

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Jitka Večeřová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vliv aktivace AhR na expresi hTERT

Bakalářská práce

Jitka Večeřová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jitka VEČEŘOVÁ**
Osobní číslo: **R20731**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vliv aktivace AhR na expresi hTERT**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení exprese hTERT po aplikaci aktivátorů AhR
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Teruo Endoh, Naoki Tsuji, Koichi Asanuma, Atsuhito Yagihashi, Naoki Watanabe: Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1-and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription, *Experimental Cell Research* 305 (2005) 300–311
 2. Fatma Dogan and Nicholas R Forsyth: Telomerase Regulation: A role for Epigenetics, *Cancers (basel)*, 2021
 3. POONAM SARKAR, KAZUHIRO SHIIZAKI, JUNZO YONEMOTO and HIDEKO SONE: Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin in co-operation with c-Myc, *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 28: 43-51, 2006
 4. Shepeley MV et al: Xenobiotic Response Elements (XREs) from Human *CYP1A1* Gene Enhance the hTERT Promoter Activity, *BIOCHEMISTRY, BIOPHYSICS, AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2019
 5. Shervington A et al: Identification of a novel co-transcription of P450/1A1 with telomerase in A549, *Gene*, 2007
- Články publikované v odborných periodících

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 3. října 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 12. října 2022

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora:	Jitka Večeřová
Název práce:	Vliv aktivace AhR na expresi hTERT
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023
Souhrn:	<p>Bakalářská práce je zaměřena na popis souvislosti mezi indukcí exprese hTERT mRNA a aktivací aryl uhlovodíkového receptoru v buňkách rakoviny střev indolovými deriváty. V teoretické části práce byla popsána problematika zkracování telomer, telomerázy, její regulace a problematika aryl uhlovodíkového receptoru a jeho aktivátorů. V rámci experimentální části byl pomocí metody qRT-PCR popsán vliv 16 indolových derivátů aktivujících aryl uhlovodíkový receptor a jejich směsí na expresi hTERT.</p>
Klíčová slova:	telomeráza, hTERT, aryl uhlovodíkový receptor, indolové deriváty, rakovina střev
Počet stran:	48
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Jitka Večeřová

Title: The effect of AhR activation on hTERT expression

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Summary: The bachelor thesis is focused on the description of relationship between induction of hTERT mRNA expression and activation of the aryl hydrocarbon receptor in colon cancer cells by indole derivatives. The theoretical part describes telomeres and their shortening, telomerase and its regulation and aryl hydrocarbon receptor and its activators. In the experimental part, it was described the impact of 16 indole derivatives, which are the aryl hydrocarbon receptor activators, and their mixtures on the hTERT expression using qRT-PCR.

Keywords: telomerase, hTERT, aryl hydrocarbon receptor, indole derivatives, colon cancer

Number of pages: 48

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D., s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, dne

.....

Jitka Večeřová

Poděkování

Mé poděkování patří vedoucímu práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za jeho čas a trpělivost při zpracovávání teoretické části práce a především za odborné vedení v rámci experimentální části. Rovněž bych chtěla poděkovat za pomoc v rámci laboratorní práce i všem ostatním pracovníkům laboratoří Molekulární toxikologie a farmakologie.

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Telomery	3
3.1.1	Historie výzkumu telomer	3
3.1.2	Struktura telomer	3
3.1.3	Zkracování telomer při replikaci DNA.....	4
3.2	Telomeráza	5
3.2.1	Historie výzkumu telomerázy.....	6
3.2.2	Lidské buňky s aktivní telomerázou.....	7
3.2.3	Telomeráza v rakovinných buňkách.....	8
3.2.4	Podjednotka hTERT	9
3.2.5	Promotor <i>hTERT</i> a transkripční faktory c-Myc a Sp1	10
3.2.6	Epigenetická regulace exprese hTERT.....	10
3.2.7	Specifické regulace exprese hTERT v rakovinných buňkách	11
3.2.8	Regulace exprese hTERT v souvislosti s AhR.....	12
3.3	Aryl uhlovodíkový receptor	13
3.3.1	Regulace transkripce AhR.....	14
3.3.2	Vliv AhR na buněčné i orgánové úrovni	15
3.3.3	Deriváty tryptofanu jako aktivátory AhR.....	15
3.3.4	AhR ve střevních buňkách.....	17
4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Chemikálie.....	18
4.3	Laboratorní pomůcky	20
4.4	Přístroje	20
4.5	Využívané experimentální metody.....	21
4.5.1	Příprava kultivačního média.....	21
4.5.2	Rozmrazení buněčné linie	21
4.5.3	Pasážování buněk	21
4.5.4	Odběr depletovaného média.....	22
4.5.5	Stanovení koncentrace buněk v buněčné suspenzi	23
4.5.6	Vysívání buněk do 6jamkové desky.....	23
4.5.7	Příprava zásobních roztoků testovaných indolových látek.....	23
4.5.8	Inkubace buněk LS180 s indolovými látkami	24

4.5.9	Izolace RNA pomocí TRI Reagent.....	25
4.5.10	Reverzní transkripce.....	26
4.5.11	qRT-PCR.....	27
5	Výsledky.....	29
5.1	Optimalizace buněčné linie na stanovení exprese <i>hTERT</i> mRNA.....	29
5.2	Časová optimalizace stanovení exprese <i>hTERT</i> mRNA.....	30
5.3	Vliv indolových derivátů na expresi <i>hTERT</i> a <i>CYP1A1</i> mRNA.....	32
5.4	Vliv ekvimolárních směsí na expresi <i>hTERT</i> a <i>CYP1A1</i> mRNA.....	33
6	Diskuse.....	35
7	Závěr.....	39
8	Literatura.....	40

SEZNAM ZKRATEK

3'UTR	untranslated region, nepřekládaná oblast na 3' konci RNA
A	adenin
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AhRR	AhR represor
ALT	alternativní prodlužování telomer
ALT+	buňky s aktivním ALT mechanismem
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
ARNT	AhR jaderný translokátor
BaP	benzo(a)pyren
BCRP/ABCG2	breast cancer resistance protein
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
C	cytosin
c-Myc	bHLH transkripční faktor rodiny MYC
CYP1A1	cytochrom P450 rodiny 1, podrodiny A, člen 1
Dnmt1	DNA methyltransferáza 1
DRE	dioxin responsive element
E2	estradiol
ER	estrogenový receptor
ERE	estrogen responsive element
ER β	estrogenový receptor β
EST2	ever shorter telomeres 2, gen TERT v kvasinkách
G	guanin
hsp90	heat shock protein 90
hTER	RNA podjednotka lidské telomerázy
hTERT	lidská telomerová reverzní transkriptáza

IAP	protein inhibující apoptózu
IL	interleukiny
lncRNA	long non-coding RNA
M1	first mortality stage
M2	second mortality stage
miRNA	microRNA
mTER	myší telomerázová RNA podjednotka
NES	nuclear export signal
PAS	Period/ARNT/Single minded
pGRN121	protein hTERT
PON-1	paraoxonáza 1
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
siRNA	short interfering / silencing RNA
Sp1	specifity protein 1
T	thymin
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin, dioxin
TER	telomerázová RNA podjednotka
TERT	telomerázová reverzní transkriptáza
TRF2	telomeric repeat binding factor
TSA	inhibitor histonových deacetyláz
XAP2	immunophilin-like X-associated protein 2
XRE	xenobiotic responsive element

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Schématické rozložení EREs a XREs v promotoru <i>hTERT</i>	12
Obrázek č. 2: Schématické znázornění funkčních domén AhR a ARNT	14

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Přehled všech testovaných indolových látek.....	24
Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (na jeden vzorek).....	27
Tabulka č. 3: Složení RT-qPCR reakční směsi na jednu jamku	28
Tabulka č. 4: Časový profil průběhu qRT-PCR	28

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Exprese <i>CYP1A1</i> mRNA v LS180, HT-29 a Caco-2.....	29
Graf č. 2: Exprese <i>hTERT</i> mRNA v LS180, HT-29 a Caco-2	30
Graf č. 3: Exprese <i>CYP1A1</i> mRNA v LS180 po různě dlouhých expozicích indolu	31
Graf č. 4: Exprese <i>hTERT</i> mRNA v LS180 po různě dlouhých expozicích indolu.....	31
Graf č. 5: Vliv indolových látek na expresi <i>CYP1A1</i> mRNA v LS180	32
Graf č. 6: Vliv indolových látek na expresi <i>hTERT</i> mRNA v LS180.....	33
Graf č. 7: Vliv směsi indolových látek na expresi <i>CYP1A1</i> mRNA v LS180	34
Graf č. 8: Vliv směsi indolových látek na expresi <i>hTERT</i> mRNA v LS180.....	34

1 ÚVOD

Telomeráza, respektive její katalytická podjednotka hTERT s funkcí reverzní transkripce, je zodpovědná za syntézu telomerových sekvencí *de novo*, čímž je schopná kompenzace zkracování lineárních chromozomů na 5' konci, ke kterému dochází při každé replikaci. Díky tomu je telomeráza spojována s immortalizací buněk a její aktivita je ve vysoké míře detekována v rakovinných buňkách. Objasnění kompletní regulace exprese její podjednotky hTERT, která je považována za marker aktivity celého enzymu, by tak vedlo k možnosti cílené represe enzymu jako formě nádorové terapie. Přestože základní regulace exprese skrze transkripční faktory c-Myc a Sp1 je již známa, jsou neustále popisovány nové mechanismy jako je regulace skrze aktivaci aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). Tento cytosolický receptor v buňce funguje jako ligandy aktivovaný transkripční faktor, který spouští expresi genů, v jejichž promotoru se nachází specifické XRE oblasti, které byly popsány právě i v promotoru *hTERT*. Mezi ligandy AhR patří mnoho indolových derivátů, které se v těle vyskytují jako produkty metabolismu tryptofanu vytvářené střevní mikrobiotou. Buňky střevního epitelu jsou tak na aktivaci AhR velmi citlivé, díky čemuž je v nich možné stanovit souvislost mezi složením metabolitů, aktivací AhR a indukcí exprese hTERT. Na základě těchto vztahů by mohlo zastoupení indolových látek ve střevě různě ovlivňovat proliferaci střevní rakoviny.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce.
3. Stanovení exprese hTERT po aplikaci aktivátorů AhR.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Telomery

Genetická informace eukaryotických organismů je uložena v buněčném jádře ve strukturách zvaných chromozomy, které jsou složeny z DNA a proteinů histonové a nehistonové povahy. Na konci jejich chromatid se nachází speciální strukturní oblasti zvané telomery tvořené konstitutivním heterochromatinem. Hlavními funkcemi těchto struktur je zabránění fúze mezi chromozomy a ochrana genetické informace před poškozením způsobeným neúplnou replikací DNA na 5' konci, kvůli které dochází při každém dělení ke zkracování chromozomů (Blackburn, 1994; Blasco, 2003).

3.1.1 Historie výzkumu telomer

Osobou, která stála na počátku studia telomer, byla Barbara McClintock, která se ve svém výzkumu zabývala cytologickými jevy u kukuřice seté (*Zea mays*), jako je dělení triploidních jedinců nebo chování prstencových chromozomů, které se často v jádrech kukuřice tvoří (McClintock, 1929; 1938). V rámci toho vypožorovala, že přirozené konce chromozomů jsou svými vlastnostmi a chováním velmi odlišné od konců, které v chromozomu vzniknou vnitřními zlomy. Chromozomové konce vykazují vysokou míru intaktnosti, zatímco konce v místě zlomů jsou schopné přilnout k jiné části chromozomu, čehož je v buňkách využíváno buď právě při vzniku prstencových chromozomů nebo při meiotickém dělení v procesu crossing-overu (McClintock, 1941). V roce 1964 bylo při pozorování růstu různých buněčných kultur popsáno, že každá buňka dosahuje jen určitého limitního počtu dělení, než přechází do apoptózy (Hayflick, 1965). Tento počet byl později pojmenován po svém objeviteli jako Hayflickův limit a byla popsána souvislost s jeho velikostí a se zkracováním chromozomů v průběhu každé replikace, kdy není DNA polymeráza schopná přepsat kompletní sekvenci a produkt je o část nukleotidové sekvence na konci chromozomu kratší. Počet replikací, které vedou k takovému limitnímu zkrácení chromozomů odpovídá Hayflickovu limitu a úseky, o které buňka přichází, byly označeny jako telogeny (Olovnikov, 1973).

3.1.2 Struktura telomer

Základním motivem telomer jsou tandemové repetice, jednoduché sekvence nukleotidů, které se ve velkém množství opakují neustále za sebou a nekódují žádný protein (Blackburn *et* Gall, 1978). Podoba této sekvence se liší mezi skupinami organismů, nicméně pro konkrétní druh nebo větší taxonomickou skupinu jde o vysoce konzervativní oblast chromozomu. U člověka

jsou telomery tvořeny sekvencí TTAGGG, což bylo zjištěno srovnáním sekvencí v neupravené lidské DNA a DNA našťípané exonukleázou Bal-31. V našťípané DNA bylo zastoupení sekvencí TTAGGG tak malé, že se sekvence musela objevovat pouze v koncových oblastech DNA, které byly exonukleázou odstraněny. Tato hypotéza byla následně potvrzena pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), kde se sonda dosedající právě na TTAGGG sekvence zachytila pouze v oblasti telomer všech chromozomů (Moyzis *et al.*, 1988).

Ze začátku studia telomer se předpokládalo, že jsou konce chromozomů tvořeny pouze telomerovými sekvencemi, které jsou lineárně zakončené tak, že 3' vlákno DNA bohaté na guanosin tvoří přesah nad vláknem druhým (Gravel *et al.*, 1998). Později se ale díky využití elektronové mikroskopie podařilo odhalit, že se v této oblasti nachází komplikovanější struktura pojmenovaná jako T-smyčka. Důležitou roli ve formování smyčky hrají proteiny, které se podílejí jak na jejím vytváření, tak na její stabilitě. Jedním z nich je TRF2 (telomeric repeat binding factor 2), nacházející se u báze smyčky, kde zprostředkovává vazbu mezi koncovým přesahujícím vláknem bohatým na G a původním dvojitým vláknem DNA (Griffith *et al.*, 1999). Tento zápoj je specifický tím, že se zde nachází komplementární telomerové sekvence, díky kterým se v místě zapojení volného vlákna vytváří ještě další menší D-smyčka. Kratší 5' vlákno bohaté na cytosin je tedy součástí pouze velké T-smyčky a do tvorby druhé smyčky a interakce s TRF2 se nezapojuje (Greider, 1999).

Hlavní výhodou uspořádání telomerových sekvencí do T-smyčky na koncích chromozomů je v tom, že udržuje konce intaktní a stabilní, což zajišťuje správnou funkci telomer. Z tohoto důvodu je správná stavba smyčky v buňce pečlivě hlídána a pokud dojde k porušení funkce TRF2 (například použitím specifických inhibitorů), je v buňce indukována apoptóza (Karlseder *et al.*, 1999).

3.1.3 Zkracování telomer při replikaci DNA

Mechanismus neúplné syntézy DNA pomocí DNA polymerázy zkracující chromozomy v oblasti telomer je označován jako „end replication problem“ a souvisí čistě s lineárními chromozomy, díky čemuž se telomery nevyskytují u kruhových chromozomů prokaryotních organismů nebo jiných cirkulárních molekul DNA (Lingner *et al.*, 1995). DNA polymerázy jsou enzymy schopné propojovat nukleotidy do podoby nového řetězce na základě komplementarity s vláknem původní (mateřské) molekuly DNA, syntéza ale probíhá pouze ve směru 5' → 3', a tak je syntéza druhého vlákna DNA (tzv. opožděující vlákno) ve směru 3' → 5' o něco pomalejší. Na tomto vlákně jsou nejprve pomocí primázy vytvořeny RNA primery, za kterými jsou formovány Okazakiho fragmenty, jež jsou spojovány do vlákna DNA

za odbourávání primerů. Po dokončení syntézy celého opožďujícího vlákna je odstraněn původní RNA primer na 5' konci. Tím, že je DNA polymeráza schopná prodlužovat řetězce jen ve směru 5'→3', neexistuje způsob, jak tento úsek nahradit, nové vlákno DNA je tak o tento úsek kratší (Wynford-Thomas *et* Kipling, 1997). Při každé replikaci se délka telomerové sekvence v lidských buňkách zkracuje průměrně o 30 – 50 bazí, u lidských fibroblastů bylo pozorováno zkracování dokonce o 50 – 100 bazí v jednom buněčném cyklu (Allsopp *et al.*, 1992; Sfeir *et al.*, 2005). Přestože většina buněk vykazuje na čase závislé zkracování délky telomer, existují v lidském organismu buňky, u nichž je během života zkracování telomerových délek prakticky nepozorovatelné. Jedním z příkladů jsou nervové buňky, které se během života prakticky nedělí a zkracování tak neprobíhá. I tak na nervové buňky nepřímo dopadá vliv zkracování telomer skrze dělicí se buňky, se kterými jsou v kontaktu (Panossian *et al.*, 2003). Dalšími buňkami s téměř nepozorovatelným zkracováním jsou buňky kmenové, v nichž je udržování délky způsobeno aktivitou enzymu telomeráza, který dokáže syntetizovat telomerové sekvence *de novo* (De Lange *et al.*, 1990).

