

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Karolína Poulíková**

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



**Vliv mTOR signalizační dráhy  
na indukovatelnou expresi  
biotransformačního enzymu CYP1A1 v  
lidském hepatocelulárním karcinomu**

**Bakalářská práce**

**Karolína Poulíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

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

V Olomouci dne

Karolína Poulíková

## Souhrn

Cytochrom CYP1A1 je enzym účastnící se I. fáze biotransformace xenobiotik u člověka. Bakalářská práce se zaměřila na vliv rapamycinu, inhibitoru komplexu mTORC1, který je součástí kinázy mTOR, na indukovatelnou expresi CYP1A1 přes aryl uhlovodíkový receptor (AhR). Jako induktor exprese byl použit 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Účinek rapamycinu byl sledován ve dvou koncentracích – 1 ng/ml a 20 ng/ml.

Exprese enzymu CYP1A1 byla zkoumána na buněčné linii odvozené od hepatocelulárního karcinomu pomocí metod real-time PCR, elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného s následným Western blottingem a pomocí fluorimetrie. Po inkubaci buněk s rapamycinem nebyla detekována zvýšená hladina mRNA, ani katalytické aktivity CYP1A1. S rostoucí koncentrací rapamycinu v kombinaci s TCDD dochází ke zvýšení hladiny mRNA CYP1A1. Katalytická aktivita byla taktéž zvýšena v kombinaci TCDD s rapamycinem, nejvíce však v nižší koncentraci rapamycinu. Výsledky naznačují, že mTOR kináza ovlivňuje signalizaci AhR v přítomnosti jeho ligandů.

## **Summary**

Cytochrome CYP1A1 is a biotransformation enzyme involved in the phase I of drug metabolism in humans. This thesis focuses on the influence of rapamycin, an inhibitor of mTOR kinase, on inducible expression of CYP1A1 mediated by aryl hydrocarbon receptor (AhR) in hepatoma cell line HepG2. The expression was induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). The effect of rapamycin was examined in concentrations 1 ng/ml and 20 ng/ml.

The expression of CYP1A1 was monitored by a real-time polymerase chain reaction, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting and fluorimetry. The TCDD-inducible level of CYP1A1 mRNA was increased significantly in the presence of rapamycin in dose-dependent manner. The catalytic activity was increased as well but the bigger increase was detected for the lowest concentration of rapamycin. The results suggest that mTOR kinase affects AhR signaling in the presence of its ligands.

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a cenné rady, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále také děkuji kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za ochotu vždy mi pomoci. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině za umožnění studia a podporu během něj.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Biotransformace.....	9
2.1. Fáze I.....	9
2.1.1. Cytochromy P450.....	10
2.2. Fáze II.....	12
2.3. Fáze III.....	15
3. Podrodina CYP1A.....	16
3.1. CYP1A1.....	16
3.2. CYP1A2.....	17
4. Regulace exprese enzymů metabolizujících xenobiotika.....	18
4.1. Aryl uhlovodíkový receptor (AhR).....	18
4.2. Pregnanový X receptor (PXR).....	19
4.3. Konstitutivní androstanový receptor (CAR).....	20
4.4. Glukokortikoidní receptor (GR).....	20
5. mTOR.....	21
5.1 Komplexy mTORC1 a mTORC2.....	21
6. Cíl práce.....	23
7. Materiál a přístroje.....	24
7.1 Biologický materiál.....	24
7.2 Laboratorní pomůcky.....	24
7.3 Chemikálie a použité roztoky.....	24
7.4 Laboratorní přístroje.....	26
8. Metodika.....	27
9. Výsledky.....	35
10. Diskuze.....	38
11. Závěr.....	40
12. Literatura.....	41
13. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	46

## 1. Úvod

Lidská populace je každý den vystavena velkému množství látek ať už přírodního nebo syntetického původu. Mohou to být například léčiva, potravinová aditiva, kosmetické produkty, průmyslové exhaláty i návykové látky, které vstupují do těla přes trávicí trakt, respirační systém či pokožku a poté jsou rozváděny krví. Ne všechny sloučeniny jsou pro organismus využitelné, nejsou nutné pro jeho vývoj a ani neslouží jako zdroj energie. Organismus se s nimi snaží vypořádat, aby si udržel své stálé vnitřní prostředí (homeostázu), což je pro jeho přežití klíčové. Velká většina cizorodých látek (xenobiotik) jsou látky s lipofilním charakterem, které jsou špatně rozpustné ve vodě, snadno difundují přes membrány a jsou těžce eliminovány.

Aby se organismus mohl bránit před nepříznivými vlivy okolí, dala evoluce vzniknout detoxifikačnímu ději zvanému biotransformace. Biotransformace neboli metabolismus xenobiotik se dělí do tří fází. V první fázi je zvyšován polární charakter xenobiotika vnesením či odkrytím substituentů, které jsou schopny dále reagovat s enzymy druhé fáze. Mezi důležité enzymy první fáze biotransformace patří cytochromy P450 metabolizující množství endogenních a exogenních sloučenin. V neméně podstatné druhé fázi dochází ke zvyšování polaritě konjugacími reakcemi s endogenní molekulou. Výsledkem je inaktivované xenobiotikum neboli hydrofilní metabolit snadno rozpustný ve vodě, který špatně prochází membránami buněk a je následně rychle eliminován močí z organismu. Třetí fáze zahrnuje export metabolitů z buňky ven.

Genová exprese cytochromů P450 je transkripčně regulována. Indukce CYP1A1 probíhá prostřednictvím aryl uhlovodíkového receptoru a ovlivňuje rychlost detoxifikace organismu a s tím spojeného ovlivnění účinku léčiva.



## 2. Biotransformace

Organismus se musí neustále potýkat s cizorodými látkami, které mohou vést při dlouhodobém působení k jeho nevratnému poškození. Tělo se s nimi snaží vypořádat pomocí detoxifikačních procesů. Xenobiotika se nejprve dostanou do krevního řečiště organismu a poté dochází k jejich vstupu do cílových buněk. Transport látek do buněk probíhá volnou či zprostředkovanou difúzí (přenos molekul přes membránu po směru gradientu koncentrace), endocytosou (přenos molekuly pomocí endosomu) nebo aktivním transportem (přenos molekuly proti koncentračnímu gradientu) za pomoci energie ve formě ATP. Organismy si proti cizorodým látkám v průběhu evoluce vytvořily detoxifikační mechanismy, kterými se před jejich negativním působením chrání (Dostálek *et al.*, 2006; Knejzlík *et al.*, 2000). Tento proces se nazývá metabolismus xenobiotik neboli biotransformace. Organismus se snaží škodlivé látky z organismu eliminovat tím, že zvýší polární charakter sloučeniny, která je poté z jeho těla odstraněna (Croom, 2012; Gibson *et Skett*, 2001).

Dlouhou dobu se biotransformace dělila do dvou fází. Nyní hovoříme i o fázi III, která se zabývá transportem molekuly z buňky ven (Vrzal *et al.*, 2004).

### 2.1. Fáze I

V první fázi se zvyšuje polarita látky za pomoci oxidačních, redukčních, a hydrolytických reakcí. Dochází k odhalení nebo tvorbě nových funkčních skupin (např. -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, =CO, -COOH) (Dostálek *et al.*, 2006). Tyto reakce zahrnují N- a O-dealkylace, alifatické a aromatické hydroxylace, N- and S-oxidace a deaminace. Na katalýze první fáze biotransformace se podílí velké množství enzymů. Důležitou roli zde hrají cytochromy P450 (CYP), kterými se budu zabývat detailně v následující kapitole 2.1.1 a kapitole 3. Mezi další významné enzymy patří flavinové monooxidasy, alkoholdehydrogenasy, reduktasy, hydrolasy aj. (Vrzal *et al.*, 2004; Fukasawa *et al.*, 2007; Jancova *et al.*, 2010).

### 2.1.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450, zkráceně CYP, představují enzymy obsahující esenciální hemovou skupinu. Patří mezi monooxygenasy a katalyzují oxidační reakce. Jedná se o hemoprotein typu b, který ve své molekule obsahuje nekovalentně vázaný protoporfyrin IX (Knejzlík *et al.*, 2000; Dostálek *et al.*, 2006). Lokalizovány jsou především v játrech (Anzenbacher *et Anzenbacherová*, 2001).

P450 mají širokou substrátovou specifitu, indukovány mohou být exogenními (potravinová aditiva, léky) i endogenními (mastné kyseliny, steroidy, prostaglandiny) metabolity, které se do organismu dostávají potravou přes trávicí trakt, dále také přes kůži či plíce. Byly nalezeny téměř ve všech živých organismech, u plísní, bakterií, rostlin i savců (Knejzlík *et al.*, 2000).

U eukaryot jsou cytochromy P450 lokalizované na cytosolické straně v membráně endoplazmatického retikula (Vrzal *et al.*, 2004), v membráně jádra či mitochondrií. U bakterií se nachází v rozpustné formě v cytosolu (Dostálek *et al.*, 2006).

Pojem P450 byl poprvé zaveden v roce 1962. O rok později byla popsána jeho funkce (Dostálek *et al.*, 2006). Název P450 je založen na identifikaci tohoto enzymu. Redukovaná forma červeného pigmentu (P) v játrech s vázaným oxidem uhelnatým je schopna absorbovat světlo o 450 nm (Croom, 2012; Glue *et Clement*, 1999).

Cytochrom P450 je nestabilní. Inaktivní forma vzniká například nahrazením thiolátové skupiny cysteinu imidazolem, serinem či histidinem, což se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukované formy s oxidem uhelnatým na 420 nm (Dostálek *et al.*, 2006).

Bylo charakterizováno více než 50 izoform, ovšem pouze pět z nich je zodpovědných za většinu aktivity P450. Nejvíce se podílejícím enzymem na metabolismu xenobiotik v lidském organismu je CYP3A4/5 (36 %), dále CYP2D6 (19 %), CYP2C8/9 (16 %), CYP1A1/2 (11 %) a CYP2C19 (8 %) (Fukasawa *et al.*, 2007).

V současnosti je u člověka popsáno 57 genů a více než 58 pseudogenů, které jsou rozděleny do 18 rodin a 43 podrodin genů CYP (Pávek *et Dvořák*, 2008), z nichž čtrnáct genů se podílí na metabolismu steroidů včetně žlučových kyselin (např. CYP7A1, CYP7B1 a CYP8B1), čtyři na metabolismu vitamínů rozpustných v tucích (např. CYP24A1) a devět na metabolismu mastných kyselin a eikosanoidů

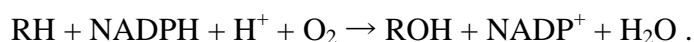
(např. CYP2C9 a CYP2J2). Celkem patnáct genů se podílí na metabolismu léčiv a jiných cizorodých látek (např. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a CYP3A4) (Guengerich, 2003; Nakata *et al.*, 2006; Spector *et al.*, 2015; Annalora *et al.*, 2010). Velké množství CYP poukazuje nejen na odlišnou aminokyselinovou sekvenci jednotlivců, na rozdílnou odpověď na xenobiotika, ale i na velice rozdílné potřeby jednotlivých organismů. Liší se navzájem strukturou, nukleotidovou sekvencí a vlastnostmi jejich aktivních míst (Anzenbacher *et al.*, 2001; Vrzal *et al.*, 2004).

