

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2024**

**Barbora Plečáková**

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



**Srovnávací analýza vlivu vybraných katabolitů  
tryptofanu na transkripční aktivitu AhR v myši a lidské  
hepatomové linii**

**Bakalářská práce**

**Barbora Plecáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora PLEČÁKOVÁ**  
Osobní číslo: **R210174**  
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Srovnávací analýza vlivu vybraných katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu AhR v myší a lidské hepatomové linii**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení účinku vybraných látek na viabilitu buněk reportérové linie AZ-AHR a Hepa1c1c7.
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím metody "reporter gene assay".
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E. & Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 124(1): 1-22.
- Dere, E., Lee, A. W., Burgoon, L. D. & Zacharewski, T. R. (2011). Differences in TCDD-elicited gene expression profiles in human HepG2, mouse Hepa1c1c7 and rat H4IIE hepatoma cells. *BMC Genomics* 12: 193
- Dvorak, Z., Li, H. & Mani, S. (2022). Microbial Metabolites as Ligands to Xenobiotic Receptors: Chemical Mimicry as Potential Drugs of the Future. *Drug Metabolism and Disposition*. 51 (2) 219-227
- Flaveny, C. A., Murray, I. A. & Perdew, G. H. (2010). Differential gene regulation by the human and mouse aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 114(2): 217-225.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* 7: 1-9.
- Lin, L., Dai, Y. & Xia, Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002-2022): A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 244: 114845.
- Novotna, A., Petr, P. & Dvorak, Z. (2011). Novel Stably Transfected Gene Reporter Human Hepatoma Cell Line for Assessment of Aryl Hydrocarbon Receptor Transcriptional Activity: Construction and Characterization. *Environmental Science & Technology* 45(23): 10133-10139.
- Sondermann, N. C., Fassbender, S., Hartung, F., Hatala, A. M., Rolfes, K. M., Vogel, C. F. A. & Haarmann-Stemann, T. (2023). Functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 208: 115371.
- Vyhliadalova, B., Krasulova, K., Pecinkova, P., Marcalikova, A., Vrzal, R., Zemankova, L., Vanco, J., Travnicek, Z., Vondracek, J., Karasova, M., Mani, S. & Dvorak, Z. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21(7).

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.**  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: **19. března 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2024**

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 22. března 2023



## **Bibliografická identifikace:**

**Jméno a příjmení:** Barbora Plecáková

**Název práce:** Srovnávací analýza vlivu vybraných katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu AhR v myši a lidské hepatomové linii

**Typ práce:** Bakalářská

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

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

**Rok obhajoby práce:** 2024

**Klíčová slova:** Aryl uhlovodíkový receptor, katabolity tryptofanu, druhové rozdíly, reporter gene assay

**Počet stran:** 58

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

### **Souhrn:**

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) je ligandy aktivovaný transkripční faktor zodpovědný nejen za metabolismus xenobiotik, ale i za správnou funkci několika fyziologických procesů. Receptor je exprimován v mnoha tkáních jedinců několika živočišných druhů, a přestože jsou mezi organismy jeho struktura a funkce fylogeneticky vysoce konzervovány, dochází v případě některých látek k jeho druhově specifickému působení. V několika výzkumných pracích byly takové rozdíly již dříve zaznamenány mimo jiné i ve spojitosti s indolovými deriváty tryptofanu, které jsou schopny modulace aktivity AhR. Velké množství z nich jsou produkty mikrobiálního metabolismu této aminokyseliny a hrají tak důležitou roli v endogenní AhR signalizaci. Tato bakalářská práce se zaměřuje na srovnání vlivu vybraných katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru v myši a lidské buněčné linii odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Data získaná z experimentů prokázala druhově specifický účinek na aktivitu AhR u všech testovaných látek, přičemž nejvýraznější rozdíly byly pozorovány v jeho aktivaci látkami FICZ a indirubin. Tato práce tak poskytuje informace o rozdílné úrovni aktivace myšičího a lidského AhR identickými látkami, které jsou důležitou znalostí pro vyhodnocení výsledků studií týkajících se tohoto receptoru.

# **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Barbora Plecáková

**Title:** Comparative analysis of tryptophan catabolites-elicited AhR activation in human and mouse hepatoma cell line

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

**Supervisor:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2024

**Keywords:** Aryl hydrocarbon receptor, tryptophan catabolites, species differences, reporter gene assay

**Number of pages:** 58

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

**Summary:**

Aryl hydrocarbon receptor is a ligand-dependent transcription factor responsible not only for the metabolism of xenobiotics, but also for the proper function of several physiological processes. The receptor is expressed in many tissues of individuals of several animal species and although its structure and function are highly conserved among organisms, it is species-specific in the case of certain substances. In several research works, such differences have been observed before, including in association with indole derivatives of tryptophan, which are capable of modulating AhR activity. Large numbers of these are products of the microbial metabolism of this amino acid and thus play an important role in endogenous AhR signalling. This Bachelor thesis focuses on comparing the effect of selected tryptophan catabolites on the transcription activity of the aryl hydrocarbon receptor in mice and human cell line derived from hepatocellular carcinoma. Data obtained from the experiments showed a species-specific effect on AhR activity across all substances tested, with the most pronounced differences observed in its activation by FICZ and indirubin. This work thus provides information about different levels of mouse and human AhR activation by identical substances, which is important knowledge for evaluating the results of the AhR studies.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Anety Vrzalové, Ph.D. s použitím pouze uvedené odborné literatury a pramenů.

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

## **Poděkování**

V první řadě děkuji Mgr. Anetě Vrzalové Ph.D. za odborné vedení a rady, trpělivost, praktickou pomoc a připomínky v průběhu vypracovávání této práce. Poděkování patří také mým přátelům a rodině, kteří mi v průběhu studia byli velkou oporou.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Aryl uhlovodíkový receptor .....	3
3.1.1	Chemická struktura AhR .....	3
3.1.2	Ligandy AhR .....	4
3.2	Metabolismus tryptofanu .....	5
3.2.1	Kynureninová dráha metabolismu tryptofanu .....	5
3.2.2	Serotoninová metabolická dráha.....	6
3.2.3	Indolová metabolická dráha.....	6
3.2.4	Deriváty indolu jako agonisté AhR .....	8
3.3	AhR signalizace .....	11
3.3.1	Neaktivní stav receptoru .....	11
3.3.2	Kanonická dráha AhR .....	11
3.3.3	Jiné než kanonické signální dráhy AHR.....	12
3.3.4	Interakce AhR s různými signalizačními drahami.....	13
3.4	Role AhR v biologických procesech.....	16
3.4.1	Střevní mikrobiota.....	17
3.4.2	Onemocnění způsobená narušením střevní mikrobioty.....	18
3.4.3	AhR jako terapeutický cíl při léčbě IBD .....	18
3.5	Druhové rozdíly mezi účinky ligandů AhR .....	19
3.5.1	Aminokyselinové složení LBD domén.....	20
3.5.2	Dioxin responsivní elementy .....	20
4	MATERIÁL A METODY .....	21
4.1	Biologický materiál.....	21
4.2	Použité chemikálie a roztoky .....	21
4.3	Složení použitých roztoků.....	22
4.4	Seznam laboratorních přístrojů a zařízení.....	22
4.5	Rozmrazování buněk .....	22
4.6	Kultivace a pasážování buněk.....	22
4.7	Počítání buněk a vysetí na desky .....	23
4.8	Příprava testovaných látek .....	24
4.9	MTT test.....	26
4.10	Reporter gene assay .....	27
5	VÝSLEDKY .....	29
5.1	Stanovení cytotoxicity testovaných látek pomocí MTT testu.....	29
5.2	Srovnání vlivu katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu AhR pomocí luciferázové reportérové eseje.....	34
6	DISKUZE.....	43

7	ZÁVĚR.....	47
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	48

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

3MI	3-methylindol
5-HT	5-hydroxytryptamin
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AhR KO	Ahr „knockout“
AhRR	AhR represor
AIP	AhR interagující protein
ARNT	AhR jaderný translokátor
BaP	benzo(a)pyren
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix (bazická šroubovice-smyčka šroubovice)
CD	Crohnova choroba
CNS	centrální nervová soustava
c-Src	cytosolická tyrosin kináza
CYP	cytochromy P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE	dioxinový responsivní element
EC <sub>50</sub>	half maximal effective concentration
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	estrogenový receptor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FBS	fetální bovinní sérum
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]karbazol
GIT	gastrointestinální trakt
HSP90	protein teplotního šoku 90
I3C	indol-3-karbinol
IAA	kyselina indolactová

IAD	indol-3-acetamid
IBD	idiopatické střevní záněty
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IEC	buňky intestinálního epitelu
IPA	kyselina indolpropionová
KLF6	Krüppel-like factor 6
KYNA	kyselina kynureninová
LBD	ligand vazebná doména
L-kyn	L-kynurenin
MTT	methyltetrazoliová sůl
NC-XRE	non-konsenzuální xenobiotický responzivní element
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
p21 <sup>Cip1</sup>	inhibitor cyklin dependentní kinázy 1
p27 <sup>Kip1</sup>	inhibitor cyklin dependentní kinázy 1B
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	fosfátový pufr
TAD	transaktivační doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TDO	tryptofan 2,3-dioxygenáza
TPH	tryptofan hydroxyláza
Trp	tryptofan
UC	ulcerózní kolitida
XANA	kyselina xanthurenová
XAP 2	hepatitis B Virus X-associated protein 2
XRE	xenobiotický responzivní element



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Sekundární struktura aryl uhlovodíkového receptoru .....	3
<b>Obrázek 2:</b> Chemická struktura L-tryptofanu .....	5
<b>Obrázek 3:</b> Schématické znázornění metabolismu tryptofanu.....	7
<b>Obrázek 4:</b> Chemická struktura jednotlivých testovaných látek .....	10
<b>Obrázek 5:</b> Rozdíl mezi kanonickou a nekanonickou AhR signalizací .....	15

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky FICZ stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	29
<b>Graf 2:</b> Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky FICZ stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	30
<b>Graf 3:</b> Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky indirubin stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	30
<b>Graf 4:</b> Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky indirubin stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	31
<b>Graf 5:</b> Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky I3C stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	31
<b>Graf 6:</b> Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky I3C stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	32
<b>Graf 7:</b> Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky IAD stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	32
<b>Graf 8:</b> Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky IAD stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	33
<b>Graf 9:</b> Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky 3MI stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	33
<b>Graf 10:</b> Viabilita buněk linie AZ-AhR po aplikaci látky 3MI stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace .....	34
<b>Graf 11:</b> Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa a AZ-AhR po 4 a 24 hodinách inkubace s testovanou látkou FICZ .....	36
<b>Graf 12:</b> Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa a AZ-AhR po 4 a 24 hodinách inkubace s testovanou látkou Indirubin .....	37
<b>Graf 13:</b> Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa a AZ-AhR po 4 a 24 hodinách inkubace s testovanou látkou I3C .....	39
<b>Graf 14:</b> Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa a AZ-AhR po 4 a 24 hodinách inkubace s testovanou látkou IAD .....	40
<b>Graf 15:</b> Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa a AZ-AhR po 4 a 24 hodinách inkubace s testovanou látkou 3MI .....	41

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Příprava koncentrační řady FICZ ze zásobního roztoku o koncentraci 20 mM. ....	24
<b>Tabulka 2:</b> Příprava koncentrační řady Indirubinu ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mM. ....	25
<b>Tabulka 3:</b> Příprava koncentrační řady I3C ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mM. ....	25
<b>Tabulka 4:</b> Příprava koncentrační řady IAD ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mM. ....	26
<b>Tabulka 5:</b> Příprava koncentrační řady 3MI ze zásobního roztoku o koncentraci 200 mM. ....	26
<b>Tabulka 6:</b> Souhrnný přehled hodnot $EC_{50}$ testovaných látek po 4 a 24 hodinách působení.....	42

# 1 ÚVOD

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) je ligandy aktivovaný transkripční faktor zodpovědný především za metabolismus xenobiotik. Receptor reguluje expresi genů pro biotransformační enzymy, jako jsou cytochromy P450, přispívá k regulaci buněčného cyklu, normální funkci imunitního systému, tumorigenezi a má důležitou funkci v endogenním metabolismu. Mezi exogenní ligandy tohoto receptoru řadíme zejména environmentální polutanty, ale i některé přírodní látky, jako třeba flavonoidy. V posledních letech bylo popsáno také mnoho látek endogenního charakteru interagujících s AhR, kterými jsou katabolity a deriváty tryptofanu, bilirubin či eikosanoidy.

Katabolity tryptofanu vznikají v našem těle třemi metabolickými dráhami – kynureninovou, serotoninovou a přímou transformací střevními mikroorganismy. U některých z těchto látek byla prokázána schopnost aktivace aryl uhlovodíkového receptoru. Je známo, že mikrobiální metabolity tak mohou ovlivnit homeostázu střevní mikrobioty, která je velmi důležitá pro udržení integrity bariéry střevní sliznice a normální funkci imunitního systému. Narušení této rovnováhy může vést k různým patofyziologickým jevům, jako jsou zánětlivá onemocnění střev, obezita, cukrovka nebo poruchy kardiovaskulárního systému.

Většina ligandů vykazuje v rámci různých druhů odlišný účinek na AhR. Struktura receptoru je mezi druhy podstatně konzervovaná, avšak sekvence některých domén receptoru se liší. Již malá změna může způsobit dramatický rozdíl ve vazbě ligandu k receptoru. Tyto rozdíly byly pozorovány i mezi AhR lidských a myších hepatomových linií. Mezi těmito dvěma druhy byly také zjištěny odlišné konformační změny receptoru vyvolané jeho aktivací některými ligandy.

Hlavním cílem této práce je shromáždit a analyzovat údaje týkající se úrovně aktivace lidského a myšího AhR specifickými endogenními ligandy tohoto receptoru. Tato studie je důležitá pro budoucí experimenty, jelikož poukazuje na potenciální rozdíly ve výsledcích experimentů při testování identických látek. Porozumění těmto rozdílům je zásadní pro interpretaci a porovnání výsledků v rámci studií souvisejících s AhR.

## 2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení účinku vybraných látek na viabilitu buněk reportérové linie AZ-AHR a Aherepa metodou MTT.
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím metody „Reporter Gene Assay“.
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce.

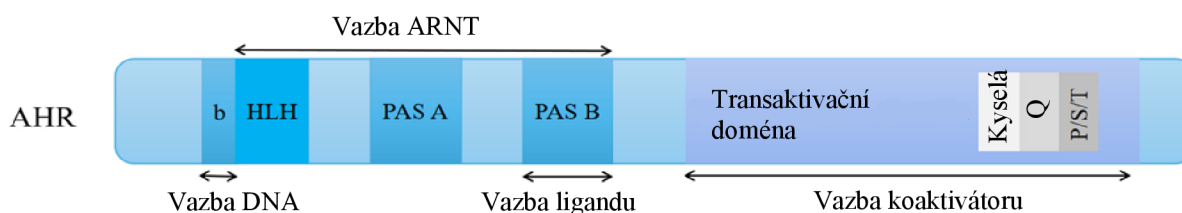
### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor (receptor pro aromatické uhlovodíky, AhR) je transkripční faktor aktivovaný látkami exogenního a endogenního původu. Gen pro tento receptor se skládá z 11 exonů ležících na chromozomu 7 lidského genomu (Ema *et al.*, 1994, Le Beau *et al.*, 1994) a na chromozomu 12 genomu myšího (Schmidt *et al.*, 1993). Aktivace receptoru vede prostřednictvím různých signalizačních drah k expresi cílových genů, jako jsou například biotransformační enzymy, konkrétně enzymy její první a druhé fáze (Bock *et Köhle*, 2006), a AhR represor (AHRR). Receptor je fylogeneticky vysoce konzervován u bezobratlých i obratlovců a je exprimován v mnoha typech buněk a tkání savců, ryb a ptáků, zejména potom v myších a lidských plicích, játrech, ledvinách, slezině a placentě, ale také v několika primárních a od nádorů odvozených buněk a buněčných liniích (Li *al.*, 1994). Mimo biotransformace tak receptor díky jeho vlivu na proliferaci, adhezi, apoptózu a migraci buněk v těchto orgánech ovlivňuje řadu fyziologických procesů (Hahn, 2002).

##### 3.1.1 Chemická struktura AhR

AhR, stejně jako jaderný translokátor uhlovodíkového receptoru (ARNT) a AhR represor (AHRR), spadá do rodiny bHLH/PAS (basic-Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim) transkripčních faktorů (Abel *et Haarmann-Stemmann*, 2010). Receptor má dvě terminální domény lišící se aminokyselinovou sekvencí i funkcí v procesu aktivace receptoru. Vazba DNA a následná dimerizace proteinu se uskutečňuje prostřednictvím N-terminální bHLH domény receptoru (Gu *et al.*, 2000), zatímco C-terminální oblast AhR obsahuje tzv. transaktivační doménu (TAD) skládající se ze tří subdomén. První z nich obsahuje kyselé zbytky glutaminu a asparátu, druhá velké množství glutaminu (Q) a třetí subdoména je bohatá na serin, threonin a prolin (P/S/T). Právě na glutamin bohatá oblast TAD je nepostradatelná pro aktivaci cílových genů, jelikož interaguje s transkripčními koaktivátory (Rowlands *et al.*, 1996). Mezi těmito dvěma oblastmi receptoru se nachází PAS doména sestávající ze dvou strukturálních opakování A a B. PAS A doména je stejně jako N-terminální bHLH doména zapojena do procesu dimerizace receptoru a je vazebným místem pro molekuly proteinu teplotního šoku (HSP90), zatímco PAS B doména je místem vazby ligandu na receptor (Coumailleau *et al.*, 1995).



**Obrázek 1:** Sekundární struktura aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). Převzato z článku (Hu *et al.*, 2023).

### 3.1.2 Ligandy AhR

Mnoho látek exogenního i endogenního původu je schopno vazby na aryluhlovodíkový receptor a regulace transkripce jeho cílových genů. Tyto látky mají původ především v přírodních polutantech, stravě a produktech mikrobiálního metabolismu. Ligandy je možno také podle mechanismu jejich účinku rozdělit do tří kategorií na agonisty, parciální agonisty a antagonisty.

Dosud nejlépe charakterizovanou skupinou exogenních AhR ligandů jsou environmentální toxiny dělicí se na halogenované aromatické uhlovodíky (HAHs) a nehalogenované polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). HAHs jsou metabolicky více stabilní, a proto reprezentují hlavní skupinu exogenních AhR ligandů, které jsou schopny vazby na receptor již v množství o jednotkách pM a nM. Jako zástupce lze v první řadě uvést 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), který je již dlouhou dobu modelovým AhR ligandem (Denison *et al.*, 2003). Z PAHs mají poté velký význam látky benzo(a)pyren (BaP), 3-methylchlorantren a aromatické aminy. I některé sloučeniny přírodního charakteru jsou exogenními ligandy AhR. Příkladem jsou flavonoidy hojně obsažené v ovoci a zelenině a rostlinné sekundární metabolity alkaloidy (Denison *et al.*, 1998). Je však známo také několik antagonisticky se chovajících přírodních sloučenin, mezi něž patří fytochemikálie kyselina brevifolinkarboxylová (Amakura *et al.*, 2003). Také katechiny, produkty zeleného čaje, který představuje usušené listy čajovníku čínského, se ukázaly být inhibitory genů regulovaných aryl uhlovodíkovým receptorem (Fukuda *et al.*, 2015). Dalším příkladem antagonistických ligandů jsou neobvyklé methylované a methoxylované formy indolů zahrnující sloučeniny 2,3-dimethylindol a 2,3,7-trimethylindol (Stepankova *et al.*, 2018), u kterých byla při *in vitro* experimentech pozorována inhibice transkripční aktivity AhR.

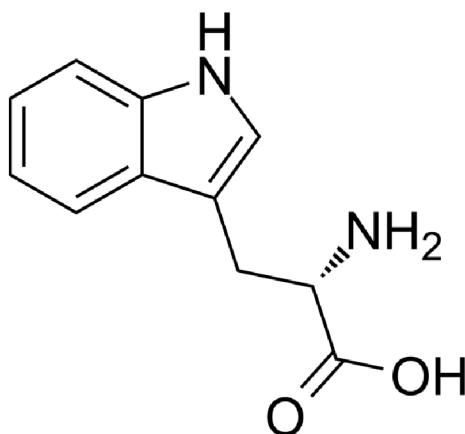
Mimo látky vyskytující se v přírodě byly objeveny i ligandy syntetického původu užívané jako léčiva. Nejzajímavější a první takovou popsanou látkou je agonista omeprazol. Během jeho metabolické degradace dochází k přeměně na omeprazol-sulfid, který se na rozdíl od jeho prekurzoru chová jako antagonist a myších a lidských buněk (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2006). Vzhledem k potenciálnímu využití AhR v terapii různých onemocnění je nyní věnována pozornost objevování a vyvíjení i mnoha xenobiotik s antagonistickým účinkem. Pomocí strukturních modifikací prováděných za účelem zlepšení jejich farmakologických vlastností jsou vybíráni antagonisté vhodní jako kandidáti pro předklinický a klinický výzkum (Lin *et al.*, 2022).

Endogenní ligandy AhR mají význam především v regulaci fyziologických dějů. Jejich největší skupinou jsou metabolické a UV zářením generované deriváty aminokyseliny tryptofanu. Mezi zástupce endogenních aktivátorů řadíme indirubin a jeho izomer indigo (Adachi *et al.*, 2001), indol-3-acetamid, indol-3-pyruvát (Vyhlidalova *et al.*, 2020) a fotoprodukt tryptofanu 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ) (Wincent *et al.*, 2009). Také při endogenním metabolismu hemu na biliverdin a jeho následné

konverzi na bilirubin byla pozorována změna hladiny CYP1A1 mRNA v myší buněčné linii Hepa 1c1c7. Sinal *et Bend* (1997) v této studii uvedli, že všechny zmíněné látky jsou schopny indukce CYP1A1 enzymů, přičemž bilirubin se ukázal být nejvíce potentním a účinným. Vazby na receptor jsou schopny i eikosanoidy, sloučeniny odvozené od nenasycených mastných kyselin s hlavním řetězcem obsahujícím dvacet atomů uhlíku. Zástupci této skupiny, kteří našli své místo mezi ligandy AhR, jsou lipoxin A4 a některé z prostaglandinů G (Seidel *et al.*, 2001).

### 3.2 Metabolismus tryptofanu

L-tryptofan (Trp) je esenciální aminokyselina, tudíž je třeba věnovat pozornost jeho pravidelnému příjmu z potravin, například masa, ryb, vajec, mléčných výrobků či ořechů. Její metabolismus není klíčový jen v roli prekurzoru proteosyntézy, ale vzniká při něm mnoho bioaktivních látek povahy neurotransmiterů a signálních molekul důležitých pro lidské tělo. Tyto látky jsou produkovány prostřednictvím postupných přeměn Trp třemi katabolickými cestami vedoucími k rozdílným produktům v různých částech zažívacího traktu a v malé míře také v imunitních buňkách a centrální nervové soustavě (CNS).



