

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Ondřej Vrbka

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Modulace aktivity aryluhlovodíkového receptoru a její vliv na
markery senescence ve střevních buňkách**

Bakalářská práce

Ondřej Vrbka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ondřej VRBKA
Osobní číslo: R21764
Studijní program: B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Modulace aktivity aryluhlovodíkového receptoru a její vliv na markery senescence ve střevních buňkách
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení exprese markerů senescence působením vybraných látek modulujících aktivitu aryluhlovodíkového receptoru
- 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) Nacarino-Palma A et al: Aryl hydrocarbon receptor blocks aging-induced senescence in the liver and fibroblast cells, 2022
- 2) Giménez-Bastida JA et al: The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells, 2020
- 3) Kehagias P et al: Regorafenib Induces Senescence and Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer to Promote Drug Resistance, 2022
- 4) Qin S et al: Role of senescence induction in cancer treatment. World Journal of Clinical Oncology, 2018
- 5) Collado et al: Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature, 2005

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 5. února 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 20. února 2023

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

| | |
|---------------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Ondřej Vrbka |
| Název práce: | Modulace aktivity aryluhlovodíkového receptoru a její vliv na markery senescence ve střevních buňkách |
| Typ práce: | Bakalářská |
| Pracoviště: | Katedra buněčné biologie a genetiky |
| Vedoucí práce: | doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2024 |
| Abstrakt: | Bakalářská práce se zabývá vlivem agonistů a antagonistů aryluhlovodíkového receptoru na expresi senescenčních markerů. V teoretické části je blíže popsán aryluhlovodíkový receptor, jeho ligandy a signální dráha. Dále byla popsána senescence a jak k ní v buňkách dochází. V experimentální části byla nejdříve pomocí western blot analýzy potvrzena absence proteinu AhR v AhR-deficientních buňkách a následně bylo na základě qRT-PCR analýzy exprese CDKN1A a CDKN2A ověřeno, zda použití antagonistů AhR může vyvolat podobný senescenci indukující účinek jako knockout AhR a případně ho srovnat s účinkem typických agonistů. |
| Klíčová slova: | Aryluhlovodíkový receptor, senescence, CDKN1A, CDKN2A, CYP1A1 |
| Počet stran: | 45 |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | Český |

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Ondřej Vrbka

Title: Modulation of arylhydrocarbon receptor activity and its impact on markers of senescence in the intestinal cells

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

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

The year of presentation: 2024

Summary: The bachelor thesis deals with the influence of arylhydrocarbon receptor agonists and antagonists on the expression of senescence markers. In the theoretical part, the arylhydrocarbon receptor, its ligands and the signaling pathway are described in detail. Furthermore, senescence and how it occurs in cells was described. In the experimental part, the non-functionality of the AhR protein in AhR-deficient cells was first confirmed by western blot analysis and then, based on qRT-PCR analysis of CDKN1A and CDKN2A expression, it was tested whether the use of AhR antagonists can induce a similar senescence-inducing effect as AhR knockout and possibly compared it with the effect of typical agonists.

Keywords: Arylhydrocarbon receptor, senescence, CDKN1A, CDKN2A, CYP1A1

Number of pages: 45

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení

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

V Olomouci, dne

.....

Ondřej Vrbka

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkovat svému vedoucímu práce, panu doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., především za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup. Dále bych chtěl poděkovat za pomoc a cenné rady při laboratorní práci všem pracovníkům laboratoře Molekulární toxikologie a farmakologie.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Cíle práce | 2 |
| 3 Literární přehled | 3 |
| 3.1 Aryluhlovodíkový receptor..... | 3 |
| 3.1.1 Signální dráha AhR..... | 4 |
| 3.1.2 Ligandy AhR | 5 |
| 3.1.3 CYP1A1 | 6 |
| 3.2 Senescence..... | 7 |
| 3.2.1 Cyklin-dependentní kinázy..... | 9 |
| 3.2.2 Inhibitory CDK..... | 12 |
| 3.2.3 Sekreční fenotyp asociovaný se senescencí | 13 |
| 4 Materiály a metody | 15 |
| 4.1 Biologický materiál | 15 |
| 4.2 Chemikálie..... | 15 |
| 4.3 Laboratorní pomůcky | 17 |
| 4.4 Přístroje..... | 18 |
| 4.5 Experimentální metody | 19 |
| 4.5.1 Rozmražení buněčné linie..... | 19 |
| 4.5.2 Pasaážování buněk..... | 19 |
| 4.5.3 Stanovení koncentrace buněk a vysetí na 6jamkovou kultivační destičku | 20 |
| 4.5.4 Inkubace buněk s testovanými látkami..... | 21 |
| 4.5.5 Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace | 22 |
| 4.5.6 SDS-PAGE..... | 22 |
| 4.5.7 Western blotting..... | 23 |
| 4.5.8 Detekce proteinů | 24 |
| 4.5.9 Izolace RNA | 24 |
| 4.5.10 Reverzní transkripce..... | 25 |
| 4.5.11 qRT-PCR..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 5 Výsledky | 28 |
| 5.1 Exprese AhR na úrovni RNA a proteinu | 28 |
| 5.2 Exprese genů CDKN1A a CDKN2A na úrovni RNA v buněčných liniích HT29-WT a HT29-AhR KO | 29 |
| 5.3 Vliv agonistů a antagonistů AhR na expresi genů CYP1A1, CDKN1A a CDKN2A na úrovni RNA | 30 |
| 6 Diskuse | 35 |
| 7 Závěr | 38 |
| 8 Literatura | 39 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------------|--|
| 3-MC | 3-methylcholantren |
| AhR | aryluhlovodíkový receptor |
| AhRR | AhR represor |
| APS | peroxodisíran amonný |
| ARNT | jaderný translokátor AhR |
| BaP | benzo(a)pyren |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| CDKN1A | inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1A |
| CDKN2A | inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A |
| CKD | cyklin-dependentní kináza |
| CKI | inhibitory cyklin-dependentní kináz |
| CYP1A1 | cytochrom P450 rodiny 1, podrodiny A, člen 1 |
| dH ₂ O | deionizovaná voda |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| FAK | fokální adhezivní kináza |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| FICZ | 6-formylindolo[3,2- <i>b</i>]carbazole |
| FOXM1 | Forkhead Box M1 |
| GADPH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina |
| HSP90 | Heat Shock Protein 90 |
| IL1 | inteleukin 1 |
| IPA | indol-3-propionová kyselina |
| ITE | 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester |
| KLF6 | Krüppel-like faktor 6 |
| MAPK | mitogenem aktivovaná proteinkináza |
| MNF | 3'-methoxy-4'-nitroflavone |
| NC-XRE | non-canonical XRE |

| | |
|------------------|---|
| PAS | Per-Arnt-Sim |
| PBS | fosfátový pufr |
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| RB | retinoblastomový protein |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institut médium |
| RT-qPCR | reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí |
| SA- β -gal | β -galaktosidáza asociovaná se senescencí |
| SASP | sekreční fenotyp asociovaný se senescencí |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným |
| TCDD | 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin |
| TEMED | tetramethylethylendiamid |
| TNF α | faktor nádorové nekrózy |
| UT | untreated (negativní kontrola) |
| XRE | xenobiotic responsive element |

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Kanonická dráha AhR

Obrázek č. 2: Buněčný cyklus

Obrázek č. 3: Schéma pipetování testovaných sloučenin do 6jamkové destičky

Obrázek č. 4: Časové rozvržení experimentu

Obrázek č. 5: Reprezentativní western blot detekce proteinů AhR a β -aktin

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Složení chemikálií k přípravě dělicího a zaostřovacího gelu

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro RT-qPCR

Tabulka č. 4: Časový profil průběhu RT-qPCR reakce

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro TaqMan RT-qPCR

Tabulka č. 6: Časový profil průběhu TaqMan RT-qPCR reakce

Tabulka č. 7: Naměřené Ct hodnoty RT q-PCR analýzy genu AhR

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Exprese CDKN1A a CDKN2A mRNA pro vzorky negativní kontroly v HT29-WT a AhR KO

Graf č. 2: Exprese CYP1A1 mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek

Graf č. 3: Exprese CYP1A1 mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek a inkubaci 72 h

Graf č. 4: Exprese CDKN1A mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek

Graf č. 5: Exprese CDKN1A mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek a inkubaci 72 h

Graf č. 6: Exprese CDKN2A mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek

Graf č. 7: Exprese CDKN2A mRNA v HT29-WT a AhR KO po 24h expozici látek a inkubaci 72 h

1 ÚVOD

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který hraje důležitou roli v buněčné fyziologii. Tento receptor spouští expresi mnoha genů, mezi nimi i těch, které kódují řadu enzymů metabolizujících cizorodé látky. Nedávná pozorování odhalila důležitou roli AhR v diferenciaci buněk a pluripotenci, což podporuje jeho potenciál jako terapeutického cíle. V posledních letech se zaměřily studie ohledně AhR na jeho funkci při buněčné senescenci, protože roste zájem o terapeutické ovlivnění senescence s cílem zlepšit průběh zdravého stárnutí a onemocnění souvisejících s věkem. Nedávná studie uvádí experimentální důkaz, že AhR je molekulárním mezistupněm v signálních drahách, které řídí interakci mezi senescencí a buněčném přeprogramováním. V této studii byla také zjištěna souvislost mezi AhR a expresí senescenčních markerů indukované v myších fibroblastech, která podporuje roli AhR jako anti-senescenčního a protinádorového faktoru. Pokud by se podařila zopakovat indukce některých těchto senescenčních markerů při experimentech s lidskými buněčnými liniemi, u kterých bude napodobeno prostředí, ve kterém nebude přítomen funkční AhR, otevřelo by to možnost modulace aktivity AhR pomocí nových terapeutických postupů a léčiv.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení exprese markerů senescence působením vybraných látek modulujících aktivitu aryluhlovodíkového receptoru
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR, receptor pro aromatické uhlovodíky, z angl. „aryl hydrocarbon receptor,“) je ligandem aktivovaný transkripční faktor patřící do rodiny PAS (Per-ARNT-Sim) transkripčních faktorů, který společně s proteinem ARNT (jaderný translokátor AhR – „AhR nuclear translocator“) řídí expresi genů kódujících řadu enzymů metabolizujících cizorodé látky (xenobiotika), jako jsou např. cytochromy P450 rodiny 1 (např. CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) (Whitlock Jr, 1999). Lidský gen AhR se nachází na chromozomu 7. Má 12 exonů, které kódují 848 aminokyselin proteinu s teoretickou hmotností 96 kDa (Vrzal *et al.*, 2004). AhR má důležitou roli v toxikologii a buněčné fyziologii. Svou funkci uplatňuje v základních signálních drahách řídících buněčný cyklus, kontakt mezi buňkami, apoptózu, angiogenezi, diferenciaci, pluripotenci a fungování buněk imunitního systému (Nacarino-Palma *et al.*, 2022). Deregulace těchto drah, které jsou kritické pro udržení homeostázy, predisponuje organismy k rozvoji několika patologií, včetně rakoviny (Nacarino-Palma *et al.*, 2022).

AhR je exprimován ve většině orgánů a tkání, a je zřejmé, že vedle reakce na vystavení organismu cizorodým látkám, hraje významnou roli v kontrole řady fyziologických procesů a udržování buněčné homeostázy (Murray *et al.*, 2014).

AhR je zajímavým a hojně studovaným biologickým prvkem, protože zdraví člověka může ovlivňovat jak pozitivně, tak i negativně. Některé látky, které se vážou na AhR, mohou mít karcinogenní účinky a způsobovat zdravotní potíže, zatímco jiné mohou působit protizánětlivě a podporovat zdraví.

Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor, což znamená, že váže chemické sloučeniny, tzv. ligandy, a to způsobuje jeho aktivaci a následně modulaci genové exprese. AhR byl původně objeven jako buněčný protein, který se uplatňuje při detoxikaci xenobiotických sloučenin (např. aromatických a polyaromatických uhlovodíků, které jsou přítomné v cigaretovém kouři, průmyslových emisích nebo v grilovaných potravinách). Rozsáhlé studie v posledních dvou desetiletích však identifikovaly mnoho endogenních ligandů AhR a odhalily četné fyziologické funkce receptoru (Kou *et Dai*, 2021).

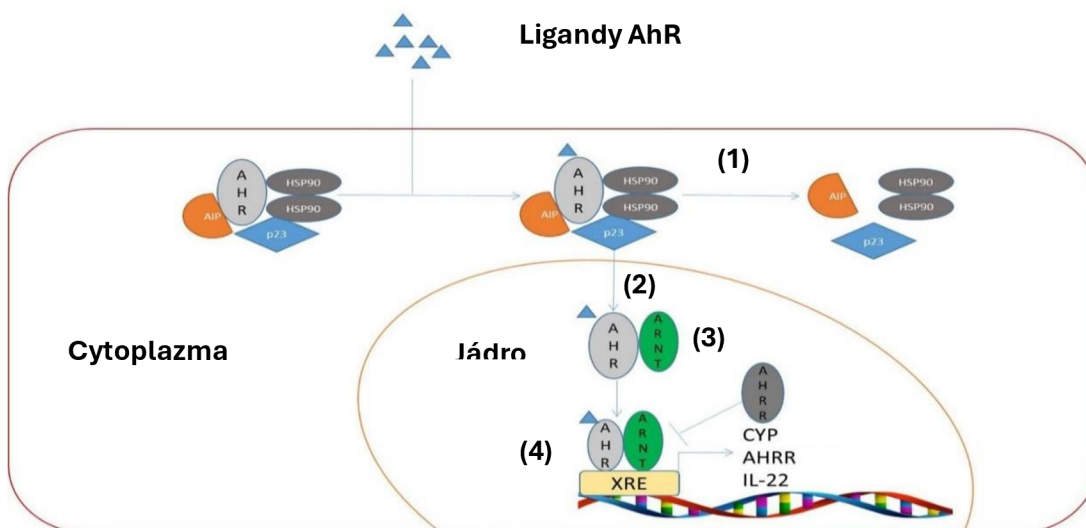
V lidském těle se AhR vyskytuje v široké škále tkání. Nejvýraznější hladina exprese mRNA byla zaznamenána v placentě, plicích a játrech, naopak nízké hladiny AhR byly pozorovány v mozku, ledvinách a kosterním svalstvu (Jiang *et al.*, 2010).

Neaktivovaná forma AhR je cytoplazmatická a tvoří komplex s několika chaperony, mezi něž patří dva HSP90 (Heat Shock Protein 90), protein p23 a protein interagující s AhR (AIP/XAP2/ARA9) (Kou *et Dai*, 2021). Tyto proteiny udržují správnou konformaci AhR, umožňují správné rozpoznání ligandu receptorem a následně nepřímo zajišťují účinný transkripční efekt.

3.1.1 Signální dráha AhR

Signální dráha aryluhlovodíkového receptoru je klíčovým mechanismem pro regulaci metabolismu xenobiotik a imunitní odpovědi. Je aktivována řadou environmentálních a endogenních ligandů a její aktivace vede k indukci enzymů a transportních látek podílejících se na metabolismu a eliminaci těchto sloučenin.

Aktivace AhR a její následná signální transdukce je členěna na kanonickou a nekanonickou dráhu (Wright *et al.*, 2017). V kanonické dráze tvoří AhR komplexy s molekulárními chaperony a zůstává neaktivní v cytosolu. Po navázání ligandu prochází AhR konformační změnou a komplex AhR/ligand se uvolňuje z chaperonových proteinů. AhR je následně translokován do jádra, kde heterodimerizuje s ARNT a následně se komplex AhR/ARNT váže na XRE („xenobiotic responsive element“) cílových genů a reguluje jejich expresi.



