

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Studium vlivu derivátů biologicky aktivních látek na
transkripční aktivitu xenoreceptorů**

Bakalářská práce

Tat'ána Táborská

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium - Biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Aneta Grycová, PhD.

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem řádně citovala veškeré použité zdroje uvedené v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Taťána Táborská

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Anetě Grycové, Ph.D., která mi ochotně věnovala svůj čas, trpělivost, odborné vedení a nesčetné konzultace. Poděkování také patří kolektivu Katedry buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci za zpřístupnění laboratoře a jejího vybavení. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a manželovi za podporu ve studiu.

Bibliografická identifikace

Jména a příjmení autora: Taťána Táborská
Název práce: Studium vlivu derivátů biologicky aktivních látek na transkripční aktivitu xenoreceptorů
Typ práce: Bakalářská práce
Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce: Mgr. Aneta Grycová, PhD.
Rok obhajoby: 2016

Abstrakt: Předmětem studia byla řada nově syntetizovaných derivátů přírodních látek (IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1346). Charakteristickým znakem těchto sloučenin je výskyt heterocyklu pyridinu a pyrimidinu. V současné době jsou právě tyto heterocykly součástí mnoha léčiv. Sloučeniny byly hodnoceny pro případnou interakci s aryl uhlovodíkovým (AhR) a glukokortikoidním (GR) receptorem, které patří mezi ligandem aktivované transkripční faktory. Změnou transkripční aktivity těchto receptorů dochází v organismu k regulaci mnoha signálních drah. Pro sledování vlastností testovaných sloučenin byly použity následné metodiky: MTT testem byla stanovena cytotoxicita, metodou Genne Reporter Assay byla sledována transkripční aktivita. Byly použity stabilně transfekované buněčné linie AZ-AHR a AZ-GR ošetřené testovanými sloučeninami IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 μmol/l; 10 μmol/l; 50 μmol/l a 100 μmol/l, přičemž látka IRCBM 1303 byla testována do koncentrace 50 μmol/l. Po použití MTT testu bylo zjištěno, že látka IRCBM 1346 způsobila snížení viability buněk AZ-AHR při koncentraci 50 μmol/l o 24% a při koncentraci 100 μmol/l o 30%. Z těchto důvodů nebyly tyto dvě koncentrace dále použity při sledování vlivu na aktivitu AhR. Na základě získaných výsledků všech experimentů bylo zjištěno, že žádná z látek nevystupuje jako agonista GR a AhR. Látka IRCBM 1827 byla identifikována jako plný antagonist GR, která v koncentraci 100 μmol/l způsobila pokles transkripční aktivity receptoru o 75%. Výsledky této bakalářské práce mohou mít význam pro farmakologii, ale taktéž syntézu nových látek.

Klíčová slova: AhR, GR, pyridin, pyrimidin, MTT assay, Genne reporter assay
Počet stran: 58
Počet příloh: 0
Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author's first name a surname: Taťána Táborská
Title: Effect of derivates of biologically active compounds on transcriptional activity of xenoreceptors
Type of thesis: bachelor
Department: Department of cell biology and genetics
Supervisor: Mgr. Aneta Grycová, PhD.
The year of presentation: 2016

Abstract: The subject of study was series of newly synthesized derivates of natural substances (IRCBM 1827, IRCBM 1346 and IRCBM 1303). These compounds are characterized by the occurrence of heterocycle pyridine and pyrimidine. Many drugs contain these heterocycles. Newly synthesized compounds were evaluated for interaction with AhR and GR receptors. These receptors belong among ligand activated transcriptional receptors. The change in transcriptional activity influence many regulation pathways in organism. The MTT test and Gene Reporter Assay were used to determine cytotoxicity and transcriptional activity respectively. Two stably transfected cell lines AZ-AHR and AZ-GR were exposed to tested compounds IRCBM 1827, IRCBM 1346 and IRCBM 1303. Compounds concentrations were 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l and 100 µmol/l. Compound IRCBM 1303 was tested to concentration 50 µmol/l. MTT test revealed compounds IRCBM 1346 caused a reduction in AZ-AHR cell viability at concentration 50 µmol/l by 24% and at concentration 100 µmol/l by 30%. Therefore these concentrations were not used further. Based on experiments no compounds were found to be GR or AhR agonist. Compounds IRCBM 1827 were identified as full GR antagonist. It caused reduction in receptor transcriptional activity by 75% at concentration 100 µmol/l. This bachelor thesis results can be used in pharmacology and new compound synthesis.

Keywords: AhR, GR, pyridine, pyrimidine, MTT assay, Gene reporter assay

Number of pages: 58
Number of appendices: 0
Language: czech

Obsah

Seznam obrázků.....	8
Seznam grafů	9
Seznam tabulek.....	9
1. Úvod.....	10
2. Pyrimidin, pyridin.....	11
2.1. Pyrimidin a jeho deriváty	11
2.1.1. Obecné vlastnosti	11
2.1.2. Využití.....	11
2.1.3. Deriváty pyrimidinu	12
2.2. Pyridin a jeho deriváty	14
2.2.1. Obecné vlastnosti	14
2.2.2. Využití.....	15
2.2.3. Deriváty pyridinu	16
3. Genová exprese a její regulace.....	17
3.1. Regulace genové exprese na úrovni transkripce	18
3.2. Jaderné receptory.....	19
3.2.1. Struktura jaderných receptorů	20
3.2.2. Mechanismus účinku jaderných receptorů	20
3.2.3. Rozdělení jaderných receptorů.....	21
3.3. Receptor AhR.....	21
3.4. Glukokortikoidní receptor (GR).....	23
4. Biotransformace	25
4.1. Fáze biotransformace	26
4.2. Cytochromy P450.....	27
4.2.1. Názvosloví.....	27
4.2.2. Výskyt a význam v lidském organismu	27
6. Cíle práce	29
7. Materiál a metodika	30
7.1. Materiál	30
7.1.1. Chemikálie	30
7.1.2. Laboratorní přístroje.....	32
7.1.3. Roztoky	32

7.1.4.	Biologický materiál	33
7.1.4.1.	Buněčná linie AZ-GR.....	33
7.1.4.2.	Buněčná linie AZ-AHR.....	33
7.2.	Metody	33
7.2.1.	Pasážování buněk.....	33
7.2.2.	Počítání buněk.....	34
7.2.3.	MTT test.....	34
7.2.3.1.	Postup MTT testu	34
7.2.4.	Gene Reporter Assay.....	35
7.2.4.1.	Postup Gene Reporter Assay	35
7.2.5.	Kontrola aktivity luciferázy.....	36
7.2.5.1.	Postup.....	36
8.	Výsledky	38
8.1.	Vliv testovaných látek na viabilitu buněčných linií AZ-AHR a AZ-GR	38
8.2.	Vliv testovaných látek na aktivitu receptorů AhR a GR	41
8.2.1.	Vliv testovaných látek na aktivitu AhR	42
8.2.2.	Vliv testovaných látek na aktivitu GR	44
8.3.	Vliv testovaných látek na katalytickou aktivitu luciferázy	47
9.	Diskuze	48
10.	Závěr.....	50
11.	Literatura.....	51

Seznam obrázků

Obr. 1: Strukturní vzorec pyrimidinu	11
Obr. 2: Strukturní vzorec kyseliny barbiturové, barbitalu a fenobarbitalu.....	12
Obr. 3: Struktura vitamínu B1	13
Obr. 4: 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin	14
Obr. 5: Diethylester 1,3-dicyclopentyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4,5-dikarboxylové kyseliny.....	14
Obr. 6: Diethyl - 1,3- dicyclohexyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin -4,5-dikarboxylát.....	14
Obr. 7: Strukturní vzorec pyridinu	15
Obr. 8: Strukturní vzorec nikotinu.....	16
Obr. 9: Strukturní vzorec kyseliny nikotinové	16
Obr. 10: Strukturní vzorec nikotinamidu.....	17
Obr. 11: Strukturní vzorec pyridoxinu	17
Obr. 12: Struktura jaderného receptoru	20
Obr. 13: Signální dráha AhR	23
Obr. 14: Signální dráha GR	25
Obr. 15: Strukturní vzorec IRCBM 1827	31
Obr. 16: Strukturní vzorec IRCBM 1346	31
Obr. 17: Strukturní vzorec IRCBM 1303	31

Seznam grafů

Graf 1: Viabilita buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek.....	39
Graf 2: Viabilita buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných látek.....	40
Graf 3: Agonistický mód u buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek	42
Graf 4: Antagonistický mód u buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek	43
Graf 5: Agonistický mód u buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných látek	44
Graf 6: Antagonistický mód u buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných látek	46
Graf 7: Verifikace aktivity luciferázy AZ-AHR	47

Seznam tabulek

Tab. 1: Seznam použitých chemikálií.....	30
Tab. 2: Seznam použitých laboratorních přístrojů.....	32

1. Úvod

S přírodními látkami a jejich deriváty se setkáváme každý den, ať už v podávaných léčích či potravě. Svým složením i strukturou jsou velmi rozmanité. Vznikají při chemických přeměnách v rostlinných a živočišných buňkách. Mezi přírodní látky patří alkaloidy, heterocyklické sloučeniny, steroidy, přírodní barviva a mnohé další. Tyto látky jsou biotransformovány v těle. Proces biotransformace je řízen klíčovými receptory, které fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory. Jaderné receptory patří do skupiny ligandem aktivovaných transkripčních faktorů. Ovlivňují vývoj, metabolismus a mimo jiné se podílejí na regulaci cytochromu P450, který se účastní biotransformace většiny xenobiotik.

Heterocyklické sloučeniny jsou hojně zastoupeny v přírodě. Mají značný vliv na život, neboť jejich strukturu můžeme najít v řadě přírodních produktů, jako jsou vitamíny, hormony a antibiotika. Jsou tedy vhodnými kandidáty na vývoj nových biologicky aktivních látek. Hledání nových léčiv je věnováno velké úsilí a syntéza sloučenin "in vitro" zaznamenala v posledních letech veliký pokrok.

Pyrimidin a pyridin jsou heterocyklické sloučeniny, které jsou biologicky velmi aktivní. Pyrimidin je např. součástí nukleových bází a pyridin nalezneme v mnoha vitamínech. Také tyto dvě látky a jejich deriváty jsou studovány k vývoji léčiv.

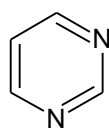
V praktické části bakalářské práce byla sledována interakce uměle syntetizovaných derivátů látek s jadernými receptory, vystupujícími jako ligandem aktivované transkripční faktory. Při experimentech byl sledován aryl uhlovodíkový a glukokortikoidní receptor. Inhibice nebo aktivace transkripčních faktorů může jít ruku v ruce s různými nemocemi. Je proto nutné této tématice věnovat značnou pozornost již na molekulární úrovni.

2. Pyrimidin, pyridin

2.1. Pyrimidin a jeho deriváty

2.1.1. Obecné vlastnosti

Pyrimidin (Obr. 1) je organická heterocyklická sloučenina obsahující 4 atomy uhlíku, 4 atomy vodíku a 2 atomy dusíku v poloze 1 a 3. Strukturální název je 1,3-diazin nebo také m-diazin. Bod varu pyrimidinu je 124 °C a bod tání 21 °C. Hodnota pKa pro plně protonizovaný pyrimidin je 1,23 (Červinka et al., 1991).



Pyrimidir

Obr. 1: Strukturální vzorec pyrimidinu

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991

Pyrimidinové deriváty, kyselina močová a alloxan, jsou známy od počátku 19. století, avšak do roku 1879 nebyla laboratorně žádná syntéza pyrimidinu provedena. Systematické studium pyrimidinu zahájil v roce 1884 Adolf Pinner, který syntetizoval deriváty kondenzací ethylacetoacetátu s amidiny. Pyrimidiny byly dále objeveny v meteoritech, ale jejich původ nebyl doposud objasněn. Můžeme je také najít v syntetických sloučeninách, jako jsou barbituráty a léčiva HIV (Sharma et al., 2014; Červinka et al., 1991).

2.1.2. Využití

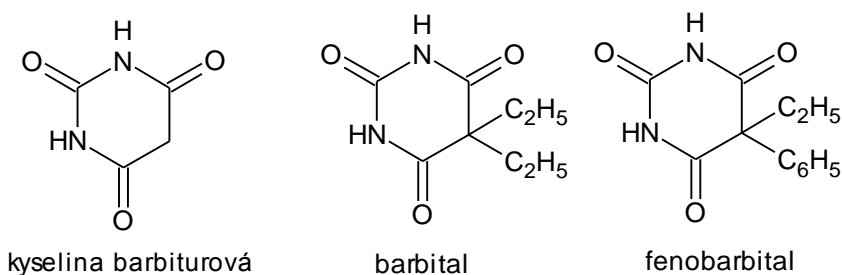
Pyrimidinům je věnována velká pozornost z důvodu jejich vysoké biologické aktivity, jako jsou protizánětlivé, analgetické a protirakovinové účinky. Dále jsou to COX-inhibitory. COX, neboli cyklooxygenáza, je enzym, který je zodpovědný za tvorbu biologických mediátorů prostanoidů, včetně prostaglandinů, prostacyklinů a tromboxanu. COX se v těle vyskytuje ve dvou formách, a to ve formě COX-1 a COX-2. Druhá forma je zodpovědná za tvorbu zánětu a bolesti (Tirunagari et al., 2009). COX-1 je konstitutivní a odpovědný za

udržování fyziologické homeostázy. Objev těchto dvou izoform vedl k vývoji nové třídy nesteroidních protizánětlivých léků, které jsou selektivní pro COX-2. Jsou to tzv. koxiby. COX katalitická doména v inhibitech COX-2 je o 20% větší a liší se v přítomnosti boční kapsy ve srovnání s COX-1. Obě formy vykazují 65% homologii aminokyselinové sekvence, avšak výrazný rozdíl je v substituci isoleucinu v pozici 523 v COX-1 s valinem na COX-2, která umožňuje interakci sulfonamidové nebo sulfonové skupiny koxibu s Arg 513 v postranní kapse COX-2 (Vane et al., 1998).