### Názvosloví CYP

Nomenklatura CYP je založena na homologii v AK sekvencích. K objasnění názvosloví CYP slouží označení pomocí arabských číslic a písmen. Rodina je označena arabskou číslicí za písmeny CYP, např. CYP1. Sekvence překrývajících se částí u enzymů patřící do stejné rodiny se shoduje ve 40 %. Podrodiny jsou značeny písmeny a mají nejméně 55% homologii, např. CYP1A. Dále už jsou jednotlivé enzymy značeny číslicí, např. CYP1A1, v tomto případě se musí sekvence lišit ve více než 3 % (Anzenbacher *et al.*, 2001).

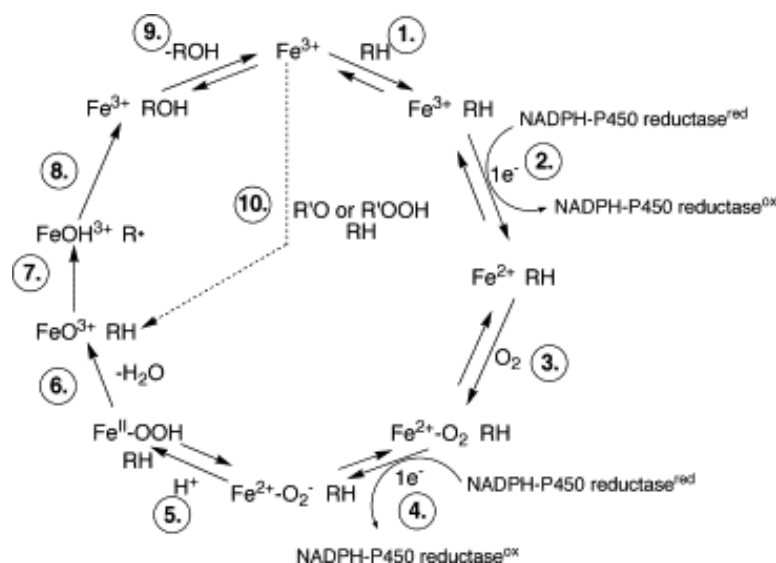
### Katalytický cyklus

CYP jsou enzymy závislé na nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), který je zdrojem elektronů pro katalytickou reakci. Všechny CYP váží dva atomy kyslíku. Jeden atom se váže do molekuly substrátu (R), s nímž poté vytváří produkt (ROH), a druhý do molekuly vody. Mechanismus reakce můžeme vyjádřit:



Katalytický cyklus zahrnuje navázání substrátu (RH) na oxidovanou formu  $\text{Fe}^{3+}$ . Na vzniklý komplex  $\text{Fe}^{3+}(\text{RH})$  je přenesen elektron pomocí enzymu NADPH-P450 reduktasy, čímž vznikne  $\text{Fe}^{2+}(\text{RH})$ . Dojde k navázání molekuly kyslíku do komplexu. NADPH-P450 reduktasa je oxidována, komplex přijímá elektron, který je zabudováván a vzniká  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-(\text{RH})$ . V dalším kroku se uvolňuje voda (první produkt), jelikož dochází k reakci protonu s komplexem. Tvoří se komplex  $\text{Fe}^{3+}(\text{RH})$  a rozpadá se vazba O-O. Kyslík, dříve vázaný v komplexu s Fe, se dále váže na molekulu RH. Z reakce

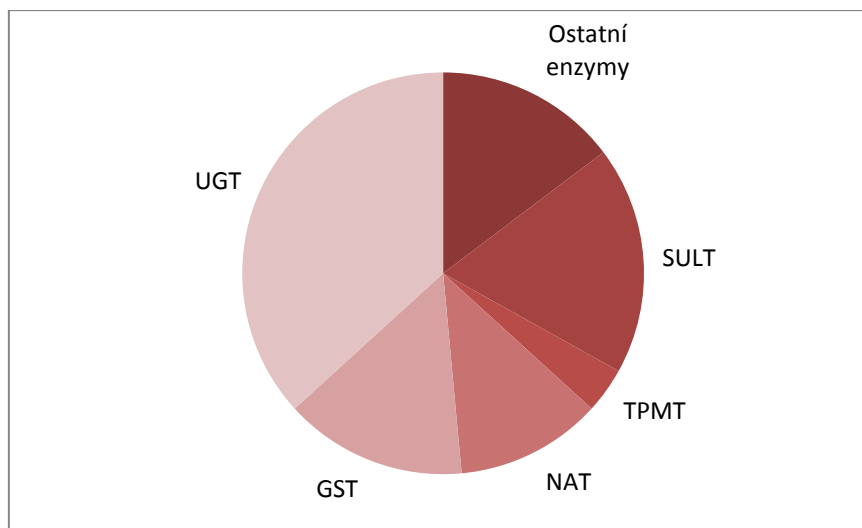
se uvolňuje i ROH (druhý produkt) a dochází k uzavření cyklu vytvořením oxidované formy enzymu s  $\text{Fe}^{3+}$  (Isin *et* Guengerich, 2007; Zuber *et al.*, 2002)



Obr. 1: Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z: Isin *et* Guengerich, 2007).

## 2.2. Fáze II

Druhá fáze biotransformace se označuje jako konjugační. Dochází ke zvýšení polaritu produktu první fáze připojením polární molekuly. Mezi tyto reakce řadíme glukoronidaci, glykosylaci, sulfataci, methylaci, acetylaci, kondenzaci a konjugaci s aminokyselinami a glutathionem. Reakce této fáze jsou katalyzovány pomocí enzymů UDP-glukoronyltransferasy (UGT), sulfotransferasy (SULT), glutathion-S-transferasy (GST), N-acetyltransferasy (NAT) a methyltransferasy (především thiopurin S-methyltransferasy (TPMT) a katechol O-methyltransferasy (COMT) (Xu *et al.*, 2005; Jancova *et al.*, 2010).



Obr. 2: Podíl některých enzymů účastnících se II. fáze metabolismu xenobiotik. UGT, UDP-glukoronyltransferasy; SULT, sulfotransferasy; NAT, N-acetyltransferasy; GST, glutathion-S-transferasy; TPMT, thiopurin S-methyltransferasy (převzato a upraveno podle: Jancova *et al.*, 2010).

### Glutathion S-transferasy (GST)

Glutathion S-transferasa je jedním z nejdůležitějších enzymů účastnících se detoxikace elektrofilních sloučenin a je důležitá při obraně organismu před oxidativním stresem. Rodina GST katalyzuje konjugaci glutationu s xenobiotikem. Tyto enzymy mají důležitou roli při odbourávání epoxidů odvozených od polycyklických aromatických uhlovodíků (Jancova *et al.*, 2010). Savčí GST dělíme do osmi skupin – Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Zeta, Omega a Kappa (Sheehan *et al.*, 2001).

### Sulfotransferasy (SULT)

Sulfotransferasy jsou enzymy účastnících se O-, N- nebo S-sulfatačních reakcí, kdy dochází ke konjugaci nukleofilní akceptorové skupiny s 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfátem (PAPS). Sulfatace hraje významnou roli v metabolismu xenobiotik a biotransformaci nízkomolekulárních látek (např. steroidy, katecholaminy, eikosanoidy, retinol, vitamín D, serotonin aj.) (Jancova *et al.*, 2010).

U savců rozlišujeme dvě třídy SULT. První skupina je lokalizovaná na membránách Golgiho aparátu a metabolizuje endogenní sloučeniny. Do druhé třídy patří cytosolické SULT, které se podílí na metabolismu xenobiotik a malých endogenních sloučenin jako jsou hormony či neurotransmitery (Glatt, 2001).

### **UDP-glukoronosyltransferasy (UGT)**

UDP-glukoronosyltransferasy jsou enzymy zodpovědné za metabolismus většiny endogenních (např. bilirubin, steroidní a thyroïdní hormony aj.) i exogenních sloučenin a jsou klíčové pro proces zvaný glukuronidace. Jedná se o membránově vázané enzymy katalyzující tvorbu chemických vazeb mezi nukleofilními atomy (O-, N-, S- nebo C-) s uridin 5'-difosfoglukuronovou kyselinou (UDPGA). Rodina UGT obsahuje 117 členů (Jancova *et al.*, 2010).

### **N-acetyltransferasy (NAT)**

N-acetyltransferasa je cytosolický jaterní enzym katalyzující přenos acetylové skupiny acetyl koenzymu A na volnou amino skupinu xenobiotika. U člověka rozeznáváme dvě formy, které se liší substrátovou specifitou – N-acetyltransferasa 1 (NAT1) a N-acetyltransferasa 2 (NAT2). Tyto dvě skupiny mají nukleotidovou sekvenci shodnou v 85 % (Sim *et al.*, 2008; Jancova *et al.*, 2010).

### **Thiopurin S-methyltransferasy (TPMT)**

Thiopurin S-methyltransferasa je cytosolický enzym katalyzující S-methylaci aromatických heterocyklických sloučenin s thiolovou skupinou, které obsahují thiopuriny (např. 6-metkaptopurin, azothioprin nebo 6-thioguanin). Ve vysoké koncentraci se nachází v ledvinách a játrech, naopak nízká koncentrace je v plicích a mozkové tkáni (Jancova *et al.*, 2010).

### **Katechol O-methyltransferasy (COMT)**

Intracelulární katechol O-methyltransferasy jsou enzymy lokalizované v postsynaptickém neuronu. Mezi substráty se řadí norepinefrin, epinefrin, dopamin a léky, jejichž struktura je na bázi katecholaminu. Tyto enzymy katalyzují přenos methylové skupiny z S-adenosylmethioninu na katecholamin (Jancova *et al.*, 2010).

### 2.3. Fáze III

Tato fáze zahrnuje export metabolitů z buňky a následně jejich vyloučení močí nebo žlučí z organismu (Gibson *et Skett*, 2001). Této fáze se účastní transmembránové proteiny (pumpy), díky kterým se snižuje koncentrace xenobiotik v intracelulárním prostoru buňky. Řadí se mezi ně P-glykoprotein, OATP (organické anionty přenášející polypeptidy) a OCT (organický kationtový přenašeč) (Vrzal *et al.*, 2004).

P-glykoprotein je ATP-dependentní membránový přenašeč organických iontů, který zodpovídá za tzv. mnohočetnou lékovou rezistenci (multidrug resistance) a chrání živé organismy před nepříznivým vlivem látek. Nejčastěji je exprimován v endoteliálních buňkách trávicího traktu. P-glykoprotein snižuje koncentraci xenobiotika v cytoplasmě pomocí transportu organické látky z intracelulárního do extracelulárního prostředí buňky (Vrzal *et al.*, 2004; Knejzlík *et al.*, 2000). Skládá se ze dvou velmi podobných polovin, každá obsahuje šest transmembránových segmentů, a intracelulárního vazebného místa pro ATP (Schinkel *et Jonker*, 2012).

Dále mohou být kojugáty s kyselinou glukoronovou, sulfátem a glutathionem exportovány pomocí OATP (peptidy přenášející organické anionty). Tyto pumpy transportují amfipatické látky a jsou exprimovány v játrech, tenkém střevě, plicích, srdci, placentě a v řadě jiných tkání (Vrzal *et al.*, 2004). V játrech jsou OATP lokalizovány na bazolaterální membráně a transportují látky z krve do žluče. Bilirubin, cholecystokinin, žlučové kyseliny, steroidy a thyroïdní hormony jsou substráty pro OATP (Tirona *et Kim*, 2002).