Obrázek č. 1: Kanonická dráha AhR. Po navázání ligandu se chaperonové proteiny disociují z komplexu AhR/chaperon v cytoplasmě (1), což vede k translokaci AhR s navázaným ligandem do jádra (2), AhR/ligand se heterodimerizuje s ARNT v jádře (3), kde se váže na cis-elementy XRE cílových genů, což vede k jejich aktivaci (4) (převzato z Kou *et Dai*, 2021, upraveno).

Jako vysoce konzervativní sekvence XRE se udává 5'-TNGCGTG-3', kde na místě N může být přítomen jakýkoliv nukleotid (Yao *et* Denison, 1992). Mezi cílové geny AhR patří geny kódující enzymy nadrodiny cytochromu P450 či represoru AhR (AhRR), které hrají důležitou roli v detoxikaci environmentálních karcinogenů a negativní regulaci genů závislých na AhR (Androutsopoulos *et al.*, 2009). Průběh kanonické dráhy je schematicky znázorněn na obrázku č. 1.

V nekanonické signální dráze nevytváří aktivovaný AhR komplexy s ARNT, ale s různými transkripčními faktory v jádře, což vede k jeho vazbě na jiné než XRE DNA elementy a k regulaci exprese cílových genů (Jackson *et al.*, 2015). Mezi takové faktory se řadí protein KLF6 (z angl. Krüppel-like factor 6). Jedná se o transkripční faktor se strukturním motivem zinkového prstu, který se kromě potlačování nádorů uplatňuje například při vývoji ledvin. Bylo prokázáno, že tento protein interaguje s AhR, což vede k jeho připojení do nové sekvence DNA, která nemá známou strukturu XRE a označuje se často jako NC-XRE (z angl. non-canonical XRE) (Huang *et* Elferink, 2012).

3.1.2 Ligandy AHR

Indukce exprese genů pro enzymy metabolizující xenobiotika v reakci na chemický impuls je adaptivní reakcí u většiny organismů (Denison *et* Nagy, 2003). U obratlovců je AhR jedním z několika intracelulárních receptorů, jehož signalizace je závislá na chemických látkách/ligandech, které mohou stimulovat transkripci genů. Schopnost AhR vázat a aktivovat se řadou strukturně odlišných chemických látek naznačuje, že AhR obsahuje poměrně proměnlivé vazebné místo pro ligandy. Převážná část látek, které se vážou na AhR a spouštějí jeho aktivaci, patří mezi organické sloučeniny s hydrofobní povahou. Kromě syntetických a environmentálních chemických látek však byla identifikována také řada přirozeně se vyskytujících hydrofilních endogenních ligandů AhR např. FICZ, tryptofan, kynurenin, IPA, ITE (Denison *et* Nagy, 2003).

Aryluhlovodíkový receptor byl poprvé identifikován jako intracelulární protein, který váže a zprostředkovává toxické účinky 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD, dioxin) a dioxinům podobných sloučenin (DLC). Následné studie ukázaly, že AhR je univerzální receptor, který váže širokou škálu ligandů, včetně toxinů z životního prostředí, léčiv a zdraví prospěšných fytochemikálií. Tyto ligandy mohou vykazovat tkáňově/buňkově specifickou agonistickou a antagonistickou aktivitu, podobně jako selektivní modulátory receptorů (Safe *et al.*, 2020). Sloučeniny na bázi indolů, které pochází primárně z přírodních zdrojů, byly

identifikovány jako nadějná skupina ligandů AhR s potenciálním terapeutickým a chemopreventivním využitím (Dvořák *et al.*, 2021). Trvalá aktivace AhR, která je způsobena perzistentními látkami, mezi které se řadí například dioxiny a polychlorované bifenyly, a je posílena velice pomalým či žádným metabolismem, má škodlivé účinky na lidský organismus. Oproti tomu dočasná aktivace AhR endogenními ligandy je nezbytná pro správnou funkci buněk. Dvojitá povaha AhR, s prospěšnými i škodlivými účinky v závislosti na ligandu, podtrhuje důležitost pochopení specifických účinků různých ligandů na aktivitu AhR. (Stejskalová *et al.*, 2011).

3.1.3 CYP1A1

Cytochrom P450 (zkratka CYP) označuje rozsáhlou skupinu enzymů, které obsahují hemovou skupinu s vázaným železem. Svě označení dostaly podle schopnosti absorbovat světlo o vlnové délce 450 nm v komplexu s oxidem uhelnatým. Klasifikační systém cytochromů P450 je založen na podobnosti v aminokyselinové sekvenci příbuzných enzymů s označením CYP. Přestože je u savců známo asi 18 CYP rodin, jen 3 z nich (CYP1, 2 a 3) jsou primárně zodpovědné za metabolismus xenobiotik (Vrzal, 2014). Proteiny cytochromu P450 jsou monooxygenázy, které katalyzují mnoho reakcí zapojených do metabolismu léčiv a syntézy cholesterolu, steroidů a dalších lipidů.

Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) je jedním ze tří členů rodiny CYP1. Jedná se o extrahepatální enzym (zatímco například CYP1A2 je enzym jaterní) s expresí v orgánech jako plíce, prsa a lymfocyty, nicméně je indukovatelný a následně detekovatelný i v játrech (Vrzal, 2014). CYP1A1 se podílí na I. fázi biotransformace řady endogenních i exogenních sloučenin, mezi tyto metabolické reakce patří například C-, N- a S-oxidace a dealkylace. Transkripční aktivace genu CYP1A1 je indukována prostřednictvím AhR látkami znečišťující životní prostředí.

Protein kódovaný tímto genem je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a jeho exprese je indukována některými polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH), z nichž některé se nacházejí v cigaretovém kouři, například benzo[*a*]pyren (BaP), jehož oxidaci katalyzuje CYP1A1 za vzniku BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu, který je karcinogenní. Mezi další prokarcinogeny a mutageny, na jejichž metabolismu se tento enzym podílí, lze zařadit aflatoxin B1 a 2-acetylaminofluoren.

CYP1A1 je indukován primárně skrze signální dráhu AhR, kdy indukce genu pomocí TCDD nebo 3-methylcholantrenu (3-MC) je tak silná (více než 50násobná), že ji lze snadno zjistit běžnými metodami genové exprese (Pansoy *et al.*, 2010), a lze ji tak využít jako marker aktivace

AhR. Mezi další geny pro enzymy fáze I a fáze II metabolizující léčiva, o nichž je známo, že jsou pod kontrolou AhR, patří geny pro CYP1A2 a CYP1B1 (Go *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2001).

3.2 Senescence

Kromě mnoha genetických příčin a příčin způsobených životním prostředím zůstává hlavním rizikovým faktorem pro vznik rakoviny stárnutí (Kruk *et al.*, 2019). Během stárnutí dochází k postupné degeneraci biologických systémů a k akumulaci molekulárních změn, které ohrožují a snižují fyziologické a fertlní funkce, což v konečném důsledku vede ke ztrátě homeostázy a patologickým stavům souvisejícím s věkem. Většina degenerativních nebo hyperplastických patologií souvisejících se stárnutím je spojena se stresovou reakcí zvanou senescence. Senescence, známá také jako buněčné stárnutí, je biologický proces, který omezuje replikaci buněk a vede k jejich postupné ztrátě schopnosti dělení. Jedná se o klíčový aspekt stárnutí organismů a je úzce spojena s řadou biologických a patologických procesů.

Buněčná senescence je antiproliferační program, který omezuje nádorové bujení tím, že omezuje množení a transformaci stárnoucích a poškozených buněk (Ewald *et al.*, 2010). Buněčná senescence se označuje také jako stav trvalého zastavení růstu buněk, když dosáhnou určitého bodu svého životního cyklu. Senescence může být vyvolána řadou vnitřních i vnějších podnětů, včetně zkrácení telomer, poškození DNA, oxidačního stresu, vystavení chemoterapeutickým látkám, expozice ionizujícímu záření a aktivace onkogenů, jako je například Ras protein (He *et Sharpless*, 2014).

Terapií indukovaná buněčná senescence byla navržena jako způsob léčby rakoviny, protože zabraňuje progresi buněčného cyklu nádorových buněk. Nejčastější charakteristické znaky senescentních buněk jsou změny buněčné morfologie (zvětšený a zploštělý tvar) a aktivace β -galaktosidázy asociované se senescencí (SA- β -gal) (Dimri *et al.*, 1995). Kromě toho je aktivace senescence doprovázena podstatnými molekulárními změnami v genové expresi souvisejícími s inhibicí buněčného růstu, jako je up-regulace proteinu p53, inhibitorů buněčného cyklu, včetně proteinů p21 a p16, a také hypofosforylované formy retinoblastomu (Rb) (Giménez-Bastida *et al.*, 2020).

Nedávná studie však odhalila, že senescence je významnou odpovědí některých nádorů na terapii, při níž se nádorové buňky vyhýbají apoptóze a místo toho vstupují do stabilní a prodloužené zástavy buněčného cyklu (He *et Sharpless*, 2014). Kromě toho se ukázalo, že cílená léčba a imunoterapie rakoviny rovněž způsobují regresi rakoviny prostřednictvím

indukce senescence v nádorových buňkách (Braumüller *et al.*, 2013). Tato zjištění podtrhují významné důsledky indukce senescence při léčbě rakoviny.

Senescence se aktivuje také při poškození buněk jako obranný mechanismus. V případě onkogenního poškození omezuje senescence progresi nádoru. Po poškození tkání senescence koordinuje remodelaci tkání, čímž se podílí na mnoha patologických stavech, včetně fibrotických onemocnění, cévních poruch, obezity, diabetu 2. typu, onemocnění ledvin a sarkopenie. U těchto onemocnění plní buněčná senescence obvykle antagonistickou roli. Zpočátku funguje tak, že omezuje fibrotickou reakci (indukuje senescenci v poškozených buňkách a v aktivovaných fibroblastech), a také spouští imunitní reakci, která poškozené buňky odstraňuje. V pokročilých patologických stádiích však nejsou senescentní buňky účinně odstraňovány, ale hromadí se a přispívají ke zhoršení patologických projevů (Muñoz *et Serrano*, 2014).

Senescentní buňky lze detekovat nejméně dvěma způsoby. První a nejpoužívanější metoda spočívá v barvení buněčných kultur nebo tkáňových řezů specifickým postupem, který vizualizuje buňky exprimující β -galaktosidázu (β -gal) s optimem katalytické aktivity při pH 6 (Dimri *et al.*, 1995). Dalším markerem používaným pro sledování buněk vstupujících do senescence je exprese nádorového supresorového genu $p16^{INK4a}$ (Campisi *et Robert*, 2014). Jeho exprese je ve většině normálních, netransformovaných buněk a tkání nízká nebo nedetekovatelná, ale po indukci senescence různými podněty se stává snadno detekovatelnou (Ohtani *et al.*, 2004).

Většina induktorů senescence způsobuje genomické poškození, což se projevuje trvalým poškozením lokusů DNA a signalizací poškozené DNA (Campisi *et Robert*, 2014). Senescence spočívá v podstatě v nevratném zastavení buněčného cyklu a změnách v organizaci chromatinu a genové expresi (Gorgoulis *et al.*, 2019). To vede k sekreci několika proteinů, známých jako sekrety spojené se senescencí (SAS), které zahrnují protizánětlivé cytokiny, chemokiny, růstové faktory a proteázy, jež mají významný vliv na stromální buňky prostřednictvím autokrinních a parakrinních mechanismů, a čímž vzniká sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SASP) (Campisi *et Robert*, 2014). Následné molekulární změny umožňují buňkám přetrvávat po neomezenou dobu s poněkud sníženou životaschopností, přičemž si zachovávají možnost opětovného růstu nádoru za příznivějších okolností (Faheem *et al.*, 2020).

Buněčná senescence tak funguje jako spouštěč remodelace tkání, který působí během normálního embryonálního vývoje a při poškození tkání. Za tímto účelem senescentní buňky

zastavují svou vlastní proliferaci, rekrutují fagocytující imunitní buňky a podporují obnovu tkání. Tento sled událostí nicméně nemusí být dostatečně účinný ve stárnoucích tkáních nebo v patologických případech, což vede k hromadění senescentních buněk. Během normálního embryonálního vývoje přispívá buněčná senescence k remodelaci tkání a morfogenezi tím, že odstraňuje přechodné struktury a reguluje relativní nadbytek různých buněčných populací (Muñoz *et Serrano*, 2014).

Senescence tak může mít dvojí povahu: na jedné straně může být senescence užitečná, protože brání vzniku rakoviny omezováním buněčné proliferace po poškození DNA nebo jiných stresových situacích. Na druhé straně, akumulace senescentních buněk v tkáních může být spojena s různými degenerativními onemocněními a stárnutím, protože senescentní buňky produkují zánětlivé látky a další faktory, které mohou poškozovat okolní buňky a tkáně.

V současné době je senescence intenzivně zkoumána, protože pochopení jejich mechanismů může mít důležité důsledky pro léčbu a prevenci se stárnutím souvisejících onemocnění. Některé léky a terapeutické postupy jsou navrženy tak, aby cílily na senescentní buňky a minimalizovaly jejich negativní vliv na organismus.

3.2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Indukce senescence je hlavním mechanismem účinku cílených terapeutik založených na inhibici cyklin-dependentních kináz 4/6 (Qin *et al.*, 2018). Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou velkou rodinou serin-threoninových kináz, které hrají klíčovou roli v regulaci progresu buněčného cyklu. CDK patří mezi pozitivní regulátory vstupu buňky do buněčného cyklu a u většiny lidských nádorů jsou nadměrně aktivní (Anders *et al.*, 2011).

