

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Richard Václavek

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizace myší stabilně transfekované reportérové
linie odvozené od Hepa-1c1c7 buněk pro sledování
transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru**

Bakalářská práce

Richard Václavek

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Aneta Grycová PhD.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Richard VÁCLAVEK**
Osobní číslo: **R21760**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Charakterizace myši stabilně transfekované reportérové linie odvozené od Hepa-1c1c7 buněk pro sledování transkripční aktivity aryl uhlíkovdíkového receptoru**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma *in vitro* experimentálních reportérových systémů.
2. Stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti.
3. Dose-response analýza vybraných modelových aktivátorů AhR po 4, 24 a 48 hod.
4. Časová analýza transkripční aktivity AhR v rozmezí 4 – 24 hod.
5. Sledování transkripční aktivity AhR po zamražení a rozmražení buněk.
6. Zpracování literární rešerše, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tiskněná**

Seznam doporučené literatury:

1. Nowotna et al., Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environ Sci Technol.* 2011 Dec 1;45(23):10133-9.
2. Nowotna et al., Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Dec 18;47(5):842-7.
3. Degroille et al., Novel fluorescent and secreted transcriptional reporters for quantifying activity of the xenobiotic sensor aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Environ Int.* 2022 Nov;169:107545.
4. Pagio A et al., Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. *Curr Chem Genomics.* 2010;4:43-9.
5. Zwart et al., High-Throughput Effect-Directed Analysis Using Downscaled *In Vitro* Reporter Gene Assays To Identify Endocrine Disruptors in Surface Water. *Environ Sci Technol.* 2018 Apr 3; 52(7): 4367–4377.
6. Wider D and Picard D., Secreted dual reporter assay with *Gussia luciferase* and the red fluorescent protein *mCherry*. *PLoS One.* 2017; 12(12): e018940

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení:	Richard Václavek
Název práce:	Charakterizace myší stabilně transfekované reportérové linie odvozené od Hepa-1c1c7 buněk pro sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru.
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	Mgr. Aneta Grycová Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2024
Klíčová slova:	AhR, AhRepa, reportérové systémy, TCDD, FICZ, omeprazol
Počet stran	61
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním transkripční aktivity AhR v myší stabilně transfekované reportérové linii AhRepa odvozené od Hepa-1c1c7 buněk. V teoretické části se zabývá reportérovými geny, popisuje stavbu, funkci a expresi AhR v různých orgánech, poukazuje na rozdíly mezi lidským a myším AhR a v neposlední řadě popisuje typy reportérových systémů a jejich využití.

V praktické části byla reportérová linie AhRepa charakterizována pomocí modelových ligandů TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), FICZ (6-formylindolo[3,2*b*]karbazol) a omeprazolu. Nejprve byly stanoveny koncentrace ligandů tak, aby nebyly cytotoxické pro zvolenou buněčnou linii formou testu proliferace buněk krystalovou violetí a poté byly tyto koncentrace použity pro stanovení transkripční aktivity AhR. Následně byla stanovena transkripční aktivita AhR v závislosti na čase a také byla sledována její inhibice působením antagonistů. Na závěr byl sledován vliv dlouhodobé kultivace buněk na transkripční aktivitu AhR.

Bibliographical identification

Name and surname:	Richard Václavek
Title:	Characterization of mice stably transfected reporter cell line derived from Hepa-1c1c7 cells for assesment of transcriptional aktivity of aryl hydrocarbon receptor.
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor:	Mgr. Aneta Grycová Ph. D.
Year of presentation:	2024
Key words:	AhR, AhRepa, reporter systems, TCDD, FICZ, omeprazol
Number of pages:	61
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Abstract:

This bachelor thesis deals with monitoring the transcriptional activity of AhR in a mouse stable transfected reporter cell line AhRepa derived from Hepa-1c1c7 cells. The theoretical part focuses on reporter genes, describing their structure, function, and AhR expression in various organs, highlighting the differences between human and mouse AhR, and finally describing types of reporter systems and their utilization.

In the practical part, the AhRepa reporter cell line was characterized employing the model ligands, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), FICZ(6-formylindolo[3,2*b*]karbazol and omeprazole. Firstly, ligand concentrations were determined to be non-cytotoxic for the chosen cell line using a crystal violet cell proliferation assay, and then these concentrations were used to determine the transcriptional activity of AhR. Subsequently, the transcriptional activity of AhR was determined over time and its inhibition by antagonists was also monitored. Finally, the impact of long-term cell culture on the transcriptional activity of AhR was assessed.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Anety Grycové, PhD. a použil jen zde uvedené literární zdroje.

V Olomouci dne:

.....

Richard Václavek

Poděkování

Chtěl bych opravdu moc poděkovat paní Mgr. Anetě Grycové, Ph.D. za ochotu, příjemný přístup, cenné rady, umožnění této příležitosti, a hlavně za opravdu velkou trpělivost.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Reportérové geny	3
3.1.1	Chloramfenikol acetyltransferasa (CAT).....	3
3.1.2	Alkalická fosfatáza (AP)	4
3.1.3	Green fluorescent protein (GFP)	4
3.1.4	β -galaktosidáza	5
3.1.5	Luciferáza	5
3.2	Transfekce, stabilní a transientní typ.....	6
3.3	Reportérové systémy	8
3.4	AhR, jeho exprese a funkce v různých orgánech	9
3.4.1	Stavba a role AhR v organismu	9
3.4.2	AhR v kůži	11
3.4.3	AhR ve střevech	11
3.4.4	AhR v plicích	12
3.4.5	AhR v srdci.....	12
3.4.6	AhR v játrech	13
3.5	Rozdíly mezi lidským a myším AhR.....	13
4	MATERIÁL A METODY	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Laboratorní pomůcky	15
4.3	Použité chemikálie a roztoky	15
4.4	Přístroje	16
4.5	Metodika pracovních postupů	17

4.5.1	Pasážování buněk	17
4.5.2	Vysetí buněk pro experimenty	17
4.5.3	Aplikace jednotlivých AhR ligandů či antagonistů na buňky	18
4.5.4	Měření proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti	20
4.5.5	Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu.....	21
4.5.6	Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase	21
4.5.7	Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR v přítomnosti antagonistů	22
4.5.8	Sledování udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci.....	22
5	VÝSLEDKY	23
5.1	Stanovení proliferační aktivity buněk AhRepa pomocí krystalové violeti	23
5.2	Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu.....	25
5.3	Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase	35
5.4	Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů	36
5.5	Vliv dlouhodobé kultivace na luciferázovou aktivitu	41
6	DISKUSE	44
7	ZÁVĚR.....	47
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

Seznam symbolů a zkratk

AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
AhRepa	nová stabilně transfekovaná buněčná linie
ATP	adenintrinukleotidfosfát
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
bHLH/PAS	rodina helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim
CALUX	chemically activated luciferase expression
CAT	Chloramfenikol acetyltransferáza
DMEs/XMEs	xenobiotics metabolizing enzymes
DRE/XRE	dioxin responzivní element
EROD	etoxyresorufin- <i>O</i> -deetyláza
EGFP	obohacený zelený fluoreskující protein
FICZ	6-formylindolo[3,2 <i>b</i>]karbazol
FMNH2	flavinmononukleotid
GFP	Green fluorescent protein
IECs	střevní epiteliální buňky
ILCs	přirozené lymfoidní buňky
MUG	4-metyllumbelliferyl- β -D-galaktosid
OPNG	<i>o</i> -nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid
PCB	polychlorované bifenyly
PCD	programovaná buněčná smrt
PNPP	<i>p</i> -nitrofenylfosfát
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
Th17	pomocné imunitní buňky produkující IL-17
UV-A	ultrafialové záření A
XAP2	hepatitis virus X asociovaný protein 2
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Seznam obrázků

Obrázek 1: Reakční schéma luciferázy a D-luciferinu pro vznik světelného signálu

Obrázek 2: Schématické znázornění signální transdukční dráhy Aryl uhlovodíkového receptoru.

Obrázek 3: Schéma rozdílné struktury myšního a lidského AhR

Seznam tabulek

Tabulka 1: Koncentrační řady jednotlivých ligandů pro stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti.

Tabulka 2: Koncentrační řady jednotlivých ligandů pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandů.

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých ligandů pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase a při dlouhodobé kultivaci

Tabulka 4: Koncentrační řada vybraných antagonistických látek pro sledování inhibice transkripční aktivity AhR

Tabulka 5: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu.

Seznam grafů

- Graf 1: Sledování vlivu TCDD na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách.
- Graf 2: Sledování vlivu FICZ na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách.
- Graf 3: Sledování vlivu omeprazolu na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách.
- Graf 4: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení TCDD.
- Graf 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení TCDD.
- Graf 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení TCDD.
- Graf 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení FICZ.
- Graf 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení FICZ.
- Graf 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení FICZ.
- Graf 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení omeprazolu.
- Graf 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení omeprazolu.
- Graf 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení omeprazolu.
- Graf 13: Stanovení transkripční aktivity ligandů TCDD a FICZ v čase.
- Graf 14: Stanovení transkripční aktivity ligandu omeprazol v čase.
- Graf 15: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti TCDD.
- Graf 16: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti FICZ.
- Graf 17: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti omeprazolu.
- Graf 18: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191 v přítomnosti TCDD nebo FICZ.
- Graf 19: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191 v přítomnosti omeprazolu.
- Graf 20: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu po působení TCDD nebo FICZ.
- Graf 21: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu po působení omeprazolu

1 ÚVOD

Arylhydrovodíkový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který má zásadní roli v regulaci odpovědi na environmentální toxiny, a endogenní látky. Patří do bHLH/PAS rodiny transkripčních faktorů, které regulují genovou expresi v odpovědi na různé buněčné signály.

AhR se účastní metabolismu různých exogenních látek, jako jsou dioxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky a jiné environmentální polutanty. Ovšem váže i endogenní ligandy, mezi které patří FICZ (6-formylindolo[3,2*b*]karbazol), indirubin a různé deriváty tryptofanu. Při navázání na tyto ligandy AhR mění svou konformaci a přesouvá se do jádra, což vede k jeho aktivaci.

Funkce AhR sahají ale nad rámec metabolismu xenobiotik. Dnes je již známo, že je AhR vysoce exprimován v různých orgánech, jako jsou játra, plíce, střeva, kůže, placenta, ale také i srdce. Hraje klíčovou roli ve správné funkci kůže, intestinálním traktu, reguluje imunitní odpovědi, je spojen se záněty a podílí se na vývoji a homeostáze nebo také ovlivňuje cirkadiánní rytmus.

K zjištění míry transkripční aktivity AhR byly vyvinuty buněčné reportérové systémy, které používají reportérové geny, jako je například luciferáza, GFP nebo sekretovaná alkalická fosfatáza. Tyto reportérové systémy jsou nejčastěji vytvořeny pomocí transfekce savčích buněk nebo i kvasinek pomocí plazmidu obsahující reportérový gen, který obsahuje kopie dioxin responzivních elementů. Při expozici patřičnému ligandu dochází k indukci transkripční aktivity AhR společně s reportérovým genem, přičemž vznikne produkt, jehož kvantifikace je přímo úměrná expresi AhR.

2 CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše na téma *in vitro* experimentálních reportérových systémů.
2. Stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti
3. Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci modelových aktivátorů
4. Časová analýza transkripční aktivity AhR.
5. Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení vybraných antagonistů.
6. Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci.
7. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Reportérové geny

Hodně fyziologických fenoménů, jako jsou například: buněčná komunikace, buněčný vývoj, regulace růstu, proliferace a v neposlední řadě onkogeneze, může být spjata s rozličnou genovou expresí, která je pevně a přesně regulována v rámci vnitřních a vnějších buněčných signálů. Ke zjištění informací o vztahu mezi aktivací či inhibicí jednotlivých regulačních drah a jejich efektů na genovou expresi jsou fúzovány specifické responsivní elementy s geny kódujícími reportérové proteiny. Tyto geny se pak mohou využít jako indikátory v monitorování transkripční aktivity v buňkách (Rosenthal 1987). Za normálních okolností jsou promotorová oblast nebo responsivní elementy upstream reportérového genu v reportérovém plasmidu, který je následně přenesen do buněk. Výsledkem úspěšného přenosu je přítomnost reportéru přímo stanovením množství buď reportérové mRNA, reportérových proteinů nebo měření enzymatické aktivity těchto proteinů (Gambhir et al. 1999). Obecně by reportérové geny nejen měly mít sníženou aktivitu na pozadí, ale měly by být schopné i amplifikovat signál z buňky tak, aby produkovaly rychlou, senzitivní, reprodukovatelnou, a hlavně lehce detekovatelnou odpověď (Jiang et al. 2008). V dnešní době jsou reportérové geny hojně využívány jak v *in vitro*, tak i v *in vivo* aplikacích. Zejména jsou pak reportérové systémy používány ke studiu promotorových a enhancerových sekvencí, trans-acting mediátorů¹ v transkripci, mRNA úprav a translaci (Alam a Cook 1990; Ignowski a Schaffer 2004).

3.1.1 Chloramfenikol acetyltransferasa (CAT)

Gen pro CAT je derivovaný z transpozonu 9 *E. coli* (Alton a Vapnek 1979) a kóduje trimerní protein složený z třech 25 kDa podjednotek (Leslie et al. 1988). Tento enzym v bakteriích zajišťuje rezistenci proti antibiotiku chloramfenikolu jeho acetylací (Shaw 1975). CAT je užitečný jako reportérový gen pro savčí buňky, protože v těchto buňkách neexistují žádné endogenní proteiny vykazující podobné vlastnosti. Kódující region pro CAT je poměrně malý úsek (660 bp), což znamená, že vektory, které nesou tento gen, mohou být lehce modifikovány (Selbert a Rannie 2002). Zviditelnění aktivity CAT reportéru je dosaženo díky radioaktivního značení [¹⁴C]Chloramfenikol v případě vyhodnocení chromatografickou esejí

¹ Trans-acting mediátory jsou specifické regulační faktory genové exprese, které narozdíl od cis-acting mediátorů regulují genovou expresi i na jiných molekulách DNA, než na které se samy nacházejí.

nebo [^{14}C]acetyl nebo [^3H]acetyl CoA v případě vyhodnocení pomocí kapalinové scintilační spektrometrie (Shaw 1967; 1975).

3.1.2 Alkalická fosfatáza (AP)

Termín alkalická fosfatáza je označení pro rodinu fosfomonoesteráz, které vykazují optimální aktivitu v alkalickém pH. Jedná se o relativně stabilní protein produkovaný jak bakteriemi, tak savčími buňkami. Existuje několik způsobů, jak měřit jejich aktivitu. Klasickým přístupem je hydrolyza substrátů AP k vybuzení změny absorbance při spektrofotometrickém stanovení. Mezi běžně používané substráty pro tento přístup jsou *p*-nitrofenylfosfát (PNPP) (Schenborn a Groskreutz 1999) nebo flavinadenindinukleotidfosfát (FADP) (Harbron et al. 1992). Vylepšenou metodou, díky které není třeba lyzovat buňky pro zjištění aktivity AP, je sekretovaná alkalická fosfatáza (SEAP). Jedná se o přidání terminačního kodonu po kodonu 489, čímž se docílí získání plně aktivního sekretovaného enzymu, který by jinak nemohl být sekretován a byl by zadržován na buněčných membránách (Cullen a Malim 1992).

3.1.3 Green fluorescent protein (GFP)

GFP je jedním z nejrozšířenějších reportérových genů v biologických systémech. Tento protein existuje v mnoha žahavcích, jako jsou např. *Aequorea*, *Obelia* nebo *Phialidium* a mnoho dalších (Tsien 1998; Prasher et al. 1992). Vizualizace světelného signálu zprostředkovaného pomocí GFP je dána excitací tohoto proteinu při rozhraní modré a blízké ultrafialové (UV-A) oblasti světla a následné emisi světla v zelené oblasti spektra. K maximální absorpci světla tak dochází při vlnové délce 395 nm a k emisi světelného signálu dochází při vlnové délce 509 nm. Látkou, která je zodpovědná za fluorescenční aktivitu tohoto proteinu je *p*-hydroxybenzylidenimidazolinon (Cubitt et al. 1995).

Vědecký potenciál fluorescentního proteinu se neustále zvětšoval po jeho klonování. Primárně jsou fluorescenční proteiny používány jako sondy pro detekci značených buněk *in vivo*. Fluorescenční proteiny zakódované v plazmidu jsou k dispozici pro klonování proteinů buď na N- nebo C-konci. Tyto plazmidy umožňují kontrolovanou expresi v různých typech buněk a organismů, včetně bakterií, kvasinek a savčích buněk (Rizzo et al. 2004). GFP se tak stal důležitou alternativou k již existujícím reportérovým genům jako jsou: *lacZ* (Lac operon), CAT (Chloramfenikol acetyltransferáza) a luciferáza, které pro měření aktivity musejí být podrobeny vícestupňovému zpracování jako například chemická fixace, přidání exogenního

substrátu nebo protilátkovým značením. Užití fluorescentního chromoforu nepotřebuje další faktory a je obecně dost stabilní v denaturujících podmínkách (Chalfie et al. 1994).

3.1.4 β -galaktosidáza

β -galaktosidáza je enzym kódovaný genem bakterie *LacZ* v bakterii *E. coli*. β -galaktosidáza je jedním z nejvíce všestranných genových reportérů, jelikož má využití jak pro *in vivo*, tak i *in vitro* formáty esejí. Tento enzym katalyzuje hydrolyzu různých β -galaktosidů včetně několika specializovaných substrátů zvolených pro odlišné typy analýz. Používá se zejména jako vnitřní kontrola k normalizování variability jiných reportérových esejí, zejména pak pro CAT nebo luciferázové eseje (Alam a Cook 1990). Pro *in vitro* sledování aktivity β -galaktosidázy byly vyvinuty kolorimetrické eseje používající substrát *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (OPNG) a fluorimetrické eseje používající 4-metyllumbelliferyl- β -D-galaktosid (MUG), které byly později nahrazeny mnohem senzitivnější metodou používající chemiluminiscentní substráty 1,2-dioxetanu (Young et al. 1993; Kain a Ganguly 2001). Jindy se β -galaktosidáza využívá i ke stanovení úspěšné transfekce. Úspěšně transfekované buňky exprimují tento enzym, který v přítomnosti substrátu X-Gal produkuje sytě modrý produkt (Alam a Cook 1990).

