

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Veronika Kollárová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genotoxické poškodenie pľúcnych buniek
dlhodobými nízkymi dávkami skatolu**

Bakalářská práce

Veronika Kollárová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika KOLLÁROVÁ**
Osobní číslo: **R20703**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Genotoxické poškození plicních buniek dlhodobými nízkými dávkami skatolu**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení markerů genotoxického poškození metodou western blotting ve vybrané plicní linii
- 3) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Zhang et al: Cytochrome P450 2A13 mediates the neoplastic transformation of human bronchial epithelial cells at a low concentration of aflatoxin B1, International journal of cancer, 2014
- 2) Weems JM et al: Potent Mutagenicity of 3-Methylindole Requires Pulmonary Cytochrome P450-Mediated Bioactivation: A Comparison to the Prototype Cigarette Smoke Mutagens B(a)P and NNK, Chemical Research in Toxicology, 2010
- 3) Weems JM et al: 3-Methylindole is Mutagenic and a Possible Pulmonary Carcinogen, Toxicological Science, 2009
- 4) Regal et al: Detection and Characterization of DNA Adducts of 3-Methylindole, Chemical Research in Toxicology, 2010
- 5) Nichols WK et al: 3-Methylindole-Induced Toxicity to Human Bronchial Epithelial Cell Lines. Toxicological Sciences, 2003

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 30. září 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 6. října 2021

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Meno a priezvisko	Veronika Kollárová
Názov práce	Genotoxické poškodenie pľúcnych buniek dlhodobými nízkymi dávkami skatolu
Typ práce	Bakalárska práca
Pracovisko	Katedra bunkovej biológie a genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedúci práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Táto bakalárska práca sa zaoberá možným genotoxickým poškodením pľúcnych buniek po ich chronickom vystavení skatolu. V experimentálnej časti boli bunky A549 najskôr dlhodobo vystavované nízkym koncentráciám skatolu, pričom miera ich poškodenia bola sledovaná v indukcii proteínu p53. Proteín bol taktiež detekovaný u buniek vystavených TCDD a dexametasonu (DEX) v kombinácii so skatolom. U takto preinkubovaných buniek boli detekované i biotransformačné enzýmy CYP1A1 a CYP2A6. Výsledky získané Western blot metódou nepotvrdili genotoxický účinok skatolu na bunky A549.
Kľúčové slová	p53, skatol, AhR, CYP1A1, GR, CYP2A6
Počet strán	44
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Veronika Kollárová
Title	Genotoxic damage of lung cells with low doses of skatole in long-term
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the possible genotoxic damage to lung cells after their chronic exposure to skatole. In the experimental part, A549 cells were first exposed to low concentrations of skatole for a prolonged period of time, and the extent of their damage was monitored by the induction of p53 protein. The protein was also detected in cells exposed to TCDD and dexamethasone (DEX) in combination with skatole. The biotransformation enzymes CYP1A1 and CYP2A6 were also detected in preincubated cells. The results obtained by Western blot did not confirm a genotoxic effect of skatole on A549 cells.</p>
Keywords	p53, skatole, AhR, CYP1A1, GR, CYP2A6
Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. s označením všetkých použitých literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa:

.....
Veronika Kollárová

Pod'akovanie

Veľmi rada by som poďakovala môjmu vedúcemu práce, pánovi doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D., za jeho odborné vedenie, trpezlivosť, ochotný prístup a čas. Veľká vďaka patrí i celému kolektívu Laboratória molekulárnej farmakológie a toxikológie, najmä Mgr. Eliške Zgarbovej za užitočné rady a ochotu pomôcť. Pod'akovanie patrí i mojej rodine a priateľom, ktorí mi boli po celú dobu štúdia veľkou oporou.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1 Pľúca	3
3.1.1 Alveolárne bunky typu I.....	4
3.1.2 Alveolárne bunky typu II	4
3.1.3 Alveolárne makrofágy	5
3.1.4 Rakovina pľúc	5
3.2 3-Methylindol.....	6
3.2.1 Syntéza 3MI	6
3.2.2 Pôsobenie 3MI.....	8
3.3 Proteín p53	9
3.3.1 Štruktúra p53	9
3.3.2 Fyziologická funkcia p53	10
3.4 Aryl uhľovodíkový receptor.....	11
3.4.1 Štruktúra AhR.....	12
3.4.2 Signálna dráha AhR.....	12
3.4.3 Cytochróm P450.....	13
3.4.3.1 CYP1A1	13
3.4.3.2 CYP2A6	14
3.5 Glukokortikoidný receptor	14
3.5.1 Štruktúra GR.....	15
3.5.2 Signálna dráha GR.....	15
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	16
4.1 Materiál	16
4.1.1 Biologický materiál	16
4.1.2 Použitý materiál.....	16
4.1.3 Chemikálie.....	17
4.1.4 Prístroje	19
4.1.5 Počítačové programy	19
4.2 Metodika práce	20
4.2.1 Pasážovanie buniek	20
4.2.2 Mrazenie vzoriek pre Western blot	20
4.2.3 Počítanie a vysádzanie buniek na kultivačnú doštičku pre pozitívnu a negatívnu kontrolu. 21	
4.2.4. Počítanie a vysádzanie buniek na kultivačnú doštičku pre stanovenie aktivity AhR a GR. 21	
4.2.5 Inkubácia buniek s testovanými látkami	21
4.2.6 Mrazenie vzoriek pre Western blot po inkubácii s testovanými látkami.....	22
4.2.7 Izolácia proteínov a stanovenie ich koncentrácie	22

4.2.8	Príprava vzoriek pre SDS-PAGE	23
4.2.9	SDS-PAGE.....	23
4.2.10	Prenos proteínov na PVDF membránu (Semi-Dry)	24
4.2.11	Detekcia proteínov	24
4.3	Výsledky.....	26
4.3.1	Detekcia genotoxického markeru poškodenia - p53.....	26
4.3.2	Stanovenie expresie CYP1A1 a CYP2A6 génov	30
5	DISKUSIA	32
6	ZÁVER	34
7	LITERATÚRA	35

Zoznam symbolov a skratiek

3MEIN	3-metylindolenin
3MI	3-metylindol
β -AR	β -adrenergny receptor
ABT	1-aminobenzotriazol
AF-1	oblasť aktivačnej funkcie 1
AF-2	oblasť aktivačnej funkcie 2
AhR	aryl uhl'ovodíkový receptor
AhRC	aryl uhl'ovodíkový receptorový komplex
Akt	proteín kináza B
APS	persíran amónny
AhR	aryl uhl'ovodíkový jadrový receptor
ATM	zmutovaná ataxia-telangiectasia proteín kináza
Bad	Bcl-2-asociovaný agonista bunečnej smrti
B[a]P	benzo[a]pyrén
Bcl-2	lymfóm B buniek
BEAS-2B	bronchiálne epitelové bunky
bHLH	basic helix-loop-helix
Bax	Bcl-2-asociovaný X proteín
Caco2	bunky ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
CDK	cyklín-dependentné kinázy
Chk2	kináza 2 kontrolného bodu
DBD	DNA-väzobná doména
DEX	dexametason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DTT	DL-Ditiotreitol
EGF	epidermálny rastový faktor
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktoru
FBS	fetálne bovinné sérum

FKBP51	FK506-väzobný proteín 51
FKBP52	FK506-väzobný proteín 52
GR	glukokortikoídny receptor
GRE	glukokortikoid-responzívny DNA element
GSH	glutathion
HAHs	halogénové aromatické uhľovodíky
HR	pántová oblasť
HSP70	70kDa proteín tepelného šoku
HSP90	90kDa proteín tepelného šoku
IAA	indol-3-octová kyselina
IAD	indolacetát dekarboxyláza
IPY	indol-3-pyrohroznová kyselina
LD50	letálna dávka u 50% jedincov
LBD	ligand-väzobná doména
MDM2	mouse double minute 2 homológ
NAD	nikotínamidadenindinukleotid
nAChR	nikotín acetylcholínový receptor
NF- κ B	jadrový faktor κ B
NHBE	normálne ľudské bronchiálne epitelové bunky
NTD	N-terminálna doména
PAHs	polycyklické aromatické uhľovodíky
PAS	PER-ARNT-SIM doména
PBS	fosfátový pufor
PVDF	polyvinylidéndifluorid
SDS	dodecylsírán sodný
Ser15	serín 15
Src	tyrosin kináza
TCDD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxín
XAP2	X-asociovaný proteín vírusu hepatitídy B
XRE	DNA element responzívny na xenobiotiká

Zoznam obrázkov a grafov

Obrázok č. 1: Metabolizmus tryptofanu za vzniku 3MI

Obrázok č. 2: Štruktúra p53

Obrázok č. 3: Aryl uhl'ovodíkový receptor

Obrázok č. 4: Ligandom-sprostredkovaná aktivácia AhR

Obrázok č. 5: Štruktúra glukokortikoidného receptora

Obrázok č. 6: Schéma 6 jamkových doštičiek po aplikácii testovaných látok v rámci jedného opakovania

Obrázok č. 7: Efekt 3MI o koncentráciách $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na expresiu proteínu p53 u bunečnej línie A549

Obrázok č. 8: Efekt 3MI o koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na expresiu proteínu p53 u bunečnej línie A549

Obrázok č. 9: Western blot detekcia p-p53 (Ser15)

Obrázok č. 10: Western blot detekcia proteínu p53 u buniek A549 inkubovaných s 3MI, TCDD a DEX

Obrázok č. 11: Western blot detekcia CYP1A1 a CYP2A6 u buniek A549 vystavených 3MI, TCDD a DEX

Graf č. 1: Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 po vystavení buniek A549 3MI o koncentráciách $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Graf č. 2: Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 po vystavení buniek A549 3MI o koncentráciách $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Graf č. 3: Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 u buniek A549 inkubovaných s TCDD, DEX a 3MI

Graf č. 4: Kvantifikácia expresie proteínu CYP1A1 u buniek A549 vystavených 3MI za pôsobenia TCDD

Graf č. 5: Kvantifikácia expresie proteínu CYP2A6 u buniek A549 vystavených 3MI za pôsobenia DEX

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Zloženie 10% deliaceho gélu s hrúbkou 1,5 mm

Tabuľka č. 2: Zloženie 4% zaostrovacieho gélu s hrúbkou 1,5 mm

Tabuľka č. 3: Riedenie jednotlivých protilátok

1 ÚVOD

Rakovina pľúc patrí medzi najrozšírenejšie formy rakoviny a je spôsobená genetickými zmenami DNA pľúcnych buniek. Jedným z dôvodov vzniku týchto zmien je i vdychovanie cigaretového dymu či iných škodlivých látok, ktoré obsahujú viaceré pneumotoxíny, ako napríklad benzo[a]pyren (B[a]P), nikotín či 3-metylnol (3MI). Tieto látky môžu byť následne aktivované enzýmami cytochrómu P450, čo vedie k tvorbe DNA aduktov a následne mutáciám tumor supresorových génov, medzi ktoré patrí i proteín p53. Práve mutácie génu kódujúceho tento proteín sú príčinou vzniku väčšiny rakovín u ľudí. K aktivácii pľúcnych karcinogénov dochádza napríklad prostredníctvom aryl uhl'ovodíkového receptora (AhR) alebo glukokortikoidného receptora (GR) ktorých aktivácia vedie k indukcii expresie biotransformačných enzýmov, vrátane enzýmov cytochrómu P450. Tie sú často zodpovedné za bioaktiváciu xenobiotík.

2 CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešeršu na téma bakalárskej práce

Vypracovanie bakalárskej práce a multimediálnej prezentácie k obhajobe bakalárskej práce

Experimentálna časť

Stanovenie markerov genotoxického poškodenia metódou western blotting vo vybranej pľúcnej
línií

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Pľúca

Pľúca sú párové orgány kužeľovitého tvaru, ktoré predstavujú základ dýchacieho systému, zabezpečujúceho výmenu kyslíka a oxidu uhličitého medzi vonkajším prostredím a krvou (Wagner, 2007). Systém je rozdelený na horné dýchacie cesty, ktoré sa skladajú z nosovej dutiny a nosohltanu, a dolné dýchacie cesty zložené z hrtanu, priedušnice, priedušiek a pľúc (Patwa *et* Shah, 2015). Pľúca sú lokalizované v hrudnej dutine po oboch stranách srdca. Od brušnej dutiny ich oddeľuje bránica. Obe pľúca sú pokryté tenkou blanou nazývanou popľúcnica. Tá postupne prechádza na vnútornú stranu hrudníka ako pohrudnica. Medzi popľúcnicou a pohrudnicou je malé množstvo tekutiny, ktorá pri dýchaní zabezpečuje správny pohyb pľúc voči okolitým štruktúram (Čihák, 2016, Hoffman, 2021). I keď ide o párový orgán, pravá a ľavá strana pľúc nie sú tvarovo a veľkosťou úplne symetrické. Ľavá strana pľúc je mierne dlhšia než pravá s výrazným otláčkom srdca na povrchu. Pravá strana pľúc má však o niečo väčšiu hmotnosť (Newman, 2021). Obe pľúca sa taktiež líšia počtom lalokov. Zatiaľ čo pravá strana pozostáva z troch, ľavá strana má len dva. Laloky sa ďalej delia na lalôčky, jednotlivé segmenty nazývané podľa príslušných vetiev priedušiek (bronchov), ktoré do nich vstupujú a ďalej sa v nich delia (Chaudhry, 2021). Najmenšie priedušky sa v pľúcach označujú ako priedušničky (bronchioli), ktoré sa v pľúcach stromovito rozvetvujú až do terminálnych vetiev, ktoré ventilujú jednotlivé pľúcne lalôčky (Čihák, 2016).

Ventilácia prebieha prostredníctvom dvoch a viac respiračných priedušničiek, vznikajúcich z terminálnych vetiev. Ich steny obsahujú výklenky nazývané pľúcne mechúriky, ktoré predstavujú základ pľúcnej respirácie. Sú miestom výmeny kyslíka a oxidu uhličitého medzi vonkajším prostredím a krvou. Majú vakovitý tvar s priemerom 200 μm a sú zodpovedné za špongiový vzhľad pľúc. Pľúca dospelého jedinca obsahujú okolo 400 miliónov mechúrikov s plochou približne 75 m^2 . Medzi jednotlivými mechúrikmi sú tenké septá, ktoré obsahujú elastické a retikulárne vlákna. Tie zabezpečujú správne rozťahovanie a spätné sťahovanie mechúrikov počas dýchania, bez ohrozenia vzniku pneumotoraxu (nahromadenie vzduchu v pleurálnej dutine). Septá sú pórovitého charakteru, ktorý prepája jednotlivé mechúriky a vyrovnáva v nich tlak vzduchu. Taktiež umožňujú vedľajší priebeh vzduchu v prípade, že dôjde k uzatvoreniu priedušničiek. Negatívom týchto pórov je však rýchlejšie prenikanie mikroorganizmov pri zápalových reakciách (Čihák, 2016; Mescher, 2018; Noppen *et* De Keukeleire, 2008). Epitel pľúcnych mechúrikov tvorí vrstva pneumocytov (alveolárnych buniek) typu I a II, ako aj makrofágy a lymfocyty.

Existuje významné množstvo chemikálií, ktoré selektívne poškodzujú pľúcne tkanivá cicavcov bez výrazného poškodenia ďalších orgánov. Selektívna pneumotoxicita týchto xenobiotík môže byť vysvetlená na základe spôsobu, akým sa dostali do tela organizmu. Toxické látky ako O₃, NO₂, H₂CO či akroleín, ktoré sa do tela dostávajú inhalovaním, môžu spôsobovať priame poškodenie už prvého tkaniva, s ktorým sa dostanú do kontaktu. Práve preto sa tento spôsob mechanizmu považuje za jednu z hlavných príčin poškodenia pľúc u ľudí. Iné zlúčeniny, ako napríklad paraquat, sa selektívne akumulujú v pľúcnych bunkách a ich pneumotoxicita je spôsobená práve vysokými koncentráciami v týchto bunkách. Medzi významné pneumotoxikanty patrí však i 3-metylnol, ktorý primárne poškodzuje pľúcne tkanivá po systematickej cirkulácii a v pľúcach sa neakumuluje (Yost, 1989).