Na mitogenech závislý průběh G1 fáze a zahájení syntézy DNA (S fáze) během cyklu buněčného dělení savců je kooperativně regulován několika třídami CDK, jejichž činnost je naopak omezována inhibitory cyklin-dependentní kináz (CKI). CKI, které tyto děje řídí, byly na základě své struktury a cílů CDK zařazeny do jedné ze dvou rodin. Do první třídy patří proteiny INK4 (inhibitory CDK4), pojmenované tak pro svou schopnost specificky inhibovat katalytické podjednotky CDK4 a CDK6. Čtyři takové proteiny (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} a p19^{INK4d}) se skládají z několika ankyrinových repetic a vážou se pouze na CDK4 a CDK6, ale ne na jiné CDK nebo na cykliny typu D. Proteiny INK4 lze dát do kontrastu s rozsáhleji působícími inhibitory rodiny Cip/Kip, jejichž působení ovlivňuje aktivity cyklin D-, E- a A-dependentních kináz. Do posledně jmenované třídy patří p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, které všechny

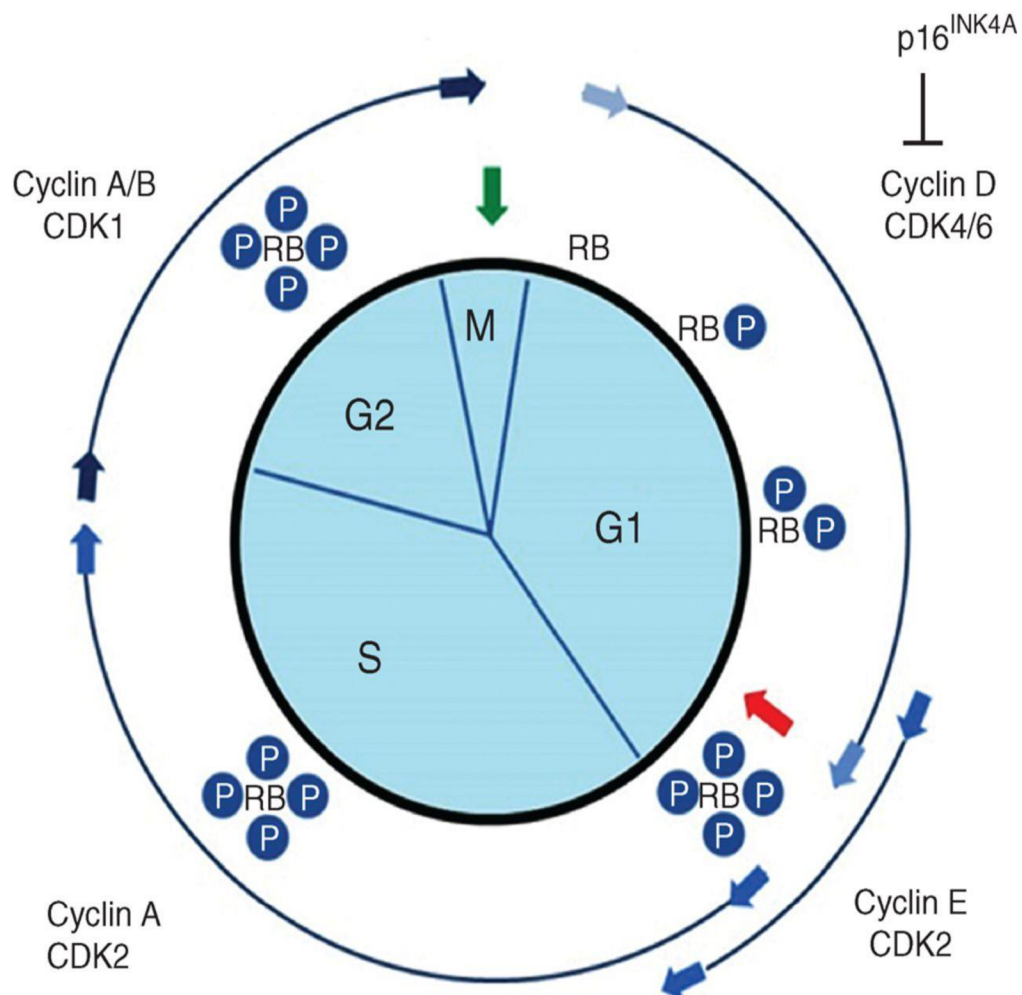
obsahují charakteristické motivy v rámci svých amino-terminálních částí, jež jim umožňují vázat se jak na podjednotky cyklinů, tak na podjednotky CDK (Sherr *et Roberts*, 1999).

Na rozdíl od CDK1 a CDK2, které působí později v buněčném cyklu v reakci na periodické oscilace cyklinů E, A a B a koordinují replikaci DNA s mitózou, jsou enzymatické aktivity CDK4 a CDK6 v první fázi (G1) buněčného cyklu řízeny cykliny typu D exprimovanými v reakci na různé extracelulární signály, včetně stimulačních mitogenů, inhibičních cytokinů, induktorů diferenciaci, buněčných kontaktů a dalších prostorových signálů (Sherr *et al.*, 2016). Ke vstupu do buněčného cyklu dochází během fáze G1, kdy se CDK4 a CDK6 spojují s jedním ze tří cyklinů typu D (D1, D2 nebo D3) a vytvářejí enzymaticky aktivní holoenzymové komplexy (Sherr *et al.*, 2016).

Biochemická a genetická charakterizace CDK4 a CDK6 odhalila, jak savčí buňky regulují vstup do S fáze DNA cyklu buněčného dělení v závislosti na retinoblastomovém proteinu (RB). Tato zkoumání poskytla důkaz, že inhibitory CDK4/6, zejména v kombinaci s koinhibicí příbuzných mitogenně závislých signálních drah, především signální MAPK kaskádou, by se mohly ukázat jako cenné v léčbě rakoviny (Sherr *et al.*, 2016).

Počáteční funkční charakterizace retinoblastomového proteinu po objevení genu RB jako prvního nádorového supresoru se zaměřila na jeho roli ústředního regulátoru progresu buněčného cyklu. Původně se předpokládalo, že funkce nádorového supresoru RB je z velké části způsobena jeho schopností zastavit buňky v G1 inhibicí aktivity transkripčních faktorů E2F1/2. Nyní se předpokládá, že RB má kromě funkce kontrolního bodu G1 mnoho dalších buněčných rolí, včetně kontroly buněčné diferenciaci během embryogeneze a v dospělých tkáních, regulace apoptotické buněčné smrti, udržování trvalé zástavy buněčného cyklu a zachování chromozomální stability (Burkhart *et Sage*, 2008). Průběh buněčného cyklu a stupně fosforylace RB při přechodu mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu jsou schematicky znázorněny na obrázku č. 2. Hladina aktivity CDK je nejnižší v rané G1 fázi a postupně narůstá pod vlivem různých komplexů cyklin-CDK, přičemž maximální aktivita CDK je dosažena při vstupu buňky do mitózy (Malumbres *et Barbacid*, 2009). RB je defosforylován v M fázi (zelená šipka) a postupně refosforylován v G1 fázi, nejprve v přítomnosti cyklinu D-dependentní kinázy 4/6 a později cyklinu E-dependentní kinázy 2. RB se stává plně fosforylovaným v pozdní G1 fázi (červená šipka), což vede k inaktivaci jeho proliferaci potlačující funkce a spouští následný vstup buňky do S fáze. Bod v buněčném cyklu (někdy nazývaný "bod restrikce"; červená šipka), ve kterém se RB zcela fosforyluje, časově odpovídá přechodu do pozdní G1 fáze, kdy buňky ztrácejí svou závislost na extracelulárních

mitogenech a zavazují se ke vstupu do S fáze a dokončení cyklu. Během S a G2 fází je fosforylace RB udržována postupnou aktivací dalších CDK, jako např. komplexů cyklinu A-CDK2 a cyklinů A/B-CDK1. Degradace cyklinů A a B v mitóze vede ke kolapsu aktivity CDK a obnovení stavu G1. Protein p16^{INK4A} specificky inhibuje cyklin D-dependentní kinázy 4/6, čímž inhibuje fosforylaci RB a zastavují buňky ve fázi G1. Zastavené buňky se mohou po vysazení mitogenu vrátit do necyklového, ale reverzibilního klidového stavu (G0), v němž jsou obvykle degradovány cykliny typu D, nebo mohou v reakci na určité stresové podmínky projít trvalou zástavou buněčného cyklu (senescenci). Klidové buňky restimulované mitogeny obnovují syntézu cyklinů D a znovu vstupují do buněčného cyklu v rané G1 fázi, zatímco senescentní buňky jsou odolné vůči restimulaci mitogeny a vzdorují onkogenezi (Sherr *et al.*, 2016).



Obrázek č. 2: Buněčný cyklus; čtyři fáze mitotického cyklu buněčného dělení jsou naznačeny ve vnitřním kruhu – M fáze (mitóza), S fáze (syntéza buněčné DNA) a jejich oddělení dvěma G fázemi: G1 fáze (mezi fázemi M a S) a G2 fáze (mezi fázemi S a M) (převzato z Sherr *et al.*, 2016)

CDK4 a CDK6 jsou nadměrně exprimovány u většiny lidských nádorových onemocnění a pravděpodobně podporují tumorigenezi potlačením senescence v nádorových buňkách. Je dobře známo, že inhibitory CDK4/6 potlačují růst nádorů indukci senescence u různých typů nádorových buněk (Rader *et al.*, 2013). Mechanistické studie odhalily, že CDK4/6 potlačují senescenci nádorových buněk prostřednictvím fosforylace a aktivace transkripčního faktoru Forkhead Box M1 (FOXO1) a že aktivace FOXO1 může inhibovat indukci senescence v nádorových buňkách potlačením oxidačního stresu zprostředkovaného ROS (Anders *et al.*, 2011). Přesné mechanismy, kterými FOXO1 řídí ROS a oxidační stres, však zůstávají nejasné (Qin *et al.*, 2018).

3.2.2 Inhibitory CDK

Inhibitory CDK jsou skupinou sloučenin, které působí na cyklin-dependentní kinázy, klíčové regulátory buněčného cyklu. Tyto inhibitory usnadňují nebo dokonce spouštějí apoptózu u proliferujících buněk, zatímco neurony a thymocyty před apoptózou chrání (Meijer, 2000). K objevení nových, účinných a selektivních inhibitorů CDK byly použity metody *in silico* (Tutone *et Almerico*, 2017). Jelikož se deregulace CDK, ať už přímou, nebo nepřímou cestou, vyskytuje u většiny nádorových buněk, stala se farmakologická inhibice CDK atraktivní strategií pro mechanismy založené na negenotoxické léčbě v onkologii stejně tak i při léčbě kardiovaskulárních a neurologických onemocnění (Fisher *et Gianella-Borradori*, 2003). Například Flavopiridol (alvocidib) je předmětem klinických studií pro léčbu leukémie a dalších krevních nádorů (Zhang *et al.*, 2021). V dnešní době toto léčivo už získalo od správy FDA (Food and Drug Administration) status “orphan drug“ (tento status definuje léčivo, které je používáno pro léčbu vzácných onemocnění), je tak možné Flavopiridol využít pro léčbu akutní myeloidní leukémie (AML). Mezi další identifikované inhibitory CDK patří roscovitín (seliciclib) a olomoucín.

Objev vysoce specifického 16kDa polypeptidového inhibitoru CDK4 kódovaného genem INK4a (formálně CDKN2A) poskytl přesvědčivé údaje o tom, že CDK4 působí proti RB (Serrano *et al.*, 1993). Klíčovým zjištěním bylo, že p16^{INK4a} se váže na cyklin D-CDK4 kinázovou aktivitu a účinně ji inhibuje, ale šetří holoenzymové komplexy obsahující jiné CDK, a zároveň že exprese p16^{INK4a} inhibuje fosforylaci RB a zastavuje buňky v G1 fázi buněčného cyklu (Koh *et al.*, 1995). Dále bylo podstatné, že buňky bez funkčního RB byly rezistentní vůči zastavení buněčného cyklu prostřednictvím p16^{INK4a}, což naznačuje, že schopnost CDK4 (a později CDK6) řídit progresi ve fázi G1 vyžaduje RB, a předpovídá, že chemické inhibitory CDK4/6 budou účinné pouze v případě, že RB bude funkčně neporušený.

Gen CDKN2A, který kóduje protein p¹⁶^{INK4A}, se nachází na chromozomu 9p21 (Hussussian *et al.*, 1994). Protein p¹⁶^{INK4A} se nachází převážně v cytoplazmě, ale za určitých podmínek může vstupovat i do jádra. Častá delece nebo mutace CDKN2A v různých lidských nádorech a lidských buněčných liniích naznačuje, že p¹⁶^{INK4a} působí jako nádorový supresor (Boyce *et Fairman*, 1996). Nadměrná exprese p¹⁶^{INK4a} v určitých typech buněk vede k zástavě ve fázi G1 buněčného cyklu (Medema *et al.*, 1995). „Wild type“ p¹⁶^{INK4a} zastavuje zdravé diploidní buňky v pozdní fázi G1, zatímco nádorová mutace proteinu p¹⁶^{INK4a} nikoli. Významné je, že schopnost p¹⁶^{INK4a} vyvolat zástavu buněčného cyklu se ztrácí v buňkách bez funkčního RB. Ztráta p¹⁶^{INK4a}, nadměrná exprese D-cyklinů a ztráta RB mají tedy podobné účinky na progresi G1 fáze a mohou představovat běžnou cestu k nádorovému bujení (Lukas *et al.*, 1995).

Další endogenní inhibitor cyklin dependentní kinázy, p21, je multifunkční protein, který se podílí na koordinaci buněčné odpovědi na negativní růstové signály. Indukován poškozením buňky pod transkripční kontrolou nádorového supresorového proteinu p53, p21 spolupracuje s řadou buněčných proteinů zapojených do kontroly růstu. Hraje klíčovou roli v koordinaci buněčné odpovědi na negativní růstové signály, zejména v souvislosti s poškozením DNA, regulací buněčného cyklu, apoptózou a senescencí (Ball, 1997). P21 je flexibilní protein s různými funkcemi, včetně regulace aktivit nádorových buněk, jako je autofagie, což z něj činí potenciální cíl pro radioterapii (Dowaidar, 2021). P21 se také hromadí v místě lézí DNA vyvolaných ionty těžkých kovů, což je proces závislý na jeho interakci s proliferujícím buněčným jaderným antigenem (PCNA), který hraje klíčovou roli při replikaci a opravě DNA (Rudolph *et al.*, 2005). Dále bylo zjištěno, že je tento protein homologní s eukaryotickým transkripčním elongačním faktorem SII, což naznačuje jeho potenciální roli v transkripční regulaci (Yeh *et al.*, 1994). P21 může nahrazovat protein p16 při iniciaci senescence a jeho úlohou v tomto procesu je vyvolat zastavení buněčného cyklu (Leontieva *et Blagosklonny*, 2013).

3.2.3 Sekreční fenotyp asociovaný se senescencí

Sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SASP, z angl. „senescence-associated secretory phenotype“) je charakteristickým znakem senescentních buněk a zprostředkovává mnoho jejich patofyziologických účinků. SASP například posiluje a šíří senescenci autokrinním a parakrinním způsobem a aktivuje imunitní reakce, které eliminují senescentní buňky (Gorgoulis *et al.*, 2019). Skutečnost, že SASP má více parakrinních aktivit, naznačuje, že senescence podporuje opravu a regeneraci tkání při poranění (Nacarino-Palma *et al.*, 2022). Faktory SASP zprostředkovávají vývojovou senescenci, tvárnost tkání a přispívají také

k přetrvávajícímu chronickému zánětu. Dále faktory SASP mohou posílit nádorové bujení tím, že podporují proliferaci, metastázy a imunosupresi. SASP tak může vysvětlit některé škodlivé účinky senescentních buněk, které podporují stárnutí (Gorgoulis *et al.*, 2019).

Faktory SASP přispívají k rozvoji nádorů a remodelaci extracelulární matrix, což usnadňuje expanzi transformovaných buněk. V nedávné studii bylo prokázáno spojení SASP a AhR, kde absence AhR v knockoutovaných myších embryonálních fibroblastech vyvolalo zvýšenou indukci p16, p21, SA- β -gal, TNF α , či IL1, stejně tak jako v AhR-deficientních játrech myši (Nacarino-Palma *et al.*, 2022). Závěry této studie tak podporují roli AhR jako anti-senescentního a protinádorového faktoru.

