

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv zánětlivých faktorů produkovaných makrofágy
na enzymy podílející se na metabolické aktivaci
polyaromatických promutagenů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Svobodová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně a za použití citované literatury.

V Olomouci dne 2. 5. 2013

.....

Jana Svobodová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména svému školiteli doc. RNDr. Janu Vondráčkovi, PhD., za odborné vedení, všestrannou pomoc a věnovaný čas při zpracování diplomové práce. Dále patří poděkování Mgr. Lence Šmerdové, PhD., za pomoc, ochotu a cenné rady, které mi poskytla. Dále děkuji doc. RNDr. A. Kozubíkovi, CSc. a doc. RNDr. J. Hofmanové, CSc. za vytvoření kvalitních pracovních podmínek i všem zaměstnancům Oddělení cytokinetiky Biofyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i. za vytvoření zázemí a vstřícný přístup. Poděkování za podporu patří i mojí rodině.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Svobodová
Název práce	Vliv zánětlivých faktorů produkovaných makrofágy na enzymy podílející se na metabolické aktivaci polyaromatických promutagenů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i.
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), jako je benzo[a]pyren (B[a]P), představují významné environmentální kontaminanty. Na jejich detoxikaci i metabolické aktivaci se podílejí cytochromy P450 rodiny 1 (CYP1), jejichž hladina a aktivita je kontrolována především působením Ah receptoru (AhR). AhR je transkripční faktor, který zprostředkovává široké spektrum biologických a toxických účinků environmentálních polutantů. Hladina CYP1 enzymů může být ovlivněna také patologickými procesy v plicní tkáni, jako je chronický zánět. Studie zkoumající vliv prozánětlivých cytokinů na aktivitu AhR ukazují, že hladina CYP1 může být v podmínkách zánětlivé reakce významně ovlivněna. Deregulace aktivity CYP1 enzymů může významně měnit tvorbu toxických metabolitů B[a]P. V rámci předložené diplomové práce byl studován vliv komplexních směsí zánětlivých mediátorů, kondiciovaného média, připraveného aktivací alveolárních makrofágů MH-S. Bylo prokázáno, že toto médium, které obsahuje účinnou směs prozánětlivých cytokinů a dalších zánětlivých mediátorů, lze využít jako vhodný model indukce zánětlivé reakce v plicních epiteliálních buňkách <i>in vitro</i>. Kondiciované médium v plicních alveolárních buňkách typu II (AEII; linie RLE-6TN) aktivovalo tvorbu zánětlivých mediátorů a posilovalo indukci CYP1B1, jednoho z hlavních enzymů podílejících se na bioaktivaci B[a]P na toxické reaktivní metabolity. Působením zánětlivých mediátorů došlo v použitém buněčném modelu AEII k posílení tvorby stabilních BPDE aduktů. Zvýšené poškození DNA bylo potvrzeno detekcí zvýšené fosforylace nádorového supresoru p53. Analýzou B[a]P metabolitů bylo prokázáno, že došlo k urychlení metabolismu B[a]P. Podobně, jako v případě působení modelového prozánětlivého cytokinu TNF-α, je v případě působení směsi prozánětlivých mediátorů pozorováno posílení zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN a zvýšená bioaktivace a genotoxicita B[a]P. Tyto výsledky naznačují, že chronický zánět, který vede k lokálnímu zvýšení produkce zánětlivých mediátorů v plicní tkáni, může ovlivnit metabolismus PAU a následně posilovat genotoxické působení PAU v AEII buňkách.</p>
Klíčová slova	AhR, polycyklické aromatické uhlovodíky, CYP1B1, benzo[a]pyren, prozánětlivé cytokiny, DNA adukty, plicní epiteliální buňky (AE II)
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Jana Svobodová
Title	The effects of inflammatory mediators produced by macrophages on enzymes participating in metabolic activation of polyaromatic promutagens
Type of thesis	master
Department	Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.
Supervisor	doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstrakt	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as benzo[a]pyrene (B[a]P), are important environmental contaminants. Their detoxification and metabolite activation is mediated by cytochrome P450 family 1 enzymes (CYP1), which levels and activities are primarily controlled by the aryl hydrocarbon receptor (AhR). AhR is a transcription factor, which mediates a broad spectrum of biological and toxic effects of environmental pollutants. Nevertheless, levels of the CYP1 enzymes can also be affected by pathological processes in pulmonary tissue, such as chronic inflammation. Studies investigating effects of pro-inflammatory cytokines on AhR activity and expression of his targets genes have indicated that activities of a number of enzymes participating in detoxification and elimination of PAHs, could be significantly modified under inflammatory conditions. Deregulation of CYP1 enzyme activity can significantly change production of toxic B[a]P metabolites. Within the present diploma thesis, we studied influence of complex mixtures of inflammatory mediators, which were prepared as conditioned medium from activated alveolar macrophage MH-S cells. We confirmed that this medium, which contains an effective mixture of pro-inflammatory cytokines and other inflammatory mediators, can be employed as suitable model of induction of inflammatory response in the pulmonary epithelial cells in vitro. The conditioned medium activated production of inflammatory mediators and enhanced induction of CYP1B1, one of major enzymes involved in the bioactivation of B[a]P to toxic reactive intermediates, in alveolar type II epithelial cells (AE II, cell line RLE-6TN). The action of inflammatory mediators lead to the augmented the formation of stable B[a]P diolepoxide-DNA adducts in employed model AE II cells. Increased DNA damage was further confirmed by detection of enhanced phosphorylation of tumor suppressor p53. Analysis of B[a]P metabolites showed that metabolism of B[a]P was accelerated. Similarly to model pro-inflammatory cytokine TNF- α , we observed that mixtures of pro-inflammatory mediators may potentiate inflammatory response and increase bioactivation and genotoxicity of B[a]P in RLE-