Pokud v buňce proběhne tolik replikací, že se telomery dostanou do délky, která již nezaručuje dostatečnou ochranu genetické informace chromozomů, je v buňce spuštěna dráha senescence, která ji může dovést až do apoptózy. Jedná se o dvoufázový mechanismus kontroly senescence, který nastává i v případě poškození DNA a spočívá v indukci kontrolních bodů (checkpoints) M1 a M2. Nejdůležitějšími faktory M1 (first mortality stage) jsou retinoblastomový protein a protein p53, jejichž porucha je v buňkách většiny rakovin spojována s rozvojem proliferace. Druhý kontrolní bod M2 (second mortality stage), je již na p53 nezávislý a více než se senescencí je spojen s buněčnou smrtí. Díky tomu dokáže odstranit i buňky, kterým se přes poškození podařilo projít prvním kontrolním bodem (Wright *et* Shay, 1992).

3.2 Telomeráza

Telomeráza je enzym vykazující reverzně transkriptázovou aktivitu a je schopný kompenzovat replikační problém se zkracováním telomer přidáváním nových telomerových sekvencí na 3' konec. Tím dokáže buňka s aktivní telomerázou překročit Hayflickův limit, oddálit svoji senescenci a apoptózu a při výrazné aktivitě je telomeráza schopná dovést buňku až k imortalizaci. Enzym je složený ze dvou základních podjednotek, samotné enzymatické podjednotky TERT a RNA vlákna nesoucího sekvenci komplementární k telomerám (TER), podle kterého TERT nové sekvence syntetizuje (Greider *et* Blackburn, 1987; Lingner *et al.*, 1997). Celý enzymatický komplex lidské telomerázy funguje jako strukturní

a funkční homodimer a kromě dvou hTERT o velikosti 127 kDa a dvou hTER o velikosti 153 kDa jsou jeho součástí i dvě sady s telomerázou asociovaných proteinů dyskerinu a Nop10 (Sauerwald *et al.*, 2013). Přesto byly popsány i případy buněk, které měly telomerázu aktivní ve formě monomeru, tyto výjimečné případy jsou ale spojovány především s různými mutacemi nebo geneticky podmíněnými chorobami (Errington *et al.*, 2008).

3.2.1 Historie výzkumu telomerázy

Mechanismus prodlužování telomer byl poprvé popsán díky experimentu na telomerách *Tetrahymena*. Experiment vycházel z předpokladu, že je pro *de novo* syntézu zapotřebí volného 3'-OH konce a vhodného oligonukleotidu (TTGGGG)₄, který odpovídá sekvenci telomer studovaných buněk. Po přidání tohoto jednovláknového řetězce k extraktu buněk *Tetrahymena* byl pozorován nárůst sekvencí na vlákně, a to vždy o 6 nukleotidů odpovídajících jedné telomerové sekvenci. Pokud se ale do reakce místo vlákna bohatého na G a T přidalo DNA vlákno nesoucí komplementární sekvenci bohatou na A a C nebyla elongace telomer pozorována. Funkčnost prodlužovacího mechanismu byla rovněž testována výměnou sekvence používaného oligonukleotidu, který nenesl sekvenci telomer *Tetrahymena*, ale telomerovou sekvenci kvasinek. Přestože má tato sekvence o jeden guanin navíc, repetice, které se během reakce na oligonukleotid navazovaly, odpovídaly šesti nukleotidové sekvenci telomer *Tetrahymena* a přebývající guanin v kvasinkovém oligonukleotidu tak pro syntézu nehrál žádnou roli (Greider *et Blackburn*, 1985). Tím bylo jednoznačně prokázáno, že se mechanismus prodlužování telomer liší od běžné elongace DNA řetězců DNA polymerázami a že je zde přítomný specifický enzym s telomerovou terminální transferázovou aktivitou, později zkrácen na dnes běžně používané pojmenování telomeráza (Greider *et Blackburn*, 1987).

Po popisu prodlužování telomer v jednodušších organismech byla pozornost obrácena na telomerázu v lidských buňkách. Ta byla poprvé popsána v buňkách linie HeLa, což je linie odvozená od maligního karcinomu děložního čípku. Buňky byly vystaveny tzv. telomerázové eseji používané i v případě *Tetrahymena*, v tomto případě byl přidáván oligonukleotid odpovídající v té době již známé sekvenci lidských telomer (TTAGGG)₄. Výsledky tohoto experimentu vedly k popsání čtyř základních rozdílů mezi elongací telomer katalyzovanou telomerázou a běžným prodlužováním DNA vlákna DNA polymerázou. Prvním z nich byla citlivost na předpůsobení RNázami, po němž nebyla telomerázová aktivita detekována. Tím se potvrdilo, že je telomeráza na rozdíl od DNA polymeráz ribonukleoproteinem, který kromě proteinové složky obsahuje i úsek RNA nesoucí příslušnou telomerovou sekvenci (vlákno bohaté na C a A), sloužící jako templát. Při elongaci polymerázou by také stačila přítomnost

komplementární sekvence telomer (CCCTAA) chromozomálního původu, která by se navázala na telomerovou sekvenci oligonukleotidu a sloužila jako templátové vlákno pro elongaci. Tento mechanismus byl ale opět vyvrácen, a to použitím oligonukleotidů s jinou sekvencí, na které se i tak přidávala sekvence odpovídající lidským telomerům, stejně jako tomu bylo v případě elongace telomer *Tetrahymena*. Dalším rozdílem byla rychlost syntézy sekvencí, která byla po celou dobu reakce konstantní, v případě rekombinace by se rychlost syntézy neustále zvyšovala díky navyšujícímu se množství nově syntetizovaných sekvencí, které mohou sloužit jako templát. Poslední rozdíl byl popsán po přidání oligonukleotidu se sekvencí CCCTAA. Kdyby se ve vzorku vyskytovala tato sekvence v DNA běžně, existovala by zde i její komplementární sekvence, která by posloužila jako templát pro elongaci oligonukleotidu bohatého na C a A. V takových podmínkách ale nebyly v reakci žádné produkty (prodloužené řetězce CCCTAA sekvencí) detekovány. V průběhu syntézy nových lidských telomerových sekvencí bylo pozorováno, že se jejich syntéza většinou zastaví po prvním G v sekvenci a až s určitou prodlevou pokračuje v přidávání dalších nukleotidů, což vedlo k predikci sekvence hTER na sekvenci CUAACCCUA... (Morin, 1989).

3.2.2 Lidské buňky s aktivní telomerázou

V experimentech prováděných na jednodušších organismech, byla telomeráza aktivní ve všech typech buněk v poměrně vysoké míře, například u *Tetrahymena* dokázala vložený oligonukleotid prodlužovat až o 8 000 nukleotidů (Blackburn *et al.*, 1989). Tím se zásadně liší od lidské telomerázy, která dokázala ve stejně navrženém experimentu prodlužovat příslušný oligonukleotid pouze o 65–80 nukleotidů (Morin, 1989). Ve fyziologickém stavu je navíc lidská telomeráza aktivní pouze v kmenových buňkách a buňkách zárodečných linií, patologicky je pak nejmarkantnější ve většině rakovinných buňkách. V lidském těle je tak telomeráza spjata pouze s takovými buňkami, jejichž dlouhá životnost a zachování nepoškozené DNA je pro organismus klíčová. Jedná se např. o myeloidní progenitory nacházející se v kostní dřeni, které jsou důležité pro hematopoézu, kdy slouží jako prekurzory všech krevních buněk. Čím více jsou následně krevní buňky diferenciovány, tím je v nich nižší aktivita telomerázy (Chiu *et al.*, 1996). Dalšími kmenovými buňkami s popsanou aktivitou telomerázy jsou mezenchymální kmenové buňky, které jsou v těle zodpovědné za obnovu mezenchymální a krevetvorné tkáně a podílí se na interakci s imunitním systémem (Niu *et al.*, 2009).

Jiným příkladem buněk lidského těla, u kterých je vyžadován vysoký počet dělení bez jejich poškození, jsou zárodečné a embryonální buňky. Aktivita telomerázy byla zjištěna v lidských vaječnicích a varlatech, zatímco ve zralých pohlavních buňkách už aktivita detekována nebyla.

Přestože ani zralý neoplozený oocyt ani spermie nevykazovaly žádnou telomerázovou aktivitu, u zárodka ve stádiu blastocysty (kdy probíhá intenzivní dělení) byla již její aktivita opět detekována. Aktivita v embryu postupně klesala s diferenciací do jednotlivých tkání a po porodu nebyla detekována již v žádných somatických tkáních jako jsou svaly, játra, plíce apod. (Wright *et al.*, 1996).

3.2.3 Telomeráza v rakovinných buňkách

Přestože se v normálních tkáních aktivní telomeráza až na výjimky nevyskytuje, byla její aktivita popsána téměř ve všech známých nádorech (85 %) a díky obnově telomer a oddálení apoptózy souvisí s imortalizací a proliferací, které jsou pro rakovinné buňky typické. Studie na aktivitu telomerázy však byly většinou prováděny pouze v odvozených rakovinných liniích, které jsou tvořeny buňkami jednoho typu, kvůli čemuž může být situace v nádorech *in vivo* trochu odlišná. Na vzniku nádoru se totiž podílí více typů buněk a ne všechny z nich musí mít telomerázu aktivní, i tak je ale průměrná telomerázová aktivita celého nádoru výrazně vyšší než ve zdravé tkáni (Kim *et al.*, 1994). Kromě aktivní telomerázy jsou pro chromozomy nádorových buněk typické velmi krátké telomery, které se tak i přes jejich *de novo* syntézu telomerázou blíží limitní délce. Rozdíl mezi délkou telomer rakovinných a příslušných somatických buněk byl popsán např. u kolorektálních karcinomů, kde udržování těchto krátkých telomer vede ke vzniku chromozomových fúzí a podobných anomálií, které jsou pro rakovinné buňky typické (Hastie *et al.*, 1990). Tato souvislost mezi karcinogenezí a aktivní telomerázou otevírá možnosti rakovinné léčby, která by mohla využívat telomerázu jako specifický terč nádorové terapie. Pro testování této teorie byl vytvořen model z myších embryonálních kmenových buněk, u kterých byl knockoutovaný gen pro myši *Ter*, který stejně jako gen pro *Tert* slouží jako marker celého enzymatického komplexu (Blasco *et al.*, 1995). Na základě toho mohly být popsány dva základní principy, kterými inhibice telomerázy (respektive její podjednotky) ovlivňuje tumorogenezi. V prvním z nich vede ztráta aktivity ke zkracování telomer, což vede k dosažení jejich limitní délky a následné aktivaci p53 vedoucí k apoptóze buňky. Pokud je ale kontrolní dráha p53 poškozená, nedochází k indukci apoptózy a krátké telomery naopak způsobují větší frekvenci mutací a rychlejší tumorogenezi. Rakovinná terapeutika založená na inhibici telomerázy by tak mohla být aplikována pouze v případě nádorů, jejichž buňky mají zachované funkční kontrolní mechanismy (De Lange *et al.*, 1999).

Telomerázová kompenzace ale není jediným mechanismem, který rakovinné buňky využívají, aby zabránily zkracování telomer. Již na počátku studia replikačního problému byl vedle predikce telomerázy predikován i způsob přidávání nových sekvencí na základě homologní

rekombinace (Blackburn *et al.*, 1983). Tento mechanismus byl později skutečně popsán jako alternativní prodlužování telomer (ALT) a byl poprvé pozorován v kvasinkách (*Kluyveromyces lactis*). I přes delecí genu pro TER zde docházelo k výraznému nárůstu telomer, které byly výrazně delší než ve standardních buňkách (McEachern *et al.*, 1996). Mezi lidskými nádorovými buňkami tento mechanismus vykazuje asi 15 % linií, označovaných jako ALT+. U některých z nich je mechanismus detekován až druhotně jako reakce na předcházející rakovinnou léčbu. ALT probíhá na základě homologní rekombinace mezi telomerovým vláknem daného chromozomu nebo telomerovými sekvencemi z jiného chromozomu a prodlužovaným vláknem. Elongace pomocí ALT je tak daleko méně regulovaná než při syntéze telomerázou, což vede ke vzniku velmi dlouhých telomer, které i v rámci jedné buňky vykazují velkou variabilitu (Dunham *et al.*, 2000).

3.2.4 Podjednotka hTERT

První poznatky, které vedly k bližšímu popisu enzymatické složky telomerázy, byly zjištěny na základě studia kvasinkových mutantů, díky kterým byl jako gen pro kvasinkovou TERT identifikován gen EST2. Sekvence genu EST2 se projevila jako vysoce konzervativní napříč různými skupinami organismů a jeho funkční i strukturní homolog se podařilo identifikovat např. u kroužkoců (Lingner *et al.*, 1997). Kódování lidské telomerové reverzní transkriptázy (hTERT) bylo o něco komplikovanější. Její jednotlivé motivy totiž nejsou kvůli přítomnosti inzertu neznámého původu uspořádány v jednom čtecím rámci, jako tomu je u EST2 a jeho homologů. Shoda byla ale popsána mezi proteinovým produktem EST2 a lidským pGRN121, díky čemuž se následně podařilo identifikovat i samotný gen, který byl alternativně nazýván jako *hEST2* (Nakamura *et al.*, 1997). Gen, který katalytickou podjednotku telomerázy kóduje, je umístěn na 5p15.33 a je složen z 15 intronů a 16 exonů. Samotná složka sloužící jako reverzní transkriptáza je kódována v exonech 5 až 9. Díky velkému množství intronů bylo dosud popsáno 22 variant alternativních sestřihů *hTERT* mRNA, což umožňuje vznik velkého množství isoform enzymu (Akincilar *et al.*, 2016; Hrdličková *et al.*, 2012). Umístění tohoto genu u konce krátkého raménka chromozomu 5 není náhodné, ale souvisí s regulací exprese hTERT a téměř všichni velcí savci dožívající se vysokého věku mají genový lokus *TERT* v subtelomerické oblasti. Telomery o dostatečné délce vytváří v oblasti lokusu *hTERT* smyčku, která zabraňuje expresi genu. Pokud se ale telomery zkrátí, nejsou již schopné tuto strukturu udržet funkční a tím je umožněno zvýšení exprese. Kromě toho je přítomnost smyčky spojena s metylací *hTERT* především v oblasti promotoru a vazebných míst některých proteinů, což se opět podílí na regulaci exprese hTERT (Kim *et al.*, 2016).

3.2.5 Promotor *hTERT* a transkripční faktory c-Myc a Sp1

Promotor *hTERT* dosahuje velikosti 260 bp a základními regulačními elementy jsou zde E-box a na GC bohaté oblasti. E-box, element typický sekvencí CACGTG, se nachází v oblasti -165 a +44 a při deleci promotoru v oblasti 5', ve které se E-box vyskytuje, dochází k výrazné redukci exprese, kvůli čemuž je tento element považován za klíčovou regulační část promotoru. Transkripčním faktorem, který se na element, váže je c-Myc, který tvoří heterodimer s Max a váže se především na E-box v oblasti -165. Vazba na promotor vede ke zvýšení exprese *hTERT*, která je přes c-Myc zprostředkovávána histonovými acetyltransferázami. Kromě c-Myc se ale na E-box může navazovat i jeho strukturní homolog Mad, který vazbou (opět v heterodimeru s Max) zablokuje regulační oblast pro vazbu s c-Myc, čímž dojde k redukci exprese *hTERT*. Indukci exprese přes c-Myc napomáhá druhý významný transkripční faktor Sp1 (Specificity protein 1), který se váže do GC oblastí (Kyo *et al.*, 2000). Oba zmiňované faktory jsou považovány za klíčové komponenty regulace exprese *hTERT*. Indukce exprese přes faktor c-Myc může být kromě Sp1 aktivována i mnoha proteiny, které jsou spojovány se specifickými typy nádorů, jako je estrogen, survivin, ETS proto-onkogen 2 nebo Colony stimulating factor 1 (Ramlee *et al.*, 2016).

3.2.6 Epigenetická regulace exprese *hTERT*

Regulace exprese *hTERT* neprobíhá jen pomocí různých transkripčních faktorů a jiných signálních látek, ale i na úrovni epigenetiky, jak bylo již naznačeno v souvislosti s regulací exprese telomerázy pomocí délky telomer a s tím související metylací. Právě methylace je jedním ze základních epigenetických vlivů, které na promotor *hTERT* působí a její navýšení způsobuje výrazný pokles transkripce tohoto genu. Hlavními enzymy zodpovědnými za metylaci jsou DNA methyltransferázy, z nichž je nejvýraznější Dnmt1 (popsáno v buňkách odvozených od lidského teratokarcinomu), která právě i v oblasti promotoru *hTERT* vykazuje nejvyšší methylační aktivitu (Lopatina *et al.*, 2003). Dalším epigenetickým vlivem pozorovaným v promotorové oblasti jsou změny na úrovni histonů. Jedná se především o jejich acetylaci, která s popsanou metylací velmi úzce souvisí. Při použití TSA (inhibitor histonových deacetyláz) bylo pozorováno nejen navýšení exprese *hTERT* ale i pokles methylace katalyzované Dnmt1 (Fuks *et al.*, 2000).