**Obrázek 2:** Chemická struktura L-tryptofanu. Převzato z internetové stránky MedChemExpress.

#### 3.2.1 Kynureninová dráha metabolismu tryptofanu

Většina přijatého Trp je metabolizována tzv. kynureninovou cestou za prvotní katalýzy enzymy indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO) a tryptofan 2,3-dioxygenáza (TDO). Tyto enzymy se liší strukturou, substrátovou specifikou, potřebnými kofaktory i funkcí, a proto se vyskytují v různých tkáních, kde je jejich exprese přísně regulována. Zatímco IDO je všudypřítomný enzym a roli v metabolismu tryptofanu plní jak v játrech, tak v CNS i imunitních buňkách, TDO je lokalizována převážně jen v játrech. Rychlost metabolické dráhy závisí právě na aktivitě těchto dvou enzymů, tedy na konverzi L-Trp na N-Formyl-L-kynurenin, který je poté kynurenin formamidázou přeměněn na kynurenin (Le Floc'h *et al.*, 2011). Při různých onemocněních bývá u některých jedinců často pozorováno zrychlené



odbourávání Trp doprovázené zvýšením koncentrace kynureninů v krevním séru, mozkomíšním moku či mozkové tkáni. Mezi patologické jevy způsobující upregulaci kynureninové dráhy, která má v rámci těchto onemocnění protektivní roli, řadíme například HIV a neurologické a afektivní poruchy, jako jsou Alzheimer, Huntingtonova choroba, schizofrenie, deprese a úzkost. Vysoké hladiny kynureninů v krevním séru jsou také indikací vzniku revmatoidní artritidy, kterou řadíme k onemocněním autoimunitním. (Chen *et Guillemin*, 2009). Z výčtu chorob je evidentní jejich spojitost s tkáňovou lokalizací enzymů katalyzujících tuto metabolickou dráhu.

### 3.2.2 Serotoninová metabolická dráha

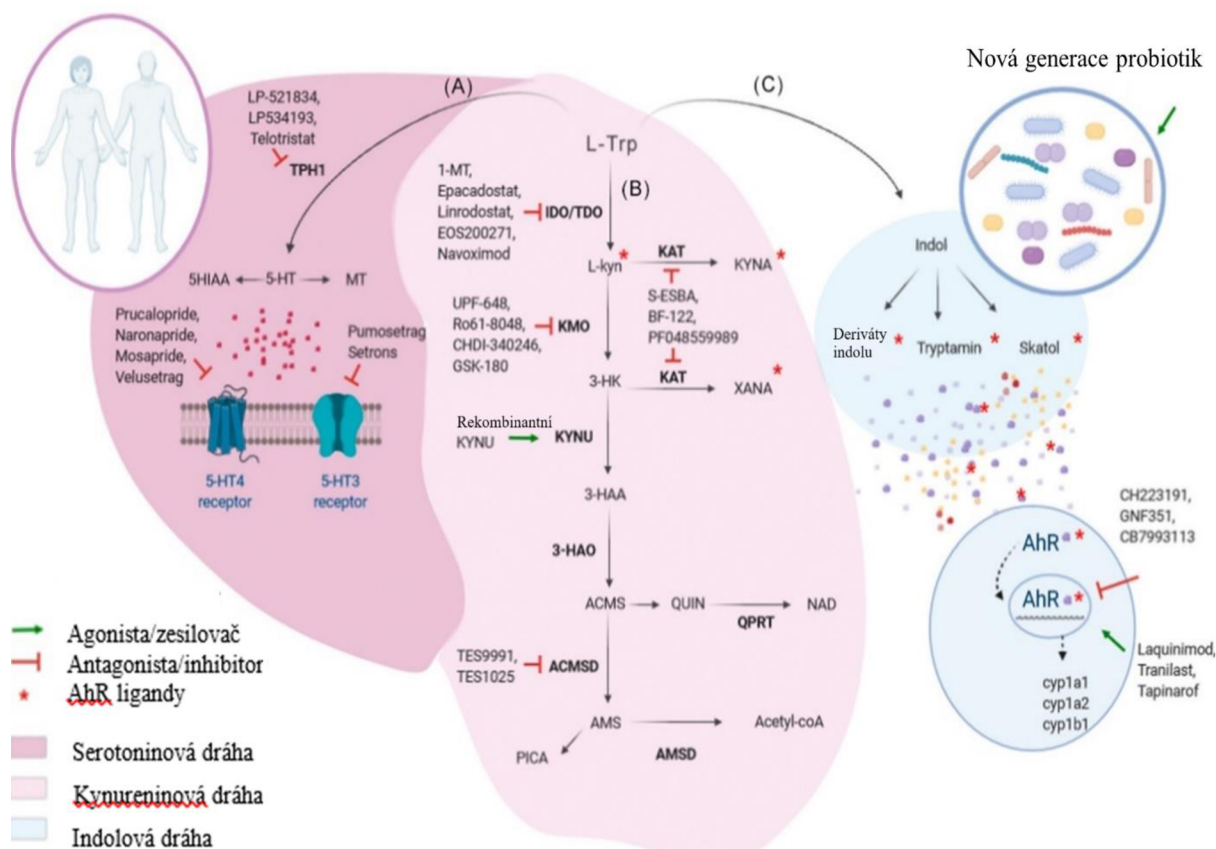
5-hydroxytryptamin (5-HT), jiným názvem serotonin je významný neurotransmitter vznikající dvoukrokovou transformací Trp tzv. serotoninovou cestou. První krok je uskutečněn za katalýzy enzymem tryptofan hydroxyláza (TPH) na 5-hydroxytryptofan, přičemž jsou známy 2 jeho izoformy: TPH1 a TPH2 (Le Floch *et al.*, 2011). V CNS má při vzniku této sloučeniny zásadní význam enzym tryptofan hydroxyláza 2 (TPH2), avšak více než 90 % 5-HT vzniká činností enzymu tryptofan hydroxyláza 1 (TPH1) v GIT, konkrétně ve specializovaném subtypu buněk intestinálního epitelu zvaných enterochromafinní buňky (Agus *et al.*, 2018). Druhým krokem je dekarboxylace 5-hydroxytryptofanu za nutné pomoci vitamínu B6 na serotonin (Le Floch *et al.*, 2011), který je mimo jiné také prekurzorem melatoninu produkovaného epifýzou. Mnohé výzkumy potvrdily existenci obousměrné komunikační sítě mezi mozkem a zažívacím traktem, kde serotonin vystupuje jako klíčová signalizační molekula jak v enterickém, tak centrálním nervovém systému (Mawe *et Hoffman*, 2013). Tato možnost významného ovlivnění hladiny serotoninu v CNS metabolismem Trp probíhajícím v GIT je důvodem úzké souvislosti duševního zdraví se složením střevního mikrobiomu.

### 3.2.3 Indolová metabolická dráha

Neopomenutelné je také odbourání tryptofanu na látky indolové povahy a jejich deriváty. Metabolickou dráhu nazýváme indolová cesta a účastní se jí mikroorganismy střevního mikrobiomu. Schopnost produkce indolových derivátů mají však jen některé z komenzálních druhů bakterií, jako je *Lactobacillus* spp. Oxidativní a redukční reakce, za které jsou tyto mikroorganismy zodpovědné, vedou mimo jiných produktů k tvorbě kyseliny indolové (IAA) a indolpropionové (IPA), dvou metabolitů, u kterých je znám vliv na permeabilitu střevní stěny a imunitní systém hostitele (Lamas *et al.*, 2016).

Metabolismus hostitele:

Metabolismus střevní mikrobioty:



**Obrázek 3:** Schématické znázornění metabolismu tryptofanu. Převzato z článku (Modoux *et al.*, 2021)

Vysvětlení zkratk:

1-MT, 1-methyltryptofan; 3-HAA, kyselina 3-hydroxyanthranilová; 3-HAO, kyselina 3-hydroxyanthranilová-3,4-dioxygenáza; 3-HK, 3-hydroxykynurenin; 5HIAA, kyselina 5-hydroxyindolactová; 5-HT, serotonin; ACMS, 2-amino-3-karboxymukonátsemialdehyd; ACMSD, 2-amino-3-karboxymukonátsemialdehyd dekarboxyláza; AhR, aryl uhlovodíkový receptor; AMSD, semialdehyd 2-aminomukonové dehydrogenázy; IDO, indolamin 2,3-dioxygenáza; KAT, kynurenin aminotransferáza; KMO, kynurenin monooxygenáza; KYNA, kyselina kynureninová; KYNU, kynurenináza; L-kyn, L-kynurenin; L-Trp, L-tryptofan; MT, melatonin; NAD, nikotinamid; PICA, kyselina pikolinová; QPRT, chinolinát fosforibosyltransferáza; QUIN, kyselina chinolinová; TDO, tryptofan 2,3-dioxygenáza; TPH1, tryptofan hydroxyláza 1; XANA, kyselina xantureninová

### 3.2.4 Deriváty indolu jako agonisté AhR

Mnohé katabolity tryptofanu mají vliv na transkripční aktivitu AhR a vystupují tak jako jeho endogenní ligandy (Obrázek 1). Z kynureninů má schopnost vazby na AhR L-kynurenin (L-kyn), kyselina kynureninová (KYNA) a kyselina xanthurenová (XANA) (Michaudel *et al.*, 2023). Větší pozornost je však věnována produktům indolové dráhy, jelikož řada z nich byla ve fyziologických koncentracích klasifikována jako slabě potentní ligandy tohoto receptoru. Jejich účinek na receptor je však podstatně odlišný. Mohou se chovat nejen jako plnohodnotní, nebo parciální agonisté, ale i jako ligand-selektivní antagonisté (Vyhlidalova *et al.*, 2020). Skutečnost, že mikrobiální metabolismus Trp ovlivňuje aktivitu AhR byla potvrzena deficiencí AhR agonistů u myši s disbiotickým, nebo úplně amikrobiotickým složením GIT. U těchto jedinců s DSS-indukovanou kolitidou byla zaznamenána snížená koncentrace mikrobiálního metabolitu tryptofanu IAA, která je ligandem AhR, avšak hladina L-Kyn metabolizovaná enzymemIDO zůstala nezměněná. Z toho vyplývá, že mikrobiota je zodpovědná za metabolismus Trp na agonisty AhR (Lamas *et al.*, 2016).

Jedny z prvních studií týkající se derivátů indolu se zaměřovaly na indukci enzymu CYP1A1 po ozáření tkáňových kultur UV světlem. Bylo zjištěno, že tento proces vyžaduje přítomnost tryptofanu, aminokyseliny silně absorbující v blízké UV oblasti (Paine, 1976). Po ozáření buněk dochází ke vzniku několika UV generovaných látek, z nichž se ideálním induktorem exprese genů kódujících proteiny CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 ukázal být FICZ, který se také na receptor váže s nejvyšší afinitou a je tak modelovým ligandem pro demonstraci endogenní AhR signalizace. Navíc již velmi nízké koncentrace této látky jsou schopny aktivovat receptor jak *in vivo*, tak *in vitro*. Při dlouhodobé expozici však byla pozorována inhibice metabolismu této sloučeniny, což znamená, že ve vyšších koncentracích je FICZ sám o sobě inhibítorem CYP1 enzymů (Wincent *et al.*, 2009).

Také methylované a methoxylované formy indolu jsou schopny indukovat či inhibovat expresi AhR cílových genů. Jedním z nich je i metabolit střevního mikrobiomu 3-methylindol neboli skatol. Tento indol je slabým aktivátorem a parciálním agonistou AhR v lidských hepatocytech, jenž v závislosti na koncentraci a době expozice zvyšuje indukci CYP1A1/2 a CYP1B1 enzymů. Ve srovnání s plnohodnotným agonistou TCDD je však exprese CYP1A1 mRNA téměř desetkrát nižší. Vliv skatolu je také závislý na jeho metabolické konverzi na další indoly, jako je indol-3-karbinol, který je již více potentním aktivátorem AhR (Rasmussen *et al.*, 2016). Existují i další formy mono-methylovaných indolů jako je 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methoxyindol, které jsou silnými agonisty AhR. V tomto případě se však již nejedná o látky endogenního původu, ale o xenobiotika. Štepankova *et al.* (2018) se zabývali testováním jejich synergického účinku a dospěli k několika překvapivým zjištěním. Zatímco 7-methoxyindol a 4-methylindol každý vyvolávají při vazbě na AhR funkční odpověď srovnatelnou s modelovým agonistou TCDD, spojení jejich substituentů do molekuly 7-methoxy-4-methylidol působí na receptor antagonisticky. Při následné kombinaci těchto

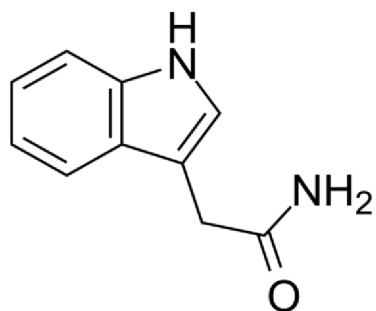
dvou látek do směsi však již očekávaný synergický účinek na receptor nastal a byla pozorována jeho zesílená aktivace.

Indol-3-karbinol (I3C), již zmíněný metabolit 3-methylindolu, je přirozeným proligandem AhR pocházejícím ze stravy (Rasmussen *et al.*, 2016). Aktivace receptoru tímto ligandem také souvisí s jeho pozitivním vlivem na mnoho fyziologických procesů, jako je regulace buněčného cyklu, navození oprav DNA, inhibice zánětu a indukce apoptózy nádorových buněk (Rogan, 2006). Tyto vlastnosti udávají sloučenině protirakovinné a protizánětlivé účinky, které jsou důvodem zájmu o využití I3C při terapii různých nádorových a chronických zánětlivých onemocnění, například ulcerózní kolitidy (Peng *et al.*, 2021). U lidí má I3C navíc schopnost metabolizovat estrogény, což bylo potvrzeno studií na ženách s vysokým rizikem rozvoje estrogény vyvolané rakoviny prsu, kdy I3C indukoval přeměnu těchto látek na karcinogeny metabolizující enzymy (Reed *et al.*, 2005). U obou zmíněných experimentů byla také pozorována vysoká i indukce CYP1A1/A2 a CYP1B1, což potvrdilo, že I3C působí prostřednictvím AhR.

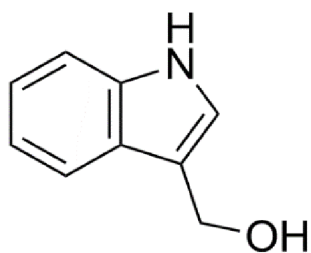
Vyhliďalova *et al.* (2020) odhalili, že metabolit intestinálních mikroorganismů indol-3-acetamid (IAD) je ve fyziologických koncentracích jedním z nejúčinnějších mikrobiálních agonistů AhR. Po 24hodinové inkubaci IAD se střevními buňkami byla zaznamenána silná indukce CYP1A1 mRNA. Při použití AhR KO buněčné linie již žádný signál pozorován nebyl, což potvrzuje jeho roli agonistického ligandu tohoto receptoru. V rámci studie bylo navíc zjištěno, že látka indukuje formaci heterodimeru AhR-ARNT a s podobnou intenzitou jako TCDD spouští jeho translokaci do buněčného jádra. Při následném testování jeho antagonistického vlivu byl však překvapivě pozorován dvojitý efekt na receptor aktivovaný látkami TCDD, BaP a FICZ. IAD antagonizoval odpověď vyvolanou TCDD, ale zesiloval aktivaci receptoru vyvolanou FICZ a BaP. Na základě výsledků z této studie bylo usouzeno, že IAD je stejně jako ostatní mikrobiální metabolity v souvislosti s AhR zapojen do mnoha fyziologických funkcí v našem těle, a proto má význam věnovat se jeho účinkům i v dalších studiích.

Agonistický účinek indirubinu a jeho izomeru indiga na lidský AhR prokázali Adachi *et al.* (2001) ze vzorků lidské moči, kde se tyto dvě látky vyskytují přibližně v 0,2nM koncentracích. Interakce látek s AhR byla sledována pomocí kvasinkové reportérové eseje a míra jejich aktivity byla následně srovnána s modelovým ligandem TCDD. V případě indiga byla transkripční aktivita AhR srovnatelná s TCDD a u indirubinu vyšlo najevo, že je dokonce přibližně padesátkrát více potentní než použitý modelový ligand. Jelikož je tedy koncentrace indirubinu a indiga v lidské moči dost vysoká na vyvolání funkční odpovědi AhR, byly obě látky identifikovány jako endogenní ligandy tohoto receptoru.

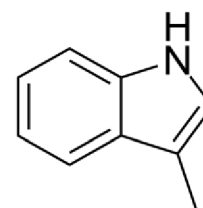
Tato bakalářská práce je zaměřena na testování vlivu vybraných katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu AhR ve dvou druhově odlišných buněčných liniích. Jedná se o látky FICZ, 3MI, indirubin, I3C a IAD, jejichž chemická struktura je znázorněna níže na obrázku 4.



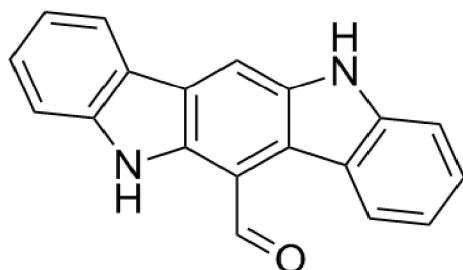
Indol-3-acetamid (IAD)



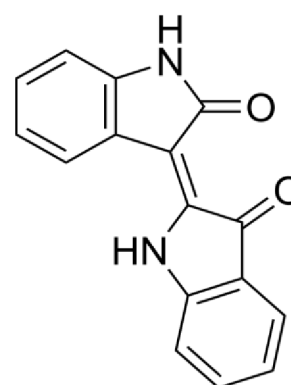
Indol-3-karbinol (I3C)



3-methylindol (3MI)



6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ)



Indirubin

**Obrázek 4:** Chemická struktura jednotlivých testovaných látek. Převzato z internetové stránky MedChemExpress.

### 3.3 AhR signalizace

Po navázání ligandu k receptoru projde inaktivní komplex několika konformačními změnami, zahrnujícími především disociaci chaperonových kofaktorů, a dochází k aktivaci různých signalizačních drah. Ty dělíme podle mechanismu působení a typu proteinů, se kterými AhR v procesu signalizace interaguje, na dráhu genomickou a nengenomickou. Genomická signalizace se dále dělí na dráhu kanonickou a nakanonickou.

#### 3.3.1 Neaktivní stav receptoru

V klidovém stavu se receptor nachází v cytoplazmě, kde tvoří komplex s několika chaperony udržujícími jej v ligand-afinitní konformaci. Mezi tyto kofaktory patří dvě molekuly proteinu HSP90 vázané na N-terminální bHLH doménu, 23 kDa velký ko-chaperon p23 a AhR interagující protein příbuzný immunofilinu (AIP) neboli XAP molekula 2 (XAP2; hepatitis B Virus X-associated protein 2) (Kazlauskas *et al.*, 2000; Pongratz *et al.*, 1992). Hlavní vliv na udržení receptoru ve formě schopné interagovat s ligandy mají dvě molekuly proteinu HSP90, které navíc zamezují jeho nekontrolovatelné translokaci do jádra v absenci ligandu (Pongratz *et al.*, 1992). Jejich vazbu na receptor stabilizuje ko-chaperon p23, zatímco molekula XAP2 zesiluje AhR signalizaci posílením správného prostorového složení receptoru v cytoplazmě, a navíc chrání celý komplex před ubiquitací a jeho následnou degradací v proteosomu (Kazlauskas *et al.*, 2000). S výše popsaným komplexem je spojena také cytosolická tyrosin kináza (c-Src) (Enan *et al.*, 1996). Udržení multiproteinového komplexu v dané konformaci pomocí zmíněných molekul je tedy klíčové pro možnost následné aktivace receptoru ligandy a zahájení transkripce cílových AhR genů.

#### 3.3.2 Kanonická dráha AhR

V kanonické signalizaci vystupuje jako heterodimerizační partner AhR jaderný translokátor uhlovodíkového receptoru (ARNT). Navázání ligandu na PAS B doménu receptoru způsobí odkrytí jaderného lokalizačního signálu (NLS), což má za následek rychlou translokaci receptoru s navázaným ligandem do jádra. Zde dochází k jeho heterodimerizaci s jaderným translokátorem uhlovodíkového receptoru (ARNT) prostřednictvím PAS a N-terminálních bHLH domén obou proteinů (Probst *et al.*, 1993). Vytvořený transkripčně aktivní heterodimer AhR/ARNT je schopný exprese genů po vazbě do xenobiotického responzivního elementu (XRE) vyznačujícího se konsenzuálním sekvenčním motivem 5'-GCGTG-3' v promotorových a enhancerových oblastech cílových genů (Abel *et al.*, 2010). Vazba dimeru AhR/ARNT na DNA vede k stimulaci několika koaktivačních molekul napomáhajících lokálnímu rozvolňování chromatinu, změnám prostorového uspořádání histonů a rekrutaci obecných transkripčních faktorů (Rowlands *et al.*, 1996). Prostřednictvím kanonické dráhy AhR dochází expresi genů kódujících například enzymy s monoxygenázovou aktivitou, které zodpovídají za metabolismus xenobiotik, cytochromy P450 (CYP). Geny kódující

enzymy z rodiny CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) je možné identifikovat již v raných stádiích expozice buněk ligandem TCDD, jinými látkami dioxinové povahy a organickými halogeny. Také některé enzymy 2. fáze, jako třeba chinon oxidoreduktáza 1 (Jaiswal, 1991), glutathion-S-transferáza A2 (Rushmore *et al.*, 1990) a některé UDP-glukuronosyl transferázy (UGT) jsou indukovány v rámci kanonické AhR signalizace. Jako další je z klíčových cílových genů aktivován AhR represor (AhRR), protein svou strukturou velmi podobný AhR, avšak z důvodu absence PAS B domény není schopen vazby ligandů. Jeho C-terminální oblast obsahuje na rozdíl od transaktivační domény AhR doménu transrepresní a umožňuje vazbu korepresoru, který je zapojen do negativní regulace AhR signalizace, tedy je schopen potlačit aktivitu tohoto receptoru jeho transportem z jádra a okamžitou degradací v proteasomu (Mimura *et al.*, 1999). Transkripční aktivita AhR je dále vlivem AhRR potlačována tak, že AhR represor soutěží s receptorem o ARNT a potlačuje funkci komplexu AhR-ARNT rekrutací korepresorů na XRE (Panda *et al.*, 2023).