2.1.3. Deriváty pyrimidinu

Pyrimidiny mají velmi široké spektrum vlastností, analogy pyrimidinu mají antibakteriální, antimykotické, protizánětlivé, protivirové, analgetické, antihypertenzní, antipyretické, antikonvulzivní, protirakovinové a další vlastnosti (Sharma et al., 2014). Mezi nejdůležitější pyrimidinové deriváty patří nukleové báze cytosin (C), thymin (T) a uracil (U). Jedná se o nukleové báze, které jsou základní součástí nukleových kyselin

Další významnou skupinou derivátů, jsou deriváty kyseliny barbiturové, tzv. barbituráty. Ve farmaceutickém průmyslu se používají barbital (diethylbarbiturová kyselina) a fenobarbital (ethylfenylbarbiturová kyselina) jako sedativa a hypnotika (Obr. 3).

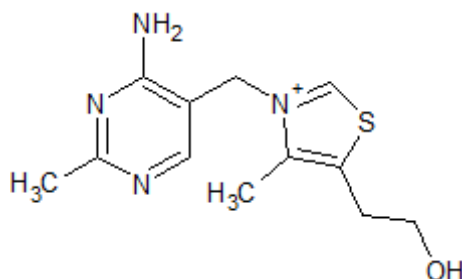


Obr. 2: Strukturní vzorec kyseliny barbiturové, barbitalu a fenobarbitalu

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991

Vitamín B₁ (thiamin) (Obr. 3) je člen vitamínu B komplexu. Je velmi důležitý pro všechny organismy, avšak člověk a zvířata obecně jej neumí syntetizovat a je nutné jej přijímat v potravě. Působí příznivě na nervový systém a proti únavě. Nedostatek thiaminu se může projevit nemocí beri-beri, vyčerpaností, podrážděností, degenerací kardiovaskulárního systému, svalů a dalších. Jeho fosfátovaná forma je přítomna v játrech jako koenzym a působí

při metabolismu uhlovodíků, bílkovin a tuků. Je také důležitý při syntéze acetylcholinu a gama aminomáselné kyseliny (Rao et al., 2010; Kesler et al., 2005).

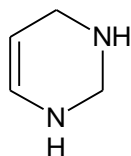


Obr. 3: Struktura vitamínu B1

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991

Tetrahydropyrimidin (Obr. 4) je dalším představitelem derivátů pyrimidinu. Tetrahydropyrimidin, spolu s řadou derivátů, má širokou oblast biologické aktivity, např. protizánětlivé, antihypertenzní, antimikrobiální, protinádorová, antituberkulární a antiproliferativní účinky (Godhani et al., 2014). Jsou to inhibitory melanogeneze. Inhibují také HIV-1 proteázu, která je důležitá pro replikaci viru HIV (Gulnik et al., 2000). Taktéž zachycují radikály a jsou to agonisté muskarinových receptorů. Tetrahydropyrimidiny tedy patří do skupiny multiblokátorů. Biologická a stejně také medicínská důležitost 1,2,3,4-tetrahydropyrimidinů je výzvou pro další modifikace v heterocyklu (Červinka et al., 1991).

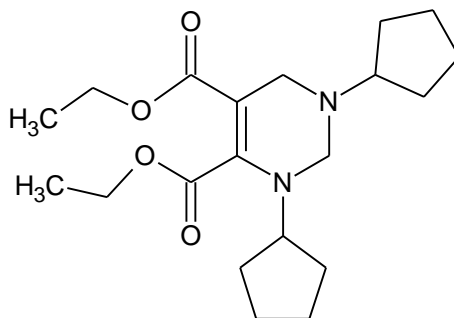
Diethylester 1,3-dicyclopentyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4,5-dikarboxylové kyseliny (Obr. 5) vyvolává snížení obsahu kyseliny octové u myší, která po aplikaci do myší způsobovala stavy svíjení. Po použití výše zmíněného derivátu toto svíjení ustupovalo (Yuning et al., 2013). Tato sloučenina může být vedoucí látkou pro vývoj nových látek na léčbu nemocí, jako je např. revma. Derivát diethyl-1,3-dicyclohexyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4,5-dikarboxylát (Obr. 6) vykazoval protizánětlivé účinky u zvířat, ale při nízké účinnosti (Gondkar et al., 2013).



1,2,3,4-tetrahydropyrimidine

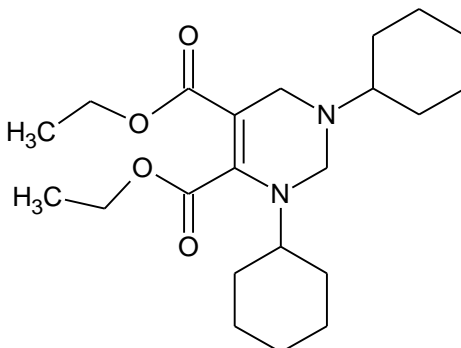
Obr. 4: 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991



Obr. 5: : Diethylester 1,3-dicyclopentyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4,5-dikarboxylové kyseliny

Vytvořeno podle Yuning et al., 2013



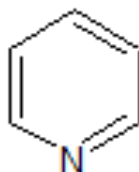
Obr. 6: Diethyl - 1,3- dicyclohexyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin -4,5-dikarboxylát

2.2. Pyridin a jeho deriváty

2.2.1. Obecné vlastnosti

Pyridin (Obr. 7) je heterocyklická organická sloučenina, která obsahuje 5 atomů uhlíku, 5 atomů vodíku a 1 atom dusíku. Strukturně je podobný benzenu. Pyridinový kruh se vyskytuje v mnoha důležitých sloučeninách, např.: azinech nebo vitamínech. Pyridin je bezbarvá kapalina pronikavého zápachu o bodu varu 116 °C, bodu tuhnutí -41,6 °C a hustotě

0,9819 g/cm³. Je hořlavý a rozpustný ve vodě. Je to výborné rozpouštědlo, avšak rozšíření použití brání jeho silný zápach a toxicita. Pyridin je slabá zásada s hodnotou pK_a = 5,22 a se silnými kyselinami tvoří soli. Rozložení elektronů předurčuje pyridin k elektrofilním substitučním reakcím, které budou probíhat na atomu dusíku a do β polohy (Červinka et al., 1991).



Obr. 7: Strukturní vzorec pyridinu

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991

Pyridin způsobuje zdravotní potíže, pokud je vdechnut, spolknut nebo absorbován kůží. Akutní otrava pyridinem se vyznačuje bolestí hlavy, ztrátou koordinace, nevolností, ztrátou chuti k jídlu. Otrava může vést až k bolesti hrudníku a bezvědomí. Pyridin není považován za karcinogenní.

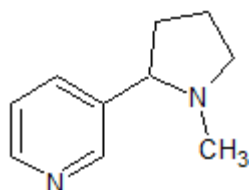
Pyridin byl objeven v roce 1849 skotským chemikem Thomasem Andersonem jako jedna ze složek kostního oleje. Čistý pyridin se v přírodě moc nevyskytuje, pouze v listech a kořenech některých rostlin, například v rulíku zlomocném (*Atropa bella-donna*) či proskurníku lékařském (*Althea officinalis*) (Buhler et al., 1990). Nicméně jeho deriváty jsou často součástí biomolekul, např.: pyridinových nukleotidů nebo alkaloidů (Červinka et al., 1991).

2.2.2. Využití

Pyridin se používá jako rozpouštědlo v organické chemii, které je relativně nereaktivní. Bazická povaha pyridinu z něj dělá ideální molekulu pro vychytávání kyselin. Dále je pyridin vhodný pro acylace, dehydrochlorace a extrakce antibiotik. Pyridin se také používá jako „startující“ materiál v agrochemii a farmaceutickém průmyslu. Je prekurzorem pro herbicidy jako je diaquat a paraquat, insekticidy jako je chlorpyrifos a antifungální látky. Také je prekurzorem při výrobě piperidinu (Červinka et al., 1991).

2.2.3. Deriváty pyridinu

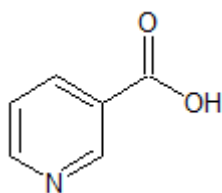
Nikotin (Obr. 8) je rostlinný alkaloid, který se vyskytuje v tabáku. Na organismus působí stimulačními a uvolňujícími účinky, avšak je návykový. Stimuluje myšlení a pozornost. Jeho vliv byl zkoumán u Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, ale nebyl shledán nijak významným. Dříve se nikotin používal jako insekticid (D'Souza et al., 2011).



Obr. 8: Strukturní vzorec nikotinu

Vytvořeno podle McMurry, 2007

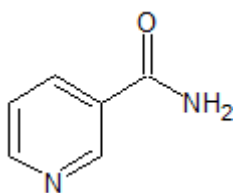
Kyselina nikotinová (Obr. 9), známá také jako niacin, je ve vodě rozpustný vitamín. Je označován jako vitamín B₃. Jeho syntéza v těle je omezená, je tudíž nutný jeho příjem v potravě. Zdrojem niacinu jsou játra, krůtí maso či listová zelenina. Niacin je nutný pro uvolnění energie z potravy. Důležitý je také pro správnou funkci nervové soustavy. (Zempleni et al., 2007). Nedostatek niacinu se projevuje nespavostí, nechutenstvím a dalšími nespecifickými symptomy. Vážný nedostatek vitamínu B₃ způsobí nemoc zvanou pelagra. Ta se projevuje hubnutím, poruchami zažívání a demencí (Prakash et al., 2008).



Obr. 9: Strukturní vzorec kyseliny nikotinové

Vytvořeno podle Zempleni et al., 2007

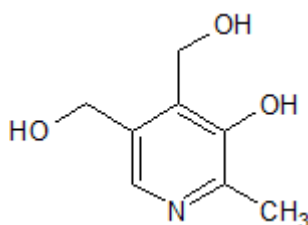
Nikotinamid (Obr. 10) je amid kyseliny nikotinové. Jedná se o ve vodě rozpustný vitamín. Nikotinamid je součástí NADH, důležitého koenzymu, který se účastní metabolismu uhlovodíků, tuků, bílkovin a alkoholu v těle. Je také součástí NADPH, který se účastní anabolických reakcí např. syntézy mastných kyselin a cholesterolu (Wan et al., 2011).



Obr. 10: Strukturní vzorec nikotinamidu

Vytvořeno podle McMurry, 2007

Dalším derivátem pyridinu je pyridoxin, také znám jako vitamin B₆ (Obr. 11). Působí jako koenzym a napomáhá např. ke správné tvorbě červených krvinek, tvorbě bílkovin či tvorbě chemických látek v mozku. Uplatnění také najdeme při prevenci srdečních onemocnění (Prasad, 2010).



Obr. 11: Strukturní vzorec pyridoxinu

Vytvořeno podle Červinka et al., 1991

Velkou zkoumanou skupinou derivátů pyridinu je tetrahydropyridin. Tetrahydropyridin se svými deriváty je zkoumán nejen v oboru lékařství, jako možné léčivo, ale také v potravinovém průmyslu. Látka 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridin způsobuje typickou příchut' a aroma chleba (De Kimpe et al., 1993). Parkinsonova nemoc vyvolává neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridin, který u lidí způsobuje neuropatologické a klinické abnormality (Javitch et al., 1985). 3-Aryl-N-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridinové deriváty byly studovány jako inhibitory acetylcholinesterázy, k potlačení příznaků Alzheimerovy choroby (Prasad et al., 2007).

3. Genová exprese a její regulace

Genová exprese je proces, při kterém jsou informace uložené v genu použity při syntéze funkčního genového produktu, tzv. proteosyntézou a tyto produkty jsou označovány

jako proteiny. Proteosyntéza probíhá ve dvou stupních. Prvním stupněm je transkripce a po ní následuje translace (Šafářová, 2011).

Regulace genové exprese zahrnuje velkou řadu mechanismů, které jsou používány pro zvýšení nebo naopak snížení produkce specifických genových produktů. Prakticky každý krok genové exprese může být modulován, od zahájení transkripce, přes zpracování RNA po post-translační modifikace proteinu (Hoopes, 2008). Konečný krok u mnoha signálních transdukčních cest je modifikace transkripčních faktorů, které regulují expresi specifických genů. Neurotransmitery, růstové faktory a léčiva jsou schopné ovlivnit genovou expresi v buňce. Mechanismy, které kontrolují genovou expresi, jsou stále více prozkoumávány (Martin et al., 1998).

Aby mnohobuněčný organismus fungoval správně, je nutná specializace buněk, tedy z nesespecializovaných buněk se stanou buňky specializované, které navzájem spolupracují. Buňky takového organismu mají téměř vždy totožnou DNA, liší se pouze změnou aktivity jednotlivých genů. Geny, které buňka potřebuje, zůstávají aktivní, za to nepotřebné geny jsou vypnuté (Šafářová, 2011).

3.1. Regulace genové exprese na úrovni transkripce

Regulace aktivity jednotlivých dějů se děje na různých úrovních. Může probíhat na úrovni genomu, transkripce, translace, postranslačních dějů, degradací mRNA a nasyntetizovaných proteinů či modifikací RNA a jejím transportem z jádra (Phillips et al, 2008).

O tom, zda bude daný gen přepsán do mRNA a bude schopen přejít na další úroveň, rozhoduje transkripce. Proto je z úrovní regulace genové exprese nejdůležitější. Jedná se o proces, který probíhá ve všech živých organismech. Regulace transkripce je tedy děj, kterým buňka reguluje přeměnu DNA do RNA a podílí se na něm transkripční faktory. Ty nalezneme ve všech živých organismech. Díky transkripčním faktorům je genová exprese přizpůsobena potřebám buňky. Lidský genom obsahuje přibližně 2600 bílkovin, které obsahují DNA-vazebné domény, a u většiny z nich se předpokládá, že fungují jako transkripční faktory (Babu et al., 2004). Někdy je zapotřebí pro efektivní genovou expresi kooperace několika různých transkripčních faktorů (Phillips et al., 2008).

Transkripční faktory obsahují jednu nebo více oblastí vázající DNA. Ty se vážou na specifické sekvence DNA, na tzv. zesilovače nebo do promotorové oblasti, které sousedí s

geny, jež regulují. Některé transkripční faktory musí být pro funkčnost aktivovány, u jiných je nutné odstranit inhibitor (Gill, 2001). Vazbou na promotor mohou usnadnit vazbu RNA-polymeráze, případně ji také blokovat. Jsou to také katalyzátory při acetylaci či deacetylaci histonů. Acetylované histony oslabují vazbu s DNA, která se tak stává přístupnější pro transkripci. Deacetylované histony posilují vazbu s DNA a stává se tak méně přístupnou pro transkripci.

