

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Andrea Kisková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium vlivu signální dráhy receptoru pro
vitamín D (VDR) na aktivitu aryluhlovodíkového
receptoru (AhR) ve střevní linii LS174T**

Bakalářská práce

Andrea Kisková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí
vedoucího práce a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Andrea Kisková

Souhrn

Předkládaná bakalářská práce se zaměřuje na studium vlivu aktivovaného receptoru pro vitamín D na biotransformační enzym CYP1A1 v buněčné linii odvozené z adenokarcinomu tlustého střeva. Receptor byl aktivován potentním agonistou kalcitriolem ve třech koncentracích blízkých fyziologickému stavu. Indukce enzymu CYP1A1 byla zprostředkována pomocí aryluhlovodíkového receptoru, který byl aktivován modelovým induktorem 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem. Po 24 hodinách inkubace byla stanovena hladina mRNA CYP1A1 pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a po 48 hodinách 7-ethoxy-O-resorufin deethylásová katalytická aktivita enzymu. Výsledky ukazují na statistický pokles katalytické aktivity v nejvyšší zkoumané koncentraci kalcitriolu s 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem. Pokles hladiny mRNA byl zjištěn s rostoucí koncentrací kalcitriolu v kombinaci s 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem. Výsledky naznačují funkční interakci mezi VDR a AhR signalizační dráhou.

Summary

The bachelor thesis is focused on the study of the influence of activated receptor for vitamin D on biotransformation enzyme CYP1A1 in adenocarcinoma-derived cell line. Receptor was activated by potent agonist calcitriol, in doses relevant to physiological conditions. The induction of enzyme CYP1A1 was mediated by aryl hydrocarbon, activated by model inducer 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. After 24 hours of incubation, the level of CYP1A1 mRNA was determined by polymerase chain reaction in real time and after 48 hours, the 7-ethoxy-O-resorufin deethylase activity was determined. The results showed a statistical decrease in catalytic activity at the highest concentration of studied calcitriol with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Decreased level of mRNA was detected with increasing concentration of calcitriol in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. The results suggest a functional interaction between VDR and AhR signaling pathway.

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli, Doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za trpělivost, ochotu a cenné rady, jenž mi při mé bakalářské práci dal a za čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za jejich rady a pomoc v průběhu vykonání praktické části bakalářské práce.

Obsah

Úvod.....	9
Teoretická část	
1. Metabolismus xenobiotik.....	10
1.1 I. fáze biotransformace.....	11
1.1.1 Cytochromy P450 (CYP).....	12
1.1.2 Podrodina CYP1A.....	13
1.2 II. fáze biotransformace.....	14
1.3 III. fáze biotransformace.....	15
2. Regulace CYP1A1 a AhR.....	16
2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR).....	16
2.2 Regulace exprese CYP1A1.....	17
2.2.1 Hormonální regulace exprese.....	19
2.2.1.1 Regulace glukokortikoidy.....	19
2.2.1.2 Regulace inzulínem.....	20
2.2.1.3 Regulace glukagonem.....	20
2.2.1.4 Regulace androgeny.....	21
2.2.1.5 Regulace estrogenery.....	21
2.2.1.6 Regulace progesteronem.....	22
2.2.1.7 Regulace thyroidy.....	23
2.2.2 CYP1A1 a signalizace jadernými receptory.....	23
2.2.2.1 Vliv retinoidních receptorů na AhR-CYP1A1 signalizaci.....	24
2.2.2.2 Vliv receptoru pro vitamín D na AhR-CYP1A1 signalizaci...	24
3. Receptor pro vitamín D (VDR).....	25
3.1 VDR a CYP1A1.....	26
4. Vitamín D.....	28
4.1 Vznik vitamínu D působením ultrafialového záření.....	29
4.2 Vitamín D jako hormon.....	30
4.3 Deficit.....	31
4.4 Suplementace	31
4.5 Vitamín D v potravinách.....	32
4.6 Doporučená denní dávka.....	33

5. Cíl práce.....	34
Experimentální část	
6. Materiál a metodika.....	35
6.1 Materiál.....	35
6.1.1 Biologický materiál.....	35
6.1.2 Chemikálie a použité roztoky.....	35
6.1.3 Laboratorní přístroje.....	37
6.1.4 Laboratorní pomůcky.....	37
6.2 Metodika.....	38
6.2.1 Detekce exprese genu CYP1A1 metodou RT-PCR ve střevní linii	38
6.2.1.1 Izolace RNA.....	41
6.2.1.2 cDNA syntéza.....	42
6.2.1.3 Real-time PCR (qPCR).....	42
6.2.2 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD) na detekci katalytické aktivity CYP1A1 v 96 jamkovém uspořádání.....	45
7. Výsledky.....	47
7.1 Detekce exprese genu CYP1A1 metodou RT-PCR ve střevní linii.....	47
7.2 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD) na detekci katalytické aktivity CYP1A1 v 96 jamkovém uspořádání.....	48
8. Diskuze.....	50
9. Závěr.....	52
10. Literatura.....	53
11. Seznam použitých zkratk.....	60

Úvod

Lidský organismus se denně potýká s nepřeborným množstvím pro něj cizích látek (xenobiotik), která musí zpracovat. Obklopují nás ve vzduchu, který dýcháme (popílek, cigaretový kouř), v potravě (aditiva) a v neposlední řadě je také přijímáme jako látky, které nás zbavují různých útrap, tedy léčiva. Aby nedošlo k hromadění těchto pro tělo cizích látek, musejí být odbourány pomocí detoxikačních procesů. Tyto procesy se převážně uskutečňují v játrech, ledvinách, zažívacím traktu a také v plicích, tedy ve vylučovacích orgánech. Na detoxikaci xenobiotik se podílejí specializované proteiny označované jako cytochromy P450. Tyto enzymy hrají také důležitou roli v metabolismu endogenních látek, nicméně přeměna cizorodých látek je pro ně u člověka prioritní. Metabolismus xenobiotik probíhá ve třech fázích. V první fázi dochází k zpolárnění sloučeniny vnesením či odkrytím polární skupiny, oxidoredukčními a hydrolytickými reakcemi. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci molekuly z první fáze s konjugacním činidlem, odtud se tato fáze označuje jako konjugační. V poslední třetí fázi je výsledná molekula přepravena pomocí transmembránových přenašečů do extracelulárního prostředí a poté z organismu ven.

V každé fázi dochází k regulaci enzymů, jež se jich účastní a to pomocí transkripčních faktorů. Sledováním změn hladiny těchto enzymů je možné zabránit nežádoucím vlivům na lidský organismus.

1. Metabolismus xenobiotik

V roce 1828 německý chemik Friedrich Woehler dokázal existenci buněčného metabolismu tím že, syntetizoval močovinu pomocí tepelného rozkladu kyanatanu amonného. Do této doby panovalo přesvědčení, že děje v živých organismech jsou založeny na životní síle (*vital force*) (Dvořák *et Cvek*, 2011).

Mezi základní vlastnosti živých organismů patří schopnost udržet si stále vnitřní prostředí (homeostázu). Na základě toho musí živý organismus čelit působení rozličného množství látek z vnějšího prostředí, jelikož vysoké koncentrace nebo dlouhé působení těchto látek vede k nevratnému poškození a tedy smrti jedince. Tyto látky tělu cizí jsou označovány jako xenobiotika. Xenobiotika nejsou nutné pro zdravý vývoj organismu ani nejsou využívány jako zdroj energie. Za xenobiotika můžeme považovat léčiva, environmentální polutanty jako například cigaretový kouř nebo dioxiny, dále chemikálie používané v zemědělství (herbicide, pesticidy), v potravinářství přídatná aditiva (ochucovadla, barviva, stabilizátory, atd.) i přírodní látky (alkaloidy, flavonoidy, terpeny) a jiné nečistoty ovzduší (popílek, SO₂, CO₂, atd.) (Dvořák *et Cvek*, 2011; Knejzlík *et al.*, 2000).

Cizorodé látky do těla vstupují skrz trávicí trakt (žaludek, střeva), respirační systém (epitely plic, nosní sliznice) a pokožku, přičemž ta slouží jako nejúčinnější bariéra při vstupu cizích látek do těla. Dále se xenobiotika dostávají do krevního řečiště, kde mohou interagovat s plazmatickými proteiny, které slouží například jako transportéry. Příkladem takového proteinu může být albumin. Nakonec látka vstupuje do jednotlivých buněk. Způsob vstupu cizorodých látek do těla závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech (Dostálek *et al.*, 2006; Knejzlík *et al.*, 2000).

Biotransformace neboli metabolismus xenobiotik probíhá zejména v játrech. Kromě jater se na přeměně cizorodých látek podílí také ledviny, plíce, střeva, placenta i kůže. Aby je organismus následně mohl vyloučit ven pomocí moči a stolice, musí nejprve v průběhu biotransformace dojít ke zpolárnění xenobiotika, čímž se usnadňuje jeho exkrece. Vysoce polární látky však mohou organismem projít beze změny.

Cílem biotransformace je detoxikace organismu. Ne vždy však dochází k biodegradaci cizorodých látek. Zejména u léčiv může naopak dojít k jejich bioaktivaci, kdy se stávají farmakologicky aktivnější. Ve výsledku může vzniknout toxičtější metabolit než ten, který do biotransformace vstupoval (Dostálek *et al.*, 2006; Dvořák *et Cvek*, 2011; Knejzlík *et al.*, 2000).

Proces biotransformace probíhá ve třech fázích:

1.1 I. fáze biotransformace

V první fázi metabolismu xenobiotik dochází k přeměně substrátu na polárnější produkt. Toho lze dosáhnout chemickou přeměnou molekuly, kdy dojde k odkrytí polární skupiny nebo zavedením jiné polární funkční skupiny do molekuly (např.: -OH, -NH₂, -SH, =CO, -COOH), či přeměnou méně polární skupiny na polárnější. V této fázi se uplatňují oxidoredukční a hydrolytické reakce. Z oxidoredukčních lze zmínit aromatickou a alifatickou hydroxylaci, epoxidaci, dealkylaci, nitro-oxidaci, oxidativní a redukční dehalogenaci, nitroredukce a azoredukce. Karboxyesterázy, peptidázy, epoxihydrolázy katalyzují reakce hydrolytické. Nejvýznamnějším enzymovým systémem, který se podílí na přeměnách I. fáze jsou cytochromy P450. Katalyzují velké množství oxidačních, redukčních, dealkylačních a epoxidačních reakcí. Jako substráty pro cytochrom P450 slouží jak endogenní metabolity (steroidy, vyšší mastné kyseliny), tak i xenobiotika (léky, aditiva, atd.). Vyznačuje se tedy vysokou substrátovou specifitou. Oxidačně-redukční reakce také katalyzují flavin monooxidázové enzymy. Nejčastěji katalyzují oxygenace dusíku, síry a dalších látek obsahující heteroatomy. Další oxidačně-redukční enzymy této fáze jsou alkohol dehydrogenáza, aldehyd dehydrogenáza, aldehyd oxidázy a xantin oxidázy. Peroxidáza se podílí na přeměně cizorodých látek v játrech a placentě. Nejvyšší obsah karboxyl esterázy, která katalyzuje hydrolyzu látek mající ve své struktuře esterovou nebo amidovou vazbu, je v játrech. Všechny tyto reakce vytvářejí metabolit, který vstupuje do II. fáze biotransformace, kde reaguje s konjugačním činidlem. Xenobiotika, která již obsahují ve své molekule reaktivnější skupiny, nepodléhají I. fázi a mohou vstoupit rovnou do II. fáze (Dostálek *et al.*, 2006; Dvořák *et Cvek*, 2011; Knejzlík *et al.*, 2000; Vrzal *et al.*, 2004).

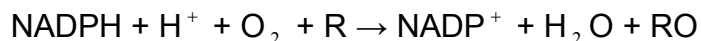
1.1.1 Cytochromy P450 (CYP)

První zmínka v literatuře o cytochromu P450 se objevila v roce 1962. O rok později byla objasněna i jeho funkce (Dostálek *et al.*, 2006). Strukturně se jedná o hemoprotein typu b, který ve své molekule nekovalentně váže protoporphyrin IX. Označení cytochromu P450 je odvozeno od jeho redukované formy enzymu, která váže oxid uhelnatý a vykazuje silné absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. CYPy jsou nestabilní, a proto snadno dochází k přeměně na inaktivní formu, která má maximální absorpci při 420 nm (Dostálek *et al.*, 2006; Knejzlík *et al.*, 2000).

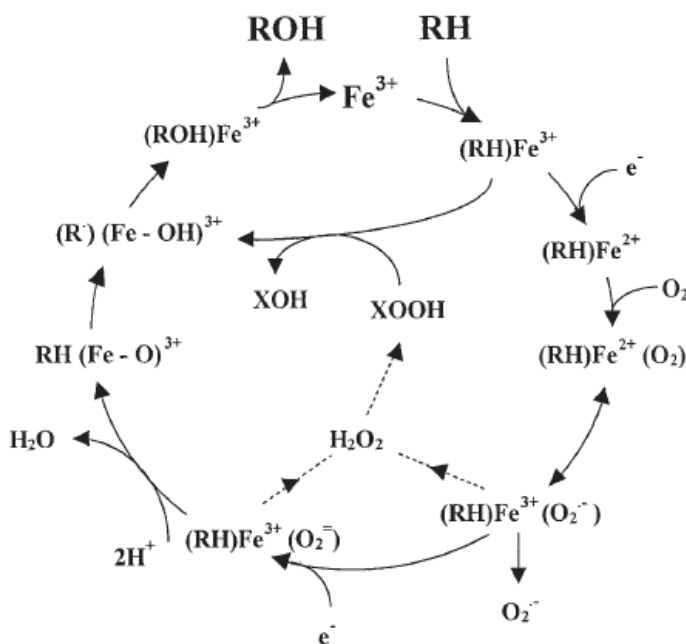
Později bylo zjištěno, že se nejedná pouze o jeden protein, ale o celou skupinu. Evolučně jsou tyto proteiny velmi staré. Některé z nich vznikly genovou duplikací (např.: u živočichů jako obrana před rostlinnými jedy), proto některé izoenzymy (individuální enzymy) vykazují vysoký stupeň homologie. Doposud bylo popsáno více než 3000 různých enzymů cytochromu P450 katalyzující více než 40 různých reakcí, z nichž jako nejdůležitější se jeví hydroxylace. Čím více CYPů bylo popsáno, tím nutnější bylo zavedení systémového názvosloví. Všechny cytochromy tvoří tzv. nadrodinu (superfamily). Příslušnost k této superrodině se označuje zkratkou CYP. Dále se dělí do rodin a podrodin podle podobnosti aminokyselinové sekvence. Rodiny se označují arabskou číslicí, patří sem sekvence proteinů s minimálně 40% podobností. Podrodiny se pak značí velkými písmeny a vykazují nejméně 55% podobnost. Individuální enzymy (zástupci podrodin) se opět označují arabskými číslicemi. Příkladem takové izoformy může být třeba CYP1A1, známo je však více než 150 izoform.