### 3. Podrodina CYP1A

K podrodině CYP1A se řadí dva mikrosomální isoenzymy, CYP1A1 a CYP1A2. Oba tyto enzymy hrají klíčovou roli v aktivaci metabolismu karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a heterocyklických aromatických aminů a amidů (HAA), které vedou k toxicitě a vzniku rakovinového bujení (Ma *et al.*, 2007). Enzymy CYP1A1 a CYP1A2 jsou v primární aminokyselinové sekvenci v 72 % identické (Walsh *et al.*, 2013). Exprese obou enzymů je indukovaná PAH, například benzo[a]pyrenem a 3-methylchloranthrenem (3-MC) a dioxiny přes aryl uhlovodíkový receptor (AhR) (Pávek *et al.*, 2008).

#### 3.1. CYP1A1

Cytochrom CYP1A1 je biotransformační enzym lokalizovaný především v mimo jaterních tkáních jako jsou plíce, mozek, trávicí trakt a srdce, ale i v malém množství jej nalezneme v játrech. Vykazuje substrátovou specifitu, což z něj dělá jeden z nejdůležitějších detoxifikačních enzymů (Pávek *et al.*, 2008). Nejznámější induktor pro CYP1A1, a vysokoafinitní ligand pro AhR, je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (Ma *et al.*, 2007). Dalším významným induktorem exprese je 3-MC. Inhibitorem formy CYP1A1 je  $\alpha$ -naftoflavon (Walsh *et al.*, 2013).

CYP1A1 katalyzují přeměnu PAH do reaktivních metabolitů, které mohou indukovat poškození DNA. Například v plicích člověka dochází ke zvýšené expresi CYP1A1 z čehož vyplývá zvýšené riziko vzniku nádoru (Tekpli, 2012). Hladina mRNA je vysoká v plicích kuřáka na rozdíl od nekuřáka, kde je obvykle nedetekovatelná (Walsh *et al.*, 2013).

Gen CYP1A1 je lokalizován na chromozomu 15q22–q24 (Dostálek *et al.*, 2006). Rozeznáváme čtyři typy jednonukleotidových polymorfismů tohoto genu – m1, m2, m3 a m4. Frekvence četnosti polymorfismů m1 a m2 je vyšší, než u zbylých dvou variant. Mutace alely m1 CYP1A1 je způsobena změnou thyminu (T) na cytosin (C) na 3' nekódující oblasti. Tranzice adeninu (A) za guanin (G) v exonu 7 je výsledkem mutace alely m2 CYP1A, což vede k substituci aminokyseliny valinu (Val) za isoleucin (Ile) v místě, kde se váže hem. Obě dvě mutace mají za následek zvýšení aktivity enzymu (Hussein *et al.*, 2014).



### 3.2. CYP1A2

Jaterní isoenzym CYP1A2 je také zapojený do metabolismu xenobiotik, například kofeinu, paracetamolu nebo theofylinu (Anzenbacher *et al.*, 2001). Tento enzym má širokou substrátovou specifitu a je exprimován konstitutivně (Ingleman-Sundberg *et al.*, 2007). Stejně jako u CYP1A1, tak i u tohoto enzymu zvýšená aktivita může vést k řadě patologických stavů a i jeho indukce probíhá shodným způsobem.

Cigaretový kouř je u této formy typickým induktorem. U kuřáků je navíc zvýšena incidence rakoviny tlustého střeva (Wei *et al.*, 2002; Dostálek *et al.*, 2006).

## 4. Regulace exprese enzymů metabolizujících xenobiotika

Působením látek na organismus může dojít ke zvýšení enzymatické aktivity, tzn. indukci, nebo ke snížení, tzn. inhibici. Regulaci enzymů metabolizujících xenobiotika ovlivňují reakční podmínky, koncentrace substrátů nebo přítomnosti a koncentraci kofaktorů (Skálová *et al.*, 2011).

Za regulaci exprese jsou zodpovědné nukleární receptory, mezi které se řadí aryl uhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR), receptor pro kyselinu cis-retinovou (RXR), glukokortikoidní receptor (GR), receptor pro kyselinu trans-retinovou (RAR), konstitutivní androstanový receptor (CAR) a receptor pro vitamín D (VDR) (Vrzal *et al.*, 2004).

### 4.1. Aryl uhlovodíkový receptor (AhR)

Receptor pro polyaromatické uhlovodíky je transkripční faktor patřící k PAS rodině, pro které je společným znakem tzv. PAS doména (Per-ARNT-Sim). AhR reguluje expresi lidských CYP1A1/2 a CYP1B1 a některých enzymů druhé fáze biotransformace (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004) a kontroluje odpověď organismu na environmentální polutanty, které na něj působí jako chemické směsi (Harper *et al.*, 2006). Mezi cílové geny jsou řazeny i geny zapojené do regulace buněčného cyklu, apoptózy a proliferace buněk (Mimura *et Fujii-Kuriyama*, 2003; Nebert *et al.*, 2000). Je aktivován specifickými ligandy, mezi které řadíme PAH a TCDD (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004).

Gen AhR je lokalizován na chromozomu 7 (Vrzal *et al.*, 2004) a skládá se ze tří domén. Doména bHLH (basic helix-loop-helix) se nachází na N-terminálním konci a je zodpovědná za vazbu na specifickou sekvenci DNA. Druhou doménou je PAS doména, která zajišťuje vazbu ligandů AhR, například TCDD, a následnou interakci s proteiny v jádře a cytoplasmě. Na C-terminálním konci proteinu je lokalizovaná transaktivační doména s velkým množstvím glutaminových zbytků, které jsou klíčové pro transkripční aktivitu AhR (Gu *et al.*, 2000; Skálová *et al.*, 2011).

V cytoplasmě se nachází AhR v inaktivní formě v komplexu s proteiny Hsp90, XAP2 a p23. Po vazbě ligandu na receptor dojde ke změně konformace, uvolní se Hsp90 a XAP2. Následuje přesun receptoru do jádra, kde tvoří heterodimer s nukleárním translokátorem (ARNT) (Skálová *et al.*, 2011; Marlowe *et Puga*, 2005). Posledním krokem je vazba heterodimeru do specifické oblasti DNA, na xenobiotický

(XRE) nebo dioxinový responzivní element (DRE), které se nachází v promotorové oblasti DNA definované sekvencí 5'-CACGCNA-3', čímž je spuštěna transkripce genů (Vrzal *et al.*, 2004; Hankinson, 2005).

Významné jsou i posttranslační modifikace pro regulaci genové exprese. Fosforylace hraje klíčovou roli v transformaci inaktivního AhR do aktivního heterodimeru AhR/ARNT (Li *et Dougherty*, 1997) a ovlivňuje i vazebnou aktivitu heterodimeru AhR/ARNT (Puga *et al.*, 2002). Probíhá na C-terminálním konci peptidu *in vitro* a je katalyzovaná kinázami, například proteinkinázou C a mitogeny aktivovanými protein kinázami (MAPKs). Proteiny AhR a ARNT jsou fosforylovány na threoninových zbytcích, z čehož vyplývá, že serin/threoninová kináza se může významně podílet na regulaci funkce AhR (Vrzal *et al.*, 2004; Henklová *et al.*, 2008). Její inhibicí se výrazně zvýší genová exprese řízená pomocí AhR (Puga *et al.*, 2002). Bylo dokázáno, že serin/threoninové fosfatázy mohou ovlivnit vazbu heretodimeru do XRE a inhibovat schopnost AhR/ARNT stimulovat transkripci (Li *et Dougherty*, 1997). Serin/threoninovou kinázou mTOR se budu detailně zabývat v kapitole 5.

#### **4.2. Pregnanový X receptor (PXR)**

Nukleární pregnanový X receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který aktivuje transkripci cílových genů, které kódují různé enzymy a proteiny účastníci se biotransformačních mechanismů. Ve vysoké míře je exprimován především v jaterních buňkách. Ligandy PXR jsou steroidy a xenobiotika. Mezi aktivátory PXR řadíme endogenní sloučeniny jako bilirubin a žlučové kyseliny (Konno *et al.*, 2008; Gao *et Xie*, 2010). PXR byl poprvé objeven a popsán u myši. Tento receptor je klíčový pro regulaci exprese genů podrodiny CYP3A (Mani *et al.*, 2013).

V cytoplasmě je lokalizován volně, naopak po vazbě ligandu na PXR dochází k jeho transportu do jádra, kde následuje tvorba stabilního heterodimeru s receptorem pro kyselinu cis-retinovou alpha (RXR $\alpha$ ). Vzniklý heterodimer PXR- RXR $\alpha$  se poté váže na specifickou oblast DNA (Dostálek *et al.*, 2006; Konno *et al.*, 2008).

### 4.3. Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

CAR je, stejně jako PXR, nukleární jaterní receptor účastnící se metabolismu xenobiotik (Gao *et al.*, 2010). V inaktivní formě se CAR vyskytuje v cytoplasmě v komplexu s chaperony, s proteiny Hsp90 a ko-chaperonem CCRP (Konno *et al.*, 2008). Po vazbě ligandu dojde k aktivaci receptoru a transportu do jádra. Ke komplexu CAR/CCRP/HSP90 s navázaným ligandem se připojuje proteinová fosfatáza 2A (PP-2A). Následuje připojení RXR za vzniku heterodimeru CAR-RXR $\alpha$ . Komplex se za pomoci koaktivátorů a současného uvolnění chaperonů váže do CAR regulační oblasti (CARRE) (Pávek *et al.*, 2008). K aktivaci může dojít i bez přítomnosti exogenní látky (Dostálek *et al.*, 2006).

### 4.4. Glukokortikoidní receptor (GR)

Glukokortikoidní receptor hraje důležitou roli v regulaci transkripce cizorodých látek. Rozlišujeme dva subtypy GR $\alpha$  a GR $\beta$ . Izoforma GR $\alpha$  je transkripčně aktivní a skládá se ze 777 aminokyselin. GR $\beta$  je tvořena 742 aminokyselinami a neváže exogenní ani endogenní glukokortikoidy. Váže transkripční faktory uvolněné při aktivaci GR $\alpha$  a zpětnovazebně inhibuje jeho aktivitu (McMaster *et al.*, 2007).

V inaktivním stavu se nachází v cytoplasmě, kde tvoří komplex s jednou molekulou Hsp70 a Hsp56, dvěma molekulami Hsp90 a dalšími složkami proteinové struktury. Vazba ligandu na receptor způsobí odštěpení chaperonů a již v cytoplasmě dochází k dimerizaci za vzniku homodimeru GR/GR. Vzniklý komplex je až poté transportován do jádra a je schopný se vázat do specifického místa ve struktuře DNA. Homodimer GR/GR se váže na vazebné místo pro glukokortikoidy (GRE) (Dostálek *et al.*, 2006; McMaster *et al.*, 2007). GRE je lokalizován v promotoru genu a rozlišujeme pozitivní (pGRE) a negativní (nGRE). Vazba homodimeru na nGRE způsobí inhibici transkripce, zatímco interakce s pGRE indukuje transkripci.