Na epigenetické regulaci exprese *hTERT* se mohou rovněž podílet i různé funkční RNA, především miRNA. Na buněčné linii HeLa byl popsán vliv miR-138 (microRNA-138), která přímo napadá 3'UTR oblast *hTERT* mRNA. Díky tomuto mechanismu funguje miR-138 jako tumor supresorový faktor, který výrazně snižuje rychlost proliferace (Zhou *et al.*, 2016).

Opačnou závislost na expresi hTERT vykazuje lncRNA BC032469 v prostředí buněčné linie odvozené od nádoru žaludku, jejíž zvýšená hladina korelovala jak s vyšší mírou exprese hTERT, tak s rychlostí růstu nádoru a jeho velikostí (Lü *et al.*, 2016). Regulací skrze funkční RNA bylo popsáno velké množství a většina z nich vykazuje tkáňovou specifitu, čehož lze využít pro specifickou detekci nádoru. Jedná se např. o miR-1207-5p (rakovina žaludku), miR-21 (glioblastom) nebo miR-491-5p (rakovina dělohy) a mechanismus všech spočívá ve vazbě na 3'UTR oblasti *hTERT* mRNA (Dogan *et Forsyth*, 2021).

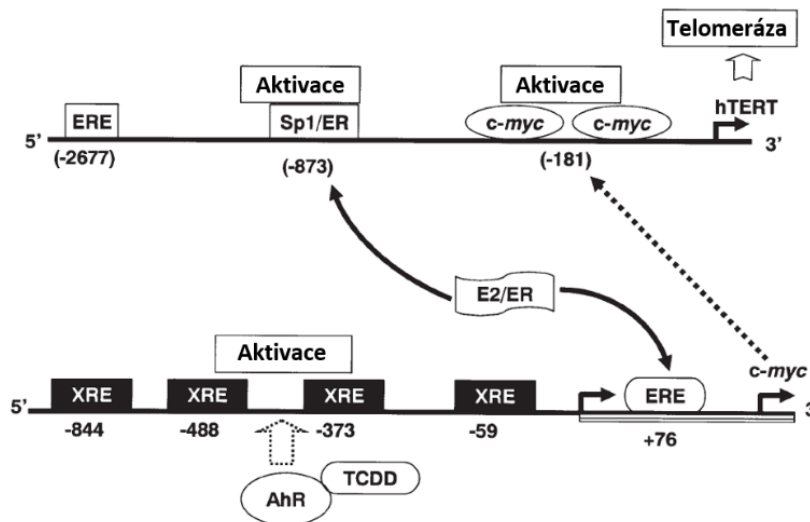
3.2.7 Specifické regulace exprese hTERT v rakovinných buňkách

Expese hTERT v rakovinných buňkách je obecně spojována s jejich proliferací a imortalizací, z toho důvodu je pravděpodobné, že i její regulace bude souviset s proteiny, které se na těchto procesech podílí. Takovou skupinou proteinů jsou např. IAP (rodina proteinů inhibujících apoptózu), mezi které patří survivin. Přítomnost survivinu byla detekována téměř výhradně v rakovinných buňkách, kde je schopný stejně jako jiné inhibitory apoptózy blokovat kaspázy. Survivin rovněž blokuje uvolňování mitochondriálního APAF1, což je faktor schopný aktivovat apoptické proteázy (Wheatley *et Altieri*, 2019). Souvislost exprese survivinu a hTERT byla popsána na několika buněčných liniích odvozených od střevních adenokarcinomů (např. linie LS180, HT-29, Caco2). Tyto buňky byly transfekovány vektorem pcDNA3-myc-survivin, což vedlo k nárůstu exprese survivinu, se kterým korelovalo zvýšení exprese hTERT. Survivin je navíc schopný indukovat fosforylaci transkripčních faktorů c-Myc a Sp1, což posiluje jejich vazbu na promotor (Endoh *et al.*, 2005).

Specifickou regulací vyskytující se zejména v nádorech vaječníku je mechanismus fungující přes estrogen, respektive estrogenový receptor. Estradiol (E2) funguje jako aktivátor exprese hTERT, která se v buňkách rakoviny vaječníku bohatých na estrogen výrazně zvyšuje. Toto navýšení je způsobeno estrogenovou aktivací c-Myc, čímž estrogen nahrazuje funkci transkripčního faktoru Sp1 a umožňuje expresi hTERT. Další propojení signálních drah ER a telomerázy bylo popsáno v promotoru *hTERT*, kde se nachází sekvence fungující jako ERE (Estrogen response element). V buňkách s dostatečnou hladinou estrogenu se estrogenový receptor α (ER β nevykazoval s ERE v promotoru *hTERT* žádnou aktivitu) specificky váže do ERE v promotoru *hTERT*, čímž je opět indukovaná exprese (Misiti *et al.*, 2000).

3.2.8 Regulace exprese hTERT v souvislosti s AhR

Souvislost mezi aktivací AhR a expresí hTERT byla poprvé popsána v buňkách rakovinné linie BeWo (odvozená od buněk placenty pacientky s choriokarcinomem), které byly vystaveny modelovému aktivátoru AhR 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD). Efekt na expresi hTERT po působení TCDD odpovídal vlivu, který měl na expresi estrogenový receptor aktivovaný E2. V promotoru *hTERT* byly navíc popsány AhR responsivní elementy (XRE), které se tak zde vyskytují společně s ERE jak je zobrazeno na Obrázku č. 1. Na základě toho tak bylo předpokládáno, že se oba receptory podílí na regulaci exprese stejně, a to skrze aktivaci transkripčního faktoru c-Myc. Tato hypotéza byla následně potvrzena výskytem antagonistických vztahů při souběžné aktivaci obou receptorů. Buňky vystavené TCDD i E2 totiž vykazovaly nižší expresi než v případě buněk vystavených aktivátorům samostatně. Přesto se ale ukázala částečná spolupráce obou receptorů na regulaci jako nezbytná. Pokud totiž došlo v buňce k deaktivaci estrogenového receptoru, nebyl samotný aktivátor AhR schopný vyvolat navýšení exprese hTERT. (Sarkar *et al.*, 2006).



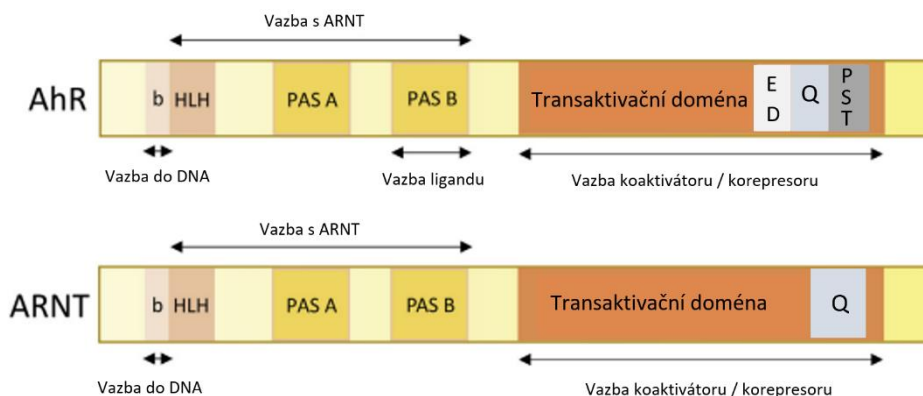
Obrázek č. 1: Schématické rozložení ERE a XRE v promotoru *hTERT* (převzato z Sarkar *et al.*, 2006)

Zvýšení exprese hTERT pomocí AhR bylo ověřeno i za využití BaP (benzo(a)pyren), což je vedle TCDD jeden z nejznámějších agonistů AhR. Vlivu BaP byly vystaveny buňky plicní rakovinné linie, které opět vykazovaly signifikantní nárůst exprese v porovnání s negativní kontrolou. Kromě toho bylo rovněž pozorováno, že síla indukce exprese závisí na počtu XRE v promotoru, čím více jich bylo do promotoru přidáno (maximální počet byl 6), tím byla exprese výrazněji indukována (Shelpev *et al.*, 2019). Jako významný ukazatel nárůstu exprese hTERT spojený s AhR aktivací se ukázal CYP1A1. Ten jako jediný z detoxifikačních enzymů indukovaných AhR vykazoval v buněčné linii A549 obdobný profil exprese jako hTERT.

Teorie závislosti exprese hTERT na expresi CYP1A1 byla navíc podpořena snížením exprese hTERT při specifickém blokování CYP1A1 pomocí siRNA (Shervington *et al.*, 2007).

3.3 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor byl popsán na základě aktivace pomocí TCDD, díky čemuž je rovněž nazýván dioxinový receptor. TCDD je vysoce toxické xenobiotikum, které se hromadí primárně v játrech, kde byla také po expozici organismu pozorována zvýšená aktivita uhlovodíkových hydroxyláz, která byla specifickou odpovědí na TCDD. Kromě dioxinu vykazovalo stejné chování i velké množství jeho strukturně příbuzných látek, které se do nově popsaného receptoru navazovaly s různou afinitou. Absolutní většina navázaného TCDD byla navíc detekována v cytosolu, z čehož bylo usouzeno, že místo se specifickou vazbou k TCDD se nenachází na povrchu buňky jako nějaký membránový receptor, ale v cytosolu, kam se TCDD dostává osmoticky (Poland *et al.* 1976). AhR je tak do momentu navázání ligandu volně přítomný v cytoplazmě v tetramerickém komplexu s dimerem hsp90 a XAP2 (immunophilin-like X-associated protein 2). Funkce XAP2 je především ve vazbě obou zbylých složek, čímž drží celý komplex pohromadě, zatímco hsp90 zabraňuje předčasné dimerizaci AhR s ARNT a podílí se na správné struktuře nově vznikajících receptorů (Petruilis *et al.* 2002). AhR se v buňce podílí na regulaci exprese určitých genů jako ligandy aktivovaný transkripční faktor, který je součástí bHLH-PAS rodiny (basic Helix-Loop-Helix – Period/ARNT/Single minded) a skládá se tak ze tří základních částí zobrazených na Obrázku č. 2. První je bHLH doména, kterou se AhR váže do DNA a rovněž se váže na ARNT, s nímž vytváří dimer. Druhou oblastí je PAS, její podjednotka PAS A slouží stejně jako bHLH k vazbě na ARNT, zatímco PAS B váže ligandy. Poslední oblast je tvořena subdoménou bohatou na glutamát a aspartát, subdoménou bohatou na glutamin a subdoménou bohatou na serin, threonin a prolin. Jedná se o regulační část, do které se navazují různé koaktivátory nebo korepresory (Jain *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 1997; Whitelaw *et al.*, 1995). Příkladem takovýchto regulátorů může být např. ERAP-140 jako zástupce koaktivátorů nebo SMRT jako korepresor (Nguyen *et al.*, 1999). Součástí heterodimeru v jádře je vedle AhR i ARNT (AhR nuclear translocator), který je AhR strukturně velmi podobný (viz Obrázek č. 2) a bez jeho přítomnosti by nebyla vazba do XRE v promotoru genu vůbec možná (Reyes *et al.*, 1992).



Obrázek č. 2: Schématické znázornění funkčních domén AhR a ARNT (převzato z Larigot *et al.*, 2018)

3.3.1 Regulace transkripce AhR

Komplex, ve kterém se v cytoplasmě AhR nachází, je aktivován navázáním ligandu do PAS B oblasti a po této vazbě je aktivována c-Src protein kináza, která umožní přesun komplexu do jádra (Köhle *et al.*, 1999). Zde se od komplexu uvolňuje hsp90, což umožňuje tvorbu dimeru s ARNT, který se navazuje v PAS a bHLH oblastech (Corrada *et al.*, 2017). Tento dimer se váže jako transkripční faktor v promotoru spouštěných genů do XRE neboli DRE, na základě této vazby se pozmění uspořádání chromatinu a umožní se navázání druhého transkripčního faktoru Sp1, čímž se spustí příslušná transkripce (Ko *et al.*, 1996). Vysoce konzervativní sekvence XRE je udávána jako 5'-TNGCGTG-3', kde na místě N může být jakýkoliv nukleotid, nicméně nejvýraznější transkripci po aktivaci AhR vykazuje přítomnost guaninu (Li *et al.*, 2014). Po odpojení z XRE nastává degradace, která se ale v buňce týká pouze AhR. Po působení jeho ligandů totiž dochází k prudkému poklesu AhR v buňce (v závislosti na typu buněk o 85 – 90 %), zatímco zastoupení ARNT není nijak ovlivněno (Giannone *et al.*, 1998). Jak bylo zmíněno, AhR se do jádra dostává v komplexu s hsp90, který ale po vstupu do jádra od AhR oddisociuje. Tím se na proteinu odhaluje NES místo (nuclear export signal) a pokud nedojde k jeho maskování pomocí ARNT nebo je naopak rozpojením dimeru AhR-ARNT odhaleno, odchází díky této sekvenci AhR pomocí exportinu 1 do cytoplazmy. Tímto mechanismem je regulována míra odpovědi na aktivaci ligandem a v případě velkého množství translokovaných aktivovaných AhR v jádře jednoduše nedochází k vazbě s ARNT. Receptor je tak z jádra odváděn k degradaci dříve, než indukoval transkripci příslušných enzymů. V cytoplasmě probíhá jeho ubiquitinace a samotná degradace je prováděna v proteozomu (Davarinos *et al.*, 1999).

Nejtypičtějším geny, na jejichž transkripci se AhR podílí, jsou geny detoxifikačních enzymů, především cytochromů P450. Zatímco člen této skupiny CYP1A2 vykazuje tkáňovou specifitu

v játrech, druhý zástupce této skupiny CYP1A1 je spojován s metabolismem xenobiotik nejen v jaterních buňkách ale i v tkáních jako jsou střeva, placenta, ledviny apod. Na transkripci tohoto enzymu se vedle AhR podílí také transkripční faktor Sp1. Přestože je role CYP1A1 pro detoxifikaci organismu klíčová, jeho nadměrná exprese bývá spojována s nádorovým bujením, případně bioaktivací různých protoonkogenů (Ye *et al.*, 2019). Dalším typickým genem, jehož transkripci AhR indukuje je AhRR, tedy AhR represor, díky kterému dochází ke zpětné regulaci AhR. Rozdíl mezi AhRR a AhR je v nepřítomnosti PAS B oblasti, AhRR tak není schopný vázat ligandy, je ale schopný tvořit v jádře dimer s ARNT, čímž snižuje indukci exprese, kterou by jinak způsoboval AhR (Hahn *et al.*, 2009). XRE oblasti se ale kromě promotorů standardních detoxifikačních enzymů vyskytují i v mnoha dalších promotorech, jako je např. promotor telomerázy nebo PON-1 (paraoxonáza 1). U tohoto enzymu byla popsána souvislost pouze s některými ligandy AhR. Zatímco expozice TCDD způsobovala malé navýšení PON-1 po působení quercetinu nebo jiných polyfenolových AhR aktivátorů docházelo k velkému nárůstu jeho exprese. Na základě toho je tak patrné, že ne všechny oblasti XRE jsou zcela stejné a AhR aktivovaný rozdílnými ligandy k nim vykazuje různou afinitu (Gouédard *et al.*, 2004).

3.3.2 Vliv AhR na buněčné i orgánové úrovni

Vliv AhR na buněčné úrovni je pozorován především v souvislosti s detoxifikací, ovlivněním proliferace buněk (pozitivně nebo negativně) a vztahy buňky se svým okolím, ať už se jedná o buněčnou migraci nebo adhezi mezi buňkami (Larigot *et al.*, 2018). Role AhR byla popsána i v souvislosti s různými onemocněními sledovanými především v tkáních, ke kterým se lépe dostávají ligandy AhR. Jedná se tak o játra, která mají klíčovou detoxifikační funkci v těle, brzlík, kam se mohou dostávat skrz imunitní systém nebo plíce a střeva, do kterých se mohou buď dostávat xenobiotika z vnějšího prostředí nebo mohou být v rámci střev produkovány mikroorganismy. Pokud byly tyto tkáně (myšího původu) vystaveny TCDD, byly zde pozorovány změny jako rozvoj atrofie brzlíku, nekrózy na játrech apod. V případě jedinců, kteří měli gen pro AhR knockoutovaný, nebyly tyto změny vůbec detekovány, což ukazuje, že za rozvojem těchto komplikací stojí právě AhR aktivovaný TCDD. Nicméně při dostatečně velké dávce TCDD (větší než 200 µg/kg jedince) může k poškození buněk docházet i v knockoutovaných buňkách, toxicita způsobená TCDD tak funguje i jinou dráhou, než je ta přes AhR (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996).

3.3.3 Deriváty tryptofanu jako aktivátory AhR

Velkou skupinou endogenních ligandů AhR jsou různé deriváty indolu, které ve střevech vznikají rozkladem tryptofanu komenzálními bakteriemi. Složení střevní mikrobioty tak může

mít vliv na zastoupení jednotlivých derivátů a tím pádem i na regulaci aktivace AhR. Tryptofan je pro střevní bakterie klíčový jakožto zdroj dusíku a jeho degradací vznikají ve střevech mono-substituované indolové deriváty (Hubbard *et al.*, 2015). V buňkách kvasinek, do kterých byl vložen plazmid s geny pro lidský AhR i ARNT, byla aktivace AhR popsána u indolu, indol-3-karbinolu, indolactové kyseliny a tryptaminu (Miller, 1997). Tyto poznatky byly následně přeneseny do prostředí lidského střeva, respektive buněčných linií odvozených od rakovin střev, kde byla aktivace AhR přes indolové deriváty rovněž detekována. Specifickou odpověď ale ve střevní linii Caco2 vykazoval samotný indol, který se zde choval při vyšších koncentracích, které jsou ve střevech běžné, jako antagonist AhR. Vzhledem k tomu, že je indol produktem metabolismu mikrobioty s nejvyšším zastoupením, může se jednat o mechanismus, kterým se kompenzuje navyšování aktivity AhR ostatními deriváty (Jin *et al.*, 2014).

