

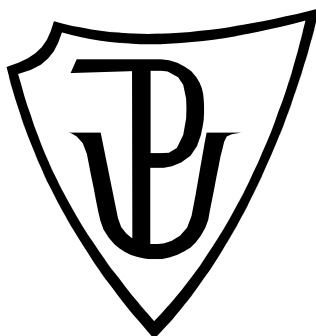
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2022**

**Jakub Huška**

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



**Účinky střevních mikrobiálních katabolitů  
na aryluhlovodíkový receptor**

**Bakalářská práce**

**Jakub Huška**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

**Vedoucí práce: Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.**

## Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Jakub HUŠKA**  
Osobní číslo: **R19832**  
Adresa: **Cihelna II 602, Konice, 79852 Konice, Česká republika**  
Téma práce: **Účinky mikrobiálních střevních katabolitů na aryluhlovodíkový receptor**  
Téma práce anglicky: **Effects of gut microbial catabolites on the aryl hydrocarbon receptor**  
Vedoucí práce: **Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru metodou reporter gene assay
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

### Seznam doporučené literatury:

Dvorak, Z. et al. (2020). Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *Embo Molecular Medicine* 12(4)  
Dvorak, Z., Sokol, H. & Mani, S. (2020). Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends Pharmacol Sci* 41(12): 900-908  
Roager, H. M. & Licht, T. R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* 9.  
Vyhliďalova, B. et al. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Internal Journal of Molecular Sciences* 21(7).

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení:** Jakub Huška

**Název práce:** Účinky střevních mikrobiálních katabolitů na aryluhlovodíkový receptor

**Typ práce:** Bakalářská

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

**Vedoucí práce:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2022

**Klíčová slova:** Aryluhlovodíkový receptor, biotransformace, střevní katabolity, Reporter Gene Assay

**Počet stran:** 41

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

**Souhrn:** Tato bakalářská práce se zabývá účinkem binární směsi indolu (IND) a indol-3-propionové kyseliny (IPA) na aryluhlovodíkový receptor (AhR). Teoretická část se zabývá biotransformací a jadernými receptory se zaměřením na aryluhlovodíkový receptor. Dále je zde také pojednáno o střevním mikrobiomu, zánětlivých onemocněních, které postihují gastrointestinální trakt a tryptofanu a jeho metabolitech. V experimentální části byl sledován účinek binární směsi IND a IPA na AhR metodou Reporter Gene Assay a zjišťována cytotoxicita na buněčnou linii LS174T-AhR metodami MTT a Neutral Red. Zatímco samotný indol zvyšoval transkripční aktivitu AhR po 4 hodinách podobně jako modelový ligand TCDD, účinek IPA byl nízký. Účinek látek společně v podobě binárních směsí s různými poměry koncentrací nevykazovaly potenciální synergický účinek na studovaný receptor pravděpodobně z důvodu vysoké efektivity samotného IND na AhR, který byl již pravděpodobně saturován.

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Jakub Huška

**Title:** Effects of gut microbial catabolites on the aryl hydrocarbon receptor

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

**Supervisor:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2022

**Keywords:** Aryl hydrocarbon receptor, Biotransformation, Gut catabolites, Reporter Gene Assay

**Number of pages:** 41

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

**Summary:** This bachelor's thesis deals with the effect of binary mixtures of indole (IND) and indole-3-propionic acid (IPA) on the aryl hydrocarbon receptor (AhR). The theoretical part deals with biotransformation and nuclear receptors with a focus on the aryl hydrocarbon receptor. There is discussed the intestinal microbiome, inflammatory diseases affecting the gastrointestinal tract, and tryptophan and its metabolites. The experimental part monitors the effect of the binary mixtures of IND and IPA on the AhR using the Reporter Gene Assay, and cytotoxicity on the LS174T-AhR cell line was determined using the MTT and Neutral Red Assays. While indole alone increased AhR transcriptional activity similarly to the model ligand TCDD after four hours treatment the effect of IPA was low. The effect of the substances together in the form of binary mixtures with different concentration ratios did not show a potential synergistic effect on the studied receptor, probably due to the high efficiency of the IND alone on the AhR, which was probably already saturated.

### **Prohlášení**

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

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis

## **Poděkování**

Děkuji Mgr. Anetě Vrzalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracovávání této bakalářské práce. Poděkování náleží i mé rodině a přátelům za vytrvalou pomoc a podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	3
3.1	Biotransformace.....	3
3.2	Jaderné receptory .....	4
3.2.1	Aryluhlovodíkový receptor .....	5
3.3	Střevní mikrobiom.....	9
3.4	Mikrobiota a nemoci gastrointestinálního traktu - Idiopatické střevní záněty .....	10
3.4.1	Metabolismus tryptofanu.....	13
4	MATERIÁL A METODY .....	18
4.1	Materiál.....	18
4.1.1	Biologický materiál .....	18
4.1.2	Použité chemikálie .....	18
4.1.3	Testované látky .....	19
4.1.4	Složení použitých roztoků.....	19
4.1.5	Seznam laboratorních zařízení a přístrojů.....	19
4.2	METODIKA .....	20
4.2.1	Kultivace buněk.....	20
4.2.2	Pasážování buněk .....	20
4.2.3	Počítání buněk .....	20
4.2.4	Vysévání buněk .....	21
4.2.5	Analýza koncentrace indolu a IPA v kolonoskopických aspirátech .....	21
4.2.6	Příprava zásobních roztoků použitých látek.....	21
4.2.7	Stanovení viability buněčné linie .....	24
4.2.8	Reporter gene assay.....	25
5	VÝSLEDKY .....	26
5.1	Testování vlivu vybraných látek na viabilitu buněk buněčné linie LS174T-AhR ....	26



5.2	Testování vlivu vybraných látek a jejich kombinací na transkripční aktivitu AhR ..	29
6	DISKUSE .....	35
7	ZÁVĚR.....	37
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	38

## Seznam symbolů a zkratk

ABC	ATP vazebná doména
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AhRR	represor aryluhlovodíkového receptoru
AIP	AhR-interagující protein
ARNT	jaderný translokátor pro aryluhlovodíkový receptor
ATP	adenosin trifosfát
bHLH	bazický helix-smyčka-helix
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CD	Crohnova choroba
C-SRC	tyrozin kináza
CYP	cytochrom P450
DMEM	komerční médium
DMSO	dimethyl sulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GIT	gastrointestinální trakt
GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutathion-S-transferáza
HSP90	protein teplotního šoku o velikosti 90 kDa
IBD	idiopatické střevní záněty
IFN- $\gamma$	interferon gama
IgA	imunoglobulin A
IL	interleukin

IPA	indol-3-propionová kyselina
LBD	ligand vazebná doména
MTT	methyltetrazoliová sůl
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NEAA	neesenciální aminokyseliny
NF $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NR	neutrální červeň
PAH	polyaromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	fosfátový pufr
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor kyseliny retinové
RXR	retinoidní X receptor
SLC	přenašeč rozpuštěných látek
TCDD	2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Th	T-lymfocytů
TLR	receptor podobný genu Toll
UC	ulcerózní kolitida
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
VDR	vitamin D receptor
XAP2	X asociovaného proteinu 2
XRE	responzivní element xenobiotik

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Obecná struktura jaderných receptorů. Převzato z článku (Aranda et Pascual, 2001).....	5
<b>Obrázek 2:</b> Kanonická cesta AhR. Převzato z článku (Zhu et al, 2019).....	7
<b>Obrázek 3:</b> Chemická struktura L-tryptofanu. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich.....	14
<b>Obrázek 4:</b> Chemická struktura indolu. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich ....	14
<b>Obrázek 5:</b> Chemická struktura indol-3-propionové kyseliny. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich .....	15
<b>Obrázek 6:</b> Metabolismus tryptofanu. Převzato z článku (Agus et al, 2018).....	16
<b>Obrázek 7:</b> Schematické znázornění účinků indolu a jeho derivátů syntetizovaných střevním mikrobiotou na komunikaci mezi mikroby a účinky bakteriálních metabolitů ve tkáni hostitele. Převzato z článku (Tennoune et al, 2022) .....	17

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Příprava zásobních roztoků testovaných látek .....	22
<b>Tabulka 2:</b> Příprava zásobních roztoků .....	23

## Seznam grafů

<b>Graf 1:</b> Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii.....	26
<b>Graf 2:</b> Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii.....	27
<b>Graf 3:</b> Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii.....	27
<b>Graf 4:</b> Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii.....	28
<b>Graf 5:</b> Viabilita po aplikaci IPA na buněčnou linii. ....	29
<b>Graf 6:</b> Vliv binární směsi na aktivitu AhR (koncentrace 1x). ....	31
<b>Graf 7:</b> Vliv binární směsi na aktivitu AhR (koncentrace 5x). ....	33
<b>Graf 8:</b> Závislost aktivace AhR na koncentraci testovaných látek indolu a IPA. ....	34

# 1 ÚVOD

V gastrointestinálním traktu (GIT) hraje mikrobiom klíčovou roli při řízení imunitního systému a udržování metabolické a tkáňové homeostázy. Ideálním stavem pro hostitele je mikrobiom bez poškození a bez zánětu.

Buňky střevní sliznice jsou vystaveny širokému spektru metabolicky aktivních molekul produkovaných mikrobioty. Tyto látky mají významný dopad na funkci střevní bariéry a na imunitní odpověď. Změny ve střevním mikrobiomu jsou spojovány s nástupem a zhoršením průběhu čtených onemocnění - např. idiopatických střevních zánětů (IBD), onemocnění jater, nádory GIT, metabolicky podmíněná onemocnění a další. Správné složení těchto mikrobiálních metabolitů je proto zásadní pro lidské zdraví, a identifikace molekulárních cílů pomáhá určit mechanismus nemocí a rozvoj potenciálních terapeutik. Významnou skupinu mikrobiálních katabolitů tvoří indol a jeho deriváty. Tyto látky jsou produkovány bakteriálními druhy z tryptofanu získaného z potravy - některé z těchto látek byly popsány jako ligandy aryluhlovodíkového receptoru (AhR). Bylo zjištěno, že tento xenoreceptor endogenních i exogenních sloučenin je jeden z klíčových senzorů metabolitů produkovaných střevní mikrobiotou a podílí se na regulaci slizničního imunitního systému a funkce střevní bariéry. Současná znalost účinku katabolitů tryptofanu však většinou vychází ze studií účinků jedné molekuly. Je důležité vzít v úvahu realističtější situace v GIT, kde je biologická odpověď určena přítomností více metabolitů, které tak představují rezervoár potenciální aktivity AhR.

Hlavním cílem této práce je prozkoumat potenciální synergický účinek známých střevních mikrobiálních metabolitů tryptofanu (za použití fyziologických koncentrací) na aktivitu lidského AhR ve střevním adenokarcinomovém reportérovém buněčném systému. Účinky směsí mikrobiálních katabolitů na aktivitu AhR doposud nebyly studovány. Získané výsledky mohou přispět k objasnění role AhR v lidském střevním zdraví a zavedení nových strategií terapie IBD.

## **2 CÍL PRÁCE**

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Testování vlivu indolu a indol-3-propionové kyseliny na viabilitu buněčné linie LS174T-AhR metodou MTT a testem neutrální červeni
3. Studium vlivu binárních směsí indolu a indol-3-propionové kyseliny na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru metodou Reporter Gene Assay
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce



## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Biotransformace

Lidská populace je neustále vystavována chemickým látkám, ať už přírodního nebo syntetického původu, které nejsou tělu vlastní. Tyto, pro lidské tělo cizí látky, se nazývají xenobiotika. Mezi xenobiotika se řadí léčiva, látky znečišťující životní prostředí, kosmetické přípravky, potravinová aditiva a další. Pro organismus jsou xenobiotika potenciálním nebezpečím v rámci interakce s endogenními látkami, čímž může dojít k narušení fyziologických pochodů (Skálová, 2017). V rámci evoluce se z tohoto důvodu u člověka vyvinuly detoxifikační procesy hrající významnou roli v obraně proti cizorodým látkám. Do takových detoxifikačních procesů patří například transportní proteiny a biotransformační enzymy, jejichž činností dochází ke změně struktury xenobiotik z hydrofobních na hydrofilní pro snazší vyloučení (Vrzal *et al*, 2004). Hlavní část biotransformace se odehrává v jaterních hepatocytech. Některé z enzymů reakcí jednotlivých fází se mohou také vyskytovat v tukové tkáni, střevě, ledvinách, plicích a kůži. V jednotlivých buňkách je pak biotransformace lokalizována v cytoplazmě, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022).

Biotransformace xenobiotik se dělí na tři fáze, a to fázi I, II a III. Tyto fáze mohou, ale nemusí následovat za sebou. Mohou taktéž probíhat pozpátku. Produkty reakcí jedné fáze mohou být substráty jiné fáze (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022).

V první fázi biotransformace jsou funkční skupiny, jako je OH nebo NH<sub>2</sub> odkryty nebo navázány na molekulu xenobiotika, a to oxidací, redukcí, hydrolýzou nebo izomerací za účelem přeměny lipofilní sloučeniny na více polární sloučeninu, která je snáze metabolizovatelná (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022). Těchto procesů se účastní enzymy, jako je NADPH-CYP-reduktasa a velké množství dalších enzymů z rodiny cytochromů P450 (CYP), jako je CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8 a mnoho dalších (Skálová, 2017). Cytochromy P450 náleží do skupiny enzymů vázaných na membránu a nachází se v endoplazmatickém retikulu. Nejhojnějším typem cytochromu je CYP3A4, který v játrech zastává téměř poloviční aktivitu všech cytochromů v organismu. V první fázi biotransformace dochází s využitím cytochromů k oxidaci a redukcí za využití NADPH (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022). Mnoho cytochromů je indukováno xenobiotiky a jsou pod transkripční kontrolou receptorů, jako je například aryluhlovodíkový receptor (AhR), konstitutivní androstanový receptor (CAR) nebo pregnanový X receptor (PXR) (Vrzal *et al*, 2004).

Mezi reakce druhé fáze biotransformace se řadí methylace, glukuronidace, acetylace, sulfatace, konjugace glutathionu a aminokyselin. Souhrnně dochází ke konjugaci oxygenovaných produktů první fáze biotransformace s endogenními sloučeninami, jako je kyselina glukuronová, glutathion, sulfát, cystein nebo acetát. Mezi enzymy, které katalyzují reakce druhé fáze biotransformace patří glutathion-S-transferáza (GST), UDP-glukuronyltransferáza (UGT) a N-acetyltransferáza (Vrzal *et al*, 2004).