### 3.3.3 Jiné než kanonické signální dráhy AHR

V nekanonické signální dráze působí AhR nezávisle na přítomnosti ARNT a tvoří dimery s jinými proteiny, či ligandy neobsazenými receptory. Do této skupiny řadíme například estrogenový receptor (Ohtake *et al.*, 2003), protein Krüppel-like faktor 6 (KLF6) (Wilson *et al.*, 2013) a nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) (Tian *et al.*, 1999). Bylo pozorováno, že po formaci takového transkripčně aktivního komplexu nedochází k jeho vazbě do XRE sekvence DNA typické pro kanonickou signalizaci, ale do tzv. non-konsenzuální XRE sekvence (NC-XRE). Huang *et al.* (2012) se zabývali analýzou genu inhibitoru plazminogenového aktivátoru (PAI-1), který je genem exprimovaným po působení TCDD jinou než kanonickou AhR signalizací. V promotorové oblasti tohoto genu byl charakterizován non-konsenzuální XRE motiv 5'-GGGA-3', který podporuje přímou vazbu AhR na DNA nezávisle na proteinu ARNT (Huang *et al.*, 2012, Patel *et al.*, 2023). Cílená delece N-terminální domény AhR nezbytné pro vazbu dimeru receptoru s ARNT do XRE sekvencí DNA navíc v rámci nekanonické signalizace neměla žádný vliv na jeho navázání do NC-XRE sekvence. Tato skutečnost poukazuje na nezávislost receptoru na ARNT, která je tedy zásadním rozdílem mezi nekanonickou a kanonickou AhR signalizací (Wilson *et al.*, 2013). NC-XRE sekvence byla nalezena především v promotorech genů kódujících inhibitory cyklin dependentních kináz p21<sup>Cip1</sup> a p27<sup>Kip1</sup> zodpovědných za vývoj orgánů (Barnes-Ellerbe *et al.*, 2004), enzymy obrany před mikroorganismy, kam patří podjednotka p40phox NADPH oxidázy (Wada *et al.*, 2013) a proteiny účastníci se imunitních a zánětlivých reakcí, kterými jsou enzymyIDO a TDO (Opitz *et al.*, 2011) a interleukiny Il-1 $\beta$ , Il-6 (Lahoti *et al.*, 2013).

Negenomická AhR signalizace pak nastává uvolněním c-Src z neaktivního komplexu receptoru do cytoplazmy po jeho aktivaci ligandem (Enan *et al.*, 1996). Tato tyrosin kináza díky své schopnosti fosforylovat molekuly podněcuje signalizaci receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), který spadá do skupiny tyrozinkinázových receptorů (RTK) (Randi *et al.*, 2008). Aktivací

EGFR pak dochází k ovlivnění proliferace, diferenciace a apoptózy buněk prostřednictvím dalších signálních drah zahrnujících například fokální adhezivní kinázu (FAK) (Tomkiewicz *et al.*, 2013) a některá dráhy mitogen aktivovaných proteinkináz (MAPK) (Xie *et al.*, 2012).

### 3.3.4 Interakce AhR s různými signalizačními drahami

Jako heterodimerizační partner pro ligandem aktivovaný AhR může vystupovat estrogenový receptor (ER). V tomto případě dochází k vazbě komplexu AhR/ARNT na ligandem neobsazený ER, což vede k vytvoření transkripčně aktivního komplexu dále se translokujícího do estrogenových responzivních elementů (Ohtake *et al.*, 2003). Stejným způsobem může AhR interagovat s proteinem p300, retinoblastomovým proteinem (pRb) a transkripčním faktorem E2F a potlačovat tak například expresi genů v S-fázi buněčného cyklu (Puga *et al.*, 2000).

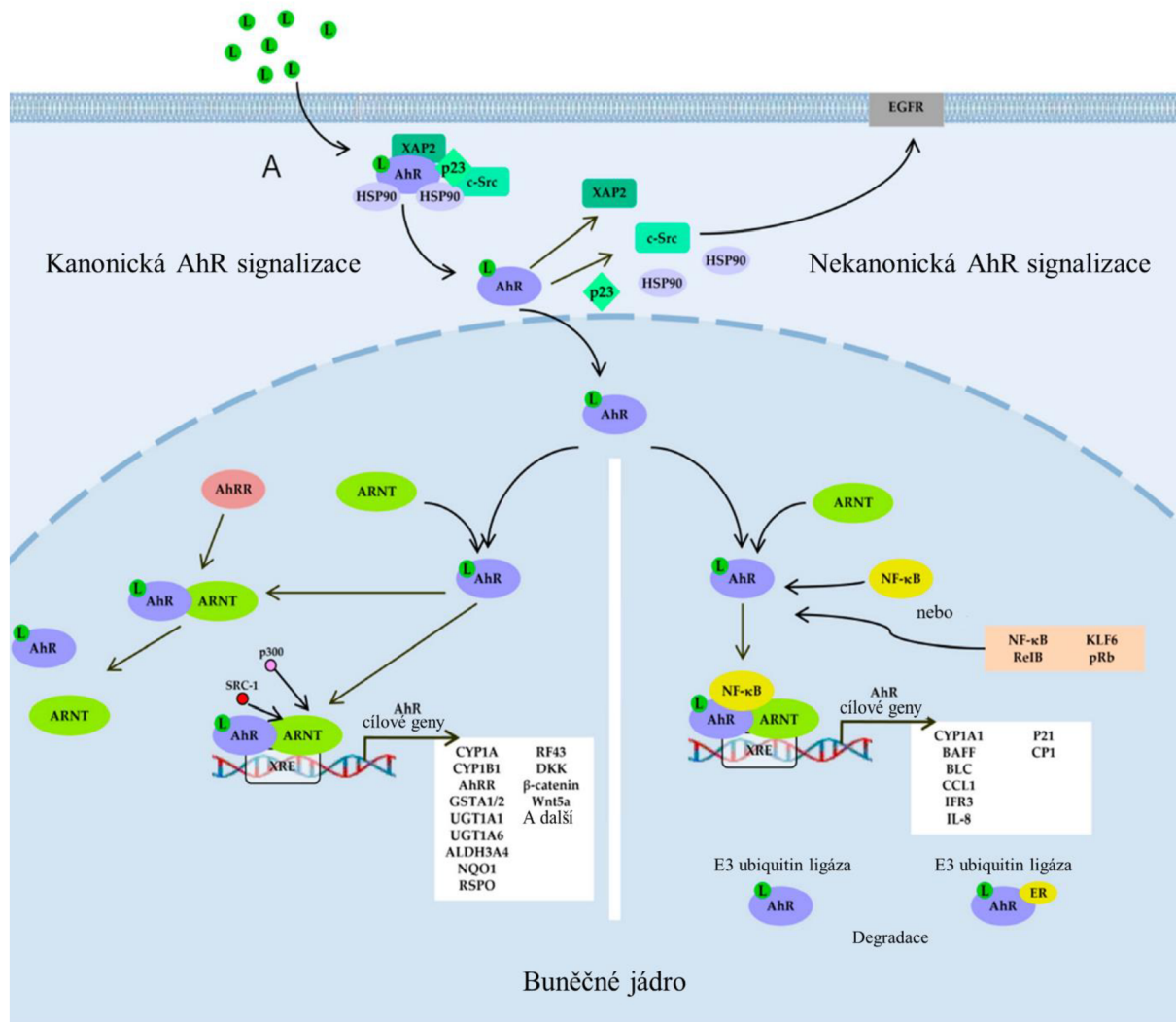
Signální kaskáda AhR může významně ovlivňovat i jiné dráhy, například Wnt signalizaci (zkratka z anglického Wingless-related integration site). V kanonické Wnt signalizaci vystupují ligandy zvané Wnt a klíčovým mediátorem této dráhy je protein  $\beta$ -katenin působící jako aktivátor transkripce cílových genů (Clevers, 2006). Proto je dráha často označována jako Wnt/ $\beta$ -katenin signalizace. Po navázání Wnt ligandů na transmembránové koreceptory Fz/LRP (Frizzled receptory/lipoproteinové receptory) spouští  $\beta$ -katenin kanonickou Wnt signalizaci (Bhanot *et al.*, 1996, Pinson *et al.*, 2000). Ta se podílí například na regulaci embryonálního vývoje, sebeobnově diferencovaných tkání a udržení normálního počtu kmenových buněk v těle (Clevers, 2006). Cílové geny této dráhy jsou regulovány transkripčními faktory TCF/LEF (T-buněčný faktor/lymfoidní spouštěcí faktor) iniciujícími transkripci stejnojmenných genů (*tcf/lef*), které jsou nezbytné pro vazbu  $\beta$ -kateninu (van de Wetering *et al.*, 1997). Najdeme mezi nimi geny zapojené do procesu karcinogeneze, onkogen *c-Myc* a cyklin D1 (Clevers, 2006), dále negativní regulátor Wnt signalizace *Axin2* (Jho *et al.*, 2002) a transkripční faktor *SP5* (Weidinger *et al.*, 2005). Procházková *et al.* (2011) popsali možnou spolupráci AhR a Wnt/ $\beta$ -katenin signalizace na indukci vybraných AhR cílových genů, především genů *CYP1A1* a *CYP1B1*. Při aktivaci AhR ligandem TCDD zaznamenali změny ve Wnt signalizaci, konkrétně downregulaci výše zmíněných genů řízených kateninem v jaterních progenitorových buňkách. Aktivace AhR v těchto buňkách způsobila také změnu jejich fenotypu a narušení adheze, což opět nasvědčuje ovlivnění dráhy Wnt/ $\beta$ -katenin AhR signalizací. Tyto poznatky mohou být důležité především v oblasti onkologie, jelikož již dříve byla prokázána souvislost aberantní aktivace  $\beta$ -kateninu s rozvojem několika typů nádorů jater (Thompson *et al.*, 2007).

Mnohé výzkumy potvrdily také aktivitu proteinu KLF6 (z anglického Krüppel-like faktor 6) indukovanou ligandem TCDD *in vivo* i *in vitro* (Wilson *et al.*, 2013, Jackson *et al.*, 2014). Bureau *et al.* (2009) předpokládají význam KLF6 jako nádorového supresoru působícího prostřednictvím regulace inhibitoru cyklin dependentních kináz *p21<sup>cip1</sup>*. Jeho downregulace, mutace a ztráta heterozygotnosti



je navíc spojena s rozvojem rakoviny prostaty a vznikem hepatocelulárního, kolorektálního a primárního nemalobuněčného karcinomu plic a glioblastomu. Přechodná exprese tohoto inhibitoru během jaterní regenerace je závislá na regulaci aktivity AhR-KLF6 indukované ligandem TCDD a zprostředkované vazbou s NC-XRE (Jackson *et al.*, 2014). Data navíc potvrzují, že tato signalizace reguluje normální funkci buněčného cyklu a poukazují na škodlivé účinky TCDD vedoucí mimo jiné k narušení již zmíněné jaterní regenerace. Vzhledem k již několikrát zdokumentované roli KLF6 a AhR v regulaci buněčného cyklu (Bureau *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2005), lze předpokládat významný příspěvek komplexu AhR-KLF6 ke karcinogenezi zprostředkované dioxiny (Wilson *et al.*, 2013).

Několik studií ukazuje, že složky signální dráhy AhR fyzicky interagují se složkami dráhy NF- $\kappa$ B a navzájem ovlivňují svoji aktivitu. Transkripční faktor NF- $\kappa$ B hraje kritickou roli v mnoha buněčných procesech včetně vrozené a adaptivní imunity, buněčné proliferace a diferenciaci a indukce apoptózy. Transkripčně aktivní homo- či heterodimer se tvoří kombinovanou vazbou dvou z pěti různých podjednotek, kterými jsou proteiny p50, RelA (p65), p52, c-Rel a RelB (Chen *et al.*, 1998). Kanonickou dráhu signalizace spouští dimer p50-RelA, jehož formace je indukována především signály z cytokinových receptorů, jako je tumor nekrotizující faktor (TNF $\alpha$ ) a interleukinový receptor 1 (IL1) a vede k expresi velkého množství cílových genů, například genu pro chemokin produkovaný T lymfocyty RANTES, intracelulární adhezivní molekulu 1 (ICAM-1), IL8, protoonkogen Bcl-2 a mnoho dalších (Oeckinghaus *et al.*, 2011). Některé funkce regulované tímto pleiotropním transkripčním faktorem je ovlivňováno také působením xenobiotik, především TCDD, což nasvědčuje existenci vzájemné interakce NF- $\kappa$ B a AhR signalizace (Tian *et al.*, 1999). Po transfekci buněk exprimujících AhR plazmidem nesoucím gen pro velké množství RelA proteinu bylo zjištěno, že tato podjednotka NF- $\kappa$ B efektivně potlačuje aktivitu AhR indukovanou TCDD, což naznačuje, že již dříve pozorovaná inhibice exprese CYP1A1 a CYP1A2 cytokiny probíhá prostřednictvím indukce NF- $\kappa$ B signalizace. Stejná represe byla pozorována i z hlediska vlivu AhR na funkci NF- $\kappa$ B. Pro zjištění přímé formace dimery AhR s RelA byla v rámci této studie provedena ko-immunoprecipitační esej a následná Western blot analýza jejich komplexu. Výsledkem obou experimentů bylo potvrzení fyzické interakce těchto proteinů (Tian *et al.*, 1999). V další studii provedení této eseje vedlo ke zjištění, že AhR je schopný fyzicky interagovat také s podjednotkou RelB jak po aktivaci TCDD, tak za nepřítomnosti tohoto ligandu (Vogel *et al.*, 2007). V této laboratoři bylo také zjištěno, že vzniklý komplex RelB-AhR se váže do RelB/AhR responsivního elementu v promotoru genu pro interleukin 8 (IL-8), který doposud zůstal bez povšimnutí. Následně spouští dimer dvě cesty signalizace, jednu aktivovanou ligandem TCDD a druhou protein kinázou A (PKA). Tím je zahájena indukce exprese CYP1A1 a iniciace transkripce některých zánětlivých chemokinů, tedy RelB cílových genů, mezi které patří již zmíněný IL-8.



**Obrázek 5:** Schématické znázornění kanonické a nekanonické AhR signalizace. Převzato z článku (Grishanova *et al.*, 2023)

### 3.4 Role AhR v biologických procesech

AhR se prostřednictvím různých signalizačních drah účastní několika biologických procesů. Řadíme mezi ně například ovlivnění imunitních reakcí, kdy v experimentech u AhR KO myši nebyla pozorována správná diferenciací T-lymfocytů, což mělo za následek větší náchylnost těchto jedinců k bakteriálním infekcím. AhR totiž pravděpodobně ovlivňuje vývoj T-lymfocytů na úrovni transkripce, čemuž nasvědčuje právě jeho funkce jakožto transkripčního faktoru (Stevens *et al.*, 2009). Vysoká hladina exprese a aktivace AhR je pozorována i v nádorových liniích, jako je například lidská epiteliální linie karcinomu prsu MCF, kde probíhá ovlivnění rozvoje tumorigeneze prostřednictvím kontaktu AhR se signální dráhou estrogenového receptoru (Wong *et al.*, 2009). Další důležitou rolí AhR je udržení homeostázy intestinálních kmenových buněk a integrity epiteliální bariéry, čímž ji chrání před poškozením zánětem, který byl vyvolán v reakci na různá onemocnění (Metidji *et al.*, 2018).

Intestinální epiteliální bariéra je prvním místem kontaktu AhR ligandů získaných ze stravy s tělem živočichů. Nejvyšší hladina exprese tohoto receptoru je u myši pozorována ve vrchní části tenkého střeva přiléhající k žaludku (Ireland *et al.*, 2004), kde dochází k transformaci některých stravou přijatých látek, které jsou proligandy AhR, na aktivní ligandy. Mezi tyto látky patří například již zmíněný I3C (Bjeldanes *et al.*, 1991). Indukce CYP1A1 a CYP1B1 vyvolaná aktivací receptoru těmito ligandy je navíc klíčovým krokem regulace hladiny ligandů v celém těle jedince. Případná konstitutivní exprese CYP1A1 v buňkách intestinálního epitelu (IEC) pak vede ke vzniku AhR deficientního fenotypu. Ten je projevem negativní zpětnovazebné regulace AhR, která je v tomto případě způsobena úplnou degradací ligandu aktivujícího receptor enzymy CYP1, což vede utlumení jeho signalizace (Chiaro *et al.*, 2007). Účinek je reverzibilní suplementací proligandu I3C, což naznačuje, že deficientní fenotyp receptoru je způsoben nadměrným metabolismem těchto liganů. Dalším důležitým následkem konstitutivní exprese CYP1A1 v IEC buňkách je ovlivnění intestinálních imunitních buněk střev, jejichž funkce je zcela závislá na ligandech AhR (Schiering *et al.*, 2017). V intestinálním epitelu je mechanismus působení pravděpodobně AhR zprostředkovan Wnt/ $\beta$ -katenin signalizací popsanou v předchozí kapitole. Prostřednictvím této dráhy se pak receptor ovlivněním proliferace a diferenciací kmenových buněk podílí na udržení správné funkce střevní bariéry. Opravení poškozeného střevního epitelu má velmi zásadní význam z hlediska rezistence proti patogenům způsobujícím střevní onemocnění. Neúspěšné dosažení této obnovy bylo pozorováno u myších jedinců s defektním AhR, u nichž docházelo k nadměrné indukci CYP1A1 enzymů (Metidji *et al.*, 2018).

Dysregulace AhR v kmenových buňkách intestinálního epitelu vede také k aberantnímu zánětu a zesílení jejich proliferace, což jsou jevy běžně asociované s maligní transformací buněk a rozvojem vzniku kolorektálního karcinomu. U starších myši s AhR deficientními intestinálními kmenovými buňkami byla zaznamenána jejich abnormální proliferace. Po expozici mutagenu azoxymethanu se u těchto jedinců do čtyř měsíců vyvinuly rozsáhlé nádory, avšak u *wild type* myši nebyly pozorovány

žádné náznaky tumorigenní buněčné aktivity. Správná funkce AhR má tak společně s dostatečným příjmem protektivních agonistů, jako je I3C, důležitý příznivý vliv na inhibici vzniku intestinálních karcinomů (Metidji *et al.*, 2018).

### 3.4.1 Střevní mikroflóra

Střevní mikrobiom (mikrobiota, mikroflóra) je soubor mikroorganismů, jako jsou bakterie, archea, viry a jiné eukaryotní mikroby, osídlujících lidské střevo. Tyto organismy žijí s lidským tělem v symbióze a jejich počet v gastrointestinálním traktu (GIT) zdravého dospělého člověka dosahuje až 100 bilionů, tedy  $10^{14}$  (Thursby *et Juge*, 2017). Obsah bakteriálních buněk v jednom mililitru mikrobiální suspenze získané ze vzorku tlustého střeva je odhadován od  $10^{11}$  do  $10^{12}$ , což z něj dělá jedno z nejhustěji osídlených mikrobiálních stanovišť na světě. Většina druhů těchto bakterií pochází z relativně málo známých bakteriálních populací, kterým významně dominují kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Ley *et al.*, 2006).

Není však možné definovat přesné druhové zastoupení mikrobů mezi jedinci stejného živočišného druhu. Největší podobnost mikrobiálního osídlení GIT je u jednotlivců v prvních týdnech po narození. Mikrobiom poté přirozeně podléhá změnám během celého života primárně vývojem a stárnutím jedince, ale i působením vnějších vlivů, jako je strava, pohyb a frekvence užívání antibiotik. Složení mikrobioty se množstvím a taxonomickou diverzitou liší také v každé části lidského zažívacího ústrojí, především z hlediska funkce, kterou dané mikroorganismy vykonávají. Důvodem je specifita anatomické stavby jednotlivých částí trávicího traktu, které zároveň vykazují rozdílné hladiny parciálního tlaku kyslíku a oxidu uhličitého (Flint *et al.*, 2012), jejichž fyziologické hodnoty jsou pro jednotlivé skupiny mikrobů odlišné. Všechny tyto faktory způsobují, že se střevní mikrobiom může různit také mezi jednotlivými zjevně zdravými osobami, aniž by u nich docházelo k jakémukoliv rozvoji patologických jevů.

Bylo prokázáno, že zdravá mikrobiota je velmi důležitá pro udržení správné funkce imunitního systému, ochranu proti patogenům a přímo i nepřímo ovlivňuje většinu fyziologických funkcí v našem těle. Mikroby jsou také nedílnou součástí metabolismu a jsou schopny rozložit a absorbovat z přijaté potravy prospěšné živiny, které jsou pro lidské tělo jinak nestravitelné. Nejčastěji se jedná o trávení polysacharidů rostlinného původu, celulózy a hemicelulózy, či o metabolismus látek pro tělo esenciálních, jako je například aminokyselina tryptofan. Mikroby také odštěpují z vlákniny mastné kyseliny s krátkými řetězci, čímž vytváří nenahraditelné energetické zdroje pro funkci intestinální sliznice, zvláště pro vyvolání imunitní odpovědi a řízení tumorigeneze (Shreiner *et al.*, 2015). Nerovnováha těchto symbiotických vztahů může vést k mnoha zdravotním komplikacím, jako jsou idiopatické střevní záněty (IBD), ale i další závažná onemocnění týkající se ostatních orgánových soustav (Sivaprakasam *et al.*, 2017).

### 3.4.2 Onemocnění způsobená narušením střevní mikrobioty

Užívání antibiotik především v dětství a nevyvážená strava jedince způsobují dysbiózu mikroorganismů v GIT. Tyto vnější faktory jsou momentálně nejvíce sledovanými aspekty souvisejícími s vyvoláním autoimunitních a zánětlivých onemocnění střev.

Nejčastějším patologickým projevem narušení rovnováhy střevního mikrobiomu je skupina chronických zánětlivých onemocnění označovaných jako idiopatické střevní záněty (IBD). Mezi nejvíce globálně se vyskytující onemocnění spadající do této kategorie řadíme Crohnovu chorobu (CD) a ulcerózní kolitidu (UC). Při zkoumání mikrobiálního osídlení zažívacího traktu pacientů s IBD byla ve srovnání se zdravými jedinci pozorována snížená taxonomická diverzita bakterií. U pacientů trpících CD jsou typické také výrazné posuny v počtu mikrobů ve prospěch aerobních a fakultativně anaerobních kmenů, a naopak snížení četnosti obligátně anaerobních populací, které jsou při tomto onemocnění z těla vylučovány. Bylo zjištěno, že tuto mikrobiální dysbiózu podporuje užívání antibiotik, které běžně představují první fázi léčby CD (Gevers *et al.*, 2014). Takové porušení integrity střevní bariéry, která je za fyziologických podmínek přísně regulována, vede k translokaci symbiontů do slizniční vrstvy GIT, což způsobí mechanické poranění s následným zanícením tkáně a navození nežádoucí imunitní odpovědi jedince (de Souza *et Fiocchi*, 2016). To má za následek nástup vnějších symptomů, obvykle horečky, bolesti břicha, průjmu a úbytku na váze.

Zvažován je také vztah mikrobiomu ke vzniku nádorových onemocnění. Byly zaznamenány rozdíly v činnosti střevních bakterií mezi zdravými jedinci a osobami s kolorektálním karcinomem. Jedná se především o redukci počtu bakteriálních producentů butyrátu, látky s prokazatelnou protirakovinnou aktivitou, a nárůst oportunních patogenů produkujících různé druhy toxinů, které mohou významně přispívat k rozvoji tohoto onemocnění. Celá problematika je však zatím nejasná, jelikož při výzkumu byly použity vzorky tkání pacientů, kterým již byla rakovina diagnostikována a změny mikrobioty tak mohou být až projevem tohoto onemocnění (Wang *et al.*, 2012).

Pro člověka však může nepříznivá struktura mikrobiomu způsobovat mnoho zdravotních komplikací mimo gastrointestinální trakt, jako jsou různá neurologická, metabolická a kardiovaskulární onemocnění či obezita (Sivaprakasam *et al.*, 2017).

