

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Jana Bednářová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Srovnávací analýza vlivu vybraných xenobiotik na transkripční aktivitu
AhR v myši a lidské hepatomové linii**

Bakalářská práce

Jana Bednářová

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana BEDNÁŘOVÁ**
Osobní číslo: **R210170**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Srovnávací analýza vlivu vybraných xenobiotik na transkripční aktivitu AhR v myši a lidské hepatomové linii**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení účinku vybraných látek na viabilitu buněk reportérové linie AZ-AHR a Hepa1c1c7
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím metody "reporter gene assay".
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E. & Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 124(1): 1-22.
- Dere, E., Lee, A. W., Burgoon, L. D. & Zacharewski, T. R. (2011). Differences in TCDD-elicited gene expression profiles in human HepG2, mouse Hepa1c1c7 and rat H4IIE hepatoma cells. *BMC Genomics* 12: 193.
- Flaveny, C. A., Murray, I. A. & Perdew, G. H. (2010). Differential gene regulation by the human and mouse aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 114(2): 217-225.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* 7: 1-9.
- Lin, L., Dai, Y. & Xia, Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002-2022): A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 244: 114845.
- Novotna, A., Petr, 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.
- Sondermann, N. C., Fassbender, S., Hartung, F., Hatala, A. M., Rolfes, K. M., Vogel, C. F. A. & Haarmann-Stemmann, T. (2023). Functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 208: 115371.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 20. března 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 22. března 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jana Bednářová
Název práce:	Srovnávací analýza vlivu vybraných xenobiotik na transkripční aktivitu AhR v myši a lidské hepatomové linii
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Klíčová slova:	Aryluhlovodíkový receptor (AhR), TCDD, BaP, PCB-126, omeprazol, MTT Assay, luciferázová reportérová esej
Počet stran:	65
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český
Souhrn:	

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, podílející se na expresi velkého množství genů ve fyziologických i patofyziologických procesech v těle organismu. V posledních letech se kvůli své přítomnosti v různých procesech AhR zkoumá jako možný terapeutický cíl pro velké množství nemocí včetně rakoviny. Celá řada publikovaných studií prokazuje výrazné druhové rozdíly v afinitě AhR ligandů mezi hlodavci a člověkem. V této bakalářské práci byl testován vliv TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazolu na transkripční aktivitu AhR pomocí luciferázové reportérové eseje v myši a lidské hepatomové linii. Na základě dose-response analýzy byly stanoveny hodnoty EC_{50} a účinnost pro jednotlivé látky. Z experimentálních dat je patrné, že po 24hodinovém působení modelového ligandu TCDD byla maximální indukce dané látky přibližně 60x vyšší u lidské linie než u myši. Hodnoty EC_{50} po 24hodinovém působení TCDD vyšly $4,9 \pm 2,4$ nM u linie lidské a $0,06 \pm 0,01$ nM u linie myši. U BaP získané hodnoty EC_{50} ukázaly na velký

mezidruhový rozdíl v aktivaci lidského a myšního AhR. Po 24 hodinách inkubace s touto látkou se hodnota EC_{50} na lidské linii rovnala 1500 ± 10 nM a na myši 103 ± 57 nM. Výsledné hodnoty EC_{50} pro testovanou látku PCB-126 opět poukázaly na velký mezidruhový rozdíl mezi myším a lidským AhR. EC_{50} u lidské linie po 24hodinovém působení se rovnala 230 ± 170 nM, zatímco u myší linie byla po stejně dlouhé době inkubace EC_{50} rovna $0,67 \pm 0,2$ nM. Výsledné EC_{50} omeprazolu byly v porovnání s ostatními testovanými látkami nejvyšší. Po 24 hodinách působení omeprazolu na myší linii hodnota EC_{50} rovna 43 ± 45 μ M, po 4hodinovém působení omeprazol na myší linii neaktivoval AhR.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jana Bednářová

Title: Comparative analysis of xenobiotic-elicited AhR activation in human and mouse hepatoma cell line

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: AhR, TCDD, BaP, PCB-126, omeprazole, MTT Assay, Gene reporter Assay

Number of pages: 65

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary:

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor involved in the expression of a large number of genes in physiological and pathophysiological processes in the body. In recent years, due to its presence in various processes, AhR has been investigated as a potential therapeutic target for a large number of diseases including cancer. A number of published studies demonstrate significant species differences in the affinity of AhR ligands between rodents and humans. In this undergraduate thesis, the effect of TCDD, BaP, PCB-126 and omeprazole on AhR transcriptional activity was tested using a luciferase reporter assay in mouse and human hepatoma cell lines. EC_{50} values and efficacy for each substance were determined by dose-response analysis. From the experimental data, it can be seen that after 24 h of exposure to the model ligand TCDD, the maximum induction of the substance was approximately 60 times higher in the human line than in the mouse line. The EC_{50} values after 24 h exposure to TCDD were 4.9 ± 2.4 nM for the human line and 0.06 ± 0.01 nM for the mouse line. For BaP, the EC_{50} values obtained showed a large interspecies difference in the activation of human and mouse AhR. After 24 h of incubation

with this substance, the EC₅₀ value was 1500 ± 10 nM in the human line and 103 ± 57 nM in the mouse line. The obtained EC₅₀ values for the tested compound PCB-126 once again pointed to a large interspecies difference between mouse and human AhR responses. Following 24 hours of exposure, the EC₅₀ for the human cell line was 230 ± 170 nM, whereas for the mouse cell line, the EC₅₀ after the same incubation time was 0.67 ± 0.2 nM. The resulting EC₅₀ of omeprazole was the highest compared to the other test substances. After 24 hours of treatment with omeprazole on the mouse cell line, the EC₅₀ value equaled to 43 ± 45 μM, while omeprazol failed to activate AHR in the mouse cell line after 4 hours of treatment.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Anety Vrzalové, Ph.D. a že jsem řádně citovala veškeré použité zdroje uvedené v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Anetě Vrzalové, PhD., za její vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala. Ráda bych také poděkovala celému kolektivu z katedry Buněčné biologie a genetiky za ochotu s čímkoli pomoci. Také bych chtěla poděkovat své rodině, především rodičům a přátelům, kteří byli vždy trpěliví a maximálně mě podporovali po celou dobu bakalářského studia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Aryluhlovodíkový receptor	3
3.1.1	Struktura AhR.....	3
3.1.2	Ligandy AhR	5
3.1.3	Signalizace AhR	8
3.1.4	Kanonická signální dráha	8
3.1.5	Nekanonická signální dráha	9
3.1.6	Negenomická signální dráha	10
3.1.7	Srovnání lidského a myšního AhR	11
3.1.8	AhR a nádorová onemocnění	13
3.2	Studované sloučeniny.....	16
3.2.1	TCDD	16
3.2.2	BaP	17
3.2.3	PCB-126 - 3,3',4,4',5-pentachlorbifenyl	18
3.2.4	Omeprazol	19
4	MATERIÁL A METODY	22
4.1	Biologický materiál	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy, roztoky	22
4.3	Laboratorní pomůcky	23
4.4	Přístroje	24
4.5	Použité metody	24
4.5.1	Kultivace a pasážování buněk	24
4.5.2	Počítání buněk a vyšetí na desky.....	25
4.5.3	Příprava a aplikace testovaných látek na buňky.....	26

4.5.4	MTT test	27
4.5.5	Reporter gene assay	27
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Stanovení cytotoxicity testovaných látek pomocí metody MTT	29
5.2	Vliv vybraných xenobiotik na transkripční aktivitu myšího a lidského AhR	33
6	DISKUZE.....	43
7	ZÁVĚR.....	46
8	LITERATURA	47
9	INTERNETOVÉ ZDROJE	65

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

3MC	3-methylcholantren
AhR	arylhydrouhlovodíkový receptor
AHRR	AhR represor
ARNT	aryluhlovodíkový jaderný transportér
BaP	benzo(<i>a</i>)pyren
bHLH	basic helix-loop-helix (bazická šroubovice-smyčka-šroubovice)
c-SRC	cytosolická tyrosin kynáza
CYP	cytochrom P450
dFICZ	6,12-diformylindolo[3,2- <i>b</i>]karbazol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE	dioxin responsivní element
EC ₅₀	half maximal effective concentration
FBS	fetální bovinní sérum
FIZ	6-formylindol[3,2- <i>b</i>]karbazol
GRA	Gene reporter assay
HAH	halogenované aromatické uhlovodíky
hAhR	lidský AhR
Hsp90	Heat shock protein 90
I3C	indol-3-karbinol
IAA	kyselina indol-3-octová
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IL-6	interleukin-6

IL-8	interleukin-8
IPA	kyselina indol-3-propionová
KLF6	Krüppel-like factor 6
LBD	ligand vazebná doména
mAhR	myší AhR
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
NC-XRE	Non Consensus Xenobiotic Response Element
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
PAH	nehalogenované aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-SIM
PBS	fosfátový pufr
PCB-126	3,3',4,4',5-pentachlorbifenyl
PCBs	polychlorované bifenyly
Q	glutamin
RGA	reporter gene assay (reportérová luciferázová esej)
SRC	koaktivátor steroidního receptoru
TAD	transaktivační doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCDF	2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran
TDO	tryptofan 2,3-dioxygenáza
XAP2	hepatitis B virus X associated protein 2
XRE	Xenobiotic Response Element

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura aryluhlovodíkového receptoru.....	4
Obrázek 2: Kanonická a nekanonická signální dráha AhR.....	10
Obrázek 3: Genomická a negenomická signální dráha AhR.....	11
Obrázek 4: Chemická struktura TCDD.....	17
Obrázek 5: Chemická struktura BaP.....	18
Obrázek 6: Chemická struktura PCB-126.....	19
Obrázek 7: Chemická struktura omeprazolu.....	21

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení TCDD	29
Graf 2: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení TCDD	30
Graf 3: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení BaP	30
Graf 4: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení BaP	31
Graf 5: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení PCB-126	31
Graf 6: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení PCB-126	32
Graf 7: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení omeprazolu	33
Graf 8: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení omeprazolu	33
Graf 9: Vliv působení TCDD na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách	35
Graf 10: Vliv působení BaP na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách	37
Graf 11: Vliv působení PCB-126 na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách	39
Graf 12: Vliv působení omeprazolu na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady exogenních ligandů AhR	6
Tabulka 2: Příklady endogenních ligandů AhR	7
Tabulka 3: Ředění testovaných látek k MTT a GRA.....	26
Tabulka 4: EC ₅₀ k jednotlivým testům GRA při působení TCDD.....	34
Tabulka 5: EC ₅₀ k jednotlivým testům GRA při působení BaP.....	36
Tabulka 6: EC ₅₀ k jednotlivým testům GRA při působení PCB-126.....	38
Tabulka 7: EC ₅₀ k jednotlivým testům GRA při působení omeprazolu	40
Tabulka 8: Souhrnná tabulka pro EC ₅₀ všech testovaných látek po 4 a 24hodinových inkubacích	42

1 ÚVOD

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem-aktivovaný transkripční faktor regulující genovou expresi genů kódujících enzymy metabolizující xenobiotika, jako jsou CYP1A1 a CYP1B1. Jedná se o druhově specifický receptor, který byl primárně spojený s metabolismem xenobiotik. AhR je exprimován v mnoha orgánech, jako jsou plíce, játra, ledviny, mozek, srdce a placenta, kde je zapojen do důležitých fyziologických funkcí a regulačních drah.

AhR váže velké množství přírodních i syntetických ligandů, exogenních i endogenních. U exogenních ligandů se jedná o polutanty životního prostředí, léčiva, nebo jiné syntetické průmyslově produkováné sloučeniny. Mezi nejúčinnější ligandy AhR patří TCDD, který patří mezi toxické látky. Jedná se o prvního objeveného agonistu AhR, který je stále brán jako nejúčinnější a modelový a často bývá toxicita ostatních látek srovnávána právě s toxicitou TCDD.

V posledních letech došlo k objevu dalších důležitých fyziologických funkcí AhR, které se staly velkým zájmem studií. Mnohé výzkumy zkoumají AhR jako možný terapeutický cíl, který by mohl být zásadní v léčbě rakoviny a různých zánětlivých onemocnění. Ke studiu receptoru AhR se používají různé modelové organismy, například myši, což usnadňuje výzkum složitých biologických interakcí a fyziologických procesů. Zatímco zvířecí modely poskytují poznatky o základní funkci receptoru, lidské buňky mají zásadní význam pro primární screening sloučenin interagujících s AhR a podrobnou molekulární analýzu vzhledem k rozdílům v aktivaci ligandů a genové expresi mezi jednotlivými druhy. Ačkoli základní funkce AhR jsou u hlodavců a lidí podobné, existují strukturní, expresní a funkční rozdíly. Pochopení těchto rozdílů může nabídnout cenné poznatky pro léčbu různých onemocnění.

2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
2. Osvojení si základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur.
3. Stanovení vlivu vybraných látek na viabilitu buněk reportérových liniích AZ-AhR a Aherepa.
4. Určení vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR prostřednictvím metody „reporter gene assay“.
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků, sepsání bakalářské práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je na ligandu závislý transkripční faktor regulující genovou expresi. Funkční ortology AhR genu jsou přítomné u savců, obojživelníků, plazů a ptáků a jsou eprimovány v mnoha orgánech jako jsou plíce, játra, ledviny, placenta, srdce, slinivka a mnohé další (Dolwick *et al.*, 1993; Sondermann *et al.*, 2023). AhR byl původně objeven a popsán jako protein podílející se na zprostředkovávání detoxikace xenobiotických sloučenin (Conney *et al.*, 1956). V posledních letech byly objeveny další důležité funkce AhR spojené s normální fyziologií kardiovaskulárního, gastrointestinálního, nervového nebo imunitního systému (Denison *et Nagy*, 2003; Kou *et al.*, 2021). AhR je zapojen do základních buněčných regulačních drah a má důležitou roli ve vývojových procesech. Důležitá funkce AhR je při kontrole rovnováhy v procesu proliferace, diferenciaci a v programované smrti buněk – apoptóze. Narušení těchto procesů pak přispívá k negativním událostem ve formě rakovinného bujení a tvorby nádorů (Gasiewicz *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2021).

3.1.1 Struktura AhR

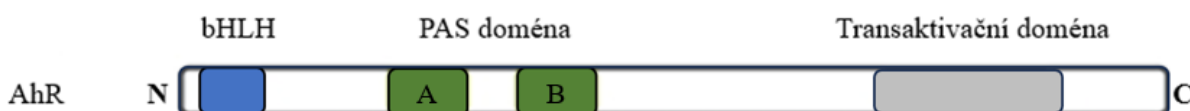
Aryluhlovodíkový receptor patří do rodiny bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix/ Per-ARNT-SIM minded). Na obrázku 1 je schématicky znázorněna struktura AhR, N-terminální doména bHLH, centrální PAS doména a C-terminální doména (C-konec).

Doména bHLH umožňuje dimerizaci se strukturně příbuznými proteiny známými jako nukleární translokátory aryluhlovodíkového receptoru (ARNT), vazbu DNA a interakci s chaperony. Také obsahuje sekvence důležité pro nukleární import a export. Centrální PAS doména (Per-ARNT-Sim) je tvořena dvěma degenerovanými repeticemi A a B (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1988; Burbach *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1994; Whitelaw *et al.*, 1995). PAS A doména zprostředkovává heterodimerizaci s ARNT a PAS B doména je označována jako ligand-vazebná doména, jelikož právě zde bylo zmapováno vazebné místo ligandu na AhR (Manchester *et al.*, 1987; Soshilov *et Denison*, 2008). PAS-B ligandová vazebná doména AhR funguje nejen jako senzor environmentálních a fyziologických signálů, ale také poskytuje vazebné rozhraní pro Hsp90 a PAS-B doménu ARNT. Díky nedávnému stanovení krystalové struktury domény PAS B *Drosophila* AhR, včetně forem vázaných na apoenzym, ligandy a ARNT, byla detailně pochopena vazba AhR-ligand (Dai *et al.*, 2022). Ve stejném roce byla publikována i studie, kde byla pomocí kryoelektronové mikroskopie poprvé

experimentálně vizualizována AhR PAS B doména s navázaným ligandem a byla tak odhalena unikátní organizace vazebného místa a strukturální determinanty specifčnosti a promiskuity vazby ligandu na AhR receptor (*Gruszczuk et al., 2022*), což má velký význam pro budoucí vývoj terapeutik spojených s AhR (*Dai et al., 2022; Gruszczuk et al., 2022*).

C-konec je variabilní a obsahuje transaktivační doménu (TAD) odpovědnou za aktivaci transkripce po navázání do DNA (*Fujisawa-Sehara et al., 1988; Burbach et al., 1992; Jain et al., 1994; Whitelaw et al., 1995*). Transaktivační doména TAD na C-konci je složena ze tří odlišných subdomén, a to subdoménu bohatou na P/S/T (prolin/serin/threonin), druhou bohatou na Q (glutamin) a třetí kyselou subdoménu. Subdoména bohatá na Q je klíčová pro účinnou interakci s koaktivátorem steroidního receptoru 1 (SRC-1, sloužící jako koaktivátor. Delece P/S/T nebo kyselá domény vede sice k poklesu vazby se SRC-1, nicméně slabá vazba mezi SRC-1 a TAD je stále zachována (*Kumar et Perdew, 1999; Kumar et al., 2001*).

Koaktivátory jsou důležité složky zapojené do genové regulace a transkripční aktivity. Aktivace transkripce konkrétního genu obecně vyžaduje koaktivátory, které interagují s transaktivační doménou a patří mezi ně již zmíněný SRC-1 nebo jaderný koaktivátor 2 (NCoA-2, SRC-2). V nepřítomnosti ligandu AhR je interakce mezi SRC-1 a tímto receptorem pouze slabá, zatímco po přidání exogenního ligandu se vazba na AhR zvýší. Pro interakci SRC-1 s AhR jsou nezbytné motivy LXXLL, což jsou oblasti koaktivátoru usnadňující ligand-dependentní interakci s jadernými receptory (*Kumar et Perdew, 1999; Beischlag et al., 2002*). LXXLL motivy (L značí leucin, X představující jakoukoli jinou aminokyselinu) jsou krátké α -helikální sekvence z konzervovaných leucinových zbytků ohraničených nekonzervovanými zbytky. Koaktivátory obsahují často více LXXLL motivů v různých nukleárně receptorových (NR) boxech, které mohou interagovat s různými receptory (*Heery et al., 1997, Kumar et Perdew, 1999*).



Obrázek 1: Struktura aryluhlovodíkového receptoru (upraveno podle *Stevens et al., 2009*)

3.1.2 Ligandy AhR

AhR byl původně objeven jako cílový receptor pro dioxiny (např. 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) (Poland *et al.*, 1976). Předpokládalo se, že vytváří vazbu s xenobiotiky a podílí se na jejich metabolismu. Nicméně v posledních letech je AhR spojován i s dalšími ligandy a hraje důležitou roli ve fyziologických i patofyziologických procesech (Denison *et Nagy*, 2003; Stevens *et al.*, 2009). Ligandy AhR lze rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenní jinak také xenobiotika zahrnují léky (např. avitriptan, semaxinib), polutanty životního prostředí (např. dioxiny, PAH), syntetické sloučeniny (např. SP600125, karbaryl) a různé další sloučeniny (např. kvercetin, kurkumin). Endogenní ligandy zahrnují sloučeniny produkované lidským tělem (např. lipoxin A4, tryptamin) a střevní nebo kožní mikroflórou (např. kyselina kynurenová, indol) (Denison *et Nagy*, 2003; Nguyen *et Bradfield*, 2008; Sladekova *et al.*, 2023).

Aktivace AhR ligandem může být trvalá, udržována persistentními látkami antropogenního původu (dioxiny, PCB, některé PAH) a vede k toxickým důsledkům. Na druhé straně se mnoho agonistů (FITZ, deriváty tryptofanu) velice rychle metabolizuje a má jen dočasné účinky. Na základě toho je možné usoudit, že AhR nebyl evolučně cílen na dlouhodobé působení látek znečišťující životní prostředí, které by byly spojeny s akumulací. Typ ligandu pak může ovlivnit, zda aktivace AhR vyvolá nebo utlumí zánětlivé či rakovinné procesy (Lin *et al.*, 2022).