Dexametazon je nejznámějším aktivátorem, který zvyšuje aktivitu biotransformačních enzymů P450, především izoenzymu CYP3A5 (Dostálek *et al.*, 2006). Jeho zvýšená exprese je vyvolána skrze indukci PXR a CAR (Pascussi *et al.*, 2001).

## 5. mTOR

Protein mTOR, savčí rapamycinový cíl, je serin/threoninová kináza, která funguje jako důležitý regulátor buněčného růstu a proliferace buněk. Ovlivňuje celou řadu buněčných procesů včetně autofagie, správné funkce mitochondrií, metabolismu, diferenciaci a přežití buněk. Vyskytuje se ve formě dvou funkčně odlišných komplexů mTORC1 a mTORC2 (Laplante *et* Sabatini, 2012; Nascimento *et al.*, 2010). Poprvé byl identifikován ve kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman *et al.*, 1991).

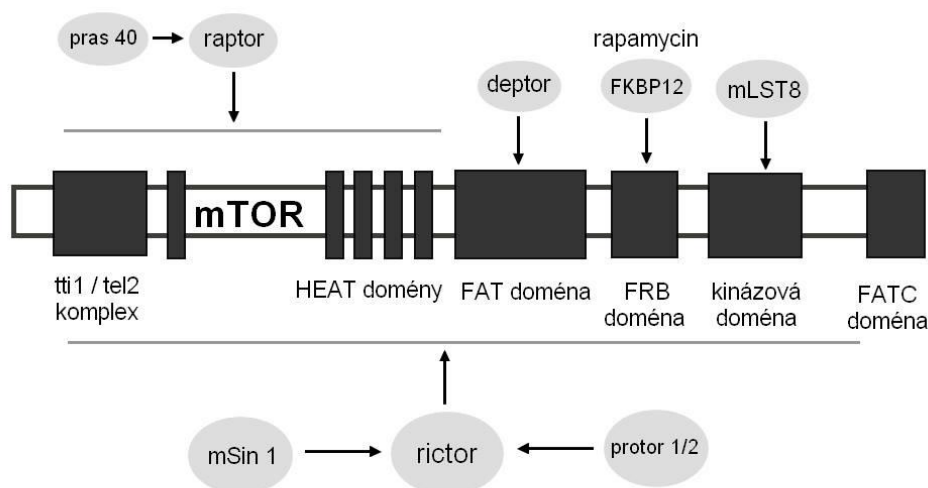
Deregulace mTOR signalizační dráhy je příčinou lidských nemocí včetně rakoviny, obezity, diabetes mellitus 2. typu, metabolických poruch nebo neurodegenerace, dokonce i alkoholismu a depresí (Dazert *et* Hall, 2011).

### 5.1 Komplexy mTORC1 a mTORC2

Komplexy mTORC1 a mTORC2 sdílejí katalytickou jednotku mTOR (serin/threoninovou kinázu), mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8, GβL), deptor (DEP domain containing mTOR-interacting protein) a Tti1/Tel2 complex. Pro mTORC1 je typický protein raptor (regulatory-associated protein of mTOR) obsahující velké množství konzervovaných opakujících se motivů HEAT a protein pras40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa). Naproti tomu rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein) a protor 1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) jsou typické pro mTORC2 (Laplante *et* Sabatini, 2012).

mTORC1 fosforyluje S6K1 (ribosomal protein S6 kinase-1) a 4EBP1 (elongation factor 4E binding protein 1), které jsou zodpovědné za translaci a s ní spojenou syntézou proteinů (Chiang *et* Abraham, 2007). Fosforylací je S6K1 aktivována, naopak 4EBP-1 je inhibována (Thomas *et* Hall, 1997). Komplex mTORC1 podporuje růst buněk indukci či inhibicí katabolických a anabolických procesů, syntézu lipidů a také řídí buněčný cyklus. Signální dráha mTORC1 reaguje na intracelulární (růstové faktory) i extracelulární podněty (kyslíkový stav, stresové faktory) (Chiang *et* Abraham, 2007; Laplante *et* Sabatini, 2012) a je obzvlášť citlivá na rapamycin, který inhibuje funkci komplexu (Chiang *et* Abraham, 2007).

V aktivním stavu komplexu mTORC1 dochází k syntéze proteinů a lipidů a intenzivnímu metabolismu, naopak pokud je kinázová aktivita inhibována, dojde k autofagii, degradačnímu procesu buňky (Laplante *et* Sabatini, 2012).



Obr. 3: Schématické znázornění mTOR kinázy a její interakční místa (nakresleno podle Laplante *et* Sabatini, 2012).

mTORC2 fosforyluje členy rodiny AGC kináz včetně Akt, SGK1 a PKC a tím dochází k ovlivnění glykolýzy buněk (Hagiwara *et al.*, 2012). Může být inhibován LY294002 and PtdIns-103 (Chiang *et* Abraham, 2007). Komplex mTORC2 reaguje na růstové faktory, reguluje metabolismus a organizaci aktinového cytoskeletu (Hagiwara *et al.*, 2012; Chiang *et* Abraham, 2007). Je rezistentní k inhibici rapamycinem, FKBP12-rapamycin se na něj nemůže vázat (Sarbasov *et al.*, 2004). Ovšem při dlouhodobému působení rapamycinu může být narušena jeho struktura (Laplante *et* Sabatini, 2012).

Rapamycin se používá jako imunosupresivum známé pod názvem sirolimus. Poprvé byl izolován v 70. letech 19. století z půdních vzorků z aktinomycety *Streptomyces hygroscopicus* na Velikonočním ostrově (Viklický *et al.*, 2008). Sirolimus vede k disociaci komplexu mTORC1 a následně k inhibici mTOR signalizační dráhy. Jeho působením dochází ke zpomalení až zastavení přechodu T lymfocytů z G1 do S fáze buněčného cyklu. V dnešní době se sirolimus využívá v transplantační medicíně jako prevence nepřijetí transplantovaného orgánu organismem (Girman *et* Saudek, 2002). Významnou vlastností je i antiproliferační účinek na nádorové buňky (Hidalgo *et* Rowinsky, 2000).

## **6. Cíl práce**

Cílem bakalářské práce bylo zjistit vliv mTOR signalizační dráhy na indukovatelnou expresi enzymu CYP1A1 na buněčné linii HepG2 použitím metod Real-time PCR, Western blotting a fluorimetrické detekce katalytické aktivity.

## 7. Materiál a přístroje

### 7.1 Biologický materiál

- Buněčná linie HepG2 odvozená od hepatocelulárního karcinomu (ECACC, 85011430)

### 7.2 Laboratorní pomůcky

- Automatické pipety o rozsahu 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- Multikanálové pipety o rozsahu 0,5 – 10 µl, 30 – 300 µl, 10 – 100 µl (Eppendorf)
- Plastové špičky o rozsahu 0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl a 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- FastPette (Labnet)
- Sterilní skleněné pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- Kultivační lahev o obsahu 75 cm<sup>2</sup> (TPP)
- 6 jamkové kultivační destičky (TPP)
- 96 jamkové kultivační destičky (TPP)
- PCR 96 jamkové bílé destičky (Roche, LightCycler 480)
- Fólie na PCR 96 jamkové bílé destičky (Roche, LightCycler 480)
- 96 jamková černá destička pro měření fluorescence (NUNC Denmark)
- Petriho misky (TPP)
- Mikrozkušavky o objemech 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- Zkušavky o objemech 15 a 50 ml (TPP)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- Krycí sklíčka
- Plastové stojany na zkušavky a mikrozkušavky
- Polystyrenová krabice na led
- Plastová škrabka 24 cm (TPP)

### 7.3 Chemikálie a použité roztoky

- Komerční médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Aldrich, D6546) s přidanými 5 ml roztoku antibiotik penicilinu a streptomycinu (Sigma Aldrich, P4333), 5 ml L-glutaminu (Sigma Aldrich, G8540), 50 ml fetálního bovinního séra (Sigma Aldrich, F6178) a 5 ml neesenciálních aminokyselin (Gibco, 11140-035)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- 2,3,7,8-tetrachlórdibenop-dioxin (ULTRA Scientific, 48599)
- Rapamycin (Sigma Aldrich, R8781)
- Dimethylsulfoxid (Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0)



- Bradfordovo činidlo (Sigma Aldrich, B6916)
- TRI reagent (Sigma Aldrich, T9424)
- Chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- Izopropanol (Lab-Nev s.r.o., 20037-AT0)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, 459844)
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- Trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- dNTP 10 mM (Takara; dATP (B1053A), dTTP (B1048A), dGTP (B1058A), dCTP (B1050A))
- Pufr reverzní transkripce M-MuLV (BioLabs, B0253S)
- Random Primer (TaKaRa, 3801)
- Inhibitor RNA (BioLabs, M0307L)
- M-MuLV reverzní transkriptáza (BioLabs, M0253L)
- Primery pro CYP1A1 (GeneriBiotech, Hradec Králové)
  - Sekvence primeru (forward): 5'- CCAGGCTCCAAGAGTCCA - 3'
  - Sekvence primeru (reverse): 5'- GATCTTGGAGGTGGCTGCT - 3'
- Primery pro GAPDH (GeneriBiotech, Hradec Králové)
  - Sekvence primeru (forward): 5'- CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC - 3'
  - Sekvence primeru (reverse): 5'- ACGACCAAATCCGTTGACTC - 3'
- UPL sondy 60 (Roche, 04688589001) a 33 (Roche, 04687663001)
- Probes Master (Roche, 04707494001)
- 7-ethodyresorufin 2mM (Sigma-Aldrich, E3763)
- Dikumarol 10 mM (Sigma-Aldrich, M1390)
- Tablety PhosSTOP (Roche, 04906837001)
- Tablety complete Mini (Roche, 04693124001)
- Bovinní sérový albumin BSA (Sigma-Aldrich, A2153)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (Bio Basic, TB0508)
- 10% dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, L3771)
- 40% Akrylamid/bis-akrylamid (Bio Basic, A0007)
- Lyzační pufr pH=7,5 (50 mM HEPES; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100)
- 1 x fosfátový pufr (PBS, pH = 7,5) (500 ml dH<sub>2</sub>O; 4 g NaCl; 0,1 g KCl; 1,605 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O; 0,1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 2x loading pufr (2,5 ml 4x zaostřovací pufr; 4 ml 10% SDS; 2 mg bromfenolová modř; 2 ml glycerol; 0,31 g DTT; 10 ml dH<sub>2</sub>O)
- 1x transferový pufr (100 ml Tris-glycin pufr 10x; 200 ml methanol; 700 ml dH<sub>2</sub>O)
- 4x zaostřovací pufr (pH = 6,8; 24 g 0,5M Tris/HCl; 400 ml dH<sub>2</sub>O)
- 4x dělicí pufr (pH = 8,8; 72,6 g 1,5M Tris/HCl; 400 ml dH<sub>2</sub>O)
- 1x migrační pufr (100 ml 10x Tris-glycin-SDS pufr; 900 ml dH<sub>2</sub>O)
- 10x tris-glycin pufr (Bio Basic, A0029)

- 10x tris-glycin-SDS pufr (Bio Basic, A0031)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, P3504)
- Methanol (Sigma-Aldrich, 65542)
- Sušené mléko (Laktino)
- 1x TBS/Tween (900 ml dH<sub>2</sub>O; 100 ml 10x TBS; 0,5 ml Tween20)
- 10x TBS (pH = 7,5; 500ml dH<sub>2</sub>O; 15,1 g Tris; 58,4 g NaCl)
- Primární protilátka CYP1A1 (H-70), králičí polyklonální IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-20772)
- Primární protilátka aktin (I-19), koží polyklonální IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-1616)
- Sekundární protilátka koží proti králičí IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)
- Sekundární protilátka králičí proti koží IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2768)

#### **7.4 Laboratorní přístroje**

- Laminární flowbox Biohazard SafeFAST Top (Chemos)
- Mikroskop IMT-2 (Olympus)
- Vodní lázeň LCB11D (LabTech)
- Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Stolní centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Termoblok MD-02N (BioTech)
- LightCycler 480 II (Roche)
- Dry Bath Incubator (Major Science)
- Laboratorní houpačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- Vortex Relax top D-91126 (Heidolph)
- Analytické váhy ABS 80-4 (Kern)
- Spektorfotometr Infinite F200 (Tecan)
- Spektorfotometr Infinite M200 (Tecan)
- Vyvolávací automat XR 24 PRO (Dürr Dental)
- C-Digit Blot Scanner (LI-COR)

## 8. Metodika

### Kultivace buněk HepG2

Adherentní buněčná linie HepG2 byla kultivována v plastové kultivační lahvi s 20 ml média (viz chemikálie a použité roztoky) v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub>.