V *in vivo* analýzách se β -galaktosidáza využívá například v kombinaci s fluorescenční sondou k monitorování enzymové aktivity ve vybraných rakovinných buňkách (Kim et al. 2017).

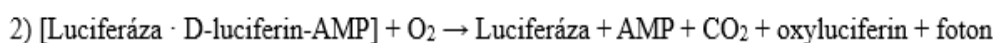
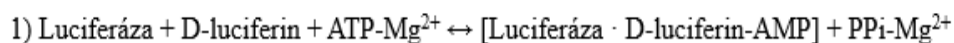
3.1.5 Luciferáza

Luciferáza je obecný termín pro skupinu bioluminiscentních proteinů, které generují světlo skrze enzymatickou reakci spolu se substrátem a kyslíkem. Tento enzym je nyní jedním z nejčastěji používaných reportérů. Mezi dnes nejčastěji využívané luciferázy patří luciferázy izolované ze zemních nebo mořských bakterií (*Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio logei*), alternativně pak ze světlušek (*Photinus pyralis*) nebo měkkých korálů (*Renilla reniformis*) (Hastings 1996). Bakteriální luciferázy jsou strukturně heterodimerické enzymy skládající se z jedné 40 kDa α -jednotky a jedné 37 kDa β -jednotky. Tyto jednotky jsou kódovány pomocí *luxA* a *luxB* genů (Baldwin et al. 1995). Tyto bakteriální luciferázy pak katalyzují oxidaci redukovaného flavinmononukleotidu (FMNH₂) a dlouhého řetězce alifatického aldehydu v přítomnosti kyslíku za vzniku modrého světla (Bronstein et al. 1994). Bohužel tyto typy luciferáz nedokážou dostatečně zajistit kontinuální světelnou emisi kvůli FMNH₂, které rapidně oxiduje na vzduchu. Důsledkem je pak náročnost použití těchto proteinů

pro expresi v savčích buňkách. (Jiang et al. 2008).

Dalším členem luciferázové rodiny je renilla luciferáza (Rluc) izolovaná z organismu *Renilla reniformis*, ta pro svou katalytickou funkci nepotřebuje na rozdíl od luciferázy izolované ze světlušek ATP a používá jiný substrát s názvem koelenterazin. Výsledkem této oxidace je pak emise modrého světla o vlnové délce 480 nm (Hastings 1996).

Jednou z nejpoužívanějších luciferáz jakožto reportérového genu je světlušková luciferáza (Luc), která je nejrozšířenějším členem luciferázové rodiny. Aktivita tohoto enzymu spočívá v přeměně specifického substrátu, D-luciferinu, na oxyluciferin a uvolnění energie ve formě viditelného světla žlutozelené barvy v širokém spektru vlnových délek 530-640 nm s maximem při 560 nm (Obr. 1) (Rice et al. 2001).



Obrázek 1: Reakční schéma luciferázy a D-luciferinu pro vznik světelného signálu (Upraveno podle: McElroy 1947)

Luciferázy jsou skvělými markery genové exprese, protože postrádají posttranskripční modifikace, mají nepřítomné endogenní proteiny nebo enzymy a vykazují rychlé enzymatické interakce. Všechny tyto atributy přispívají k analýze promoterů s transientní expresí (Selden et al. 1986). Dnes je luciferázová aktivita v širokém spektru používána pro vizualizaci buněk *in vivo* (Choy et al. 2003), k monitorování transkripční aktivity a nebo k detekci protein-proteinových interakcí (De a Gambhir 2005).

3.2 Transfekce, stabilní a transientní typ

Transfekce je proces, při kterém je introdukována cizí nukleová kyselina do eukaryotických, specificky, savčích buněk tak, aby byly produkovány geneticky modifikované buňky. Je analytickou pomůckou, díky které je možné studovat regulaci a funkci genů či funkci jejich produktů. Introdukovaný genetický materiál pak v buňkách existuje stabilně nebo transientně (Recillas-Targa 2006). Mezi ideální podmínky každé transfekce patří vysoká efektivita transfekce, nízká buněčná toxicita, minimální efekty na normální fyziologii buněk a jednoduchost a reprodukovatelnost dané transfekce (Kim a Eberwine 2010). Vnesení nukleové kyseliny do vybraných buněk lze docílit metodami biologickými, chemickými a

fyzikálními. Mezi biologické metody se řadí virově zprostředkovaná transfekce (transdukce) (Pfeifer a Verma 2001). Chemické metody spočívají v použití pozitivně nabitých polymerů, aminokyselin nebo lipidů k tvorbě komplexu s negativně nabitou DNA a následnému přenosu buněčnou membránou. Účinnost těchto metod závisí na faktorech jako je pH, poměr použité látky s nukleovou kyselinou a náboj buněčné membrány. Výhodami této metody jsou poměrně nízká cytotoxicita, nízká mutagenéza a nebo oproti transdukci volný výběr velikosti insertované nukleové kyseliny (Kim a Eberwine 2010). Fyzikální metody jsou nejnovějšími používanými metodami transfekce, které využívají rozličných fyzikálních nástrojů k vnesení nukleových kyselin do buněk. Mezi tyto metody patří přímá mikroinjekce, biolistický přenos, laserem zprostředkovaná transfekce a elektroporace. Metoda přímé mikroinjekce spočívá v přímé injekci nukleové kyseliny do cytoplasmy nebo jádra. Je velmi účinnou, avšak pracnou metodou, která může způsobit mimo jiné i buněčnou smrt. Metoda biolistického přenosu ('Gene-gun') využívá částice těžkých kovů jakožto nosičů nukleových kyselin urychlených pomocí vysoko napěťové elektrické jiskry nebo heliového výboje. Laserem zprostředkovaná transfekce (optoporace, fototransfekce) využívá pulsního laseru k ozáření buněčné membrány k vytvoření dočasného póru, kterým může nukleová kyselina volně osmoticky prostoupit. Elektroporace využívá silných elektrických pulzů, díky kterým se buněčná membrána dočasně destabilizuje a nukleová kyselina tak může prostoupit dovnitř buňky (Mehier-Humbert a Guy 2005).

V závislosti na povaze experimentu se volí buď stabilní nebo transientní transfekce. Obě z těchto metod mají své výhody i nevýhody. Novotna et al. popisují stabilní transfekci jako časově a materiálně náročný proces, jehož užití v experimentech má řadu výhod oproti transientní transfekci. Mezi tyto výhody patří: (1) není nutností transfekovat buňky před každým experimentem, což šetří čas a materiál; (2) není nutností normalizovat data na β -Gal díky variabilní efektivnosti transfekce, tím pádem jsou výsledná data více homogenní; (3) v použité eseji je dosaženo daleko větší sensitivity díky tomu, že jsou všechny přítomné buňky transfekované a v neposlední řadě (4) kombinací bodů 1-3 stabilně transfekované buněčné linie umožňují měření v 96-jamkových mikrotitračních destičkách (Novotna et al. 2011). Oproti tomu transientní transfekce poskytuje rapidní analýzu funkcí genů, pokud může být tato funkce detekována v rámci 72 hodin od proběhlé exprese. Je tedy vhodné zkoumat funkce genů nejdříve pomocí esejí vycházejících z transientních transfekcí, ty jsou totiž rychlou a podstatně levnější alternativou k zjištění, zdali je zvolená buněčná linie vhodným typem pro studovaný gen. Dalším uplatněním transientní transfekce je při studiu genů vyvolávajících programovanou buněčnou smrt (PCD, apoptóza), protože takové geny většinou indukují apoptózu během

několika hodin jejich exprese a je tak často velmi těžké či nemožné etablovat stabilní buněčné linie obsahující apoptotické geny (Miura a Yuan 2000).

3.3 Reportérové systémy

Už od dob markantního industriálního průmyslu se začal zvyšovat podíl škodlivých látek typu dioxinů a látkám jim podobným, které představují značné nebezpečí pro lidské zdraví (Bansal a Kim 2015). Dioxiny, furany a polychlorované bifenylly jsou velmi toxické látky, u kterých rozsáhlý výzkum poukázal na jejich spojitost s různými zdravotními problémy od hormonální nerovnováhy (Pohjanvirta a Tuomisto 1994) až po rakovinu (Kogevinas 2001). Specificky dioxiny jsou pak převážně obsaženy v potravě zvířecího původu. Zpočátku byly tyto látky identifikovány chemickými analýzami, které, ačkoliv jsou velmi precizní a citlivé, jsou také velmi drahé, časově náročné a vyžadují sofistikované laboratorní vybavení. Pro usnadnění a zefektivnění identifikace těchto látek byly vyvinuty metody, které využívají schopnosti těchto škodlivých látek vázat se na aryluhlovodíkový receptor (Mascarelli 2012).

Začátkem pro bioeseje používající savčí buňky ke kvantifikaci dioxinů byla metoda EROD v buněčných liniích H4IIE krysího hepatomu. Tato metoda spočívá v indukci exprese genu CYP1A1 asociovaným s enzymovou aktivitou etoxyresorufin-*O*-deetylázy (EROD) v AhR dependentním způsobu. Míra indukce této aktivity je tedy přímo úměrná koncentraci ligandu indukující aktivitu enzymu (Bradlaw a Casterline 1979). Dalším posunem ve vývoji bylo použití rekombinantních savčích buněk s použitím reportérových genů, jako jsou placentální alkalická fosfatáza, obohacený zelený fluoreskující protein (EGFP) nebo luciferáza. Vystavení těchto rekombinantních buněk dioxinům nebo jiným AhR agonistům způsobí expresi transfekovaného reportérového genu. Nejvýznamnějšími systémy pak byly bioeseje CALUX (chemically activated luciferase expression) nebo P450HRGS (Denison et al. 2004; Han et al. 2004). Další novou alternativou pro CALUX bioesej se stala takzvaná CAFLUX (chemically activated fluorescence expression) bioesej, která využívá EGFP místo luciferázy. Ačkoliv obě tyto metody mají velmi podobný minimální detekční limit, tak EGFP má velkou výhodu oproti luciferáze jakožto reportérový gen, protože dovoluje měření přímo v živoucích buňkách bez nutnosti odstranění média nebo lýze buněk (Nagy et al. 2002). Alternativně existují i eseje kombinující dva typy luciferáz, a to *Renilla* luciferázu (R-Luc) a firefly luciferázu (F-Luc) s vyšší citlivostí než klasická CALUX esej (Liu et al. 2009), eseje využívající sekretovanou alkalickou fosfatázu (SEAP) (Kasai et al. 2005) nebo relativně novou metodu DR-EcoScreen esej, která spočívá v aktivaci 7 dioxin responzivních elementů ke zvýšení citlivosti měření (Kojima et al. 2018).

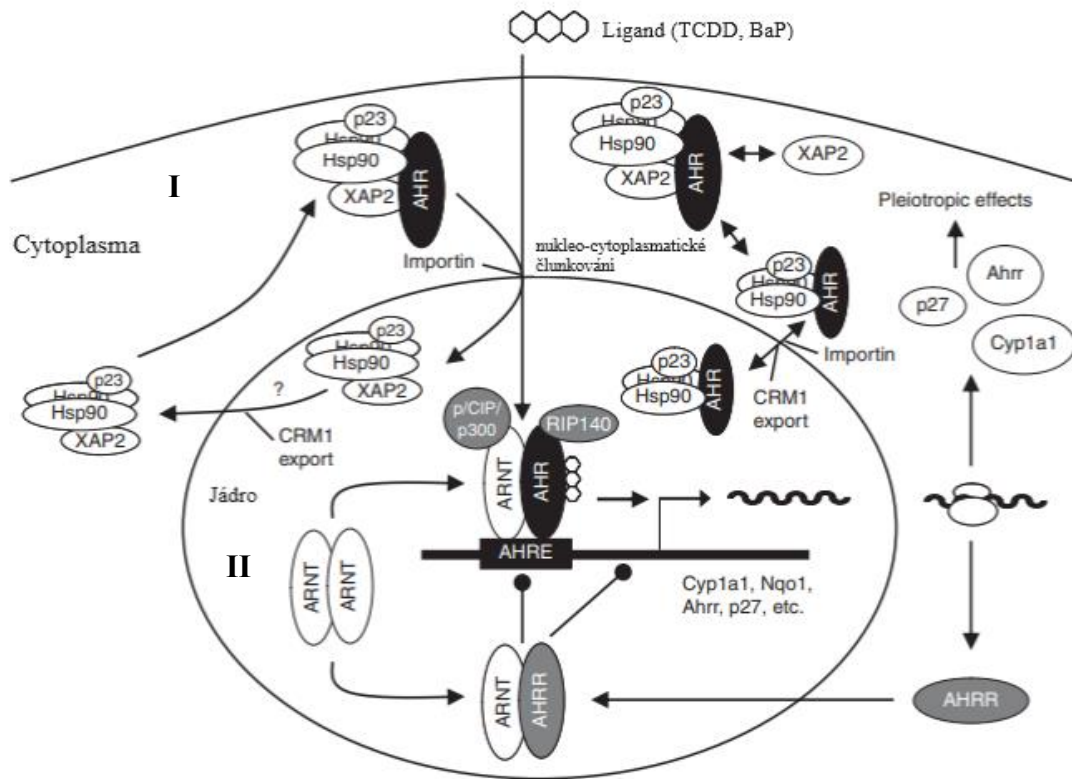
3.4 AhR, jeho exprese a funkce v různých orgánech

3.4.1 Stavba a role AhR v organismu

Organismy si vyvinuly varietu molekulárních mechanismů k adaptaci pro jak endogenní, tak exogenní stimuly. Expozice xenobiotikům může indukovat přenosy signálů v buňce, které mohou vést k různým odpovědím včetně vzniku fyziologického stresu a buněčných odpovědí jako jsou proliferace, diferenciace, apoptóza nebo dokonce nekróza. K minimalizování poškození způsobenému takovou expozicí mají organismy velkou škálu enzymů metabolizujících léčiva nebo xenobiotika (DMEs nebo XMEs), které hrají hlavní roli v detoxifikaci a/nebo biotransformaci xenobiotických látek. DMEs jsou přítomny v nadbytku buď v bazální hladině nebo jsou indukované ve většině tkání a orgánech po expozici odpovídajícím ligandům (Rushmore a Kong 2002). Aktivace AhR ligandy je jedním z mechanismů, pomocí kterých organismy reagují na environmentální xenobiotika, primárně díky schopnosti AhR indukovat nebo upregulovat DMEs. AhR je členem bHLH/PAS rodiny transkripčních regulátorů, skupiny klíčových vývojových a environmentálních sensorických proteinů (Furness et al. 2007). Nejtypičtějším ligandy AhR jsou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), benzo[*a*]pyren (BaP) a polychlorované bifenylly (PCB), které indukují širokou škálu nepříznivých toxikologických následků v lidských populacích. V jádru těchto toxikologických efektů figuruje AhR signální dráha.

Ve své inaktivované formě AhR existuje jako cytosolický proteinový komplex s dimerem 90 kD heat-shock proteinu (hsp90), hsp90 asociovaným kochaperonem p23 a XAP2 (hepatitis B virus X asociovaný protein 2) (Chen a Perdew 1994; Denis et al. 1988; Cox a Miller 2004; Carver a Bradfield 1997). Hsp90 váže jak ligand vážící PAS doménu, tak i bHLH DNA vážící doménu a pomáhá tak udržovat správné skládání a stabilitu proteinového komplexu (Antonsson et al. 1995). K udržení stability AhR také pomáhá XAP2, jehož hlavní role v asociaci s AhR spočívá v zabránění dynamickému nukleo-cytoplazmatickému člunkování receptoru ve stavu bez navázaného ligandu (Pollenz et al. 2006). Po navázání ligandu se celý AhR komplex translokuje do jádra vlivem konformační změny a formuje heterodimer s ARNT (aryl uhlovodíkový receptor-nukleární translokátor). Spolu s navázáním ARNT současně ztrácí hsp90-p23-XAP2 komplex (McGuire et al. 1994; Reyes et al. 1992). Následně se AhR-ARNT heterodimer váže na DNA v místě dioxin responzivního element (DRE, známé také jako XRE, AhRE), které obsahuje hlavní rozpoznávací motiv 5'-GCGTG-3' (Swanson et al. 1995). Po navázání na tyto elementy je spuštěna transkripce cílových genů, mezi které patří zejména geny

kódující enzymy metabolizující léčiva (DMEs) patřící do CYP1 rodiny, jmenovitě pak CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a CYP2S1 (Obr. 2) (Nebert et al. 2000; Mimura a Fujii-Kuriyama 2003).



Obrázek č. 2: Schématické znázornění signální dráhy AhR. I: AhR setrvává v inaktivní formě v komplexu s chaperony, p23 a XAP2, II: vlivem vazby ligandu AhR mění konformaci a ztrácí proteiny tvořící komplex; pomocí importinů se dostává do jádra a díky uvolnění XAP2 dimerizuje s ARNT. Celý heterodimer se pak váže na AhRE cílových genů. Upraveno podle (Mimura a Fujii-Kuriyama 2003).

AhR je exprimován ve velké škále orgánů a v těchto specifických orgánech nabývá různých funkcí. Největší úroveň exprese AhR je pozorována v placentě, plicích, srdci, slinivce a v neposlední řadě v játrech; naopak nejméně exprimován je v ledvinách, mozku a v kosterním svalstvu. Přítomnost AhR je ve většině tkání způsobena jeho provázaností s imunitou, zejména pak v bariérových orgánech, jako jsou kůže, střeva, plíce a oči (Esser a Rannug 2015).

3.4.2 AhR v kůži

Kůže poskytuje obranu proti environmentálnímu stresu jako jsou dehydratace, UV světlo, mechanické trauma a různé infekce (Esser a Rannug 2015). V buňkách kůže (keratinocyty, fibroblasty) lze pozorovat vysokou úroveň exprese AhR, která je spjatá s fyziologickými funkcemi těchto buněk. Hledání takových funkcí je dvojího typu: (1) použití zvýšené indukce AhR a (2) užití AhR deficientních myších modelů. Studie zabývající se AhR deficientními myši indikovaly, že AhR je potřebný pro proliferaci melanocytů a tím pádem jejich pigmentaci (Jux et al. 2011). U lidí bylo naopak zjištěno, že poluce vzduchu sazemi je spjata se zvýšenou úrovní vnějšího stárnutí kůže (Vierkötter et al. 2010). Studie s topickými nebo systémovými aplikacemi ligandů AhR (TCDD, FICZ) demonstrovaly, že AhR signalizace je spjata s degranulací mastocytů (Sibilano et al. 2012). V keratinocytech je AhR zapojen v UV-B stresové odpovědi (Fritsche et al. 2007) a jeho přítomnost v kůži může působit jako obrana proti UV indukované erythemě nebo změnit profil genové exprese keratinocytů (Navid et al. 2013).