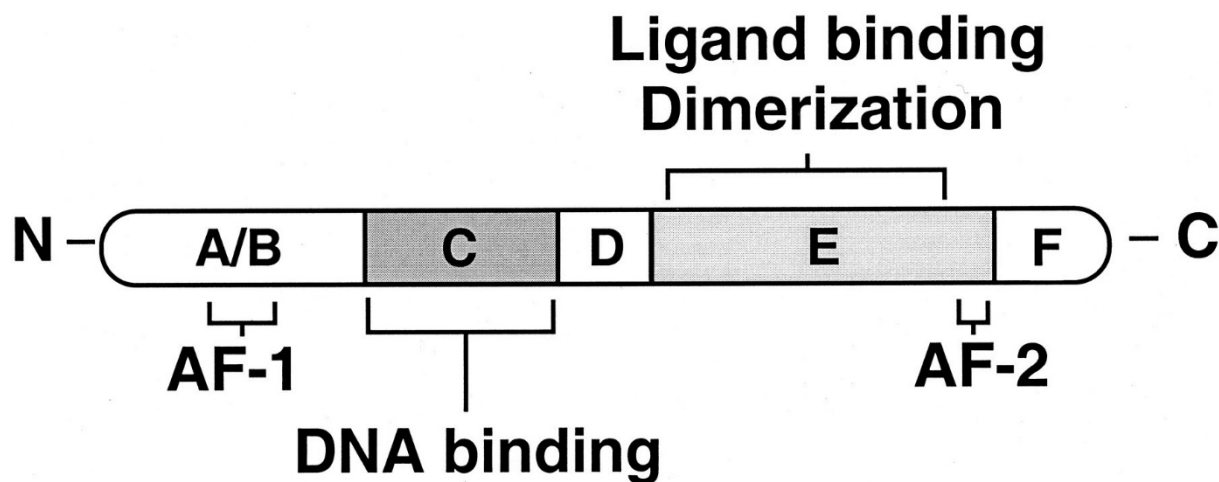
Do třetí fáze biotransformace se řadí transmembránový transport. To vyžaduje transmembránové proteiny, chovající se jako pumpy, které transportují xenobiotika, která nebyla metabolizována, nebo sloučeniny vzniklé ve druhé fázi biotransformace ven z buňky. Tím se zvyšuje koncentrace xenobiotik mimo buňku. Řadí se sem superrodiny enzymů ATP-vazebné kazety (ABC) a přenašeče rozpuštěných látek (SLC). Asi nejznámější je P-glykoproteinová pumpa (Vrzal *et al*, 2004).

Enzymy metabolismu xenobiotik jsou běžně regulovány transkripčně receptory, kdy dojde k navázání ligandu na receptor v cytosolu, který je pak translokován do jádra, kde se naváže na cílovou sekvenci DNA a zahájí transkripci (Vrzal *et al*, 2004).

### 3.2 Jaderné receptory

Rodina jaderných receptorů obsahuje evolučně příbuzné a architektonicky podobné transkripční faktory, které se účastní mnoha funkcí v rámci vývoje, růstu a homeostázy. Efektorovou funkcí jaderných receptorů je transkripce, a to i mechanismy aktivace a represe na základě navázání specifického ligandu do aktivačního místa. Jaderné receptory se skládají z pěti až šesti domén, pojmenovaných A až F od N-konce po C-konec. Oblast A/B vykazuje velkou diverzitu mezi jadernými receptory a může být fosforylována. Oblast C je téměř stejná u všech jaderných receptorů a je místem řídicím rozpoznání cílového úseku DNA a navázáním receptoru na toto místo. Oblast D je označována jako oblast pantu a její předpokládanou funkcí je spojení C a E/F domény. E doména je místem, kde se na receptor váže specifický ligand, který je schopen aktivovat nebo potlačit transkripční funkci jaderného receptoru. Poslední částí je doména F, o jejíž funkci je známo jen velmi málo (Obrázek 1). Jaderné receptory koordinují a regulují velké množství procesů přijímáním signálů z vnitřního i vnějšího prostředí, a tím zajišťují homeostázu (Pawlak *et al*, 2012). Jaderné receptory také zprostředkovávají transkripční regulaci, která je nejdůležitější v rámci exprese enzymů 1. a 2. fáze biotransformace (Skálová, 2017). Tyto receptory se dělí na cytosolické a jaderné podle jejich lokalizace před navázáním ligandu. Zástupci cytosolických receptorů jsou glukokortikoidní

receptor (GR), konstitutivní androstanový receptor a aryluhlovodíkový receptor. Mezi jaderné se řadí pregnanový X receptor, retinoidní X receptor (RXR), vitamin D receptor (VDR) a receptor kyseliny retinové (RAR) (Vrzal *et al*, 2004).



**Obrázek 1:** Obecná struktura jaderných receptorů. Převzato z článku (Aranda *et Pascual*, 2001)

### 3.2.1 Aryluhlovodíkový receptor

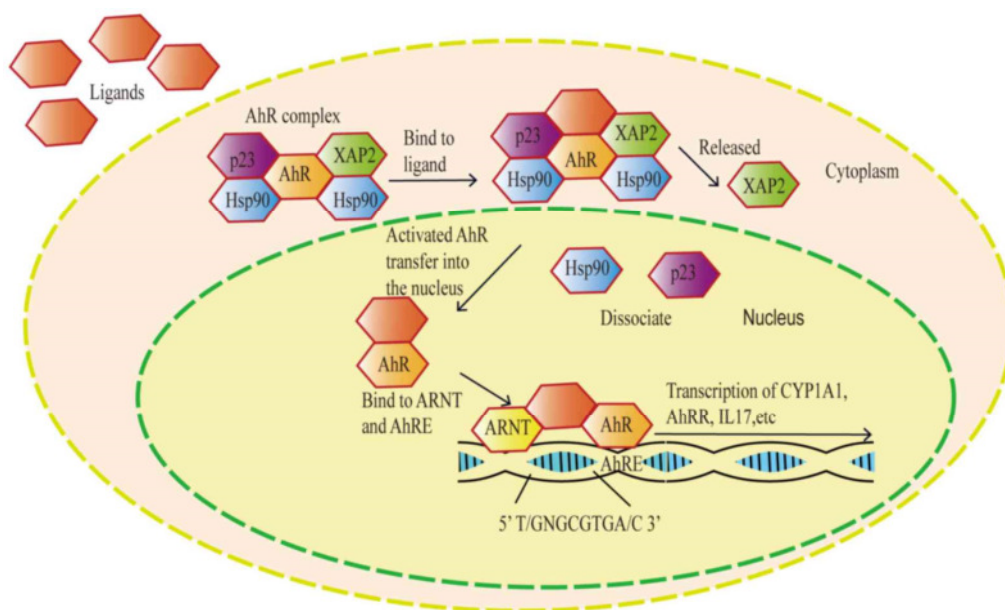
AhR patří do rodiny základních bazických-helix-smyčka-helix (bHLH) transkripčních faktorů z rodiny Per-ARNT-Sim (PAS). Je aktivován řadou xenobiotických ligandů, které můžeme rozdělit podle původu do tří hlavních skupin, a to na látky původu antropogenního, přírodního a metabolity organismu. Mezi látky antropogenního původu můžeme zařadit polychlorované bifenyly, dibenzo-*p*-dioxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky a dibenzofurany. Do skupiny látek přírodního původu patří především flavony a jim příbuzné sloučeniny. Poslední skupinou xenobiotických ligandů jsou metabolity organismu, mezi které se řadí deriváty mastných kyselin, aminokyselin a další (Skálová, 2017). Vzhledem k jejich vlivu na AhR se ligandy dělí na agonisty, parciální agonisty a antagonisty (Dvořák *et al*, 2021). AhR byl původně charakterizován jako regulátor metabolismu xenobiotik, přesněji polyaromatických uhlovodíků (PAH). Původní experimenty odhalily zvýšenou expresi cytochromu p450 po expozici benzo[*a*]pyrenu. Metabolismus PAH je závislý na AhR, kdy se xenobiotický ligand naváže na AhR a ten zahájí transkripci a expresi enzymů, které řídí biotransformaci těchto xenobiotik (Stevens *et al*, 2009). Gen pro AhR je u člověka lokalizován na 7 chromozomu. Nachází se zde 12 exonů, které kódují 848 aminokyselin, které dohromady

vytváří protein o teoretické velikosti 96 kDa. Typickými ligandy AhR jsou polyaromatické uhlovodíky a 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (Vrzal *et al*, 2004).

Existují dvě signální dráhy AhR, kanonická a nekanonická. Transkripční aktivita v kanonické dráze AhR je vždy zahájena navázáním AhR na responzivní element xenobiotik (XRE) v jádře (Wright *et al*, 2017). V kanonické dráze je AhR před aktivací v inaktivním stavu součástí proteinového komplexu, který se skládá z dimeru 90kDa proteinů teplotního šoku (HSP90), AhR-interagujícího proteinu (AIP), X asociovaného proteinu 2 (XAP2), chaperonu p23 a tyrozin kinázy (c-SRC). Jedna molekula HSP90 se váže do oblasti PAS AhR, kdežto druhá molekula HSP90 interaguje na obou stranách AhR s bHLH a PAS oblastí, které jsou zapojeny v navázání DNA a ligandu. AIP stabilizuje chaperonový komplex AhR přímou interakcí s HSP90 a AhR, a také vykazuje funkci zesilovače AhR aktivace (Dvořák *et al*, 2021). Když se ligand naváže na AhR, AIP disociuje z komplexu, což vede k obnažení AhR (Rothhammer *et Quintana*, 2019). AhR je poté uvolněn z proteinového komplexu a translokován do jádra pomocí  $\beta$ -importinů, kde vytvoří komplex s ARNT (jaderný translokátor pro aryluhlovodíkový receptor) (Dvořák *et al*, 2021). AIP se také účastní skládání a stabilizace AhR, ovlivňuje jeho lokalizaci v cytoplazmě inhibicí interakce AhR komplexu s importinem  $\beta$ , který řídí transport do jádra. Chaperon p23 chrání AhR před ubiquitinací a reguluje lokalizaci AhR v cytoplazmě. C-SRC se účastní úvodních kroků aktivace AhR po navázání ligandu, a chaperonový komplex stabilizuje AhR v cytoplazmě a udržuje jej v konformaci, která má vysokou afinitu k ligandům. Aktivace AhR vede k translokaci do jádra a kontrole exprese cílových genů ukrývajících AhR-responzivní DNA element XRE v regulační oblasti (Rothhammer *et Quintana*, 2019). AhR/ARNT heterodimer reaguje s koaktivátory a vzniklý komplex se váže do komplementárního místa XRE sekvence 5-CGTG-3, která se nachází v regulační oblasti cílových genů, jako je CYP1A1. Exprese končí uvolněním heterodimeru AhR/ARNT z DNA a následnou degradací receptoru v cytosolu (Obrázek 2) (Roman *et al*, 2018). V jádře se také nachází AhRR (represe aryluhlovodíkového receptoru), který není schopen vázat ligand. AhRR je schopen interakce s ARNT za vzniku dimeru AhRR-ARNT, který není transkripčně aktivní a slouží jako negativní zpětná vazba (Vrzal *et al*, 2004).

Nekanonická cesta AhR je brána jako transkripční cesta AhR nezávislá na XRE. Může se jednat o latentní sekundární účinky AhR, nebo změnu transkripce AhR prostřednictvím místa odlišného od XRE (Wright *et al*, 2017). Příkladem nekanonické cesty je navázání ligandy aktivovaného AhR/ARNT, který asociuje s estrogenním receptorem, a spolu s koaktivátorem

p300 dochází k přemístění do estrogen-responzivního elementu, které vede k iniciaci transkripce. Kromě ARNT jsou známy další transkripční faktory, které dokážou asociovat s AhR nezávisle na XRE, jako jsou retinoblastomový protein, RelB podjednotka nukleárního faktoru kappa B (NFκB) nebo Kruppelův faktor 6 (Dvořák *et al*, 2021).



**Obrázek 2:** Kanonická cesta AhR. Převzato z článku (Zhu *et al*, 2019)

Důležitým farmakologickým ukazatelem v signální dráze AhR je také délka aktivace. Ligandy, jako benzo[*a*]pyren, indirubin a karbazol jsou velmi rychle metabolizovány, což vede ke krátké aktivaci AhR. Tato aktivace vede k expresi cílových genů AhR pouze v řádu hodin. Naopak, TCDD je metabolizován pomalu a aktivuje AhR na delší dobu a exprese cílových genů probíhá v řádu dnů (Stevens *et al*, 2009). Do dnešního dne byla identifikována řada strukturně odlišných ligandů AhR (Dvořák *et al*, 2021). Nejvíce studovaný agonista AhR TCDD se váže s vysokou afinitou. Čtyři atomy chloru, které TCDD obsahuje, brání metabolickým enzymům k navázání do aktivních míst. Proto je TCDD metabolizován velmi pomalu (Stevens *et al*, 2009). AhR je také aktivován škálou exogenních látek, jako jsou uhlovodíky, halogenované dioxiny, polyhalogenované uhlovodíky a furany, a endogenních látek, jako je indol, eikosanoidy, kyselina kynurenová a indolactová kyselina (Stejskalova *et al*, 2011).

AhR je považován za jeden z hlavních regulátorů metabolismu xenobiotik, kdy podporuje expresi cílových genů, které se účastní fáze I a II metabolické detoxifikace. Expese těchto genů poskytuje lokální i systémovou ochranu před xenobiotiky (Dong *et al*, 2020). Mezi cílové geny

kontroly exprese AhR patří CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a enzymy druhé fáze biotransformace, jako je quinoneoxidoreduktáza, GST a UGT (Vrzal *et al*, 2004).

Lidský AhR může po navázání indolu vytvořit speciální bimolekulární vazebnou stechiometrii (2:1), která není po navázání jiného ligandu na AhR pozorována. Takto vzniklá konformace může vytvořit signalizaci mezi střevní mikroflórou a imunitním systémem (Hubbard *et al*, 2015).