Mezi exogenní ligandy AhR se řadí primárně environmentální polutanty, kam spadají nehalogenované (PAH) a halogenované aromatické uhlovodíků (HAH). Metabolicky stabilnější HAH jsou hlavním typem ligandů AhR, zatímco PAH jsou labilnější a mají relativně nižší afinitu k AhR. Mezi HAH se řadí polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny, dibenzofurany a bifenyly (PCBs). Nejvíce zkoumaným zástupcem HAH je TCDD, který patří do třídy dioxinů. Jedná se o nejúčinnější HAH, který má různé tkáňově specifické toxické a biologické účinky, včetně podpory růstu nádorů, teratogenity a různých typů orgánově specifických toxicit (Denison *et Nagy*, 2003). Mezi PAH patří benzo(*a*)pyren (BaP), antracen a 3-methylcholantren, jedná se o látky znečišťující prostředí, které se nacházejí v produktech průmyslového spalování, cigaretovém kouři a v potravinách grilovaných na dřevěném uhlí (Miller *et Ramos*, 2001). Jako další exogenní ligandy jsou brány různé typy léčiv (např. omeprazol) nebo například i různé látky vyskytující se přirozeně v ovoci a zelenině jako jsou kurkumin a kvercetin (Nguyen *et Bradfield*, 2008; Sladekova *et al.*, 2023). Všechny zmíněné exogenní ligandy jsou spolu s dalšími příklady uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady exogenních ligandů AhR

Typy ligandů	Původ	Zástupci
Exogenní	HAHs	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)
		3,3',4,4',5-pentachlorbihpenyl
		1,2,3,6,7,8-hexachlordibenzo[<i>b,d</i>]furan
		2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF)
		PAHs
	Přírozené sloučeniny	β-naftoflavon
		benzo(<i>a</i>)pyren (BaP)
		benzo(<i>k</i>)fluoranthen
		kurkumin
	Farmaceutika	kvercetin
		aminoflaviny
		avitriptan
		karbidoba
		omeprazol

Převzato z publikací: *Lin et al., 2022; Safe et Zhang, 2022; Kou et al., 2023; Sládeková et al., 2023*

Jak již bylo zmíněno výše, endogenní ligandy zahrnují sloučeniny syntetizované organismem samotným a střevní nebo kožní mikroflórou. Všechny v textu zmíněné endogenní ligandy jsou spolu s dalšími příklady uvedeny níže v tabulce 2. Například v lidské moči se nachází indigo a indirubin. Mezi endogenní ligandy patří také produkty metabolismu tryptofanu, oxindolu, nebo hemu (bilirubin, biliverdin). FICZ je agonista AhR a fotooxidační produkt tryptofanu, který je produkován po vystavení kůže UV nebo viditelnému záření (*Lin et al., 2022*). Metabolismus tryptofanu probíhá v gastrointestinálním traktu a má tři hlavní cesty. První je přímá transformace tryptofanu, která je zprostředkována mikroorganismy a dochází k tvorbě ligandů pro AhR (*Zelante et al., 2013; Agus et al., 2018*). Druhá, kynureninová dráha, je hlavní metabolickou dráhou tryptofanu. Do této dráhy vstupuje 95 % tryptofanu a probíhá v imunitních a epitelálních buňkách gastrointestinálního traktu (*Badawy,*

2017). Třetí serotoninová dráha zahrnuje nejprve přeměnu tryptofanu na 5-HT (5-hydroxytryptamin) (Matthes et Bader, 2018) a po jeho dekarboxylaci vzniká serotonin, který následně vykonává funkci neurotransmiteru (Walther et al., 2003). Přímá metabolická dráha tryptofanu pomocí mikroorganismů zahrnuje transformaci tryptofanu na několik molekul jako jsou indoly a jejich deriváty. Bylo zjištěno, že řada těchto sloučenin aktivuje AhR, například indol-3-aldehyd, nebo kyseliny indol-3-octová (IAA) a indol-3-propionová (IPA). Mezi další metabolity tryptofanu se řadí indirubin, kyselina kynurenová nebo kyselina xanthurenová (Agus et al., 2018).

Tabulka 2: Příklady endogenních ligandů AhR

Typy ligandů	Původ	Zástupci
Endogenní	Metabolity tryptofanu	6,12-diformylindolo[3,2- <i>b</i>]karbazol (dFICZ)
		indirubin
		kyselina cinnabarinová
		kyselina kynurenová
		kyselina xanthurenová
	Mikroflóra	3-indoxylsulfát
		3-methyl-indol (skatol)
		indol
		indol-3-aldehyd
		indol-3-karbinol (I3C)
		kyselina indol-3-octová (IAA)
		kyselina indol-3-propionová (IPA)
	Další ligandy	tryptamin
		bilirubin
		biliverdin
		dopamin
indigo		
		lipoxin A4
		prostaglandiny

Převzato z publikací: Agus et al., 2018; Lin et al., 2022; Safe et Zhang, 2022; Kou et. al, 2023; Sládeková et al., 2023

3.1.3 Signalizace AhR

Od svého objevu, byl aryl uhlovodíkový receptor hlavním zájmem výzkumu z hlediska jeho účinku v toxikologii. Studie se převážně zaměřovaly na toxickou indukci AhR pomocí ligandu TCDD v kanonické neboli genomické signální dráze, která zahrnuje translokaci AhR do jádra (*Okey et al., 1979*) a heterodimerizaci s ARNT (*Elferink et al., 1990; Reyes et al., 1992*). Výsledný dimer se pak váže na xenobiotický responzivní element (XRE) (*Hankinson, 1995*). XRE je specifická sekvence v promotorových oblastech cílových genů (5'-TA/TGCGTG-3'), jehož aktivací dojde k cílových genů (*Denison et al., 1988*).

V různých laboratořích byla k lepšímu pochopení působení TCDD na AhR a identifikaci jeho cílových genů použita metoda DNA microarray (*Puga et al., 2000; Frueh et al., 2001; Boverhof et al., 2005*). Pomocí této metody byla identifikována celá řada cílových genů AhR a vědci došli k zajímavému zjištění, že mnoho responzivních genů neobsahovalo vazbu s XRE. Zjištění naznačovalo, že AhR může indukovat expresi jiné sekvence, než je XRE, což postupně vedlo k objevu nekanonické signální dráhy (*Dere et al., 2011b*).

3.1.4 Kanonická signální dráha

Průběh kanonické signální dráhy je vidět na obrázku 2. Aryl uhlovodíkový receptor je v neaktivní formě lokalizován v cytoplazmě buňky, kde tvoří proteinový komplex spolu se dvěma proteiny Hsp90 (Heat shock protein 90), které jsou spojeny molekulou XAP2 (X-asociovaný protein 2), dále ko-chaperonem p23 a proteinkinázou c-SRC (*Perdew, 1988*). Zmíněné proteiny zajišťují správné sbalení AhR a rozpoznání ligandu receptorem. Hsp90 se podílí na skládání nově syntetizovaného AhR, XAP2 ukotvuje AhR na cytoskeletu a brání jeho inkorporaci do nukleoproteinů. Tyto molekulární chaperony také mohou inhibovat ubiquitinaci a degradaci AhR, čímž udržují určité množství AhR v cytoplazmě (*Fujisawa-Sehara et al., 1988; Jain et al., 1994; Whitelaw et al., 1995*).

Po navázání vhodného exogenního nebo endogenního ligandu na AhR dojde k odpojení XAP2 a SRC a translokaci AhR do jádra. V jádře dochází k disociaci chaperonových proteinů a heterodimerizaci AhR s ARNT. Aktivní heterodimer AhR-ARNT reguluje expresi cílových genů tak, že se váže na DNA přes specifickou sekvenci XRE (5'-CACGCNA-3') v promotorových oblastech cílových genů (*Denison et al., 1988; Jackson et al., 2015; Larigot et al., 2018; Hu et al., 2023*).

Komplex AhR-ARNT-XRE reguluje expresi mnoha genů včetně biotransformačních enzymů I. a II. fáze, jako jsou například cytochromy P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1

(Morgan et al., 1998; Sakuma et al., 1999). Tyto geny jsou spojené s adaptivní nebo toxickou odpovědí na exogenní agonisty (Wright et al., 2017). Adaptivní odpověď probíhá tak, že AhR se váže na xenobiotické ligandy a aktivuje transkripci enzymů, které zprostředkují její biotransformaci a vylučování (Conney, 1982). Toxická metabolická odpověď nastává, když vazba ligandu s AhR vede k vyvolání toxického působení látky v těle. Například toxicita dioxinů zahrnuje hepatocelulární poškození, chlorakné, nebo zvýšený růst nádorů (Pitot et al., 1980; Poland et Knutson, 1982). Určité formy cytochromů P450 jsou schopny metabolizovat chemické látky tak, že po biotransformaci jsou látky toxicitější než ve stavu, v jakém se dostali do těla (Conney, 1982). Reakce katalyzované CYP1 mohou mít také za následek produkci reaktivních metabolitů vyvolávající oxidační stres, který by mohl narušit fyziologické fungování DNA a buněk v těle organismu. Což potvrzuje například i výzkum, ve kterém bylo prokázáno, že myši s deficitem AhR vykazují rezistenci vůči nádorům vyvolaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH) (Sondermann et al., 2023).

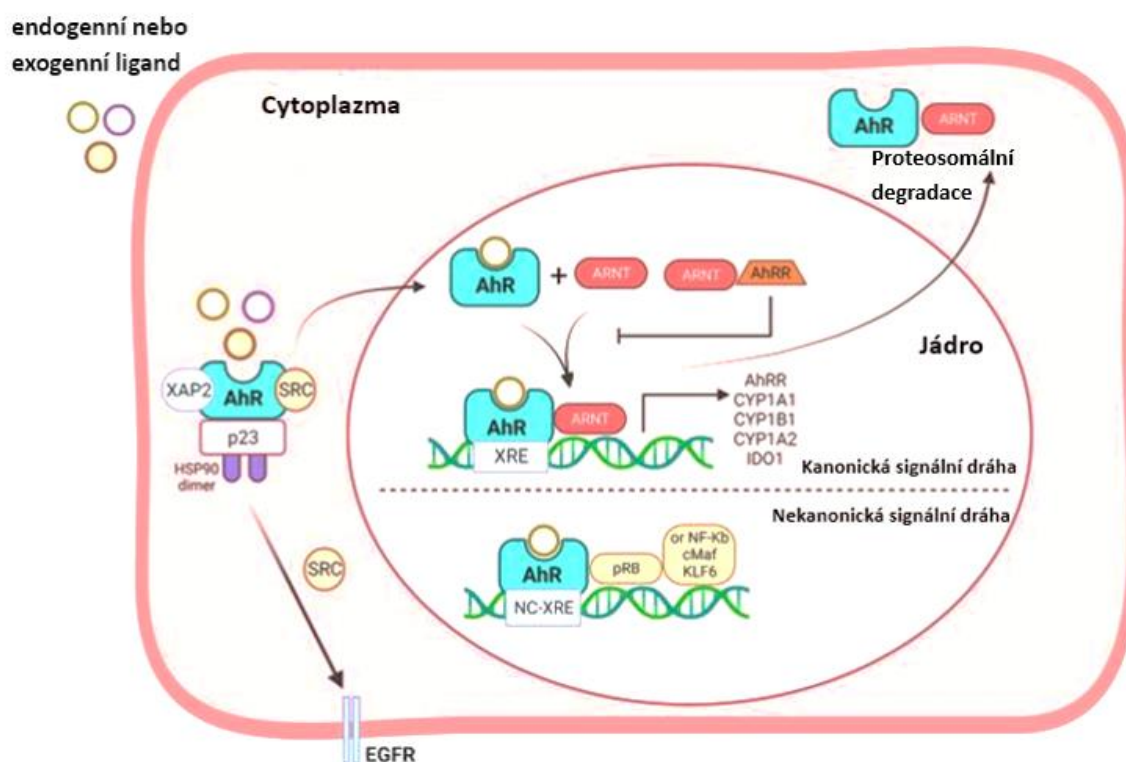
Transkripční aktivita AhR je regulována na několika úrovních, např. degradací ligandu enzymem CYP1A1, pomocí AhR represoru AHRR (Baba et al., 2001) nebo degradací 26S proteazomem. Jedním z důležitých cílových genů v genomické dráze je AhR represor (AHRR). AHRR soutěží o vazbu s AhR, ovšem nedokáže vázat ligandy, jelikož má na rozdíl od AhR, porušenou PAS B doménu v N-koncové oblasti. Rozdíl je také v C-koncové transaktivační doméně. AHRR může kompetitivně potlačovat transaktivaci AhR vazbou na ARNT za tvorby neaktivního heterodimeru AHRR-ARNT. Tímto způsobem může ARNT regulovat transkripci u AhR-dependenčních genů (Jackson et al., 2015; Hu et al., 2023).

Po disociaci komplexu AhR/ARNT může být uvolněný AhR prostřednictvím NES sekvence exportován z jádra, ubikvitinován a degradován 26S proteazomovou dráhou (Hu et al., 2023). Mechanismus degradace 26S proteazomovou dráhou byl studován např. pomocí imunologické analýzy potkaních hladké svaloviny, myších buněk Hepa-1 a lidských buněk HepG2. Bylo zjištěno že degradace proteinu je kritickou složkou dráhy a případné zablokování degradace pomocí inhibitoru proteazomu má za následek zvýšení koncentrace komplexů AhR-ARNT v jádře (Davarinos et Pollenz, 1999).

3.1.5 Nekanonická signální dráha

Nekanonická signální dráha (viz obrázek 2) má velice podobný průběh jako dlouho jediná známá kanonická, s rozdílem, že u nekanonické může AhR interagovat s jinými heterodimerizačními partnery, než je ARNT. Heterodimerizačním partnerem pro AhR může být například Krüppel-like factor 6 (KLF6) (Wilson et al., 2013), retinoblastomový protein

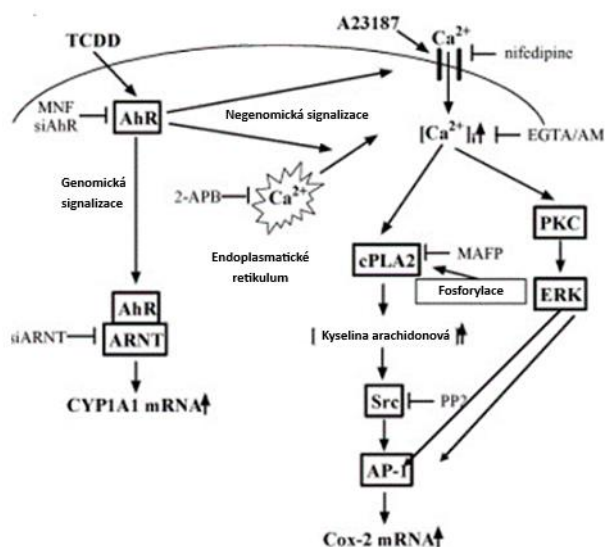
(pRB) nebo nukleárním faktorem kappa B (NF- κ B) (Vogel *et al.*, 2007b). Heterodimer se následně váže do sekvence NC-XRE (non-consensus XRE), s motivem 5'-GGGA-3'), kde dojde k iniciaci transkripce cílových genů, kterými jsou například IL-6, IL-8, c-Myc, serpina-1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21cip1) (Jackson *et al.*, 2015).



Obrázek 2: Kanonická a nekanonická signální dráha AhR (upraveno podle Guerra-Ojeda *et al.*, 2023)

3.1.6 Negenomická signální dráha

U negenomické dráhy, která je popsána i níže na obrázku 3, dochází k odštěpení cytosolické tyrosin kinázy (c-SRC) z komplexu s receptorem a následně je schopna aktivovat jiné než kanonické signální dráhy AhR. Negenomická signální dráha nezahrnuje translokaci AhR do jádra, ale dochází ke sledu signalizačních událostí včetně fosforylace mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK), enzymatická aktivace cytosolové fosfolipázy A2 (cPLA2), zvýšení množství intracelulárního vápníku, uvolnění kyseliny arachidonové a indukce zánětlivých mediátorů. Negenomická signální dráha je součástí různých buněčných procesů, včetně regulace imunity, zánětu a řízení buněčného cyklu (Bock, 2020; Hu *et al.*, 2023).



Obrázek 3: Genomická a nengenomická signální dráha AhR (upraveno podle *Matsumura, 2008*)

3.1.7 Srovnání lidského a myšičího AhR

Za účelem studia receptoru AhR se využívá celá řada modelových organismů (myši, krysy), které jsou vhodné ke studiu komplexních biologických interakcí a fyziologických procesů. Některé biologické procesy nejsou u zvířecích modelů úplně identické s těmi u lidí a je potřeba zahrnout i lidské buňky, které jsou však vhodné spíše pro primární screening sloučenin interagujících s AhR a pro detailnější analýzu buněčných a molekulárních mechanismů. Například některé ligandy mohou aktivovat lidský AhR jinak než myšičí AhR a naopak. To může mít důsledky pro odpověď na toxiny a exprese genů (*Ware et al., 2020*). Základní funkce AhR u hlodavců i člověka jsou velmi podobné, ale stále existují rozdíly ve struktuře, expresi a funkčních rolích. Důkladné pochopení rozdílů ve struktuře, aktivaci a mechanismu by nám mohly přinést důležité poznatky, které by se daly využít při léčbě různých typů onemocnění (*Quintana et Sherr, 2013; Mulero-Navarro et Fernandez-Salguero, 2016*).

U myšičí je AhR dlouhý 805 aminokyselin, u lidí pak 848 aminokyselin a je kódován genem ležícím na chromozomu 7p15 u lidí a 12 A3 u myšičí (*Seldin, 1989; Le Beau, 1994*). Rozdíly v molekulové hmotnosti mAhR a hAhR jsou výsledkem hypervariability aminokyselinových sekvencí na karboxylových koncích, kdy odlišné použití stop kodonů vytváří proteiny s molekulovou hmotností rozdílnou o 6 kDa (*Dolwick et al., 1993*). Z hlediska struktury mají mAhR a hAhR 86% identitu aminokyselinového složení

na N-terminálním konci, zatímco u C-terminální domény obsahují pouze 58 % sekvence stejné. U myšičího a lidského AhR mají subdomény TAD různé role v transaktivačním potenciálu pro C-doménu. Například bylo zjištěno, že delece subdomény Q, způsobuje u lidského AhR zablokování transkripční aktivity hAhR, zatímco u myšičího receptoru došlo pouze k snížení (Kumar *et al.*, 2001; Flavelly *et al.*, 2008).

Po porovnání aminokyselinové sekvence bylo zjištěno, že sekvence mAhR je nejvíce podobná s Per (protein cirkadiálního rytmu) a Sim (single-minded) proteiny *Drosophily* a s lidským ARNT. Primární oblast podobnosti mezi těmito čtyřmi proteiny byla na N-konci a obsahovala 200-350 aminokyselin. Výsledky studie odhalily, že v N-terminální oblasti je myšičí AhR ze 31 % shodný s proteinem Sim, z 19 % s ARNT a 15 % má stejných s Per. Kromě sekvenční podobnosti má mAhR, Sim, ARNT také C-terminální doménu bohatou na glutamin (Burbach *et al.*, 1992).

Již v roce 1994 ve studii Okey *et al.*, 1994 uvedli, že se obecně zdá, že lidský AhR funguje podobně jako u hlodavců, nicméně u hAhR je afinita, s jakou se ligand váže na receptor, nižší než u hlodavčího receptoru. S přibývajícím výzkumy se potvrdilo, že aktivace receptoru je různá mezi jednotlivými druhy živočichů (Zeiger *et al.*, 2001). V roce 2006 byl vydán rozsáhlý přehled rozdílů na působení TCDD mezi několika druhy, včetně člověka. Shrnutím bylo, že studie potvrdily, že lidský AhR sdílí klíčové mutace s mAhR^d, které mají za následek vznik AhR s nižší reaktivitou. V souvislosti s tím, vyžadovaly lidské buňky přibližně 10x vyšší koncentrace TCDD než buňky hlodavců (Connor *et al.*, 2006). Lokus AhR je u myšičí polymorfni, kmeny nesoucí alelu AhR^b exprimují receptor s vysokou afinitou a jsou citlivé na receptorové agonisty, zatímco kmeny nesoucí alelu AhR^d mají nižší afinitu receptoru a jsou méně citlivé na agonisty (Poland *et al.*, 1987). U myšičí s nízkou afinitou k ligandu s alelou mAhR^d je pozorovaná vyšší odolnost vůči toxicitě způsobené TCDD. Tato alela má ligand-vazebné doméně substituci aminokyseliny alaninu za valin, který pak narušuje vazbu typických ligandů AhR (Ema *et al.*, 1994). Mezidruhové rozdíly AhR a jejich schopnost reagovat na ligandy má u různých druhů jiné projevy. Například u hlodavců má expozice TCDD za následek imunotoxicitu, reprodukční toxicitu, rakovinu kůže a jater, zatímco u člověka způsobí kontakt s TCDD pouze chlorakné (Watson *et al.*, 1995; Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Jedny z nejvíce citlivých obratlovců na expozici TCDD jsou ryby, kde se opět vyskytují četné rozdíly mezi jednotlivými druhy (Peterson *et al.*, 1993; King-Heiden *et al.*, 2012). Naopak bezocasí obojživelníci jsou na působení TCDD velmi necitlivé (Collier *et al.*, 2008).

Jiným příkladem, kdy byl pozorován mezidruhový rozdíl AhR na ligandy, jsou indigo a indirubin, agonisté AhR, používající se v klinické medicíně k léčbě ulcerózní enteritidy (chronický typ zánětu trávicí trubice). U člověka mohou tyto ligandy AhR způsobit výskyt krve ve stolici a plicní arteriální hypertenzi, zatímco u myši toto působení není pozorováno (*Nishio et al., 2016; Cho et al., 2020; Ozawa et al., 2020*).