Transkripční faktory jsou nepostradatelné v buněčném vývoji. V reakci na podněty transkripční faktory aktivují nebo naopak inhibují transkripci, což umožňuje změny v buněčné diferenciaci. Rodina transkripčních faktorů HOX je důležitá pro správné tělesné uspořádání. Obsahují zvláštní sekvenci bází, tzv. homeobox. Z HOX genů je syntetizována homeodoména, což je protein, který se váže na DNA a ovlivňuje její transkripci (Myers, 2008.) Transkripční faktor, kódovaný SRY, určuje pohlaví člověka. Mužské pohlaví je podmíněno přítomností chromozomu Y. Gen SRY navozuje produkci testosteronu. Při nerovnoměrném crossing-overu může dojít k translokaci SRY na chromozom X, za vzniku ženského fenotypu XY nebo mužského fenotypu XX. U takových jedinců se vyskytují zakrnělá varlata či vaječníky a s tím spojené problémy s reprodukcí (Matsuzawa-Watanabe et al., 2003).

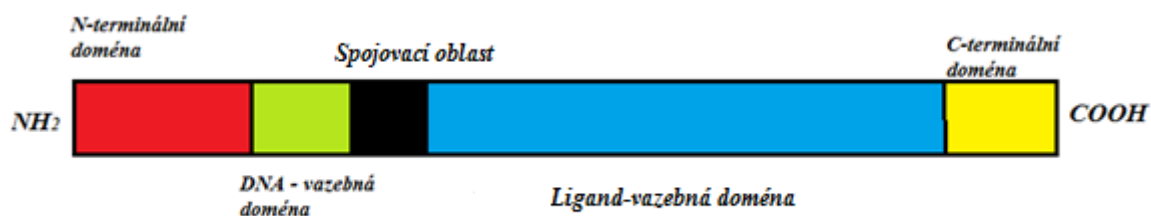
3.2. Jaderné receptory

Jaderné receptory patří do skupiny ligandem aktivovaných transkripčních faktorů, které řídí expresi specifických genů, čímž ovlivňují vývoj, homeostázu a metabolismus organismu. Tyto receptory se podílejí na regulaci cytochromu P450. Přímou vazbou na DNA dochází ke konformačním změnám receptoru, což má za následek ovlivnění genové exprese (Olefsky, 2001). Mezi jaderné receptory patří například tyroidní receptor, retinoidní receptor, vitamin D receptor a xenoreceptory (pregnanový, aryluhlovodíkový, a jiné) (Germain et al., 2006). Ligandy, které se váží na jaderné receptory, a tím je aktivují, jsou lipofilní látky. Mezi ty patří především endogenní hormony, vitamin A, vitamin D a nejrůznější xenobiotika. Některé jaderné receptory, jako FXR (Farnesoid X Receptor), LXR (Liver X Receptor) či PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) vážou řadu metabolických produktů, například mastné kyseliny nebo deriváty s nízkou afinitou. Tyto receptory mohou fungovat jako metabolické senzory. Ostatní jaderné receptory, jako CAR (Constitutive Androstane

receptor) či PXR (Pregnane X Receptor), reagují na cizorodé látky a regulují expresi cytochromu P450 (Mohan et al., 2003).

3.2.1. Struktura jaderných receptorů

Jaderné receptory mají modulární strukturu (Obr. 12). Ta obsahuje N-terminální regulační doménu, DNA-vazebnou doménu, spojovací oblast, ligand-vazebnou doménu a C-terminální doménu. N-terminální regulační doména má aktivační funkci, jejíž činnost je závislá na přítomnosti ligandu. DNA-vazebná doména se váže na specifické sekvence DNA, tzv. elementy odezvy hormonu. Spojovací oblast propojuje Dna-vazebnou doménu s doménou ligand vázající. Navázání ligandu a dimerizace se uskutečňuje prostřednictvím ligand - vazebné domény. Ligand-vazebná doména se skládá z dimerizační oblasti, oblasti pro navázání koregulátoru, šroubovice s aktivační funkcí a místa vázající ligand. C-terminální doména obsahuje velice variabilní sekvenci nukleotidů v závislosti na různých jaderných receptorech (Kumar et al., 1999).



Obr. 12: Struktura jaderného receptoru

Vytvořeno podle Tenbaum et al., 1997

3.2.2. Mechanismus účinku jaderných receptorů

Neaktivní jaderné receptory se nacházejí především v cytoplazmě, společně s proteiny teplotního šoku (HSP), které pomáhají udržet prostorovou strukturu bílkovin. Za přítomnosti ligandu dochází k vazbě ligandu na jaderný receptor, konformačním změnám receptoru a odštěpení HSP. Následně je komplex ligand-receptor translokován do jádra, kde dochází k dimerizaci receptoru. Jaderné receptory se vážou na specifickou sekvenci DNA, v

promotoru cílového genu. Na jaderné receptory se mohou vázat koregulátory či koaktivátory a tím ovlivnit buněčné mechanismy. Ligandy, které svou vazbou na jaderný receptor zesílí genovou expresi, označujeme jako agonisty. Tyto účinky mohou být napodobovány některými syntetickými ligandy, např. aktivace glukokortikoidního receptoru protizánětlivým lékem dexametazonem (LaLone et al., 2012). Jiné syntetické ligandy nemají žádný zjevný účinek na transkripci genu za nepřítomnosti endogenního ligandu. Ovšem blokují účinek agonisty prostřednictvím kompetitivní vazby na stejné vazebné místo v receptoru. Tyto ligandy označujeme jako antagonisty. Jako příklad antagonistického léčiva můžeme uvést mifepriston, který se váže na glukokortikoidní receptor a progesteronový receptor a blokuje tak aktivitu kortizolu a progesteronu (Morgan et al, 2013; LaLone 2012).

3.2.3. Rozdělení jaderných receptorů

Jaderné receptory jsou klasifikovány do čtyř kategorií, podle jejich dimerizace (Mangelsdorf DJ et al, 1995). Receptory typu I tvoří homodimery, jejichž ligandy představují steroidní hormony. Řadíme zde androgenní receptor, estrogení receptor, glukokortikoidní receptor, progesteronový receptor a mineralokortikoidní receptor (Linja et al., 2004). Receptory typu II vytváří heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR). Do této skupiny patří receptor kyseliny retinové (RAR), receptor vitamínu D3 (VDR), receptor hormonu štítné žlázy (TR) a receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR) (Klinge et al, 1997). Receptory typu III vytváří heterodimery s RXR a nazývají se orfánové, jejichž ligandy jsou doposud neznámé. Receptory IV typu se mohou vázat jako monomery (Mangelsdorf DJ et al, 1995).

3.3. Receptor AhR

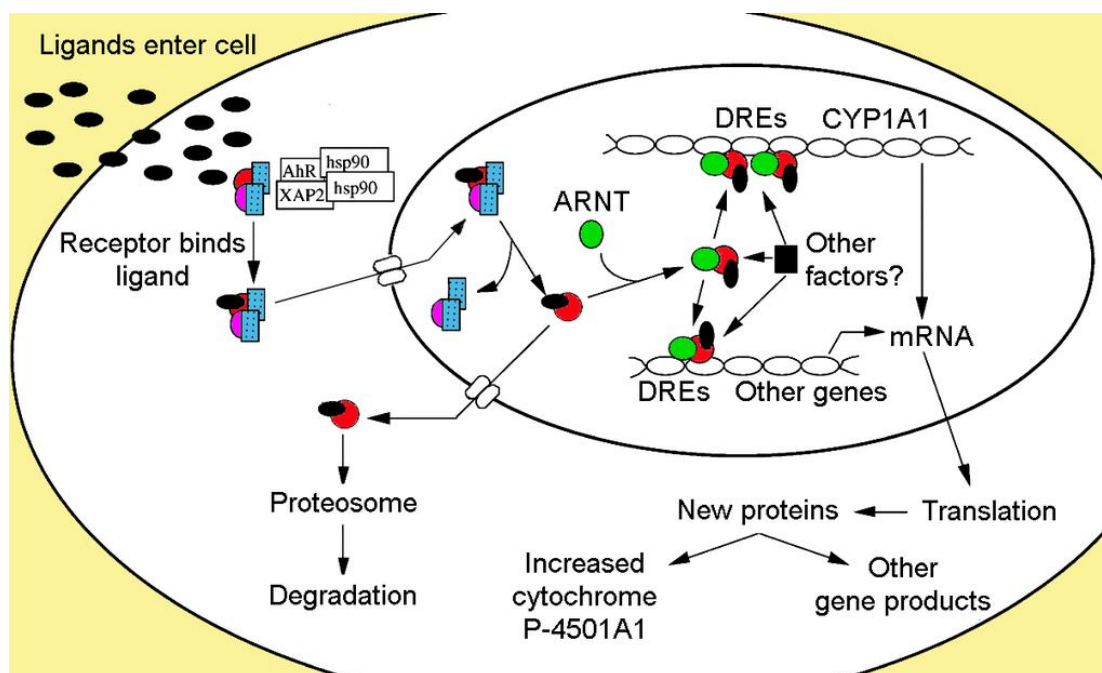
Receptor AhR patří do skupiny ligandem aktivovaných transkripčních faktorů. Gen AhR se vyskytuje na 7. chromozomu. Společně s jeho represorem AhRR a nukleárním translokátorem ARNT řídí expresi CYP P450. Tento receptor patří do rodiny bHLH-PAS (basic-helix-loop-helix) transkripčních faktorů. Je spojován s odpovědí organismu na látky znečišťující životní prostředí, z nichž většina z nich jsou synteticky vyrobená. V současné

době bylo více jak 40 let věnováno úsilí do experimentální činnosti k pochopení funkce AhR, pomocí exogenních látek. Mezi ty můžeme uvést polycyklické uhlovodíky, indoly, karotenoidy či flavonoidy. Mezi ligandy z endogenních sloučenin lze uvést např. deriváty mastných kyselin a aminokyselin (Beischlag, et al., 2008).

Velmi známá látka 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) způsobuje aktivaci AhR. TCDD je velmi toxická látka, která se čím dál častěji vyskytuje v ekosystémech ruku v ruce s používáním herbicidů. Způsobuje vážná onemocnění i při menších koncentracích. Právě jeho toxicita je primárně zprostředkována přes AhR (Beischlag et al., 2008).

Fyziologická úloha receptoru AhR se nachází jak u obratlovců, tak u bezobratlých. U bezobratlých je důležitý pro správný rozvoj segmentů antény a nohou (Duncan et al., 1998). U obratlovců hraje roli v buněčné proliferaci a diferenciaci mnoha vývojových drah, včetně krvetvorby a lymfatického systému (Tijet et al., 2005). Také bylo zjištěno, že má důležitou funkci v hematopoetických kmenových buňkách, kde AhR antagonismus podporuje jejich sebeobnovu a je zapojený do diferenciaci megakaryocytů (Boitano et al., 2010). Endogenní a exogenní ligandy mohou inhibovat apoptózu nebo ji také aktivovat.

Při nepřítomnosti ligandu, se AhR vyskytuje v cytoplazmě jako inaktivní proteinový komplex skládající se z dimeru Hsp90, prostaglandinu E syntázy 3 (P23) a jedné molekuly imunovilinu, jako interagujícího AhR proteinu (AIP). Dimer Hsp90 spolu s P23, má multifunkční úlohu při ochraně receptoru před proteolýzou. AIP interaguje s karboxylovým koncem Hsp90 a váže se na AhR nukleární lokalizační sekvenci, aby nedošlo k odchodu z jádra (Carver et al., 1998). Po navázání ligandu do ligand vazebné domény PAS B dochází ke konformačním změnám, zpřístupnění jaderného lokalizačního signálu a je zahájen jaderný transport, při kterém dochází k disociaci chaperonových proteinů a heterodimerizaci s ARNT. (Lensu et al., 2011) Heterodimer se váže na tzv. xenobiotické responzivní elementy v promotorové oblasti cílových genů. Tyto elementy obsahují sekvenci 5'-TnGCGTG-3' (Bacsi et al., 1995). Heterodimer pak dále vytváří vazbu s transkripčními koaktivátory. V přítomnosti RNA polymerázy II dojde k iniciaci. Nakonec dochází ke kompetitivní inhibici AhR zapříčiněnou vazbou AhRR s ARNT. Jaderný exportní signál receptoru je rozpoznán a receptor je následně translokován zpět do cytoplazmy, kde je degradován (Obr. 13) (Nagy et al., 2003).



Obr. 13: Signální dráha AhR

Převzato z Nagy et al; 2003

Toxická reakce vyvolaná aktivací AhR je výsledkem dvou různých signalizací AhR. První z nich je produkce toxických metabolitů indukovaných metabolizujícími enzymy. Příkladem je polycyklický aromatický uhlovodík benzo-a-pyren (BaP), ligand pro AhR, který indikuje svůj vlastní metabolismus a bioaktivaci do toxického metabolitu prostřednictvím indukce CYP1A1 a CYP1B1 v několika tkáních (Harrigan et al., 2004). Druhý přístup k toxicitě je výsledkem aberantních změn v transkripci genu, které vedou k nežádoucím změnám v buněčných procesech, změnám v metabolismu lipidů a funkci štítné žlázy, endokrinním poruchám a další (Lindén et al., 2010).