AhR je exprimován ve většině typů buněk lidského těla. Vyšší exprese pak byla zaznamenána v plicích, brzlíku, ledvinách a játrech. Hlavní úlohou AhR je regulace proliferace buněk a jejich přežití, v poslední době je však zkoumán jeho vliv na záněty a nádorová onemocnění. Mezi jeho další funkce patří regulace apoptózy, buněčného cyklu, imunomodulace a podpora funkce střevní bariéry (Yin *et al*, 2016). Buňky se neustále adaptují a reagují na změny v prostředí tlustého střeva způsobené stravou, flórou komenzálních bakterií a metabolismem hostitele. Změny v buněčném prostředí jsou detekovány množstvím senzorů. Jeden z těchto senzorů je ligandy aktivovaný transkripční faktor AhR (Rothhammer *et Quintana*, 2019). Exprese a aktivace AhR v buňkách GIT pomáhá udržovat zdravou rovnováhu ve střevní mikroflóře, zvyšuje imunitu a posiluje funkci bariéry střev. Tímto způsobem je možné předcházet nemocem, jako jsou různé druhy nádorových onemocnění nebo Crohnova choroba, která je způsobena zánětem výstelky střev. Aktivace AhR také vysoce ovlivňuje systémovou a tkáňově specifickou imunitu (Dong *et al*, 2020).

AhR je schopen reagovat na hladinu kyslíku, redoxní potenciál, změny v cirkadiánním rytmu a kontrolu buněčného prostředí. Ovlivňuje také biologické procesy, které souvisí s homeostázou tkání nebo s rozvojem patologických stavů od zánětlivých po neoplastické poruchy (Rothhammer *et Quintana*, 2019). V nedávné době došlo k potvrzení, že AhR hraje důležitou roli ve vývoji pomocných T-lymfocytů (Th) Th17, které mají velký vliv v autoimunitě a v ničení infekčních agens. Buňky Th17 jsou význačné sekrecí prozánětlivých interleukinů (IL) IL-17 a IL-22 (Stevens *et al*, 2009).

AhR hraje také důležitou roli ve velkém množství fyziologických procesů, jako je imunita, vývoj orgánů, embryogeneze, hematopoéza a opravná neurogeneze. Naproti tomu je AhR také zapojen do patogeneze určitých onemocnění, jako jsou záněty střev, steatóza jater, atopická dermatitida a již zmíněná nádorová onemocnění. Vzhledem k velkému významu AhR v rámci lidské fyziologie, imunologie a původu nemocí se stává cílem v rámci terapie (Dvořák *et al*, 2021).

### 3.3 Střevní mikrobiom

Kolekce bakterií, archeí a eukaryot kolonizujících gastrointestinální trakt se souhrnně nazývá střevní mikrobiom. U mikrobiomu probíhala ko-evoluce po dobu tisíců let, až do vzniku mutuálního soužití (Thursby *et Juge*, 2017). Lidský střevní mikrobiom může být tvořen z přibližně 1150 rozdílných druhů bakterií, kdy každý jedinec má vlastní mikrobiom, který je tvořen asi 160 druhy (Zhang *et Li*, 2014). Celkové množství mikroorganismů vyskytujících se v GIT je odhadováno na  $10^4$  (Thursby *et Juge*, 2017). Střevní mikrobiom se začíná tvořit během prvních 2 týdnů života a v průběhu života každého jedince se poměrně výrazně mění. Víceméně stabilní je až mikrobiom zdravého dospělého člověka (Spor *et al*, 2011). Kolonizace střeva je postupná, kdy první střevo obsazují aerobní druhy následované anaerobními druhy (Chistiakov *et al*, 2015).

Střevní mikrobiota hrají důležitou úlohu při vývoji vrozené imunity a orální tolerance, což je schopnost organismu vyrovnat se s náloží antigenů přijatých potravou (Chistiakov *et al*, 2015). Během mikrobiální kolonizace střeva dozrává mukózní imunitní systém a vzniká orální imunitní tolerance. Pochody odpovědné za vytvoření orální tolerance na antigeny z potravy nejsou zcela objasněny a obsahují komplikované anatomické, buněčné a humorální faktory. Tyto faktory potlačují imunitní reakci na antigeny přichozí do střevní lumen, které by jinak vyvolaly zánětlivou reakci (Baumgart *et Carding*, 2007).

Střevní mikroflóra poskytuje několik benefitů. V tlustém střevě například syntetizuje esenciální aminokyseliny a vitaminy a zpracovává jinak nestravitelné komponenty, jako jsou rostlinné polysacharidy (Gill *et al*, 2006). Všechny tyto metabolické procesy vedou k produkci nespočetného množství mikrobiálních metabolitů. Přestože je většina požitých proteinů štěpena a absorbována v tenkém střevě, značné množství proteinů a aminokyselin může postoupit až do tlustého střeva, kde jsou degradovány velkým množstvím komenzálních bakterií. Intenzita katabolismu komenzálních střevních bakterií je zvýšena vyšším příjmem proteinů, vyčerpáním sacharidů, zvýšeným pH a prodloužením doby průchodu proteinů tlustým střevem. Postupné vyčerpávání sacharidových substrátů od proximální k distální části tlustého střeva způsobuje změnu v bakteriálním katabolismu ze sacharolytické k proteolytické fermentaci. V proximální části tlustého střeva je čtyřikrát vyšší koncentrace fenolických látek z degradace aromatických aminokyselin než v distální části (Roager *et Licht*, 2018).

Tyto metabolity mohou mít pro hostitele jak prospěšné, tak i toxické účinky. Narušení rovnováhy v zastoupení jednotlivých druhů bakterií a metabolitů ve střevě je spojeno s rizikem vzniku zánětů střev, obezity, diabetu, nádorů nebo alergií. Mikrobiota produkuje látky, které

slouží jako ligandy pro specifické receptory a hrají významnou roli v udržování homeostázy (Holmes *et al.*, 2011).

Metabolismus střevní mikrobioty může ovlivňovat funkci imunitního systému působením na genovou expresi hostitelských buněk (Oliphant *et Allen-Vercoe*, 2019).

### **3.4 Mikrobiota a nemoci gastrointestinálního traktu - Idiopatické střevní záněty**

Moderní medicína se potýká s mnohými problémy. V dnešní době jsou globálním problémem zánětlivá střevní onemocnění (idiopatické střevní záněty - IBD) (Zhang *et Li*, 2014). Jedná se o komplexní proces, kdy i mírná změna střevního mikrobiomu vede u geneticky predisponovaných jedinců k nepřiměřené zánětlivé odezvě (Morgan *et al.*, 2012). Mezi zástupce IBD se řadí hlavně ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD), ale také neinfekční záněty střev (Strober *et al.*, 2007).

CD poprvé pozoroval německý chirurg Guilielmus Fabricius Hildanus roku 1623. Ve 30. letech 20. století byla nemoc detailněji popsána, a to především zásluhou amerického gastroenterologa Burrilla Bernarda Crohna, po němž je také tato nemoc pojmenována (Baumgart *et Carding*, 2007). Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění tlustého střeva, které postihuje lidi všeho věku. Příznaky se obvykle začínají vyskytovat v pubertě, nebo rané dospělosti, tedy ve věku 15 až 30 let. U pacientů byly zaznamenány příznaky, jako je bolest břicha, průjem, krev ve stolici a také systémové příznaky, jako je horečka, únava a ztráta na váze (Strober *et al.*, 2007). V počátečních stádiích se k léčbě CD využívají aminosalicyláty, při rozvoji onemocnění se léčí pomocí kortikosteroidů a imunosupresiv, jako je azathioprin a metotrexát. V dnešní době dochází k rozvoji biologické léčby, jež jsou efektivnější náhradou léčby farmakologické. K látkám používaným k takovéto léčbě se řadí infiximab, adalimumab, vedolizumab nebo ustekinumab. U většiny pacientů s CD musí být v průběhu života provedena operace, při které dojde k odstranění části zasaženého střeva (Crohnova choroba).

UC poprvé popsal britský fyzik sir Samuel Wilks, a to v roce 1859 (Baumgart *et Carding*, 2007). Častými příznaky jsou průjem a krvácení z konečníku. Léčba je prováděna stejně jako u CD, takže farmakologicky i biologicky. Pokud dojde nemoc do pokročilého stádia, kdy musí pacient podstoupit chirurgickou léčbu, dochází většinou k odstranění celého tlustého střeva (Crohnova choroba).

Bylo zjištěno, že UC i CD jsou polygenní onemocnění sdílející některé geny, které jsou spojovány s rozvojem těchto onemocnění (Gaya *et al.*, 2006).



Po celogenomovém sekvenování pacientů s těmito onemocněními byly určeny oblasti na 12 chromozomech, které by mohly být za etiologii těchto onemocnění (Baumgart *et Carding*, 2007). Nové studie uvádějí 163 genových lokusů, které jsou asociovány s IBD, z toho 110 je spojováno s UC i CD, 30 s CD a 23 s UC (Zhang *et Li*, 2014).

Podle studií je CD spojována s nárůstem produkce IL-12, IL-23, IL-17 a interferonu gama (IFN- $\gamma$ ), které způsobují nesouvislou tvorbu vředů v tenkém i tlustém střevě a zánět po celé tloušťce tlustého střeva, často spolu s granulomy. UC je také spojována se zvýšenou produkcí IL-13, který způsobuje souvislé zanícení sliznice tlustého střeva obvykle dosahující až po konečník (Strober *et al*, 2007).

Lidé, kteří v životě prodělali infekční onemocnění GIT jsou více náchylní na vznik IBD. Také u pacientů, kterým bylo diagnostikováno IBD, byl zjištěn vyšší počet bakterií ve střevní sliznici než u lidí bez diagnostikovaného IBD. Koncentrace těchto bakterií se také zvyšuje se závažností onemocnění, a to jak v zanícené, tak nezanícené části tlustého střeva. U pacientů s IBD mohou ve střevní mikroflóře převládat adhezivní bakterie, avšak žádný z kmenů adhezivních bakterií nebyl identifikován jako spouštěč onemocnění (Baumgart *et Carding*, 2007).

Přestože není z velké části původ onemocnění objasněn, nové studie naznačují, že se na vzniku onemocnění mohou podílet vlivy, jako je vnější prostředí, genetická náchylnost jedince, střevní mikrobiom a odpověď imunitního systému (Zhang *et Li*, 2014). V dnešní době převládá názor, že IBD vznikají důsledkem nepřiměřené odpovědi porušeného imunitního systému sliznice na původní mikrobiální antigeny (Baumgart *et Carding*, 2007). Velké množství vnějších vlivů je označováno jako rizikové faktory pro IBD. Mezi ně se řadí například kouření, strava, léky, stres, psychologické faktory a geografické podmínky. Předpokládá se také spojitost vitamínu D na velké množství chorob, včetně IBD, neboť u pacientů s IBD byl zjištěn nedostatek vitamínu D a zároveň je potvrzeno, že nedostatek tohoto vitamínu zvyšuje riziko IBD (Zhang *et Li*, 2014).

Velké množství studií se zabývalo střevní mikroflórou u pacientů s CD a UC a byla zjištěna dysbióza jak v zanícené, tak nezanícené části, a byla výrazně snížena biodiverzita a stabilita mikrobiomu v porovnání s mikrobiomem zdravého člověka. Ve střevě zdravého člověka převažují kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, kdežto ve střevě zasaženém CD byl výskyt kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* snížen. Oproti tomu byl zaznamenán nárůst enterobakterií. U UC bylo zaznamenáno snížení rodu *Clostridium* (Zhang *et Li*, 2014).

První linií obrany imunitního systému střevního sliznice je epitelová tkáň (Zhang *et Li*, 2014). Charakteristickým rysem epiteliálních tkání je poskytovat bariéru mezi dynamickým vnějším prostředím a tím zajišťovat vnitřní homeostázu (Dong *et al*, 2020). Střevní epitel je jednovrstevná tkáň pokrytá sliznicí (*tunica mucosa*) osídlená střevní mikrobiotou. U osob s CD nebo UC jsou zaznamenány poruchy v tvorbě této sliznice. Apikální povrch epiteliálních buněk je pokryt imunoglobulina (IgA) a glykokalyxem (Baumgart *et Carding*, 2007). Zdravé střevo je pokryto sliznicí, skládající se ze dvou částí. Vnější vrstva je přilnavá a vhodná pro růst bakterií, vnitřní je oproti tomu nepřilnavá a obvykle sterilní. U pacientů s IBD, především s CD, byl zaznamenán nárůst bakterií na přilnavé části střeva (Zhang *et Li*, 2014).

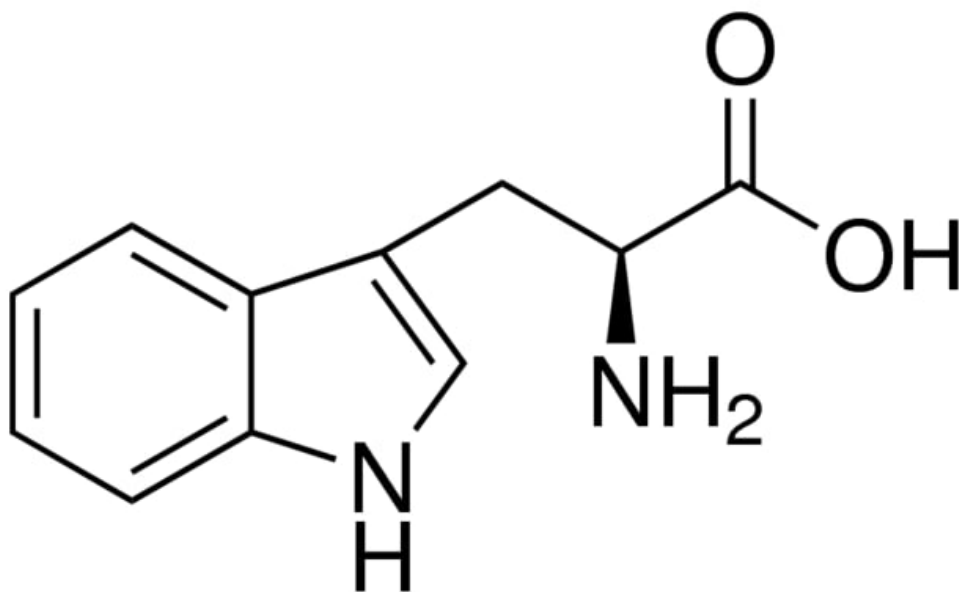
UC a CD jsou spojeny s chronickým zánětem střev, který je způsoben poruchou homeostázy ve střevě. Jednovrstevná tkáň buněk poskytuje fyzickou i imunitní bariéru střevním lumenálním komponentům, jako je střevní mikroflóra nebo strava. Zánětlivá střevní onemocnění se vyznačují narušenou funkcí střevní epiteliální bariéry, která dovoluje antigenům přístup k hlouběji ležící tkáni, ve které jsou buňky imunitního systému. Toto porušení střevní bariéry vede k aktivaci imunitní odpovědi hostitele a zvýšení zánětu řídící patologii onemocnění (Scott *et al*, 2020). U pacientů s CD a UC byla zaznamenána snížená rezistence epitelové tkáně a vyšší propustnost zanícené i nezanícené sliznice. Tyto negativní vlivy předcházejí nástupu klinického onemocnění u osob, které mají rodinnou predispozici pro toto onemocnění. Poruchy propustnosti byly též zaznamenány u zdravých jedinců v bližším příbuzenském vztahu s osobami s IBD. Výzkumem byly identifikovány mechanismy vzniku poruch propustnosti sliznice. Mezi ně patří narušení proteinů těsných spojů způsobené T-lymfocyty a dysfunkce enterických neuronů. Lidé s IBD mají narušené mechanismy vrozené imunity epitelu. U těchto pacientů mají buňky epitelu sliznice rozdílnou expresi receptoru podobného genu Toll (TLR). Zdravé buňky epitelu sliznice exprimují TLR3 a TLR5. TLR2 a TLR4 nejsou u zdravého člověka obvykle detekovatelné. U pacientů s CD je exprese TLR3 výrazně potlačena. Naopak, u pacientů s UC je exprese TLR4 navýšena (Baumgart *et Carding*, 2007). Dostupné důkazy nasvědčují tomu, že poruchy vrozené a získané imunity mohou přispívat ke vzniku zánětlivé odpovědi u pacientů s IBD. Zaměřením se na IBD bylo zjištěno, že CD a UC způsobují dva odlišné typy zánětu. Zánět u CD je způsobován odpovědí Th1, u UC je zánět způsoben Th2. Nově popsané Th17 jsou také zapojeny do IBD (Zhang *et Li*, 2014).