3.1.1 Alveolárne bunky typu I

Tento typ pľúcnych buniek predstavuje veľké, vysoko diferencované ploché bunky bez schopnosti deliť sa. Pokrývajú väčšinu povrchu mechúrka ako veľmi tenká výstelka, pričom najväčšiu hrúbku majú v oblasti jadra, kde sa zhlukujú všetky organely. Práve fakt, že pokrývajú takmer celý povrch mechúrka je jedným z dôvodov, prečo sú náchylnejšie na poškodenie rôznymi faktormi (Čihák, 2016; Haschek *et al.*, 2002). Zdieľajú membránu s pľúcny kapilárnym endotelom, čím dochádza k vzniku vzduchovo-krvnej bariéry, ktorá je miestom výmeny plynov. Bunky sú tesne spojené dezmozómami, čo zabraňuje, aby sa do priestoru pľúcnych mechúrikov dostal tkanivový mok z pľúc (Brandt *et Mandiga*, 2022; Mescher, 2018). Dezmozómy sú medzibunkové spojenia, ktoré prostredníctvom spojenia s intermediárnymi filamentami cytoskeletu adhezívne spájajú bunky a dodávajú im mechanickú pevnosť (Garrod *et Chidgey*, 2008). Po naplnení mechúrku vzduchom, dochádza k prechodu kyslíka vzduchovo-krvnou bariérou do krvi. V krvi sa kyslík viaže na hemoglobín, ktorým je transportovaný do zvyšku tela. Po uvoľnení kyslíka je naviazaný oxid uhličitý, ktorý je krvou vracaný cez bariéru späť do mechúrka, kde je prostredníctvom vydychovania postupne vytláčaný dýchacími cestami von z tela (Terjung, 2011).

3.1.2 Alveolárne bunky typu II

Alveolárne bunky typu II sú malé kubické bunky s povrchovými mikroklkmi. Sú roztrúsené pomedzi alveolárne bunky typu I, s ktorými sú tesne prepojené dezmozómami. Ich cytoplazma obsahuje viaceré vakuoly s lamelárnymi telieskami, ktoré obsahujú rôzne lipidy, proteíny, fosfolipidy a iné. Tieto telieska sa vytvárajú kontinuálne a ich obsah sa vylieva na povrch bunky. Tým sa vytvára povrchový film pokrývajúci vnútro mechúrikov, ktorý znižuje

ich povrchové napätie a tým zabraňuje ich kolapsu. Taktiež uľahčuje výmenu kyslíka a oxidu uhličitého cez vzduchovo-krvnú bariéru. Na rozdiel od alveolárnych buniek typu I majú alveolárne bunky typu II schopnosť deliť sa (Brandt *et al.*, 2022; Čihák, 2016; Mescher, 2018). Poskytujú taktiež i antioxidačnú ochranu proti škodlivým oxidantom z ovzdušia, a to vylučovaním glutathionu (Cantin *et al.*, 1987). Medzi ďalšie schopnosti tohto typu buniek patria metabolizmus cudzorodých látok a obnova výstelky alveolárneho epitelu (Castranova *et al.*, 1988).

3.1.3 Alveolárne makrofágy

Alveolárne makrofágy sú bunky nachádzajúce sa vo vnútri pľúcnych mechúrikov, ako aj v septách, ktoré ich prepájajú. Ide o fagocyty nešpecifického imunitného systému, ktoré zbavujú mechúrikový priestor od alergických častíc, ako aj ďalších infekčných či toxických častíc. V tom im napomáha i množstvo cytokínov, chemokínov a metabolitov kyseliny arachidonovej, ktoré makrofágy vylučujú a iniciujú tak zápalové reakcie (Rubins, 2003).

3.1.4 Rakovina pľúc

Rakovina pľúc je jednou z najrozšírenejších foriem rakoviny na svete (Minna *et al.*, 2002). Je spôsobená niekoľkonásobnými genómovými zmenami pľúcnych buniek, ktoré môžu nastať ako dôsledok vdychovania karcinogénov z tabakového dymu či priemyslu (Sekido *et al.*, 2003). Medzi zmeny, ktoré výrazne prispievajú k transformácii zdravých buniek v rakovinové patria najmä metylácia DNA, modifikácia histónových a chromatinových proteínov a mikro-RNA. Všetky tieto procesy sa podieľajú na potláčaní tumor supresorových génov a zvyšovaní expresie onkogénov (Brambilla *et Gazdar*, 2009).

Medzi najčastejšie karcinogény, ktorým je človek vystavený patria napríklad benzo[a]pyren (B[a]P) a nitrozamíny, obsiahnuté v cigaretovom dyme. Enzýmy cytochrómu P450 sú schopné aktivovať tieto karcinogény, čo má za následok ich naviazanie na DNA a tvorbu aduktov. Chronická tvorba týchto aduktov môže viesť až k mutáciám tumor supresorových génov ako je p53 (MacKinnon *et al.*, 2010).

Ďalším faktorom prispievajúcim ku vzniku rakoviny je i nikotín, ktorý ma mimo iné i schopnosť inhibovať apoptózu indukovanú chemoterapeutickými látkami ako sú opioidy, cisplatina či UV žiarenie v bunkách rakoviny pľúc. Tento inhibičný účinok súvisí so schopnosťou nikotínu aktivovať a fosforylovať antiapoptotické proteíny Bcl-2 (lymfóm B buniek), indukovať komplexy NF- κ B (jadrový faktor κ B), aktivovať Akt (proteín kináza B) dráhu, ako aj na schopnosti inaktivovať proapoptotické proteíny Bax (Bcl-2-asociovaný

X proteín) a Bad (Bcl-2 asociovaný agonista bunečnej smrti) v rakovinových bunkách pľúc (Dasgupta *et al.*, 2006). V niektorých prípadoch môže dokonca zastávať i funkciu nádorového promotora v pľúcnych bunkách prostredníctvom nikotín acetylcholinového receptora (nAChR). Predpokladá sa, že nAChR je schopný funkčne sa prepojiť s β -AR (β -adrenergný receptor) a EGFR (receptor epidermálneho rastového faktora) a koexistovať s nimi na bunkách rakoviny pľúc a endoteliálnych a epiteliálnych bunkách dýchacích ciest. Po naviazaní nikotínu dochádza k aktivácii $\alpha 7$ nAChR, ktorý následne stimuluje sekréciu jedného rastového faktora, ako je EGF, ktoré aktivujú EGFR, tak aj adrenalínu a noradrenalínu, ktoré sa viažu na β -AR a aktivujú ho. Ten následne stimuluje EGF (epidermálny rastový faktor) sekréciu čím dochádza k zvýšenej transaktivácii EGFR. Všetky tieto komponenty prispievajú k rozvoju a progresii rakoviny pľúc (Schaal *et Chellappan*, 2014).

3.2 3-Methylindol

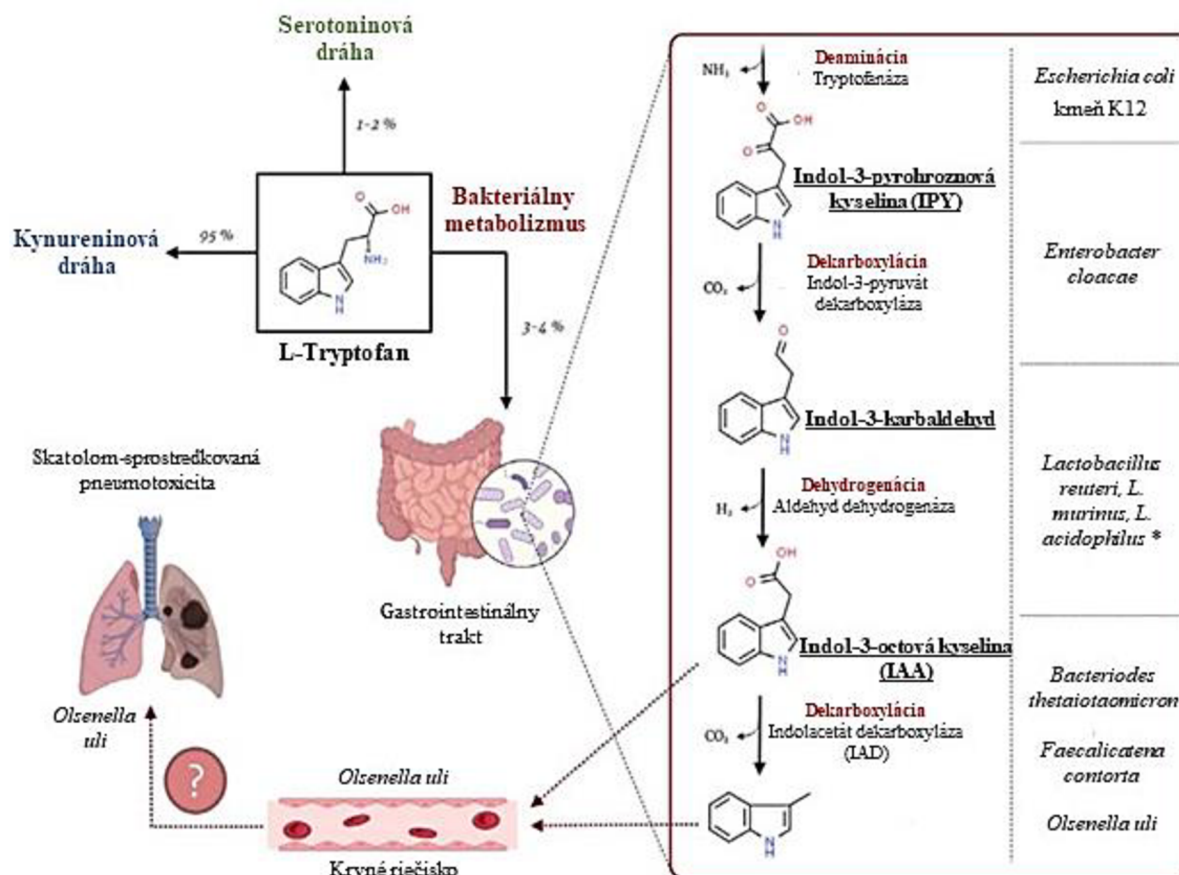
3-methylindol (3MI), nazývaný taktiež ako skatol, je prchavá indolová zlúčenina rozpustná vo vode. Prirodzene sa vyskytuje v živočíšnych výkaloch, rastlinách a taktiež je významným prekursorom v tvorbe potravinárskych aditív a priemyselných chemikálií (Ma *et al.*, 2021). Napriek tomu, že je zodpovedný za špecifický zápach výkalov, v nízkych koncentráciách má kvetinovú vôňu, ktorá pôsobí ako silný feromón priťahujúci samcov viacerých druhov orchideových včiel, ako aj komáre. To môže viesť k prenosu viacerých chorôb (Ji Ram *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2020).

3MI-sprostredkované poškodenie pľúc je druhovo špecifické. U prežúvavcov, ktoré sú vysoko náchylné na tento pneumotoxín, mala intravenózna dávka už 30–40 mg/kg u kozy fatálne účinky. U hlodavcov bolo toto poškodenie pozorované pri oveľa vyšších dávkach, kedy LD₅₀ myši predstavovalo 578 mg/kg 3MI. Podstatne nižšiu toxicitu má 3MI u králikov, u ktorých bola letalita spôsobená až pri dávkach nad 900 mg/kg (Yost, 1989).

3.2.1 Syntéza 3MI

V tele človeka sa 3MI vyskytuje dvomi spôsobmi. Prvým je bakteriálna fermentácia tryptofanu v hrubom čreve, pričom baktérie zodpovedné za jeho vznik sú prirodzenou súčasťou črevnej mikrobioty (Obrázok č. 1) (Deslandes *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2020). Hodnoty 3MI v hrubom čreve však môžu kolísť nielen v závislosti od obsahu proteínov obsahujúcich tryptofan, ale aj od obsahu vláknin či polyfenolov, ktorých fermentácia vedie k zníženému výskytu baktérií podieľajúcich sa na jeho tvorbe (Ose *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Väčšina tryptofanu je v hrubom čreve degradovaná v kynureninovej (NAD, kynurenin, kyselina

pikolinová a iné) a serotoninovej (serotonin, melatonin) dráhe (Gao *et al.*, 2018). Baktériami-sprostredkovaná syntéza 3MI je iniciovaná deamináciou tryptofanu katalyzovanou enzýmom tryptofanázou, produkovaným kmeňom K12 baktérie *Escherichia coli* (UniProt, 2021). Indol-3-pyrrohroznová kyselina (IPY), ktorá vzniká ako produkt tejto reakcie podlieha dekarboxylácii za vzniku indol-3-karbalddehydu, pričom táto reakcia je katalyzovaná indol-3-pyrvát dekarboxylázou baktérie *Enterobacter cloacae* (Koga *et al.*, 1992; Vyhliadalová *et al.*, 2020).



Obrázok č. 1: Metabolizmus tryptofanu za vzniku 3MI (obrázok prevzatý od Zgarbová *et Vrzal*, 2023; upravený).

Následnou dehydrogenáciou vzniká indol-3-octová kyselina (IAA), ktorá predstavuje jeden z hlavných prekursorov 3MI v hrubom čreve (Gao *et al.*, 2018; Yokoyama *et Carlson*, 1979). Ten vzniká jej dekarboxyláciou katalyzovanou enzýmom indolacetát dekarboxyláza (IAD). U človeka boli sekvencie pre tento enzým nájdené iba u dvoch baktérii, *Olsenella uli* a *Faecalibacterium contorta* (Liu *et al.*, 2018). *Olsenella uli* sa stala veľkou témou pre viaceré štúdie, po zistení jej možného zapojenia pri zápale pľúc (Yan *et al.*, 2022). Taktiež bola detekovaná v krvnom riečiisku ľudí s gastrointestinálnymi ochoreniami ako cholangiocarcinóm či choledochálna cysta (Lau *et al.*, 2004).

Okrem jeho prirodzenej produkcie v ľudskom tele vzniká 3MI i pyrolýzou tryptofanu pri horení tabaku (Deslandes *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2020). Štúdie ukázali, že pri koncentrácii skatolu 0,4–1,4 µg/cigareta, môže byť silný fajčiar vystavený väčším koncentráciám skatolu, než boli objavené u dvoch karcinogénov cigaretového dymu - B[a]P a 4- (metylnitrozamino)- 1- (3- pyridyl)-1-butanón (Weems *et al.*, 2009). 3MI však môže byť spojený i s výskytom viacerých ochorení, keďže zvýšené koncentrácie jeho metabolitov boli nájdené v plazme ľudí trpiacich schizofréniou či rôznymi poruchami pečene, ako i vo výkaloch ľudí s rakovinou hrubého čreva. Tieto metabolity však boli nájdené i v ľudskom moči. Tieto zistenia naznačujú, že 3MI môže predstavovať jeden z biomarkerov detekcie viacerých patologických stavov v tele človeka (Rasmussen *et al.*, 2016; Zgarbová *et Vrzal*, 2023).

3.2.2 Pôsobenie 3MI

Štúdie na prežúvavcoch z roku 1979 (Bray, Carlson) ukázali, že toxicita 3MI je spôsobená jeho bioaktíváciou, pričom nevyhnutým krokom je práve oxidácia/dehydrogenácia indolu (Weems *et al.*, 2010; Weems *et Yost*, 2010; Yost, 1989). Rada enzýmov ľudského cytochrómu P450 exprimovaných v pľúcach vrátane 1A1, 2F1, 2A13 či 4B1, katalyzujú metabolizmus 3MI na jeden z jeho reaktívnych medziproduktov, 3-metylindolenin (3MEIN) (Weems *et Yost*, 2010). Ten sa kovalentne viaže na bunčné makromolekuly a dochádza tak k tvorbe DNA aduktov, DNA zlomom a indukcií programovanej bunčnej smrti. V štúdií z roku 2003, bola schopnosť akou elektrofilné metabolity 3MI indukujú apoptózu, posudzovaná v bunčnej línii BEAS-2B (bronchiálne epitelové bunky), meraním externalizácie fosfatidylserínu a fragmentácie DNA (Nichols, 2003). Testovanie tejto línie bolo vykonané na základe predošlých štúdií, v ktorých boli BEAS-2B inkubované s vysokými koncentraciami 3MI, čo viedlo ako k apoptóze, tak aj bunkovej nekróze (Nichols *et al.*, 2000; Nichols, 2003). BEAS-2B boli inkubované s 1mmol·l⁻¹ 3MI po dobu 12–48 hodín, kedy bolo pozorované progresívne zvyšovanie DNA fragmentácie u buniek vystavených 3MI v porovnaní s kontrolou. Táto DNA fragmentácia však bola detekovaná už pri nízkych koncentráciách 3MI (10–100 µmol·l⁻¹). Tým sa potvrdila myšlienka, že BEAS-2B exprimujú enzýmy P450, ktoré metabolizujú už nízke koncentrácie 3MI na reaktívny metabolit indukujúci apoptózu (Nichols, 2003). Ďalšie štúdie, vykonané na bunkách hrubého čreva (Caco2), ktoré boli inkubované s 1–10µmol·l⁻¹ 3MI, potvrdili 3MI-sprostredkovanú aktiváciu AhR a následnú transkripciu CYP1A (Hubbard *et al.*, 2015). Náchylnosť na pľúcne poškodenie bola taktiež porovnávaná u troch typov pľúcnych buniek u kráľika: Clarove bunky, alveolárne bunky typu II a alveolárne makrofágy. Bunky boli vystavené 0,25; 0,5 a 1,0mmol·l⁻¹ koncentráciám 3MI a ich viabilita

bola pozorovaná v hodinových intervaloch po dobu 4 hodín. Po 3 hodinovej inkubácii bola toxicita pozorovaná pri 0,25 a 0,5mmol·l⁻¹ koncentráciách len u Clarových buniek. U alveolárnych buniek typu II a alveolárnych makrofágov bolo pozorované signifikantné zníženie viability len u 1mmol·l⁻¹ koncentrácie 3MI, čo indikovalo poradie zvyšovania náchylnosti na 3MI Clarove bunky > alveolárne bunky typu II > alveolárne makrofágy. (Nichols *et al.*, 1990). 3MI je však schopný poškodzovať pľúca aj ďalším spôsobom. V štúdií Kirklanda a Braya boli kozie pľúcne rezy vytavené 40 mg/kg hmotnosti tela 3MI, pričom bolo pozorované zníženie obsahu lamelárnych teliesok, ako aj schopnosti surfaktantu znižovať povrchové napätie pľúc (Kirkland *et Bray*, 1989).