Cytochromy se vyskytují jak u člověka, tak u bakterií, rostlin, živočichů i hub. CYP je u eukaryot lokalizován na membránách endoplasmatického retikula, mitochondrií nebo jádra. Bakterie je mají v cytosolu a to v rozpuštěné formě. V lidském genomu se přibližně vyskytuje 60 různých forem CYPů, u rostlin jich bylo objeveno na 300. U savců se cytochromy vyskytují ve všech typech tkání, kromě erytrocytů a svalových buněk. Nejvíce je zastoupen v játrech, ale také v placentě, střevech, plicích a kůži. Jeho množství v jednotlivých tkáních nelze považovat za absolutní, jelikož závisí na řadě faktorů, jako například na genetickém polymorfismu, podmínkách vnějšího prostředí, kouření, výživě, věku, pohlaví, atd. (Anzenbacher *et al.*, 2001; Dostálek *et al.*, 2006; Knejzlík *et al.*, 2000).

Cytochromy P450 mají monooxygenázovou aktivitu a jsou schopny metabolizovat lipofilní cizorodé látky. Při hydroxylačních reakcích, které nejčastěji katalyzují (Obr. 1), váží jeden atom kyslíku do struktury substrátu a druhý atom tvoří vodu. Donorem elektronů tohoto enzymatického systému je NADPH. Reakci, kterou cytochromy katalyzují, bychom obecně mohli napsat takto:



(Dostálek *et al.*, 2006; Guengerich, 2001)



Obr. 1: Katalytický cyklus CYP (převzato z: Anzenbacher *et al.*, 2001)

Enzymatický systém cytochromu P450 také syntetizuje endogenní látky, jako jsou například steroidní hormony. Dále se podílí na tvorbě cholesterolu, žlučových kyselin, steroidů, prostacyklinů a tromboxanu A₂ (Dostálek *et al.*, 2006).

1.1.2 Podrodina CYP1A

Podrodina CYP1A má dvě konkrétní formy, a to CYP1A1 a CYP1A2. Oba zástupci se významně podílejí na biotransformaci xenobiotik u člověka. Vykazují 70% shodu aminokyselinové sekvence a katalyzují podobné reakce (Dostálek *et al.*, 2006). Lidský cytochrom CYP1A1 se nachází především v extrahepatálních tkáních

jako je epitel plic, kůže a gastrointestinální trakt. Dále byl objeven v placentě, plodu a embryu. Jeho konstitutivní exprese je v těchto tkáních těžko zjištělná, pokud nedojde k jeho indukci pomocí polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), jako je například benzo[a]pyren (BaP), nebo třeba halogenovaných aromatických uhlovodíků jako je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Také metabolity vzniklé při spalování tabáku indukují expresi CYP1A1 v plicích kuřáků. Tyto indukce jsou většinou řízené pomocí jaderných receptorů aktivovaných příslušným ligandem. Indukci CYP1A1 zprostředkovává aryl uhlovodíkový receptor (AhR). (Pávek *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2013). Inhibitorem formy CYP1A1 je α -naftoflavon (Pelkonen *et al.*, 2008).

Přestože je CYP1A1 jeden z nejdůležitějších detoxikačních enzymů procesu biotransformace, díky své široké substrátové specifitě a velkému rozšíření po celém těle, může ale také produkovat karcinogenní intermediáty v průběhu oxidace polycyklických aromatických uhlovodíků (Pávek *et al.*, 2008). Zvýšená aktivita tohoto enzymu ovlivňuje výskyt nádorů plic, prsu a kůže (Dostálek *et al.*, 2006).

Enzym CYP1A2 se vyskytuje převážně v játrech. Podílí se na bioaktivaci řady karcinogenů, která se může projevit zvýšenou náchylností k onkologickým onemocněním. Jeho aktivaci způsobuje celá řada fyziologických a patologických pochodů v organismu i exogenní faktory. Indukci vyvolávají heterocyklické aminy a PAU (Dostálek *et al.*, 2006). Metabolizuje látky jako kofein, fenacetin, heterocyklické aromatické aminy a několik klinicky užívaných léčiv (Walsh *et al.*, 2013). Nejznámějším inhibitorem pro CYP1A2 je furafyllin (Pelkonen *et al.*, 2008). Stejně tak jako CYP1A1 i CYP1A2 způsobuje vznik rakoviny, zejména močového měchýře (Dostálek *et al.*, 2006).

1.2 II. fáze biotransformace

Druhá fáze procesu biotransformace bývá označována jako konjugační nebo také jako syntetická. Oxidovaný produkt neboli metabolit z první fáze je dále polarizován, pro snadnější vyloučení z organismu. Dochází k interakci s konjugačním činidlem za vzniku produktu zvaného konjugát. Jako konjugační činidla slouží látky, které se běžně vyskytují v organismu, tedy látky endogenní. Patří mezi ně především

glycin, kyselina glukuronová, glutamin, glutathion, acetát a sulfát. Mezi enzymy účastníci se druhé fáze patří UDP-glukuronosyltransferáza, sulfotransferáza, glutathion-s-transferáza a N-acetyltransferáza. Nejvýznamnější biodegradačním procesem druhé fáze je konjugace s kyselinou glukuronovou. Glukuronidace je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferázou (UGT), který je lokalizován na membráně endoplasmatického retikula a jádra vedle cytochromu 450.

Na konci této fáze dochází ke snížení toxicity meziproductů z první fáze biotransformace a následně k jejich vyloučení z organismu (Dostálek *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004).

1.3 III. fáze biotransformace

Dlouhou dobu byla transformace rozdělena pouze do dvou fází. S objevem membránových proteinů, které slouží jako přenašeče xenobiotik skrz buněčnou membránu, byla do procesu biotransformace zařazena třetí fáze. Tyto transportní proteiny se označují jako enzymy třetí fáze. Transport konjugátů z buňky zajišťuje nadčeď přenašečů známých jako OATPs (Organic anion transporting polypeptides) (Vrzal *et al.*, 2004). Nejznámějším příkladem transmembránového proteinu s toxikologickým významem je P-glykoprotein. Je zodpovědný za ochranu živých organismů před vlivem xenobiotik. Transportuje organické látky z cytoplazmy buňky do vnějšího prostředí, a tím chrání buňku před vysokými koncentracemi toxických látek.

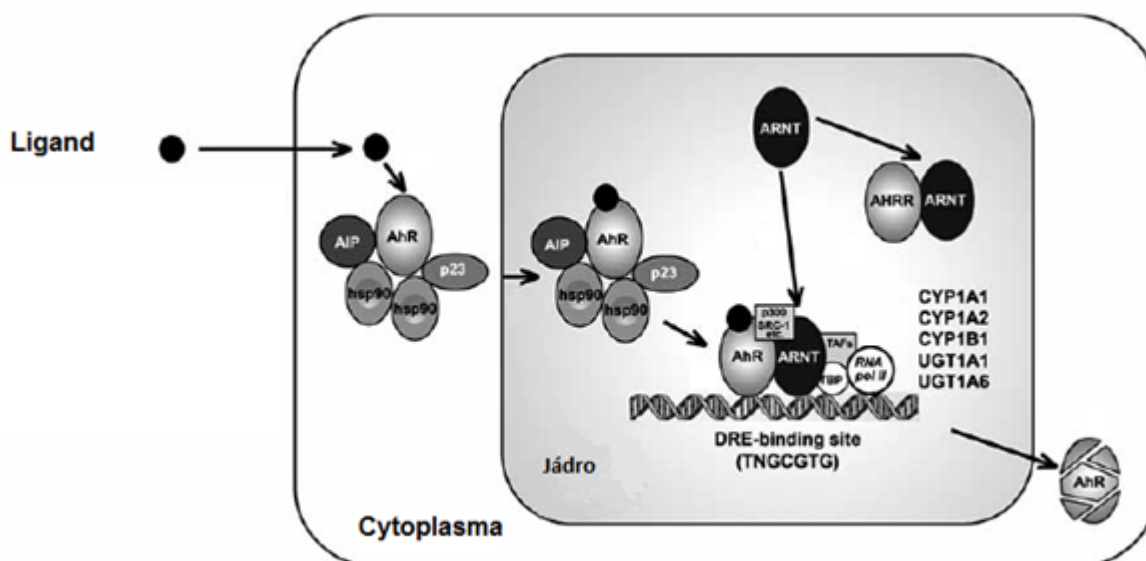
Největší roli při exkreci hrají ledviny a také játra. Látky, které prošly přeměnou v játrech, se mohou dostat do žluče a následně do střev. Přeměněná xenobiotika lidský organismus všeobecně vylučuje pomocí stolice, moče, potu a vydechováním vzduchu (Knejzlík *et al.*, 2000).

2. Regulace CYP1A1 a AhR

2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR)

AhR je cytosolový protein patřící do rodiny jaderných receptorů. AhR je také členem rodiny transkripčních faktorů PAS (Per-ARNT-Sim), které se podílejí na expresi detoxikačních genů (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST, UGT, NADPH – red.) a spousty dalších (Vrzal *et al.*, 2004). AhR je hlavním transkripčním faktorem rodiny CYP1A (Fujii-Kuriyama *et Kawajiri*, 2010). Mezi nejznámější exogenní ligandy aktivující AhR patří PAU a TCDD. Tyto planární molekuly mohou ovšem vyvolat pro organismus řadu toxických účinků jako například oslabení imunitního systému, nebo i rakovinu. Velké množství přirozeně se vyskytujících ligandů (karotenoidy, fenolické látky, aj.) aktivující AhR přijímáme i ve stravě a nápojích. Příkladem může být zelenina z čeledi brukvovitých (př.: květák, brokolice), která se při kyselém pH chová jako aktivátor AhR. Bilirubin, biliverdin, indirubin, deriváty tryptofanu a eikosanoidy jsou endogenními aktivátory AhR. (Dvořák *et Cvek*, 2011; Jeuken *et al.*, 2003; Vrzal *et al.*, 2004). Dlouhodobější aktivace AhR může vést ke vzniku karcinogeneze (Marlowe *et Puga*, 2005).

AhR se nachází v cytoplasmě v neaktivní formě ve spojení s chaperonovými proteiny (Obr. 2). Tento multiproteinový komplex tvoří kromě AhR dva HPS90 (90-kDa heat-shock protein) jeden malý protein p23 a protein XAP2 (immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated protein 2). Po stimulaci ligandem dojde k translokaci AhR do jádra a k oddělení komplexu s chaperonovými proteiny. Následně AhR tvoří heterodimer s ARNT (jaderný transfokátor). AhR-ARNT se pak váže na specifické oblasti DNA zvané DRE (dioxin-responsive elements) nebo XRE (xenobiotic-responsive elements), které obsahují 5'-TNGCGTG-3' motiv. Po navázání do sekvence je spuštěna transkripce příslušných genů (Vrzal *et al.*, 2004).



Obr. 2: Signalizace AhR (upraveno podle: Pávek *et al.*, 2008)

AhR se krom indukce CYP1A1 podílí také na imunitní odpovědi, diferenciaci, vývoji, buněčném cyklu a rozmnožování (Fujii-Kuriyama *et al.*, 2010). Novým poznatkem je také funkce AhR jako ubiquitin-E3-ligasy (Ohtake *et al.*, 2009). Nejvyšší koncentrace AhR byla zjištěna v placentě, plicích, játrech a brzlíku (Dostálek *et al.*, 2006).

2.2 Regulace exprese CYP1A1

Na regulaci CYP1A1 během transkripce se primárně podílí AhR. Enzymy CYP1A1 jsou hlavními katalyzátory metabolické aktivity a inaktivity četných prokarcinogenů, karcinogenů, polutantů a terapeutických činidel. Hormony, či jiné vnitřní faktory mohou měnit indukci CYP1A1 a tak přímo ovlivnit jeho expresi nebo také funkci AhR. Nepřímo jej mohou ovlivnit jiné transkripční faktory. Nejznámějším a nejúčinnějším aktivátorem exprese genů CYP1A1 je TCDD, jelikož je vysoce afinitním agonistou AhR (Monostory *et al.*, 2009; Nebert *et al.*, 2004). CYP1A1 přeměňuje své substráty, především PAU (benzo[a]pyren) na vysoce reaktivní produkty (epoxidy následně dioly), které se mohou vázat na DNA, RNA a proteiny a spustit tak transformaci buněk a cytotoxické procesy.