3.4. Glukokortikoidní receptor (GR)

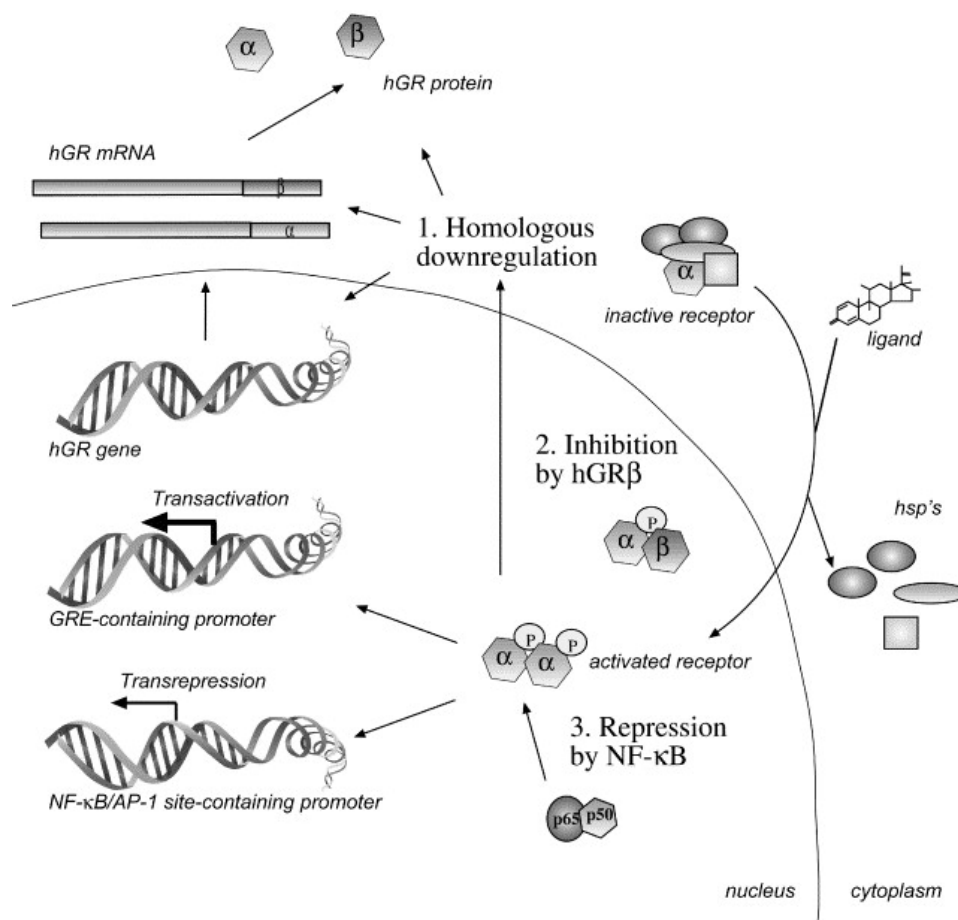
Glukokortikoidní receptor (GR), také známý jako NR3C1, je ligandem aktivovaný transkripční faktor, stejně jako AhR. Oproti AhR se však GR nachází na 5. chromozomu a patří do skupiny nukleárních hormonálních receptorů. GR se nachází téměř ve všech buňkách v těle a reguluje geny řídící vývoj, metabolismus a imunitní reakce. Tento gen je exprimován v několika formách, což má za následek různé účinky v různých částech těla. Mezi dvě

nejčastější izoformy patří GR α a GR β . GR β působí antagonisticky vůči GR snížením vazby koaktivátorů na komplex GR α /GR α (Schaaf et al., 2002).

Jeho nejdůležitějším ligandem je hormon kortizol, který je produkován kůrou nadledvin. GR je aktivován především endogenními ligandy, ale také exogenními, a to synteticky připravenými glukokortikoidy. Dexametazon či betametazon jsou uměle synteticky připravené glukokortikoidy, které aktivují GR. Tyto látky jsou předepisovány jako léčiva (Novotna et al., 2012). Mezi enzymy, které jsou regulovány pomocí GR patří syntázy oxidu dusnatého (iNOS), cyklooxygenázy (COX-2), cytokininy, chemokininy, kininy a další (Newton, 2000).

Nenavázaný GR se nachází v cytoplazmě buňky v komplexu s různými proteiny, včetně proteinu tepelného šoku 70 (Hsp 70), proteinu tepelného šoku 90 (Hsp 90) a proteinu FKBP52. Endogenní ligand, hormon kortizol, difunduje přes buněčnou membránu do cytoplazmy a váže se na GR, což vede k uvolnění proteinů tepelného šoku. Výsledný aktivovaný GR má dva hlavní mechanismy účinku, a to transaktivaci a transrepresi (Obr. 14) (Hayashi et al., 2004).

- Transaktivace - zvýšení účinku genové exprese. Přímý mechanismus účinku zahrnuje homodimerizaci receptoru, translokaci přes aktivní transport do jádra a vázání se na specifické DNA responzivní prvky aktivující genovou transkripci.
- Transreprese - potlačení činnosti proteinu jiným proteinem. V nepřítomnosti aktivovaného GR, jiné transkripční faktory, např. NF- κ B a AP-1, jsou samy o sobě schopny transaktivovat cílové geny. Aktivovaný GR může vytvořit komplex s těmito transkripčními faktory a zabránit tak vazbě svých cílových genů a tím potlačit expresi genu, která je normálně pomocí NF- κ B a AP-1 stimulována.



Obr. 14: Signální dráha GR

Převzato z Schaaf et al., 2002

4. Biotransformace

Biotransformace je proces, při kterém dochází k přeměně jedné látky v jinou chemickou reakcí v těle. Těmito procesy se snaží organismus exogenní látky postupně detoxikovat a eliminovat z těla. Přeměna látek je důležitá, pro správné fungování tělesných funkcí. Může probíhat jak u látek endogenních, tak především exogenních, tzv. xenobiotik, mezi které řadíme všechny látky tělu cizí, např. přísady do potravin, polutanty v ovzduší, léky a mnoho dalších.

Aby nedocházelo k akumulaci xenobiotik a látky se nestávaly toxické pro organismus, je nutné je z těla vyloučit. Biotransformací rozumíme sled po sobě následujících reakcí, jejichž následkem dojde ke změně struktury a polaritě látky. Látky polární jsou poté snadno

vyloučeny ledvinami. Látky lipofilní (hydrofóbní) jsou pro tělo těžce odstranitelné. Cirkulaci mezi ledvinami a játry se přemění v hydrofilní metabolity, které tak mohou být močí odstraněny (Hoensch et al., 1979).

4.1. Fáze biotransformace

Biotransformace se skládá ze tří fází. Během první fáze vzniká hydrofilnější sloučenina. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci s endogenní sloučeninou a vzniku ještě více hydrofilnějšího metabolitu. V třetí fázi jsou metabolity transportovány z buňky ven.

V první fázi biotransformace (I. fáze) dochází k přeměně méně polární látky v látku polárnější, která se uskutečňuje v endoplazmatickém retikulu buňky (Skálová et al., 2011). Chemické reakce, které zde probíhají, jsou založeny na principu především oxidace (N-oxidace, aromatická a alifatická hydroxylace, oxidativní dehalogenace a další), dále redukce (redukční dehalogenace, nitroredukce a další) a hydratace. Vzniklá polární látka může vstoupit do II. fáze biotransformace. Hlavním enzymem, podílejícím se v této fázi, je cytochrom P450 (CYP), dále flavinové monooxygenasy, monoaminoxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy a další (Knejzlík et al., 2000).

Ve druhé fázi biotransformace (II. fáze) vzniká polárnější konjugát xenobiotika a endogenní sloučeniny. Sloučenina vstupující do konjugační reakce musí mít ve své struktuře vhodnou skupinu ke konjugaci, jako je např. hydroxyl (-OH), amino (-NH₂), a karboxyl (-COOH). Mezi chemické reakce, které v této fázi probíhají, patří glukoronidace, acetylace, konjugace s glutathionem, sulfátová konjugace, methylace, konjugace s aminokyselinami a hydratace. Vzniklé metabolity jsou obvykle hydrofilní a mohou být odstraněny z těla (Knejzlík et al., 2000).

Třetí fáze biotransformace (III. fáze) zahrnuje transmembránové proteiny, které přepravují xenobiotika ven z buňky. Mezi nejznámější transmembránové proteiny patří P-glykoproteiny. Tyto proteiny jsou zodpovědné za tzv. multilékovou rezistenci systému. P-glykoproteiny využívají energii z hydrolýzy adenosin-5'-trifosfátu (ATP). Na exkreci konjugátů se také podílejí peptidy organických aniontů (OATP). Cílem této fáze a všech přenašečů je snížení koncentrace toxických látek v těle (Vrzal et al., 2004).

4.2. Cytochromy P450

Nejprostudovanější biotransformační procesy jsou ty, které jsou katalyzovány cytochromy P450 (CYP). Cytochromy P450 jsou enzymy, které ve své struktuře obsahují porfyrin a centrální atom železa, které přechází mezi stavy Fe^{2+} a Fe^{3+} . Cytochromy P450 se vyskytují v různých izoformách. Ty jsou řazeny dle míry homologie jejich primární struktury proteinových molekul do genetických rodin a podrodin.

4.2.1. Názvosloví

Název P450 nám říká, že se jedná o pigment, který po redukci hemového železa oxidem uhlenatým dosahuje absorpčního maxima při vlnových délkách okolo 450 nm. Zkratkou CYP (**CY**tochrome **P**450) se v zápise označuje superrodina. Následná arabská číslice, př. (CYP**1**A2), označuje rodinu. Podrodina se značí velkým tiskacím písmenem následujícím po arabské číslici, př. (CYP**1**A**2**). Arabská číslice na posledním místě, př. (CYP**1**A**2**), identifikuje konkrétní gen. Do rodin řadíme cytochromy P450 se sekvenční homologií vyšší než 40 % a do podrodin s homologií vyšší než 55 %.

4.2.2. Výskyt a význam v lidském organismu

U člověka bylo doposud identifikováno 18 rodin cytochromů P450 (Zanger et al., 2013). Metabolismu xenobiotik se účastní především rodiny 1,2 a 3. U této skupiny je také významný genetický polymorfismus. Zbývající rodiny se účastní hlavně metabolismu endogenních látek, např. sterolů, žlučových a mastných kyselin (Lamb et al, 2009). CYP se nacházejí ve vnitřní mitochondriální membráně nebo v endoplazmatickém retikulu buněk (Berka et al., 2011). CYP metabolizují tisíce endogenních a exogenních chemikálií. Cytochromy P450 jsou přítomny ve většině tkání těla, především v játrech, a hrají důležitou roli při syntéze hormonů, syntéze cholesterolu a metabolismu vitamínu D. Také metabolizují toxické sloučeniny, včetně léků. Z jaterních cytochromů P450 jsou nejvýznamnější izoenzymy CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C (2C8, 2C9, 2C18, 2C19), CYP2E1 a CYP3A4. Z cytochromů P450, které se vyskytují se v jiných tkáních, jsou pro přeměnu cizorodých látek důležité izoenzymy CYP1A1, CYP2B6, CYP2E1a CYP3A4 (Stiborová et al., 1999).

CYP jsou hlavními enzymy podílející se na metabolismu léků. Mnoho léků může zvýšit nebo naopak snížit aktivitu různých izoenzymů CYP. To je hlavním zdrojem nežádoucích lékových interakcí, neboť změny CYP enzymové aktivity mohou ovlivnit metabolismus a vylučování léčiv. Například, jestliže jedno léčivo inhibuje CYP, který se podílí na metabolismu druhého léku, může se toto léčivo hromadit v těle v toxických koncentracích. Je proto nutné volit léky, které nereagují s CYP systémem. Bylo zjištěno, že přirozeně biologicky aktivní látky vyskytující se v grapefruitové šťávě, inhibují CYP3A4, zprostředkovaný v metabolismu některých léků, což vede k možnosti předávkování (Bailey et al., 2004).

Vyskytuje-li se v populaci geneticky podmíněná odlišnost s frekvencí výskytu alespoň 2%, jedná se o tzv. genetický polymorfismus. Jde o vrozené změny DNA, které vedou k absenci, nemožnosti indukce či tvorbě forem cytochromů P450 s odlišnou katalytickou aktivitou. Na základě metabolické aktivity zjištěné pro jednotlivé formy cytochromů P450 jsou pozorovaní jedinci rozdělováni do tří kategorií, a to pomalí, rychlí a ultrarychlí metabolizátoři. Většinu populace tvoří homozygoti pro normální gen s dobrou metabolickou funkcí, tzv. rychlí metabolizátoři. U pomalých metabolizátorů je patrná nízká nebo žádná enzymová aktivita. U ultrarychlých metabolizátorů dochází k urychlení metabolismu, který je způsobený duplikací nebo amfiplikací funkčního genomu (Shu-Feng et al., 2009).

6. Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Stanovení viability vybraných buněčných linií pomocí MTT.
3. Stanovení míry aktivace jaderných receptorů v buněčných liniích.
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce.

7. Materiál a metodika

7.1. Materiál

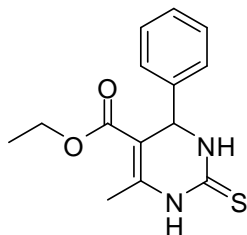
7.1.1. Chemikálie

Tab. 1: Seznam použitých chemikálií

Reagencie	Firma	Katalogové číslo
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	Ultra Scientific	48599
Substrát pro luciferázu	Připraveno na katedře buněčné biologie a genetiky, UP	
Dexamethazon (DEX)	Sigma-Aldrich	D4902
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM)	Sigma-Aldrich	D6546
Fetální bovinní sérum (FBS)	PAA	A15-144
Hygromycin B (HygB)	Sigma-Aldrich	H7772
L-glutamin	Sigma-Aldrich	8540
Lyzační pufr	Promega	E3971
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich	D4551
Methyltetrazoliová sůl (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Neesenciální aminokyseliny	Sigma-Aldrich	M7145
Oktylfenol etoxylát (Triton X-100)	Sigma-Aldrich	X100
Penicilin-streptomycin (ATB)	Sigma-Aldrich	P4333
Fosfátový pufr (PBS)	Gibco	10010015
Trypanová modř	Sigma-Aldrich	T6146
Trypsin-EDTA 0,25%	Sigma-Aldrich	T4049
Testované látky - IRCBM 1827,1343,1303	Interdisciplinary Research Centre in Biomedical Materials, Pákistán	

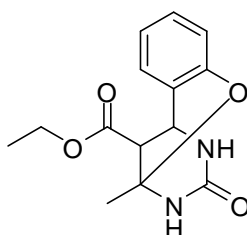
- Testované látky **IRCBM 1827**, **IRCBM 1346** a **IRCBM 1303**

IRCBM 1827 (Ethyl 6-methyl-2-thioxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate)



Obr. 15: Strukturální vzorec IRCBM 1827

IRCBM 1346 (2,6-methano-4-oxo-3,4,5,6-tetrahydro-2H-[1,3,5] benzoxadiazocines)



Obr. 16: Strukturální vzorec IRCBM 1346

IRCBM 1303 (Ethyl 1-(4-chlorophenyl)-4-(4-phenylamino)-2,6-diphenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxylate)

Obr. 17: Strukturální vzorec IRCBM 1303

7.1.2. Laboratorní přístroje

Tab. 2: Seznam použitých laboratorních přístrojů

Název a typ přístroje	Firma
Inkubátor Mitre 4000 Series	Contherm Scientific
Laminární flowbox Safe Fast Top	Faster
Luminometr/Spektrofotometr Infinite M200	Tecan
Mikroskop HT-NIB-100	All Pro Corporation
Skříňový mrazicí box MDF-U53V	Sanyo
Vodní lázeň LCB 22D	Labtech

7.1.3. Roztoky

Kultivační médium:

- 500 ml DNEM
- 2 mM L- glutamin
- 10% FBS
- 1% neesenciální aminokyseliny
- 1% Penicilin-streptomycin

Substrát pro luciferázu:

- 5 mg D-Luciferin
- 9,6 Adenozin-5'-trifosfát
- 6,83 mg Koenzym A
- 168 mg Dithiothreitol
- 1,32 ml Pufr-trisacetát 1M (pH 7,8)
- 1,23 mg Kyselina ethylendiamintetraoctová
- 30,3 mg Heptahydrát síranu hořečnatého

Vše doplnit na 30 ml destilovanou vodou.