6TN cells. These results suggest that chronic inflammation, which leads to an increased local production of inflammatory cytokines in lung tissue, may affect PAHs metabolism and subsequently enhance genotoxic effects of PAHs in AEII cells.

Keywords

AhR, polycyclic aromatic hydrocarbon, CYP1B1, benzo[a]pyrene, proinflammatory cytokines, DNA adducts, lung epithelial cells (AE II)

Number of pages

64

Number of appendices

0

Obsah

1	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)	9
2.2	Regulace exprese a aktivace AhR	12
2.3	Funkce Ah receptoru	14
2.4	AhR a regulace transkripce Cyp1 rodiny; Metabolismus B[a]P a příbuzných sloučenin	16
2.5	Zánět a AhR, regulace Cyp1 rodiny zánětlivými faktory	22
2.6	Modely plicních buněk použité v diplomové práci (linie MH-S, RLE-6TN)	25
3	MATERIÁL A METODY	27
3.1	Buněčné modely a kultivační podmínky	27
3.2	Experimentální design	28
3.3	Použité metody	29
3.3.1	Western blotting	29
3.3.2	Izolace RNA a qRT-PCR	31
3.3.3	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS)	33
3.3.4	Analýza DNA aduktů	34
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1	Stanovení aktivace alveolárních makrofágů (MH-S) za použití LPS; příprava kondiciovaného média	36
4.2	Potvrzení aktivace zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN pomocí kondiciovaného média - detekce indukce exprese genů Tnf (TNF- α), Ptg2 (COX-2) a stanovení degradace I κ B α	37
4.3	Stanovení hladiny proteinů CYP1 rodiny podílejících se na metabolizaci B[a]P v zánětlivých podmínkách v buněčné linii RLE-6TN	39
4.4	Vliv kondiciovaného média v kombinaci s B[a]P na metabolickou aktivaci B[a]P a tvorbu DNA aduktů spojenou s poškozením DNA	42
4.5	Detekce hladiny metabolitů B[a]P v buňkách RLE-6TN pomocí LC/MS/MS	44
4.5.1	Metabolity B[a]P v buňkách	44
4.5.2	Metabolity B[a]P v médiu po hydrolyze konjugátů	45
5	DISKUSE	48
6	ZÁVĚR	54
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	62