Jednou z možností ako predísť poškodeniu DNA či apoptóze je použitie 1-aminobenzotriazolu (ABT). ABT je samovražedný inhibítor cytochrómu P450, ktorý inhibuje tvorbu 3-methyléndoleninu a kovalentných väzieb v ľudských pľúcnych bunkách. Bunky sú tak menej náchylné skatol-sprostredkovej cytotoxicite (Nichols, 2003; Weems *et al.*, 2009). Ďalšou možnosťou ako zabrániť 3MI-sprostredkovanému poškodeniu je i glutathion (GSH), ktorý dokáže 3-methyléndolenin nukleofilne vychytávať prostredníctvom glutathion S- transferázy. Glutathion S-transferáza je enzým schopný katalyzovať konjugáciu redukovanej formy glutathionu s 3-methyléndoleninom, čo vedie k jeho úspešnej detoxikácii (Nichols, 2003; Sheehan *et al.*, 2001).

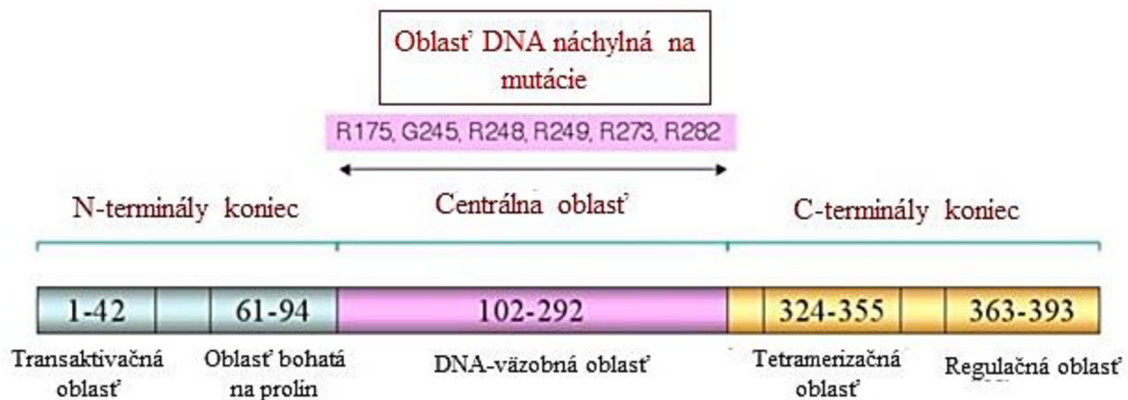
3.3 Proteín p53

Tvorba aduktov (viz 3.2) predstavuje počiatočný krok genotoxického stresu. Významným markerom poškodenia DNA je práve proteín p53. Tumor supresorový p53 je jadrový fosfoproteín o molekulovej hmotnosti 53 kDa, kódovaný génom *TP53*, ktorý sa nachádza na malom ramene 17. chromozómu (Isobe *et al.*, 1986; Lamb *et Crawford*, 1986). Stal sa záujmom viacerých štúdií po zistení, že viac ako polovica rakovín u ľudí je spôsobená mutáciami práve tohto génu. Najčastejšie ide o mutácie spôsobené zaradením odlišnej aminokyseliny, čo vedie ku vzniku chybného proteínu, neschopného väzby na DNA (Jayaraman *et Prives*, 1999). Aktivita p53 má niekoľko biologických dôsledkov, akými sú napríklad regulácia bunkového cyklu, indukcia apoptózy, diferenciácia, amplifikácia génov, chromozomálna segregácia či starnutie buniek (Oren *et Rotter*, 1999).

3.3.1 Štruktúra p53

Proteín p53 je transkripčný faktor obsahujúci 393 aminokyselín a skladá sa z troch funkčných oblastí (Obrázok č. 2) (Jayaraman *et Prives*, 1999; Levine, 1997). N-terminálny

koniec tvoria dve oblasti: transaktivačnú oblasť, ktorá je schopná viazať sa na radu transkripčných faktorov vrátane acetyltransferáz a MDM2 (u ľudí identifikovaná ako HDM2), čím aktivuje transkripciu, a oblasť bohatú na prolin (Kaelin, 1999).



Obrázok č. 2: Štruktúra p53 (obrázok prevzatý z Kaelin, 1999; upravený).

V prípade naviazania MDM2 na transaktivačnú oblasť p53 a následnému vytvoreniu triméru zloženého z p53, p300 a MDM2, dochádza k narušeniu transaktivačnej funkcie, výsledkom čoho je ubiquitin-dependentná degradácia proteínu p53 (Grossman *et al.*, 1998). DNA-väzobná oblasť sa špecificky viaže na DNA a je najčastejším miestom vzniku mutácií p53. C-terminálny koniec obsahuje dve oblasti: tetramerizačnú oblasť, zodpovednú za konformačné zmeny p53, potrebné pre správnu funkciu tohto proteínu, a regulačnú oblasť (Kim *et al.*, 2012; Levine, 1997). C-koniec môže taktiež negatívne regulovať funkciu DNA-väzobnej oblasti jej „uzamknutím“ do latentnej konformácie, čo zabraňuje naviazaniu DNA. V prípade, že je interakcia medzi týmito dvoma oblasťami narušená posttranslačnými modifikáciami (fosforylácia, acetylácia), DNA-väzobná oblasť sa stáva aktívnou a dochádza k zvýšeniu transkripčnej aktivity (Kaelin, 1999). Viaceré štúdie poukazujú na to, že fosforylácia serínov 15 a 20 proteínu p53 môže spôsobiť konformačné zmeny N-konca, čo môže zohrávať dôležitú úlohu v regulácii stability p53 a jeho schopnosti viazať sa na DNA (Chao, 2000).

3.3.2 Fyziologická funkcia p53

Svojou tumor supresorovou aktivitou zabraňuje nevhodnej proliferácii buniek a podieľa sa na udržiavaní celistvosti genómu po genotoxickom poškodení (Kaelin, 1999). Proteín sa v bunke za normálnych okolností vyskytuje v nízkych koncentráciách so životnosťou niekoľkých minút. V niektorých typoch buniek sa môže taktiež vyskytovať v latentnej forme, ktorá nie je schopná transkripcie. Z tohto dôvodu je nutné, aby došlo k jeho aktivácii prijatím stresového signálu. Pri poškodení DNA, aktivácii onkogénu, či inej skutočnosti, ktorá má negatívny dopad na bunku (teplotný šok, hypoxia), dochádza k rýchlemu zvýšeniu koncentrácie

p53 a jeho aktivácii ako transkripčného faktoru (Levine, 1997; Pietsch *et al.*, 2008). Dochádza tak k aktivácii ATM proteín kinázy, čo vedie k aktivácii Chk2 kinázy. Obe tieto kinázy následne fosforylujú špecifické miesta p53 (Kaelin, 1999). Proteín následne iniciuje jeden z dvoch procesov. Môže pozastaviť bunecný cyklus vo fázi G1, čo poskytuje čas pre opravu poškodenia, alebo, ak poškodenie nie je možné opraviť, proteín zaháji programovanú bunkovú smrť - apoptózu (Goodsell, 1999). Po aktivácii p53 ako transkripčného faktoru, tak dochádza k jeho hromadeniu v jadre, kde sa viaže na špecifické miesta v regulačných oblastiach génov ním transkribovaných ako napríklad p21^{Waf1/Cip1}, Gadd45 či gény Bcl-2 génovej rodiny (Kaelin, 1999; Kern *et al.*, 1991). Transkripcia génu kódujúceho proteín p21 vedie k jeho väzbe na cyklin-dependentné kinázy (CDK), potrebné pre kontinuitu bunecného cyklu, čím ich inhibuje. Tým dochádza k zastaveniu bunecného cyklu v G1 bode (Bertoli *et al.*, 2013; Levine, 1997). Bolo dokázané, že vloženie vektorov wild-type p53 do pľúcnych nádorov, viedlo k zastaveniu ich rastu a neskôr i k apoptóze (Sekido *et al.*, 2003).

3.4 Aryl uhl'ovodíkový receptor

Aryl uhl'ovodíkový receptor (AhR) je ligandom aktivovaný transkripčný faktor (Barouki *et al.*, 2012), podieľajúci sa na viacerých fyziologických procesoch vrátane tvorby nádorov (Powell, 2018), metabolizme xenobiotík (Bock, 2017) či imunitných reakciách (Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018). Tvorí spolu s aryl uhl'ovodíkovým jadrovým transportérom (ARNT) aryl uhl'ovodíkový receptorový komplex (AhRC) (Beischlag *et al.*, 2008), ktorý je súčasťou bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM) rodiny transkripčných faktorov (Bersten *et al.*, 2013).

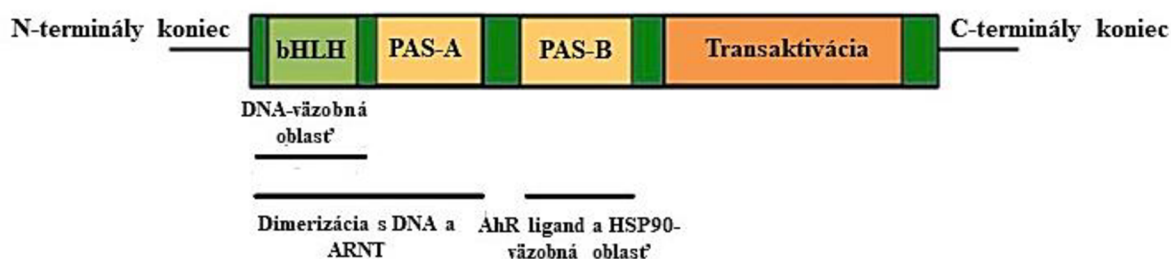
Neaktivovaný AhR sa nachádza v cytosole v komplexe s chaperonmi (HSP90, XAP2, p23) (Mimura *et Fujii-Kuriyama*, 2003), ktoré udržuju jeho vysokú afinitu pre ligandy. Viaceré štúdie taktiež naznačili, že na AhR-chaperon neaktivovaný komplex je naviazaná i tyrosin kináza (Src), ktorej disociácia má viesť k aktivácii AhR (Blankenship *et Matsumura*, 1997; Dong *et al.*, 2011).

Ide o sirotsky receptor, ktorý môže byť aktivovaný ako endogénnymi zlúčeninami, tak i xenobiotikami (Adachi *et al.*, 2001; Weems *et al.*, 2010; Weems *et Yost*, 2010). Príkladom ligandov s vysokou afinitou k AhR sú napríklad polycyklické aromatické uhl'ovodíky (PAHs), vyskytujúce sa mimo iné i v cigaretovom dyme (B[a]P) (Shimada *et Guengerich*, 2006), či halogénové aromatické uhl'ovodíky (HAHs), ku ktorým patrí i jeden z najznámejších AhR agonistov 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín (TCDD) (Beischlag *et al.*, 2008). Jedným z jeho aktivátorov je i 3MI, ktorý tak iniciuje napríklad transkripciu CYP1A1 v ľudských

bronchiálnych epiteliálnych bunkách a v bunkách hrubého čreva (Caco2) (Hubbard *et al.*, 2015; Rasmussen *et al.*, 2016).

3.4.1 Štruktúra AhR

AhR je tvorený N-terminálnym koncom pozostávajúcím z bHLH domény, zodpovedajúcej za naviazanie AhR:ARNT komplexu na XRE (DNA element responzívny na xenobiotiká) sekvencie v promótorových oblastiach cieľových génov. AhR ďalej tvoria dve PAS domény (A a B) a C-terminálna transaktivačná doména (Obrázok č. 3) (Denison *et al.*, 2003; Schulte *et al.*, 2017).

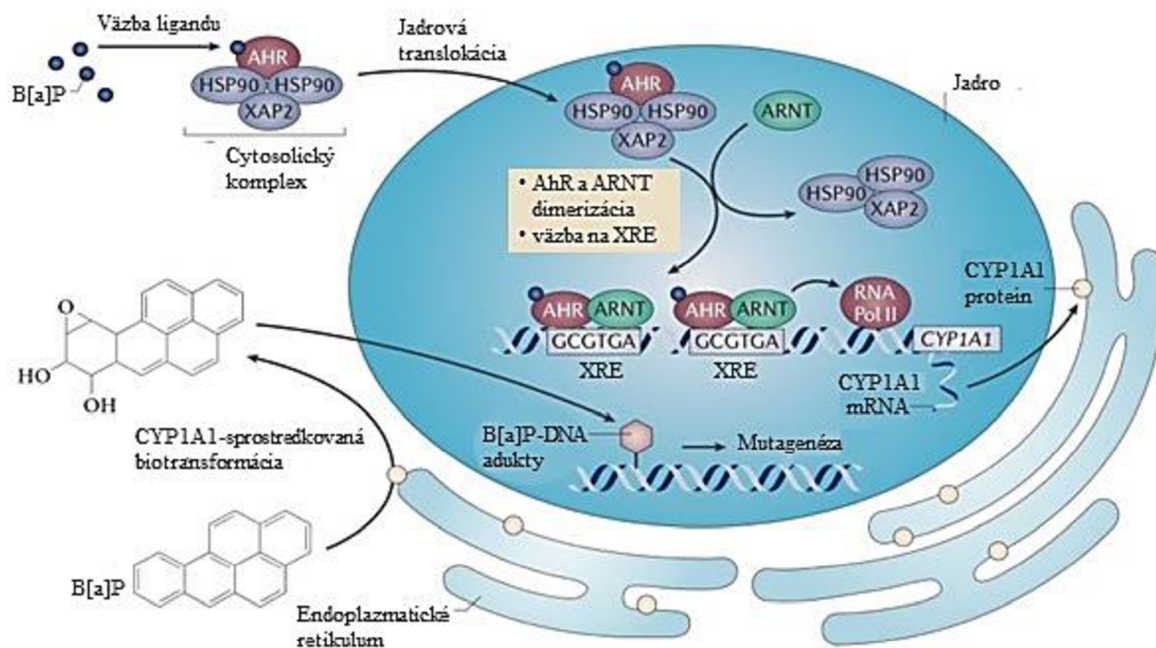


Obrázok č. 3: Aryl uhľovodíkový receptor (obrázok prevzatý z E.S. Mosa *et al.*, 2022; upravený)

Obe PAS domény interagujú s ARNT, za vzniku heterodimérneho komplexu AhR:ARNT, avšak iba PAS B doména sa funkčne podieľa na viazaní AhR ligandov (Wu *et al.*, 2013). C-terminálna doména obsahuje oblasť bohatú na glutamín, ktorá je zodpovedná za aktiváciu transkripcie cieľových génov (Rowlands *et al.*, 1996).