Transkripce exprese genu CYP1A1 je rychlá a probíhá za nepřítomnosti syntézy bílkovin, proto je pravděpodobné, že veškeré proteinové faktory důležité pro

jeho indukci existovaly již předtím v buňce. Mezi hlavní transkripční faktory podílející se na regulaci exprese CYP1A1 jsou AhR a jeho nukleární translokátor (ARNT) (Monostory *et al.*, 2009). ARNT s AhR vytváří heterodimer, který se váže na enhancer (zesilovač) a následně dochází ke změně struktury chromatinu a tím ke zvýšení transkripční aktivity cílových genů. Tyto změny jsou závislé na vazbě AhR-ARNT a probíhají zřejmě ve dvou krocích. Nejprve vazbou heterodimeru na enhancer, kdy dojde ke změně lokálního chromatinu a ve druhém kroku AhR-ARNT nepřímo mění chromatinovou strukturu vlastního promotoru (Fujii-Kuriyama *et Kawajiri*, 2010; Nebert *et Dalton*, 2006). Po indukci cílových genů dochází k negativní regulaci AhR pomocí represoru (AhRR). Nastává zpětnovazebná inhibice a následně je AhR v cytosolu degradován proteasom – ubiquitinovým systémem (Monostory *et al.*, 2009).

Na funkci AhR má vliv řada fyziologických a pato-fyziologických faktorů. Látky jako kolchicin a nokodazol, běžně využívané v klinické praxi jako protinádorová léčiva, narušují cytoskelet buňky (brání polymeraci mikrotubulů). Bylo vyzkoušeno, že narušením funkce mikrotubulů pomocí těchto dvou látek dochází k potlačení indukce CYP1A1 vyvolanou TCDD v lidských buňkách HepG2 a hepatocytech potkana. Obě sloučeniny způsobují pokles hladiny mRNA a bílkovin CYP1A1 a úroveň aktivity v HepG2 buňkách. Narušením cytoskeletu buňky dochází k zamezení přesunu aktivovaného AhR do jádra a tím k potlačení indukce enzymu CYP1A1. Utlumení transkripční aktivity AhR pomocí kolchicinu a nokodazolu může být spojováno se zastavením buněčného cyklu v G2/M fázi v dělících se buňkách. Z tohoto důvodu byly testy provedeny v neproliferujících primárních hepatocytech potkana. Byl pozorován stejný výsledek jako v buňkách HepG2. Toto zjištění vede k názoru, že úloha cytoskeletu buňky je důležitá pro modulaci AhR-zavislé exprese (Dvořák *et al.*, 2006). Mezi další látky narušující funkci mikrotubulů krom kolchicinu a nokodazolu patří vinkristin, vinblastin a taxol. Taxol jako jediný působí opačným mechanismem a to tak, že mikrotubuly stabilizuje a brání jejich depolymeraci. Účinky všech těchto látek byly zkoumány v primárních lidských hepatocytech na AhR-CYP1A2 signální dráhu (Vrzal *et al.*, 2007). Indukce CYP1A2 mRNA vyvolaná pomocí TCDD byla inhibována všemi zkoumanými látkami, včetně taxolu. Stejně tak bylo zjištěno, že látky narušující funkci mikrotubulů brání v přesunu AhR do jádra. Z toho vyplývá, že signalizace AhR je závislá na dynamice mikrotubulů, nikoliv na

jejich celistvosti. Bylo také prokázáno, že kolchicin a nokodazol nejsou antagonisté AhR. Všechny testované látky narušující cytoskelet buňky způsobují aktivaci c-Jun N terminální kinázy (JNK), částečně aktivují protein p38, ale nemají žádný vliv na extracelulární-regulované protein kinázy (ERK). Aktivace glukokortikoidního receptoru (GR) dexamethasonem (syntetický ligand GR) zvyšuje expresi CYP1A2 indukovanou TCDD. Podobný účinek látek narušující mikrotubuly, jako na inhibici translokace AhR do jádra, byl pozorován i u GR, pravděpodobně prostřednictvím aktivace JNK. Účinky látek narušující cytoskelet buňky ukazují, že na AhR-CYP1A2 signalizaci se podílejí GR i JNK (Vrzal *et al.*, 2007).

2.2.1 Hormonální regulace exprese

Důležitou roli v regulaci transkripce CYP1A1 hrají endogenní faktory a to včetně hormonů, které mohou ovlivňovat kaskády transkripční exprese nebo působit přímo na geny.

2.2.1.1 Regulace glukokortikoidy

Glukokortikoidy hrají důležitou roli v regulaci glukoneogeneze, buněčné proliferaci, diferenciaci a inhibici zánětu. V buňkách působí přes receptor glukokortikoidů (GR, NR3C1). Regulace exprese genů AhR je závislá na fyziologických hladinách glukokortikoidů. V játrech potkanů je exprese CYP1A1 glukokortikoidy zesílena. Samy o sobě výrazný vliv na expresi nemají, ale společně s PAU ji zvyšují, pokud jsou obklopeny dimerem AhR-ARNT a aktivují XRE. Dexamethason v lidských hepatocytech inhibuje indukci CYP1A1 na úrovni proteinu přes GR-nezávislý mechanismus, ovšem nemá vliv na transkripční expresi tohoto genu. Na rozdíl od potkana je v lidských jaterních buňkách exprese AhR pomocí dexamethasonu potlačena (Monostory *et al.*, 2009). Dexamethason tedy řídí v lidských hepatocytech expresi a aktivitu CYP1A1 skrz několik mechanismů, které ovšem nejsou zatím známy (Vrzal *et al.*, 2009).

2.2.1.2 Regulace inzulínem

Inzulín je hormon vylučovaný β buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, který snižuje hladinu cukru v krvi a je tedy antagonistou glukagonu. Bylo zjištěno (Monostory *et al.*, 2009), že inzulín negativně ovlivňuje AhR-CYP1A1 kaskády. Exprese CYP1A1 závislá na indukci byla v primárních hepatocytech potkana snížena pomocí inzulínu o 60%. Podávání inzulínu výrazně inhibuje na omeprazolu závislou CYP1A1 indukci, ale TCDD a BaP vyvolanou indukci ovlivňuje jen částečně (Backlund *et al.*, 1997). Na druhé straně společné působení TCDD a inzulínu vede ke stimulaci mitotické aktivity a syntéze DNA v primárních hepatocytech potkana (Wölfler *et al.*, 1993). Dále bylo zjištěno, že inhibiční účinek TCDD na buněčné vychytávání glukózy a tvorby progesteronu je výraznější v přítomnosti inzulínu a D-glukózy (Enan *et al.*, 1996). V dalších studiích bylo prokázáno, že vystavení účinku TCDD může být spojováno s hyperinzulinémií a tím zvýšenému riziku vzniku diabetu typu II. u lidí. Role AhR v regulaci inzulínu byla zkoumána pomocí AhR-null myši. Tyto myši se vyznačovaly sníženou schopností reagovat na exogenní inzulín a také byla snížena citlivost na vychytávání glukózy zprostředkovanou inzulínem, oproti kontrole (Thackaberry *et al.*, 2003). TCDD navíc inhibuje inzulínem stimulovanou proliferaci MCF-7 buněk rakoviny prsu a fosforylaci inzulínového receptoru. Parciální agonista AhR α -naftoflavon blokuje inhibiční účinky TCDD. Toto zjištění naznačuje zapojení AhR v TCDD indukované reakci (Liu *et al.*, 1996). Indukce CYP1A1 může hrát roli při změně sekrece β buněk pankreatu, jelikož indukci provází zvýšení sekrece inzulínu (Monostory *et al.*, 2009).

Inzulín také dokáže (Yim *et al.*, 2003) aktivovat ARNT v fosfatidylinositol-3-kináze a H_2O_2 -dependentní dráze. Lez tedy předpokládat, že inzulín je schopen zasahovat do AhR zprostředkované aktivace genů. Je však nutné provést další studie.

2.2.1.3 Regulace glukagonem

Glukagon je polypeptidický hormon vylučovaný α buňkami pankreatu. Tento hormon působí přes G-protein spojený s adenylátcyklázovým redukčním systémem. Oproti inzulínu, nebylo zjištěno žádné ovlivnění AhR – dependentní signalizace (Monostory *et al.*, 2009).

2.2.1.4 Regulace androgeny

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony, které v buňkách působí přes androgenní receptor (AR, NR3C4) a tím regulují genovou expresi. Nejvýznamnějším androgenem je testosteron. Podílí se na funkci a diferenciaci mužských reprodukčních orgánů a na vývoji sekundárních pohlavních znaků. U dospělých prasat byly zkoumány pohlavní rozdíly v jaterní expresi CYP1A1 ve spojitosti s androgeny. U samic a kastrovaných samců byla mRNA a hladina proteinů vyšší než prasečích samců. U samců tedy dochází ke snížení exprese CYP1A1 androgeny. Stejně tak testosteron snižuje expresi CYP1A1 u mláďat, což vede k závěru, že androgeny způsobují inhibici exprese CYP1A1, ovšem mechanismus není zatím jasný (Kojima *et al.*, 2008). Je možné, že antiandrogenní účinky může způsobovat znečištění ovzduší a také PAU tím, že aktivují AhR. Negativní vliv AhR na AR – signalizační dráhu testosteronu byl pozorován v buňkách rakoviny prostaty po přidání TCDD. Působením TCDD se snižuje testosteron závislá transkripční aktivita a prostatický - specifický antigen exprese. Testosteron pro změnu blokuje TCDD a tím i expresi a aktivitu enzymu CYP1A1. Účinky testosteronu a TCDD navzájem negativně regulují svoji aktivitu. Karcinogenní metabolity produkované CYP1A1 vedou k výraznému poklesu AR exprese (Monostory *et al.*, 2009).

2.2.1.5 Regulace estrogeny

Estradiol, estron a estriol jsou pohlavní hormony odvozené z estrálního cyklu, jež regulují. V reprodukčním období žen dominuje hormon estradiol, který je po menopauze primárně nahrazen estronem. Estriol je produkován během těhotenství. Estrogeny napomáhají vývoji ženských sekundárních pohlavních znaků a účastní se také menstruačního cyklu. Estrogeny se váží na estrogenové receptory (ER) a následně působí jako ligandem aktivované transkripční faktory. Existují dvě rozdílné formy tohoto receptoru [ER α (NR3A1) a ER β (NR3A2)]. Již několik studií se zabývalo interakcí mezi AhR a ER signálními dráhami, ale přesný molekulární mechanismus nebyl zatím zcela vyjasněn. Vliv estrogenů a ER na expresi cílových genů AhR se v různých studiích liší. V některých byla pozorována aktivace, v jiných naopak inhibice a v dalších dokonce neměly žádný vliv (Monostory *et al.*, 2009). Estradiol významně inhibuje přeměnu AhR do podoby, která je schopna komunikovat s XRE sekvencí a TCDD indukovanou aktivitou CYP1A1 nebo akumulací jeho mRNA. Na

druhé straně bylo prokázáno, že ER α dokáže potlačit indukci AhR-ARNT CYP1A1 prostřednictvím přímé protein-protein interakce s AhR. Aktivovaný ER α je tedy schopen komunikovat s AhR i s ARNT a je přítomen v enhanceru CYP1A1 pouze po ošetření pomocí TCDD. Ligandem indukovaný ER se pravděpodobně neváže na XRE v promotoru CYP1A1. Kromě toho nemá estradiol v buňkách MCF-7 a Hepa 1c1c7 žádný vliv na bazální nebo TCDD indukovanou aktivitu CYP1A1 nebo mRNA, proto zřejmě nedochází k modulaci AhR – zprostředkované genové expresi CYP1A1. Rozdílnost lze vysvětlit testováním různých buněčných kultur v odlišných podmínkách a jinou metodikou (Klinge *et al.*, 1999). V jiné studii bylo zjištěno rekrutování aktivovaných ER α v enhanceru CYP1A1 vystavených účinku TCDD. V buňkách MCF-7 a T47D nemá TCDD vliv na ER α obsazenost na promotoru CYP1A1 ani na jeho změny v expresi. Ovšem v buňkách HuH7 transfektovaných ER α došlo k podstatnému zvýšení jak v transkripci, tak v expresi mRNA CYP1A1. Tato odchylka spočívá v důsledku rozdílů ve struktuře a regulaci mezi přechodnou transfekcí reportérového plasmidu a endogenními promotory (Matthews *et al.*, 2005). Snížená citlivost AhR – estradiol deprivovaných buněk může být změněna přidáním estradiolu do média, což vede k normální úrovni AhR a k opětovné inducibilitě CYP1A1. Přestože mechanismus interakce mezi AhR a ER není jasný, některé studie nastiňují, že ER jsou nutné pro úplnou aktivitu AhR (Monostory *et al.*, 2009).

2.2.1.6 Regulace progesteronem

Progesteron je steroidní hormon patřící do skupiny gestagenů. V přírodě se vyskytuje pouze hormon gestagen, zbytek zástupců je vytvořen synteticky. Progesteron je zapojen do regulace menstruačního cyklu, těhotenství a embryogeneze. Na molekulární úrovni působí přes progesteronový receptor (PR, NR3C3), který u lidí můžeme najít ve dvou formách (PR-A a PR-B). Interference mezi progesteronem a dioxinovou signální dráhou byly zjištěny v buňkách rakoviny prsu (T47D) a karcinomu jater (HepG2), kde PR isoformy působí jako silný represor na AhR funkci (Monostory *et al.*, 2009). Progesteron zvyšuje ethoxyresorufin O-dealkylásovou aktivitu CYP1A1 a částečně také jeho mRNA a hladinu proteinů v buňkách Hepa 1c1c7. Nabízí se teorie, že steroidní struktura může být ligandem AhR a vyvolat tak indukci CYP1A1 závislou na AhR (Lee *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že TCDD blokuje estrogen-indukované reakce snížením ER-inducibilní PR mRNA a proteinů v lidských buňkách rakoviny prsu MCF-7 (Harper *et al.*, 1994). Působení

TCDD na luteální buňky, izolované ze žlutého tělíska dospělých prasat, způsobuje snížení sekrece progesteronu a aktivity mitochondriálních enzymů, které přeměňují cholesterol na hormon pregnenolon. Tyto TCDD akce v luteálních buňkách jsou závislé na AhR mechanismu, nikoliv na ER (Gregoraszczyk *et al.*, 2001).