### 3.4.1 Metabolismus tryptofanu

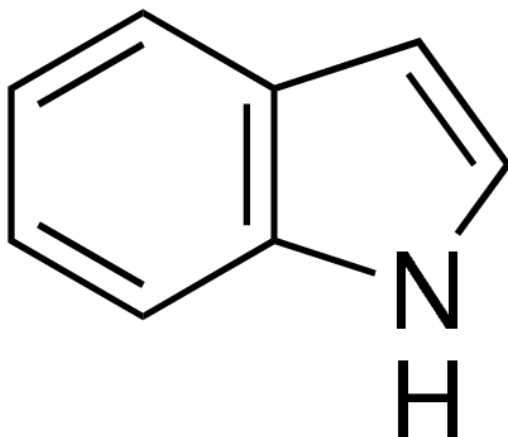
L-tryptofan (Trp) je aminokyselina, která obsahuje aromatický indolový kruh (Obrázek 3). Řadí se mezi esenciální aminokyseliny a savčí buňky jej nedokáží syntetizovat, proto musí být přijímán potravou (Agus *et al*, 2018). V těle je tryptofan prekurzorem pro syntézu proteinů a biologicky aktivních sloučenin, jako jsou neurotransmitery serotonin a tryptamin, hormon melatonin, nebo niacin a kyselina nikotinová. Většina tryptofanu přijatého potravou je zpracována v různých orgánech a tkáních. Malé množství, které není zcela stráveno je metabolizováno střevní mikrobiotou (Tennoune *et al*, 2022). Metabolismus tryptofanu ve střevě je založen na přímé transformaci tryptofanu střevními mikroorganismy v množství molekul, v největší míře na indol (Obrázek 4) a dále na jeho deriváty jako je tryptamin, indol-3-propionová kyselina (IPA) (Obrázek 5), 3-methylindol, indolaldehyd, indolakrylová kyselina, indolactová kyselina a indolethanol (Roager *et Licht*, 2018). Metabolismus tryptofanu se v GIT skládá ze tří cest. Hlavní, kynureninová je katalyzovaná indolamin-2,3-dioxygenázou. Méně významné jsou cesta přímé degradace tryptofanu střevní mikroflórou, a serotoninová cesta, která je katalyzována tryptofan hydroxylázou 1 (Obrázek 6) (Agus *et al*, 2018). Katabolismus tryptofanu závislý na komensálních mikrobech v GIT je schopen vyvinout velké účinky na hostitelovu fyziologii, včetně údržby epiteliální bariéry a funkce imunity (Obrázek 7). Bylo prokázáno, že množství metabolitů tryptofanu pocházejících z mikrobiomu je agonisty či antagonisty aryluhlovodíkového receptoru (Dong *et al*, 2020).

Indol je syntetizován velkou skupinou Gram pozitivních i Gram negativních bakterií, jako je *Escherichia coli*, *Proteus Vulgaris*, a rody *Clostridium* a *Bacteroides*. Indol se ve střevě účastní komunikace mezi bakteriemi, antibiotické rezistence a tvorby biofilmu. Mezi hlavní producenty IPA patří *Clostridium sporogenes*. Podání IPA orální cestou vykazuje výhodné účinky na funkci střevní bariéry na myším modelu. IPA také snižuje propustnost střevní bariéry a působí protizánětlivě. U pacientů s UC byla zjištěna snížená hladina IPA v porovnání se zdravými jedinci. Nárůst hladiny tohoto metabolitu zase značí remisi UC (Tennoune *et al*, 2022).

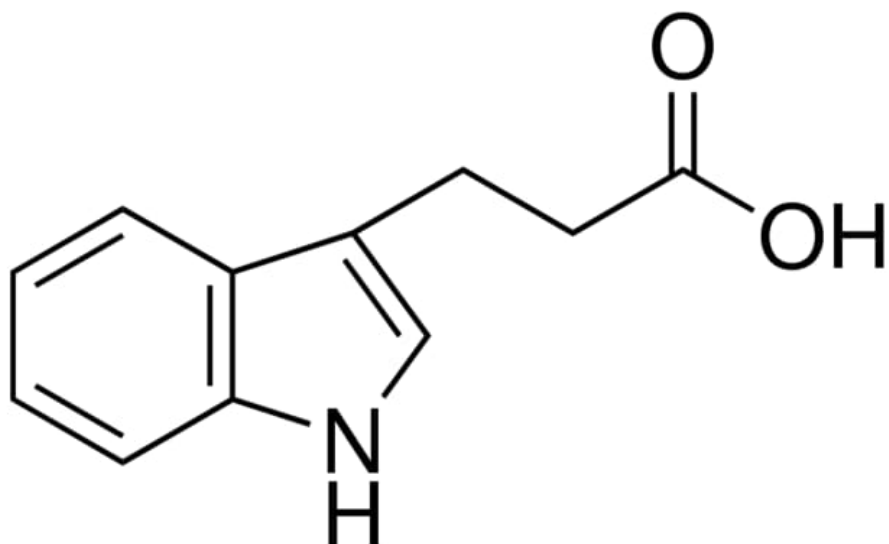
V dnešní době bylo identifikováno velké množství střevních mikrobiálních katabolitů tryptofanu, jako je indol, indol-3-propionová kyselina, skatol, tryptamin, indol-3-pyruvát, indol-3-ethanol, indol-3-acetát, indol-3-laktát, indol-3-akrylát a další (Vyhlídalová *et al*, 2020).



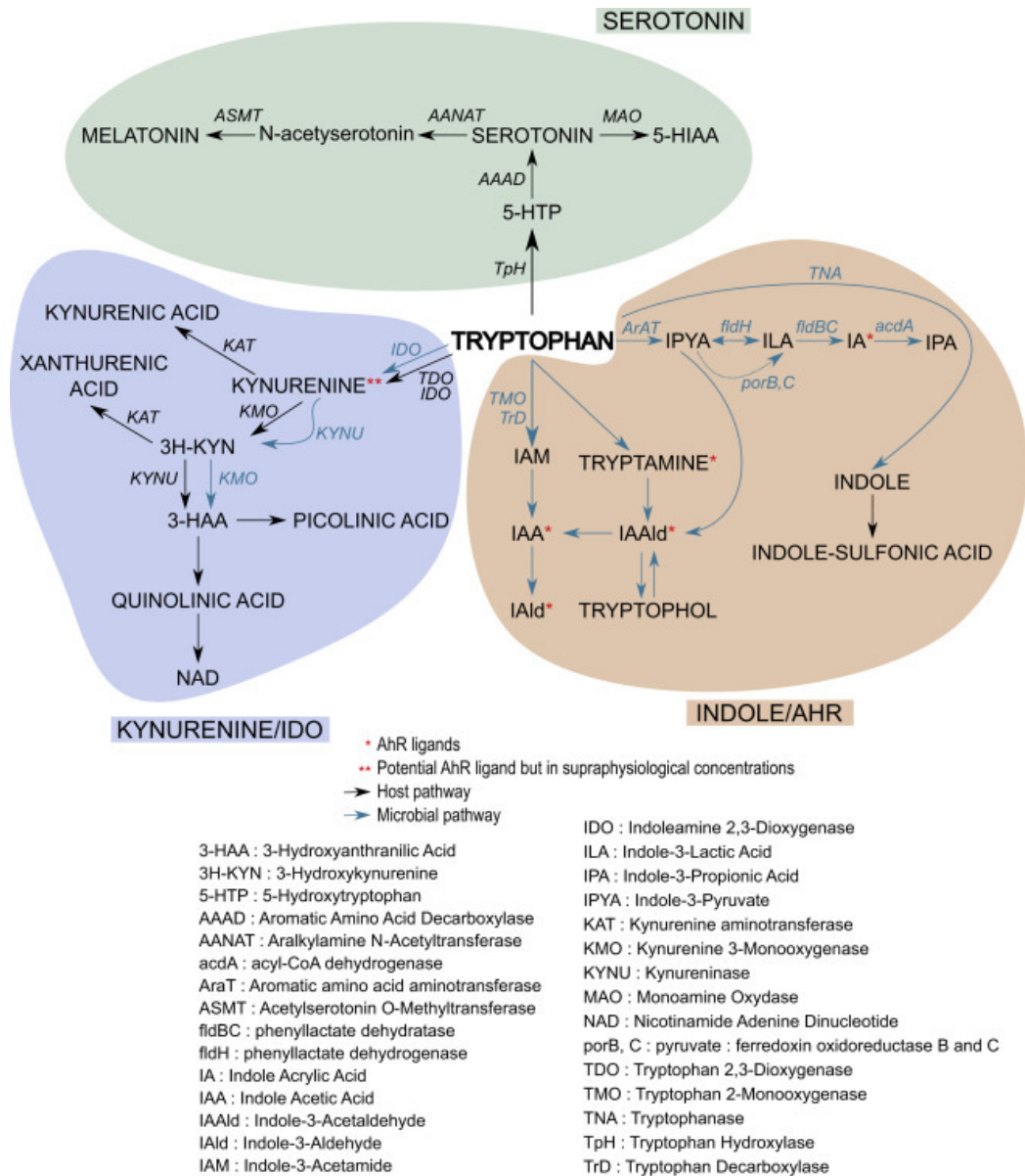
**Obrázek 3:** Chemická struktura L-tryptofanu. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich



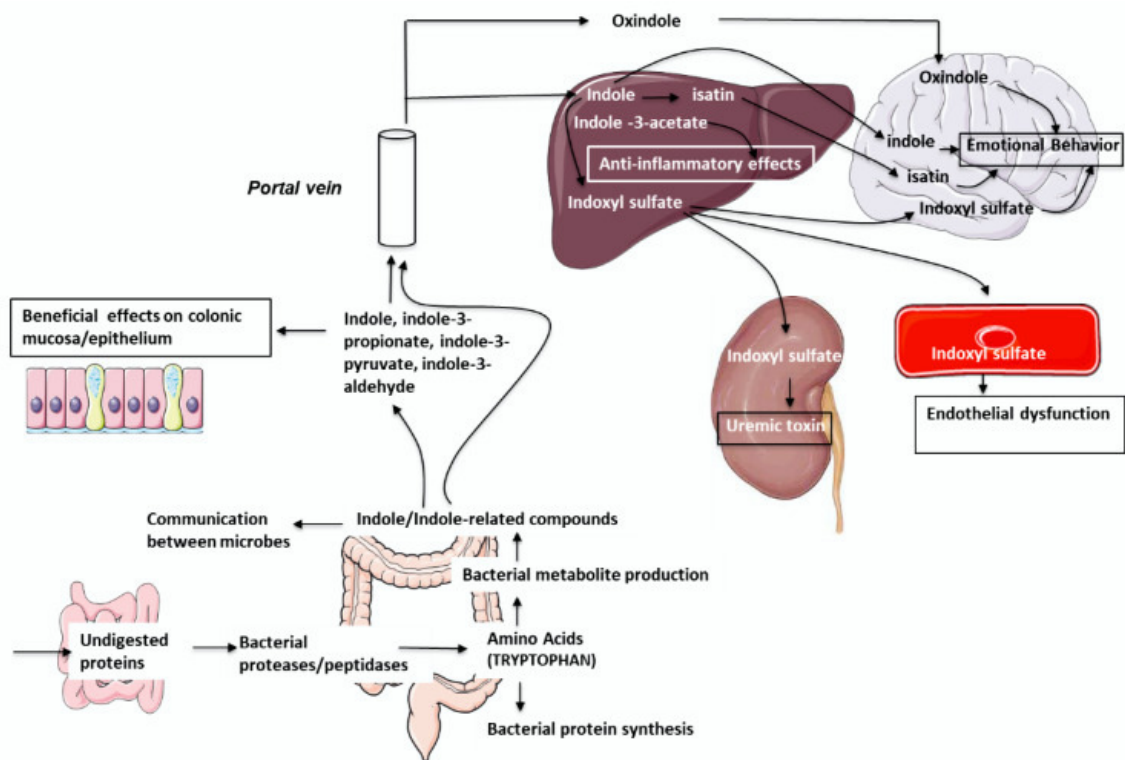
**Obrázek 4:** Chemická struktura indolu. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich



**Obrázek 5:** Chemická struktura indol-3-propionové kyseliny. Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich



**Obrázek 6:** Metabolismus tryptofanu. Převzato z článku (Agus *et al*, 2018)



**Obrázek 7:** Schematické znázornění účinků indolu a jeho derivátů syntetizovaných střevní mikrobiotou na komunikaci mezi mikroby a účinky bakteriálních metabolitů ve tkáni hostitele. Převzato z článku (Tennoune *et al*, 2022)

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

- Stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie LS174T-AhR. Tato linie byla připravena transfekací buněčné linie odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva LS174T (ECACC 87060401) plazmidem pGL-4.27-DRE, nesoucí gen pro rezistenci hygromycinu.