3.1.8 AhR a nádorová onemocnění

Rakovinné buňky mají narušené regulační obvody, které řídí fyziologickou buněčnou proliferaci a homeostázu. Bylo navrženo šest základních změn, které musí nastat, aby se buňka stala rakovinnou, a to: produkce vlastních růstových signálů, necitlivost na růstové inhibiční signály, vyhýbání se apoptóze, neomezený replikační potenciál, stálá angiogeneze a tkáňová invaze s tvorbou metastáz (*Hanahan et Weinberg, 2000*). K těmto základním vlastnostem byly přidány další, a to deregulovaný metabolismus, obcházení imunitního systému, nestabilní genom a zánět (*Hanahan et Weinberg, 2011*).

AhR reguluje expresi genů zapojených do metabolismu cizorodých látek, imunitní odpovědi, buněčného cyklu, diferenciaci, metabolismu lipidů a sacharidů. Je proto klíčovým faktorem nejen ve fyziologii člověka, ale také ve výskytu, vzniku a progresi patofyziologických procesů, včetně karcinogeneze, zánětu, infekce, diabetu a kardiovaskulárních onemocnění. Kvůli jeho hojnému zastoupení v různých procesech se poslední dobou AhR stává velice často vyhledávaným terapeutickým cílem (*Kou et Dai, 2021*).

U různých typů rakoviny bylo prokázáno, že AhR sloužící jako transkripční faktor je schopen inhibovat expresi onkogenu, nebo aktivovat expresi tumor supresorových genů, jako jsou například p53, BRCA-1 (*Jeffy et al., 1999; Su et al., 2009*). Ve výzkumu *Phillips et al., 2022* pozorovali vliv AhR na výskyt p53 a přežití myši s deficientem p53. Výsledky ukázaly, že AhR má tumor supresivní funkce i v nepřítomnosti supresoru p53. Jedním z vysvětlení by mohlo být, že AhR a p53 nezávisle řídí buněčný cyklus a apoptózu. Účinky AhR na rakovinu mohou být závislé na kontextu a lišit se v závislosti na konkrétním typu tkáně a faktorech prostředí. Zatímco aktivace AhR může v některých souvislostech podporovat karcinogenezi, v jiných situacích může mít také ochranné účinky tím, že indukuje detoxikační dráhy (*Conney, 1982; Yang et al., 2005*).

Aktivace AhR mnoha xenobiotickými ligandy je obvykle přechodná (*Mitchell et Elferink, 2009*). Expozice TCDD a dalších perzistentních polutantů však vede k trvalé aktivaci receptoru, který se akumuluje v těle, je velice těžko metabolizován a váže se s vysokou

vazebnou afinitou (Budinsky et al., 2013). Řada důkazů potvrzuje, že trvalá aktivace AhR je ústředním a počátečním faktorem nádorového působení. Studie dokázaly, že ligandy AhR s nižší afinitou jsou méně účinné v souvislosti s nádorovým onemocněním (Buchmann et al., 1994; Budinsky et al., 2006). Dále bylo zjištěno, že mutace AhR zabraňující translokaci a dimerizaci s ARNT chrání před chemickou toxicitou podobnou dioxinům (Walisser et al., 2005). V některých případech může samotná aktivita AhR vést k nádorovému bujení, kdy bylo zjištěno, že konstitutivně aktivní AhR zvyšuje výskyt nádorů jater a žaludku u myši (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004; Brunnberg et al., 2006).

Aktivace AhR může přispívat ke vzniku nádorových onemocnění různými mechanismy, včetně metabolismu environmentálních karcinogenů a modulace imunitních reakcí. Kontextově závislá povaha signalizace AhR zdůrazňuje potřebu dalšího výzkumu, který by objasnil jeho přesnou úlohu u různých typů rakoviny. AhR se podílí na metabolismu karcinogenů, včetně PAH obsažených v cigaretovém kouři a látkách znečišťující životní prostředí. Aktivace AhR vede k indukci enzymů, jako jsou enzymy cytochromu P450 (CYP), které tyto sloučeniny metabolizují na reaktivní meziprodukty, jež mohou poškozovat DNA a potenciálně přispívat ke vzniku rakoviny (Bukowska et al., 2022).

Změnou funkce imunitních buněk, jako jsou T-lymfocyty a dendritické buňky, v důsledku aktivace nebo inhibice AhR může být způsobena dysregulace imunitních reakcí, což je následně spojováno s rozvojem a progresí rakoviny (Stevens et al., 2009). V posledních letech jsou velice rozsáhlé testy imunoterapie, které jsou založeny na schopnosti některých nádorů odolávat účinkům protinádorovým T lymfocytům (Boon et al., 2006). Za rezistenci proti T lymfocytům může být zodpovědná celá řada mechanismů. Jedním z nich je mechanismus založený na katabolismu tryptofanu prostřednictvímIDO (indolamin 2,3-dioxygenázy), která je často exprimována v nádorech.IDO degraduje tryptofan a tím je inhibována proliferace T lymfocytů, která je jinak závislá na přítomnosti tryptofanu. Pokud by se ale pomocí inhibitoru zastavila aktivitaIDO mohlo by dojít k částečnému zvrácení rezistence a mohl by tak být nalezen případný způsob léčby nádorů prostřednictvím imunoterapie (Uyttenhove et al., 2003). Jiným příkladem mechanismu může být produkceTDO (tryptofan 2,3-dioxygenázy), enzymu, který degraduje tryptofan. TDO je běžně exprimován v játrech a v menším množství i v mozku (Miller et al., 2004). Při testování TDO bylo zjištěno, že je exprimován v lidských glioblastomech a podporuje růst nádoru, prostřednictvím produkce kynureninu. Kynurenin působí jako endogenní ligand pro AhR, což vede k vyšší odolnosti nádoru a ke snížení protinádorové imunitní odpovědi (Opitz et al.,

2011). Byl vyvinut inhibitor TDO, který byl následně použit u imunizovaných myší proti P815 (*Van den Eynde et al., 1991*). Po systémové léčbě tímto inhibitorem došlo k obnovení schopnosti myší odmítnout nádor exprimující TDO. Inhibice TDO by v budoucnu mohla být bezpečnou cestou při léčbě nádorového onemocnění, tak že by se podpořilo imunitní odmítnutí nádoru a posílení imunoterapie (*Pilotte et al., 2012*).

Modulace aktivity AhR by mohla být potenciálně využita ke zvýšení účinnosti chemoterapie nebo k inhibici růstu nádoru zásahem do procesů, jako je angiogeneze (tvorba nových cév), které jsou klíčové pro přežití nádoru. AhR má terapeutický potenciál například u rakoviny prsu, prostaty, plic, střeva a konečníku, kůže, nebo lymfatického systému (*Loaiza-Pérez et al., 2004; Fritz et al., 2007; Vogel et al., 2007a; Nothdurft et al., 2020; Shah et Itzkowitz, 2022; Ondrová et al., 2023*).

Studie naznačují, že aktivace AhR může u některých druhů rakoviny podporovat růst nádorů a jejich metastazování. Například signalizace AhR se podílí na podpoře proliferace a invazivity buněk rakoviny prsu (*Goode et al., 2013*). Jako možný terapeutický cíl k léčení rakoviny prsu se testoval omeprazol, který se běžně používá jako lék proti zánětlivým onemocněním gastrointestinálního traktu. Ve studii bylo zjištěno, že omeprazol inhibuje migraci a invazi buněk zhoubného nádoru prsu a přímo cílil na metastázované nádory. Zároveň bylo prokázáno, že downregulace onkogenů omeprazolem v nádorových buňkách rakoviny prsu je závislá na AhR (*Jin et al., 2014*).

U rakoviny plic byl vliv AhR testován pomocí myšího modelu. AhR působil proti potenciálnímu onkogenu K-Ras^{G12D} v plicích a tím potlačoval nemalobuněčný karcinom plic (*Nacarino-Palma et al., 2021*). Při aktivaci AhR omeprazolem došlo k indukci exprese aktivačního transkripčního faktoru 4 (ATF4) a upregulaci asparaginsyntázy (ASNS), která zvýšila hladiny asparaginu na úkor snížení hladin aspartátu, což vedlo k potlačení růstu buněk plicního karcinomu (*Nothdurft et al., 2020*).

V nedávné studii bylo zjištěno, že TCDD zvyšuje toxické účinky CCl₄ v myších játrech pravděpodobně zvýšením exprese cytochromu CYP2E1, závislým na AhR. Nedostatek AhR podpořil regeneraci myších jater po akutním toxickém poškození, ale zároveň se zvýšil rozvoj hepatokarcinomu (*Moreno-Marín et al., 2017*).

Při testování účinku AhR u rakoviny prostaty byl použit myší model TRAMP (*transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*). U myší, které postrádaly jednu nebo obě alely pro AhR, byl výskyt nádorů prostaty v průměru vyšší než u myší, které měly přítomné

obě alely pro AhR (*wild type*). Výsledky výzkumu naznačovaly, že vzniklé nádory prošly neuroendokrinní diferenciací, která je regulována AhR (Fritz *et al.*, 2007).

U pacientů trpících IBD (zánětlivé onemocnění střev) je zvýšené riziko vývoje kolorektálního karcinomu (CRC), přičemž toto riziko narůstá se závažností zánětu a s délkou trvání IBD. Mnoho patogenních mikrobů (např. *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori*) je schopno indukovat produkci SMO (sperminooxidáza) a to vede k produkci reaktivních kyslíkových radikálů a poškození DNA (Xu *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že enterotoxigenní bakterie *Bacteroides fragilis* vytváří patogenní toxin BFT, který se váže na specifický receptor epiteliálních buněk tlustého střeva a aktivuje signální dráhu zprostředkovanou AhR (Shah *et Itzkowitz*, 2022).

Ve různých studiích se vědci zaměřili na možný vliv TCDD na buněčné linie rakoviny lymfomu. Výsledky ukázaly, že aktivace AhR vede k rezistenci proti apoptické odpovědi u tří různých buněčných linií lidského lymfomu. Aktivace pomocí TCDD vedla ke snížení apoptózy a indukovala expresi protizánětlivých a anti-apoptických proteinů (COX-2, C/EBPβ a Bcl-x) (Vogel *et al.*, 2007a).

Klíčovým aspektem terapeutického využití AhR je kontextová specifčnost závislá na molekulárním základu onemocnění. Například četné studie uvádějí příznivé účinky agonistů AhR při léčbě zánětlivých střevních onemocnění. V tomto případě vedla farmakologická aktivace AhR agonisty (včetně mikrobiálních metabolitů tryptofanu) k potlačení imunitní odpovědi a zlepšení stavu zánětlivého onemocnění, především prostřednictvím zvýšené transkripce IL-22 a obnovené slizniční odpovědi (Lamas *et al.* 2016, Zelante *et al.*, 2013). Na druhé straně u rakoviny nesouvisející se zánětem, jako je duktální adenokarcinom pankreatu, byla aktivace AhR mikrobiálními metabolity tryptofanu identifikována jako faktor zhoršující výsledek onemocnění, zatímco farmakologická inhibice AhR antagonisty vedla k obnovení funkcí makrofágů, zvýšení infiltrace T-buněk, a následně ke zlepšení onemocnění a potlačení růstu nádoru (Hezaveh *et al.*, 2022)

3.2 Studované sloučeniny

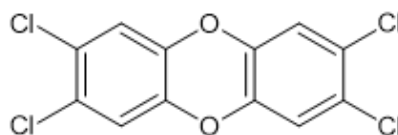
3.2.1 TCDD

2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) spadá mezi skupinu dioxinů, které se řadí mezi POPs (perzistentní organické polutanty). Všechny dioxiny jsou složeny ze dvou benzenových kruhů, spojených jedním nebo dvěma atomy kyslíku a mohou se vázat se čtyřmi až osmi atomy chloru. TCDD je bezbarvá až bílá krystalická pevná látka a jedná se o jednu

z ekologicky nejúčinnějších toxických sloučenin. S TCDD jsou spojována nebezpečí akutní toxicity, je vysoce toxický pro vodní organismy jak u akutního, tak dlouhodobého působení, řadí se mezi karcinogeny a teratogeny (*Patrizi et Siciliani de Cumis., 2018; National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 15625, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin*).

Dioxiny se mohou dostat do atmosféry převážně jako vedlejší produkty různých spalovacích a průmyslových procesů pracující se sloučeninami chloru a následně dostávají do půdy a vody a hromadí se v potravním řetězci, kde se ukládají v tukových tkáních zvířat ve znečištěném prostředí, a tímto způsobem se mohou dostat do tkání člověka (*Von Burg, 1988; Breivik et al., 2004*). Expozice dioxinů zahrnuje široké množství toxických důsledků, jako je chlorakné, snížení plodnosti, teratogenitu, imuno-, hepatoto-, kardio a dermální toxicitu, podporu růstu nádorů, letalitu, změny v endokrinní homeostáze a stimuluje expresi velkého množství genů (*Denison et al., 2011*).

TCDD je agonista AhR a do responzivní buňky vstupují difúzí, kde dochází k vysoce afinitní vazbě s cytosolickým AhR a AhR následně vstupuje do kanonické signální dráhy. Genová exprese TCDD zprostředkovaná AhR je druhově specifická, kdy u hlodavců může být citlivost receptoru k TCDD mnohem menší, než u člověka a nedají se tedy přímo vyvodit možné následky TCDD pro člověka (*Denison et al., 2011; Dere et al., 2011a*).



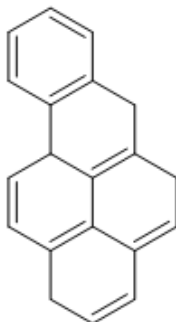
Obrázek 4: Chemická struktura TCDD

3.2.2 BaP

Benzo(a)pyren (BaP) je členem skupiny polycyklických aromatických uhlovdíků (PAH), nacházející se v pevném skupenství ve formě žlutých krystalů. Jedná se o toxickou látku, špatně rozpustnou ve vodě a snadno v organických rozpouštědlech (toluen, benzen, chloroform). Je řazen mezi tabákové, environmentální a chemický karcinogen, který je častým iniciátorem nádorového bujení (*Hecht, 2002; National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 2336, Benzo[a]pyrene*).

BaP je produktem neefektivního spalování fosilních paliv, dřeva a dalších organických materiálů, nachází se také v cigaretovém kouři. Může se ale nacházet také v potravinách, které byly zpracovávány při vysokých teplotách. BaP spolu s ostatními PAH se uvolňuje do atmosféry a následně se ukládá v půdě a ve vodě. Prostřednictvím vody se kontaminují vodní zdroje potravin, zemědělské plodiny a rostliny (*Dipple, 1983*). Expozice BaP u zvířat může mít po metabolické aktivaci za následek tvorbu nádorů plic, jater, kůže lymfatických tkání, průdušnic a předžaludku. U člověka je působení BaP spojeno se zvýšeným výskytem rakoviny plic a kůže (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Polychlorinated dibenzoparadioxins*).

Tumorogenní aktivita PAH je zprostředkovaná metabolickou aktivací na chemicky reaktivní sloučeniny. BaP je metabolizován převážně cytochromy P450 CYP1A1 a CYP1B1 a epoxidovou hydrolázou, kdy vznikne konečný reaktivní produkt BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) (*Arlt et al., 2008*). BPDE tvoří adukty s DNA, které mají mutagenní a karcinogenní účinky a podílí se na tvorbě methylované DNA a změně DNA metyltransferázy (*Wojciechowski et Meehan, 1984*).



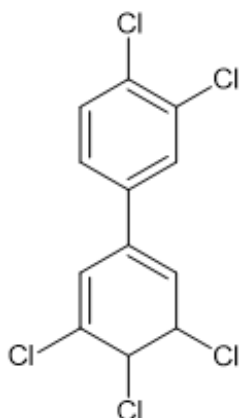
Obrázek 5: Chemická struktura BaP

3.2.3 PCB-126 - 3,3',4,4',5-pentachlorbifenyl

PCBs neboli polychlorované bifenylly jsou směsí až 209 jednotlivých chlorovaných sloučenin (kongenerů). Základem sloučeniny je bifenyl, na kterém je navázáno 1–10 atomů chloru. Nejsou žádné přírodní zdroje PCB, jedná se buď o olejovité kapaliny nebo o pevné látky bezbarvé až světle žluté barvy. Chemicky jsou inertní a stabilní při hydrolýze a oxidaci v průmyslovém použití. Po zahřátí dochází k uvolňování toxických plynů chloru (*Lewis, 2004; National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 63090, 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl*).

Komerční polychlorované bifenyly se skládají ze směsi kongenerů a u živočichů mohou vyvolat škálu biochemických a toxických reakcí. Některé z polychlorovaných bifenyly mají účinky a strukturu podobnou TCDD, proto se jim jinak říká dioxinům podobné (dioxin-like) a druhou kategorií jsou dioxinům nepodobné (non-dioxin-like) (*Safe, 1994*). Expozice PCB může způsobit nepříznivé neurologické, reprodukční, vývojové, imunologické a metabolické účinky. Vliv sloučenin je závislý na dávce a délce expozice (*Who, 2003*). PCB podobně jako dioxiny uplatňují své toxické působení prostřednictvím aktivace AhR a následné cíle indukované transkripce zahrnují několik členů rodiny cytochromu P450 – CYPy, zajišťující metabolismus xenobiotik (*Zhang et al., 2012*).

PCB-126 je nejtoxičtější sloučenina patřící mezi polychlorované bifenyly a vykazuje silnou afinitu k AhR. Složení a vlastnosti jsou podobné TCDD, chemická struktura má základní strukturu bifenyl, na který je připojených pět atomů chloru v pozicích 3, 3', 4, 4' a 5. Toxické působení PCB-126 je velice podobné působení TCDD. Z výzkumů bylo dále zjištěno, že PCB-126 má hepatotoxický účinek a snižuje obsah bazálního glykogenu v primárních myších hepatocytech. PCB-126 inhibuje glukoneogenzi (GNG) z laktátu a pyruvátu potlačením transkripce genu PEPCK (fosfoenolpyruvátcarboxykináza), zatímco GNG z glykogenu není ovlivněna, jelikož je řízena jinými geny (*Zhang et al., 2012*). V další studii se došlo k závěru, že PCB-126 narušuje střevní mikrobiom, a přispívá ke střevním zánětům a metabolickým poruchám (*Petriello et al., 2018*).



Obrázek 6: Chemická struktura PCB-126

3.2.4 Omeprazol

Omeprazol patří mezi benzimidazolové sloučeniny, ve své chemické struktuře nese substituovaný benzimidazolový kruh a substituovaný pyridinový kruh, které jsou spojeny řetězcem obsahující sulfoxid. Díky asymetrickému chirálnímu atomu síry se může nacházet

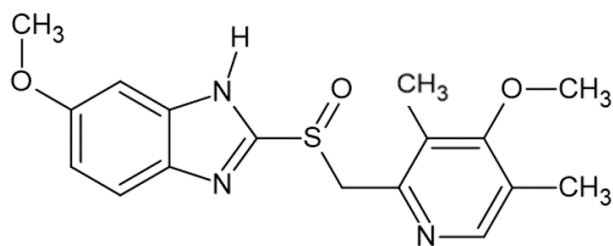
ve formě R- nebo S- izomeru (esomeprazol). Jedná se o bílý krystalický prášek, snadno rozpustný v ethanolu a methanolu, těžko v acetonu, isopropanolu a ve vodě. Omeprazol je poměrně stabilní v kyselém pH, ale rychle se odbourává v pH kyselém (*National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4594, Omeprazole*).

Jedná se o inhibitor protonové pumpy (PPI) a silný inhibitor žaludeční acidity. V lékařství se používá pro léčbu zánětlivých onemocnění gastrointestinálního traktu, včetně léčby žaludečních vředů. Částečná přeměna omeprazolu probíhá v ledvinách a úplný metabolismus probíhá v játrech, prostřednictvím cytochromu P450, který je také odpovědný za vznik jeho hlavních metabolitů (*Andersson et al., 1993; Sachs et al., 1993*). Omeprazol inhibuje oxidativní metabolismus některých léků, mezi nejdůležitější patří například fenytoin, který se používá při léčbě epilepsie (*Howden, 1991*).

Omeprazol se využívá nejen k léčení zánětlivých onemocnění trávicího traktu, ale v posledních letech se masivně testují jeho terapeutické účinky v oblasti karcinogeneze (viz kapitola 3.1.8 AhR a nádorová onemocnění). Bylo prokázáno, že omeprazol indukuje expresi genu CYP1A1 v buňkách lidského hepatomu a primárních lidských hepatocytech (*Curi-Pedrosa et al., 1994*). Ve studii *Shiizaki et al., 2014a* ukazují, že reakce myšího AhR na omeprazol je způsobena metabolitem omeprazolu generovaným kvasinkami ve střevech myší a lidí. Jak dále v článku uvádějí, aktivace AhR omeprazolem je také závislá na druhové specifitě receptoru, kdy myší hepatomové buňky jsou necitlivé vůči omeprazolu, zatímco lidské na omeprazol reagují. Molekulární mechanismy indukce CYP1A1/2 omeprazolem (i dalšími benzimidazolovými inhibitory protonové pumpy) však nezahrnují přímou vazbu léčiv na receptor AhR a nejsou tak řazeny mezi ligandy pro AhR (*Daujat et al., 1992; Lesca et al., 1995*).

