

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Jakub Přikryl

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium účinků vybraných derivátů oxindolu na aktivitu
aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru
v *in vitro* lidských buněčných modelech**

Bakalářská práce

Jakub Přikryl

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jakub PŘIKRYL**
Osobní číslo: **R20718**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Studium účinků vybraných derivátů oxindolu na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru v in vitro lidských buněčných modelech.**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Studium vlivu testovaných látek na buněčnou viabilitu. Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru metodou reporter gene assay.
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Khetmalis, Y.M. et al. (2021) Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141, 111842. 10.1016/j.biopha.2021.111842
2. Stepankova, M. et al. (2018) Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* 93, 631-644. 10.1124/mol.118.112151
3. Dvořák, Z. et al. (2020) Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Mol Med* 12, e11621. 10.15252/emmm.201911621
4. Dvorak, Z. et al. (2020) Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends Pharmacol Sci* 41, 900-908. 10.1016/j.tips.2020.09.013
5. Vyhliđalova, B. et al. (2020) Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21072614

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 21. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

UNIVERSITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
Fakulta pedagogická

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Informace o zadání

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. března 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Jakub Přikryl
Název práce:	Studium účinků vybraných derivátů oxindolu na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru v <i>in vitro</i> lidských buněčných modelech.
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023
Klíčová slova:	Biotransformace, Aryluhlovodíkový receptor, Pregnanový X receptor, Deriváty 2-oxindolu
Počet stran:	51
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český
Souhrn:	

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) a pregnanový X receptor (PXR) jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které regulují expresi velkého množství genů kódujících zejména detoxifikační a antioxidantní enzymy. Správná endogenní aktivace těchto receptorů je žádoucí pro řadu fyziologických dějů v organismu. Výzkumné práce poukazují na účast metabolitů střevní mikroflóry při aktivaci daných receptorů. V této práci byl testován vliv halogenovaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR a PXR pomocí luciferázové reportérové eseje ve střevní nádorové buněčné linii. Experimentální data značí, že všechny testované deriváty jsou aktivátory AhR při 4 hodinách působení. Nicméně po 24 hodinách schopnost 5-fluor-2-oxindolu aktivovat AhR na rozdíl od 5-brom-2-oxindolu a 6-brom-2-oxindolu významně klesla. Dále bylo zjištěno, že transkripční aktivita PXR po inkubaci s testovanými deriváty byla velmi nízká. Tato práce přináší nové informace o možných ligandech AhR a PXR a současně jsou zde demonstrovány rozdílnosti ve vlastnostech derivátů 2-oxindolu v závislosti na pozici a typu substituentů.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Jakub Přikryl
Title:	Effects of selected oxindole derivatives on the activity of arylhydrocarbon receptor and pregnane X receptor in human <i>in vitro</i> models.
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor:	Mgr. Aneta Vrzalová Ph.D.
The year of presentation:	2023
Keywords	Biotransformation, Aryl hydrocarbon receptor, Pregnane X receptor, 2-oxindole derivatives
Number of pages	51
Number of appendices:	0
Language:	Czech
Summary:	

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and pregnane X receptor (PXR) are ligand-activated transcription factors regulating the expression of numerous genes encoding mainly detoxifying and antioxidative enzymes. Correct endogenous activation of these receptors is necessary for many physiological processes in the organism. Research works imply that metabolites of gut microbiota participate in the activation of said receptors. In this bachelor thesis, the effect of halogenated oxindole derivatives on the transcriptional activity of AhR and PXR in intestinal tumor cell lines was tested utilizing the luciferase reporter assay. The experimental data suggest that all of the tested derivatives are activators of AhR after 4 hours of incubation. However, the ability of 5-fluoro-2-oxindole to activate AhR significantly decreased after 24 hours of incubation in contrast with the results from experiments with 5-bromo-2-oxindole and 6-bromo-2-oxindole. Next, it was observed that the transcriptional activity of PXR after the incubation with the tested derivatives was rather low. This thesis brings new information on possible new ligands of AhR and PXR and, at the same time, demonstrates the differences in features of oxindole derivatives based on the position and type of substituents.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Anety Vrzalové, Ph.D. a použil pouze literární zdroje uvedené v seznamu literatury.

V Olomouci dne:

Poděkování

V první řadě bych chtěl velmi poděkovat Mgr. Anetě Vrzalové, Ph.D. za odborné vedení a za pomoc a rady při zpracování této bakalářské práce i při práci v laboratoři. Rovněž děkuji své rodině a blízkým přátelům, kteří mě v průběhu studia nepřetržitě podporovali a byli mojí oporou.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Biotransformace.....	3
3.1.1	První fáze biotransformace a účastníci se enzymy	3
3.1.2	Druhá fáze biotransformace a účastníci se enzymy	4
3.1.3	Třetí fáze biotransformace.....	4
3.2	Aryluhlovodíkový receptor.....	5
3.2.1	Ligandy AhR	5
3.2.2	Struktura	6
3.2.3	Cílové geny	7
3.2.4	Inaktivní forma	7
3.2.5	Aktivace AhR a kanonická signalizační dráha.....	8
3.2.6	Nekanonická signalizační dráha AhR	8
3.2.7	Fyziologické a patofyziologické procesy řízené AhR.....	9
3.3	Pregnanový X receptor	12
3.3.1	Ligandy.....	12
3.3.2	Struktura	13
3.3.3	Cílové geny	13
3.3.4	Vnitrobuněčná lokalizace a aktivace.....	13
3.3.5	PXR a metabolismus cholesterolu a žlučových kyselin.....	14
3.3.6	PXR a metabolismus glukózy	14
3.3.7	PXR a metabolismus lipidů.....	15
3.3.8	Role PXR v procesu apoptózy	15
3.3.9	Úloha PXR při zánětu	15
3.3.10	Mezilékové interakce	16
3.4	Oxindoly	16
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Plazmidy	20
4.3	Použité chemikálie a roztoky.....	20
4.4	Složení použitých roztoků	21

4.5	Seznam laboratorních přístrojů a zařízení	21
4.6	Kultivace a pasážování buněk	22
4.7	Počítání buněk a vyšetí na desky	23
4.8	Příprava látek	23
4.9	MTT test	24
4.10	Lipofekce	25
4.11	Reporter gene assay	26
5	VÝSLEDKY	28
5.1	Stanovení cytotoxických účinků testovaných látek pomocí MTT testu	28
5.2	Stanovení vlivu derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR	30
5.3	Stanovení vlivu derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR	33
6	DISKUZE	35
7	ZÁVĚR	38
8	SEZNAM LITERATURY	39

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	ATP binding cassette (ATP transportní proteiny)
AF-2	activation function 2 helix
AHH	aryl hydrokarbon hydroxyláza
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AHRR	AhR represor
AIP	AhR interagující protein
ARNT	aryluhlovodíkový jaderný transportér
ATP	adenosin-5'-trifosfát
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large protein
bHLH	basic helix-loop-helix (bazická šroubovice-smyčka-šroubovice)
CD36	diferenční skupina 36
CoA	koenzym A
CREB	vazebným proteinem cAMP responsivního elementu
CUL4B	cullin 4B
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vazebná doména
DDI	meziléková interakce
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE	dioxin responsivní element
EC ₅₀	half maximal effective concentration
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

ER	esterogenový receptor
FBS	fetální bovinní sérum
FBS CS	fetální bovinní sérum, charcoal stripped (fetální bovinní sérum filtrované přes aktivní uhlí)
FICZ	6-formylindol[3,2-b]karbazol
FMOs	flavin obsahující monooxygenázy
Foxa2	forkhead box protein A2
H	pantová oblast
HDAC8	histon deacetyláza 8
HIV	human immunodeficiency virus
HSP90	protein teplotního šoku 90
I3C	indol-3-karbinol
IEL	intraepiteliální lymfocyt
ILC	vrozená lymfoidní buňka
KLF6	Krüppel-like factor 6
LBD	ligand vazebná doména
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukováná forma)
NCoR2	nuclear receptor corepressor 2 (korepresor jaderného receptoru 2)
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NLS	jaderný lokalizační signál
NRF2	nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OATPs	polypeptidy transportující organické ionty
OCTs	transportéry organických kationtů

P	prolin
p21 ^{CIP1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27 ^{KIP1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p300	histon acetyltransferáza p300
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	fosfátový pufr
PGC-1a	peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1a
proteinkináza SRC	sarcoma protooncogene tyrosine protein kinase
PXR	pregnanový X receptor
Q	glutamin
Rb1	retinoblastomový protein
RGA	reporter gene assay (reportérová luciferázová esej)
RIF	rifampicin
RXR α	retinoidní X receptor α
S	serin
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors (umlčující mediátor pro receptory retinoidních a tyroidních hormonů)
SRC	steroid receptor coactivator
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein 1c
SULT	sulfottransferáza
T	threonin
TAD	transaktivační doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Th17	pomocné CD4 ⁺ Th 17 lymfocyty

TNF α	tumor nekrotizující faktor α
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
XAP2	hepatitis B virus X associated protein 2

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura aryluhlovodíkového receptoru (převzato z Larigot et al., 2018).	7
Obrázek 2: Příklady buněčných procesů, kterých se AhR účastní (převzato z Rothhammer et Quintana, 2019).	11
Obrázek 3: Struktura pregnanového X receptoru.....	13
Obrázek 4: Struktura 2-oxindolu.....	18
Obrázek 5: Struktura 5-brom-2-oxindolu.....	18
Obrázek 6: Struktura 6-brom-2-oxindolu.....	18
Obrázek 7: Struktura 5-fluor-2-oxindolu	19
Obrázek 8: Transkripční aktivita AhR a hodnoty EC_{50} po 4 a 24hodinovém působení daných koncentrací (c) 2-oxindolu a jeho derivátů 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T-AhR.....	32
Obrázek 9: Transkripční aktivita PXR po 24hodinovém působení daných koncentrací (c) 2-oxindolu a jeho derivátů 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T.....	34

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 5-brom-2-oxindolu.	28
Graf 2: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 6-brom-2-oxindolu.	29
Graf 3: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 5-fluor-2-oxindolu.	30

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Ředění testovaných látek	24
Tabulka 2: Množství jednotlivých složek pro přípravu lipofekční směsi a následnou luciferázovou reportérovou esej.	26

1 ÚVOD

Arylhydroxidový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor regulující expresi zejména genů pro biotransformační enzymy, jako jsou cytochromy P450, transferázy a další. Nicméně již byla popsána účast tohoto transkripčního faktoru v expresi i jiných než biotransformačních genů. Od objevu AhR bylo popsáno velké množství ligandů exogenního i endogenního charakteru. K exogenním aktivátorům se řadí například environmentální polutanty a pesticidy, k endogenním ligandům pak indigoidy, metabolity hemu nebo eikosanoidy. AhR tak hraje důležitou roli v mnohých fyziologických a patofyziologických procesech zahrnujících například zánětlivá onemocnění, rakovinu a udržování integrity kožní a střevní bariéry.

Pregnanový X receptor (PXR) je jaderný receptor a ligandem aktivovaný transkripční faktor. Podobně jako AhR se i PXR účastní regulace exprese biotransformačních enzymů, které zahrnují zástupce rodiny cytochromů P450, UDP-glukuronyltransferázy a glutathion-S-transferázy. Nejčastěji bývá působení PXR spojováno s metabolismem léčiv, ale je známá důležitost tohoto receptoru mimo jiné i v metabolismech cholesterolu, žlučových kyselin a glukózy. Současně byla popsána účast PXR při apoptóze, zánětu a mezilékových interakcích. Mezi ligandy PXR patří léčiva a, podobně jako u AhR, environmentální polutanty a pesticidy. Známými endogenními aktivátory jsou již zmíněné žlučové kyseliny a dále estrogeny a progesterony.

2-oxindol v rámci lidského organismu vzniká působením střevních symbiotických bakterií. Výzkumné práce poukazují na schopnost střevní mikroflóry produkovat metabolity aminokyseliny tryptofanu, které aktivují AhR a PXR, čímž je ovlivňována intestinální imunita a střevní bariéra. Deriváty 2-oxindolu navíc vykazují odlišné vlastnosti v závislosti na poloze a typu substituentů na 2-oxindolové kostře.

V rámci této bakalářské práce je snaha rozšířit současné znalosti o ligandech AhR a PXR testováním vlivů derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu těchto receptorů. Vzhledem k důležitosti zmíněných receptorů mohou získané výsledky pomoci v oblasti výzkumu nových léčiv.

2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Studium vlivu testovaných látek na buněčnou viabilitu. Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru metodou reporter gene assay.
3. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biotransformace

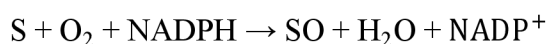
Lidské tělo je během života vystaveno působení 1-3 milionů tělu cizích sloučenin, xenobiotik (Idle *et* Gonzales, 2007). Organismus podléhá expozici těmto látkám zejména přes potravu, vodu, vzduch a užíváním léků. Typickými xenobiotiky jsou sloučeniny rostlinného původu, environmentální polutanty, léčiva, složky kosmetických přípravků, pesticidy, sladidla a potravinářská aditiva. Hlavními cestami, kterými se xenobiotika do těla dostávají, jsou absorpce kůží, gastrointestinálním traktem a respirační absorpce.

Metabolismus xenobiotik a endogenních látek popisuje proces biotransformace, jehož cílem je zprostředkování jejich exkrece. Zvýšením polaritativní látky a rozpustnosti ve vodě je umožněno její vyloučení z těla. Jedná se tedy o způsob ochrany a detoxifikace organismu. V průběhu metabolických přeměn však může nastat situace, že se xenobiotikum aktivuje a nabyde toxických vlastností. Samotná biotransformace je rozdělena do 3 fází a každá fáze se liší typem reakcí, kterým sloučeniny podléhají. (Phang-Lyn *et* Llerena, 2022).

3.1.1 První fáze biotransformace a účastníci se enzymy

Enzymy první fáze biotransformace katalyzují chemické reakce za účelem zpolarizování výchozí sloučeniny. Uplatňují se zde především procesy oxidace, redukce a hydrolýzy, kdy výsledkem je vnesení polárních funkčních skupin do molekuly substrátu, případně jejich odhalení (-OH, -COOH, -NH₂) (Phang-Lyn *et* Llerena, 2022).

Cytochromy P450 (CYP) jsou skupina enzymů účastnících se reakcí první fáze biotransformace. Označení „P450“ vzniklo ze slova pigment a absorpčního maxima při vlnové délce 450 nm v komplexu s oxidem uhelnatým (Omura *et* Sato, 1962). Jedná se o enzymy s hemovou skupinou ve svém aktivním místě. Orgánem disponujícím největší expresí cytochromů P450 jsou játra. Nacházejí se však i v placentě, ledvinách, gastrointestinálním traktu a kůži. V rámci buněčné lokalizace hovoříme o membránových proteinech endoplazmatického retikula. Několik zástupců cytochromů P450 však bylo identifikováno i v mitochondriích (Guengerich, 2019). Typickou reakcí cytochromů je monooxygenace. Jeden atom kyslíku je poskytnut substrátu (S), druhý atom kyslíku je využit pro tvorbu molekuly vody. Nezbytná součást reakce, NADPH, je dodávána pomocí enzymu NADPH: cytochrom P450 reduktázy (Meunier *et al.*, 2004) (Zanger *et* Schwab, 2013). Mechanismus monooxygenace znázorňuje následující reakce (upraveno z Phang-Lyn *et* Llerena, 2022):



U člověka se cytochromy P450 dělí na 18 rodin a 44 podrodin (Zanger *et Schwab*, 2013). Dělení je založeno na podobnostech v aminokyselinových sekvencích jednotlivých enzymů. Rodinu značí první arabská číslice v názvu cytochromu (CYP3), podrodinu pak následující velké písmeno (CYP3A). Druhá arabská číslice popisuje již konkrétního člena (CYP3A4). Ne všechny cytochromy se však podílejí na metabolismu xenobiotik. Pouze několik členů rodin 1, 2 a 3 je přiřazováno k této funkci. Většina cytochromů hraje roli v biosyntéze mastných kyselin, steroidních hormonů a prostaglandinů (Nebert *et Russell*, 2002).

Krom cytochromů P450 se v 1. fázi biotransformace uplatňují například flavin obsahující monooxygenázy (FMOs). U savců bylo identifikováno celkem 5 isoform FMOs (Eswaramoorthy *et al.*, 2006).

3.1.2 Druhá fáze biotransformace a účastníci se enzymy

Do druhé fáze biotransformace mohou vstoupit produkty první fáze, ale i sloučeniny, které již polární funkční skupiny obsahovaly, čímž první fázi projít nemusely (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022).

