

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Lucie Rogožanová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru
s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie odvozené
od HaCat buněk**

Bakalářská práce

Lucie Rogožanová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lucie ROGOŽANOVÁ
Osobní číslo: R20719
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie odvozené od HaCat buněk
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

- 1) Literární rešerše zaměřující se na in vitro experimentální reportérové systémy
- 2) Stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti
- 3) Dose-response analýza vybraných modelových aktivátorů AhR po 4, 24 a 48 hod
- 4) Časová analýza transkripční aktivity AhR v rozmezí 2 – 24 hod
- 5) Sledování transkripční aktivity AhR po zamražení a rozmražení buněk
- 6) Zpracování literární rešerše, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Novotna et al., Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environ Sci Technol.* 2011 Dec 1;45(23):10133-9.

Novotna et al., Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Dec 18;47(5):842-7.

Bartonkova et al., Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS One.* 2015.

Paguio A. et al., Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. *Curr Chem Genomics.* 2010;4:43-9.

Zwart et al., High-Throughput Effect-Directed Analysis Using Downscaled in Vitro Reporter Gene Assays To Identify Endocrine Disruptors in Surface Water. *Environ Sci Technol.* 2018 Apr 3; 52(7): 4367–4377.

Wider D and Picard D., Secreted dual reporter assay with Gaussia luciferase and the red fluorescent protein mCherry. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0189403

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: **29. března 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2023**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Lucie Rogožanová
Název práce:	Sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie odvozené od HaCat buněk
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023
Klíčová slova:	AhR, AhRaCat, reportérové systémy, TCDD, BaP, FICZ
Počet stran:	46
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie odvozené od kožních buněk HaCat. V teoretické části jsou přiblíženy reportérové systémy a jejich geny, které se používají. Následně se také teoretická část zabývá aryl uhlovodíkovým receptorem (AhR), je zde popsána struktura, ligandy, které AhR aktivují. V neposlední řadě jsou zmíněny i srovnání AhR reportérových systémů, které jsou dostupné.

V praktické části bylo nejdříve důležité stanovit koncentrační rozmezí látek, které by nebyly pro danou buněčnou linii toxické a následně toto koncentrační rozmezí bylo použito pro sledování transkripční aktivity AhR v buněčné linii. Buňky AhRaCat byly vystaveny působení látek a byla sledována jejich proliferační aktivita pomocí krystalové violeti. Následně byly buňky podrobeny luciferázové reportérové eseji, pomocí které byla zjištěna transkripční aktivita AhR, dále byla stanovena transkripční aktivita AhR v závislosti na čase a také v přítomnosti antagonistů. V neposlední řadě bylo sledováno udržení inducibility po dlouhodobém udržování buněk v kultivačním médiu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Lucie Rogožanová
Title:	Monitoring of transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor using of new stably transfected reporter gene cell line derived from HaCat cells
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Supervisor:	Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.
The year of presentation:	2023
Keywords:	AhR, AhRaCat, Reporter system, TCDD, BaP, FICZ
Number of pages:	46
Number of appendices:	0
Language:	Czech

SUMMARY

This bachelor thesis looks at monitoring the transcription activity of the aryl hydrocarbon receptor with using a new stable transfected reporter line derived from HaCat skin cells. In the theoretical part are approached reporters system and their genes that are used. Subsequently, the theoretical part also deals with the aryl hydrocarbon receptor (AhR), describing the structure, ligands, that activate AhR. Last but not least, comparisons of the AhR reporter's systems available are also mentioned.

In the practical part, it was first important to establish concentration ranges of substances that would not be toxic to a given cell line and then this concentration range was used to monitor AhR transcription activity in the cell line. AhRaCat cells, were exposed to the substances and their proliferation activity was monitored using crystal violet. Subsequently, the cells were subjected by luciferase reporters assay by which AhR transcription activity was detected, AhR transcription activity was further determined depending on the time and also in the presence of antagonists. Last but not least, the maintenance of inducibility after the long-term maintenance of cells in the culture medium was monitored.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Anety Grycové, Ph.D.

V Olomouci dne:

.....

Lucie Rogožanová

Poděkování

Nejdříve bych chtěla poděkovat mé vedoucí práce, paní Mgr. Anetě Grycové, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při zpracování experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Janě Novotné za přečtení této práce a v neposlední řadě Bc. Dominikovi Foltánkovi za velkou psychickou podporu.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Teoretická část	3
3.1	Reportérové systémy pro sledování aktivity transkripčních faktorů	3
3.1.1	Transfekce transientní a stabilní	4
3.1.2	Reportérové geny	5
3.1.2.1	Luciferáza	5
3.1.2.2	β -galaktosidáza	7
3.1.2.3	β -laktamáza.....	7
3.1.2.4	Chloramfenikol acetyl transferáza.....	8
3.1.2.5	Alkalická fosfatáza	8
3.1.2.6	Zelený fluorescenční protein	8
3.1.2.7	Ekvorin	9
3.2	Aryl uhlovodíkový receptor	9
3.2.1	Funkce AhR v kůži	11
3.3	AhR reportérové systémy	13
4	Materiál a metody	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Laboratorní pomůcky	15
4.3	Použité chemikálie a roztoky	15
4.4	Přístroje	16
5	Metodika práce	17
5.1	Pasážování buněk	17
5.2	Počítání a vyšetí buněk	18
5.3	Aplikace látek	19
5.4	Měření proliferační aktivity buněk AhRaCat pomocí krystalové violeti	23
5.5	Stanovení transkripční aktivity buněk AhRaCat v závislosti na koncentraci ligandu	23

5.6	Sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na čase	23
5.7	Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů	24
5.8	Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci.....	24
6	Výsledky	25
6.1	Proliferační aktivita buněk AhRaCat pomocí krystalové violeti	25
6.2	Sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu	27
6.3	Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase	33
6.4	Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů	34
6.5	Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci.....	36
7	Diskuze	38
8	Závěr.....	41
9	Seznam použité literatury	42
10	Seznam použitých zdrojů u obrázků	46

Seznam symbolů a zkratek

AD	atopická dermatitida
AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
AhRaCat	nová stabilně transfekovaná linie
ARNT	translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
BaP	benzo[a]pyren
bHLH/PAS	rodina helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim
BLA	β -laktamáza
CALUX	chemicky aktivovaná exprese luciferázy
CAT	chloramfenikol acetyl transferáza
CTZ	koelentrazin
CYP	nadrodina cytochrom P450
DRE	deoxin responzivní element
FDG	fluorescein- β -digalaktopyranosid
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]karbazol
FMNH ₂	flavinmononukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
GH rodiny	glykosid hydrolázová rodina
Gluc	Gaussia luciferáza
KYN	kynurenin
MNF	3'-methoxy-4'-nitroflavon
Nluc	Nano luciferáza
seAP	sekretovaná alkalická fosfatáza
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin
Th	pomocné imunitní buňky
TLC	tenkovrstvá chromatografie
XRE	xenobiotický responzivní element

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Schematický nákres stabilní a transientní transfekce

Obrázek č. 2: Reakce vyzařující světlo od světlušky *Photinus pyralis*

Obrázek č. 3: Schematická struktura funkčních domén aryl uhlovodíkového receptoru

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Vyšetí buněk pro sledování proliferační aktivity AhRaCat pomocí krystalové violeti

Tabulka č. 2: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci modelových aktivátorů

Tabulka č. 3: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhRaCat v závislosti na čase

Tabulka č. 4: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhRaCat po působení antagonistů

Tabulka č. 5: Vyšetí buněk pro udržení luciferázové inducibility ligandů AhR

Tabulka č. 6: Příprava koncentrací TCDD ze zásobního roztoku $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka č. 7: Příprava koncentrací BaP ze zásobního roztoku 50mmol.l^{-1}

Tabulka č. 8: Příprava koncentrací FICZ ze zásobního roztoku 25mmol.l^{-1}

Tabulka č. 9: Příprava koncentrací u testovaných antagonistů CH223191 a MNF

Tabulka č. 10: Sledování dlouhodobé kultivace buněk v buněčné linii AhRaCat na indukci luciferázové aktivity

Seznam grafů

Graf č. 1: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení TCDD po 24 hod a 48 hod inkubace

Graf č. 2: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení BaP po 24 hod a 48 hod inkubace

Graf č. 3: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení FICZ po 24 hod a 48 hod inkubace

Graf č. 4: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení TCDD

Graf č. 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení TCDD

Graf č. 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení TCDD

Graf č. 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení BaP

Graf č. 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení BaP

Graf č. 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení BaP

Graf č. 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení FICZ

Graf č. 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení FICZ

Graf č. 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení FICZ

Graf č. 13: Stanovení transkripční aktivity modelových aktivátorů v závislosti na čase

Graf č. 14: Stanovení transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191

Graf č. 15: Stanovení transkripční aktivity AhR po působení antagonisty MNF

Graf č. 16: Sledování transkripční aktivity AhR buněk po dlouhodobé kultivaci

1 Úvod

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který zprostředkovává toxicitu široké řady xenobiotik, ale v posledních letech bylo objeveno, že AhR také hraje důležitou roli ve fyziologických a patofyziologických procesech. Z tohoto důvodu je důležité sledovat transkripční aktivitu AhR a identifikovat tak látky, které jsou schopné ho aktivovat. Sledování transkripční aktivity receptoru působících jako transkripční faktory umožňuje metoda Reporter Gene Assay neboli reportérová genová esej, kdy je měřená aktivita reportérového genu přímo úměrná transkripční aktivitě receptoru.

Aryl uhlovodíkový receptor je vysoce exprimován v lidských buňkách a tkáních a po následné aktivaci ligandy je translokován do jádra buňky. AhR se řadí mezi hlavní senzory chemických signálů v kůži. Kůže je největším orgánem lidského těla, která je v neustálém kontaktu s různými faktory. Pokud je kůže zdravá, tak je známo, že aryl uhlovodíkový receptor přispívá k diferenciaci keratinocytů, k funkci kožní bariéry a také k pigmentaci kůže. Tento cyklus je pravděpodobně dosažen díky přechodné aktivaci AhR pomocí rychle metabolizovaných AhR ligandů jako je např. FICZ (6-formylindol[3,2-b]karbazol).

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací nové stabilně transfekované reportérové linie AhRaCat odvozené od kožních buněk HaCat. Tato linie bude sloužit jako nástroj ke sledování transkripční aktivity AhR a k identifikaci potenciálních AhR aktivních látek v kůži.

2 Cíle práce

1. Literární rešerše zaměřující se na *in vitro* experimentální reportérové systémy
2. Stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti
3. Stanovení transkripční aktivity modelových aktivátorů v závislosti na koncentraci
4. Stanovení transkripční aktivity modelových aktivátorů v závislosti na čase
5. Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů
6. Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci
7. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace

3 Teoretická část

3.1 Reportérové systémy pro sledování aktivity transkripčních faktorů

Reportérové systémy používané pro sledování aktivity receptorů působících jako transkripční faktory, jsou často založené na stabilně transfekovaných reportérových buněčných liniích (*Sedlák et al.* 2011). Transfekce je metoda pro vnesení cizí DNA do eukaryotních buněk, např. lipofekce, nukleofekce a elektroporace. Lipofekce není univerzálně úspěšná transfekce, jelikož účinnost jak transientní, tak i stabilní transfekce exogenními geny se v jednotlivých buněčných liniích liší. Lipofekce je účinná např. u transfekce primárních kultur nebo kultur s diferenciovanými buňkami (*Kumar et al.* 2019). Elektroporace využívá elektrické pulsy, díky tomu může být použita k vnesení cizí DNA do živočišných, rostlinných buněk i bakterií. Nukleofekce je specializovaná forma elektroporace, která vnáší NK přes jadernou membránu přímo do jádra (*Kumar et al.* 2019). Reportérové plazmidy nesou reportérové geny a upstream jsou zaklonovány regulační sekvence, kam se transkripční faktory vážou. Aktivita reportérového genu je pak přímo úměrná transkripční aktivitě sledovaného receptoru (*Kang et al.* 2008).

Reportérový plazmid dále obsahuje gen pro rezistenci k antibiotiku pro prokaryota, např. ampicilin, gen pro rezistenci k antibiotiku pro eukaryota, např. hygromycin, dále reportérový gen a multiklonovací místo, kam se klonuje regulační sekvence pro vazbu receptoru. Dále obsahuje minimální promotor, upstream, downstream, syntetický polyA, který slouží pro začátek transkripce (*Novotná et al.* 2011). Reportérová metoda kóduje protein nebo peptidovou značku, kterou lze následně snadno detekovat a změřit na pozadí hostitelské buňky, jelikož poskytuje snadno měřitelný signál. Reportérový gen by měl být v buňce snadno rozlišitelný od pozadí endogenní buňky a neměl by ovlivňovat fyziologii hostitelské buňky. (*Boy et al.* 2022). Luciferázová esej je typem reportérové eseje. Tato esej se používá ke studiu intracelulární signalizaci, expresi genů, transkripční aktivity receptorů a skládání proteinů (*Nair et al.* 2018).

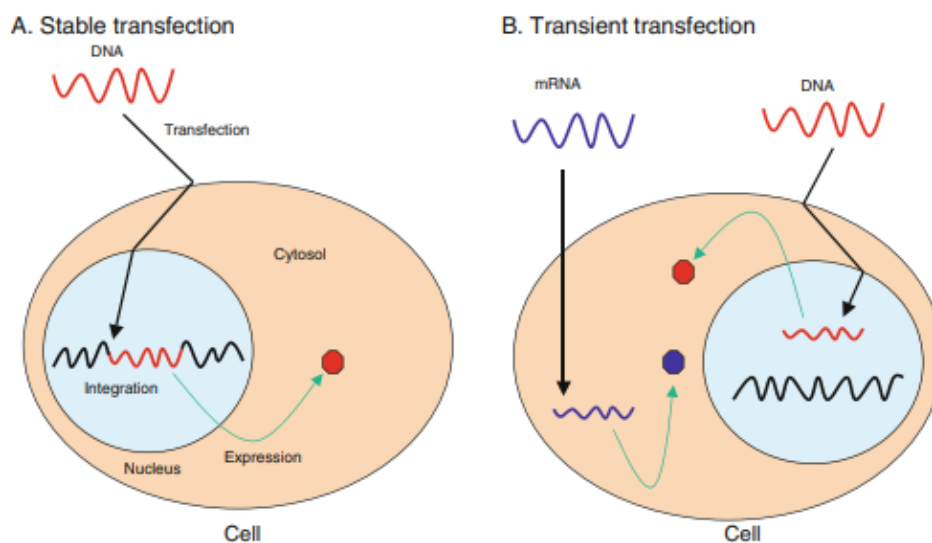
Reportérové geny mohou být intracelulární i extracelulární povahy. Intracelulární produkty jsou v buňce zadrženy pro kvantifikaci *in situ* nebo po lýze buněk. Typickými intracelulárními reportérovými geny jsou chloramfenikol acetyl transferáza, β -galaktosidáza, luciferáza, ekvorin a GFP. Oproti tomu extracelulární produkty se vylučují do extracelulárního média k testování, to umožňuje odběr vzorků bez narušení buněk a opakované experimentování. Extracelulární

reportérové geny jsou např. sekretovaná alkalická fosfatáza, sekretovaná luciferáza nebo β -laktamáza (Liu *et al.* 2009).

3.1.1 Transfekce transientní a stabilní

Transfekce je zavedení cizí nukleové kyseliny do vnitra buněk za účelem získání geneticky modifikovaných buněk (Kim *et al.* 2010). Byla vyvinuta pro definování transkripčně regulačních prvků jako jsou např. promotory, enhancery a také silencers. Transfekce slouží k pozorování fragmentu DNA, který je umístěn upstream reportérového genu a pomocí měření transkripční aktivity reportérového genu lze určit regulační potenciál sekvence (Yin *et al.* 2005). Transfekce transientní neboli přechodná a transfekce stabilní neboli trvalá patří mezi nástroje molekulární a buněčné biologie při zkoumání genových a proteinových funkcí. V připraveném plazmidu se může vyskytovat gen pro rezistenci vůči antibiotiku. Pomocí selekčního tlaku s daným antibiotikem v kultivačním médiu lze připravit buněčnou linii, která je stabilně transfekovaná daným plazmidem. U této stabilní transfekce je plazmidová DNA integrována do genomu hostitelských buněk. (Kim *et al.* 2010, Stepanenko *et al.* 2017). Při přípravě každé stabilně transfekované linie by měla být připravena i buněčná linie, která bude sloužit jako negativní kontrola a bude obsahovat reportérový plazmid bez klonovaného DNA produktu (Stepanenko *et al.* 2017). Stabilně transfekovaná buněčná linie je oproti transientní transfekci časově a materiálově náročná, ale i tak v laboratoři patří mezi hojně používané transfekce, a to zejména díky třem výhodám. První výhodou stabilně transfekované linie je, že není potřeba před každým prováděným experimentem transfekovat buňky, díky tomu je čas i materiál šetřen. Druhá výhoda je ta, že není nutné normalizovat údaje na β -galaktosidázu a to vzhledem k proměnlivé účinnosti transfekce, z tohoto důvodu jsou údaje homogennější. A v neposlední řadě třetí výhoda stabilní transfekce je ta, že test má mnohem vyšší citlivost, jelikož jsou všechny buňky již transfekované (Novotna *et al.* 2011). Stabilní transfekce je také účinně využívána k identifikaci nových ligandů pro specifické signální dráhy (Lai *et al.* 2006).