Degradace tryptofanu ve střevě probíhá hned několika metabolickými drahami, jejichž výslednými produkty jsou serotonin, indol, tryptamin nebo kynurenin. Rozklad vedoucí ke vzniku kynureninu je vůbec nejrozšířenější a absolutní většina tryptofanu prochází právě jím. Z pohledu střevních mikroorganismů je ale podstatná indolová dráha, která je právě bakteriemi zprostředkována a kterou je na indol zpracováno 4 – 6 % celkového tryptofanu (Wyatt *et Greathouse*, 2021). *Escherichia coli* produkuje Mtr, TnaB a AroP permeázy, které jsou schopné transportovat tryptofan přes membránu, uvnitř buňky je pak tryptofan rozložen na zmiňovaný indol, pyruvát a amoniak, kromě toho ale mohou vznikat i různé jiné indolové deriváty, které slouží jako aktivátory AhR. Katalyzátorem této reakce je tryptofanáza, která je ale rovněž schopná katalyzovat i opačnou reakci, při které je tryptofan syntetizován z indolu nebo serinu. Syntéza všech těchto podílejících se enzymů je regulována pomocí tryptofanového operonu, řízeného na základě koncentrace tryptofanu v okolí. Díky tomu je bakterie schopná rozeznat, jestli má tryptofan degradovat za vzniku indolu, nebo ho naopak syntetizovat (Yanofsky *et al.*, 1991).

Indol tvořený mikrobiotou zastává ve střevech hned několik důležitých funkcí, kvůli kterým je zde v tak výrazném zastoupení v porovnání s ostatními metabolity tryptofanu. Působením indolu totiž dochází k indukci genů v epiteliálních buňkách střeva, které souvisí s posílením epitelové bariéry. Z toho také vyplývá potřeba udržovat zdravý střevní mikrobiom, jeho poškozením totiž dochází ke snížení této bariéry a tím i snížené odolnosti střev a náchylnosti k různým typům onemocnění včetně rozvoje rakoviny (Shimada *et al.*, 2013). Druhá významná funkce indolu je důležitá přímo pro samotné komenzální bakterie, u kterých slouží jako

mezibuněčná signální molekula a podílí se na synchronizaci dějů v rámci bakterií, které tak nepracují jako zcela oddělení jednotlivci. Komunikace je navíc možná i mezi různými druhy, protože indol je z tryptofanu produkován téměř všemi grampozitivními i gramnegativními bakteriemi přítomnými ve střevě (Lee *et al.*, 2010).

3.3.4 AhR ve střevních buňkách

První střevní buňky, ve kterých byla aktivita AhR pozorována, byly buňky rakovinná linie LS180, v nichž docházelo k aktivaci pomocí TCDD. Zjištěná vysoká aktivita receptoru, projevující se standardně navyšováním exprese cytochromů P450 potvrdila, že jsou střevní buňky na aktivaci AhR velmi citlivé (Harper *et al.*, 1991). Tato citlivost je způsobena velmi častým kontaktem s aktivátory AhR, které se ve střevech běžně vyskytují, jak bylo popsáno výše. AhR se ve střevních buňkách podílí na velkém množství dějů, týkajících se správného fungování imunity, metabolismu apod. Při jeho knockoutu ve střevních rakovinných liniích HCT116 a HT-29, dochází k výraznému poklesu exprese enzymů, které se podílejí na metabolismu mastných kyselin nebo lipidů (Karasová *et al.*, 2022). Vzhledem k souvislostem s mnoha pochody ve střevech je zvýšená nebo snížená aktivita AhR spojována s různými onemocněními a poruchami trávicího traktu. Příkladem nemoci, u které byla popsána souvislost s AhR, je i autoimunitní Crohnova choroba projevující se zánětlivou tkání ve střevech. Myši jedinci, kteří byli vystaveni TCDD vykazovali lepší výsledky než kontrolní jedinci, což se projevovalo zejména menším úbytkem na váze nebo lepším uzdravováním zanícené tkáně. Aktivovaný AhR byl totiž v modelu schopný cíleně potlačovat produkci prozánětlivých cytokininů (IL-6, IL-12, IL-10 a IL-17) (Benson *et Shepherd*, 2011).

Důsledky aktivace AhR ve střevních buňkách jsou také pozorovány na úrovni průběhu nebo rozvoje rakoviny. Na buněčné linii LoVo bylo pozorováno, že pokud byly buňky vystaveny vlivu aktivátoru aryl uhlovodíkového receptoru FICZ, docházelo v nich k významnému poklesu proliferace. K té docházelo snížením možnosti přechodu z G0 respektive G1 fáze buněčného cyklu do S fáze díky AhR regulovaným snížením cyklinu D1 a naopak navýšením p27 (Yin *et al.*, 2016). Opačný efekt byl ale pozorován u buněčné linie LS174T, ve které docházelo po aktivaci AhR pomocí TCDD k nárůstu BCRP/ABCG2. Jedná se o protein rezistence vůči rakovině prsu, jehož exprese je naopak spojována s rozvojem proliferace (Tompkins *et al.*, 2010). Vzhledem k popisu mnoha dalších vlivů, které aryl uhlovodíkový receptor na rakovinné střevní buňky má a které jsou často velmi protichůdné, jak je vidět na popsáných dvou případech, je využívání agonistů nebo antagonistů AhR jakožto nádorových terapeutik zatím velmi komplikované (Kolluri *et al.*, 2017).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Adherentní buněčná linie LS180 odvozená od lidského adenokarcinomu tlustého střeva (ECACC, 87021202)
- Adherentní buněčná linie Caco-2 odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu (ECACC, 86010202)
- Adherentní buněčná linie HT29 odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu (ECACC, 91072201)

4.2 Chemikálie

- 2-oxoindol (Sigma Aldrich, O9808)
- 3-methyl-2-oxoindol (Sigma Aldrich, 493937)
- 3-methylindol (ChemCruz, sc-255215)
- deionizovaná voda bez nukleáz
- deoxynukleosidtrifosfáty: dATP (TaKaRa, 4026)
- deoxynukleosidtrifosfáty: dCTP (TaKaRa, 4028)
- deoxynukleosidtrifosfáty: dGTP (TaKaRa, 4027)
- deoxynukleosidtrifosfáty: dTTP (TaKaRa, 4029)
- DMSO (Sigma-Aldrich, D8418)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma Aldrich, D6546)
- Dulbecco's PBS (BioConcept, 3-05F29-I)
- ethanol (Sigma Aldrich, 459844)
- primery CYP1A1 (Sigma Aldrich)
F primer: 5'-GGA AGT GTA TCG GTG AGA CC-3' (ST04795193-004)
R primer: 5'-CAT AGA TGG GGG TCA TGT CC-3' (ST04795182-004)
- primery GAPDH (Sigma Aldrich)
F primer: 5'-GAA GGA AAT GAA TGG GCA GC-3' (SY210803057-095)
R primer: 5'-TCT AGG AAA AGC ATC ACC CG-3' (SY210803057-096)
- primery hTERT (Generi Biotech)
F primer: 5'-ACG GCG ACA TGG AGA ACA A-3' (2337R2)
R primer: 5'-CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC-3' (2337R3)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, F6178)

- FICZ (Sigma-Aldrich, SML1489)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- indol (ChemCruz, sc-257606)
- indol-3-acetamid (ChemCruz, sc-255213)
- indol-3-akrylát (ChemCruz, sc-272496)
- indol-3-butyrová kyselina (SigmaAldrich, 57310)
- indol-3-ethanol (Sigma Aldrich, T90301)
- indol-3-karbaldehyd (Sigma Aldrich, 129445)
- indol-3-karboxylová kyselina (Sigma Aldrich, 284734)
- indol-3-mléčná kyselina (ChemCruz, sc-489732)
- indol-3-octová kyselina (ChemCruz, sc-254494A)
- indol-3-propionová kyselina (ChemCruz, sc-255215)
- indol-3-pyrohroznová kyselina (ChemCruz, sc-218597)
- inhibitor RNáz (New England BioLabs, M0307L)
- isopropanol (Lachner, 20037-AT0)
- KiCqStart Probe qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (Serana,a RGL-001)
- MEM Roztok neesenciálních aminokyselin (100x) (Sigma-Aldrich, M7145)
- M-MuLV reverzní transkriptáza (New England BioLabs, M0253L)
- proba CYP1A1 (Sigma Aldrich, HA15943029-002)
- 5'-[6FAM] GCA ACG GGT GGA ATT CAG CGT GCC A [OQA]-3'
- proba GAPDH (Sigma Aldrich, HA15943026-002)
- 5'-[6FAM] ACT AAC CCT GCG CTC CTG CCT CGA T [OQA]-3'
- proba hTERT (Generi Biotech, 2337R4)
- 5'-CTC CTG CGT TTG GTG GAT TTC TTG TTG-3'
- Random Primers 6 (New England BioLabs, S1230S)
- reakční pufr M-MuLV 10x (New England BioLabs, B0253S)
- TCDD (Ultra Scientific, RPE-029)
- TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- trypanová modř: 0,4% roztok v PBS (Sigma Aldrich, T6146)
- trypsin: 0,25% roztok v EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- tryptamin (ChemCruz, sc-206065)

4.3 Laboratorní pomůcky

- 6jamkové kultivační desky (TPP)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- dávkovací automatická pipeta Xstream (Eppendorf)
- jednorázové sérologické sterilní pipety: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP)
- krycí sklíčka (Menzel Gläser)
- lihový kahan
- nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- papírová krabička na vzorky (Biologix)
- PCR 96jamková destička (Roche)
- PCR fólie (Roche)
- pipetor Fastpette plus (Labnet)
- plastové sterilní zkumavky: 15 ml, 50 ml (TPP)
- sterilní škrabka na buněčné kultury (TPP)
- stojánek na mikrozukavky (TPP)
- těsnící film (Parafilm)
- kultivační lahve: 25 cm², 75 cm², 150 cm² (TPP)
- špičky na dávkovací pipetu 0,2 ml (Eppendorf)
- plastové mikrozukavky: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml (BIOplastics)
- automatické pipety 100 – 1000 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 2 – 20 µl, 0,5 – 10 µl, 0,1 – 2,5 µl (Eppendorf)
- plastové špičky k automatickým pipetám: 0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)

4.4 Přístroje

- analytické váhy ACJ 120-4 M (Kern)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- centrifuga 5810 R; rotory F-34-6-38, A-4-61 (Eppendorf)
- hlubokomrazicí box MDF-U53V (Sanyo)
- chladnička s mrazničkou (Whirlpool)
- inkubátor Co₂ NB-203XL (N-Biotec)
- kývačka MR-12 (Biosan)

- laminární box Labculture Class II Type A2 (ESCO)
- mikrocentrifuga (Spectrafuge)
- mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- odsávačka Flask-Trap 1 (Biosan)
- qPCR termocykler LightCycler 480 II (Roche) a program LightCycler 480 SW 1.5
- spektrofotometr NanoDrop Lite (Thermo Fisher)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator Md-02n (Major Science)
- vodní lázeň LCB11D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)
- výrobek ledu F100 Compact (Icematic)

4.5 Využívané experimentální metody

4.5.1 Příprava kultivačního média

Všechny tři buněčné linie byly kultivovány ve stejném kultivačním médiu DMEM, které je dodáváno v 500 ml balení a bylo obohaceno o 5 ml L-glutaminu, 5 ml neesenciálních aminokyselin a 50 ml FBS. Příprava média stejně jako veškerá manipulace s buňkami a látkami, které s nimi přicházely do kontaktu, byla prováděna v laminárním boxu.

4.5.2 Rozmrazení buněčné linie

Buněčné linie byly uchovány v kryozkumavkách v prostředí tekutého dusíku nebo mrazícího boxu (-80 °C) ve směsi FBS a DMSO, které slouží jako kryoprotektivum. Nejprve bylo v laminárním boxu přeneseno 5 ml DMEM do 25 cm² kultivační lahve. Kryozkumavka byla vyjmuta z tekutého dusíku (mrazícího boxu) a přenesena na 3 min do vodní lázně vyhřáté na 37 °C. V případě vzorků z tekutého dusíku byl v boxu před vložením do lázně povolen uzávěr kryozkumavky a opět uzavřen, aby došlo k eliminaci nahromaděného dusíku. V boxu byl k rozpuštěné suspenzi přidán 1 ml média z kultivační lahve, obsah byl propipetován a přenesen nazpět do kultivační lahve, která byla vložena do inkubátoru. Druhý den bylo v lahvi vyměněno médium za čerstvé, aby se odstranil zbytkový DMSO a neuchycené buňky.

4.5.3 Pasážování buněk

Pasážování buněk je proces, kdy se redukuje počet buněk dané linie v kultivační lahvi, aby veškeré přítomné buňky měly dostatečný prostor pro růst a další dělení. Pasážováním adherentní linie je také zajištěno, že buňky skutečně zůstávají pouze v jedné vrstvě na dně kultivační lahve a netvoří shluky, případně se neuvolňují do média. Vzhledem k tomu,

že všechny tři používané buněčné linie mají přibližně stejně dlouhý buněčný cyklus, byly pasážovány vždy se stejným intervalem, a to každý třetí nebo čtvrtý den, kdy buňky dosahovaly téměř úplné konfluence. Míra konfluence byla před každou pasáží zhodnocena mikroskopicky.

Buňky byly uchovávány v inkubátoru, ve kterém byly udržovány konstantní podmínky: 95% vlhkost, teplota 37 °C a 5% atmosféra CO₂.

Nejprve bylo ve vodní lázni zahřáto DMEM (uchovávané v chladničce) a PBS (uchovávané při pokojové teplotě) na 37 °C, aby měly roztoky stejnou teplotu jako je teplota v inkubátoru a buňky tak nebyly vystaveny teplotnímu šoku. Při pokojové teplotě byl rozpuštěn alikvot roztoku trypsinu, který je uchováván při teplotě -20 °C. Všechny používané látky byly přeneseny do laminárního boxu a hrdla lahví byla ožehuta pomocí lihového kahanu, aby byla zajištěna sterilita. Do boxu byla přenesena i kultivační lahev (následující uvedené objemy látek jsou pro inkubační lahev o velikosti 75 cm²) s pasážovanou linií z inkubátoru a pomocí serologické pipety napojené na odsávačku bylo z lahve odsáto médium. Následně bylo k buňkám přidáno 5 ml PBS na promytí buněk a odstranění zbytků média, které obsahuje látky zabraňující působení trypsinu. PBS bylo poté opět pomocí odsávačky odstraněno. Do kultivační lahve byl automatickou pipetou přidán 1 ml roztoku trypsinu a kultivační lahev byla přenesena zpět do inkubátoru přibližně na 10 min, než byly buňky uvolněné ode dna lahve. Po uvolnění buněk byla kultivační lahev přenesena zpět do laminárního boxu, kde bylo k roztoku buněk v trypsinu serologickou pipetou přidáno 9 ml DMEM, ve kterém byly buňky resuspendovány do podoby homogenního roztoku, který byl následně přenesen do plastové zkumavky o objemu 15 ml. Ze zkumavky byla vrácena suspenze do kultivační lahve (0,5 – 1 ml, podle koncentrace buněk) a byla doplněna DMEM na celkový objem 20 ml. Lahev byla následně popsána datem a číslem pasáže a byla vrácena do inkubátoru. V jedné kultivační lahvi byla linie uchováвана vždy po dobu tří pasáží, při čtvrté byla lahev vyměněna za novou. Pokud buněčná suspenze nebyla na nic dalšího využívána, byla ze zkumavky odsáta odsávačkou. Používané lahve s roztoky byly opět ožehnuty a sterilně uzavřeny.

4.5.4 Odběr depletovaného média

Pro experimenty bylo zapotřebí eliminovat možné falešně pozitivní signály, které by mohlo čerstvé DMEM způsobovat. Využívalo se tak depletovaného média, které bylo odebráno od buněčné linie v kultivační lahvi po několikadenní inkubaci (bylo odebíráno po čtyřech dnech) a došlo v něm, díky metabolismu buněk, k redukci potenciálně interferentních látek. Staré médium proto bylo při pasáží odebráno serologickou pipetou a přeneseno do sterilní 50ml zkumavky. Toto médium bylo následně zcentrifugováno (3 000 rpm, 3 min), aby došlo

k usazení buněčných fragmentů. V laminárním boxu byl supernatant slit do nové sterilní zkumavky, ve které byl následně uchovávan v ledničce. Víčko zkumavky bylo zajištěno parafilmem.