Enzymy zapojené do druhé fáze biotransformace endogenních sloučenin a xenobiotik katalyzují konjugační reakce ve snaze dalšího zvýšení hydrofilních vlastností a tvorby forem s ulehčenou exkrecí z těla. Typickými účastníci se enzymy jsou transferázy: UDP-glukuronyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), N-acetyltransferázy, glutathion-S-transferázy a methyltransferázy. Správnou funkci těchto enzymů ovlivňují externí (kouření, vliv prostředí) i interní faktory (věk, pohlaví, polymorfismy) (Jancová *et al.*, 2010).

3.1.3 Třetí fáze biotransformace

V této fázi nedochází k chemickým reakcím, ale k transportu metabolizovaných xenobiotik přes membrány dovnitř a ven z buněk. Takzvané ATP transportní proteiny (ATP binding cassette transporters, ABC transportéry) spotřebovávají pro svoji funkci ATP (Phang-Lyn *et Llerena*, 2022). Kromě ABC transportérů se třetí fázi biotransformace účastní například transportéry organických kationtů (OCTs) a polypeptidy transportující organické ionty (OATPs) (Roth *et al.*, 2012).

3.2 Arylhydroxidový receptor

Receptor pro aromatické uhlovodíky (Arylhydroxidový receptor, AhR) je transkripční faktor aktivovaný ligandy lišícími se svým původem i strukturou. Jedná se o receptor regulující expresi genů pro mnohé biotransformační enzymy, zejména cytochromy P450, spojené s metabolismem xenobiotik a endogenních molekul. Dále se však účastní mnohých fyziologických i patofyziologických procesů, a proto je důkladně studován jakožto potenciální cíl pro vývoj nových léčiv. AhR je exprimován zejména v játrech a dále v gastrointestinálním traktu, kůži, plicích, ledvinách a v mozku. Gen pro AhR leží na krátkém raménku chromozomu 7, konkrétně na lokusu 7p21 (Ema *et al.*, 1994). V pozdější studii Bennett *et al.* (1996) podrobněji popsali gen kódující AhR. Jedná se o gen o délce zhruba 50 kbp a je tvořen 11 exony.

První výzkumné práce se zabývaly funkcí a aktivitou takzvané benzpyren hydroxylázy v gastrointestinálním traktu krys při administraci polyaromatických uhlovodíků. Zvýšená aktivita byla pozorována právě při podávání těchto látek, čímž vznikly teorie, že tento enzym funguje jako forma ochrany vůči jejich karcinogenním účinkům (Wattenberg *et al.*, 1962). Později se pro benzpyren hydroxylázu začal používat název aryl hydrokarbon hydroxyláza (AHH). Nebert *et al.* (1969) popsali 6 polyaromatických uhlovodíků, které byly metabolizovány pomocí AHH na deriváty s vyšší polaritou, jež mohou být méně nebo naopak více karcinogenní. Poland *et al.* (1976) prováděli experimenty s 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD) ve spojitosti s AHH a uvedli, že existuje receptor (AhR) schopný vazby s příslušnou aromatickou sloučeninou. Následně komplex receptor-ligand indukuje expresi genu pro AHH, případně genů pro další enzymy.

3.2.1 Ligandy AhR

AhR je aktivován širokým spektrem sloučenin, které mohou být exogenního i endogenního původu. Současně se mohou chovat jako agonisté, parciální agonisté nebo antagonisté tohoto receptoru.

Mezi exogenní ligandy řadíme environmentální polutanty znečišťující prostředí. Ty byly identifikovány jako první ligandy a jak již bylo popsáno, jejich využití vedlo k samotnému objevu AhR. Řadíme zde polyaromatické uhlovodíky, halogenované i nehalogenované. Příklady halogenovaných polyaromatických uhlovodíků jsou polychlorované dioxiny (zástupce TCDD), bifenylly a dibenzofurany. TCDD je ligand vyznačující se nejvyšší účinností a afinitou k AhR. Je nerozpustný ve vodě a akumuluje se v tukové tkáni, což z TCDD dělá jednu s nejvíce toxických látek. Mezi známé ligandy ze skupiny nehalogenovaných polyaromatických

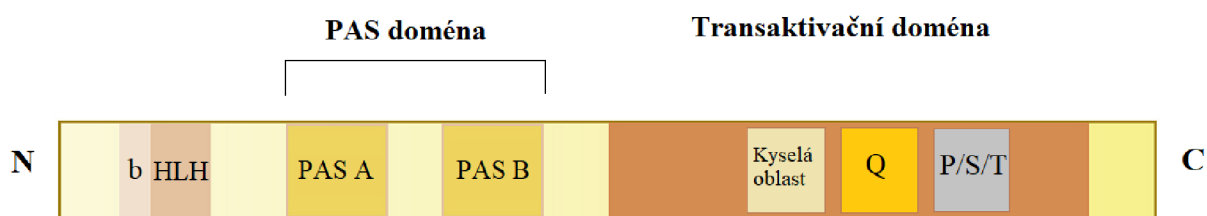
uhlovodíků patří benzo(a)pyren a 3-methylchloranthren (Lin *et al.*, 2022). Jedná se o karcinogeny s toxickými účinky na hormonální, rozmnožovací, imunitní a nervovou soustavu. Nejčastější příčinou expozice těmto chemikáliím je kontaminované jídlo, případně průmyslové havárie (Larigot *et al.*, 2018). Skupina exogenních ligandů přijímaných potravou zahrnuje například indol-3-karbinol (I3C) a indol-3-acetonitril, což jsou sloučeniny obsažené zejména v rostlinách rodu brukvovité. V kyselém prostředí žaludku I3C generuje metabolity jako indolo[3,2-*b*]karbazol a 3,3'-diindolylmethan. U všech těchto zmíněných sloučenin byl pozorován účinek na aktivitu AhR (Bjeldanes *et al.*, 1991; De Juan *et Segura*, 2021). Dalšími exogenními ligandy jsou resveratrol, quercetin, alkaloidy harman a berberin nebo léčiva (Stejskalova *et al.*, 2011).

Mezi endogenní ligandy řadíme indigo, indirubin, metabolity hemu a aminokyseliny tryptofanu, eikosanoiody nebo produkt fotooxidace tryptofanu 6-formylindol[3,2-*b*]karbazol (FICZ) (Stejskalova *et al.*, 2011). V rámci studie z roku 2001 (Adachi *et al.*, 2001) byly indirubin a indigo, sloučeniny obsahující oxindol ve své struktuře, identifikovány ve vzorcích lidské moči a byla u nich prokázána schopnost aktivovat AhR. Bilirubin a biliverdin jsou produkty degradace hemu a jsou schopny vyvolat expresi genů přes AhR signalizační dráhu v krysích, morčecích i lidských buněčných modelech (Phelan *et al.*, 1998). Metabolity tryptofanu vznikají činností symbiotických střevních bakterií a současně byla pozorována druhová specifita mezi myším a lidským AhR při jeho aktivaci těmito látkami. Příkladem jsou indol nebo 3-methylindol (skatol). V případě těchto sloučenin byla schopnost aktivace myšího AhR výrazně nižší, než při experimentech na lidských buněčných modelech (Hubbard *et al.*, 2015). Dalšími ligandy ze skupiny endogenních tryptofanových metabolitů jsou kyselina indol-3-octová a tryptamin (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998)

3.2.2 Struktura

Aryluhlovodíkový receptor je zařazen do bHLH (basic helix-loop-helix; bazická šroubovice-smyčka-šroubovice)/PAS (Per-ARNT-Sim) rodiny transkripčních faktorů (Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992). PAS doména se skládá z A a B typu a tyto typy se od sebe liší funkcí i samotnou sekvencí aminokyselin (McIntosh *et al.*, 2010). Transaktivační doména (TAD) je lokalizována na C konci proteinu a obsahuje 3 úseky: kyselou oblast, úsek bohatý na aminokyselinu glutamin (Q) a úsek bohatý na aminokyseliny prolin, serin a threonin (P/S/T) (Obrázek 1) (Kumar *et al.*, 2001).

Vliv jednotlivých domén na schopnost vazby ligandů, složek neaktivního komplexu AhR, dimerizaci a vazbu do responsivních elementů DNA byl testován specifickými delekcemi (Fukunaga *et al.*, 1995). Doména bHLH lokalizovaná na N-koncové části je potřebná pro vazbu jedné molekuly proteinu teplotního šoku o velikosti 90kDa (HSP90) a dále zprostředkovává vazbu do DNA. Helixy této domény se podílí na dimerizaci receptoru s aryluhlovodíkovým jaderným transportérem (ARNT). Navazující PAS doména tvořená z přiléhajících částí PAS A a PAS B umožňuje vazbu ligandu a současně zodpovídá za interakce AhR s dalšími proteiny. PAS A se taktéž jako bHLH doména účastní tvorby dimeru s heterodimerizačním partnerem ARNT. Druhá molekula HSP90 se k AhR váže v oblasti PAS B domény. PAS doména je rovněž esenciální pro vazbu AhR interagujícího proteinu (AIP), který je součástí cytozolického AhR komplexu (Meyer *et Perdew*, 1999). TAD umožňuje interakce s transkripčními koaktivátory a tudíž je důležitou doménou pro zahájení transkripce cílových genů (Kumar *et al.*, 2001).



Obrazek 1: Struktura aryluhlovodíkového receptoru (převzato z Larigot *et al.*, 2018)

3.2.3 Cílové geny

Mezi typické příklady genů, jejichž transkripce je řízena AhR, se řadí enzymy první fáze biotransformace, cytochromy P450 (zejména CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2S1, CYP3A4), a dále enzymy druhé fáze biotransformace (UDP-glukuronyltransferázy UGT1A1 a UGT1A6, chinon oxidoreduktáza, glutathion-S-transferázy). ABC transportéry ABCB1, ABCC2, ABCC4 a ABCG2 jsou regulovány pomocí AhR (Ramadoss *et al.*, 2005; Mahringer *et al.*, 2019).

3.2.4 Inaktivní forma

Neaktivní forma AhR je lokalizována v cytoplasmě jako součást proteinového komplexu, jehož složkami je již zmiňovaný HSP90, AhR interagující protein (AIP, také označovaný jako hepatitis B virus X associated protein 2; XAP2), co-chaperon p23 a proteinkináza SRC (Rothhammer *et Quintana*, 2019). Dimer HSP90 udržuje receptor v konformaci schopné vazby ligandu. Současně bylo potvrzeno, že přítomnost HSP90 zabraňuje vazbu neaktivovaného AhR na DNA (Pongratz *et al.*, 1992). XAP2 zabraňuje ubiquitinaci, a tedy degradaci receptoru proteasomem. Dále stabilizuje lokalizaci AhR v cytoplasmě a zpomaluje jeho translokaci do jádra po aktivaci ligandem (Kazlauskas *et al.*,

2000). Co-chaperon p23 se rovněž podílí na ochraně receptoru před ubiquitinací a degradací (Pappas *et al.*, 2018). Proteinkináza SRC je po vazbě ligandu AhR aktivována a disociuje z cytozolického AhR komplexu (Enan *et al.*, 1996).

3.2.5 Aktivace AhR a kanonická signalizační dráha

Po vazbě ligandu prostřednictvím PAS B domény dochází k odhalení jaderného lokalizačního signálu (nuclear localization signal, NLS). Fosforylace oblasti NLS inhibuje translokaci AhR do jádra. Transportu se účastní importiny, které interagují s NLS (Ikuta *et al.*, 2004). V jádře se AhR uvolňuje z proteinového komplexu a tvoří heterodimer s jaderným translokátorem aryluhlovodíkového receptoru (ARNT). V této formě se váže do specifických sekvencí DNA, dioxin responsivních elementů (DRE). Konsenzuální sekvence DRE se udává jako 5'-TNGCGTG-3' nebo 5'-CACGCNA-3'. „N“ pozice je variabilní a může se zde vyskytovat nukleotid s jakoukoliv dusíkatou bází (Nukaya *et al.*, 2009). Množství DRE v promotorových oblastech stejného genu se liší mezi druhy. Jako příklad může sloužit gen pro CYP1A1, důležitý enzym při biotransformaci xenobiotik. Rozdíly v promotoru tohoto genu byly zkoumány u myši, u člověka a u krysy. Bylo zjištěno, že 5 oblastí s dioxin responsivními elementy bylo konzervováno napříč těmito druhy, ale myši a krysy v této regulační oblasti nesly další 2 dioxin responsivní elementy, které nebyly konzervované u člověka. Nukleotidové sekvence v blízkosti DRE rovněž ovlivňují transkripci (Li *et al.*, 2014). Efekt okolních nukleotidů byl sledován na příkladu s TCDD. Exprese cílového genu nebyla uskutečněna, dokud nebyl guanin na 3. nukleotidu od konsenzuální sekvence zaměněn za adenin (Matikainen *et al.*, 2001). Pro zahájení transkripce cílových genů RNA polymerázou II jsou potřebné interakce s koaktivátory (jaderný koaktivátor 1 a 2, histon acetyltransferáza p300) (Hankinson, 2005). Známým regulátorem v signalizační dráze AhR je AHRR neboli AhR represor. Existuje kompetice mezi AHRR a ligandem aktivovaným AhR při vazbě s ARNT, čímž se snižuje dostupné množství ARNT pro komplexy s AhR (Sakurai *et al.*, 2017).

3.2.6 Nekanonická signalizační dráha AhR

Výše popsany mechanismus kanonické signalizace není jedinou dráhou, které se AhR účastní. V případě nekanonických signalizačních drah AhR interaguje i s jinými proteiny než s jeho heterodimerizačním partnerem ARNT. Jedná se například o estrogenový receptor (ER) (Ohtake *et al.*, 2003), nukleární faktor kappa B (NF-κB) (Vogel *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2014), transkripční faktor odvozený od erytroidů (nuclear factor erythroid-2-related factor 2; NRF2) (Miao *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2007) nebo Krüppel-like factor 6 (KLF6) (Wright *et al.*, 2017).

AhR může fungovat jako koaktivátor pro jiné transkripční faktory a tím se zapojuje do transkripce jiných genů. Například AhR-ARNT-ligand komplex interaguje s estrogenovým receptorem v nepřítomnosti vhodného ligandu pro ER, čímž vzniká komplex AhR-ARNT-ligand-ER. Tento komplex se následně váže do responsivních elementů pro estrogenový receptor, což vede k transkripci cílových genů (Ohtake *et al.*, 2003).

V případě NF- κ B byla identifikována vzájemná interakce mezi AhR a NF- κ B podjednotkami RelA a RelB. Aktivovaný AhR, který byl translokovaný do jádra, interaguje s RelB podjednotkou NF- κ B komplexu. AhR-RelB se váže do takzvaného RelBAhR responsivního elementu v promotorech genů pro chemokiny (zejména interleukinu 8) a umožňuje jejich transkripci (Vogel *et al.*, 2007). NF- κ B komplexy vykazují schopnost regulace exprese genů, které se podílejí na modulaci imunitních a zánětlivých reakcí. Jedná se například o geny pro interleukiny 4, 5 a 8 nebo cyklooxygenázu 2 (Bonizzi *et al.*, 2004). Stimulace NF- κ B lipopolysacharidy vede k upregulaci exprese AhR. To je dáno skutečností, že promotor genu kódující AhR obsahuje vazebné místo pro NF- κ B. Důsledkem zvýšené exprese AhR je i zvýšená exprese CYP1A1, která je řízena pomocí AhR. Současně při této stimulaci zánětu dochází ke zvýšení citlivosti AhR k ligandům. Naopak inhibice NF- κ B se projevuje snížením exprese AhR a tudíž v dalším kroku i snížením koncentrace CYP1A1 (Vogel *et al.*, 2014).

Vztah mezi AhR a transkripčním faktorem NRF2 popisuje vzájemnou komunikaci při expresi genů kódujících detoxifikační a antioxidační enzymy. Zatímco AhR většinou reguluje expresi enzymů I. fáze biotransformace, NRF2 se podílí na expresi enzymů II. fáze biotransformace (například UDP-glukuronyltransferázy, glutathion-S-transferázy). Aktivace AhR pomocí TCDD indukuje expresi genu pro NRF2, neboť tento gen obsahuje úseky podobné dioxin responsivním elementům, které jsou schopné vázat AhR (Miao *et al.*, 2005). V dalším kroku dochází k indukci exprese NRF2 cílových genů jako je glutathion-S-transferáza alfa 1, UDP-glukuronyltransferáza 1A6 a NADPH chinon oxidoreduktáza 1 (Yeager *et al.*, 2009). Nicméně provázanost mezi těmito transkripčními faktory vykazuje značnou komplexitu, neboť byl objeven i obrácený mechanismus, kdy farmakologická aktivace NRF2 indukuje expresi *Ahr* genu vazbou NRF2 do antioxidant responsivního elementu v promotoru *Ahr*, což má za následek indukci exprese AhR cílových genů (Shin *et al.*, 2007).