### 3.4.3 AhR jako terapeutický cíl při léčbě IBD

Jak již bylo několikrát zmíněno, látky produkované intestinálními mikroorganismy aktivují AHR. Jelikož se tento receptor podílí na regulaci zánětlivých procesů a tumorigenezi, není žádným překvapením, že se mnohé výzkumy věnují jeho potenciálnímu využití právě v terapii chronických střevních zánětů.

Má se za to, že kynureninová cesta metabolismu tryptofanu hraje roli v zánětlivých procesech. Při bližším zkoumání jejího vlivu na samicích myši s kolitidou vyvolanou dextranem sulfátem sodným (DSS) byla zaměřena pozornost na metabolity KYNA a XANA, ligandy AhR. Mezi zvyšujícími se koncentracemi těchto látek v krevním séru a intenzitou zánětu v průběhu kolitidy byla pozorována. Stejně tak tomu bylo i u myši v souvislosti s úbytkem na váze, což je jeden z hlavních příznaků tohoto onemocnění. Pro ověření zlepšení popsanych příznaků byly následně testovány jedincům tyto dvě látky podány orálně, což vedlo ke zvýšení jejich koncentrace v krevním séru. Ve srovnání s kontrolními jedinci byla opět pozorována signifikantní redukce v úbytku váhy, zkrácení délky tlustého střeva a ve snížení jeho histologického skóre. Tím byl potvrzen protizánětlivý vliv XANA a KYNA, který je na molekulární úrovni vyvolán prostřednictvím AhR, kdy jeho signalizací dochází k obnovení energetického metabolismu v zánětem poškozených pomocných T lymfocytech a intestinálních epiteliálních buňkách. Experiment byl následně aplikován i na vzorky lidských pacientů s IBD a bylo dospěno ke stejnému závěru, jako v případě předchozích pokusů na myších modelech (Michaudel *et al.*, 2023).

Peng *et al.* (2021) prováděli tentýž výzkum jako Michaudel *et al.*, avšak zkoumanou látkou byl indol-3-karbinol (I3C), z potravy získávaný agonista AhR. Myši s DSS-indukovanou kolitidou stejně jako v případě vlivu látek XANA a KYNA po vystavení I3C přibývaly na váze, došlo k utlumení exprese proteinů doprovázejících nekroptózu intestinálních epiteliálních buněk, snížení jejich histologického skóre a k prodloužení jejich tlustého střeva. Na histologických řezech byla patrná redukce infiltrace zánětlivých buněk do tlustého střeva a snížení poškození střevní tkáně vyvolaného onemocněním. UC je doprovázena také narušením intestinální homeostázy, která byla po aplikaci I3C zmírněna a jeho vlivem došlo dokonce k prevenci odumírání buněk střevního epitelu a k zachování jejich proliferace. I v případě I3C bylo zjištěno, že redukce nekroptózy a zánětu bylo docíleno aktivací AhR, kdy prostřednictvím jeho signální dráhy interagující s nukleárním faktorem kappa B došlo k poklesu produkce zánětlivých cytokinů v buňkách jak myších, tak lidských. Z těchto důvodů je I3C vhodným kandidátem na terapii UC a z důvodu jeho hojné přítomnosti v košťálové zelenině by mohl být přijímán dokonce jako doplněk stravy. Před zavedením této látky jako léčiva je však třeba více porozumět molekulárnímu mechanismu tohoto onemocnění a přesnému působení doposud užívaných léčiv.

### **3.5 Druhové rozdíly mezi účinky ligandů AhR**

I když jsou struktura a mechanismus působení AhR fylogeneticky vysoce konzervovány (Hahn, 2002), chemické složení jeho ligand vazebné domény či dioxinových responsivních elementů (DRE) se může v rámci různých živočišných druhů lišit. Rozdílný může být také transaktivační potenciál receptoru, specifita cílových genů a relativní afinita vazby k HSP90 a XAP2. Lidský AhR je například *in vitro* méně stabilní než AhR myši a pro udržení konformace vazající ligand je třeba přítomnosti solí kyseliny molybdenové (Manchester *et al.*, 1987). Receptor také váže asi o 50 % HSP90

než receptor myši (Hogenesch *et al.*, 1997) a i v případě vazby molekuly XAP2 je její afinita pravděpodobně nižší, což vede k rozdílné subcelulární lokalizaci receptorů (Ramadoss *et al.*, 2004). Všechny tyto rozdíly způsobují, že následná míra odpovědi na aktivaci receptoru ligandem není mezi organismy shodná. Na afinitě ligandů k receptorům se podílí navíc i různá konformace molekul společně s konformací, které receptor po navázání ligandu zaujme. Nejčastěji využívanými modelovými organismy pro studium aktivity AhR jsou člověk, myš a krysa. Zjištěný fakt, že ve funkci AhR existují mezi těmito druhy rozdíly vede k tomu, že některá data získaná z laboratorních experimentů na velice často používaných buněčných liniích hlodavců nelze analogicky aplikovat u lidí.

### 3.5.1 Aminokyselinové složení LBD domén

Pomocí místně cílené mutagenese *in vitro* se povedlo identifikovat některé z rozdílů v aminokyselinových zbytcích ligand vazebných domén AhR. Nejvíce studovaným reziduem je alanin v pozici 375 (Ala375) u myšičího AhR, jelikož právě ten zprostředkovává vazbu dioxinových ligandů k receptoru, mezi které patří i nejvíce využívaný modelový agonista TCDD (Poland *et al.*, 1994). Jeho místně cílená mutace na valin způsobila snížení afinity k tomuto ligandu. Stejný fenomén byl pozorován v rámci evoluce lidského AhR, kde u primátů a neandrtálců tuto vazbu zprostředkoval alanin v pozici 381 (A381). Během evoluce došlo k jeho mutaci na valin, což vedlo ke snížení afinity TCDD k AhR dnešního člověka a ke zmírnění následků jeho toxických projevů (Aarts *et al.*, 2021). Příkladem druhově specifického účinku AhR ligandů je i mikrobiální metabolit indirubin, který je více potentním aktivátorem lidského receptoru obsahujícího v pozici 375 na rozdíl od myšičího AhR valin. Ve stejné studii byla věnována pozornost i C-terminální části receptoru. Tato tzv. transaktivační doména vykazuje v rámci lidského a myšičího AhR pouze 58% podobnost v aminokyselinových sekvencích, přičemž nejzásadnějšími jsou rozdíly v oblasti bohaté na glutamin. To může mít za následek vazbu rozdílných kofaktorů v rámci aktivace obou receptorů stejnými ligandy a následnou detekci jejich odlišných funkčních odpovědí (Flaveny *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Dioxin responsivní elementy

Vedle různých struktur receptoru byly mezi živočišnými druhy identifikovány rozdíly mezi počtem, distribucí a umístěním dioxinových responsivních elementů (DRE). Dere *et al.* (2011) provedli srovnávací analýzu TCDD-indukované exprese AhR genů v hepatomových liniích člověka (HepG2), myši (Hepa1c1c7) a krysy (H4IIE). Metoda DNA microarray odhalila odlišné sekvence DRE elementů v rámci stejných genů GSTA5, CCND1 a ID3 napříč těmito druhy. Jejich počet v jednotlivých genech byl navíc přímo úměrný stupni aktivace receptoru. Ta byla po 24 hodinách inkubace s TCDD nejvyšší u lidského AhR (9,9 %), poté u AhR kryšičího (5,2 %) a nejnižší indukce byla pozorována u myšičí linie Hepa1c1c7 (1,1 %). Rozdílná míra aktivace receptoru v daných liniích tak měla za následek odlišnou indukci transkripce AhR cílových genů zahrnujících například CYP1A1 a UGT1A6.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

- Stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie Ahrepa odvozená od parentální myši hepatomové linie Hepalcl7.
- Stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-AhR odvozená od parentální lidské hepatomové linie HepG2.
- Plazmid pGL-4.27-DRE – plazmid použitý pro stabilní transfekci Hepalcl7 a HepG2 nesoucí dioxinový responsivní element (DRE) a gen pro rezistenci proti hygromycinu použitý pro transfekci obou buněčných linií.

### 4.2 Použité chemikálie a roztoky

- 0,25 % Trypsin-EDTA (Biosera, LM-T1720)
- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (LGC Standards)
- 3-methylindol (3MI) (SantaCruz Biotechnology, sc-256535)
- 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ) (Sigma-Aldrich, SML 1489-5MG)
- Antibiotika penicilin (10 000 U/ml) a streptomycin (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, P4333)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, 20022-CT0)
- D-luciferin (Sigma-Aldrich, L9504)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) – glukóza (4500 mg/l); 10 % FBS; L-glutamin (2 mM); antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml), 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, D6546)
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biosera, LM-S2041)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma Aldrich, F6765)
- Hygromycin B (SantaCruz Biotechnology, SC-29067)
- Indirubin (SantaCruz Biotechnology, SC-201531)
- Indol-3-acetamid (IAD) (SantaCruz Biotechnology, SC-255213)
- Indol-3-karbinol (I3C) (Sigma-Aldrich, I7256)
- L-glutamin (200 mM) (SERANA, RGL-001)
- Lyzační pufr (Promega, E3971)
- Methyltetrazoniová sůl (MTT; 5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, M2128)
- Neesenciální aminokyseliny (100x) (Sigma-Aldrich, M7145)
- Triton X-100 (Serva, 37 240)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, T6146)



### 4.3 Složení použitých roztoků

- Kultivační médium: 500 ml komerčního média DMEM; 50 ml 10% FBS; 5 ml roztoku antibiotik penicilinu (100 U/ml) a streptomycinu (100 µg/ml); 5 ml 2mM L-glutaminu; 5 ml 1% neesenciálních aminokyselin
- Substrát pro luciferázu: 168 mg DTT; 10 mg ATP; 5mg koenzymu A; 5 mg D-luciferinu; 3,03 mg heptahydrátu síranu hořečnatého; 1,23 mg EDTA; 1,32 ml Tris-acetát-EDTA pufru (1M, pH 7,8); objem doplněn destilovanou vodou na 30 ml

### 4.4 Seznam laboratorních přístrojů a zařízení

- Spektrofotometr (Infinite M200, Tecan)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (NB-203 XL, N-Biotek)
- Laboratorní třepačka (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)
- Laminární box (Labculture Class II Type A2, Esco)
- Mikroskop (NIB-100, Novel Optics)
- Odsávačka (Flask-Trap 1, Biosan)
- Vodní lázeň (LCB-11D, Labtech)
- Vortex (Reax top, Heidolph)

### 4.5 Rozmrazování buněk

Před zahájením experimentu bylo nutné potřebné buněčné linie zamražené na -80 °C nebo v tekutém dusíku rozmrazit. Při rozmrazování je nutné pracovat rychle, aby bylo zabráněno tvorbě ledových krystalů v buňkách a nedocházelo tak k jejich poškození.

1. V laminárním boxu bylo do kultivační lahve o ploše 25 cm<sup>2</sup> napipetováno 5 ml kultivačního média předeřátého na teplotu 37 °C.
2. Buňky byly inkubovány 2 minuty ve vodní lázni (37 °C).
3. 1 ml média z kultivační lahve byl přepipetován k buňkám, které byly ihned poté přepipetovány zpět do kultivační lahve.
4. Kultivační lahev s buňkami přemístit do inkubátoru (37 °C, 5% atmosféra CO<sub>2</sub>)
5. Následující den bylo v kultivační nádobě vyměněno médium.

### 4.6 Kultivace a pasážování buněk

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích o ploše 75 a 150 cm<sup>2</sup> v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>.

Po nárůstu buněk do dostatečné konfluence, tedy kdy buňky zaplnily celý povrch dna kultivační nádoby, bylo nutné buňky zpasážovat. Pasáž je nezbytná pro započítání experimentů a také k zabránění tzv. kontaktní inhibice, která spočívá v zastavení buněčného dělení z důvodu nedostatku prostoru pro buněčný růst. Pasáž byla prováděna každé 2–3 dny.

1. Médium a fosfátový pufr byly nahřáty ve vodní lázni (37 °C). Mezitím byl při pokojové teplotě rozmražen trypsin.
2. Buňky byly vytaženy z inkubátoru a prohlédnuty pomocí světelného mikroskopu.
3. Buňky byly společně s vydesinfikovanými nahřátými chemikáliemi přeneseny do laminárního boxu.
4. Z kultivační lahve o ploše 75 cm<sup>2</sup> bylo odsáto staré kultivační médium. Buňky v lahvi byly promyty 5–7 ml fosfátového pufru, který byl opět odsát.
5. Na buňky byl aplikován 1 ml pracovního roztoku trypsinu a kultivační lahev byla na 5 minut přenesena do inkubátoru, aby došlo k oddělení buněk od kultivačního povrchu.
6. Po inkubaci bylo působení trypsinu zastaveno přidáním 9 ml média. Pro dosažení rovnoměrné suspenze bylo médium s buňkami opakovaně nasáváno a vypouštěno pomocí sérologické pipety.
7. Buněčná suspenze byla přenesena do 50 ml plastové centrifugační zkumavky a část buněčné suspenze byla vrácena do kultivační nádoby.
8. K tomuto objemu bylo přidáno 20 ml kultivačního média a láhev s buňkami byla vrácena do inkubátoru.

#### **4.7 Počítání buněk a vyšetí na desky**

1. Ze suspenze získané pasážováním buněk bylo mikropipetou odebráno 10 µl do 0,5 ml mikrozkušavky.
2. K obsahu zkumavky bylo přidáno 90 µl Trypanové modři a suspenze byla promíchána opakovaným nasáváním mikropipetou.
3. Bürkerova komůrka byla překryta krycím sklíčkem a byla do ní aplikována buněčná suspenze obarvená Trypanovou modří tak, aby se suspenze dostala do prostoru pod krycí sklíčko.
4. Pod mikroskopem byly spočítány buňky v pěti zorných polích horní části komůrky a následně v pěti zorných polích její dolní části.
5. Z počtu buněk ve všech zorných polích byla spočítána koncentrace buněk v jednotkách mil./ml.
6. Byly vypočítány objemy suspenze a média potřebné k jejímu naředění na koncentraci požadovanou pro provedení experimentu.
7. Buňky o koncentraci 25 000 buněk na jamku byly po 190 µl vysety na kultivační 96-jamkové desky, které byly následně na 24 hodin umístěny do inkubátoru.
8. Takto připravené buňky byly následně použity pro provedení MTT testu a Reporter gene assay.

## 4.8 Příprava testovaných látek

Po 24 hodinách od vysetí buněk na desky následovala aplikace testovaných látek FICZ, indirubin, I3C, IAD a 3MI. Pro testování látek bylo nutné nejprve připravit jejich požadované koncentrace. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním v DMSO a následně byly metodou postupného ředění namíchány koncentrační řady jednotlivých látek podle rozpisů v Tabulkách 1–5. Koncentrace zásobních roztoků činily 20 mM pro FICZ, 10 mM pro indirubin, 1000 mM pro látky I3C a IAD a 200 mM pro 3MI.

Pro stanovení cytotoxicity látek pomocí MTT testu byly takto připravené vzorky 1000x ředěny do kultivačního média. Jako negativní kontrola bylo v experimentu použito 0,1% DMSO a jako kontrola pozitivní 2% Triton X-100. Při stanovení transkripční aktivity AhR metodou Reporter gene assay byly látky ředěny do depletovaného média obsahujícího buněčné metabolity, které bylo pravidelně odebráno z kultivační lahve s buňkami během pasáží. Jako negativní kontrola zde bylo opět použito 0,1% DMSO. Pro provedení obou experimentů byly použity tytéž koncentrace testovaných látek.

**Tabulka 1:** Příprava koncentrační řady FICZ ze zásobního roztoku o koncentraci 20 mM.

Ředění	Objem roztoku látky [ $\mu$ l]	Objem DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace naředěného roztoku [ $\mu$ M]	Ředění do média	Konečná koncentrace v médiu [nM]
2x	100	100	10000	1000x	10000
10x	20	180	1000		1000
10x	20	180	100		100
10x	20	180	10		10
10x	20	180	1		1
10x	20	180	0,1		0,1
10x	20	180	0,01		0,01
10x	20	180	0,001		0,001

**Tabulka 2:** Příprava koncentrační řady Indirubinu ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mM.

Ředění	Objem roztoku látky [ $\mu$ l]	Objem DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace naředěného roztoku [ $\mu$ M]	Ředění do média	Konečná koncentrace v médiu [nM]
-----	200	0	10000	1000x	10000
2x	100	100	5000		5000
5x	40	160	1000		1000
10x	20	180	100		100
2x	100	100	50		50
2x	100	100	25		25
2,5x	80	120	10		10
2x	100	100	5		5
5x	40	160	1		1
10x	20	180	0,1		0,1
10x	20	180	0,01		0,01
10x	20	180	0,001		0,001

**Tabulka 3:** Příprava koncentrační řady I3C ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mM.

Ředění	Objem roztoku látky [ $\mu$ l]	Objem DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace naředěného roztoku [mM]	Ředění do média	Konečná koncentrace v médiu [ $\mu$ M]
-----	200	0	1000	1000x	1000
2x	100	100	500		500
5x	40	160	100		100
2x	100	100	50		50
5x	40	160	10		10
2x	100	100	5		5
5x	40	160	1		1
10x	20	180	0,1		0,1
10x	20	180	0,01		0,01

**Tabulka 4:** Příprava koncentrační řady IAD ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mM.

Ředění	Objem roztoku látky [ $\mu$ l]	Objem DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace naředěného roztoku [mM]	Ředění do média	Konečná koncentrace v médiu [ $\mu$ M]
-----	200	0	1000	1000x	1000
2x	100	100	500		500
5x	40	160	100		100
10x	20	180	10		10
10x	20	180	1		1
10x	20	180	0,1		0,1
10x	20	180	0,01		0,01
10x	20	180	0,001		0,001

**Tabulka 5:** Příprava koncentrační řady 3MI ze zásobního roztoku o koncentraci 200 mM.

Ředění	Objem roztoku látky [ $\mu$ l]	Objem DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace naředěného roztoku [mM]	Ředění do média	Konečná koncentrace v médiu [ $\mu$ M]
-----	200	0	200	1000x	200
2x	100	100	100		100
10x	20	180	10		10
10x	20	180	1		1
10x	20	180	0,1		0,1
10x	20	180	0,01		0,01
10x	20	180	0,001		0,001

#### 4.9 MTT test

Jako první byl sledován účinek jednotlivých koncentrací látek na viabilitu buněk za účelem stanovení jejich toxicity. Vyhodnocení bylo provedeno na základě MTT testu, kdy byly buňky inkubovány s roztokem methyltetrazoniové soli. Test využívá aktivity buněčných mitochondriálních dehydrogenáz, které jsou v živých buňkách aktivní a jejich prostřednictvím dochází k redukci methyltetrazoniové soli na tmavě fialový formazan. Tyto enzymy však v poškozených či mrtvých buňkách ztrácí svoji aktivitu, a tak jejich mitochondrie nejsou takové přeměny schopny a vznik fialového produktu nenastává.

1. Ředěním zásobních roztoků do média byly připraveny koncentrační řady testovaných látek, negativní kontrola (0,1% DMSO) a pozitivní kontrola (2% Triton X-100).
2. Buňky byly vytaženy z inkubátoru a pomocí mikroskopu byla zkontrolována jejich konfluence.
3. V laminárním boxu bylo z jamek s buňkami odsáto staré médium a na buňky byly aplikovány připravené roztoky testovaných látek.
4. Látky byly na buňky aplikovány vzestupně po koncentracích, přičemž každá z nich byla na desku pipetována v pěti opakováních. Do první řady jamek byla nanесena negativní kontrola a do poslední kontrola pozitivní.
5. Desky byly na 24 hodin přeneseny do inkubátoru.
6. Po uplynutí stanovené doby inkubace byl připraven roztok MTT ředěním 10x s PBS ze zásobního roztoku o koncentraci 5 mg · ml<sup>-1</sup>.
7. Desky byly vytaženy z inkubátoru a jejich obsah byl vyklepnut do výlevky.
8. Buňky, které zůstaly přisedlé na dnech jamek destičky byly promyty 100 μl 1x PBS, který byl následně opět vyklepnut.
9. Do každé jamky bylo aplikováno 100 μl připraveného roztoku MTT s 1x PBS.
10. Buňky byly inkubovány při 37 °C do doby, než se žlutý MTT roztok nepřeměnil na fialový.
11. Obsah desek byl vyklepnut do výlevky a vzniklé krystalky formazanu byly rozpuštěny v DMSO.
12. Byla změřena absorbance roztoků v jednotlivých jamkách pomocí programu I-Controll na spektrofotometrickém readru. Měření probíhalo při vlnové délce 570 nm s protřepáním desky každých 10 s.

#### 4.10 Reporter gene assay

Druhou částí této bakalářské práce bylo stanovení transkripční aktivity AhR pomocí reportérové eseje. K provedení této metody je třeba transfekovat buňky plazmidem obsahujícím reportérový gen. Buněčné linie sloužící k provedení experimentů byly již stabilně transfekovány plazmidem nesoucím AhR responsivní element (DRE) a gen pro luciferázu. Tento enzym oxiduje substrát D-luciferin na oxyluciferin a během reakce dochází k emisi světla. Míra emitované chemiluminiscence je přímo úměrná transkripční aktivitě sledovaného genu.

Při sledování transkripční aktivity AhR byly experimenty vyhodnocovány po 24 a 4 hodinách inkubace buněk s testovanými látkami.

1. Ředěním zásobních roztoků do depletovaného média byly připraveny koncentrační řady testovaných látek a negativní kontrola (0,1% DMSO).
2. Buňky byly vytaženy z inkubátoru a pod mikroskopem byla zkontrolována jejich konfluence.
3. V laminárním boxu bylo z jamek s buňkami odsáto staré médium a na buňky byly aplikovány

připravené roztoky testovaných látek.