U transfekce transientní, je plazmidová DNA přechodně udržována v jádře a není integrována do genomu, jelikož plazmid je pro konkrétní experiment vložen *ad hoc*. Z tohoto důvodu se může transientní transfekce kdykoli ztratit, a to např. vlivem buněčného dělení (viz Obrázek č. 1) (Stepanenko *et al.* 2017, Boy *et al.* 2022, Kim *et al.* 2010). Účinnost transfekce je snadno ovlivnitelná např. typem buňky, příjmem vektoru a jeho vlastnostmi konkrétně velikostí, kvalitou ale i dodaným množstvím (Yin *et al.* 2005).



Obrázek č. 1: Schematický náčrt stabilní a transienční transfekce. Převzato z článku *Kim et al.* (2010). A) U stabilní transfekce je cizí DNA vložena do jádra průchodem buněčné a jaderné laminy, DNA je tak integrována do hostitelského genomu. B) U přechodné transfekce je cizí DNA dodávána do jádra, ale není integrována do genomu.

3.1.2 Reportérové geny

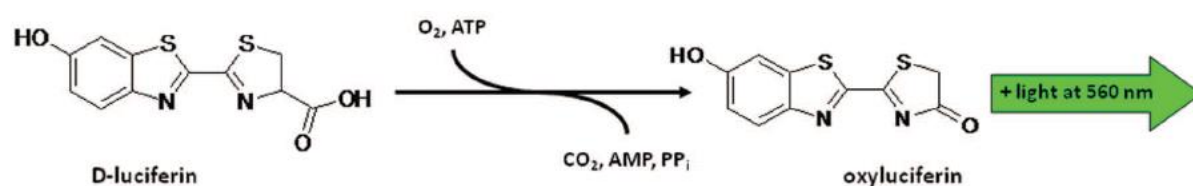
3.1.2.1 Luciferáza

Proces, během kterého je viditelné světlo emitováno působením enzymatické reakce katalyzované enzymem luciferázou, se nazývá bioluminiscence. Luciferáza byla identifikována zejména z mořských živočichů (*Waidmann et al.* 2011). Nyní se nejvíce používají luciferázy odvozené od severoamerické světlušky (*Photinus pyralis*) (*Smale et al.* 2010). Mezi nejlépe prostudované gramnegativní bioluminiscenční bakteriální systémy se řadí *lux* systémy *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi* a *Photobacterium luminescens*. V podstatě všechny tyto bakteriální systémy jsou kódovány operonem *luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* a *luxE*. *LuxA* a *luxB* geny kódují α -podjednotky i β -podjednotky heterodimerní luciferázy, oproti tomu geny *luxC*, *luxD* a *luxE* kódují reduktázu mastných kyselin, které jsou potřebné pro regeneraci mastného aldehydu, který následně slouží jako luciferin (*Waidmann et al.* 2011).

Bakteriální luciferázy jsou heterodimerní enzymy, které jsou složeny z α -podjednotky i β -podjednotky. Tyto podjednotky vykazují zhruba 32% sekvenční identitu na proteinové úrovni. Bakteriální luciferáza katalyzuje oxidaci redukovaného flavinmononukleotidu

(FMNH₂) a alifatického aldehydu s dlouhým řetězcem v přítomnosti molekulárního kyslíku na FMN a odpovídající mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Heterodimerní luciferáza váže jednu molekulu FMNH₂, čímž chrání FMNH₂ před autooxidací (Waidmann *et al.* 2011).

U světlušky (*Photinus pyralis*) bylo zjištěno, že proces zvaný bioluminiscence je produkován ve speciálním orgánu, který se nachází v zadní části břicha, zvaném lucerna. Tento orgán kromě luminiscence také slouží jako přitahovací mechanismus pro pářící se partnery. Luciferáza se u světlušek nachází v peroxizomech ve specializovaných buňkách luceren, které jsou nazývány jako fotocyty¹. Luciferáza kóduje protein, který katalyzuje dvoustupňovou enzymatickou oxidaci D-luciferinu za přítomnosti ATP, O₂ a Mg, čímž vzniká fluorescenční produkt oxyluciferin a emise světla o vlnové délce 550-570 nm. D-luciferin je nejprve aktivován adenylací na luciferyl-adenylát, který je v posledním kroku oxidován na oxyluciferin (viz Obrázek č. 2). Oxyluciferin působí jako silný inhibitor luciferázy (Waidmann *et al.* 2011, Smale *et al.* 2010).



Obrázek č. 2: Reakce vyzařující světlo od světlušky *Photinus pyralis*. Převzato z článku Waidmann *et al.* (2011)

Mezi luciferázovými testy jsou používány různé druhy luciferáz. Mezi nejvíce zkoumané a používané luciferázy patří již zmíněná luciferáza u světlušky (*Photinus pyralis*). Dále velmi používanou luciferázou je *Gussia luciferáza* (Gluc), která je klonována z *Gussia princeps*. Tato luciferáza katalyzuje oxidaci substrátu koelentrazinu v reakci za účelem vytvoření světla. Nově vyvinutá luciferáza NanoLuc (Nluc) katalyzuje oxidaci nového substrátu imidazopyrazinonu také za účelem výroby světla. Tato luciferáza se jeví jako nejvíce citlivý reportér ze všech reportérových genů, jelikož se rychle v buňce rozkládá a nedochází tak k její akumulaci (Cevenini *et al.* 2016).

Mezi hlavní výhodu použití luminiscenčních reportérů oproti klasičtějšímu zelenému fluorescenčnímu proteinu (GFP) je kratší poločas rozpadu. To umožňuje opakované online měření nejen u nástupu genové exprese, ale také u snížené exprese při vysokém časovém

¹ Jedná se o buňky, které jsou schopny katalyzovat enzymy k produkci světla neboli k luminiscenci.

rozlišení. Další výhodou použití luciferáz je vlnová délka emitovaného světla, která je delší a tím je i energie nižší. Ve srovnání s acetyltransferázou, β -galaktosidázou, glukuronidázou a alkalickou fosfatázou je luciferáza rychlejší, méně pracná a také méně drahá (Waidmann *et al.* 2011). Mezi další výhody luciferázového systému patří neizotopický test bioluminiscence, vysoký stupeň citlivosti, nepřítomnost endogenní enzymové aktivity v eukaryotických buňkách, velké rozmezí kvantifikace a v neposlední řadě snadnost a také rychlost výkonu (Yin *et al.* 2005).

Jako hlavní nevýhoda použití luciferázy je velká potřeba kyslíku při reakci emitující světlo, proto se luciferáza nesmí používat pro online měření za anaerobních podmínek. Online měření pomocí luciferázy se využívá k měření biologických procesů v reálném čase, včetně promotorových testů a monitorování bakterií v komplexních maticích (Waidmann *et al.* 2011).

3.1.2.2 β -galaktosidáza

Enzym β -galaktosidáza byl izolován z bakterie, hub a kvasinek. β -galaktosidáza, též známa jako laktáza, je enzym, který hydrolyzuje laktózu a také se řadí mezi jedny z primárních hydrolytických enzymů u živočichů, rostlin a mikroorganismů (Sagib *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2020). Podle databáze aktivních enzymů jsou β -galaktosidázy rozděleny do čtyř glykosid hydrolázových rodin (GH rodin), které se označují jako GH1, GH2, GH35 a GH42 (Zhu *et al.* 2020). Přítomnost nadměrného množství laktózy ve střevě vede k dehydrataci tkání a dochází tak ke sníženému vstřebávání vápníku, a to v důsledku nízké kyselosti, která může způsobit střevní potíže. Nedostatek enzymu laktázy ve střevě vede k laktóзовé intoleranci (Sagib *et al.* 2017). β -galaktosidáza je řazena mezi klíčové enzymy, a to díky své schopnosti uvolňovat galaktózu z oligosacharidů a následně poskytovat zdroj uhlíku pro mikrobiální růst. K velkým výhodám β -galaktosidázových reportérových systémů patří poměrně nízká cena, velmi snadná detekce a bezpečnost pracovníků, jelikož tento enzym nevyžaduje radioaktivní detekci a ani jiné přípravné kroky. Mezi nevýhody tohoto systému se řadí velká velikost enzymu a endogenní exprese v některých buněčných liniích, jako jsou např. makrofágy (Boy *et al.* 2022). Aktivita tohoto enzymu je detekována fluorometricky v živých buňkách se syntetickým substrátem fluorescein- β -digalaktopyranosidem (FDG) (Qureshi *et al.* 2007).

3.1.2.3 β -laktamáza

β -laktamáza (BLA) patří mezi strukturálně rozmanité skupiny enzymů, které produkují chromogeny z hydrolyz β -laktamových antibiotik, jako je penicilin a cefalosporin. Tyto chromogeny mohou být detekovány buď průtokovou cytometrií, fluorescenční

mikroskopii anebo kolorimetrickými testy. Hlavní výhodou tohoto enzymu je jeho citlivé detekování v buňce a také ho lze využít pro studium genové exprese v živých buňkách, avšak tento enzym má i velkou nevýhodu, a to velmi pomalý a složitý detekční proces (Boy *et al.* 2022, Qureshi *et al.* 2007). β -laktamázový reportérový systém využívá enzym TEM-1 β -laktamázu, kterému chybí N-terminální 23 aminokyselinová periplazmatická sekreční sekvence. Enzym BLA je kódovaný rezistentním genem na ampicilin, který je následně aktivní buď jako monomer nebo dimer při terminálním spojení N nebo také C konců s heterologním proteinem a následně dokáže štěpit molekuly, které obsahují β -laktam, jako jsou např. již zmíněné peniciliny anebo cefalosporiny, s jednoduchou kinetikou a vysokou katalytickou účinností (Qureshi *et al.* 2007).

3.1.2.4 Chloramfenikol acetyl transferáza

Enzym chloramfenikol acetyl transferáza (CAT) patří mezi nejstarší reportérové geny (Qureshi *et al.* 2007). CAT se v minulosti řadil mezi velmi využívaný reportérový gen, ale dnes se používá jen zřídka, a to kvůli tomu, že je mnohem méně citlivý, než je již zmíněná luciferáza (Smale *et al.* 2010). Chloramfenikol acetyl transferáza má bakteriální původ a nevyskytuje se v savčích buňkách, tudíž interference endogenního enzymu téměř neexistuje (Lai *et al.* 2006). Buňky transfekované reportérovým plazmidem s CAT se lyzují opakovatelnými cykly mrznutí a rozmrznutí. Buněčné zbytky, které při tomto postupu vzniknou, se odstraňují pomocí centrifugy. Dále se lyzát inkubuje s chloramfenikolem a acetyl-koenzymem A. CAT následně katalyzuje acetylaci chloramfenikolu. Acetylace se zviditelňuje pomocí autoradiografie po tenkovrstvé chromatografii (TLC) (Smale *et al.* 2010).

3.1.2.5 Alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza je reportérový enzym, u kterého je protein sekretován z buňky do média, tudíž se nemusí buňky lyzovat. Sekretovaná alkalická fosfatáza (seAP) má obecně velmi nízké pozadí, ale nemusí být vhodná pro detekci buněk s vysokou aktivitou endogenní fosfatázy (Lai *et al.* 2006). Sekretovaná alkalická fosfatáza detekuje „světlo“, které vzniká rozkladem dioxetanu za působení enzymu. (Qureshi *et al.* 2007).

3.1.2.6 Zelený fluorescenční protein

Zelený fluorescenční protein (GFP) z medúzy *Aequorea victoria* je další enzym, který se běžně používá jako reportérový gen. Hlavní výhodou tohoto enzymu je,

že je tento enzym fluorescenční, což znamená, že nevyžaduje žádný substrát pro detekci. Zároveň také umožňuje sledovat expresi dvou a více genů v jedné buňce (Qureshi *et al.* 2007). GFP je poměrně malý protein, který stabilně fluoreskuje jako monomer. Reportérovým genem se stal díky jeho stálosti, snadné detekci v neporušených buňkách a také díky nízkým detekčním limitům. To že jeho aktivita může být detekována přímo v neporušených buňkách bez jakéhokoli použití specifických substrátů, tak zkracuje potřebu časově náročné extrakce proteinů, enzymatických reakcí ale i imunoblotů. Z těchto důvodů se GFP využívá zejména k přímému sledování úrovně exprese, skládání a stability proteinů (Belardinelli *et al.* 2017).

3.1.2.7 Ekvorin

Ekvorin je světelný monomerní protein, který byl původně charakterizován světélkující medúzou *Aequorea victoria*. Ekvorin je odlišný od ostatních luminiscenčních organismů, a to konkrétně ze tří důvodů. Za prvé se jedná o luciferázu, která je schopna katalyzovat oxidaci speciálních luciferinů s nízkou molekulovou hmotností zvaných jako koelentraziny (CTZ). Druhý důvod je ten, že se jedná o protein, který se váže na luciferin, a proto je nazýván jako fotoprotein. CTZ nabitý ekvorinem má tři vazebné domény pro Ca^{2+} ionty. Po navázání vápníku se koelentrazin oxiduje na koelenteramid a vzniklý protein prochází konformační změnou, za které se uvolňuje oxid uhličitý a emise modrého světla. Bioluminiscence ekvorinu proto vzájemně souvisí se skutečnou koncentrací volných iontů Ca^{2+} , jelikož ekvorin je bioluminiscenčním indikátorem pro Ca^{2+} ionty. Ekvorin lze spojit s dalšími reportérovými proteiny jako je např. GFP, a tím zjednodušit lokalizaci exprimovaného rekombinantního ekvorinu fluorescenční mikroskopii (Plieth *et al.* 2006).

3.2 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) byl objeven jako první xenosenzor, který zprostředkovává indukci aryl uhlovodíkové hydroxylázy polycyklickými uhlovodíky a halogenovanými polyaromaty (Dvořák *et al.* 2021). Aryl uhlovodíkový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který je vysoce exprimován v lidských buňkách a tkáních (Novotna *et al.* 2011, Degrelle *et al.* 2022).

AhR je aktivován řadou různých ligandů, jako jsou např. exogenní ligandy, mezi které přísluší syntetické sloučeniny (dioxiny, polyaromatické aminy a uhlovodíky), sloučeniny přírodního původu (berberin a flavonoidy) a léčiva. Dále je aryl uhlovodíkový receptor aktivován endogenními ligandy, mezi které se řadí bilirubin, biliverdin, indoly, deriváty tryptofanu a kyseliny arachidonové. AhR se také řadí mezi regulátory genů zapojených

do metabolismu léků, které jsou zařazeny do nadrodiny cytochromu P450 (CYP), konkrétně patří do podrodiny CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, kde číslo 1 za CYP je rodina, písmena A i B za číslicí 1 je podrodina a poslední číslo znamená individuální isoformu enzymu. Také je zapojen do regulaci buněčného cyklu a proliferaci, imunitní reakci a propagaci nádorů (Novotna *et al.* 2011). Mezi prototypický exogenní ligand aryl uhlovodíkového receptoru se řadí TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin). Mezi nejcharakterističtější planární aromatické a hydrofobní ligandy AhR s vysokou afinitou patří halogenované dioxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky a halogenované bifenyly (Gargaro *et al.* 2021).

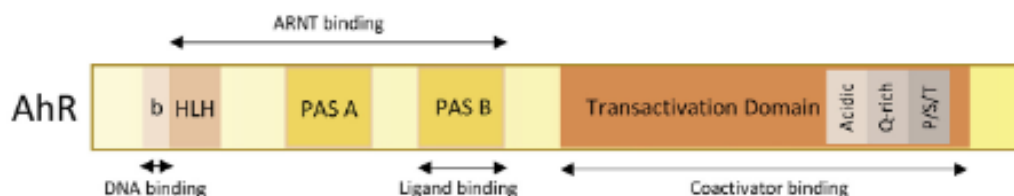
Mezi nejvíce studované ligandy AhR patří endogenní ligandy, které jsou odvozeny od tryptofanu. Tyto ligandy můžeme rozdělit mezi tři hlavní tryptofanové deriváty, které nejvíce přispívají k výsledku regulace genových transkripcí pomocí AhR. Náleží sem kynurenin (KYN), který se vyskytuje v dendritických buňkách u myši v lymfoidních tkání, dále do této skupiny patří 6-formylindol[3,2,b]karbazol (FICZ), který je syntetizován v keratinocytech lidské kůže (Gargaro *et al.* 2021).

Mezi další studované endogenní ligandy se zařazují eikosanoidy jako např. lipoxin anebo hemové metabolity, mezi které náleží bilirubin a biliverdin. Bilirubin je známý tím, že je u novorozenců velmi neurotoxický, ale na druhou stranu má důležité antioxidační vlastnosti. Hlavní enzym, který detoxikuje bilirubin u novorozence je UGT1A1. Pro další antioxidační vlastnosti bilirubinu může vést redoxní cyklování mezi zmíněným bilirubinem a biliverdinem (Bock *et al.* 2018).