3.2.7 Fyziologické a patofyziologické procesy řízené AhR

AhR bývá v první řadě spojován s regulací exprese genů účastnících se biotransformace. Mnohé výzkumné práce však poukazují na účast tohoto receptoru v různých fyziologických

a patofyziologických procesech, neboť se podílí na regulaci exprese i jiných genů, kódujících například cyclin-dependent kinase inhibitor 1 p21^{CIP1}, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B p27^{KIP1} (Pang *et al.*, 2008), plasminogen activator inhibitor 1 PAI-1 (Huang *et Elferink*, 2012), c-jun (Weiss *et al.*, 2005) nebo interleukin 22 (Vogel *et al.*, 2013).

AhR je důležitým modulátorem vrozené střevní imunity, neboť je exprimován v mnohých střevních imunitních buňkách, jako jsou pomocné Th 17 lymfocyty (Th17), intraepiteliální lymfocyty (IEL), vrozené lymfoidní buňky (ILC), makrofágy, dendritické buňky a neutrofilů (Nieves *et al.*, 2022). Současně je velké množství ligandů AhR produkováno právě lidskou střevní mikroflórou. Aktivace endogenními ligandy o fyziologických koncentracích působí prospěšně na správnou funkci a integritu intestinální bariéry a udržování střevní homeostázy (Vrzalová *et al.*, 2022).

AhR také ovlivňuje neurogenезi a správné fungování hipokampu (Latchney *et al.*, 2013).

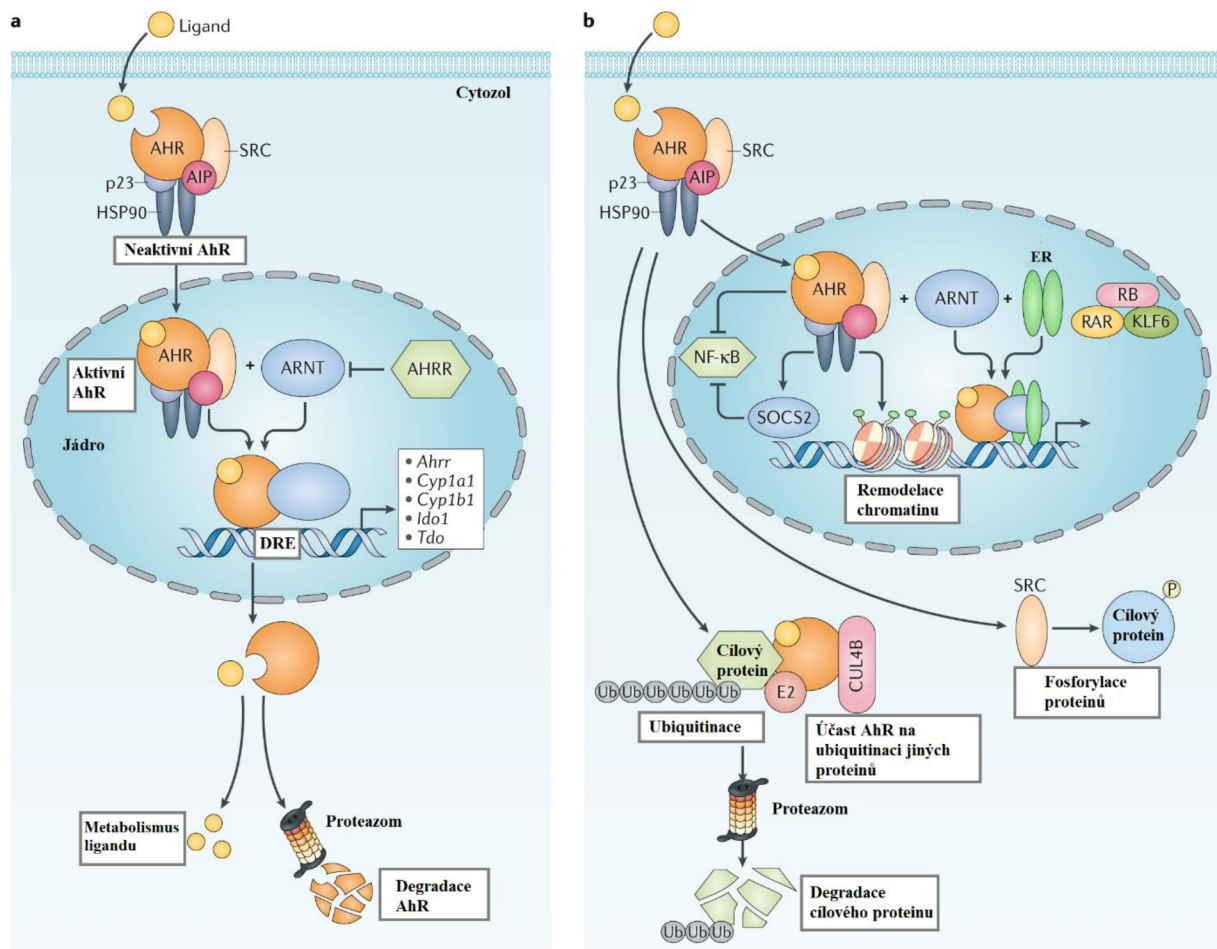
Dále se AhR zapojuje do drah degradace jiných proteinů. AhR funguje jako E3 ubiquitin protein ligáza a podílí se na ubiquitinaci a proteasomové degradaci. V prvním kroku je nutná interakce aktivovaného AhR s cullin 4B ubiquitin ligázovým komplexem CUL4B. CUL4B^{AhR} komplex vyhledává a označuje proteiny určené k degradaci (Obrázek 2). Tento mechanismus degradace byl pozorován u transkripčních faktorů jako je ER a androgenní receptor (Kato *et al.*, 2007).

AHR má důležitou roli ve výskytu, nástupu a progresi patofyziologických procesů a onemocnění, včetně infekce, zánětu, cukrovky, kardiovaskulárních chorob a karcinogeneze. Zapojení AHR do karcinogeneze prokazuje mnoho prací popisující pro- i protinádorové funkce u několika druhů rakoviny (Murray *et al.*, 2014; Kolluri *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2017) ve studii zabývající se buněčnou proliferací a rakovinou pozoroval, že u pacientů s hepatocelulárním karcinomem vzájemně korelují zvýšené koncentrace AhR a histon deacetylázy 8 (HDAC8). V tomto případě je exprese HDAC8 aktivována právě přes AhR signalizační dráhu. HDAC8 provádí deacetylaci v promotorové oblasti genu pro retinoblastomový protein (Rb1), který za normálních okolností vykazuje tumor supresorové vlastnosti. Výsledkem procesu deacetylace je snížení exprese genu pro Rb1 a podpora tumorogeneze.

Udržování homeostázy střevních epiteliálních buněk, integrity střevní bariéry a prevence nádorové transformace ve spojitosti se střevními záněty je taktéž ovlivněno

aryluhlovodíkovým receptorem a jeho ligandy. Dysregulace AhR v buňkách střevního epitelu způsobuje zvýšenou buněčnou proliferaci a podporu zánětu. AhR reguluje transkripci genů pro tumor supresorové E3 ubiquitin ligázy, proto deficience AhR podporuje tumorigenezi (Metidji et al., 2018).

V případě zánětlivých kožních onemocnění tapinarof, polyfenolická látka bakteriálního původu, a uhelný dehet indukují expresi genů modulujících kožní bariéru přes AhR signalizační dráhu a tím pomáhají zmírnit příznaky onemocnění jako je atopická dermatitida (van den Bogaard et al., 2013; Smith et al., 2017).



Obrázek 2: Příklady buněčných procesů, kterých se AhR účastní (převzato z Rothhammer et Quintana, 2019).

a) Kanonická signalizační dráha AhR; b) Další signalizační procesy, ve kterých je AhR složkou

3.3 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor (PXR) je jaderný receptor a transkripční faktor zapojený do exprese detoxifikačních a dalších enzymů. Vliv PXR byl pozorován nejen v metabolických drahách xenobiotik, ale i endogenních sloučenin. Mezi orgány s vysokou expresí PXR patří zejména játra a tenké a tlusté střevo. Nižší expresi vykazují například mozek, jícen, kůže nebo slezina (Lv *et al.*, 2022). Receptor je tvořen 434 aminokyselinami a je kódovaný genem *NR1I2*, který se nachází na dlouhém raménku chromozomu 3. Konkrétně se jedná o lokus 3q11-13. Gen má délku 35 kbp a je tvořen 9 exony (Zhang *et al.*, 2001).

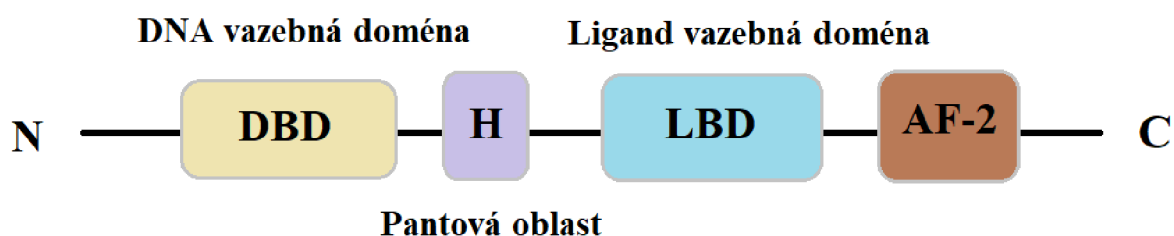
Objev pregnanového X receptoru (PXR) sahá do roku 1998 a představoval milník pro pochopení metabolismu léčiv. Steven A. Kliewer *et al.* (1998) poprvé popsal PXR ve vztahu s indukcí cytochromů CYP3A přírodními steroidními látkami pregnenolonem, progesteronem a dále syntetickým glukokortikoidem dexamethasonem. Kliewer uvedl, že se PXR vyskytuje ve 2 izoformách, které pojmenoval PXR.1 a PXR.2. *PXR.2* gen kóduje o 41 aminokyselin kratší protein než *PXR.1*. Výchozí teorie, že existují tzv. buněčné faktory a DNA elementy ovlivňující expresi CYP3A genů, tímto byla potvrzena. DNA element byl popsán jako PXR responsivní element v promotorové oblasti CYP3A genů. PXR se do responsivních elementů váže a ovlivňuje genovou expresi (Quattrochi *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 2016).

3.3.1 Ligandy

Pregnanový X receptor je aktivován širokým spektrem strukturně si nepříbuzných ligandů. Je aktivován léčivy, environmentálními polutanty i endobiotiky. Známymi ligandy z řad léčiv jsou rifampicin, klotrimazol, ritonavir, lovastatin, karbamazepin nebo tamoxifen (Honkakoski *et al.*, 2009). Z environmentálních polutantů mezi ligandy PXR řadíme polychlorované bifenylly a organochlorové pesticidy (Coumoul *et al.*, 2002; Honkakoski *et al.*, 2009). Extrakty z třezalky tečkované, pepřovníku opojného a extrakt gugulipid, které se používají k léčbě úzkostí nebo vysokého cholesterolu, taktéž aktivují PXR (Moore *et al.*, 2000; Urizar *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008). Příkladem potvrzených endobiotických ligandů jsou žlučové kyseliny, progesterony a estrogény (Honkakoski *et al.*, 2009). Oxindol indirubin, již zmíněný ligand AhR, je ligandem i PXR (Kumagai *et al.*, 2016). PXR však vykazuje i druhovou specifitu vůči ligandům. Rifampicin je typickým ligandem lidského PXR, ale transkripční aktivita PXR v krysích hepatocytech za použití rifampicinu je velmi nízká (Lehmann *et al.*, 1998). Střevní mikrobiální metabolity tryptofanu indol a indol-3-acetamid (Illés *et al.*, 2020) a methylované deriváty indolu (Vyhlídalová *et al.*, 2020a) jsou schopny aktivovat PXR a indukovat expresi CYP3A4 ve střevních buňkách.

3.3.2 Struktura

PXR sdílí strukturní podobnosti s jinými jadernými receptory (Obrázek 3). N-terminální oblast obsahuje variabilní úsek, na který navazuje DNA vazebná doména (DNA binding domain; DBD) s motivem dvou zinkových prstů. DBD je zodpovědná za rozpoznávání responsivních elementů cílových genů a zprostředkovává jejich vazbu s PXR. Pantová oblast (H) propojuje DBD s doménou zprostředkovávající vazbu ligandů poblíž C konce (ligand binding domain; LBD), která je od ostatních jaderných receptorů odlišná. LBD umožňuje vazbu ligandu s PXR a také dimerizaci s retinoidním X receptorem α (RXR α). Tato doména PXR je tvořena 3 vrstvami α helixů a pětivláknovým antiparalelním β listem. Uspořádání a vlastnosti LBD jsou důvodem, proč je PXR aktivovatelný strukturně odlišnými sloučeninami. „Activation function 2 helix“ (AF-2) je klíčovou složkou pro funkci PXR tím, že váže potřebné koaktivátory (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Watkins *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2002).



Obrázek 3: Struktura pregnanového X receptoru

3.3.3 Cílové geny

PXR bývá v první řadě spojován s ovlivňováním exprese enzymů 1. fáze biotransformace, cytochromů P450. Příklady cytochromů P450 pod transkripční kontrolou PXR jsou CYP1A2, CYP3A4, CYP3A7, CYP2B6, CYP2C9 a další (Zollner *et al.*, 2010). Tímto receptorem jsou však regulovány i enzymy 2. fáze biotransformace, UDP-glukuronyltransferáza (UGT) UGT1A1 a UGT1A6 (Xie *et al.*, 2003; Naspinski *et al.*, 2008), sulfotransferáza SULT2A1 a glutathion-S-transferázy (Echchgadda *et al.*, 2007; Naspinski *et al.*, 2008). Exprese některých transportérů účastnících se 3. fáze biotransformace je regulována přes PXR. Konkrétně se jedná o P-glykoprotein nebo skupinu polypeptidů transportující organické ionty (OATPs) (Ihunnah *et al.*, 2011) (Mills *et al.*, 2004).

3.3.4 Vnitrobuněčná lokalizace a aktivace

Lokalizace inaktivního PXR je nejasná. Prováděné studie poukazují na případy, kdy aktivaci dochází k translokaci do jádra (Squires *et al.*, 2004). V jádře se však nacházel i inaktivní PXR (Saradhi *et al.*, 2005). V nepřítomnosti ligandu PXR existuje ve vztahu s korepresory. V tomto případě korepresory jako korepresor jaderného receptoru 2 (nuclear

receptor corepressor 2; NCoR2) a umlčující mediátor pro receptory retinoidních a tyroidních hormonů (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors; SMRT) navozují deacetylaci chromatinu a zpětnou kondenzaci, což má negativní vliv na transkripci (Collingwood *et al.*, 1999; Rigalli *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2005). Po aktivaci ligandem jsou korepresory z vazby uvolněny a jsou naopak nahrazeny koaktivátory (Rigalli *et al.*, 2021). Příklady takových koaktivátorů jsou SRC 1, 2 a 3 (steroid receptor gamma coactivator), PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1) a histon acetyltransferáza p300 (Rigalli *et al.*, 2018). Efekt jejich účinku je opačný, jako u korepresorů. Koaktivátory jsou spojeny s acetylací histonů, čímž je podpořena transkripce (Collingwood *et al.*, 1999). Aktivace vazbou ligandu má za následek tvorbu heterodimeru s retinoidním X receptorem α (RXR α). V jádře se PXR-RXR α váže do responsivních elementů se sekvencí AG(G/T)TCA v motivech direct repeats 3,4,5 a everted repeats 6,8 (Orans *et al.*, 2005).

3.3.5 PXR a metabolismus cholesterolu a žlučových kyselin

V rámci endogenního metabolismu se PXR podílí například na regulaci metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin. V klinických studiích se zvýšila cholesterogeneze v závislosti na aktivaci PXR rifampicinem. Byly zaznamenány elevované hladiny nízkodenzitního cholesterolu a celkového cholesterolu. Tato pozorování mohou být signifikantní z hlediska následků administrace léčiv schopných aktivovat PXR na riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Karpale *et al.*, 2021). Pregnanový X receptor reguluje expresi genů biosyntézy a transportu žlučových kyselin. Receptor hraje roli senzoru kyseliny lithocholové, jelikož tato kyselina je schopná aktivovat PXR. Zvýšené koncentrace kyseliny lithocholové jsou toxické, a proto je její tvorba takto kontrolována (Staudinger *et al.*, 2001).