### Pasážování buněk

- 1) Kultivační lahev s buněčnou linií HepG2 jsem přenesla z inkubátoru do sterilního laminárního boxu.
- 2) Odsála jsem staré kultivační médium. Poté jsem lahev promyla roztokem 1x fosfátového pufru a opět jsem roztok odsála.
- 3) Na buňky jsem aplikovala 1 ml trypsinu a přenesla jsem lahev na 5 minut do inkubátoru.
- 4) Po uplynutí stanovené doby došlo k rozrušení kontaktu buněk s kultivačním povrchem. K buňkám jsem přidala 9 ml nového média, čím jsem zastavila působení trypsinu. Suspenzi jsem promíchala opětovným nasáváním pipety a zpětným vypouštěním.
- 5) Obsah lahve jsem přenesla do nové plastové zkumavky. Dostala jsem suspenzi, ze které jsem odebrala 2 ml a ty jsem poté nanasla na dno kultivační lahve. Přidala jsem 20 ml nového předehřátého kultivačního média a lahev dala do inkubátoru. Pasážování buněk bylo nutné opakovat přibližně každé tři dny.

### Počítání buněk a vyšetí buněk na kultivační destičku

- 1) Z plastové zkumavky se suspenzí jsem odebrala 10 µl roztoku, který jsem v mikrozkušavce smíchala s 90 µl roztoku trypanové modři.
- 2) Takto připravený roztok jsem nanasla na Bürkerovu komůrku a pod mikroskopem jsem počítala množství buněk v deseti čtvercích.
- 3) Spočítala jsem průměrný počet buněk ve čtverci a ten jsem vynásobila zřed'ovacím faktorem 10<sup>5</sup>. Výsledné číslo udávalo množství buněk v 1 ml suspenze.
- 4) Pro 6 jamkovou destičku jsem vysela 1 milion buněk na jamku v 2 ml média.
- 5) Pro 96 jamkovou destičku jsem vysela 25 000 buněk na jamku v 200 µl média.
- 6) Kultivační destičky jsem vrátila zpět do inkubátoru.

### Příprava roztoků a jejich aplikace

- 1) Po 24 hodinách jsem v kultivačních deskách vyměnila médium za nové, ke kterému jsem přidala požadované chemikálie. Množství a složení roztoků je uvedeno v Tab. 1.
  - a. Pro 6 jamkovou destičku jsem potřebovala 2 ml média s požadovanými chemikáliemi na jamku. Aplikace testovaných látek je znázorněna na Schématu 1.

- b. Pro 96 jamkovou destičku jsem potřebovala 200  $\mu$ l média s požadovanými chemikáliemi na jamku. Aplikace testovaných látek je znázorněna na Schématu 2.
- 2) Takto ošetřené buňky jsem dala inkubovat na 24 hodin pro izolaci RNA a na 48 hodin pro metody RT-PCR a fluorometrickou detekci katalytické aktivity.

Tab. 1: Příprava roztoků s testovanými látkami pro dvě 6 jamkové a jednu 96 jamkovou kultivační destičku (s rezervou pro pipetování)

Testovaná látka	Složení roztoku
UT	11 $\mu$ l DMSO + 5,5 ml média
TCDD	5,5 $\mu$ l TCDD + 5,5 $\mu$ l DMSO + 5,5 ml média
Rapamycin o koncentraci 1 ng/ml	5,5 $\mu$ l rapamycinu + 5,5 $\mu$ l DMSO + 5,5 ml média
Rapamycin o koncentraci 20 ng/ml	5,5 $\mu$ l rapamycinu + 5,5 $\mu$ l DMSO + 5,5 ml média
TCDD + Rapamycin o koncentraci 1 ng/ml	5,5 $\mu$ l TCDD + 5,5 $\mu$ l rapamycinu + 5,5 ml média
TCDD + Rapamycin o koncentraci 20 ng/ml	5,5 $\mu$ l TCDD + 5,5 $\mu$ l rapamycinu + 5,5 ml média

Legenda: UT - negativní kontrola (0,1% roztok DMSO), TCDD – pozitivní kontrola (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 5nM)

Schéma 1: Aplikace testovaných látek na 6 jamkové kultivační destičce

UT	Rapamycin (1 ng/ml)	TCDD + Rapamycin (1 ng/ml)
TCDD	Rapamycin (20 ng/ml)	TCDD + Rapamycin (20 ng/ml)

Legenda: UT - negativní kontrola (0,1% roztok DMSO), TCDD – pozitivní kontrola (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 5 nM)

Schéma 2: Systém aplikace testovaných látek na 96 jamkové kultivační destičce

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
UT	A												
TCDD	B												
Rapamycin (1 ng/ml)	C												
Rapamycin (20 ng/ml)	D												
TCDD + Rapamycin (1 ng/ml)	E												
TCDD + Rapamycin (20 ng/ml)	F												
	G												
	H												

Legenda: UT - negativní kontrola (0,1% roztok DMSO), TCDD – pozitivní kontrola (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 5 nM)

### Izolace RNA a měření koncentrace

- 1) K izolaci RNA jsem použila 6 jamkovou kultivační destičku.
- 2) Do jamek bez média jsem aplikovala 1 ml TRI Reagentu a homogenát jsem přenesla do mikrozkušavek.
- 3) Do každé mikrozkušavky jsem přidala 200 µl chloroformu a obsah jsem protřepala po dobu 1 minuty. Poté jsem mikrozkušavky nechala stát při laboratorní teplotě 5 minut.
- 4) Poté jsem provedla centrifugaci (13 000 RPM/15 min/4 °C).
- 5) Do čistých mikrozkušavek jsem odebrala supernatant (obsahuje RNA) a k němu jsem poté přidala 500 µl isopropanolu a vzorek jsem krátce promíchala na vortexu.
- 6) Vzorky jsem inkubovala 5 minut při pokojové teplotě a poté jsem provedla centrifugaci (13 000 RPM/13 min/4 °C). RNA se vysrážela na dně zkumavky (pelet).
- 7) Odstranila jsem supernatant jeho slitím a k peletu jsem přidala 1 ml 75% ethanolu (vychlazený na - 20 °C).
- 8) Provedla jsem centrifugaci (13 000 RPM/5 min/4 °C).
- 9) Opět jsem odstranila supernatant jeho slitím a k peletu jsem přidala 1 ml 75% ethanolu (vychlazený na - 20 °C).
- 10) Provedla jsem centrifugaci (13 000 RPM/5 min/4 °C).
- 11) Opět jsem odstranila supernatant jeho slitím a k peletu jsem přidala 50 µl vody (množství vody je úměrné velikosti peletu).
- 12) Následovala inkubace po dobu 5 minut při 65 °C.
- 13) Na přístroji NanoDrop1000 jsem změřila koncentraci RNA a čistotu RNA (podíl hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm).

## Přepis na cDNA

- 1) Podle naměřené koncentrace RNA jsem připravila roztoky RNA tak, aby v nových mikrozkuvkách bylo 5 µl/1000 ng RNA.
- 2) Do mikrozkuvek jsem přidala 1 µl náhodných primerů (koncentrace 100 pmol/µl) a uchovávala jsem je na ledu.
- 3) Vzorky jsem inkubovala 5 minut při 65 °C, poté jsem je ochladila na ledu a krátce centrifugovala.
- 4) Ke každému vzorku jsem přidala 6 µl MIXu (viz Tab. 2).
- 5) Krátce jsem vzorky centrifugovala a poté inkubovala 1 hodinu při 42 °C a poté 10 minut při 65 °C.
- 6) Přepsané vzorky na cDNA jsem vložila na led a přidala jsem 48 µl vody a promíchala pomocí vortexu.
- 7) Pokud jsem výslednou cDNA nepoužila ihned na metodu PCR, tak jsem ji vložila do mrazáku na - 80 °C.

Tab. 2: Příprava MIXu pro reverzní transkripci

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [µl]
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6
Inhibitor RNAs	0,3
dNTP (10 mM zásobní roztok)	0,6
10x reakční pufr	1,2
Přečištěná voda	3,3
<b>Celkem</b>	<b>6</b>

## Real-time PCR (Polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

- 1) Pro tuto metodu jsem použila 96 jamkovou bílou PCR destičku. Detekovala jsem geny CYP1A1 a GAPDH, a to pro každou testovanou látku ve třech opakováních (viz Schéma 3).
- 2) Vytvořila jsem si PCR směs (viz Tab. 4 a 5) a tu jsem následně aplikovala po 8 µl na jamku.
- 3) Do každé jamky jsem přidala 2 µl příslušné cDNA a přelepila jsem desku fólií.
- 4) Provedla jsem centrifugaci destičky (1500 RPM/3 min/4 °C).
- 5) Poté jsem vložila PCR destičku do LightCycler 480 II s programem viz Tab. 3.

Tab. 3: Nastavení PCR

Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probes		
Objem	10 $\mu$ l		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	10 min	1
Amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
Chlazení	40	30 s	1

Tab. 4: Složení PCR směsi pro detekci genu CYP1A1 pro jeden vzorek

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
UPL 33	0,2
Směs primerů F+R pro CYP1A1	0,8
2x Probe Master	5
Voda	2

Tab. 5: Složení PCR směsi pro detekci genu GAPDH pro jeden vzorek

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
UPL 60	0,2
Směs primerů F+R pro GAPDH	0,8
2x Probe Master	5
Voda	2

Schéma 3: Systém aplikace testovaných látek na 96 jamkové kultivační destičce

		GAPDH	CYP1A1	7	8	9	10	11	12
UT	A								
TCDD	B								
Rapamycin (1 ng/ml)	C								
Rapamycin (20 ng/ml)	D								
TCDD + Rapamycin (1 ng/ml)	E								
TCDD + Rapamycin (20 ng/ml)	F								
	G								
	H								

- 5) Výsledná data jsem zpracovala pomocí metody  $\Delta\Delta C_t$ , díky které jsem dostala srovnání úrovně exprese RNA jednotlivých vzorků. Dále jsem vypočítala hodnotu fold induction, která reprezentuje zvýšení exprese oproti negativní kontrole a poté ji použila k vytvoření grafu.