Úkolem této bakalářské práce bylo ověření, zda použití antagonistů AhR může vyvolat podobný senescenci indukující účinek jako knockout AhR a porovnat ho s účinkem typických agonistů na základě analýzy exprese CDKN1A a CDKN2A.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- adherentní buněčná linie HT29 odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu – varianta „wild type“ (ECACC, 91072201)
- adherentní buněčná linie HT29 odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu – varianta „s knockoutovaným AhR“ (knockout AhR byl proveden pomocí metody CRISPR/CAS9 popsané v publikaci Vyhlídalová *et al.*, 2020)

4.2 Chemikálie

- 2x Loading Buffer (BioRad, 1610737)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (ULTRA Scientific, 48599)
- 3'-methoxy-4'-nitroflavone (MNF) (dárek od Thomase Haarmann-Stemmana)
- 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ) (Sigma Aldrich, SML149)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid (Sigma Aldrich, A4058)
- bovinní sérový albumin (Sigma Aldrich, A2153)
- Bradfordovo činidlo (Sigma Aldrich, B6916)
- deionizovaná voda
- deoxynukleosidtrifosfáty: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (TaKaRa, 4026; 4027; 4028; 4029)
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, D8418)
- dodecylsírán sodný (SDS) (BioRad, 1610302)
- Dulbecco's PBS (Biosera, LM-S2041)
- ethanol (Lachner, 20026-AT0)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, F6178)
- chemiluminiscenční substrát WesternSure®PREMIUM (Li-Cor, 926-95000)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- inhibitor fosfatáz (Roche, 04906837001)
- inhibitor proteáz (Roche 04693132001)
- inhibitor RNáz (New England BioLabs, M0307L)
- isopropanol (Lachner, 20037-AT0)
- KiCqStart Probe qPCR ReadyMix (Sigma Aldrich)
- lyzační pufr (Promega, E3971)
- L-glutamin (Serana, RGL-001)
- methanol (Lachner, 20038-AT0)

- methylcarvone (Enamine, EN300-1611720)
- migrační pufr Tris-glycin-SDS, 10x koncentrovaný (Bio-Rad, A0031)
- M-MuLV reverzní transkriptáza (New England BioLabs, M0253L)
- neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich, M7145)
- penicilin/streptomycin (Biosera, XC-A4122)
- persíran amonný (APS) (Sigma Aldrich, A3678)
- Ponceau S. Rouge (ChemCruz, sc-301558)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, 1610374)
- primery
 - GAPDH (Sigma Aldrich)
 - forward primer: 5'-GAAGGAAATGAATGGGCAGC-3'
 - reverse primer: 5'-TCTAGGAAAAGCATCACCCG-3'
 - CYP1A1 (Sigma Aldrich)
 - forward primer: 5'-GGAAGTGTATCGGTGAGACC-3'
 - reverse primer: 5'-CATAGATGGGGGTCATGTCC-3'
 - CDKN1A (Sigma Aldrich)
 - forward primer: 5'-ACTGTCTTGTACCCTTGTGC-3'
 - reverse primer: 5'-CCTCTTGGAGAAGATCAGCC-3'
 - CDKN2A
 - Sequence Detection Primer (ThermoFisher Scientific, 4304972)
- próby
 - GAPDH (Sigma Aldrich, HA16156483-002)
 - 5'-[6FAM]ACTAACCCTGCGCTCCTGCCTCGAT[OQA]-3'
 - CYP1A1 (Sigma Aldrich, HA17151515-002)
 - 5'-[6FAM]GCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCA[OQA]-3'
 - CDKN1A (Sigma Aldrich, HA17017231-002)
 - 5'-[6FAM]AACGGCGGCAGACCAGCATGACAGA[OQA]-3'
 - CDKN2A
 - TaqMan™ MGB Probe (ThermoFisher Scientific, 4316034)
- protilátky
 - primární protilátka β -aktin – mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-47778)
 - primární protilátka AhR – mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-133088)
 - primární protilátka CYP1A1 – rabbit polyclonal (Santa Cruz, sc-393979)
 - sekundární protilátka rabbit anti-mouse (Santa Cruz, sc-358914)

- sekundární protilátka mouse anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2357)
- pufr pro dělicí gel – 1,5 M Tris-HCl pufr; pH 8,8 (Bio-Rad, 161-0798)
- pufr pro zaostřovací gel – 0,5 M Tris-HCl pufr; pH 6,8 (Bio-Rad, 161-0799)
- random primers 6 (New England BioLabs, S1230S)
- reakční pufr M-MuLV 10x (New England BioLabs, B0253S)
- RNase free water (Sigma Aldrich, W4502)
- RPMI-1640 médium s 25mM HEPES (Sigma Aldrich, R5886)
- sušené mléko (Laktino)
- S-Carvone (Santa Cruz, sc-239480)
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix 2x (ThermoFisher Scientific, 4444557)
- TaqMan™ Gene Expression Assay 20x – obsahuje směs „pre-formulated assay“ (1 próba a 2 primery) (ThermoFisher Scientific, 4331182)
- TBS pufr, 20x koncentrovaný (ThermoFisher Scientific, 28358)
- tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma Aldrich, T9281)
- transferový pufr Tris-glycinový, 10x koncentrovaný (Bio-Rad, 161-0771)
- TriReagent® (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, T9284)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, P1379)
- trypanová modř: 0,4% roztok v PBS (Sigma Aldrich, T6146)
- trypsin: 0,25% roztok v EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- WesternSure®Pen (Li-Cor, 926-91000)

4.3 Laboratorní pomůcky

- 6jamková kultivační destička (TPP)
- 96jamková kultivační destička (TPP)
- 96jamková destička pro PCR (Roche)
- automatické pipety 100 – 1000 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 2 – 20 µl, 0,5 – 10 µl, 0,1 – 2,5 µl (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- dávkovací automatická pipeta Xstream (Eppendorf)
- filtrační papír pro western blotting (BioRad)
- hřebínek pro elektroforézu (Biorad)
- kultivační lahve - 25 cm², 75 cm², 150 cm² (TPP)

- krycí sklíčko (Menzel Gläser)
- lihový kahan
- multikanálové pipeta 20 - 200 μ l (Eppendorf)
- nitrilové rukavice (NitriSense)
- papírová krabička na vzorky do -80 °C (Biologix)
- parafilm
- PCR fólie (Roche)
- pipetor Fastpette plus (Labnet)
- Petriho miska (TPP)
- plastové mikrozkušavky: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml (BIOplastics)
- plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky (TPP)
- plastové špičky k automatickým pipetám: 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- plastové špičky s filtrem 100-1000 μ l (Eppendorf)
- plastové zkumavky - 15 ml, 50 ml (TPP)
- polyvinylidenefluoridová (PVDF) membrána Immobilon-P (Millipore)
- sérologické pipety: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP)
- škrabka na buňky (TPP)
- špičky na dávkovací pipetu 0,2 ml (Eppendorf)

4.4 Přístroje

- analytické váhy ACJ 120-4 M (Kern)
- aparatura pro western blotting Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- centrifuga Combi-Sin FVL-2400 (Biosan)
- elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- hlubokomrazicí box MDF-U53V (Sanyo)
- chladnička s mrazícím boxem (Whirlpool)
- inkubátor CO₂ NB-203XL (N-Biotek)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- laminární box Labculture (ESCO)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-Cor Biosciences)
- mikrocentrifuga (Spectrafuge)

- mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- minikývačka MR-1 (Biosan)
- odsávačka Flask-Trap 1 (Biosan)
- program LightCycler 480 SW 1.5 (Roche)
- qPCR termocykler LightCycler 480 II (Roche)
- sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- spektrofotometr NanoDrop Lite (Thermo Fisher)
- svářečka fólií (Eta)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator Md-02n (Major Science)
- třepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- vodní lázeň LCB11D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)
- výrobek ledu F100 Compact (Icematic)
- zdroj napětí EnduroTM 300V (Labnet)

4.5 Experimentální metody

4.5.1 Rozmrazení buněčné linie

Buněčné linie uchované v kryozkumavkách ve směsi FBS a DMSO byly přeneseny z mrazícího boxu (-80°C) do vodní lázně (předem zahřáté na 37°C) na 2 min. Po rozmrazení buněk byly kryozkumavky umístěny do laminárního boxu. K buněčné suspenzi byl přidán 1 ml kultivačního média, veškerý obsah byl propipetován a přenesen do připravené kultivační lahve (velikost 25 cm²) obsahující 5 ml média. Kultivační láhev s buněčnou suspenzí byla poté umístěna do inkubátoru, kde byly udržovány konstantní podmínky: teplota 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkost. Následující den bylo původní médium nahrazeno čerstvým z důvodu odstranění odumřelých a neusazených buněk. V dalších dnech byly buňky pasážovány a přeneseny do kultivační lahve o větším obsahu.

Pro kultivaci bylo použito komerční kultivační médium RPMI-1640 s 25mM HEPES, ke terému bylo přidáno 50 ml fetálního bovinního séra, 5 ml L-glutaminu, 5 ml roztoku neesenciálních aminokyselin a 5 ml směsi penicilinu a streptomycinu.

4.5.2 Pasážování buněk

Pasážování se provádí k redukci buněk rostoucích v kultivačních lahvích a z důvodu vyčerpání živin v kultivačním médiu. Je tak zajištěno, že buňky netvoří shluky a zůstávají pouze v jedné

vrstvě na dně kultivační láhve. Obě použité buněčné linie byly pasážovány každé 3-4 dny. Před každou pasáží byla pod mikroskopem zhodnocena míra jejich konfluence.

Ve vodní lázni bylo zahřáto na 37 °C kultivační médium, které je uchováváno v chladničce, a při pokojové teplotě byl rozmražen roztok trypsinu, který je uchováván v mrazícím boxu při teplotě -20 °C. Následně byly médium, roztok trypsinu a PBS, které je uchovávané při pokojové teplotě, přeneseny do laminárního boxu a pomocí lihového kahanu byly ožehnuty hrdla láhví. Po přenesení kultivační láhve z inkubátoru do laminárního boxu bylo pomocí odsávačky staré kultivační médium odsáto. Adherované buňky na povrchu lahve byly promyty 10 ml PBS, roztok byl následně pomocí odsávačky odstraněn. K buňkám byly přidány 2 ml trypsinu a kultivační láhev byla vrácena zpátky do inkubátoru dokud nedošlo k uvolnění buněk ode dna lahve (3-8 min). Po přenesení kultivační lahve zpět do laminárního boxu bylo k buňkám přidáno 13 ml kultivačního média a pomocí sérologické pipety byly buňky resuspendovány, aby se vytvořila homogenní suspenze v celém objemu. Buněčná suspenze byla přenesena do 50ml zkumavky. Do 0,5ml mikrozkušavky bylo odebráno 20 μ l této suspenze pro následující stanovení koncentrace buněk. Z buněčné suspenze byl odebrán 1 ml zpět do kultivační lahve a po přidání 29 ml kultivačního média byla kultivační láhev přenesena zpátky do inkubátoru. Kultivační láhev byla využívána po dobu tří pasáží, poté byla vyměněna za novou.

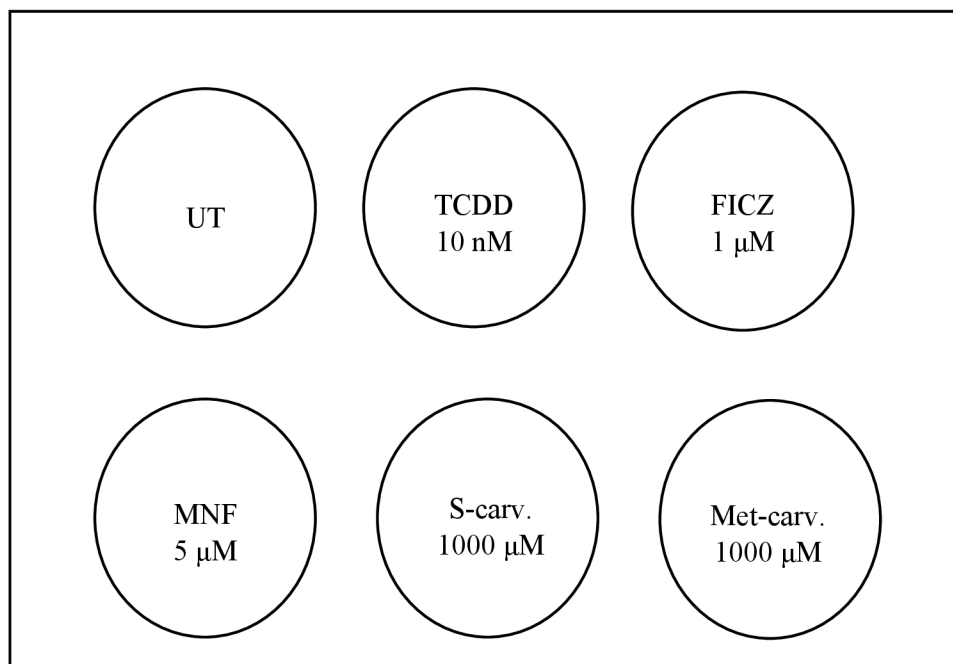
4.5.3 Stanovení koncentrace buněk a vyšetí na 6jamkovou kultivační destičku

Pro správný průběh experimentů je nutné pracovat se stejným obsahem buněk, proto bylo množství buněk stanoveno pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem. Mimo sterilní laminární box bylo do 0,5ml mikrozkušavky s 20 μ l buněčné suspenze přidáno 80 μ l roztoku trypanové modři. Na Bürkerovu komůrku bylo nanášeno přibližně 10 μ l propipetovaného roztoku a pomocí mikroskopu byl při zvětšení 100x spočítán počet živých buněk. Počet buněk byl spočítán v pěti čtvercích komůrky. Následně byl aritmetický průměr těchto hodnot přepočítán na množství buněk v 1 ml suspenze.

Buňky byly vysety na 6jamkové destičky tak, aby v každé jamce byly 2 ml naředěné buněčné suspenze kultivačním médiem. V těchto 2 ml byl přibližně 1 milion buněk. Naředěná buněčná suspenze byla rozpipetována do jamek a destičky byly vloženy do inkubátoru do dalšího dne, aby došlo k adhezi buněk.

4.5.4 Inkubace buněk s testovanými látkami

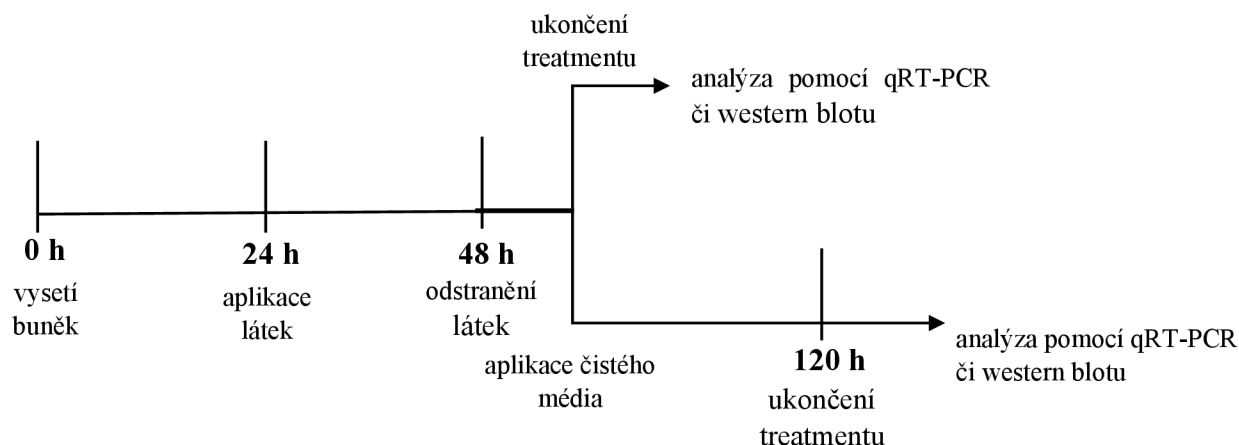
Další den byly k buňkám přidány testované látky. Koncentrace látek byly 1000x naředěny ze zásobních roztoků. Schéma rozvržení s jednotlivými koncentracemi testovaných látek je znázorněn na obrázku č. 3. Následující uvedené objemy látek jsou pro použití do čtyř 6jamkových destiček.