Lyzační pufr

- 5 ml zásobního roztoku lyzačního pufru
- 20 ml destilované vody

7.1.4. Biologický materiál

7.1.4.1. Buněčná linie AZ-GR

Pro sledování aktivity GR byla použita stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-GR. Linie AZ-GR je odvozena od lidských rakovinových buněk děložního čípku - HeLa buněk, které byly transfekovány plazmidem pGL-4.27-GRE, obsahující tři kopie GRE, reportérový gen pro luciferázu a gen rezistence proti hygromycinu B (HygB) (Novotna et al., 2012).

7.1.4.2. Buněčná linie AZ-AHR

Pro sledování aktivity AhR, byla použita buněčná linie AZ-AHR, vzniklá stabilní transfekcí plazmidem pGL -4.27m obsahující 4 repetitivní sekvence dioxin rezponzivního elementu -(DRE). Linie je odvozena od HepG2 buněk lidského hepatocelulárního karcinomu (Novotna et al., 2011).

7.2. Metody

7.2.1. Pasážování buněk

Pasážováním buněk dojde k obnově přerostlé vrstvy buněk. Také předcházíme deficitu živin a nedostatku místa pro buňky. Při práci s buňkami ve flow boxu bylo nutné dodržovat sterilní podmínky. Nejen roztoky, ale i pomůcky byly sterilní. Při pasážování bylo vždy opatrně odsáto kultivační médium z kultivační nádoby. Po odsátí kultivačního média následovala aplikace 5 ml PBS (37 °C) na dno nádoby s buňkami, které bylo po několika sekundách odsáto. Poté bylo na buňky aplikováno 1 ml trypsinu (37 °C) a takto ponecháno na 2 až 3 minuty v inkubátoru. Po vyjmutí nádoby z kultivátoru a přidání 9 ml média byly buňky resuspendovány pomocí pipety. Po resuspendaci byl obsah kultivační lahve převeden do

kónické zkumavky. 2 ml buněk společně s 14 ml média byly vráceny zpět do kultivační láhve, kde byly ponechány pro další experiment v inkubátoru. Na víkend bylo k buňkám přidáno antibiotikum HygB o koncentraci 0,3 mg/ml.

7.2.2. Počítání buněk

K 10 μ l buněčné suspenze bylo přidáno 90 μ l trypanové modři do eppendorfky a obsah byl promíchán. Pro spočítání celkového počtu buněk bylo 10 μ l přepipetováno do tzv. Bürkerovy komůrky. Výpočet vycházel z průměrného počtu buněk z 10 čtverců a vynásobených 10^5 .

7.2.3. MTT test

V mrtvých buňkách jsou mitochondriální dehydrogenázy inaktivní. U živých buněk jsou tyto dehydrogenázy schopny redukovat žlutou methyltetrazoliovou sůl (MTT) na tmavě fialový formazan vhodný k fotometrickému stanovení (Stockert et al., 2012).

7.2.3.1. Postup MTT testu

Bylo připraveno 26 ml média s buňkami, kdy obsah buněk odpovídal počtu 3,25 mil. na 26 ml. Do kultivačních desek bylo multipipetou vyseto 200 μ l buněk s médiem, což odpovídalo počtu cca 25 000 buněk na 1 jamku. Takto připravená deska byla ponechána do druhého dne v inkubátoru. Poté bylo médium z jamek opatrně odsáto a byly aplikovány testované látky IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Látka IRCBM 1303 byla testována do koncentrace 50 μ mol/l. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% triton X-100 a jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMF v médiu. Takto připravená deska byla opět vložena do inkubátoru, kde byla ponechána do druhého dne pro samotné měření. Měření již neprobíhalo ve flow boxu. Z desky, obsahující buňky s testovanými látkami, bylo vylito médium. Kapky média na desce byly osušeny o papírovou utěrku. Nejdříve byly jamky 1x promyty 100 μ l roztoku PBS. Poté bylo do jamek aplikováno 100 μ l média s MTT o koncentraci 0,3 mg/ml. Deska byla inkubována v inkubátoru v závislosti na intenzitě fialového zbarvení, přibližně 20-

30 min. Tento roztok byl poté z jamek vyklepán a bylo přidáno 100 μ l roztoku DMSO. Následovalo spektrofotometrické stanovení viability buněk při vlnové délce 570 nm.

7.2.4. Gene Reporter Assay

Regulace genové exprese je zajišťována prostřednictvím vazby transkripčních faktorů nebo receptorů do promotorové oblasti genu. Toto ovlivnění lze sledovat pomocí různých technik. Jednou z nich je technika gene reporter assay. Pomocí této techniky jsme schopni studovat regulační sekvence promotorů, enhancerů a transkripčních faktorů. Vlastní reportérový plazmid obsahuje ve své struktuře specifickou vazebnou promotorovou sekvenci pro studovaný receptor, která je zaklonovaná těsně před reportérovým genem. Pokud je reportérový systém správně designován, pak hladina exprese reportérového genu koreluje s transkripční aktivitou sledovaného receptoru či transkripčního faktoru. Se zaklonováním responzivního elementu před reportérovým genem, souvisí míra exprese responzivního elementu s aktivitou sledovaného receptoru (Kameníčková, 2012). Za přítomnosti substrátu luciferinu a kosubstrátu O_2 a ATP dochází k monooxygenaci luciferinu. Pro zjištění, zda jsou látky schopny ovlivnit aktivitu receptorů, byly použity 2 módy - agonistický a antagonistický. Pomocí agonistického módu bylo zjištěno, zda látky aktivují receptor či nikoliv. Pomocí antagonistického módu bylo možné určit inhibici receptorů.

7.2.4.1. Postup Gene Reporter Assay

U agonistického módu byly buňky vysety do 96 jamkových kultivačních desek. Do každé jamky bylo nanášeno 25 000 buněk s 190 μ l média. Desky byly do druhého dne ponechány v inkubátoru. Druhý den následoval treatment. Médium z jamek bylo odsáto a k buňkám bylo přidáno 195 μ l testovaných látek IRCBM 1827, IRCB 1346 a IRCBM 1303 v různých koncentracích. Pro linii AZ-GR byly testovány látky IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Látka IRCBM 1303 byla testována do koncentrace 50 μ mol/l. Pro linii AZ-AHR byly použity látky IRCBM 1827 o koncentraci 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Dále látka IRCBM 1346 o koncentraci 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l. A látka IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l;

50 $\mu\text{mol/l}$. Jako pozitivní kontrola byl pro linii AZ-AHR použit dioxin (TCDD) o koncentraci 5 nmol/l a pro linii AZ-GR dexamthazon (DEX) o koncentraci 100 nmol/l . Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMF. Takto připravené desky byly vloženy do dalšího dne do inkubátoru.

U antagonistického módu bylo postupováno stejně jako u agonistického, ale v přítomnosti modelového aktivátoru. Bylo sledováno snížení indukce vyvolané modelovým aktivátorem 5 mol/l TCDD pro AhR a 100 nmol/l DEX pro GR. Pro linie AZ-AHR byl jako negativní kontrola zvolen 0,1% DMF, pozitivní kontrola sestávala z 5 nmol/l TCDD. U linie AZ-GR byl pro pozitivní kontrolu použit DEX o koncentraci 100 nmol/l a pro negativní kontrolu 0,1 % DMF. Zbývající jamky obsahovaly testované látky o různé koncentraci společně s DEX nebo TCDD dle sledované linie. Takto připravené desky byly vloženy do dalšího dne do inkubátoru.

Třetí den bylo médium vyklepnuto do výlevky a každá jamka byla promyta 1 x 50 μl PBS a obsah opět vyklepnut do výlevky. Dále bylo do jamek nanášeno 30 μl lyzačního pufru a dno s víkem kultivační desky bylo slepeno páskou. Takto připravená deska byla na 20 minut umístěna do hlubokomrazicího boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 20 minutách byly za pokojové teploty desky s buňkami rozmrazeny. Obsah jamek byl pomocí pipety zhomogenizován. Substrát pro luciferázu byl rozmražen ve vodní lázni při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z lyzátu bylo přeneseno 3 μl u linie AZ-AHR a 20 μl u AZ-GR do černé 96 jamkové destičky, která sloužila pro měření luminiscence. K lyzátu AZ-AHR bylo přidáno 30 μl substrátu a k lyzátu AZ-GR bylo přidáno 100 μl substrátu. Na závěr bylo provedeno měření luminiscence při vlnové délce 560 nm.

7.2.5. Kontrola aktivity luciferázy

Pomocí tohoto testu lze potvrdit potencionální antagonismus látek IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303. Pro ověření katalytické aktivity luciferázy stačí test provádět na jedné buněčné linii, jelikož se v obou vyskytuje stejný reportérový gen.

7.2.5.1. Postup

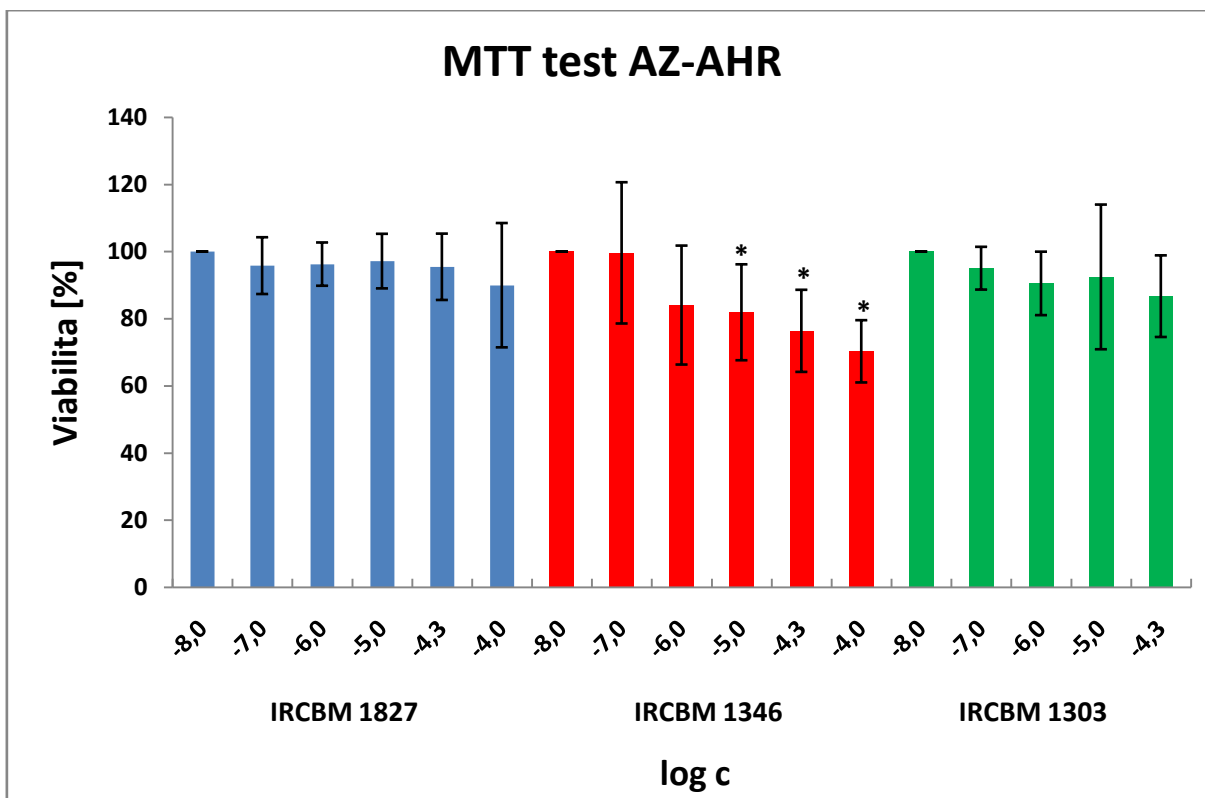
Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 25 000 buněk s 195 μl media. Takto připravená destička byla umístěna do inkubátoru do dalšího dne. Druhý den byl proveden

treatment s modelovým aktivátorem TCDD o koncentraci 5 nmol/l. Třetí den bylo medium z jamek odstraněno a do jamek bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufu. Deska byla slepena páskou a vložena do hlubokomrazicího boxu na 20 min o teplotě -80 °C. Lyzační směs byla poté homogenizována a sesbírána do jedné falkonky. Směs byla 10x naředěna lyzačním pufrem. Do zkumavek bylo přeneseno 4x 1 ml lyzátu a ke každé přidáno 1 μ l IRCBM 1827 a IRCBM 1346 o koncentraci 100 μ mol/l a IRCBM 1303 1 μ l o koncentraci 50 μ mol/l. Do 96 jamkové destičky určené pro měření luminiscence bylo přeneseno 3 μ l lyzátu a 30 μ l sunstrátu a byla změřena aktivita luciferázy. Jako kontrola sloužil buněčný lyzát s TCDD.