Aktivace AhR omeprazolem není zcela objasněna, nicméně četné výzkumy se touto problematikou v průběhu let podrobně zajímaly. Aktivace omeprazolem je druhově specifická a indukce CYP1A1 bylo identifikováno v lidských primárních hepatocytech ale ne v myších buňkách (*Kikuchi et al., 1996*). Další výzkumy odhalily, že OMS (omeprazol-sulfid), degradační metabolit omeprazolu, je antagonistou AhR v hepatomových buněčných liniích lidského nebo myšího původu, ale v čerstvě vyšetých hepatocytech se chová jako agonista. Výsledkem výzkumu byl důkaz, že sloučenina se může změnit z antagonisty na agonistu AhR, a naopak modulací aktivity metabolismu léčiv hostitelské buňky (*Gerbal-Chaloin et al., 2006*). *Shiizaki et al., 2014b* zjistili, že aktivace reportérového genu řízeného XRE

zprostředkovaná omeprazolem je závislá na druhu, ze kterého AhR pochází, ale nezávislá na druhu hostitelské buňky, ve které je AhR exprimován.



Obrázek 7: Chemická struktura omeprazolu

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Stabilně transfekovaná buněčná linie AZ-AhR, odvozená od lidských hepatomových buněk a stabilně transfekovaná buněčná linie AheRepa, odvozená od myších hepatomových buněk hepa1c1c7. Obě buněčné linie jsou adherentní.

Buněčná linie AZ-AhR umožňuje sledovat transkripční aktivitu receptoru AhR. Vznikla stabilní transfekací lidských hepatomových buněk linie HepG2 pomocí komplexního plazmidu pGL-4.27-DRE, který nese gen pro rezistenci na hygromycin a plazmid nesoucí DRE (dioxin-responsive element), díky kterému se váže na AhR a spouští transkripci luciferázy (*Novotna et al., 2011*).

Hepa1c1c7 je jaterní buněčná linie izolovaná z myši s hepatomem. Jedná se o parentální linii, od níž byla odvozena linie Aherepa, u které byla testována transkripční aktivita AhR. Aherepa vznikla stabilní transfekací buněčné linie hepa1c1c7 plazmidem pGL-4.27-DRE, nesoucí gen rezistence na hygromycin.

4.2 Použité chemikálie, soupravy, roztoky

- 0,25% trypsin-EDTA (Biosera, kat. č. V5265)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD, ULTRA Scintific, kat. č. 48599)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Benzo(a)pyren (BaP, Sigma-Aldrich, kat. č. B1760)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, kat. č. D4540)
- Fosfátový pufr PBS (Biosera LM-S2041)
- Kultivační médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546)
 - 2mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich, kat. č. RGL-001)
 - 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, kat. č. M7145)
 - 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
 - 10 % fetálního bovinního séra (FBS, Sigma-Aldrich, kat. č. F7524)
- Lyzační pufr (5x Reporter Lysis buffer, Promega, kat. č. E3971)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- Oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- Omeprazol (Supelco, kat. č. 12262)

- PCB-126 (Ehrenstorfer, kat. č. EHERC20012600)
- Substrát pro luciferázu:
 - 1,23 mg kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511)
 - 1,32 ml Tris-acetát-EDTA pufr (1 mol·l⁻¹, pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280)
 - 5 mg D-luciferin (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504)
 - 6,83 mg koenzym A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C4282)
 - 9,6 mg adenosin-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A6419)
 - 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921)
 - 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, kat. č. 43819)
 - Doplněno do 30 ml deionizovanou vodou
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)

4.3 Laboratorní pomůcky

- 96-jamková bílá deska na měření luminiscence (NUNC)
- 96-jamkové kultivační desky (TPP)
- Automatické pipety s rozsahem 0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- Buničina (Tork)
- Jednorázové sérologické pipety s objemy 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- Krycí skříčka 22x22 mm (Menzel Gläser)
- Mikrozkušavky s objemy 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml (BIOplastics)
- Multikanálové pipety s rozsahem 0,5–10 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 30–300 µl (Eppendorf)
- Petriho misky o objemu 60 ml (TPP)
- Pipetor (FastPette, Labnet)
- Plastová nádoba s objemem 125 ml (TPP)
- Plastové kultivační láhve 75 ml a 150 ml (TPP)
- Plastové stojany na mikrozkušavky a zkušavky
- Plastové špičky s rozsahem 0,1–10 µl, 2–200 µl, 20–300 µl, 100–1000 µl (Eppendorf)
- Plastové zkušavky s objemy 15 ml a 50 ml (TPP)

4.4 Pístroje

- CO₂ inkubátor (NB-203, N-Biotek)
- Hlubokomrazící box (Schoeller)
- Laboratorní třepačka (Rocker Shaker MR-12, Biosan)
- Laminární box Labculture (Labculture Class II Type A2, Esco)
- Multifunkční modulární reader (Infinite M200, Tecan)
- Odsávačka (Flask-Trap 1, Biosan)
- Světelný mikroskop (NIB100, Novel Optics)
- Vodní lázeň (LCB-11D, Labtech)
- Vortex (Reax top, Heidolph)

4.5 Použité metody

4.5.1 Kultivace a pasážování buněk

Buňky linie Aherepa a AZ-AhR byly kultivovány v plastových lahvích o ploše 75 nebo 150 cm². Buňky byly uloženy v inkubátoru při 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO₂.

Pasážování buněk, prováděné jednou za 3–4 dny, probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu. Pasážování slouží k získání buněčné suspenze k experimentu a zároveň k zamezení nadbytečného nárůstu buněk na dno kultivační láhve, které by mohlo způsobit následnou smrt buněk z nedostatku živného média.

1. DMEM médium a fosfátový pufr PBS byly ve vodní lázni nahřáty na 37 °C a 0,25% trypsin byl rozmrazen při pokojové teplotě.
2. Kultivační láhev s buněčnou linií byla přenesena z inkubátoru a pod světelným mikroskopem byla sledována konfluence buněk. Následně byla láhev přenesena do sterilního laminárního boxu.
3. Nahřáté kultivační médium, PBS a trypsin byly zdesinfikovány a přeneseny do laminárního boxu.
4. Původní kultivační médium bylo odsáto a láhev byla promyta 5–7 ml 1x PBS, který byl následně opět odsát.
5. Na buňky byl aplikován 1 ml trypsinu a láhev byla přenesena na 5 minut do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Působením trypsinu došlo k odlepení buněk z povrchu kultivační láhve.

6. Kultivační láhev byla přenesena zpět do laminárního boxu a k buňkám bylo přidáno 9 ml média, ve kterém byly resuspendovány opakujícím se nasáváním a vypouštěním sérologickou pipetou.
7. Obsah láhve byl přenesen do 50ml centrifugační zkumavky. 10 μ l suspenze bylo přeneseno do 0,5 ml mikrozukavky k počítání buněk.
8. 2 ml suspenze byly pipetou odebrány a přeneseny zpět na láhev. K buňkám bylo přidáno 20 ml nového média a láhev byla umístěna do inkubátoru.

Při pasážování buněk na větších kultivačních lahvích (150 cm²) byly použity dvojnásobné objemy reagensů.

4.5.2 Počítání buněk a vyšetí na desky

Počet buněk v suspenzi byl určen spočítáním buněk v Bürkerově komůrce v 10 zorných polích. Na zviditelnění buněk v suspenzi byla použita 0,04% trypanová modř, která se dostane pouze do mrtvých buněk nebo buněk s narušenou membránou. Zdravé živé buňky nejsou zabarveny a ve světelné mikroskopu se jeví jako bezbarvé.

1. Buněčná suspenze byla přenesena do plastové zkumavky, z níž bylo 10 μ l odebráno a přepipetováno do 0,5 ml mikrozukavky.
2. K buněčné suspenzi bylo přidáno 90 μ l 0,04% trypanové modři.
3. Bürkerova komůrka byla překryta krycím sklíčkem a následně byla aplikována suspenze do Bürkerovy komůrky pipetou tak, že se suspenze dostala do prostoru pod krycí sklíčko kapilárními silami.
4. Buňky spočítány pod mikroskopem v deseti různých zorných polích. Z průměru získaných hodnot byla spočítána hustota buněk v suspenzi.
5. Z počtu buněk v jednotlivých polích Bürkerovy komůrky byl spočítán aritmetický průměr a koncentrace buněk v 1 ml suspenze.
6. U MTT testu bylo do 96jamkové desky aplikováno 190 μ l suspenze s hustotou buněk 25 000 buněk/1 jamku a stejně tak i u luciferázové eseje.
7. Desky s vyšetými buňkami byly inkubovány 24 hodin při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Po inkubaci bylo médium odsáto a byly aplikovány testovací látky.

4.5.3 Příprava a aplikace testovaných látek na buňky

Byla vytvořena zásobní koncentrační řada roztoků TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazolu, rozpuštěním těchto látek v DMSO na požadované koncentrace. U MTT testu byly látky i kontroly ředěny v kultivačním médiu. Jako negativní kontrola bylo aplikováno 0,1% DMSO rozpuštěné v DMEM médiu a jako pozitivní kontrola 2% Triton X-100 v DMEM médiu. Před aplikací látek na desku s vyšetými buňkami byly roztoky zásobní koncentrační řady naředěny 1 000x v DMEM médiu (viz tab. 3).

U luciferázové reportérové eseje (RGA), kde byla testována aktivace AhR se látky koncentrační řady (viz tab. 3) ředily 1 000x v depletovaném médiu jednotlivých buněčných linií. Depletovaná média DMEM byla průběžně odebírána z kultivačních lahví s buňkami linií AZ-AhR a Aherepa. Jako negativní kontrola byl použit roztok 0,1% DMSO v depletovaném DMEM médiu AZ-AhR nebo Aherepa. Látky i pozitivní kontrola byly aplikovány na 96-jamkové desky a byly vloženy na 4 nebo 24 hodin do inkubátoru.

Tabulka 3: Ředění testovaných látek k MTT a GRA

Zásobní roztoky TCDD	Koncentrace zředěných roztoků TCDD	Zásobní roztoky BaP, PCB-126	Koncentrace zředěných roztoků BaP, PCB-126	Zásobní roztoky omeprazolu	Koncentrace zředěných roztoků omeprazolu
0,1 nM	0,1 pM	10 nM	10 pM	10 nM	10 pM
1 nM	1 pM	100 nM	100 pM	1 nM	1 pM
10 nM	10 pM	500 nM	500 pM	1 µM	1 nM
100 nM	100 pM	1 µM	1 nM	10 µM	10 nM
1 µM	1 nM	10 µM	10 nM	100 µM	100 nM
2,5 µM	2,5 nM	100 µM	100 nM	1 mM	1 µM
5 µM	5 nM	1 mM	1 µM	5 mM	5 µM
10 µM	10 nM	10 mM	10 µM	10 mM	10 µM
25 µM	25 nM			50 mM	50 µM
50 µM	50 nM			100 mM	100 µM
				200 mM	200 µM

4.5.4 MTT test

MTT test je kolorimetrický test, stanovující viabilitu buněk s funkčními mitochondriemi. Test je založený na barevné změně žlutého MTT na fialový formazan. Tetrazolium-bromid (MTT) je redukován na fialové krystaly formazanu při katalýze mitochondriální sukcinát dehydrogenázou u živých buněk. Mrtvé buňky krystaly nevytváří. Krystaly MTT-formazanu jsou následně rozpuštěny v DMSO a spektrofotometricky se měří absorbance v jednotlivých jamkách. Množství absorbance je přímo úměrné množství životaschopných buněk.

1. Po provedené pasáži, spočítání buněk a vysetí buněk na 96jamkovou desku se buňky nechaly inkubovat do druhého dne při 37 °C, 5% CO₂.
2. Testované látky, pozitivní (DMSO) a negativní (Triton X-100) kontroly naředěny DMEM médiem.
3. Z desky bylo pomocí odsávačky odstraněno médium a byly aplikovány připravené roztoky testovacích látek. Každá koncentrace dané látky byla pipetována po 190 µl do 5 jamek desky.
4. Po aplikaci testovaných látek byly desky inkubovány 24 hodin ve 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO₂.
5. Po inkubaci bylo médium v jamkách vyklepnuto a jamky byly promyty 100 µl 1x PBS. PBS bylo také odstraněno, deska byla osušena buničinou a bylo napipetováno 100 µl 10x ředěného MTT ze zásobního roztoku 5 mg·ml⁻¹.
6. Deska byla inkubována ve 37 °C, při 5 % CO₂ do vzniku modrých krystalů. Po vzniku modrého zbarvení byla deska vyklepnuta a do jamek bylo přidáno 50 µl DMSO, ve kterém byly krystaly rozpuštěny.
7. Desky byly zlehka protřepány a po rozpuštění krystalů byla změřena jejich absorbance pomocí spektrofotometru Infinite M200 při vlnové délce 570 nm.
8. Ze změřených hodnot byla vypočítána viabilita buněk vztažená k DMSO jako k negativní kontrole, která tedy představovala 100 % životaschopnost buněk. Z výsledků byly sestaveny grafy znázorňující viabilitu buněk v závislosti na koncentraci testovaných látek.

4.5.5 Reporter gene assay

Luciferázová reportérová esej je metoda využívající se ke zjištění, zda je určitý ligand schopen aktivovat receptor nebo transkripční faktor, který se váže do cílového promotoru

a spouští expresi cílových genů. Princip metody je založený na enzymatické přeměně luciferázy a substrátu D-Luciferinu. Gen pro luciferázu je obsažen v plazmidu, který byl transfekací přenesen na buněčnou linii. Následně po přidání substrátu dochází k enzymatické reakci, oxidaci D-Luciferinu a emisi světla, které lze měřit. Z naměřených hodnot luminiscence lze stanovit míru aktivace testovaného receptoru.

Testy byly prováděny na stabilně transfekovaných myších (Aherepa) a lidských (AZ-AhR) buněčných liniích s již komplexním plazmidem pGL-4.27-DRE, který nese gen pro rezistenci na hygromycin a kopie DRE (dioxin-responsive element), díky kterým se váže na AhR a spouští transkripci luciferázy (Novotna et al., 2011).

Prováděné RGA byly vyhodnocovány po 4 a 24hodinové inkubaci látek s buňkami ve čtyřech validních opakováních.

1. Po provedení pasáže a spočítání buněk byly buňky vysety na 96jamkové desky a byly inkubovány do druhého dne při 37 °C, 5 % CO₂.
2. Po inkubaci byly aplikovány připravené testované látky, kde byla každá koncentrace dané látky pipetována po 190 μl do 5 jamek desky. Desky byly inkubovány další 4 nebo 24 hodin, ve 37 °C, při 5 % CO₂.
3. Následně byly desky vyklepnuty a osušeny buničinou a bylo přidáno 30 μl lyzačního pufru. Desky byly vloženy do hlubokomrazícího boxu na – 80 °C minimálně po dobu 20 minut.
4. Poté byly zmražené desky vyjmuty z hlubokomrazícího boxu a byly uloženy na třepačku k rozmrazení.
5. Na bílou 96-jamkovou desku pro měření luminiscence bylo napipetováno po 6 μl lyzátu z každé jamky. Do jamek bylo k 6 μl lyzátu přidáno po 30 μl substrátu s D-Luciferinem.
6. Pomocí spektrofotometru Infinite 200 byla u jednotlivých desek změřena luminiscence. V programu i-control byl nastaven program pro RGA na měření luminiscence.

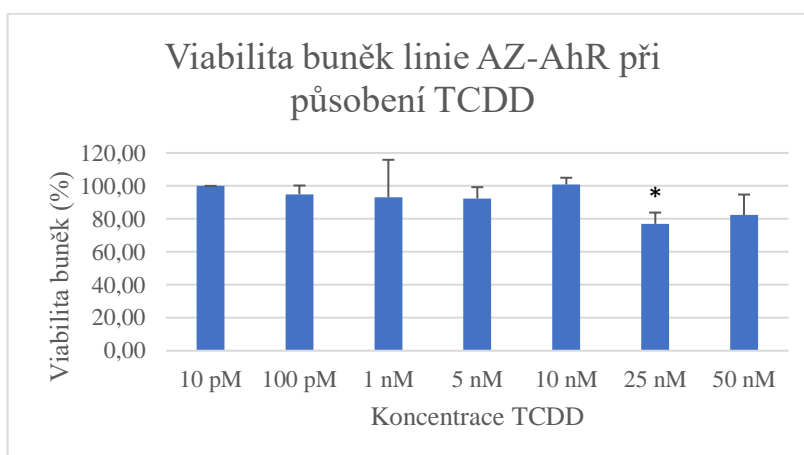
Ze všech opakování byla vypočítána průměrná FOLD indukce, která byla v závislosti na koncentraci látky vložena do grafů látek. U všech testovaných látek na obou liniích byly pomocí programu GraphPad Prism 10.0 spočítány hodnoty EC₅₀.

5 VÝSLEDKY

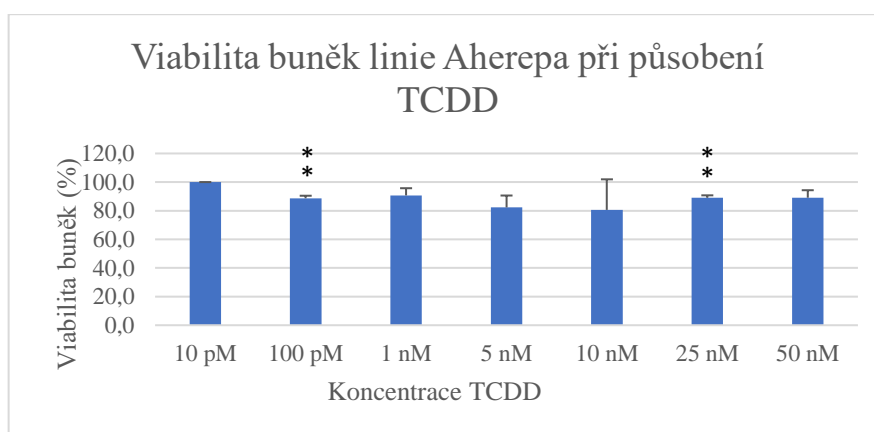
5.1 Stanovení cytotoxicity testovaných látek pomocí metody MTT

Buněčné linie AZ-AhR i Aherepa byly vystaveny působení TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazolu. Cílem bylo testovat tyto látky na transkripční aktivitu AhR, což by ale nebylo možné, pokud by byly látky pro buňky toxické. Prvním úkolem v praktické části tedy bylo určení vhodné koncentrační řady roztoků pomocí metody MTT. Z naměřených hodnot byla stanovena viabilita buněk a byla vyjádřena jako procentuální hodnota závislá na nejnižší koncentraci testované látky. Všechny výsledné grafy pro metodu MTT jsou vyjádřeny jako průměr ze třech opakování.

Viabilita buněk po 24hodinové kultivaci s TCDD byla u obou linií vztažena k nejnižší testované koncentraci TCDD 10 pM. Níže v grafu 1 jsou znázorněny výsledky MTT testů linie AZ-AhR. Nejnižší viabilita buněk byla měřena u koncentrací 25 a 50 nM, kdy se hodnoty pohybovaly okolo 80 %. U ostatních hodnot koncentrační řady se viabilita buněk pohybovala okolo 100 %. Graf 2 vyjadřuje výsledky MTT testů linie Aherepa. Nejvyšší hodnota viability 100% byla naměřena u TCDD s koncentrací 10 pM. Viabilita buněk po aplikaci ostatních roztoků koncentrační řady se pohybovaly okolo 90 %.

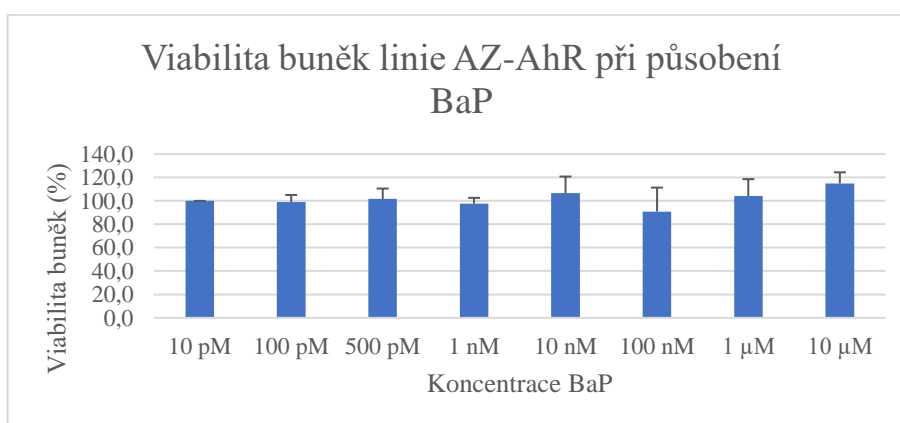


Graf 1: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení TCDD v rozmezí koncentrací 10 pM – 50 nM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standardní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.