4.5.5 Stanovení koncentrace buněk v buněčné suspenzi

Pro experimenty bylo důležité mít všechny vzorky se stejným obsahem buněk, aby jejich nerovnoměrnost neovlivňovala výsledky. Obsah buněk byl stanoven mikroskopicky pomocí Bürkerovy komůrky. Z resuspendované směsi zpasážovaných buněk bylo do plastové mikrozkušavky odebráno 10 μl , a mimo laminární box bylo doplněno o 90 μl roztoku trypanové modři a celý roztok byl propipetováním zhomogenizován. Na Bürkerovu komůrku bylo umístěné krycí sklíčko, pod které bylo na každou polovinu napipetováno 10 μl obarvené buněčné suspenze. Následně byla komůrka vložena do mikroskopu a při zvětšení 100x byl spočítán počet buněk v deseti čtvercích komůrky. Z těchto hodnot byl vypočítán aritmetický průměr, který byl následně vynásoben 10 (faktor ředění) a 10^4 (přepočít z obsahu jednoho čtverce komůrky). Výsledkem byla koncentrace buněk v suspenzi udávaná v jednotkách milion buněk v 1 ml.

4.5.6 Vysívání buněk do 6jamkové desky

Pro přípravu dostatečně velkých vzorků, ze kterých je následně možné izolovat RNA, bylo využíváno 6jamkové destičky, jejíž jamky mají plochu dna přibližně 9 cm^2 . Do každé jamky bylo pipetováno 2 ml naředěné buněčné suspenze, která se z původní suspenze naředila DMEM natolik, aby ve 2 ml suspenze bylo 1,5 milionu buněk. Po rozpipetování suspenze do jamek byla destička vložena do inkubátoru, kde byla nechána do druhého dne.

4.5.7 Příprava zásobních roztoků testovaných indolových látek

Ze všech testovaných látek (přehled je uveden v Tabulce č. 1) byl připraven 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobní roztok v DMSO o objemu 1 ml. Jedinou výjimkou byl FICZ, který aktivuje AhR intenzivněji než zbylé látky a byl tak připraven roztok o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzniklé roztoky byly rozpipetovány do tří alikvotů a uchovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Výjimkou byl roztok indol-3-pyrohroznové kyseliny, její alikvoty byly kvůli vyšší nestabilitě uchovány při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka č. 1: Přehled všech testovaných indolových látek

český název látky	anglický název látky	zkratka	MW
2-oxoindol	2-oxindole	2OI	133,15
3-methyl-2-oxoindol	3-methyl-2-oxindole	3M2OI	131,17
3-methylindol	3-methylindole	3MI	147,17
6-formylindolo(3,2-b)karbazol	6-formylindolo(3,2-b)carbazole	FICZ	384,31
Indol	indole	IND	117,15
indol-3-acetamid	indole-3-acetamide	IAD	174,20
indol-3-akrylát	indole-3-acrylate	IAC	209,18
indol-3-butyrová kyselina	indole-3-butyric acid	IBA	203,24
indol-3-ethanol	indole-3-ethanol	IET	161,20
indol-3-karbaldehyd	indole-3-aldehyde	IA	145,16
indol-3-karboxylová kyselina	indole-3-carboxylic acid	I3C	161,16
indol-3-mléčná kyselina	indole-3-lactic acid	ILA	205,21
indol-3-octová kyselina	indole-3-acetic acid	IAA	175,18
indol-3-propionová kyselina	indole-3-propionic acid	IPA	189,21
indol-3-pyrohroznová kyselina	indole-3-pyruvic acid	IPY	203,19
tryptamin	tryptamin	TRY	160,22

4.5.8 Inkubace buněk LS180 s indolovými látkami

Buňky vyšetě v 6jamkové destičce byly po 24 h od vyšetí vystaveny působení testovaných látek. Koncentrace látek, ve které byly přidávány k buňkám, byla $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, jednalo se tedy o 1000x naředěný zásobní roztok (pouze u FICZ byla koncentrace zásobního roztoku $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a výsledná koncentrace tak byla $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Do mikrozkušavek byly napipetovány 2 ml depletovaného média a byly doplněny o 2 μl látky. Kromě roztoků testovaných látek byly součástí experimentu také kontroly připravované stejným ředěním jako ostatní roztoky. Jako negativní kontrola sloužil roztok DMSO, který byl použit jako rozpouštědlo všech ostatních látek a mohl tak odstínit potenciální vliv rozpouštědla. Pozitivní kontrolou bylo TCDD, který se k buňkám přidával ve finální koncentraci $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z desky

s vyšetými buňkami bylo sterilní špičkou napojenou na odsávačku odsáto původní médium a na buňky byly nanесeny 2 ml příslušných roztoků. Jednotlivé jamky byly popsány a deska byla vložena do inkubátoru na 4 h (v případě optimalizačních experimentů byly buňky vystaveny působení látek i po dobu 8, 12, 16, 24 a 48 h).

Kromě testování jednotlivých látek byl také studován vliv ekvimolárních směsí všech látek, a to o koncentracích 100, 10 a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejprve byly zásobní roztoky látek nařaděny na koncentrace 10 a 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kromě FICZ, který se do směsi nepřidával). Z těchto roztoků byly připraveny tři směsi, kdy se na 2 ml depletovaného média pipetovaného k buňkám přidávaly vždy 2 μl od všech látek příslušné koncentrace. Aby došlo k vyrovnání množství rozpouštědla v negativní kontrole, bylo do ní pipetováno 30 μl , což odpovídá 1,5% obsahu DMSO v negativní kontrole. Jako pozitivní kontrola opět sloužil roztok TCDD. Buňky byly působením směsí vystaveny po dobu 4 h.

4.5.9 Izolace RNA pomocí TRI Reagent

Izolace RNA byla zahájena ihned po ukončení inkubace. Z 6jamkových desek bylo vyklepnuto médium a do každé jamky byl napipetován 1 ml vychlazeného PBS na promytí, který byl opět vyklepnut. Do jamek bylo následně napipetováno po 1 ml TRI Reagent a desky byly do zahájení izolace RNA uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vzorky s TRI Reagent byly nejprve při pokojové teplotě rozmrazeny na kývačce. Pomocí škrabky byly všechny buňky uvolněny ode dna jamek do suspenze, která byla následně přenesena do popsaných 1,5ml mikrozkuavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,2 ml chloroformu. Vzorky byly uzavřeny a po dobu 1 min protřepávány, následně byly vzorky ponechány 2 min při pokojové teplotě. Vzorky byly centrifugovány v centrifuze vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min a 14 000 rpm. Po centrifugaci byly ve vzorcích jasně patrné tři oddělené vrstvy. U dna byla patrná růžová organická fáze, ve které se nacházely proteiny, nahoře byla vodná fáze s rozpuštěnou RNA a mezi fázemi se nacházela bílá vrstva obsahující DNA. Pro izolaci RNA je tak relevantní pouze vrchní vrstva, která byla odebrána do čisté mikrozkuavky tak, aby nedošlo ke kontaminaci zbylými fázemi (bylo přenášeno 3 x 150 μl). Do mikrozkuavky bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného isopropanolu a obsah mikrozkuavek byl zvortexován a ponechán 5 min při pokojové teplotě. Poté byla opět provedena centrifugace (14 000 rpm, 13 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), po které byl u dna patrný světlý pelet RNA. Aniž by došlo k jeho porušení byl isopropanol slit a hrdla mikrozkuavek byla osušena o buničinu. K peletu byl připipetován 1 ml 75% ethanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mikrozkuavky byly opět

zcentrifugovány (14 000, 5 min, 4 °C) a stejným postupem jako u isopropanolu byl ethanol od peletu odstraněn. Aby se alkohol od RNA zcela odpařil, byly otevřené mikrozkušavky vloženy na 1 min do termobloku nastaveného na 65 °C. K vysušenému peletu bylo připipetováno 50 µl deionizované vody (objem vody byl přizpůsoben velikosti peletu RNA) a mikrozkušavky byly vloženy zpět na termoblok vyhřátý na 65 °C na dobu 5 min. Následně byly mikrozkušavky přeneseny do ledové tříště a jejich obsah byl propipetován.

Po ukončení izolace byla stanovena koncentrace získaného roztoku RNA. Spektrofotometr NanoDrop byl nastaven na stanovení koncentrace RNA a nejprve na něj bylo nanášeno 2 µl deionizované vody, aby došlo k eliminaci signálů rozpouštědla (pozadí). Následně byly proměřeny všechny získané roztoky RNA (vždy nanášeno 2 µl) a byla odečtena jak koncentrace RNA, tak poměr absorbancí při 260 a 280 nm, který odráží čistotu vyizolované nukleové kyseliny. Roztok RNA byl uchováván při teplotě -80 °C.

4.5.10 Reverzní transkripce

Pro přípravu vzorků na PCR byly potřeba vzorky DNA. Vyizolovaná jednovláčková RNA tak musela být přepsána do dvouvláčkové DNA označované jako cDNA, k čemuž sloužil proces reverzní transkripce.

Prvním krokem bylo naředění vzorků RNA vodou tak, aby bylo získáno 5 µl roztoku s obsahem 1 000 ng RNA. Objemy roztoku RNA a deionizované vody byly výpočtem stanoveny z koncentrace roztoku RNA získané spektrofotometrickým stanovením na NanoDropu. K naředěné RNA bylo přidáno po 1 µl roztoku random primerů a mikrozkušavky se směsí byly vloženy do termobloku zahřátého na 65 °C na 5 min. Vzorky byly přeneseny na led a následně byly krátce zcentrifugovány na mikrocentrifuze. Ke vzorkům bylo připipetováno po 6 µl připravené reakční směsi, jejíž složení je uvedeno v Tabulce č. 2. Směs v mikrozkušavkách byla krátce zcentrifugována a vzorky byly umístěny do termobloku nastaveného na 42 °C na 1 h, aby mohla probíhat samotná reverzní transkripce. Po uplynutí času byly mikrozkušavky přemístěny do termobloku vyhřátého na 65 °C, kde byly inkubovány po dobu 10 min, čímž byl proces reverzní transkripce zastaven. Roztok s nově nasyntetizovanou cDNA byl přenesen do ledové tříště (minimálně na 2 min) a byl 5 x naředěn přidáním 48 µl vody. Roztok byl řádně propipetován a uchován při teplotě -80 °C.

Roztok dNTPs přidávaný do reakční směsi byl připraven ze 100 mmol·l⁻¹ roztoků jednotlivých dNTPs (dTTP, dATP, dGTP, dCTP). Výsledný roztok dNTPs je 10x ředěný, z roztoků dTTP,

dATP, dGTP a dCTP tak bylo debráno po 100 μl a objem byl 600 μl deionizované vody doplněn na objem 1 ml, ten byl rozalíkvotovaný po 200 μl a uchován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (na jeden vzorek)

složka reakční směsi	koncentrace	objem (μl)
inhibitor RNáz	40 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,3
M-MuLV – reverzní transkriptáza	200 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,6
směs dNTPs	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,6
reakční pufr	10x	1,2
deionizovaná H_2O	-	3,3

4.5.11 qRT-PCR

V rámci experimentu byla sledována exprese genů *hTERT* a *CYP11A1*, kromě nich byl sledován také gen *GAPDH*, který slouží jako housekeeping gen. *GAPDH* by měl být ve všech buňkách exprimován ve stejné míře nezávisle na působení testovaných látek, přes míru jeho exprese je tak možné objektivně srovnávat rozdíly v expresi studovaných genů.

Všechny tři geny byly detekovány pomocí KiCqStart Probe Assays mixu. Pro gen *hTERT* byly nejprve přichystány zásobní roztoky primerů a proby, které jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Primery i proba pro *hTERT* byly rozpuštěny v deionizované vodě tak, aby vzniklé roztoky měly koncentraci $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Proba ale byla do reakce dávána v koncentraci $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ze zásobního roztoku tak byl vytvořen ještě 10x ředěný roztok (10 μl $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku proby + 90 μl vody). Pro všechny geny byly vytvořeny roztoky primerů, ve kterých měl F i R primer koncentraci $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (10 μl R primeru + 10 μl F primeru + 80 μl vody).

Podle počtu vzorků byly připraveny reakční směsi pro jednotlivé geny, jejich složení je uvedeno v Tabulce č. 3. PCR probíhalo v bílé 96jamkové destičce, na jednu jamku bylo pipetováno 8 μl reakční směsi, ke kterým byly přidány 2 μl roztoku cDNA daného vzorku. Pro každý vzorek byla PCR prováděna v triplikátu a jako kontrola byl zařazen i triplikát, kde k reakční směsi nebyl přidán žádný vzorek DNA, ale pouze voda. Pro každý vzorek tak bylo v rámci jednoho experimentu 9 jamek, tedy triplikát pro každý ze studovaných genů. V průběhu přípravy PCR byly po celou dobu jak všechny složky reakční směsi, tak samotná destička, do které se reakce pipetovala, uchovávány na ledové tříšti, aby nedocházelo k aktivaci přítomných enzymů.

Tabulka č. 3: Složení RT-qPCR reakční směsi na jednu jamku

složka reakční směsi	koncentrace	objem (μl)
KiCqStart mix	-	5,0
F + R primery	10 μmol·l ⁻¹	0,3
proba	10 μmol·l ⁻¹	0,2
voda	-	2,5

Po napipetování celé desky byla její vrchní část překryta průhlednou PCR fólií a uhlazena tak, aby nepřesahovala hrany desky. Deska byla poté centrifugována 3 min při 4 °C a 1 500 rpm. Následně byla deska přenesena do qPCR termocyklieru, v programu LightCycler 480 SW 1.5 byl nastavený profil průběhu PCR reakce, jak uvádí Tabulka č. 4. V programu byl také nastaven formát detekce na Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe a celkový objem reakce v jedné jamce na 10 μl.

Tabulka č. 4: Časový profil průběhu qRT-PCR

	teplota (°C)	čas	počet cyklů
preinkubace	95	10 min	1
amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
chlazení	40	30 s	1

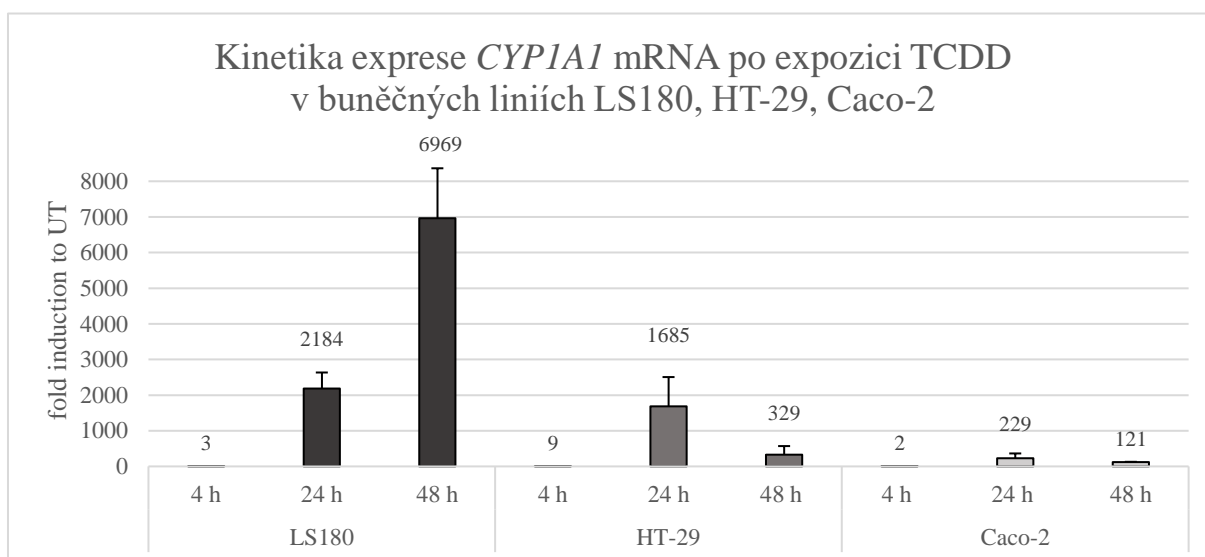
Po ukončení PCR byla v softwaru LightCycler 480 SW 1.5 provedena analýza naměřených dat (quantitative analysis/2nd derivate). Výsledkem této analýzy bylo číselné vyjádření Ct hodnot pro jednotlivé jamky, tzn. tři Ct hodnoty pro jeden gen každého vzorku, jejichž průměr byl následně vyhodnocen pomocí delta-delta Ct metody. Jedná se o relativní kvantifikaci qPCR, kdy byly přes průměry Ct hodnot referenčního genu (*GAPDH*) porovnány průměry Ct hodnot sledovaných genů (*CYP11A1* nebo *hTERT*) pro konkrétní vzorek a negativní kontrolu (UT). Výsledkem tak byla číselná hodnota vyjadřující kolikrát byla ve vzorku zvýšená exprese studovaného genu v porovnání s expresí v negativní kontrole. Signifikance těchto rozdílů napříč experimenty byla následně ověřena pomocí T-testu (parametry: oboustranné rozdělení; výběry s různým rozptylem, hladina významnosti 5 %).

5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace buněčné linie na stanovení exprese *hTERT* mRNA

Pro experiment byla důležitá volba buněčné linie, ve které bude změna exprese *hTERT* mRNA po přidání aktivátorů AhR nejvýraznější. Vzhledem ke studiu vlivu indolových derivátů, z nichž se mnohé vyskytují ve střevech jako metabolity střevních mikroorganismů, byly všechny testované linie odvozené od lidských adenokarcinomů střeva. Jednalo se o adherentní linie LS180, HT-29 a Caco-2.