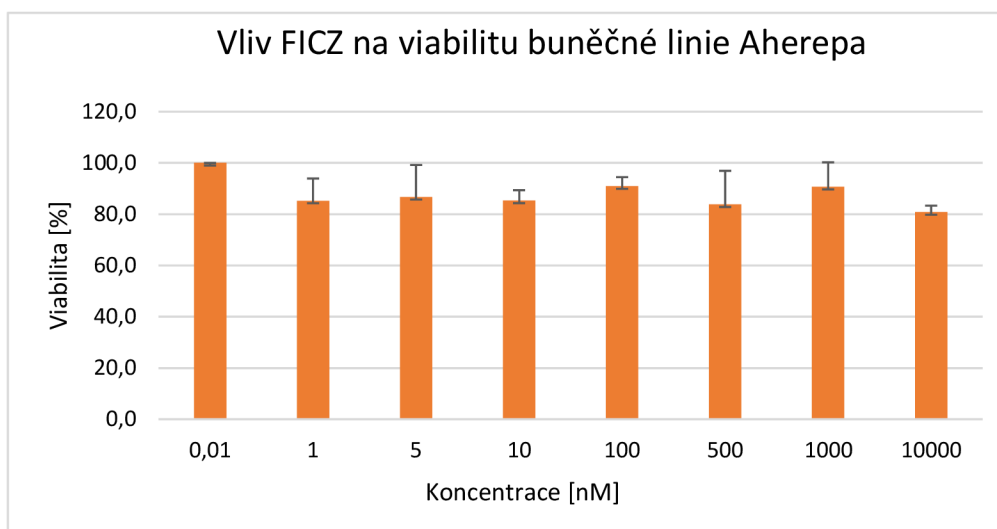
4. Látky byly na buňky aplikovány vzestupně po koncentracích, přičemž každá z nich byla na desku pipetována v pěti opakováních. Do první řady jamek byla nanese negativní kontrola.
5. Desky byly inkubovány po dobu 4 nebo 24 hodin.
6. Po uplynutí stanovené doby inkubace byl připraven roztok lyzačního pufru 50x ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.
7. Desky byly vytaženy z inkubátoru a jejich obsah byl vyklepnut do výlevky.
8. Do jamek mikrotitrační desky bylo aplikováno 30  $\mu$ l 1x lyzačního pufru.
9. Desky byly minimálně na dobu 30 minut umístěny do mrazáku s teplotou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby došlo k jejich lýzi.
10. Po vytažení z mrazáku byly desky rozmrazeny na stolní třepače.
11. Byly připraveny speciální desky pro měření luminiscenčního signálu.
12. Do každé jamky desky bylo pipetováno 6  $\mu$ l lyzátu a 30  $\mu$ l substrátu D-luciferinu.
13. Byla změřena míra luminiscence v jednotlivých jamkách pomocí programu I-Controll na spektrofotometrickém readru. Měření probíhalo v programu bioluminiscence určeném pro luciferázovou reportérovou esej.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení cytotoxicity testovaných látek pomocí MTT testu

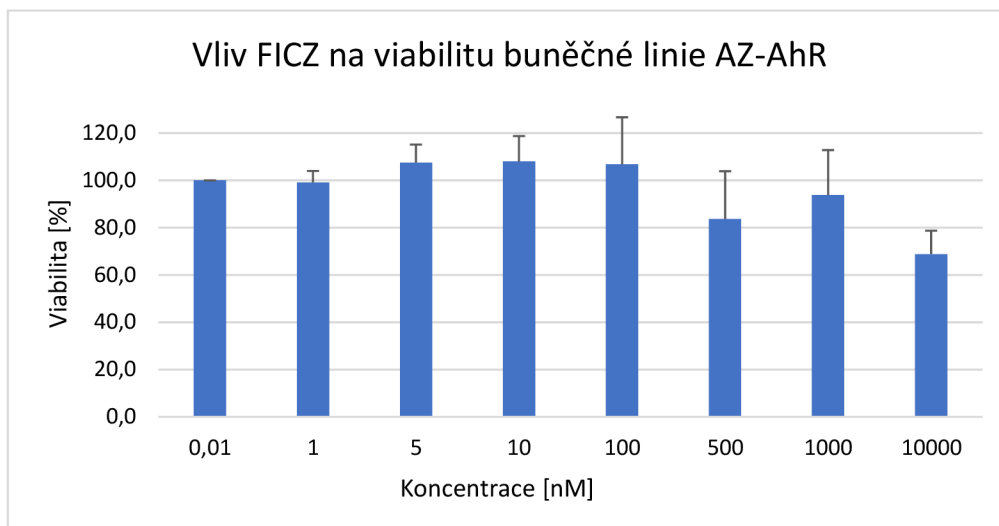
Po inkubaci buněk s testovanými látkami byl pomocí MTT testu stanoven jejich potenciální cytotoxický účinek. Zjištění, zda některá z testovaných koncentrací látek je či není cytotoxická je důležité pro následující provedení experimentu sledujícího transkripční aktivitu AhR. Takové koncentrace, po jejichž 24hodinovém působení na buněčné linie Aherepa a AZ-AhR klesla životnost buněk pod 50 %, byly pro následující experiment vyřazeny.

Expozice buněk látky FICZ nezpůsobila u žádné z koncentrací cytotoxický efekt na buněčné linie Aherepa (Graf 1) ani AZ-AhR (Graf 2). Hodnoty viability se u nižších koncentrací pohybovaly kolem 100 %, u nejvyšší koncentrace (10000 nM) byl zaznamenán lehký pokles na  $80,8 \pm 2,6$  % u linie Aherepa a  $68,8 \pm 9,9$  % u linie AZ-AhR. Mezi toxickým vlivem FICZ na tyto dvě linie nebyly pozorovány zásadní rozdíly.



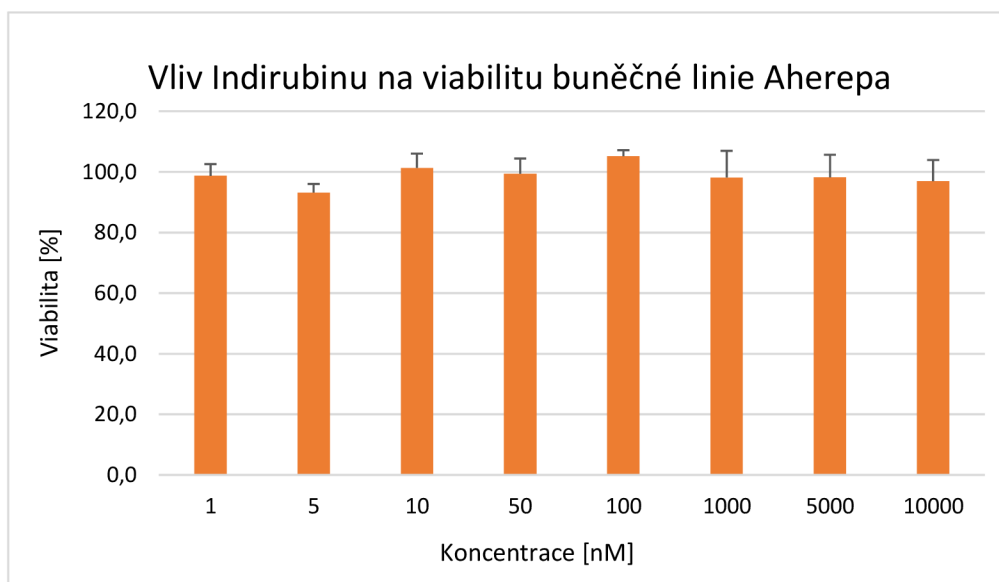
**Graf 1:** Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky FICZ stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,01 nM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.



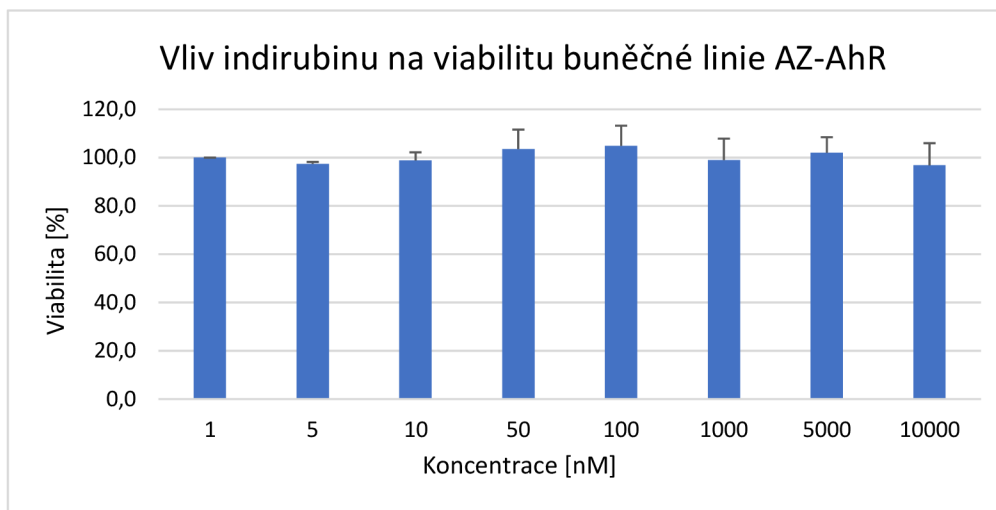


**Graf 2:** Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky FICZ stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,01 nM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.

V případě indirubinu nebyl u žádné z linií po 24 hodinách působení pozorován výrazný pokles viability buněk. Ta se pohybovala v rámci testovaných koncentrací 1–10000 nM v rozmezí 93–105 %. Mezi experimenty provedenými na buněčných liniích Aherepa (Graf č. 3) a AZ-AhR (Graf č. 4) nebyly opět pozorovány podstatné rozdíly v hodnotách procent viability.

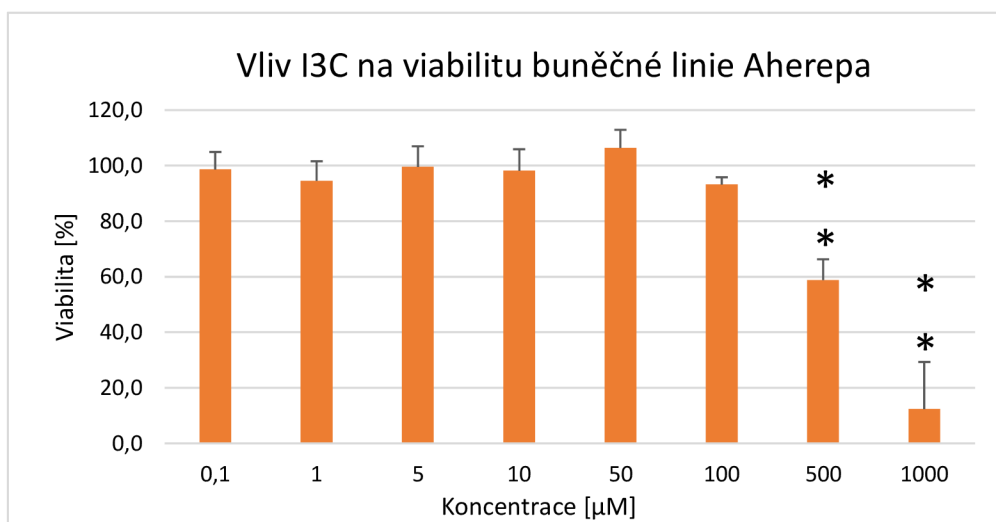


**Graf 3:** Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky indirubin stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 1 nM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů

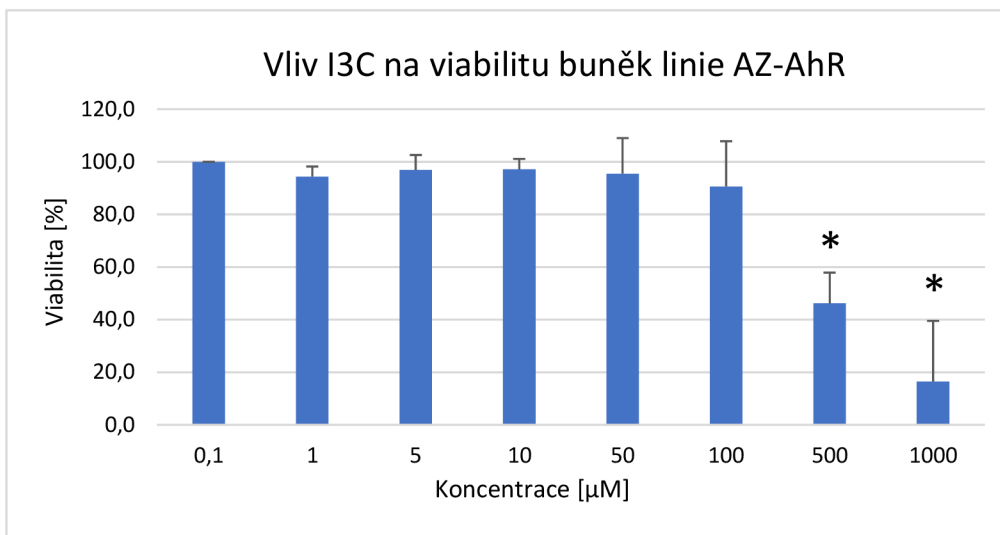


**Graf 4:** Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky indirubin stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 1 nM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.

Po 24 hodinách působení látky I3C na testované buněčné linie byl zaznamenán signifikantní pokles viability buněk u nejvyšší koncentrace (1000  $\mu\text{M}$ ). Viabilita v tomto případě u buněčné linie Aherepa (Graf 5) i AZ-AhR (Graf 6) klesla pod 20 %. U lidské buněčné linie byl pokles životnosti lehce pod 50 % pozorován i u koncentrace 500  $\mu\text{M}$ , a to konkrétně na hodnotu  $46,2 \pm 11,7$  %. V toxicitě nižších koncentrací I3C však nebyly mezi buněčnými liniemi pozorovány další podstatné rozdíly.

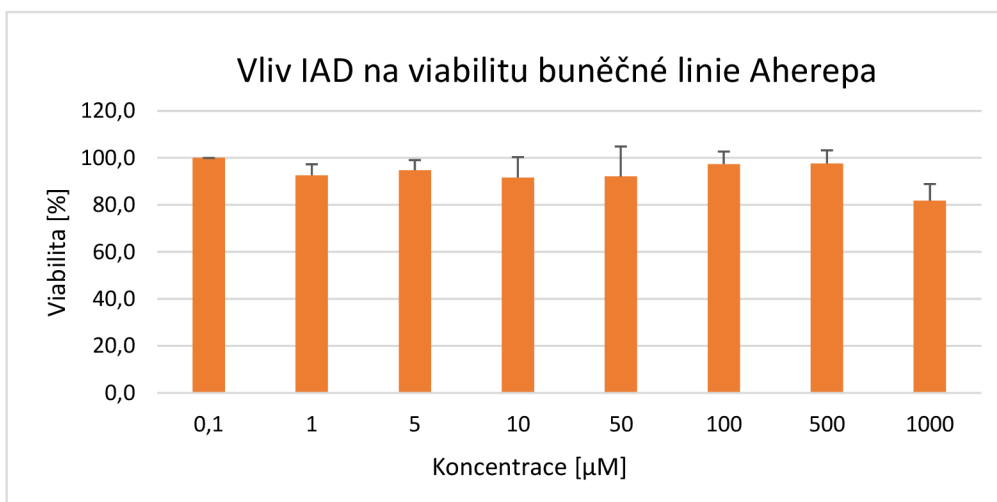


**Graf 5:** Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky I3C stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .

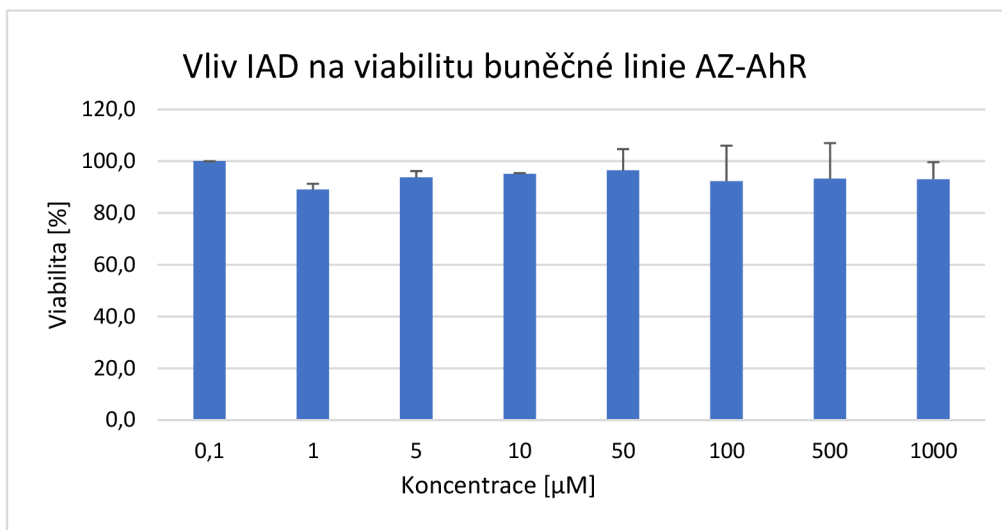


**Graf 6:** Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky I3C stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,1 µM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .

Životnost obou testovaných buněčných linií se po vystavení vlivu IAD po dobu 24 hodin pohybovala mezi 90–100 %. Až u nejvyšší koncentrace této látky (1000 µM) byl pozorován mírný pokles viability buněk na  $81,8 \pm 7,1$  % u linie Aherepa (Graf 7). V případě buněčné linie AZ-AhR pokles viability u nejvyšší koncentrace IAD nenastal (Graf 8).

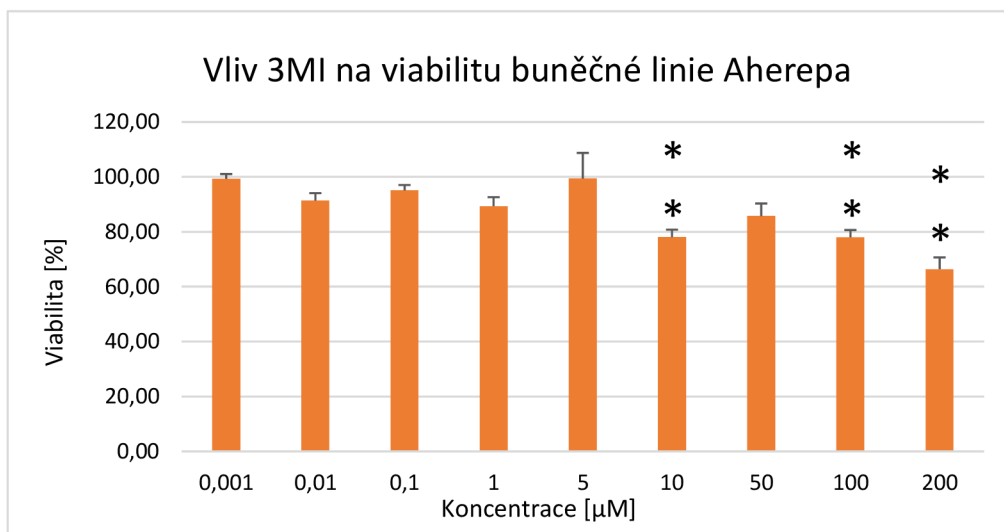


**Graf 7:** Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky IAD stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,1 µM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.

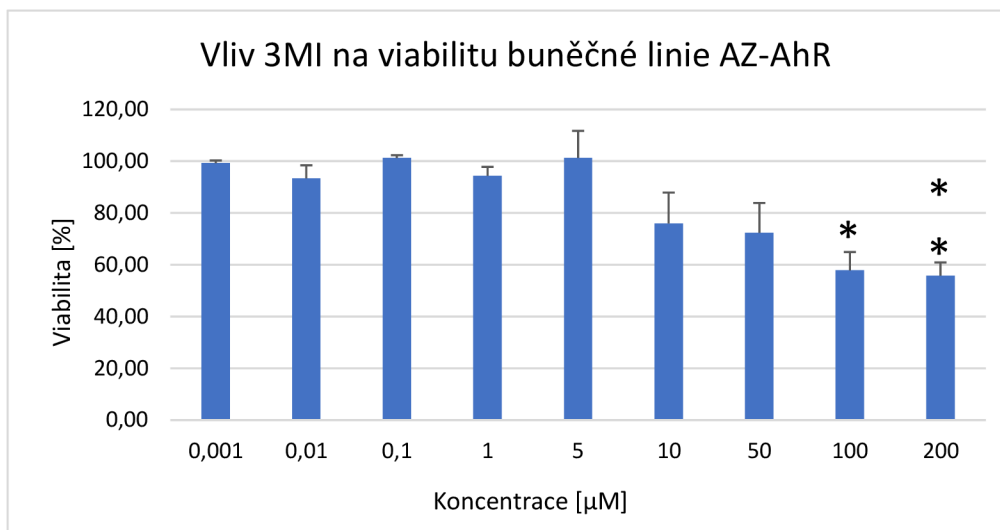


**Graf 8:** Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci látky IAD stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,1 µM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.

Taktéž u 3MI nebyl pozorován cytotoxický vliv na testované buněčné linie u žádné z koncentrací. U prvních z nich (0,001 – 5 µM) se procenta viability pohybovala kolem 90 %. Postupný pokles této hodnoty byl zaznamenán od koncentrace 10 µM. U buněčné linie Aherepa dosáhla její viabilita nejnižší hodnoty  $66,4 \pm 4,3$  % (Graf 9) a u AZ-AhR  $55,8 \pm 5,1$  % (Graf 10). Tento zaznamenaný pokles byl tedy u buněčné linie AZ-AhR výraznější než u linie Aherepa.



**Graf 9:** Viabilita buněčné linie Aherepa po aplikaci látky 3MI stanovena MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,001 µM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .



**Graf 10:** Viabilita buněk linie AZ-AhR po aplikaci látky 3MI stanovená MTT testem po 24 hodinách inkubace. Procenta viability byla vztažena ke koncentraci 0,001 µM. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako kontrola negativní 0,1% DMSO. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .

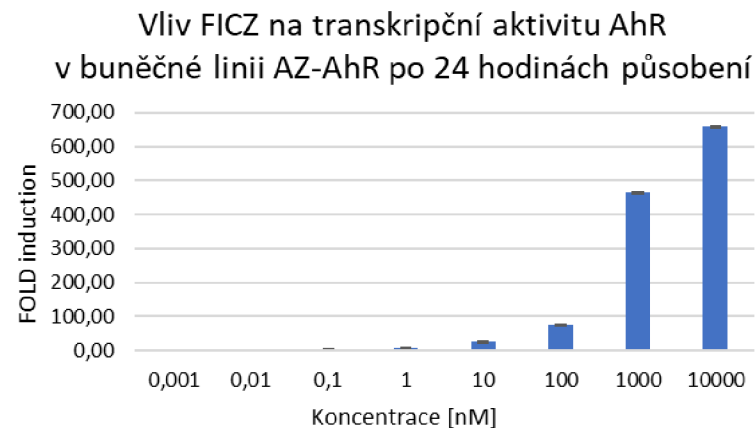
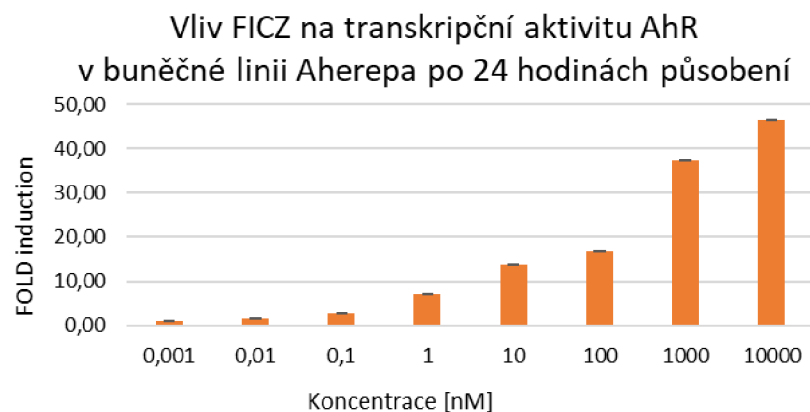
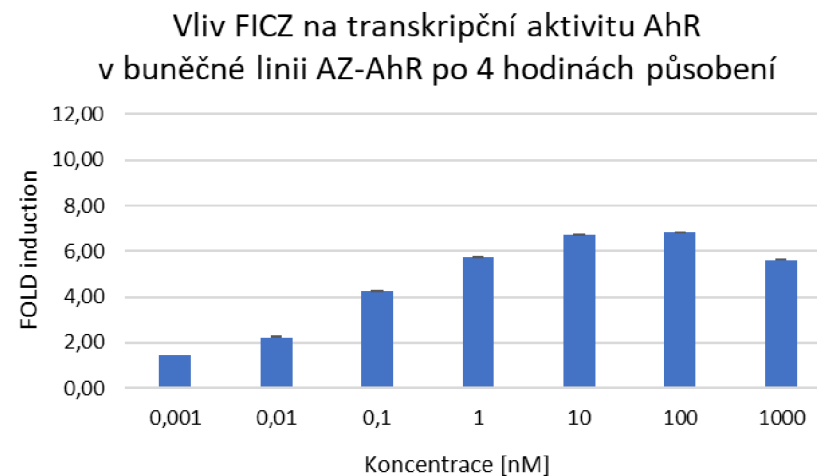
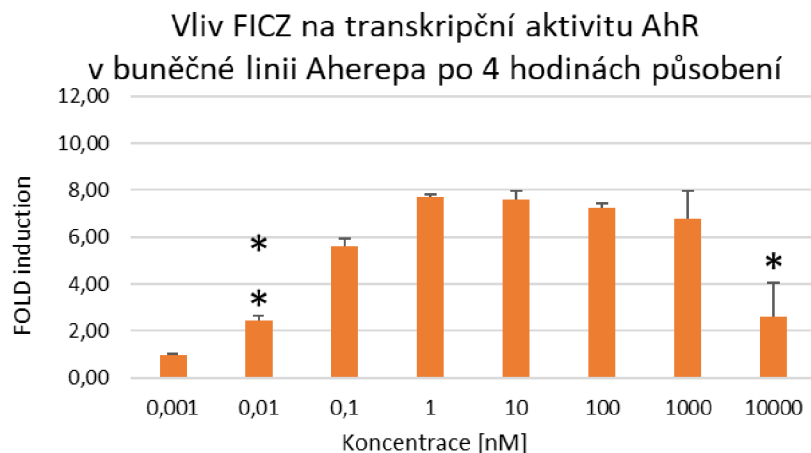
Na základě výše uvedených výsledků bylo usouzeno, že pouze látka I3C v koncentraci 1000 µM má na obě linie cytotoxický účinek, a proto byla vyřazena pro následující experimenty pomocí luciferázové reportérové esaje.