3.4.3 AhR ve střevech

Ve střevě hraje AhR důležitou roli v udržování integrity a funkce střevní bariéry. Ovlivňuje různé aspekty střevních epitelálních buněk (IECs) zahrnující proliferaci IECs a produkci IEC-derivovaných molekul. Studie ukázaly, že u AhR deficientních myši došlo k narušení proliferace kmenových buněk Lieberkühnovy krypty, což upozorňuje na roli AhR v obnově a 'turnoveru' epitelálních buněk (Stockinger et al. 2014). Zároveň bylo na myších modelech demonstrováno, že aktivace AhR pomocí FICZ bránila vzniku bariérové dysfunkce IECs způsobenou hypoxií *in vitro* (Han et al. 2016). Podobně byl pozorován účinek bakteriálně derivovaného indolu na funkci bariéry střevních epitelálních buněk ve formě zvýšení její integrity a zvýšení odolnosti vůči kolonizaci patogeny (Bansal et al. 2010). V neposlední řadě bylo pozorováno, že myši s deficiencí AhR v intestinálních epitelálních buňkách byly více senzitivní k DSS (dextran sodium sulfát) indukované kolitidě než kontrolní myši a měly tak zvýšenou úroveň apoptózy, poukazující na fakt, že AhR má vliv na integritu IECs (Chinen et al. 2015).

AhR je dále důležitý v kontextu imunitního systému střev. Jeho aktivace zvyšuje diferenciaci Th17 buněk, jež jsou podtypem CD4⁺ T buněk, které exprimují cytokiny jako jsou IL-17, IL-17A, IL-17F a IL-22. IL-22 indukuje produkci antimikrobiálních peptidů a mucinů, které napomáhají udržovat integritu sliznice (Aujla et al. 2008). Novější studie ukazují, že IL-

IL-22 je produkován NK-22 (Natural killer buňky typu 22) buňkami a LT α i (buňky podporující vznik lymfoidní tkáně) buňkami (dohromady se obecně označují jako ILCs – Přirozené lymfoidní buňky). Tyto buňky exprimují ROR γ t, důležitý transkripční faktor řídící jejich vývoj a tak i produkci IL-22 (Sawa et al. 2010). Role AhR v tomto případě spočívá v regulaci akumulace ROR γ t⁺ ILCs ve střevě. Qiu et al. prokázali, že ROR γ t⁺ ILCs měly zvýšenou úroveň apoptózy a jejich počet byl významně nižší u dospělců AhR deficientních myších modelů. Zároveň u těchto modelů bylo pozorováno zhoršení exprese IL-22, což mělo za následek vyšší susceptibilitu vůči bakteriálním infekcím jako například *Citrobacter rodentium*. Exogenní exprese IL-22 pak bylo dosaženo obranyschopnosti AhR deficientních modelů vůči těmto infekcím, což poukazuje na fakt, že AhR zaujímá ochrannou funkci v organizaci vrozené imunity střev (Qiu et al. 2012).

3.4.4 AhR v plicích

Plicní epiteliální tkáň je, podobně jako střevní, jednovrstevná. V plicích existuje několik typů buněk, jako jsou bazální buňky, řasinky, pohárkovité buňky tvořící hlen a kartáčové buňky. Tyto útvary společně tvoří dýchací cesty na tkáňové úrovni. Epitel a jeho hlenová vrstva jsou postupně užší směrem k alveolům a pod epitelem se nachází bazální matrix, ve kterém jsou přítomny buňky imunitního systému (mastocyty, lymfocyty a ILCs skupin 1, 2 a 3). Ve všech těchto typech buněk je přítomna vysoká úroveň exprese AhR (Frericks et al. 2007). Funkce AhR v plicní tkáni je rozličná. Kromě funkce v imunitní odpovědi při vystavení vzdušným částicím (cigaretový kouř, zplodiny diesellových spalovacích motorů, popř. prach), kdy je zvýšena produkce IL-17 prostřednictvím aktivace AhR (van Voorhis et al. 2013), bylo také demonstrováno, že AhR pomáhá chránit fibroblasty před apoptózou způsobenou cigaretovým kouřem (Rico de Souza et al. 2011). V další studii bylo zjištěno, že působením B[a]P na epiteliální buňky plic, a tím pádem aktivací AhR, byla zvýšena exprese *MUC5AC* genu a nadprodukce mucinu (Chiba et al. 2011).

3.4.5 AhR v srdci

AhR znatelně ovlivňuje srdeční funkci. Studie ukazují, že deficiencie AhR vede k srdeční hypertrofii a kardiomyopatii, které jsou pravděpodobně ovlivněny faktory, jako jsou VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), ET-1 (endothelin-1) a Ang II (Angiotensin II) (Kim et al. 2000; Yi et al. 2018). Mimoto je AhR signální dráha nezbytná pro vývoj srdce. Aktivací AhR dioxinem došlo k narušení signálních drah TGF- β /BMP (transformující růstový

faktor/kostní morfogenický protein) a WNT, čímž došlo k zastavení diferenciaci kardiomyocytů a v rané diferenciaci byla i narušena kardiogeneze (Zhu et al. 2012).

3.4.6 AhR v játrech

AhR je vysoce exprimován v játrech (specificky v hepatocytech nebo Kupfferových buňkách stejně jako u jiných bariérových orgánů. Ovšem zatímco jeho role v regulaci imunitní odpovědi je již popsána v mukózních tkáních, jeho význam v játrech je stále předmětem výzkumu. Studie však naznačují jeho klíčovou roli pro normální vývoj jater, důkazem toho mohou být menší velikost jater a hepatocytů, jejich narušená polyploidizace nebo znatelný portosystemový zkrat u myši s knockoutovaným AhR (Moreno-Marín et al. 2018; Walisser et al. 2005; Lahvis et al. 2000). Další studie ukázaly, že administrace TCDD ‘wild-type‘ myším vede k zánětu jater a k jejich fibróze (Pierre et al. 2014). V rámci AhR dependentní imunitní regulace jsou v játrech konstantně produkovány tryptofanové deriváty kyseliny kynureninové, u kterých bylo zjištěno, že indukují imunosupresi v jak T buňkách, tak i v antigen prezentujících buňkách (Gutiérrez-Vázquez a Quintana 2018).

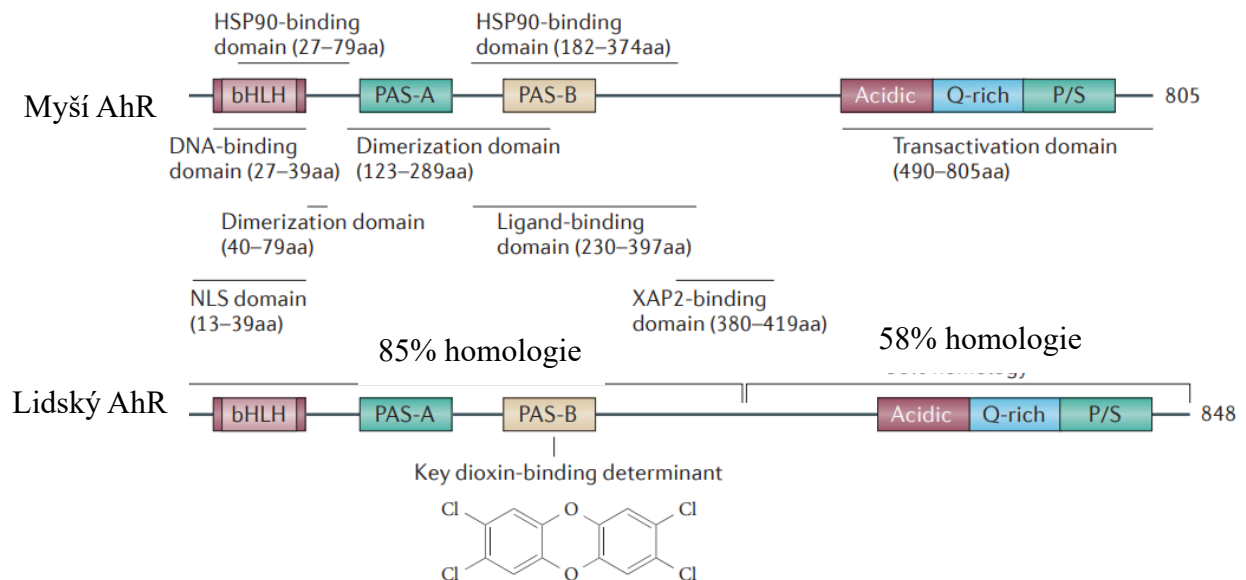
3.5 Rozdíly mezi lidským a myším AhR

Pro studium a přiblížení účinku environmentálních polutantů či endogenních ligandů na aryl uhlovodíkový receptor se používají modely různých organismů, ať už krysy, myši, lidské či jiné za účelem komparativních analýz napříč druhy (Hahn 1998). Nejčastěji se však pro studium AhR využívají myši modely díky jejich podobnosti s lidskými modely a jejich dostupnosti. Ovšem i přes jistou podobnost se myši a lidský AhR liší v různých aspektech. Hlavní rozdíly lze pak hledat v odlišné struktuře, která vede k jiným funkcím AhR v daných modelech a v afinitě jednotlivých ligandů, které mohou být v jednom organismu velmi silnými agonisty a v druhém naopak slabými agonisty (Murray et al. 2014).

Lidský AhR se strukturálně liší od myšičího, jak již bylo zmíněno. Prvním rozdílem je snížená stabilita lidského komplexu AhR-HSP90 (Manchester et al. 1987). Porovnání aminokyselinových sekvencí odhalilo 85% sekvenční homologii v N-terminální polovině receptoru a pouze necelou 60% homologii v C-terminální polovině receptoru s většinou nekonzervovaných změn v oblasti transaktivační domény (Obr. 3). Dále studie, ve kterých bylo použito lidských, myšičích a humanizovaných myšičích hepatocytů, ukázaly, že lidský a myšičí AhR různě regulují genovou expresi v hepatocytech (Flaveny et al. 2010; Forgacs et al. 2013).

Míra odpovědi k AhR ligandům se liší napříč druhy díky již zmíněným rozdílným strukturám AhR mezi druhy, ale je také závislá na biochemických a fyziologických

charakteristikách (zejména pak kvůli rozdílné farmakokinetice, farmakodynamice a metabolismu různých druhů organismů). Ovšem i přes to je specifita vazby a potence většiny ligandů podobná pro AhR jak mezi druhy, tak i mezi různými tkáněmi, ale nikdy není identická (Denison et al. 2011). Například nejmarkantnější rozdíl ve vazbě ligandů mezi lidskými a myšimi buňkami je míra afinity TCDD, která je u myších hepatocytů až desetkrát vyšší než u lidských hepatocytů na základě změny pouze jedné aminokyseliny v PAS-B doméně (Ramadoss a Perdew 2004). Naopak lidské AhR vykazuje vyšší afinitu pro endogenní indolové deriváty, jako jsou indirubin a indoxyl sulfát (Schroeder et al. 2010; Flaveny et al. 2009). Dalším zajímavým rozdílem je neschopnost aktivace AhR u myších hepatocytů benzimidazolovým léčivem používaným pro léčbu GERD (refluxní choroba jícnu), omeprazolem (Kikuchi et al. 1996).



Obrázek 3: Schéma rozdílné struktury myšího a lidského AhR (Upraveno podle Murray et al. 2014).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Adherentní stabilně transfekovaná myší buněčná linie AhRepa připravená stabilní transfekcí buněk Hepa-1c1c7 odvozených od myšího hepatálního karcinomu.

Reportérový plasmid pGL-4.27-DRE použitý pro konstrukci linie obsahuje 4 kopie DRE pro vazbu AhR.

4.2 Laboratorní pomůcky

- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 μ l, 0,5 – 10 μ l, 2 – 20 μ l, 20 – 200 μ l, 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 μ l, 10 – 100 μ l, 30 – 300 μ l (Eppendorf)
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- pipetor FastPette (Labnet)
- sterilní sérologické pipety s objemy 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- střední a velké plastové kultivační lahve (TPP)
- 96 jamkové kultivační destičky (TPP)
- bílá 96 jamková destička na měření luminiscence (NUNC)
- Petriho misky (TPP)
- mikrozkušavky s objemy 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- plastové zkumavky s objemy 15 ml, 50 ml a 60 ml (TPP)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- krycí sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- plastové stojany na zkumavky
- buničina (Tork)

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- deionizovaná voda
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D4540)
- kultivační médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, kat. č. D429) s 2 mmol.l⁻¹ L-glutaminu (Serana, kat. č. RGL-001), 50 ml fetálního bovinního

séra (Sigma Aldrich, kat. č. F7524), 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma Aldrich, kat. č. F7524) a antibiotikem penicilin – streptomycin (Sigma Aldrich, kat. č. P4333)

- fosfátový pufr (BioConcept, kat. č. T9650)
- 0,1% roztok krystalové violeti; příprava smícháním 40 ml deionizované vody s 10 ml 0,5% krystalové violeti (Sigma Aldrich, kat. č. V5265)
- trypanová modř (Sigma Aldrich, kat. č. T9650)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, kat. č. T4049)
- substrát pro luciferázu 30 ml: 5 mg D-luciferin (Sigma Aldrich, katalogové číslo L9504-50MG), 10 mg adenosin-5'-trifosfát (ATP, Sigma Aldrich, katalogové číslo A2383-5G), 5 mg koenzymu A (CoA, Sigma Aldrich, katalogové číslo C4780-100MG), 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma Aldrich, katalogové číslo 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufr 1 mol·l⁻¹ (pH 7,8; Sigma Aldrich, katalogové číslo T9650), 1,23 mg/6,6 µl 0,5 mol·l⁻¹ kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Sigma Aldrich, katalogové číslo E9884), 3,03 mg/1,23 ml 100 mmol·l⁻¹ heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄ · 7 H₂O, LACHEMA) a doplnit do 30 ml destilovanou vodou
- metanol (Penta Chemicals Unlimited, kat. č. 10047-A80)
- triton X-100 (Serva, kat. č. 37240)
- ligandy AhR:
 - 2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin (TCDD, ULTRA Scientific, kat. č. 48599)
 - 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ, Sigma Aldrich, kat. č. SML149)
 - omeprazol (Supelco, kat. č. 12262)
- antagonisté AhR:
 - GNF-351 (Sigma Aldrich, kat. č. 182707)
 - CH223191 (Sigma Aldrich, kat. č. C8124)

4.4 Přístroje

- laminární box Labculture (ESCO)
- mrazící box MDF-U53V (Sanyo)
- lednice (Gorenje)
- inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm)
- odsávací nádoba Flask-Trap 1 (Biosan)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- světelný mikroskop (Novel Optics)

- třepací deska MR-12 (Biosan)
- vodní lázeň LCB22D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)

4.5 Metodika pracovních postupů

4.5.1 Pasážování buněk

Kultivace buněk probíhala v plastových kultivačních lahvích v DMEM médiu ve sterilním prostředí inkubátoru při podmínkách 37 °C, 5% atmosféře CO₂ a vlhkosti 95 %. Pro pasáž buněk bylo zahřáto médium a PBS na 37 °C ve vodní lázni a trypsin byl rozmražen při pokojové teplotě. Kultivační láhev s DMEM, PBS a trypsinem byly dezinfikovány a přeneseny do laminárního boxu, kde bylo nejdříve odsáto médium z lahve, poté byla lahev promytá 10 ml PBS, znovu došlo k odsání a poté k přidavku 2 ml trypsinu. Lahev s trypsinem byla přenesena do inkubátoru na zhruba 5 minut, aby se trypsin nechal působit. Po přenesení lahve zpět do laminárního boxu byla trypsinizace ukončena přidavkem 18 ml čistého kultivačního média a bylo provedeno rozsuspendování buněk. Z výsledné suspenze byly odebrány 4 ml zpět do kultivační lahve, do které bylo doplněno 26 ml kultivačního média. Pasážování buněk probíhalo 3x týdně, a to v pondělí, středu a pátek.

Zároveň bylo pravidelně odebíráno médium, označované jako depletované, z kultivační lahve vždy po 24 hodinách od pasáže. Depletované médium bylo použito pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu (bod 4.5.5).

4.5.2 Vyšetření buněk pro experimenty

Pro přípravu buněk na experimenty byl postup stejný jako při pasážování do kroku rozsuspendování buněk, kdy byl celý objem suspenze přenesen do 50ml zkumavky, ze které bylo odpipetováno 10 µl suspenze do 0,5 ml mikrozukavky. Do mikrozukavky bylo následně přidáno 90 µl trypanové modři a nově vzniklá směs byla několikrát propipetována. Poté bylo nanášeno 10 µl směsi suspenze s trypanovou modří na Bürkerovu komůrku a bylo spočítáno 5 polí buněk z horní strany Bürkerovy komůrky a 5 ze spodní strany. Následně byl spočítán průměr buněk, který byl vynásoben koeficientem 10⁵ a vzniklý výsledek udával počet buněk v jednom mililitru. Pro další práci s buňkami byla suspenze naředěna médiem tak, aby byl počet buněk roven 40 000 v jedné jamce mikrotitrační destičky (pro dobu inkubace 4 a 24 hodin), v případě doby inkubace 48 hodin byla suspenze naředěna na 25 000 buněk pro jednu jamku. Takto připravené destičky pak byly ponechány v inkubátoru do dalšího dne.

4.5.3 Aplikace jednotlivých AhR ligandů či antagonistů na buňky

K připraveným buňkám z kroku 4.5.2 byly druhý den připraveny potřebné ligandy nebo antagonistické látky s přidavkem kultivačního média tak, aby jejich finální koncentrace byla ředěná 1000x. Takto naředěné látky byly napipetovány na mikrotitrační destičku po 200 μl na jednu jamku, každá koncentrace byla pipetována v pentaplikátu. Jednotlivé koncentrace ligandů či antagonistů AhR použitých při různých analýzách jsou uvedeny v tabulkách 1-4.

Tabulka 1: Koncentrační řady jednotlivých ligandů pro stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti.