3.4.2 Signálna dráha AhR

Inaktivovaný cytosolický AhR je teda súčasťou komplexu proteínov - dimérneho HSP90, XAP2, p23 a Src kinázy. Jedna z molekúl HSP90 je naviazaná na PAS A receptoru AhR, zatiaľ čo druhá interaguje s jeho bHLH a PAS B doménami. Celý proteínový komplex je stabilizovaný proteínom XAP2, ktorý zvyšuje aktivitu AhR a zabraňuje, aby bol neaktivovaný AhR translokovaný do jadra, inhibovaním väzby AhR s importinom- β . Proteín p23 zabezpečuje, aby nedošlo k ubiquitin-sprostredkovanej proteolýze AhR receptoru a Src kináza je zapojená do aktivácie receptoru (Rothhammer *et al.*, 2019). Po naviazaní ligandu na PAS B receptoru AhR, dochádza k disociácii proteínu XAP2 a AhR i s naviazaným ligandom sú transportované do jadra (Obrázok č. 4) (Ikuta *et al.*, 2004). AhR v jadre následne vytvára heterodimérny komplex s ARNT, ktorý sa viaže na XREs sekvencie (Rothhammer *et al.*, 2019) a spolu s ďalšími koaktivátormi indukuje transkripciu viacerých génov (Murray *et al.*, 2014).



Obrázok č. 4: Ligandom-sprostredkovaná aktivácia AhR (obrázok prevzatý z Murray *et al.*, 2014; upravený).

3.4.3 Cytochróm P450

Cytochróm P450 predstavuje skupiny enzýmov obsahujúcich hém, ktoré katalyzujú Fázu I metabolických reakcií xenobiótík, ako napríklad C-, N- a S- oxidácia a dealkylácia (Androutsopoulos *et al.*, 2009). Primárne sú exprimované v pečeni, sekundárne v tenkom čreve a obličkách, ďalej v pľúcach a ďalších orgánoch, kde sa podieľajú na biotransformácii, ktorá môže viesť k bioaktivácii a tvorbe reaktívnych metabolitov. Bioaktivácia endo- a exogénnych zlúčenín v pľúcach zohráva významnú úlohu u rôznych chorôb vrátane rakoviny pľúc, kedy inhalované polycyklické aromatické uhľovodíky (PAHs), ktoré za normálnych podmienok nie sú karcinogénne, môžu byť bioaktivované enzýmami cytochrómu P450 na metabolity, ktoré následne alkylujú DNA (Weems *et al.*, 2010). V eukaryotických bunkách existujú ako membránovo-viazané (ER, mitochondria) hemoproteíny zložené z približne 500 aminokyselín. Ich prostetickú skupinu tvorí protoporfyrín IX s naviazaným železom (Hasler *et al.*, 1999; Šrejber *et al.*, 2018).

3.4.3.1 CYP1A1

CYP1A1 je jedným z dvoch členov rodiny CYP1 (Kim, 2004), ktorá sa nachádza predovšetkým v extrahepatických tkanivách, kde katalyzuje rôzne reakcie, vrátane hydroxylácie aromatického kruhu iniciujúcej karcinogénu (Androutsopoulos *et al.*, 2009). Medzi jeho inhibítory patrí hesperidin (Briguglio *et al.*, 2018), fluorochinolony a makrolidy

a jeho induktory predstavujú polycyklycké aromatické uhľovodíky (PAHs), ako i 3MI (Beresford, 2008; Hubbard *et al.*, 2015). Jeho expresia je regulovaná heterodimérom AhR:ARNT, čím sa CYP1A1 stáva markerom aktivácie AhR (Hu, 2007). Aby sa dokázalo, že CYP1A1 je indukovaný i v primárnych ľudských bunkách, bola vykonaná štúdia, v ktorej boli NHBE bunky (normálne ľudské bronchiálne epitelové bunky) vystavené $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3MI po dobu 24 hodín. I keď sa po 8 hodinách expresia CYP1A1 vrátila na hodnoty kontroly (0,5% DMSO), počas 6. hodiny bolo pozorované signifikantné zvýšenie CYP1A1 expresie (Weems *et al.*, 2010).

3.4.3.2 CYP2A6

CYP2A6 je proteín kódujúci gén, nachádzajúci sa na dlhom ramienku 19. chromozómu (GeneCards, 2008). Je exprimovaný prevažne v pečeni, kde tvorí len 4% z celkových hepatických CYP P450 (Chen *et al.*, 2007; Tutka *et al.*, 2005). Na základe zistenia, že časť promótorovej oblasti CYP2A6 génu obsahuje GRE sekvencie, bolo konštatované, že CYP2A6 môže byť regulovaný glukokortikoidným receptorom (GR) (viz 3.4) (Onica *et al.*, 2007). Podobne ako CYP1A1, aj CYP2A6 sa podieľa na metabolizme xenobiotík, vrátane nikotínu a kumarínu (Chen *et al.*, 2007; Tutka *et al.*, 2005). Podieľa sa taktiež i na degradácii 3MI u prasiat, i keď v oveľa menšej miere, než s akou dochádza k akumulácii 3MI v ich tukových tkanivách (Chen *et al.*, 2007). Jedným z ligandov, ktoré sa viažu na GR a spúšťajú expresiu proteínu CYP2A6 je i dexametason (DEX). V štúdií z roku 2007 bolo preukázané, že DEX v koncentračnej rade $1\text{--}100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zvyšoval expresiu CYP2A6 mRNA a proteínu v ľudských hepatocytoch (Onica *et al.*, 2007).

3.5 Glukokortikoidný receptor

Glukokortikoidný receptor (GR) je transkripčný faktor, ktorého aktivácia je indukovaná naviazaním steroidného hormónu (Bledsoe *et al.*, 2002). Je zodpovedný za reguláciu génov viacerých fyziologických procesov, ako napríklad diferenciácia buniek, regulácia hladiny glukózy v krvi či zapojenie v zápalových reakciách (Reichardt *et al.*, 1998). Medzi jeho ďalšie ligandy však patria i DEX a prednisolon, ktoré sa podávajú pri astme, reumatickej artritíde a leukémií (Barnes *et al.*, 1998). Jeho mutácie sú spojené s mnohými ochoreniami, vrátane rôznych druhov rakovín, autoimunitných ochorení či Cushingovho syndrómu (Werner *et Brönnegård*, 1996). Práve z toho dôvodu sa GR považuje za dôležitý cieľ v liečbe (Bledsoe *et al.*, 2002).

3.5.1 Štruktúra GR

Gén kódujúci GR, *NR3C1* (jadrový receptor, Subrodina 3, Skupina C, Člen 1), je lokalizovaný na dlhom ramienku 5. chromozómu a tvorí ho 10 exónov (Chrousos *et* Kino, 2005). GR sa skladá z troch funkčných domén: N-terminálna doména (NTD), ligand-väzobná doména (LBD) a DNA-väzobná doména (DBD) (Obrázok č. 5). NTD obsahuje špeciálnu oblasť bohatú na aminokyselinové zvyšky, AF-1 (oblasť aktivačnej funkcie 1), ktorá pôsobí ako zosilňovač transkripcie a môže fungovať i v neprítomnosti LBD (Kumar *et* Thompson, 2005). Nasleduje DBD, ktorá obsahuje dva motívy zinkových prstov, prostredníctvom ktorých sa GR viaže na špecifické GRE (glukokortikoid-responzívne DNA elementy) sekvencie cieľových génov (Nader *et al.*, 2009), a ktoré taktiež stabilizujú DBD:GRE komplex. C-terminálna LBD zodpovedá za rozpoznanie a naviazanie ligandu a obsahuje malú aktivačnú oblasť AF-2, ktorá sa skladá tak, aby umožnila naviazanie ďalších proteínov ako napríklad koaktivátorov či korepresorov (Kumar *et* Thompson, 2005). Medzi DBD a LBD sa mimo iné nachádza i tzv. pántová oblasť (HR, hinge region), ktorá zabezpečuje flexibilitu GR (Nader *et al.*, 2009).



Obrázok č. 5: Štruktúra glukokortikoidného receptora (obrázok odvodený z Ratman *et al.*, 2013).

3.5.2 Signálna dráha GR

Neaktivovaný GR je v cytoplazme súčasťou veľkého proteínového komplexu zloženého z chaperónov HSP90, HSP70 (proteíny tepelného šoku), p23 a imunofilínov FKBP51 a FKBP52 (FK506-väzobný proteín 51-kDa a 52-kDa). Ich úlohou je udržiavanie GR v transkripčne neaktívnej konformácii, no s vysokou afinitou k ligandom (Oakley *et* Cidlowski, 2013; Zgajnar *et al.*, 2019). Po naviazaní ligandu na LBD GR, dochádza k zmene jeho konformácie, čo vedie k disociácii proteínového komplexu a translokácii GR cez jadrové póry do jadra. Tam dochádza k naviazaniu DBD GR na GRE sekvencie cieľových génov a zahájeniu transkripčnej aktivity/represie. Ubikvitín-proteazomálna dráha následne degraduje ligandom viazaný GR, čím uľahčuje jeho uvoľnenie z GRE sekvencií. Uvoľnená časť receptora sa tak vracia späť do cytoplazmy, kde opäť tvorí komplex s chaperonovými proteínmi (Nicolaidis *et al.*, 2018; Oakley *et* Cidlowski, 2013).

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

- Adherentná bunková línia A549 (CCL-18), odvodená a izolovaná z buniek ľudského karcinómu pľúc, prostredníctvom explantátovej kultúry.

4.1.2 Použitý materiál

- 96 jamkové kultivačné doštičky (Techno Plastic Products)
- 6 jamkové kultivačné doštičky (Techno Plastic Products)
- automatické pipety 0,1–2,5µl; 0,5–10µl; 2–20µl; 20–200µl; 10–100µl; 100–1000µl (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistant)
- filtračný papier pre Western blotting (BioRad)
- fixka WesternSure® Pen (LI-COR)
- hrebienok na ELFO (BioRad)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- kultivačné fľaše s plochou dna 25 cm²; 75 cm²; 150 cm² (Techno Plastic Products)
- multikanálová pipeta 20–200µl (Eppendorf)
- nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- papierová krabička na vzorky do –80 °C (Biologix)
- Petriho misky (Techno Plastic Products)
- plastová škrabka na bunky (Techno Plastic Products)
- plastové mikroskúmavky o objemoch 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml (BIOplastics)
- plastové skúmavky o objemoch 15 a 50 ml (Techno Plastic Products)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky (Techno Plastic Products)
- plastové špičky 0,1 - 10µl, 10 - 200µl, 100 - 1000µl (Eppendorf)
- PVDF membrána (Thermo Scientific)
- sérologické pipety 0,1–2ml; 1–5ml; 1–10ml; 1–25ml (Techno Plastic Products)
- sklá pre western blotting 1,5 mm Mini-PROTEAN® (BioRad)
- sklenená kadička (Simax)

4.1.3 Chemikálie

- 2x koncentrovaný Laemmlí Sample Buffer (BioRad, 1610737)
- 4x koncentrovaný pufoer do deliaceho gélu (BioRad, 161-0798)
- 4x koncentrovaný pufoer do zaostrovacieho gélu (BioRad, 161-0799)
- 5x koncentrované Bradfordovo činidlo (Serva, 39222.03)
- 10x koncentrovaný migračný pufoer Tris/glycin/SDS (Bio Basic, 1610732)
- 10x koncentrovaný reblotačný pufoer Re-blot Plus Strong Solution (MilliporeSigma, 2504)
- 10x koncentrovaný transferový pufoer Tris/glycin (Bio Basic, 1610771)
- 20x koncentrovaný Tris Buffered Saline (Thermo Scientific, 28358)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- 10% dodecylsírán sodný (BioRad, 1610302)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid (Sigma Aldrich, A2792)
- 96% etanol (Lach-ner, 20025-A99)
- 2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxín, TCDD (ULTRA Scientific, 48599)
- 3-metylundol (Sigma Aldrich, M51458)
- bovinný sérový albumín (Sigma Aldrich, A2153)
- bromfenolová modrá (Sigma Aldrich, B0126)
- deionizovaná voda, ddH₂O
- dexametason (Sigma Aldrich, D4902)
- dimetylsulfoxid, DMSO (Sigma Aldrich, D8418)
- DL-Ditiotreitol, DTT (Sigma Aldrich, 43819)
- dodecylsírán sodný, SDS (Sigma Aldrich, L3771)
- doxorubicin (10 mmol·l⁻¹ zásobný roztok) (Abcam, ab234039)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, D6546)
- fetálne bovinné sérum, FBS (Sigma Aldrich, F6178)
- fosfátový pufoer, PBS (Serana, BDL-001)
- glycerol (Lach-ner, kat. č. 40058-AT0)
- chemiluminiscenčný substrát Western Sure Premium Chemiluminiscent Substrate:
 - Stable Peroxide Solution (LI-COR, 826-13462)
 - Luminol Enhancer Solution (LI-COR, 826-13460)
- inhibítor fosfatáz PhosSTOP™ (Roche, 04906837001)
- inhibítor proteáz cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini (Roche, 04693159001)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025)

- izopropanol (Sigma Aldrich, I9516)
- L-glutamín (Sigma Aldrich, F6178)
- lyzačný pufor (Promega, E3971)
- metanol (Penta, 67-56-1)
- neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich, M7145)
- N,N,N',N'-tetrametyléndiamin, TEMED (Merck Millipore, 110-18-9)
- persíran amónny, APS (Sigma Aldrich, A3678)
- Ponceau S. Rouge (Sigma Aldrich, P7170)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, 1610374)
- protilátky:
 - primárna protilátka β -aktin, mouse monoclonal (Cell Signaling Technology, 3700S)
 - primárna protilátka CYP1A1, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-393979)
 - primárna protilátka CYP2A6, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-53615)
 - primárna protilátka p-53, mouse monoclonal (Cell Signaling Technology, 48818S)
 - primárna protilátka p-p53 (S15), rabbit polyclonal (Cell Signaling Technology, 9284S)
 - sekundárna protilátka anti-mouse (Cell Signaling Technology, 7076S)
 - sekundárna protilátka anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074S)
- sušené mlieko (Laktino)
- trypanová modrá (Sigma Aldrich, T6146)
- Tween® 20 (Sigma Aldrich, P1379)
- WesternSure® Pen (LI-COR, 926-91000)
- WesternSure® Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder (LI-COR, 926-98000)

4.1.4 Prístroje

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- aparátúra pre western blot Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- centrifúga 5418 R (Eppendorf)
- centrifúga Spectrafuge mini (Labnet)
- digitálny mikroskop (Novel Optics)
- elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- hlbokomraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- chladnička (Gorenje)
- chemiluminiscenčný skener Li-COR C-DiGit™ (Li-Cor Biosciences)
- inkubátor NB-203XL (N-Biotek)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- laminárny box Labculture® (ESCO)
- mikrocentrifúga 5414 R (Eppendorf)
- minikývačka MR-1 (Biosan)
- platová aparátúra na prípravu gélov pre SDS-PAGE (BioRad)
- prístroj na výrobu ľadu F100 Compact (Icematic)
- sonikačná lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- vodná lázeň LCB11D (Daihan LabTech)
- vortex Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- zdroj napätia Enduro™ 300V (Labnet)
- zvaračka fólií (Eta)

4.1.5 Počítačové programy

- Image Studio Digits
- i-Control

4.2 Metodika práce

V experimentálnej časti boli bunky A549 dlhodobo vystavované 3-metyldolu (3MI) v koncentračnej rade 0,1–100 nmol·l⁻¹. V rámci tohto časového obdobia boli postupne odoberané vzorky, ktoré boli zamrazené v -80°C a neskôr vyhodnotené prostredníctvom western blot metódy. Touto metódou bola taktiež stanovená expresia génov CYP1A1 a CYP2A6, ktorá odráža transkripčnú aktivitu AhR a GR. Bunky boli kultivované v plastových fľašiach v inkubátore pri teplote 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti.

4.2.1 Pasážovanie buniek

Bunky sa neustále množia a postupom času sú čoraz konfluentnejšie, následkom čoho dochádza k úbytku živín v kultivačnom médiu. Proces pasážovania slúži na zredukovanie počtu buniek, kedy pôsobením proteázy trypsin, dochádza k rozrušeniu ako medzibunečných kontaktov, tak aj kontaktu s povrchom kultivačnej fľaše.

V rámci pasážovania bolo v laminárnom boxe odsaté staré médium z kultivačnej fľaše o veľkosti 25 cm² a bunky usadené na povrchu boli jemne premyté s 4 ml PBS. Následne boli inkubované po dobu 5 minút s 0,5 ml trypsinu v inkubátore. Po oddelení buniek od povrchu fľaše bolo pridaných 4,5 ml nového živného média a suspenzia bola zhomogenizovaná pipetou. 4 ml suspenzie boli prenesené do plastovej skúmavky a pripravené na zamrazenie. K zvyšnému 1 ml suspenzie, ktorý zostal v kultivačnej fľaši, boli pridané 4 ml nového živného média a kultivačná fľaša bola inkubovaná 3–5 dní v inkubátore.