3.3.6 PXR a metabolismus glukózy

Metabolismus glukózy zahrnuje důležité procesy glukoneogeneze, glykolýzy, glykogeneze a glykogenolýzy. Dílčí reakce těchto drah jsou katalyzovány velkým množstvím enzymů. PXR se uplatňuje v glukoneogenezi a reguluje expresi genu pro glukóza-6-fosfatázu. Obecně je tvorba tohoto enzymu ovlivněna hormonem glukagonem a vazebním proteinem cAMP responsivního elementu (CREB). CREB je transkripční faktor, který je zodpovědný za transkripci genu pro glukóza-6-fosfatázu. Inhibice tvorby tohoto enzymu je dána tvorbou komplexu aktivovaného PXR s CREB, který se v tomto stavu nemůže vázat do responsivních elementů (Kodama *et al.*, 2007).

3.3.7 PXR a metabolismus lipidů

Do procesu lipogeneze se PXR nezapojuje regulací lipogenních enzymů (sterol regulatory element-binding protein 1c; SREBP-1c a další), ale regulací exprese transportéru volných mastných kyselin CD36 (diferenciační skupina 36), jelikož promotor genu *CD36* obsahuje responsivní element pro PXR. Zvýšení exprese transportéru CD36 má za následek jaterní steatózu akumulací triglyceridů (Zhou *et al.*, 2006a). Při nedostatku energie se uplatňují procesy β -oxidace a ketogeneze. PXR inhibuje tvorbu účastnících se enzymů 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntázy a karnitin palmytoyltransferázy tvorbou komplexu s transkripčním faktorem Foxa2 (Forkhead box protein A2). Foxa2 je klíčovým transkripčním faktorem zmíněných enzymů a v komplexu s PXR mu není umožněna vazba do regulačních oblastí genů, čímž je potlačena jejich transkripce (Nakamura *et al.*, 2007).

3.3.8 Role PXR v procesu apoptózy

Skupina proteinů Bcl-2 slouží jako jedna z klíčových součástí procesu apoptózy. Bcl-2 proteiny mohou být jak protiapoptické, tak i proapoptické. Jejich působením je modifikována mitochondriální membrána. Proapoptické proteiny se účastní formování kanálů v mitochondriální membráně, které zprostředkovávají uvolnění cytochromu c z této organely, následnou aktivaci kaspáz a apoptózu. Protiapoptické proteiny účinkují v opačném směru a inhibují funkci proapoptických proteinů (Jürgensmeier *et al.*, 1998; Hardwick *et al.*, 2013). Zucchini *et al.* (2005) popsali vztah mezi apoptózou indukovanou staurosporinem a aktivací PXR. K experimentu byly použity ligandy lidského a krysího PXR (rifampicin, dexamethason, klotrimazol a další) a byla sledována spojitost s následnou expresí protiapoptických Bcl-2 u lidských hepatocytů a Bcl-xL u krysích hepatocytů. Výsledkem experimentů byly zvýšené koncentrace těchto protiapoptických proteinů. V dalším testování bylo zjištěno, že snížení exprese PXR v krysích hepatocytech nevedlo ke zvýšení koncentrace Bcl-xL při použití klotrimazolu jako PXR ligandu. Naopak zvýšená exprese PXR v HepG2 buňkách indukovala nárůst koncentrace protiapoptických Bcl-2 při použití klotrimazolu.

3.3.9 Úloha PXR při zánětu

Podobně jako v případě AhR, i u PXR je známý vztah s NF- κ B. Aktivace PXR inhibuje transkripci genů, které jsou regulovány přes NF- κ B. Při absenci PXR je transkripce cílových genů NF- κ B podpořena a rovněž je posílen i zánět. Naopak aktivace NF- κ B tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF α) inhibuje expresi PXR mRNA a transkripci PXR cílových genů (Zhou *et al.*, 2006b). Tento způsob vzájemné interakce vysvětluje, proč je u pacientů se zánětlivými střevními onemocněními výrazně snížena exprese genů pro cytochromy a PXR

(Langmann *et al.*, 2004). Ke stejnému efektu dochází i v případě prozánětlivého cytokinu interleukinu 6 (Pascussi *et al.*, 2000) nebo při podání bakteriálního lipopolysacharidu, kdy dochází ke snížení hladin mRNA PXR, konstitutivního androstanového receptoru a retinoidního X receptoru. Dále pak i hladin mRNA CYP3A enzymů. Pozorované změny v expresi jsou závislé na dávce lipopolysacharidu.

3.3.10 Mezilékové interakce

Cytochromy P450 významně přispívají k metabolismu velkého množství dostupných léčiv. Jak již bylo zmíněno, exprese CYP3As je regulována právě přes PXR. Mezilékové interakce (drug-drug interactions, DDI) mohou do jisté míry být zapříčiněny regulací exprese enzymů metabolizujících léky. Užívání rifampicinu způsobilo navýšení hladiny CYP3A4 a následně došlo ke snížení biodostupnosti orálně podaného léčiva Verapamilu téměř o 100 %. Verapamil je lék síňových tachykardií a anginy pectoris. Drastický pokles biodostupnosti téměř zcela eliminoval terapeutické účinky léčiva (Fromm *et al.*, 1996; Ihunnah *et al.*, 2011). Léky s výtažky z třezalky tečkované indukují expresi CYP3A4 a dalších cytochromů. Současná administrace s warfarinem nebo kontraceptivy měla za následek zrychlené vyloučení těchto léčiv z těla a tím i snížení jejich farmakologických účinků (Jiang *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2005). Dalším příkladem nežádанých interakcí je vztah mezi grepovým džusem a orálně užívanými léky. Furanokumariny obsažené v džusu podléhají metabolismu přes CYP3A4. Vzniklý metabolit však působí jako ireverzibilní inhibitor CYP3A4, čímž se snižuje koncentrace funkčních CYP3A4. Požití léčiv, které jsou metabolizovány CYP3A4, může mít za následek vznik toxických účinků na organismus (Lown *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 2013).

3.4 Oxindoly

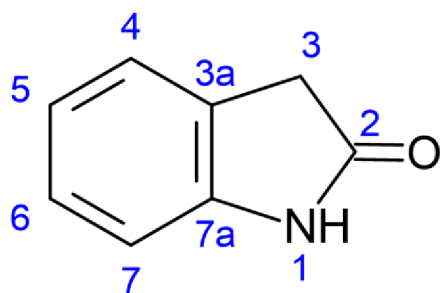
Deriváty oxindolu jsou látky vyskytující se v tělních tekutinách a tkáních savců, v rostlinách a různých rostlinných produktech, v bakteriích i v tělech bezobratlých. Látky obsahující oxindolovou kostru vykazují široké spektrum významných vlastností. Mnoho derivátů oxindolu působí pozitivně v léčbě nemocí jako je rakovina, diabetes, HIV, leishmanióza a Alzheimerova choroba. Dále je nutné zmínit antioxidantní, analgetické, vasodilatační a antibakteriální účinky, účinky spojené s inhibicí fosfatáz, kináz a acetylcholinesterázy. Některé deriváty fungují jako neuroprotektiva (Kaur *et al.*, 2016).

2-oxindol, neboli 1,3-dihydro-2H-indol-2-on, je sloučenina složená z benzenového jádra a pyrrolového kruhu s karbonylovou skupinou na pozici 2 (Obrázek 4). Oxindol je schopný tautomerie a i přes to, že je jeho základní struktura nejčastěji zobrazována v laktam formě, může nabývat i laktim a enol konformací (Sumpter, 1945).

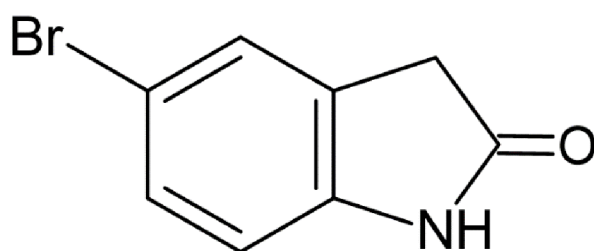
Za první organismus, ze kterého byl vyizolovaný derivát oxindolu, se uvádí rostlina řemdihák plstnatý. Extrakty z kůry této tropické rostliny mají antioxidační efekty a chrání před vznikem tumorů (Dreifuss *et al.*, 2010; Khetmalis *et al.*, 2021). Samotný 2-oxindol je ve vysokých koncentracích generován v gastrointestinálním traktu jakožto metabolit tryptofanu činností střevní mikrobioty a byla u něj pozorována schopnost aktivovat AhR (Dong *et al.*, 2020). Pro esenciální aminokyselinu tryptofan existují 3 cesty degradace: serotoninová cesta, cesta kyseliny kynureninové a takzvaná indolová cesta (Gao *et al.*, 2020). Právě komenzální střevní bakterie produkují množství katabolických produktů tryptofanu zahrnující například již zmiňovaný indol a 2-oxindol a dále tryptamin, 3-methylindol, 3-methyl-2-oxindol, indol-3-acetát a další. Přijímaná strava navíc do jisté míry ovlivňuje koncentrace těchto produktů ve střevech. Výrazné rozdíly v závislosti na stravě byly naměřeny u indolu, ale 2-oxindol téměř nebyl ovlivněn (Dong *et al.*, 2020). Aktivace AhR i PXR deriváty 2-oxindolu již byla popsána v kapitolách 3.2.1 a 3.3.1. Deriváty oxindolu indirubinu inhibují glykogen syntázu kinázu-3, která je důležitá v procesu šíření nádorových buněk, a zabraňují nádorové angiogenezi (Williams *et al.*, 2011). Farmakologický význam oxindolů je nepřehlédnutelný a některé synteticky připravené deriváty jsou schváleny jako dostupná léčiva (Sunitinib, Nintedanib, Indolidan a další) (Khetmalis *et al.*, 2021). Sunitinib a Nintedanib jsou inhibitory tyrosinkinázových receptorů a tím jsou schopny blokovat proliferaci některých nádorových buněk (Hilberg *et al.*, 2008; Mendel *et al.*, 2015). Indolidan je používán jako léčivo kardiovaskulárních onemocnění (Khetmalis *et al.*, 2021).

Zajímavá je skutečnost, že účinky derivátů oxindolu jsou často závislé na substituentech a na jaké pozici v oxindolovém jádře k substituci došlo. Substituce halogeny na 5. uhlíku v některých nasyntetizovaných oxindolových derivátech způsobila cytotoxicitu vůči lidským nádorovým buněčným liniím. Substituce bromem měla vyšší vliv na cytotoxicitu než substituce chlorem nebo fluorem (Sharma *et al.*, 2016). Substituce chlorem na 6. uhlíku a současně substituce na 5. uhlíku heterocyklickou sloučeninou měla za následek inhibici růstu buněk několika lidských nádorových linií a případně i genotoxicitu (Meti *et al.*, 2016). Antimikrobiální účinky derivátů vykazují variabilitu v závislosti na testovaném mikroorganismu, ale obecně deriváty se substituentem na 1. pozici obsahujícím -CF₃ nebo -Br skupinu měly prokazatelně lepší antimikrobiální vlastnosti (Yagnam *et al.*, 2019). Deriváty s dusíkatým nebo sirným heterocyklem na 3. pozici a současně s -Br nebo -Cl skupinou na 4. nebo 5. pozici se od ostatních testovaných sloučenin lišily antibakteriální aktivitou vůči rodu *Staphylococcus*, ale ne vůči gramnegativním bakteriím (Shin *et al.*, 2019).

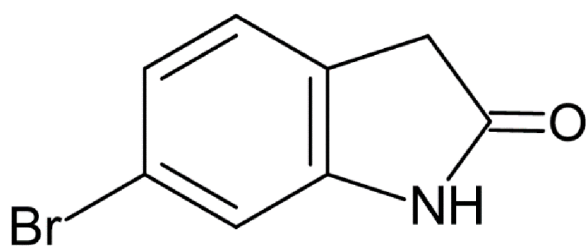
V rámci této bakalářské práce byly testovány vlivy 3 derivátů 2-oxindolu na aktivitu AhR a PXR. Jedná se o komerčně dostupné syntetické látky, 5-brom-2-oxindol (Obrázek 5), 6-brom-2-oxindol (Obrázek 6) a 5-fluor-2-oxindol (Obrázek 7).



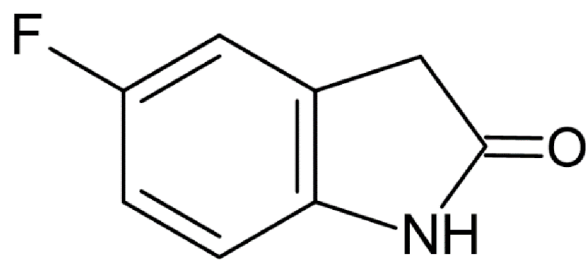
Obrázek 4: Struktura 2-oxindolu



Obrázek 5: Struktura 5-brom-2-oxindolu



Obrázek 6: Struktura 6-brom-2-oxindolu



Obrázek 7: Struktura 5-fluor-2-oxindolu

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Parentální buněčná linie adenokarcinomu tlustého střeva LS174T (ATCC: CL-188; 7 000 3535)

Stabilně transfekovaná buněčná linie LS174T-AhR.

4.2 Plazmidy

plazmid pGL-4.27-DRE – plazmid použitý ke stabilní transfekci buněk linie LS174T-AhR. Plazmid nese gen pro rezistenci na hygromycin a současně gen pro luciferázu jakožto reportérový protein. Plazmid v promotorové oblasti obsahuje dioxin responsivní elementy (DREs).

plazmid pSG5-hPXR a reportérový vektor p3A4-luc – použity k transientní transfekci buněk LS174T pro testování aktivace PXR. Plazmid pSG5-hPXR kóduje gen pro lidský pregnanový X receptor.

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- 0,25% Trypsin-EDTA (Biosera, LM-T1720)
- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (LGC Standards)
- 5-brom-2-oxindol (Santa Cruz Biotechnology, sc-254784)
- 5-fluor-2-oxindol (Sigma-Aldrich, 586579)
- 6-brom-2-oxindol (Sigma-Aldrich, 586595)
- Adenosin-5'-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich, A6419)
- Antibiotika penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich, P4338)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, 20022-CT0)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, 43819)
- D-luciferin (Sigma-Aldrich, L9504)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) (Sigma-Aldrich, D6546)
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biosera, LM-S2041)
- Fetální bovinní sérum, charcoal stripped (FBS CS) (Sigma-Aldrich, F6765)

- Fetální bovinní sérum, regulární (FBS) (Sigma-Aldrich, M5921)
- FuGENE HD (Promega, E2312)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich, M5921)
- Hygromycin B (Santa Cruz Biotechnology, SC-29067)
- Koenzym A (Sigma-Aldrich, C4780)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, E6511)
- L-glutamin (SERANA, RGL-001)
- Lyzační pufr (Promega, E3971)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, M7145)
- Rifampicin (RIF) (Sigma-Aldrich, R3501)
- Tris-acetát-EDTA pufr (Sigma-Aldrich, T8280)
- Triton X-100 (Serva, 37 240)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, T6146)

4.4 Složení použitých roztoků

- Substrát pro luciferázu: 5 mg D-luciferin; 10 mg ATP; 5 mg koenzym A; 168 mg dithiotreitol; 1,32 ml Tris-acetát-EDTA pufr (1M, pH 7,8); 1,23 mg EDTA; 3,03 mg heptahydrát síranu hořečnatého; do 30 ml doplněno destilovanou vodou
- Kultivační médium s regulárním FBS: 500 ml DMEM; 50 ml FBS; 5 ml neesenciální aminokyseliny; 5 ml L-glutamin; 5 ml antibiotika penicilin, streptomycin
- Kultivační médium s charcoal stripped FBS: 500 ml DMEM; 50 ml FBS-CS; 5 ml neesenciální aminokyseliny; 5 ml L-glutamin; 5 ml antibiotika penicilin, streptomycin

4.5 Seznam laboratorních přístrojů a zařízení

- CO₂ inkubátor (NB-203 XL, N-Biotek)
- Laboratorní třepačka (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)
- Laminární box (Labculture Class II Type A2, Esco)
- Mikroskop (NIB100, Novel Optics)
- Odsávačka (Flask-Trap 1, Biosan)
- Optický systém (Infinite M200, Tecan)

- Vodní lázeň (LCB-11D, Labtech)
- Vortex (Reax top, Heidolph)

4.6 Kultivace a pasážování buněk

Buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích o ploše 75 nebo 150 cm². Lahve byly uchovávány v inkubátoru s teplotou 37 °C, 95% vlhkostí a atmosférou s 5 % CO₂.