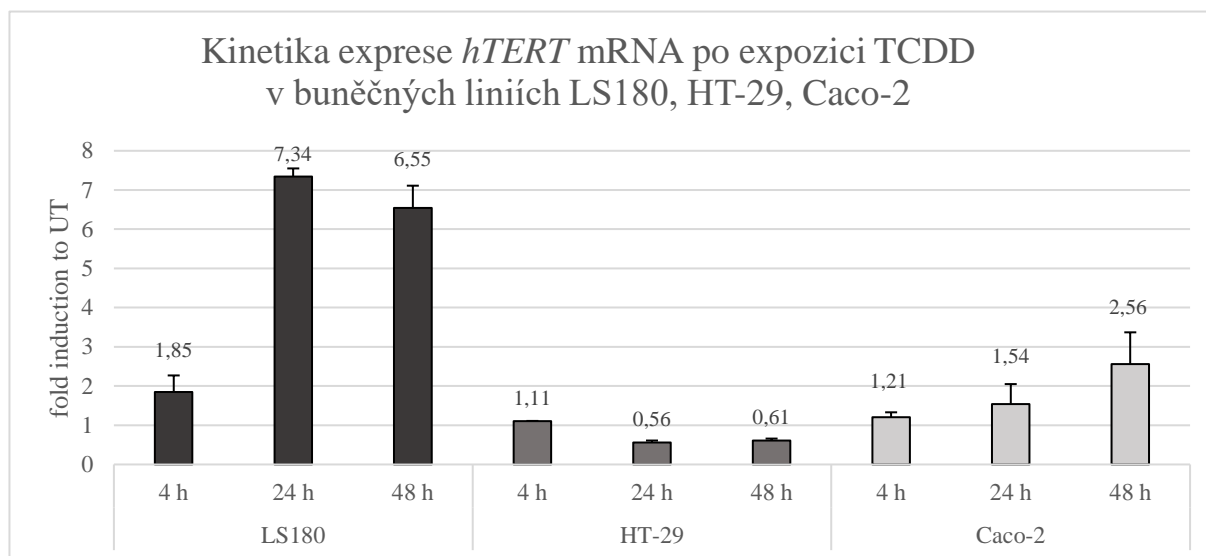
Tyto buňky byly ve dvou opakováních vystaveny působení aktivátoru AhR (TCDD, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 4, 24 a 48 h. Experiment byl následně vyhodnocen srovnáním indukce exprese testovaných vzorků a negativní kontroly (fold induction to UT). Prvním sledovaným genem byl *CYP1A1*, jehož exprese odráží funkčnost AhR signální dráhy (Graf č. 1). Jeho nejvýraznější indukce byla pozorována u buněčné linie LS180, u které rostla s časem působení TCDD, a tak byla nejvyšší hodnota indukce *CYP1A1* pozorována po 48 h expozici (průměrný nárůst vůči UT = 6960). U linií HT-29 a Caco-2 byla relativní indukce *CYP1A1* ve srovnání s indukcí v LS180 nižší a obě linie dosáhly maximální hodnoty ve vzorcích vystavených TCDD po 24 h, kdy byl u HT-29 nárůst 1685x a u Caco-2 nárůst 229x. Celkově nejnižší míry indukce *CYP1A1* dosahovala buněčná linie Caco-2 a to ve všech testovaných časech.



Graf č. 1: Indukce exprese *CYP1A1* mRNA u buněčných linií LS180, HT-29 a Caco-2 po 4, 24 a 48 h působení TCDD, vyjádřena pomocí průměrných hodnot relativní indukce exprese vůči negativní kontrole (untreated, UT; fold induction = 1), experiment byl prováděn ve dvou nezávislých opakováních

Nejvýraznější nárůst exprese *hTERT* ve všech testovaných časech vykazovala buněčná linie LS180 (Graf č. 2), kde bylo maximální zvýšení exprese (7,34 proti negativní kontrole) dosaženo za 24 h. U buněčné linie HT-29 byl pouze u 4 h expozice TCDD pozorován nevýznamný nárůst

exprese, u zbylých časových intervalů exprese *hTERT* v porovnání s negativní kontrolou dokonce klesla. U buněčné linie Caco-2 byla indukce *hTERT* méně významná než u LS180 a maxima dosáhla v čase 48 h.



Graf č. 2: Indukce exprese *hTERT* mRNA u buněčných liniích LS180, HT-29 a Caco-2 po 4, 24 a 48 h působení TCDD, vyjádřená pomocí průměrných hodnot relativní změny exprese vůči negativní kontrole (untreated, UT; fold induction = 1), experiment byl prováděn ve dvou nezávislých opakováních

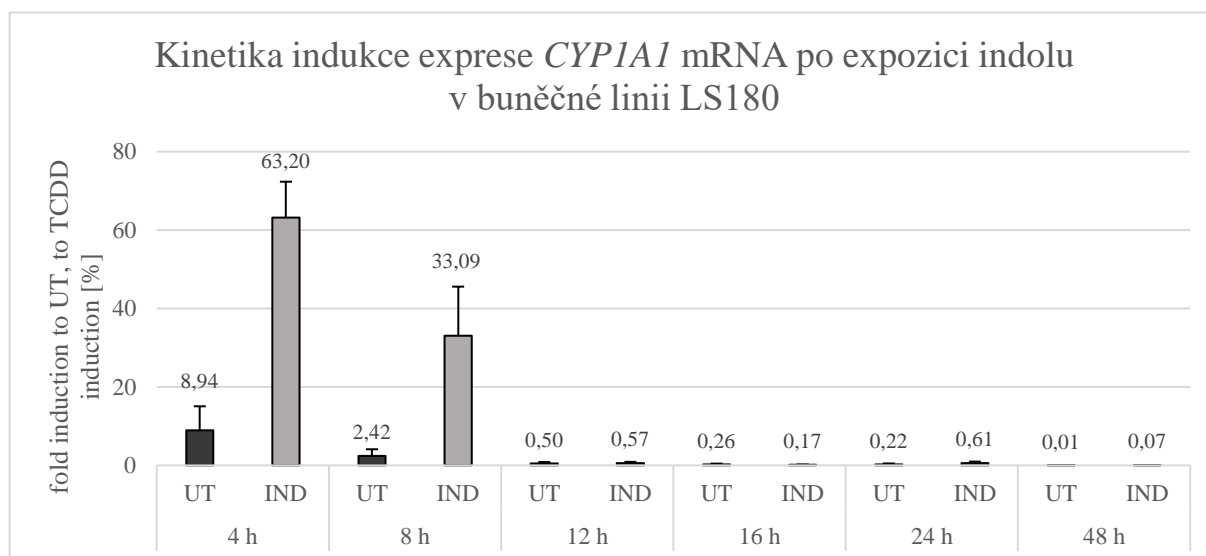
Na základě indukce exprese *CYP1A1* a *hTERT* byla pro následující experimenty zvolena linie LS180, která vykazovala pro oba geny jednoznačně nejvyšší fold induction vůči negativní kontrole.

5.2 Časová optimalizace stanovení exprese *hTERT* mRNA

Cílem druhého experimentu byla optimalizace času, po který bude buněčná linie LS180 vystavována indolovým derivátům. Na základě toho, že jsou všechny testované látky odvozeny od indolu (IND), byl v tomto experimentu vedle negativní (DMSO) a pozitivní (10 nmol·l⁻¹ TCDD) kontroly začleněn právě indol (100 μmol·l⁻¹) a buňky LS180 byly vlivu těchto látek vystaveny po dobu 4, 8, 12, 16, 24 a 48 h. Celý optimalizační experiment byl proveden ve dvou opakováních.

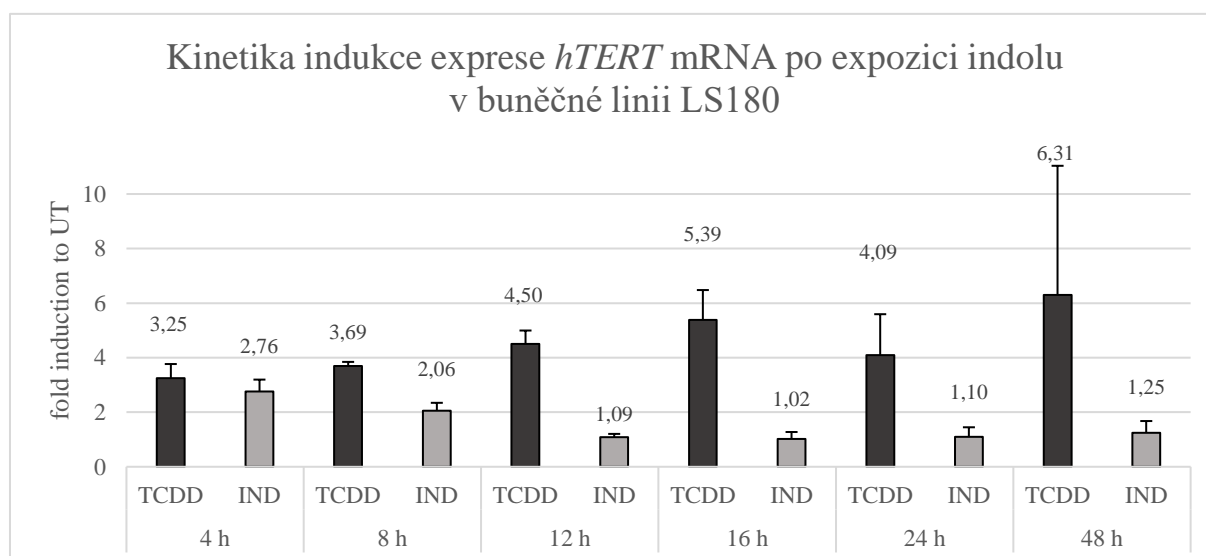
U vyjádření exprese *CYP1A1* mRNA nejsou hodnoty uváděny přímo ve fold induction (Graf č. 3) a to z důvodu velké rozmanitosti dat mezi jednotlivými experimenty. Aritmetické průměry jejich hodnot by tak nebyly dostatečně vypovídající. Hodnoty v grafu jsou proto vyjádřeny jako průměr procentuálních poměrů míry indukce exprese *CYP1A1* mRNA indolem a TCDD v rámci jednotlivých experimentů. Nejvyšší indukci exprese vykazovaly buňky LS180, které byly vystaveny působení IND po dobu 4 h (63 % indukce způsobené TCDD),

v ostatních časech docházelo k prudkému poklesu indukce a u 12, 16, 24 a 48 h inkubace byla indukce dokonce nižší než 1 % indukce TCDD (Graf č. 3).



Graf č. 3: Indukce exprese *CYP1A1* mRNA v buněčné linii LS180 po různých dlouhých expozicích indolu, vyjádřena jako procento indukce TCDD (100 % v daném čase), experiment byl prováděn ve dvou nezávislých opakováních

Indukce *hTERT* byla působením indolu maximální po 4 h (fold induction to UT = 2,76) a poté postupně klesala až k hodnotám negativní kontroly (Graf č. 4). Rozdílný profil indukce exprese *hTERT* vykazoval TCDD, u kterého docházelo k mírnému navyšování míry indukce od 4 h po 48 h, kde bylo dosaženo maxima (fold induction to UT = 6,31).



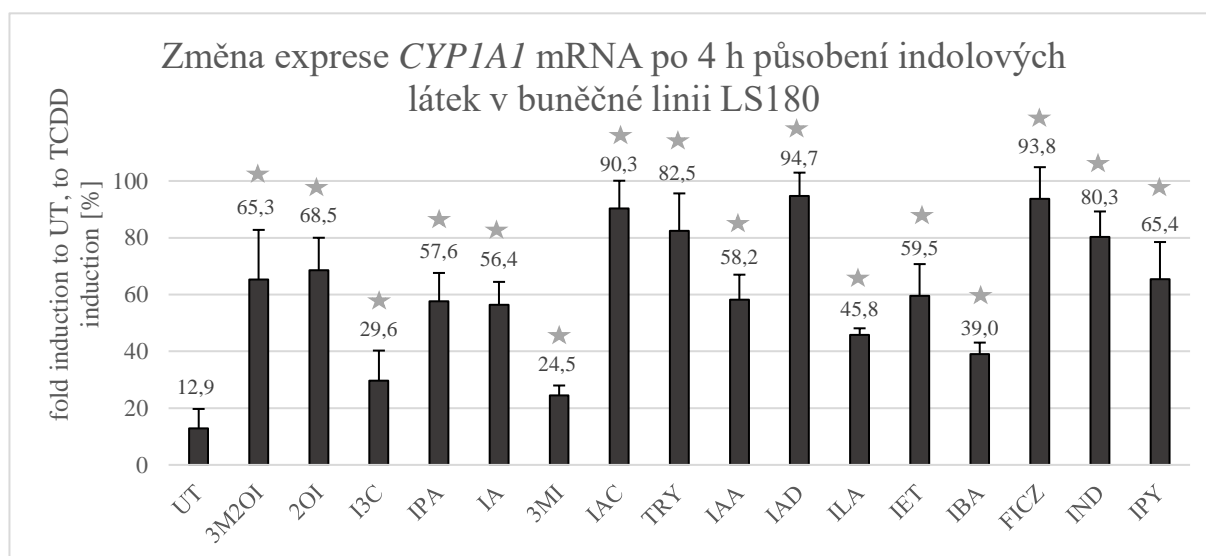
Graf č. 4: Indukce exprese *hTERT* mRNA u buněčné linii LS180 po různých dlouhých expozicích indolu a TCDD, vyjádřena pomocí průměrných hodnot indukce exprese vůči negativní kontrole (untreated, UT; fold induction = 1), experiment byl prováděn ve dvou nezávislých opakováních

Jako ideální délka expozice IND buněčné linie LS180 byl stanoven čas 4 h, který pro oba sledované geny vykazoval jednoznačně nejvyšší navýšení exprese.

5.3 Vliv indolových derivátů na expresi *hTERT* a *CYP1A1* mRNA

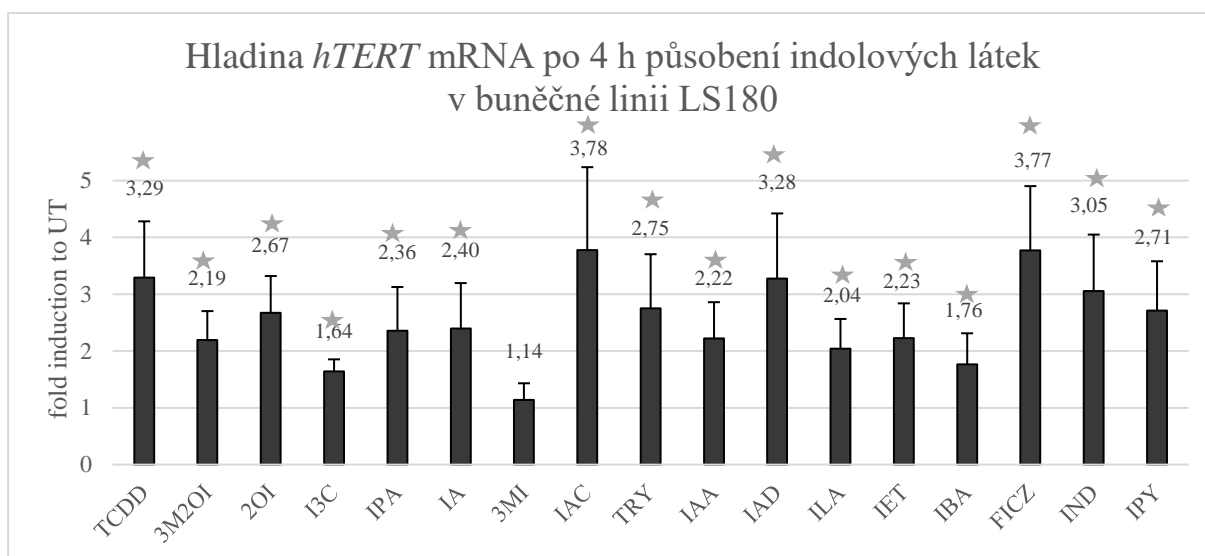
Všechny látky byly k buněčné linii LS180 přidávány na 4 h ve 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci v depletovaném médiu a pro každou látku bylo provedeno pět opakování.

Pro srovnání indukce exprese *CYP1A1* mRNA vyvolané indolovými deriváty byly opět hodnoty nárůstu proti negativní kontrole vztaženy do poměru k indukci TCDD, aby se eliminovaly řádové rozdíly indukce exprese mezi jednotlivými experimenty. Hodnoty fold induction pro TCDD se pohybovaly v rozmezí od 4,61 – 28,7x s průměrem 11,22x a byla zde pozorovaná snižující se míra indukce v závislosti na stáří buněčné linie LS180. Nejvyšší nárůst byl pozorován u IAD (94,7 %), FICZ (93,8 %) a IAC (90,3 %), naopak nejnižší u 3MI (24,5 %). U všech ostatních látek byl u *CYP1A1* pozorován procentuální nárůst indukce v rozmezí 30 – 80 % indukce TCDD (Graf č. 5).