## **7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD) na detekci katalytické aktivity CYP1A1 v 96 jamkovém uspořádání**

- 1) Pro detekci katalytické aktivity CYP1A1 jsem použila buňky vyseté na 96 jamkovou destičku s aplikovanými testovanými látkami, které byly inkubovány 48 hodin (viz Schéma 2).
- 2) Odstranila jsem médium, buněčnou kulturu jsem promyla chladným 1x PBS, které jsem také odstranila a do všech jamek jsem aplikovala nové médium s ethoxyresorufinem a dikumarolem (viz Tab. 6).

Tab. 6: Složení média pro detekci katalytické aktivity CYP1A1 pro 96 jamkovou destičku

<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
Médium (viz chemikálie a použité roztoky)	10 ml
Ethoxyresorufin 2 mM (zásobní roztok 2 mM v DMSO)	40 $\mu$ l
Dikumarol (zásobní roztok 10 mM v 0,1 M NaOH)	10 $\mu$ l

- 3) Po nanesení nového média s požadovanými látkami jsem vložila destičku do inkubátoru na 30 minut.
- 4) Po uplynutí doby jsem přenesla 75  $\mu$ l obsahu všech jamek do černé fluorescenční desky a poté jsem přidala 125  $\mu$ l methanolu do každé jamky.
- 5) Změřila jsem fluorescenci (excitace 530 nm, emise 590 nm).

### **Izolace proteinů**

- 1) Pro izolaci proteinů jsem použila buňky vyseté na 6 jamkovou desku s testovanými látkami (viz Schéma č. 1), které byly inkubovány 48 hodin.
- 2) Odstranila jsem médium a buněčnou kulturu jsem omyla chladným 1x PBS a opět jsem ho odstranila.
- 3) Do každé jamky jsem přidala 1 ml chladného 1x PBS a buňky jsem z podkladu seškrábala a poté jsem obsah přenesla do 1,5ml mikrozkuavek.
- 4) Provedla jsem centrifugaci (13 000 RPM/3 min/4 °C).
- 5) Odstranila jsem pelet a mikrozkuavky s peletem jsem uchovávala na ledu.
- 6) Přidala jsem 200  $\mu$ l lyzačního pufru a opakovaným propipetováním jsem roztok promíchala. Vzorky jsem promíchala vortexem při nízkých otáčkách.
- 7) Provedla jsem centrifugaci (13 000 RPM/13 min/4 °C).
- 8) Supernatant jsem přepipetovala do nových 1,5 ml mikrozkuavek.

### **Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové a příprava vzorků pro SDS-PAGE**

- 1) Ze supernatantu (viz bod 8 izolace proteinů) jsem odebrala 5  $\mu$ l do 1ml mikrozkuavky a přidala jsem 20  $\mu$ l vody. Směs jsem promíchala na vortexu.



- 2) Vzorky, vodu a bovinní sérový albumin o koncentracích 0,25 µg/µl a 0,5 µg/µl jsem napipetovala do sterilní 96 jamkové desky a poté jsem přidala do každé jamky 200 µl Bradfordové činidla.
- 3) Změřila jsem absorbanci (586 nm).
- 4) Výsledná data jsem vyhodnotila a použila pro přípravu vzorků SDS-PAGE. Vzorke jsem naředila vodou na výsledný objem 15 µl a poté jsem ke směsi přidala 15 µl 2x loading pufru.
- 5) Vzorke jsem umístila do termobloku (5 min/95 °C).

### **Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)**

- 1) Připravila jsem si polyakrylamidový gel smícháním potřebných reagensů (viz Tab. 7). TEMED a APS jsem přidala nakonec. Nejprve jsem si připravila dělicí gel, který jsem nalila mezi připravená skla pro elektroforézu.
- 2) Tuto vrstvu gelu jsem převrstvila 200 µl izopropanolu, tím jsem vyhladila nerovnosti na gelu.
- 3) Po ztuhnutí dělicího gelu jsem připravila zaostřovací gel, kterým jsem jej převrstvila.
- 4) Ihned jsem vložila hřebínek, který vytvořil jamky.
- 5) Připravené gely jsem přenesla do elektroforetické aparatury a zalila migračním pufrům.
- 6) Do první jamky jsem aplikovala 3 µl markeru molekulové hmotnosti a poté 29 µl každého připraveného vzorku.
- 7) Elektroforetickou aparaturu jsem připojila ke zdroji elektrického napětí. Pro zakoncentrování proteinů jsem nastavila proud 15 mA/gel a poté jsem zvýšila proud na 30 mA/gel. Separace probíhala asi 1 hodinu.

Tab. 7: Reagencie pro přípravu dvou 1mm gelů na SDS-PAGE

<b>Reagencie</b>	<b>Dělicí gel (10%)</b>	<b>Zaostřovací gel (4%)</b>
4x dělicí pufr	2 ml	-
4x zaostřovací pufr	-	0,75 ml
40% Akrylamid/bis-akrylamid	2 ml	0,3 ml
dH <sub>2</sub> O	3,9 ml	1,92 ml
10% SDS	80 µl	30 µl
10% APS	80 µl	15 µl
TEMED	8 µl	1,5 µl

### **Western blotting a vizualizace proteinů fixovaných na membráně**

- 1) Polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu jsem hydratovala v methanolu a poté 10 minut v dH<sub>2</sub>O na třepače.

- 2) Po ukončení elektroforézy jsem vyjmula gel, ze kterého jsem odřízla zaostřovací gel a zbylý dělicí gel jsem umístila do vaničky s blotovacím pufrem.
- 3) Filtrační papíry jsem namočila do blotovacího pufru.
- 4) Na spodní elektrodu (anodu) blotovací aparatury jsem skládala tzv. sendvič. Nejprve dva filtrační papíry, poté membránu, gel a nahoru dva filtrační papíry.
- 5) Vše jsem přiklopila druhou elektrodou (katodou) a připojila ke zdroji. Nastavila jsem proud 350 mA. Blotting probíhal asi 1,5 hodiny.
- 6) Po uplynutí této doby jsem membránu promyla v dH<sub>2</sub>O a poté ji obarvila 5 minut v Ponceau S Rouge.
- 7) Membránu jsem poté několikrát promyla v dH<sub>2</sub>O a nechala na filtračním papíře vyschnout.

### Imunodetekce

- 1) Z membrány jsem odřízla oblast odpovídající proteinům o molekulové hmotnosti v rozmezí 35-72 kDa .
- 1) Vyříznutý kus PVDF membrány jsem hydratovala v methanolu a poté promyla v dH<sub>2</sub>O .
- 2) Membránu jsem promyla v 1x TBS/Tween na třepačce.
- 3) Připravila jsem si 5% roztok BSA a 5% roztok sušeného mléka v 1x TBS/Tween.
- 4) Poté jsem membránu blokovala 10 ml 5% roztoku sušeného mléka v 1x TBS/Tween.
- 5) K 5% roztoku BSA v 1x TBS/Tween jsem napipetovala primární protilátku proti CYP1A1 (ředící poměr viz Tab. 8) a tento roztok jsem nalila k membráně a nechala na třepačce 1 hodinu.
- 6) Po uplynutí doby jsem membránu promyla 3x 5 minut v 1x TBS/Tween.
- 7) Připravila jsem si 2,5% roztok sušeného mléka, ke kterému jsem napipetovala sekundární protilátku a tento roztok jsem nalila k membráně na třepačce.
- 8) Po 1 hodině jsem membránu promyla 3x 5 minut v 1x TBS/Tween.
- 9) Membránu jsem inkubovala 5 minut s detekčním substrátem luminol, který jsem připravila smícháním roztoků A a B v poměru 1:1.
- 10) Poté jsem substrát odstranila a membránu detekovala na vyvolávacím automatu a C-Digit Blot Scanneru.
- 11) Pro ověření správnosti pipetování jsem postup zopakovala i pro detekci aktinu (ředící poměr viz Tab. 8).

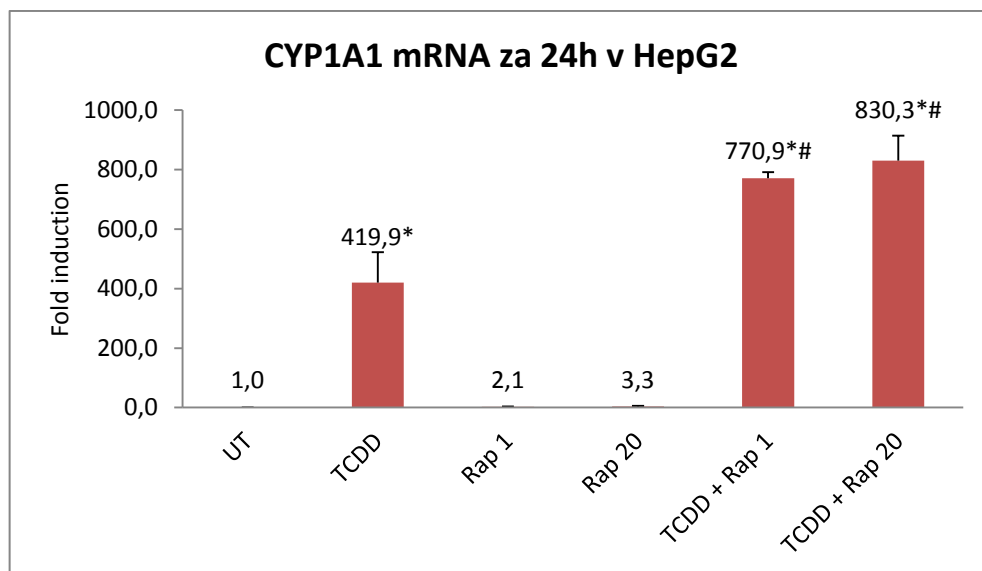
Tab. 8: Ředící poměry protilátek pro imunodetekci CYP1A1 a aktinu

Detekované proteiny	Ředící poměr	
	Primární protilátka	Sekundární protilátka
CYP1A1	1:500	1:6000
Aktin	1:500	1:5000

## 9. Výsledky

V buněčné linii HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu byl testován vliv rapamycinu, inhibitoru mTOR signální dráhy, na indukovatelnou expresi mRNA genu CYP1A1. Buňky byly inkubovány s rapamycinem o koncentraci 1 a 20 ng/ml a 5 nM TCDD, ligandem Ah receptoru. Detekce byla provedena pomocí metod Real-time PCR, Western blotting a ethoxyresorufin-O-deethylasové aktivity. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO. Buňky byly inkubovány se sledovanými látkami 24 hodin pro metodu Real-time PCR a na 48 hodin pro fluorimetrickou detekci katalytické aktivity s následnou SDS-PAGE.

Výsledky exprese CYP1A1 mRNA i katalytické aktivity uvádím jako průměr tří nezávislých experimentů.

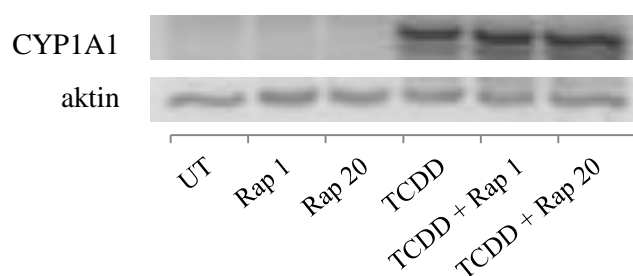


Graf 1: Vliv rapamycinu na expresi CYP1A1 mRNA v buněčné linii HepG2.