Pasážování bylo prováděno každé 3–4 dny, aby byla získána buněčná suspenze pro započetí experimentu. Současně se tak zabrání kontaktní inhibici buněk z důvodu vysoké úrovně konfluence.

1. Kultivační médium a fosfátový pufr (PBS) byly ve vodní lázni rozeřhřaty na teplotu 37 °C. Trypsin byl rozmražen při pokojové teplotě.
2. Kultivační lahev byla vytažena z inkubátoru a stav buněk byl pozorován pomocí mikroskopu. Lahev byla přenesena do laminárního boxu.
3. Médium, PBS a trypsin byly vydesinfikovány a přeneseny do laminárního boxu.
4. Stávající médium bylo odsáto pomocí odsávačky.
5. Zbytky média z lahve byly odstraněny promytím 5 ml PBS a následným odsátím.
6. Do lahve byl pipetován 1 ml trypsinu. Naklápěním lahve byl trypsin rozprostřen po celé kultivační ploše lahve.
7. Lahev byla přenesena do inkubátoru na přibližně 5 minut. Teplotou aktivovaný trypsin uvolnil buňky z povrchu lahve.
8. Lahev byla přenesena zpět do laminárního boxu a bylo přidáno 9 ml média.
9. Buňky byly resuspendovány opakovaným nasáváním a vypouštěním sérologickou pipetou a pipetovacím nástavcem.
10. Suspenze byla přenesena do 50ml centrifugační zkumavky.
11. 10 µl suspenze bylo přeneseno do 0,5ml mikrozukavky k následnému počítání buněk.
12. Přibližně 2 ml suspenze byly přeneseny zpět do lahve a bylo přidáno 20 ml média. Kultivační lahev byla umístěna zpět do inkubátoru.

V případě pasážování buněk kultivovaných v lahvích o ploše 150 cm² byly použity 2x větší objemy reagensů.

4.7 Počítání buněk a vyšetí na desky

Počet buněk v získané suspenzi byl stanoven za použití trypanové modři a Bürkerovy komůrky. Mrtvé buňky mají narušenou integritu membrán a barvivo se dostává do jejich vnitřních prostor. Do živých buněk se modř nedostane, což umožňuje počítání ve světelném mikroskopu.

1. K 10 μl buněčné suspenze bylo přidáno 90 μl trypanové modři.
2. Nanášecí plochy Bürkerovy komůrky byly přikryty krycími skly. Do prostor mezi skly a komůrkou byla pipetována směs buněk a trypanové modři.
3. Komůrka byla přenesena do světelného mikroskopu. Byly spočítány buňky v 5 zorných polích horní a 5 zorných polích spodní části Bürkerovy komůrky.
4. Hodnoty byly sečteny a přepočítány na počet buněk v 1 ml buněčné suspenze.
5. Byly vypočítány objemy suspenze a média pro dané experimenty.
6. Buňky byly vysety do 96jamkových desek. Pro MTT 200 μl média a 40 000 buněk na jamku. Pro reporter gene assay 200 μl média a 80 000 buněk na jamku pro 4hodinový test, 200 μl média a 40 000 buněk na jamku pro 24hodinový test.
7. Desky s vyšetými buňkami byly vloženy do inkubátoru.

4.8 Příprava látek

Zásobní roztoky testovaných látek a kontrol byly pro jednotlivé testy ředěny na požadované koncentrace. Pro stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu bylo k ředění použito kultivační médium. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. 2% Triton X-100 sloužil jako pozitivní kontrola. Koncentrace roztoků derivátů 2-oxindolu pro MTT testy činily 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM a 200 μM .

V případě testování aktivace AhR metodou reporter gene assay (RGA) byly veškeré vzorky ředěny v depletovaném DMEM, což je částečně zmetabolizované médium odebrané z kultivační lahve s buňkami. Pro testování aktivace PXR metodou RGA byly vzorky ředěny v médiu obsahující charcoal stripped FBS, sérum filtrované přes aktivní uhlí. Jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMSO. Modelovým ligandem pro AhR byl 10nM roztok TCDD. Jako modelový ligand pro PXR byl použit 10 μM rifampicin. Koncentrace roztoků derivátů 2-oxindolu použitých v luciferázové reportérové esaji činily 100 nM, 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM a 200 μM . Pro látku 6-brom-2-oxindol byly navíc použity i koncentrace 1 a 10 nM.

Koncentrace zásobních roztoků testovaných látek a jejich ředění zachycuje tabulka (Tabulka 1).

Tabulka 1: Ředění testovaných látek

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace zředěného roztoku	Ředění
5-brom-2-oxindol 6-brom-2-oxindol 5-fluor-2-oxindol	1 μM	1 nM	1000x
	10 μM	10 nM	
	100 μM	100 nM	
	1 mM	1 μM	
	10 mM	10 μM	
	25 mM	25 μM	
	50 mM	50 μM	
	100 mM	100 μM	
	200 mM	200 μM	

4.9 MTT test

Cytotoxicita vybraných derivátů 2-oxindolu byla vyhodnocena provedením MTT testu, který je založen na skutečnosti, že v živých buňkách jsou aktivní mitochondriální dehydrogenázy. Ty jsou schopny redukovat žlutý substrát MTT na fialově zbarvený formazan ve formě krystalů. Mrtvé buňky tohoto procesu nejsou schopny. Následně jsou krystaly rozpuštěny v rozpouštědle DMSO. Spektrofotometricky lze stanovit absorbance v jednotlivých jamkách a určit životnost přítomných buněk.

1. Byla provedena pasáž buněk a jejich následné spočítání. Podle množství buněk byly vypočítány objemy buněčné suspenze a média potřebné pro vysetí na 96jamkové desky tak, aby v jamkách bylo 200 μl buněčné suspenze po 40 000 buňkách.
2. Desky byly do druhého dne umístěny do inkubátoru.
3. Byly připraveny roztoky testovaných látek, pozitivní kontroly (Triton X-100) a negativní kontroly (DMSO) ředěním zásobních roztoků médiem.
4. Pomocí laboratorní odsávačky bylo z jamek odstraněno přítomné médium. Následně byla provedena aplikace připravených roztoků na buňky. Každý vzorek byl pipetován do 4 jamek desky.
5. Desky byly vloženy na 24 h. do inkubátoru.

6. Po 24hodinové kultivaci byl připraven 10x zředěný roztok MTT ze zásobního roztoku o koncentraci $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.
7. Desky byly vyňaty z inkubátoru a médium přítomné v jamkách bylo vyklepnuto do výlevky.
8. Residua média v jamkách byla vymyta $100 \mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$.
9. Desky byly vyklepnuty do výlevky.
10. Do jamek bylo pipetováno po $100 \mu\text{l}$ médiem zředěného roztoku MTT.
11. Desky byly inkubovány při 37°C do doby, než se v jamkách vytvořily modrofialové krystaly.
12. Desky byly vyklepnuty do výlevky.
13. Krystaly byly rozpuštěny přidavkem $70 \mu\text{l}$ DMSO.
14. Pomocí spektrofotometru a programu i-control (měření při vlnové délce 570 nm , protřepání desky po 10 s , měření uprostřed) byly stanoveny hodnoty absorpance pro zvolené jamky.
15. Ze získaných dat byly určeny hodnoty viability buněk pro jednotlivé látky a jejich použité koncentrace. Z výsledků byly sestaveny grafy závislosti koncentrací použitých látek na životnosti buněk.

4.10 Lipofekce

Metoda RGA vyžaduje, aby testované buňky nesly reportérový gen, jenž umožňuje stanovení míry aktivace daného receptoru a následné transkripce tohoto genu. Zkoumání vlivu derivátů 2-oxindolu na aktivaci PXR bylo prováděno na buňkách LS174T, které na rozdíl od buněk LS174T-AhR nebyly stabilně transfekovány. Před prováděním RGA byly buňky LS174T transientně transfekovány lipofekcí. Lipofekční činidlo FuGENE HD obalí DNA z transfekční směsi a ve formě lipozomů ji vnese do recipientních buněk. Transfekční směs sestává z média Optimem, lipofekčního činidla FuGENE HD, reportérového vektoru p3A4-luc a plazmidu pSG5-hPXR. Parametry složek směsi pro přípravu experimentu o 300 jamkách jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Množství jednotlivých složek pro přípravu lipofekční směsi a následnou luciferázovou reportérovou esej.

	1 jamka	300 jamek
Buňky LS174T	40 000	12 000 000
Médium (ml)	0,2	60
	3 jamky	300 jamek
Optimem (μl)	20	2 000
FuGENE HD (μl)*	1,2	120
PXR**	0,1 μg	10 μg = 10,3 μl
Reporter***	0,3 μg	30 μg = 34,2 μl

*FuGENE HD v poměru 3:1 k celkovému množství DNA (PXR + reporter)

**Zásobní plazmid pSG5-hPXR o koncentraci 970 ng·μl⁻¹

***Zásobní reportérový vektor p3A4-luc o koncentraci 878 ng·μl⁻¹

1. Buňky byly zpasážovány a spočítány.
2. Do 5ml mikrozkušavky bylo napipetováno médium Optimem a FuGENE HD. Mikrozkušavka se v laminárním boxu nechala inkubovat po dobu 5 min.
3. Do 5ml mikrozkušavky byly pipetovány reporter a PXR plazmidy.
4. Po dokončení inkubace byla směs Optimem + FuGENE HD přenesena do mikrozkušavky obsahující DNA.
5. Vytvořená směs byla důkladně promíchána a ponechala se v laminárním boxu inkubovat po dobu 15 min.
6. Byla připravena buněčná suspenze o požadovaném množství buněk.
7. Po uplynutí inkubace byla směs přenesena do buněčné suspenze. Suspenze byla promíchána a bylo provedeno vyšetření buněk na 96jamkové desky po 200 μl suspenze na jamku.

4.11 Reporter gene assay

Bioluminiscenční metoda luciferázová reportérová esej je založena na enzymatické reakci luciferázy a substrátu D-Luciferinu. Oxidací D-Luciferinu dochází k emisi světla, které je měřitelné. Transfekce pomocí speciálně zkonstruovaných vektorů umožňuje vpravení

reportérového genu pro luciferázu a příslušné promotorové oblasti do buněk. Z naměřených hodnot bioluminiscence je následně stanovena míra aktivace sledovaného receptoru.

Při sledování aktivace AhR byly experimenty vyhodnoceny po 4 a 24hodinové inkubaci látek s buňkami. Vliv testovaných látek na aktivaci PXR byl vyhodnocen po 24hodinové inkubaci látek s buňkami.

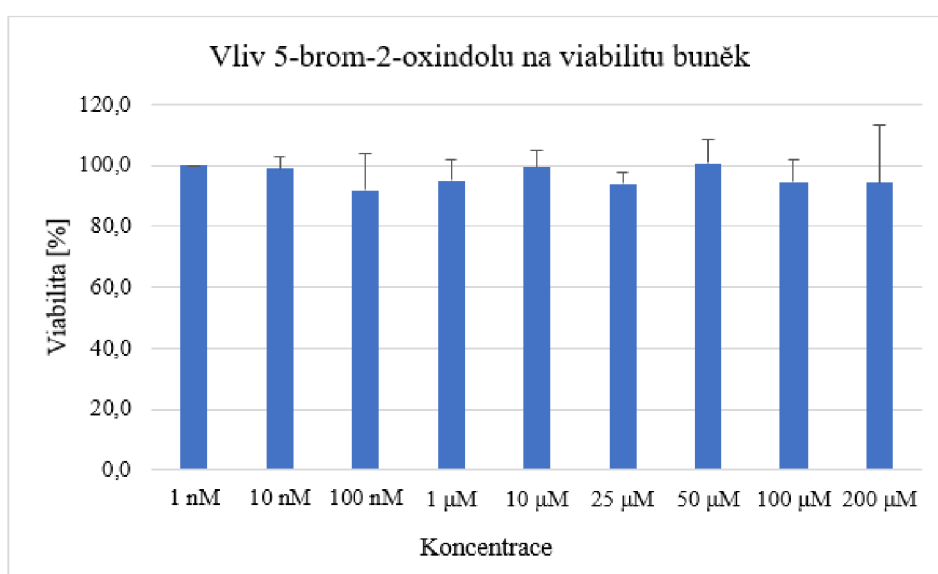
1. Buňky byly zpasážovány a spočítány. Byly připraveny buněčné suspenze podle postupu v kapitole 4.7. Při testování PXR byla provedena transfekce podle postupu v kapitole 4.10. Buňky byly vysety na 96jamkové desky.
2. Desky byly na 24 hodin umístěny do inkubátoru.
3. Po inkubaci byly připraveny roztoky testovaných látek a kontrol a byla provedena jejich aplikace na buňky.
4. Desky byly inkubovány po dobu 4 nebo 24 hodin v inkubátoru.
5. Po uplynutí inkubační doby bylo z desek vyklepnuto médium.
6. Jamky byly promyty 80 μ l 1x PBS.
7. Desky byly vyklepnuty do výlevky.
8. Do jamek bylo pipetováno 20 μ l lyzačního pufru. Desky byly umístěny do mrazáku s teplotou -80°C do úplného zamražení přítomného lyzačního pufru.
9. Desky byly rozmrazeny na stolní třepače.
10. 6 μ l lyzátu bylo z každé jamky přeneseno do speciálních desek pro měření luminiscence.
11. Bylo přidáno 30 μ l substrátu obsahující D-Luciferin do každé jamky.
12. Desky byly proměřeny ve spektrofotometru. V programu i-control byl nastaven program pro měření bioluminiscence pro luciferázovou reportérovou esej.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení cytotoxických účinků testovaných látek pomocí MTT testu

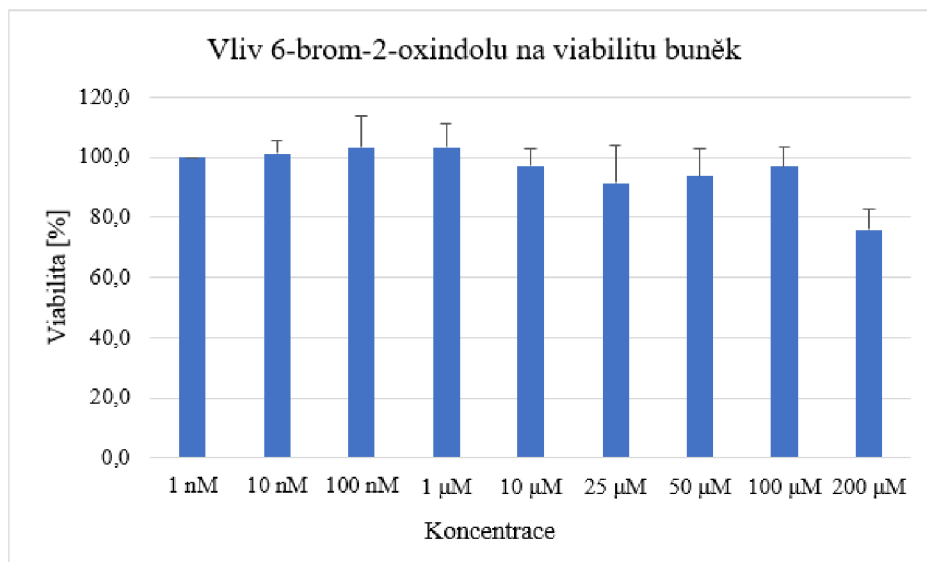
Při kultivaci buněk s chemikáliemi existuje pravděpodobnost, že na buňky bude látka při určité koncentraci působit toxicky. Potencionální cytotoxické účinky 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T byly vyhodnoceny pomocí MTT testu. Ze získaných dat byla stanovena viabilita buněk. Ta byla vyjádřena jako procentuální hodnota vztažená k nejnižší použité koncentraci aplikované látky (1 nM).

Viabilita buněk vystavených 24hodinovému účinku 5-brom-2-oxindolu nebyla výrazně ovlivněna (Graf 1). Životnost buněk se v rámci všech použitých koncentracích 5-brom-2-oxindolu pohybovala kolem hodnoty 100 %.