Aryl uhlovodíkový receptor patří do základní rodiny helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS). V neaktivním stavu se AhR vyskytuje v cytosolu, kde je obklopen chaperonovými proteiny HSP90, kochaperonem p23, protoonkogenem SRC a proteinu 2, který aktivuje virus hepatitidy B (Dvořák *et al.* 2021 a Gargaro *et al.* 2021). Po aktivaci ligandů dochází k disociaci chaperonů a k translokaci do jádra, kde formuluje heterodimer s jaderným translokátorem AhR (ARNT) patřící do bHLH/PAS rodiny (Dvořák *et al.* 2021 a Degrelle *et al.* 2022). V této formě se váže do DNA sekvence cílových genů, zvaných jako xenobiotický responzivní element (XRE), kde spouští expresi cílových genů CYP1 rodiny (Dvořák *et al.* 2021).

AhR funkční doména obsahuje bHLH doménu, která umožňuje dimerizaci s ARNT, vazbu DNA a interakci s chaperony. Dále obsahuje PAS doménu, která je složena ze dvou strukturálních opaků A a B, konkrétně PAS A se také podílí na dimerizaci s ARNT a PAS B umožňuje vázání ligandů. AhR funkční doména také obsahuje C-terminální doménu, která je složena ze tří subdomén. První subdoména je obohacena o kyselé zbytky, konkrétně

o glutamát nebo asparát, druhá subdoména je obohacena o glutamin Q-rich a třetí subdoména je obohacena o serin, threonin a prolin (viz Obrázek č. 3) (Larigot *et al.* (2018)).



Obrázek č. 3: Schematická struktura funkčních domén aryl uhlovodíkového receptoru. Převzato z článku Larigot *et al.* (2018).

AhR je důležitý v mnoha fyziologických procesech, jako je např. imunita, vývoj orgánů, embryogeneze a regenerační neurogeneze (Dvořák *et al.* 2021 a Gargaro *et al.* 2021). Dále je nezastupitelný v xenobiotickém metabolismu, imunitní reakci, proliferaci buněk, diferenciaci a apoptóze buněk (Gargaro *et al.* 2021). Na druhou stranu se AhR podílí na patogenezi škodlivých onemocnění, jako jsou rakovina, jaterní steatóza a atopická dermatitida (Dvořák *et al.* 2021).

Aryl uhlovodíkový receptor může také mít i alternativní biologické role kromě již známé regulace xenobiotického metabolismu. AhR funguje jako ligand dependentní E3 ubiquitinová ligáza konkrétních nukleárních receptorů. AhR má také důležitou funkci při potlačení střevní karcinogeneze, také může účinně sloužit pro modulaci střevního imunitního systému. Aryl uhlovodíkový receptor také řídí udržování a diferenciaci střevních lymfatických buněk (Satsu *et al.* 2015). AhR se také používá pro regulování cílových genů NFκB, které především řídí prozánětlivou odpověď. Hladina exprese aryl uhlovodíkového receptoru je velmi vysoká v játrech a v bariérových orgánech např. plíce, střeva a kůže. Tato exprese dobře spadá do již zmíněných funkcí AhR v xenobiotickém metabolismu, tak i do nově objevených rolí, jako je např. imunitní odpověď a buněčná hemostáze (Esser *et al.* 2013).

3.2.1 Funkce AhR v kůži

Kůže je největším orgánem lidského těla, které je v neustálém kontaktu s různými faktory, jako je např. teplo, chlad, působení chemických látek, bakterie, viry a mnoho dalších. Pokožka tak vytváří účinnou bariéru proti působení cizorodých látek a zároveň také chrání integritu celého těla (Esser *et al.* 2013). Mezi hlavní sensor chemických signálů v kůži se řadí již zmíněný aryl uhlovodíkový receptor, který je důležitým regulátorem funkce kožní bariéry (Fernández-Gallego *et al.* 2021).

Kůže se skládá ze tří částí, a to epidermis, dermis a subcutis. Epidermis neboli pokožka slouží k ochraně těla, zejména se jedná o mechanickou, chemickou a biologickou bariéru. Pokožka také chrání tělo před velkými ztrátami vody, bojuje proti mikrobům a virům, vrozenými i adaptivními imunitními reakcemi. Dále také metabolizuje a vylučuje vnější chemické látky a chrání se před poškozením DNA ultrafialovým zářením, a to prostřednictvím pigmentace a detekce, popř. eliminace nádorových buněk. V dermis neboli škáře jsou zejména umístěny sensorické orgány pro teplotu a dotek, mazové žlázy, vlasové cibulky, nervové buňky, cévy a lymfatika, které slouží jako porty pro migraci leukocytů do anebo z kůže. Subcutis neboli podkoží je třetí vrstva kůže, která se nachází pod škárkou (*Esser et al. 2013*).

Pokud je kůže zdravá, tak je známé, že aryl uhlovodíkový receptor přispívá k diferenciaci keratinocytů, k funkci kožní bariéry a také k pigmentaci kůže. Tento cyklus je pravděpodobně dosažen díky přechodné aktivaci AhR pomocí rychle metabolizovaných AhR ligandů jako je např. FICZ. Oproti tomu je např. TCDD pomalu metabolizován, a tak vede k trvalé aktivaci AhR a k omezení regulačních zásahů tohoto systému, což může vést k zánětu a také ke karcinogenním pochodům v buňce. Aktivace AhR v závislosti na ligandu TCDD dokáže buď zánětlivou odpověď zmírnit anebo naopak zvýšit, tedy může způsobit prozánětlivou i protizánětlivou odpověď. Je to ligand specifická odpověď, tudíž v každých buňkách TCDD působí jinak. Mezi chronická zánětlivá kožní onemocnění se řadí např. atopická dermatitida a psoriáza neboli lupénka. U těchto onemocnění se aktivuje AhR a ten může vést i k potlačení zánětlivé odpovědi. Jako podpora pro atopickou dermatitidu a lupénku se po určitou dobu používá uhelný dehet, který je schopen aktivovat aryl uhlovodíkový receptor a tím zmírnit příznaky kožního onemocnění (*Bock et al. 2018*).

AhR je zkoumán v souvislosti s onemocněním lupénka. Jedná se o komplexní chronickou autoimunitní poruchu kůže (*Neavin et al. 2018*). Dříve bylo toto onemocnění zkoumáno v kožních buňkách u myši. Tyto buňky byly vystaveny působení FICZ, který zvýšil transkripční aktivitu AhR a tím snížil závažnost zánětu lupénky u myších buněk (*Kyoreva et al. 2021*). Lupénka se u mužů vyskytuje až dvakrát častěji než u žen. Jedná se o kosmetické onemocnění na těle, které narušuje kvalitu života pacientů. Vzhledem k tomu, že aryl uhlovodíkový receptor reguluje převážně imunitní rovnováhu pomocných buněk (Th), konkrétně Th17, Th22 a Treg, tak se očekává, že AhR bude mít zásadní význam při tomto onemocnění. Studie prokázaly, že za zhoršení tohoto zánětu je pravděpodobně zodpovědný nedostatek AhR v nehematopoetických buňkách včetně keratinocytů (*Furie et al. 2019*). Dále je AhR zkoumán také společně s atopickou dermatitidou. Atopická dermatitida (AD) je běžné ekzémové onemocnění, které je svědivé a chronicky se opakující zánětlivé kožní onemocnění

(Furue *et al.* 2019 a Hidaka *et al.* 2017). Zatím není znám cílový reportérový gen AhR, který je zodpovědný za fenotypy podobné AD a jeho funkce u AD (Hidaka *et al.* 2017).

3.3 AhR reportérové systémy

V současnosti je transkripční aktivita aryl uhlovodíkového receptoru testována pomocí klasického luciferázového testu, který je většinou založený na přechodné transfekci plazmidu v buňce anebo na stabilně transfekovaných buněčných liniích (Degrelle *et al.* 2022). Jako první gen pro sledování transkripční aktivity byl použit reportérový gen CAT (Wider *et.* 2017).

Látka TCDD vyvolává širokou škálu toxických a biologických účinků specifických pro jednotlivé druhy organismu a jejich tkání (Garrison *et al.* 1996). TCDD se nachází v nízkých koncentracích, jejich chemická analýza je velmi citlivá, ale je finančně a časově náročná. Chemická analýza nedokáže poskytnout informace o biologických reakcích látek a jejich působení. Z toho důvodu se začali využívat tzv. bioeseje, které jsou schopné aktivovat AhR po působení určitých látek, jako je např. již zmíněný TCDD (Otarola *et al.* 2018).

V 80. letech byly vytvořené nové reportérové buněčné linie jako jsou např. LS180 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva a buňky odvozené od lidského hepatomu HepG2. Tyto linie vykazovali vysokou expresi AhR (Garrison *et al.* 1996). Reportérové systémy, které jsou používány pro sledování aktivity receptorů působících jako transkripční faktory, jsou založené na transfekovaných reportérových buněčných liniích (Sedlák *et al.* 2011). Transfekce je metoda pro vnesení cizí DNA do eukaryotních buněk (Kumar *et al.* 2019). Transfekce slouží k pozorování fragmentu DNA, který je umístěn upstream reportérového genu, např. luciferáza a pomocí měření transkripční aktivity reportérového genu lze určit regulační potenciál sekvence (Yin *et al.* 2005). Exprese reportérového genu byla regulovaná AhR responzivními elementy. V těchto liniích byla exprese luciferázové aktivity kontrolována čtyřmi kopiemi XRE. Pomocí těchto linií bylo prokázáno, že 2,2',5,5'-tetrachlorbifenyl může působit jako druhově specifický antagonist AhR. Tyto rekombinantní buněčné linie lze použít pro detekci a kvantifikaci AhR agonistů nebo antagonistů (Garrison *et al.* 1996). Tyto buněčné linie jsou označovány jako tzv. CALUX testy, jelikož využívaly chemicky aktivovanou expresi luciferázy. Tento test se stal komerčně nejúspěšnější bioesejí prováděný v buněčných liniích (Otarola *et al.* 2018).

CALUX test byl průběžně rozvíjen a charakterizován, ale na druhou stranu inspiroval řadu dalších biologických zkoušek, které byly založené na stejném principu, ale využívali jiné detekční faktory, jako např. chemicky aktivovaná fluorescenční exprese. Která byla navržena

tak, aby zjednodušila postup měření a umožnila analýzu odezvy v živých buňkách. Luciferázový gen byl tak nahrazen GFP genem (*Otarola et al.* 2018). Dále byla vytvořena bioesej seAP, která byla založená na seAP reportérového genu (*Kasai et al.* 2005). Dále byla využívána duální reportérová esej, která využívala dva reportérové geny, a to luciferázu a seAP, pomocí těchto reportérových genů byla měřena transkripční aktivita AhR v stabilně transfekovaných buněčných liniích (*Sato et al.* 2010). Několik lidských stabilně transfekovaných reportérových linií bylo připraveno pro sledování transkripční aktivity AhR. Linie AZ-AhR byla připravena stabilní transfekcí buněk odvozených od lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2 reportérovým plazmidem nesoucím 4 kopie DRE (deoxin responzivní element) pro vazbu AhR. Tato buněčná linie je vhodná pro objevování dalších ligandů AhR (*Novotna et al.* 2011). Pro zlepšení studií a ke sledování aktivity AhR byly sestrojeny dvě nové reportérové linie, jedna využívala gen fluorescenční histon 2B a druhá vylučovanou nanoluciferázu v BeWo lidských placentárních buňkách (*Degrelle et al.* 2022).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Stabilně transfekovaná buněčná linie AhRaCat, která je odvozená od lidských keratinocytů HaCat. Jedná se o adherentní buněčnou linii.

4.2 Laboratorní pomůcky

- 96jamkové černé destičky pro měření luminiscence (NUNC)
- 96jamkové kultivační destičky (Techno Plastic Products)
- Automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 μ l, 0,5 – 10 μ l, 2 – 20 μ l, 10 – 100 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1 000 μ l (Eppendorf)
- Buničina (Tork)
- Bürkova komůrka (Assient)
- Krycí sklíčka 22x22mm (Manzel Gläser)
- Kultivační láhev s obsahem 25 cm² a 75 cm² (Techno Plastic Products)
- Multikanálová pipeta 30 – 300 μ l (Eppendorf)
- Nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- Petriho misky (Techno Plastic Products)
- Pipetor FastPette (Labnet)
- Plastové centrifugační zkumavky s objemem 15 ml a 50 ml (Techno Plastic Products)
- Plastové mikrocentrifugační zkumavky s objemem 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml a 5 ml (BIOPlastics)
- Plastové stojánky na zkumavky (Techno Plastic Products)
- Plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 10 – 300 μ l, 100 – 1 000 μ l (Eppendorf)
- Sérologické pipety 0,1 – 2 ml, 1 – 5 ml, 1 – 10 ml a 1 – 25 ml (Techno Plastic Products)

4.3 Použité chemikálie a roztoky

- Antagonisty AhR: CH223191 (Sigma Aldrich, katalogové číslo C8124), MNF (kind gift from Thomas Haarmann-Stemmann)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, katalogové číslo D4540)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, katalogové číslo 19516)

- Kultivační médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, katalogové číslo D6429) s L-glutaminu (Serana, katalogové číslo RGL-001), 10% fetálního bovinního séra (FBS, Sigma Aldrich, katalogové číslo F7524), neesenciálních aminokyselin (Sigma Aldrich, katalogové číslo M7145) a antibiotika penicilin - streptomycin (Sigma Aldrich, katalogové číslo P4333)
- Methanol (Penta Chemicals Unlimited, katalogové číslo 21210-20005)
- Substrát pro luciferázu 30 ml: 5 mg D-luciferin (Sigma Aldrich, katalogové číslo L9504-50MG), 10 mg adenzin-5'-trifosfát (ATP, Sigma Aldrich, katalogové číslo A2383-5G), 5 mg koenzymu A (CoA, Sigma Aldrich, katalogové číslo C4780-100MG), 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma Aldrich, katalogové číslo 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufr 1 mol.l⁻¹ (pH 7,8; Sigma Aldrich, katalogové číslo T9650), 1,23 mg/6,6 µl 0,5 mol.l⁻¹ kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Sigma Aldrich, katalogové číslo E9884), 3,03 mg/1,23 ml 100 mmol.l⁻¹ heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄ · 7 H₂O, LACHEMA) a doplnit do 30 ml destilovanou vodou.
- Trypanová modř (Sigma, katalogové číslo T9650)
- Ligandy AhR: 2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin (TCDD, ULTRA Scientific, katalogové číslo 48599), 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ, Sigma Aldrich, katalogové číslo SML149), benzo[a]pyren (BaP, Sigma Aldrich, katalogové číslo B1760)
- Fosfátový pufr PBS (BioConcept, katalogové číslo 305F29I)
- 0,1% roztok krystalové violeti: bylo připraveno smícháním 40 ml deionizované vody a 10 ml 0,5% krystalové violeti (Sigma Aldrich, katalogové číslo V5265)
- 0,25% trypsin-EDTA (Biosera, katalogové číslo MS00CY100B)
- 10x zředěný RLB: bylo připraveno smícháním 40 ml deionizované vody a 10 ml Reporter Lysis 5x Buffer (Promega, katalogové číslo E3971)

4.4 Přístroje

- Chladnička (Gorenje)
- Inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm)
- Laminární box Labculture (ESCO)
- Mrazicí box MDF-U53V (Sanyo)
- Odsávačka Flask-Trap 1 (Biosan)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- Světelný mikroskop (Novel Optics)

- Třepačka MR-12 (Biosan)
- Vodní lázeň LCB22D (Daihan LabTech)
- Vortex Reax top (Heidolph)

5 Metodika práce

V praktické části bakalářské práce byla sledována transkripční aktivita AhR ve stabilně transfekované reportérové buněčné linii AhRaCat odvozené od kožních buněk HaCat. Proliferační aktivita byla stanovována pomocí barvení krystalovou violetí, transkripční aktivita AhR byla testována po působení modelových aktivátorů TCDD, BaP a FICZ v závislosti na koncentraci a čase. Buňky byly kultivovány v plastové láhvi v inkubátoru při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂. Na kultivaci buněk bylo použito DMEM médium, jehož složení je popsáno v kapitole 4.3.