Ligand	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
TCDD	1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
FICZ	100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Omeprazol	100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$
	1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
	200 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Tabulka 2: Koncentrační řady jednotlivých ligandů pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandů.

Ligand	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
TCDD	1 nmol·l ⁻¹	1 pmol·l ⁻¹
	10 nmol·l ⁻¹	10 pmol·l ⁻¹
	100 nmol·l ⁻¹	100 pmol·l ⁻¹
	1 μmol·l ⁻¹	1 nmol·l ⁻¹
	5 μmol·l ⁻¹	5 nmol·l ⁻¹
	10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹
	50 μmol·l ⁻¹	50 nmol·l ⁻¹
FICZ	1 nmol·l ⁻¹	1 pmol·l ⁻¹
	10 nmol·l ⁻¹	10 pmol·l ⁻¹
	100 nmol·l ⁻¹	100 pmol·l ⁻¹
	1 μmol·l ⁻¹	1 nmol·l ⁻¹
	10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹
	100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹
	1 mmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹
5 mmol·l ⁻¹	5 μmol·l ⁻¹	
10 mmol·l ⁻¹	10 μmol·l ⁻¹	
Omeprazol	100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹
	1 mmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹
	10 mmol·l ⁻¹	10 μmol·l ⁻¹
	50 mmol·l ⁻¹	50 μmol·l ⁻¹
	100 mmol·l ⁻¹	100 μmol·l ⁻¹
	200 mmol·l ⁻¹	200 μmol·l ⁻¹

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých ligandů pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase a při dlouhodobé kultivaci

Ligand	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
TCDD	200 nmol·l ⁻¹	200 pmol·l ⁻¹
FICZ	2 mmol·l ⁻¹	2 μmol·l ⁻¹
Omeprazol	140 mmol·l ⁻¹	140 μmol·l ⁻¹

Tabulka 4: Koncentrační řada vybraných antagonistických látek pro sledování inhibice transkripční aktivity AhR.

Antagonista	Přítomný ligand	Koncentrace antagonisty	Finální koncentrace antagonisty	
	TCDD (200 pmol·l ⁻¹)	1 μmol·l ⁻¹	1 nmol·l ⁻¹	
		10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹	
		100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹	
		250 μmol·l ⁻¹	250 nmol·l ⁻¹	
		500 μmol·l ⁻¹	500 nmol·l ⁻¹	
	GNF351	FICZ (2 μmol·l ⁻¹)	1 μmol·l ⁻¹	1 nmol·l ⁻¹
			10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹
			100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹
			1 mmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹
			5 mmol·l ⁻¹	5 μmol·l ⁻¹
		Omeprazol (140 μmol·l ⁻¹)	10 mmol·l ⁻¹	10 μmol·l ⁻¹
			1 μmol·l ⁻¹	1 nmol·l ⁻¹
			10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹
			100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹
			1 mmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹
		5 mmol·l ⁻¹	5 μmol·l ⁻¹	
		10 mmol·l ⁻¹	10 μmol·l ⁻¹	
		10 μmol·l ⁻¹	10 nmol·l ⁻¹	
		100 μmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹	
		1 mmol·l ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹	
CH223191	TCDD/FICZ/omeprazol	5 mmol·l ⁻¹	5 μmol·l ⁻¹	
		10 mmol·l ⁻¹	10 μmol·l ⁻¹	

4.5.4 Měření proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti

Buňky byly vysety podle bodu 4.5.2 a druhý den byla provedena aplikace jednotlivých ligandů se zvyšující se koncentrací podle Tabulky 1. Každá koncentrace dané látky byla ředěna 1000x DMEM a výsledné roztoky byly pipetovány na mikrotitrační destičku vždy v pěti opakováních po 200 μl. Jako negativní kontrola sloužil 1000x zředěný roztok DMSO v DMEM a jako pozitivní kontrola sloužil triton, který byl ředěn 10x pomocí DMEM k dosažení 2% koncentrace. Poté byly jednotlivé destičky ponechány v inkubátoru po dobu 24 a 48 hodin. Po tomto intervalu byla směs kultivačního média a ligandu vyklepnuta do odpadu (v případě látek FICZ, omeprazol) nebo do vyhrazené lahve určené pro toxický odpad (TCDD) a destička byla

osušena na buničině. Jednotlivé jamky byly poté promyty 60 μ l PBS a po jejich osušení na buničině bylo k buňkám přidáno 60 μ l 0,1% krystalové violeti a buňky se nechaly inkubovat 30 – 60 minut na třepačce. Po inkubaci byl z destiček vyklepnutý roztok krystalové violeti a buňky byly posléze promyty 60 μ l PBS tak dlouho, dokud bylo evidentní vymývání barviva (minimálně 5x). Buňky byly po posledním kroku promytí PBS osušeny a navázané barvivo bylo rozpuštěno přidavkem 200 μ l metanolu. Vzniklý roztok v jamkách byl několikrát propipetován, dokud nebyl homogenní. Takto připravené destičky byly vloženy do spektrofotometru a byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

4.5.5 Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu

Buňky byly nejdříve vysety (bod 4.5.2) a další den byly připraveny zásobní roztoky ligandů, které byly 1000x ředěny pomocí depletovaného média (podle Tabulky 2). Negativní kontrolou byl roztok 1000x ředěného DMSO v depletovaném médiu. Po napipetování jednotlivých ligandů byly připravené destičky vloženy do inkubátoru po dobu 4, 24 a 48 hodin. Po inkubaci byl obsah destiček vyklepán do odpadu, popř. do toxického odpadu a poté byly desky promyty 50 μ l PBS a osušeny na buničině. V dalším kroku bylo k buňkám přidáno 30 μ l lyzačního pufru a poté byly buňky zmrazeny při -80 °C po dobu minimálně 20 minut. Následně byly jednotlivé mikrotitrační desky ponechány na třepací desce, dokud zcela nerozmrzly. Po jejich rozmražení bylo odebráno 6 μ l lyzátu do bílých mikrotitračních destiček, ke kterým bylo přidáno 30 μ l substrátu pro luciferázu. Jednotlivé destičky byly opatrně proklepány, aby se nanesená směs homogenně smísila. Posledním krokem bylo změření luminiscence ve spektrofotometru.

4.5.6 Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase

Buňky byly vysety na mikrotitrační desku podle bodu 4.5.2 a další den byly připraveny zásobní roztoky ligandů, které byly 1000x ředěny v depletovaném médiu a jako negativní kontrola sloužil roztok 1000x ředěného DMSO v depletovaném médiu. Jednotlivé ligandy o koncentraci uvedené v Tabulce 3 a negativní kontrola byly aplikovány na buňky vždy v pěti opakováních. Poté byly buňky vloženy do inkubátoru po dobu 4, 8, 12, 16 a 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby jednotlivých desek byly provedeny stejné kroky jako v bodě 4.5.5 a nakonec byla pomocí spektrofotometru změřena luminiscence.

4.5.7 Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR v přítomnosti antagonistů

Buňky byly vysety na mikrotitrační desku podle bodu 4.5.2 a další den byla připravena kultivační média obsahující jednotlivé agonisty (TCDD s koncentrací $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, FICZ s koncentrací $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a omeprazol s koncentrací $140 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Pomocí těchto připravených médií byly připraveny zásobní roztoky antagonistů, které byly 1000x ředěny na koncentrace uvedené v Tabulce 4. Připravené roztoky byly nanесeny na mikrotitrační desky a ty byly inkubovány po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly provedeny stejné kroky jako v bodě 4.5.5 a posléze byla pomocí spektrofotometru změřena luminiscence.

4.5.8 Sledování udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci

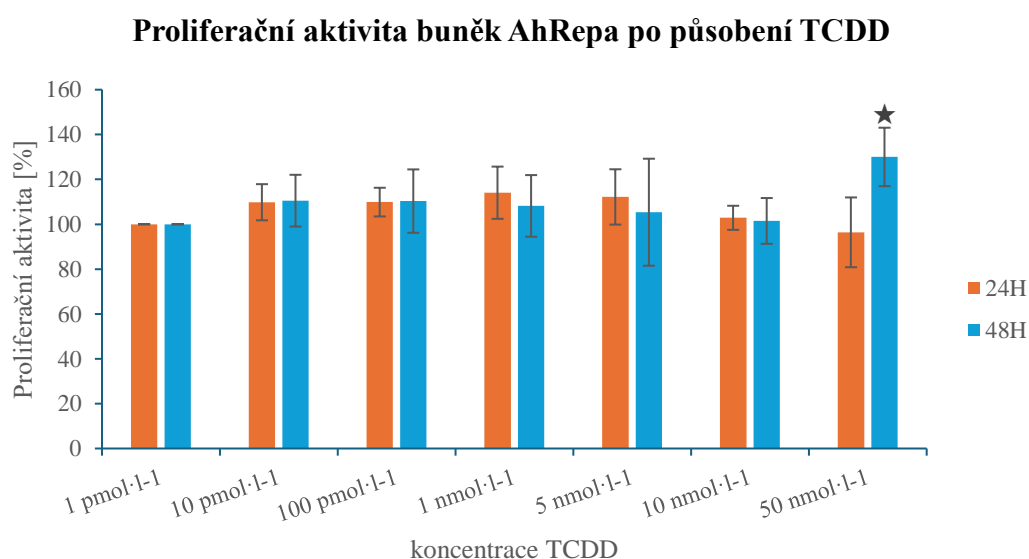
Buňky byly vysety na mikrotitrační destičku podle bodu 4.5.2 a další den byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých ligandů, které byly 1000x ředěny kultivačním médiem do požadované koncentrace uvedené v Tabulce 3. Jako negativní kontrola bylo použito kultivačním médiem 1000x zředěné DMSO. Po aplikaci jednotlivých ligandů a kontroly byly destičky uloženy do inkubátoru po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly provedeny stejné kroky jako v bodě 4.5.5 a poté byla pomocí spektrofotometru změřena luminiscence.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení proliferační aktivity buněk AhRepa pomocí krystalové violeti

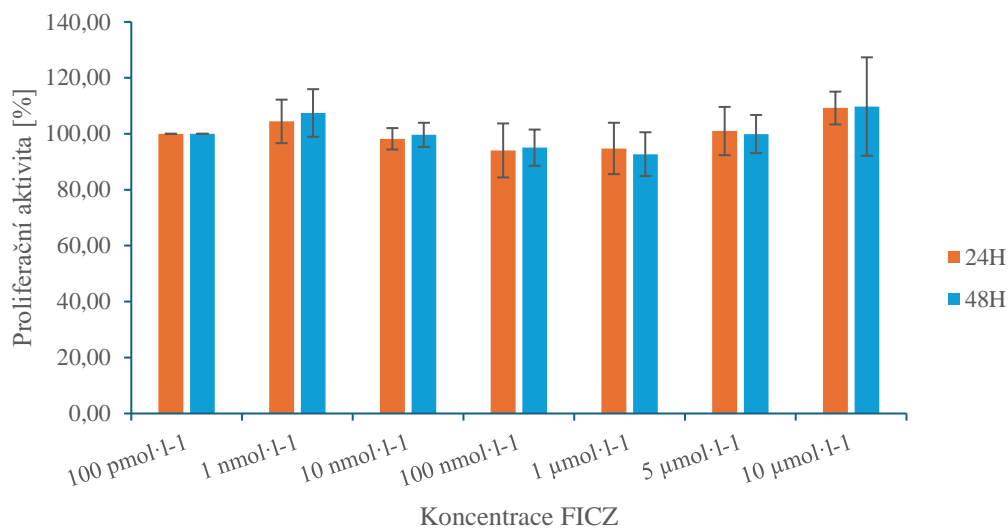
Na buňky AhRepa byly aplikovány ligandy TCDD, FICZ a omeprazol. Byla sledována jejich proliferační aktivita pomocí eseje krystalové violeti v časovém formátu 24 a 48 hodin. TCDD byl aplikován v koncentračním rozmezí $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ podle tabulky 1, FICZ byl aplikován v koncentračním rozmezí $100 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ podle tabulky 1 a omeprazol byl aplikován v rozmezí $100 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ podle tabulky 1. Jako negativní kontrola sloužily nejnižší koncentrace daných ligandů, které představují 100% proliferační aktivitu.

Z naměřených hodnot vyplývá, že u všech použitých ligandů došlo pouze k mírnému poklesu proliferační aktivity buněk, konkrétně u TCDD na $96 \pm 15 \%$ v koncentraci $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách (Graf 1), u FICZ na $93 \pm 8 \%$ v koncentraci $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 48 hodinách (Graf 2) a u omeprazolu na $94 \pm 6 \%$ v koncentraci $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách (Graf 3). Naopak u jediného ligandu TCDD došlo ke zvýšení proliferační aktivity na $130 \pm 13 \%$ v koncentraci $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 48 hodinách (Graf 1).



Graf 1: Sledování vlivu TCDD na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách. Graf schematicky znázorňuje působení TCDD na buňky AhRepa. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku pro 24 hodinové působení (oranžová) a 25 000 buněk na jamku pro 48 hodinové působení (modrá). TCDD byl aplikován v koncentracích $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, která představuje 100% proliferační aktivitu. Pomocí hvězdičky jsou označeny hodnoty signifikance ($p < 0,05$) pomocí studentova t-testu. Uvedené hodnoty jsou průměrem 4 nezávislých experimentů.

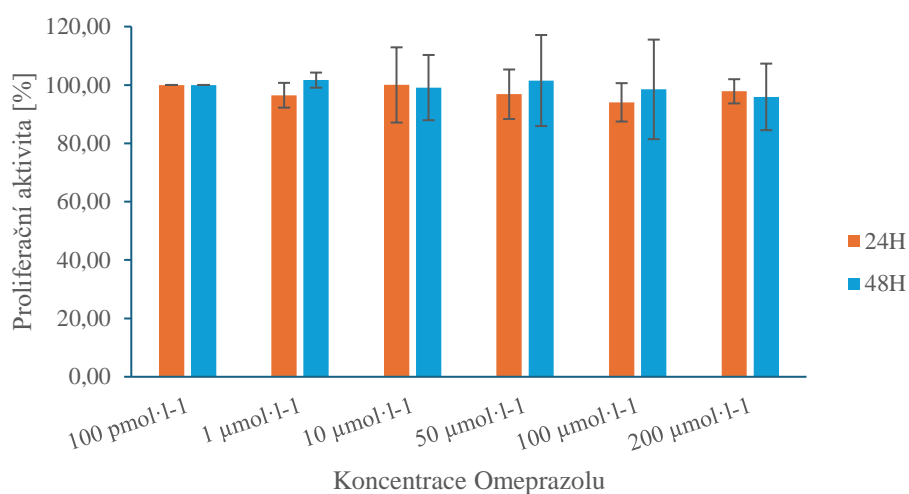
Proliferační aktivita buněk AhRepa po působení FICZ



Graf 2: Sledování vlivu FICZ na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách.

Graf schematicky znázorňuje působení FICZ na buňky AhRepa. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku pro 24 hodinové působení (oranžová) a 25 000 buněk na jamku pro 48 hodinové působení (modrá). FICZ byl aplikován v koncentracích 100 pmol·l⁻¹ – 10 μmol·l⁻¹. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 100 pmol·l⁻¹, která představuje 100% proliferační aktivitu. Pomocí hvězdičky jsou označeny hodnoty signifikance ($p < 0,05$) pomocí studentova t-testu. Uvedené hodnoty jsou průměrem 4 nezávislých experimentů.

Proliferační aktivita buněk AhRepa po působení omeprazolu

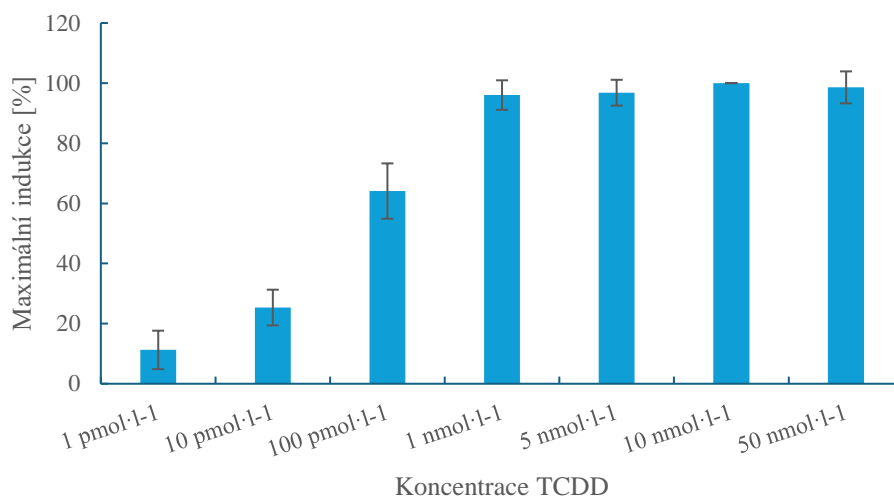


Graf 3: Sledování vlivu omeprazolu na proliferační aktivitu buněk AhRepa po 24 a 48 hodinách. Graf schematicky znázorňuje působení omeprazolu na buňky AhRepa. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku pro 24 hodinové působení (oranžová) a 25 000 buněk na jamku pro 48 hodinové působení (modrá). Omeprazol byl aplikován v koncentracích 100 pmol·l⁻¹ – 200 μmol·l⁻¹. Výsledky jsou vztaheny k nejnižší koncentraci 100 pmol·l⁻¹, která představuje 100% proliferační aktivitu. Pomocí hvězdičky jsou označeny hodnoty signifikance (p<0,05) pomocí studentova t-testu. Uvedené hodnoty jsou průměrem 4 nezávislých experimentů.