## 5.2 Srovnání vlivu katabolitů tryptofanu na transkripční aktivitu AhR pomocí luciferázové reportérové esaje

Účinek testovaných látek na aktivitu AhR v buněčných liniích AZ-AhR a Aherepa byl určen provedením luciferázové reportérové esaje (Grafy 11–15). Buňky byly s látkami inkubovány po dobu 4 a 24 hodin. Naměřené hodnoty chemiluminiscenčního signálu byly vztaženy k negativní kontrole 0,1 % DMSO, čímž byly převedeny do formy násobků indukce (Fold induction). Cílem tohoto experimentu bylo také vypočítat hodnoty  $EC_{50}$  látek, tedy koncentraci dané látky, která vyvolá právě 50% odpověď receptoru. Hodnoty  $EC_{50}$  byly stanoveny vedoucí práce z průměru několika experimentů v programu GraphPad Prism 9 a jsou uvedeny níže v Tabulce 6. U některých z Grafů 11–15, které představují experiment reprezentativní, jsou dále uvedeny hodnoty  $EC_{50}$  získané z těchto konkrétních experimentů. Účinky testovaných látek mezi sebou byly nakonec vzájemně porovnány, a to jak v rámci jedné linie s rozdílným inkubačním časem, tak mezi liniemi se stejnou dobou působení látek. Porovnání výsledků mezi dvěma druhově odlišnými buněčnými liniemi sloužilo k zjištění potenciačního rozdílu v aktivaci AhR mezi myší linií Aherepa a lidskou AZ-AhR tryptofanovými katabolity.

Aplikace látky FICZ na buněčnou linii Aherepa v koncentraci 1 nM po čtyřech hodinách (Graf 11A) vyvolala nejvyšší nárůst transkripční aktivity receptoru a bylo dosaženo tzv. fáze plateau (oblast křivky, kde obecně již nedochází ke zvýšení odpovědi). S dalším zvyšováním koncentrací již nedocházelo k nárůstu transkripční aktivity AhR, ba naopak k jejímu postupnému poklesu od 1  $\mu$ M koncentrace. U linie AZ-AhR byl pozorován velmi podobný průběh transkripční aktivity receptoru, kdy při koncentraci FICZ okolo 10–100 nM došlo v reprezentativní experimentu k vyvolání nejvyšší odpovědi receptoru (Graf 11B). U následující testované koncentrace látky (1  $\mu$ M) byl opět zjevný nápadný pokles v aktivitě AhR. Průměrné hodnoty  $EC_{50}$  po 4hodinovém působení látkou FICZ se rovnaly  $43 \pm 8.3$  pM a  $0.4 \pm 0.5$  nM v liniích Aherepa a AZ-AhR. Po 24 hodinách inkubace FICZ s buněčnou linií Aherepa nedocházelo zprvu u nižších koncentrací k významnému zvýšení indukce (Graf 11C). Od koncentrace 1 nM však začal signál postupně narůstat, přičemž nejsilnější odpověď receptoru látka vyvolala v koncentraci 10  $\mu$ M. U lidské buněčné linie byl sledován stejný průběh aktivace AhR, avšak je zde viditelný velký skok v aktivitě receptoru mezi koncentracemi 0,1 a 1  $\mu$ M (Graf 11D). Indukce transkripční aktivity lidského receptoru navíc dosáhla hodnot desetkrát vyšších, než tomu bylo u linie Aherepa. Po 24hodinové inkubaci s látkou FICZ byl pozorován výrazný nárůst hodnot násobků indukce, ovšem ani u jedné buněčných linií nebylo dosaženo plateau a průměrné hodnoty  $EC_{50}$  uvedené v tabulce 6 jsou pouze orientační.

Po 4 hodinách inkubace buněčné linie Aherepa s indirubinem dosáhla tato látka nejvyšší indukce v koncentraci 1  $\mu$ M (Graf 12A), kdy bylo dosaženo plateau (koncentrace 5  $\mu$ M není v grafu uvedena, jelikož nebyla testovaná ve všech nezávislých experimentech), podobně tomu tak bylo u buněčné linie AZ-AhR (Graf 12B). Stejný průběh aktivace receptoru v rámci obou testovaných linií byl pozorován i u 24hodinových experimentů. Nejsilnější indukci vyvolal indirubin v nejvyšší testované koncentraci 5000 nM, avšak u buněčné linie AZ-AhR (Graf 12C) byly její hodnoty od koncentrace 100 nM až stokrát vyšší než u linie Aherepa (Graf 12D). Nižší než 100nM koncentrace této látky vyvolaly u obou buněčných linií srovnatelnou funkční odpověď receptoru. Průměrné hodnoty  $EC_{50}$  indirubinu u linie Aherepa činily  $13 \pm 18$  nM po 4 hodinách a  $1.2 \pm 0.39$   $\mu$ M po 24 hodinách inkubace. V případě linie Az-AhR byla průměrná hodnota  $EC_{50}$  po 4 hodinách působení  $0.18 \pm 0.15$  nM a po 24 hodinách  $1.0 \pm 0.54$   $\mu$ M.



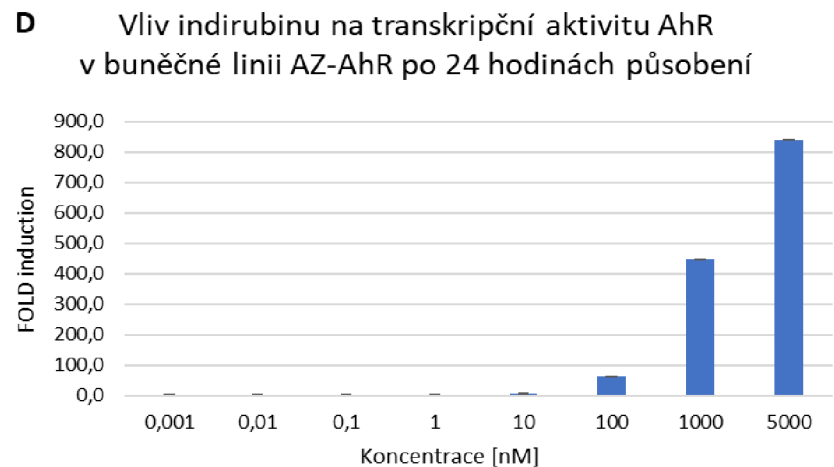
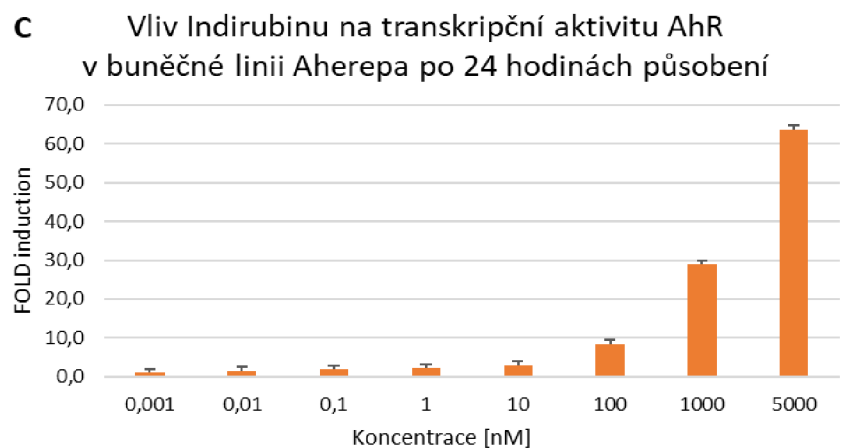
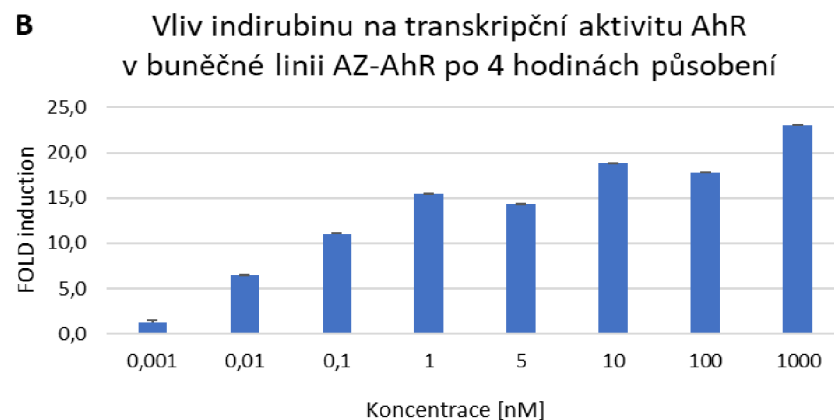
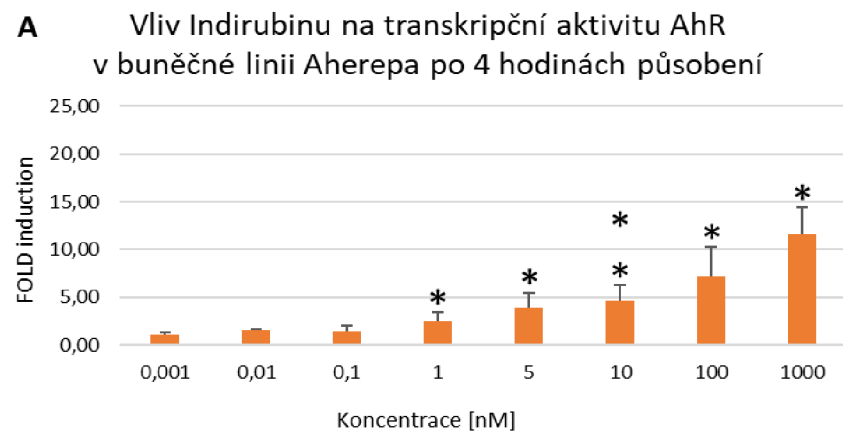
**Graf 11:** Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa (A, C) a AZ-AhR (B, D) po 4 (A, B) a 24 (C, D) hodinách inkubace s testovanou látkou FICZ. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$

(A) Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.  $EC_{50} = 0,04 \pm 0,008$  nM.

(B) Graf byl vybrán jako reprezentativní z 5 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 0,1 nM, průměrná  $EC_{50} = 0,4 \pm 0,5$  nM.

(C) Graf byl vybrán jako reprezentativní ze 7 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 122 nM, průměrná  $EC_{50} = 59 \pm 48$  nM.

(D) Graf byl vybrán jako reprezentativní z 6 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 500 nM, průměrná  $EC_{50} = 220 \pm 240$  nM.



**Graf 12:** Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa (A, C) a AZ-AhR (B, D) po 4 (A, B) a 24 (C, D) hodinách inkubace s testovanou látkou Indirubin. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$

(A) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001 nM. Graf je vyobrazením průměru šesti nezávislých experimentů.  $EC_{50} = 13 \pm 18$  nM

(B) Graf byl vybrán jako reprezentativní z 6 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 0,078 nM, průměrná  $EC_{50} = 0.18 \pm 0.15$  nM.

(C) Graf byl vybrán jako reprezentativní ze 7 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 1,08  $\mu$ M, průměrná  $EC_{50} = 1.2 \pm 0.39$   $\mu$ M.

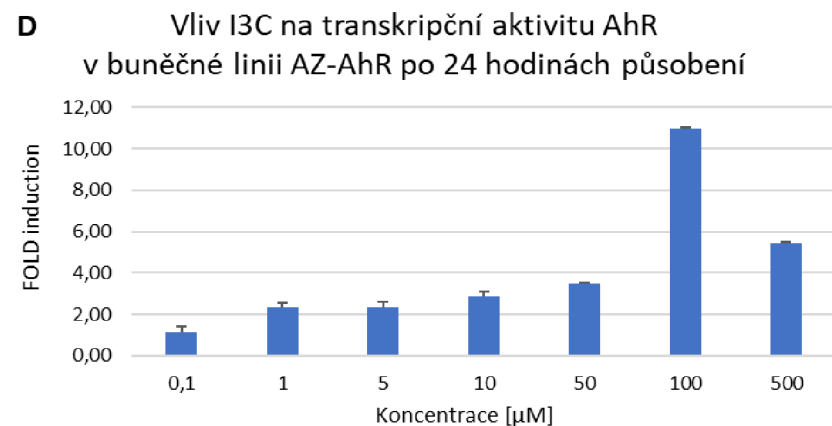
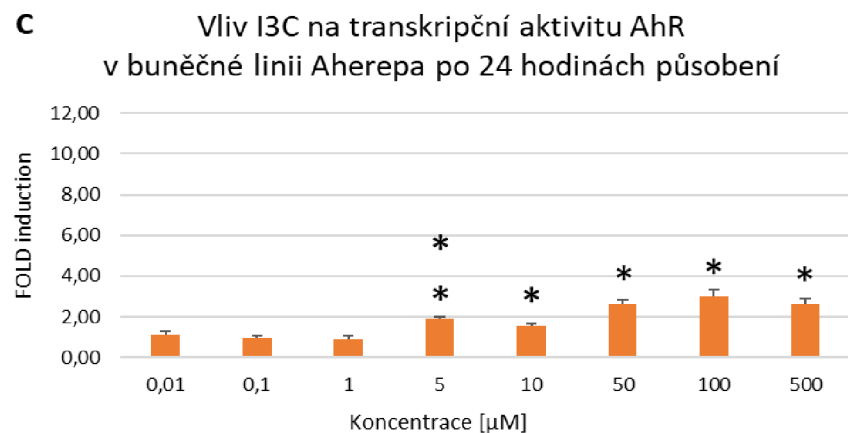
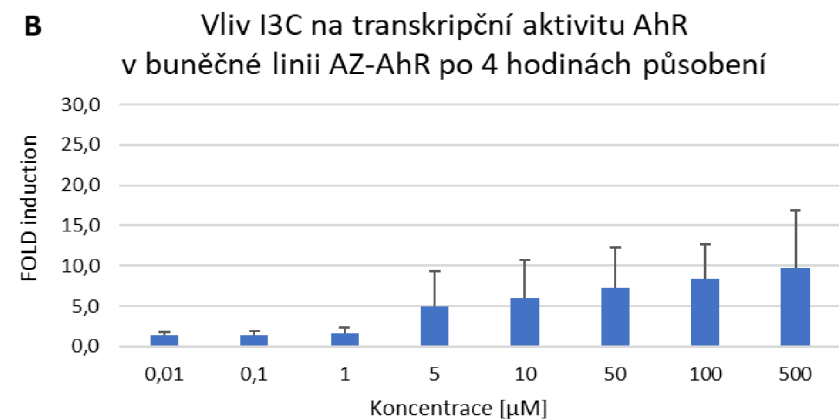
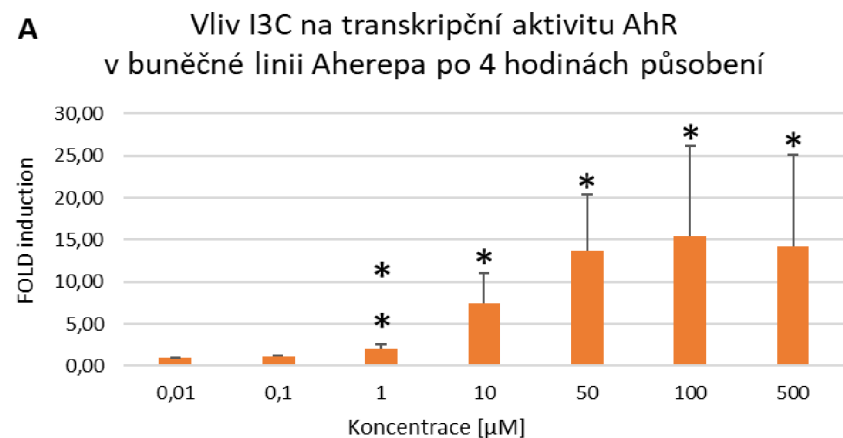
(D) Graf byl vybrán jako reprezentativní z 6 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 0,93  $\mu$ M, průměrná  $EC_{50} = 1.0 \pm 0.54$   $\mu$ M.



Působení látky I3C je prezentováno ve skupině grafů č. 13. Po 4 hodinách působení I3C o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na buněčnou linii Aherepa byl pozorován nárůst transkripční aktivity AhR (Graf 13A), která dosáhla maximální hodnoty při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Podobný trend byl pozorován u buněčné linie AZ-AhR, kdy u 500  $\mu\text{M}$  koncentrace hodnoty násobku indukce v rámci nezávislých experimentů mírně narůstaly (graf 13B je prezentován jako průměr ze čtyř experimentů). Vystavení linie Aherepa látky I3C po dobu 24 hodin nevedlo v žádné z koncentrací k významně vysoké indukci transkripční aktivity AhR (Graf 13C). V případě AZ-AhR se indukce vyvolaná nižšími koncentracemi I3C výrazně nelišila od linie Aherepa, avšak u 100 $\mu\text{M}$  koncentrace došlo v lidské buněčné linii k významnému zesílení odpovědi receptoru. Nejvyšší koncentrace (500  $\mu\text{M}$ ) vyvolala signifikantní pokles indukce, a to na polovinu hodnoty vyvolané předchozí koncentrací testované látky. Během 24 hodin inkubace I3C s buněčnou linií Aherepa nedošlo ke zvýšení aktivity receptoru oproti 4 hodinám inkubace, ba naopak naměřený signál byl u všech testovaných koncentrací o více než polovinu nižší. Průměrné hodnoty  $\text{EC}_{50}$  pro I3C v buněčné linii Aherepa činily  $11 \pm 6.5 \mu\text{M}$  po 4 hodinách působení a  $11 \pm 5.7 \mu\text{M}$  po 24 hodinách. U lidské buněčné linie vyvolala 4hodinová i 24hodinová inkubace s touto látkou přibližně stejnou odezvu receptoru, až na již zmíněný pokles v transkripční aktivitě po 24 hodinách inkubace s její nejvyšší koncentrací. Průměrná hodnota  $\text{EC}_{50}$  u 4hodinového experimentu je  $16 \pm 10 \mu\text{M}$ . U 24hodinového experimentu je  $\text{EC}_{50}$  pouze orientační a činí  $110 \pm 65 \mu\text{M}$ , jelikož se mezi jednotlivými experimenty výrazně lišila.

Aplikace látky IAD vedla k nárůstu transkripční aktivity AhR v obou buněčných liniích a výsledky jsou prezentovány ve skupině grafů č. 14. Účinek této látky v linii Aherepa byl po 4h a 24h velmi podobný (14A,B), kdy maximální odpověď receptoru vyvolala látka v koncentraci 500–1000  $\mu\text{M}$ . Hodnoty násobků indukce u linie AZ-AhR po 4 h působení byly v průměru 2,5x vyšší než tomu bylo v případě myší buněčné linie (Graf 14B) nicméně průběh nárůstu aktivity je velmi podobný, což se odráží také na podobných průměrných hodnotách  $\text{EC}_{50}$  (Tabulka 6). V případě 24 hodin inkubace IAD s testovanými buněčnými liniemi došlo u linie AZ-AhR postupně od koncentrace 100  $\mu\text{M}$  k vyvolání mnohonásobně silnější odpovědi receptoru oproti linii Aherepa (Graf 14D a 14C). Během 24 hodin působení došlo u linie Aherepa k výraznému nárůstu indukce působením IAD o koncentraci 500 a 1000  $\mu\text{M}$ . Průměrné hodnoty  $\text{EC}_{50}$  po 24h inkubaci s IAD se mezi buněčnými liniemi příliš neliší a jsou pouze orientační, jelikož nebylo dosaženo plateau (Tabulka 6).

3MI vyvolal po 4 a 24 hodinách působení na buněčnou linii Aherepa maximální odpověď receptoru v koncentraci 200  $\mu\text{M}$  (Graf 15A, C). Podobný trend byl pozorován u buněčné linie AZ-AhR (Graf 15B, D), čemuž nasvědčují i podobné průměrné hodnoty  $\text{EC}_{50}$ . Ty byly po 4 hodinách inkubace  $17 \pm 2.2 \mu\text{M}$  (Aherepa) a  $5.8 \pm 7.4 \mu\text{M}$  (AZ-AhR) a po 24 hodinách činily  $3.1 \pm 4.2 \mu\text{M}$  (Aherepa) a  $60 \pm 34 \mu\text{M}$  (AZ-AhR).



**Graf 13:** Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa (A, C) a AZ-AhR (B, D) po 4 (A, B) a 24 (C, D) hodinách inkubace s testovanou látkou I3C. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu.

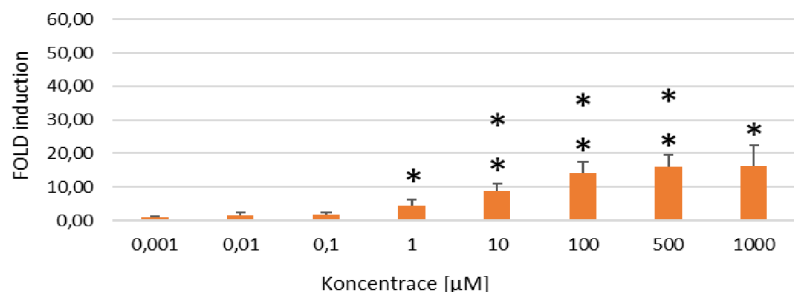
(A) Graf je vyobrazením průměru čtyř nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,01$ .  $EC_{50} = 11 \pm 3,5 \mu\text{M}$ .