5.1 Pasážování buněk

Na pasáž buněk bylo použito DMEM médium, PBS a trypsin. Nejdříve bylo DMEM médium vytáhnuo z ledničky a bylo dáno do vodní lázně, aby se zahřálo na 37 °C. Trypsin byl nechán rozmrazit při pokojové teplotě. Vše se dezinfekcí očistilo a následně bylo vloženo do laminárního boxu. Kultivační láhev s buňkami byla vytáhnuo z inkubátoru, byla zkontrolována pod mikroskopem, zda jsou buňky dostatečně narostlé. Poté byla láhev vydezinfikována a vložena do laminárního boxu. Z kultivační láhve bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty 5 ml PBS. Následně bylo PBS odsáto odsávací kůčkou a do kultivační láhve byl přidán 1 ml trypsinu, který rozruší mezibuněčné kontakty. Láhev byla uzavřena a opatrným nakláněním láhve bylo docíleno rovnoměrného rozprostření roztoku trypsinu po celé kultivační ploše. Kultivační láhev byla vložena do inkubátoru cca na 5 minut, dokud se buňky nezačaly odlepovat od povrchu láhve. Kultivační láhev byla opakovaně nakláněna a poklepávána, aby se docílilo odlepení buněk od kultivačního podkladu. Po uvolnění buněk byla kultivační láhev vložena zpět do laminárního boxu. K 1 ml trypsinu bylo do kultivační láhve přidáno 9 ml média. Pomocí sérologické pipety byly buňky resuspendovány a to postupným nasáváním do pipety a zpětným vypouštěním do láhve. Následně byl objem v láhvi přenesen do 15ml plastové falkony. Do kultivační láhve bylo přeneseno z 15ml falkony 2 ml suspenze a objem byl doplněn DMEM médiem do 20 ml. Poté byla láhev vložena do inkubátoru. Zbylá buněčná suspenze v 15ml plastové falkoně byla využita na experiment (viz kapitola 5.2) anebo byla suspenze odsávací kůčkou odsáta, pokud suspenze nebyla již potřeba k dalšímu využití. Pasážování bylo provedeno dvakrát nebo třikrát týdně.

5.2 Počítání a vyšetí buněk

Pro provedení experimentů bylo nejdříve nutné buňky spočítat a provést jejich následné vyšetí na kultivační 96jamkovou desku. Z buněčné suspenze, která byla připravena podle kapitoly 5.1 bylo odebráno 10 μl do 0,5ml mikrozkuhavky a bylo přidáno 90 μl trypanové modři. Tato suspenze byla pipetou promíchána postupným nasáváním a vypouštěním. Následně byla suspenze aplikována dvakrát po 10 μl na Bürkovu komůrku pod krycí sklíčko. Poté byly buňky spočítány pod světelným mikroskopem, a to v deseti polích. Byl spočítán průměrný počet buněk v jednom čtverci a poté byl výsledek vynásoben 10^5 . Buněčná suspenze pro sledování proliferační aktivity buněk AhRaCat pomocí krystalové violeti byla vyseta podle tabulky č. 1, pro sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandů podle tabulky č. 2, pro časovou analýzu aktivity AhR podle tabulky č. 3, pro sledování transkripční aktivity AhR po působení antagonisty podle tabulky č. 4 a pro udržení luciferázové inducibility modelovými ligandy AhR podle tabulky č. 5. U všech metod byly buňky vysety na 96jamkovou desku. Pro všechny experimenty kromě experimentu pro udržení inducibility ligandů AhR bylo provedeno vyšetí buněk ve čtyřech opakováních, pro experiment udržení inducibility ligandů AhR bylo vyšetí provedeno v pěti opakováních. Následně bylo potřebné množství buněk a DMEM média smícháno, bylo přelito do Petriho misky a multikanálovou pipetou byla buněčná suspenze rozpipetována do jednotlivých jamek po 200 μl . Po vyšetí byly kultivační desky inkubovány v inkubátoru do dalšího dne.

Tabulka č. 1: Vyšetí buněk pro sledování proliferační aktivity AhRaCat pomocí krystalové violeti

Doba inkubace	Počet buněk
24 hod	25 000
48 hod	15 000

Tabulka č. 2: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci modelových aktivátorů

Doba inkubace	Počet buněk
4 hod	25 000
24 hod	25 000
48 hod	15 000

Tabulka č. 3: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhRaCat v závislosti na čase

Doba inkubace	Počet buněk
4 hod	25 000
8 hod	25 000
12 hod	25 000
20 hod	25 000
24 hod	25 000

Tabulka č. 4: Vyšetí buněk pro sledování transkripční aktivity AhRaCat po působení antagonistů

Doba inkubace	Počet buněk
24 hod	25 000

Tabulka č. 5: Vyšetí buněk pro udržení luciferázové inducibility ligandů AhR

Doba inkubace	Počet buněk
24 hod	25 000

5.3 Aplikace látek

Následující den po vyšetí buněk byly buňky v kultivační 96jamkové desce připraveny pro aplikaci látek. Zásobní roztoky jednotlivých látek (TCDD, BaP a FICZ) byly rozpuštěné v DMSO a následně naředěné na požadovanou koncentraci podle Tabulky č. 6, 7 a 8. Látky byly následně ředěné 1 000x do kultivačního média pro získání finální koncentrace, která je aplikovaná na buňky. Před aplikací látek byla deska vytáhnutá z inkubátoru a byla zkontrolována pod mikroskopem. Deska byla vydezinfikována a byla vložena do laminárního boxu. Aplikace látek byla provedena tak, že se kultivační médium v jamkách odsálo a bylo přidáno 200 μ l nového média, které obsahovalo jednotlivé látky o finálních koncentracích. Po dokončení byly desky vloženy do inkubátoru po určený čas experimentu.

Tabulka č. 6: Příprava koncentrací TCDD ze zásobního roztoku 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Zkumavka	Ředění	Množství DMSO	Množství TCDD	Koncentrace zásobního roztoku TCDD	Finální koncentrace TCDD
1	10x	54 μl	6 μl	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	50 nmol.l^{-1}
2	5x	48 μl	12 μl	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	10 nmol.l^{-1}
3	2x	30 μl	30 μl	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	5 nmol.l^{-1}
4	5x	48 μl	12 μl	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	1 nmol.l^{-1}
5	10x	54 μl	6 μl	100 nmol.l^{-1}	100 pmol.l^{-1}
6	10x	54 μl	6 μl	10 nmol.l^{-1}	10 pmol.l^{-1}
7	10x	54 μl	6 μl	1 nmol.l^{-1}	1 pmol.l^{-1}

Tabulka č. 7: Příprava koncentrací BaP ze zásobního roztoku 50 mmol.l^{-1}

Zkumavka	Ředění	Množství DMSO	Množství BaP	Koncentrace zásobního roztoku BaP	Finální koncentrace BaP
1	-----	-----	-----	50 mmol.l^{-1}	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
2	5x	48 μl	12 μl	10 mmol.l^{-1}	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
3	2x	30 μl	30 μl	5 mmol.l^{-1}	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
4	1,7x	25 μl	35 μl	3 mmol.l^{-1}	3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
5	3x	40 μl	20 μl	1 mmol.l^{-1}	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
6	2x	30 μl	30 μl	500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	500 nmol.l^{-1}
7	5x	48 μl	12 μl	100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	100 nmol.l^{-1}
8	10x	54 μl	6 μl	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	10 nmol.l^{-1}
9	10x	54 μl	6 μl	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	1 nmol.l^{-1}

Tabulka č. 8: Příprava koncentrací FICZ ze zásobního roztoku 25 mmol.l⁻¹

Zkumavka	Ředění	Množství DMSO	Množství FICZ	Koncentrace zásobního roztoku FICZ	Finální koncentrace FICZ
1	-----	-----	-----	25 mmol.l ⁻¹	50 μmol.l ⁻¹
2	2,5x	36 μl	24 μl	10 mmol.l ⁻¹	10 μmol.l ⁻¹
3	2x	30 μl	30 μl	5 mmol.l ⁻¹	5 μmol.l ⁻¹
4	1,25x	12 μl	48 μl	4 mmol.l ⁻¹	4 μmol.l ⁻¹
5	4x	45 μl	15 μl	1 mmol.l ⁻¹	1 μmol.l ⁻¹
6	2x	30 μl	30 μl	500 μmol.l ⁻¹	500 nmol.l ⁻¹
7	5x	48 μl	12 μl	100 μmol.l ⁻¹	100 nmol.l ⁻¹
8	10x	54 μl	6 μl	10 μmol.l ⁻¹	10 nmol.l ⁻¹
9	10x	54 μl	6 μl	1 μmol.l ⁻¹	1 nmol.l ⁻¹
10	2x	30 μl	30 μl	500 nmol.l ⁻¹	500 pmol.l ⁻¹
11	5x	48 μl	12 μl	100 nmol.l ⁻¹	100 pmol.l ⁻¹
12	2x	30 μl	30 μl	50 nmol.l ⁻¹	50 pmol.l ⁻¹
13	5x	48 μl	12 μl	10 nmol.l ⁻¹	10 pmol.l ⁻¹

Pro stanovení proliferační aktivity buněk pomocí krystalové violeti byl TCDD testován v koncentracích od 1 pmol.l⁻¹ do 50 nmol.l⁻¹, BaP byl testován v koncentracích od 1 nmol.l⁻¹ do 50 μmol.l⁻¹ a FICZ byl testován v koncentracích od 1 nmol.l⁻¹ do 50 μmol.l⁻¹. Jediná koncentrace u FIZCE 50 μmol.l⁻¹ byla ze zásobního roztoku ředěna 500x. Jako pozitivní kontrola byl použit Triton, který byl také zředěn 1 000x s DMEM médiem. Jako negativní kontrola byl použit roztok DMSO, který byl také 1 000x zředěn s DMEM médiem.

Pro stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandů pomocí reportérové eseje byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek, které byly ředěny 1 000x v depletovaném médiu. Pro získání koncentrace 50 μmol.l⁻¹ FICZ byl zásobní roztok ředěn 500x. TCDD byl testován v koncentracích podle Tabulky č. 6 po dobu 4 hod, 24 hod a 48 hod. Působení BaP po 4 hod bylo testováno v koncentracích podle Tabulky č. 7 kromě koncentrace 500 nmol.l⁻¹ a 3 μmol.l⁻¹, pro působení látek 24 hod a 48 hod byly použity všechny uvedené koncentrace kromě 3 μmol.l⁻¹. Působení FICZ po 4 hod bylo testováno v koncentracích podle Tabulky č. 8 kromě koncentrací od 50 μmol.l⁻¹ do 1 μmol.l⁻¹, pro působení látek 24 hod a 48 hod byly použity všechny uvedené koncentrace kromě 50 pmol.l⁻¹, 500 pmol.l⁻¹,

4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Jako negativní kontrola byl použit roztok DMSO, který byl také 1 000x zředěn v depletovaném médiu.

Pro sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na čase pomocí reportérové eseje byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek, které byly ředěné 1 000x v depletovaném médiu. Jednotlivé koncentrace byly stanoveny programem Graphpad, kde byly vypočteny hodnoty EC_{80} a EC_{50} . Pro TCDD byla stanovena koncentrace 5 nmol.l^{-1} podle Tabulky č. 6, pro BaP 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ podle Tabulky č. 7 a pro FICZ 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentrace podle Tabulky č. 8. Jedná se o hodnoty EC_{50} . Jako negativní kontrola byl použit roztok DMSO, který byl také 1 000x zředěn v depletovaném médiu.

Pro sledování inhibice transkripční aktivity AhR byly buňky vystaveny po dobu 24 hod působení modelových ligandů (TCDD 5 nmol.l^{-1} , BaP 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a FICZ 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) v kombinaci s rostoucí koncentrací AhR antagonistů CH223191 a MNF v koncentračním rozmezí 10 nmol.l^{-1} – 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 9). Látky byly ředěny do kultivačního média 1 000x. Jako negativní kontrola byl použit roztok DMSO, který byl také 1 000x zředěn v DMEM médiu.

V poslední sadě experimentů byl sledován vliv AhR ligandů na udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci. Byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek v depletovaném médiu. Ředění bylo provedeno 1 000x. Pro TCDD byla použita koncentrace 5 nmol.l^{-1} , pro BaP 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a pro FICZ 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Jako negativní kontrola byl použit roztok DMSO, který byl také 1 000x zředěn v depletovaném médiu.

Tabulka č. 9: Příprava koncentrací u testovaných antagonistů CH223191 a MNF

Zkumavka	Ředění	Množství DMSO	Množství antagonisty	Koncentrace zásobního roztoku antagonisty	Finální koncentrace antagonisty
1	----	-----	-----	10 mmol.l^{-1}	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
2	2x	30 μl	30 μl	5 mmol.l^{-1}	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
3	5x	48 μl	12 μl	1 mmol.l^{-1}	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
4	10x	54 μl	6 μl	100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	100 nmol.l^{-1}
5	10x	54 μl	6 μl	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	10 nmol.l^{-1}

5.4 Měření proliferační aktivity buněk AhRaCat pomocí krystalové violeti

Po vyšetí buněk a následné aplikaci látek (viz kapitola 5.2 a 5.3) byly desky uloženy do inkubátoru. V inkubátoru byly uloženy pro působení látek 24 hod a 48 hod. Po uplynutí dané inkubační doby, bylo kultivační médium v desce opatrně vyklepáno do speciální nádoby pro toxický odpad, deska byla osušena na buničině. Jednotlivé jamky byly propláchnuty 100 μ l nesterilním PBS. Desky s PBS byly vyklepnuty do odpadu a byly osušeny na buničině. Do jamek bylo k buňkám přidáno 60 μ l krystalové violeti o koncentraci 0,1 %. Následně byly kultivační desky inkubované na třepačce po dobu 1 hod – 1,5 hod. Po uplynutí doby inkubace bylo vyklepnuto barvivo, destička byla osušena na buničině. Následně byly buňky promývány 60 μ l roztoku PBS, a to minimálně 5x. Byly promývány, dokud se vymývala barva. Po posledním promytí byla deska osušena na buničině. Navázané barvivo na buňkách bylo rozpuštěno přidáním 200 μ l methanolu. Pokud nebyl roztok v jamkách homogenní, byl propipetován. Výsledek byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

5.5 Stanovení transkripční aktivity buněk AhRaCat v závislosti na koncentraci ligandu

Po vyšetí buněk a následné aplikaci látek (viz kapitola 5.2 a 5.3) byly desky uloženy do inkubátoru a inkubovány po dobu 4 hod, 24 hod a 48 hod. Po uplynutí inkubační doby bylo kultivační médium v desce opatrně vyklepáno do speciální nádoby pro toxický odpad, deska byla osušena na buničině. K buňkám do jednotlivých jamek bylo aplikováno 30 μ l reportérového lyzačního pufru. Kultivační desky byly uloženy do mrazáku (-80 °C) min. po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byly kultivační desky položeny na třepačku po dobu cca 20 minut, dokud nebyl buněčný lyzát v jamkách rozmražený. Následně bylo z kultivačních desek odebráno 6 μ l buněčného lyzátu do čistých černých 96jamkových desek určených k měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30 μ l substrátu pro luciferázu a byla změřena luminiscence pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

5.6 Sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na čase

Po vyšetí buněk a následné aplikaci látek (viz kapitola 5.2 a 5.3) byly desky inkubovány při 37 °C v inkubátoru po dobu 4 hod, 8 hod, 12 hod, 20 hod a 24 hod. Po uplynutí inkubační doby bylo kultivační médium v desce opatrně vyklepáno do speciální nádoby pro toxický odpad a deska byla osušena na buničině. K buňkám do jednotlivých jamek bylo přidáno po 30 μ l reportérového lyzačního pufru. Kultivační desky byly vloženy do mrazáku (-80 °C) min. po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byly kultivační desky položeny na třepačku po dobu cca 20 minut, dokud nebyl buněčný lyzát v jamkách rozmražený. Následně

bylo z kultivačních desek odebráno 6 μ l buněčného lyzátu do čistých černých 96jamkových desek určených k měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30 μ l substrátu pro luciferázu a byla změřena luminiscence pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

5.7 Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů

Po vyšetí buněk a následné aplikaci látek (viz kapitola 5.2 a 5.3) byly desky inkubovány při 37 °C v inkubátoru po 24 hod. Po uplynutí inkubační doby bylo kultivační médium v desce opatrně vyklepáno do speciální nádoby pro toxický odpad a deska byla osušena na buničině. K buňkám do jednotlivých jamek bylo aplikováno 30 μ l reportérového lyzačního pufu. Kultivační desky byly uloženy do mrazáku (-80 °C) min. po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byly kultivační desky položeny na třepačku po dobu cca 20 minut, dokud nebyl buněčný lyzát v jamkách rozmražený. Následně bylo z kultivačních desek odebráno 6 μ l buněčného lyzátu do čistých černých 96jamkových desek určených k měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30 μ l substrátu pro luciferázu a byla změřena luminiscence pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