5.2 Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu

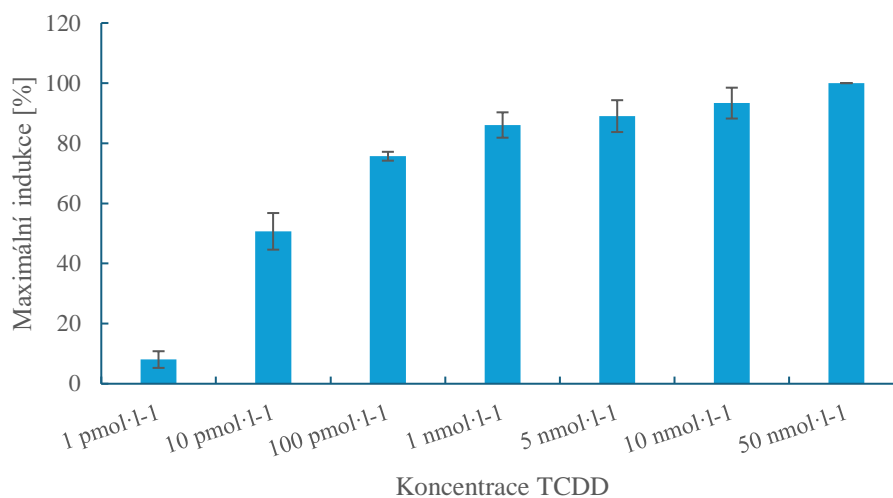
Vybrané ligandy TCDD, FICZ a omeprazol byly aplikovány na buňky AhRepa za účelem stanovení změny transkripční aktivity v závislosti na koncentraci ligandu. Buňky byly v přítomnosti ligandů inkubovány 4, 24 a 48 hodin. TCDD byl testován v rozmezí koncentrací 1 pmol·l⁻¹ až 50 nmol·l⁻¹ podle tabulky 2. Ve 4hodinovém formátu znatelně vzrůstala transkripční aktivita AhR již při koncentraci 10 pmol·l⁻¹ a svého maxima dosáhla již při koncentraci 1 nmol·l⁻¹ s tím, že společně s následujícími koncentracemi 5, 10 a 50 nmol·l⁻¹ bylo dosaženo přibližně stejné aktivity (Graf 4). U 24hodinového formátu byl zaznamenán kontinuální nárůst transkripční aktivity AhR s maximem v koncentraci 50 nmol·l⁻¹ (Graf 5). Ve 48hodinovém formátu byla taktéž zaznamenána zvyšující se transkripční aktivita AhR v závislosti na koncentraci s maximem opět v koncentraci 50 nmol·l⁻¹. Ovšem v koncentraci 5 nmol·l⁻¹ byl pozorován propad na 74 ± 11 % oproti předchozí koncentraci 1 nmol·l⁻¹, která vykazovala 83 ± 16% maximální odpověď (Graf 6).

Transkripční aktivita AhR po 4 hodinách působení TCDD



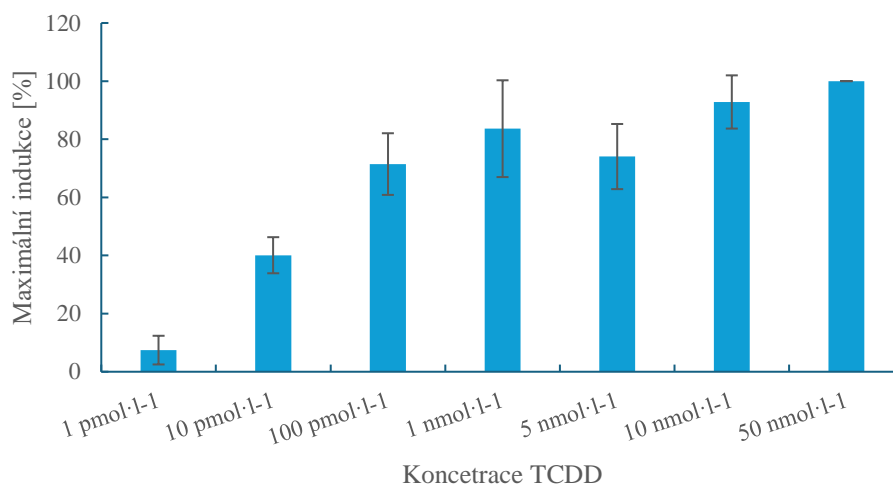
Graf 4: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení TCDD. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. TCDD bylo aplikováno v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 50 nmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace TCDD vztažena ke koncentraci 10 nmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

Transkripční aktivita AhR po 24 hodinách působení TCDD



Graf 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení TCDD. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. TCDD bylo aplikováno v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 50 nmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace TCDD vztažena ke koncentraci 50 nmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

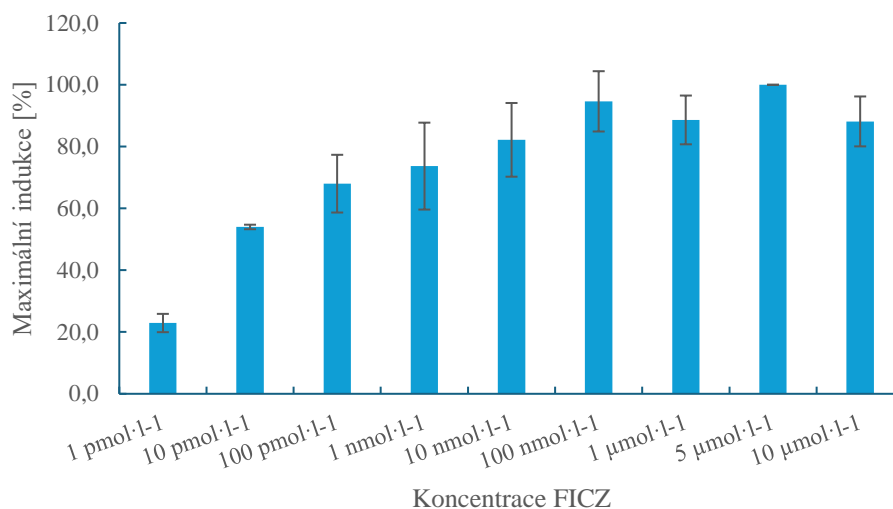
Transkripční aktivita AhR po 48 hodinách působení TCDD



Graf 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení TCDD. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku. TCDD bylo aplikováno v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 50 nmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace TCDD vztažena ke koncentraci 50 nmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

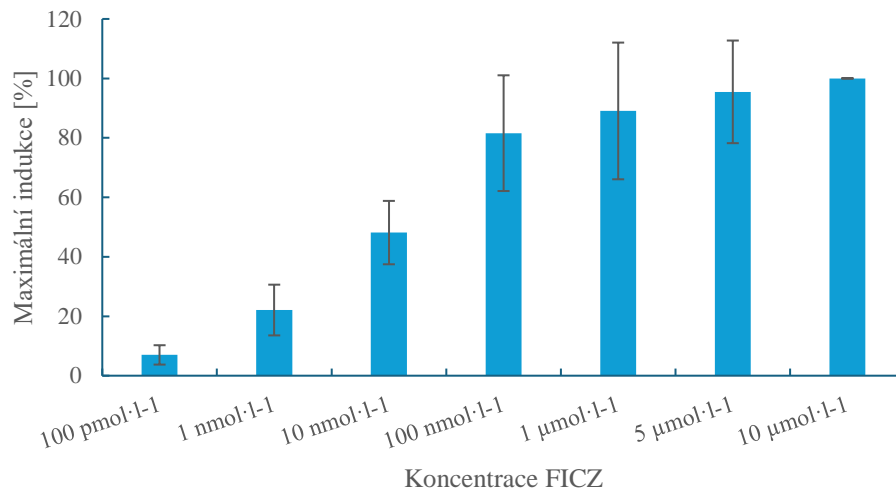
FICZ byl testován v rozmezí koncentrací 1 pmol·l⁻¹ až 10 μmol·l⁻¹ po 4 hodinách inkubace. Po 24 a 48 hodinách inkubace byl testován v rozmezí koncentrací 100 pmol·l⁻¹ až 10 μmol·l⁻¹. Po 4 hodinách inkubace byla zaznamenán znatelný nárůst transkripční aktivity již v koncentraci 10 pmol·l⁻¹ a maximální indukce bylo dosaženo v koncentraci 5 μmol·l⁻¹, po které už míra indukce opět klesla na 88 ± 8 % v koncentraci 10 μmol·l⁻¹ (Graf 7). Po 24 hodinách inkubace byl pozorován znatelný nárůst indukce v koncentraci 10 nmol·l⁻¹ a nejvyšších indukcí bylo dosaženo v koncentracích 5 a 10 μmol·l⁻¹ (Graf 8). Po 48 hodinách inkubace se oproti 24 hodinám inkubace koncentrace 100 nmol·l⁻¹ a 1 μmol·l⁻¹ pohybují v 60% maximální odpovědi a až koncentrace 5 a 10 μmol·l⁻¹ představují maximum (Graf 9).

Transkripční aktivita AhR po 4 hodinách působení FICZ



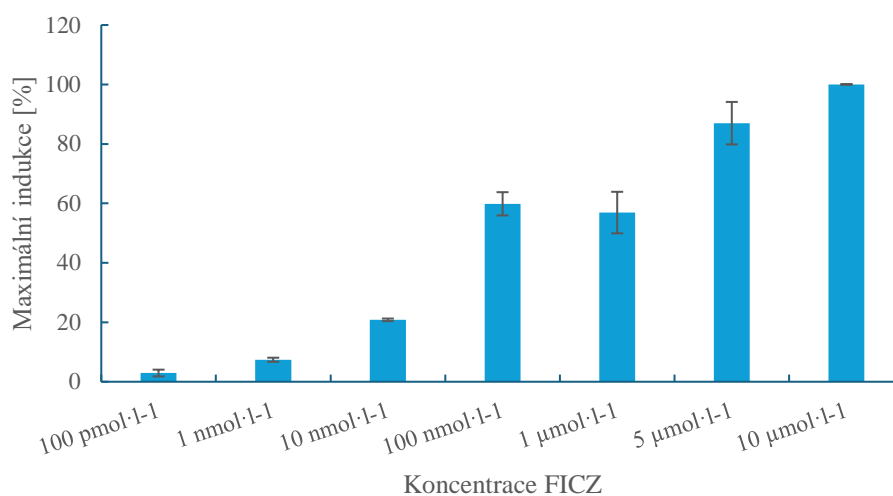
Graf 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení FICZ. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. FICZ byl aplikován v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 10 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace FICZ vztažena ke koncentraci 5 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

Transkripční aktivita AhR po 24 hodinách působení FICZ



Graf 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení FICZ. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. FICZ byl aplikován v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 10 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace FICZ vztažena ke koncentraci 10 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

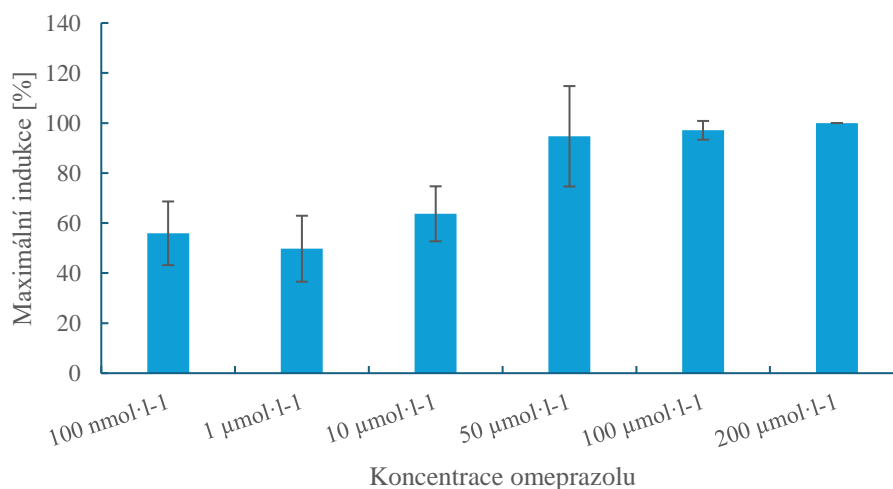
Transkripční aktivita AhR po 48 hodinách působení FICZ



Graf 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení FICZ. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku. FICZ byl aplikován v koncentracích 1 pmol·l⁻¹ – 10 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace FICZ vztažena ke koncentraci 10 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

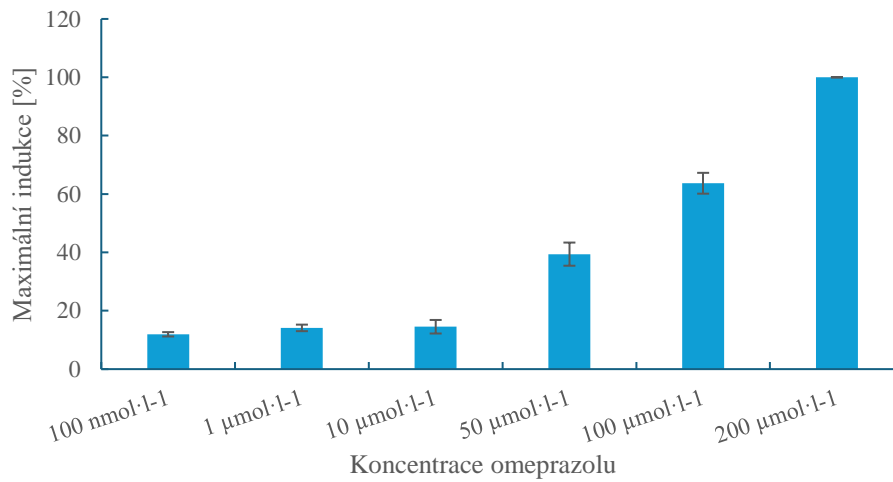
Omeprazol byl testován v rozmezí koncentrací 100 nmol·l⁻¹ až 200 μmol·l⁻¹ podle Tabulky 2 ve všech časech inkubace. Po 4 hodinách inkubace se transkripční aktivita AhR pohybovala v rozmezí 50-60 % maximální aktivity u prvních tří koncentrací (100 nmol·l⁻¹, 1 a 10 μmol·l⁻¹) a maxima bylo dosaženo u koncentrací 50, 100 a 200 μmol·l⁻¹. Po 24 hodinách inkubace byl zaznamenán nárůst luciferázové aktivity v koncentracích 50 a 100 μmol·l⁻¹ s maximem v koncentraci 200 μmol·l⁻¹. Po 48 hodinách inkubace byla pozorována kontinuálně se zvyšující indukce luciferázové aktivity s maximem opět v koncentraci 200 μmol·l⁻¹.

Transkripční aktivita AhR po 4 hodinách působení omeprazolu

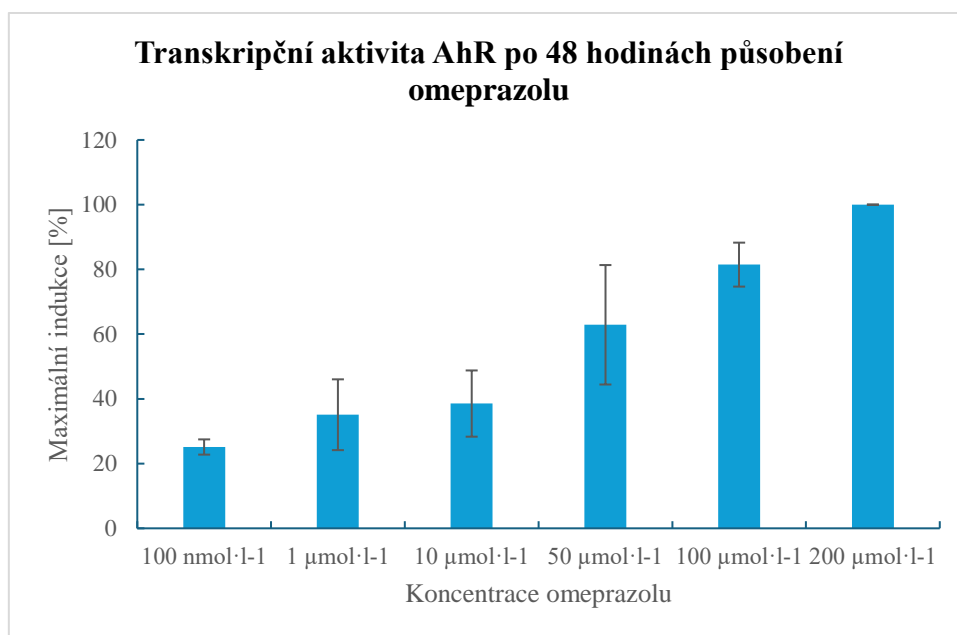


Graf 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hodinách působení omeprazolu. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. Omeprazol byl aplikován v koncentracích 100 nmol·l⁻¹ – 200 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace omeprazolu vztažena ke koncentraci 200 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

Transkripční aktivita AhR po 24 hodinách působení omeprazolu



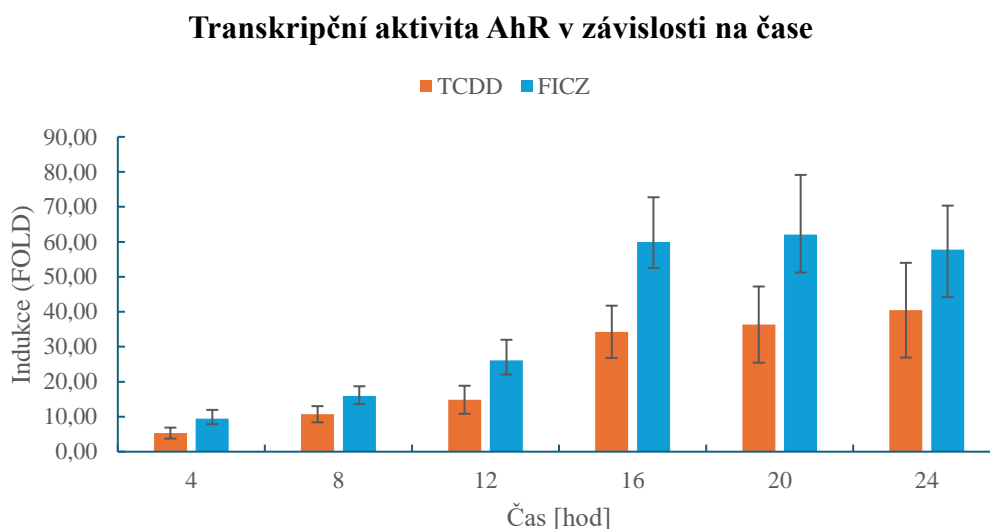
Graf 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hodinách působení omeprazolu. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. Omeprazol byl aplikován v koncentracích 100 nmol·l⁻¹ – 200 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace omeprazolu vztažena ke koncentraci 200 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.