Graf č. 5: Indukce exprese *CYP1A1* mRNA u buněčné linie LS180 po 4 h působení indolových látek, vyjádřena jako procento indukce TCDD (indukce TCDD = 100 %), signifikantní nárůst exprese vůči UT ověřený T-testem ($p < 0,05$) je označen ★, experiment byl prováděn v pěti nezávislých opakováních

Nejvyšší průměrné relativní indukce exprese *hTERT* mRNA vůči negativní kontrole (Graf č. 6) dosahovaly látky IAC (3,78x) a FICZ (3,77x). Statisticky nevýznamnou míru exprese vykazoval 3MI (1,14x). Relativně nízkého, ale statisticky významného nárůstu exprese *hTERT* dosahovaly také látky I3C (1,64x) a IBA (1,76x), u kterých indukce odpovídala přibližně 50 – 60 % exprese indukované TCDD. Nárůst exprese indukovaný působením ostatních látek (3M2OI, 2OI, IPA, IA, IAC, TRY, IAA, IAD, ILA, IET, IND, IPY) se pohyboval v rozmezí 70 – 90 % indukce TCDD. Indukce exprese *hTERT* mRNA byla na základě výsledků T-testu stanovena jako signifikantní vůči negativní kontrole u všech látek s výjimkou 3MI.



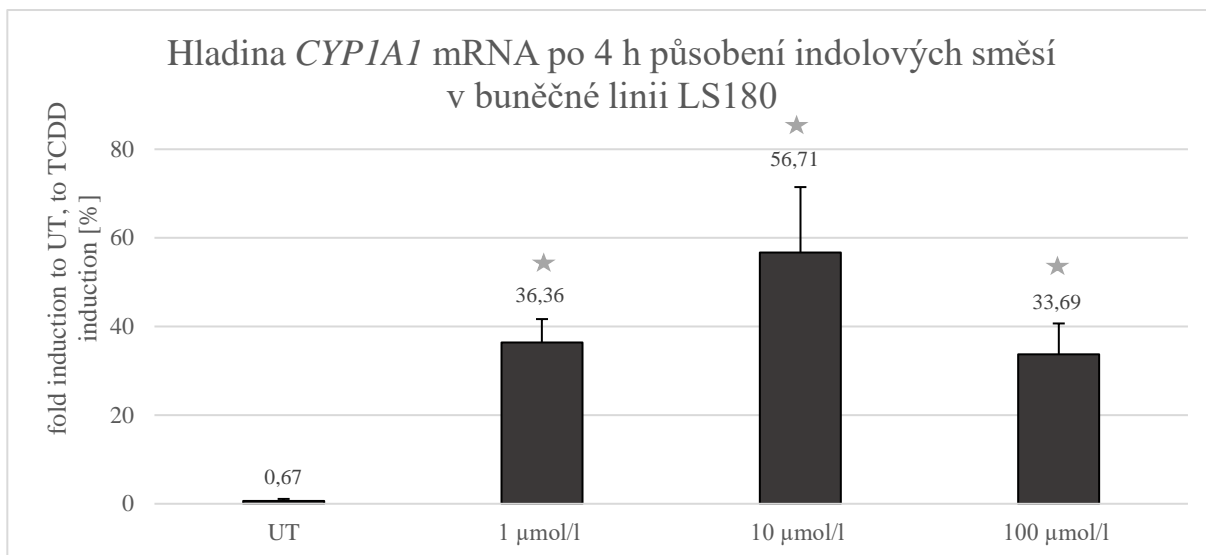
Graf č. 6: Indukce exprese *hTERT* u buněčné linie LS180 po 4 h působení indolových látek, vyjádřena pomocí průměrných hodnot indukce exprese vůči negativní kontrole (untreated, UT; fold induction = 1), signifikantní nárůst exprese vůči UT ověřený T-testem ($p < 0,05$) je označen ★, experiment byl prováděn v pěti nezávislých opakováních

5.4 Vliv ekvimolárních směsí na expresi *hTERT* a *CYP1A1* mRNA

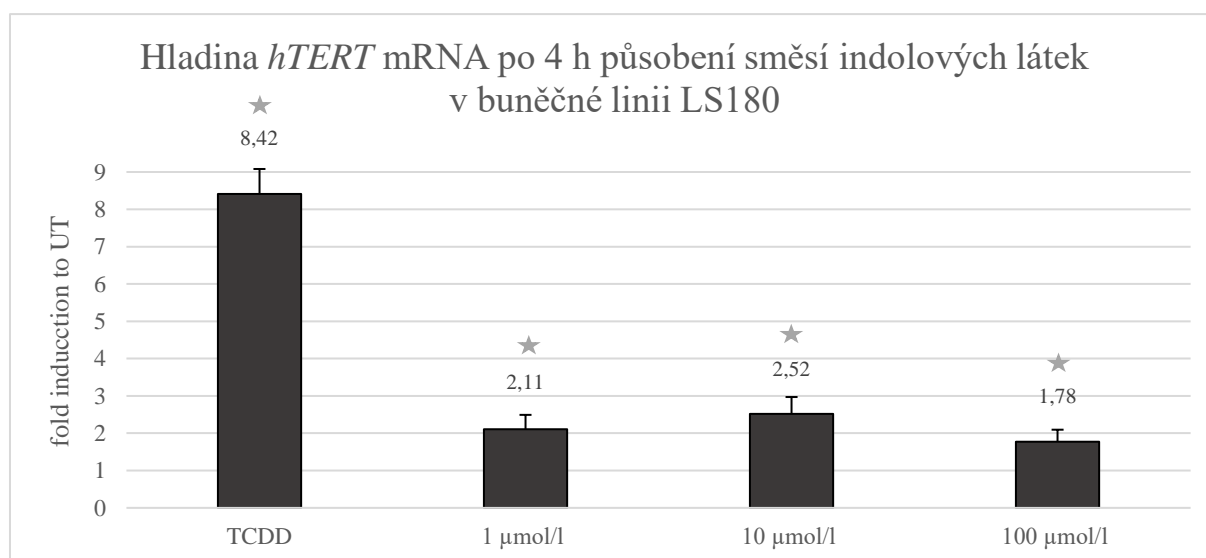
Poslední část práce se zabývala sledováním vlivu, který mohou mít na výslednou expresi *hTERT* či *CYP1A1* mRNA směsi testovaných indolových látek, v rámci, kterých se mohou látky různě ovlivňovat. Pro experiment byly připraveny ekvimolární směsi ze všech látek kromě FICZ o koncentracích 100, 10 a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kterým byly buňky LS180 vystaveny po dobu 4 h. Po ukončení inkubace buněk se směsmi nebyla ani v jednom vzorku na buněčné linii mikroskopicky pozorována jakákoliv morfologická změna ve srovnání s buňkami negativní kontroly.

Výsledky pro *CYP1A1* byly opět vztaženy k indukci způsobené TCDD a vyjádřeny v procentech (Graf č. 7). Nejvýraznější zde byla indukce u 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ směsi (56,71 %), poté u 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (36,36 %) a nejmenší u 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ směsi (33,69 %). Hodnota indukce exprese *CYP1A1* mRNA dioxinem se pohybovala v rozmezí 85 – 580x exprese v negativní kontrole.

U exprese *hTERT* mRNA dosáhla nejvyšší indukce indolová směs o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Graf č. 8), její hodnota (2,52x) odpovídá průměru hodnot nárůstu exprese všech 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indolových látek z předchozího experimentu, který je 2,50x. Nejnižší indukce dosáhla exprese *hTERT* mRNA po použití 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ směsi (1,78x), profil indukci ekvimolárních směsí indolových látek u *hTERT* tak odpovídal indukci u *CYP1A1*.



Graf č. 7: Indukce exprese *CYP1A1* mRNA u buněčné linie LS180 po 4 h působení směsí indolových látek, vyjádřena jako procento indukce TCDD (indukce TCDD = 100 %), signifikantní nárůst exprese vůči UT ověřený T-testem ($p < 0,05$) je označen ★, experiment byl prováděn ve čtyřech nezávislých opakováních



Graf č. 8: Indukce exprese *hTERT* u buněčné linie LS180 po 4 h působení směsí indolových látek, vyjádřena pomocí průměrných hodnot indukce exprese vůči negativní kontrole (untreated, UT; fold induction = 1), signifikantní nárůst exprese vůči UT ověřený T-testem ($p < 0,05$) je označen ★, experiment byl prováděn ve čtyřech nezávislých opakováních

6 DISKUSE

Bakalářská práce se zabývá studiem vlivu aktivátorů AhR, které se v těle vyskytují jako produkty metabolismu střevní mikrobioty (indolové deriváty), na expresi *hTERT* mRNA v prostředí střevních rakovinných buněčných linií. Indukce exprese *hTERT* je považována za ukazatele aktivity telomerázy v buňkách, díky které dochází ke kompenzaci zkracování telomer, což může vést až k imortalizaci buněk. Po aktivaci AhR příslušnými agonisty se receptor váže do XRE nacházejících se v promotorové oblasti genu *hTERT* a indukuje expresi.

Aktivita aryl uhlovodíkového receptoru je primárně spjata s detoxikací buňky a metabolismem různých xenobiotik, polutantů a aromatických uhlovodíků. V prostředí střev se nachází velké množství AhR aktivátorů, které zde vznikají jako produkty metabolismu střevní mikrobioty, a tak je zde AhR vysoce aktivní. U využívaných buněčných linií LS180, Caco-2 a HT-29 byla již dříve aktivita AhR popsána pomocí exprese *CYP1A1* mRNA, která se běžně používá jako maker aktivity receptoru (Burczynski *et al.*, 1999; Probst *et al.*, 1993; Rosenberg *et al.*, 1993). U všech tří linií byla rovněž detekována přítomnost aktivní telomerázy, která se v nerakovinných buňkách střevního epitelu nevyskytuje a ve studii Endoh *et al.* (2005) byla navíc prokázána indukce exprese *hTERT* mRNA v buňkách LS180 prostřednictvím survivinu. Souvislost mezi aryl uhlovodíkovým receptorem a změnou exprese *hTERT* mRNA byla poprvé popsána v Sarkar *et al.* (2006) na buněčné linii BeWo vystavené aktivátoru TCDD. Aktivovaný AhR v těchto buňkách aktivoval c-Myc (zásadní transkripční faktor pro expresi *hTERT*), čímž docházelo k navýšení exprese *hTERT* mRNA. Popsaný mechanismus je předpokládán i v tomto experimentu, nicméně indolové deriváty byly k buňkám přidávány ve vysoké koncentraci a tím, že nebyl proveden genetický knockout AhR, nelze vyloučit, že k indukci exprese *hTERT* nemohlo docházet i jiným mechanismem. Exprese katalytické podjednotky telomerázy je sice brána jako marker celkové aktivity telomerázy (Counter *et al.*, 1998), nicméně v této práci nebylo nijak ověřeno, zda navýšení exprese *hTERT* mRNA skutečně vede až ke vzniku funkčního enzymu, který je schopný syntézy nových telomerových sekvencí. Pokud by se ale podařilo prokázat nárůst aktivity enzymu v buňkách, bylo by možné vyvozovat souvislost mezi zastoupením indolových derivátů ve střevech a rychlostí proliferace rakoviny, se kterou aktivní telomeráza souvisí. Komplikací aplikace pozorovaného vlivu indolových derivátů *in vitro* do *in vivo* prostředí je rovněž komplexnost reálného střevního epitelu, kde se na rozdíl od rakovinné střevní linie nevyskytuje pouze jediný druh buněk, reagující na aktivaci AhR uniformně.

Linie byly nejprve vystaveny působení pouze TCDD, aby bylo zjištěno, v které z nich je nárůst exprese *hTERT* mRNA nejmarkantnější za předpokladu, že v této linii bude následně vykazovat největší rozdíly i při testování jednotlivých aktivátorů AhR. Na základě toho byla pro následující experimenty zvolena jen linie LS180 a vyloučené linie HT-29 a Caco-2 nebyly vůbec podrobeny působení indolů. Profily změn exprese *hTERT* mRNA po působení TCDD u buněčných linií LS180, HT-29 a Caco-2 neukazovaly žádný společný, na čase závislý trend. U exprese *CYP1A1* mRNA vykazovala linie LS180 kontinuální nárůst exprese s časem, zatímco linie HT-29 a Caco-2 dosáhly maximální indukce po 24h expozici, po které hladina exprese ke 48 h klesala. Důvod tohoto poklesu zůstal neobjasněný, protože všechny dosud prováděné experimenty na zmiňovaných liniích v souvislosti s aktivací AhR pomocí TCDD uvádí data pouze pro 24 h expozici. Zajímavá je i skutečnost, že zatímco indukce exprese *CYP1A1* mRNA u linie LS180 rostla s časem, indukce *hTERT* dosáhla maxima za 24 h a dále již nerostla. Oproti tomu indukce exprese *CYP1A1* mRNA u Caco-2 dosáhla maxima za 24 h a následně klesala, u exprese *hTERT* mRNA indukce rostla s časem. Odlišný byl výsledek i u linie HT-29, kde byl trend exprese *CYP1A1* mRNA stejný jako u Caco-2, zatímco exprese *hTERT* mRNA klesala v čase. To může naznačovat, že i přesto, že se jedná o velmi podobný typ buněk, regulace zprostředkovaná TCDD aktivovaným aryl uhlovodíkovým receptorem v nich neprobíhá stejně. K vysvětlení tohoto jevu by bylo zapotřebí např. metody chromatinové imunoprecipitace, která by prokázala, zda se AhR případně c-Myc, váží do promotoru *hTERT*.

Indol a od něho odvozené sloučeniny jsou v buňce rychle metabolizovány a ztrácí jejich schopnost aktivovat AhR, čímž se liší od stabilního TCDD. Přestože v linii LS180 byla nejvyšší indukce exprese *hTERT* mRNA po působení TCDD pozorována až po 48 h, po působení indolu nastával nejvyšší nárůst po 4 h. Tím že jsou ostatní testované látky od indolu odvozené, bylo i jejich působení testováno pouze po 4 h inkubaci. Je tak možné, že by některé deriváty (např. 3MI) v jiné časové expozici mohly vykazovat výraznější indukci exprese obou sledovaných genů. Aby byl minimalizován vliv interferujících látek, byly aktivátory AhR k buňkám přidávány v depletovaném médiu. Ve studii Öberg *et al.* (2005) bylo totiž popsáno, že se v médiu, a především ve fetálním bovinním séru kterým se médium obohacuje, vyskytují různé produkty metabolismu tryptofanu, což by mohlo způsobovat aktivaci AhR mimo záměrnou aktivaci způsobenou přidávaným indolem nebo jeho deriváty. Depletované médium se od buněk LS180 odebíralo vždy po čtyřech dnech, nicméně počet buněk nebyl vždy úplně stejný a roli mohlo také hrát stáří linie (médium bylo odebíráno v různých pasážích). Tato rozmanitost mohla způsobit různé zastoupení látek v depletovaném médiu a následnou variabilitu výsledků

mezi experimenty, pozorovanou zejména při indukci exprese *CYP1A1* mRNA. Aby bylo možné tato data vůbec porovnávat musela být exprese tohoto genu vyjadřována jako procento maximální indukce (TCDD), nikoliv jako násobek indukce v negativní kontrole.

Z prezentovaných výsledků Shervington *et al.* (2007) bylo převzato navržení experimentu, kdy se v rámci qRT-PCR sledovala exprese *hTERT*, *CYP1A1* a *GAPDH* mRNA. V této studii byla rovněž popsána přímá souvislost mezi expresí *hTERT* a *CYP1A1* mRNA. Při poklesu exprese *CYP1A1* mRNA způsobenou interferencí *CYP1A1* s siRNA totiž docházelo i k odpovídajícímu poklesu na úrovni *hTERT*. Tato souvislost ale nebyla na střevních buňkách v rámci této práce potvrzována. Testováním vlivu aktivace AhR jednotlivými indolovými deriváty na expresi *hTERT* mRNA bylo stanoveno, že všechny deriváty exprese proti negativní kontrole navyšovaly srovnatelně s pozitivní kontrolou (TCDD). Jediný aktivátor, který nevykazoval signifikantní nárůst exprese *hTERT* byl 3MI, u něhož mohla být tato nízká indukce způsobena délkou expozice, ve Vyhliďalová *et al.* (2019) byl totiž popsán signifikantní nárůst exprese *CYP1A1* mRNA u monometylovaných indolových derivátů až po 24 h. V rámci indukce exprese *CYP1A1* mRNA sice 3MI vykazoval signifikantní nárůst proti negativní kontrole, ale exprese byla při porovnání s ostatními látkami velmi nízká. Je tak možné že by se při delší expozici prokázala signifikantní indukce také u *hTERT* mRNA.