2.2.1.7 Regulace thyroidy

Hormony štítné žlázy patří mezi steroidní hormony a působí přes specifické receptory štítné žlázy jako hormonem aktivovaný transkripční faktor. Receptory pro thyroïdní hormony se mohou vázat do DNA bez přítomnosti hormonu, což obvykle vede k transkripční represi. Rozlišujeme dvě formy tohoto receptoru [TR α (NR1A1) a TR β (NR1A2)]. Nedávno byla zjištěna fyzikální a funkční interakce mezi AhR-ARNT a SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors) v buňkách MCF-7. Protein SMRT inhibuje AhR-ARNT vazbu xenobiotika, a tím je možná modulace transkripce zprostředkovaná AhR (Nguyen *et al.*, 1999). Objevena byla také interakce mezi SMRT a PAS B ligand-vázající doménou AhR. Existuje ovšem i jiný faktor, který se se SMRT podílí na potlačení promotoru CYP1A1. Retinoblastoma-interagující protein 230 (potencionální aktivátor receptoru pro thyroïdní hormony) je schopen komunikace přímo s ARNT a má také zásadní význam pro hypoxické a TCDD zprostředkované transkripční odpověď (Rushing *et Denison*, 2002). Velká řada studií, prokázala, že aktivace AhR-CYP1A1 signální dráhy má negativní vliv na signalizaci TR. Při podávání TCDD potkanům dochází ke snížení tyroxinu, ale ne 3,5,3'-trijodtyroninu. AhR je pravděpodobně zapojen do TCDD zprostředkovaného narušení hormonální homeostázy štítné žlázy, což potvrzuje i fakt, že TCDD nemá žádný dopad na myši s inaktivovaným AhR (Monostory *et al.*, 2009). TCDD a polychlorovaný bifenyly (PBC126) inhibuje expresi sodno-iodidového symportéru a katepsinu B. Snížením regulace těchto dvou enzymů pomocí aktivátorů AhR přispívá k narušení funkce štítné žlázy (Pocar *et al.*, 2006).

2.2.2 CYP1A1 a signalizace jadernými receptory

Signalizace AhR nemusí být ovlivněna jenom hormonálně aktivovanými receptory, ale může být také regulována interakcemi se signálními drahami jaderných receptorů. Různá xenobiotika či vitamíny mohou ovlivnit jejich funkce.

2.2.2.1 Vliv retinoidních receptorů na AhR-CYP1A1 signalizaci

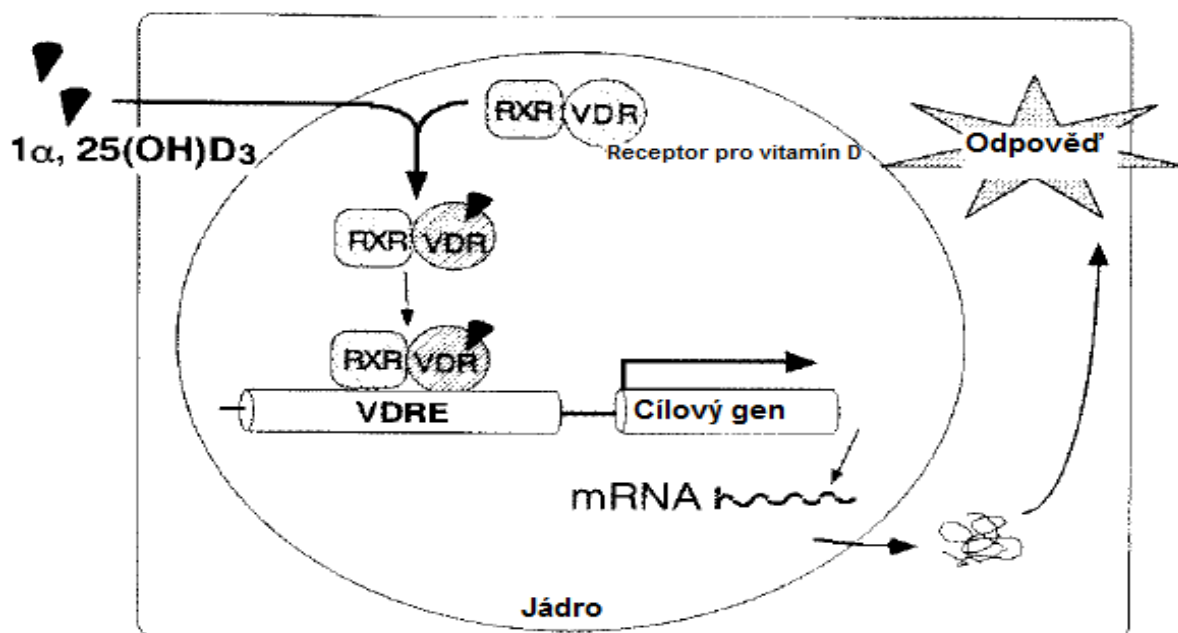
Receptor pro kyselinu *trans*-retinovou (RAR) a receptor pro kyselinu *cis*-retinovou (RXR) jsou ligandem aktivované transkripční faktory. Často jsou označovány jako jaderné receptory, přestože jejich ligandy nejsou hormony. Retinoidní receptory jsou zapojeny do mnoha důležitých dějů, jako jsou fyziologické a vývojové procesy ve většině tkání vyšších obratlovců (krvetvorba, reprodukce, tvorba kostí) (Monostory *et al.*, 2009). Po aplikaci kyseliny retinové na buněčnou linii lidských keratinocytů HaCaT dochází ke snížení hladiny mRNA AhR a TCDD indukované mRNA CYP1A1. Stejná studie informovala o zvýšené hladině mRNA AhR a ARNT během diferenciacce, která byla také poté inhibována pomocí kyseliny all-*trans*-retinové. Jedná se však o nepřímé účinky (Wanner *et al.*, 1995). V 5' regulační oblasti genu CYP1A1 byla objevena přítomnost vazebného elementu pro kyselinu retinovou, který je transaktivovaný pomocí aktivovaného RAR α 1 (Vecchini *et al.*, 1994). Indukce CYP1A1 pomocí TCDD se zdá být zvýšená u divokých myší než u myší s deficitem CRBP-I (Cellular Retinol Binding Protein typu I). Ovšem snížení indukce bylo pozorováno v hypofýze u myší s deficitem pro CRBP-I, oproti divokým myším. Tento rozdíl nejspíš spočívá ve vyšší bazální expresi genu AhRR v hypofýze myší s deficitem CRBP-I (Huang *et al.*, 2003). Zdá se, že spojitost mezi RAR-RXR a signální dráhou AhR má také SMRT a to interakcí s AhR-ligand vazebnou doménou PAS B. Interakce byla ovlivněna přítomností ligandu AhR, ovšem asociace SMRT s AhR-ARNT-DNA komplexem nebyla registrována. Výsledky ukázaly, že SMRT nepotlačuje, ale naopak zvyšuje signalizaci AhR v regulační oblasti CYP1A1. Komplex AhR-SMRT je v buňkách Caco-2 zodpovědný za potlačení transkripční aktivity AhR působením retinoidů. Antagonistický účinek SMRT na signalizaci AhR i na retinoidy a následné interakce mezi SMRT a AhR dále vedou k oddělení SMRT od AhR a k možné aktivaci RAR α bez přítomnosti ligandu (Fallone *et al.*, 2004; Rushing *et al.*, 2002).

2.2.2.2 Vliv receptoru pro vitamín D na AhR-CYP1A1 signalizaci

O této problematice pojednává kapitola 3.

3. Receptor pro vitamín D (VDR)

VDR je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 12 (Hausler *et al.*, 1998; Matsunawa *et al.*, 2012) a spadá mezi jaderné receptory do podrodiny NR1I, stejně jako pregnanový receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Tyto receptory regulují společné cílové geny, jako například CYP3A4 (Matsunawa *et al.*, 2012). Další důležité transkripční cíle pro VDR jsou například enzymy jako CYP2B6, CYP2C9, CYP24 nebo také SULT1A2 (Eloranta *et Kullak-Ublick*, 2005; Pascussi *et al.*, 2003). VDR na cílové geny působí jako ligandem indukovaný transkripční faktor (Obr. 3). Po navázání ligandu dochází k aktivaci VDR a následně k jeho konformační změně. VDR tvoří heterodimer VDR-RXR (RXR α , RXR β , RXR γ) a následně se váže do DNA (Kato, 2000). Komplex VDR-RXR se váže do sekvence značené jako VDRE (Vitamín D – Responzivní Element). Tato vazba však není charakteristická jenom pro VDR, ale vážou se do ní i PXR a CAR (Dvořák *et Cvek*, 2011), tedy členové stejné podrodiny jako VDR. Stejně tak se VDR váže i do ER-6 (everted repeats) vazebných elementů, které slouží jako vazebná místa pro PXR a CAR. VDR je tedy zapojen do regulace metabolismu xenobiotik a to zejména ve střevě (Dvořák *et Cvek*, 2011).



Obr. 3: Molekulární mechanismus VDR (převzato a upraveno podle: Kato, 2000)

Fyziologickým agonistou VDR je $1\alpha, 25$ -dihydroxycholecalciferol (kalcitriol). VDR je také aktivován pomocí kyseliny litocholové (LCA) i jejich derivátů (např. LCA acetát) a funguje jako receptor pro sekundární žlučové kyseliny, včetně LCA (Eloranta *et* Kullak-Ublick, 2005; Makishima *et al.*, 2002). Přírodní i syntetické ligandy VDR inhibují proliferaci a (nebo) indukují diferenciaci různých typů maligních buněk, včetně myeloidní leukémie. VDR reguluje četné fyziologické a farmakologické postupy, včetně metabolismu vápníku a fosforu a jejich následné ukládání do kostí. Dále ovlivňuje buněčný růst a diferenciaci, imunitu a kardiovaskulární funkce (Matsunawa *et al.*, 2012). Dále byla také zjištěna spojitost mezi polymorfizmem VDR a *diabetes mellitus* typu 1. Předpokládá se, že VDR je schopný ovlivnit predispozici k tomuto onemocnění modulací funkce vitamínu D (De Azevêdo Silva *et al.*, 2013).

3.1 VDR a CYP1A1

Nedávno bylo zjištěno, že CYP1A1 je novým cílovým genem VDR podílejícím se na metabolismu xenobiotik. Do transkripce tohoto enzymu je aktivně zapojen AhR i VDR. Jak již bylo dříve zmíněno silným fyziologickým agonistou VDR je kalcitriol. Ten sám o sobě indukci CYP1A1 nevyvolal. Ovšem kalcitriol ve spojení s BaP, což je aktivátor AhR, způsobil zvýšení hladiny mRNA CYP1A1 a to v lidských monocytech (U937, THP-1), v buňkách rakoviny prsu a v derivovaných buňkách ledvin, oproti samotnému BaP. Stejného účinku bylo dosaženo i pomocí litocholin acetátu a BaP, což poukazuje na to, že transkripce CYP1A1 je regulována pomocí aktivace VDR. Dále pak, pokud došlo ke snížení VDR pomocí siRNA, následovalo i snížení indukce CYP1A1, přestože byl přítomen kalcitriol s BaP. I antagonisté VDR ADTT [(25R)-25-adamantyl- $1\alpha, 25$ -dihydroxy-2-methylene-22,23-didehydro-19,26,27-trinor-20-epi-vitamin D₃] a ADMI3 [(25S)-26-adamantyl- $1\alpha, 25$ -dihydroxy-2-methylene-22,23-didehydro-19,27-dinor-20-epi-vitamin D₃] účinně snižují indukci CYP1A1 vyvolanou kalcitriolem a BaP. Buňky U937 ošetřené TCDD, jakožto vysoce afinitním ligandem AhR a kalcitriolem vykazovaly taktéž zvýšenou expresi CYP1A1. Tato fakta proto potvrzují, že VDR se aktivně podílí na indukci CYP1A1. Pokud byl přidán α -naftoflavon, antagonistá AhR, došlo k inhibici exprese CYP1A1 indukovanou BaP

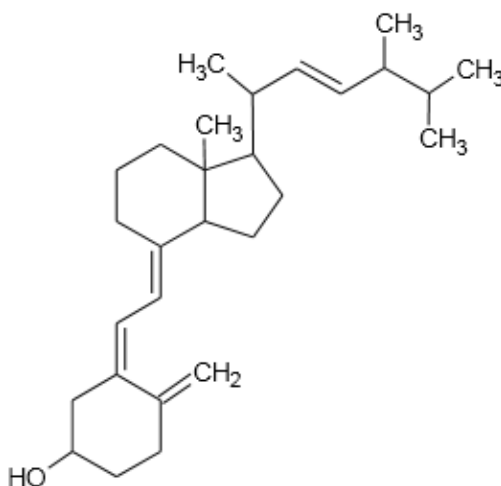
samotným, či v kombinaci s kalcitriolem. Toto zjištění naznačuje, že ligandem aktivovaný VDR je nezbytný pro navýšení exprese CYP1A1, jež je regulovaný AhR.

Užitím metod EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) a CHIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) bylo zjištěno (Matsunawa *et al.*, 2012), že VDR se ve formě heterodimeru VDR-RXR váže do motivu ER8 lokalizovaném na proximálním promotoru lidského genu CYP1A1. Jedná se o přímou vazbu. Kalcitriol spolu s BaP nezvyšují nábor AhR či VDR na promotor CYP1A1. Jelikož nebyly zjištěny žádné přímé interakce mezi AhR a VDR, vychází se z názoru, že se na promotor CYP1A1 vážou nezávisle na sobě. Kombinace ligandů může tedy měnit hladinu mRNA CYP1A1 s tím, že AhR ovlivňuje VDR nepřímo. K objasnění selektivního působení VDR na regulační oblast genu CYP1A1 jsou nutné další studie.