Buněčná linie byla inkubována 24 hodin s rapamycinem o koncentraci 1 a 20 ng/ml (Rap 1, Rap 20), s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM) a s rapamycinem v obou koncentracích v kombinaci s TCDD (TCDD + Rap 1, TCDD + Rap 20). Data v grafu jsou normalizována na expresi GAPDH a jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Hodnoty označené [\*] jsou statisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti UT. Hodnoty označené [#] jsou statisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti TCDD.

Graf 1 znázorňuje účinek samotného rapamycinu a rapamycinu v kombinaci s induktorem TCDD na buněčnou odpověď AhR. Samotný rapamycin v obou koncentracích téměř neindukuje CYP1A1 mRNA, v porovnání s TCDD jsou to zanedbatelné hodnoty. Ovšem v kombinaci rapamycinu s TCDD dochází k výrazné indukci genové exprese a to v závislosti na rostoucí koncentraci rapamycinu ve srovnání s pozitivní kontrolou, TCDD. Nárůst oproti samotnému TCDD je téměř dvojnásobný.

Množství exprimovaných proteinů jsem si ověřila pomocí imunodetekce CYP1A1 (viz Obr. 4), pro verifikaci jsem provedla i detekci aktinu. Uvádím reprezentativní výsledek ze dvou detekcí. Výsledky jsem kvantifikovala a předkládám je jako průměr ze dvou měření (viz Tab. 8).



Obr. 4: Vliv rapamycinu na expresi proteinů CYP1A1 v buněčné linii HepG2. Buněčná linie byla inkubována 48 hodin s rapamycinem o koncentraci 1 a 20 ng/ml (Rap 1, Rap 20), s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM) a s rapamycinem v obou koncentracích v kombinaci s TCDD (TCDD + Rap 1, TCDD + Rap 20).

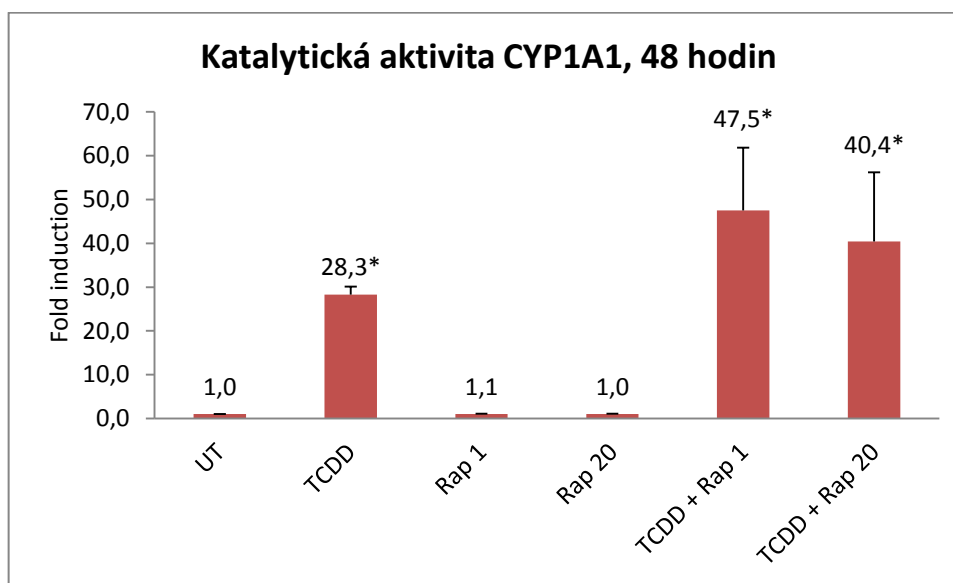
Tab. 8: Kvantifikace výsledků Western blotu

Chemikálie	CYP1A1 Fold induction	Procentuální navýšení oproti TCDD
UT	1,0	.
Rap 1	0,7	-
Rap 20	0,9	-
TCDD	69,4	0,0
TCDD + Rap 1	79,7	14,8
TCDD + Rap 20	83,5	20,3

Buněčná linie byla inkubována 48 hodin s rapamycinem o koncentraci 1 a 20 ng/ml (Rap 1, Rap 20), s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5nM) a s rapamycinem v obou koncentracích v kombinaci s TCDD (TCDD + Rap 1, TCDD + Rap 20). Data v grafu jsou normalizována na aktin a jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Výsledky byly pořízeny C-Digit Blot Scannerem.

Na Obrázku 4 je patrný vliv rapamycinu na úroveň exprimovaných proteinů CYP1A1. Výsledek potvrzuje korelaci s mRNA detekovanou metodou RT-PCR. Zvýšená hladina byla detekovaná u obou koncentrací rapamycinu v kombinaci s TCDD, kdy došlo k nárůstu indukce CYP1A1 o 15 – 20%.

Dále jsem provedla detekci katalytické aktivity CYP1A1 metodou EROD. Výsledky uvádím jako průměr ze tří nezávislých experimentů (viz Graf 2).



Graf 2: Vliv rapamycinu na katalytickou aktivitu CYP1A1 v buněčné kultuře HepG2. Buněčná linie byla inkubována 48 hodin s rapamycinem o koncentraci 1 a 20 ng/ml (Rap 1, Rap 20), s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 5nM 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD) a s rapamycinem v obou koncentracích v kombinaci s TCDD (TCDD + Rap 1, TCDD + Rap 20). Data v grafu jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Hodnoty označené [\*] jsou statisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti UT.

Z Grafu 2 je patrné, že samotný rapamycin není induktorem katalytické aktivity, naopak TCDD ji výrazně indukoval. V kombinaci rapamycinu s TCDD došlo ještě k výraznějšímu vzrůstu katalytické aktivity CYP1A1, nejvyšší hodnotu vykazoval rapamycin o koncentraci 1 ng/ml s TCDD. Naopak u rapamycinu v koncentraci 20 ng/ml s TCDD je patrný mírný pokles hladiny katalytické aktivity, která je však stále větší než u TCDD.

## 10. Diskuze

V bakalářské práci byl sledován vliv rapamycinu, inhibitoru mTOR signalizační dráhy, na indukci biotransformačního enzymu CYP1A1 regulovaného aryl uhlovodíkovým receptorem (AhR). Pro tyto účely byla využita buněčná linie HepG2 odvozená od hepatocelulárního karcinomu. Účinek rapamycinu byl zkoumán ve dvou koncentracích – 1 ng/ml a 20 ng/ml. Jako induktor exprese CYP1A1 a pozitivní kontrola byl použit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

V mém experimentu samotný rapamycin nevykazoval účinek na hladinu CYP1A1 mRNA ani na katalytickou aktivitu enzymu. Ovšem v jeho kombinaci s TCDD došlo k výraznému vzestupu hladiny mRNA a to o 20 až 70% v závislosti na koncentraci rapamycinu. Výsledky byly potvrzeny detekcí exprese proteinů CYP1A1, kdy je patrná korelace s výsledky detekce CYP1A1 mRNA. Indukce CYP1A1 proteinu narostla o 15 – 20%. Rapamycin v obou koncentracích v kombinaci s TCDD zvyšoval katalytickou aktivitu enzymu CYP1A1, nicméně v koncentraci 1 ng/ml došlo k jejímu nejvyššímu nárůstu. Významný byl mírný pokles katalytické aktivity u rapamycinu o koncentraci 20 ng/ml s TCDD.

Fosforylace reguluje aktivitu AhR, ovlivňuje vazbu heterodimeru AhR/ARNT do DNA či jeho translokaci do jádra. Serin/threoninová kináza katalyzuje fosforylaci, která má vliv právě na regulaci funkce AhR (Puga *et al.*, 2002). Mezi popsané klíčové regulátory AhR patří například mitogeny aktivované protein kinázy (MAPKs), které fosforylují důležité transkripční faktory přímo nebo pomocí MAP kinázové signální dráhy (Henklová *et al.*, 2008). Dalším regulátorem AhR je protein kináza C. Její down regulace způsobí pokles aktivity dimeru AhR/ARNT a sníží akumulaci receptoru v jádře (Li *et Dougherty*, 1997).

Inhibicí aktivity serin/threoninových fosfatáz (protein fosfatázy 1, protein fosfatázy 2A a protein fosfatázy 2B) dochází ke zvýšení genové exprese řízené pomocí AhR. Ke zkoumání účinku inhibitorů fosfatázy (calyculin A, kyselina okadaiová a cyklosporin A) na transkripci genů byly použity myší jaterní buňky Hepa-1. Tyto inhibitory zvyšovaly transkripci genů v přítomnosti TCDD, naopak při jeho absenci na ni neměly žádný vliv. Získané výsledky naznačují možný vliv serin/threoninové kinázy na schopnost dimeru AhR/ARNT stimulovat transkripci (Li *et Dougherty*, 1997). Díky zjištěným informacím lze usuzovat, že fosforylace má vliv na rychlost transformace AhR do aktivní formy, a tím i na rychlost jeho přemístění do jádra.

V současné době je upřena pozornost také na inhibitory serin/threoninové kinázy mTOR, které mohou být inovací v léčbě rakoviny. Existují důkazy o schopnosti rapamycinu zvýšit citlivost buněk k apoptóze inhibicí mTOR. Tento vliv byl například sledován na buněčné linii T-lymfocytů CEM-C1 a CEM-C7 regulované přes indukovaný GR dexametazonem. Kombinace dexametazonu a rapamycinu se projevila inhibicí růstu buněk, zastavením buněčného cyklu v G1 fázi a apoptózou (Guo *et al.*, 2013). Léčba rapamycinem má také pozitivní účinek na supresi rakovinného bujení buněk plic. Cigaretový kouř je zdrojem prokarcinogenu benzo[a]pyrenu, ligandu AhR, který představuje zvýšené riziko rozvoje rakoviny plic pro aktivní i pasivní kuřáky (Yan *et al.*, 2006, Pal *et al.* 2008). Výzkum byl veden na myších, kterým byl samostatně podáván benzo[a]pyren a následně rapamycin. Terapie způsobila inhibici progresu nádoru o 84% (Pal *et al.* 2008).

Podobné účinky posttranslační modifikace jako u AhR byly pozorovány i u GR. Předmětem výzkumu byl vliv rapamycinu na MAPKs, především c-Jun N-terminální kinázy (JNK). K tomuto experimentu byla použita buněčná linie CEM. Bylo zjištěno, že rapamycin snižuje aktivitu fosforylované JNK (Miller *et al.*, 2007), což má za následek nižší fosforylaci GR na Ser246 (Rogatsky *et al.*, 1998), a tím pádem vyšší aktivitu GR. Nádorová linie tak byla citlivější k apoptóze po stimulaci kortikoidy.

Výsledky naznačují, že mTOR kináza významně ovlivňuje signalizaci AhR v přítomnosti jeho ligandů.

## 11. Závěr

V bakalářské práci jsem se zaměřila na detekci vlivu inhibitoru mTOR na bazální a indukovatelnou expresi genu CYP1A1 na úrovni mRNA, proteinu a katalytické aktivity enzymu v hepatomové buněčné linii HepG2.