8. Výsledky

8.1. Vliv testovaných látek na viabilitu buněčných linií AZ-AHR a AZ-GR

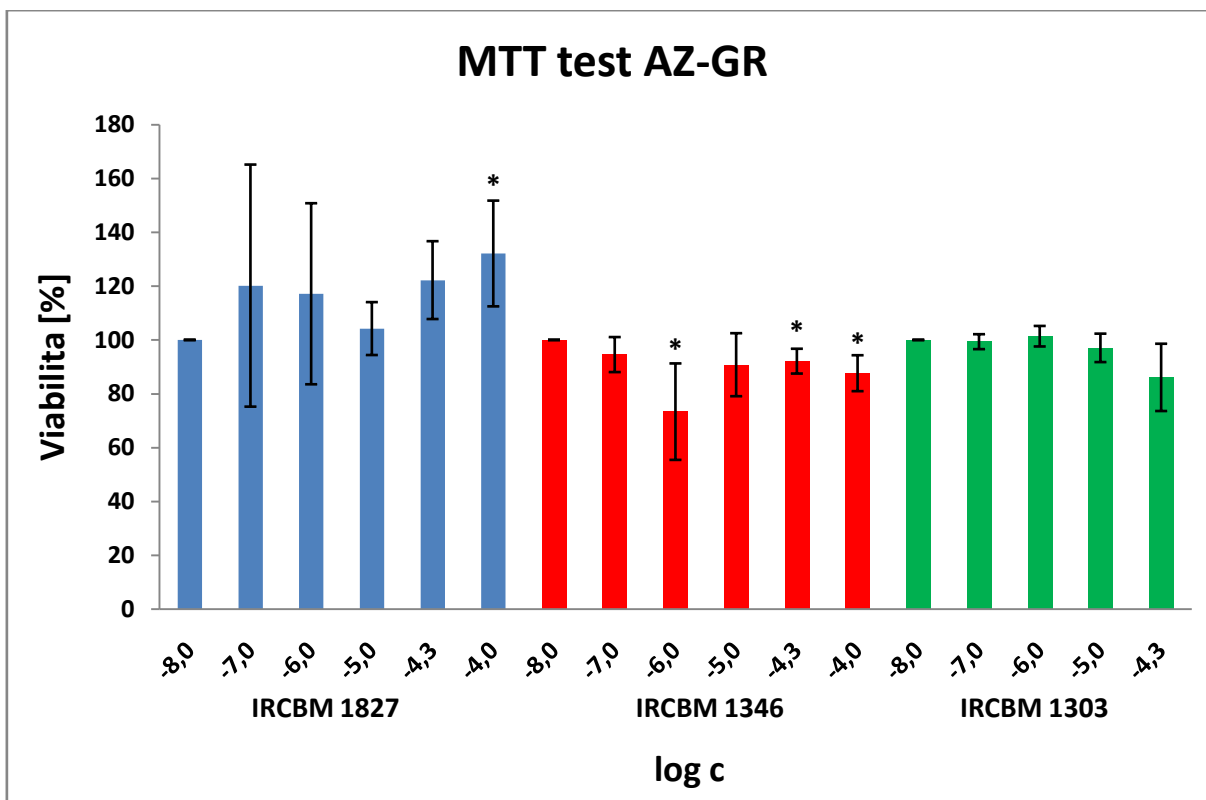
Pomocí MTT testu bylo pozorováno cytotoxické působení testovaných látek na buněčnou linii AZ-AHR a AZ-GR. Měření MTT bylo prováděno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Na buněčné linie byly aplikovány látky IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Látka IRCBM-1303 byla sledována do koncentrace 50 μ mol/l. Pro pozitivní kontrolu byl použit detergent 2% Triton X-100, jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMF. Viabilita byla vztažena k látce s nejnižší koncentrací, která byla považována za 100%. MTT test byl v případě linie AZ-GR proveden třikrát. U linie AZ-AHR byl při sledování látky IRCBM 1827 a IRCBM 1346 opakován pětkrát a u látky IRCBM 1303 opakován šestkrát z důvodu vyšších odchylek.



Graf 1: Viabilita buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek

Buňky AZ-AHR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 µl media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látek IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l a 100 µmol/l. Látka IRCBM byla testována do koncentrace 50 µmol/l. Po 24 hod inkubaci byl nasazen MTT test a následně byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Úroveň viability buněčné linie byla vztažena k nejnižší koncentraci, která představuje 100% viabilitu. Zobrazená data představují průměr z 5 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

U linie AZ-AHR nevykazovaly látky IRCBM 1827 a 1303 výrazný cytotoxický účinek. Látka IRCBM 1346 způsobila snížení viability buněk AZ-AHR při koncentraci 50 µmol/l o 24% a při koncentraci 100 µmol/l o 30%. Z těchto důvodů nebyly tyto dvě koncentrace dále použity při sledování vlivu na aktivitu AHR.



Graf 2: Viabilita buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných látek

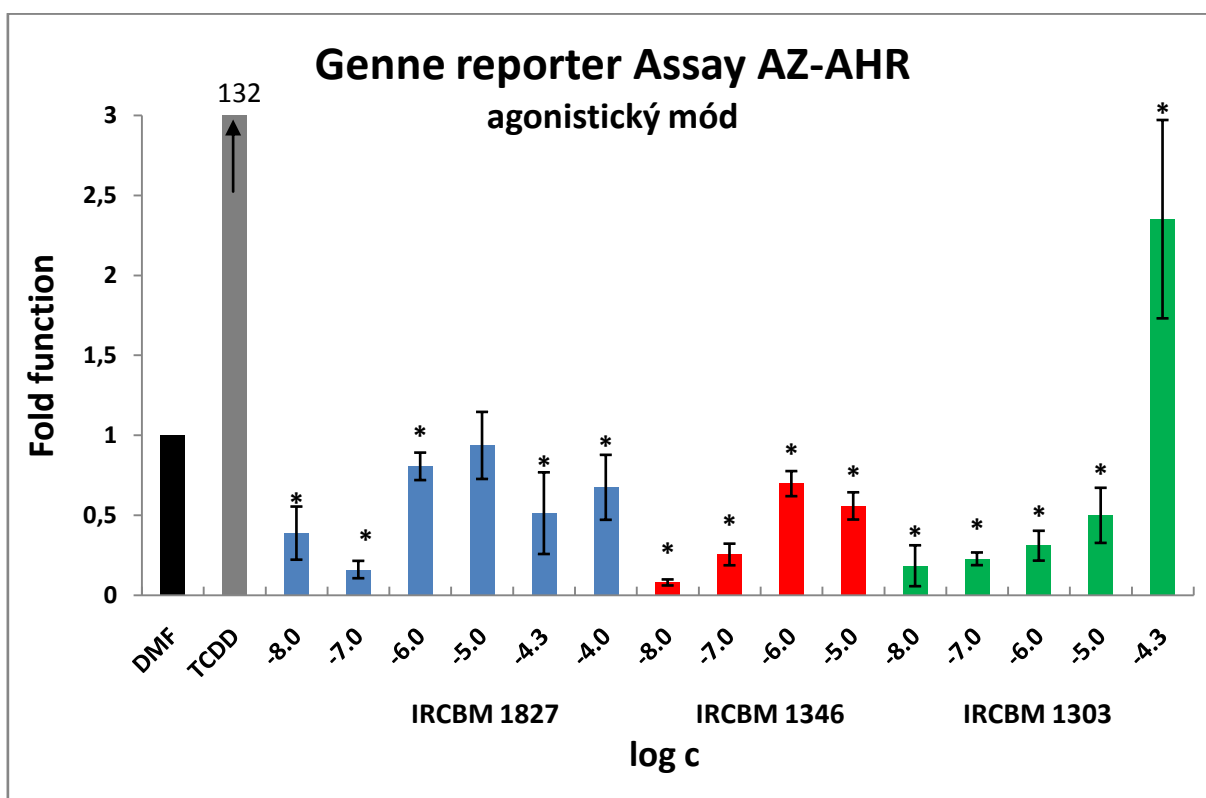
Buňky AZ-GR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 µl media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látek IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l a 100 µmol/l. Látka IRCBM byla testována do koncentrace 50 µmol/l. Po 24 hod inkubaci byl nasazen MTT test a následně byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Úroveň viability buněčné linie byla vztažena k nejnižší koncentraci, která představuje 100% viabilitu. Zobrazená data představují průměr z 3 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

Látky IRCBM 1827 a 1303 nezpůsobily výrazný pokles viability buněk AZ-GR. Látka IRCBM 1346 o koncentraci 1 µmol/l snížila životaschopnost buněk AZ-GR o 27%, ale ve vyšších koncentracích (10 µmol/l, 50 µmol/l a 100 µmol/l) nedošlo k dalšímu snížení viability a životaschopnost buněk se pohybovala okolo 90%. Pro další testování aktivity GR byly použity všechny koncentrace testovaných látek.

8.2. Vliv testovaných látek na aktivitu receptorů AhR a GR

Za pomoci Genne reporter assay byla zjištěna transkripční aktivita receptorů AhR a GR v přítomnosti testovaných látek. U agonistického módu byla vyjádřena pomocí fold induction (FI), která byla vypočítána jako podíl luciferázové aktivity pro testované látky a negativní kontroly. Výsledky antagonistického módu byly vyjádřeny v procentech, kdy 100 % představovala hodnota luciferázové aktivity nejnižší koncentrace v přítomnosti modelového aktivátoru.

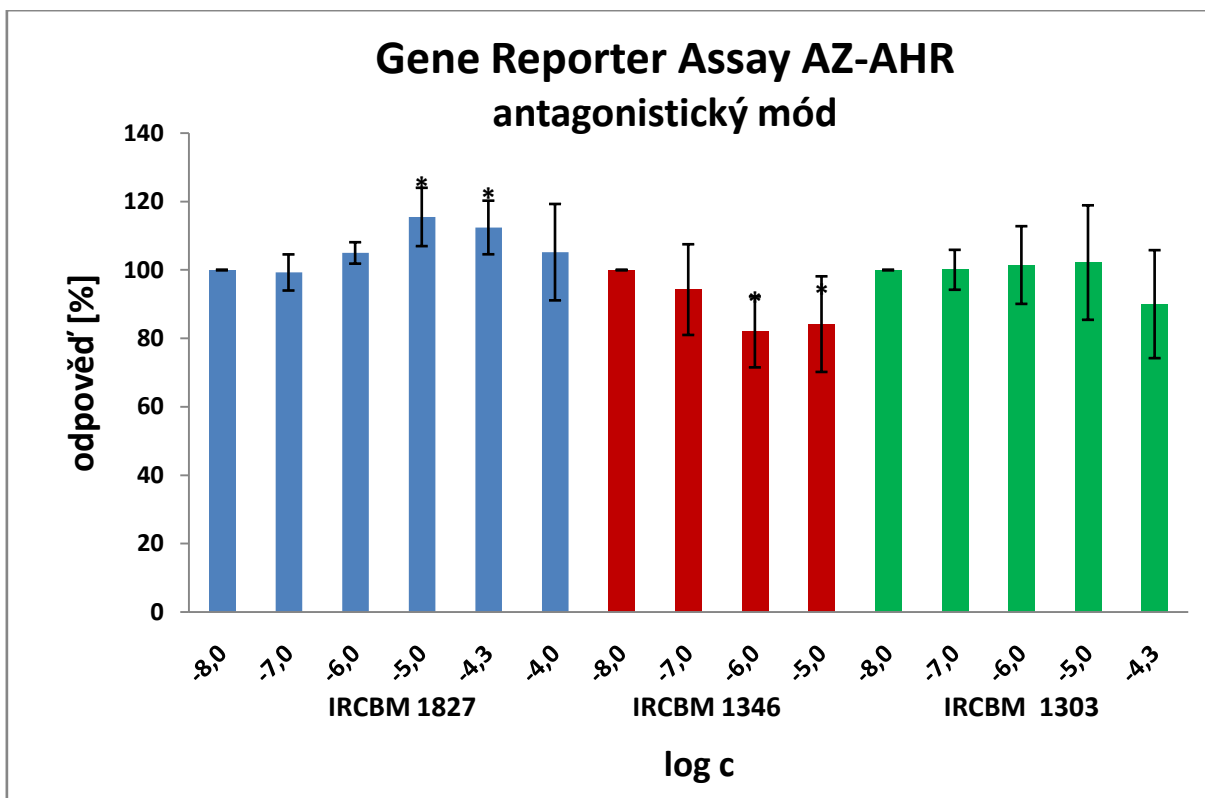
8.2.1. Vliv testovaných látek na aktivitu AhR



Graf 3: Agonistický mód u buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek

Buňky AZ-AHR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 µl media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látky IRCBM 1827 v koncentracích 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l a 100 µmol/l. Dále byla aplikována látka IRCBM 1346 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 µmol/l a 10 µmol/l. Látka IRCBM 1303 byla použita v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l a 50 µmol/l. Po 24 hod inkubaci byla spektrofotometricky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm. Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole 0,1 % DMF. Zobrazená data představují průměr z 3 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

Nízká aktivace AhR byla patrná u sloučeniny IRCBM 1303 o koncentraci 50 µmol/l a dosahovala 2,5 násobné indukce DMF. V porovnání se 132 násobnou aktivací modelovým ligandem TCDD se ale jednalo o zanedbatelnou indukci. Hodnoty FI u většiny látek byly s menšími odchylkami blízko hodnotě negativní kontroly DMF a tyto látky tedy nemají vliv na transkripční aktivitu AhR.