Graf 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hodinách působení omeprazolu. Graf schematicky znázorňuje zvyšující se indukci transkripční aktivity AhR. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku. Omeprazol byl aplikován v koncentracích 100 nmol·l⁻¹ – 200 μmol·l⁻¹. Indukce luciferázové aktivity je pro jednotlivé koncentrace omeprazolu vztažena ke koncentraci 200 μmol·l⁻¹, která představuje 100% indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

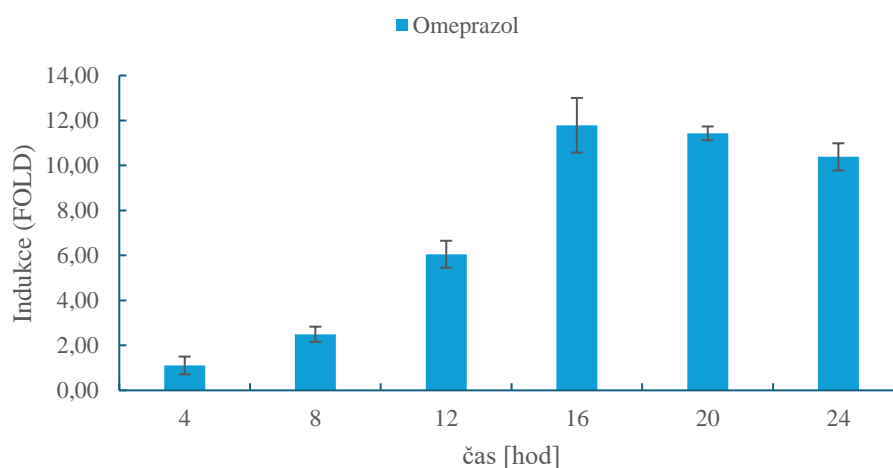
5.3 Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase

Pro stanovení transkripční aktivity AhR v čase byly použity koncentrace jednotlivých látek odpovídající jejich hodnotám EC_{80} v čase 24 hodin, které byly stanoveny na základě výsledků z předešlých analýz pomocí programu GraphPad. TCDD bylo aplikováno v koncentraci $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, FICZ v koncentraci $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a omeprazol v koncentraci $140 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz. Tabulka 3). Buňky byly testovány v časech 4, 8, 12, 16, 20 a 24 hodin. Transkripční aktivita se zvyšovala se zvyšujícím se časem inkubace u TCDD s maximální indukcí $40 \pm 13,54 \text{ FOLD}$ v čase 24 hodin (Graf 13). U omeprazolu došlo ke zvyšování transkripční aktivity do 16 hodin, kdy bylo dosaženo maximální odpovědi $11,79 \pm 1,22 \text{ FOLD}$ (Graf 14). U látky FICZ bylo dosaženo maximální indukce v čase 20 hodin, konkrétně $62 \pm 17 \text{ FOLD}$ (Graf 13).



Graf 13: Stanovení transkripční aktivity AhR pomocí ligandů TCDD a FICZ v čase. Graf schematicky znázorňuje transkripční aktivitu AhR v závislosti na čase. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci $40\ 000$ na jamku pro 4, 8, 12, 16, 20 a 24 hodin působení TCDD v koncentraci $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (oranžová) a FICZ v koncentraci $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (modrá). Tyto výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

Transkripční aktivita AhR v závislosti na čase



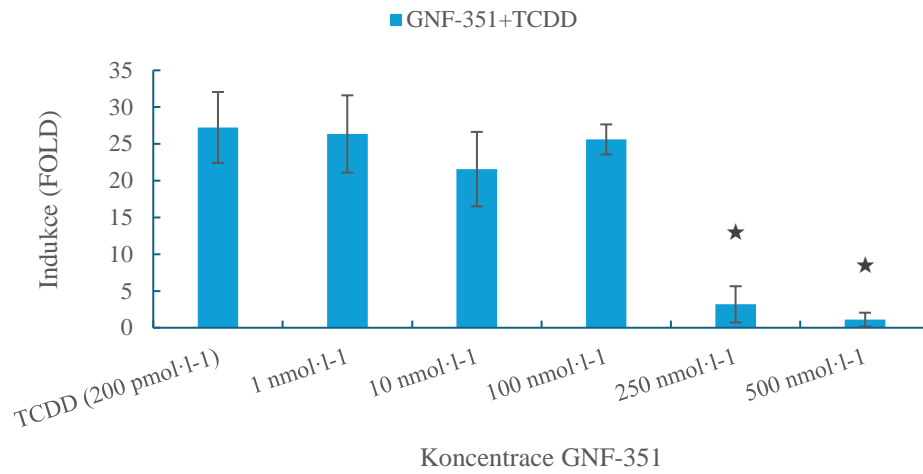
Graf 14: Stanovení transkripční aktivity AhR pomocí ligandu omeprazol v čase. Graf schematicky znázorňuje transkripční aktivitu AhR v závislosti na čase. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku pro 4, 8, 12, 16, 20 a 24 hodin působení omeprazolu v koncentraci $140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

5.4 Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů

Použitím luciferázové reportérové eseje byla stanovena inhibiční aktivita vybraných antagonistů GNF-351 a CH223191 v přítomnosti ligandů TCDD (koncentrace $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$), FICZ (koncentrace $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a omeprazolu (koncentrace $140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

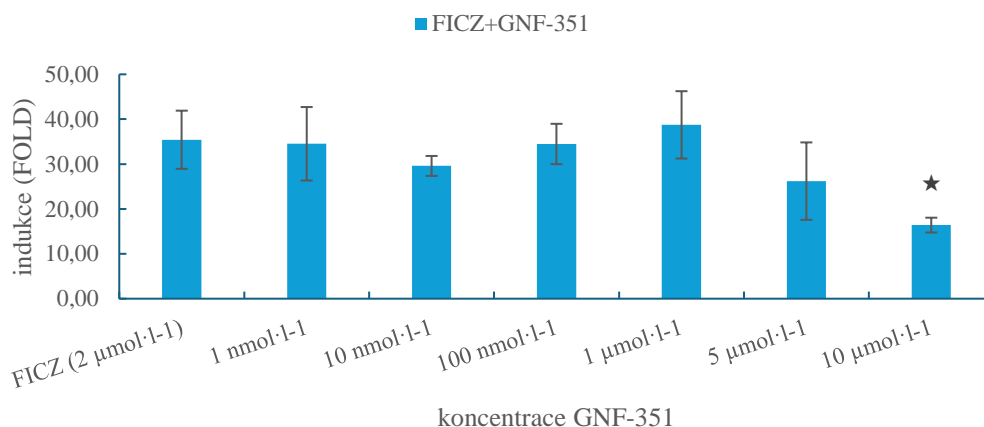
Látka GNF-351 byla testována v koncentracích 1, 10, 100, 250 a $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v přítomnosti TCDD. V přítomnosti FICZ byla testována v koncentracích 1, 10, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1, 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v přítomnosti omeprazolu byla testována v koncentracích 10, $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1, 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Látka GNF-351 způsobila v koncentracích 250 a $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ signifikantní a téměř 100% inhibici TCDD indukované luciferázové aktivity (Graf 15). Luciferázová aktivita vyvolaná FICZ byla v přítomnosti $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GNF-351 signifikantně snížena na 46 % (Graf 16). V přítomnosti omeprazolu byl sledován pokles transkripční aktivity AhR u koncentrací 1, 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GNF-351, z čehož snížení při koncentracích 1 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo signifikantní (Graf 17).

Inhibice transkripční aktivity AhR po působení GNF-351



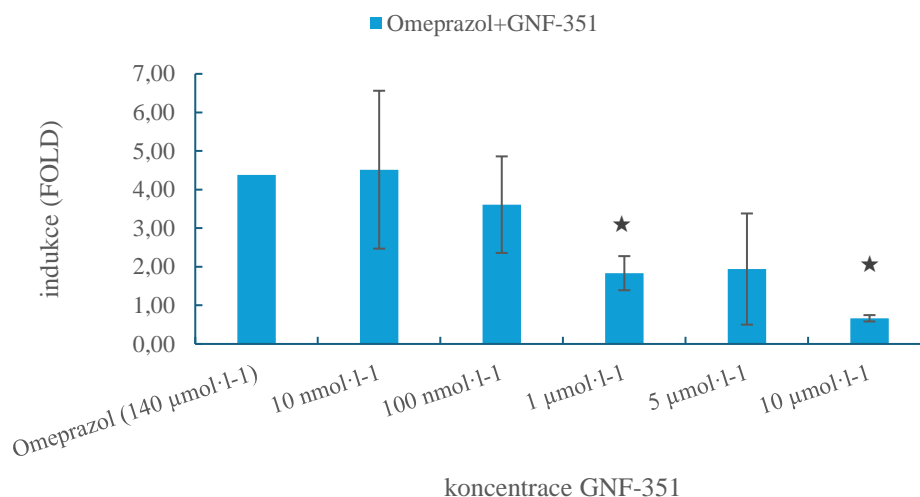
Graf 15: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti TCDD. Graf schematicky znázorňuje inhibici transkripční aktivity AhR antagonistou GNF-351 v přítomnosti TCDD v koncentraci 200 pmol·l⁻¹. GNF-351 byl aplikován v koncentracích 1 nmol·l⁻¹ – 500 nmol·l⁻¹ po dobu 24 hodin. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty significance ($p < 0,05$) pomocí studentova t-testu. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

Inhibice transkripční aktivity AhR po působení GNF-351



Graf 16: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti FICZ. Graf schematicky znázorňuje inhibici transkripční aktivity AhR antagonistou GNF-351 v přítomnosti FICZ v koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. GNF-351 byl aplikován v koncentracích $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty signifikance ($p < 0,05$) pomocí studentova t-testu. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

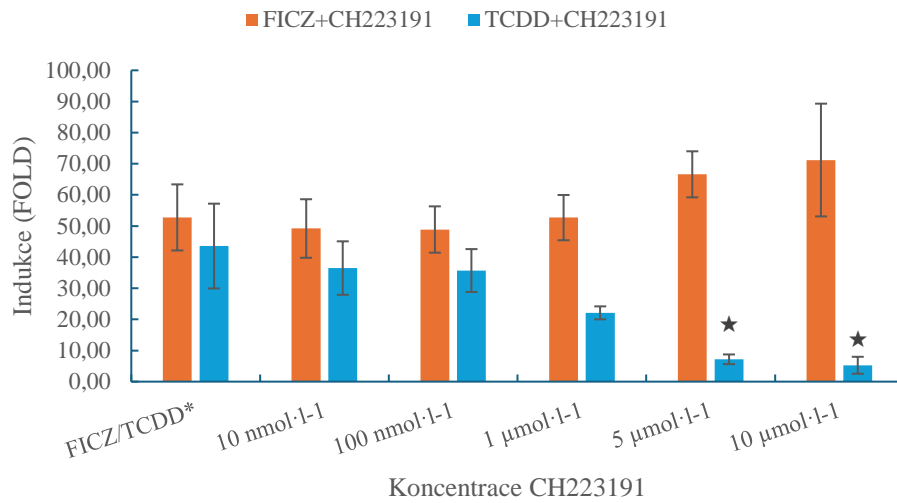
Inhibice transkripční aktivity AhR po působení GNF-351



Graf 17: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty GNF-351 v přítomnosti omeprazolu. Graf schematicky znázorňuje inhibici transkripční aktivity AhR antagonistou GNF-351 v přítomnosti omeprazolu v koncentraci 140 µmol·l⁻¹. GNF-351 byl aplikován v koncentracích 1 nmol·l⁻¹ – 5 µmol·l⁻¹ po dobu 24 hodin. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty signifikance (p<0,05) pomocí studentova t-testu. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

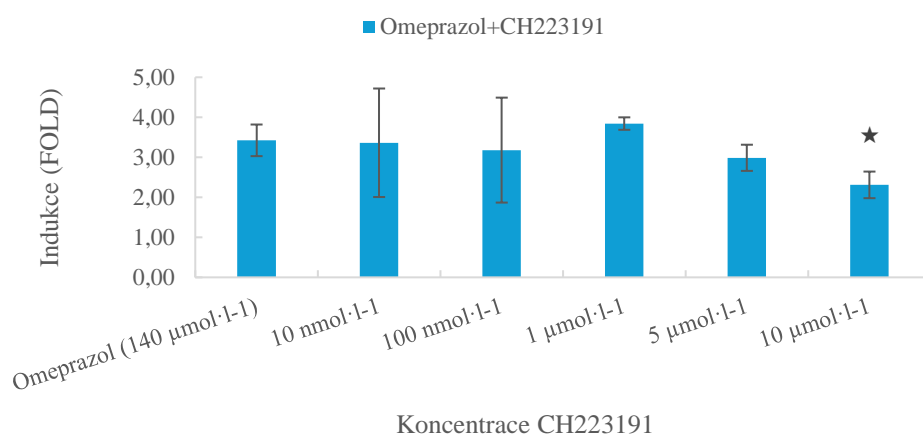
Látka CH223191 byla testována ve stejných koncentracích 10, 100 nmol·l⁻¹, 1, 5 a 10 µmol·l⁻¹ pro TCDD, FICZ i omeprazol. Látka CH223191 je selektivním antagonistou TCDD a jiných halogenovaných aromatických uhlovodíků a zdatně inhibovala transkripční aktivitu AhR v přítomnosti TCDD již při koncentraci 1 µmol·l⁻¹. Při koncentracích 5 a 10 µmol·l⁻¹ byla pozorována signifikantní inhibice TCDD-indukované luciferázové aktivity, která dosahovala přibližně 95 % maximální aktivity (Graf 18). V přítomnosti látky FICZ nebyla pozorována žádná inhibice transkripční aktivity AhR (Graf 18) a v přítomnosti omeprazolu byl pozorován lehký, nicméně signifikantní pokles indukce v koncentraci 10 µmol·l⁻¹ na 2,31 ± 0,33 FOLD oproti 3,42 ± 0,39 FOLD u omeprazolu v koncentraci 140 µmol·l⁻¹ bez přítomného CH223191 (Graf 20).

Inhibice transkripční aktivity AhR po působení CH223191



Graf 18: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191 v přítomnosti TCDD nebo FICZ. Graf schematicky znázorňuje inhibici transkripční aktivity AhR antagonistou CH223191 v přítomnosti *TCDD o koncentraci $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (modrá) nebo *FICZ o koncentraci $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (oranžová). CH223191 byl testován v koncentracích $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty signifikance ($p < 0,05$) pomocí studentova t-testu. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

Inhibice transkripční aktivity AhR po působení CH223191



Graf 19: Stanovení inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191

v přítomnosti omeprazolu. Graf schematicky znázorňuje inhibici transkripční aktivity AhR antagonistou CH223191 v přítomnosti omeprazolu v koncentraci 140 µmol·l⁻¹. CH223191 byl testován v koncentracích 10 nmol·l⁻¹ – 10 µmol·l⁻¹ po dobu 24 hodin. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 buněk na jamku. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty signifikance (p<0,05) pomocí studentova t-testu. Zobrazené výsledky jsou průměrem třech nezávislých experimentů.

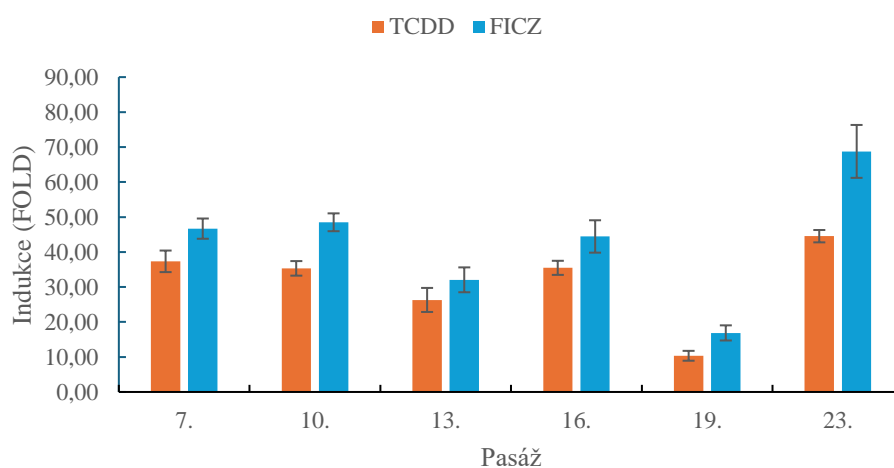
5.5 Vliv dlouhodobé kultivace na luciferázovou aktivitu

Dlouhodobou kultivací buněk může dojít k ovlivnění funkce dané reportérové linie, příkladem je ztráta luciferázové aktivity. Na buňky byly v každé třetí pasáži aplikovány ligandy TCDD v koncentraci 200 pmol·l⁻¹, FICZ v koncentraci 2 µmol·l⁻¹ a omeprazol v koncentraci 140 µmol·l⁻¹ a po 24hodinové inkubaci byla stanovena luciferázová aktivita. Dohromady byl tento experiment proveden šestkrát a celková doba kultivace buněk byla 58 dní. Výsledné hodnoty indukce jsou uvedeny v Tabulce 5 a jsou graficky znázorněny v Grafech 20 a 21.

Tabulka 5: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu.

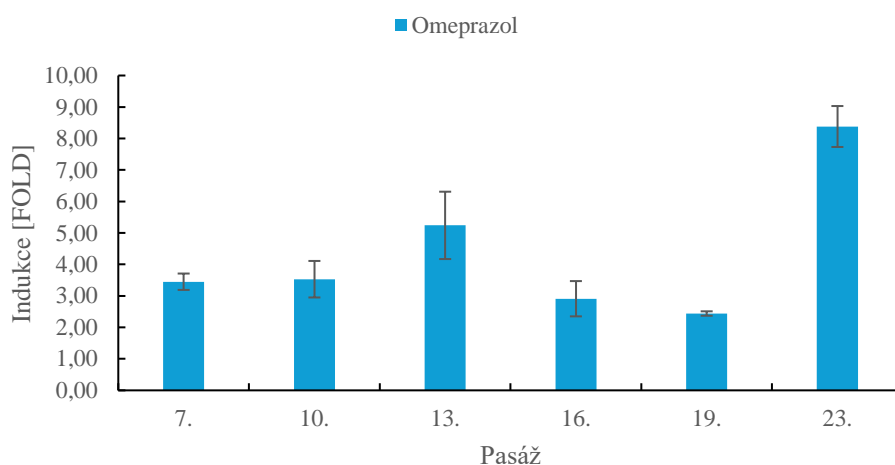
pasáž	počet dní v kultuře	TCDD	FICZ	Omeprazol
		[FOLD ± SD]	[FOLD ± SD]	[FOLD ± SD]
7.	21	37,34 ± 3,08	46,68 ± 2,89	3,45 ± 0,26
10.	28	35,33 ± 2,08	48,50 ± 2,55	3,53 ± 0,58
13.	35	26,30 ± 3,43	32,06 ± 3,55	5,24 ± 1,07
16.	42	35,48 ± 2,02	44,45 ± 4,63	2,91 ± 0,56
19.	49	10,34 ± 1,41	16,88 ± 2,16	2,44 ± 0,07
23.	58	44,53 ± 1,77	68,76 ± 7,56	8,38 ± 0,65

Transkripční aktivita AhR při dlouhodobé kultivaci



Graf 20: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu po působení TCDD nebo FICZ. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po 24 hodinách působení TCDD v koncentraci 200 pmol·l⁻¹ (oranžová) a FICZ v koncentraci 2 μmol·l⁻¹ (modrá). Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku. Celkem bylo měřeno 6 pasáží a doba kultivace činila 58 dní.