V teoretické části jsem popsala biotransformaci a regulaci exprese enzymů metabolizujících xenobiotika. Podrobněji jsem se zaměřila na biotransformační enzym CYP1A1 jehož exprese je regulována AhR, ligandy aktivovaným transkripčním faktorem. Závěrem jsem se věnovala kináze mTOR, jejím funkcím a možnostem její deregulace.

V experimentální části jsem sledovala vliv rapamycinu na expresi CYP1A1 v buněčné linii odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Jako aktivátor AhR jsem použila TCDD. Zjišťovala jsem hladinu mRNA a katalytickou aktivitu CYP1A1, množství exprimovaných proteinů jsem ověřila pomocí SDS-PAGE. Expresi genu jsem detekovala metodou Real-time PCR, která ukázala statisticky významnou indukci hladiny mRNA CYP1A1 při kombinaci rapamycinu s TCDD po 24 hodinách. Nejvyšší indukce byla zaznamenána u buněk ošetřených rapamycinem o koncentraci 20 ng/ml s TCDD. Detekce exprese proteinů ukázala indukci CYP1A1 o 15 – 20 % vyšší v kombinaci rapamycinu s TCDD než se samotným TCDD. Samotný rapamycin není induktorem mRNA CYP1A1 ani katalytické aktivity enzymu. Hladina katalytické aktivity byla významně statisticky zvýšena v kombinaci rapamycinu s TCDD, nejvíce rapamycinem o koncentraci 1 ng/ml. Mírný pokles katalytické aktivity byl zaznamenán u rapamycinu o koncentraci 20 ng/ml s TCDD.

Tato práce ukázala, že látka používaná k inhibici serin/threoninové kinázy mTOR potencuje účinek aktivace AhR ligandem dioxinem. Nicméně, přesný molekulární mechanismus vlivu mTOR na signalizaci AhR může být předmětem dalšího výzkumu.



## 12. Literatura

Annalora, A. J., Goodin, D. B., Hong, W. - X., Zhang, Q., Johnson, E. F., Stout, C. D. (2010): Crystal Structure of CYP24A1, a Mitochondrial Cytochrome P450 Involved in Vitamin D Metabolism. *J Mol Biol.* 396: 441 - 451.

Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 58: 737 - 747.

Chiang, G. G., Abraham, R. T. (2007): Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med.* 13: 433 - 442.

Croom, E. (2012): Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 112: 31 - 88.

Dazert, E., Hall, M. N. (2011): mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol.* 23: 744 - 755.

Dostálek, M., Janoščíková, E., Juřica, J., Zahradníková, L. (2006): *Farmakokinetika*. Grada Publishing. Praha. ISBN: 80-247-1464-7.

Fukasawa, T., Suzuki, A., Otani, K. (2007): Effects of Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 Enzymes on the Pharmacokinetics of Benzodiazepines. *J Clin Pharm Ther.* 32: 333 - 341.

Gao, J., Xie, W. (2010): Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metab Dispos.* 38: 2091 - 2095.

Girman, P., Saudek, F. (2002): Sirolimusum (Rapamycyn, Lékové profily). *Remedia.* 12: 290 - 299.

Glatt, H. R. (2001): Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 129: 141 - 170.

Glue, P., Clement, R. P. (1999): Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism-basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol* 19: 309 - 323.

Gordon Gibson, G., Skett, P., (2001): *Introduction to drug metabolism* 3rd edition. Nelson Thornes Publishers. Cheltenham. ISBN 0 7487 6011 3.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., Bradfield, C. A. (2000): The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40: 519 - 61.

Guengerich, F. P. (2003): Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Mol Interv.* 3: 194 - 204.

- Guo, X., Zhou, C. Y., Li, Q., Gao, J., Zhy, Y. P., Gu, L., Ma, Z. G. (2013): Rapamycin sensitizes glucocorticoid resistant acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells to dexamethasone induced apoptosis through both mTOR suppression and up-regulation and activation of glucocorticoid receptor. *Biomed Environ Sci.* 26: 371 - 381.
- Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., Terracciano, L., Heim, M. H., Rüegg, M. A., and Hall, M. N. (2012): Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell. Metab.* 15: 725 - 733.
- Hankinson, O. (2005): Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 433: 379 - 386.
- Harper, P. A., Riddick, D. S., Okey, A. B. (2006): Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol.* 72: 267 - 279.
- Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991): Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253: 905 - 909.
- Henklová, P., Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2008): Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact.* 172: 93 -104.
- Hidalgo M., Rowinsky E. K. (2000): The Rapamycin-Sensitive Signal Transduction Pathway as a Target for Cancer Therapy. *Oncogene.* 19: 6680 - 6686.
- Hussein, A. G., Pasha, H. F., El-Shahat, H. M., Gad, D. M., Toam, M. M. (2014): CYP1A1 gene polymorphisms and smoking status as modifier factors for lung cancer risk. *Gene.* 542: 26 - 30.
- Ingleman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 116: 496 - 526.
- Isin, E. M., Guengerich, F. P. (2007): Complex reactions catalyzed by cytochrom P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1770: 314 - 329.
- Jancova, P., Azenbacher, P., Azenbacherova, E. (2010): Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 154: 103 - 116.
- Konno, Y., Negishi, M., Kodama, S. (2008): The Roles of Nuclear Receptors CAR and PXR in Hepatic Energy Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23: 8 - 13.
- Krejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. listy.* 94: 913 - 918.

- Laplane, M., Sabatini, D. M. (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149: 274 - 293.
- Li, S. Y., Dougherty J. J. (1997): Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys*. 340: 73 - 82.
- Ma, Q., Lu, A. Y. H. (2007): Perspective CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Envolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metab Dispos*. 35: 1009 - 1016.
- Mani, S., Dou, W., Redinbo, M. R. (2013): PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab Rev*. 45: 60 - 72.
- Marlowe, J. L., Puga, A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem*. 96: 1174 - 1184.
- McMaster, A., Ray, D. W. (2007): Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agens with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol*. 92: 299 - 309.
- Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. (2003): Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*. 1619: 263 - 268.
- Miller, A. L., Garza, A. S., Johnson, B. H., Thompson, E. B. (2007): Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int*. 7: 3.
- Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T. (2006): Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*. 21: 437 - 457.
- Nascimento, E. B., Snel, M., Guigas, B., van der Zon, G. C., Kriek, J., Maassen, J. A., Jazet, I. M., Diamant, M., Ouwens, D. M. (2010): Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell Signal*. 22: 961 - 967.
- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., Gonzalez, F. J. (2004): Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*. 279: 23847 - 23850.
- Pal, S. K., Figlin, R. A., Reckamp, K. L. (2008): The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 9: 340 - 345.
- Pascussi, J. M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P., Vilarem, M. J. (2001): Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human

hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem.* 268: 6346 - 6358.

Pávek, P., Dvořák, Z. (2008): Xenobiotic-induced transcriptional of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* 9: 129 - 143.

Puga, A., Xia, Y., Elferink, C. (2002): Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 181-182: 171 - 177.

Rogatsky, I., Logan, S. K., Garabedian, M. J. (1998): Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 2050 - 2055.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14: 1296 - 1302.

Schinkel, A. H., Jonker, J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55: 3 - 29.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Down, C. A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1 - 16.

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

Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V. (2011): *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Karolinum. Praha. ISBN-13: 978-80-246-1917-0.

Spector, A. A., Kim, H. Y. (2015): Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1851: 335 - 336.

Tekpli, X., Zienolddiny, S., Skaug, V., Stangeland, L., Haugen, A., Mollerup, S. (2012): DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer.* 131: 1509 - 1516.

Thomas, G., and Hall, M. N. (1997): TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin. Cell Biol.* 9: 782 - 7.

Tirona, R. G., Kim, R. B. (2002): Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev.* 54: 1343 - 1352.

Viklický, O., Janoušek, L., Baláž, P. (2008): *Transplantace ledvin v klinické praxi.* Grada Publishing. Praha. ISBN: 978-80-247-2455-3.

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: 3 - 10.

Walsh, A. A., Szklarz, G. D., Scott, E. E. (2013): Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility In Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *J Biol Chem.* 288: 12932 - 12943.

Wei, C., Caccavale, R. J., Weyand, E. H., Chen, S., Iba, M. M. (2002): Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer Lett.* 178: 25 - 36.

Xu, C., Li, C. Y., Kong, A. N. (2005): Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 28: 249 - 268.

Yan, Y., Wang, Y., Tan, Q., Hara, Y., Yun, T. K., Lubert, R. A., Xou, M. (2006): Efficacy of polyphenon E, red ginseng, and rapamycin on benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia.* 8: 52 - 58.

Zuber, R., Anzenbacherová, E., Anzenbachert, P. (2002): Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 6: 189 - 198.

### 13. Seznam použitých zkratek a symbolů

3-MC	3-methylchloranthren
4EBP1	elongation factor 4E binding protein 1
A	adenin
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
Akt	protein kinase B
APS	persíran amonný
ARNT	AhR nukleární translokátor
ATP	adenosintrifosfát
bHLH	basic helix-loop-helix transkripční faktor
BSA	bovinní sérový albumin
C	cytosin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CARRE	CAR regulační oblast
CCRP	cytoplasmic CAR retention protein
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
COMT	katechol O-methyltransferasy
CYP	cytochrom P450
deptor	DEP domain containing mTOR-interacting protein
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DRE	dioxinový responzivní element
EROD	7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita
FAT	FAT-carboxy terminal doména
FATC	FRAP-ATM-TTRAP doména
FKBP12	intracellular 12-kDa FK506-binding protein
FRB	FKBP12-rapamycin binding doména
G	guanin
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutathion-S-transferasy
HAA	heterocyklické aromatické aminy a amidy
HEAT	Huntingtin-Elongation factor 3-regulatory subunit A of PP2A- <i>TOR1</i> repeats
HepG2	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
Hsp56	56 kDa heat-shock protein
Hsp70	70 kDa heat-shock protein
Hsp90	90 kDa heat-shock protein
Ile	izoleucin
MAPKs	mitogeny aktivované protein kinázy
mLST8	mammalian lethal with sec-13 protein 8
M-MuLV	reverzní transkriptáza
mSin1	proline-rich Akt substrate 40 kDa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mTOR	savčí rapamycinový cíl, serin/threoninová kináza

NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukována forma
NAT	N-acetyltransferasy
OATP	organické anionty přenášejí polypeptidy
OCT	organický kationtový přenašeč
p23	ko-chaperon pro Hsp90, prostaglandin E syntasa 3
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-Sim doména
PKC	protein kináza C theta
pras40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
protor 1/2	protein observed with rictor 1 and 2
PVDF	polyvinylidendifluorid
PXR	pregnanový X receptor
Rap	rapamycin
raptor	regulatory-associated protein of mTOR
rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
S6K1	ribosomal protein S6 kinase-1
SDS	dodecylsírán sodný
Ser246	serin 246
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu, rychlost rotoru centrifugy
RXR $\alpha$	receptor pro kyselinu cis-retinovou alpha
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
SULT	sulfottransferasy
T	thymin
TBS	Tris pufr
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamin
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TPMT	thiopurin S-methyltransferasy
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UGT	UDP-glukoronyltransferasy
UT	negativní kontrola (untreated)
Val	valin
VDR	receptor pro vitamín D
XAP2	aryl hydrocarbon receptor interacting protein
XRE	xenobiotický responzivní element