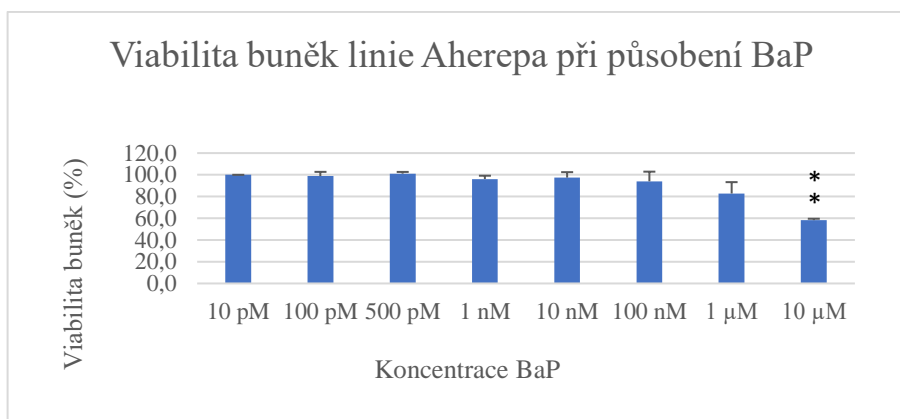
Graf 2: Viabilita buněk line Aherepa po 24hodinovém působení TCDD v rozmezí koncentrací 10 pM – 50 nM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

Při kultivaci obou linií s benzo(a)pyrenem se výsledky opět vztahovaly k nejnižší koncentraci BaP, která byla 10 pM. V grafu 3 jsou zaznamenány výsledky MTT testů pro linii AZ-AhR. U aplikace většiny roztoků koncentrační řady se viabilita buněk pohybovala okolo 100 %. Nejnižší hodnota viability $91 \% \pm 20,5 \%$ byla naměřena při aplikaci 100nM roztoku BaP. V následujícím grafu 4 jsou shrnuty výsledky MTT testu při působení BaP u line Aherepa. Viabilita buněk s rostoucí koncentrací BaP klesala a nejnižší naměřená hodnota v aplikaci $10\mu\text{M}$ BaP byla $58 \% \pm 1,3 \%$. U roztoku BaP s koncentrací $10 \mu\text{M}$ byly u myší line zaznamenány vyšší cytotoxické účinky než u lidské, kde viabilita buněk nebyla významně ovlivněna.



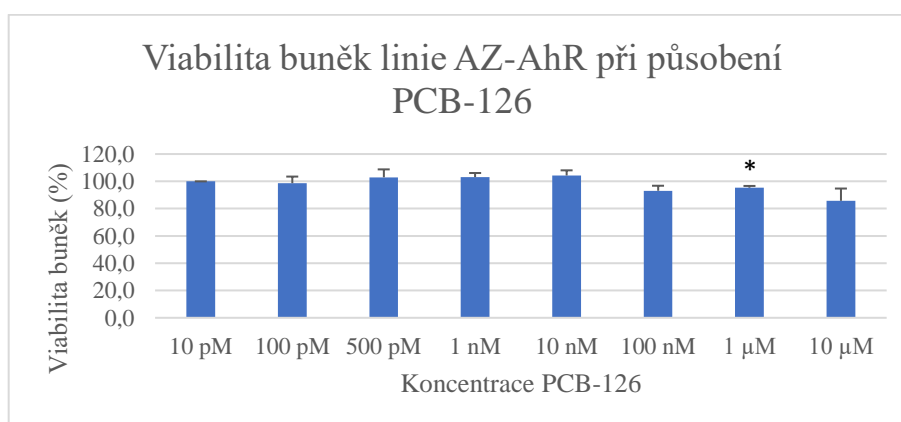
Graf 3: Viabilita buněk line AZ-AhR po 24hodinovém působení BaP v rozmezí koncentrací 10 pM – $10 \mu\text{M}$. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk

byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních.



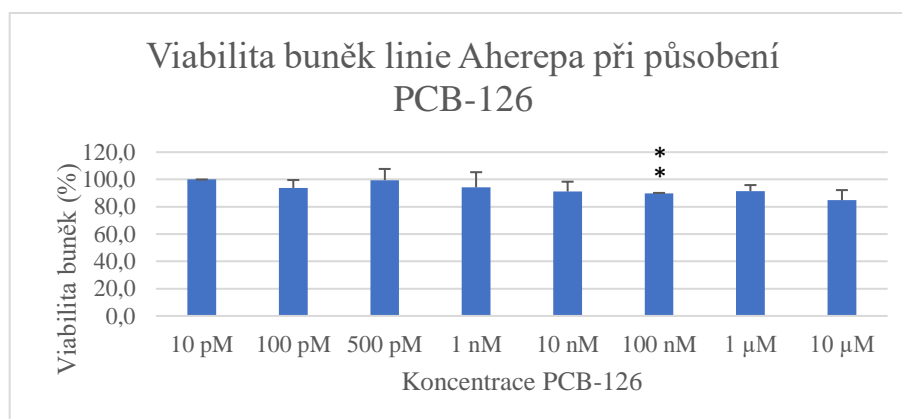
Graf 4: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení BaP v rozmezí koncentrací 10 pM – 10 μM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standardní chybu, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

Při testování viability buněk po aplikaci PCB-126 byly výsledky MTT testů u obou linií vztaženy k nejnižší aplikované koncentraci 10 pM. V grafu 5 jsou výsledky MTT testu při působení koncentrační řady PCB-126 na linii AZ-AhR. Viabilita buněk se až na poslední aplikovanou koncentraci pohybovala okolo 100 %. V poslední koncentraci byla životaschopnost buněk po aplikaci 10 μM PCB-126 rovna 86 % \pm 9 %. MTT testy myší linie Aherepa jsou znázorněny v grafu 6. Viabilita buněk se po aplikaci všech látek kromě poslední pohybovala mezi 90–100 %. Životaschopnost buněk se v závislosti na nejvyšší koncentraci PCB-126 10 μM rovnala 85 % \pm 7,4 %.



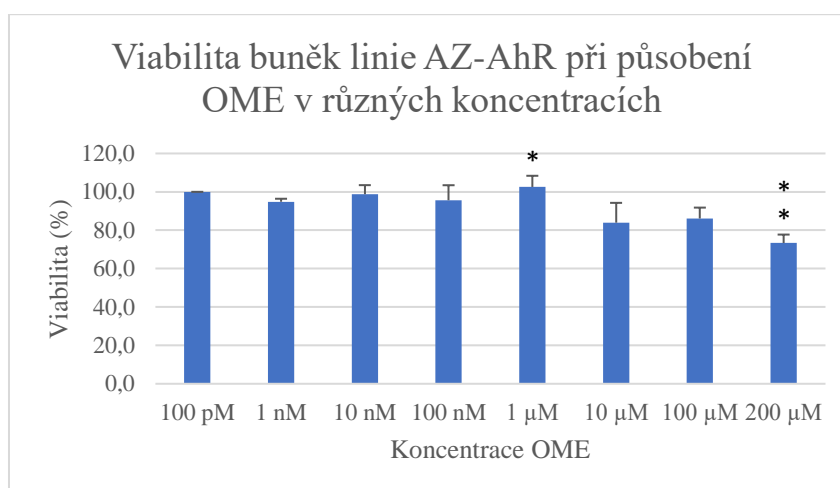
Graf 5: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení PCB-126 v rozmezí koncentrací 10 pM – 10 μM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton.

Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

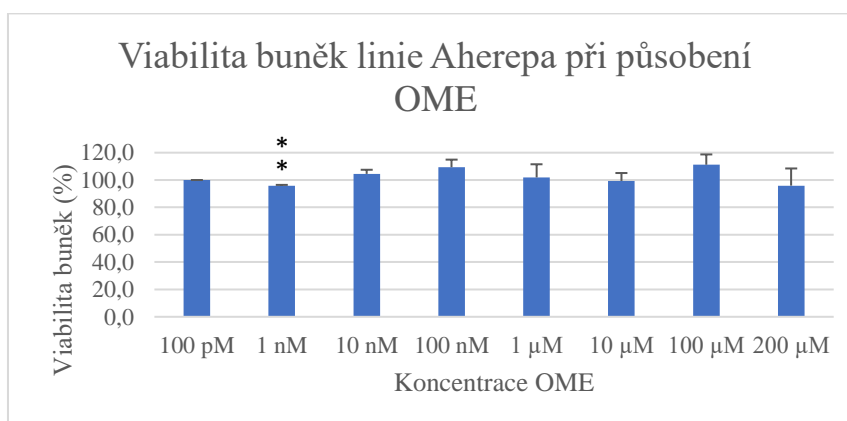


Graf 6: Viabilita buněk line Aherepa po 24hodinovém působení PCB-126 v rozmezí koncentrací 10 pM – 10 μM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 10 pM, která představovala 100 %. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdičky (**) označují $p < 0,01$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

U testování cytotoxických účinků omeprazolu byly výsledky MTT testů u obou linií vztaženy k nejnižší aplikované koncentraci 0,1 nM. V grafu 7 jsou výsledky MTT testů s aplikací omeprazolu na lidskou buněčnou linii. U testování čtyř nejnižších koncentrací roztoku omeprazolu, se viabilita buněk pohybovala okolo 100 %. Životaschopnost buněk při testování třech nejvíce koncentrovaných roztoků klesla a pohybovala se okolo 85 %. Nejnižší míra viability byla v závislosti na roztoku 200 μM omeprazolu, kdy klesla na 73 % ± 4,4 %. Graf 8 znázorňuje výsledky MTT testů při aplikaci omeprazolu na myší buněčnou linii. Viabilita všech buněk při aplikaci různých koncentrací omeprazolu se pohybovala okolo 100 %, u některých koncentrací (100 nM, 100 μM) byla viabilita buněk i o 10 % vyšší než hodnota srovnávací. Nejnižší viabilitu měly buňky po aplikaci 200 μM roztoku omeprazolu a dosahovaly hodnoty 96 % ± 12,5 %.



Graf 7: Viabilita buněk linie AZ-AhR po 24hodinovém působení omeprazolu v rozmezí koncentrací 100 pM – 200 μM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 100 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.



Graf 8: Viabilita buněk linie Aherepa po 24hodinovém působení omeprazolu v rozmezí koncentrací 100 pM – 200 μM. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton. Viabilita buněk byla vztažena k nejnižší koncentraci 100 pM, která představovala 100 %. Graf je průměrem ze tří na sobě nezávislých měřeních. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

5.2 Vliv vybraných xenobiotik na transkripční aktivitu myšního a lidského AhR

Pomocí luciferázové reportérové eseje byla měřena míra indukce transkripční aktivity AhR v buněčných liniích AZ-AhR a Aherepa po aplikaci TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazolu. Po provedených testech GRA byly naměřené hodnoty chemiluminiscenčního signálu

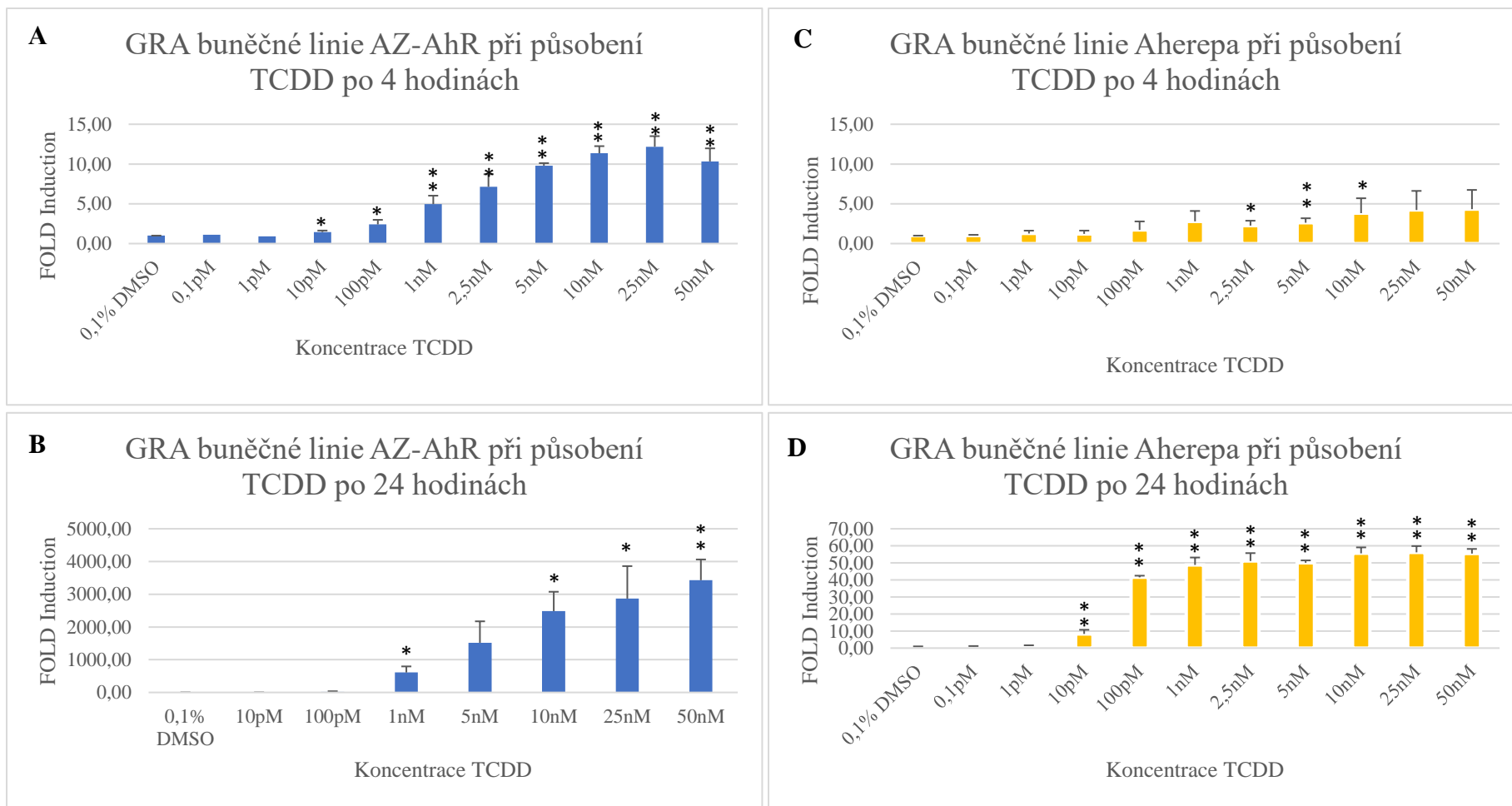
luciferázové aktivity přepočítány na násobky indukce vztažené k negativní kontrole DMSO (fold induction). GRA byly u obou linií prováděny po 4 a 24hodinové inkubaci látek s buňkami. K výsledkům byly také spočítány hodnoty EC_{50} , které znázorňují koncentraci testované látky, kdy je dosaženo 50 % maximálního účinku. Hodnoty EC_{50} byly s pomocí vedoucí určeny v programu GrafPad Prism 9.

Při testování TCDD na lidskou linii byla po 4 hodinách maximální odpověď při aplikaci 25 nM roztoku TCDD a dosahovala hodnoty násobku indukce $12,18 \pm 1,32$ (graf 9A). Po 24hodinovém působení TCDD byla maximální odpověď $3429,08 \pm 632,68$ při koncentraci 50 nM (graf 9B). U testování myší linie byla luciferázová aktivita po 4 hodinách nejvyšší při koncentraci 50 nM a dosahovala hodnoty násobku indukce $4,33 \pm 2,42$ (graf 9C). Po 24hodinové inkubaci byla maximální odpověď při koncentraci 25 nM a rovnala se $56,17 \pm 3,68$ (graf 9D).

Hodnoty EC_{50} určeny pro jednotlivé grafy testů s TCDD jsou uvedeny v tabulce 4. U linie AZ-AhR byla hodnota EC_{50} po 4hodinovém působení TCDD $1,9 \pm 1,0$ nM a po 24hodinovém působení $4,9 \pm 2,4$ nM. U myší linie Aherepa se EC_{50} značně lišila a po 4 hodinách působení TCDD se rovnala $0,2 \pm 0,1$ nM, po 24 hodinách pak $0,06 \pm 0,01$ nM.

Tabulka 4: EC_{50} k jednotlivým testům GRA při působení TCDD

	EC_{50}	
	4 hodiny	24 hodin
AZ-AhR	$1,9 \pm 1,0$ nM	$4,9 \pm 2,4$ nM
Aherepa	$0,2 \pm 0,1$ nM	$0,06 \pm 0,01$ nM



Graf 9: Vliv působení TCDD na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách

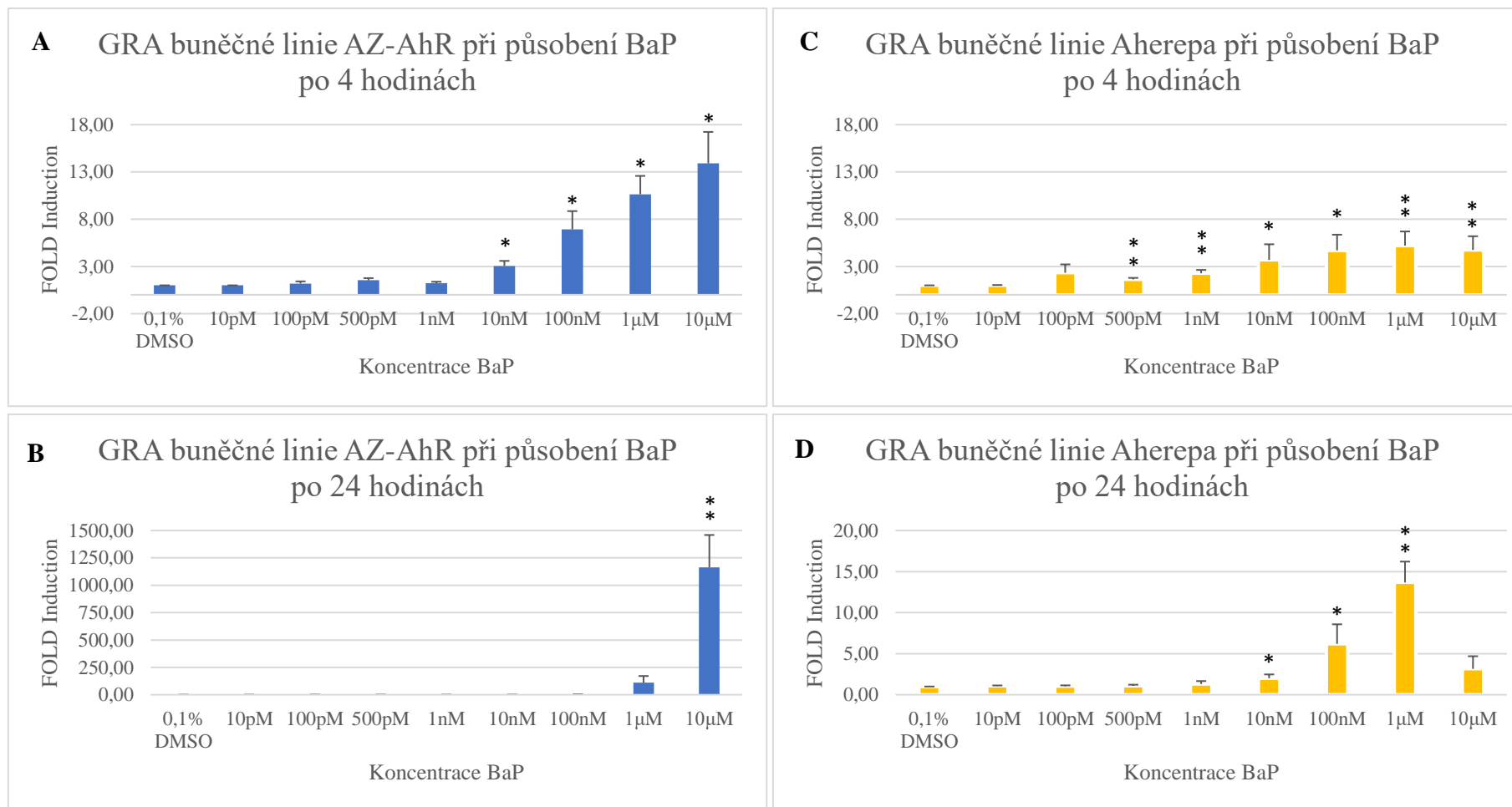
Buněčné linie byly inkubovány s TCDD v koncentrační řadě v rozmezí 0,1 pM – 50 nM. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Naměřené hodnoty aktivace receptoru byly vztaženy k negativní kontrole, která tedy představovala 100 %. Výsledné hodnoty jsou u 4hodinového testu linie AZ-AhR průměrem ze čtyř na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu z pěti na sobě nezávislých experimentů. U linie Aherepa jsou hodnoty v grafu 4hodinového testu průměrem ze tří na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze čtyř na sobě nezávislých experimentech. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standardní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

Při testování BaP, byla luciferázová aktivita u linie AZ-AhR po 4 hodinách nejvyšší u roztoku 10 μ M BaP a dosahovala hodnoty násobku indukce $13,91 \pm 3,33$ (graf 10A). V grafu 10A i 10B je vidět, že luciferázová aktivita rostla s rostoucí koncentrací BaP. Po 24hodinovém působení BaP byla viditelná změna indukce luciferázové aktivity až při koncentraci roztoku 1 μ M. Nejvyšší luciferázová aktivita u linie AZ-AhR po 24hodinovém působení BaP byla měřena u nejvyšší koncentrace 10 μ M a dosahovala zde hodnoty $1163,71 \pm 295,5$. Po 4 hodinách byla nejvyšší naměřená hodnota indukce při koncentraci BaP 1 μ M a dosahovala hodnoty $5,2 \pm 1,5$ (graf 10C). Po 24 hodinách byla nejvyšší měřená luciferázová aktivita opět u roztoku s 1 μ M BaP, kdy dosahovala $13,67 \pm 1,54$ (graf 10D).