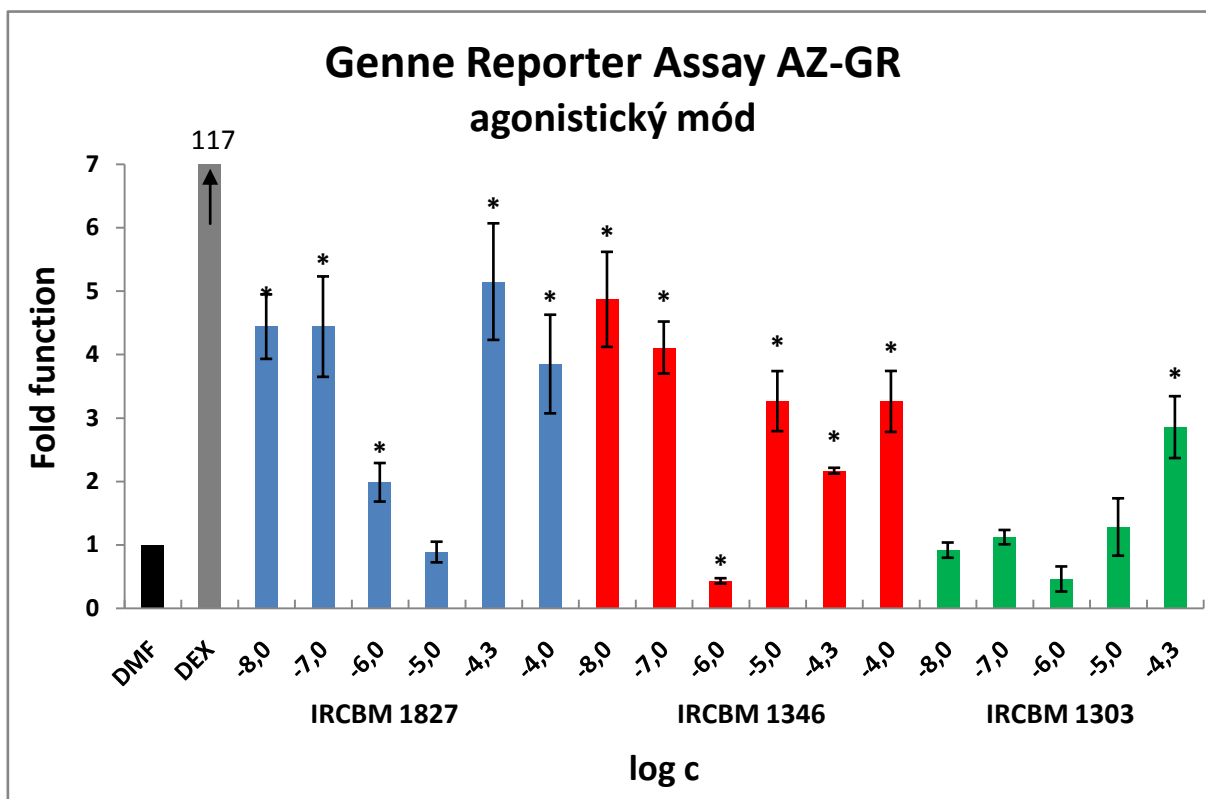


Graf 4: Antagonistický mód u buněčné linie AZ-AHR po aplikaci testovaných látek

Buňky AZ-AHR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 μ l media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látky IRCBM 1827 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Dále byla aplikována látka IRCBM 1346 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 μ mol/l a 10 μ mol/l. Látka IRCBM 1303 byla použita v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l a 50 μ mol/l. Po 24 hod inkubaci byla spektrofotometricky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm. Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k nejnižší koncentraci, která představuje 100%. Zobrazená data představují průměr z 3 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

V antagonistickém módu byl sledován vliv látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti modelového ligandu TCDD. Látka IRCBM 1346 v koncentraci 1 μ mol/l a 10 μ mol/l způsobila přibližně 20 % inhibici aktivity AhR v přítomnosti TCDD. IRCBM 1303 v nejvyšší testované koncentraci 50 μ mol/l snížila TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu na 90 %. Látka IRCBM 1827 měla mírné, ale signifikantní aditivní účinky na TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu, která dosáhla maxima v koncentraci 10 μ mol/l a její hodnota činila 115 % maximální aktivace TCDD.

8.2.2. Vliv testovaných látek na aktivitu GR

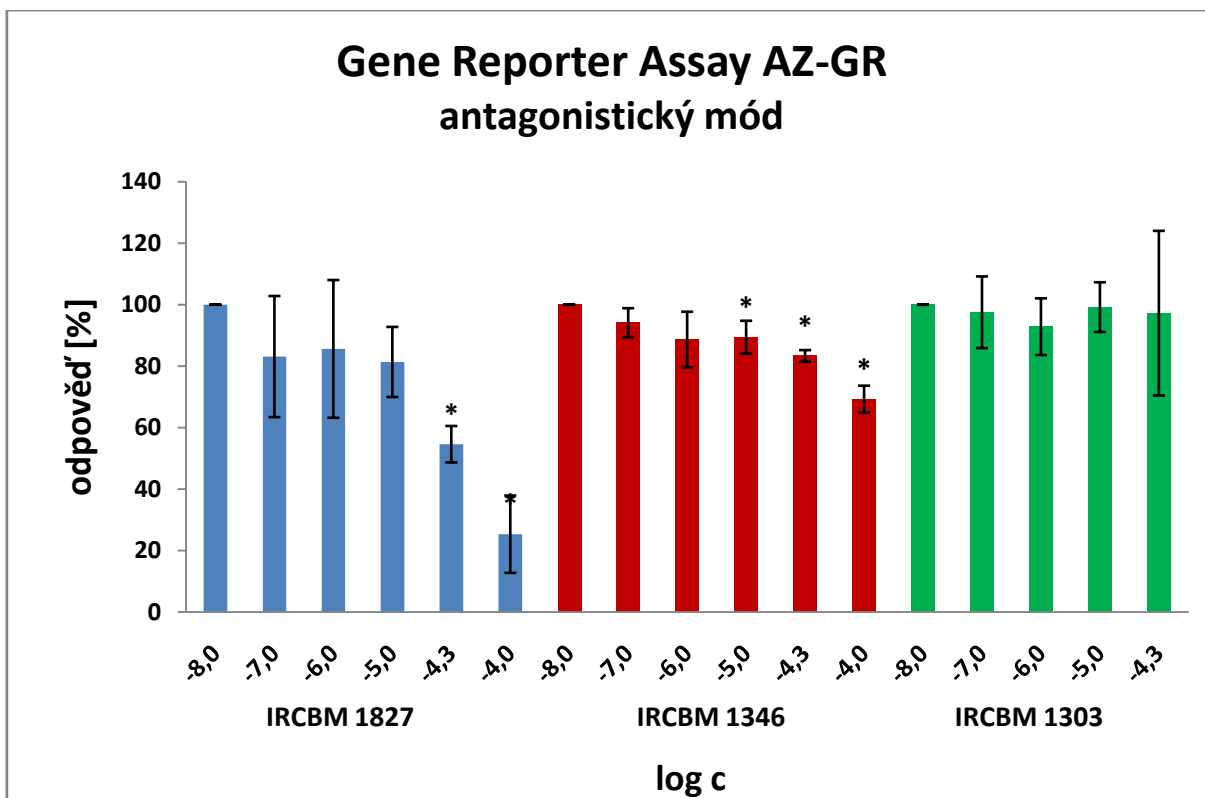


Graf 5: Agonistický mód u buněčné linie AZ-GR po aplikace testovaných látek

Buňky AZ-GR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 µl media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látky IRCBM 1827 a IRCBM 1346 v koncentracích 10 nmo/l; 100nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l a 100 µmol/l. Dále byla aplikována látka IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l a 50 µmol/l. Po 24 hod inkubaci byla spektrofotometricky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm. Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole 0,1 % DMF. Zobrazená data představují průměr z 3 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

Při sledování aktivace GR testovanými látkami nebyl zaznamenán žádný trend v závislosti vyvolané odpovědi na koncentraci látky. Nejsilnější a signifikantní aktivaci GR s indukci 5,5x vyvolaly látky IRCBM 1827 o koncentraci 50 µmol/l a IRCBM 1346 v koncentraci 100 nmol/l. V porovnání se 117 násobnou indukci luciferázové aktivity vyvolané DEX se jednalo o přibližně 6% maximálního účinku. Látka IRCBM 1303 vyvolala nejsilnější aktivaci GR s idukcí 3x v nejvyšší koncentraci 50 µmol/l a opět se jednalo o indukci

signifikantní. V porovnání se 117 násobnou indukcí luciferázové aktivity vyvolané DEX se jednalo o 3,5 % maximálního účinku.

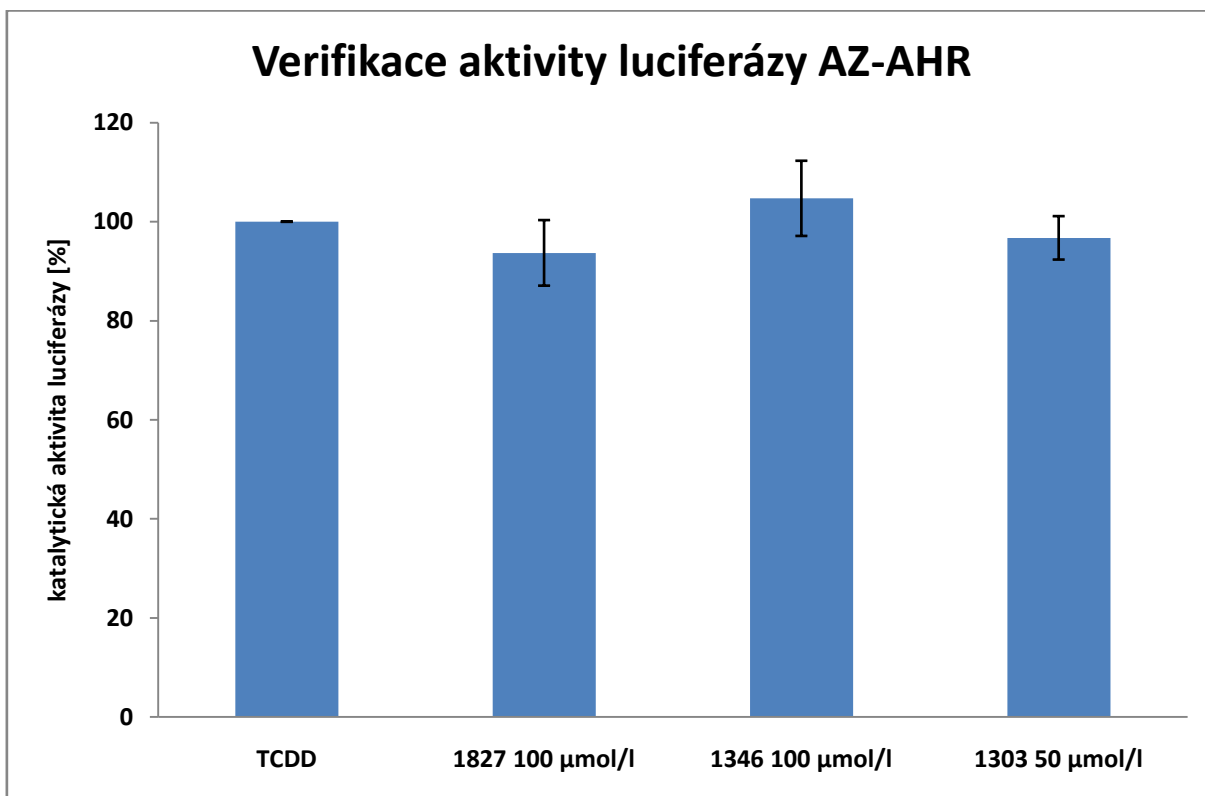


Graf 6: Antagonistický mód u buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných látek

Buňky AZ-GR byly vysety v počtu 25 000 buněk/200 µl media na jamku, na 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byla provedena aplikace látky IRCBM 1827 a IRCBM 1346 v koncentracích 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l; 50 µmol/l a 100 µmol/l. Dále byla aplikována látka IRCBM 1303 v koncentracích 10 nmo/l; 100 nmol/l; 1 µmol/l; 10 µmol/l a 50 µmol/l. Po 24 hod inkubaci byla spektrofotometricky změřena luminiscence při vlnové délce 560 nm. Úroveň transkripční aktivity byla vztahována k nejnižší koncentraci, která představuje 100%. Zobrazená data představují průměr z 3 nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

V antagonistickém módu byl sledován vliv látek na transkripční aktivitu GR v přítomnosti modelového ligandu DEX. Všechny testované látky vykazovaly snižování DEX-indukované luciferázové aktivity v závislosti na koncentraci. Nejvýraznější a zároveň signifikantní snížení aktivity GR byl pozorován látkou IRCBM 1827 v koncentraci 100 µmol/l, který dosahoval 25 % maximální aktivity DEX. Látka IRCBM 1346 signifikantně snížila aktivitu GR v nejvyšší koncentraci 100 µmol/l na 70 % maximální aktivity DEX. Látka IRCBM 1303 nezpůsobila v žádné koncentraci signifikantní snížení aktivity GR.

8.3. Vliv testovaných látek na katalytickou aktivitu luciferázy



Graf 7: Verifikace aktivity luciferázy AZ-AHR

Buněčná kultura AZ-AHR byla vystavena účinkům (zleva do prava) 5 nmol/l TCDD - negativní kontrola; testované sloučeniny IRCBM 1827, IRCBM 1346 o koncentraci 100 µmol/l a IRCBM 1303 o koncentraci 50 µmol/l v přítomnosti 5 nmol/l TCDD. Úroveň katalytické aktivity byla vyjádřena v procentech negativní kontroly. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$)

Testované látky IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 byly v koncentraci 100 µmol/l přidány k buněčnému lyzátu ošetřenému 5 nmol/l TCDD. Hodnoty luciferázové aktivity byly následně procentuálně vztaženy k hodnotě lyzátu z TCDD-indukovaných buněk, který byl stanoven jako 100 %. Tímto experimentem bylo vyvráceno inhibiční působení zkoumaných látek vůči luciferáze, jelikož žádná z testovaných látek neměla vliv na luciferázovou aktivitu. Z grafu je patrné, že hodnota luciferázové aktivity v TCDD-buněčném lyzátu ošetřeném testovanými látkami se pohybovala ve všech případech nad 90% hodnoty TCDD.

9. Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo studium chování testovaných látek IRCBM 1827, IRCBM 1303 a IRCBM 1346. Jedná se o deriváty pyridinu a pyrimidinu. V současné době se deriváty pyrimidinu a pyridinu užívají v mnoha léčích a jsou laboratorně zkoumány. U testovaných látek byla sledována transkripční aktivita jaderných receptorů a cytotoxicita. Ke studiu byly použity receptory AhR a GR. Tyto receptory ovlivňují metabolismus léčiv, buněčný cyklus, imunitu a další. Bylo sledováno, zda dochází k aktivaci, případně deaktivaci receptorů. Pro sledování aryl uhlovodíkové a glukokortikoidní aktivity zkoumaných sloučenin byly použity stabilně transfekované linie AZ-AHR a AZ-GR (Novotna et al., 2011; Novotna et al., 2012). Látky IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303 byly použity v koncentracích 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μ mol/l; 10 μ mol/l; 50 μ mol/l a 100 μ mol/l. Látka IRCBM-1303 byla sledována do koncentrace 50 μ mol/l. Zda jsou uvedené koncentrace toxické a dochází k ovlivnění viability buněk, bylo zjišťováno pomocí MTT testu. Po použití MTT testu bylo zjištěno, že látka IRCBM 1346 způsobila snížení viability buněk AZ-AHR při koncentraci 50 μ mol/l o 24% a při koncentraci 100 μ mol/l o 30%. Z těchto důvodů nebyly tyto dvě koncentrace dále použity při sledování vlivu na aktivitu AhR. Ostatní látky nevykazovaly znatelný pokles viability obou buněčných linií. Mohlo se tedy postoupit k dalším experimentům.