Testované směsi byly připraveny jako ekvimolární roztoky všech indolových derivátů s výjimkou FICZ (který v lidském těle nevzniká primárně ve střevech ale v kůži). Ekvimolární směsi neodpovídaly reálnému zastoupení metabolitů ve střevech, které bylo na základě rozboru lidské stolice popsáno v Dong *et al.* (2020). Příprava směsi, která by odpovídala popsané realitě střev by byla komplikovaná s ohledem na velmi nízké koncentrace některých látek a také na přítomnost metabolitů, jejichž samostatný vliv nebyl v rámci práce testován. Použitím směsi se stejným zastoupením všech látek tak bylo alespoň demonstrováno, že směs látek o 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indukovala expresi *hTERT* mRNA slaběji než jednotlivé roztoky látek o této koncentraci, což ukazuje na přítomnost antagonistických vztahů mezi jednotlivými indoly. Antagonistické chování bylo v Rasmunssen *et al.* (2016) popsáno u 3MI, který samostatně aktivoval AhR, nicméně v kombinaci s TCDD indukci exprese *CYP1A1* mRNA snižoval v porovnání s indukcí způsobenou čistě TCDD. Mohl tak způsobovat snížení aktivity AhR způsobené ostatními látkami v ekvimolární směsi, nicméně antagonistické chování mohly vykazovat i jiné deriváty.

Závěrem lze tedy říct, že mikrobiální deriváty indolu až na výjimky aktivují AhR a vyvolávají indukci exprese *hTERT* mRNA, která klesá, pravděpodobně v důsledku metabolismu, s časem.

Navíc, vzájemná kombinace látek poukazuje na agonisticko-antagonistické chování v rámci ekvimolární směsi testovaných látek. To, zda je jediný indolový derivát schopen antagonismu nebo se jedná o souhrnné působení vícero látek, bude třeba ověřit dalšími experimenty. Stejně tak, zda opakovaná expozice těmto indolům či jejich směsi má vliv na proliferaci nádorových střevních linií LS180, HT-29 či Caco-2 nebo dokonce na fyziologické střevní enterocyty.

7 ZÁVĚR

V rámci této práce byla zjištěna indukce exprese *hTERT* mRNA přes aktivaci AhR v prostředí střevních buněčných linií HT-29, Caco-2 a LS180, z nichž nejvýraznější nárůst vykazovala poslední z nich. Hlavní detekční metodou, kterou byla tato exprese detekována, byla qRT-PCR, v rámci které se vedle exprese *hTERT* mRNA rovněž sledovala exprese *CYP1A1* mRNA, který sloužil jako marker aktivity AhR. Využívanými ligandy byl indol a 15 jeho derivátů, u kterých se používaly 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoky s výjimkou FICZ o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a které všechny vykazovaly po 4 h působení u buněčné linie LS180 signifikantní korelující nárůst exprese obou sledovaných genů vůči negativní kontrole. Jedinou látkou, která signifikantní expresi nevyvolala, byl 3-methylindol. Následně byly testovány i směsi všech látek s výjimkou FICZ, které byly studovány v koncentracích 100, 10 a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kde nejvýraznější aktivaci vykazovala směs o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Snížená aktivace exprese ve 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ směsi naznačuje přítomnost antagonistického chování některých testovaných látek.

8 LITERATURA

- 1 Akincilar S. C., Unal B., Tergaonkar V. (2016): Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Science* 73(8): 1659-1670
- 2 Allsopp R. C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E. V., Futcher A. B., Greider C. W., Harley C. B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(21): 10114-10118
- 3 Benson J. M., Shepherd D. M. (2011): Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicological Sciences* 120(1): 68-78
- 4 Blackburn E. H. (1994): Telomeres: No end in sight. *Cell* 77(5): 621-623
- 5 Blackburn E. H., Budarf M. L., Challoner P. B., Cherry J. M., Howard E. A., Katzen A. L., Pan W. C., Ryan T. (1983): DNA termini in Ciliate macronuclei. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 47(0): 1195-1207
- 6 Blackburn E. H., Gall J. (1978): A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* 120(1): 33-53
- 7 Blackburn E. H., Greider C. W., Henderson E., Lee M. S., Shampay J., Shippen-Lentz D. (1989): Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome* 31(2): 553-560
- 8 Blasco M. A. (2003): Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *European Journal of Cell Biology* 82(9): 441-446
- 9 Blasco M. A., Funk W., Villeponteau B., Greider C. W. (1995): Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269(5228): 1267-1270
- 10 Burczynski M. E., Lin H. K., Penning T. M. (1999): Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Research* 59(3): 607-614
- 11 Corrada D., Denison M. S., Bonati L. (2017): Structural modeling of the AhR: ARNT complex in the bHLH-PASA-PASB region elucidates the key determinants of dimerization. *Molecular BioSystems* 13(5): 981-990

- 12 Counter C. M., Meyerson M., Eaton E. N., Ellisen L. W., Caddle S. D., Haber D. A., Weinberg R. A. (1998): Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16(9): 1217-1222
- 13 Davarinos N. A., Pollenz R. S. (1999): Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 274(40): 28708-28715
- 14 De Lange T., Jacks T. (1999): For better or worse? Telomerase inhibition and cancer. *Cell* 98(3): 273-275
- 15 De Lange T., Shiue L., Myers R. M., Cox D. R., Naylor S. L., Killery A. M., Varmus H. E. (1990): Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular and Cellular Biology* 10(2): 518-527
- 16 Dogan F., Forsyth N. R. (2021): Telomerase regulation: A role for epigenetics. *Cancers* 13(6): 1213
- 17 Dong F., Hao F., Murray I. A., Smith P. B., Koo I., Tindall A. M., Kris-Erheron P. M., Gowda K., Amin S. G., Patterson A. D., Perdew G. H. (2020): Intestinal microbiota-derived tryptophan metabolites are predictive of Ah receptor activity. *Gut Microbes* 12(1): 1-24
- 18 Dunham M. A., Neumann A. A., Fasching C. L., Reddel R. R. (2000): Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26: 447-450
- 19 Endoh T., Tsuji N., Asanuma K., Yagihashi A., Watanabe N. (2005): Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription. *Experimental Cell Research* 305(2): 300-311
- 20 Errington T. M., Fu D., Wong J. M. Y., Collins K. (2008): Disease-associated human telomerase RNA variants show loss of function for telomere synthesis without dominant-negative interference. *Molecular and Cell Biology* 28(20): 6510-6520
- 21 Fernandez-Salguero P. M., Hilbert D. M., Rudikoff S., Ward J. M., Gonzalez F. J. (1996): Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant

- to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140(1): 173-179
- 22 Fuks F., Burgers W. A., Brehm A., Hughes-Davies L., Kouzarides T. (2000): DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* 24(1): 88-91
 - 23 Giannone J. V., Li W., Probst M., Okey A. B. (1998): Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochemical Pharmacology* 55(4): 489-497
 - 24 Gouédard C., Barouki R., Morel Y. (2004): Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 24(12): 5209-5222
 - 25 Gravel S., Larrivée M., Labrecque P., Wellinger R. J. (1998): Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280(5364): 741-744
 - 26 Greider C. W. (1999): Telomeres do D-loop – T-loop. *Cell* 97(4): 419-422
 - 27 Greider C. W., Blackburn E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43(2): 405-413
 - 28 Greider C. W., Blackburn E. H. (1987): The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51(6): 887-898
 - 29 Griffith J. D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R. M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. (1999): Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97(4): 503-514
 - 30 Hahn M. E., Allan L. L., Sherr D. H. (2009): Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochemical Pharmacology* 77(4): 485-497
 - 31 Harper P. A., Prokipcak R. D., Bush L. E., Golas C. L., Okey A. B. (1991): Detection and characterization of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 290(1): 27-36
 - 32 Hastie N. D., Dempster M., Dunlop M. G., Thompson A. M., Green D. K., Allshire R. C. (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346(6287): 866-868

- 33 Hayflick L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37(3): 614-636
- 34 Hrdličková R., Nehyba J., Bose H. R. Jr. (2012): Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Molecular and Cell Biology* 32(21): 4283-4296
- 35 Hubbard T. D., Murray I. A., Perdew G. H. (2015): Indole and tryptophan metabolism: Endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. *Drug Metabolism and Disposition* 43(10): 1522-1535
- 36 Chiu C.-P., Dragowska W., Kim N. W., Vaziri H., Yui J., Thomas T. E., Harley C. B., Lansdorp P. M. (1996): Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human Bone Marrow. *Stem cells* 14(2): 239-248
- 37 Jain S., Dolwick K. M., Schmidt J. V., Bradfield C. A. (1994): Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *The Journal of biological chemistry* 269(50): 31518–31524
- 38 Jin U.-H., Lee S.-O., Sridharan G., Lee K., Davidson L. A., Jayaraman A., Chapkin R. S., Alaniz R., Safe S. (2014): Microbiome-derived tryptophan metabolites and their aryl hydrocarbon receptor-dependent agonist and antagonist activities. *Molecular Pharmacology* 85(5): 777-788
- 39 Karasová M., Procházková J., Tylichová Z., Fedr R., Ciganek M., Machala M., Dvořák Z., Vyhlídalová B., Zůvalová I., Ehrmann J., Bouchal J., Andrsík Z., Vondráček J. (2022): Inhibition of aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression disrupts cell proliferation and alters energy metabolism and fatty acid synthesis in colon cancer cells. *Cancers* 14(17): 4245
- 40 Karlseder J., Broccoli D., Dai Y., Hardy S., de Lange T. (1999): p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283(5406): 1321-1325
- 41 Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266(5193): 2011-2015
- 42 Kim W., Ludlow A. T., Min J., Robin J. D., Standler G., Mender I., Lai T.-P., Zhang N., Wright W. E., Shay J. W. (2016): Regulation of the human telomerase gene TERT

- by telomere position effect – over long distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLOS Biology* 14(12): e2000016
- 43 Ko H. P., Okino S. T., Ma Q., Whitlock J. P. (1996): Dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Molecular and Cellular Biology* 16(1): 430-436
 - 44 Ko H. P., Okino S. T., Ma Q., Whitlock J. P. Jr. (1997): Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. *Molecular and Cell Biology* 17(7): 3497-3507
 - 45 Köhle C., Gschaidmeier H., Lauth D., Topell S., Zitzer H., Bock K. W. (1999): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Archives of Toxicology* 73(3): 152-158
 - 46 Kolluri S. K., Jin U.-H., Safe S. (2017): Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Archives of Toxicology* 91(7): 2497-2513
 - 47 Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M. (2000): Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic acids research* 28(3): 669–677
 - 48 Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. (2018): AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 1-9
 - 49 Lee J.-H., Lee J. (2010): Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4): 426-444
 - 50 Li S., Pei X., Zhang W., Xie H. Q., Zhao B. (2014): Functional analysis of the dioxin Response Elements (DREs) of the murine CYP1A1 gene promoter: Beyond the core DRE sequence. *International Journal of Molecular Sciences* 15(4): 6475-6487
 - 51 Lingner J., Hughes T. R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T. R. (1997): Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276(5312): 561-567
 - 52 Lingner J., Cooper J. P., Cech T. R. (1995): Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 269(5230):1533–1534

- 53 Lopatina N. G., Poole J. C., Saldanha S. N., Hansen N. J., Key J. S., Pita M. A., Andrews L. G., Tollefsbol T. O. (2003): Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306(3): 650-659
- 54 Lü M.-H., Tang B., Zeng S., Hu C.-J., Xie R., Wu Y.-Y., Wang S.-M., He F.-T., Yang S.-M. (2016): Long noncoding RNA BC032469, a novel competing endogenous RNA, upregulates hTERT expression by sponging miR-1207-5p and promotes proliferation in gastric cancer. *Oncogene* 35(27): 3524-3534
- 55 McClintock B. (1929): A Cytological and Genetical Study of Triploid Maize. *Genetics* 14(2): 180-222
- 56 McClintock B. (1938): The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23(4): 315-376
- 57 McClintock B. (1941): The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26(2): 234-282
- 58 McEachern M. J., Blackburn E. H. (1996): Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes and development* 10(14): 1822-1834
- 59 Miller C. A. (1997): Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 272(52): 32824-32829
- 60 Misiti S., Nanni S., Fontemaggi G., Cong Y. S., Wen J., Hirte H. W., Piaggio G., Sacchi A., Pontecorvi A., Bacchetti S., Farsetti A. (2000): Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Molecular and Cellular Biology* 20(11): 3764-377
- 61 Morin G. B. (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59(3): 521-529
- 62 Moyzis R. K., Buckingham J. M., Cram L. S., Dani M., Deaven L. L., Jones M. D., Meyne J., Ratliff R. L., Wu J. R. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(18): 6622-6626

- 63 Nakamura T. M., Morin G. B., Chapman K. B., Weinrich S. L., Andrews W. H., Lingner J., Harley C. B., Cech T. R. (1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277(5328): 955-959
- 64 Nguyen T. A., Hoivik D., Lee J. E., Safe S. (1999): Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 367(2): 250-257
- 65 Niu C.-C., Yuan L.-J., Lin S.-S., Chen L.-H., Chen W.-J. (2009): Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile. *Clinical Orthopaedics and Related Research®* 467(12): 3263-3272
- 66 Öberg M., Bergander L., Håkansson H., Rannug U., Rannug A. (2005): Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicological Sciences* 85(2): 935-943
- 67 Olovnikov A. M. (1973): A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology* 41(1): 181-190
- 68 Panossian L. A., Porter V. R., Valenzuela H. F., Zhu X., Reback E., Masterman D., Cummings J. L., Effros R. B. (2003): Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of Aging* 24(1): 77-84
- 69 Petrusis J., Perdew G. H. (2002): The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-Biological Interactions* 141(1-2): 25-40
- 70 Poland A., Glover E., Kende A. S. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 251(16): 4936-4946
- 71 Probst M. R., Reisz-Porszasz S., Agbunag R. V., Ong M. S., Hankinson O. (1993): Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Molecular Pharmacology* 44(3): 511-518
- 72 Ramlee M. K., Wang J., Toh W. X., Li S. (2016): Transcription Regulation of the human Telomerase reverse transcriptase (hTERT) Gene. *Genes* 7(8): 50
- 73 Rasmussen M. K., Balaguer P., Ekstrand B., Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S., Ryffel B. (2016): Skatole (3-methylindole) is a partial aryl hydrocarbon receptor agonist

- and induces CYP1A1/2 and CYP1B1 expression in primary human hepatocytes. *PLoS One* 11(5): e0154629
- 74 Reyes H., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. (1992): Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256(5060): 1193-1195
- 75 Rosenberg D. W., Leff T. (1993): Regulation of cytochrome P450 in cultured human colonic cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300(1): 186-192
- 76 Sarkar P., Shiizaki K., Yonemoto J., Sone H. (2006): Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in co-operation with c-Myc. *International Journal of Oncology* 28(1): 43-51
- 77 Sauerwald A., Sandin S., Cristofati G., Scheres S. H. W., Lingner J., Rhodes D. (2013): Structure of active dimeric human telomerase. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(4): 454-460
- 78 Sfeir A. J., Chai W., Shay J. W., Wright W. E. (2005): Telomere-end processing. *Molecular Cell* 18(1): 131-138
- 79 Shepelev M. V., Kalinichenko S. V., Saakian E. K., Korobko I. V. (2019): Xenobiotic response elements (XREs) from human CYP1A1 gene enhance the hTERT promoter activity. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 485(1): 150-152
- 80 Shervington A., Mohammed K., Patel R., Lea R. (2007): Identification of a novel co-transcription of P450/1A1 with telomerase in A549. *Gene* 388(1-2): 110-116
- 81 Shimada Y., Kinoshita M., Harada K., Mizutani M., Masahata K., Kayama H., Takeda K. (2013): Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS ONE* 8(11): e0080604
- 82 Tompkins L. M., Li H., Li L., Lynch C., Xie Y., Nakanishi T., Ross D. D., Wang H. (2010): A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochemical Pharmacology* 80(11): 1754-1761
- 83 Vyhlídalová B., Poulíková K., Bartoňková I., Krasulová K., Vančo J., Trávníček Z., Mani S., Dvořák Z. (2019): Mono-methylindoles induce CYP1A genes and inhibit CYP1A1 enzyme activity in human hepatocytes and HepaRG cells. *Toxicology Letters* 313: 66-76

- 84 Wheatley S. P., Altieri A. C. (2019): Survivin at a glance. *Journal of Cell Science* 132(7): jcs223826
- 85 Whitelaw M. L., McGuire J., Picard D., Gustafsson J. A., Poellinger L. (1995): Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(10): 4437-4441
- 86 Wright W. E., Piatyszek M. A., Rainey W. E., Byrd W., Shay J. W. (1996): Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics* 18(2): 173-179
- 87 Wright W. E., Shay J. W. (1992): The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental Gerontology* 27(4): 383-389
- 88 Wyatt M., Greathouse K. L. (2021): Targeting dietary and microbial tryptophan-indole metabolism as therapeutic approaches to colon cancer. *Nutrients* 13(4): 1189
- 89 Wynford-Thomas D., Kipling D. (1997): The end-replication problem. *Nature* 389: 551
- 90 Yanofsky C., Horn V., Gollnick P. (1991): Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 173(19): 6009-6017
- 91 Ye W., Chen R., Chen X., Huang B., Lin R., Xie X., Chen J., Jiang J., Deng Y., Wen J. (2019): AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1. *The FEBS Journal* 286(21): 4215-4231
- 92 Yin J., Sheng B., Han B., Pu A., Yang K., Li P., Wang Q., Xiao W., Yang H. (2016): The AhR is involved in the regulation of LoVo cell proliferation through cell cycle-associated proteins. *Cell Biology International* 40(5): 560-568
- 93 Zhou N., Fei D., Zong S., Zhang M., Yue Y. (2016): MicroRNA-138 inhibits proliferation, migration and invasion through targeting hTERT in cervical cancer. *Oncology Letters* 12(5): 3633-3639