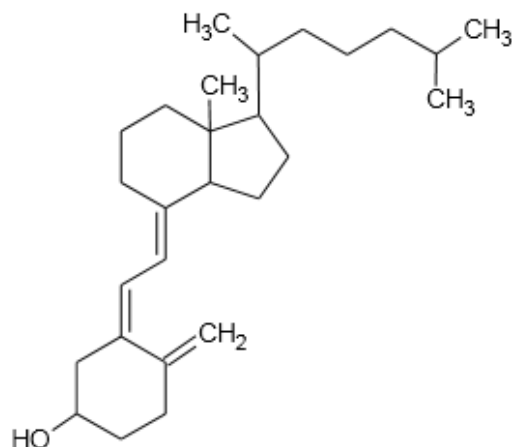
4. Vitamín D

Vitamín D je rozpustný v tucích, stejně jako vitamíny A, E a K (Mindell, 2000). Nejedná se však o jedinou chemickou látku. Vitamín D je souhrnný název pro skupinu blízce příbuzných lipofilních 9,10-sekosteroidů (Velíšek, 1999). Jsou známy vitamíny D_2 , D_3 , D_4 , D_5 . Vitamín D_1 není již uváděn, jelikož bylo zjištěno, že se jedná o sloučeninu vitamínu D_2 s lumisterolem, což je látka chemicky velmi podobná vitamínům D (Žamboch, 1996).

Největší význam mají vitamíny D_2 neboli ergokalciferol (9, 10-seko- $\Delta^{10(19),5,7,22}$ -ergostatetraen-3 β -ol) (Obr. 4) a vitamín D_3 neboli cholekalciferol (9, 10-seko- $\Delta^{10(19),5,7}$ -dehydrocholestatien-3 β -ol) (Obr. 5) (Velíšek, 1999). Účinky těchto dvou vitamínů na lidský organismus jsou víceméně shodné. Proto se často hovoří o vitamínu D bez jakéhokoliv rozlišení (Žamboch, 1996).



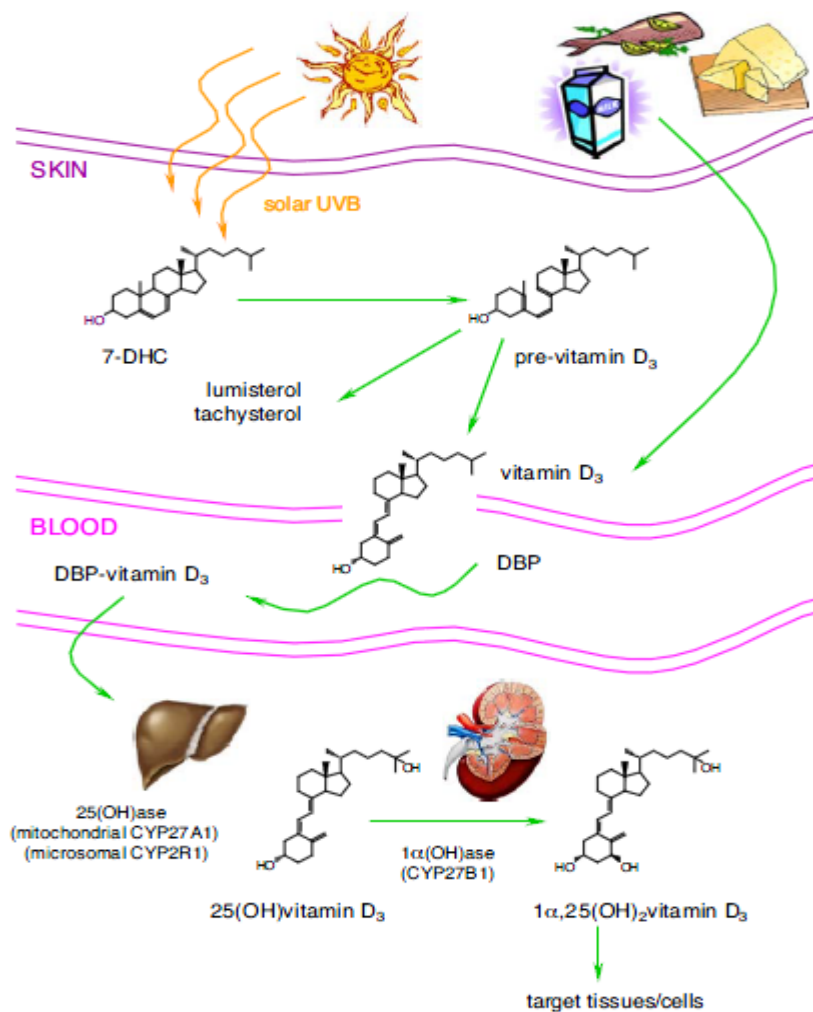
Obr. 4: Chemická struktura ergokalciferolu (upraveno podle: Velíšek, 1999)



Obr. 5: Chemická struktura cholekalciferolu (upraveno podle: Velíšek, 1999)

4.1 Vznik vitamínu D působením ultrafialového záření

Vitamín D_2 vzniká působením ultrafialového záření v kůži (Obr. 6) z ergosterolu (látky rostlinného původu), který bývá označován jako provitamin D_2 . Stejně tak vzniká vitamín D_3 z provitaminu zvaného 7-dehydrocholesterol (Žamboch, 1996). Z provitaminu D_3 nejprve vzniká za působení UV záření o vlnové délce 280 – 320 nm tzv. previtamin D_3 , který samovolně isomeruje na cholekalciferol. Vitamín D_3 se v plazmě váže na specifický globulin DBP, což je protein vázající vitamín D a je transportován do jater. Cholekalciferol je v játrech uskládován a podle potřeby metabolizován enzymy, které jsou členy nadrodiny cytochromů P450 na cirkulující 25-hydroxycholecalciferol (kalcidiol). Jeho koncentraci v plasmě ovlivňuje například doba vystavení slunečním paprskům nebo roční doba. Kalcidiol se v proximálních tubulech ledvin dále mění na kalcitriol ($1\alpha, 25$ -dihydroxycholecalciferol). Biologická účinnost kalcitriolu je 10x vyšší než cholekalciferolu. Kalcitriol je považován za vlastní aktivní formu vitamínu (Ganong, 2005; Velíšek, 1999).



Obr. 6: Syntéza a metabolismus vitamínu D₃ (podle: Mathieu *et al.*, 2005)

4.2 Vitamín D jako hormon

Vitamín D bývá také označován jako prohormon. Toto tvrzení podtrhuje fakt, že lidský organismus není schopný vytvářet vitamíny, hormony však ano (Žamboch, 1996). Kalcitriol se spolu s kalcitoninem a parathormonem podílí na metabolismu vápníku a fosforu. Zvyšuje jejich vstřebávání ve střevě. Zvýšené vstřebávání vápníku je důsledkem zvýšené tvorby bílkoviny, jež vycytává vápník ve střevě a přenáší ho do nitra buněk střevní stěny, odkud se pak dostává do krve a následně je ukládán do kostí. Dalším účinkem kalcitriolu je zvýšené zpětné vstřebávání vápníku a fosfátu vylučovaného v ledvinách do moči. Stejně účinky má i kalcidiol, ovšem se slabšími účinky ve střevě a naopak silnějšími v ledvinách. Vitamín D se tedy uplatňuje při

resorpci a ukládání vápníku a fosforu v kostech a zubech, a také se účastní dalšího řízení velmi složitého osudu těchto látek (Ganong, 2005; Mindell, 2000; Žamboch, 1996). Je také tzv. transkripčním faktorem v genech pro všechny procesy vyživující vaziva a kosti (Oberbeil *et* Lenzová, 2001).

4.3 Deficit

Projevem nedostatku vitamínu D u dětí je křivice neboli rachitida a u dospělých se projevuje, jako měknutí kostí tedy osteomalacie. Obě onemocnění jsou následkem poruchy hospodaření vápníku a fosfátů.

Příčinou hypovitaminózy může být jeho nedostatek v potravě, což se především týká veganů (přísných vegetariánů), kteří odmítají jakékoliv živočišné bílkoviny, nebo nedostatečné slunění, respektive nedostatečné ozařování kůže ultrafialovými paprsky (Žamboch, 1996).

4.4 Suplementace

Za nejdůležitější a nejlevnější metodu suplementace je považováno slunění, jelikož běžná strava většinou denní dávku vitamínu D nepokryje. Proto musí být zbývající množství vytvořeno v kůži z rostlinného ergosterolu nebo ze 7-dehydrocholesterolu pomocí UV-B. Pro dosažení přiměřené produkce vitamínu D doporučuje světová zdravotnická organizace (WHO) vystavovat denně obličej a paže slunečnímu záření po dobu 30 minut. Vzniklé přebytky mohou být uloženy v tukové tkáni pro pozdější využití. Není však možné získat velké přebytky takto uloženého vitamínu D, jelikož autoregulační mechanismy zabraňují jeho nadměrné tvorbě pomocí slunečního záření v důsledku zvýšené teploty, která vede k přeměně vitamínu D na nefunkční analogy (Ovesen *et al.*, 2003; WHO, 2004; Žamboch, 1996).

U jedinců se snědou pletí se vitamín D vytváří v nedostatečné míře. Jejich silná pigmentace kůže brání průniku UV-B záření k buňkám syntetizující vitamín D. Stejně tak časté a důkladné používání opalovacích krémů analogicky blokuje tvorbu vitamínu D v kůži. Přesto jsou opalovací krémy doporučovány jako ochrana kůže před vznikem rakoviny. Vitamín D je tedy nutné přijímat i ve stravě (<http://www.eufic.org/article/cs/artid/Jasna-budoucnost-vitaminu-D>, 5. 6. 2012)

4.5 Vitamín D v potravinách

Cholekalciferol i ergokalciferol a stejně tak jejich metabolity přijímané potravou se vstřebávají ve střevech a lymfatickým cévním systémem. Po navázání na DBP a transportu do jater dojde k jejich uskladnění či metabolické přeměně (Velíšek, 1999).

Cholekalciferol se vyskytuje v potravinách (Tab. I) živočišného původu, jelikož savci, ptáci i ryby jej syntetizují stejným způsobem jako člověk. Nejvyšší koncentrace cholekalciferolu jsou v jaterních tucích mořských ryb a mase tučných ryb. Nižší obsah cholekalciferolu je v mase a vnitřnostech hospodářských zvířat a také v jejich produktech (mléko, vejce). Ještě nižší obsah vitamínu D je v těchto produktech v zimním období, kdy není sluneční aktivita tak vysoká. U mléka je například obsah vitamínu až čtyřikrát nižší než v letním období (Velíšek, 1999).

V potravinách rostlinného původu se nachází ergokalciferol, který vzniká za pomoci slunečního záření z ergosterolu (provitamín D₂). Významným zdrojem ergokalciferolu jsou houby. Jeho obsah však závisí na řadě faktorů, jimiž jsou klimatické podmínky, barva třmene houby, apod.. Samotný ergosterol je obsažen ve většině plísni a kvasinkách, jelikož je jejich hlavním steroidem (Velíšek, 1999).

Tab. I: Obsah vitamínu D v některých potravinách

Potravina	Obsah vitamínu D (µg/100g)	Potravina	Obsah vitamínu D (µg/100g)
Olej z rybích jater	400 000	Játra hovězí	2,5
Losos	12	Játra vepřová	2,2
Makrela	3	Maso vepřové	1,1
Sardinka	10	Žloutek	8
Tuňák	6	Tvaroh	0,25
Treska	1	Máslo	2,5
Úhoř	40	Kakaové máslo	750
Sardinka v tomatu	8	Mléko plnotučné	0,02
Tuňák v oleji	3	Jogurt bílý 3,5%	0,06

(upraveno podle: <http://www.osteoporoza.cz/vitamin-d-v-potravinach>, 19. 3. 2013, Žamboch, 1996)

4.6 Doporučená denní dávka

Světová zdravotnická organizace doporučuje jednotnou denní dávku, a to 5 µg pro děti, dospělé do věku padesáti let, včetně kojících žen. S věkem nad padesát let se zvyšuje průměrně denní dávka vitamínu D o 5 µg na každých patnáct let. Hodnotě 5 µg denní dávky vitamínu D odpovídá 200 mezinárodních jednotek (IU – International Units) (WHO, 2004).

Potřeba doplňovat vitamín D závisí na i na klimatických a geografických faktorech. V zemích, kde je obsah vitamínu D v potravinách nízký, dochází k jejich fortifikaci ergokalciferolem. Fortifikují se tak například margaríny, mléko, cereální snídaně i pomerančové šťávy. Větší potřebu suplementace vitamínu D obsaženého v potravinách, mají lidé žijící v severní části polokoule, kde je nedostatek slunečního svitu potřebného k tvorbě dostatečného množství vitamínu D (<http://www.eufic.org/article/cs/artid/Jasna-budoucnost-vitaminu-D>, 5. 6. 2012).

5. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit roli receptoru pro vitamín D v expresi biotransformačního enzymu první fáze CYP1A1 v buněčné linii LS174T pomocí metody Real Time PCR.

6. Materiál a metodika

6.1 Materiál

6.1.1 Biologický materiál

Buněčná linie LS174T byla zakoupena od HPA (katalogové číslo: 87060401) (<http://hpacultures.org.uk/>, 10. 7. 2012).

LS174T byla kultivována v plastové kultivační láhvi (75 cm²) s 15 – 20 ml média (viz kultivační médium pro LS174T) v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% CO₂.