Obrázek č. 3: Schéma pipetování testovaných sloučenin do 6jamkové destičky (UT - negativní kontrola, TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, FICZ - 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole, MNF - 3-methoxy-4-nitroflavone, S-carv. – S-carvone, Met-carv. – methyl-carvone)

Do 15ml zkumavek bylo přidáno 8 ml kultivačního média a 8 μ l látky. Jako negativní kontrola sloužilo kultivační médium, ke kterému bylo přidáno 8 μ l DMSO a 8 μ l 99,8% ethanolu. Tyto látky slouží jako rozpouštědla všech testovaných látek. Aby bylo možné zanedbat potenciální vliv těchto rozpouštědel, byly rozpouštědla přidány tak, aby ve všech roztocích byly obě rozpouštědla (pro DMSO je rozpouštědlo TCDD, proto k roztoku kultivačního média a TCDD bylo napipetováno 8 μ l 99,8% ethanolu).

Odsávačkou bylo z destiček odstraněno původní médium a do jamek byly postupně naneseny 2 ml jednotlivých roztoků. Destičky byly vloženy do inkubátoru na 24 h. Po 24 h byl u dvou destiček odsát roztok média s látkami a k jamkám byly přidány 2 ml čerstvého kultivačního média. Destičky byly vráceny do inkubátoru na dalších 72 h. Poté se postupovalo stejně jako u dalších dvou destiček. Časové rozvržení experimentu je schematicky znázorněno na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Časové rozvržení experimentu

4.5.5 Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace

Po 24 h, respektive 72 h inkubaci byly destičky odebrány z inkubátoru a původní médium bylo vyklepnuto do výlevky. Jamky byly promyty vychlazeným PBS, který byl poté také vyklepnut. Do jamek byl přidán 1 ml vychlazeného PBS a pomocí škrabky byly buňky odděleny ode dna jamek a přeneseny do připravených 1,5ml mikrozkušavek. Zkušavky byly zcentrifugovány 2 min při 4000 rpm. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 120 μ l lyzačního pufru s inhibitory fosfatáz a proteáz. Vzorky byly zvortexovány, 30 s sonikovány a ponechány 10 min na ledu. Zkušavky byly zcentrifugovány 15 min při 13200 rpm a při teplotě 4 °C. Supernatant s izolovanými proteiny byl přenesen do čistých zkušavek.

Pomocí Bradfordovy metody byla stanovena koncentrace izolovaných proteinů. Do 0,5ml mikrozkušavek byly vzorky naředěny 5x deionizovanou vodou. Vzorky byly měřeny v duplikátech na 96jamkové destičce. Pro přípravu kalibrační křivky byla využita PCR voda a roztoky BSA v koncentracích 0,2 a 0,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek destičky bylo napipetováno 10 μ l vzorku a 100 μ l Bradfordova činidla. Pomocí spektrofotometru byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 595 nm. Následně byla stanovena kalibrační křivka a koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

4.5.6 SDS-PAGE

Pro správné provedení SDS-PAGE bylo nutné připravit vzorky, které budou v objemu 20 μ l obsahovat 30 μ g proteinů. Během přípravy byly vzorky uchovávány na ledu. Vzorky byly naředěny deionizovanou vodou do nových 0,5ml mikrozkušavek. Pro vizualizaci v gelu bylo ke všem vzorkům přidáno 20 μ l 2x LB pufru. Připravené směsi byly zvortexovány,

zcentrifugovány a 5 min denaturovány v termobloku při teplotě 95 °C. Po denaturaci byly směsi ihned vráceny na led.

Před přípravou akrylamidového gelu bylo nutné podložní a krycí skla očistit ethanolem a zkontrolovat, zda ve stojánku neprotékají. Podle tabulky č. 1 byl připraven 10% separační gel, který byl převrstven 400 µl isopropanolu. Jakmile došlo ke ztuhnutí separačního gelu, tak byl isopropanol odstraněn. Na separační gel byl nanesen 10% zaostřovací gel. Složení 10% zaostřovacího gelu je uvedena také v tabulce č.1. Okamžitě po nanesení zaostřovacího gelu byl do něj vložen hřebínek pro vytvoření jamek, do kterých se budou nanášet vzorky. Po ztuhnutí byl gel přenesen ze stojánku do elektroforetické komůrky. Komůrka byla naplněna migračním pufrem a z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek. Do první jamky byly napipetovány 2 µl markeru molekulové hmotnosti, do dalších jamek byly nanесeny připravené vzorky. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a po připojení ke zdroji napětí byl nastaven konstantní proud 30 mA na 1 gel. Elektroforetická separace probíhala tak dlouho, dokud separované vzorky nedoputovaly do vzdálenosti 2 cm před koncem gelu.

Tabulka č. 1: Složení chemikálií k přípravě dělicího a zaostřovacího gelu

| 10% dělicí gel | |
|-------------------------------------|---------|
| složka gelu | objem |
| 40% směs akrylamidu a bisakrylamidu | 2,5 ml |
| deionizovaná voda | 4,9 ml |
| pufř pro dělicí gel | 2,5 ml |
| 10% SDS | 100 µl |
| APS | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |
| 10% zaostřovací gel | |
| složka gelu | objem |
| 40% směs akrylamidu a bisakrylamidu | 0,40 ml |
| deionizovaná voda | 2,56 ml |
| pufř pro zaostřovací gel | 1,00 ml |
| 10% SDS | 40 µl |
| APS | 30 µl |
| TEMED | 4 µl |

4.5.7 Western blotting

PVDF membrána byla hydratována 2 min v methanolu, promyta 2x po 5 min v deionizované vodě a poté byla přenesena do transferového pufru. Po skončení elektroforetické separace byl také gel umístěn do transferového pufru. Byla sestavena blotovací aparatura (semi-dry). Skládalo se v pořadí od spodu: 2x filtrační papír namočený v transferovém pufru,

PVDF membrána, gel, 2x filtrační papír namočený v transferovém pufru. Každá vrstva byla důkladně uhlazena, aby nevznikaly bubliny. Aparatura byla uzavřena a zapojena do elektrického zdroje. Byl nastaven konstantní proud 300 mA a maximální napětí 23 V. Doba přenosu proteinů z gelu na membránu trvala 1,5 h.

Po dokončení přenosu byla aparatura vypojena z elektrického zdroje a rozebrána. Membrána s přenesenými proteiny byla opláchnuta 2x po 5 min v deionizované vodě a poté byla obarvena po dobu 5 min pomocí Ponceau S. Rouge. Po obarvení byla membrána opláchnuta v deionizované vodě pro odstranění přebytečného barviva. Membrána byla vysušena a podle potřeby k detekci jednotlivých proteinů byla rozřezána na menší části dle velikosti proteinů.

4.5.8 Detekce proteinů

Po nařezání byla membrány rehydratovány v methanolu, promyty v deionizované vodě a přeneseny do roztoku TBS/Tween. Byl připraven 5% roztok mléka v TBS/Tween, ve kterém byla následně membrány inkubovány na kývačce po dobu 1 h. Byl připraven 5% roztok BSA v TBS/Tween, do kterého byly přidány primární protilátky (pro AhR a CYP1A1 ředění 1:500, pro β -actin ředění 1:2000). V těchto roztocích s jednotlivými protilátkami byly inkubovány příslušné membrány přes noc na kývačce při teplotě 4 °C. Následující den byly membrány promyty 3x po 5 min v roztoku TBS/Tween. Byl připraven 2,5% roztok mléka v TBS/Tween, do kterého byly přidány sekundární protilátky (pro AhR a β -actin ředění 1:2000, pro CYP1A1 ředění 1:4000). V těchto roztocích s jednotlivými protilátkami byly inkubovány příslušné membrány 45 minut na kývačce při laboratorní teplotě. Membrány byly promyty 3x po 5 min v roztoku TBS/Tween. Byl připraven chemiluminiscenční substrát pro detekci. Membrána byla se substrátem inkubována 5 min. Pomocí LI-COR skeneru byl měřen chemiluminiscenční substrát. Přítomnost signálů byla vzájemně porovnána mezi oběma buněčnými liniemi a jednotlivými testovanými látkami.

4.5.9 Izolace RNA

Izolace RNA proběhla po 24 h a 72 h inkubaci destiček pomocí TRI Reagent. Původní médium bylo z jamek odstraněno. Jamky byly promyty 1 ml vychlazeného PBS. Do jamek byl přidán 1 ml TRI Reagent. Pomocí škrabky byly adherované buňky uvolněny ode dna jamek, vytvořená suspenze byla přenesena do 1,5ml zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno 200 μ l chloroformu. Uzavřené mikrozkušavky byly protřepány po dobu 1 min, poté byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po inkubaci byly mikrozkušavky zcentrifugovány 15 min při 13000 rpm a teplotě 4 °C. Horní vodní fáze, ve které se nacházela rozpuštěná RNA,

byla následně přenesena do nových 1,5ml mikrozkušavek (cca 450 µl). K jednotlivým vzorkům bylo napipetováno 500 µl isopropanolu, mikrozkušavky byly zvortexovány a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány po dobu 13 min při 13000 rpm a teplotě 4 °C. Po centrifugaci se na dně mikrozkušavek vytvořil viditelný pelet RNA. Supernatant byl opatrně slit a pelet byl promyt 1 ml vychlazeného 75% ethanolu. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány po dobu 5 min při 13000 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a pelet se nechal vysušit při laboratorní teplotě (3-5 min). K vysušenému peletu bylo přidáno 50 µl RNase free water a mikrozkušavky byly inkubovány v termobloku při teplotě 65 °C po dobu 5 min. Ihned po inkubaci byly mikrozkušavky přeneseny na led. Obsah v mikrozkušavkách byl propipetován. Byla změřena koncentrace RNA jednotlivých vzorků pomocí spektrofotometru NanoDrop. Nejprve bylo nutné eliminovat pozadí, proto byla změřena koncentrace 2 µl RNase free water (blank). Poté byly změřeny koncentrace 2 µl jednotlivých vzorků. Po změření byly vzorky uchovány při teplotě -80 °C.

4.5.10 Reverzní transkripce

Na základě naměřených koncentrací na spektrofotometru byly jednotlivé vzorky RNA připraveny ředěním PCR vodou tak, aby 5 µl roztoku obsahoval 1000 ng RNA. K naředěným vzorkům bylo přidán 1 µl roztoku random primerů. Mikrozkušavky byly inkubovány na termobloku při 65 °C po dobu 5 min, následně byly ihned přeneseny na led. Mikrozkušavky byly krátce zcentrifugovány. Byla připravena reakční směs, složení této směsi je uvedeno v tabulce č. 2. Ke každému vzorku bylo přidáno 6 µl reakční směsi. Mikrozkušavky byly krátce zcentrifugovány, inkubovány 1 h v termobloku při teplotě 42 °C a poté inkubovány v termobloku 10 min při teplotě 65 °C. Po skončení inkubace byly mikrozkušavky ochlazeny 2 min na ledu. Získaná cDNA byla 5x naředěna (ke 12 µl cDNA bylo přidáno 48 µl PCR vody).

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

| složka reakční směsi | objem [µl] |
|----------------------------------|------------|
| M-MuLV – reverzní transkriptáza | 0,6 |
| inhibitor Rnáz | 0,3 |
| směs dNTPs | 0,6 |
| reakční pufř (10x koncentrovaný) | 1,2 |
| deionizovaná voda | 3,3 |
| celkem | 6,0 |

4.5.11 qRT-PCR

V rámci této bakalářské práce byla detekována exprese genů CDKN1A, CDKN2A, CYP1A1 a housekeeping genu GAPDH. Exprese genů CDKN1A, CYP1A1 a GAPDH byla sledována za použití KiCqStart Probe Assays mixu. Směs primerů byla připravena smícháním 10 μ l forward primeru, 10 μ l reverse primeru a doplněním 80 μ l PCR vody. Reakční směs byla připravena dle tabulky č. 3. Do 96jamkové destičky pro PCR, která byla umístěna na led, bylo postupně napipetováno 3 x 2 μ l cDNA, takže každý vzorek měl svůj triplikát. Poté do jamek bylo přidáno 8 μ l reakční směsi. 96jamková destička byla překryta fólií a centrifugována 3 min při 1500 rpm. Následně byla destička přenesena do přístroje Light Cycler a podle tabulky č. 4 byl nastaven profil průběhu PCR reakce. Po ukončení PCR reakce byla provedena analýza naměřených dat.

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro qRT-PCR

| složka reakční směsi | objem [μ l] |
|--------------------------------|------------------|
| KiCqStart Probe qPCR ReadyMix | 5,0 |
| směs forward a reverse primerů | 0,3 |
| próba | 0,2 |
| PCR voda | 2,5 |
| celkem | 8,0 |

Tabulka č. 4: Časový profil průběhu qRT-PCR reakce

| cyklus | teplota [$^{\circ}$ C] | čas | počet cyklů |
|-------------|-------------------------|--------|-------------|
| preinkubace | 95 | 10 min | 1 |
| amplifikace | 95 | 10 s | 45 |
| | 60 | 30 s | |
| chlazení | 40 | 30 s | 1 |

Expresse genu CDKN2A byla sledována za použití TaqMan Fast Advanced mixu, kdy dle tabulky č. 5 byla připravena reakční směs. 96jamková destička pro PCR byla umístěna na led. Měření jednotlivých vzorků probíhalo v triplicátech. Do jamek bylo postupně napipetováno 2 μ l cDNA, poté do jamek bylo přidáno 9 μ l reakční směsi. 96jamková destička byla překryta fólií a centrifugována 3 min při 1500 rpm. Následně byla destička přenesena do přístroje

LightCycler a podle tabulky č. 6 byl nastaven profil průběhu PCR reakce. Po ukončení PCR reakce byla provedena analýza naměřených dat.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro TaqMan qRT-PCR

| složka reakční směsi | objem [μl] |
|--------------------------------------|------------|
| TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x) | 5,0 |
| TaqMan Assay (20x) | 0,5 |
| PCR voda | 3,5 |
| celkem | 9,0 |

Tabulka č. 6: Časový profil průběhu TaqMan qRT-PCR reakce

| cyklus | teplota [°C] | čas | počet cyklů |
|-------------|--------------|------|-------------|
| preinkubace | 95 | 20 s | 1 |
| amplifikace | 95 | 3 s | 40 |
| | 60 | 30 s | |
| chlazení | 40 | 30 | 1 |

Výsledkem analýzy bylo číselné vyjádření Ct hodnot pro jednotlivé vzorky v triplicátech, 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 (CYP1A1, CDKN1A a CDKN2A) pro konkrétní vzorek s testovanou látkou a negativní kontrolu (UT). Výsledkem byla číselná hodnota vyjadřující kolikrát byla ve vzorku zvýšená exprese sledovaného genu v porovnání s expresí v negativní kontrole.