Transkripční aktivita AhR při dlouhodobé kultivaci



Graf 21: Vliv dlouhodobé kultivace buněk AhRepa na luciferázovou aktivitu po působení omeprazolu. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po 24 hodinách působení omeprazolu v koncentraci $140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky AhRepa byly vysety v koncentraci 40 000 na jamku. Dohromady bylo měřeno 6 pasáží a celková doba kultivace činila 58 dní.

Na základě výsledků experimentu měření luciferázové aktivity byl sledován mírný pokles indukce v 13. pasáži u ligandů TCDD a FICZ a prudký pokles indukce v 19. pasáži u všech testovaných ligandů. U ligandu TCDD se ve 13. pasáži snížila indukce z původních $37,34 \pm 3,08$ FOLD ze 7. pasáže na $26,30 \pm 3,43$. Podobný pokles v 13. pasáži byl pozorován i u FICZ, kdy se indukce snížila na $32,06 \pm 3,55$ FOLD z $46,68 \pm 2,89$ v 7. pasáži. V 19. pasáži byl pozorován prudký pokles indukce u TCDD, FICZ i omeprazolu (Graf 20 a 21). Na základě toho, že u 19. pasáže indukce luciferázové aktivity výrazně klesla u všech těchto ligandů, byl proveden experiment ještě ve 23. pasáži pro zajištění faktu, že buněčná linie neztratila luciferázovou aktivitu v dlouhodobé kultivaci. Naměřené indukce ukazují, že se v případě 19. pasáže mohlo jednat o pipetovací chybu, jelikož pozorované indukce se v 23. pasáži opět zvýšily na podobné hodnoty, jako v pasážích předchozích. Konkrétně pro TCDD $44,53 \pm 1,77$ FOLD, FICZ $68,76 \pm 7,56$ FOLD a omeprazol $8,38 \pm 0,65$.

Na základě zjištěných výsledků je tedy evidentní, že dlouhodobá kultivace buněk AhRepa neovlivňuje luciferázovou aktivitu.

6 DISKUSE

AhR je ligand dependentní transkripční faktor, kterým disponují téměř všichni obratlovci. AhR reguluje biologické a toxické procesy indukované toxickými environmentálními kontaminanty nebo ligandy endogenního původu (Denison a Whitlock 1995). Ke zjištění, zda daná látka aktivuje tento receptor, byly vyvinuty transgenní buněčné reportérové systémy, které se vyznačují plazmidem nesoucím sekvenční vazbu příslušného receptoru s reportérovým genem, nejčastěji luciferázou, který je vložen do dané buněčné linie. Takovému vložení cizího genu do zvolené buněčné linie se říká transfekce. Existují buď přechodně nebo stabilně transfekované buněčné reportérové linie. Stabilní buněčné linie, ačkoliv časově a materiálně náročné na konstrukci, mají oproti transiентní transfekci mnoho výhod, zejména pak to, že není nutností transfekovat buňky před experimentem a díky antibiotické selekci je zajištěno, že všechny buňky v kultuře jsou transfekované (Novotna et al. 2011).

Existuje několik buněčných reportérových linií pro stanovení transkripční aktivity AhR. Z toho většina pochází z hlodavčích rakovinných buněk. Nejznámějšími systémy odvozenými od hlodavčích buněk jsou CALUX systém používající krysí H4IIE buňky (Murk et al. 1996) nebo systémy využívající myší buňky Hepa-1c1c7, jako je Dr-EcoScreen (Kojima et al. 2018) nebo CALUX (G3) třetí generace (He et al. 2011). Protože mezi lidským a hlodavčím AhR existují strukturální rozdíly, které ovlivňují afinitu některých ligandů a míru transkripční aktivity AhR (Ramadoss a Perdew 2004), byla v této práci charakterizována stabilně transfekovaná reportérová linie AhRepa odvozená od myší buněčné linie Hepa-1c1c7 a srovnána s jinými reportérovými systémy, buď s hlodavčími či lidskými.

Transkripční aktivita AhR rostla se zvyšující se koncentrací u všech použitých ligandů. Indukce luciferázové aktivity v buňkách AhRepa byla pozorována po působení TCDD, FICZ a omeprazolu. U TCDD byl pozorován nárůst luciferázové aktivity blížící se 100% odpovědi už při koncentraci $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v časech 4, 24 i 48 hod. Podobné výsledky byly publikované i ve studii popisující CALUX G3 linii, kde byla stanovena maximální luciferázová aktivita také v koncentraci $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ po 24 hodinách působení TCDD (He et al. 2011). Pro srovnání s lidskou buněčnou linií AZ-AhR byla téměř maximální luciferázová aktivita po 24 hodinách působení TCDD sledována až v koncentraci $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Novotna et al. 2011), tedy o celý řád výš. Zajímavý je také fakt, že ve studii Kikuchi et al. 1996 testovali indukci transkripční aktivity AhR pomocí omeprazolu v myších buňkách Hepa-1 a zjistili, že vlivem tohoto ligandu nedochází k indukci transkripční aktivity (Kikuchi et al. 1996). V této práci se nám však podařilo pozorovat vliv omeprazolu na transkripční aktivitu AhR, která však byla v porovnání

s TCDD nebo FICZ výrazně nižší. Konkrétně omeprazol v koncentraci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolal po 48 hod působení indukce od 4,3 po 10,4 FOLD, což odpovídalo přibližně 5 – 10 % indukce vyvolané TCDD či FICZ. FICZ zvyšoval transkripční aktivitu AhR s rostoucí koncentrací. Ve srovnání s buněčnou linií HaCat odvozenou od lidských kožních buněk byl nárůst luciferázové aktivity pozorován v AhRepa linii již v koncentraci $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách působení oproti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách působení v AhRaCat linii (Rogožanová 2023).

V buněčné linii AhRepa byla také sledována transkripční aktivita po působení modelových ligandů v závislosti na čase. U ligandů TCDD a omeprazolu bylo možno pozorovat indukcii luciferázové aktivity už po 4 hodinách působení oproti 6 hodinám v lidských buňkách AZ-AHR odvozených od HepG2 (Novotna et al. 2011). FICZ indukoval luciferázovou aktivitu také po 4 hodinách působení s maximem indukce po 24 hodinách. Podobnou FICZ-indukovanou luciferázovou aktivitu v čase sledovala ve své práci z roku 2023 Lucie Rogožanová v buněčné linii AhRaCat (Rogožanová 2023).

Dále byla sledována inhibice luciferázové aktivity pomocí antagonistů GNF-351 a CH223191. GNF-351 inhiboval luciferázovou aktivitu u ligandů TCDD, FICZ i omeprazolu. U TCDD došlo k téměř 100 % inhibici aktivity AhR již při koncentraci $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GNF-351. U látek FICZ a omeprazolu pak byl sledován pokles transkripční aktivity o 46 % v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro FICZ a o 85 % v koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro omeprazol. Smith et al. publikovali v roce 2011 studii zaměřující se na rozdílný antagonistický efekt GNF-351 v přítomnosti TCDD v myších H1L1.1c2 buňkách a lidských HepG2 buňkách. V jejich studii GNF-351 začalo antagonizovat TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu u myších buněk při koncentraci $150 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a podobně jako v této práci téměř kompletně antagonizovalo při koncentracích 250 a $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V lidských buňkách GNF-351 antagonizovalo již v koncentraci $15 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což podporuje fakt, že myší buňky mají zhruba 10x vyšší afinitu k vazbě TCDD na AhR než buňky lidské (Smith et al. 2011). CH223191 je selektivní antagonist a vůči TCDD a antagonizoval TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu v koncentracích 1, 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V experimentech s omeprazolem byla pozorována pouze částečná inhibice v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v přítomnosti látky FICZ docházelo dokonce k nárůstu transkripční aktivity AhR po souběžném působení s CH223191 v koncentracích 1, 5 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Podobný efekt byl popsán i v práci Ondrové et al., 2023, kdy v lidských buňkách AZ-AHR také pozorovali nárůst FICZ-indukované luciferázové aktivity v přítomnosti CH223191 v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ondrová et al. 2023). Příčinou zvýšení indukce luciferázové aktivity by v tomto případě mohla být zvýšená proliferace buněk po působení CH223191 ve vyšších koncentracích (Choi et al. 2012). Ve studii publikované v roce 2010 byl

sledován vliv CH223191 na inhibici TCDD-indukované transkripční aktivity AhR v myších buňkách H1L1.1c2. V této publikaci byl CH223191 aplikován na buňky v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a inhiboval TCDD v koncentracích od $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po $100 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V koncentraci $100 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD byla v přítomnosti $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CH223191 sledována 100% inhibice transkripční aktivity AhR (Zhao et al. 2010), což je srovnatelné s linií AhRepa, kdy byla také sledována téměř 100% inhibice TCDD-indukované transkripční aktivity AhR po působení CH223191 v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Posledním bodem charakterizace linie AhRepa bylo sledování luciferázové aktivity po působení TCDD, FICZ a omeprazolu při dlouhodobé kultivaci buněk. Buněčná linie AhRepa si, podobně jako linie AZ-AhR (Novotna et al. 2011), linie AhRaCat (Rogožanová 2023) nebo linie LS174-AhR (Sirotová 2022), stabilně udržela luciferázovou aktivitu i po dobu 58 dní v kultuře, kdy kromě pár výkyvů FOLD indukci nedošlo k viditelnému poklesu transkripční aktivity AhR.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat novou reportérovou buněčnou linii AhRepa derivovanou z myších buněk Hepa-1c1c7. V teoretické části práce byly popsány typy používaných reportérových genů a reportérových systémů, byl vysvětlen rozdíl mezi transfekcí transientní a stabilní a byl popsán AhR včetně jeho exprese v různých orgánech a odlišnosti mezi jeho lidskou a myší formou. V praktické části této práce byla charakterizována buněčná linie AhRepa sloužící ke stanovení transkripční aktivity AhR. Pomocí krystalové violeti byla určena proliferační aktivita buněk pro použité ligandy TCDD, FICZ a omeprazol. Následně byla pomocí luciferázové reportérové eseji stanovena závislost indukce luciferázové aktivity na koncentraci ligandu. Na základě těchto výsledků byly určeny hodnoty EC_{80} pro jednotlivé ligandy po 24 hod působení: TCDD $200 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, FICZ $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro omeprazol $140 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ligandy v těchto koncentracích byly podrobeny časové analýze, kdy se ukázalo, že buňky mají zvýšenou transkripční aktivitu již po 4 hodinách expozice ligandem. Dále byla sledována inhibice luciferázové aktivity způsobená selektivními antagonisty, kdy bylo zjištěno, že CH223191 v koncentracích 1, 5 a $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ selektivně inhibovalo TCDD a také byla pozorována inhibice omeprazolu v koncentraci $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. GNF-351 inhibovalo všechny použité ligandy. Inhibice byla sledována u TCDD indukované luciferázové aktivity již při koncentraci $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, FICZ při koncentraci $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a omeprazol při koncentraci $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nakonec byl sledován vliv dlouhodobé kultivace buněčné linie na její luciferázovou aktivitu, kdy bylo stanoveno, že je linie zcela funkční i po 58 dnech v kultuře, což odpovídá 23 pasážím.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALAM, J. a J. L. COOK, 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry* [online]. **188**(2), 245–254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(90)90601-5

ALTON, N. K. a D. VAPNEK, 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* [online]. **282**(5741), 864–869. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/282864a0

ANTONSSON, C, M L WHITELAW, J MCGUIRE, J A GUSTAFSSON a L POELLINGER, 1995. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Molecular and Cellular Biology*. **15**(2), 756–765. ISSN 0270-7306.

AUJLA, Shean J., Yvonne R. CHAN, Mingquan ZHENG, Mingjian FEI, David J. ASKEW, Derek A. POCIASK, Todd A. REINHART, Florencia MCALLISTER, Jennifer EDEAL, Kristi GAUS, Shahid HUSAIN, James L. KREINDLER, Patricia J. DUBIN, Joseph M. PILEWSKI, Mike M. MYERBURG, Carol A. MASON, Yoichiro IWAKURA a Jay K. KOLLS, 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine* [online]. **14**(3), 275–281. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm1710

BALDWIN, Thomas O, Jon A CHRISTOPHER, Frank M RAUSHEL, James F SINCLAIR, Miriam M ZIEGLER, Andrew J FISHER a Ivan RAYMENT, 1995. Structure of bacterial luciferase. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. **5**(6), 798–809. ISSN 0959-440X. Dostupné z: doi:10.1016/0959-440X(95)80014-X

BANSAL, Tarun, Robert C. ALANIZ, Thomas K. WOOD a Arul JAYARAMAN, 2010. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **107**(1), 228–233. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0906112107

BANSAL, Vasudha a Ki-Hyun KIM, 2015. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International* [online]. **84**, 26–38. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2015.06.016

BRADLAW, J. A. a J. L. CASTERLINE, 1979. Induction of enzyme activity in cell culture: a rapid screen for detection of planar polychlorinated organic compounds. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. **62**(4), 904–916. ISSN 0004-5756.

BRONSTEIN, I., J. FORTIN, P. E. STANLEY, G. S. A. B. STEWART a L. J. KRICKA, 1994. Chemiluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assays. *Analytical Biochemistry* [online]. **219**(2), 169–181. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1994.1254

CARVER, Lucy A. a Christopher A. BRADFIELD, 1997. Ligand-dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor with a Novel Immunophilin Homolog in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(17), 11452–11456. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.17.11452

COX, Marc B. a Charles A. MILLER, 2004. Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress & Chaperones* [online]. **9**(1), 4–20. ISSN 1355-8145, 1466-1268. Dostupné z: doi:10.1379/1466-1268(2004)009<0004:COHSPA>2.0.CO;2

CUBITT, A. B., R. HEIM, S. R. ADAMS, A. E. BOYD, L. A. GROSS a R. Y. TSIEN, 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **20**(11), 448–455. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/s0968-0004(00)89099-4

CULLEN, B. R. a M. H. MALIM, 1992. Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology* [online]. **216**, 362–368. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(92)16033-g

DE, Abhijit a Sanjiv Sam GAMBHIR, 2005. Noninvasive imaging of protein-protein interactions from live cells and living subjects using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. **19**(14), 2017–2019. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.05-4628fje

DENIS, M., S. CUTHILL, A. C. WIKSTRÖM, L. POELLINGER a J. A. GUSTAFSSON, 1988. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **155**(2), 801–807. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/s0006-291x(88)80566-7

DENISON, Michael S., Anatoly A. SOSHILOV, Guochun HE, Danica E. DEGROOT a Bin ZHAO, 2011. Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicological Sciences* [online]. **124**(1), 1–22. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfr218

DENISON, Michael S. a James P. WHITLOCK, 1995. Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome P450 Genes *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(31), 18175–18178. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.31.18175

DENISON, Michael S., Bin ZHAO, David S. BASTON, George C. CLARK, Hiroshi MURATA a Dalho HAN, 2004. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals. *Talanta* [online]. **63**(5), 1123–1133. ISSN 1873-3573. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2004.05.032

ESSER, Charlotte a Agneta RANNUG, 2015. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacological Reviews* [online]. **67**(2), 259–279. ISSN 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.114.009001

FLAVENY, Colin A., Iain A. MURRAY, Chris R. CHIARO a Gary H. PERDEW, 2009. Ligand selectivity and gene regulation by the human aryl hydrocarbon receptor in transgenic mice. *Molecular Pharmacology* [online]. **75**(6), 1412–1420. ISSN 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.109.054825

FLAVENY, Colin A., Iain A. MURRAY a Gary H. PERDEW, 2010. Differential Gene Regulation by the Human and Mouse Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicological Sciences* [online]. **114**(2), 217–225. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfp308

FORGACS, Agnes L., Edward DERE, Michelle M. ANGRISH a Timothy R. ZACHAREWSKI, 2013. Comparative Analysis of Temporal and Dose-Dependent TCDD-Elicited Gene Expression in Human, Mouse, and Rat Primary Hepatocytes. *Toxicological Sciences* [online]. **133**(1), 54–66. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kft028

FRERICKS, Markus, Marc MEISSNER a Charlotte ESSER, 2007. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **220**(3), 320–332. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2007.01.014

FRITSCHÉ, Ellen, Claudia SCHÄFER, Christian CALLES, Thorsten BERNSMANN, Thorsten BERNSHAUSEN, Melanie WURM, Ulrike HÜBENTHAL, Jason E. CLINE, Hossein HAJIMIRAGHA, Peter SCHROEDER, Lars-Oliver KLOTZ, Agneta RANNUG, Peter FÜRST, Helmut HANENBERG, Josef ABEL a Jean KRUTMANN, 2007. Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of America [online]. **104**(21), 8851–8856. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0701764104

FURNESS, Sebastian George Barton, Michael J. LEES a Murray L. WHITELAW, 2007. The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Letters*. **581**(19), 3616–3625. ISSN 0014-5793.