V antagonistickém módu byl sledován vliv látek na transkripční aktivitu AhR a GR. U linie AZ-AHR látka IRCBM 1346 v koncentraci 1 μ mol/l a 10 μ mol/l způsobila přibližně 20% signifikantní inhibici aktivity AhR a látka IRCBM 1303 v koncentraci 50 μ mol/l snížila transkripční aktivitu o 10%. Látka IRCBM 1827 měla aditivní účinky na TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu, která dosáhla maxima v koncentraci 10 μ mol/l a její hodnota činila 115%. Patrnější pokles transkripční aktivity byl pozorován u linie AZ-GR. Látka IRCBM 1827 způsobila signifikantní pokles transkripční aktivity v koncentraci 100 μ mol/l o 75%. Látka IRCBM 1346 v nejvyšší koncentraci 100 μ mol/l způsobila signifikantní pokles aktivity GR o 30%. Ze získaných hodnot se dá usoudit, že látka IRCBM 1827 má výrazné antagonistické účinky na glukokortikoidní receptor.

Aktivace transkripční aktivity byla sledována agonistickým módem. U linie AZ-GR vyvolaly nejsilnější aktivaci GR s indukcí 5,5x látky v 1346 v koncentraci 100 nmol/l a IRCBM 1827 v koncentraci 50 μ mol/l. V porovnání se 117 násobnou indukcí luciferázové aktivity vyvolané DEX se jednalo o přibližně 6% maximálního účinku a tyto výsledky nemají

významnou roli. U linie AZ-AHR byla pozorována aktivace AhR sloučeninou IRCBM 1303 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$, která vyvolala nejsilnější aktivaci AhR s indukcí 2,5x. V porovnání s 132 násobnou aktivací modelovým ligandem TCDD se ale jednalo o zanedbatelnou indukci.

Na základě získaných výsledků všech experimentů bylo zjištěno, že žádná z látek výrazným způsobem neovlivňuje transkripční aktivitu GR a AhR. Látky aktivující GR jsou užívány v řadě léčiv s protizánětlivými, imunosupresivními a protinádorovými účinky. Také agonisté AhR jsou využívány v léčích s protizánětlivými účinky. Zde se vyžaduje zvýšená exprese cílových genů, proto použití látek jako agonistů GR či AhR by bylo zbytečné (Sundahl et al., 2015; O'Donnell et al., 2010). Avšak bylo zaznamenáno antagonistické působení GR látkou IRCBM 1827, která v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ způsobila pokles transkripční aktivity o 75%. Použití antagonistů GR najdeme při léčbě Cushingovy nemoci, depresí, cukrovky, obezity a dalších (Clark, 2008). Jako zástupce antagonisty GR můžeme uvést mifepriston. Mifepriston je syntetický steroid, který je využíván jako prostředek pro chemickou interrupci. Vazbou na progesteronový receptor je zabráněno vazbě progesteronu, což vede k potratu (Sitruk-Ware, 2006).

10. Závěr

V předkládané bakalářské práci byl testován vliv syntetických derivátů přírodních látek (IRCBM 1827, IRCBM 1346 a IRCBM 1303) na transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru (AhR) a glukokortikoidního (GR) receptoru. Jedná se o nově syntetizované látky. MTT testem byla stanovena cytotoxicita těchto látek. Pro stanovení aryl uhlovodíkové a glukokortikoidní aktivity byly použity stabilně transfekované buněčné linie AZ-AHR a AZ-GR. Tyto linie byly vystavené koncentracím 10 nmol/l; 100 nmol/l; 1 μmol/l; 10 μmol/l; 50 μmol/l a 100 μmol/l, přičemž látka IRCBM 1303 byla testována do koncentrace 50 μmol/l. Metodou Gene Reporter Assay byla stanovena transkripční aktivita. Při sledování agonistického působení vůči AhR a GR nebyla zaznamenána výrazná aktivace receptorů. Při sledování antagonistického působení vůči GR byl zaznamenán signifikantní pokles transkripční aktivity o 75% vyvolaný látkou IRCBM 1827 o koncentraci 100 μmol/l. Na základě toho byla sloučenina IRCBM 1827 identifikována jako plný antagonist GR a určitě by měla být dále testována z důvodu potenciálního medicínského využití, např. v antidepresivech. Tato bakalářská práce poukazuje na farmakologický význam testovaných sloučenin a získané informace, by mohly být využity pro syntézu nových sloučenin.

11. Literatura

Vědecké publikace

Babu M. M., Luscombe N. M., Aravind L., Gerstein M., Teichmann S. A. (2004): Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Structural Biology* (3): 283–91.

Bacsi S. G., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. (1995): Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. *Molecular Pharmacology* 47 (3): 432-438.

Bailey D. G., Dresser G. K. (2004): Interaction between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 4 (5): 281-297.

Beischlag T. V., Morales J. L., Hollingshead B. D., Perdew G. H. (2008): The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Critical Reviews in Eukaryot Gene Expression* 18 (3): 207–250.

Prasad S. B., Sunil Kumar Y. C., Ananda Kumar C. S., Sadashiva C. T., Vinaya K., Rangappa K.S. (2007): Synthesis of Novel 3-Aryl-N-Methyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine Derivatives by Suzuki coupling: As Acetyl Cholinesterase Inhibitors. *The Open Medicinal Chemistry Journal* (1): 4–10.

Berka K., Hendrychova T., Otyepka M., Anzenbacher P. (2011): Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site. *The Journal of Physical Chemistry A* 115 (41): 11248-11255.

Boitano A. E., Wang J., Romeo R., Bouchez L. C., Parker A. E., Sutton S. E., Walker J. R., Flaveny C. A., Perdew G. H., Denison M. S., Schultz P. G., Cooke M. P. (2010): Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329 (5997): 1345-1348.

Carver L. A., LaPres J. J., Jain S., Dunham E. E., Bradfield C. A. (1998): Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *Journal of Biological Chemistry* 273 (50): 33580-33587.

Clark R. D. (2008): Glucocorticoid receptor antagonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8 (9): 813-838.

D'Souza M. S., Markou A. (2011): Neuronal Mechanisms Underlying Development of Nicotine Dependence: Implications for Novel Smoking-Cessation Treatments. *Addiction Science & Clinical Practice* 6 (1): 4-16.

De Kimpe N., Stevens C. (1993): A convenient synthesis of 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, the principle bread flavor component. *Journal of Organic Chemistry* 58 (10): 2904–2906.

Duncan D. M, Burgess E. A., Duncan I. (1998): Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by *spineless-aristapedia*, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev* 12 (9): 1290-1303.

Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006): Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews* (58): 685–704.

Gill G. (2001): Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays in Biochemistry* 37: 33–43.

Godhani D. R., Dobariya P. B., Jogel A. A., Sanghani A. M., Mehta J.P. (2014): An efficient synthesis, characterization, and antimicrobial screening of tetrahydropyrimidine derivatives. *Medicinal Chemistry Research* (23): 2417–2425.

Gondkar A. S., Deshmukh V. K., Chaudhari S. R. (2013): Synthesis, characterization and in-vitro antiinflammatory activity of some substituted 1,2,3,4 tetrahydropyrimidine derivatives. *Drug invention today* (5): 175-181.

Harrigan J. A., Vezina C. M., McGarrigle B. P., Ersing N., Box H. C., Maccubbin A. E., Olson J. R. (2004): DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicological Sciences* 77 (2): 307-314.

Hayashi R., Wada H., Ito K., Adcock I. M. (2004): Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 500 (1-3): 51-62

Hoensch H. P., Hutt R., Hartmann F. (1979): Biotransformation of xenobiotics in human intestinal mucosa. *Environmental Health Perspectives* (33): 71-78.

Hoopes L. (2008): Introduction to the gene expression and regulation topic room. *Nature Education* 1(1): 160.

Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittmatter S. M., Snyder S. H. (1985): Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (7): 2173–2177.

Kesler A., Stolovitch C., Hoffmann C., Avni I., Morad Y. (2005): Acute ophthalmoplegia and nystagmus in infants fed a thiamine-deficient formula: An epidemic of Wernicke encephalopathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 25 (3): 169–172.

Klinge C. M., Bodenner D. L., Desai D., Niles R. M., Traish A. M. (1997): Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Research* 25 (10): 1903–1912.

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

Kumar R., Thompson E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64 (5): 310–319.

LaLone C. A., Villeneuve D. L., Olmstead A. W., Medlock E. K., Kahl M. D., Jensen K. M., Durhan E. J., Makynen E. A., Blanksma C. A., Cavallin J. E., Thomas L. M., Seidl S. M., Skolness S. Y., Wehmas L. C., Johnson R. D., Ankley G. T. (2012): Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (3): 611-622.

Lamb D. C., Waterman M. R. (2009): Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*: 368 (1612): 1 – 13.

Lensu S., Tuomisto J. T., Tuomisto J., Viluksela M., Niittynen M., Pohjanvirta R. (2011): Immediate and highly sensitive aversion response to a novel food item linked to AH receptor stimulation. *Toxicology Letters* 203 (3): 252–257.

Lindén J., Lensu S., Tuomisto J., Pohjanvirta R. (2010): Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31 (4): 452-478.

Linja M. J., Porkka K. P., Kang Z., Savinainen K. J., Jänne O. A., Tammela T. L. J., Vessella R. L., Palvimo J. J., Visakorpi T. (2004): Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 10 (3): 1032–1040.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6): 835–839.

Martin J. L., Magistretti P. J. (1998): Regulation of Gene Expression by Neurotransmitters in the Central Nervous System. *European Neurology* (39): 129-134.

Matsuzawa-Watanabe Y., Inoue J., Semba K. (2003): Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene* (22): 7900–7904.

Mohan R., Heyman R. A. (2003). Orphan nuclear receptor modulators. *Curr Top Med Chem* 3 (14): 1637–1647.

Morgan F. H., Laufgraben M. (2013): Medical Management of Cushing's Syndrome. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 8 (2): 183-193.

Myers P. Z. (2008): Hox Genes in Development: The Hox Code. *Nature Education* 1 (1): 2.

Nagy S. R., Denison M. S. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43: 309-334.

Newton R. (2000); Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?. *Thorax* 55: 603–613.

Novotna A., Pavek P., Dvorak Z.(2011): Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization; *Environmental science & Technology* 45 (23):10133-10139

Novotna A., Pavek P., Dvorak Z.(2012): Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47 (5): 842-847.

O'Donnell E. F., Sali K. S., Koch D. C., Koppurapu P. R., Farrer D., Bisson W. H., Mathew L. K., Sengupta S., Kerkvliet N. I., Tanguay R. L., Kolluri S. K. (2010): The anti-inflammatory drug leflunomide is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 5 (10): e13128.

Olefsky J. M. (2001): Nuclear receptor minireview series. *Journal of Biological Chemistry* 276 (40): 36863-36864.

Phillips T., Hoopes L. (2008): Transcription Factors and Transcriptional Control in Eukaryotic Cells. *Nature education* 1 (1): 119.

Prakash R., Gandotra S., Singh L. K., Das B., Lakra A. (2008): Rapid resolution of delusional parasitosis in pellagra with niacin augmentation therapy. *General Hospital Psychiatry*, Volume 30 (6): 581–584.

Rao S. N., Chandak G. R. (2010): Cardiac beriberi: Often a missed diagnosis. *Journal of Tropical Pediatrics* 56 (4): 284–285.

Sharma V., Chitranshi N., Agarwal A. K. (2014): Significance and Biological Importance of Pyrimidine in the Microbial World. *International Journal of Medicinal Chemistry* (2014): 31 pages.

Shu-Feng Z., Jun-Ping L., Balram C. (2009): Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews* 41(2): 89-295.

Schaaf M. J., Cidlowski J. A. (2002): Molecular mechanism of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83 (1-5): 37-48.

Sitruk-Ware R. (2006): Mifepristone and misoprostol sequential regimen side effects, complications and safety. *Contraception* 74 (1): 48-55.

Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 93: 229-237.

Stockert J. C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R. W., Villanueva Á. (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 114 (8): 785-796.

Sundahl N., Bridelance J., Libert C., De Bosscher K, Beck I. M. (2015): Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacology & Therapeutics* 152: 28-41.

Tenbaum S., Baniahmad A. (1997): Nuclear receptors: Structure, function and involvement in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (12): 1325-1341.

Tijet N., Boutros P. C., Moffat I. D., Okey A. B., Tuomisto J., Pohjanvirta R. (2005): Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Molecular Pharmacology* 69 (1): 140-153.

Tirunagari S. K., Derry S., Moore R. A., McQuay H. J. (2009): Single dose oral etodolac for acute postoperative pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (3): CD007357.

Vane J. R., Bakhle Y. S., Botting R. M. (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (38): 97-120.

Vrzal R., Ulrichová J., Dvořák Z. (2004); Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers* 148 (1): 3-10.

Wan P., Moat S., Anstey A. (2011): Pellagra: A review with emphasis on photosensitivity. *The British journal of dermatology* 164 (6): 1188–1200.

Yuning L., Hong X., Qun Z., Chuanlin Y., Nana C., Xiaojuan L., Shuwen L., Linsheng L. (2013): Anti-inflammatory and immunosuppressive activities of 1,3-dicyclopentyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-4,5-dicarboxylic acid diethyl ester (ZL-5015). *International Immunopharmacology* (17): 168–177.

Zanger U. M., Schwab M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138 (1): 103-141.

Knižní zdroje:

Buhler D. R., Reed D. J. (1990): Ethel Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents, Volume II: Nitrogen and Phosphorus Solvents, Elsevier, Amsterdam, 260 s., ISBN 0-444-81316-0.

Červinka O., Dědek V., Ferles M. (1991): Organická chemie; 4nd Edition, Státní nakladatelství technické literatury, 687-713s., ISBN 80-85427-03-6.

Kameníčková A.(2012); Praktická cvičení z moderních technik studia buňky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

McMurry J. (2004): Organická chemie, 6th edition, Nakladatelství Vutium, Brno, 892 s., ISBN 978-80-214-3291-8.

Prasad Jagadish (2010): Conceptual Pharmacology, Universities Press, India, 676 s., ISBN 978-81-7371-679-9.

Skálová L., Boušová I., Machala M., Pávek P., Podlipná,R., Souček P., Szotáková B., Vondráček J., Wsól V. (2011): Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, Karolinum, Praha, 162 s., ISBN 978-80-246-1917-0.

Šafářová D. (2011): Kapitoly z obecné genetiky, Univerzita Palackého v Olomouci, 81-87 s. ISBN 978-80-244-2822-2.

Zempleni J., Rucker R. B., McCormick D. B., Suttie J. W. (2007): Handbook of Vitamins, 4th edition, CRC Press, New York, 191-199 s., ISBN 0-8493-4022-5.