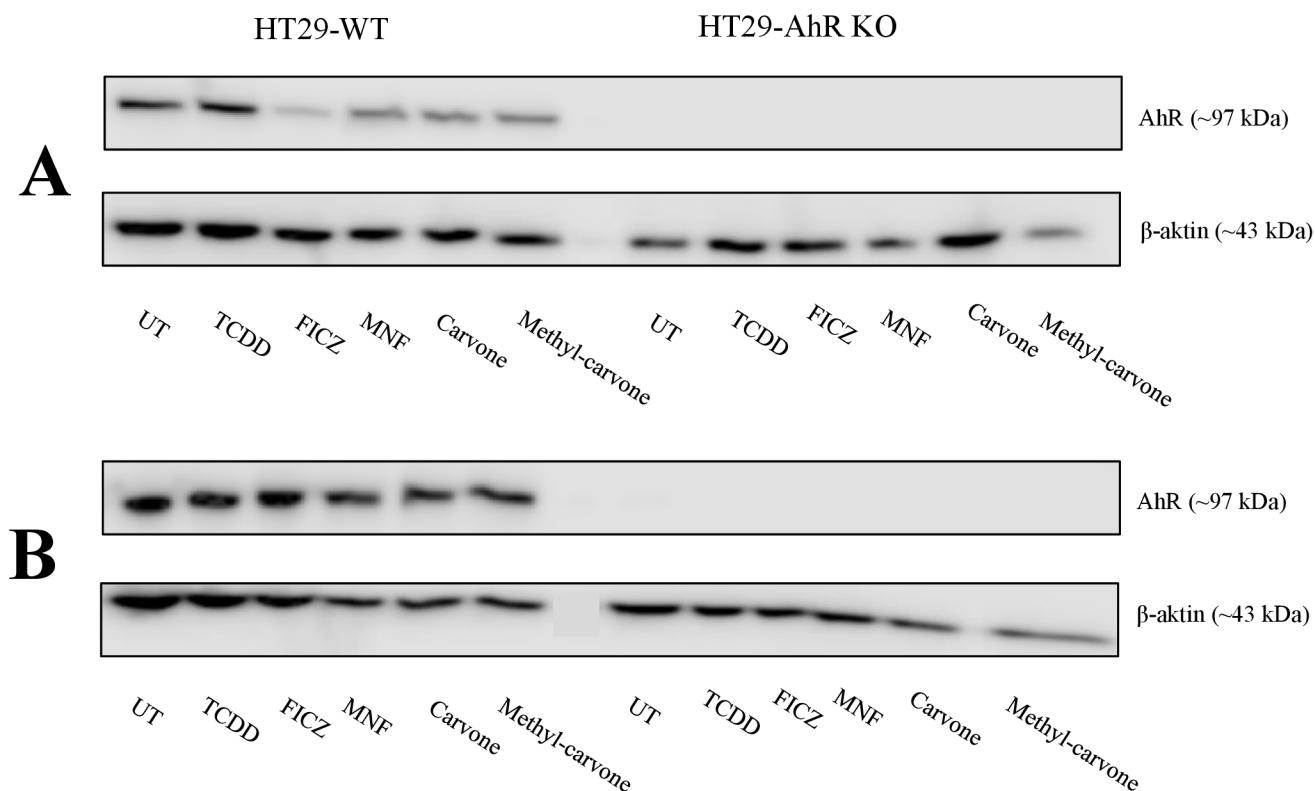
5 VÝSLEDKY

5.1 Exprese AhR na úrovni RNA a proteinu

Pro experiment byly zvoleny dva typy adherentní buněčné linie HT29 odvozené od lidského kolorektálního adenokarcinomu. První buněčná linie představovala linii „wild type“, ve druhé buněčné linii byl nefunkční aryluhlovodíkový receptor. Tento fakt, že v knockoutované linii HT29, není funkční AhR, bylo potřeba nejprve potvrdit. Buňky byly ve třech opakováních vystaveny působení látkám, které jsou agonisty (TCDD, FICZ) a antagonisty (MNF, carvone, methylcarvone) pro AhR po dobu 24 h. Po 24h inkubaci byla část vzorků inkubována dalších 72 h v čistém kultivačním médiu. Následně byla pomocí qRT-PCR u genu AhR stanovena exprese na úrovni RNA. Jednotlivé Ct hodnoty AhR transkriptu jsou souhrnně zaznamenány v tabulce č. 7. Jelikož byl detekován AhR transkript i u knockoutované buněčné linie (HT29-AhR KO), bylo nutné pomocí western blot analýzy ověřit, že v buněčné linii není vůbec přítomen AhR protein (Obrázek č. 5). Výsledky přesvědčivě prokázaly, že i přes poměrně vysokou hladinu AhR transkriptu, v buňkách HT29-AhR KO není AhR protein přítomen. Bylo tak možné pokračovat v dalších analýzách. U WT linie u látky FICZ je možné vidět, že po 24 h došlo k downregulaci AhR, což překvapivě nebylo pozorovatelné pro TCDD. Ostatní látky, které byly charakterizovány jako AhR antagonisté, pouze mírně snížily hladinu AhR proteinu.

Tabulka č. 7: Naměřené Ct hodnoty RT q-PCR analýzy genu AhR pro jednotlivé vzorky buněčné linie HT29-WT a HT29-AhR KO

| Délka inkubace | | 24h | 72h |
|----------------|-------------------------------------|------------|-------|
| Bun. linie | Typ vzorku | Ct hodnoty | |
| HT29-WT | Negativní kontrola (UT – untreated) | 21,52 | 22,26 |
| | TCDD [10 nM] | 21,64 | 22,71 |
| | FICZ [1 µM] | 22,01 | 22,13 |
| | MNF [5 µM] | 21,66 | 21,61 |
| | Carvone [1000 µM] | 23,04 | 22,29 |
| | Methyl-carvone [1000 µM] | 22,02 | 22,07 |
| HT29-AhR KO | Negativní kontrola (UT – untreated) | 24,15 | 23,87 |
| | TCDD [10 nM] | 23,47 | 23,69 |
| | FICZ [1 µM] | 24,39 | 24,33 |
| | MNF [5 µM] | 23,73 | 23,81 |
| | Carvone [1000 µM] | 24,00 | 23,76 |
| | Methyl-carvone [1000 µM] | 24,86 | 25,13 |

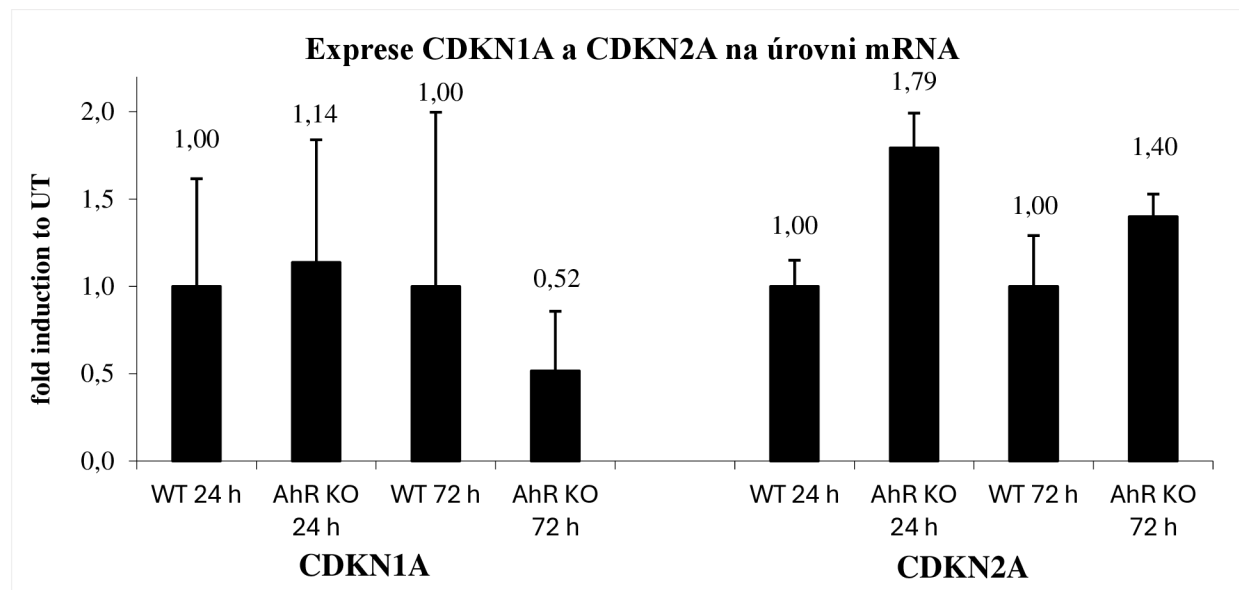


Obrázek č. 5: Reprezentativní western blot detekce proteinů AhR a β-aktin. Obrázek představuje výsledky detekce proteinových produktů AhR (97 kDa) a β-aktin (43 kDa). Detekce proteinů proběhla po vystavení buněčných linií HT29 - „wild type“ (HT29-WT) a HT29 - „AhR knockout“ (HT29-AhR KO) působení agonistů a antagonistů AhR po dobu 24 h, písmeno **A** značí detekci, která proběhla po působení látek, písmeno **B** značí detekci, u které byly buňky, u kterých došlo po 24 h působení látek k výměně inkubačního média za čerstvé a buňky byly dále inkubovány 72 h v kultivačním médiu RPMI-1640. Jako negativní kontrola (UT) bylo použito kultivační médium RPMI-1640. Zobrazen je reprezentativní blot ze tří nezávislých experimentů.

5.2 Exprese genů CDKN1A a CDKN2A na úrovni RNA v buněčných liniích HT29-WT a HT29-AhR KO

V další části experimentu byly porovnávány exprese senescenčních genů (CDKN1A a CDKN2A) na úrovni RNA. Byla provedena qRT-PCR analýza tří na sobě nezávislých experimentů. Tato analýza byla zaměřena na vzorky, u kterých nebyla použita žádná testovaná látka, porovnávaly se pouze negativní kontroly (UT). Míra exprese genů CDKN1A a CDKN2A zjištěné pomocí qRT-PCR analýzy jednotlivých experimentů byly zprůměrovány a souhrnně znázorněny v grafu č. 1. Při srovnání obou buněčných linií je patrné, že exprese genu CDKN2A je vyšší u linie s knockoutovaným AhR než u „wild type“ linie. Tento výsledek je pozorovatelný, jak u výsledků 24h inkubace, tak i u výsledků 72h inkubace v čistém kultivačním médiu. Pro expresi genu CDKN1A platí, že jeho hladina se nelišila mezi WT a AhR-KO liniemi, dokonce tu byl nesignifikantní pokles po 72h inkubaci s čistým médiem. Z těchto výsledků lze konstatovat, že pro gen CDKN2A byl zaznamenán stejný výsledek

jako ve studii, kterou provedli Nacarino-Palma *et al.* (2022), při kterém byla zjištěna vyšší exprese obou těchto senescenčních genů ve fibroblastech myši, u kterých byl nefunkční AhR.

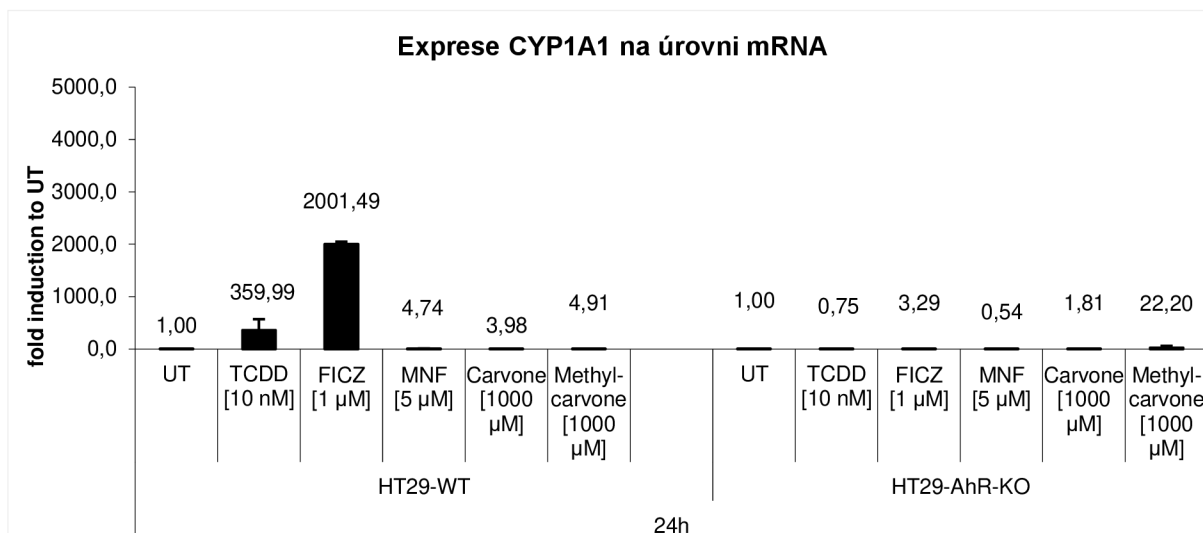


Graf č. 1: Expresce CDKN1A a CDKN2A na úrovni mRNA pro vzorky negativní kontroly (UT) u buněčných linií HT29-WT (WT) a HT29-AhR KO (AhR KO) po 24h s navazující inkubací dalších 72 h s čerstvým kultivačním médiem. Výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole označené jako WT. Jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů

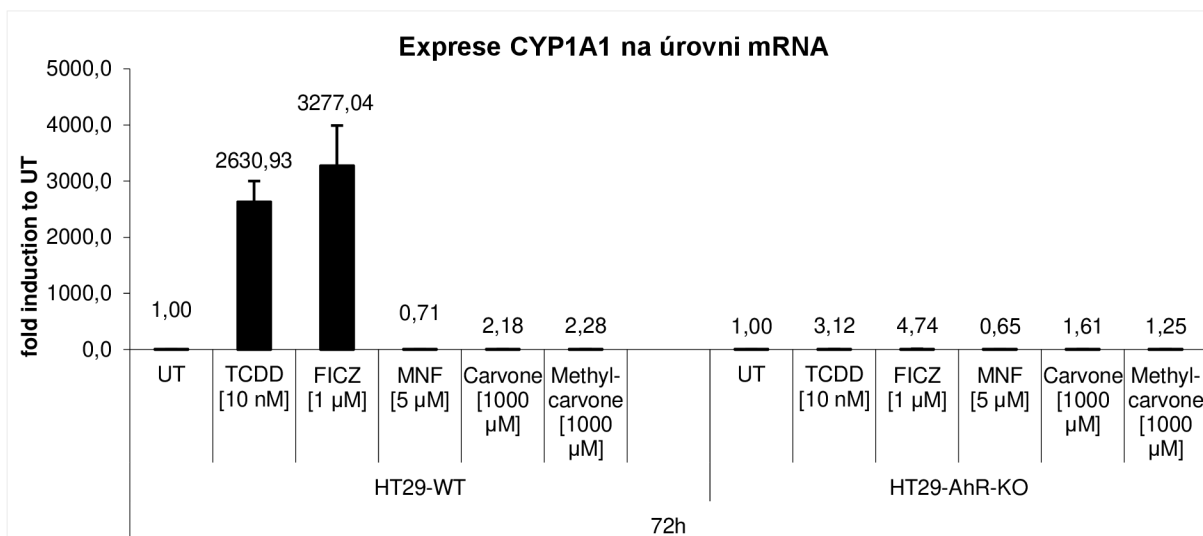
5.3 Vliv agonistů a antagonistů AhR na expresi genů CYP1A1, CDKN1A a CDKN2A na úrovni RNA

Testované látky byly k buněčným liniím HT29-WT a HT29-AhR KO přidány na 24 h. Následně byla část vzorků inkubována dalších 72 h v čistém kultivačním médiu. Tímto způsobem byly provedeny tři nezávislé experimenty. Následně byla provedena RT q-PCR analýza experimentů.