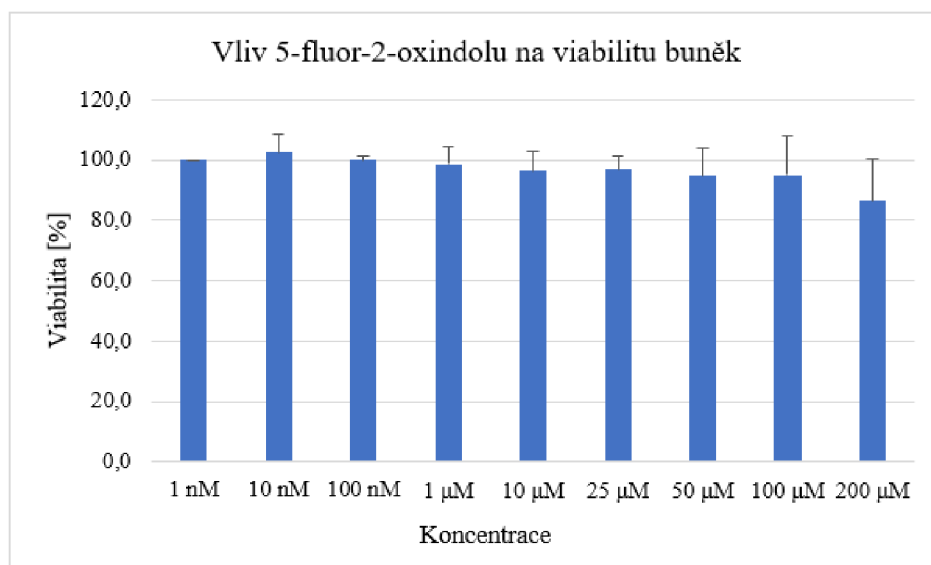
Graf 1: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 5-brom-2-oxindolu. 5-brom-2-oxindol byl testován v koncentracích 1 nM – 200 μM. Graf byl sestaven z výsledků čtyř nezávislých opakování MTT testu pro tuto látku.

Po 24 hodinách působení 6-brom-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T nedošlo k vyššímu poklesu životnosti buněk u většiny použitých koncentrací (Graf 2). Při nejvyšší koncentraci 6-brom-2-oxindolu (200 μM) byla viabilita $75,9 \% \pm 7,1 \%$. U koncentrací nižších se životnosti buněk pohybovaly okolo 100 %.



Graf 2: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 6-brom-2-oxindolu. 6-brom-2-oxindol byl testován v koncentracích 1 nM – 200 μM . Graf byl sestaven z výsledků tří nezávislých opakování MTT testu pro tuto látku.

Rovněž ani u 5-fluor-2-oxindolu nebyl zaznamenán významný pokles viabilit buněk LS174T po 24 hodinách společné inkubace (Graf 3). Životnosti buněk se pro koncentrace 1 nM – 100 μM nacházejí v rozmezí 100 a 94,7 %. Nejnižší zaznamenaná hodnota viability byla $86,6 \% \pm 13,9 \%$ pro 5-fluor-2-oxindol o koncentraci 200 μM .



Graf 3: Viabilita buněk LS174T po 24hodinovém působení 5-fluor-2-oxindolu. 5-fluor-2-oxindol byl testován v koncentracích 1 nM – 200 μM. Graf byl sestaven z výsledků tří nezávislých opakování MTT testu pro tuto látku.

Z výše uvedených výsledků bylo usouzeno, že žádný z použitých derivátů 2-oxindolu nebyl při použitých koncentracích (1 nM – 200 μM) výrazně cytotoxický, což znamená, že luciferázovou reportérovou esej bylo možné provést se všemi navrženými koncentracemi.

5.2 Stanovení vlivu derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR

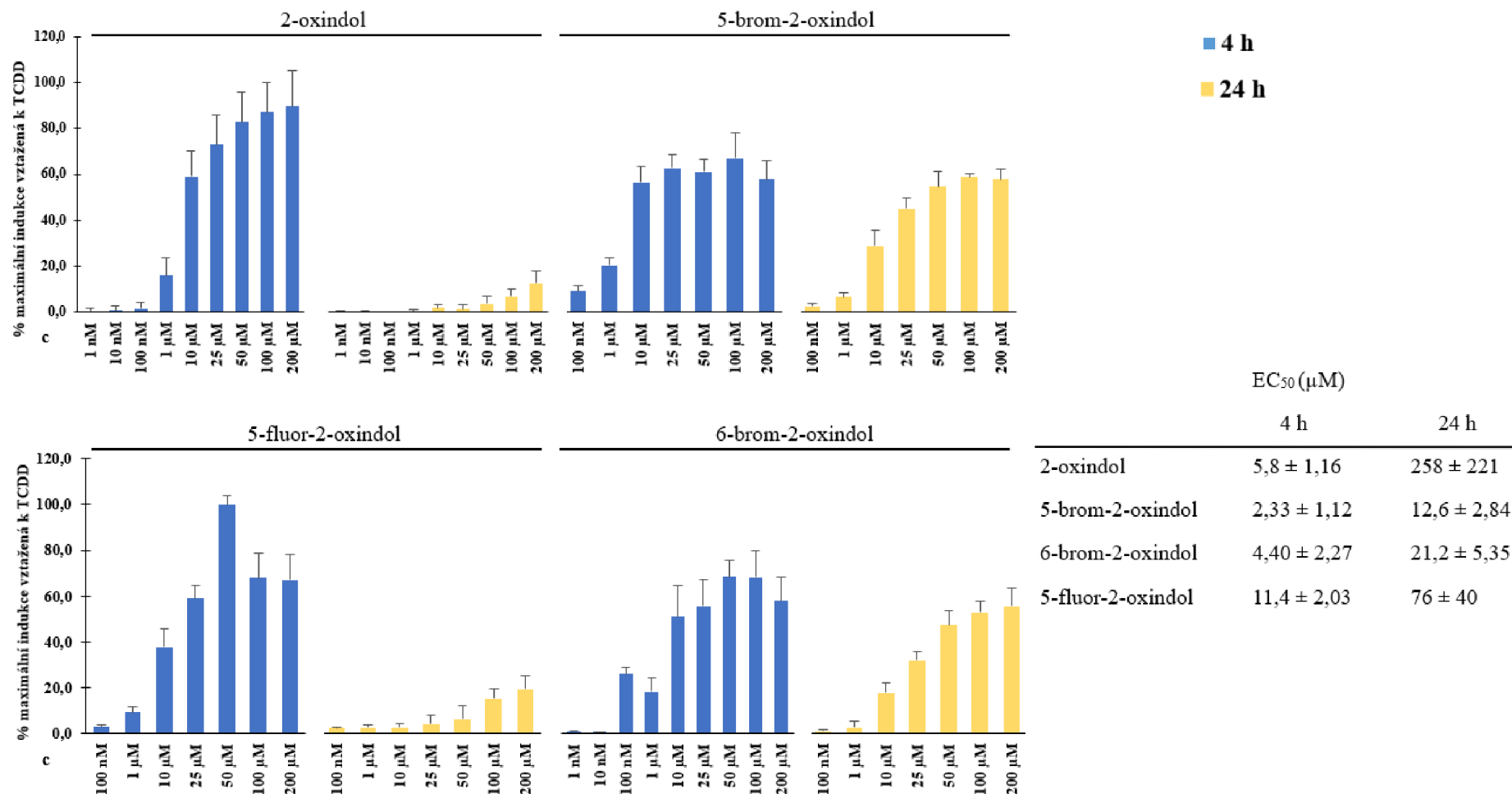
Potencionální účinky derivátů 2-oxindolu (5-brom-2-oxindol, 6-brom-2-oxindol a 5-fluor-2-oxindol) na aktivaci AhR v buňkách linie LS174T-AhR byly zkoumány pomocí luciferázové reportérové eseje (Obrázek 8). Účinky těchto derivátů byly porovnány s 2-oxindolem. Hodnoty bioluminiscenčního signálu byly přepočítány do formy násobků indukce vůči negativní kontrole DMSO (fold induction) luciferázové aktivity. Hodnoty násobků indukce byly vztaženy k pozitivní kontrole (10nM TCDD), která odpovídala 100% indukci. Výsledky experimentů zahrnují také hodnoty EC_{50} , které udávají koncentraci testované látky, při které je dosaženo 50 % maximálního účinku. Ty byly vygenerovány s pomocí vedoucí práce za použití softwaru GraphPad Prism 9.

Po 4hodinovém působení vyvolal 2-oxindol maximální odpověď při koncentraci 200 μM, což odpovídá účinnosti $89,8 \pm 15,4$ %. Substituce bromem na pozici 5 a 6 měla za následek snížení míry aktivace AhR v porovnání s 2-oxindolem o zhruba 28 %. Účinnost bromovaných derivátů na aktivitu AhR byla po 4 hodinách srovnatelná, při koncentraci 10 μM se pohybovala kolem 50 % a již se výrazně neměnila. Testovaný 6-brom-2-oxindol byl na rozdíl od 5-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu doplněn o opakování s 2 nižšími koncentracemi,

tedy 1 a 10 nM, a to z toho důvodu, že již při koncentraci 100 nM indukce činila $25,8 \pm 3,7 \%$. Nicméně konečná schopnost 6-brom-2-oxindolu aktivovat AhR při těchto koncentracích byla téměř nulová. Konkrétně se jednalo o indukci 1 % při koncentraci 1 nM a 0,8 % při koncentraci 10 nM. Nejvyšší účinnost, $99,8 \pm 3,9 \%$, byla zaznamenána u 5-fluor-2-oxindolu s koncentrací 50 μM po 4 hodinách působení testovaných látek. S další zvyšující se koncentrací však klesla na hodnoty $68,0 \pm 10,7 \%$ pro koncentraci 100 μM a $67,0 \pm 10,9 \%$ pro koncentraci 200 μM . Hodnoty EC_{50} po 4h působení studovaných látek jsou velmi podobné. Nejvyšší potenci ze všech čtyř oxindolů vykazuje 5-brom-2-oxindol s EC_{50} $2,33 \pm 1,12 \mu\text{M}$ následovaný 6-brom-2-oxindolem s EC_{50} $4,40 \pm 2,27 \mu\text{M}$. EC_{50} pro 2-oxindol byla stanovena jako $5,8 \pm 1,16 \mu\text{M}$. Potence 5-fluor-2-oxindolu byla nejnižší s hodnotou EC_{50} rovné $11,4 \pm 2,03 \mu\text{M}$.

Znatelný pokles v transkripční aktivitě AhR byl pozorován při 24hodinovém působení testovaných látek u 2-oxindolu (Obrázek 8). K obdobnému poklesu došlo i u 5-fluor-2-oxindolu. Maximální účinnost zde dosahovala hodnoty $19,5 \pm 5,6 \%$ při koncentraci 200 μM , což odpovídá poklesu o zhruba 80 % v porovnání s 4hodinovými experimenty. Na druhou stranu účinnost bromovaných derivátů 2-oxindolu po 24 hodinách působení na buněčnou linii LS174T-AhR poklesla pouze mírně při srovnání s výsledky, kdy jim buňky byly vystaveny 4 hodiny. Nejvyšší účinnost po inkubaci s 5-brom-2-oxindolem nastala při koncentraci 100 μM a jednalo se o hodnotu $59,0 \pm 1,7 \%$. Podobná maximální hodnota, $55,4 \pm 7,9 \%$, byla stanovena i u 6-brom-2-oxindolu o koncentraci 200 μM . Účinnosti těchto látek tedy jsou téměř totožné, nicméně 5-brom-2-oxindol v tomto případě vyvolal maximální odpověď při nižší koncentraci než 6-brom-2-oxindol, což se odráží i v hodnotách EC_{50} . Ta se pro 5-brom-2-oxidnol rovná $12,6 \pm 2,84 \mu\text{M}$ a pro 6-brom-2-oxindol $21,2 \pm 5,35 \mu\text{M}$. Hodnoty EC_{50} pro 5-fluor-2-oxindol ($76 \pm 40 \mu\text{M}$) a 2-oxindol ($258 \pm 221 \mu\text{M}$) jsou pouze orientační.

Vliv 2-oxindolu a jeho vybraných derivátů na transkripční aktivitu AhR



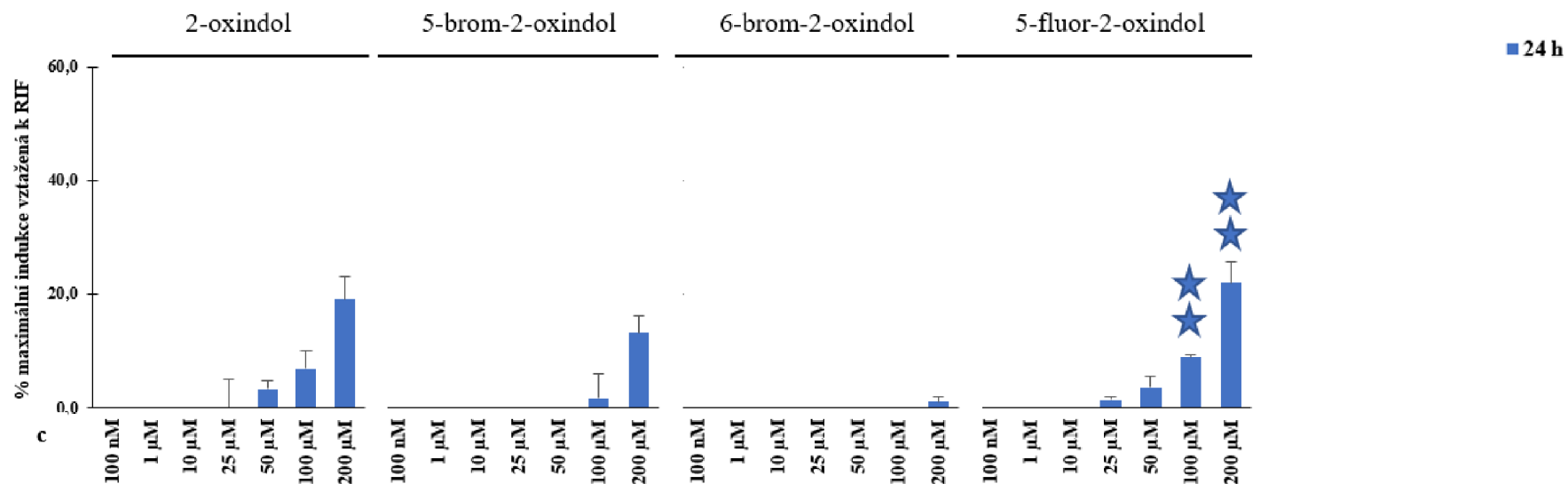
Obrázek 8: Transkripční aktivita AhR a hodnoty EC₅₀ po 4 a 24hodinovém působení daných koncentrací (c) 2-oxindolu a jeho derivátů 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. Grafy byly sestaveny z výsledků 3 nezávislých experimentů s výjimkou grafů pro 2-oxindol (4 h) a 6-brom-2-oxindol (4 h), které byly sestaveny ze 4 nezávislých opakování RGA. Jako pozitivní kontrola byl použit modelový ligand AhR TCDD o koncentraci 10 nM, jako negativní kontrola 0,1% DMSO.

5.3 Stanovení vlivu derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu PXR

Podobně jako v případě AhR, i pro pregnanový X receptor byla použita luciferázová reporter gene assay ke stanovení aktivace receptoru studovanými látkami a výsledky byly porovnány s 2-oxindolem. Výsledné hodnoty bioluminiscence byly přepočítány do formy násobků indukce vůči negativní kontrole DMSO (fold induction) luciferázové aktivity. Hodnoty násobků indukce byly vztaženy k pozitivní kontrole (10 μ M RIF), která odpovídala 100% indukci. Grafické zobrazení získaných dat je prezentováno na obrázku 9.

Vliv vybraných derivátů na aktivaci PXR byl vyhodnocován po 24 hodinách společné inkubace s buňkami. Nejvyšší účinnost 2-oxindolu na aktivaci PXR byla pozorována při koncentraci 200 μ M ($19,2 \pm 4,0$ %). Přítomnost bromu na 5. pozici v tomto případě vyvolala pokles aktivace PXR v porovnání s 2-oxindolem o téměř 6 %. Současně zde lze pozorovat vliv polohy substituentu v rámci oxindolové kostry na výslednou aktivitu receptoru. Na rozdíl od 5-brom-2-oxindolu, kde byla nejvyšší účinnost $13,3 \pm 2,9$ % pro koncentraci 200 μ M, u 6-brom-2-oxindolu klesla na $1,1 \pm 0,8$ %. V porovnání s ostatními látkami byla nejvyšší míra aktivace PXR zaznamenána pro látku 5-fluor-2-oxindol o koncentraci 200 μ M ($22,1 \pm 3,8$ %).