#### 4.1.2 Použité chemikálie

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (LGC Standards)
- Adenosin-5' trifosfát (ATP) (Sigma Aldrich, SML1489)
- D-Luciferin (Sigma Aldrich, L9504)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, 20022-CT0)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High glucose (DMEM) (Sigma Aldrich, D6546)
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biosera, LM-S2041)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma Aldrich, M5921)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma Aldrich, M5921)
- Hygromycin B (SantaCruz Biotechnology, SC-29067)
- Koenzym A (Sigma Aldrich, C4780)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich, E6511)
- L-glutamin (SERANA, RGL-001)
- Lyzační pufr: Reporter Lysis 5x Buffer (Promega, E3971)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT) (Sigma Aldrich, M2128)
- Neesenciální aminokyseliny (NEAA) (Sigma Aldrich, M7145)
- Neutral red assay kit (Abcam)
- Triton X-100 (Serva, 37 240)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, T6146)
- Trypsin (Biosera, LM-T1720)
- Tris-acetát (Sigma Aldrich, T8280)



#### 4.1.3 Testované látky

- Indol (SantaCruz Biotech, sc-257606)
- Indol-3-propionová kyselina (IPA) (SantaCruz Biotech, sc-255215)

#### 4.1.4 Složení použitých roztoků

- Kultivační médium
  - 500 ml DMEM
  - 50 ml FBS
  - 5 ml NEAA
  - 5 ml L-glutaminu
- Substrát pro luciferázu
  - 5 mg D-Luciferinu
  - 10 mg ATP
  - 5 mg Koenzymu A
  - 168 mg DTT
  - 1,32 ml Tris-acetátu
  - 1,23 mg/6,6  $\mu$ l 0,5 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> EDTA
  - 3,03mg/1,23 ml 100 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
  - Doplněno destilovanou vodou do 30 ml

#### 4.1.5 Seznam laboratorních zařízení a přístrojů

- Inkubátor (NB-203XL, N-Biotek)
- Laboratorní kývačka (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)
- Laminární flowbox (Class II Type A2, Esco Labculture)
- Mikroskop (IMT-2, Olympus)
- Odsávačka
- Spektrofotometr (Infinite M200, Tecan)
- Váhy
- Vodní lázeň (LCB-11D, Labtech)
- Vortex (Relax top D-91126, Heidolph)

## **4.2 METODIKA**

### **4.2.1 Kultivace buněk**

Adherentní buněčná linie LS174T-AhR byla kultivována v kultivační lahvi s médiem Dulbecco's Modified Eagle's Medium - s vysokým obsahem glukózy (DMEM), do kterého bylo přidáno fetální bovinní sérum, neesenciální aminokyseliny a L-glutamin. Při kultivaci buněk přes víkend bylo do kultivační lahve přidáno antibiotikum hygromycin B v koncentraci 0,3 mg/ml. Kultivační lahve s buňkami byly udržovány v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vysoké vlhkosti vzduchu.

### **4.2.2 Pasážování buněk**

Buňky byly pasážovány jednou za 2-3 dny. Kultivační médium bylo předeřháto na 37 °C ve vodní lázni. Kultivační lahev s buňkami byla vytažena z inkubátoru a zkontrolována pod mikroskopem k zjištění konfluency buněk. Poté byla lahev přenesena do sterilního laminárního boxu, kde probíhala samotná práce. Nejdříve bylo odsáto staré médium pomocí odsávačky. Po odsátí byly buňky opláchnuty 5 ml fosfátového pufru (PBS), které bylo následně také odsáto odsávačkou. Na buňky byl přidán 1 ml proteázy trypsinu, který uvolní adherentní buňky z povrchu lahve. Lahev s buňkami a trypsinem byla umístěna do inkubátoru po dobu 3 minut. Po uplynutí této doby byla lahev přemístěna zpět do laminárního boxu. Do lahve bylo přidáno 9 ml média a buňky byly nasáváním resuspendovány pomocí sérologické pipety. Následně byla buněčná suspenze přenesena do 50ml zkumavky. Do 0,5 ml zkumavky bylo přeneseno 10 µl suspenze k počítání. Část získané suspenze byla přenesena zpět do lahve spolu s 20 ml média a lahev byla umístěna do inkubátoru k další kultivaci.

### **4.2.3 Počítání buněk**

Počítání buněk je založeno na přidání trypanové modři do suspenze, kdy dochází k odlišení živých a neživých buněk. Živé buňky zůstanou nenabarveny, jelikož nedojde k prostoupení barviva přes membránu do intracelulárního prostoru. K počítání buněk byla využita Bürkerova komůrka, která je rozdělena na čtvercové plochy, a k počítání se využívá 10 těchto ploch. Buněčná suspenze o objemu 10 µl byla přidána k 90 µl trypanové modři a výsledná suspenze byla umístěna na Bürkerovu komůrku. Po prohlédnutí komůrky pod mikroskopem byla určena koncentrace buněk spočítáním živých - nenabarvených buněk.

Průměr počtu buněk z 10 čtverců byl vynásoben hodnotou  $1 \cdot 10^5$ , a výsledná hodnota udávala počet buněk v 1 ml suspenze.

#### **4.2.4 Vysévání buněk**

Pro metodu Reporter Gene Assay, MTT a neutrální červeni (NR) byly připraveny 96 jamkové destičky, kdy v každé jamce bylo vyseto 40 000 buněk ve 200  $\mu$ l média. Takto připravené destičky byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin, aby buňky narostly do požadované konfluence.

#### **4.2.5 Analýza koncentrace indolu a IPA v kolonoskopických aspirátech**

Aspiráty byly kolonoskopicky odebrány od pacientů, jimž bylo diagnostikováno zánětlivé onemocnění střev. U devíti pacientů byla diagnostikována Crohnova choroba, šest pacientů trpělo ulcerózní kolitidou (průměrný věk 52 let, 8 mužů; 7 žen). Třetí skupina byla tvořena pacienty s nezápětlivým onemocněním střev, jež byli pozorováni na klinice střevních zánětlivých onemocnění (n= 21; průměrný věk 57 let, 10 mužů; 11 žen). Koncentrace indolu a IPA byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Podrobnosti o klinické studii (NCT04089501) a analýze vzorků byly zveřejněny těmito autory (Li *et al*, 2021). Hladiny indolu a indol-3-propionové kyseliny byly normalizovány na celkové množství proteinů v aspirátu.

#### **4.2.6 Příprava zásobních roztoků použitých látek**

Testované látky, indol a indol-3-propionová kyselina, byly ředěny v dimethyl sulfoxidu (DMSO) na zásobní roztok o požadované koncentraci dle tabulky (Tabulka 1). Připravené zásobní roztoky byly následně použity pro další ředění tak, aby koncentrace jednotlivých látek odpovídala koncentraci, která byla stanovena ve vzorcích kolonoskopických pacientů (P1-25). Ředění dle tabulky (Tabulka 2) bylo provedeno vedoucím bakalářské práce.

**Tabulka 1:** Příprava zásobních roztoků testovaných látek

	<b>Molární hmotnost</b>	<b>Koncentrace [mM]</b>	<b>Objem dané látky [μl]</b>	<b>Objem DMSO [μl]</b>	<b>Celkový objem [μl]</b>
<b>Indol</b>	117,15	2500			1000
		1000	400	600	1000
		500	500	500	1000
		100	100	400	500
		50	100	100	200
<b>Indol-3-propionová kyselina</b>	189,21	500	500	0	500
		50	50	450	500
		10	200	800	1000
		5	400	400	800
		1	120	480	600
		0,5	100	100	200

**Tabulka 2:** Příprava zásobních roztoků (IND - indol, indol-3-propionová kyselina - IPA) a jejich poměry pro studium binárních směsí na základě zjištěného množství testovaných látek v jednotlivých kolonoskopických vzorcích pacientů (UC - ulcerózní kolitida, CD - Crohnova choroba, NORM - normální, do NORM zařazeno i astma)

(ng/ml·mg-1)								
Pacient	Diagnóza	IPA	IND	IND/IPA	IPA 5X ( $\mu$ M)	IPA 1x ( $\mu$ M)	IND 5x ( $\mu$ M)	IND 1x ( $\mu$ M)
P25	CD	3706,1	32056	9	97,94	19,59	1368,2	273,6
P14	NORM	5,4	22716	4236	0,14	0,03	969,5	193,9
P34	CD	8,5	22676	2671	0,22	0,04	967,8	193,6
P33	NORM	4,4	21977	5017	0,12	0,02	938,0	187,6
P22	CD	7,6	13500	1776	0,20	0,04	576,2	115,2
P18	UC	4,9	12725	2573	0,13	0,03	543,1	108,6
P30	CD	101,1	12212	121	2,67	0,53	521,2	104,2
P29	NORM	34,9	12072	346	0,92	0,18	515,2	103,0
P17	NORM	236,7	11066	47	6,26	1,25	472,3	94,5
P21	UC	10,6	8653	814	0,28	0,06	369,3	73,9
P4	NORM	16,7	7687	460	0,44	0,09	328,1	65,6
P15	CD	87,0	7616	88	2,30	0,46	325,0	65,0
P10	NORM	36,9	7398	201	0,97	0,19	315,7	63,1
P36	CD	13,9	7045	507	0,37	0,07	300,7	60,1
P12	NORM	74,3	6967	94	1,96	0,39	297,4	59,5
P23	UC	213,2	6275	29	5,63	1,13	267,8	53,6
P2	NORM	43,9	5827	133	1,16	0,23	248,7	49,7
P20	CD	154,8	5384	35	4,09	0,82	229,8	46,0
P6	NORM	1,2	5072	4191	0,03	0,01	216,5	43,3
P16	NORM	563,1	4818	9	14,88	2,98	205,6	41,1
P31	CD	102,1	4738	46	2,70	0,54	202,2	40,4
P11	NORM	6,3	4629	735	0,17	0,03	197,6	39,5
P1	NORM	205,5	4507	22	5,43	1,09	192,4	38,5
P8	NORM	145,9	4326	30	3,86	0,77	184,6	36,9
P9	NORM	1001,6	4192	4	26,47	5,29	178,9	35,8
P5	NORM	108,9	3870	36	2,88	0,58	165,2	33,0
P26	NORM	191,5	3484	18	5,06	1,01	148,7	29,7
P19	CD	152,5	3006	20	4,03	0,81	128,3	25,7
P28	NORM	21,7	2321	107	0,57	0,11	99,1	19,8
P24	UC	43,0	2149	50	1,14	0,23	91,7	18,3
P27	NORM	73,2	2084	28	1,93	0,39	88,9	17,8
P13	NORM	18,9	1914	101	0,50	0,10	81,7	16,3
P3	NORM	31,2	1626	52	0,82	0,16	69,4	13,9
P7	NORM	12,5	1464	117	0,33	0,07	62,5	12,5
P32	NORM	25,7	665	26	0,68	0,14	28,4	5,7
P35	CD	10,4	188	18	0,27	0,05	8,0	1,6

#### 4.2.7 Stanovení viability buněčné linie

Viabilita buněčné linie LS174T-AhR byla stanovena pomocí MTT a NR testu. K MTT a NR testu byly použity testované látky - indol a IPA v koncentracích, které byly připraveny postupným ředěním ze zásobních roztoků a následným ředěním 1000x do média.

##### MTT test

MTT test je založen na přeměně žlutého MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na tmavě fialové krystaly formazanu ((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan). Tato přeměna je katalyzována mitochondriální reduktázou a takové přeměny je schopna buňka s funkčním metabolismem, tedy živá.

Do 96 jamkové destičky byly první den vysety buňky v množství 25 000 buněk na jamku a byly kultivovány 24 hodin v inkubátoru. Po 24 hodinách byly destičky vytaženy a médium vyklepnuto. Na destičky bylo aplikováno 200  $\mu$ l média s testovanými látkami, a po dobu 4 nebo 24 hodin působily na buňky. Jako pozitivní kontrola sloužil Triton X-100, jako negativní kontrola pak DMSO. Médium bylo po uplynutí daného času z destiček vyklepnuto. Jamky s buňkami byly promyty 100  $\mu$ l nesterilním PBS a znovu vyklepnuty. Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l MTT 10x zředěného s médiem. Takto se destičky inkubovaly asi 20 minut do vytvoření modrých krystalů formazanu. Médium s MTT bylo vyklepnuto a krystalky rozpuštěny přidáním 50  $\mu$ l DMSO. Absorbance byla změřena ve spektrofotometru při 570 nm.

##### Test neutrální červeni

Test neutrální červeni je založen na hromadění červeného barviva (3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazin hydrochlorid) v lysosomech živých buněk. Mrtvé buňky zůstanou neobarveny.

Test neutrální červeni byl proveden přesně dle protokolu od výrobce kitu. Do 96 jamkové destičky byly první den vysety buňky v množství 25 000 buněk na jamku a byly kultivovány 24 hodin v inkubátoru. Jako pozitivní kontrola byl použit triton, jako negativní DMSO. Po 24 hodinách byly destičky vytaženy a médium vyklepnuto. Na destičky bylo aplikováno 200  $\mu$ l média s testovanými látkami, kontrolní látky, a po dobu 4 nebo 24 hodin působily na buňky. Médium bylo po uplynutí daného času z destiček vyklepnuto. Jamky promyty 200  $\mu$ l promývacího roztoku a opět vyklepnuty. Následně bylo přidáno 150  $\mu$ l roztoku neutrální červeni naředěné s médiem v poměru 1:99. S touto látkou byly buňky inkubovány po dobu 2 hodin. Po uplynutí doby a vyklepnutí média byly buňky opět opláchnuty promývacím

roztokem o objemu 250  $\mu$ l na jamku. Po vyklepnutí byly destičky s buňkami ponechány na vyschnutí. Po vyschnutí bylo do jamek přidáno 150  $\mu$ l solubilizačního roztoku a deska byla umístěna na kývačku. Následně byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm.