Prvním sledovaným genem byl CYP1A1, jehož exprese značí aktivaci AhR signální dráhy (Graf č. 2 a 3). Jak TCDD, tak FICZ indukovaly CYP1A1 mRNA za 24 h, zatímco antagonisté indukovaly velmi slabě v HT29-WT linii. Oproti tomu, v HT29-AhR KO, indukce CYP1A1 nebyla vůbec přítomna. Po 72 h inkubaci v čistém kultivačním médiu bez testovaných látek byla exprese CYP1A1 mRNA ještě vyšší než za 24 h a to jak pro TCDD, tak i pro FICZ, což vzhledem k jeho metabolické labilitě bylo překvapující (Graf č.3). Takto vysoké hodnoty exprese nebyly zaznamenány v buněčné linii HT29-AhR KO, jelikož není přítomen funkční protein AhR Slabá indukce CYP1A1 nicméně naznačuje jiné mechanismy působení než skrze AhR (např. ovlivnění jinými receptory).



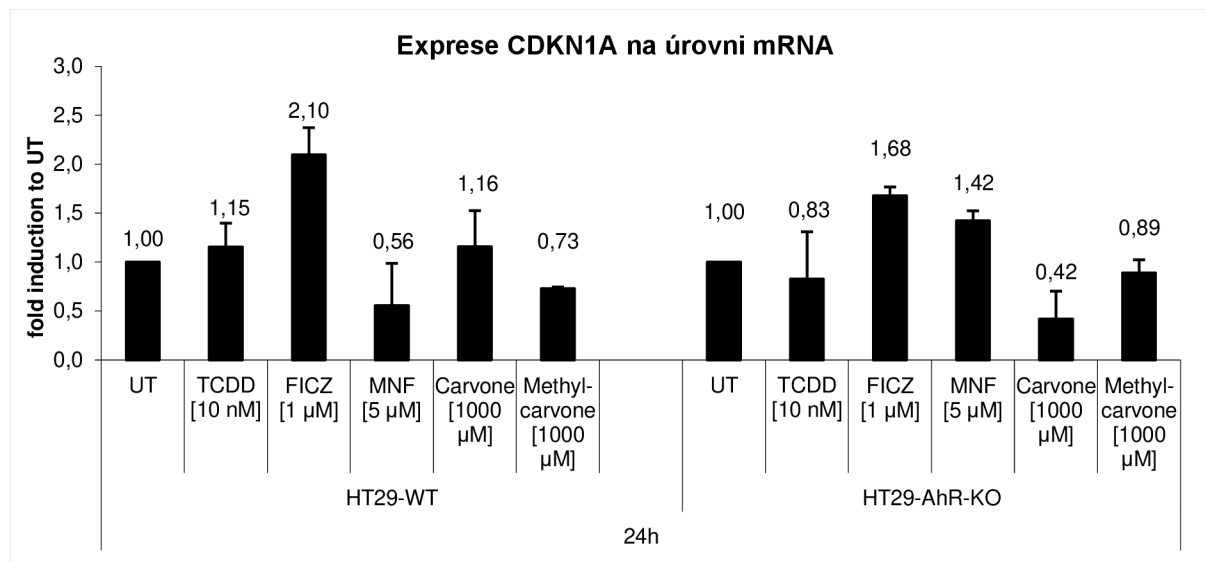
Graf č. 2: Expresse CYP1A1 na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů



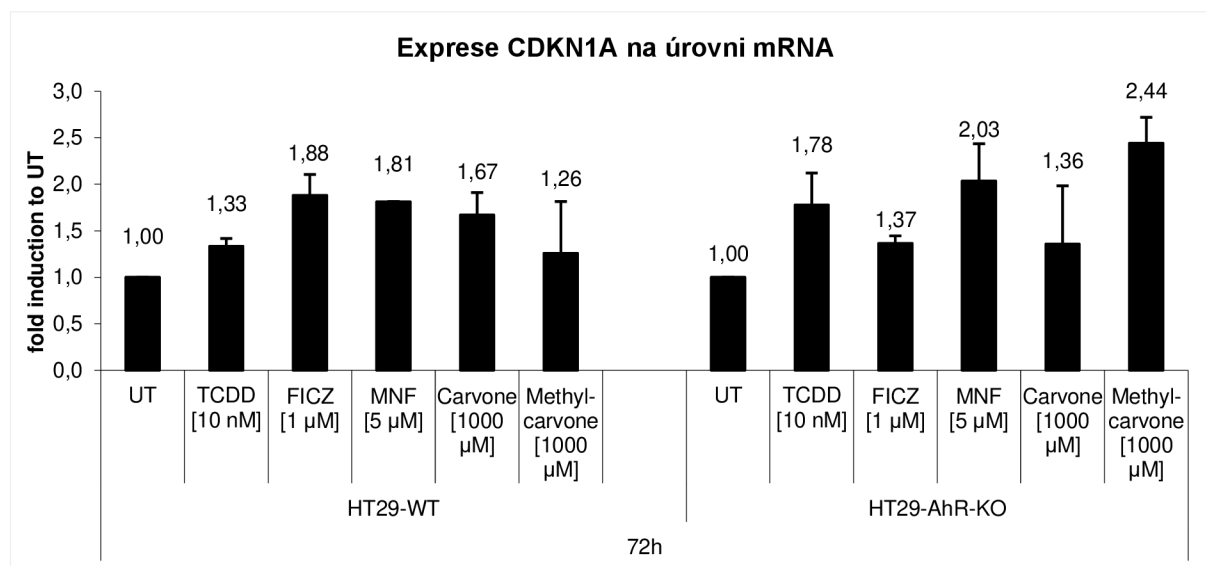
Graf č. 3: Expresse CYP1A1 na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, vzorky byly následně inkubovány dalších 72 h s čistým kultivačním médiem, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů

Dále byla provedena analýza exprese senescenčních genů. Prvním sledovaným genem byl CDKN1A, který kóduje protein p21 (Graf č. 4 a 5). Překvapivým výsledkem analýzy vzorků buněčné linie HT29-WT byla indukce exprese genu CDKN1A agonisty, předpokládalo se totiž, že k indukci nedojde a bude zaznamenána nižší exprese ve vzorcích agonistických látek než u látek antagonistických. Při analýze buněčné linie HT29-AhR KO se očekávalo, že antagonisté expresi tohoto genu nijak neovlivní (případně zesílí efekt skrze nějaký „off-target“) a bude tedy zaznamenána zvýšená exprese ve vzorcích s agonisty. Z grafů lze však vyčíst, že tato teorie,

kerou vznesli Nacarino-Palma *et al.* (2022) během své studie senescenčních genů ve fibroblastech myši, nebyla potvrzena. Tři dny po odstranění média a snahy indukovat markery senescence, nebyl nalezen viditelný rozdíl mezi WT a AHR-KO linií, a nebyl zde patrný rozdíl mezi ligandy charakterizovanými jako agonisté či antagonisté AhR (Graf č. 5).

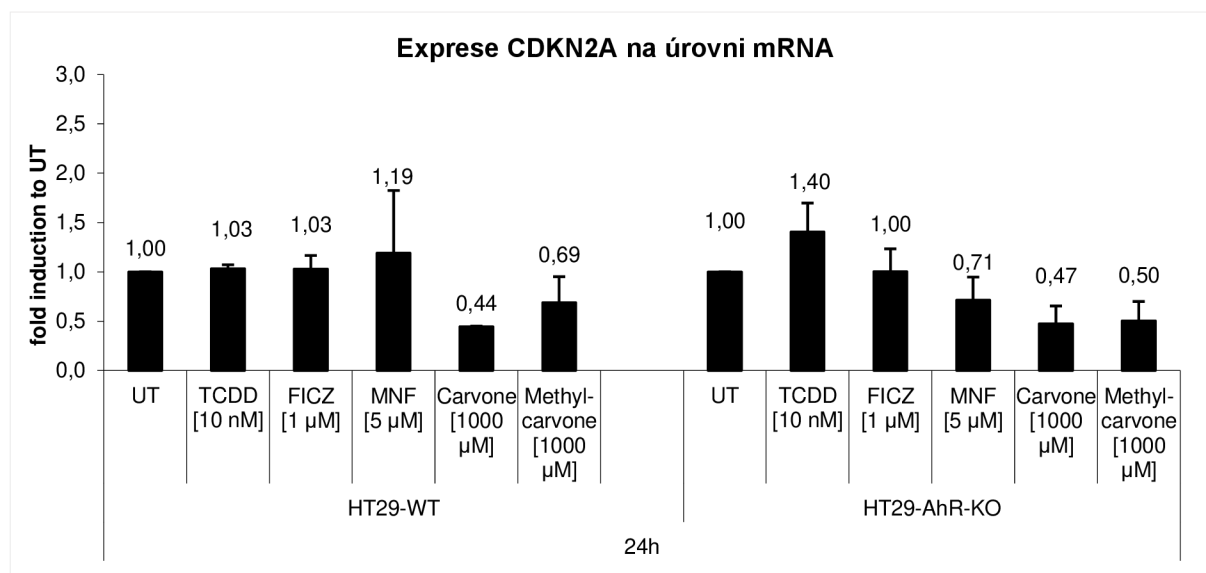


Graf č. 4: Express CDKN1A na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů

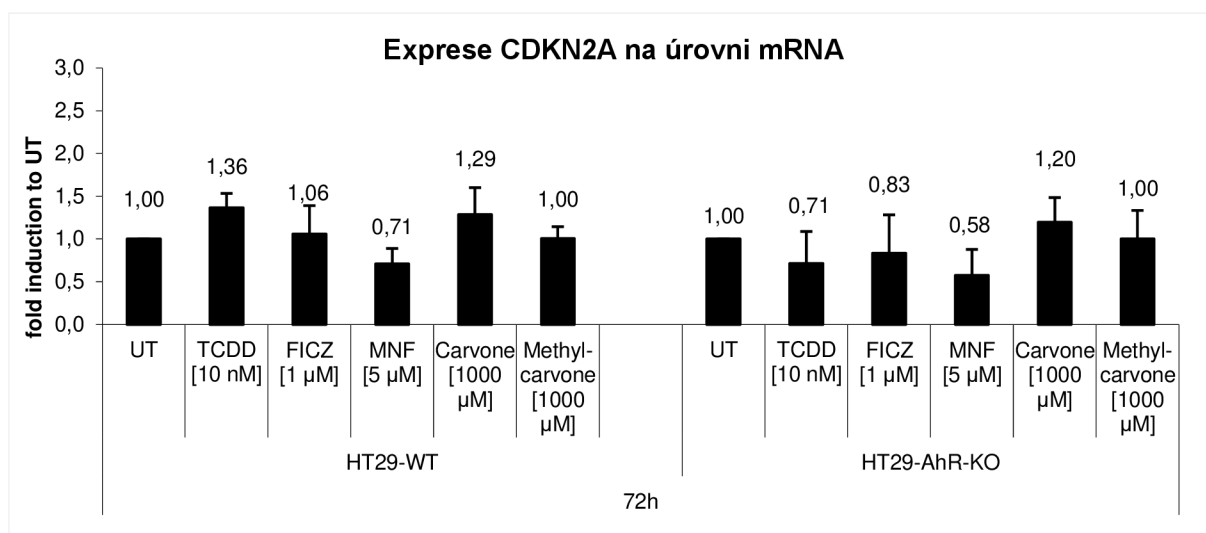


Graf č. 5: Express CDKN1A na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, vzorky byly následně inkubovány dalších 72 h s čistým kultivačním médiem, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů.

Dalším sledovaným genem byl CDKN2A, který kóduje protein p16 (Graf č. 6 a 7). Jelikož se také jedná o senescenční gen, očekávaly se obdobné výsledky jako při detekce genu CDKN1A. Nicméně i v tomto případě očekávaná teze nebyla potvrzena. V obou testovaných liniích, jak při 24h inkubaci, tak i následné 72h inkubaci, nebyla v žádném případě zaznamenána indukce tohoto senescenčního markeru, která by odpovídala míře aktivity AhR.



Graf č. 6: Expressa CDKN2A na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů.



Graf č. 7: Expressa CDKN2A na úrovni mRNA u buněčných linií HT29-WT a HT29-AhR KO po 24h působení testovaných látek, vzorky byly následně inkubovány dalších 72 h s čistým kultivačním médiem, výsledky byly normalizovány podle exprese housekeeping genu GAPDH, hodnoty značí míru exprese vůči negativní kontrole (UT), jedná se o zprůměrované výsledky tří nezávislých experimentů.

Jelikož nebyla zaznamenána souvislost mezi typem činitele (agonista vs. antagonist AhR) a mírou exprese genů CDKN1A a CDKN2A, lze konstatovat, že expresi těchto senescenčních genů v lidských nádorových střevních buňkách aktivace aryluhlovodíkového receptoru pravděpodobně neovlivňuje stejným způsobem, jak to bylo popsáno v případě studie Nacarino-Palma *et al.* (2022) v myších fibroblastech.

6 DISKUSE

Tato bakalářská práce zkoumá vliv agonistů nebo antagonistů aryluhlovodíkového receptoru na expresi senescenčních markerů v buňkách kolorektálního adenokarcinomu. Pro experiment byly použity dva typy buněčné linie HT29, aby bylo možné srovnat vliv látek jak na buňky, kde je AhR funkční (HT29-WT), tak i na buňky, u kterých byla funkce/existence proteinu AhR potlačena (HT29-AhR KO).

Buněčné stárnutí zvyšuje výskyt mnoha života ohrožujících onemocnění, včetně kardiovaskulárních a onkogenních chorob, které omezují délku života. Stále více studií uvádí funkce AhR při buněčném stárnutí (Eckers *et al.*, 2016; Brinkmann *et al.*, 2020), které mají pozitivní nebo negativní roli v závislosti na druhu, typu buňky a hladině receptoru (Mulero-Navarro *et Fernandez-Salguero*, 2016; Roman *et al.*, 2018). Nacarino *et al.* (2022) uvádí experimentální důkaz, že AhR je molekulárním mezistupněm v signálních drahách, které řídí interakci mezi senescencí a buněčným přeprogramováním. Dále tvrdí, že AhR by mohl sloužit jako limitující faktor v řízení senescence i pluripotence, což by mohlo vést k omezení vývoje nádorů s narůstajícím věkem, jelikož se jim podařilo prokázat spojení SASP a AhR, kde absence AhR v knockoutovaných myších embryonálních fibroblastech a v AhR-deficientních játrech myši vyvolala zvýšenou indukci p16, p21, SA- β -gal a cytokinů TNF α , či IL1. Proto úkolem této bakalářské práce bylo se pokusit zopakovat indukci některých těchto senescenčních markerů pomocí napodobení (mimikry) genetické absence AhR proteinu působením látek s antagonistickou aktivitou.

Na začátku studie byl pomocí metody qRT-PCR zjištěn transkript AhR v buněčné linii HT29-AhR KO, nicméně AhR protein nebyl v této linii detekován ve srovnání s WT protějškem (Obrázek č. 5) pomocí metody western blotu.