(B) Graf je vyobrazením průměru čtyř nezávislých experimentů.  $EC_{50} = 16 \pm 10 \mu\text{M}$ .

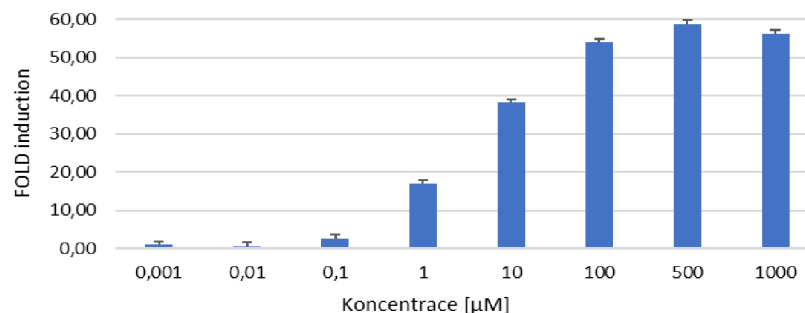
(C) Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,001$  a \*\* $p < 0,0001$ .  $EC_{50} = 11 \pm 5,7 \mu\text{M}$ .

(D) Graf byl vybrán jako reprezentativní z 5 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu =  $95 \mu\text{M}$ , průměrná  $EC_{50} = 110 \pm 65 \mu\text{M}$ .

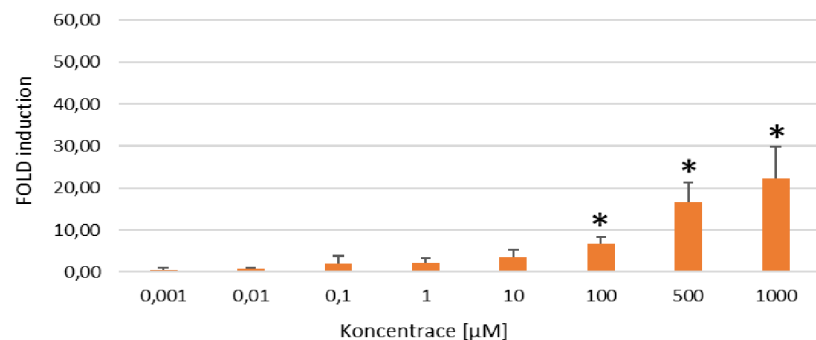
**A** Vliv IAD na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii Aherepa po 4 hodinách působení



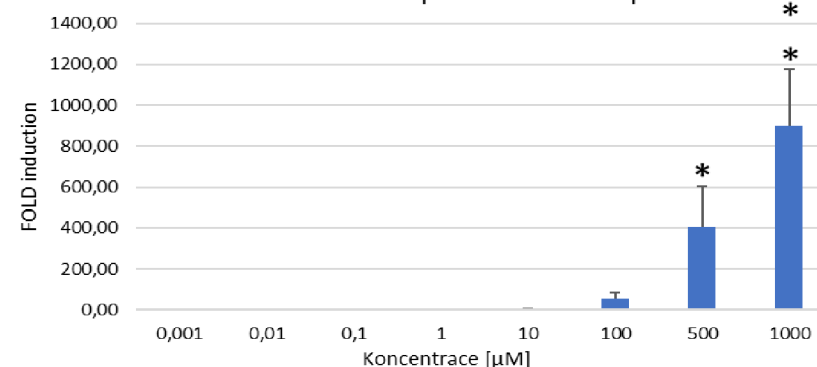
**B** Vliv IAD na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR po 4 hodinách působení



**C** Vliv IAD na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii Aherepa po 24 hodinách působení



**D** Vliv IAD na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 hodinách působení



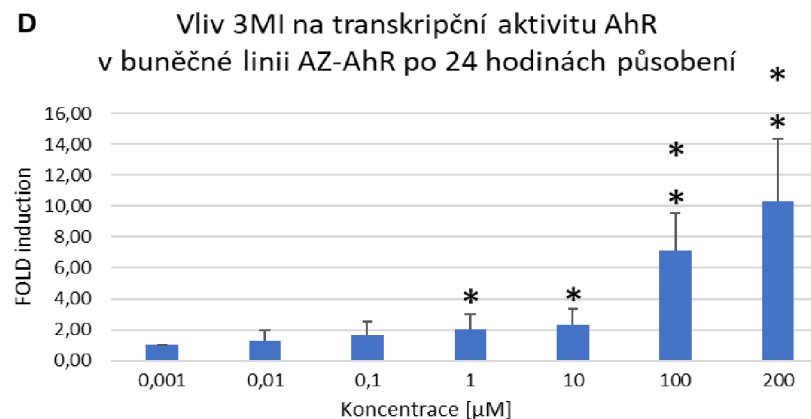
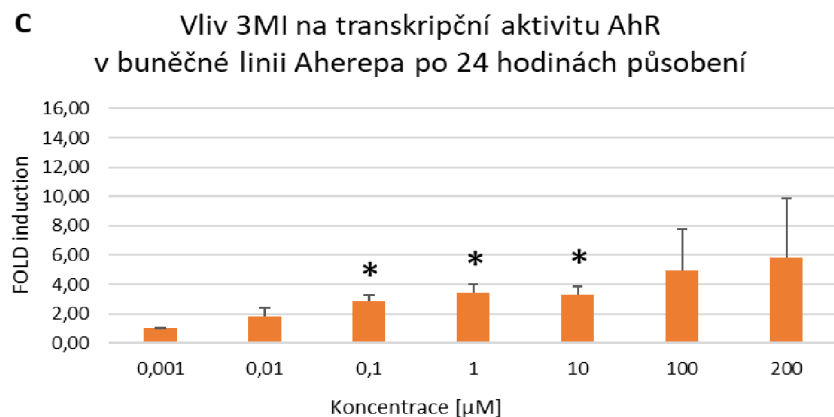
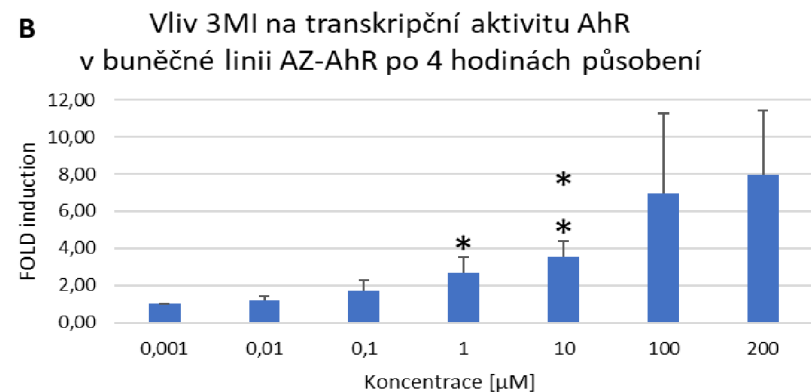
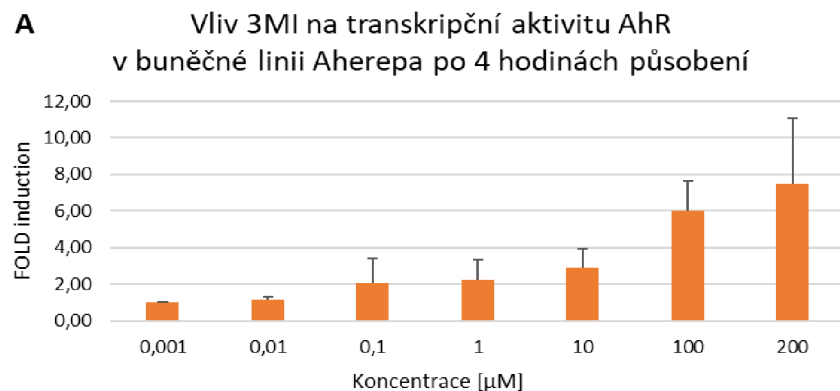
**Graf 14:** Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa (A, C) a AZ-AhR (B, D) po 4 (A, B) a 24 (C, D) hodinách inkubace s testovanou látkou IAD. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu.

(A) Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,01$ .  $EC_{50} = 9,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$ .

(B) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001  $\mu\text{M}$ . Graf byl vybrán jako reprezentativní z 6 nezávislých experimentů.  $EC_{50}$  reprezentativního experimentu = 4,13  $\mu\text{M}$ , průměrná  $EC_{50} = 2,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ .

(C) Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .  $EC_{50} = 210 \pm 43 \mu\text{M}$ .

(D) Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .  $EC_{50} = 477 \pm 79 \mu\text{M}$ .



**Graf 15:** Transkripční aktivita AhR v buněčných liniích Aherepa (A, C) a AZ-AhR (B, D) po 4 (A, B) a 24 (C, D) hodinách inkubace s testovanou látkou 3MI. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu.

(A) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001 nM. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů.  $EC_{50} = 17 \pm 2.2 \mu M$

(B) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001 nM. Graf je vyobrazením průměru pěti nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$  a \*\* $p < 0,001$ .  $EC_{50} = 5.8 \pm 7.4 \mu M$ .

(C) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001 nM. Graf je vyobrazením průměru tří nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,01$ .  $EC_{50} = 3.1 \pm 4.2 \mu M$ .

(D) Hodnoty fold induction byly vztaženy ke koncentraci 0,001 nM. Graf je vyobrazením průměru šesti nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny symbolem \*, kde \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,001$ .  $EC_{50} = 60 \pm 34 \mu M$ .

**Tabulka 6:** Souhrnný přehled hodnot EC<sub>50</sub> testovaných látek po 4 a 24 hodinách působení

Testovaná látka	Doba Inkubace	EC <sub>50</sub>	
		Aherepa	AZ-AhR
FICZ	4 h	43 ± 8.3 pM	0.4 ± 0.5 nM
	24 h	59 ± 48 nM	220 ± 240 nM
Indirubin	4 h	13 ± 18 nM	0.18 ± 0.15 nM
	24 h	1.2 ± 0.39 μM	1.0 ± 0.54 μM
I3C	4 h	11 ± 6.5 μM	16 ± 10 μM
	24 h	11 ± 5.7 μM	110 ± 65 μM
IAD	4 h	9.6 ± 3.4 μM	2.6 ± 1.4 μM
	24 h	210 ± 43 μM	477 ± 79 μM
3MI	4 h	17 ± 2.2 μM	5.8 ± 7.4 μM
	24 h	3.1 ± 4.2 μM	60 ± 34 μM

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr několika nezávislých experimentů ± směrodatná odchylka.

## 6 DISKUZE

Zjištění, že některé z katabolitů tryptofanu jsou schopny modulace činnosti aryl uhlovodíkového receptoru hraje významnou roli v mnoha fyziologických procesech (Adachi *et al.*, 2001, Michaudel *et al.*, 2023). Jedním z nich je udržení zdraví střev, jelikož část metabolismu tryptofanu mají na starost právě bakterie tvořící náš střevního mikrobiom (Schiering *et al.*, 2017, Sivaprakasam *et al.*, 2017, Lamas *et al.*, 2016, Lamas *et al.*, 2018, Metidji *et al.*, 2018, Vyhlidalova *et al.*, 2020). Některé z těchto látek by se tak daly po podrobnějším prozkoumání využít jako potencionální léčiva pro terapii různých chronických zánětlivých a nádorových onemocnění (Peng *et al.*, 2021, Rogan, 2006, Reed *et al.*, 2005). Již dříve bylo zjištěno, že při provádění laboratorních experimentů je důležité dbát na druhové rozdíly v působení testovaných látek (Dere *et al.*, 2011, Flaveny et Perdew, 2009, Faber *et al.*, 2018). Ty by v některých případech mohly vést k potencionálním nesrovnalostem ve výsledcích testování identických sloučenin. Z tryptofanových katabolitů jsou tyto odlišnosti v aktivaci AhR charakteristické především pro některé indoly a indigoidy (Hubbard *et al.*, 2015, Faber *et al.*, 2018). Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit data o druhových rozdílech týkajících se aktivace AhR vybranými katabolity tryptofanu v myši hepatomové linii Aherepa a lidské AZ-AhR. Před začátkem experimentu byl proveden test cytotoxicity látek a následně byla ke sledování transkripční aktivity receptoru použita metoda reporter gene assay.

Po provedení MTT testu nebyl u buněčných linií Aherepa a AZ-AhR inkubovaných s látkami FICZ, Indirubin a IAD pozorován prudký pokles životnosti buněk v kterékoliv z testovaných koncentrací značící její cytotoxicitu. FICZ má však zajímavý vliv na viabilitu buněk. Bylo zjištěno, že v liniích HepG2 a Hepa1 působí hormeticky, což znamená, že v nižších koncentracích (nejčastěji 0,01 nM) stimuluje jejich růst, zatímco ve vysokých koncentracích má postupný cytotoxický účinek (Mohammadi-Bardbori *et al.*, 2017). V buněčné linii Aherepa došlo po 24hodinovém působení 1000 $\mu$ M koncentrace I3C ke snížení životnosti buněk pod 20 %. V případě buněčné linie AZ-AhR však klesla viabilita již u 500 $\mu$ M koncentrace této látky, a to lehce pod 50 % a u koncentrace 1000  $\mu$ M byla opět nižší než 20%. Velmi podobný, mírně cytotoxický efekt 500 $\mu$ M I3C na lidskou buněčnou linii pozorovali i Arellano-Gutiérrez *et al.* (2022), kteří ve své studii uvádí u této koncentrace hodnotu viability 50 %. Po vystavení buněk 1000 $\mu$ M koncentraci I3C ale již žádný další pokles životnosti nezaznamenali. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben tím, že byl experiment prováděn na buněčné linii HeLa, která je odvozená od karcinomu děložního hrdla, a ne od karcinomu hepatocelulárního. Po aplikaci 100 a 200  $\mu$ M 3MI byl v obou liniích pozorován pokles viability buněk. U linie Aherepa klesla životnost buněk přibližně o 30 % a v linii AZ-AhR byla viabilita buněk po působení těchto koncentrací  $55,8 \pm 5,1$  % (AZ-AhR). Oproti tomu v práci zabývající se účinkem methylovaných a methoxylovaných forem indolů působil 3MI na linii AZ-AhR zcela netoxicky (Stepankova *et al.*, 2018).

Nejvyšší transkripční aktivita receptoru byla po 4 hodinách působení FICZ na linii Aherepa zaznamenána u koncentrace 1 nM. Vyšší koncentrace látky již nevedly k nárůstu indukce, ba naopak začala aktivita receptoru v těchto koncentracích postupně klesat. Po 24hodinové inkubaci pak vyvolala maximální odpověď nejvyšší testovaná koncentrace látky (10000 nM). Velmi podobné výsledky jsou uvedeny ve studii Vrzal *et al.* (2023), kde po dosažení 100% aktivity AhR vlivem 4hodinového působení 1nM koncentrace FICZ už dále nebyl pozorován nárůst transkripční aktivity. Po 24 hodinách byla transkripční aktivita v nižších koncentracích FICZ minimální. Od koncentrace 10 nM začala hodnota indukce narůstat, až dosáhla při 1000nM koncentraci maxima. Stanovené hodnoty EC<sub>50</sub> byly 22.4 ± 1.2 nM po 24 hodinách inkubace a 21.8 ± 1.2 pM po 4 hodinách, což se podobá výsledku v této práci 59 ± 48 nM a 43 ± 8,3 pM. V linii AZ-AhR měla koncentračně závislá transkripční aktivita stejný průběh jako u linie Aherepa, avšak po 24 hodinách inkubace došlo ve srovnání s myší buněčnou linií k vyvolání více než stokrát silnější odpovědi receptoru. V práci Ondrova *et al.* (2023) byl také sledován vliv FICZ na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR. Vystavení buněk 24hodinovému vlivu vyšších koncentrací této látky rovněž vyvolalo na rozdíl od kratší doby působení mnohonásobně vyšší transkripční aktivitu receptoru. V rámci experimentů byly stanoveny EC<sub>50</sub> 0.8 ± 0.8 nM po 4 hodinách inkubace s testovanou látkou a 1.7 ± 0.4 μM po 24 hodinách. Hodnotu stanovenou v této práci po 4 hodinách působení 0.4 ± 0.5 nM tak lze brát vzhledem k směrodatné odchylce jako relevantní. U 24hodinového experimentu se již hodnota EC<sub>50</sub> od výše zmíněné publikace odchyluje, jelikož činí 220 ± 240 nM.

Na rozdílnou míru aktivace AhR indirubinem v myší hepatomové linii H1L6.1c3 a lidské HG2L6.1c1 již poukázali ve své výzkumné práci Faber *et al.* (2018). Na základě dat z výzkumu bylo zjištěno, že indirubin je schopný po 4 hodinách působení aktivovat v koncentraci 1 nM lidský receptor dokonce více než modelový agonista TCDD, což je jev, který v myší buněčné linii pozorován nebyl. Nejvyšší účinnost 1nM indirubinu vůči koncentraci TCDD vyvolávající maximální indukci tak měla u lidského AhR hodnotu přibližně 120 %, avšak ve vyšších koncentracích (10 nM) byl indirubin stejně účinným agonistou, jako TCDD. U myšího AhR byly naopak hodnoty účinnosti obou ligandů srovnatelné a pohybovaly se kolem 100 %. Také určené EC<sub>50</sub> byly v rámci buněčných linií velmi rozdílné, a to 0.04 ± 0.02 nM u lidského receptoru a 15.60 ± 3.52 nM u myšího. Ve studii byly také identifikovány aminokyselinové zbytky v ligand vazebné doméně receptoru, konkrétně tyrosin v pozici 326, threonin 349 a valin 375, které tuto zvýšenou afinitu látky k lidskému AhR způsobují. Stejný fenomén byl pozorován i v této bakalářské práci. Při testování vlivu indirubinu byla zřetelná časově, koncentračně i druhově závislá transkripční aktivace AhR. Ve všech experimentech vyvolala testovaná látka nejsilnější aktivitu receptoru v koncentraci 1 μM. Po přepočítání hodnot získaných z experimentů na procenta účinnosti vůči 20nM TCDD byl také mezi oběma liniemi viditelný rozdíl v těchto hodnotách. V linii AZ-AhR byla nejvyšší transkripční aktivita zaznamenána při 1μM koncentraci indirubinu, jehož účinnost činila 90 %, kdežto u linie Aherepa ani nebyla procenta účinnosti této

koncentrace srovnatelná s 20nM TCDD a dosáhla pouze hodnoty 60 %. Zvýšenou citlivost lidského AhR k indirubinu naznačují i hodnoty  $EC_{50}$  stanovené v rámci 4hodinového experimentu, které jsou  $0.18 \pm 0.15$  nM u linie AZ-AhR a  $13 \pm 18$  nM u linie Aherepa. Hodnoty nejsou zcela identické s  $EC_{50}$  určenými v publikaci Faber *et al.*, jelikož experimenty byly provedeny na jiných buněčných liniích. Po 24 hodinách působení jsou potom  $EC_{50}$  indirubinu srovnatelné ( $1.0 \pm 0.54$   $\mu$ M pro lidský AhR a  $1.2 \pm 0.39$   $\mu$ M pro myši), avšak hodnota účinnosti jeho 5 $\mu$ M koncentrace je stále vyšší pro receptor lidský (100 %) než pro myši (70 %).

I3C je ve studiích charakterizován jako slabý aktivátor AhR (Arellano-Gutiérrez *et al.*, 2022). Agonisty tohoto receptoru jsou až produkty jeho metabolické konverze vyvolané nízkým pH v žaludku (Bjeldanes *et al.*, 1991). Proto samotný I3C nevedl bez další metabolické konverze k vyvolání vysoké indukce transkripční aktivity AhR v testovaných buněčných liniích. Během 4 hodin působení došlo s ohledem na odchylky mezi experimenty v obou buněčných liniích k vyvolání srovnatelné transkripční aktivity receptoru. Po 24 hodinách tato transkripční aktivita především v myši linii Aherepa prudce klesla na hodnoty blízké negativní kontrole. Snížení indukce CYP1A1 na hodnotu téměř rovnou negativní kontrole zaznamenali metodou qPCR po 24 hodinách působení I3C u myších buněk izolovaných z tenkého střeva i Kahalehili *et al.* (2021). Ti předpokládají, že katabolity I3C aktivující AhR byly u myši rychle metabolizovány, čímž navodily zpětnovazebnou regulaci receptoru. Toto snížení transkripční aktivity vlivem I3C bylo pozorováno po 24 hodinách i u linie AZ-AhR, avšak ne v takové míře jako u linie Aherepa. Výrazný pokles indukce v lidské buněčné linii způsobený 500 $\mu$ M koncentrací látky souvisí s jejím mírně cytotoxickým vlivem potvrzeným dříve provedeným MTT testem. Jelikož byl tento test vyhodnocován po 24 hodinách, je pravděpodobné, že čtyřhodinová expozice lidské buněčné linie I3C v této koncentraci ještě není cytotoxická, což dokazuje absenci poklesu v aktivitě AhR během 4 hodin inkubace.

Po 4 hodinách působení 1000 $\mu$ M koncentrace IAD došlo k vyvolání nejsilnější odpovědi AhR jak u buněčné linie Aherepa, tak u linie AZ-AhR. U obou linií byl pozorován podobný trend v transkripční aktivitě receptoru, avšak u linie AZ-AhR byly naměřeny vyšší hodnoty fold indukce. Hodnoty  $EC_{50}$  však byly u obou linií podobné, a to  $9.6 \pm 3.4$   $\mu$ M (Aherepa) a  $2.6 \pm 1.4$   $\mu$ M (AZ-AhR). Zkoumáním 4hodinového vlivu této látky na AhR v lidské buněčné linii se zabývali i Vrzalova *et al.* (2022). Ti pozorovali maximální indukci vyvolanou IAD přibližně v koncentraci 100  $\mu$ M.  $EC_{50}$  byla stanovena na  $4.5 \pm 1.7$   $\mu$ M, což je podobný výsledek jako v této práci. Při 24hodinovém působení IAD indukovala nejvyšší míru transkripční aktivity receptoru v obou buněčných liniích koncentrace 1000  $\mu$ M. V případě linie AZ-AhR tomu bylo stejně i ve studii Vyhliďalova *et al.* (2020), kde tato koncentrace vyvolala přibližně 200x větší indukci než negativní kontrola. Hodnota  $EC_{50}$  stanovená v rámci jejich experimentu byla  $99.95 \pm 2.86$   $\mu$ M, což se liší od hodnoty  $EC_{50}$   $477 \pm 79$   $\mu$ M naměřené v této práci. Nicméně je třeba dodat, že ani v jednom ve srovnávaných experimentů nebylo dosaženo



plateau a hodnoty  $EC_{50}$  jsou pouze orientační. Vyhliďalova *et al.* dále provedením ligand binding assay za použití buněčné linie Hepa 1c1c7 zjistili, že IAD se s nízkou afinitou váže i na myší AhR.