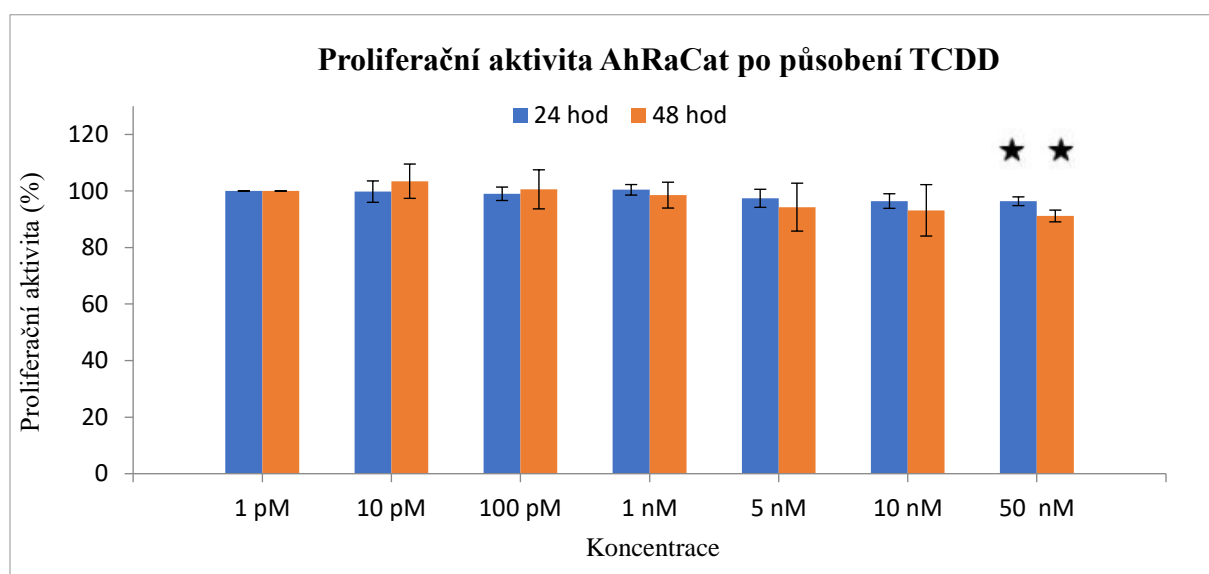
5.8 Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci

Po vyšetí buněk a následné aplikaci látek (viz kapitola 5.2 a 5.3) byly desky inkubovány při 37 °C v inkubátoru po 24 hod. Po uplynutí inkubační doby bylo kultivační médium v desce opatrně vyklepáno do speciální nádoby pro toxický odpad a deska byla osušena na buničině. K buňkám do jednotlivých jamek bylo aplikováno 30 μ l reportérového lyzačního pufu. Kultivační desky byly uloženy do mrazáku (-80 °C) min. po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byly kultivační desky položeny na třepačku po dobu cca 20 minut, dokud nebyl buněčný lyzát v jamkách rozmražený. Následně bylo z kultivačních desek odebráno 6 μ l buněčného lyzátu do čistých černých 96jamkových desek určených k měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30 μ l substrátu pro luciferázu a byla změřena luminiscence pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

6 Výsledky

6.1 Proliferační aktivita buněk AhRaCat pomocí krystalové violeti

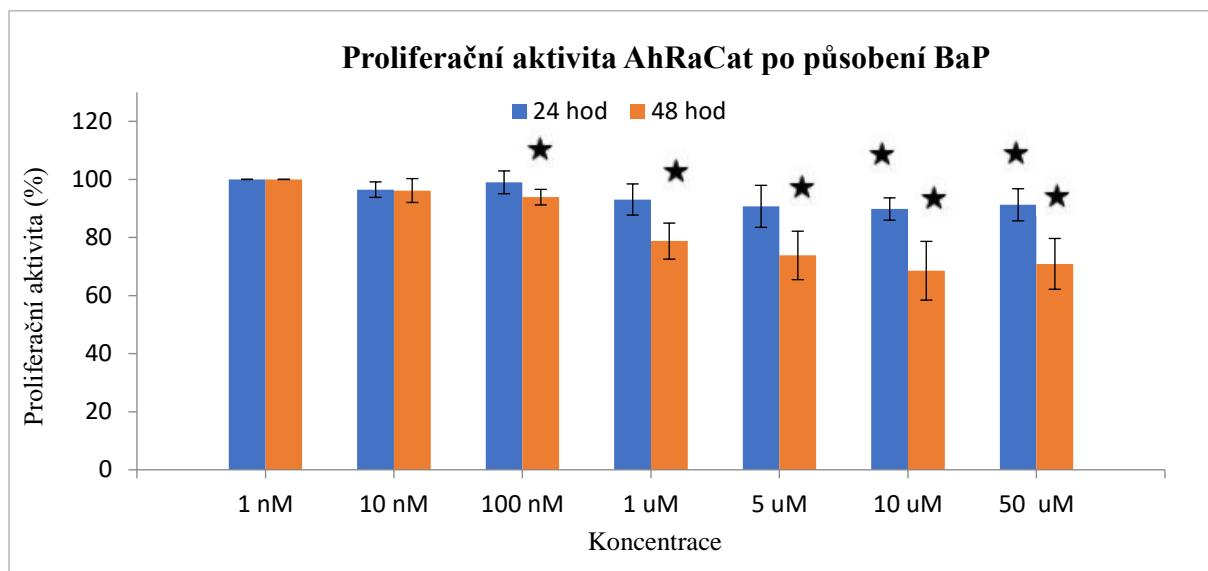
Buňky AhRaCat byly vystaveny působení TCDD, BaP a FICZ po dobu 24 hod a 48 hod a byla sledována jejich proliferační aktivita pomocí krystalové violeti. TCDD byl testován v koncentračním rozmezí 1 pmol.l^{-1} – 50 nmol.l^{-1} (viz Tabulka č. 6 a Kapitola 5.3) a za 24 hod nebyl v žádné testované koncentraci pozorován pokles proliferační aktivity. TCDD v koncentraci 50 nmol.l^{-1} snížil proliferační aktivitu buněk AhRaCat na 91,6% proti nejnižší testované koncentraci 1 pmol.l^{-1} (viz Graf č. 1).



Graf č. 1: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení TCDD po 24 hod a 48 hod inkubace. Graf znázorňuje proliferační aktivitu buněčné linie AhRaCat po působení TCDD. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení TCDD a 15 000 buněk na jamku pro 48 hod působení TCDD. TCDD byl aplikován v koncentracích 1 pmol.l^{-1} – 50 nmol.l^{-1} . Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 1 pmol.l^{-1} , která představuje 100% proliferační aktivitu. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$), které byly určeny pomocí T.TESTU.

BaP byl testován v koncentracích 1 nmol.l^{-1} – $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 7 a Kapitola 5.3). Proliferační aktivita buněk AhRaCat po působení BaP za 24 hod byla v koncentracích $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ mírně snížena, zhruba o 10 %, proti nejnižší koncentraci 1 nmol.l^{-1} . Za 48 hod BaP v koncentraci $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil proliferační aktivitu o 20 % proti nejnižší koncentraci 1 nmol.l^{-1} , v koncentraci $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil proliferační aktivitu

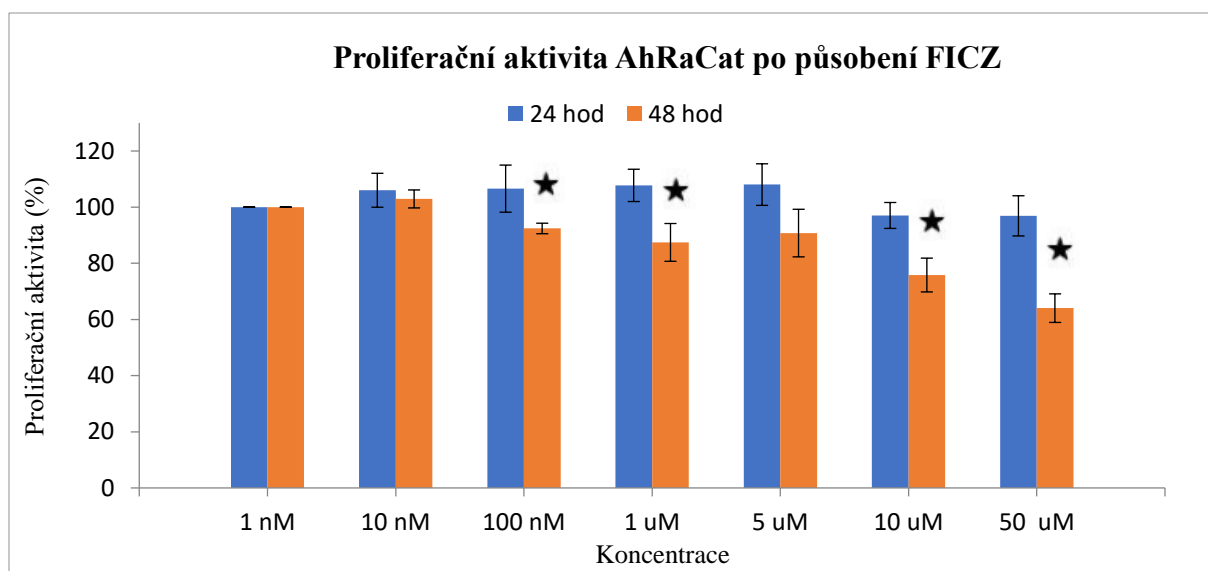
o 26 %, v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil proliferační aktivitu o 31 % a v koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil proliferační aktivitu o 28 % proti nejnižší koncentraci 1 nmol.l^{-1} (viz Graf č. 2).



Graf č. 2: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení BaP po 24 hod a 48 hod inkubace.

Graf znázorňuje proliferační aktivitu buněčné linie AhRaCat po působení BaP. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení BaP a 15 000 buněk na jamku pro 48 hod působení BaP. BaP byl aplikován v koncentracích 1 nmol.l^{-1} – $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 1 nmol.l^{-1} , která představuje 100% proliferační aktivitu. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$), které byly určeny pomocí T.TESTU.

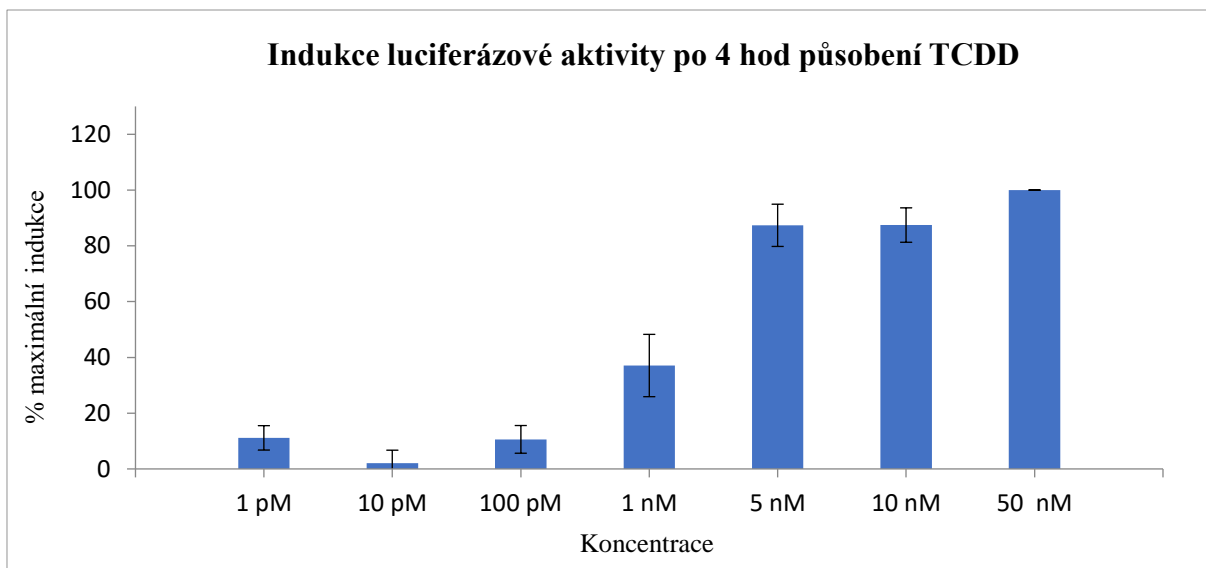
FICZ byl testován v koncentracích 1 nmol.l^{-1} – $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (viz Tabulka č. 8 a Kapitola 5.3). FICZ neovlivňoval proliferační aktivitu AhRaCat buněk v žádné z testovaných koncentrací po 24 hod. Po 48 hod jsme pozorovali signifikantně sníženou proliferační aktivitu po působení FICZ v koncentracích $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy FICZ v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ způsobil snížení o 24 % a v koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil proliferační aktivitu buněk o 35 % proti nejnižší koncentraci 1 nmol.l^{-1} (viz Graf č. 3).



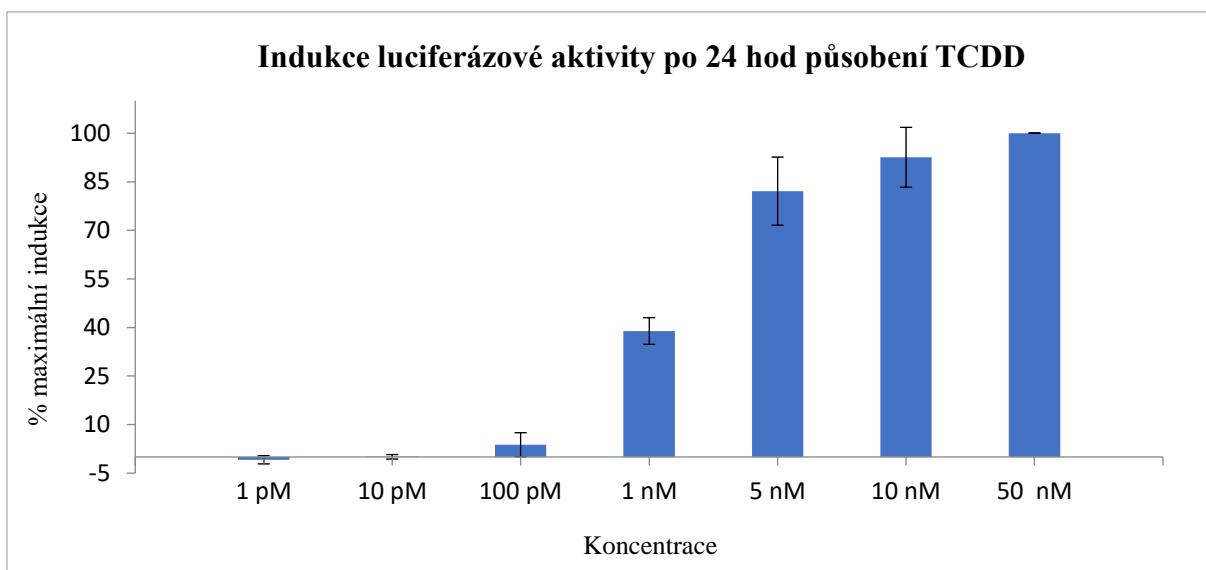
Graf č. 3: Stanovení proliferační aktivity AhRaCat po působení FICZ po 24 hod a 48 hod inkubace. Graf znázorňuje proliferační aktivitu buněčné linie AhRaCat po působení FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení FICZ a 15 000 buněk na jamku pro 48 hod působení FICZ. FICZ byl aplikován v koncentracích 1 nmol.l⁻¹ – 50 μmol.l⁻¹. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 1 nmol.l⁻¹, která představuje 100% proliferační aktivitu. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty (p<0,05), které byly určeny pomocí T.TESTU.

6.2 Sledování transkripční aktivity AhR v závislosti na koncentraci ligandu

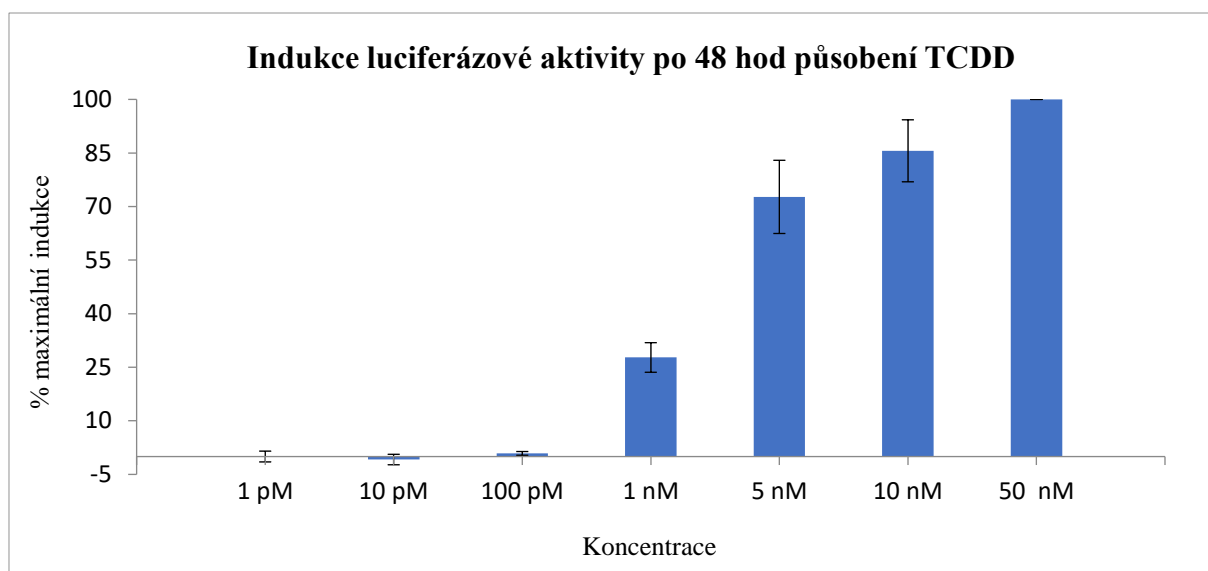
Pomocí luciferázové reportérové eseje byla stanovena transkripční aktivita AhR v buněčné linii AhRaCat. Buňky byly vystaveny působení TCDD, BaP a FICZ po dobu 4 hod, 24 hod a 48 hod. TCDD byl testován v koncentracích 1 pmol.l⁻¹ – 50 nmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 6 a Kapitola 5.3). U testované látky TCDD po 4 hod inkubace aktivita AhR rostla se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u tří nejvyšších koncentrací a to konkrétně u 5 nmol.l⁻¹, 10 nmol.l⁻¹ a 50 nmol.l⁻¹ (viz Graf č. 4). Po 24 hod inkubace (viz Graf č. 5) a 48 hod inkubace (viz Graf č. 6) byla také zaznamenána vzrůstající aktivita AhR se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší byla 5 nmol.l⁻¹, 10 nmol.l⁻¹ a 50 nmol.l⁻¹.