6.1.2 Chemikálie a použité roztoky

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose; with 4500 mg/L glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture, D6546 – 500ML (Sigma - Aldrich)
- Fetal Bovine Serum (FBS); Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML (Sigma - Aldrich)
- L-glutamin, G6392-10VL (Sigma - Aldrich)
- Penicilin/Streptomycin (100ml), P11-010PAA (The Cell Culture Company)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x), M7145-100ML (Sigma - Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), D8418-100ML (Sigma - Aldrich)
- Vitamín D₃ - 1 α , 25-dihydroxycholekalciferol, D1530 (Sigma – Aldrich)
- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), Ultra Scientific (RI, USA)
- Trypanová modř T6146-256 (Sigma - Aldrich)
- TRI Reagent, T9424 (Sigma - Aldrich)
- Trypsin-EDTA solution; 0.25%, sterile-filtered, cell culture tested, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA. 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red, T4049-500ML (Sigma - Aldrich)
- PBS (Phosphate buffered saline) 1x (pH 7,4); NaCl 4g, KCl 0,1g, Na₂HPO₄ x12 H₂O 1,605g, KH₂PO₄ 0,01g, dH₂O 50ml

- Ethanol 75%, 5032317 (Moravský lihovarKojetín, a.s.)
- Chloroform, C2432-25ML (Sigma – Aldrich)
- Isopropanol, 20037-ATO (Lach-Ner)
- Methanol 20038-AT0 (Lach-Ner)
- Light Cycler® 480 Syber Green I Master, 04 707 516 001 (Roche Diagnostic)
- Primery:
 - forward: CYP1A1 (Generi Biotech, Hradec Králové)
GAPDH (Generi Biotech, Hradec Králové)
 - reverse: CYP1A1 (Generi Biotech, Hradec Králové)
GAPDH (Generi Biotech, Hradec Králové)
- Random primer (6 mer), 3801 (Takara)
- Reakční pufr M-MuLV RT, F-572B (Finnzymes)
- Reverzní transkriptáza M-MuLV RT RNase H⁻, F-572S (Thermo Scientific)
- RNasový inhibitor, 2311A (Takara)
- RNase-free water, DD1005 (Bio Basic)
- dNTP:
 - dATP, 4026 (Takara)
 - dTTP, 4029 (Takara)
 - dCTP, 4028 (Takara)
 - dGTP, 4027 (Takara)
- 7-ethoxyresorufin, E3763 (Sigma – Aldrich)
- Dikumarol, M1390 (Sigma – Aldrich)
- Dezinfekce Isorapid (Oro-clean chemie)

Kultivační médium pro LS174T:

- 500 ml DMEM
- 50 ml FBS
- 5 ml penicilin/streptomycin
- 5 ml neesenciálních aminokyselin
- 5 ml L – glutamin

6.1.3 Laboratorní přístroje

- Centrifuga, 5415R (Eppendorf)
- Centrifuga, 5810R (Eppendorf)
- Inkubátor, Contherm Mitre 4000 Series (Contherm Scientific)
- Flow box Bio II Advance 4, 284000111 (Telstar)
- Mikroskop, HT-NIB-100
- Vortex, Heidolph Reax Top
- Thermo – circulator (LabTech)
- Chladnička kombinovaná (Whirpool)
- Skříňový mrazíci box (-80°C), SAN Sanyo, Japonsko
- Výrobník ledu, Icematic F100 Compact (Castel Mac)
- Spektrofotometr, NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Spektrofotometr, Infinite M200 (TECAN)
- Real-time cycler, Light Cycler 480 2.0 (Roche)
- Termoblok, Accublock Digital dry bathe (Labnet International)
- Vývěva membránová, 3182362
- Multi-kanálová pipeta o objemu 30 – 300 µl (Eppendorf)
- Pipety o objemu: 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 50 - 200µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- Pipetboy (Labnet)

6.1.4 Laboratorní pomůcky

- Mikrozkušavky o objemu: 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml (Tubes for you)
- Kultivační láhve 75 cm, filter cap (Orange Scientific)
- Centrifugační zkumavky o objemu 15 a 50 ml, konické (Orange Scientific)
- epTIPS 50 – 1000 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)
- ep TIPS 0,1 -10 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)
- epTIPS 2 – 200 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)
- Kultivační destičky 96 jamkové (Orange Scientific)
- Kultivační destičky 6 jamkové (Orange Scientific)
- PCR destičky 96 jamkové bílé + fólie, Light Cycler 480 (Roche)

- Destička pro měření fluorescence 96 jamková (černá)
- Petriho misky (Orange Scientific)
- Skleněné sterilní pipety o objemu 2 ml, 5 ml, 10 a 25 ml
- Bürkerova komůrka, krycí sklíčka, stěrka, kahan, zapalovač, plastové stojany, popisovač, gumové rukavice, polystyrenová krabice na led

6.2 Metodika

6.2.1 Detekce exprese genu CYP1A1 metodou RT-PCR ve střevní linii

Pracovní postup

Kultivace buněčné linie LS174T

Adherentní buněčná linie byla kultivována v plastové kultivační láhvi (75 cm²) s 15 – 20 ml média (viz kultivační médium pro LS174T) v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% CO₂.

Pasážování buněk

Z kultivační láhve vyjmuté z inkubátoru bylo ve sterilních podmínkách laminárního boxu odsáto staré médium. Následně byly buňky promyty 5 ml PBS 1x, které bylo opět odsáto. Na promyté buňky byl aplikován 1 ml trypsinu a kultivační láhev byla přenesena na 3 minuty do inkubátoru. Po uplynutí stanovené doby bylo k buňkám přidáno 9 ml média. Celkový obsah byl přepipetován do 50 ml zkumavky. Z této buněčné suspenze byl následně odebrán 1 ml, který byl vrácen zpět do kultivační láhve a doplněn o 15-20 ml nového média. Pasážování bylo nutné opakovat přibližně každý druhý až třetí den.

Počítání buněk

Z 50 ml zkumavky se suspenzí buněk bylo po resuspendování pomocí pipety odebráno 10 µl. Poté k nim bylo přidáno 90 µl trypanové modři. Po promíchání suspenze bylo odebráno dvakrát po 5 µl a naneseno na přichystanou Bürkerovu komůrku s krycím sklíčkem. Počítání buněk proběhlo pod mikroskopem, kde byly počítány buňky celkem v deseti čtvercích ohraničených dvěma čarami, z nichž byl

stanoven průměr. Průměr byl vynásoben 10^5 , aby výsledné číslo udávalo počet buněk na 1 ml suspenze.

Výsev buněk

Buněčná linie byla vyseta na dvě 6 jamkové kultivační desky po 2 ml suspenze s počtem milion buněk na jednu jamku. Desky s vyšetými buňkami byly inkubovány při 37°C přes noc.

Příprava roztoků

Do narostlých kolonií buněk byly přidány testované látky o různé koncentraci. Přehled je znázorněn v tabulce (Tab. II).

Tab. II: Schéma přípravy roztoků testovaných látek (s rezervou pro pipetování)

Testovaná látka	Složení roztoku
UT	5 μ l DMSO + 2,5 ml média
VD ₃ 10	2,5 μ l DMSO + 2,5 μ l VD ₃ 10 + 2,5 ml média
VD ₃ 75	2,5 μ l DMSO + 2,5 μ l VD ₃ 75 + 2,5 ml média
VD ₃ 150	2,5 μ l DMSO + 2,5 μ l VD ₃ 150 + 2,5 ml média
TCDD	2,5 μ l DMSO + 2,5 μ l TCDD + 2,5 ml média
TCDD + VD ₃ 10	2,5 μ l TCDD + 2,5 μ l VD ₃ 10 + 2,5 ml média
TCDD + VD ₃ 75	2,5 μ l TCDD + 2,5 μ l VD ₃ 75 + 2,5 ml média
TCDD + VD ₃ 150	2,5 μ l TCDD + 2,5 μ l VD ₃ 150 + 2,5 ml média

Legenda: UT – negativní kontrola (0,1% DMSO), VD₃ - vitamín D₃ (10, 75, 150 nM koncentrace ve vzorku), TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) – pozitivní kontrola (5 nM koncentrace ve vzorku)

Aplikace testovaných látek

Jednotlivé roztoky byly připraveny do osmi 15 ml zkumavek. Z kultivačních destiček bylo postupně odsáto médium a do každé jamky s buňkami byly přepipetovány 2 ml roztoku z připravených zkumavek. Aplikace jednotlivých roztoků do 6 jamkových destiček je znázorněna pomocí tabulek (Tab. III a IV).

Tab. III: Aplikace testovaných roztoků na první 6 jamkové destičce.

UT	VD ₃ 10	VD ₃ 75
VD ₃ 150		

Tab. IV: Aplikace testovaných roztoků na druhé 6 jamkové destičce.

TCDD	TCDD + VD ₃ 10	TCDD + VD ₃ 75
TCDD + VD ₃ 150		

Legenda: UT – negativní kontrola, VD₃ - vitamín D₃ (10, 75, 150 – nM koncentrace ve vzorku), TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) – pozitivní kontrola (5 nM koncentrace ve vzorku)

Po aplikaci testovaných roztoků na buňky byly destičky inkubovány 24 hodin.

6.2.1.1 Izolace RNA

Homogenizace

Po 24 hodinové inkubaci bylo z destiček vyklepnuto médium a buňky byly promyty PBS. Po odstranění PBS byly buňky lyzovány v 1 ml Tri Reagentu a poté byly seškrábnuty z jednotlivých jamek stěrkou. Lyzát byl přepipetován do čistých 1,5 ml zkumavek, propipetován a následně ponechán 10 min při pokojové teplotě.

Separční fáze

Po uplynutí doby inkubace bylo do každé mikrozkušavky přidáno 200 μ l chloroformu. Poté byly zkumavky ručně protřepány po dobu 60s, následně ponechány přibližně 8 minut v klidu při laboratorní teplotě a centrifugovány 15 min při 13000 rpm/4°C. Po centrifugaci se oddělila vrchní vodní fáze obsahující RNA.

Precipitace RNA

Vodní fáze byla přenesena do čistých zkumavek. RNA byla precipitována z vodné fáze přídatkem 500 μ l isopropanolu a zkumavky byly lehce zvortexovány. Zkumavky byly ponechány v klidu 5-10 min při laboratorní teplotě a poté byly centrifugovány 13 min při 13000 rpm/4°C.

Promývání RNA

Po centrifugaci byl vyjmut supernatant a vzniklý pelet byl promyt 1 ml 75% etanolu. Zkumavky byly nyní centrifugovány 5 min při 13000 rpm/4°C. Poté byl pelet znovu promyt 1 ml 75% etanolu a znovu centrifugován. Následně byl pelet vysušen.

Rozpuštění RNA

Pelet byl rozpuštěn v 30-50 μ l RNase free water (zbavená RNA restrikčních enzymů) a inkubován 5 min při 65°C na termobloku.

Měření koncentrace a čistoty

Koncentrace a čistota vzorků RNA byla měřena pomocí nanodropu. Poměr absorbancí 260/280 umožňuje hodnocení čistoty RNA. Čistá RNA odpovídá $A_{260}/A_{280} = 2$. Pokud je tento poměr absorbancí nižší, než 1,75 jsou ve vzorku přítomny kontaminující bílkoviny.

6.2.1.2 cDNA syntéza

Ze vzorků RNA byly připraveny roztoky o koncentraci 1000 ng/5 μ l přidáním RNase free water. Následně ke každému roztoku byl přidán 1 μ l random primerů ($c = 100$ pmol/ μ l). Vzorky byly inkubovány 5 min při 65°C na termobloku, poté byly zchlazeny na ledu a krátce zcentrifugovány. Ke každému vzorku bylo přidáno 6 μ l premixu pro reverzní transkripci podle tabulky (Tab. V).

Tab. V: Premix pro reverzní transkripci

Složky premixu	Objem pro 1 vzorek v μ l	Objem pro 10 vzorků v μ l
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6	6
RNasový inhibitor	0,3	3
dNTP (10mM zásobní roztok)	0,6	6
10x reakční pufr	1,2	12
RNase free water	3,3	33
celkový objem	6	60

Celkový objem reakce po přidání premixu byl 12 μ l. Zkumavky byly krátce centrifugovány, poté inkubovány 1 hodinu při 42°C a poté 10 min při 65°C. Vzorky s nově nasyntetizovanou cDNA byly zchlazeny po 2 min na ledu a následně zředěny 48 μ l vody a zvortexovány. Vzorky byly uchovány pro další práci v -20°C.

6.2.1.3 Real-time PCR (qPCR)

Kvantitativní real time PCR byla použita pro detekci exprese genu CYP1A1 v buněčné linii LS174T. Jako referenční gen pro kvantifikaci byl použit glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH).

Jakmile byly vzorky cDNA rozmrazeny byly přesunuty do polystyrenové krabice s ledem. Reakční směs pro RT-PCR obsahovala 2 μ l cDNA a 8 μ l PCR mixu

na jednu jamku. Složení PCR mixů je znázorněno v tabulce (Tab. VI). Vzorky byly pipetovány na bílou 96 jamkovou PCR destičku vždy v triplicátech (24 jamek pro každý gen). Vzor pipetování zobrazuje tabulka (Tab. VII). V experimentu byly použity tyto primery:

CYP1A1

- forward: 5'- TCCGGGACATCACAGACAGC - 3'
- reverse: 5'- ACCCTGGGGTTCATCACCAA - 3'

GAPDH

- forward: 5'- CAAAGTTGTCATGGATGACC - 3'
- reverse: 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCG-3'

(převzato z: Dvořák *et al.*, 2008)

Tab. VI: Složení PCR mixů

Složky mixů	CYP1A1 mix		GAPDH mix	
	Pro 1 vzorek	Pro 26 vzorků	Pro 1 vzorek	Pro 26 vzorků
Syber Green I Master mix	5 µl	130 µl	5 µl	130 µl
CYP1A1 F + R primery (5µM)	1 µl	26 µl	-	-
GAPDH F + R primery (5µM)	-	-	1 µl	26 µl
voda	2 µl	52 µl	2 µl	52 µl
Celkový objem	8 µl	130 µl	8 µl	130 µl

Tab. VII: Vzor pro pipetování 6 jamkové destičky s jednotlivými vzorky v triplikátech

	CYP1A1			GAPDH					
UT									
VD ₃ 10									
VD ₃ 75									
VD ₃ 150									
TCDD									
TCDD + VD ₃ 10									
TCDD + VD ₃ 75									
TCDD + VD ₃ 150									

Legenda: UT – negativní kontrola (0,1% DMSO), VD₃ - vitamín D₃ (10, 75, 150 nM koncentrace ve vzorku), TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) – pozitivní kontrola (5 nM koncentrace ve vzorku)

Po nanesení vzorků byla destička přelepena fólií a centrifugována 3 min při 1500 rpm. Poté byla vložena do LightCycleru s následujícím programem:

1 cyklus

Aktivace: 10 min při 95°C

35 cyklů

Denaturace: 10 s při 95°C

Annealing: 6 s při 65°C

Elongace: 10 s při 72°C

1 cyklus

Křivka tání: 5 s při 95°C

1 min při 63°C

1 s při 97°C

1 cyklus

Chlazení: 10 s při 40°C

Po dokončení RT-PCR byla provedena T_m analýza (probíhá při postupném zvyšování teploty od 63°C do 97°C, přičemž dochází k zaznamenání fluorescence po dobu cca 5 minut, která následně klesá s postupným rozpadem dsDNA a uvolněním inerkalačního barviva) a stanovení maxima druhé derivace. Následně byla vypočítána relativní kvantifikace pomocí metody $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta C_t = \emptyset C_t_{CYP1A1} - \emptyset C_t_{GAPDH}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{vzorů a kontrol}} - \Delta C_t_{DMSO}$$

Dále byla vypočítána hodnota fold induction (X), což je násobek zvýšení exprese oproti negativní kontrole.