Jednotlivé EC_{50} pro grafy testů s BaP jsou uvedeny v tabulce 5. Hodnota EC_{50} u lidské linie AZ-AhR bylo po 4hodinovém působení BaP měla hodnotu 135 ± 47 nM, po 24hodinové inkubaci s BaP pak 1500 ± 10 nM. Hodnota EC_{50} u AZ-AhR po 24hodinovém působení BaP je však pouze orientační, jelikož nebylo dosaženo plateau (plateau = oblast křivky, kde obecně již nedochází ke zvýšení odpovědi) a pro stanovení přesnější hodnoty EC_{50} by bylo potřeba aplikovat vyšší koncentraci testované látky, např. 100 μ M. U myší linie byla po 4 hodinách EC_{50} rovna $7,9 \pm 7,1$ nM. Po 24hodinovém působení BaP na myší linii byla látka v nejvyšší koncentraci pro buňky již toxická, a proto pozorujeme pokles.

Tabulka 5: EC_{50} k jednotlivým testům GRA při působení BaP

	EC_{50}	
	4 hodiny	24 hodin
AZ-AhR	135 ± 47 nM	1500 ± 10 nM
Aherepa	$7,9 \pm 7,1$ nM	103 ± 57 nM



Graf 10: Vliv působení BaP na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách

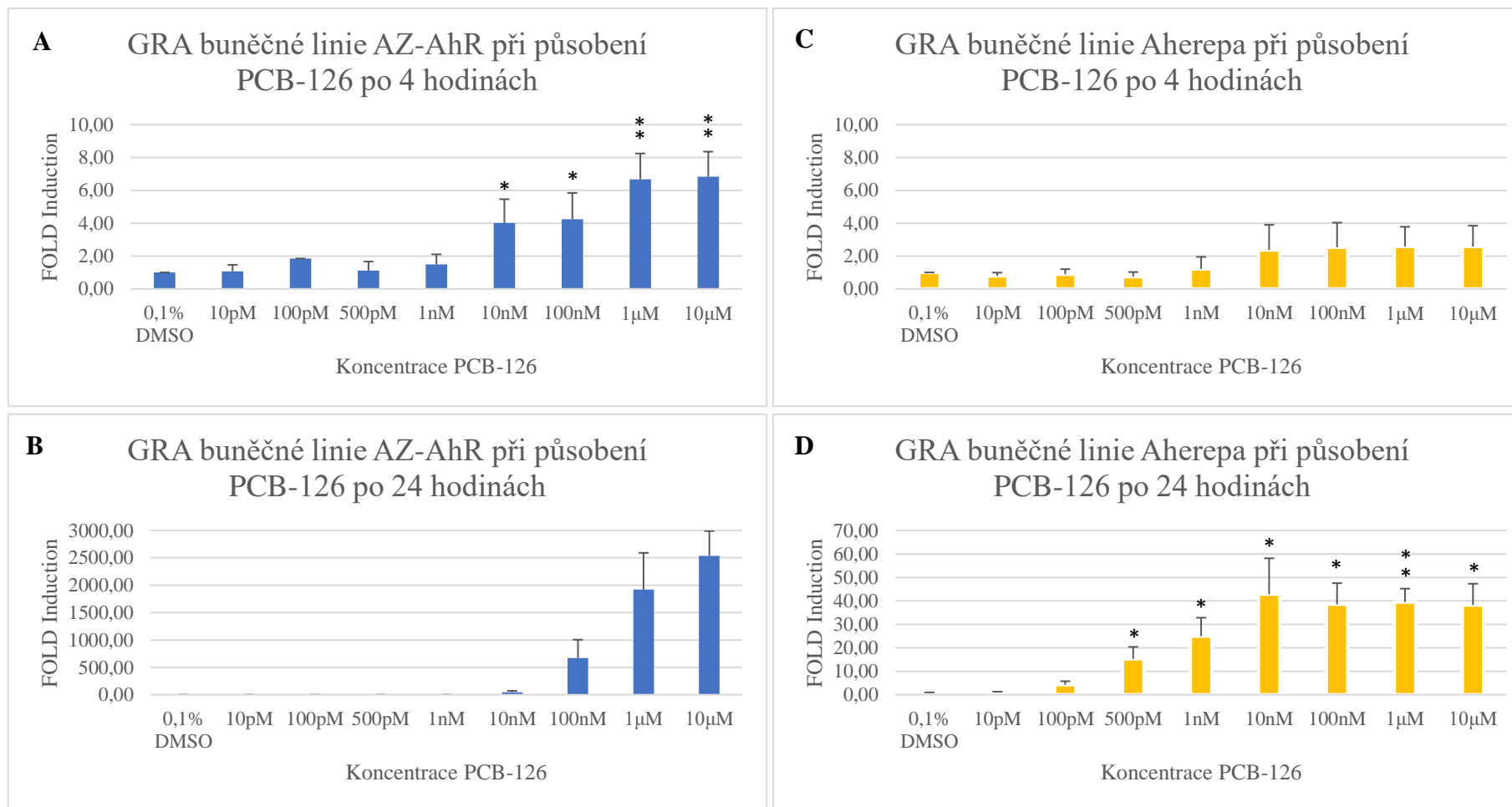
Buněčné linie byly inkubovány s BaP v koncentrační řadě v rozmezí 10 pM – 10 μM. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Naměřené hodnoty aktivace receptoru byly vztaheny k negativní kontrole, která tedy představovala 100 %. Výsledné hodnoty jsou u 4hodinového testu linie AZ-AhR průměrem ze tří na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze čtyřech na sobě nezávislých experimentů. U linie Ahrepa jsou hodnoty v grafu 4hodinového testu průměrem z pěti na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze čtyř na sobě nezávislých experimentech. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

Graf 11 ukazuje výsledky reportérových esejí po aplikaci PCB-126. U lidské linie byla hodnota násobku indukce po 4 hodinách nejvyšší při koncentraci 10 μ M PCB-126 a byla rovna 6,83 \pm 1,53 (graf 11A). Při koncentraci 10 μ M PCB-126 po 24 hodinách dosahovala maximální indukce 2538,96 \pm 451,95 (graf 11B). U myší linie byla po 4 hodinách působení PCB-126 byla nejvyšší naměřená indukce v poslední testované koncentraci 10 μ M a rovnala se 2,58 \pm 1,27 (graf 11C). Po 24hodinovém působení PCB-126 byla maximální naměřená luciferázová aktivita při koncentraci 10 nM, kde dosahovala hodnoty 42,85 \pm 15,31 (graf 11D).

Určené hodnoty EC₅₀ jsou uvedené níže v tabulce 6. U lidské linie AZ-AhR byla hodnota EC₅₀ po 4hodinovém působení PCB-126 rovna 16 \pm 5,2 nM. Po 24hodinovém působení PCB-126 byla hodnota EC₅₀ opět pouze orientační, jelikož nebylo dosaženo plateau a vyšla 230 \pm 170 nM. U linie Aherepa hodnota EC₅₀ nabývala 3,0 \pm 1,4 nM po 4hodinovém působení látky a po 24hodinovém pak 0,67 \pm 0,2 nM.

Tabulka 6: EC₅₀ k jednotlivým testům GRA při působení PCB-126

	EC ₅₀	
	4 hodiny	24 hodin
AZ-AhR	16 \pm 5,2 nM	230 \pm 170 nM
Aherepa	3,0 \pm 1,4 nM	0,67 \pm 0,2 nM



Graf 11: Vliv působení PCB-126 na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách

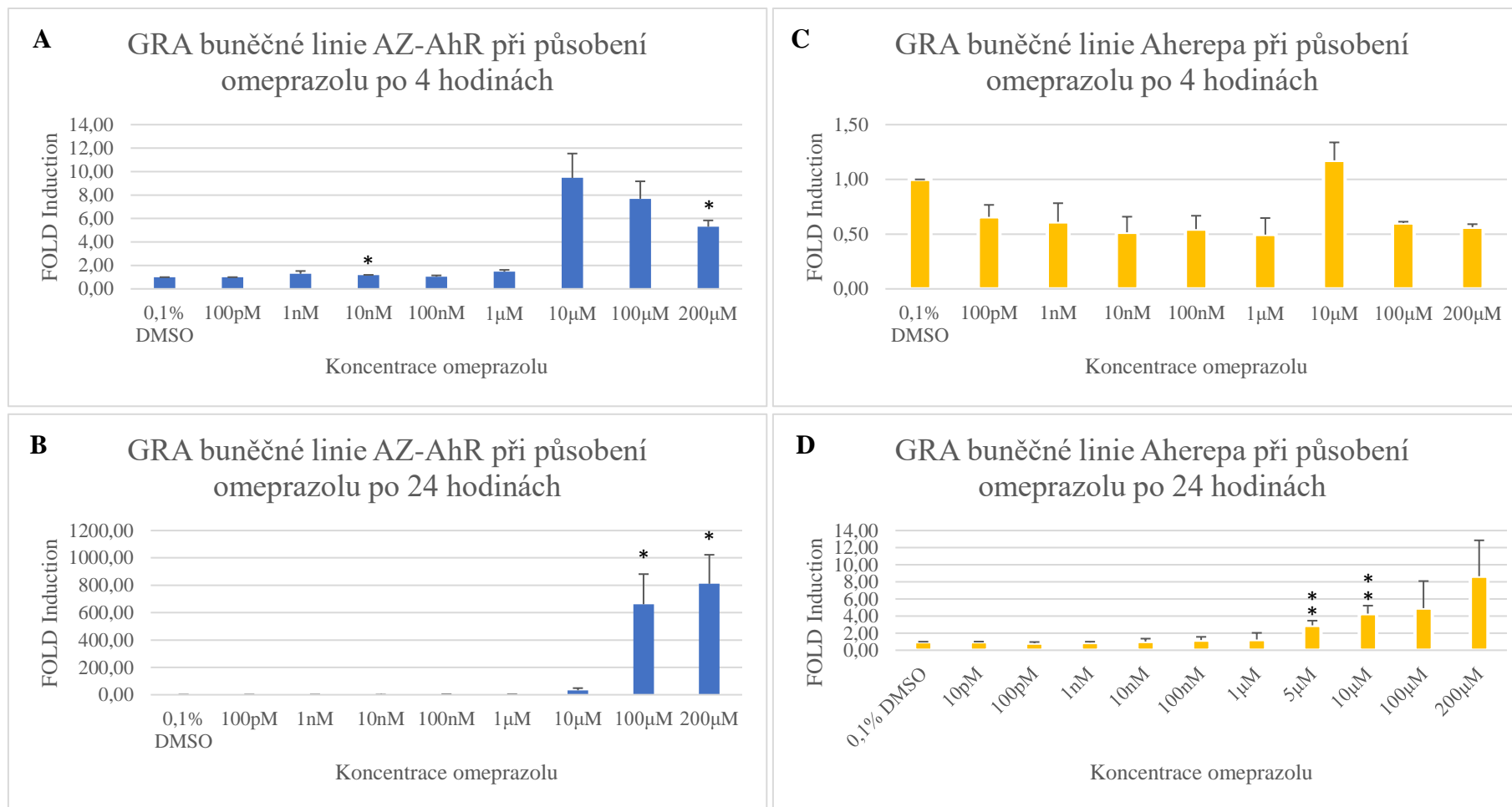
Buněčné linie byly inkubovány s PCB-126 v koncentrační řadě v rozmezí 10 pM – 10 μM. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Naměřené hodnoty aktivace receptoru byly vztaženy k negativní kontrole, která tedy představovala 100 %. Výsledné hodnoty jsou u 4hodinového testu linie AZ-AhR průměrem ze čtyř na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze dvou na sobě nezávislých experimentů. U linie Ahrepa jsou hodnoty v grafu 4hodinového testu průměrem ze čtyř na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze tří na sobě nezávislých experimentech. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standardní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

V grafu 12 jsou zobrazeny výsledky GRA u myší a lidské linie při působení omeprazolu. Jak je vidět u linie AZ-AhR byla po 4hodinovém působení omeprazolu nejvyšší indukce u roztoku s koncentrací 10 μM , kde byla rovna $9,46 \pm 2,07$ (graf 12A). Po 24 hodinách inkubace lidské linie s omeprazolem byla maximální luciferázová aktivita při nejvyšší použité koncentraci 200 μM , kde dosahovala hodnoty $810,79 \pm 211,79$ (graf 12B). U myší linie byla po 4hodinovém působení omeprazolu aktivita luciferázy srovnatelná s negativní kontrolou (graf 12C). Po 24 hodinách pak byla indukce nejvyšší při 200 μM , kde dosáhla $8,66 \pm 4,19$ (graf 12D).

EC_{50} určené k jednotlivým experimentům s omeprazolem jsou uvedeny níže v tabulce 7. Hodnota EC_{50} u linie AZ-AhR po 4hodinové inkubaci s omeprazolem byla $2,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Po 24hodinovém působení pak orientačně $36 \pm 19 \mu\text{M}$. U myší linie Aherepa po 4 hodinách působení omeprazolu nebylo možné stanovit, jelikož nebyl zaznamenán na koncentraci závislý nárůst aktivity luciferázy. Po 24 hodinách se hodnota EC_{50} se pohybuje orientačně kolem $43 \pm 45 \mu\text{M}$.

Tabulka 7: EC_{50} k jednotlivým testům GRA při působení omeprazolu

	EC_{50}	
	4 hodiny	24 hodin
AZ-AhR	$2,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$	$36 \pm 19 \mu\text{M}$
Aherepa	OME neaktivoval AhR	$43 \pm 45 \mu\text{M}$



Graf 12: Vliv působení omeprazolu na transkripční aktivitu AhR u lidské a myší linie po 4 a 24 hodinách

Buněčné linie byly inkubovány s omeprazolem v koncentrační řadě v rozmezí 100 pM – 200 μM. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO. Naměřené hodnoty aktivace receptoru byly vztaženy k negativní kontrole, která tedy představovala 100 %. Výsledné hodnoty jsou u 4hodinového testu linie AZ-AhR průměrem ze dvou na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze tří na sobě nezávislých experimentů. U linie Aherepa jsou hodnoty v grafu 4hodinového testu průměrem ze dvou na sobě nezávislých experimentů a u 24hodinového testu ze čtyř na sobě nezávislých experimentech. Statistické vyhodnocení bylo pomocí Studentova t-testu. Chybové úsečky představují standartní chybu, hvězdička (*) označuje $p < 0,01$, hvězdičky (**) označují $p < 0,001$, kde p znázorňuje nejmenší hladinu významnosti.

Níže v tabulce 8 jsou pro lepší orientaci uvedeny všechny získané hodnoty EC₅₀ z jednotlivých experimentů.

Tabulka 8: Souhrnná tabulka pro EC₅₀ všech testovaných látek po 4 a 24hodinových inkubacích

Testovaná látka	Doba inkubace	EC ₅₀	
		AZ-AhR	Aherepa
TCDD	4 hodiny	1,9 ± 1,0 nM	0,2 ± 0,1 nM
BaP		135 ± 47 nM	7,9 ± 7,1 nM
PCB-126		16 ± 5,2 nM	3,0 ± 1,4 nM
Omeprazol		2,5 ± 1,0 μM	OME neaktivoval AhR
TCDD	24 hodin	4,9 ± 2,4 nM	0,06 ± 0,01 nM
BaP		1500 ± 10 nM	103 ± 57 nM
PCB-126		230 ± 170 nM	0,67 ± 0,2 nM
Omeprazol		36 ± 19 μM	43 ± 45 μM

Poznámka: hodnoty EC₅₀ jsou průměrné hodnoty z jednotlivých na sobě nezávislých experimentů ± směrodatné odchylky.

6 DISKUZE

Role AhR je složitá a mění se v závislosti na typu tkáně, vývojovém stádiu a environmentálním kontextu. Jeho aktivace různými ligandy může mít různé fyziologické i patofyziologické důsledky, a proto je důležité porozumět funkcím AhR pro objasnění přínosu tohoto receptoru k zdraví a nemoci.

V této bakalářské práci byl sledován vliv různých xenobiotik (TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazol) na transkripční aktivitu AhR v lidské a myší hepatomové linii modifikované tak, aby exprimovaly luciferázu pod kontrolou XRE, což umožňuje studovat, jak tyto buňky reagují na xenobiotické sloučeniny měřením aktivity luciferázy jako indikátoru genové exprese. Pomocí MTT testu byla nejprve posouzena toxicita jednotlivých látek na tyto buněčné linie. Zvolené koncentrace testovaných látek nevykazovaly výrazný toxický účinek, naměřené hodnoty viability se pohybovaly kolem 90 %. Pokles viability byl zaznamenán u linie Aherepa po aplikaci 10 μ M BaP, kdy životaschopnost klesla na 58 % \pm 1,3 %. Ve studii *Gan et al., 2020* byl testován cytotoxický účinek BaP na myší buněčné linii Hepa 1-6 po 24hodinové inkubaci BaP. V této studii byl zaznamenán pokles viability o 20 % respektive 50% po aplikaci 10 μ M a 100 μ M BaP. Následně pomocí metody reporter gene assay byl sledován účinek těchto látek na transkripční aktivitu AhR a z výsledných dat byla stanovena hodnota EC₅₀ (potence) a účinnost.

TCDD jakožto nejtoxičtější a nejlépe prostudovaná sloučenina ze skupiny polychlorovaných aromatických dibenzodioxinů je ve většině studií využívána jako modelový ligand s nejvyšší afinitou vůči AhR a slouží také k porovnání relativní toxicity sloučenin s podobným účinkem. Při srovnání testů na obou liniích s TCDD je z výsledků vidět, že hodnoty maximální indukce jsou u linie AZ-AhR 60x vyšší po 24hodinovém působení 50 nM TCDD v porovnání s linií Aherepa (viz graf 9B a 9D). Ze stanovených hodnot EC₅₀ je zřejmé, že myší AhR je citlivější na přítomnost TCDD než lidský AhR (viz tabulka 4). Ve výzkumu *He et al., 2011* pracovali s metodou CALUX, kdy měřili luciferázovou aktivitu po 24hodinové inkubaci TCDD v koncentracích od 0,01 pM – 1 nM u myší buněčné linií H1L1.1c2. Uvádějí, že hodnota EC₅₀ odpovídá přibližně 70 pM a maximální indukce AhR byla při 0,1nM TCDD. V porovnání s výsledky v bakalářské práci, kdy EC₅₀ u myší linie po aplikaci TCDD je přibližně 60 pM a maximální indukce při 1nM, můžeme brát, že se tyto výsledky shodují. *Novotná et al., 2011* ve svém článku uvádí výsledky luciferázových esejí při testování TCDD v koncentracích 10 pM – 100 nM. Experimenty prováděny na pěti

klonech buněčné linie AZ-AhR. Po 24 hodinách působení TCDD u testovaných klonů byla výsledkem typická sigmoidní křivka dávka-odpověď pro každý z testovaných klonů a hodnoty EC_{50} u všech klonů se pohybovaly v rozmezí 1,64–3,93 nM. Hodnota EC_{50} v mojí práci pro 24hodinové experimenty s TCDD byla $4,9 \pm 2,4$ nM a vzhledem k odchylce by mohly být výsledky uznány jako relevantní. Ve studii *Budinski et al., 2010* sledovali účinek TCDD po 24hodinovém působení na expresi CYP1A1 mRNA v primárních lidských a krysích hepatocytech. Ve studii uvádějí, že výsledná hodnota EC_{50} u lidských hepatocytů byla $0,37 \pm 0,08$ nM a EC_{50} u krysích hepatocytů byla přibližně 10x nižší a rovnala se $0,013 \pm 0,002$ nM. Ve srovnání se získanými výsledky v bakalářské práci, je hodnota EC_{50} u lidské linie přibližně 10x větší než u linie myši, stejně tak jak tomu bylo ve studii *Budinski et al., 2010*. Ve výzkumu *Ondrová et al., 2023* opět použita buněčná linie AZ-AhR za účelem sledování antagonistického účinku karvonu. Výsledná hodnota EC_{50} byla $5,1 \pm 1,4$ nM. V korelaci s touto publikací je získaná hodnota v bakalářské práci ($4,9 \pm 2,4$ nM) téměř totožná.