Pri pasážovaní sa využívalo komerčné médium DMEM, do ktorého bolo pridaných 50 ml 10% FBS, 5 ml 1% neesenciálnych aminokyselín a 5 ml L-glutamínu na 500 ml média. V prvej polovici experimentálnej časti sa pracovalo s piatimi DMEM médiami - čisté živné médium, kontrolné médium s DMSO a zvyšné tri obsahovali každé inú koncentráciu 3MI (0,1 nmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 10 nmol·l⁻¹). V druhej polovici sa využívali iba dve DMEM média, jedno s pridaným DMSO a druhé čisté živné médium, pričom koncentračná rada 3MI (1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹) bola aplikovaná priamo na bunky počas pasážovania.

4.2.2 Mrazenie vzoriek pre Western blot

Suspenzia, ktorá bola odobratá počas pasážovania bola centrifugovaná pri 1500 rpm po dobu 2 minút. Po scentrifugovaní bol odobratý supernatant a k bunečnému sedimentu bol pridaný 1 ml nesterilného PBS. Tento roztok bol následne zhomogenizovaný pipetou, prenesený do 1,5ml mikroskúmaviek a ďalej centrifugovaný 1 minútu pri 4000 rpm. Supernatant bol následne odpipetovaný a mikroskúmavka s peletom bola vložená do -80 °C.

4.2.3 Počítanie a vysádzanie buniek na kultivačnú doštičku pre pozitívnu a negatívnu kontrolu

Počas pasážovania bolo do plastovej mikroskúmvky odobratých 10 μl bunečnej suspenzie z kultivačnej fľaše s čistým živným médiom. K bunečnej suspenzii bolo pripipetovaných 90 μl 0,4% (w/v) roztoku trypanovej modrej v PBS a výsledný roztok bol pipetou dôkladne premiešaný. Následne z neho bolo odobraných približne 10 μl , ktoré boli nanesené na Bürkerovu komôrku a pomocou mikroskopu bol spočítaný počet živých buniek v deviatich štvorcoch Bürkerovej komôrky. Počítané boli len nezafarbené živé bunky, ktoré majú na rozdiel od mŕtvych buniek neporušenú membránu, a neprepúšťajú tak do svojho intracelulárneho priestoru farbivo. Počet živých buniek bol prepočítaný na počet buniek v 1 ml bunečnej suspenzie. Bunky boli vysiate do troch jamiek 6 jamkovej kultivačnej doštičky, 1 milión buniek na jamku v objeme 1 ml.

Po vysiatí nasledovala 24 hodinová inkubácia, po ktorej nasledovalo vystavenie buniek testovaným látkam - DMSO v pomere 1:1000 (negatívna kontrola) a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ doxorubicin (zásobný roztok 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pozitívna kontrola).

4.2.4. Počítanie a vysádzanie buniek na kultivačnú doštičku pre stanovenie aktivity AhR a GR

Do 6 jamkových kultivačných doštičiek boli vysiate 2 milióny buniek na jamku v objeme 2 ml. Experiment sa vykonával v troch opakovaniach, 8 jamiek na jedno opakovanie. Na celý experiment tak bolo treba približne 48 miliónov buniek v 52 ml DMEM s prepočítanou rezervou.

Po vysiatí boli kultivačné doštičky inkubované po dobu 24 hodín, po ktorých nasledovala ďalšia 24 hodinová inkubácia s testovanými látkami.

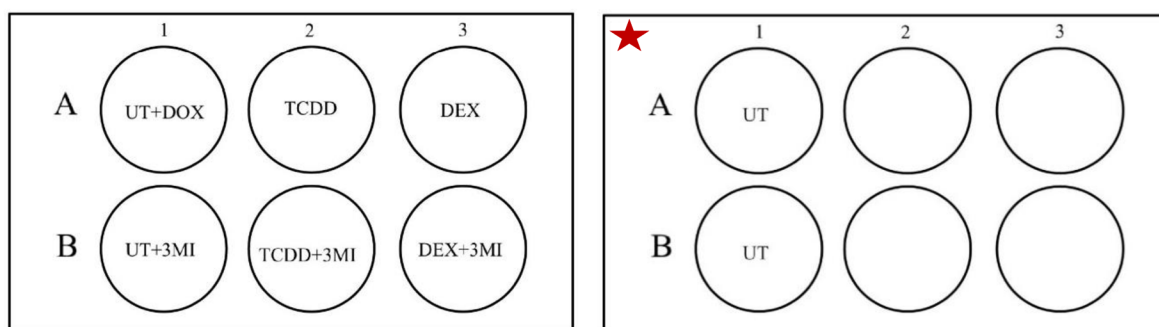
4.2.5 Inkubácia buniek s testovanými látkami

Po vysiatí buniek na kultivačné doštičky a ich 24 hodinovej inkubácii v inkubátore, boli bunky v jednotlivých jamkách, v rámci jedného opakovania, vystavené vybraným látkam nasledovne:

- 4 jamky s DMSO v pomere 1:1000 ako negatívna kontrola
- 2 jamky s TCDD o výslednej koncentrácii 10 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (zásobný roztok 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- 2 jamky s dexametasonom o výslednej koncentrácii 100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (zásobný roztok 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Staré médium v kultivačných doštičkách bolo v laminárnom boxe odsaté a nahradené novým médiom s už rozpustenými testovanými látkami v daných koncentráciách. Kultivačné doštičky

boli následne vložené do inkubátora a inkubované po dobu 24 hodín.



Obrázok č. 6: **Schéma 6 jamkových doštičiek po aplikácii testovaných látok v rámci jedného opakovania.** Jamka A1 predstavuje pozitívnu kontrolu, jamky A2, A3, B1, B2 a B3 obsahujú kultivačné médium s rozpustenými testovanými látkami. Jamky A1 a B1 ★ predstavujú negatívnu kontrolu.

Po inkubácii bolo staré médium opäť odsaté a nahradené novým s rozpustenými testovanými látkami, ku ktorým boli ale tentokrát pridané $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ doxorubicin ako pozitívna kontrola a 3MI o výslednej koncentrácii $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (zásobný roztok $100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Obrázok č. 6). Po aplikovaní testovaných látok boli kultivačné doštičky inkubované po dobu 24 hodín v inkubátore.

4.2.6 Mrazenie vzoriek pre Western blot po inkubácii s testovanými látkami

Po 24 hodinách v inkubátore bolo staré médium i s rozpustenými testovanými látkami odsaté a kultivačné doštičky boli premyté PBS. Do každej jamky bol následne napipetovaný 1 ml PBS a obsah jamky bol pomocou plastovej škrabky zoškrabaný do 1,5ml plastovej mikroskúmavky. Vzorky boli počas procesu izolácie udržiavané na ľade, aby sa zabránilo degradácii proteínov. Mikroskúmavky boli centrifugované vo vychladenej centrifúge ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pri 4600 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol následne odpipetovaný a do každej mikroskúmavky bol k bunčnému sedimentu pridaný 1 ml PBS. Nasledovala centrifugácia v predom vychladenej centrifúge pri 1500 rpm po dobu 2 minút. Supernatant bol opäť odpipetovaný a sediment uskladnený do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.7 Izolácia proteínov a stanovenie ich koncentrácie

Po vytiahnutí z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ boli vzorky ponechané na ľade k rozmrazeniu a následne bolo do každej mikroskúmavky pridaných 150 μl lyzačného pufru. Každá vzorka bola dôkladne zvortexovaná, sonifikovaná a následne opätovne zvortexovaná. Vzorky boli ponechané po dobu 5 minút na ľade a ďalej scentrifugované (13000 rpm , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 13 min). Supernatant bol následne prepipetovaný do nových 1,5ml mikroskúmaviek a celý roztok bol dôkladne premiešaný. Z každej vzorky bolo odobratých 5 μl , ktoré boli v 0,5ml mikroskúmavkách

5x nariadené vodou a následne zvortexované. Pomocou Bradfordovho činidla bola stanovená koncentrácia jednotlivých vzoriek, kedy do 96 jamkovej kultivačnej doštičky bolo z každej nariadenej vzorky napipetovaných po 10 µl na jamku. Následne bola napipetovaná kalibračná krivka BSA o koncentráciách 0,2; 0,4 a 0,6 mg/ml, a do každej jamky bolo pridaných 100 µl Bradfordovho činidla.

4.2.8 Príprava vzoriek pre SDS-PAGE

Vzorky boli nariadené do 0,5ml mikroskúmaviiek tak, aby roztok o objeme 30 µl obsahoval 28–32 µg proteínov. K jednotlivým vzorkám bo pridaný odpovedajúci objem 2x koncentrovaného vzorkovacieho LB pufu. Vzorky boli následne dôkladne zvortexované a denaturované pri 95 °C na termobloku po dobu 5 minút. Po denaturácii boli schladené na ľade a následne stočené na minicentrifúge.

4.2.9 SDS-PAGE

Do plastovej aparatúry na prípravu gélov boli umiestnené krycie a podložné sklíčka, ktoré boli dopredu očistené 96% etanolom. Následne bol pripravený 10% deliaci gél, ktorého zloženie je popísané v tabuľke č. 1. Po pripravení bol gél premiešaný a napipetovaný pomocou 10ml sérologickej pipety medzi pripravené sklá približne 1 cm od vrchného okraja krycieho skla. Deliaci gél bol prevrstvený 400 µl izopropanolu, ktorý bol po spolymerizovaní gélu odstránený a gél bol 5x premytý deionizovanou vodou. Ďalej bol pripravený 4% zaostrovací gél podľa tabuľky č. 2, ktorý bol 5 ml sérologickou pipetou nanosený na deliaci gél medzi sklá, a do ktorého bol vložený plastový hrebienok. Po spolymerizovaní bol gél vytiahnutý z plastovej aparatúry a vložený do elektroforetickej cely naplnenej migračným pufrom.

Tabuľka č. 1: Zloženie 10% deliaceho gélu s hrúbkou 1,5 mm

Zložky gélu	Objem
40% roztok akrylamid/bisakrylamid	2,5 ml
ddH ₂ O	4,9 ml
4x pufo do deliaceho gélu (Tris/HCl, pH 8.8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tabuľka č. 2: **Zloženie 4% zaostrovacieho gélu s hrúbkou 1,5 mm**

Zložky gélu	Objem
40% roztok akrylamid/bisakrylamid	0,40 ml
ddH ₂ O	2,56 ml
4x pufor do deliaceho gélu (Tris/HCl, pH 8.8)	1,00 ml
10% SDS	40 µl
APS	30 µl
TEMED	4 µl

Hrebienok bol vytiahnutý a do vytvorených jamiek boli napipetované dopredu pripravené vzorky, pričom do prvej jamky bol nanosený štandard molekulovej hmotnosti. Elektroforetická cela bola zapojená do zdroja elektrického napätia a za konštantného prúdu 30mA/gél boli vzorky separované po dobu 1,5 h.

4.2.10 Prenos proteínov na PVDF membránu (Semi-Dry)

PVDF membrána bola 2 minúty hydratovaná v metanole a následne 2x po 10 minút premývaná v ddH₂O a vložená do transfer pufra. Následne bola zostavená blotovacia aparátúra, do ktorej sa na elektródu vrstvilo v poradí: 2x filtračný papier navlhčený transfer pufrom, PVDF membrána, gél s proteínmi, 2x filtračný papier navlhčený transfer pufrom. Aparátúra bola zapojená do zdroja elektrického napätia a za konštantného prúdu 380 mA boli proteíny blotované na membránu približne 2 h. Po skončení bola membrána 3x po 5 minút premývaná v ddH₂O a následne farbená pomocou Ponceau S. Rouge po dobu 3 minút. Po zafarbení bola membrána opäť premytá v ddH₂O a po vysušení bola popísaná, orezaná a pripravená na ďalšie použitie.

4.2.11 Detekcia proteínov

Membrána s proteínmi bola rehydratovaná v metanole a premytá v ddH₂O. Následne bola 3x po 5 minút premývaná v pripravenom roztoku TBS/Tween (50 ml 2x koncentrovaného TBS, 950 ml ddH₂O a 500 µl Tween 20). Po premytí bola umiestnená do predom pripraveného roztoku 5% mlieka v TBS/Tween a inkubovaná na kývačke po dobu 1 h. Po inkubácii v mlieku bola membrána vložená do roztoku 5% BSA v TBS/Tween, v ktorom bola podľa tabuľky č. 3 rozpustená príslušná primárna protilátka. Membrána bola inkubovaná na kývačke cez noc pri 4°C.

Na druhý deň bola membrána premývaná 3x po 5 minút v TBS/Tween a následne inkubovaná na kývačke v roztoku 2,5% mlieka v TBS/Tween i s rozpustenou sekundárnou protilátkou (viz Tabuľka č. 3) po dobu 1 h. Po inkubácii bola premývaná 3x po 5 minút v TBS/Tween a vložená na 5 minút do pripraveného chemiluminiscenčného substrátu, pomocou ktorého bol následne v prístroji Li-Cor detekovaný príslušný signál.

Tabuľka č. 3: **Riedenie jednotlivých protilátok**

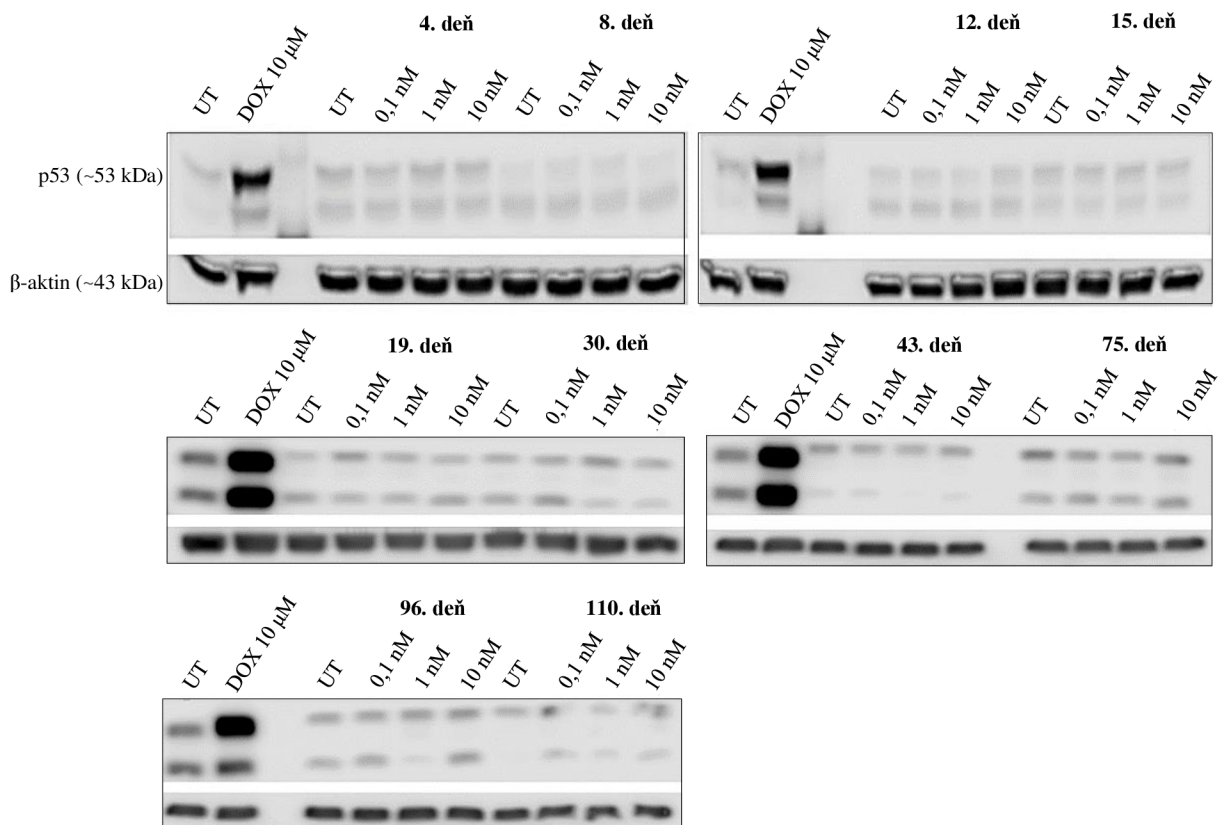
Protilátka	Riedenie
primárna β -aktín, mouse monoclonal	1:2000
primárna CYP1A1, mouse monoclonal	1:500
primárna CYP2A6, mouse monoclonal	1:250
primárna p-53, mouse monoclonal	1:750
primárna p-p53 (S15), rabbit polyclonal	1:1000
sekundárna anti-mouse	1:2000
sekundárna anti-rabbit	1:5000

Po zdetekovaní proteínov bola membrána 5 minút premývaná v roztoku TBS/Tween a následne inkubovaná v 10x nariadenom reblotačnom pufri po dobu 15 minút. Ďalej bola 2x po 5 minút premývaná v 5% mlieku, čím bola pripravená na inkubáciu v 5% BSA s ďalšími protilátkami.