GAMBHIR, S. S, J. R BARRIO, H. R HERSCHMAN a M. E PHELPS, 1999. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. **26**(5), 481–490. ISSN 0969-8051. Dostupné z: doi:10.1016/S0969-8051(99)00021-9

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Cristina a Francisco J. QUINTANA, 2018. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* [online]. **48**(1), 19–33. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2017.12.012

HAHN, Mark E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* [online]. **121**(1), 23–53. ISSN 0742-8413. Dostupné z: doi:10.1016/S0742-8413(98)10028-2

HAN, Bin, Baifa SHENG, Zhicao ZHANG, Aimin PU, Jiuhe YIN, Qimeng WANG, Kunqiu YANG, Lihua SUN, Min YU, Yuan QIU, Weidong XIAO a Hua YANG, 2016. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Intestinal Obstruction Ameliorates Intestinal Barrier Dysfunction Via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Pathway. *Shock (Augusta, Ga.)* [online]. **46**(3), 319–328. ISSN 1540-0514. Dostupné z: doi:10.1097/SHK.0000000000000594

HAN, Dalho, Scott R. NAGY a Michael S. DENISON, 2004. Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists. *BioFactors (Oxford, England)* [online]. **20**(1), 11–22. ISSN 0951-6433. Dostupné z: doi:10.1002/biof.5520200102

HARBRON, Stuart, Henny J. EGGELTE, Mark FISHER a Brian R. RABIN, 1992. Amplified assay of alkaline phosphatase using flavinadeninedinucleotide phosphate as substrate. *Analytical Biochemistry* [online]. **206**(1), 119–124. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2697(05)80020-X

HASTINGS, J. W., 1996. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* [online]. **173**(1 Spec No), 5–11. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(95)00676-1

HE, Guochun, Tomoaki TSUTSUMI, Bin ZHAO, David S. BASTON, Jing ZHAO, Sharon HEATH-PAGLIUSO a Michael S. DENISON, 2011. Third-generation Ah receptor-responsive luciferase reporter plasmids: amplification of dioxin-responsive elements dramatically increases CALUX bioassay sensitivity and responsiveness. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* [online]. **123**(2), 511–522. ISSN 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfr189

CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD a D. C. PRASHER, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **263**(5148), 802–805. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8303295

CHEN, H. S. a G. H. PERDEW, 1994. Subunit composition of the heteromeric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(44), 27554–27558. ISSN 0021-9258.

CHIBA, Takahito, Hiroshi UCHI, Gaku TSUJI, Hisaki GONDO, Yoichi MOROI a Masutaka FURUE, 2011. Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* [online]. **24**(1), 133–140. ISSN 1522-9629. Dostupné z: doi:10.1016/j.pupt.2010.08.002

CHINEN, Ichino, Taisuke NAKAHAMA, Akihiro KIMURA, Nam T. NGUYEN, Hiroshi TAKEMORI, Ayako KUMAGAI, Hisako KAYAMA, Kiyoshi TAKEDA, Soyoung LEE, Hamza HANIEH, Barry RIPLEY, David MILLRINE, Praveen K. DUBEY, Kishan K. NYATI, Yoshiaki FUJII-KURIYAMA, Kamal CHOWDHURY a Tadimitsu KISHIMOTO, 2015. The aryl hydrocarbon receptor/microRNA-212/132 axis in T cells regulates IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *International Immunology* [online]. **27**(8), 405–415. ISSN 0953-8178. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxv015

CHOI, Eun-Young, Hyosung LEE, R. W. Cameron DINGLE, Kyung Bo KIM a Hollie I. SWANSON, 2012. Development of Novel CH223191-Based Antagonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* [online]. **81**(1), 3–11. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.111.073643

CHOY, Garry, Peter CHOYKE a Steven K. LIBUTTI, 2003. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer

research. *Molecular Imaging* [online]. **2**(4), 303–312. ISSN 1535-3508. Dostupné z: doi:10.1162/15353500200303142

IGNOWSKI, Jolene M. a David V. SCHAFFER, 2004. Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **86**(7), 827–834. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20059

JIANG, Tingting, Bengang XING a Jianghong RAO, 2008. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* [online]. **25**, 41–75. ISSN 0264-8725. Dostupné z: doi:10.5661/bger-25-41

JUX, Bettina, Stephanie KADOW, Sandra LUECKE, Agneta RANNUG, Jean KRUTMANN a Charlotte ESSER, 2011. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **131**(1), 203–210. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2010.269

KAIN, S. R. a S. GANGULY, 2001. Overview of genetic reporter systems. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **Chapter 9**, Unit9.6. ISSN 1934-3647. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0906s36

KASAI, Ayumi, Nobuhiko HIRAMATSU, Yiman MENG, Jian YAO, Shuichiro MAEDA a Masanori KITAMURA, 2005. Fast-track DRESSA: a bioassay for fast, sensitive, and selective detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical Biochemistry* [online]. **337**(1), 84–88. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2004.10.004

KIKUCHI, H., H. KATO, M. MIZUNO, A. HOSSAIN, S. IKAWA, J. MIYAZAKI a M. WATANABE, 1996. Differences in inducibility of CYP1A1-mRNA by benzimidazole compounds between human and mouse cells: evidences of a human-specific signal transduction pathway for CYP1A1 induction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **334**(2), 235–240. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1996.0451

KIM, D. W., L. GAZOURIAN, S. A. QUADRI, R. ROMIEU-MOUREZ, D. H. SHERR a G. E. SONENSHEIN, 2000. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* [online]. **19**(48), 5498–5506. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203945

KIM, Eun-Joong, Rajesh KUMAR, Amit SHARMA, Byungkwon YOON, Hyun Min KIM, Hyunseung LEE, Kwan Soo HONG a Jong Seung KIM, 2017. *In vivo* imaging of β -galactosidase stimulated activity in hepatocellular carcinoma using ligand-targeted fluorescent

probe. *Biomaterials* [online]. **122**, 83–90. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.009

KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE, 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **397**(8), 3173–3178. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3821-6

KOGEVINAS, M., 2001. Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Human Reproduction Update* [online]. **7**(3), 331–339. ISSN 1355-4786. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/7.3.331

KOJIMA, Hiroyuki, Shinji TAKEUCHI, Mitsuru IIDA, Shoji F. NAKAYAMA a Takuya SHIOZAKI, 2018. A sensitive, rapid, and simple DR-EcoScreen bioassay for the determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in environmental and food samples. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **25**(8), 7101–7112. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-4662-9

LAHVIS, Gareth P., Susanne L. LINDELL, Russell S. THOMAS, Robert S. MCCUSKEY, Christopher MURPHY, Edward GLOVER, Michael BENTZ, James SOUTHARD a Christopher A. BRADFIELD, 2000. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **97**(19), 10442–10447. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.190256997

LESLIE, A G, P C MOODY a W V SHAW, 1988. Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**(12), 4133–4137. ISSN 0027-8424.

LIU, Xuemei, Jeffrey A. KRAMER, Yi HU, James M. SCHMIDT, Jianghong JIANG a Alan G. E. WILSON, 2009. Development of a high-throughput human HepG(2) dual luciferase assay for detection of metabolically activated hepatotoxicants and genotoxicants. *International Journal of Toxicology* [online]. **28**(3), 162–176. ISSN 1092-874X. Dostupné z: doi:10.1177/1091581809337166

MANCHESTER, D. K., S. K. GORDON, C. L. GOLAS, E. A. ROBERTS a A. B. OKEY, 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 Research*. **47**(18), 4861–4868. ISSN 0008-5472.

MASCARELLI, Amanda, 2012. Environment: Toxic effects. *Nature* [online]. **483**(7389), 363–365. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nj7389-363a

MCELROY, William D., 1947. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **33**(11), 342–345. ISSN 0027-8424.

MCGUIRE, J., M. L. WHITELAW, I. PONGRATZ, J. A. GUSTAFSSON a L. POELLINGER, 1994. A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **14**(4), 2438–2446. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.14.4.2438-2446.1994

MEHIER-HUMBERT, Sophie a Richard H. GUY, 2005. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **57**(5), Pharmacokinetics in Gene Delivery, 733–753. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2004.12.007

MIMURA, Junsei a Yoshiaki FUJII-KURIYAMA, 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **1619**(3), 263–268. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/s0304-4165(02)00485-3

MIURA, M. a J. YUAN, 2000. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in Enzymology* [online]. **322**, 480–492. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/s0076-6879(00)22044-2

MORENO-MARÍN, Nuria, Jaime M. MERINO, Alberto ALVAREZ-BARRIENTOS, Daxeshkumar P. PATEL, Shogo TAKAHASHI, José M. GONZÁLEZ-SANCHO, Pablo GANDOLFO, Rosa M. RIOS, Alberto MUÑOZ, Frank J. GONZALEZ a Pedro M. FERNÁNDEZ-SALGUERO, 2018. Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Liver Polyploidization and Inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ β -Catenin Signaling. *iScience* [online]. **4**, 44–63. ISSN 2589-0042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2018.05.006

MURK, A. J., J. LEGLER, M. S. DENISON, J. P. GIESY, C. VAN DE GUCHTE a A. BROUWER, 1996. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* [online]. **33**(1), 149–160. ISSN 0272-0590. Dostupné z: doi:10.1006/faat.1996.0152

MURRAY, Iain A., Andrew D. PATTERSON a Gary H. PERDEW, 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer* [online]. **14**(12), 801–814. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3846

NAGY, Scott R., James R. SANBORN, Bruce D. HAMMOCK a Michael S. DENISON, 2002. Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* [online]. **65**(2), 200–210. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/65.2.200

NAVID, Fatemeh, Anika BRUHS, Winfried SCHULLER, Ellen FRITSCHÉ, Jean KRUTMANN, Thomas SCHWARZ a Agatha SCHWARZ, 2013. The Aryl hydrocarbon receptor is involved in UVR-induced immunosuppression. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **133**(12), 2763–2770. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.221

NEBERT, Daniel W, Amy L ROE, Matthew Z DIETER, Willy A SOLIS, Yi YANG a Timothy P DALTON, 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [*Ah*] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* [online]. **59**(1), 65–85. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-2952(99)00310-X

NOVOTNA, A, P PAVEK a Z DVORAK, 2011. Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental science & technology* [online]. **45**(23) [vid. 2024-03-19]. ISSN 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es2029334

ONDROVÁ, Karolína, Iveta ZŮVALOVÁ, Barbora VYHLÍDALOVÁ, Kristýna KRASULOVÁ, Eva MIKOVÁ, Radim VRZAL, Petr NÁDVORNÍK, Binod NEPAL, Sandhya KORTAGERE, Martina KOPEČNÁ, David KOPEČNÝ, Marek ŠEBELA, Fraydoon RASTINEJAD, Hua PU, Miroslav SOURAL, Katharina Maria ROLFES, Thomas HAARMANN-STEMMANN, Hao LI, Sridhar MANI a Zdeněk DVOŘÁK, 2023. Monoterpenoid aryl hydrocarbon receptor allosteric antagonists protect against ultraviolet skin damage in female mice. *Nature Communications* [online]. **14**(1), 2728. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-023-38478-6

PFEIFER, A. a I. M. VERMA, 2001. Gene therapy: promises and problems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. **2**, 177–211. ISSN 1527-8204. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.genom.2.1.177

PIERRE, Stéphane, Aline CHEVALLIER, Fatima TEIXEIRA-CLERC, Ariane AMBOLET-CAMOIT, Linh-Chi BUI, Anne-Sophie BATS, Jean-Christophe FOURNET, Pedro FERNANDEZ-SALGUERO, Martine AGGERBECK, Sophie LOTERSZTAJN, Robert BAROUKI a Xavier COUMOUL, 2014. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* [online]. **137**(1), 114–124. ISSN 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kft236

POHJANVIRTA, R. a J. TUOMISTO, 1994. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacological Reviews*. **46**(4), 483–549. ISSN 0031-6997.

POLLENZ, Richard S., Sarah E. WILSON a Edward J. DOUGHERTY, 2006. Role of endogenous XAP2 protein on the localization and nucleocytoplasmic shuttling of the endogenous mouse Ahb-1 receptor in the presence and absence of ligand. *Molecular Pharmacology* [online]. **70**(4), 1369–1379. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.106.027672

PRASHER, D. C., V. K. ECKENRODE, W. W. WARD, F. G. PRENDERGAST a M. J. CORMIER, 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* [online]. **111**(2), 229–233. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(92)90691-h

QIU, Ju, Jennifer J. HELLER, Xiaohuan GUO, Zong-ming E. CHEN, Kamonwan FISH, Yang-Xin FU a Liang ZHOU, 2012. The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* [online]. **36**(1), 92–104. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2011.11.011

RAMADOSS, Preeti a Gary H. PERDEW, 2004. Use of 2-azido-3-[125I]iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin as a probe to determine the relative ligand affinity of human versus mouse aryl hydrocarbon receptor in cultured cells. *Molecular Pharmacology* [online]. **66**(1), 129–136. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.66.1.129

RECILLAS-TARGA, Félix, 2006. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals.

Molecular Biotechnology [online]. **34**(3), 337–354. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:34:3:337

REYES, H., S. REISZ-PORSZASZ a O. HANKINSON, 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **256**(5060), 1193–1195. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.256.5060.1193

RICE, B. W., M. D. CABLE a M. B. NELSON, 2001. In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of Biomedical Optics* [online]. **6**(4), 432–440. ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.1413210

RICO DE SOUZA, Angela, Michela ZAGO, Stephen J. POLLOCK, Patricia J. SIME, Richard P. PHIPPS a Carolyn J. BAGLOLE, 2011. Genetic Ablation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Causes Cigarette Smoke-induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(50), 43214–43228. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.258764

RIZZO, Megan A., Gerald H. SPRINGER, Butch GRANADA a David W. PISTON, 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology* [online]. **22**(4), 445–449. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt945

ROGOŽANOVÁ, Lucie. Sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie odvozené od HaCat buněk. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. 2023. Dostupné z: <https://theses.cz/id/hsliv4>

ROSENTHAL, N., 1987. Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods in Enzymology* [online]. **152**, 704–720. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(87)52075-4

RUSHMORE, Thomas H. a A.-N. Tony KONG, 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism* [online]. **3**(5), 481–490. ISSN 1389-2002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200023337171

SAWA, Shinichiro, Marie CHERRIER, Matthias LOCHNER, Naoko SATOH-TAKAYAMA, Hans Jörg FEHLING, Francina LANGA, James P. DI SANTO a Gérard EBERL, 2010. Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **330**(6004), 665–669. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1194597

SELBERT, Stefan a Dominic RANNIE, 2002. Analysis of transgenic mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **180**, 305–341. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-178-7:305

SELDEN, R F, K B HOWIE, M E ROWE, H M GOODMAN a D D MOORE, 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. **6**(9), 3173–3179. ISSN 0270-7306.

SHAW, W. V., 1967. The Enzymatic Acetylation of Chloramphenicol by Extracts of R Factor-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **242**(4), 687–693. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)96259-9

SHAW, W. V., 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods in Enzymology* [online]. **43**, 737–755. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(75)43141-x

SCHENBORN, E. a D. GROSKREUTZ, 1999. Reporter gene vectors and assays. *Molecular Biotechnology* [online]. **13**(1), 29–44. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:13:1:29

SCHROEDER, Jennifer C., Brett C. DINATALE, Iain A. MURRAY, Colin A. FLAVENY, Qiang LIU, Elizabeth M. LAURENZANA, Jyh Ming LIN, Stephen C. STROM, Curtis J. OMIECINSKI, Shantu AMIN a Gary H. PERDEW, 2010. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* [online]. **49**(2), 393–400. ISSN 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/bi901786x

SIBILANO, Riccardo, Barbara FROSSI, Marco CALVARUSO, Luca DANELLI, Elena BETTO, Alessandra DALL'AGNESE, Claudio TRIPODO, Mario P. COLOMBO, Carlo E. PUCILLO a Giorgia GRI, 2012. The aryl hydrocarbon receptor modulates acute and late mast cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. **189**(1), 120–127. ISSN 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1200009

SIROTOVÁ, Natália. Charakterizácia novej reportérovej bunkovej línie LS174T-AhR-luc na stanovenie transkripčnej aktivity AhR. Online. Diplomová práca. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. 2022. Dostupné z: <https://theses.cz/id/nvcfx8>

SMITH, Kayla J., Iain A. MURRAY, Rachel TANOS, John TELLEW, Anthony E. BOITANO, William H. BISSON, Siva K. KOLLURI, Michael P. COOKE a Gary H. PERDEW, 2011. Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor

antagonism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. **338**(1), 318–327. ISSN 1521-0103. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.110.178392

STOCKINGER, Brigitta, Paola DI MEGLIO, Manolis GIALITAKIS a João H. DUARTE, 2014. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annual Review of Immunology* [online]. **32**, 403–432. ISSN 1545-3278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245

SWANSON, Hollie I., William K. CHAN a Christopher A. BRADFIELD, 1995. DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins (*). *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(44), 26292–26302. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.44.26292

TSIEN, R. Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **67**, 509–544. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509

VAN VOORHIS, Michael, Samantha KNOPP, Walker JULLIARD, John H. FECHNER, Xiaoji ZHANG, James J. SCHAUER a Joshua D. MEZRICH, 2013. Exposure to atmospheric particulate matter enhances Th17 polarization through the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* [online]. **8**(12), e82545. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0082545

VIERKÖTTER, Andrea, Tamara SCHIKOWSKI, Ulrich RANFT, Dorothea SUGIRI, Mary MATSUI, Ursula KRÄMER a Jean KRUTMANN, 2010. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **130**(12), 2719–2726. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2010.204

WALISSER, Jacqueline A., Edward GLOVER, Kalyan PANDE, Adam L. LISS a Christopher A. BRADFIELD, 2005. Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **102**(49), 17858–17863. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0504757102

YI, Tao, Jinxia WANG, Kaixi ZHU, Yaoliang TANG, Shian HUANG, Xiaorong SHUI, Yuanlin DING, Can CHEN a Wei LEI, 2018. Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International* [online]. **2018**, 6058784. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2018/6058784

YOUNG, D. C., S. D. KINGSLEY, K. A. RYAN a F. J. DUTKO, 1993. Selective inactivation of eukaryotic beta-galactosidase in assays for inhibitors of HIV-1 TAT using bacterial beta-

galactosidase as a reporter enzyme. *Analytical Biochemistry* [online]. **215**(1), 24–30. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1993.1549

ZHAO, Bin, Danica E. DEGROOT, Ai HAYASHI, Guochun HE a Michael S. DENISON, 2010. CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicological Sciences* [online]. **117**(2), 393–403. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfq217

ZHU, Chun, Yu-Lin CHEN, Xue-Jie WANG, Xiao-Shan HU, Zhang-Bin YU a Shu-Ping HAN, 2012. ShRNA-mediated gene silencing of AHR promotes the differentiation of P19 mouse embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes. *Molecular Medicine Reports* [online]. **6**(3), 513–518. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2012.941