Z grafu č. 10 je patrné, že po 4 hodinách inkubace BaP byla na lidské linii přibližně 2x vyšší hodnota násobku indukce než u linie myši. Co se týká účinnosti BaP po 4hodinové inkubaci, v koncentracích 100 nM – 10 μ M byla účinnost vztažená k 10nM TCDD vyšší u myši linie než u lidské. Účinnost BaP s koncentrací 1 μ M byla u myšší linie 149 % vůči 10nM TCDD, zatímco u linie lidské byla účinnost nižší a dosahovala 93 % vůči 10nM TCDD. Po 4 hodinách působení BaP, kdy u lidské linie s rostoucí koncentrací indukce rostla, u myši linie došlo v nejvyšší koncentraci 10 μ M k poklesu pravděpodobně z důvodu cytotoxického účinku BaP na buněčnou linii Aherepa. V této koncentraci 10 μ M účinnost BaP vztažená k 10nM TCDD klesla na 133 %. Ve studii *Ondrová et al., 2023* studovali aktivaci AhR v buněčné linii AZ-AhR pomocí luciferázových reportérových esejí po 24hodinovém působení BaP v rozmezí koncentrací 10 pM – 100 nM. Výsledná EC_{50} z publikace se rovnala $7,4 \pm 0,1$ μ M, zatímco získaná hodnota v bakalářské práci $1,5 \pm 0,01$ μ M. Hodnota EC_{50} v bakalářské práci je pouze orientační a bylo by potřeba upravit koncentrační řadu roztoků BaP, aby byla EC_{50} přesnější. Lepších výsledků by bylo dosaženo například již po přidání roztoků BaP s koncentracemi 500 nM, 2,5 μ M a 5 μ M. Výzkum *Trielicová et al., 2011* se zabýval stanovením transkripční aktivity AhR po aplikaci BaP pomocí metody CALUX v krysí hepatomové linii H4IIE. Ve studii uvádějí po 24hodinové inkubaci BaP získanou hodnotu EC_{50} 87 nM. Tato hodnota není vzdálená od získané hodnoty v bakalářské práci, která byla 103 ± 57 nM.

Výsledky GRA s PCB-126 ukázaly, že testovaná látka velice dobře indukovala transkripční aktivitu AhR. U lidské linie po 24hodinové inkubaci v nejvyšší testované koncentraci se hodnota maximální aktivace receptoru nejvíce přiblížila hodnotám aktivace pomocí TCDD. Ve výzkumu *Shi et al., 2019* zkoumali luciferázovou aktivitu a expresi genové rodiny CYP1A aktivovanou PCB-126. Indukci AhR měřili na liniích HepG2 a Hepa1c1c7 při 24hodinové inkubaci PCB-126 s koncentrační řadou 1 nM – 10 μM. Koncentrace testované látky, kdy je dosaženo 50 % maximálního účinku byla u lidské linie HepG2 250 ± 150 nM a u myší linie Hepa1c1c7 se hodnota rovnala $4,7 \pm 3,2$ nM. Hodnoty EC_{50} u lidské i myší linie po 24hodinové aplikaci PCB-126 jsou téměř shodné s výsledky studie od týmu *Shi et al., 2019*.

Ve studii *Dzeletovic et al., 1997* testovali účinky omeprazolu a TCDD během dlouhodobého (24–48 h) testu GRA. Bylo prokázáno, že 50μM omeprazol indukuje pravděpodobně v důsledku rychlého metabolismu hladiny mRNA cytochromu CYP1A1 v buňkách HepG2 na přibližně 30 % odpovědi pozorované u 10nM dioxinu. S tímto tvrzením by se dalo vzhledem k dosaženým výsledkům souhlasit, jelikož indukce omeprazolem po 24 hodinách u linie AZ-AhR byla přibližně 23 % v posledních dvou nejvyšších koncentracích. Musí se však brát v úvahu, že ve studii se zaměřovaly na expresi cytochromu CYP1A1 mRNA. Jak je vidět z grafu 12C u myší linie po 4 hodinách působení omeprazolu nebyla měřitelná indukce AhR. U lidské linie byla indukce po 4hodinovém působení omeprazolu měřitelná a výsledek se tedy shoduje se zmíněnou studií. Co se týká hodnot EC_{50} , u omeprazolu se pohybovaly v jednotkách μM, zatímco u ostatních testovaných látek byla hodnota 50 % maximálního účinku v nM. To může být způsobeno například nižší afinitou k receptoru, popřípadě metabolismem látky. Proto je pro dosažení hodnoty 50 % maximálního účinku AhR potřebná vyšší koncentrace dané látky. Ve studii *Novotna et al., 2014* proběhlo testování lidské linie AZ-AhR pomocí metody GRA. Buňky byly inkubovány 24 hodin s S-omeprazolem, R-omeprazolem, nebo rac-omeprazolem v koncentracích 100 pM – 250 μM. Autoři uvádějí v těchto podmínkách nastala maximální indukce AhR u R-omeprazolu při 250 μM. EC_{50} u R-omeprazolu byla přibližně $35 \pm 3,7$ μM a účinnost vůči 5nM TCDD byla přibližně 50 %. V porovnání jsou získaná EC_{50} 36 ± 19 μM a účinnost vůči TCDD v bakalářské práci v souladu s výsledky výzkumu.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl testován vliv TCDD, BaP, PCB-126 a omeprazolu na transkripční aktivaci AhR receptoru ve stabilně transfekované myší hepatomové linii Aherepa a stabilně transfekované lidské hepatomové linii AZ-AhR. Pomocí MTT testu bylo určeno, že látky v testovaných koncentracích nemají ve zvoleném koncentračním rozmezí cytotoxické účinky na buněčné linie. Následně byla pomocí reportérových luciferázových testů vyhodnocena transkripční aktivita AhR u buněčných linií po 4 a 24hodinové aplikaci testovaných látek. U všech testů na obou liniích byla aktivace po 4 hodinách podstatně nižší než po 24 hodinách. Z výsledků je také velice dobře vidět mezidruhový rozdíl indukce AhR, kdy potence u myšího AhR byla u všech testovaných látek podstatně nižší než u lidského AhR. Po 24hodinovém působení modelového ligandu TCDD byla maximální indukce dané látky přibližně 60x vyšší u lidské linie než u myší. Hodnoty EC_{50} po 24hodinovém působení TCDD vyšly $4,9 \pm 2,4$ nM u linie lidské a $0,06 \pm 0,01$ nM u linie myší. U BaP získané hodnoty EC_{50} ukázaly na velký mezidruhový rozdíl v aktivaci lidského a myšího AhR, kdy se po 24 hodinách inkubace hodnota EC_{50} na lidské linii rovnala 1500 ± 10 nM a na myší 103 ± 57 nM. Výsledné hodnoty EC_{50} u PCB-126 opět poukázaly na velký mezidruhový rozdíl v aktivaci receptoru. EC_{50} u lidské linie po 24hodinovém působení se rovnala 230 ± 170 nM, u myší linie byla po stejně dlouhé době inkubace EC_{50} rovna $0,67 \pm 0,2$ nM. Výsledné EC_{50} omeprazolu byly v porovnání s ostatními testovanými látkami nejvyšší. Po 24 hodinách působení omeprazolu na myší linii hodnota EC_{50} rovna 43 ± 45 μ M, po 4hodinovém působení omeprazol na myší linii neaktivoval AhR.

8 LITERATURA

Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun 13;23(6):716-724. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.003. PMID: 29902437.

Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9990-5. doi: 10.1073/pnas.152706299. Epub 2002 Jul 9. PMID: 12107286; PMCID: PMC126612.

Andersson T, Miners JO, Veronese ME, Tassaneeyakul W, Tassaneeyakul W, Meyer UA, Birkett DJ. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1993 Dec;36(6):521-30. doi: 10.1111/j.1365-2125.1993.tb00410.x. PMID: 12959268; PMCID: PMC1364656.

Arlt VM, Stiborová M, Henderson CJ, Thiemann M, Frei E, Aimová D, Singh R, Gamboa da Costa G, Schmitz OJ, Farmer PB, Wolf CR, Phillips DH. Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*. 2008 Mar;29(3):656-65. doi: 10.1093/carcin/bgn002. Epub 2008 Jan 19. PMID: 18204078.

Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem*. 2001 Aug 31;276(35):33101-10. doi: 10.1074/jbc.M011497200. Epub 2001 Jun 21. PMID: 11423533.

Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res*. 2017 Mar 15;10:1178646917691938. doi: 10.1177/1178646917691938. PMID: 28469468; PMCID: PMC5398323.

Beischlag TV, Wang S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O. Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):4319-33. doi: 10.1128/MCB.22.12.4319-4333.2002. PMID: 12024042; PMCID: PMC133867.

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:175-208. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090733. PMID: 16551247.

Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Chittim B, Harkema JR, Jump DB, Zacharewski TR. Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2005 Jun;85(2):1048-63. doi: 10.1093/toxsci/kfi162. Epub 2005 Mar 30. PMID: 15800033.

Breivik K, Alcock R, Li YF, Bailey RE, Fiedler H, Pacyna JM. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ Pollut.* 2004;128(1-2):3-16. doi: 10.1016/j.envpol.2003.08.031. PMID: 14667716.

Brunnberg S, Andersson P, Lindstam M, Paulson I, Poellinger L, Hanberg A. The constitutively active Ah receptor (CA-Ahr) mouse as a potential model for dioxin exposure--effects in vital organs. *Toxicology.* 2006 Jul 25;224(3):191-201. doi: 10.1016/j.tox.2006.04.045. PMID: 16766111.

Buchmann A, Stinchcombe S, Körner W, Hagenmaier H, Bock KW. Effects of 2,3,7,8-tetrachloro- and 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin on the proliferation of preneoplastic liver cells in the rat. *Carcinogenesis.* 1994 Jun;15(6):1143-50. doi: 10.1093/carcin/15.6.1143. PMID: 8020147.

Budinsky RA, LeCluyse EL, Ferguson SS, Rowlands JC, Simon T. Human and rat primary hepatocyte CYP1A1 and 1A2 induction with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran, and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran. *Toxicol Sci.* 2010 Nov;118(1):224-35. doi: 10.1093/toxsci/kfq238. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20705892.

Budinsky RA, Paustenbach D, Fontaine D, Landenberger B, Starr TB. Recommended relative potency factors for 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran: the impact of different dose metrics. *Toxicol Sci.* 2006 May;91(1):275-85. doi: 10.1093/toxsci/kfj125. Epub 2006 Feb 2. PMID: 16455694.

Budinsky RA, Schrenk D, Simon T, Van den Berg M, Reichard JF, Silkworth JB, Aylward LL, Brix A, Gasiewicz T, Kaminski N, Perdew G, Starr TB, Walker NJ, Rowlands JC. Mode of action and dose-response framework analysis for receptor-mediated toxicity: The aryl hydrocarbon receptor as a case study. *Crit Rev Toxicol.* 2014 Jan;44(1):83-119. doi: 10.3109/10408444.2013.835787. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24245878.

Bukowska B, Mokra K, Michałowicz J. Benzo[*a*]pyrene-Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 6;23(11):6348. doi: 10.3390/ijms23116348. PMID: 35683027; PMCID: PMC9181839.

Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 1;89(17):8185-9. doi: 10.1073/pnas.89.17.8185. PMID: 1325649; PMCID: PMC49882.

Cho B, Yoon SM, Son SM, Kim HW, Kim KB, Youn SJ. Ischemic colitis induced by indigo naturalis in a patient with ulcerative colitis: a case report. *BMC Gastroenterol*. 2020 May 15;20(1):154. doi: 10.1186/s12876-020-01301-3. PMID: 32414334; PMCID: PMC7229623.

Collier A, Orr L, Morris J, Blank J. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the mortality and growth of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Pseudacris triseriata*). *Int J Environ Res Public Health*. 2008 Dec;5(5):368-77. doi: 10.3390/ijerph5050368. PMID: 19151431; PMCID: PMC3699996.

CONNEY AH, MILLER EC, MILLER JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res*. 1956 Jun;16(5):450-9. PMID: 13330038.

Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res*. 1982 Dec;42(12):4875-917. PMID: 6814745.

Connor KT, Aylward LL. Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2006 Mar-Apr;9(2):147-71. doi: 10.1080/15287390500196487. PMID: 16613807.

Curi-Pedrosa R, Daujat M, Pichard L, Ourlin JC, Clair P, Gervot L, Lesca P, Domergue J, Joyeux H, Fourtanier G, et al. Omeprazole and lansoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Apr;269(1):384-92. PMID: 8169844.

Dai S, Qu L, Li J, Zhang Y, Jiang L, Wei H, Guo M, Chen X, Chen Y. Structural insight into the ligand binding mechanism of aryl hydrocarbon receptor. *Nat Commun*. 2022 Oct

20;13(1):6234. doi: 10.1038/s41467-022-33858-w. PMID: 36266304; PMCID: PMC9585082.

Daujot M, Peryt B, Lesca P, Fourtanier G, Domergue J, Maurel P. Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Oct 30;188(2):820-5. doi: 10.1016/0006-291x(92)91130-i. PMID: 1280125.

Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem.* 1999 Oct 1;274(40):28708-15. doi: 10.1074/jbc.274.40.28708. PMID: 10497241.

Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem.* 1988 Nov 25;263(33):17221-4. PMID: 2846558.

Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309-34. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828. Epub 2002 Jan 10. PMID: 12540743.

Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE, Zhao B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci.* 2011 Nov;124(1):1-22. doi: 10.1093/toxsci/kfr218. Epub 2011 Sep 9. PMID: 21908767; PMCID: PMC3196658.

Dere E, Lee AW, Burgoon LD, Zacharewski TR. Differences in TCDD-elicited gene expression profiles in human HepG2, mouse Hepa1c1c7 and rat H4IIE hepatoma cells. *BMC Genomics.* 2011a Apr 15;12:193. doi: 10.1186/1471-2164-12-193. PMID: 21496263; PMCID: PMC3089798.

Dere E, Lo R, Celius T, Matthews J, Zacharewski TR. Integration of genome-wide computation DRE search, AhR ChIP-chip and gene expression analyses of TCDD-elicited responses in the mouse liver. *BMC Genomics.* 2011b Jul 15;12:365. doi: 10.1186/1471-2164-12-365. PMID: 21762485; PMCID: PMC3160422.

Dipple A. Formation, metabolism, and mechanism of action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 1983 May;43(5 Suppl):2422s-2425s. PMID: 6403235.

Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol*. 1993 Nov;44(5):911-7. PMID: 8246913.

Dzeletovic N, McGuire J, Daujat M, Tholander J, Ema M, Fujii-Kuriyama Y, Bergman J, Maurel P, Poellinger L. Regulation of dioxin receptor function by omeprazole. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12705-13. doi: 10.1074/jbc.272.19.12705. PMID: 9139728.

Elferink CJ, Gasiewicz TA, Whitlock JP Jr. Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Evidence that the transformed Ah receptor is heteromeric. *J Biol Chem*. 1990 Nov 25;265(33):20708-12. PMID: 2173716.

Ema M, Ohe N, Suzuki M, Mimura J, Sogawa K, Ikawa S, Fujii-Kuriyama Y. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27337-43. PMID: 7961644.

Fitzgerald CT, Nebert DW, Puga A. Regulation of mouse Ah receptor (Ahr) gene basal expression by members of the Sp family of transcription factors. *DNA Cell Biol*. 1998 Sep;17(9):811-22. doi: 10.1089/dna.1998.17.811. PMID: 9778040.

Flaveny C, Reen RK, Kusnadi A, Perdew GH. The mouse and human Ah receptor differ in recognition of LXXLL motifs. *Arch Biochem Biophys*. 2008 Mar 15;471(2):215-23. doi: 10.1016/j.abb.2008.01.014. Epub 2008 Jan 26. PMID: 18242161; PMCID: PMC2293825.

Fritz WA, Lin TM, Cardiff RD, Peterson RE. The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Carcinogenesis*. 2007 Feb;28(2):497-505. doi: 10.1093/carcin/bgl179. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17052998.

Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP Jr. Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett*. 2001 Jul 6;122(3):189-203. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00364-2. PMID: 11489354.

Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(16):5859-63. doi: 10.1073/pnas.85.16.5859. PMID: 3413062; PMCID: PMC281864.

Gan M, Ding H, Chen G. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole reduces apoptosis induced by benzo[a]pyrene in a mitochondrial-dependent manner. *Cell Biol Int*. 2020 Dec;44(12):2427-2437. doi: 10.1002/cbin.11450. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32808713.

Gasiewicz TA, Henry EC, Collins LL. Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008;18(4):279-321. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v18.i4.10. PMID: 18652561.

Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Fabre JM, Sa-Cunha A, Poellinger L, Maurel P, Daujat-Chavanieu M. Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide. *Cell Signal.* 2006 May;18(5):740-50. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.07.007. Epub 2005 Aug 16. PMID: 16109480.

Goode GD, Ballard BR, Manning HC, Freeman ML, Kang Y, Eltom SE. Knockdown of aberrantly upregulated aryl hydrocarbon receptor reduces tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2013 Dec 15;133(12):2769-80. doi: 10.1002/ijc.28297. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23733406; PMCID: PMC3797219.

Gruszczuk J, Grandvullemin L, Lai-Kee-Him J, Paloni M, Savva CG, Germain P, Grimaldi M, Boulahtouf A, Kwong HS, Bous J, Ancelin A, Bechara C, Barducci A, Balaguer P, Bourguet W. Cryo-EM structure of the agonist-bound Hsp90-XAP2-AHR cytosolic complex. *Nat Commun.* 2022 Nov 16;13(1):7010. doi: 10.1038/s41467-022-34773-w. PMID: 36385050; PMCID: PMC9668932.

Guerra-Ojeda S, Suarez A, Valls A, Verdú D, Pereda J, Ortiz-Zapater E, Carretero J, Mauricio MD, Serna E. The Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in the Endothelium: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 31;24(17):13537. doi: 10.3390/ijms241713537. PMID: 37686342; PMCID: PMC10488274.

Hammerschmidt-Kamper C, Biljes D, Merches K, Steiner I, Daldrup T, Bol-Schoenmakers M, Pieters RHH, Esser C. Indole-3-carbinol, a plant nutrient and AhR-Ligand precursor, supports oral tolerance against OVA and improves peanut allergy symptoms in mice. *PLoS One.* 2017 Jun 30;12(6):e0180321. doi: 10.1371/journal.pone.0180321. PMID: 28666018; PMCID: PMC5493375.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:307-40. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.001515. PMID: 7598497.

He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S, Denison MS. Third-generation Ah receptor-responsive luciferase reporter plasmids: amplification of dioxin-responsive elements dramatically increases CALUX bioassay sensitivity and responsiveness. *Toxicol Sci.* 2011 Oct;123(2):511-22. doi: 10.1093/toxsci/kfr189. Epub 2011 Jul 20. PMID: 21775728; PMCID: PMC3179681.

Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ Mol Mutagen.* 2002;39(2-3):119-26. doi: 10.1002/em.10071. PMID: 11921179.

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 1997 Jun 12;387(6634):733-6. doi: 10.1038/42750. PMID: 9192902.

Hezaveh K, Shinde RS, Klötgen A, Halaby MJ, Lamorte S, Ciudad MT, Quevedo R, Neufeld L, Liu ZQ, Jin R, Grünwald BT, Foerster EG, Chaharlangi D, Guo M, Makhijani P, Zhang X, Pugh TJ, Pinto DM, Co IL, McGuigan AP, Jang GH, Khokha R, Ohashi PS, O'Kane GM, Gallinger S, Navarre WW, Maughan H, Philpott DJ, Brooks DG, McGaha TL. Tryptophan-derived microbial metabolites activate the aryl hydrocarbon receptor in tumor-associated macrophages to suppress anti-tumor immunity. *Immunity.* 2022 Feb 8;55(2):324-340.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2022.01.006. PMID: 35139353; PMCID: PMC8888129.

Howden CW. Clinical pharmacology of omeprazole. *Clin Pharmacokinet.* 1991 Jan;20(1):38-49. doi: 10.2165/00003088-199120010-00003. PMID: 2029801.

Hu J, Ding Y, Liu W, Liu S. When AHR signaling pathways meet viral infections. *Cell Commun Signal.* 2023 Feb 24;21(1):42. doi: 10.1186/s12964-023-01058-8. PMID: 36829212; PMCID: PMC9951170.