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

6.2.2 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD) na detekci katalytické aktivity CYP1A1 v 96 jamkovém uspořádání

Pro detekci katalytické aktivity byly buňky LS174T pasážovány, počítány, vysety a poté na ně byly aplikovány testované látky, které byly inkubovány po dobu 48 hodin (viz pracovní postup, Tab. II).

Po 48 hodinách inkubace bylo odstraněno médium a do jamek kultivační desky byl nasazen roztok A po 100 μ l na jamku.

Roztok A (pro 96 jamek):

- 10 ml PBS 1x
- 40 μ l ethoxyresorufinu (zás. roztok 2 mM v DMSO)

- 10 μ l dikumarolu (zás. roztok 10 mM v 0,1 M NaOH)

Jelikož testované látky byly aplikovány na polovině kultivační desky (48 jamek), bylo třeba roztok A přepočítat na použití pro 58 jamek (rezerva pro 10 jamek kvůli chybě při pipetování a snadnější manipulaci s vícekanálovou pipetou).

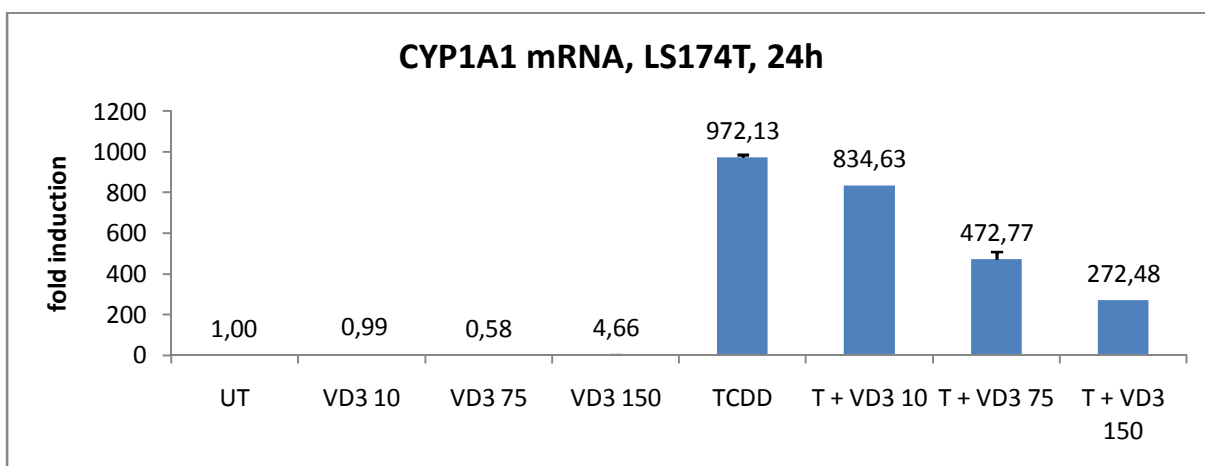
Po nanesení roztoku A do jamek byla kultivační deska vložena do inkubátoru na 30 minut. Poté bylo z každé jamky přepipetováno 75 μ l roztoku do černé fluorescenční desky a přidáno 125 μ l methanolu. Následně byla změřena fluorescence při excitaci 530 nm a emisi 590 nm.

7. Výsledky

7.1 Detekce exprese genu CYP1A1 metodou RT-PCR ve střevní linii

Pomocí metody real time PCR byla studována exprese genu CYP1A1 na úrovni mRNA v buněčné linii LS174T. Detekce byla provedena ve třech nezávislých opakováních. Buňky střevní linie byly inkubovány s vitamínem D₃ ve třech různých koncentracích (10, 75, 150 nM) a v kombinaci s TCDD (exogenní ligand AhR receptoru) vždy po dobu 24 hodin. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% roztok DMSO a jako pozitivní kontrola indukce byl použit 5 nM TCDD. Míra indukce byla vypočítána pomocí $\Delta\Delta C_t$ metody.

Ze tří na sobě nezávislých opakováních uvádím reprezentativní výsledek, který je znázorněn v podobě grafu na Obr. 7. TCDD vykazoval v nádorové linii LS174T indukci exprese CYP1A1 na úrovni mRNA 972x. Z grafu je patrné, že se zvyšující se koncentrací vitamínu D₃ v kombinaci s TCDD je exprese mRNA CYP1A1 potlačena. Pokles na indukovatelné úrovni je koncentračně závislý. Co se týče samotného vitamínu D₃, můžeme pozorovat pokles indukce u 75 nM koncentrace, oproti hodnotám s nižší (10 nM) a vyšší (150 nM) koncentrací.



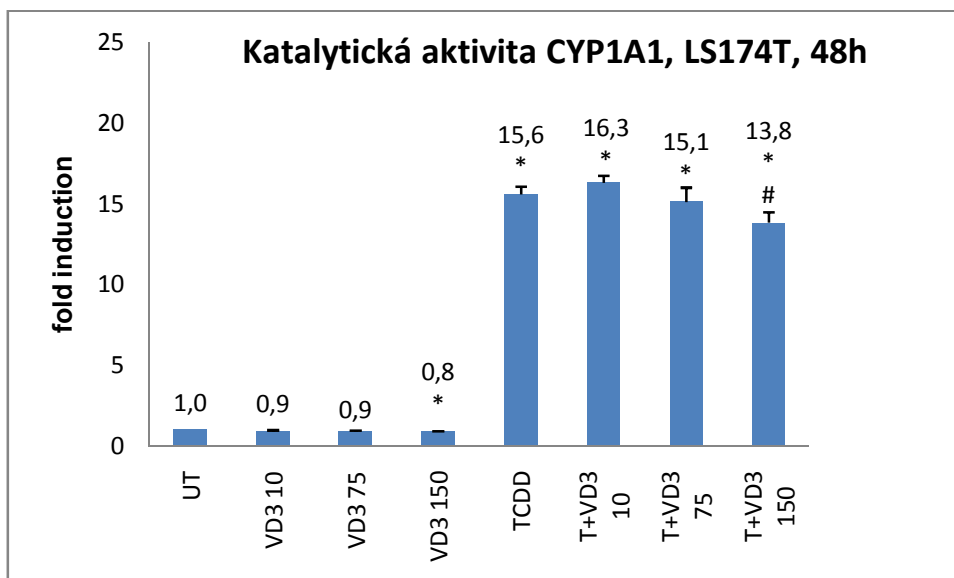
Obr. 7: Stanovení hladiny CYP1A1 mRNA v buněčné linii LS174T

Buněčná linie byla vystavena účinku vitamínu D_3 (VD3 10, 75, 150 nM), vitamínu D_3 ve spojení s TCDD (T + VD3 10, 75, 150 nM), negativní kontrole – 0,1% roztok DMSO (UT), pozitivní kontrole indukce 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (5 nM TCDD), po dobu 24 hodin. Uveden je reprezentativní výsledek. V grafu jsou hodnoty vyjádřeny jako fold induction, což je násobek zvýšení exprese oproti negativní kontrole (DMSO).

7.2 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD) na detekci katalytické aktivity CYP1A1 v 96 jamkovém uspořádání

Detekce katalytické aktivity CYP1A1 ve střevní linii byla provedena ve třech nezávislých měřeních vždy po 48 hodinové inkubaci testovaných látek. Fluorescence byla měřena při excitaci 530 nm a emisi 590 nm. Z naměřených hodnot byl vypočten průměr a hodnota fold induction vztažená k negativní kontrole (DMSO). Dále byla vypočítána statistická významnost indukce u jednotlivých vzorků (studentův T-test; $p < 0,05$) a směrodatná odchylka pomocí MS Office Excel. Průměr hodnot ze tří nezávislých měření je uveden v grafu (Obr. 8).

Vitamín D_3 v buněčné linii LS174T není induktorem katalytické aktivity. Naopak TCDD statisticky významně indukoval katalytickou aktivitu CYP1A1 v nádorové linii LS174T a v kombinaci s vitamínem D_3 došlo ke statisticky významnému poklesu v nejvyšší koncentraci (150 nM).



Obr. 8: Katalytická aktivita CYP1A1

Buněčná linie byla inkubována s vitamínem D_3 (VD3 10, 75, 150 nM), vitamínem D_3 v kombinaci s TCDD (T +VD3 10, 75, 150 nM), negativní kontrolou – 0,1% roztok DMSO (UT), pozitivní kontrolou indukce 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (5 nM TCDD), po dobu 48 hodin. Výsledky ze tří nezávislých měření byly zprůměrovány a v grafu vyjádřeny jako fold induction, tedy jako násobek indukce vůči negativní kontrole (DMSO). * - hodnota je statisticky významně odlišná od hodnoty negativní kontroly (DMSO) (studentův T-test; $p < 0,05$). # - hodnota je statisticky významně odlišná od hodnoty pozitivní kontroly indukce (TCDD) (studentův T-test; $p < 0,05$).

8. Diskuze

V této práci byla studována schopnost vitamínu D₃, což je potentní aktivátor VDR, na aktivitu AhR v nádorové linii LS174T. AhR jsme aktivovali jeho exogenním ligandem TCDD (5 nM). Aktivovaný AhR se váže do promotorové oblasti a spouští expresi CYP1A1. Přímo vázbu se do promotoru CYP1A1 váže také ligandem (kalciotriolem 10, 75, 150 nM) aktivovaný VDR a to konkrétně do motivu ER8 (Matsunawa *et al.*, 2012). Oba dva transkripční faktory se vážou nezávisle na sobě. Kombinací ligandů, aktivující tyto faktory je možné měnit hladinu mRNA CYP1A1.

Výsledky katalytické aktivity enzymu CYP1A1 ukazují, že vitamín D₃ její bazální hladinu ve střevní linii LS174T neovlivňuje. Ke statisticky významné indukci došlo v případě TCDD, který v našem případě sloužil jako pozitivní kontrola. TCDD v kombinaci s vitamínem D₃ naopak statisticky významně EROD aktivitu v nejvyšší koncentraci (VD₃ 150 nM) snížil. Vitamín D₃ tedy může ve vyšších koncentracích snižovat katalytickou aktivitu enzymu CYP1A1 podílejícího se na procesu karcinogeneze.

V hodnocení detekce exprese genu CYP1A1 pomocí RT-PCR jsme zjistili, že aktivace AhR vyvolaná pomocí TCDD je potlačena se zvyšující se koncentrací vitamínu D₃ (10, 75, 150 nM), což se odráží na snížení exprese mRNA CYP1A1 v buňkách střevního adenokarcinomu (LS174T) (Obr. 7). Účinek vitamínu D₃ spolu s BaP na expresi CYP1A1 byl zkoumán v buňkách U937, THP-1 (monocyty/makrofágy), v buňkách rakoviny prsu MCF-7 a v derivovaných buňkách ledvin HEK23 (Matsunawa *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že vitamín D₃ v těchto buňkách zvyšuje expresi CYP1A1 indukovanou TCDD nebo BaP. Samotný vitamín D₃ indukci v těchto buňkách nevyvolává. Ovšem kombinace BaP (0,3 μM) a vitamínu D₃ v koncentracích 1, 3, 10, 30 a 100 nM vede k výraznému zvýšení indukce mRNA CYP1A1 oproti samotnému BaP. Nejvyšší hranice exprese bylo dosaženo, při hodnotě koncentrace 30 nM vitamínu D₃. Při 100 nM koncentraci se VDR jeví jako satureovaný. Inkubace byla prováděna vždy po dobu 24 hodin. V mé práci byla naopak exprese genu CYP1A1 potlačena a to s rostoucí koncentrací vitamínu D₃

(10, 75 a 150 nM), TCDD zůstává neměnný (5 nM). Inkubace látek byla také prováděna po dobu 24 hodin. V mém pokusu byly použity vyšší koncentrace vitamínu D₃ oproti studii Matsunawa *et al.*, 2012 a jejich účinek jsem sledovala pouze ve střevní linii, zatímco ve srovnávané studii bylo pozorováno vzájemné zesílení účinků AhR a VDR na indukci CYP1A1 ve čtyřech liniích z různých tkání. Zda za snížení hladiny mRNA CYP1A1 v buňkách LS174T je zodpovědný VDR nelze potvrdit ani vyvrátit, pokud nebude použit příslušný antagonist a či siRNA jako ve studii Matsunawa *et al.*, 2012. Jelikož se jedná o střevní linii, je možné, že došlo k aktivaci farnesoidního receptoru pomocí vitamínu D₃ (Eloranta *et Kullak-Ublick*, 2005; Makishima *et al.*, 2002), což také nelze potvrdit bez dalších testů.

Snížení katalytické aktivity CYP1A1 jsme mohli pozorovat u nejvyšší koncentrace vitamínu D₃ (150 nM) v kombinaci s TCDD v buněčné linii LS174T. Toto snížení se shoduje s poklesem mRNA enzymu v téže koncentraci. Bylo by dobré zjistit, jestli se toho snížení koná i na úrovni proteinu, jelikož řídicí funkci tvoří až samostatný enzym.