Graf č. 4: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení TCDD. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací TCDD (1 pmol.l^{-1} – 50 nmol.l^{-1}) po dobu 4 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 nmol.l^{-1} , která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.

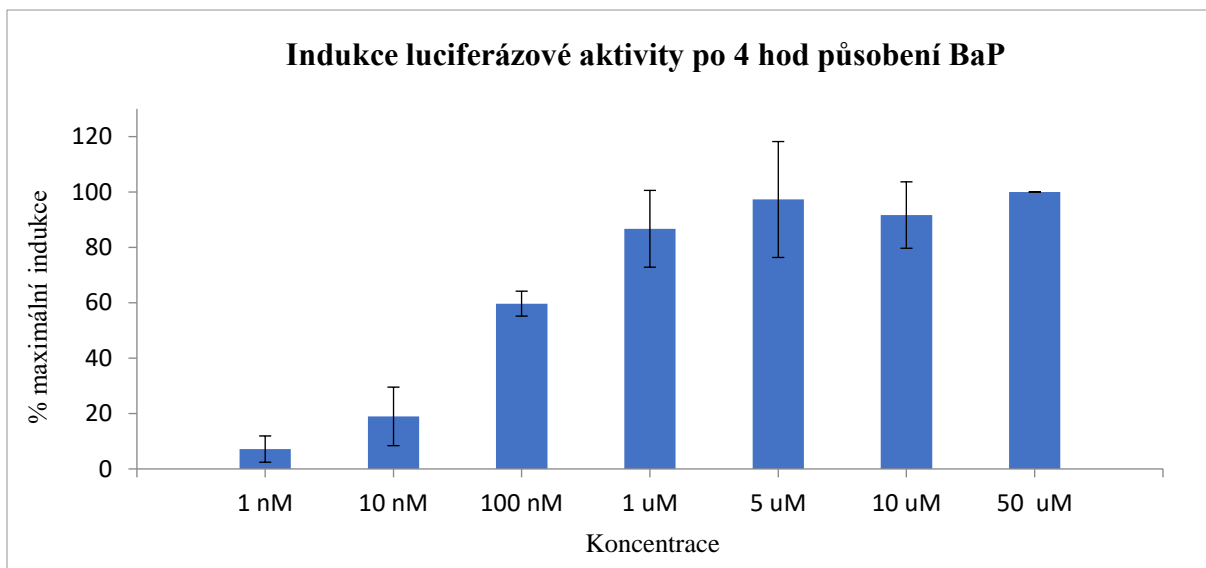


Graf č. 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení TCDD. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací TCDD (1 pmol.l^{-1} – 50 nmol.l^{-1}) po dobu 24 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 nmol.l^{-1} , která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem pěti nezávislých experimentů.

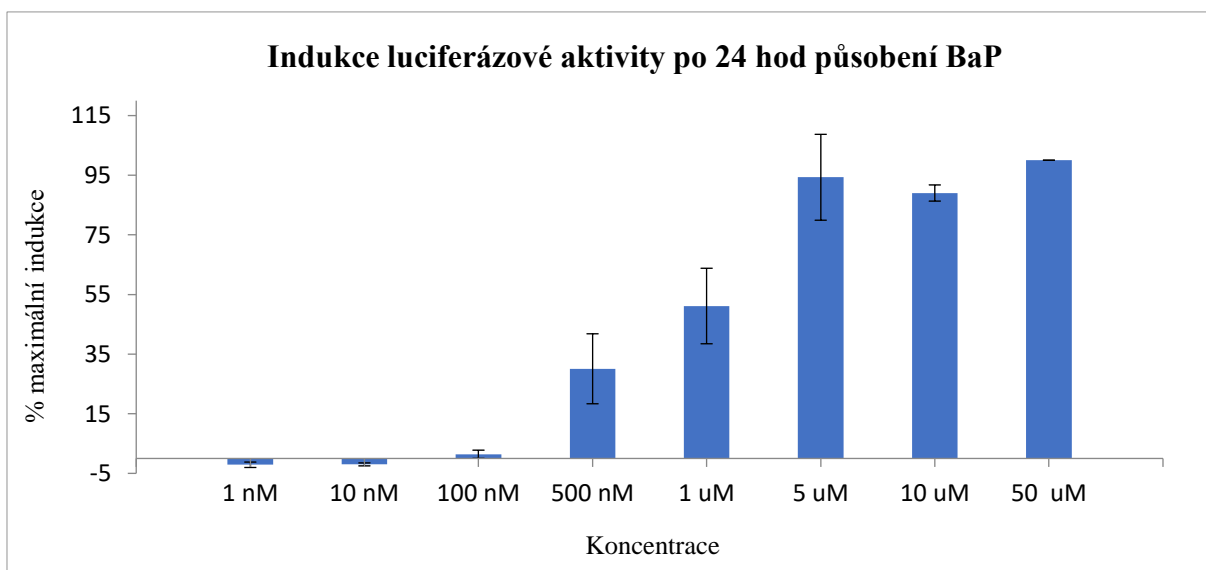


Graf č. 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení TCDD. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD. Buňky byly vysety v koncentraci 15 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací TCDD (1 pmol.l⁻¹ – 50 nmol.l⁻¹) po dobu 48 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 nmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.

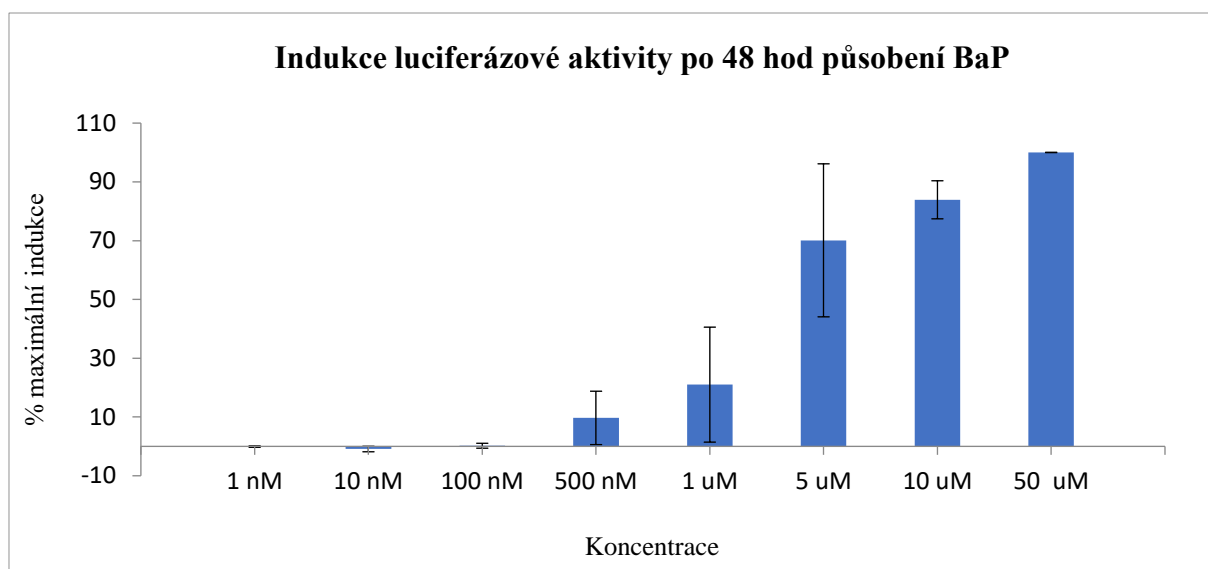
BaP byl testován v koncentracích 1 nmol.l⁻¹ – 50 μmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 7 a Kapitola 5.3). U testované látky BaP po 4 hod inkubace (viz Graf č. 7) a po 24 hod inkubace (viz Graf č. 8) aktivita AhR rostla se zvyšující se koncentrací, kromě druhé nejvyšší koncentrace 10 μmol.l⁻¹, zde je mírný pokles v aktivitě. Nejvyšší aktivita AhR byla zaznamenána u koncentrace 5 μmol.l⁻¹ a 50 μmol.l⁻¹. BaP způsobil po 48 hod zvýšenou aktivitu AhR, která byla přímo úměrná zvyšující se koncentraci. Nejvyšší aktivita byla měřena u koncentrace 50 μmol.l⁻¹ (viz Graf č. 9).



Graf č. 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení BaP. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení BaP. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací BaP (1 nmol.l⁻¹ – 50 μmol.l⁻¹) po dobu 4 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.

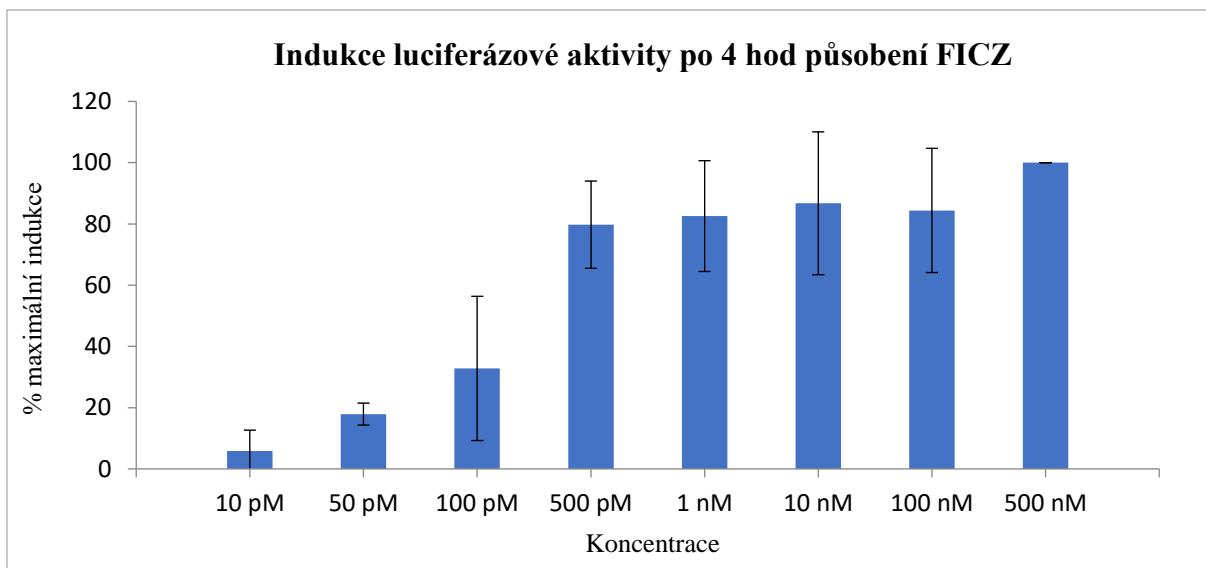


Graf č. 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení BaP. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení BaP. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací BaP (1 nmol.l⁻¹ – 50 μmol.l⁻¹) po dobu 24 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

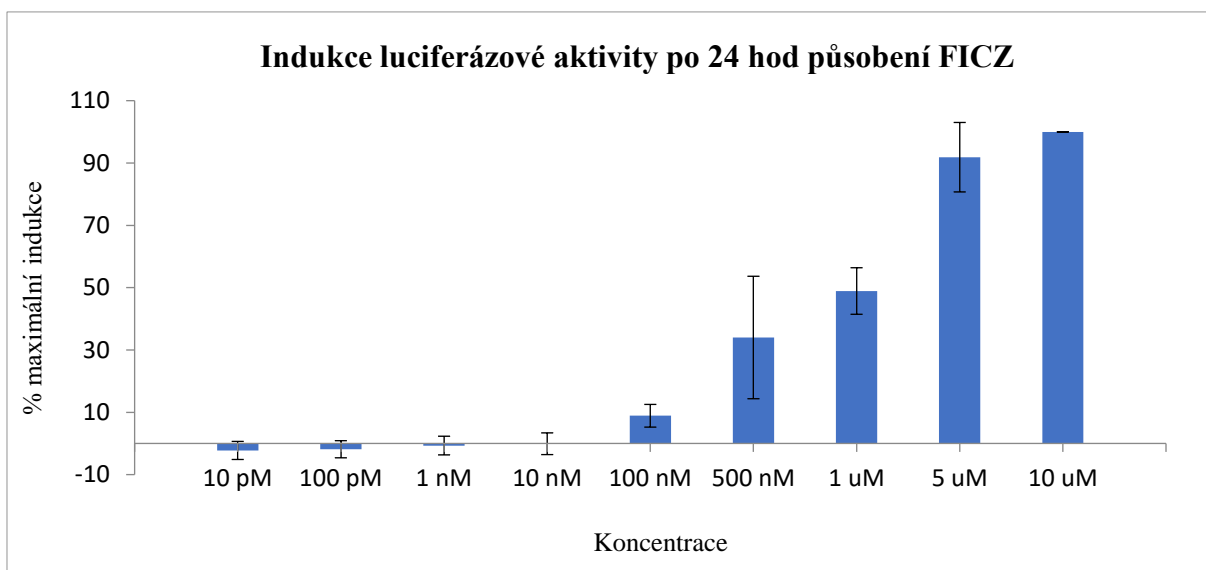


Graf č. 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení BaP. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení BaP. Buňky byly vysety v koncentraci 15 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací BaP (1 nmol.l⁻¹ – 50 μmol.l⁻¹) po dobu 48 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 50 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

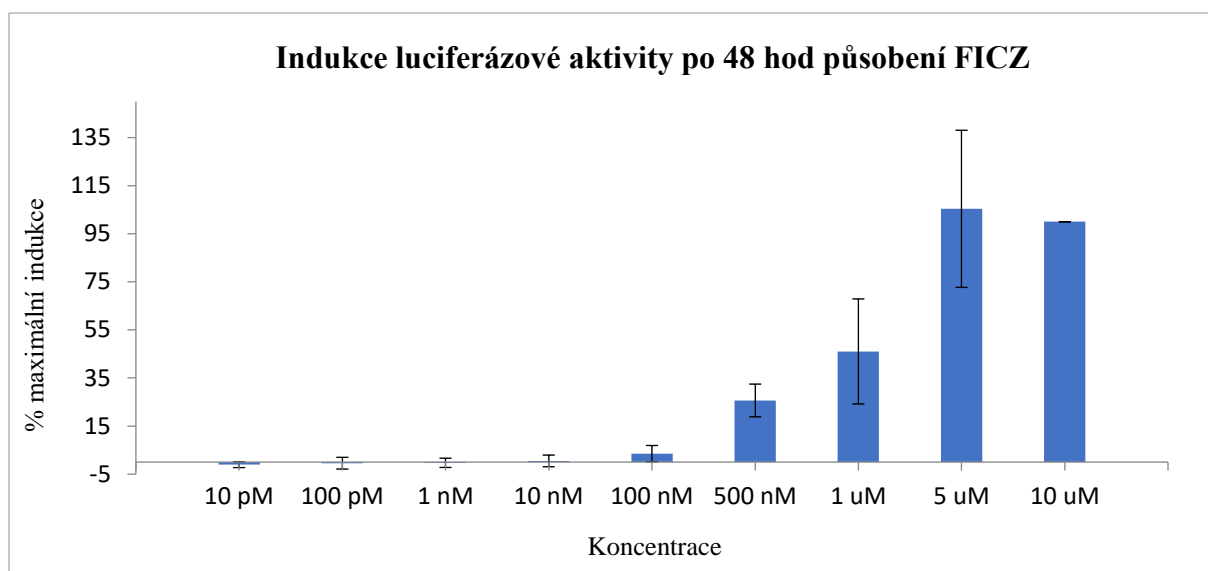
FICZ byl testován v koncentracích 10 pmol.l⁻¹ – 500 nmol.l⁻¹ pro 4 hod působení a v koncentracích 10 pmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹ pro 24 hod a 48 hod působení (viz Tabulka č. 8 a Kapitola 5.3). FICZ způsobil v koncentraci 500 pmol.l⁻¹ po 4 hod působení maximální aktivaci AhR a ve vyšších koncentracích již nedocházelo ke zvýšení luciferázové aktivity (viz Graf č. 10). Po 24 hod inkubace se aktivita AhR zvyšovala s rostoucí koncentrací, nejvyšší hodnota aktivity AhR byla naměřena u 10 μmol.l⁻¹ koncentrace (viz Graf č. 11). Po 48 hod inkubace aktivita AhR rostla se zvyšující se koncentrací. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u 5 μmol.l⁻¹ koncentrace, kde aktivita dosahovala až 105 % (viz Graf č. 12).