Huang Y, Zhang J, Tao Y, Ji C, Aniagu S, Jiang Y, Chen T. AHR/ROS-mediated mitochondria apoptosis contributes to benzo[a]pyrene-induced heart defects and the protective effects of resveratrol. *Toxicology.* 2021 Oct;462:152965. doi: 10.1016/j.tox.2021.152965. Epub 2021 Sep 28. PMID: 34597721.

Jackson DP, Joshi AD, Elferink CJ. Ah Receptor Pathway Intricacies; Signaling Through Diverse Protein Partners and DNA-Motifs. *Toxicol Res (Camb)*. 2015 Sep 1;4(5):1143-1158. doi: 10.1039/c4tx00236a. Epub 2015 Mar 17. PMID: 26783425; PMCID: PMC4714567.

Jain S, Dolwick KM, Schmidt JV, Bradfield CA. Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem*. 1994 Dec 16;269(50):31518-24. PMID: 7989319.

Jeffy BD, Schultz EU, Selmin O, Gudas JM, Bowden GT, Romagnolo D. Inhibition of BRCA-1 expression by benzo[a]pyrene and its diol epoxide. *Mol Carcinog*. 1999 Oct;26(2):100-18. doi: 10.1002/(sici)1098-2744(199910)26:2<100::aid-mc5>3.0.co;2-1. PMID: 10506754.

Jin UH, Kim SB, Safe S. Omeprazole Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion through a Nongenomic Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway. *Chem Res Toxicol*. 2015 May 18;28(5):907-18. doi: 10.1021/tx5005198. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25826687; PMCID: PMC4948974.

Jin UH, Lee SO, Pfent C, Safe S. The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer*. 2014 Jul 9;14:498. doi: 10.1186/1471-2407-14-498. PMID: 25011475; PMCID: PMC4226953.

Jin UH, Michelhaugh SK, Polin LA, Shrestha R, Mittal S, Safe S. Omeprazole Inhibits Glioblastoma Cell Invasion and Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 28;12(8):2097. doi: 10.3390/cancers12082097. PMID: 32731514; PMCID: PMC7465678.

Kikuchi H, Kato H, Mizuno M, Hossain A, Ikawa S, Miyazaki J, Watanabe M. Differences in inducibility of CYP1A1-mRNA by benzimidazole compounds between human and mouse cells: evidences of a human-specific signal transduction pathway for CYP1A1 induction. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Oct 15;334(2):235-40. doi: 10.1006/abbi.1996.0451. PMID: 8900397.

King-Heiden TC, Mehta V, Xiong KM, Lanham KA, Antkiewicz DS, Ganser A, Heideman W, Peterson RE. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 May 6;354(1-2):121-38. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.027. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21958697; PMCID: PMC3306500.

Kou Z, Dai W. Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochem Pharmacol.* 2021 Mar;185:114428. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114428. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33515530; PMCID: PMC8862184.

Kumar MB, Perdew GH. Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr.* 1999;8(5-6):273-86. PMID: 10947077; PMCID: PMC6157383.

Kumar MB, Ramadoss P, Reen RK, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):42302-10. doi: 10.1074/jbc.M104798200. Epub 2001 Sep 10. PMID: 11551916.

Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G, Bridonneau C, Jegou S, Hoffmann TW, Natividad JM, Brot L, Taleb S, Couturier-Maillard A, Nion-Larmurier I, Merabtene F, Seksik P, Bourrier A, Cosnes J, Ryffel B, Beaugerie L, Launay JM, Langella P, Xavier RJ, Sokol H. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med.* 2016 Jun;22(6):598-605. doi: 10.1038/nm.4102. Epub 2016 May 9. PMID: 27158904; PMCID: PMC5087285.

Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open.* 2018 Jun 11;7:1-9. doi: 10.1016/j.biopen.2018.05.001. PMID: 30003042; PMCID: PMC6039966.

Le Beau MM, Carver LA, Espinosa R 3rd, Schmidt JV, Bradfield CA. Chromosomal localization of the human AHR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21->p15. *Cytogenet Cell Genet.* 1994;66(3):172-6. doi: 10.1159/000133694. PMID: 8125016.

Lesca P, Peryt B, Larrieu G, Alvinerie M, Galtier P, Daujat M, Maurel P, Hoogenboom L. Evidence for the ligand-independent activation of the AH receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Apr 17;209(2):474-82. doi: 10.1006/bbrc.1995.1526. PMID: 7733914.

Lewis, R.J. Sr. (ed) *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials.* 11th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 2004., p. 2994.

Lin L, Dai Y, Xia Y. An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002-2022): A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2022 Dec 15;244:114845. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114845. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36274276.

Loaiza-Pérez AI, Kenney S, Boswell J, Hollingshead M, Alley MC, Hose C, Ciolino HP, Yeh GC, Trepel JB, Vistica DT, Sausville EA. Aryl hydrocarbon receptor activation of an antitumor aminoflavone: basis of selective toxicity for MCF-7 breast tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2004 Jun;3(6):715-25. PMID: 15210858.

Ma Q, Baldwin KT. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8432-8. doi: 10.1074/jbc.275.12.8432. PMID: 10722677.

Manchester DK, Gordon SK, Golas CL, Roberts EA, Okey AB. Ah receptor in human placenta: stabilization by molybdate and characterization of binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3-methylcholanthrene, and benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 1987 Sep 15;47(18):4861-8. PMID: 3040233.

Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem Pharmacol.* 2009 Feb 15;77(4):608-26. doi: 10.1016/j.bcp.2008.10.013. Epub 2008 Oct 19. PMID: 18996358.

Matthes S, Bader M. Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends Pharmacol Sci.* 2018 Jun;39(6):560-572. doi: 10.1016/j.tips.2018.03.004. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29628275.

Micka J, Milatovich A, Menon A, Grabowski GA, Puga A, Nebert DW. Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics.* 1997 Apr;7(2):95-101. doi: 10.1097/00008571-199704000-00002. PMID: 9170146.

Miller CL, Llenos IC, Dulay JR, Barillo MM, Yolken RH, Weis S. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2004 Apr;15(3):618-29. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.015. PMID: 15056470.

Miller KP, Ramos KS. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons, *Drug Metab. Rev.*, 2001, vol. 33 (pg. 1-35).

Mitchell KA, Elferink CJ. Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 15;77(6):947-56. doi: 10.1016/j.bcp.2008.10.028. Epub 2008 Nov 6. PMID: 19027718; PMCID: PMC2751579.

Moennikes O, Loeppen S, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4707-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0875. PMID: 15256435.

Moreno-Marín N, Barrasa E, Morales-Hernández A, Paniagua B, Blanco-Fernández G, Merino JM, Fernández-Salguero PM. Dioxin Receptor Adjusts Liver Regeneration After Acute Toxic Injury and Protects Against Liver Carcinogenesis. *Sci Rep.* 2017 Sep 5;7(1):10420. doi: 10.1038/s41598-017-10984-w. PMID: 28874739; PMCID: PMC5585208.

Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 1998 Dec;26(12):1232-40. PMID: 9860933.

Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front Cell Dev Biol.* 2016 May 11;4:45. doi: 10.3389/fcell.2016.00045. PMID: 27243009; PMCID: PMC4863130.

Nacarino-Palma A, Rejano-Gordillo CM, González-Rico FJ, Ordiales-Talavera A, Román AC, Cuadrado M, Bustelo XR, Merino JM, Fernández-Salguero PM. Loss of Aryl Hydrocarbon Receptor Favors *K-Ras*^{G12D}-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 13;13(16):4071. doi: 10.3390/cancers13164071. PMID: 34439225; PMCID: PMC8394265.

Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan;21(1):102-16. doi: 10.1021/tx7001965. Epub 2007 Dec 13. PMID: 18076143; PMCID: PMC2572005.

Nishio M, Hirooka K, Doi Y. Chinese herbal drug natural indigo may cause pulmonary artery hypertension. *Eur Heart J.* 2016 Jul 1;37(25):1992. doi: 10.1093/eurheartj/ehw090. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26984865.

Novotna A, Pavek P, Dvorak Z. 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. doi: 10.1021/es2029334. Epub 2011 Nov 2. PMID: 22017252.

Novotna A, Srovnalova A, Svecarova M, Korhonova M, Bartonkova I, Dvorak Z. Differential effects of omeprazole and lansoprazole enantiomers on aryl hydrocarbon receptor in human hepatocytes and cell lines. *PLoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98711. doi: 10.1371/journal.pone.0098711. PMID: 24887303; PMCID: PMC4041848.

Nothdurft S, Thumser-Henner C, Breitenbücher F, Okimoto RA, Dorsch M, Opitz CA, Sadik A, Esser C, Hölzel M, Asthana S, Forster J, Beisser D, Kalmbach S, Grüner BM, Bivona TG, Schramm A, Schuler M. Functional screening identifies aryl hydrocarbon receptor as suppressor of lung cancer metastasis. *Oncogenesis*. 2020 Nov 19;9(11):102. doi: 10.1038/s41389-020-00286-8. PMID: 33214553; PMCID: PMC7677369.

Okey AB, Bondy GP, Mason ME, Kahl GF, Eisen HJ, Guenther TM, Nebert DW. Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J Biol Chem*. 1979 Nov 25;254(22):11636-48. PMID: 500663.

Okey AB, Riddick DS, Harper PA. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett*. 1994 Jan;70(1):1-22. doi: 10.1016/0378-4274(94)90139-2. PMID: 8310450.

Ondrová K, Zůvalová I, Vyhlídalová B, Krasulová K, Miková E, Vrzal R, Nádvorník P, Nepal B, Kortagere S, Kopečná M, Kopečný D, Šebela M, Rastinejad F, Pu H, Soural M, Rolfes KM, Haarmann-Stemmann T, Li H, Mani S, Dvořák Z. Monoterpenoid aryl hydrocarbon receptor allosteric antagonists protect against ultraviolet skin damage in female mice. *Nat Commun*. 2023 May 11;14(1):2728. doi: 10.1038/s41467-023-38478-6. PMID: 37169746; PMCID: PMC10174618.

Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemain GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011 Oct 5;478(7368):197-203. doi: 10.1038/nature10491. PMID: 21976023.

Ozawa K, Mori D, Hatanaka A, Sawano T, Nakatani J, Ikeya Y, Nishizawa M, Tanaka H. Comparison of the anti-colitis activities of Qing Dai/Indigo Naturalis constituents in mice. *J*

Pharmacol Sci. 2020 Apr;142(4):148-156. doi: 10.1016/j.jphs.2020.01.003. Epub 2020 Jan 22. PMID: 32033881.

Patel TD, Nakka M, Grimm SL, Coarfa C, Gorelick DA. Functional genomic analysis of non-canonical DNA regulatory elements of the aryl hydrocarbon receptor. bioRxiv [Preprint]. 2023 May 1:2023.05.01.538985. doi: 10.1101/2023.05.01.538985. PMID: 37205451; PMCID: PMC10187216.

Patrizi B, Siciliani de Cumis M. TCDD Toxicity Mediated by Epigenetic Mechanisms. Int J Mol Sci. 2018 Dec 18;19(12):4101. doi: 10.3390/ijms19124101. PMID: 30567322; PMCID: PMC6320947.

Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. J Biol Chem. 1988 Sep 25;263(27):13802-5. PMID: 2843537.

Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. Crit Rev Toxicol. 1993;23(3):283-335. doi: 10.3109/10408449309105013. PMID: 8260069.

Petriello MC, Hoffman JB, Vsevolozhskaya O, Morris AJ, Hennig B. Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. Environ Pollut. 2018 Nov;242(Pt A):1022-1032. doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.039. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30373033; PMCID: PMC6211811.

Phillips JL, Löhr CV, Nguyen BD, Buermeyer AB, Kolluri SK. Loss of the aryl hydrocarbon receptor increases tumorigenesis in p53-deficient mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2022 Nov 1;454:116191. doi: 10.1016/j.taap.2022.116191. Epub 2022 Aug 1. PMID: 35926564.

Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. Cancer Res. 1980 Oct;40(10):3616-20. PMID: 6108157.

Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frédérick R, De Plaen E, Uyttenhove C, Wouters J, Masereel B, Van den Eynde BJ. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2497-502. doi: 10.1073/pnas.1113873109. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22308364; PMCID: PMC3289319.

Poland A, Glover E, Taylor BA. The murine Ah locus: a new allele and mapping to chromosome 12. *Mol Pharmacol*. 1987 Oct;32(4):471-8. PMID: 2823093.

Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:517-54. doi: 10.1146/annurev.pa.22.040182.002505. PMID: 6282188.

Puga A, Maier A, Medvedovic M. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 15;60(8):1129-42. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00403-2. PMID: 11007951.

Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*. 1992 May 22;256(5060):1193-5. doi: 10.1126/science.256.5060.1193. PMID: 1317062.

Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*. 2013 Aug 1;65(4):1148-61. doi: 10.1124/pr.113.007823. PMID: 23908379; PMCID: PMC3799235.

Sachs G, Shin JM, Besancon M, Prinz C. The continuing development of gastric acid pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther*. 1993;7 Suppl 1:4-12, discussion 29-31. doi: 10.1111/j.1365-2036.1993.tb00582.x. PMID: 8387826.

Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*. 1994;24(2):87-149. doi: 10.3109/10408449409049308. PMID: 8037844.

Safe S, Zhang L. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and Its Ligands in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 14;14(22):5574. doi: 10.3390/cancers14225574. PMID: 36428667; PMCID: PMC9688153.

Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K, Nemoto N. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab Dispos*. 1999 Mar;27(3):379-84. PMID: 10064569.

Seldin MF, Howard TA, D'Eustachio P. Comparison of linkage maps of mouse chromosome 12 derived from laboratory strain intraspecific and *Mus spretus* interspecific backcrosses. *Genomics*. 1989 Jul;5(1):24-8. doi: 10.1016/0888-7543(89)90082-7. PMID: 2570028.

Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*. 2022 Mar;162(3):715-730.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2021.10.035. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34757143; PMCID: PMC9003896.

Shi H, Hardesty JE, Jin J, Head KZ, Falkner KC, Cave MC, Prough RA. Concentration dependence of human and mouse aryl hydrocarbon receptor responsiveness to polychlorinated biphenyl exposures: Implications for aroclor mixtures. *Xenobiotica*. 2019 Dec;49(12):1414-1422. doi: 10.1080/00498254.2019.1566582. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30991879; PMCID: PMC6764862.

Shiizaki K, Kawanishi M, Yagi T. Microbial metabolites of omeprazole activate murine aryl hydrocarbon receptor in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos*. 2014 Oct;42(10):1690-7. doi: 10.1124/dmd.114.058966. Epub 2014a Jul 24. PMID: 25061160.

Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol*. 2014b Feb;85(2):279-89. doi: 10.1124/mol.113.088856. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24265133.

Sládeková L, Mani S, Dvořák Z. Ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor AhR: Facts and myths. *Biochem Pharmacol*. 2023 Jul;213:115626. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115626. Epub 2023 May 27. PMID: 37247746.

Sondermann NC, Faßbender S, Hartung F, Hätälä AM, Rolfes KM, Vogel CFA, Haarmann-Stemmann T. Functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway. *Biochem Pharmacol*. 2023 Feb;208:115371. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115371. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36528068; PMCID: PMC9884176.

Soshilov A, Denison MS. Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*. 2008 Nov 21;283(47):32995-3005. doi: 10.1074/jbc.M802414200. Epub 2008 Sep 19. PMID: 18806268; PMCID: PMC2583286.

Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 2009 Jul;127(3):299-311. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x. PMID: 19538249; PMCID: PMC2712099.

Su JM, Lin P, Wang CK, Chang H. Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target. *Anticancer Res.* 2009 Feb;29(2):509-15. PMID: 19331196.

Trilecová L, Krčková S, Marvanová S, Pěnčíková K, Krčmář P, Neča J, Hulinková P, Pálková L, Ciganek M, Milcová A, Topinka J, Vondráček J, Machala M. Toxic effects of methylated benzo[a]pyrenes in rat liver stem-like cells. *Chem Res Toxicol.* 2011 Jun 20;24(6):866-76. doi: 10.1021/tx200049x. Epub 2011 Jun 3. PMID: 21604763.

Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003 Oct;9(10):1269-74. doi: 10.1038/nm934. Epub 2003 Sep 21. PMID: 14502282.

Van den Eynde B, Lethé B, Van Pel A, De Plaen E, Boon T. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med.* 1991 Jun 1;173(6):1373-84. doi: 10.1084/jem.173.6.1373. PMID: 1903428; PMCID: PMC2190831.

Vogel CF, Li W, Sciallo E, Newman J, Hammock B, Reader JR, Tuscano J, Matsumura F. Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression. *Am J Pathol.* 2007a Nov;171(5):1538-48. doi: 10.2353/ajpath.2007.070406. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17823287; PMCID: PMC2043515.

Vogel CF, Sciallo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol.* 2007b Dec;21(12):2941-55. doi: 10.1210/me.2007-0211. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17823304; PMCID: PMC2346533.

Von Burg R. TCDD. *J Appl Toxicol.* 1988 Apr;8(2):145-8. doi: 10.1002/jat.2550080213. PMID: 3288687.

Walisser JA, Glover E, Pande K, Liss AL, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 6;102(49):17858-63. doi: 10.1073/pnas.0504757102. Epub 2005 Nov 21. PMID: 16301529; PMCID: PMC1308889.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003 Jan 3;299(5603):76. doi: 10.1126/science.1078197. PMID: 12511643.

Ware BR, Brown GE, Soldatow VY, LeCluyse EL, Khetani SR. Long-Term Engineered Cultures of Primary Mouse Hepatocytes for Strain and Species Comparison Studies During Drug Development. *Gene Expr*. 2019 Nov 4;19(3):199-214. doi: 10.3727/105221619X15638857793317. Epub 2019 Jul 24. Erratum in: *Gene Expr*. 2020 Jun 12;20(1):75-76. PMID: 31340881; PMCID: PMC6827040.

Watson MA, Devereux TR, Malarkey DE, Anderson MW, Maronpot RR. H-ras oncogene mutation spectra in B6C3F1 and C57BL/6 mouse liver tumors provide evidence for TCDD promotion of spontaneous and vinyl carbamate-initiated liver cells. *Carcinogenesis*. 1995 Aug;16(8):1705-10. doi: 10.1093/carcin/16.8.1705. PMID: 7634393.

Whitelaw ML, McGuire J, Picard D, Gustafsson JA, Poellinger L. Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4437-41. doi: 10.1073/pnas.92.10.4437. PMID: 7753824; PMCID: PMC41959.

Wilson SR, Joshi AD, Elferink CJ. The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Jun;345(3):419-29. doi: 10.1124/jpet.113.203786. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23512538; PMCID: PMC3657114.

Wojciechowski MF, Meehan T. Inhibition of DNA methyltransferases in vitro by benzo[a]pyrene diol epoxide-modified substrates. *J Biol Chem*. 1984 Aug 10;259(15):9711-6. PMID: 6430903.

Wright EJ, De Castro KP, Joshi AD, Elferink CJ. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Curr Opin Toxicol*. 2017 Feb;2:87-92. doi: 10.1016/j.cotox.2017.01.001. Epub 2017 Jan 18. PMID: 32296737; PMCID: PMC7158745.

Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, Potosky D, Meltzer SJ, Rhee JG, Kim SS, Moss SF, Hacker A, Wang Y, Casero RA Jr, Wilson KT. Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 2004 Dec 1;64(23):8521-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3511. PMID: 15574757.

Yang X, Liu D, Murray TJ, Mitchell GC, Hesterman EV, Karchner SI, Merson RR, Hahn ME, Sherr DH. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7869-81. doi: 10.1038/sj.onc.1208938. PMID: 16091746.

Zeiger M, Haag R, Höckel J, Schrenk D, Schmitz HJ. Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci*. 2001 Sep;63(1):65-73. doi: 10.1093/toxsci/63.1.65. PMID: 11509745.

Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372-85. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003. PMID: 23973224.

Zhang W, Sargis RM, Volden PA, Carmean CM, Sun XJ, Brady MJ. PCB 126 and other dioxin-like PCBs specifically suppress hepatic PEPCK expression via the aryl hydrocarbon receptor.

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Polychlorinated dibenzoparadioxins. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1997;69:330–43.[online][navštíveno 24.2. 2024] Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Polychlorinated-Dibenzo--Em-Para-Em--Dioxins-And-Polychlorinated-Dibenzofurans-1997>

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 15625, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin. [online][navštíveno 23.2. 2024] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3_7_8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin.

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 2336, Benzo[a]pyrene. [online][navštíveno 23.2. 2024] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo_a_pyrene.

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4594, Omeprazole. [online][navštíveno 23.2. 2024] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Omeprazole>.

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 63090, 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl. [online][navštíveno 23.2. 2024] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2_3-trichloro-5-3_4-dichlorophenyl_benzene.

WHO (2003) Polychlorinated biphenyls: human health aspects. Geneva, Switzerland: World Health Organization. pp. 1–64.[online][navštíveno 24.2. 2024] Dostupné z: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42640/9241530553.pdf>