Linie LS174T pochází z orgánu (střevo) podílejícím se na metabolismu xenobiotik přijímaných z potravy a nápojů, které mohou vyvolat indukci nebo inhibici CYPů prostřednictvím AhR (Jeuken *et al.*, 2003). Každý orgán se tedy vyznačuje specifickou expresí různých transkripčních faktorů, které ve svém výsledku mohou řídit expresi cílových genů odlišně. Proto je nutné provést další studie týkající se působení aktivovaného VDR na regulační oblast genu CYP1A1 i u jiných buněčných linií.

9. Závěr

Tato bakalářské práce byla zaměřena na detekci exprese genu CYP1A1 na úrovni mRNA regulovanou transkripčními faktory AhR a VDR ve střevní linii LS174T.

Teoretická část popisuje metabolismus xenobiotik, jehož první fáze se účastní ovlivňovaný enzym CYP1A1. Na regulaci CYP1A1 se primárně podílí AhR, což je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Modelovým aktivátorem AhR je TCDD. Nedávným poznatkem je, že CYP1A1 je novým cílovým genem VDR podílejícím se na metabolismu xenobiotik. Závěr teoretické části je věnovaný vitamínu D, jakožto fyziologickému agonistovi VDR.

Praktická část je zaměřena na samotnou aktivaci VDR pomocí kalcitriolu (aktivní forma vitamínu D) a sledování vlivu na změnu hladiny mRNA CYP1A1 ve střevní linii, jejíž výhodou je, že pochází z orgánu, který se primárně podílí na metabolismu xenobiotik. Jako první krok ke zjištění ovlivnění exprese genu CYP1A1 jsme zařadili vyhodnocení jeho katalytické aktivity, která byla v nejvyšší testové koncentraci vitamínu D₃ (150 nM) v kombinaci s TCDD významně statisticky snížena. Vlastní detekce exprese genu metodou RT-PCR ukázala snížení hladiny mRNA s rostoucí koncentrací vitamínu D₃ spolu s TCDD ve sledovaném čase 24 hodin. Aktivovaný VDR tedy ovlivňuje hladinu mRNA CYP1A1.

Je třeba provést další studii zabývající se ovlivněním úrovně proteinu pro komplexnější stanovení fyziologických důsledků.

10. Literatura

Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (5 – 6): 737 – 747.

Backlund M., Johansson I., Mkrtchian S., Ingelman-Sundberg M. (1997): Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *The Journal of biological chemistry* 272(50): 31755 – 31763.

De Azevêdo Silva J, Guimarães RL, Brandão LA, Araujo J, Segat L, Crovella S, Sandrin-Garcia P. (2013): Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, Epub ahead of print: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721405>.

Dostálek M., Janoščíková E, Juřica J., Zahradníková L. (2006): *Farmakokinetika*, Grada Publishing, 1. vydání, Praha, ISBN: 80-247-1464-7.

Dvořák Z., Cvek B. (2011): *Vybrané kapitoly z buněčné biologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vydání, skripta, ISBN: 978-80-244-2724-9.

Dvorak Z, Vrzal R, Henklova P, Jancova P, Anzenbacherova E, Maurel P, Svecova L, Pavek P, Ehrmann J, Havlik R, Bednar P, Lemr K, Ulrichova J. (2008): JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 75(2): 580 – 588.

Dvorák Z, Vrzal R, Ulrichová J, Pascussi JM, Maurel P, Modriansky M. (2006): Involvement of cytoskeleton in AhR-dependent CYP1A1 expression. *Current Drug Metabolism* 7(3): 301 – 313.

Eloranta J. J., Kullak-Ublick G. A. (2005): Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433(2): 397 – 412.

Enan E., Lasley B., Stewart D., Overstreet J., Vandevort C. A. (1996): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) modulates function of human luteinizing

granulosa cells via cAMP signaling and early reduction of glucose transporting activity. *Reproductive toxicology* 10(3): 191 – 198.

Fallone F., Villard P. H., Séréé E., Rimet O., Nguyen Q. B., Bourgarel-Rey V., Fouchier F., Barra Y., Durand A., Lacarelle B. (2004): Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochemical and biophysical research communications* 322(2): 551 – 556.

Fujii-Kuriyama Y., Kawajiri K. (2010): Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 86(1): 40 - 53.

Ganong W. F. (2005): *Přehled lékařské fyziologie*. Galén, 1. vydání, Praha, ISBN: 80-7262-311-7.

Gregoraszczyk E. L., Zabelny E., Ochwat D. (2001): Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-linked inhibition of luteal cell progesterone secretion in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated cells. *Journal of physiology and pharmacology* 52(2): 303 – 311.

Guengerich F. P. (2001): Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* 14(6): 611 - 650.

Harper N., Wang X., Liu H., Safe S. (1994): Inhibition of estrogen-induced progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells by aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Molecular and cellular endocrinology* 104(1): 47 – 55.

Hausler M. R., Whitfield G. K., Hausler C. A., Hsieh J. C., Thompson P. D., Selznick S. H., Dominguez C. E., Jurutka P. W. (1998): The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *Journal of bone and mineral research* 13(3): 325 – 349.

Huang P., Ceccatelli S., Hoegberg P., Sten Shi T. J., Håkansson H., Rannug A. (2003): TCDD-induced expression of Ah receptor responsive genes in the pituitary

and brain of cellular retinol-binding protein (CRBP-I) knockout mice. *Toxicology and applied pharmacology* 192(3): 262 – 274.

Jeuken A., Keser B. J., Khan E., Brouwer A., Koeman J., Denison M. S. (2003): Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(18): 5478 - 5487.

Kato S. (2000): The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *Journal of Biochemistry* 127(5): 717 – 722.

Klinge C. M., Bowers J. L., Kulakosky P. C., Kamboj K. K., Swanson H. I. (1999): The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Molecular and cellular endocrinology* 157(1 – 2): 105 – 119.

Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy* 94: 913 - 918.

Kojima M., Sekimoto M., Degawa M. (2008): A novel gender-related difference in the constitutive expression of hepatic cytochrome P4501A subfamily enzymes in Meishan pigs. *Biochemical pharmacology* 75(5): 1076 - 1082.

Lee S. S., Jeong H. G., Yang K. H. (1998): Effects of estradiol and progesterone on cytochrome P4501A1 expression in Hepa 1c1c7 cells. *Biochemistry and molecular biology international* 45(4): 775 – 781.

Liu H., Safe S. (1996): Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on insulin-induced responses in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* 138(2): 242 – 250.

Makishima M., Lu T. T., Xie W., Whitfield G. K., Domoto H., Evans R. M., Haussler M. R., Mangelsdorf D. J. (2002): Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296(5571): 1313 – 1316.

Marlowe J. L., Puga A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry* 96(6): 1174 - 1184.

Mathieu C., Gysemans C., Giulietti A., Bouillon R. (2005): Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 48(7): 1247 – 1257.

Matsunawa M., Akagi D., Uno S., Endo-Umeda K., Yamada S., Ikeda K., Makishima M. (2012): Vitamin D receptor activation enhances benzo[a]pyrene metabolism via CYP1A1 expression in macrophages. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40(11): 2059 – 2066.

Matthews J., Wihlén B., Thomsen J., Gustafsson J. A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Molecular and cellular biology* 25(13): 5317 – 5328.

Mindell E. (2000): *Vitaminová bible pro 21. Století*. Warner Books v New Yorku, vydal: Euromedia Group - Knižní klub, 1. vydání, Praha, ISBN: 80-242-0406-1.

Monostory K., Pascussi J. M., Kóbori L., Dvorak Z. (2009): Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug metabolism Reviews* 41(4): 547 – 572.

Nebert D. W., Dalton T. P. (2006): The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 6(12): 947 - 960.

Nebert D. W., Dalton T. P., Okey A. B., Gonzalez F. J. (2004): Role of aryl hydrocarbonreceptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of biological chemistry* 279(23): 23847 - 23850.

Nguyen T. A., Hoivik D., Lee J. E., Safe S. (1999): Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 367(2): 250 – 257.

Oberbeil K., Lentzová Ch. (2001): *Ovoce a zelenina jako lék*. Südwest Verlag v Münchenu, vydala: Fortuna Print, 1. vydání, Praha, ISBN: 80-86144-90-9.

Ohtake F., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2009): AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochemical pharmacology* 77(4): 474 – 484.

Ovesen L., Andersen R., Jakobsen J. (2003): Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *The Proceedings of the Nutrition Society* 62(4): 813 - 821.

Pascussi J. M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P., Vilarem M. J. (2003): The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619(3): 243 – 253.

Pávek P., Dvořák Z. (2008): Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Current drug metabolism* 9(2): 129 - 143.

Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H. (2008): Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of toxicology* 82(10): 667 - 715.

Pocar P., Klonisch T., Brandsch C., Eder K., Fröhlich C., Hoang-Vu C., Hombach-Klonisch S. (2006): AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes. *Toxicological sciences* 89(2): 408 – 414.

Rushing S. R., Denison M. S. (2002): The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Archives of biochemistry and biophysics* 403(2): 189 – 201.

Thackaberry E. A., Bedrick E. J., Goens M. B., Danielson L., Lund A. K., Gabaldon D., Smith S. M., Walker M. K. (2003): Insulin regulation in AhR-null mice: embryonic cardiac enlargement, neonatal macrosomia, and altered insulin regulation and response in pregnant and aging AhR-null females. *Toxicological sciences* 76(2): 407 – 417.

Vecchini F., Lenoir-Viale M. C., Cathelineau C., Magdalou J., Bernard B. A., Shroot B. (1994): Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochemical and biophysical research communications* 201(3): 1205 – 1212.

Velíšek J. (1999): *Chemie potravin 2*. OSSIS, 1. vydání, Tábor, ISBN: 80-902391-4-5

Vrzal R., Daujat-Chavanieu M., Pascussi J. M., Ulrichova J., Maurel P., Dvorak Z. (2007): Microtubules-interfering agents restrict aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A2 induction in primary cultures of human hepatocytes via c-jun-N-terminal kinase and glucocorticoid receptor. *European Journal of Pharmacology* 581(3): 244 – 254.

Vrzal R., Stejskalova L., Monostory K., Maurel P., Bachleda P., Pavek P., Dvorak Z. (2009): Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3): 288 – 296.

Vrzal R., Ulrichová J., Dvořák Z. (2004): Aromatic Hydrocarbon Receptor Status In The Metabolism Of Xenobiotics Under Normal And Pathophysiological Conditions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc* 148(1): 3 – 10.

Walsh A. A., Szklarz G. D., Scott E. E. (2013): Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility In Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *The Journal of biological chemistry* 288(18): 12932 - 12943.

Wanner R., Brömmer S., Czarnetzki B. M., Rosenbach T. (1995): The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 209(2): 706 – 711.

WHO (2004): *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1. vydání, Geneva, ISBN: 92- 4-154612-3.

Wölfle D., Becker E., Schmutte C. (1993): Growth stimulation of primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Cell biology and toxicology 9(1): 15 – 31.

Yim S., Choi S. M., Choi Y., Lee N., Chung J., Park H. (2003): Insulin and hypoxia share common target genes but not the hypoxia-inducible factor-1alpha. The Journal of biological chemistry 278(40): 38260 – 38268.

Žamboch J. (1996): Vitamíny. Grada Publishing, 1. vydání, Praha, ISBN: 80-7169-322-7.

Internetové zdroje:

<http://www.eufic.org/article/cs/artid/Jasna-budoucnost-vitaminu-D>

<http://www.osteoporozaz.cz/vitamin-d-v-potravinach>

<http://hpacultures.org.uk/>

11. Seznam použitých zkratek

ADMI3	(25 <i>S</i>)-26-adamantyl-1 α ,25-dihydroxy-2-methylene-22,23-didehydro-19,27-dinor-20-epi-vitamin D ₃
ADTT	(25 <i>R</i>)-25-adamantyl-1 α ,25-dihydroxy-2-methylene-22,23-didehydro-19,26,27-trinor-20-epi-vitaminD ₃
AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
AhRR	Represor aryluhlovodíkového receptoru
AR	Androgenní receptor
ARNT	Jaderný translokátor aryluhlovodíkového receptoru
BaP	Benzo[a]pyren
Caco-2	Buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRBP-I	Cellular Retinol Binding Protein typu I
CYP	Cytochrom P450
DBP	Protein vázající vitamín D
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetylsulfoxid
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
DRE	Dioxin responzivní element
dsDNA	dvouvláknová DNA
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay

ER	Estrogenový receptor
ER6/8	Everted repeat
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylasová aktivita
ERK	Extracelulární-regulované protein kinázy
FBS	Fetální bovinní sérum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GR	Glukokortikoidní receptor
GST	Glutathion-S-transferasy
HaCaT	Buněčná linie lidských keratinocytů
Hepa 1c1c7	Buněčná linie myšního hepatocelulárního karcinomu
HepG2	Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
HPA	Health Protection Agency
Hsp90	Protein teplotního šoku 90
HuH-7	Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
IU	Mezinárodní jednotka
JNK	c-Jun N terminální kináza
LCA	Kyselina litholová
LS174T	Buněčná linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva
MCF-7	Buněčná linie lidského adenokarcinomu prsu
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
OATPs	Organic Anion Transporting Polypeptides

PAS	Per-ARNT-Sim
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodky
PBC126	Polychlorovaný bifenyl 126
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PR	Progesteronový receptor
PXR	Pregnanový X receptor
p23	prostaglandin E syntáza 3
qRT-PCR	kvantitativní reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RAR	Receptor pro kyselinu trans-retinovou
RXR	Receptor pro kyselinu cis-retinovou
siRNA	small interfering ribonukleová kyselina
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors
SULT	sulfotransferasa
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
THP-1	Buněčná linie lidských monocytů
TR α/β	Thyroidní receptor α/β
UGT	UDP-glukuronosyl transferasa
UT	Negativní kontrola
UV-B	Ultrafialové záření B
U937	Buněčná linie lidských monocytů lymfatické leukémie
VDR	Receptor pro vitamín D
VD ₃	Kalcitriol
VDRE	Vitamín D responzivní element

WHO	Světová zdravotnická organizace
XAP2	Hepatitis virus B X-associated protein
XRE	Xenobiotický responzivní element