Graf č. 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4 hod působení FICZ. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací FICZ (10 pmol.l^{-1} – 500 nmol.l^{-1}) po dobu 4 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 500 nmol.l^{-1} , která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů.



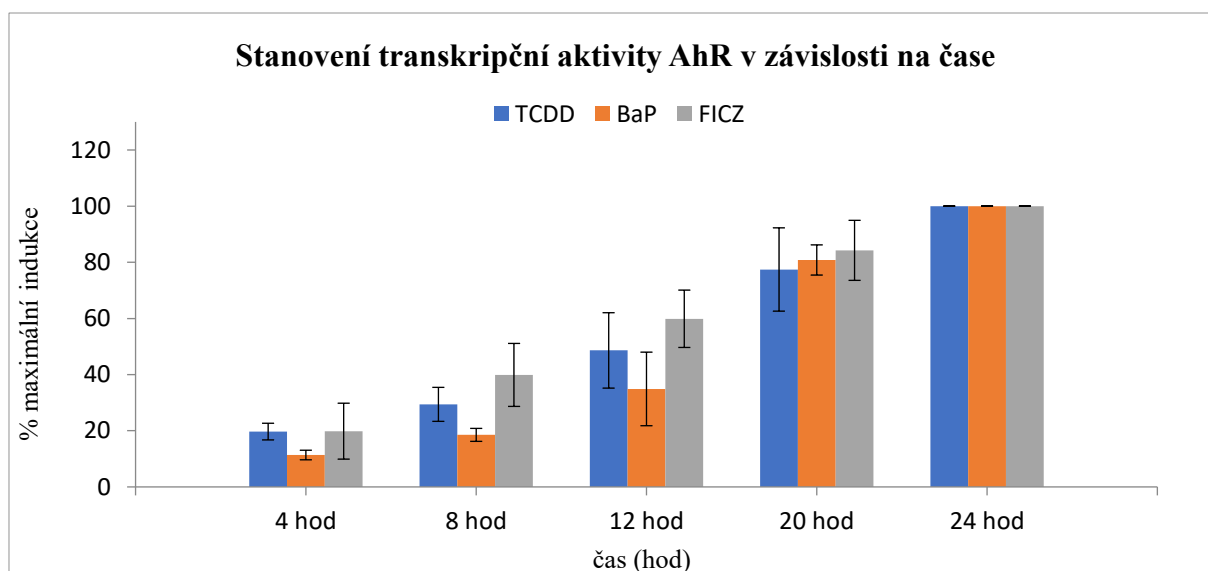
Graf č. 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24 hod působení FICZ. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací FICZ (10 pmol.l^{-1} – $10 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$) po dobu 24 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci $10 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.



Graf č. 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 48 hod působení FICZ. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 15 000 buněk na jamku a inkubovány s rostoucí koncentrací FICZ (10 pmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹) po dobu 48 hod. Výsledky jsou vztaženy k nejvyšší koncentraci 10 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.

6.3 Stanovení transkripční aktivity AhR v závislosti na čase

Pomocí luciferázové reportérové eseje byla stanovena transkripční aktivita modelových aktivátorů v závislosti na čase v buněčné linii AhRaCat. Buňky byly vystaveny působení TCDD, BaP a FICZ po dobu 4 hod, 8 hod, 12 hod, 20 hod a 24 hod. TCDD byl testován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹ a FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 6,7,8 a Kapitola 5.3). Transkripční aktivita AhR se po působení všech ligandů s rostoucím časem zvyšovala (viz Graf č. 13).

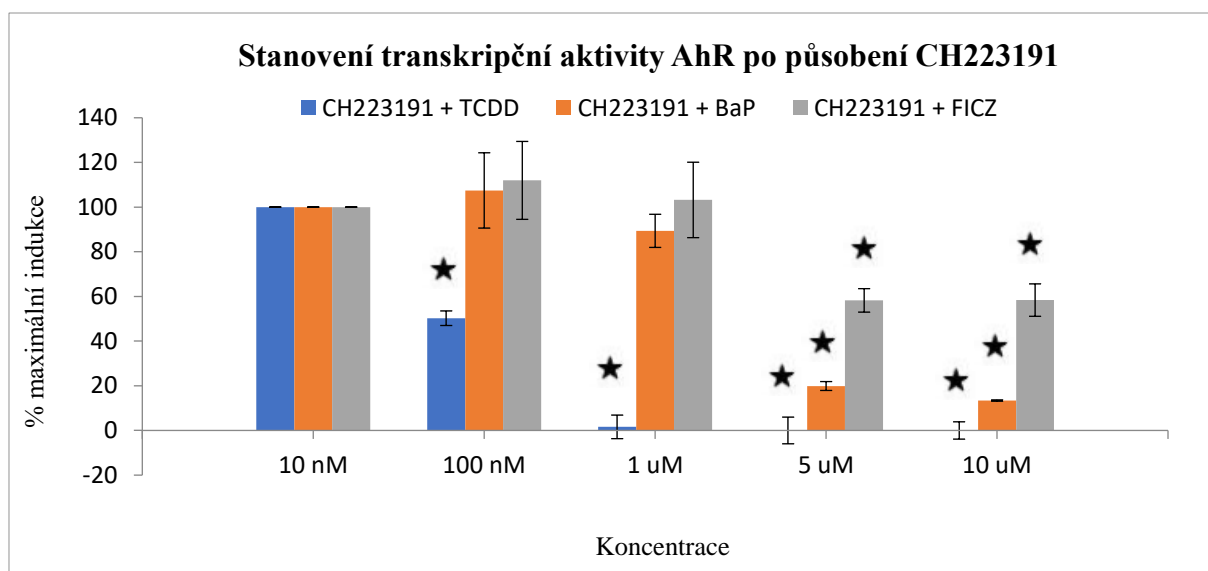


Graf č. 13: Stanovení transkripční aktivity modelových aktivátorů v závislosti na čase. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD, BaP a FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 4 hod, 8 hod, 12 hod, 20 hod a 24 hod působení TCDD, BaP a FICZ. TCDD byl aplikován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹ a FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹. Výsledky jsou vztaženy k nejvyššímu času 24 hod, který představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem čtyř nezávislých experimentů.

6.4 Sledování inhibice transkripční aktivity AhR po působení antagonistů

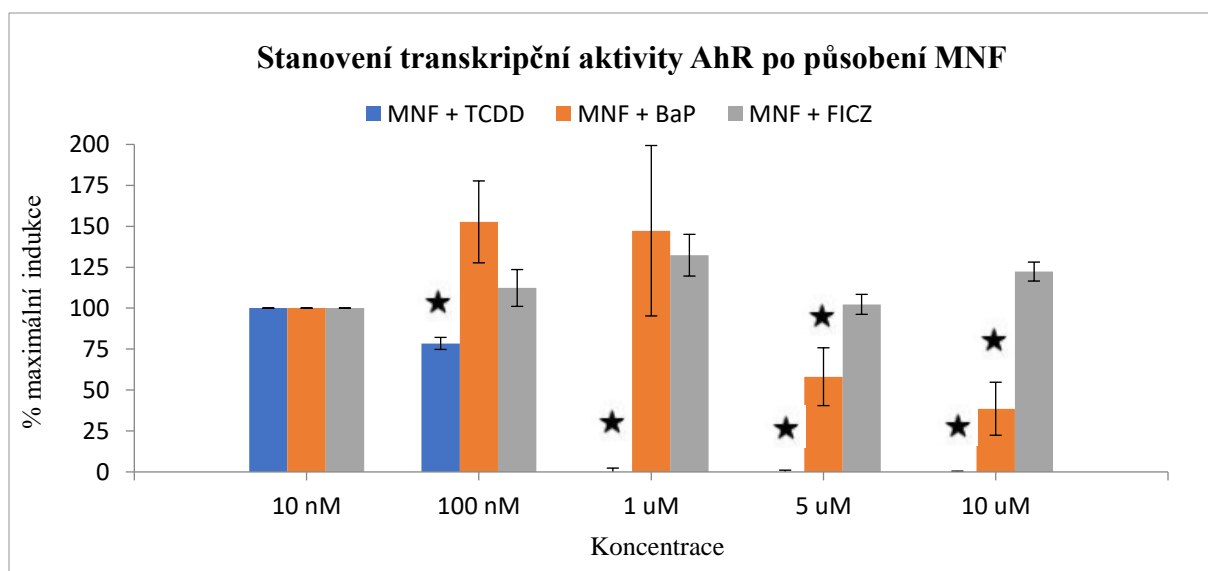
Pomocí luciferázové reportérové eseje byla stanovena transkripční aktivita modelových aktivátorů o jedné koncentraci společně se dvěma antagonisty AhR v buněčné linii AhRaCat. Buňky byly vystaveny působení TCDD, BaP, FICZ v kombinaci s modelovými antagonisty AhR, CH223191 a MNF, po dobu 24 hod. TCDD byl testován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹ a FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 6,7,8 a Kapitola 5.3), antagonisté AhR CH223191 a MNF byly na buňky aplikovány v koncentračním rozmezí 10 nmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 9).

Po aplikaci CH223191 byla pozorována inhibice TCDD indukované transkripční aktivity AhR, která byla závislá na koncentraci CH223191. CH223191 v koncentraci 100 nmol.l⁻¹ způsobil snížení TCDD indukované luciferázové aktivity o 50 %, ve vyšších koncentracích CH223191 nebyla luciferázová aktivita po působení TCDD prakticky detekovatelná. Luciferázová aktivita indukovaná BaP byla snížena o 80 % v kombinaci s CH223191 v koncentraci 5 μmol.l⁻¹ a o 87 % v koncentraci 10 μmol.l⁻¹. CH223191 v koncentracích 5 μmol.l⁻¹ a 10 μmol.l⁻¹ snížil FICZ indukovanou luciferázovou aktivitu přibližně o 40 % (viz Graf č. 14).



Graf č. 14: Stanovení transkripční aktivity AhR po působení antagonisty CH223191. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD, BaP, FICZ a antagonisty CH223191. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení TCDD, BaP, FICZ a CH223191. TCDD byl aplikován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹, FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹ a CH223191 v koncentračním rozmezí 10 nmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 10 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty (p<0,05), které byly určeny pomocí T.TESTU.

Podobný profil inhibice luciferázové aktivity indukované modelovými ligandy TCDD, BaP a FICZ byl pozorován v kombinaci s MNF. TCDD indukovaná luciferázová aktivita byla snížena o 21 % po působení MNF v koncentraci 100 nmol.l⁻¹ a ve vyšších koncentracích MNF již nebyla detekovatelná. Působení MNF v koncentraci 100 nmol.l⁻¹ a 1 μmol.l⁻¹ zvýšilo BaP indukovanou luciferázovou aktivitu o 50 %, ale po působení MNF v koncentraci 5 μmol.l⁻¹ snížilo BaP indukovanou luciferázovou aktivitu na 58 % a MNF v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ snížil luciferázovou aktivitu na 39 %. MNF v kombinaci s FICZ nezpůsobil inhibici luciferázové aktivity, naopak bylo pozorováno její mírné zvýšení (viz Graf č. 15).



Graf č. 15: Stanovení transkripční aktivity AhR po působení antagonisty MNF. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD, BaP, FICZ a antagonisty MNF. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení TCDD, BaP, FICZ a MNF. TCDD byl aplikován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹, FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹ a MNF v koncentračním rozmezí 10 nmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹. Výsledky jsou vztaženy k nejnižší koncentraci 10 μmol.l⁻¹, která představuje 100% maximální indukci. Zobrazené výsledky pro MNF + TCDD a MNF + FICZ jsou průměrem tří nezávislých experimentů, pro MNF + BaP jsou průměrem ze čtyř nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty (p<0,05), které byly určeny pomocí T.TESTU.

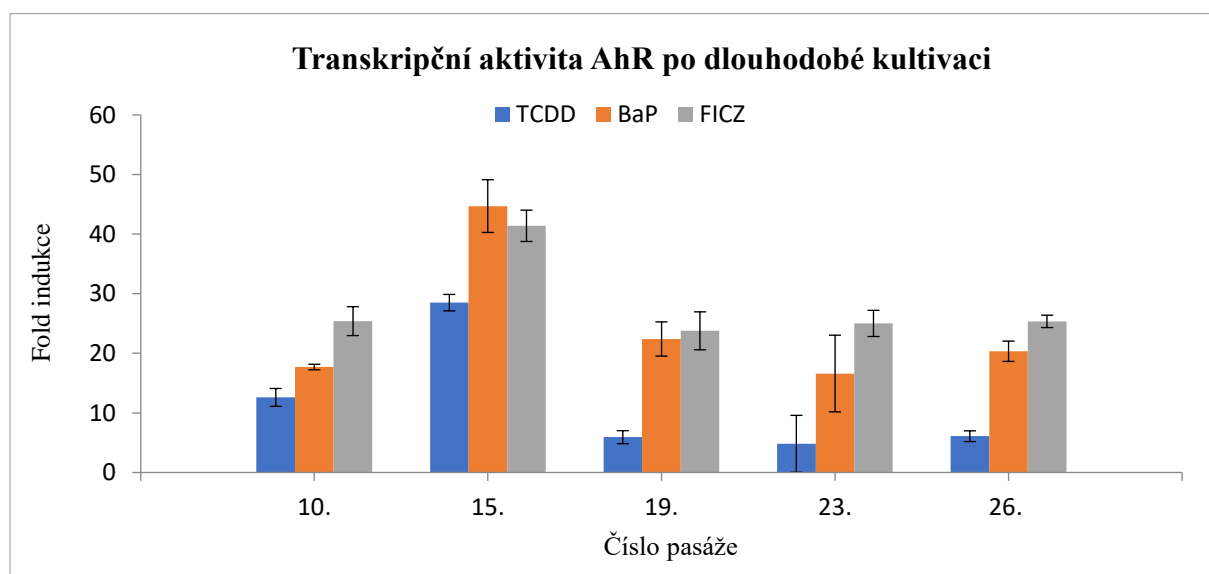
6.5 Udržení luciferázové aktivity při dlouhodobé kultivaci

Pomocí luciferázové reportérové eseje byla zjišťována transkripční aktivita AhR po dlouhodobém udržování buněk v kultivačním médiu v buněčné linii AhRaCat. Aktivita byla sledována po pěti, čtyř nebo po třech pasážích. Buňky byly vystaveny působení TCDD, BaP a FICZ po dobu 24 hod. TCDD byl testován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹ a FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹ (viz Tabulka č. 6,7,8 a Kapitola 5.3). Transkripční aktivita byla měřena od desáté pasáže, kdy byly buňky dvacet šest dní v kultuře. Poslední měření bylo provedeno ve dvacáté třetí pasáži, kdy byly buňky šedesát jedna dní v kultuře (viz Tabulka č. 10).

Z Grafu č. 16 lze pozorovat, že patnáctá pasáž vykazuje mnohem vyšší transkripční aktivitu než zbylé pasáže. Zbylé pasáže vykazují zhruba stejnou transkripční aktivitu. Z výsledku vyplývá, že dlouhodobé pasážování buněk nemá negativní vliv na luciferázovou aktivitu v buněčné linii AhRaCat.

Tabulka č. 10: Sledování dlouhodobé kultivace buněk v buněčné linii AhRaCat na indukci luciferázové aktivity

Číslo pasáže	Počet dní v kultuře	TCDD 5 nM		BaP 3 uM		FICZ 4 uM	
		Fold indukce	SD fold	Fold indukce	SD fold	Fold indukce	SD fold
10.	26	12,6	1,50	17,7	0,47	25,4	2,43
15.	40	28,5	1,38	44,7	4,42	41,4	2,63
19.	49	5,9	1,09	22,4	2,87	23,8	3,18
23.	61	4,8	4,76	16,6	6,44	25,0	2,19
26.	68	6,1	0,90	20,3	1,70	25,4	1,04



Graf č. 16: Sledování transkripční aktivity AhR buněk po dlouhodobé kultivaci. Graf znázorňuje transkripční aktivitu AhR po působení TCDD, BaP a FICZ. Buňky byly vysety v koncentraci 25 000 buněk na jamku pro 24 hod působení TCDD, BaP a FICZ. TCDD byl aplikován v koncentraci 5 nmol.l⁻¹, BaP v koncentraci 3 μmol.l⁻¹, FICZ v koncentraci 4 μmol.l⁻¹. Bylo měřeno celkem pět pasáží, celková doba buněk v kultuře činila 68 dní.