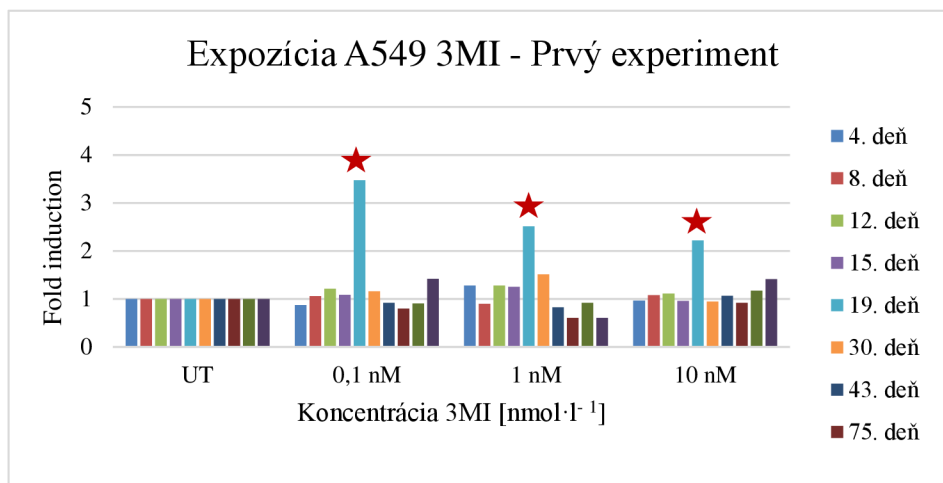
4.3 Výsledky

4.3.1 Detekcia genotoxického markeru poškodenia - p53

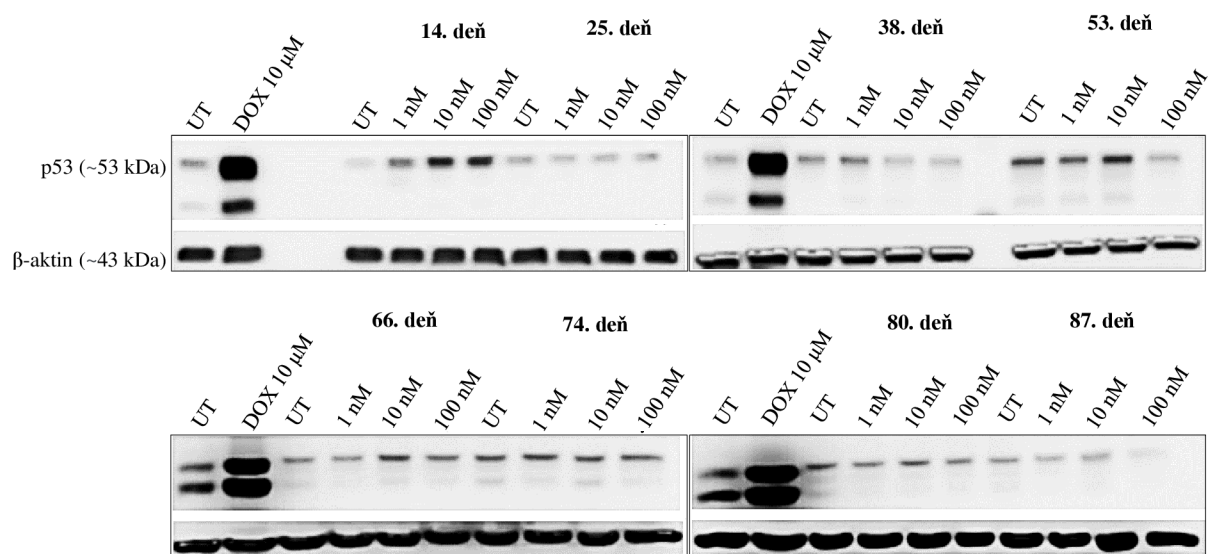
Pomocou Western blot metódy bola zisťovaná cytotoxicita pľúcnych buniek A549 po ich dlhodobom vystavovaní jednotlivými koncentráciami skatolu (3MI). V prvom opakovaní experimentálnej časti boli bunky vystavované počas 16 týždňov koncentračnej rade 0,1 nmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 10 nmol·l⁻¹ (Obrázok č. 7). Pozitívna kontrola doxorubicin (DOX) indukovala proteín p53, ktorý je markerom poškodenia DNA. I keď bol počas 3. týždňa (19. deň) pozorovaný menší nárast v expresii proteínu p53, celkové navýšenie cytotoxicity u buniek pozorované nebolo (Graf č. 1). V druhom opakovaní experimentu boli bunky po dobu 13 týždňov vystavované koncentráciam 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹ (Obrázok č. 8), kedy podobne ako v prvom opakovaní nebolo okrem 2. týždňa (14. deň) pozorované zvýšenie v expresii p53 (Graf č. 2).



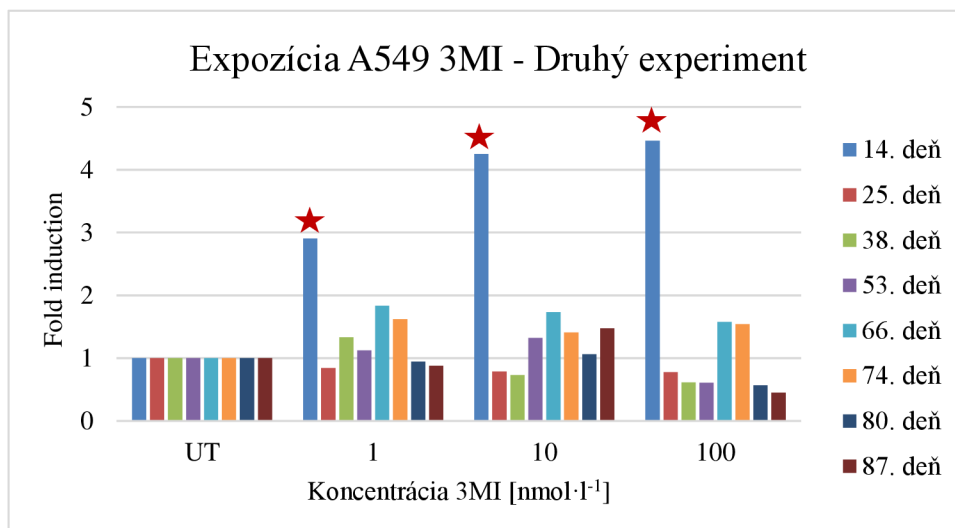
Obrázok č. 7: Efekt 3MI o koncentráciách 0,1 nmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 10 nmol·l⁻¹ na expresiu proteínu p53 u bunečnej línie A549. Obrázok zobrazuje detekciu β-aktinu (43 kDa) a proteínu p53 (53 kDa), u ktorého boli pozorované ďalšie signály v oblasti 50 kDa. Stanovenie expresie týchto proteínov prebiehalo po vystavení bunečnej línie A549 3MI po dobu 16 týždňov. Ako negatívna kontrola (UT) bolo použité DMSO v DMEM médiu (v pomere 1:1000) a ako pozitívna kontrola 10 μmol·l⁻¹ doxorubicin.



Graf č. 1: Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 po vystavení buniek A549 3MI o koncentráciách 0,1 nmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 10 nmol·l⁻¹. Rakovinová bunecná línia A549 vystavená pôsobeniu 3MI po dobu 16 týždňov. Výsledky predstavujú 10 jednotlivých experimentov, vzťahujúcich sa k negatívnej kontrole (UT), ktorá predstavuje hodnotu 1. Ako pozitívna kontrola bol použitý 10μmol·l⁻¹ doxorubicin. Hviezdičkou je označený 3. týždeň (19. deň), počas ktorého došlo k miernemu nárastu exprese proteínu p53 po vystavení buniek 3MI.



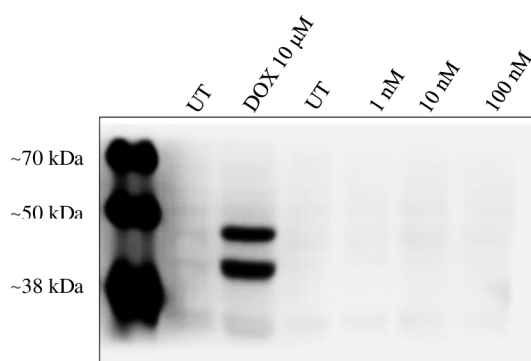
Obrázok č. 8: Efekt 3MI o koncentráciách 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹ na expresiu proteínu p53 u bunecnej línie A549. Obrázok zobrazuje detekciu β-aktínu (43 kDa) a proteínu p53 (53 kDa), u ktorého boli pozorované ďalšie signály v oblasti 50 kDa. Stanovenie exprese týchto proteínov prebiehalo po vystavení bunecnej línie A549 trom rôznym koncentráciám 3MI po dobu 13 týždňov. Ako negatívna kontrola (UT) bolo použité DMSO v DMEM médiu (v pomere 1:1000) a ako pozitívna kontrola 10μmol·l⁻¹ doxorubicin.



Graf č. 2: Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 po vystavení buniek A549 3MI o koncentráciách 1 nmol·l⁻¹, 10 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹. Rakovinová bunčná línia A549 vystavená pôsobeniu 3MI po dobu 13 týždňov. Výsledky predstavujú 10 jednotlivých experimentov, vzťahujúcich sa k negatívnej kontrole (UT), ktorá predstavuje hodnotu 1. Ako pozitívna kontrola bol použitý 10 μmol·l⁻¹ doxorubicin. Hviezdičkou je označený 2. týždeň (14. deň), počas ktorého došlo k miernemu nárastu expície proteínu p53 po vystavení buniek 3MI.

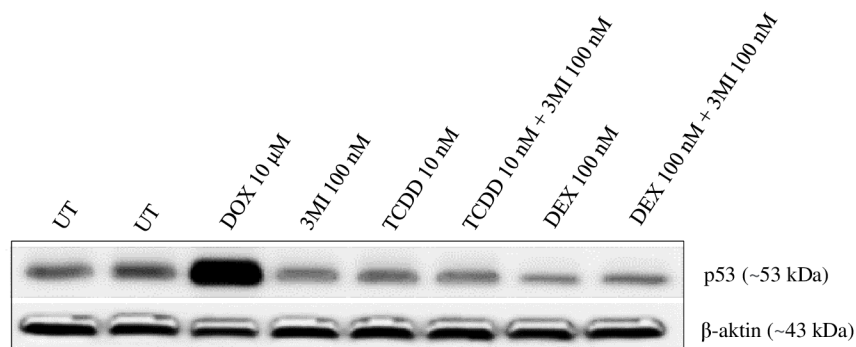
Pri detekcii proteínu p53 boli okrem samotného proteínu pozorované i ďalšie signály v oblasti 50 kDa, ktoré však už ďalej študované neboli. Mohli by však predstavovať niektorú z hypofosforylovaných či splicingových foriem proteínu p53.

Pretože hladina proteínu p53 nebola navýšená ku koncu experimentu, rozhodla som sa zdetekovať fosforylovanú formu p53, čo funguje ako citlivejší marker genotoxického poškodenia. Bola zvolená vzorka z 87. dňa druhého experimentu. Výsledky z Western blot analýzy ukázali, že u bunecnej línie A549 bola detekovaná fosforylovaná forma proteínu p53 na seríne 15 len pre pozitívnu kontrolu, doxorubicin, nie pre skatol. (Obrázok č. 9).

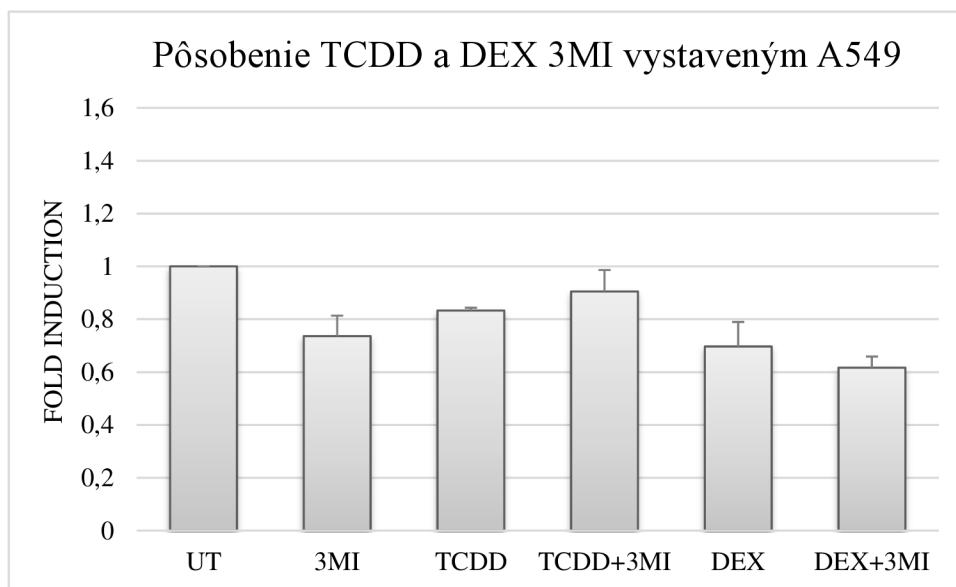


Obrázok č. 9: Western blot detekcia p-p53 (Ser15). Na obrázku je možné vidieť, že u pozitívnej kontroly (DOX), ktorá nebola vystavená 3MI, dochádza u proteínu p53 k fosforylácii na seríne 15.

Proteín p53 bol ďalej detekovaný taktiež u buniek A549, ktoré boli inkubované so $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3MI a s ligandami AhR a GR - TCDD ($10\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a dexametason ($100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (DEX) po dobu 24 h, aby sa zistilo, či táto inkubácia môže viesť ku zmene metabolizmu skatolu a indukovať p53. Výsledky predpôsobenia TCDD a DEX na bunky A549 (Obrázok č. 10, Graf č. 3) ukazujú, že skatol (3MI) znížil hladinu p53, a tá bola len mierne obnovená pôsobením TCDD. Oproti tomu samotný DEX znížil hladinu p53 skoro o 30% a v kombinácii s 3MI nemal žiaden vplyv.



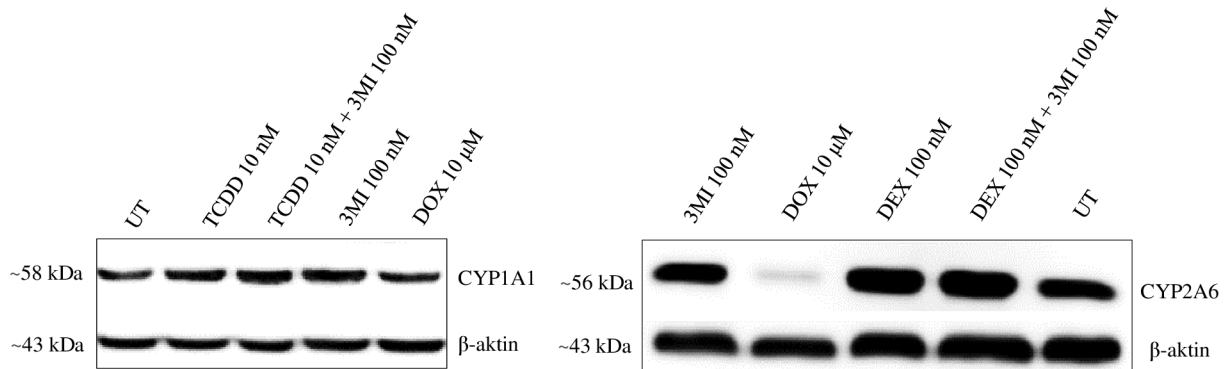
Obrázok č. 10: **Western blot detekcia proteínu p53 u buniek A549 inkubovaných s 3MI, TCDD a DEX.** Obrázok zobrazuje detekciu β-aktinu (43 kDa) a proteínu p53 (53 kDa) u buniek A549 inkubovaných s 3MI ($100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), TCDD ($10\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DEX ($100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Ako negatívna kontrola bol použitý DMSO v DMEM médiu (v pomere 1:1000).