Působení FICZ, nikoliv však TCDD, dvou typických modelových ligandů a aktivátorů AhR, vyvolalo pokles AhR proteinu. Nedostatek downregulace AhR dioxinem je pozorovatelný v různých liniích a i tento výsledek tak odráží nejen kvantitu, ale i kvalitu ligandu, neboť různé studie downregulaci AhR pomocí TCDD potvrdily (Pollenz, 1996; Davarinos *et Pollenz*, 1999; Ma *et Baldwin*, 2000). Přítomnost samotných antagonistů neměla viditelný vliv na hladinu AhR proteinu v HT29-WT linii.

Funkčnost AhR signální dráhy pomocí ligandů jako je TCDD a FICZ byla potvrzena indukcí exprese CYP1A1, který se běžně používá jako marker aktivity tohoto receptoru (Hankinson *et al.*, 1991; Rosenberg *et Leff*, 1993; Komura *et al.*, 2001). Pozoruhodným výsledkem analýzy

provedené pomocí qRT-PCR bylo zaznamenání vyšší exprese CYP1A1 mRNA indukované látkou FICZ po navazující 72 h inkubaci v čistém kultivačním médiu bez této látky než při působení látky za 24 h, což se vzhledem známé metabolické lability FICZ (Wincent *et al.*, 2009) neočekávalo. Toto pozorování však mohlo být pravděpodobně způsobeno tím, že vzorky, které byly navíc inkubovány 72 h s kultivačním médiem buď nebyly dostatečně promyty od testovaných látek anebo lze předpokládat akumulaci testovaných látek uvnitř buněk a tím pádem dlouhodobější stimulaci AhR a indukci CYP1A1. Slabá indukce CYP1A1 zaznamenaná v buněčné linii HT29-AhR KO naznačuje jiné mechanismy působení než skrze AhR, které by mohly být předmětem dalších experimentů. Použití antagonistů vyvolalo pouze mírnou indukci CYP1A1 mRNA ve WT linii, která však nebyla, s výjimkou methylcarvonu reprodukována v AhR-KO linii. Slabá indukce CYP1A1 způsobená antagonisty může naznačovat, že se tyto testované látky chovají jako parciální agonisté. Podporovalo by to tak studii Zhou *et Gasiewicz* (2003), která popisuje zvýšenou transkripci CYP1A1 po působení 3'-methoxy-4'-nitroflavonu (MNF). Stanovením detekce exprese CYP1A1 mRNA indukované TCDD a FICZ v buněčné linii HT29-WT byla potvrzena aktivace a funkčnost signální dráhy AhR a bylo tak umožněno analyzovat vliv AhR na indukci senescenčních markerů CDKN1A a CDKN2A.

Při experimentu, který pomocí qRT-PCR analýzy sledoval expresi CDKN1A, CDKN2A a GAPDH na úrovni RNA, byla zaznamenána vyšší exprese CDKN2A u linie HT29-AhR KO než u linie HT29-WT. Tento výsledek byl zaznamenán pro vzorky jak s 24 h inkubací, tak i s 72 h inkubací. Tedy je zde konzistentní nález ve srovnání se studií Nacarino *et al.* (2022). Nicméně stejný účinek, v rámci dané studie, byl zaznamenán i pro expresi CDKN1A. V mé práci však tento výsledek nebyl zaznamenán a exprese CDKN1A byla stejná či nižší ve srovnání s WT linií za 24, respektive 72 h. Odlišnost těchto výsledků mohla být způsobena tím, že můj experiment byl proveden na lidských nádorových buňkách, zatímco citovaná studie využívala myší fibroblasty. Samotné působení látek, ať agonistů či antagonistů, mělo v podstatě srovnatelný účinek na oba geny, bez ohledu na přítomnost AhR. Nedostatečné ovlivnění senescenčních markerů těmito látkami lze potenciálně přičítat metabolismu látek.

Závěrem lze tedy konstatovat, že absence funkčního aryluhlovodíkového receptoru v buňkách lidského kolorektálního karcinomu vyvolává vyšší expresi genu CDKN2A, který kóduje protein p16 a je považován za klíčový a typičtější marker senescence než gen CDKN1A, který kóduje protein p21 a je považován především za marker poškození DNA s následným zastavením buněčného cyklu (Leontieva *et Blagosklonny*, 2013). Nicméně takřka nulový dopad absence AhR na zvýšenou hladinu CDKN1A ve srovnání s WT linií naznačuje jiný

mechanismus v rámci kolorektálního karcinomu než tomu bylo u myších fibroblastů. Vzhledem k tomu, že buňky rakovin mají často mutovaný p53, který řídí CDKN1A expresi, je možné, že tato skutečnost může negativně ovlivňovat indukci senescence v nádorových liniích. Pro potvrzení této skutečnosti bude potřeba provést další studie zaměřené na detekci exprese nejen těchto senescenčních markerů, především na úrovni proteinů. Dále bude nutné ověřit, zda ke stejným výsledkům dochází v dalších buněčných liniích nebo zda je to typické pouze pro buněčnou linii HT29 odvozené od lidského kolorektálního karcinomu.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabýval modulací aktivity aryluhlovodíkového receptoru a jejím vlivem na markery senescence v buňkách lidského kolorektálního adenokarcinomu. Nejprve byl pomocí qRT-PCR analýzy detekován AhR transkript v buněčné linii s knockoutovaným AhR, bylo proto následně potřeba prokázat, že i přes poměrně vysokou hladinu transkriptu v buněčné linii není přítomen AhR protein. Při stejném postupu při analýze buněčné linie s funkčním AhR proteinem byla zaznamenána downregulace tohoto proteinu látkou FICZ. U další agonistické látky TCDD downregulace pozorovatelná nebyla. V další části experimentu byla pomocí qRT-PCR analýzy detekována vyšší exprese senescenčního markeru CDKN2A v buněčné linii s knockoutovaným AhR ve srovnání s buněčnou linií s funkčním AhR proteinem. Stejný výsledek se však nepodařil zaznamenat pro senescenční marker CDKN1A. V neposlední řadě se experiment zabýval ověřením, zda použití antagonistů AhR může vyvolat podobný senescenci indukující účinek jako knockout AhR a porovnat ho s účinkem typických agonistů pomocí qRT-PCR analýzy CYP1A1, CDKN1A a CDKN2A. Indukcí CYP1A1 látkami TCDD a FICZ byla potvrzena aktivace AhR signální dráhy v buněčné linii s funkčním AhR proteinem. Slabá indukce byla zaznamenána při působení antagonistů, což nasvědčuje k tomu, že se tyto látky chovají jako parciální agonisté. V buněčné linii s knockoutovaným AhR nebyly zaznamenány vysoké hodnoty exprese CYP1A1. Z výsledků analýzy CDKN1A a CDKN2A není viditelný rozdíl mezi oběma testovanými buněčnými liniemi, nebyl zde patrný rozdíl mezi ligandy charakterizovanými jako agonisté či antagonisté AhR a nebyla tak ani zaznamenána souvislost mezi typem ligandu a mírou exprese genů CDKN1A a CDKN2A.

8 LITERATURA

- Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y. J., Widlund, H. R., Chick, J. M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S. P., Braun, P. & Sicinski, P. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer cell*, 20(5), 620-634.
- Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer*, 9, 1-17.
- Ball, K. L. (1997). p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Progress in cell cycle research*, 125-134.
- Boice, J. A., & Fairman, R. (1996). Structural characterization of the tumor suppressor p16, an ankyrin-like repeat protein. *Protein science*, 5(9), 1776-1784
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, Ch., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek M., Häring, H., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff K. & Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494(7437), 361-365.
- Brinkmann, V., Ale-Agha, N., Haendeler, J., & Ventura, N. (2020). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the aging process: another puzzling role for this highly conserved transcription factor. *Frontiers in Physiology*, 10, 509317.
- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671-682.
- Campisi, J., & Robert, L. (2014). Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Aging*, 39, 45-61.
- Dai, D., Zeldin, D. C., Blaisdell, J. A., Chanas, B., Coulter, S. J., Ghanayem, B. I., & Goldstein, J. A. (2001). Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(7), 597-607.

- 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.
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 309-334.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens M., Rubelj I. & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367.
- Dowaidar, M. (2022). P21 is a flexible, multi-functional protein. It governs various tumor cell activities, including autophagy. p21 is a possible radiotherapy target. *SJIS-P*, 33(3), 1-28.
- Dvořák, Z., Poulíková, K., & Mani, S. (2021). Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European journal of medicinal chemistry*, 215, 113231.
- Eckers, A., Jakob, S., Heiss, C., Haarmann-Stemmann, T., Goy, C., Brinkmann, V., Cortese-Krott M. M., Sansone R., Esser Ch., Ale-Agha N., Altschmied J., Ventura N. & Haendeler, J. (2016). The aryl hydrocarbon receptor promotes aging phenotypes across species. *Scientific reports*, 6(1), 19618.
- Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(20), 1536-1546.
- Faheem, M. M., Seligson, N. D., Ahmad, S. M., Rasool, R. U., Gandhi, S. G., Bhagat, M., & Goswami, A. (2020). Convergence of therapy-induced senescence (TIS) and EMT in multistep carcinogenesis: current opinions and emerging perspectives. *Cell death discovery*, 6(1), 51.
- Fischer, P. M., & Gianella-Borradori, A. (2003). CDK inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 12(6), 955-970.
- Giménez-Bastida, J. A., Ávila-Gálvez, M. Á., Espín, J. C., & González-Sarriás, A. (2020). The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-

dependent cellular senescence in human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 139, 111260.

Go, R. E., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2015). Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 147, 24-30.

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano M. & Demaria, M. (2019). Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813-827.

Hankinson, O., Brooks, B. A., Weir-Brown, K. I., Hoffman, E. C., Johnson, B. S., Nanthur, J., Reyes H. & Watson, A. J. (1991). Genetic and molecular analysis of the Ah receptor and of Cyp1a1 gene expression. *Biochimie*, 73(1), 61-66.

He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in health and disease. *Cell*, 169(6), 1000-1011.

Huang, G., & Elferink, C. J. (2012). A novel nonconsensus xenobiotic response element capable of mediating aryl hydrocarbon receptor-dependent gene expression. *Molecular pharmacology*, 81(3), 338-347.

Hussussian, C. J., Struewing, J. P., Goldstein, A. M., Higgins, P. A., Ally, D. S., Sheahan, M. D., Clark Jr., W. H., Tucker M. A. & Dracopoli, N. C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics*, 8(1), 15-21.

Chen-Hsiung, Y., & Shatkin, A. J. (1994). A HeLa-cell-encoded p21 is homologous to transcription elongation factor SII. *Gene*, 143(2), 285-287.

Jackson, D. P., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2015). Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs. *Toxicology research*, 4(5), 1143-1158.

Jiang, Y. Z., Wang, K., Fang, R., & Zheng, J. (2010). Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(8), 679-685.

Koh, J., Enders, G. H., David Dynlacht, B., & Harlow, E. D. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*, 375(6531), 506-510.

- Komura, K., Hayashi, S. I., Makino, I., Poellinger, L., & Tanaka, H. (2001). Aryl hydrocarbon receptor/dioxin receptor in human monocytes and macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*, 226, 107-117.
- Kou, Z., & Dai, W. (2021). Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochemical pharmacology*, 185, 114428.
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Bernstein, J., & Gronostaj, M. (2019). Psychological stress and cellular aging in cancer: a meta-analysis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1-9
- Leontieva, O. V., & Blagosklonny, M. V. (2013). CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. *Cell Cycle*, 12(18), 3063-3069.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters G. & Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375(6531), 503-506.
- Ma, Q., & Baldwin, K. T. (2000). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway: role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8432-8438.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, 9(3), 153-166.
- Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F., & Weinberg, R. A. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6289-6293.
- Meijer, L. (2000). Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents. *Drug Resistance Updates*, 3(2), 83-88.
- Mulero-Navarro, S., & Fernandez-Salguero, P. M. (2016). New trends in aryl hydrocarbon receptor biology. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 45.

- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, *15*(7), 482-496.
- Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, *14*(12), 801-814.
- Nacarino-Palma, A., Rico-Leo, E. M., Campisi, J., Ramanathan, A., González-Rico, F. J., Rejano-Gordillo, C. M., Ordiales-Talavera, A., Merino, J. M., & Fernández-Salguero, P. M. (2022). Aryl hydrocarbon receptor blocks aging-induced senescence in the liver and fibroblast cells. *Aging (Albany NY)*, *14*(10), 4281.
- Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., & Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *The Journal of Medical Investigation*, *51*(3, 4), 146-153.
- Pansoy, A., Ahmed, S., Valen, E., Sandelin, A., & Matthews, J. (2010). 3-methylcholanthrene induces differential recruitment of aryl hydrocarbon receptor to human promoters. *Toxicological Sciences*, *117*(1), 90-100.
- Pollenz, R. S. (1996). The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Molecular pharmacology*, *49*(3), 391-398.
- Qin, S., Schulte, B. A., & Wang, G. Y. (2018). Role of senescence induction in cancer treatment. *World journal of clinical oncology*, *9*(8), 180.
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E. L., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R. W., Wood, A. C., Pawel, B., Cole K. A., & Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical cancer research*, *19*(22), 6173-6182.
- Roman, Á. C., Carvajal-Gonzalez, J. M., Merino, J. M., Mulero-Navarro, S., & Fernández-Salguero, P. M. (2018). The aryl hydrocarbon receptor in the crossroad of signalling networks with therapeutic value. *Pharmacology & therapeutics*, *185*, 50-63.
- Rosenberg, D. W., & Leff, T. (1993). Regulation of cytochrome P450 in cultured human colonic cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, *300*(1), 186-192.

- Rudolph, J., Jakob, B., Schweinfurth, Y., Kratz, K., Wiese, C., & Taucher-Scholz, G. PCNA dependent accumulation of p21 at heavy ion induced DNA lesions.
- Safe, S., Jin, U. H., Park, H., Chapkin, R. S., & Jayaraman, A. (2020). Aryl hydrocarbon receptor (AHR) ligands as selective AHR modulators (SAhRMs). *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6654.
- Serrano, M., Hannon, G. J., & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *nature*, 366(6456), 704-707.
- Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer discovery*, 6(4), 353-367.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13(12), 1501-1512.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2), 211-225.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., & Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism*, 12(2), 198-212.
- Tutone, M., & Almerico, A. M. (2017). Recent advances on CDK inhibitors: An insight by means of in silico methods. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 300-315.
- Vrzal, R. (2014). *Základy toxikologie*. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-4103-0.
- Vrzal, R., Ulrichová, J., & Dvořák, Z. (2004). Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 148(1), 3-10.
- Vyhliđalová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., Mani, S. & Dvořák, Z. (2020). Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2614.
- Whitlock Jr, J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 103-125.

Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug A., & Rannug, U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole is present in humans. *Journal of biological chemistry*, 284(5), 2690-2696.

Wright, E. J., De Castro, K. P., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Current opinion in toxicology*, 2, 87-92.

Yao, E. F., & Denison, M. S. (1992). DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry*, 31(21), 5060-5067.

Zhang, X. H., Hsiang, J., & Rosen, S. T. (2021). Flavopiridol (Alvocidib), a cyclin-dependent kinases (CDKs) inhibitor, found synergy effects with niclosamide in cutaneous t-cell lymphoma. *Journal of clinical haematology*, 2(2), 48.

Zhou, J., & Gasiewicz, T. A. (2003). 3'-methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416(1), 68-80.