#### **4.2.8 Reporter gene assay**

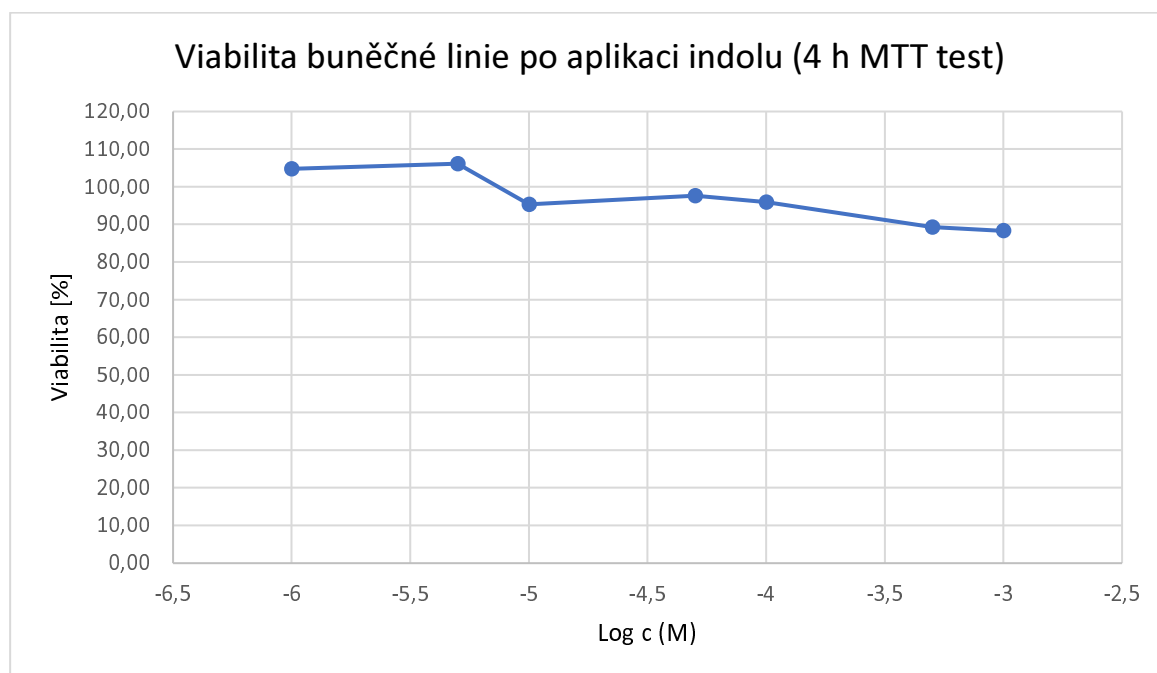
Metoda reporter gene assay je bioluminiscenční metoda určená ke sledování genové exprese. Využívá se k tomu linie transfekovaná reportérovým plazmidem, který produkuje enzym luciferázu, je-li aktivován AhR. Po přidání D-Luciferinu dojde k jeho přeměně na oxyluciferin enzymem luciferázou za vzniku měřitelného záření. Intenzita záření je přímo úměrná k aktivaci receptoru.

Na 96 jamkovou destičku byly vysety buňky o počtu 20 000 buněk na jamku. Po 24 hodinách od vysetí buněk byly destičky vytaženy z inkubátoru a přeneseny do laminárního boxu. Kombinace testovaných látek byly připraveny podle tabulky 2 a ředěny 1000x v tzv. depletovaném médiu. Jedná se o buňkami metabolizované médium odebrané z kultivační lahve po 24 hodinách. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a jako pozitivní kontrola TCDD (koncentrace 20 nM). Koncentrace DMSO ve všech vzorcích byla 0,2 %. Po 4 hodinách inkubace byly destičky vyklepnuty, promyty PBS a do každé jamky bylo aplikováno 25  $\mu$ l lyzačního pufru. Následně byla destička uložena nejméně na 20 minut do - 0 °C. Po rozmražení bylo 5  $\mu$ l lyzátu z každé jamky přeneseno do bílé 96 jamkové destičky určené pro měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30  $\mu$ l substrátu pro luciferázu. Pomocí spektrofotometru byla ve speciálním programu měřena intenzita luminiscence.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Testování vlivu vybraných látek na viabilitu buněk buněčné linie LS174T-AhR

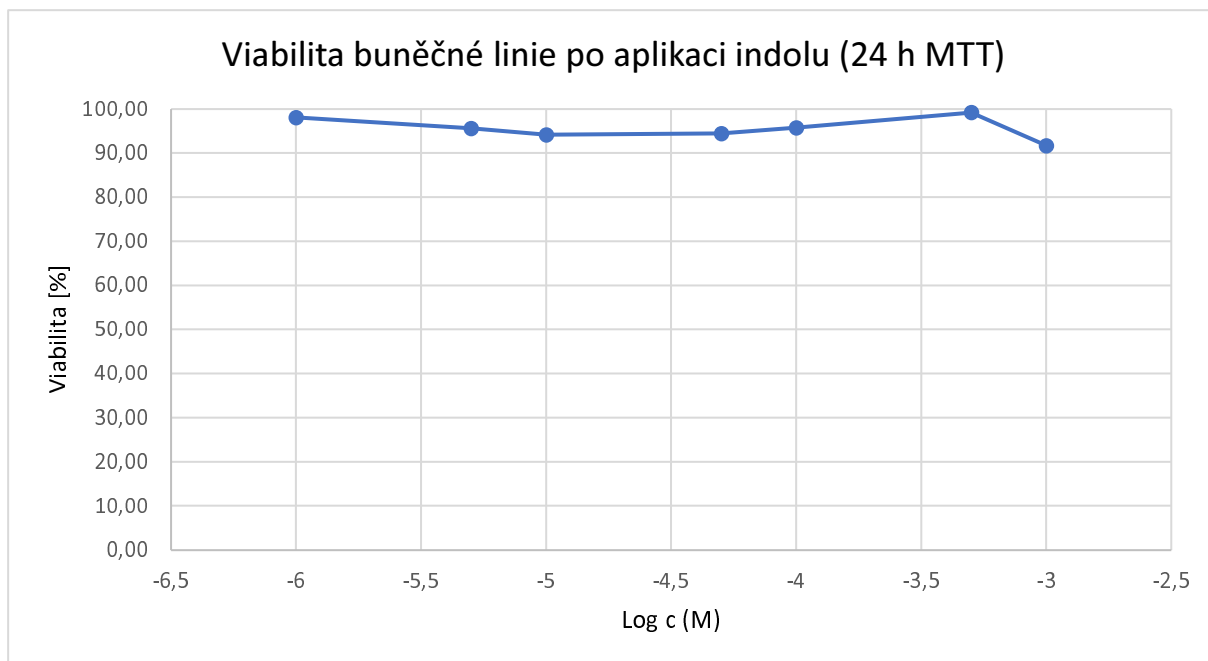
Před samotným stanovením aktivity AhR bylo potřeba zjistit, zda testované látky nevykazují toxicitu vůči buněčné linii LS174T-AhR. Pro stanovení viability bylo využito dvou testů, MTT a NR. Na buněčnou linii byl aplikován indol o koncentraci 1; 5; 10; 50; 100; 500 a 1000  $\mu\text{M}$ , u IPA byly koncentrace aplikovaných látek 10; 50; 100; 500 nM a 1; 5; 10; 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Působení látek bylo testováno za 4 hodiny a 24 hodin. V případě IPA jen 24 hodin. Jelikož indol vykazoval slabou toxicitu u nejvyšší použité koncentrace za 24 hodin, byl použit navíc alternativní test pomocí NR. Vyhodnocení se provádělo spektrofotometricky, kdy intenzita zbarvení vzorku s negativní kontrolou odpovídalo 100% životnosti. Porovnáním intenzit zbarvení testovaných koncentrací látek s intenzitou zbarvení negativní kontroly byla určena viabilita.



**Graf 1:** Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii. Viabilita změřena MTT testem po 4 hodinách. Graf je reprezentativní.

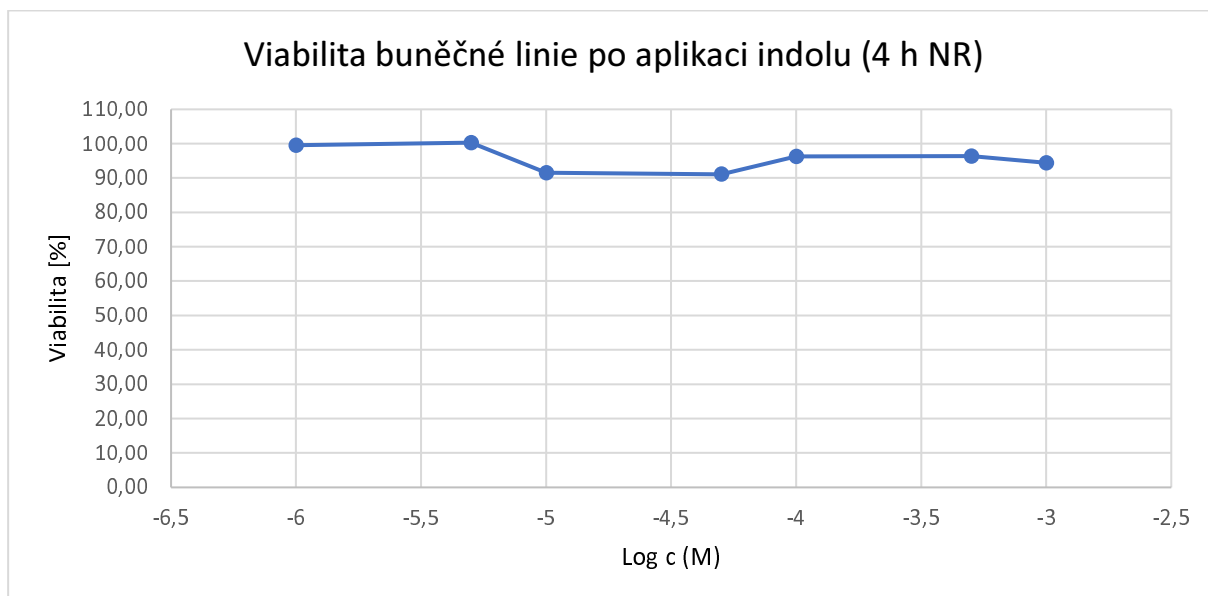
MTT testem byla zjištěna viabilita buněčné linie 4 hodiny po aplikaci indolu o předem daných koncentracích (Graf 1). Nižší koncentrace indolu neovlivnily viabilitu buněčné linie, kdy se pohybovala kolem 100 %. Pokles viability pod 90 % byl zaznamenán až při koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$ .





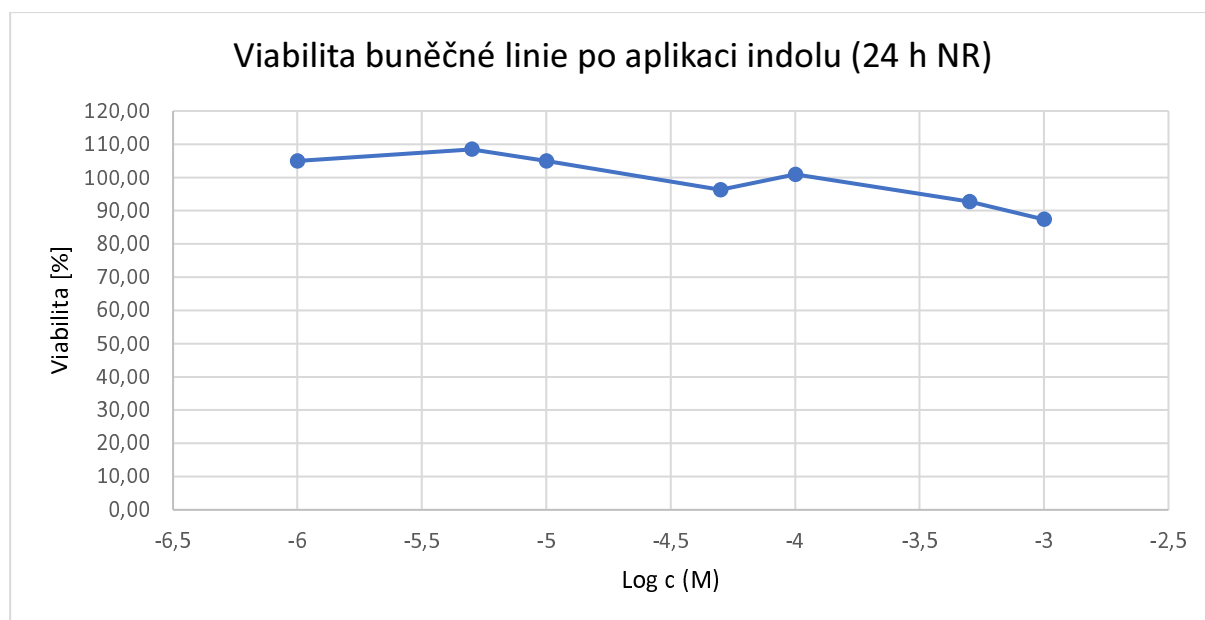
**Graf 2:** Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii. Viabilita změřena MTT testem po 24 hodinách. Graf je reprezentativní.

Viabilita buněčné linie byla zjištěna metodou MTT 24 hodin po aplikaci indolu o předem daných koncentracích (Graf 2). Viabilita se pohybovala pod 100 %. Při nejvyšší koncentraci (1  $\mu$ M) klesla viabilita na 91 %.