Vliv 2-oxindolu a jeho vybraných derivátů na transkripční aktivitu PXR



Obrázek 9: Transkripční aktivita PXR po 24hodinovém působení daných koncentrací (c) 2-oxindolu a jeho derivátů 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu na buněčnou linii LS174T. Grafy byly sestaveny z výsledků 3 nezávislých opakování RGA s výjimkou grafu pro 2-oxindol, který byl sestaven ze 2 nezávislých opakování. Jako pozitivní kontrola byl použit modelový ligand pro PXR, rifampicin (RIF), o koncentraci 10 μM. Jako negativní kontrola 0,1% DMSO. Dvě hvězdy značí statisticky signifikantní hodnoty ($p < 0,01$).

6 DISKUZE

Arylhlovodíkový a pregnanový X receptor jsou kvůli svému zapojení se do širokého množství buněčných procesů intenzivně studovány. Jedním z objevů je skutečnost, že střevní mikroflóra generuje produkty, které mohou tyto receptory aktivovat, což ovlivňuje střevní zdraví. Velkou skupinou takových látek jsou metabolity tryptofanu, které byly identifikovány jako selektivní nebo duální agonisté AhR a PXR (Dong *et al.*, 2020; Illés *et al.*, 2020; Vrzalová *et al.*, 2020; Vyhlídalová *et al.*, 2020b). Ve střevním prostředí tak regulace transkripční aktivity těchto receptorů může sloužit jako jeden z možných přístupů léčby onemocnění zahrnující například idiopatické střevní záněty.

V této bakalářské práci byl sledován účinek derivátů 2-oxindolu, 5-brom-2-oxindol, 6-brom-2-oxindol a 5-fluor-2-oxindol na aktivaci AhR a PXR v lidské buněčné linii LS174T a z ní stabilně transfekované linie LS174T-AhR, které jsou odvozeny od adenokarcinomu tlustého střeva. V současné době neexistuje mnoho studií, které by se zabývaly působením 2-oxindolu a jeho derivátu ve vztahu k aktivaci AhR a PXR i přes to, že se jedná o látku, která se hojně vyskytuje ve střevním traktu a v tomto prostředí představuje 2. nejvíce zastoupený metabolit tryptofanu po indolu. Koncentrace 2-oxindolu ve vzorcích lidské stolice se pohybovala kolem hodnoty 148 μM a změny v koncentraci nebyly příliš ovlivněny přijímanou stravou (Dong *et al.*, 2020). Oxindoly navíc vykazují rozmanitou biologickou aktivitu, která do jisté míry závisí na substitucích v rámci 2-oxindolové kostry (Khetmalis *et al.*, 2021).

První provedené experimenty byly zaměřené na stanovení potenciálně toxických účinků testovaných látek na buněčnou linii LS174T pomocí MTT testu. Ze získaných výsledků nebyl žádný z testovaných derivátů při použitých koncentracích vyhodnocen jako cytotoxický. Nejnižší viabilita byla pozorována u 6-brom-2-oxindolu o koncentraci 200 μM , kde viabilita klesla na $75,9\% \pm 7,1\%$. Ve studii Sharma *et al.* (2016) pracovali s uměle nasyntetizovanými deriváty 2-oxindolu se specificky zavedenými substituenty. Aplikovaný 5-brom-derivát vykazoval nejvyšší cytotoxické účinky v porovnání s ostatními testovanými látkami, mezi nimiž byly i sloučeniny lišící se pouze navázaným fluorem nebo například chlorem na 5. pozici 2-oxindolové kostry namísto bromu. Obzvláště cytotoxických účinků dosahoval zmiňovaný 5-brom-derivát na buněčných liniích rakoviny prsu. Je však nutné uvést, že v citované studii pracovali se strukturně složitějšími látkami a výsledky tak nelze porovnávat. Nicméně i přes to v této práci nebyl pozorován přímý vztah mezi substitucí atomem bromu a fluoru na pozicích 5 a 6 a finální cytotoxicitou.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo testování vlivu zkoumaných derivátů 2-oxindolu na transkripční aktivitu AhR a PXR pomocí luciferázové reportérové eseje (Obrázek 8 a 9). Z výsledků lze usoudit, že všechny deriváty aktivovaly AhR po 4 hodinách působení. Ve srovnání s 2-oxindolem, 5-brom-2-oxindol a 6-brom-2-oxindol vykazovaly nižší účinnosti, konkrétně $67,1 \pm 11,1 \%$ a $69,8 \pm 12,8 \%$. Podobných výsledků bylo dosaženo v publikaci pro indol a indol-3-akrylát s účinnostmi $66 \pm 26 \%$ a $68 \pm 12 \%$ v jaterní buněčné linii AZ-AhR. Potence obou zmíněných látek je však nižší než v případě 5-brom-2-oxindolu a 6-brom-2-oxindolu (Vrzalová *et al.*, 2022). Nejvyšší aktivace AhR v tomto časovém módu nastala při inkubaci buněk s 5-fluor-2-oxindolem o koncentraci $50 \mu\text{M}$, kdy aktivita dosahovala $99,8 \pm 3,9 \%$. Koncentrace $100 \mu\text{M}$ a $200 \mu\text{M}$ však nevyvolaly další nárůst indukce, AhR již byl 5-fluor-2-oxindolem o koncentraci $50 \mu\text{M}$ saturován, a proto nárůst koncentrace nevedl k navýšení transkripční aktivity. Ve 24hodinovém módu výrazně klesla transkripční aktivita za použití 5-fluor-2-oxindolu a obdobný efekt nastal i v případě 2-oxindolu. Dalšími slabými aktivátory AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 hodinách ze skupiny mikrobiálních tryptofanových derivátů jsou indol-3-acetát, indol-3-laktát a kyselina indol-3-propionová (Vyhlídalová *et al.*, 2020b). Naopak pokles transkripční aktivity AhR v experimentech s bromovanými deriváty byl velmi malý a účinnosti obou těchto látek po 24hodinovém působení byly téměř identické. Poloha substituentu tak neměla vliv na transkripční aktivitu AhR. Lze však uvažovat o stabilizaci derivátů atomem halogenů, která může být ovlivněna atomovou hmotností daného halogenu. Atomová hmotnost bromu je téměř 5x větší než atomová hmotnost fluoru. V tomto ohledu mohou být velice přínosná testování s chlorovanými deriváty 2-oxindolu, jelikož se jedná o halogen s atomovou hmotností ležící mezi fluorem a bromem.

Při testování transkripční aktivity PXR po 24 hodinách účinkování vybraných derivátů byl 5-fluor-2-oxindol látkou s největší účinností. Signifikantní nárůst transkripční aktivity PXR byl pozorován při koncentracích $100 \mu\text{M}$ ($9,0 \pm 0,4 \%$) a $200 \mu\text{M}$ ($22,1 \pm 3,8 \%$). Účinnost 2-oxindolu byla asi o 3 % nižší než 5-fluor-2-oxindolu. Bromované deriváty aktivovaly PXR velmi málo, 6-brom-2-oxindol téměř vůbec. Mezi další velmi slabé aktivátory PXR z tryptofanových metabolitů byly ve studii Illés *et al.* (2020) zařazeny tryptamin, indol-3-ethanol a indol-3-akrylát. Naopak například indol-3-acetamid aktivoval PXR více než deriváty testované v této práci.

Srovnáním výsledků z 24hodinových inkubací mezi AhR a PXR vykazovaly 2-oxindol a 5-fluor-2-oxindol podobné účinnosti. Látky 5-brom-2-oxindol a 6-brom-2-oxindol, které

aktivovaly AhR téměř stejnou mírou (zhruba 67 %), neaktivovaly PXR s výjimkou 5-brom-2-oxindolu ($13,3 \pm 2,9$ % při koncentraci 200 μM).

Případné experimenty do budoucna pro zjištění podrobnějšího účinku látek by mohly být založeny na sledování exprese cílových genů AhR a PXR na úrovni RNA například pomocí kvantitativní PCR.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl testován vliv 5-brom-2-oxindolu, 6-brom-2-oxindolu a 5-fluor-2-oxindolu, syntetických derivátů 2-oxindolu, na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového a pregnanového X receptoru v buněčné linii LS174T a z ní stabilně transfekované buněčné linie LS174T-AhR. Pomocí MTT testu nebyly tyto deriváty o testovaných koncentracích vyhodnoceny jako cytotoxické. Míra aktivace AhR a PXR těmito látkami byla testována provedením luciferázové reportérové eseje. Bylo zjištěno, že všechny studované deriváty aktivovaly AhR po 4 hodinách působení. Nicméně transkripční aktivita AhR po 24 hodinách účinkování významně poklesla při inkubaci s 5-fluor-2-oxindolem. Na rozdíl od 5-fluor-2-oxindolu byl pokles transkripční aktivity po 24hodinovém působení 5-brom-2-oxindolu a 6-brom-2-oxindolu jen velmi mírný. Dále bylo zjištěno, že 5-brom-2-oxindol aktivuje PXR velmi slabě, 6-brom-2-oxindol téměř vůbec. Derivátem s nejvyšší účinností byl 5-fluor-2-oxindol, u kterého byla pozorována slabá, ale signifikantní schopnost aktivace PXR.

8 SEZNAM LITERATURY

Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller C. A., Kato T., Saeki K., Matsuda T. (2001). Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(34), 31475-31478.

Bailey D. G., Dresser G., Arnold J. M. O. (2013). Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences?. *Canadian Medical Association Journal*, **185**(4), 309-316.

Bennett P., Ramsden D. B., Williams A. C. (1996). Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Molecular Pathology*, **49**(1), M12-M16.

Bjeldanes L. F., Kim J. Y., Grose K. R., Bartholomew J. C., Bradfield C. A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(21), 9543-9547.

Bonizzi G., Karin M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, **25**(6), 280-288.

Burbach K. M., Poland A., Bradfield C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**(17), 8185-8189.

Collingwood T. N., Urnov F. D., Wolffe A. P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *Journal of Molecular Endocrinology*, **23**(3), 255-275.

Coumoul X., Diry M., Barouki R. (2002). PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical Pharmacology*, **64**(10), 1513-1519.

De Juan A., Segura E. (2021). Modulation of Immune Responses by Nutritional Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Frontiers in Immunology*, **12**, 645168.

Dong F., Hao F., Murray I. A., Smith P. B., Koo I., Tindall A. M., Kris-Etherton P. M., Gowda K., Amin S. G., Patterson A. D., Perdew G. H. (2020). Intestinal microbiota-derived tryptophan metabolites are predictive of Ah receptor activity. *Gut Microbes*, **12**(1), 1–24.

Dreifuss A. A., Bastos-Pereira A. L., Ávila T. V., Soley B. da S., Rivero A. J., Aguilar J. L., Acco A. (2010). Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw

(*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *Journal of Ethnopharmacology*, **130**(1), 127-133.

Echchgadda I., Song C. S., Oh T., Ahmed M., De La Cruz I. J., Chatterjee B. (2007). The Xenobiotic-Sensing Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, and Orphan Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α in the Regulation of Human Steroid-/Bile Acid-Sulfotransferase. *Molecular Endocrinology*, **21**(9), 2099-2111.

Ema M., Matsushita N., Sogawa K., Ariyama T., Inazawa J., Nemoto T., Ota M., Oshimura M., Fujii-Kuriyama Y. (1994). Human Arylhydrocarbon Receptor: Functional Expression and Chromosomal Assignment to 7p211. *The Journal of Biochemistry*, **116**(4), 845-851.

Ema M., Sogawa K., Watanabe N., Chujoh Y., Matsushita N., Gotoh O., Funae Y., Fujii-Kuriyama Y. (1992). CDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **184**(1), 246-253.

Enan E., Matsumura F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochemical Pharmacology*, **52**(10), 1599-1612.

Eswaramoorthy S., Bonanno J. B., Burley S. K., Swaminathan S. (2006). Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(26), 9832-9837.

Fromm M. F., Busse D., Kroemer H. K., Eichelbaum M. (1996). Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology*, **24**(4), 796-801.

Fukunaga B. N., Probst M. R., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. (1995). Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(49), 29270-29278.

Gao K., Mu C. -long., Farzi A., Zhu W. -yun. (2020). Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Advances in Nutrition*, **11**(3), 709-723.

Goodwin B., Redinbo M. R., Klierer S. A. (2002). Regulation of CYP3A Gene Transcription by the Pregnane X Receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **42**(1), 1-23.

Guengerich F. P. (2019). Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, **294**(5), 1671-1680.

- Hankinson O. (2005). Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **433**(2), 379-386.
- Hardwick J. M., Soane L. (2013). Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(2), a008722-a008722.
- Heath-Pagliuso S., Rogers W. J., Tullis K., Seidel S. D., Cenijn P. H., Brouwer A., Denison M. S. (1998). Activation of the Ah Receptor by Tryptophan and Tryptophan Metabolites. *Biochemistry*, **37**(33), 11508-11515.
- Hilberg F., Roth G. J., Krssak M., Kautschitsch S., Sommergruber W., Tontsch-Grunt U., Garin-Chesa P., Bader G., Zoephel A., Quant J., Heckel A., Rettig W. J. (2008). BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Research*, **68**(12), 4774-4782.
- Honkakoski P., Sueyoshi T., Negishi M. (2009). Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. *Annals of Medicine*, **35**(3), 172-182.
- Huang G., Elferink C. J. (2012). A Novel Nonconsensus Xenobiotic Response Element Capable of Mediating Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Gene Expression. *Molecular Pharmacology*, **81**(3), 338-347.
- Hubbard T. D., Murray I. A., Bisson W. H., Lahoti T. S., Gowda K., Amin S. G., Patterson A. D., Perdew G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports*, **5**(1), 12689.
- Idle J. R., Gonzalez F. J. (2007). Metabolomics. *Cell Metabolism*, **6**(5), 348-351.
- Ihunnah C. A., Jiang M., Xie W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1812**(8), 956-963.
- Ikuta T., Kobayashi Y., Kawajiri K. (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **317**(2), 545-550.
- Illés P., Krasulová K., Vyhlídalová B., Poulíková K., Marcalíková A., Pečínková P., Sirotová N., Vrzal R., Mani S., Dvořák Z. (2020). Indole microbial intestinal metabolites expand the repertoire of ligands and agonists of the human pregnane X receptor. *Toxicology Letters*, **334**, 87-93.

Jancová P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. (2010). PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomedical Papers*, **154**(2), 103-116.

Jiang X., Williams K. M., Liauw W. S., Ammit A. J., Roufogalis B. D., Duke C. C., Day R. O., McLachlan A. J. (2004). Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **57**(5), 592-599.

Johnson D. R., Li C. -W., Chen L. -Y., Ghosh J. C., Chen J. D. (2005). Regulation and Binding of Pregnane X Receptor by Nuclear Receptor Corepressor Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors (SMRT). *Molecular Pharmacology*, **69**(1), 99-108.

Jürgensmeier J. M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., Reed J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(9), 4997-5002.

Karpale M., Käräjämäki A. J., Kummu O., Gylling H., Hyötyläinen T., Orešič M., Tolonen A., Hautajärvi H., Savolainen M. J., Ala-Korpela M., Hukkanen J., Hakkola J. (2021). Activation of pregnane X receptor induces atherogenic lipids and PCSK9 by a SREBP2-mediated mechanism. *British Journal of Pharmacology*, **178**(12), 2461-2481.

Kato S., Kuriyama Y. F., Ohtake F. (2007). A new signaling pathway of dioxin receptor ligands through targeted protein degradation. *AATEX, vol. 14, Special issue*, 487-494.

Kaur M., Singh M., Chadha N., Silakari O. (2016). Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **123**, 858-894.

Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. (2000). The Immunophilin-like Protein XAP2 Regulates Ubiquitination and Subcellular Localization of the Dioxin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(52), 41317-41324.

Khetmalis Y. M., Shivani M., Murugesan S., Chandra Sekhar K. V. G. (2021). Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **141**.

Kliewer S. A., Moore J. T., Wade L., Staudinger J. L., Watson M. A., Jones S. A., McKee D. D., Oliver B. B., Willson T. M., Zetterström R. H., Perlmann T., Lehmann J. M. (1998). An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell*, **92**(1), 73-82.