7 Diskuze

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru s využitím nové stabilně transfekované reportérové linie AhRaCat odvozené od kožních HaCat buněk. Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který byl prvně objevený jako xenosenzor zprostředkovávající toxicitu široké řady xenobiotik, avšak v posledních letech byla objevena jeho zásadní role ve fyziologických a patofyziologických procesech. Je známé, že AhR je důležitý pro správnou funkci kůže a jeho aktivace může výrazně přispívat ke zmírnění projevů nemoci, jako je např. atopická dermatitida nebo lupénka. Z tohoto důvodu je důležité sledovat jeho transkripční aktivitu a identifikovat látky, které jsou schopné ho v kožních buňkách aktivovat nebo inhibovat. To je možné provádět díky reportérové eseji, která je založená na měření odpovědi reportérového genu, jehož odpověď je přímo úměrná transkripční aktivitě AhR.

Příprava stabilně transfekované linie je sice časově i materiálově náročný proces, nicméně proti transientně transfekovaným buňkám má několik výhod. Zaprvé není nutné před každým experimentem provádět transfekci buněk, čímž se výrazně zkrátí čas i sníží náklady na provádění experimentů. Jelikož jsou všechny buňky transfekované, není nutné provádět normalizaci dat kvůli rozdílné účinnosti transfekce. Tyto buňky se vyznačují vysokou citlivostí a získaná data jsou v porovnání s transientní transfekcí homogennější (Novotná *et al.* 2011). Několik lidských stabilně transfekovaných reportérových linií bylo připraveno pro sledování transkripční aktivity AhR. Linie AZ-AhR byla připravena stabilní transfekcí buněk odvozených od lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2 reportérovým plazmidem nesoucím 4 kopie DRE pro vazbu AhR. Linie LS174T-AhR-luc byla připravena stabilní transfekcí s využitím stejného reportérového plazmidu, ale parentní buňky jsou odvozené od lidského adenokarcinomu tlustého střeva. V mé práci jsem charakterizovala stabilní reportérovou linii, která byla připravena s pomocí stejného reportérového plazmidu jako výše zmíněné linie.

Na základě proliferační aktivity bylo nastaveno koncentrační rozmezí pro luciferázovou reportérovou esej, kde za 24 hod nebylo u žádné testované látky pozorováno snížení proliferační aktivity, které by mělo vliv na luciferázovou aktivitu. Za 48 hod u BaP v koncentracích $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a u FICZ v koncentracích $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ došlo ke snížení proliferační aktivity. Pomocí luciferázové reportérové eseje byla sledována transkripční aktivita AhR pomocí modelových ligandů TCDD, BaP a FICZ.

Transkripční aktivita AhR rostla se zvyšující se koncentrací jednotlivých ligandů. Indukce luciferázové aktivity byla v buněčné linii AhRaCat pozorována po působení TCDD v koncentracích od 1 nmol.l^{-1} , což je srovnatelné s liniemi AZ-AhR a LS174T-AhR-Luc. Maximální hodnoty FOLD indukce se pro TCDD po 24 hod pohybovaly v rozmezí od 15-38. Tyto výsledky odpovídají hodnotám FOLD indukci získaných po působení TCDD v reportérové linii LS174T-AhR-Luc. Ve studii *Novotna et al.* (2011) byla buněčná linie AZ-AhR vystavena působení TCDD po dobu 24 hod v koncentracích 1 nmol.l^{-1} – 100 nmol.l^{-1} , v těchto koncentracích došlo k signifikantní indukci luciferázové aktivity, konkrétně se jednalo o FOLD indukci v rozmezí od 4x do 1262x. Z těchto dat vyplývá, že TCDD indukovaná transkripční aktivita AhR v buněčné linii AZ-AhR je přibližně 100krát vyšší než v linii AhRaCat.

Dále byla v buněčné linii AhRaCat stanovena transkripční aktivita modelových aktivátorů v závislosti na čase. TCDD aktivoval AhR po 8 hod inkubace, kdy luciferázová aktivita dosáhla přibližně 40% maximální indukce FICZ, 30% maximální indukce TCDD a 19% maximální indukce BaP. Tyto výsledky jsou srovnatelné s TCDD indukovanou luciferázovou aktivitou po 8 hod působení v buněčné linii AZ-AhR (*Novotna et al.* 2011). Z těchto výsledků vyplývá, že buněčná linie AhRaCat je velice senzitivní a umožňuje hodnocení transkripční aktivity AhR po 8 hod inkubace.

Inhibice luciferázové aktivity selektivními antagonisty CH223191 a MNF umožnila sledovat specifitu aktivace AhR modelovými ligandy. Luciferázová aktivita AhR indukovaná TCDD a BaP klesala se zvyšující se koncentrací CH223191 a MNF. TCDD indukovaná luciferázová aktivita byla zcela inhibována působením CH223191 a MNF v koncentracích $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. CH223191 v nejvyšší koncentraci způsobil snížení BaP indukované luciferázové aktivity na 13 % a MNF v nejvyšší koncentraci na 39 %. CH223191 v nejvyšší koncentraci způsobil snížení FICZ indukované luciferázové aktivity na 58 % a MNF nezpůsobil snížení FICZ v žádné testované koncentraci. Také pomocí luciferázové reportérové eseje byla zjišťována transkripční aktivita AhR po dlouhodobém udržování buněk v kultivačním médiu.

Ve studii *Zhou et.* (2003) byla sestrojena myší buněčná linie Hepa.2DLuc.314 stabilně transfekována luciferázovým plazmidem P2DLuc. V této studii byla testována inducibilita luciferázové aktivity modelového aktivátoru AhR TCDD s použitím antagonisty AhR 3'-methoxy-4'-nitroflavon (MNF). Na buňky byl aplikován TCDD v koncentraci 150 pmol.l^{-1} v kombinaci s MNF v koncentračním rozmezí $0,1 \text{ nmol.l}^{-1}$ – $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Po 4 hod inkubaci byla inducibilita luciferázové aktivity snižována se zvyšující se koncentrací MNF. V buněčné linii

AhRaCat bylo také sledováno potlačení transkripční aktivity AhR pomocí antagonistického působení MNF v kombinaci s TCDD. TCDD byl aplikován v koncentraci 5 nmol.l^{-1} v kombinaci s MNF, který je znám jako selektivní AhR antagonist. MNF byl aplikován v koncentračním rozmezí $10 \text{ nmol.l}^{-1} - 10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Transkripční aktivita AhR byla snižována se zvyšující se koncentrací antagonisty MNF.

Ve studii *Degrelle et al.* (2022) sestrojili dvě nové reportérové linie, jedna využívala gen fluorescenční histon 2B a druhá vylučovanou nanoluciferázu ke sledování aktivity AhR v BeWo lidských placentárních buňkách. Na buněčnou linii byl aplikován BaP v koncentraci $2 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ v kombinaci s CH223191 v koncentraci $3 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a bylo sledováno snížení luciferázové aktivity. Výsledky odhalily, že BaP zvyšuje luciferázovou aktivitu AhR a antagonist CH223191 v kombinaci s BaP snižuje luciferázovou aktivitu AhR. Tyto výsledky jsou shodné s luciferázovou reportérovou metodou využívající světluškovou luciferázu, která byla provedena v AhRaCat buňkách. Na buňky byl aplikován BaP v koncentraci $3 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ v kombinaci s CH223191 v koncentračním rozmezí $10 \text{ nmol.l}^{-1} - 10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. CH223191 v nejvyšší koncentraci způsobil snížení BaP indukované luciferázové aktivity na 13 % v buněčné linii AhRaCat.

Ve studii *Novotna et al.* (2011) byla sledována transkripční aktivita AhR po dlouhodobém udržování buněk AZ-AhR v kultuře. Buněčná linie AZ-AhR byla vystavena působení po dobu 24 hod TCDD v koncentraci 5 nmol.l^{-1} . Buňky byly celkem 30 dní v kultuře, což odpovídalo 15 pasážím. Po aplikaci TCDD nedocházelo ke snížení transkripční aktivity AhR. Transkripční aktivita AhR po dlouhodobém udržování buněk v kultivačním médiu byla také sledována v buněčné linii AhRaCat. Buněčná linie AhRaCat byla vystavena působení TCDD po dobu 24 hod v koncentraci 5 nmol.l^{-1} . Buňky byly celkem 68 dní v kultuře a bylo měřeno pět pasáží. FOLD indukce po jednotlivých pasážích dosahovaly podobných hodnot, tudíž dlouhodobé udržování buněk v kultuře nemá negativní vliv na luciferázovou aktivitu v buněčné linii AhRaCat.

8 Závěr

V této bakalářské práci byla charakterizována nová stabilní transfekovaná reportérová buněčná linie odvozená od kožních AhRaCat buněk. V teoretické části byly popsány reportérové systémy pro sledování aktivity transkripčních faktorů, rozdíl mezi transfekcí transientní a stabilní, reportérové geny, mezi které patří např. luciferáza, β -galaktosidáza, β -laktamáza, chloramfenikol acetyl transferáza, alkalická fosfatáza, zelený fluorescenční protein a také ekvorin. Dále byl popsán aryl uhlovodíkový receptor (AhR), jeho ligandy endogenního a exogenního původu, funkce AhR v kůži a AhR reportérové systémy.

V praktické části bakalářské práce byla charakterizována nová stabilně transfekovaná buněčná linie AhRaCat, která slouží pro sledování transkripční aktivity AhR. Pro charakterizaci byly použity 3 modelové AhR ligandy, TCDD, BaP a FICZ. Nejdříve byla sledována proliferační aktivita AhRaCat buněk po působení modelových AhR ligandů a na základě těchto výsledků bylo pro jednotlivé látky nastaveno koncentrační rozmezí. Po nastavení testovacího koncentračního rozmezí pro jednotlivé ligandy byla testována aktivace AhR pomocí luciferázové reportérové eseje. Bylo prokázáno, že TCDD, BaP a FICZ zvyšují luciferázovou aktivitu v závislosti na koncentraci. Na základě analýzy transkripční aktivity v závislosti na čase bylo ukázáno, že charakterizovaná linie je vysoce senzitivní a umožňuje hodnocení transkripční aktivity AhR po 8 hod inkubace. Inhibice ligandy indukované luciferázové aktivity selektivními antagonisty AhR dokazuje specifickou odpověď buněk na přítomnost AhR ligandů. Inducibilita luciferázové aktivity byla sledována v průběhu dlouhodobé kultivace buněk v kultivačním médiu a z výsledků vyplývá, že linie zůstala plně funkční i po 68 dnech v kultuře, což odpovídalo 26 pasážím.

Na základě uvedených výsledků můžeme shrnout, že charakterizovaná linie představuje nový, senzitivní a specifický *in vitro* systém pro sledování transkripční aktivity AhR.

9 Seznam použité literatury

Belardinelli, J. M., & Jackson, M. (2017). Green Fluorescent Protein as a protein localization and topological reporter in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 105, 13–17.

Bock K. W. (2018). From TCDD-mediated toxicity to searches of physiologic AHR functions. *Biochemical pharmacology*, 155, 419–424.

Boy, R. L., Hong, A., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M., & Laranjeira-Silva, M. F. (2022). Reporter gene systems: A powerful tool for Leishmania studies. *Current research in microbial sciences*, 3, 100165.

Cevenini, L., Calabretta, M. M., Calabria, D., Roda, A., & Michelini, E. (2016). Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology?. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 154, 3–17.

Degrelle, S. A., Ferecatu, I., & Fournier, T. (2022). Novel fluorescent and secreted transcriptional reporters for quantifying activity of the xenobiotic sensor aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Environment international*, 169.

Dvořák, Z., Poulíková, K., & Mani, S. (2021). Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European journal of medicinal chemistry*, 215, 113231.

Esser, C., Bargaen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., & Krutmann, J. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars in immunopathology*, 35(6), 677–691.

Fernández-Gallego, N., Sánchez-Madrid, F., & Cibrian, D. (2021). Role of AHR Ligands in Skin Homeostasis and Cutaneous Inflammation. *Cells*, 10(11), 3176.

Furue, M., Hashimoto-Hachiya, A., & Tsuji, G. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5424.

Gargaro, M., Scalisi, G., Manni, G., Mondanelli, G., Grohmann, U., & Fallarino, F. (2021). The Landscape of AhR Regulators and Coregulators to Fine-Tune AhR Functions. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 757.

Garrison, P. M., Tullis, K., Aarts, J. M., Brouwer, A., Giesy, J. P., & Denison, M. S. (1996). Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like chemicals. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 30(2), 194–203.

Hidaka, T., Ogawa, E., Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., Aiba, S., Nakayama, K., Okuyama, R., & Yamamoto, M. (2017). The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nature immunology*, 18(1), 64–73.

Kang, J. H., & Chung, J. K. (2008). Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49 Suppl 2, 164S–79S.

Kasai, A., Hiramatsu, N., Meng, Y., Yao, J., Maeda, S., & Kitamura, M. (2005). Fast-track DRESSA: a bioassay for fast, sensitive, and selective detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical biochemistry*, 337(1), 84–88.

Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173–3178.

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2019). DNA Transfection by Electroporation. *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(7).

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2019). Lipofection. *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(3).

Kyoreva, M., Li, Y., Hoosenally, M., Hardman-Smart, J., Morrison, K., Tosi, I., Tolaini, M., Barinaga, G., Stockinger, B., Mrowietz, U., Nestle, F. O., Smith, C. H., Barker, J. N., & Di Meglio, P. (2021). CYP1A1 Enzymatic Activity Influences Skin Inflammation Via Regulation of the AHR Pathway. *The Journal of investigative dermatology*, 141(6), 1553–1563.e3.

Lai, C., Jiang, X., & Li, X. (2006). Development of luciferase reporter-based cell assays. *Assay and drug development technologies*, 4(3), 307–315.

Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1–9.

Liu, A. M., New, D. C., Lo, R. K., & Wong, Y. H. (2009). Reporter gene assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 486, 109–123.

Nair, A. K., & Baier, L. J. (2018). Using Luciferase Reporter Assays to Identify Functional Variants at Disease-Associated Loci. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1706, 303–319.

Neavin, D. R., Liu, D., Ray, B., & Weinshilboum, R. M. (2018). The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3851.

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

Otarola, G., Castillo, H., & Marcellini, S. (2018). Aryl hydrocarbon receptor-based bioassays for dioxin detection: Thinking outside the box. *Journal of applied toxicology : JAT*, 38(4), 437–449.

Plieth C. (2006). Aequorin as a reporter gene. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 323, 307–327.

Qureshi S. A. (2007). Beta-lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. *BioTechniques*, 42(1), 91–96.

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7(1).

Sato, W., Suzuki, H., Sasaki, T., Kumagai, T., Sakaguchi, S., Mizugaki, M., Miyairi, S., Yamazoe, Y., & Nagata, K. (2010). Construction of a system that simultaneously evaluates CYP1A1 and CYP1A2 induction in a stable human-derived cell line using a dual reporter plasmid. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 25(2), 180–189.

Satsu, H., Yoshida, K., Mikubo, A., Ogiwara, H., Inakuma, T., & Shimizu, M. (2015). Establishment of a stable aryl hydrocarbon receptor-responsive HepG2 cell line. *Cytotechnology*, 67(4), 621–632.

Sedlák, D., Paguio, A., & Bartůněk, P. (2011). Two panels of steroid receptor luciferase reporter cell lines for compound profiling. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14(4), 248–266.

Smale S. T. (2010). Chloramphenicol acetyltransferase assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(5).

- Smale, S. T. (2010). Luciferase Assay. Cold Spring Harbor Protocols, 2010(5).
- Stepanenko, A. A., & Heng, H. H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. Mutation research. Reviews in mutation research, 773, 91–103.
- Waidmann, M. S., Bleichrodt, F. S., Laslo, T., & Riedel, C. U. (2011). Bacterial luciferase reporters: the Swiss army knife of molecular biology. Bioengineered bugs, 2(1), 8–16.
- Wider, D., & Picard, D. (2017). Secreted dual reporter assay with Gaussia luciferase and the red fluorescent protein mCherry. PloS one, 12(12), e0189403.
- Yamaguchi, M., & Hankinson, O. (2018). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses the growth of human liver cancer HepG2 cells in vitro: Involvement of cell signaling factors. International journal of oncology, 53(4), 1657–1666.
- Yin W, Xiang P, Li Q. (2005) Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. Analytical Biochemistry. ScienceDirect. Elsevier, 346(2), 289–294.
- Zhou, J., & Gasiewicz, T. A. (2003). 3'-methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. Archives of biochemistry and biophysics, 416(1), 68–80.
- Zhu, J., Sun, J., Tang, Y., Xie, J., & Wei, D. (2020). Expression, characterization and structural profile of a heterodimeric β -galactosidase from the novel strain *Lactobacillus curieae* M2011381. Process Biochemistry, 87–95.

10 Seznam použitých zdrojů u obrázků

Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173–3178.

Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1–9.

Waidmann, M. S., Bleichrodt, F. S., Laslo, T., & Riedel, C. U. (2011). Bacterial luciferase reporters: the Swiss army knife of molecular biology. *Bioengineered bugs*, 2(1), 8–16.