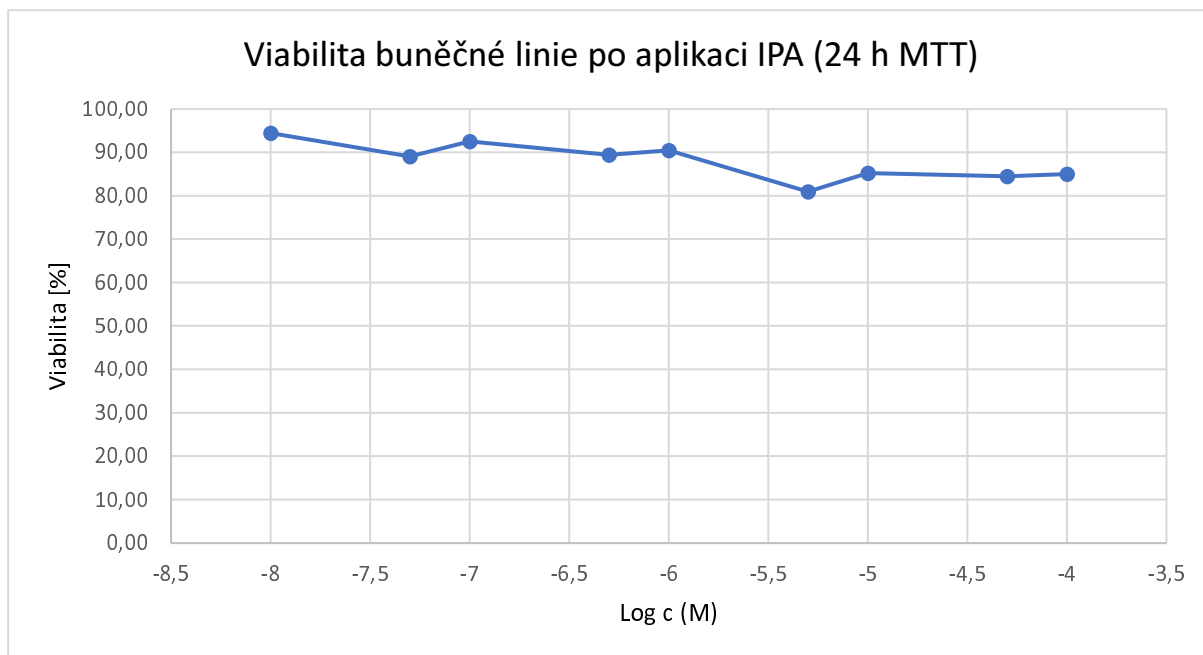
**Graf 3:** Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii. Viabilita změřena NR testem po 4 hodinách. Graf je vyobrazením průměru 2 testů.

Metodou NR byl zjištěn účinek indolu o předem daných koncentracích na viabilitu buněčné linie po 4 hodinách (Graf 3). Viabilita se při nízkých koncentracích pohybovala kolem 100 %, při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  poklesla na 90 % a kolem této hodnoty se pohybovala i při vyšších koncentracích.



**Graf 4:** Viabilita po aplikaci indolu na buněčnou linii. Viabilita změřena NR testem po 4 hodinách. Graf je vyobrazením průměru 2 testů.

Účinek indolu o předem daných koncentracích na buněčnou linii po 24 hodinách byl změřen metodou NR (Graf 4) Viabilita se při nižších koncentracích indolu příliš neměnila a pohybovala se okolo 100 %. K poklesu viability na 87 % došlo při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ .



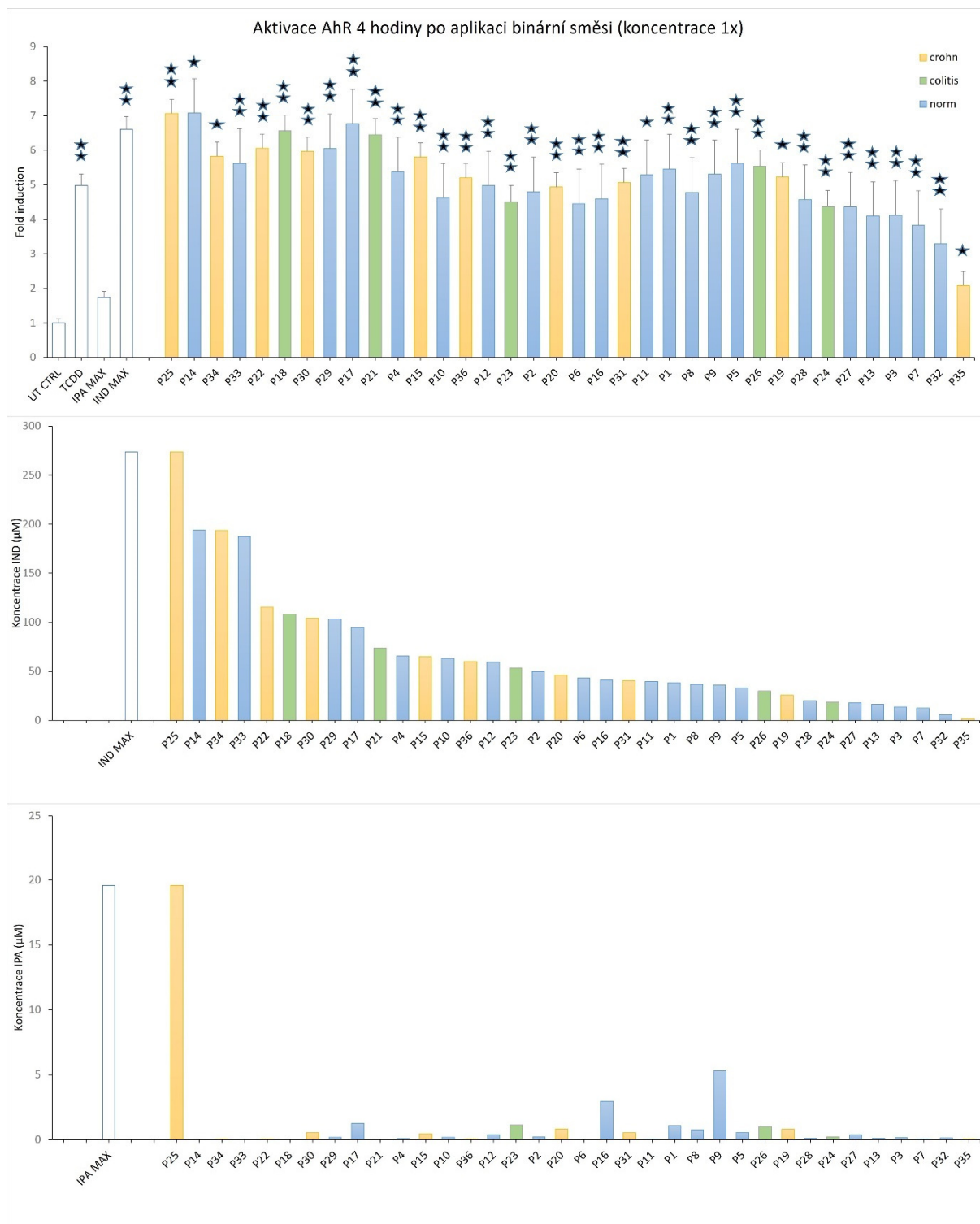
**Graf 5:** Viabilita po aplikaci IPA na buněčnou linii. Viabilita změřena MTT testem po 24 hodinách. Graf byl vytvořen průměrem hodnot dvou testů.

Viabilita buněk byla zjištěna metodou MTT 24 hodin po aplikaci IPA o předem daných koncentracích (Graf 5). Viabilita mírně klesala se zvyšující se koncentrací IPA. Celkově se pohybovala od 95 do 85 %.

## 5.2 Testování vlivu vybraných látek a jejich kombinací na transkripční aktivitu AhR

V nedávné studii (Li *et al*, 2021) byly zveřejněny poměry koncentrací indolu a IPA v aspirátech kolonoskopických pacientů zjištěných plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Přesné poměry indolu a IPA byly aplikovány na stabilní reportérovou buněčnou linii LS174T-AhR, odvozenou od adenokarcinomu tlustého střeva. Byl sledován účinek těchto binárních směsí na aktivitu AhR (Graf 6) za 4 hodiny. Vzhledem k tomu, že kolonoskopické aspiráty jsou ve formě tekutiny, hodnoty jednotlivých koncentrací indolu a IPA jsou pouze orientační a neodpovídají reálným koncentracím ve střevě. Kromě binárních směsí byly na buněčnou linii aplikovány i samotné látky o maximální použité koncentraci (IPA 19,6  $\mu\text{M}$  a indol 273,6  $\mu\text{M}$ ), dále negativní kontrola 0,2 % DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit modelový ligand TCDD (20 nM). Z hodnot koncentrací indolu a IPA (Tabulka 2) v jednotlivých vzorcích je patrné, že hladiny indolu a IPA byly vysoce variabilní a nebyl pozorován rozdíl mezi pacienty s IBD a kontrolními pacienty s nezánettivým onemocněním střev. Nejvyšší použitá koncentrace indolu (indol max = 274  $\mu\text{M}$ , 6,6x) aktivoval AhR silněji než modelový ligand TCDD (4,9x). Samotná IPA aktivovala AhR pouze 2x. Z porovnání

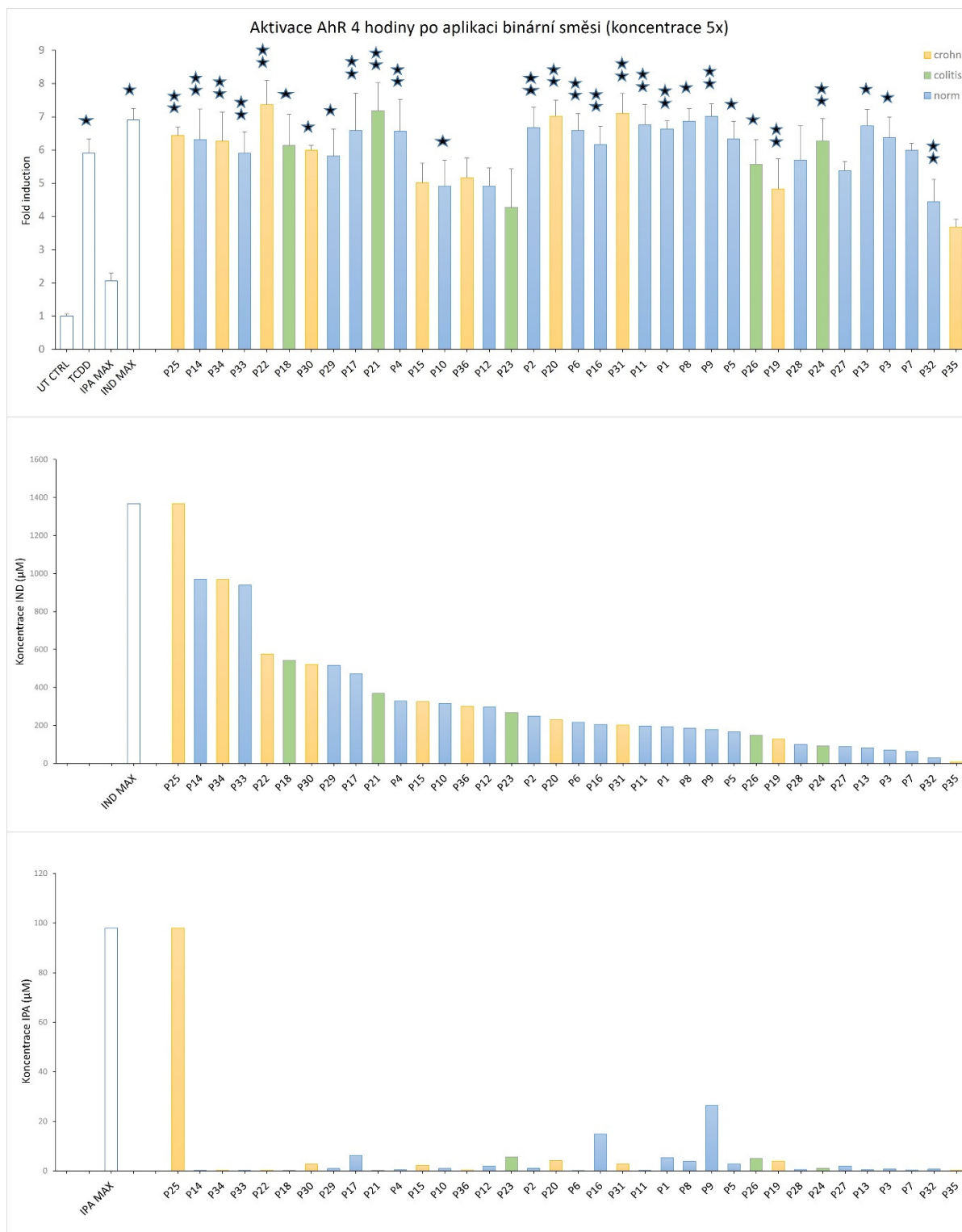
vzorků P25 a P14 (koncentrace IPA 19,6  $\mu\text{M}$  a 0,03  $\mu\text{M}$ ) je patrné, že samostatný indol patří mezi silné aktivátory AhR a přítomnost IPA nemá na tuto aktivaci vliv. Nebyly pozorovány synergistické ani antagonistické účinky na aktivitu AhR. Hodnoty aktivace AhR s klesající koncentrací indol zůstávají na podobné úrovni, což naznačuje, že je receptor saturovaný. Toto pozorování koreluje s interními výsledky z naší laboratoře, kdy hodnota  $\text{EC}_{50}$  indol byla kolem hodnoty 37  $\mu\text{M}$  (Graf 8).



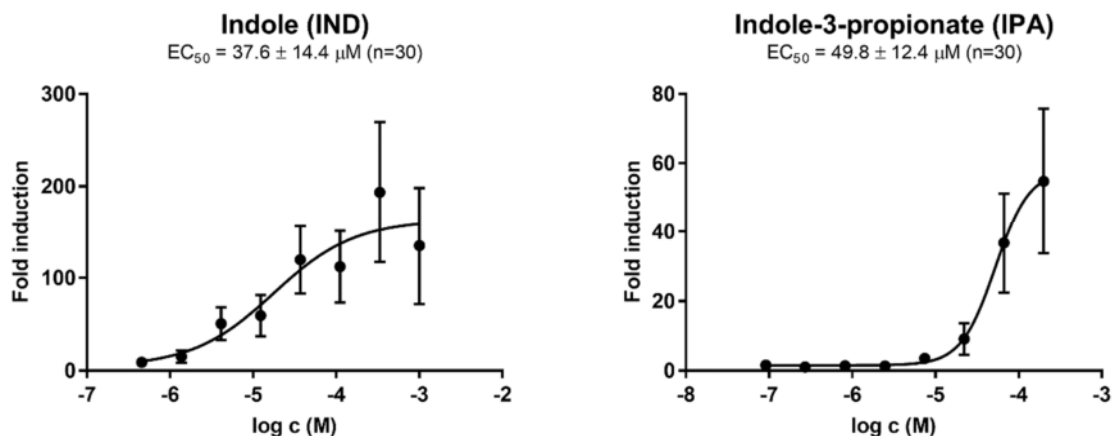
**Graf 6:** Vliv binární směsi na aktivitu AhR (koncentrace 1x). Výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Hvězdičky v grafu znázorňují statistickou hladinu významnosti. Jedna hvězdička znázorňuje statistickou hladinu významnosti  $p < 0,05$ . Dvě hvězdičky znázorňují statistickou hladinu významnosti  $p < 0,01$ .