Látka 3-MI vyvolala po 24 i 4 hodinách působení nejvyšší indukci v koncentraci 200  $\mu\text{M}$ . Stejný průběh transkripční aktivity AhR vyvolané 3-MI s podobnými hodnotami indukce pozorovali po 4 a 24 hodinách působení u lidské buněčné linie i Ondrová *et al.* (2023).  $EC_{50}$  látky stanovené v již dříve provedených studiích činily  $3.7 \pm 2 \mu\text{M}$  po 4 hodinách působení (Ondrová *et al.* 2023) a  $103.17 \pm 1.78 \mu\text{M}$  po 24 hodinách (Vyhliďalova *et al.*, 2020), zatímco v rámci této práce byly provedením stejných experimentů stanoveny hodnoty  $5.8 \pm 7.4 \mu\text{M}$  a  $60 \pm 34 \mu\text{M}$ . Hodnota  $EC_{50}$  určená po 4hodinovém vlivu 3MI je vzhledem k odchylce velmi podobná jako ve výše zmíněné publikaci. Výraznější odchylka je viditelná v hodnotě  $EC_{50}$  stanovené během 24 hodin působení. Jelikož po takové době inkubace nebylo u látky 3MI dosaženo fáze plateau, stanovené hodnoty  $EC_{50}$  jsou pouze orientační. Výsledky experimentu na linii Ahrepa se lišily od linie AZ-AhR nižšími hodnotami násobků indukce. Ta byla výraznější po 24 hodinách působení 3-MI, kdy koncentrace 100 a 200  $\mu\text{M}$  navodily poloviční hodnotu indukce vyvolané v linii AZ-AhR. Srovnávací analýzu vlivu 3MI prováděli také Hubbard *et al.* (2015) na AhR v myší buněčné linii Hepa1 a lidské HepG2. Na základě výsledků usoudili, že 3MI je druhově specifickým agonistou AhR aktivujícím lidský receptor, ale jen omezeně indukujícím transkripční aktivitu receptoru myšího. Tento fenomén preference vazby lidského AhR byl zpozorován jako charakteristický pro více derivátů indolu, jako je již zmíněný indirubin, vykazujících vysokou podobnost v chemické struktuře molekul (Flaveny *et al.*, 2009). Nicméně výše zjištěné poznatky jsou v rozporu s daty získanými z experimentů v této bakalářské práci. Po vztažení hodnot indukce k 20nM TCDD byla spočítána účinnost 200 $\mu\text{M}$  3MI u myšího AhR 143 %, zatímco u lidského pouze 83 %. Hubbard *et al.* ale uvádí své výsledky v hodnotách RLU (relative light units) s jiným expresním vektorem a 3MI bylo testováno pouze v rozsahu koncentrací 1–10  $\mu\text{M}$ , tudíž by bylo třeba výsledky ověřit dalšími experimenty.

## 7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla srovnána transkripční aktivita AhR ve stabilně transfekované myší buněčné linii Aherepa a lidské AZ-AhR vyvolaná katabolity tryptofanu FICZ, indirubinem, I3C, IAD a 3MI. Pomocí MTT testu byla pouze nejvyšší koncentrace látky I3C stanovena jako cytotoxická pro obě buněčné linie, a byla tedy vyřazena z koncentrací sloužících pro sledování transkripční aktivity AhR pomocí luciferázové reportérové eseje. Z výsledků experimentů týkajících se transkripční aktivity AhR bylo zjištěno, že FICZ, indirubin, IAD a 3MI vyvolaly po 24 hodinách působení v obou buněčných liniích vyšší hodnoty násobků indukce než po 4. Pouze v případě I3C se vzhledem k odchylkám zdá být jeho účinnost na myší a lidský receptor v obou časech inkubace stejná. Nejdůležitějším zjištěním však je, že u většiny indolových derivátů byla pozorována také druhově závislá aktivace AhR, patrná především z rozdílných hodnot  $EC_{50}$  po 4 hodinách jejich působení. Nejvýrazněji se takto projevilily látky FICZ a indirubin, zatímco u ostatních byly rozdíly v potenci látek mezi studovanými liniemi méně nápadné, nebo dokonce vůbec žádné, jak tomu bylo u látky I3C.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aarts, J.M.M.J.G.; Alink, G.M.; Franssen, H.J.; Roebroeks, W. Evolution of Hominin Detoxification: Neanderthal and Modern Human Ah Receptor Respond Similarly to TCDD. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 1292–1305.

Abel, J. & Haarmann-Stemann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* **391**(11), 1235-1248.

Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., III, Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem*, **276**, 31475–31478.

Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell host & microbe*, **23**(6), 716-724.

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, *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1754–1760.

Arellano-Gutiérrez, C. V., Quintas-Granados, L. I., Cortés, H., González del Carmen, M., Leyva-Gómez, G., Bustamante-Montes, L. P., Rodríguez-Morales, M., López-Reyes, I., Padilla-Mendoza, J. R., Rodríguez-Páez L., Figueroa-González, G. & Reyes-Hernández, O. D. (2022). Indole-3-Carbinol, a phytochemical aryl hydrocarbon receptor-ligand, induces the mRNA overexpression of UBE2L3 and cell proliferation arrest. *Current Issues in Molecular Biology*, **44**(5), 2054-2068.

Barnes-Ellerbe, S., Knudsen, K. E., & Puga, A. (2004). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Molecular pharmacology*, **66**(3), 502-511.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., & Nüsse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, **382**(6588), 225–230.

Bjeldanes, L. F., Kim, J. Y., Grose, K. R., Bartholomew, J. C., & Bradfield, C. A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proceedings of the national academy of sciences*, **88**(21), 9543-9547.

- Bock, K.W. and Köhle, C. (2006). Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 393–404.
- Bureau, C., Hanoun, N., Torrisani, J., Vinel, J. P., Buscail, L., & Cordelier, P. (2009). Expression and function of Kruppel like-factors (KLF) in carcinogenesis. *Current genomics*, **10**(5), 353-360.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480.
- Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J.A., and Whitelaw, M.L. (1995). Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 25291–25300.
- de Souza, H. S., & Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, **13**(1), 13–27.
- 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**(1), 309-334.
- Denison, M. S., Seidel, S. D., Rogers, W. J., Ziccardi, M., Winter, G. M., & Heath-Pagliuso, S. (1998). Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. *Molecular Biology Approaches to Toxicology*, 393-410.
- Dere, E., Lee, A. W., Burgoon, L. D., & Zacharewski, T. R. (2011). Differences in TCDD-elicited gene expression profiles in human HepG2, mouse Hepalclc7 and rat H4IIE hepatoma cells. *BMC genomics*, **12**, 1-14.
- Ema, M., Matsushita, N., Sogawa, K., Ariyama, T., Inazawa, J., Nemoto, T., Ota, M., Oshimura, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1994). Human arylhydrocarbon receptor: functional expression and chromosomal assignment to 7p21. *J. Biochem*, **116**, 845–851.
- Enan, E. and Matsumura, F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1599–1612.
- Faber, S. C., Soshilov, A. A., Giani Tagliabue, S., Bonati, L., & Denison, M. S. (2018). Comparative in vitro and in silico analysis of the selectivity of indirubin as a human Ah receptor agonist. *International journal of molecular sciences*, **19**(9), 2692.
- Flaveny C. A., Murray I. A., Chiaro C. R., and Perdew G. H. (2009). Ligand selectivity and gene regulation by the human aryl hydrocarbon receptor in transgenic mice. *Mol Pharmacol* **75**:1412–1420.

Flaveny C. A., Perdew G. H. (2009). Transgenic humanized AhR mouse reveals differences between human and mouse AhR ligand selectivity. *Mol. Cell. Pharmacol.* **1**:119–123.

Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, **9**(10), 577–589.

Fu, Jiajun & Li, Su-Ning & Cao, Lin-Hua & Wang, Ying & Li, Yan & Lu, Lu-De. (2009). L-Tryptophan as green corrosion inhibitor for low carbon steel in hydrochloric acid solution. *Journal of Materials Science*, **45**, 979-986.

Fukuda, I., Nishiumi, S., Mukai, R., Yoshida, K. I., & Ashida, H. (2015). Catechins in tea suppress the activity of cytochrome P450 1A1 through the aryl hydrocarbon receptor activation pathway in rat livers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **66**(3), 300-307. Fukuda, I. S. Nishiumi, R. Mukai, K.i. Yoshida, H. (2015). Ashida, Catechins in tea suppress the activity of cytochrome P450 1A1 through the aryl hydrocarbon receptor activation pathway in rat livers, *Int. J. Food Sciences and Nutrition*, **66**, 300–307.

Gerbal-Chaloin, S., Pichard-Garcia, L., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., Poellinger, L., Maurel, P., & Daujat-Chavanieu, M. (2006). Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide. *Cellular signalling*, **18**(5), 740-750.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., ... Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, **15**(3), 382–392.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., Heyman, M., Markowitz, J., Baldassano, R., Griffiths, A., Sylvester, F., Mack, D., Kim, S., Crandall, W., Hyams, J., Huttenhower, C., Knight, R. & Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, **15**(3), 382–392.

Granados, J. C., Falah, K., Koo, I., Morgan, E. W., Perdew, G. H., Patterson, A. D., Jamshidi, N., & Nigam, S. K. (2022). AHR is a master regulator of diverse pathways in endogenous metabolism. *Scientific reports* **12**(1), 16625.

Grishanova, A. Y., Klyushova, L. S., & Perepechaeva, M. L. (2023). AhR and Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathways and their interplay. *Current Issues in Molecular Biology*, **45**(5), 3848-3876.

- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519–561.
- Hahn, M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 131–160.
- Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, YZ, Pray-Grant, M., Perdew, G. H., and Bradfield, C. A. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helixPAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, **272**, 8581–8593
- Hu, J., Ding, Y., Liu, W., Liu, S. (2023) When AHR signaling pathways meet viral infections. *Cell Commun Signal* **21**, 42.
- Huang, G. M. & Elferink, C. J. (2012). A Novel Nonconsensus Xenobiotic Response Element Capable of Mediating Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Gene Expression. *Molecular Pharmacology* **81**(3), 338-347.
- Huang, G., & Elferink, C. J. (2005). Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest. *Molecular pharmacology*, **67**(1), 88-96.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., Patterson A. D., & Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific reports*, **5**(1), 12689.
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., & Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA. *Nature*, **391**(6665), 410-413.
- Chen, Y., & Guillemin, G. J. (2009). Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *International Journal of Tryptophan Research*, **2**(1), 1-19.
- Chesire, D. R., Dunn, T. A., Ewing, C. M., Luo, J., and Isaacs, W. B. (2004). Identification of aryl hydrocarbon receptor as a putative Wnt/beta-catenin pathway target gene in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 2523–25–33.
- Chiaro, C. R., Patel, R. D., Marcus, C. B., & Perdew, G. H. (2007). Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway. *Molecular pharmacology*, **72**(5), 1369-1379.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Winton, D. J. (2004). Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of

$\beta$ -catenin. *Gastroenterology*, **126**(5), 1236-1246.

J.R. Petruilis & G.H. Perdew (2002), The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem.Biol.Interact* **141**, 25–40.

Jackson, D. P., Li, H., Mitchell, K. A., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2014). Ah receptor-mediated suppression of liver regeneration through NC-XRE-driven p21Cip1 expression. *Molecular pharmacology*, **85**(4), 533-541.

Jaiswal, A.K. (1991). Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry* **30**, 10647–10653.

Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., & Costantini, F. (2002). Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, **22**(4), 1172-1183.

Kahalehili, H. M., Newman, N. K., Pennington, J. M., Kolluri, S. K., Kerkvliet, N. I., Shulzhenko, N., Morgun, A. & Ehrlich, A. K. (2021). Dietary indole-3-carbinol activates AhR in the gut, alters Th17-microbe interactions, and exacerbates insulinitis in NOD mice. *Frontiers in Immunology*, **11**, 606441.

Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. (2000). The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*. **275**, 41317–24.

Kerkvliet, N. I., Baecher-Steppan, L., Shepherd, D. M., Oughton, J. A., Vorderstrasse, B. A., & DeKrey, G. K. (1996). Inhibition of TC-1 cytokine production, effector cytotoxic T lymphocyte development and alloantibody production by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of immunology*, **157**(6), 2310-2319.

Kunsch, C., Ruben, S. M., & Rosen, C. A. (1992). Selection of optimal  $\kappa$ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- $\kappa$ B with DNA is required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*.

Lahoti, T. S., John, K., Hughes, J. M., Kusunadi, A., Murray, I. A., Krishnegowda, G., Amin, S. & Perdew, G. H. (2013). Aryl hydrocarbon receptor antagonism mitigates cytokine-mediated inflammatory signalling in primary human fibroblast-like synoviocytes. *Annals of the rheumatic diseases*, **72**(10), 1708-1716.

Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H. P., Michel, M. L., Da Costa, G., Bridonneau C., Jegou, S., Hoffmann, T. W., Natividad, J. M., Brot, L., Taleb, S., Couturier-Maillard, A., Nion-Larmurier, I., Merabtene, F., Seksik, P., Bourrier, A., Cosnes, J., Ryffel, B., Beaugerie, L., Launay, J. M., Langella,

- P., Xavier, R. J. & Sokol, H. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature medicine*, **22**(6), 598-605.
- Le Beau, M.M., Carver, L.A., Espinosa, R. III, Schmidt, J.V., and Bradfield, C.A. (1994). Chromosomal localization of the human AHR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21<sup>TM</sup>p15. *Cytogenet. Cell Genet.* **66**, 172–176.
- Le Floc'h, N., Otten, W. & Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* **41**, 1195–1205.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**(7122), 1022–1023.
- Li, W., Donat, S., Dohr, O., Unfried, K., and Abel, J. (1994). Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 279–284.
- Lin, L., Dai, Y. & Xia, Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* **244**, 114845.
- Manchester, D. K., Gordon, S. K., Golas, C. L., Roberts, E. A., and Okey, A. B. (1987). Ah receptor in human placenta: stabilization by molybdate and characterization of binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene. *Cancer Res*, **47**, 4861–4868.
- Mawe, G. M., & Hoffman, J. M. (2013). Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, **10**(8), 473–486.
- Metidji, A., Omenetti, S., Crotta, S., Li, Y., Nye, E., Ross, E., Li, V., Maradana, M. R., Schiering, C. & Stockinger, B. (2018). The environmental sensor AHR protects from inflammatory damage by maintaining intestinal stem cell homeostasis and barrier integrity. *Immunity*, **49**(2), 353-362.
- Michaudel, C., Danne, C., Agus, A., Magniez, A., Aucouturier, A., Spatz, M., Lefevre, A., Kirchgesner, J., Rolhion, N., Wang, Y., Lavelle, A., Galbert, C., Creusot, L., Michel, M. L., Benech, N., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Landman, C., Richard, M. L., Emond, P., Seksik, P., Beaugerie, L., Arguello, R. R., Moulin, D., Mani, S., Dvorak, Z., Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P. & Sokol, H. (2023). Rewiring the altered tryptophan metabolism as a novel therapeutic strategy in inflammatory bowel diseases. *Gut*, **72**(7), 1296-1307.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & development*, **13**(1), 20-25. J. Mimura, M. Ema, K.



- Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama (1999), Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function, *Genes Dev.* **13**, 20–25.
- Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S., & Sokol, H. (2021). Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. *Trends in pharmacological sciences*, **42**(1), 60–73.
- Mohammadi-Bardbori, A., Bastan, F., & Akbarizadeh, A. R. (2017). The highly bioactive molecule and signal substance 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole (FICZ) plays bi-functional roles in cell growth and apoptosis in vitro. *Archives of Toxicology*, **91**, 3365-3372.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nature immunology*, **12**(8), 695-708.
- Ohtake, F., Takeyama, K. I., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fuji-Kuriyama, Y. & Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**(6939), 545-550.
- Ondrová, K., Zůvalová, I., Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Miková, E., Vrzal, R., Nádvorník P., Nepal B., Kortagere, S., Kopečná, M., Kopečný, D., Šebela, M., Rastinejad, F., Pu, H., Sural, M., Rolfes, K. M., Haarmann-Stemann, T., Li, H., Mani, S. & Dvořák, Z. (2023). Monoterpenoid aryl hydrocarbon receptor allosteric antagonists protect against ultraviolet skin damage in female mice. *Nature communications*, **14**(1), 2728.
- Opitz, C. A., Litzemberger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W. & Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, **478**(7368), 197-203.
- Paine, A. J. (1976). Induction of benzo [a] pyrene Mono-oxygenase in liver cell culture by the photochemical generation of active oxygen species. Evidence for the involvement of singlet oxygen and the formation of a stable inducing intermediate. *Biochemical Journal*, **158**(1), 109-117.
- Panda, S. K., Peng, V., Sudan, R., Ulezko Antonova, A., Di Luccia, B., Ohara, T. E., Fachi, J. L., Grajales-Reyes, G. E., Jaeger, N., Trsan, T., Gilfillan, S., Cella, M., & Colonna, M. (2023). Repression of the aryl-hydrocarbon receptor prevents oxidative stress and ferroptosis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunity*, **56**(4).
- Patel, T. D., Nakka, M., Grimm, S. L., Coarfa, C., & Gorelick, D. A. (2023). Functional genomic analysis of non-canonical DNA regulatory elements of the aryl hydrocarbon receptor. *bioRxiv*.

- Peng, C., Wu, C., Xu, X., Pan, L., Lou, Z., Zhao, Y., Jiang, H., He, Z., & Ruan, B. (2021). Indole-3-carbinol ameliorates necroptosis and inflammation of intestinal epithelial cells in mice with ulcerative colitis by activating aryl hydrocarbon receptor. *Experimental Cell Research*, **404**(2), 112638.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J., & Skarnes, W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**(6803), 535–538.
- Poland A, Palen D, Glover E. (1994). Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**:915–921
- Pongratz I., Mason GG., Poellinger L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem.* **267**, 13728–34.
- Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Agbunag, R.V., Ong, M.S., and Hankinson, O. (1993). Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol. Pharmacol.* **44**, 511–518.
- Procházková, J., Kabátková, M., Bryja, V., Umannová, L., Bernatík, O., Kozubík, A., Machala M. & Vondráček, J. (2011). The interplay of the aryl hydrocarbon receptor and  $\beta$ -catenin alters both AhR-dependent transcription and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in liver progenitors. *Toxicological Sciences*, **122**(2), 349-360.
- Puga, A., Barnes, S. J., Dalton, T. P., Chang, C. Y., Knudsen, E. S., & Maier, M. A. (2000). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(4), 2943-2950.
- Ramadoss, P., Petrusis, J. R., Hollingshead, B. D., Kusnadi, A., and Perdew, G. H. (2004). Divergent roles of hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2) in human versus mouse Ah receptor complexes. *Biochemistry*, **43**, 700–709.
- Randi, A. S., Sanchez, M. S., Alvarez, L., Cardozo, J., Pontillo, C., & de Pisarev, D. L. K. (2008). Hexachlorobenzene triggers AhR translocation to the nucleus, c-Src activation and EGFR transactivation in rat liver. *Toxicology letters*. **177**(2), 116-122.
- Rasmussen, M. K., Balaguer, P., Ekstrand, B., Daujat-Chavanieu, M., & Gerbal-Chaloin, S. (2016). Skatole (3-methylindole) is a partial aryl hydrocarbon receptor agonist and induces CYP1A1/2 and CYP1B1 expression in primary human hepatocytes. *PloS one*, **11**(5), e0154629.

- Reed, G. A., Peterson, K. S., Smith, H. J., Gray, J. C., Sullivan, D. K., Mayo, M. S., Crowell, J. A. and Hurwitz, A. (2005). A phase I study of indole-3- carbinol in women: tolerability and effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 1953-1960.
- Rogan, E. G. (2006). The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *in vivo*, **20**(2), 221-228.
- Rowlands, J.C., McEwan, I.J., and Gustafsson, J.A. (1996). Transactivation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Mol. Pharmacol.* **50**, 538–548.
- Rushmore, T.H. and Pickett, C.B. (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* **265**, 14648–14653.
- Seidel, S. D., Winters, G. M., Rogers, W. J., Ziccardi, M. H., Li, V., Keser, B., & Denison, M. S. (2001). Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **15**(4), 187-196.
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, **31**(1), 69–75.
- Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A. J., Omenetti, S., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Nebert, D. W. & Stockinger, B. (2017). Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity. *Nature*, **542**(7640), 242-245.
- Schmidt, J.V., Carver, L.A., and Bradfield, C.A. (1993). Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* **268**, 22203–22209.
- Sinal, C. J., & Bend, J. R. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Molecular pharmacology*, **52**(4), 590-599.
- Sivaprakasam, S., Bhutia, Y. D., Ramachandran, S., & Ganapathy, V. (2017). Cell-Surface and Nuclear Receptors in the Colon as Targets for Bacterial Metabolites and Its Relevance to Colon Health. *Nutrients*, **9**(8), 856.
- Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., & Dvorak, Z. (2018). Methylindoles and methoxyindoles are agonists and antagonists of human aryl hydrocarbon receptor. *Molecular pharmacology*, **93**(6), 631-644.

- Stevens, E.A., Mezrich, J.D., and Bradfield, C.A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, **127**, 299–311.
- Thompson, M. D., and Monga, S. P. (2007). WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298–1305.
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal*, **474**(11), 1823–1836.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B., Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity, *J. Biol. Chem.* **274**(1), 510–515.
- Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L. C., Metayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., & Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene*, **32**(14), 1811-1820.
- Van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, A. & Clevers, H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, **88**(6), 789-799.
- Vogel, C. F., Sciuillo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G., & Matsumura, F. (2007). RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Molecular endocrinology*, **21**(12), 2941-2955.
- Vrzal, R., Marcalíková, A., Krasulová, K., Zemánková, L., & Dvořák, Z. (2023). Jasmone Is a Ligand-Selective Allosteric Antagonist of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(21), 15655.
- Vrzalová, A., Pečinková, P., Illés, P., Gurská, S., Džubák, P., Sztokowski, M., Hajdúch M., Mani S. & Dvořák, Z. (2022). Mixture effects of tryptophan intestinal microbial metabolites on aryl hydrocarbon receptor activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(18), 10825.
- Vyhliďalova, B., Krasulova, K., Pecinkova, P., Marcalikova, A., Vrzal, R., Zemankova, L., Vanco, J., Travnicek, Z., Vondracek, J., Karasova M., Mani, S. & Dvorak, Z. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* **21**(7).
- Wada, T., Sunaga, H., Ohkawara, R., & Shimba, S. (2013). Aryl hydrocarbon receptor modulates NADPH oxidase activity via direct transcriptional regulation of p40phox expression. *Molecular pharmacology*, **83**(5), 1133-1140.

- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., & Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME journal*, **6**(2), 320–329.
- Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J., & Moon, R. T. (2005). The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Current biology*, **15**(6), 489-500.
- Wilson, S. R., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2013). The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **345**(3), 419-429.
- Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug A., & Rannug, U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole is present in humans. *Journal of biological chemistry*, **284**(5), 2690-2696.
- Wong, P. S., Li, W., Vogel, C. F., & Matsumura, F. (2009). Characterization of MCF mammary epithelial cells overexpressing the Arylhydrocarbon receptor (AhR). *BMC cancer*, **9**, 1-15.
- Xie, G., Peng, Z., & Raufman, J. P. (2012). Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **302**(9), G1006-G1015.