- Kodama S., Moore R., Yamamoto Y., Negishi M. (2007). Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *Biochemical Journal*, **407**(3), 373-381.
- Kolluri S. K., Jin U. -H., Safe S. (2017). Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Archives of Toxicology*, **91**(7), 2497-2513.
- Kumagai T., Aratsu Y., Sugawara R., Sasaki T., Miyairi S., Nagata K. (2016). Indirubin, a component of Ban-Lan-Gen, activates CYP3A4 gene transcription through the human pregnane X receptor. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **31**(2), 139-145.
- Kumar M. B., Ramadoss P., Reen R. K., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H. (2001). The Q-rich Subdomain of the Human AhReceptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(45), 42302-42310.
- Langmann T., Moehle C., Mauerer R., Scharl M., Liebisch G., Zahn A., Stremmel W., Schmitz G. (2004). Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology*, **127**(1), 26-40.
- Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open*, **7**, 1-9.
- Latchney S. E., Hein A. M., O'Banion M. K., DiCicco-Bloom E., Opanashuk L. A. (2013). Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *Journal of Neurochemistry*, **125**(3), 430-445.
- Lehmann J. M., McKee D. D., Watson M. A., Willson T. M., Moore J. T., Kliewer S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Journal of Clinical Investigation*, **102**(5), 1016-1023.
- Li S., Pei X., Zhang W., Xie H., Zhao B. (2014). Functional Analysis of the Dioxin Response Elements (DREs) of the Murine CYP1A1 Gene Promoter: Beyond the Core DRE Sequence. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(4), 6475-6487.
- Lin L., Dai Y., Xia Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **244**, 114845.

- Lown K. S., Bailey D. G., Fontana R. J., Janardan S. K., Adair C. H., Fortlage L. A., Brown M. B., Guo W., Watkins P. B. (1997). Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *Journal of Clinical Investigation*, **99**(10), 2545-2553.
- Lv Y., Luo Y. -Y., Ren H. -W., Li C. -J., Xiang Z. -X., Luan Z. -L. (2022). The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, **13**, 959902.
- Ma X., Idle J. R., Gonzalez F. J. (2008). The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **4**(7), 895-908.
- Mahringer A., Bernd A., Miller D. S., Fricker G. (2019). Aryl hydrocarbon receptor ligands increase ABC transporter activity and protein expression in killifish (*Fundulus heteroclitus*) renal proximal tubules. *Biological Chemistry*, **400**(10), 1335-1345.
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz 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.
- Matikainen T., Perez G. I., Jurisicova A., Pru J. K., Schlezinger J. J., Ryu H. -Y., Laine J., Sakai T., Korsmeyer S. J., Casper R. F., Sherr D. H., Tilly J. L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nature Genetics*, **28**(4), 355-360.
- McIntosh B. E., Hogenesch J. B., Bradfield C. A. (2010). Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation. *Annual Review of Physiology*, **72**(1), 625-645.
- Mendel D. B., Cherrington J. M., Laird A. D. (2015). CCR 20th Anniversary Commentary: Determining a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship for Sunitinib—A Look Back. *Clinical Cancer Research*, **21**(11), 2415-2417.
- Meti G. Y., Kamble A. A., Kamble R. R., Somagond S. M., Devarajegowda H. C., Kumari S., Kalthur G., Adiga S. K. (2016). Synthesis, anti-proliferative and genotoxicity studies of 6-chloro-5-(2-substituted-ethyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-ones and 6-chloro-5-(2-chloroethyl)-3-(alkyl/ary-2-ylidene)indolin-2-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **121**, 221-231.
- Metidji A., Omenetti S., Crotta S., Li Y., Nye E., Ross E., Li V., Maradana M. R., Schiering C., Stockinger B. (2018). The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage

by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity. *Immunity*, **49**(2), 353-362.e5.

Meunier B., de Visser S. P., Shaik S. (2004). Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*, **104**(9), 3947-3980.

Meyer B. K., Perdew G. H. (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 Core Complex and the Role of the Immunophilin-Related Protein XAP2 in AhR Stabilization. *Biochemistry*, **38**(28), 8907-8917.

Miao W., Hu L., Scrivens P. J., Batist G. (2005). Transcriptional Regulation of NF-E2 p45-related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(21), 20340-20348.

Mills J. B., Rose K. A., Sadagopan N., Sahi J., de Morais S. M. F. (2004). Induction of Drug Metabolism Enzymes and MDR1 Using a Novel Human Hepatocyte Cell Line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **309**(1), 303-309.

Moore L. B., Goodwin B., Jones S. A., Wisely G. B., Serabjit-Singh C. J., Willson T. M., Collins J. L., Kliewer S. A. (2000). St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(13), 7500-7502.

Murphy P. A., Kern S. E., Stanczyk F. Z., Westhoff C. L. (2005). Interaction of St. John's Wort with oral contraceptives: effects on the pharmacokinetics of norethindrone and ethinyl estradiol, ovarian activity and breakthrough bleeding. *Contraception*, **71**(6), 402-408.

Murray I. A., Patterson A. D., Perdew G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, **14**(12), 801-814.

Nakamura K., Moore R., Negishi M., Sueyoshi T. (2007). Nuclear Pregnane X Receptor Cross-talk with FoxA2 to Mediate Drug-induced Regulation of Lipid Metabolism in Fasting Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(13), 9768-9776.

Naspinski C., Gu X., Zhou G. -D., Mertens-Talcott S. U., Donnelly K. C., Tian Y. (2008). Pregnane X Receptor Protects HepG2 Cells from BaP-Induced DNA Damage. *Toxicological Sciences*, **104**(1), 67-73.

Nebert D. W., Gelboin H. V. (1969). The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **134**(1), 76-89.

Nebert D. W., Russell D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, **360**(9340), 1155-1162.

Nieves K. M., Hirota S. A., Flannigan K. L. (2022). Xenobiotic receptors and the regulation of intestinal homeostasis: harnessing the chemical output of the intestinal microbiota. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **322**(2), G268-G281.

Nukaya M., Bradfield C. A. (2009). Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochemical Pharmacology*, **77**(4), 654-659.

Ohtake F., Takeyama K. -ichi, Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., & Kato S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**(6939), 545-550.

Omura T., Sato R. (1962). A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, **237**(4), PC1375-PC1376.

Orans J., Teotico D. G., Redinbo M. R. (2005). The Nuclear Xenobiotic Receptor Pregnane X Receptor: Recent Insights and New Challenges. *Molecular Endocrinology*, **19**(12), 2891-2900.

Pang P. -H., Lin Y. -H., Lee Y. -H., Hou H. -H., Hsu S. -P., Juan S. -H. (2008). Molecular mechanisms of p21 and p27 induction by 3-methylcholanthrene, an aryl-hydrocarbon receptor agonist, involved in antiproliferation of human umbilical vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, **215**(1), 161-171.

Pappas B., Yang Y., Wang Y., Kim K., Chung H. J., Cheung M., Ngo K., Shinn A., Chan W. K. (2018). P23 protects the human aryl hydrocarbon receptor from degradation via a heat shock protein 90-independent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **152**, 34-44.

Pascussi J. -M., Gerbal-Chaloin S., Pichard-Garcia L., Daujat M., Fabre J. -M., Maurel P., Vilarem M. -J. (2000). Interleukin-6 Negatively Regulates the Expression of Pregnane X Receptor and Constitutively Activated Receptor in Primary Human Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**(3), 707-713.

Phang-Lyn S, Llerena VA. Biochemistry, Biotransformation (2022). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31335073

Phelan D., Winter G. M., Rogers W. J., Lam J. C., Denison M. S. (1998). Activation of the Ah Receptor Signal Transduction Pathway by Bilirubin and Biliverdin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **357**(1), 155-163.

Poland A., Glover E., Kende A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **251**(16), 4936-4946.

Pongratz I., Mason G. G., Poellinger L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(19), 13728-13734.

Quattrochi L. C., Mills A. S., Barwick J. L., Yockey C. B., Guzelian P. S. (1995). A Novel cis-Acting Element in a Liver Cytochrome P450 3A Gene Confers Synergistic Induction by Glucocorticoids plus Antigluocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(48), 28917-28923.

Ramadoss P., Marcus C., Perdew G. H. (2005). Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **1**(1), 9-21.

Rigalli J. P., Reichel M., Reuter T., Tocchetti G. N., Dyckhoff G., Herold-Mende C., Theile D., Weiss J., Agoulnik I. U. (2018). The pregnane X receptor (PXR) and the nuclear receptor corepressor 2 (NCoR2) modulate cell growth in head and neck squamous cell carcinoma. *PLOS ONE*, **13**(2), e0193242.

Rigalli J. P., Theile D., Nilles J., Weiss J. (2021). Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning. *Cells*, **10**(11).

Roth M., Obaidat A., Hagenbuch B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*, **165**(5), 1260-1287.

Rothhammer V., Quintana F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, **19**(3), 184-197.

Sakurai S., Shimizu T., Ohto U. (2017). The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, **292**(43), 17609-17616.

Saradhi M., Sengupta A., Mukhopadhyay G., Tyagi R. K. (2005). Pregnane and Xenobiotic Receptor (PXR/SXR) resides predominantly in the nuclear compartment of the interphase cell and associates with the condensed chromosomes during mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1746**(2), 85-94.

Sharma P., Thummuri D., Reddy T. S., Senwar K. R., Naidu V. G. M., Srinivasulu G., Bhargava S. K., Shankaraiah N. (2016). New (E)-1-alkyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methylene)indolin-2-ones: Synthesis, in vitro cytotoxicity evaluation and apoptosis inducing studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **122**, 584-600.

Shin J., Magar K. B. S., Lee J., Kim K.-sun, Lee Y. R. (2019). Design, synthesis, and discovery of novel oxindoles bearing 3-heterocycles as species-specific and combinatorial agents in eradicating Staphylococcus species. *Scientific Reports*, **9**(1).

Shin S., Wakabayashi N., Misra V., Biswal S., Lee G. H., Agoston E. S., Yamamoto M., Kensler T. W. (2007). NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, **27**(20), 7188-7197.

Smith S. H., Jayawickreme C., Rickard D. J., Nicodeme E., Bui T., Simmons C., Coquery C. M., Neil J., Pryor W. M., Mayhew D., Rajpal D. K., Creech K., Furst S., Lee J., Wu D., Rastinejad F., Willson T. M., Viviani F., Morris D. C., et al. (2017). Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, **137**(10), 2110-2119.

Squires E. J., Sueyoshi T., Negishi M. (2004). Cytoplasmic Localization of Pregnane X Receptor and Ligand-dependent Nuclear Translocation in Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(47), 49307-49314.

Staudinger J. L., Goodwin B., Jones S. A., Hawkins-Brown D., MacKenzie K. I., LaTour A., Liu Y., Klaassen C. D., Brown K. K., Reinhard J., Willson T. M., Koller B. H., Kliever S. A.

(2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(6), 3369-3374.

Stejskalova L., Dvorak Z., Pavek P. (2011). Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. *Current Drug Metabolism*, **12**(2), 198-212.

Sumpter W. C. (1945). The Chemistry of Oxindole. *Chemical Reviews*, **37**(3), 443-479.

Urizar N. L., Moore D. D. (2003). GUGULIPID: A Natural Cholesterol-Lowering Agent. *Annual Review of Nutrition*, **23**(1), 303-313.

van den Bogaard E. H., Bergboer J. G. M., Vonk-Bergers M., van Vlijmen-Willems I. M. J. J., Hato S. V., van der Valk P. G. M., Schröder J. M., Joosten I., Zeeuwen P. L. J. M., Schalkwijk J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, **123**(2), 917-927.

Vogel C. F. A., Khan E. M., Leung P. S. C., Gershwin M. E., Chang W. L. W., Wu D., Haarmann-Stemann T., Hoffmann A., Denison M. S. (2014). Cross-talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(3), 1866-1875.

Vogel C. F. A., Sciuлло E., Li W., Wong P., Lazennec G., Matsumura F. (2007). RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription. *Molecular Endocrinology*, **21**(12), 2941-2955.

Vogel C. F. A., Wu D., Goth S. R., Baek J., Lollies A., Domhardt R., Grindel A., Pessah I. N. (2013). Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF- κ B RelB activation during dendritic-cell differentiation. *Immunology & Cell Biology*, **91**(9), 568-575.

Vrzalová A., Pečinková P., Illés P., Gurská S., Džubák P., Szotkowski M., Hajdúch M., Mani S., Dvořák Z. (2022). Mixture Effects of Tryptophan Intestinal Microbial Metabolites on Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(18), 10825.

Vyhlídalová B., Bartoňková I., Jiskrová E., Li H., Mani S., Dvořák Z. (2020a). Differential activation of human pregnane X receptor PXR by isomeric mono-methylated indoles in intestinal and hepatic in vitro models. *Toxicology Letters*, **324**, 104-110.

Vyhlídalová B., Krasulová K., Pečinková P., Marcalíková A., Vrzal R., Zemánková L., Vančo J., Trávníček Z., Vondráček J., Karasová M., Mani S., Dvořák Z. (2020b). Gut Microbial

Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(7), 2614.

Wang L. -T., Chiou S. -S., Chai C. -Y., Hsi E., Wang S. -N., Huang S. -K., Hsu S. -H. (2017). Aryl hydrocarbon receptor regulates histone deacetylase 8 expression to repress tumor suppressive activity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, **8**(5), 7489-7501.

Watkins R. E., Wisely G. B., Moore L. B., Collins J. L., Lambert M. H., Williams S. P., Willson T. M., Kliewer S. A., Redinbo M. R. (2001). The Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR: Structural Determinants of Directed Promiscuity. *Science*, **292**(5525), 2329-2333.

Wattenberg L. W., Leong J. L., Strand P. J. (1962). Benzpyrene Hydroxylase Activity in the Gastrointestinal Tract. *Cancer Research*, **22**(9), 1120–1125.

Weiss C., Faust D., Dürk H., Kolluri S. K., Pelzer A., Schneider S., Dietrich C., Oesch F., Göttlicher M. (2005). TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38–MAPK-dependent pathway. *Oncogene*, **24**(31), 4975-4983.

Williams S. P., Nowicki M. O., Liu F., Press R., Godlewski J., Abdel-Rasoul M., Kaur B., Fernandez S. A., Chiocca E. A., Lawler S. E. (2011). Indirubins Decrease Glioma Invasion by Blocking Migratory Phenotypes in Both the Tumor and Stromal Endothelial Cell Compartments. *Cancer Research*, **71**(16), 5374-5380.

Wright E. J., Pereira De Castro K., Joshi A. D., Elferink C. J. (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Current Opinion in Toxicology*, **2**, 87-92.

Xie W., Yeuh M. -F., Radominska-Pandya A., Saini S. P. S., Negishi Y., Bottroff B. S., Cabrera G. Y., Tukey R. H., Evans R. M. (2003). Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(7), 4150-4155.

Yagnam S., Rami Reddy E., Trivedi R., Krishna N. V., Giribabu L., Rathod B., Prakasham R. S., Sridhar B. (2019). 1,2,3-Triazole derivatives of 3-ferrocenylidene-2-oxindole: Synthesis, characterization, electrochemical and antimicrobial evaluation. *Applied Organometallic Chemistry*, **33**(4).

Yan J., Xie W. (2016). A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **6**(5), 450-452.

Yeager R. L., Reisman S. A., Aleksunes L. M., Klaassen C. D. (2009). Introducing the “TCDD-Inducible AhR-Nrf2 Gene Battery”. *Toxicological Sciences*, **111**(2), 238-246.

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.

Zhang J., Kuehl P., Green E. D., Touchman J. W., Watkins P. B., Daly A., Hall S. D., Maurel P., Relling M., Brimer C., Yasuda K., Wrighton S. A., Hancock M., Kim R. B., Strom S., Thummel K., Russell C. G., Hudson J. R., Schuetz E. G., et al. (2001). The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*, **11**(7), 555-572.

Zhou C., Tabb M. M., Nelson E. L., Grün F., Verma S., Sadatrafiei A., Lin M., Mallick S., Forman B. M., Thummel K. E., Blumberg B. (2006b). Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- κ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, **116**(8), 2280-2289.

Zhou J., Zhai Y., Mu Y., Gong H., Uppal H., Toma D., Ren S., Evans R. M., Xie W. (2006a). A Novel Pregnane X Receptor-mediated and Sterol Regulatory Element-binding Protein-independent Lipogenic Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(21), 15013-15020.

Zollner G., Wagner M., Trauner M. (2010). Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, **126**(3), 228-243.

Zucchini N., de Sousa G., Bailly-Maitre B., Gugenheim J., Bars R., Lemaire G., Rahmani R. (2005). Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1745**(1), 48-58.