Graf č. 3: **Kvantifikácia western blottingovej detekcie proteínu p53 u buniek A549 inkubovaných s TCDD a DEX s prítomnosťou a bez prítomnosti 3MI.** Bunečná línia A549 bola vystavená pôsobeniu 3MI ($100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), TCDD ($10\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DEX ($100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Následne k nim bol pridaný aj 3MI. Výsledky tohto experimentu sú násobkom negatívnej kontroly (UT), ktorú tvorilo DMSO v DMEM médiu v pomere 1:1000, a ktorá predstavuje hodnotu 1. Výsledky sú priemerom 2 opakovaní a vznikli normalizáciou signálu pre p53 voči signálu pre aktin.

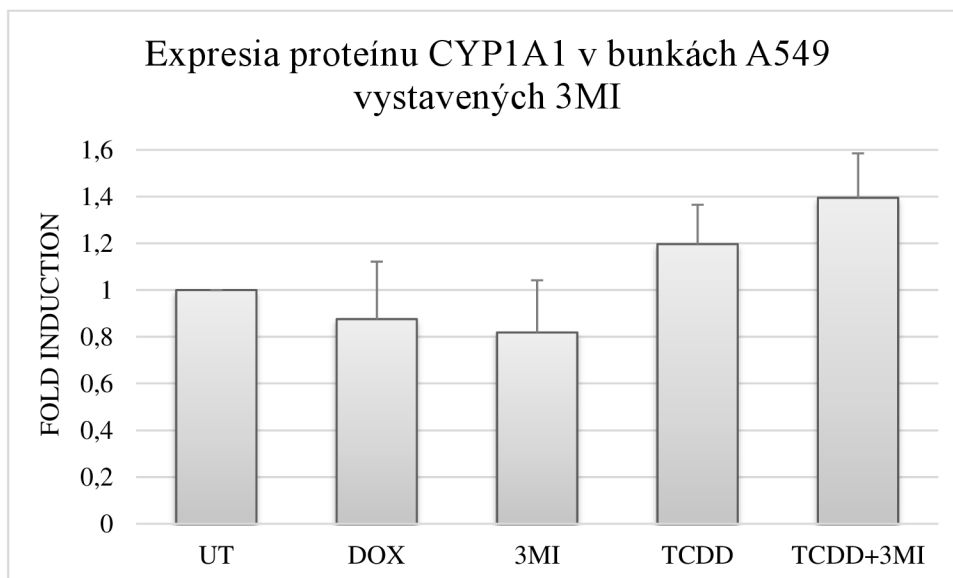
4.3.2 Stanovenie expresie CYP1A1 a CYP2A6 génov

Aby sa preukázala funkčnosť signálnych dráh pre AhR a GR, boli pomocou metódy Western blottingu stanovené hladiny proteínov CYP1A1 a CYP2A6. Tieto proteíny boli detekované v bunkách A549 inkubovaných so $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3MI a agonistami týchto receptorov - TCDD ($10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) pre CYP1A1 a DEX ($100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) pre CYP2A6 po dobu 24 h (Obrázok č. 11).

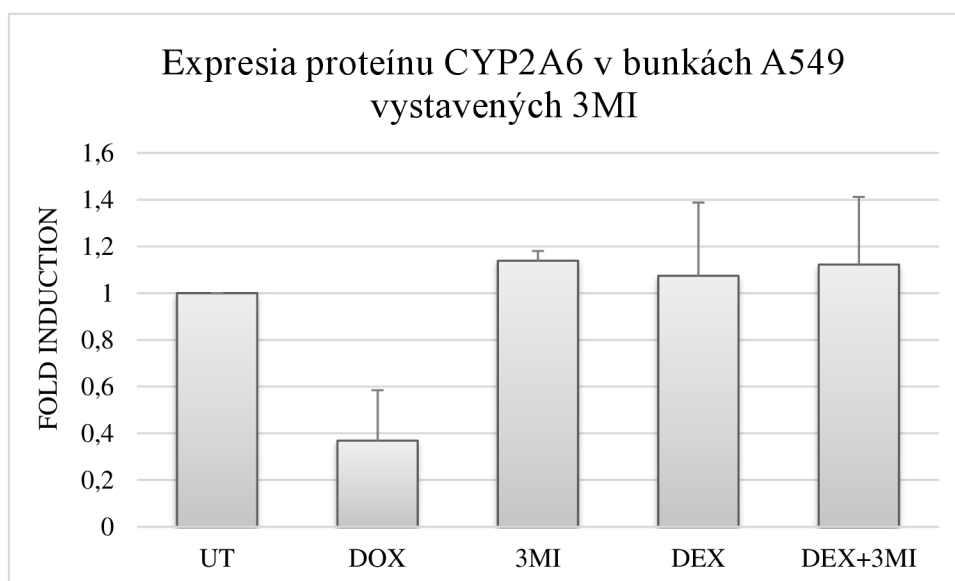


Obrázok č. 11: Western blot detekcia CYP1A1 a CYP2A6 u buniek A549 vystavených 3MI, TCDD a DEX.

Obrázok zobrazuje detekciu β-aktinu (43 kDa) a proteínov CYP1A1 (58 kDa) a CYP2A6 (56 kDa). Proteín CYP1A1 bol detekovaný u buniek A549 inkubovaných s 3MI ($100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a TCDD ($10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a proteín CYP2A6 u buniek inkubovaných s 3MI ($100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DEX ($100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Ako negatívna kontrola bolo použité DMSO v DMEM médiu (v pomere 1:1000).



Graf č. 4: Kvantifikácia expresie proteínu CYP1A1 u buniek A549 vystavených 3MI za pôsobenia TCDD. Bunečná línia A549 bola vystavená pôsobeniu 3MI ($100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a TCDD ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Výsledky tohto experimentu sú násobkom negatívnej kontroly (UT), ktorú tvorilo DMSO v DMEM médiu v pomere 1:1000, a ktorá predstavuje hodnotu 1. Výsledky sú priemerom 2 opakovaní.



Graf č. 5: Kvantifikácie expresie proteínu CYP2A6 u buniek A549 vystavených 3MI za pôsobenia DEX. Bunečná línia A549 bola vystavená pôsobeniu 3MI ($100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DEX ($100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Výsledky tohto experimentu sú násobkom negatívnej kontroly (UT), ktorú tvorilo DMSO v DMEM médiu v pomere 1:1000, a ktorá predstavuje hodnotu 1. Výsledky sú priemerom 2 opakovaní.

Výsledky pôsobenia TCDD a DEX na bunky A549 ukazujú, že zatiaľ čo TCDD len mierne navýšil expresiu proteínu CYP1A1 (Graf č. 4), DEX nemal na hladinu CYP2A6 žiaden vplyv (Graf č. 5), či už sám alebo v kombinácii s 3MI.

5 DISKUSIA

Táto bakalárska práca sa zaoberá otázkou možného genotoxického poškodenia pľúcnych buniek po ich chronickom vystavení skatolu. Skatol je indolová zlúčenina, ktorá je prirodzene vytváraná v hrubom čreve človeka a ktorá je spájaná s výskytom viacerých ochorení. U niektorých prežívavcoch malo vystavenie skatolu (30–40 mg/kg) dokonca fatálne účinky pneumotoxického charakteru.

Genotoxické poškodenie vyvolané skatolom o koncentračnej rade $0,1\text{--}100\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, malo byť u pľúcnych buniek A549 reprezentované indukciou proteínu p53, no okrem pozitívnej kontroly, doxorubicinu, skatol nemal na indukciu p53 takmer žiaden vplyv. Mierne navýšenie expresie proteínu p53 počas 3. týždňa (1. opakovanie) a 2. týždňa (2. opakovanie) ďalej študované nebolo, no keďže k ďalšiemu navýšeniu už nedošlo, je možné, že u bunkovej línie A549 mohlo dôjsť k vytvoreniu určitého druhu rezistencie voči použitým koncentráciám skatolu. Zo získaných výsledkov, genotoxický účinok skatolu na bunky línie A549 tak potvrdený nebol. Avšak, štúdie Nichols *et al.*, (2003) a Weems *et al.*, (2010) potvrdili skatolom-sprostredkované poškodenie u bunkových línií BEAS-2B či NHBE, ktoré však boli namiesto chronickej expozície jednorazovo inkubované s $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolom. Možným dôvodom, prečo toto poškodenie nebolo detekované u bunkovej línie A549 môže byť jednak rádový rozdiel v použitých koncentráciách skatolu, ako aj rozdiel v samotnej expozícii buniek skatolom. Ďalším dôvodom môže byť i pôvod jednotlivých bunkových línií. Na rozdiel od fyziologických bronchiálnych BEAS-2B a NHBE buniek, A549 sú patologickou líniou odvodenou z ľudského pľúcneho adenokarcinómu a predstavujú model alveolárnych buniek typu II. Okrem detekcie proteínu p53 som vo výsledkoch z Western blot metódy pozorovala i ďalšie signály v oblasti 50 kDa, ktoré podľa štúdie Filyak *et al.*, (1999) môžu predstavovať buď hypofosforylované alebo mutantné formy proteínu p53. Ako citlivejší marker aktivácie proteínu p53 sa občas využíva jeho špecifickej fosforylácie, ktorá reguluje stabilitu a aktivitu proteínu p53. Výsledky ukázali, že u bunkovej línie A549 bola detekovaná fosforylácia proteínu p53 na seríne 15, avšak iba u pozitívnej kontroly, doxorubicinu. Nebolo tak dokázané, že by skatol u bunkovej línie A549 spôsobil genotoxické poškodenie týchto buniek. V štúdií Weems *et al.*, (2010) však na bronchiálnych bunkách NHBE detekovali po 1 h od ich expozície $0,1\text{--}10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolu nielen zvýšenie jadrovej lokalizácie proteínu p53, ale aj zvýšenie fosforylácie jeho serínu 20.

Pre verifikáciu, či na pôsobenie skatolu nemajú vplyvu i niektoré biotranformačné enzýmy, bola sledovaná indukcia proteínov CYP1A1 a CYP2A6 po vystavení bunkovej línie A549 TCDD a DEX. TCDD je látka, ktorá sa prostredníctvom aktivácie AhR podieľa

na viacerých rakovinových procesoch v tele človeka. Po vystavení buniek A549 $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD bolo pozorované len mierne navýšenie v expresii proteínu CYP1A1, ktoré bolo najväčšie práve u buniek vystavených ako samotnému TCDD, tak aj s jeho kombináciou so skatolom. Napriek tomu, že tieto výsledky boli získané len z dvoch experimentov a sledované rozdiely v indukcii proteínu CYP1A1 neboli nijak významné, dokazujú, že skatol u bunkovej línie A549 indukuje prostredníctvom AhR expresiu biotransformačného enzýmu CYP1A1. Táto skutočnosť bola potvrdená i v štúdií Weems *et al.*, (2010) u bronchiálnych buniek BEAS-2B. Bunky A549 boli ďalej vystavené DEX o $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrácii. Dexametason je glukokortikoid aktivujúci GR, ktorého terapeutickým účinkom patrí liečba viacerých autoimúnnych a zápalových ochorení. Po 24 h pôsobení DEX na bunky A549 nebolo pozorované navýšenie v expresii proteínu CYP2A6, dokonca ani v kombinácii DEX

so skatolom. Táto skutočnosť môže súvisieť i s možnou fyziologickou prítomnosťou enzýmov II. fáze biotransformácie v bunkovej línii A549, ktoré môžu skatol metabolizovať ešte predtým, než vznikne jeho genotoxický metabolit, 3-metylenindolenin. Prítomnosť enzýmov II. fáze biotransformácie v bunkách A549 bola dokázaná i v štúdií Castell *et al.*, (2005). Funkčnosť GR dráhy tak síce v tomto výskume potvrdená nebola, no zo štúdií Greenberg *et al.*, (2002) a Patki *et al.*, (2014) je zrejmé, že u bunkovej línie A549 je GR dráha funkčná.

V tejto práci bolo taktiež zisťované, či preinkubácia buniek A549 s $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DEX a $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolom, vyvolá indukciu genotoxického produktu, p53. Výsledky ukázali, že i napriek funkčným AhR a GR dráham v línii A549, 24 hodinová indukcia p53 vyvolaná nebola, naopak, u buniek vystavených skatolu mierne poklesla. Potlačenie tohto efektu bolo pozorované u buniek preinkubovaných s TCDD, no toto navýšenie nebolo nijak významné. Najväčšie zníženie bazálnej hladiny p53 v rámci tohto výskumu bolo pozorované u buniek preinkubovaných s DEX, čo môže súvisieť s jeho pôsobením na aktivitu proteínu p53. V štúdií Sengupta *et al.*, (2000), bol na bunkách neuroblastómu (NB) skúmaný negatívny cross-talk medzi proteínom p53 a dexametason-aktivovaným GR, kde sa potvrdila ich vzájomná antagonistická aktivita.

I keď táto štúdia nepreukázala vplyv chronickej expozície skatolu na poškodenie pľúcnych buniek A549, tieto výsledky sú spájané len s použitou bunkovou líniiou. Pre získanie adekvátnych výsledkov, ktoré by potvrdili či vyvrátili možnosť genotoxického vplyvu skatolu na pľúcne bunky, by bolo nutné vykonať ďalšie výskumy, najlepšie na bunkách fyziologických bunkových línii, poprípade buniek, ktoré sú súčasťou komplexnejšieho 3D modelu.

6 ZÁVER

V mojej bakalárskej práci som sa zaoberala možným genotoxickým poškodením pľúcnych buniek A549 po ich chronickej expozícii skatolom. Pľúcne bunky A549 boli vystavené skatolu v dvoch opakovaniach, každé v inej koncentračnej rade. V prvom opakovaní boli bunky inkubované s $0,1\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolom a jeho efekt na bunky A549 bol prostredníctvom Western blot metódy pozorovaný v indukcii proteínu p53. K mierne zvýšenej indukcii p53 došlo len počas 19. dňa od expozície buniek skatolu, avšak toto navýšenie nebolo nijak signifikantné. V druhom opakovaní boli bunky vystavené $1\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolu, no k indukcii proteínu p53 však okrem 14. dňa od expozície nedošlo. V rámci tejto práce sa tak nepotvrdilo, že by skatol vyvolával genotoxické poškodenie pľúcnych buniek. Bunky A549 preinkubované s $1\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolom boli ďalej testované pre fosforylované formy proteínu p53, kedy bola detekovaná fosforylácia iba na seríne 15, avšak iba u pozitívnej kontroly (DOX). Pre stanovenie aktivity AhR a GR boli bunky A549 preinkubované s $10\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DEX a $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ skatolom po dobu 24 h. Následne bola Western blot metódou detekovaná indukcia proteínov CYP1A1 a CYP2A6. Zatiaľ čo TCDD len mierne navýšil hladinu proteínu CYP1A1, u buniek preinkubovaných s DEX k indukcii proteínu CYP2A6 nedošlo. U takto preinkubovaných buniek bol napokon detekovaný i proteín p53. Výsledky však nepotvrdili, že by inkubácia s týmito látkami vyvolala indukciu proteínu, naopak, u buniek vystavených DEX došlo k miernemu zníženiu jeho bazálnej hladiny. Pre jasné vyvrátenie hypotézy, že chronická expozícia skatolom genotoxicky poškodzuje pľúcne bunky, je však nutný ďalší výskum. Ciele bakalárskej práce boli splnené.