Jednotlivé poměry byly připraveny také v 5x koncentrovanější formě (Graf 7). Kromě binárních směsí byly na buněčnou linii aplikovány i samotné látky (5x koncentrovanější) o maximální použité koncentraci (IPA 97,94  $\mu\text{M}$  a indol 1368,2  $\mu\text{M}$ ), dále negativní kontrola

0,2 % DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit modelový ligand TCDD (20 nM). Pozitivní kontrolní látka TCDD indukovala transkripci 5,9x více než UT. Nejvyšší koncentrace IPA indukovala transkripci 2x více a nejvyšší koncentrace indolu indukovala transkripci 6,9x více než UT. Podobně jako u koncentrace látek 1x dosahovaly binární směsi podobné aktivace jako maximální koncentrace indolu, což značí, že je receptor saturovaný.



**Graf 7:** Vliv binární směsi na aktivitu AhR (koncentrace 5x). Výsledky jsou průměrem dvou nezávislých experimentů. Hvězdičky v grafu znázorňují statistickou hladinu významnosti. Jedna hvězdička znázorňuje statistickou hladinu významnosti  $p < 0,05$ . Dvě hvězdičky znázorňují statistickou hladinu významnosti  $p < 0,01$ .



**Graf 8:** Závislost aktivace AhR na koncentraci testovaných látek indolu a IPA. Stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-AhR plazmidem pGL-4.27-DRE byla inkubována 4 hodiny se zvyšující se koncentrací testovaných látek (indol 0,34 - 1000  $\mu\text{M}$ , IPA 0,091 - 200  $\mu\text{M}$ ). Po 4 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita, určující míru aktivace AhR. Experiment byl proveden ve třiceti nezávislých buněčných pasážích. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty fold indukce (průměr ze 30 experimentů) a vztaženy k negativní kontrole DMSO.



## 6 DISKUSE

V posledních letech byly účinky mikrobiálních metabolitů tryptofanu na AhR rozsáhle studovány v mnoha vědeckých pracích (Vyhlídalová *et al.*, 2020; Hubbard *et al.*, 2015; Rothhammer *et Quintana*, 2019; Stepankova *et al.*, 2018) a AhR byl tak zařazen mezi významné modulátory střevního zdraví. Současná znalost účinků střevních mikrobiálních katabolitů je však omezena na studie zabývající se účinkem jedné molekuly. Je důležité vzít v úvahu realističtější situace v GI, kde je podstatná biologická odpověď určena současnou přítomností více metabolitů, které tak představují rezervoár potenciálních ligandů AhR. Možné účinky směsi na aktivitu AhR dosud nebyly studovány, ale roste důkaz, že aktivace AhR ve střevě je pravděpodobně způsobena synergickým účinkem několika metabolitů (Goya-Jorge *et al.*, 2022). První studie zabývající se synergickým působením dvou sloučenin vázající se společně do ligand vazebné domény (LBD) byla popsána pro pregnanový X receptor. Byla objevena robustní synergická stimulace PXR směsí látek, které samy o sobě vykazují velmi nízkou účinnost (Delfosse *et al.*, 2015; Delfosse *et al.*, 2021). U myši měly agonistické účinky IPA v kombinaci s indolem silné protizánětlivé účinky zprostředkované PXR (Venkatesh *et al.*, 2014).

Stejně jako v případě PXR je také AhR schopen vázat různé typy ligandů v důsledku své rozsáhlé ligand vazebné domény a bylo popsáno, že je schopen vázat i více molekul současně. *In silico* modelování a dokování poskytlo důkaz, že ligand vazebná doména lidského AhR je schopna vázat dvě molekuly indolu prostřednictvím jedinečného bimolekulárního mechanismu (Hubbard *et al.*, 2015). Takový mechanismus může vést ke specifické konformaci a následné modulaci aktivity AhR ligandem, která by mohla ovlivnit např. tvorbu AhR ARNT dimeru nebo jiných komplexů s AhR (Soshilov *et Denison*, 2014).

Cílem práce bylo sledovat potencionální synergický účinek indolu a IPA kyseliny na aktivitu AhR. Látky byly aplikovány v podobě binárních směsí na základě koncentrací zjištěných v aspirátech kolonoskopických pacientů. Před samotným stanovením transkripční aktivity AhR metodou Reporter Gene Assay byl sledován vliv těchto látek na viabilitu buněčné linie LS174T-AhR. Studované látky nevykazovaly toxický účinek na buněčné linie LS174T-AhR s výjimkou nejvyšší použité koncentrace indolu. Viabilita klesla po 24 h o téměř 40 %, ovšem v případě 4 h inkubace nebyla tato koncentrace toxická. Z výsledků studia transkripční aktivity AhR (Graf 6 a 7) je zřejmé, že samotná IPA aktivovala AhR velmi slabě oproti indolu, jehož účinek byl srovnatelný s modelovým ligandem TCDD. Podobné účinky byly pozorovány v publikaci zabývající se sledováním účinku mikrobiálních katabolitů tryptofanu v buněčné

linii AZ-AhR za 24 h. V této práci indol vykazoval vysokou účinnost vůči AhR a IPA byla zařazena mezi katabolity s velmi nízkou účinností. V případě indolu nedošlo po 24 hodinách k saturaci receptoru a hodnota EC<sub>50</sub> byla orientačně stanovena na 1480 μM (Vyhlídalová *et al*, 2020). Porovnáním hodnot fold indukce indolu o maximální použité koncentraci (274 μM a 1374 μM) je zřejmé, že po 4 hodinách je již receptor plně saturován a výsledky naznačují, že oproti TCDD je indol v buňce rychle metabolizován. Hodnota EC<sub>50</sub> indolu byla na našem pracovišti stanovena na ~ 37,6 μM (Graf 8), což je v souladu s jinou studií označující hodnotu EC<sub>50</sub> pro indol kolem 3 μM po 4 hodinách inkubace (Hubbard *et al*, 2015). Potencionální synergický účinek studovaných látek nebyl v této práci prokázán. Ke zvýšení aktivity AhR nedošlo ani v případě, kdy byl použit indol o velmi nízké koncentraci v kombinaci s vysokou koncentrací IPA. Vzorky kolonoskopických aspirátů pocházely od zdravých dobrovolníků a pacientů trpících UC nebo CD. V našem případě jsme nepozorovali rozdíly v hladinách jednotlivých látek mezi zdravými a nemocnými jedinci. V jiné studii však byl pozorován rozdíl v koncentraci IPA v krevním séru. U pacientů s UC byla pozorována snížená hladina IPA v krevním séru oproti zdravým jedincům. Hladina IPA v aspirátech použitých pro tuto práci se výrazně neměnila při porovnání zdravých jedinců a jedinců s UC. Zvýšená hladina IPA v této studii vedla naopak k remisi onemocnění (Tennoune *et al*, 2022).

V současné době není známá přesná koncentrace indolu a IPA ve střevě. Určením hladiny fekálního indolu u dobrovolníků bylo zjištěno, že koncentrace indolu se pohybuje v širokém rozmezí, a to mezi 0,3 a 6,64 mM (Tennoune *et al*, 2022). V další studii zabývající se kvantifikací katabolitů tryptofanu ve střevě se koncentrace indolu pohybovala kolem 200-500 μM v závislosti na stravě jedince. Autoři práce dále zmiňují, že přestože je indol nejhojnějším tryptofanovým metabolitem v lidské stolici, nepředstavuje dominantní zdroj aktivace AhR v gastrointestinálním traktu pravděpodobně v důsledku variabilních hladin ostatních hlavních indolových derivátů (Dong *et al*, 2020). Rozdíly v koncentracích jsou pravděpodobně způsobeny rozdíly ve složení střevní mikroflóry jednotlivých dobrovolníků a různými úrovněmi konzumace bílkovin ve stravě (Tennoune *et al*, 2022).

## 7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce jsem se věnoval účinku binární směsi indolu a indol-3-propionové kyseliny na aktivaci AhR. Nejprve byla testována cytotoxicita studovaných látek na buněčnou linii LS174T-AhR metodami MTT a NR. Cytotoxicita nebyla v testovaných koncentracích zjištěna, až na nejvyšší koncentraci indolu po 24 hodinách. Bylo potvrzeno, že samotný indol aktivuje AhR s vysokou účinností, a naopak IPA s velmi nízkou účinností. Potenciální synergický účinek studovaných látek nebyl v této práci prokázán. Ke zvýšení aktivity AhR nedošlo ani v případě, kdy byl použit indol o velmi nízké koncentraci v kombinaci s vysokou koncentrací IPA.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGUS, Allison, Julien PLANCHAIS a Harry SOKOL, 2018. *Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease*. **23**(6), 716-724.

BAUMGART, Daniel C a Simon R CARDING, 2007. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. **369**(9573), 1627-1640.

Crohnova choroba. [online] [navštíveno 21.2.2022] Dostupné  
<https://www.crohn.cz/crohnova-choroba>

DELFOSE, Vanessa, Tiphaine HUET, Deborah HARRUS et al., 2021. Mechanistic insights into the synergistic activation of the RXR–PXR heterodimer by endocrine disruptor mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **118**(1).

DONG, Fangcong, Fuhua HAO, Iain A. MURRAY et al., 2020. Intestinal microbiota-derived tryptophan metabolites are predictive of Ah receptor activity. *Gut Microbes*. **12**(1).

DVOŘÁK, Zdeněk, Karolína POULÍKOVÁ a Sridhar MANI, 2021. Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **215**.

GAYA, Daniel R, Richard K RUSSELL, Elaine R NIMMO a Jack SATSANGI, 2006. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases?. *The Lancet*. **367**(9518), 1271-1284.

GILL, Steven R., Mihai POP, Robert T. DEBOY et al., 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. **312**(5778), 1355-1359.

GOYA-JORGE, Elizabeth, Irma GONZA, Pauline BONDUE, Caroline DOUNY, Bernard TAMINIAU, Georges DAUBE, Marie-Louise SCIPPO a Véronique DELCENSERIE, 2022. Human Adult Microbiota in a Static Colon Model: AhR Transcriptional Activity at the Crossroads of Host–Microbe Interaction. *Foods*. **11**(13).

HOLMES, Elaine, Jia V. LI, Thanos ATHANASIOU, Hutan ASHRAFIAN a Jeremy K. NICHOLSON, 2011. Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*. **19**(7), 349-359.

HUBBARD, Troy D., Iain A. MURRAY, William H. BISSON, Tejas S. LAHOTI, Krishne GOWDA, Shantu G. AMIN, Andrew D. PATTERSON a Gary H. PERDEW, 2015. Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports*. **5**(1).

CHISTIAKOV, Dimitry A., Yuri V. BOBRY SHEV, Emil KOZAROV, Igor A. SOBENIN a lexander N. OREKHOV, 2015. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in Microbiology*. **5**.

LI, Hao, Peter ILLÉS, Chamini V. KARUNARATNE et al., 2021. Deciphering structural bases of intestinal and hepatic selectivity in targeting pregnane X receptor with indole-based microbial mimics. *Bioorganic Chemistry*. **109**.

MORGAN, Xochitl C, Timothy L TICKLE, Harry SOKOL et al., 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*. **13**(9).

OLIPHANT, Kaitlyn a Emma ALLEN-VERCOE, 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*. **7**(1).

PAWLAK, Michal, Philippe LEFEBVRE a Bart STAELS, 2012. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **12**(6), 486-504.

PHANG-LYN S, LLERENA VA. Biochemistry, Biotransformation. 2021 Aug 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 31335073

ROAGER, Henrik M. a Tine R. LICHT, 2018. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications*. **9**(1).

ROMAN, Ángel C., José M. CARVAJAL-GONZALEZ, Jaime M. MERINO, Sonia MULERO-NAVARRO a Pedro M. FERNÁNDEZ-SALGUERO, 2018. *The aryl hydrocarbon receptor in the crossroad of signalling networks with therapeutic value*. **185**, 50-63.

ROTHHAMMER, Veit a Francisco J. QUINTANA, 2019. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. **19**(3), 184-197.

SCOTT, Samantha A., Jingjing FU a Pamela V. CHANG, 2020. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **117**(32), 19376-19387.

SKÁLOVÁ, Lenka, 2017. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum.

SOSHILOV, Anatoly A. a Michael S. DENISON, 2014. Ligand Promiscuity of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists and Antagonists Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Molecular and Cellular Biology*. **34**(9), 1707-1719.

SPOR, Aymé, Omry KOREN a Ruth LEY, 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. **9**(4), 279-290.

STEJSKALOVA, Lucie, Zdenek DVORAK a Petr PAVEK, 2011. Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. *Current Drug Metabolism*. **12**(2), 198-212.

STEVENS, Emily A., Joshua D. MEZRICH a Christopher A. BRADFIELD, 2009. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. **127**(3), 299-311.

STROBER, Warren, Ivan FUSS a Peter MANNON, 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*. **117**(3), 514-521.

TENNOUNE, Naouel, Mireille ANDRIAMIHAJA a François BLACHIER, 2022. Production of Indole and Indole-Related Compounds by the Intestinal Microbiota and Consequences for the Host: The Good, the Bad, and the Ugly. *Microorganisms*. **10**(5).

THURSBY, Elizabeth a Nathalie JUGE, 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. **474**(11), 1823-1836.

VRZAL, Radim, Jitka ULRICHOVÁ a Zdeněk DVOŘÁK, 2004. Aromatic Hydrocarbon Receptor Status in the Metabolism of Xenobiotics Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Biomedical Papers*. **148**(1), 3-10.

VYHLÍDALOVÁ, Barbora, Kristýna KRASULOVÁ, Petra PEČINKOVÁ et al., 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).

WRIGHT, Eric J., Karen PEREIRA DE CASTRO, Aditya D. JOSHI a Cornelis J. ELFERINK, 2017. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Current Opinion in Toxicology*. **2**, 87-92.

YIN, Jiuhe, Baifa SHENG, Yuan QIU, Kunqiu YANG, Weidong XIAO a Hua YANG, 2016. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Proliferation*. **49**(5), 554-560.

ZHANG, Yi-Zhen a Yong-Yu LI, 2014. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. **20**(1), 91-99.

ZHU, Kaixi, Qingqi MENG, Zhi ZHANG, Tao YI, Yuan HE, Jing ZHENG a Wei LEI, 2019. Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy (Review). *Molecular Medicine Reports*.