7 LITERATURA

- Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami T. H., Fujino J., Kitagawa H., Miller C. A. III., Kato T., Saeki K., Matsuda T. (2001): Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine. *The Journal of Biological Chemistry*, **(276(34))**:31475-31478).
- Androutsopoulos V. P., Tsatsakis A. M., Spandidos D. A. (2009): Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, **9(1)**.
- Barnes P. J., Pedersen S., Busse W. W. (1998): Efficacy and Safety of Inhaled Corticosteroids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **157(3)**, S1- S53.
- Barouki R., Aggerbeck M., Aggerbeck L., Coumoul X. (2012): The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **27(1)**.
- Beischlag T. V., Morales J. L., Hollingshead B. D., Perdew G. H. (2008): The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, **18(3)**, 207-250.
- Beischlag T. V., Morales J. L., Hollingshead B. D., Perdew G. H. (2008): The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, **18(3)**, 207-250.
- Beresford A. P. (2008): CYP1A1: Friend or Foe?. *Drug Metabolism Reviews*, **25(4)**, 503-517.
- Bersten D. C., Sullivan A. E., Peet D. J., Whitelaw M. L. (2013): BHLH-PAS proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **13(12)**, 827-841.
- Bertoli C., Skotheim J. M., de Bruin, R. A. M. (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14(8)**, 518-528.
- Blankenship A., Matsumura F. (1997): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) causes an Ah receptor-dependent and ARNT-independent increase in membrane levels and activity of p60Src. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **3(3)**, 211-220.
- Bledsoe R. K., Montana V. G., Stanley T. B., Delves C. J., Apolito C. J., McKee D. D., Consler T. G., Parks D. J., Stewart E. L., Willson T. M., Lambert M. H., Moore J. T., Pearce K. H., Xu H. E. (2002): Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator

- Recognition. *Cell*, **110**(1), 93-105.
- Bock K. W. (2017): Human and rodent aryl hydrocarbon receptor (AHR): from mediator of dioxin toxicity to physiologic AHR functions and therapeutic options. *Biological Chemistry*, **398**(4), 455-464.
- Brambilla E., Gazdar A. (2009): Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal*, **33**(6), 1485-1497.
- Brandt J. P., Mandiga P. (2023): Histology, Alveolar Cells. *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Briguglio M., Hrelia S., Malaguti M., Serpe L., Canaparo R., Dell'Osso B., Galentino R., De Michele S., Dina C. Z., Porta M., Banfi G. (2018): Food Bioactive Compounds and Their Interference in Drug Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profiles. *Pharmaceutics*, **10**(4).
- Cantin A. M., North S. L., Hubbard R. C., Crystal R. G. (1987): Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *Journal of Applied Physiology*, **63**(1), 152-157.
- Castell J. V., Teresa Donato M., Gómez-Lechón M. J. (2005): Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **57**, 189-204.
- Castranova V., Rabovsky J., Tucker J. H., Miles P. R. (1988): The alveolar type II epithelial cell: A multifunctional pneumocyte. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **93**(3), 472-483.
- Čihák, R. (2016): Anatomie 2 (3. vyd). Grada Publishing, Praha.
- Dasgupta P., Kinkade R., Joshi B., DeCook C., Haura E., Chellappan S. (2006): Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(16), 6332-6337.
- 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.
- Deslandes B., Gariépy C., Houde A. (2001): Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production. *Livestock Production Science*, **71**(2-3), 193-200.
- Dong B., Cheng W., Li W., Zheng J., Wu D., Matsumura F., Vogel C. F. A. (2011): FRET

- analysis of protein tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1810**(4), 427-431.
- E.S. Mosa F., O.S. El-Kadi A., Barakat K. (2022): Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR): A Review of the In-Silico Screening Approaches to Identify AhR Modulators. In S. K. Saxena (Ed.), *High-Throughput Screening for Drug Discovery*. IntechOpen.
- Filyak O.S., Stoika R.S. (1999): Comparative study of p53 expression in human carcinoma cell lines A549 and MCF7 under anticancer drug treatment. *Ukr Biokhim Zh.* 2005 Mar-Apr;**77**(2):136-40.
- Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. (2018): Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**.
- Garrod D., Chidgey M. (2008): Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1778**(3), 572-587.
- Goodsell D. S. (1999): The Molecular Perspective: p53 Tumor Suppressor. *STEM CELLS*, **17**(3), 189-190.
- Greenberg A. K., Hu J., Basu S., Hay J., Reibman J., Yie T. -an, Tchou-Wong K. M., Rom W. N., Lee T. C. (2002): Glucocorticoids Inhibit Lung Cancer Cell Growth through Both the Extracellular Signal-Related Kinase Pathway and Cell Cycle Regulators. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **27**(3), 320-328.
- Grossman S. R., Perez M., Kung A. L., Joseph M., Mansur C., Xiao Z.-X., Kumar S., Howley P. M., Livingston D. M. (1998): P300/MDM2 Complexes Participate in MDM2-Mediated p53 Degradation. *Molecular Cell*, **2**(4), 405-415.
- Gutiérrez-Vázquez C., Quintana F. J. (2018): Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, **48**(1), 19-33.
- Haschek W. M., Rousseaux C. G., Wallig M. A. (2002): Handbook of Toxicologic Pathology (2nd ed.). Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hasler J. A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J. R., Farrell G., Kaminsky L. S., Spivack S. D., Boitier E., Beaune P. (1999): Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, **20**(1), 1–137.
- Hu W., Sorrentino C., Denison M. S., Kolaja K., Fielden M. R. (2007): Induction of Cyp1a1

- Is a Nonspecific Biomarker of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation: Results of Large Scale Screening of Pharmaceuticals and Toxicants in Vivo and in Vitro. *Molecular Pharmacology*, **71**(6), 1475-1486.
- Hubbard T. D., Murray I. A., Bisson W. H., Lahoti T. S., Gowda K., Amin S. G., Patterson A. D., Perdew G. H. (2015): Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports*, **5**(1).
- Chao C. (2000): p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *The EMBO Journal*, **19**(18), 4967-4975.
- Chaudhry R., Bordoni B. (2022): Anatomy, Thorax, Lungs. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Chen G., Cue R.-A., Lundstrom K., Wood J. D., Doran O. (2007): Regulation of CYP2A6 Protein Expression by Skatole, Indole, and Testicular Steroids in Primary Cultured Pig Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(1), 56-60.
- Chrousos G. P., Kino T. (2005): Intracellular Glucocorticoid Signaling: A Formerly Simple System Turns Stochastic. *Science's STKE*, **2005**(304).
- Ikuta T., Kobayashi Y., Kawajiri K. (2004): Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **317**(2), 545-550.
- Isobe M., Emanuel B. S., Givol D., Oren M., Croce C. M. (1986): Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, **320**(6057), 84-85.
- Jayaraman L., Prives C. (1999): Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **55**(1), 76-87.
- Ji Ram V., Sethi A., Nath M., Pratap R. (2019): Five-Membered Heterocycles. *In The Chemistry of Heterocycles* (pp. 149-478). Elsevier.
- Kaelin W. (1999): The p53 gene family. *Oncogene*, **18**, 7701-7705.
- Kern S. E., Kinzler K. W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C., Vogelstein, B. (1991): Identification of p53 as a Sequence-Specific DNA-Binding Protein. *Science*, **252**(5013), 1708-1711.

- Kim H., Kim K., Choi J., Heo K., Baek H. J., Roeder R. G., An W. (2012): p53 Requires an Intact C-Terminal Domain for DNA Binding and Transactivation. *Journal of Molecular Biology*, **415**(5), 843-854.
- Kim J. (2004): Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **199**(3), 210-219.
- Kirkland J. B., Bray T. M. (1989): Impaired surfactant function in 3-methylindole-induced lung injury in goats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **94**(2), 591-593.
- Koga J., Adachi T., Hidaka H. (1992): Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(22), 15823-15828.
- Kumar R., Thompson E. B. (2005): Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **94**(5), 383-394.
- Lamb P., Crawford L. (1986): Characterization of the human p53 gene. *Molecular and Cellular Biology*, **6**(5), 1379-1385.
- Lau S. K. P., Woo P. C. Y., Fung A. M. Y., Chan K. -man, Woo G. K. S., Yuen K. -yung. (2004): Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Medical Microbiology*, **53**(12), 1247-1253.
- Levine A. J. (1997): p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, **88**(3), 323-331.
- Liu D., Wei Y., Liu X., Zhou Y., Jiang L., Yin J., Wang F., Hu Y., Nanjaraj Urs A. N., Liu Y., Ang E. L., Zhao S., Zhao H., Zhang Y. (2018): Indoleacetate decarboxylase is a glyceryl radical enzyme catalysing the formation of malodorous skatole. *Nature Communications*, **9**(1).
- Ma Q., Meng N., Li Y., Wang J. (2021): Occurrence, impacts, and microbial transformation of 3-methylindole (skatole): A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, **416**.
- MacKinnon A. C., Kopatz J., Sethi T. (2010): The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *British Medical Bulletin*, **95**(1), 47-61.
- Mescher A. L. (2018): *Junqueirovy základy histologie* (14th ed.). Galén, Praha.

- Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. (2003): Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1619**(3), 263-268.
- Minna J. D., Roth J. A., Gazdar A. F. (2002): Focus on lung cancer. *Cancer Cell*, **1**(1), 49-52.
- 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.
- Nader N., Chrousos G. P., Kino, T. (2009): Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *The FASEB Journal*, **23**(5), 1572-1583.
- Nicolaides N. C., Charmandari E., Chrousos G. P. (2018): Glucocorticoid Receptor. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (pp. 104-111).
- Nichols W. K. (2003): 3-Methylindole-Induced Toxicity to Human Bronchial Epithelial Cell Lines. *Toxicological Sciences*, **71**(2), 229-236.
- Nichols W. K., Bossio J. I., Yost G. S. (2000): 3-Methylindole causes both apoptosis and necrosis in cultured human lung cells. *Toxicol. Sci.* **54**(Suppl.), 114 (Abstract).
- Nichols W. K., Larson D. N., Yost G. S. (1990): Bioactivation of 3-methylindole by isolated rabbit lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **105**(2), 264-270.
- Noppen M., De Keukeleire T. (2008): Pneumothorax. *Respiration*, **76**(2), 121-127.
- Oakley R. H., Cidlowski J. A. (2013): The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **132**(5), 1033-1044.
- Onica T., Nichols K., Larin M., Ng L., Maslen A., Dvorak Z., Pascussi J.-M., Vilarem M. -J., Maurel P., Kirby, G. M. (2007): Dexamethasone-Mediated Up-Regulation of Human CYP2A6 Involves the Glucocorticoid Receptor and Increased Binding of Hepatic Nuclear Factor 4 α to the Proximal Promoter. *Molecular Pharmacology*, **73**(2), 451-460.
- Oren M., Rotter V. (1999): Introduction: p53 – the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **55**(1), 9-11.
- Ose R., Hirano K., Maeno S., Nakagawa J., Salminen S., Tochio T., Endo A. (2018): The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means for microbiota modulation?. *Anaerobe*, **51**, 110-119.

- Patki M., Gadgeel S., Huang Y., McFall T., Shields A. F., Matherly L. H., Bepler G., Ratnam M. (2014): Glucocorticoid Receptor Status Is a Principal Determinant of Variability in the Sensitivity of Non–Small-Cell Lung Cancer Cells to Pemetrexed. *Journal of Thoracic Oncology*, **9**(4), 519-526
- Patwa A., Shah A. (2015): Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian Journal of Anaesthesia*, **59**(9).
- Pietsch E. C., Sykes S. M., McMahon S. B., Murphy M. E. (2008): The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*, **27**(50), 6507-6521.
- Powell J. (2018): Constitutive Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in Prostate Cancer Progression. *Journal of Cancer Treatment and Diagnosis*, **2**(5), 11-16.
- Qu H., Meng N., Liu S., Wang J., Sun Y., Ma Q. (2020): Bacterial and fungal community compositions and structures of a skatole-degrading culture enriched from pig slurry. *3 Biotech*, **10**(11).
- Rasmussen M. K., Balaguer P., Ekstrand B., Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S., Ryffel, B. (2016): Skatole (3-Methylindole) Is a Partial Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist and Induces CYP1A1/2 and CYP1B1 Expression in Primary Human Hepatocytes. *PLOS ONE*, **11**(5).
- Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I. M., De Bosscher K. (2013): How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **380**(1-2), 41-54.
- Reichardt H. M., Kaestner K. H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schütz G. (1998): DNA Binding of the Glucocorticoid Receptor Is Not Essential for Survival. *Cell*, **93**(4), 531-541.
- Rothhammer V., Quintana F. J. (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, **19**(3), 184-197.
- Rowlands J. C., McEwan I. J., Gustafsson J. A. (1996): Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: Direct interactions with basal transcription factors. *Molecular Pharmacology*, **50**(3), 538–548.
- Rubins J. B. (2003): Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **167**(2), 103-104.

- Sekido Y., Fong K. M., Minna J. D. (2003): Molecular Genetics of Lung Cancer. *Annual Review of Medicine*, **54**(1), 73-87.
- Sengupta S., Vonesch J.-L., Waltzinger C., Zheng H., Wasylyk B. (2000): Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *The EMBO Journal*, **19**(22), 6051–6064.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, **360**(1).
- Shimada T., Guengerich F. P. (2006): Inhibition of Human Cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-Mediated Activation of Procarcinogens to Genotoxic Metabolites by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, **19**(2), 288-294.
- Schaal C., Chellappan S. P. (2014): Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Tumor Progression in Smoking-Related Cancers. *Molecular Cancer Research*, **12**(1), 14-23.
- Schulte K. W., Green E., Wilz A., Platten M., Daumke O. (2017): Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation. *Structure*, **25**(7), 1025-1033.e3.
- Šrejber M., Navrátilová V., Paloncýová M., Bazgier V., Berka K., Anzenbacher P., Otyepka M. (2018): Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **183**, 117-136.
- Terjung R. L. (2011): *Comprehensive Physiology*. John Wiley and Sons, Bethesda, Maryland.
- Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. (2005): Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol Rep* **57**, 143–153
- Vyhlídalová B., Krasulová K., Pečínková 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).
- Wagner P. D. (2007): Pulmonary gas exchange. *Respirology*, **12**(s2), S6-S8.
- Wang X., Gibson G. R., Costabile A., Sailer M., Theis S., Rastall R. A., McBain A. J. (2019): Prebiotic Supplementation of In Vitro Fecal Fermentations Inhibits Proteolysis by Gut

- Bacteria, and Host Diet Shapes Gut Bacterial Metabolism and Response to Intervention. *Applied and Environmental Microbiology*, **85**(9), e02749-18.
- Weems J. M., Cutler N. S., Moore C., Nichols W. K., Martin D., Makin E., Lamb J. G., Yost G. S. (2009): 3-Methylindole is Mutagenic and a Possible Pulmonary Carcinogen. *Toxicological Sciences*, **112**(1), 59-67.
- Weems J. M., Lamb J. G., D'Agostino J., Ding X., Yost G. S. (2010): Potent Mutagenicity of 3-Methylindole Requires Pulmonary Cytochrome P450-Mediated Bioactivation: A Comparison to the Prototype Cigarette Smoke Mutagens B(a)P and NNK. *Chemical Research in Toxicology*, **23**(11), 1682-1690.
- Weems J. M., Yost G. S. (2010): 3-Methylindole Metabolites Induce Lung CYP1A1 and CYP2F1 Enzymes by AhR and Non-AhR Mechanisms, Respectively. *Chemical Research in Toxicology*, **23**(3), 696-704.
- Werner S., Brönnegård M. (1996): Molecular basis of glucocorticoid-resistant syndromes. *Steroids*, **61**(4), 216-221.
- Wu D., Potluri N., Kim Y., Rastinejad F. (2013): Structure and Dimerization Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor PAS-A Domain. *Molecular and Cellular Biology*, **33**(21), 4346-4356.
- Yan Y., Li H., Li S., Liu S., Jia N., Liu Y., Liu Q., Li J., Han C. (2022): *Olsenella uli*-induced pneumonia: a case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **21**(1).
- Yokota S.-I., Higashi E., Fukami T., Yokoi T., Nakajima, M. (2011): Human CYP2A6 is regulated by nuclear factor-erythroid 2 related factor 2. *Biochemical Pharmacology*, **81**(2), 289-294.
- Yokoyama M. T., Carlson J. R. (1979): Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **32**(1), 173-178.
- Yost G. S. (1989): Mechanisms of 3-methylindole pneumotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, **2**(5), 273-279.
- Zgajnar N., De Leo S., Lotufo C., Erlejman A., Piwien-Pilipuk G., Galigniana M. (2019): Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52. *Biomolecules*, **9**(2).

Zgarbová E., Vrzal R. (2023): Skatole: A thin red line between its benefits and toxicity. *Biochimie*, **208**, 1-12.

Internetové zdroje:

GeneCards. [online] [navštívené 27.3.2023] Dostupné <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2A6#:~:text=GeneCards%20Summary%20for%20CYP2A6%20Gene,biotransformation%20Phase%20I%20and%20II.>

Medical News Today [online] [14.6.2022] Dostupné z https://www.medicalnewstoday.com/articles/305190?fbclid=IwAR3jNL51Y0YtnwraZaFjTkkhVo0BW7jeEVd1PbznY_-206v_AbUjUa4-vPQ

UniProt. [online] [navštívené 25.3.2023] Dostupné z <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A853/entry#function>

WebMD [online] [11.6.2022] Dostupné z <https://www.webmd.com/lung/picture-of-the-lungs>