1 Cíle diplomové práce

Ah receptor (AhR) je transkripční faktor regulující mnoho buněčných procesů. Jednou z jeho hlavních rolí je regulace cytochromů P450, enzymů rodiny 1 (CYP1), které jsou zodpovědné nejen za detoxikaci, ale i metabolickou aktivaci mnoha environmentálních kontaminantů, jako je benzo[a]pyren (B[a]P). Vznikají tak genotoxické intermediáty, které se kovalentně vážou na DNA a vytvářejí stabilní adukty (Beischlag *et al.*, 2008; Dietrich a Kaina, 2010). AhR hraje důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi (Monteleone *et al.*, 2011). Studie zkoumající vliv prozánětlivých cytokinů na aktivitu AhR a expresi jeho cílových genů ukazují, že podíl řady enzymů regulovaných AhR na detoxikaci a eliminaci xenobiotik může být v podmínkách zánětlivé reakce významně ovlivněn (Aitken *et al.*, 2006; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Hlavním cílem diplomové práce bylo studovat interaktivní účinky reaktivních polycyklických uhlovodíků (PAU) se směsí zánětlivých mediátorů na expresi CYP1 enzymů regulovaných AhR, a metabolickou aktivaci B[a]P v modelové linii plicních epiteliálních buněk. V průběhu řešení diplomové práce byly postupně sledovány následující cíle:

- 1) Zpracování literární rešerše
- 2) Experimentální část:
 - a) Zvládnutí a optimalizace metod kultivace makrofágů a plicních epiteliálních buněk; zpracování kondiciovaného média s obsahem zánětlivých mediátorů;
 - b) Stanovení aktivace alveolárních makrofágů po působení lipopolysacharidu (LPS), detekce hladiny faktoru nekrotizujícího nádory (TNF- α); detekce hladiny enzymů cyklooxygenasy-2 (COX-2) a inducibilní synthasy NO (iNOS);
 - c) Detekce exprese enzymů metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků rodiny CYP1;
 - d) Studium interaktivních účinků B[a]P a kondiciovaného média na metabolickou aktivaci B[a]P a tvorbu stabilních DNA aduktů; potvrzení poškození DNA pomocí stanovení hladiny fosforylované formy proteinu p53;
 - e) Detekce hladiny metabolitů B[a]P v epiteliálních alveolárních buňkách a v médiu.

2 Teoretická část

2.1 Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)

Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který zprostředkovává široké spektrum biologických a toxických účinků svých ligandů v mnoha tkáních a živočišných druzích (Denison a Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2011). Je aktivován nejen rozmanitou skupinou exogenních toxických látek, ale i endogenními ligandy, které mohou ovlivňovat hladinu/aktivitu AhR, čímž ovlivňují citlivost jemu podřízených signálních drah. Aktivovaný AhR, jako transkripční faktor, reguluje genovou expresi řady cílových genů (Dietrich a Kaina, 2010) kontrolujících jak fyziologické funkce a řadu důležitých buněčných dějů, tak odpověď organismu na toxické environmentální polutanty (Harper *et al.*, 2006).

Aktivace AhR řadou environmentálních kontaminantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), halogenované aromatické uhlovodíky (HAU), jako jsou např. polychlorované bifenyly a dibenzo-*p*-dioxiny, vede k indukci genů kódujících biotransformační enzymy. Jejich působením dochází nejen k detoxikaci a vyloučení toxických látek z organismu, ale také k jejich aktivaci na genotoxické metabolity (Beischlag *et al.*, 2008; Dietrich a Kaina, 2010). AhR se tak podílí na procesu karcinogeneze, ale účastní se nejen procesů nádorové iniciace, ale i nádorové promoce a progresu (Wang *et al.*, 2004; Barouki *et al.*, 2007; Stejskalová *et al.*, 2011).

Většina ligandů, které se vážou na AhR a aktivují ho, jsou aromatické planární molekuly hydrofobního charakteru. Tyto látky mohou být rozděleny do několika hlavních kategorií. Nejvýznamnější skupinu látek tvoří exogenní ligandy, kam lze zařadit toxické environmentální polutanty, jako jsou PAU, mezi jejichž zástupce patří například 3-methylcholanthren, benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) a řada dalších. Tyto látky vznikají zejména neúplným spalováním organických sloučenin. PAU mohou vznikat jak přírodními procesy, tak činností člověka. Přírodními zdroji mohou být lesní požáry, vulkanické erupce apod., zatímco antropogenně vznikají při spalování fosilních paliv v dopravě, průmyslu i domácnostech, při likvidaci komunálního odpadu, a lze je nalézt i v ropných produktech. Mohou vznikat i nevhodnou tepelnou úpravou pokrmů (uzení, grilování, smažení), velké množství PAU je také obsaženo v cigaretovém kouři (Stejskalová *et al.*, 2011).

Dalším významným zástupcem exogenních ligandů AhR jsou HAU. Mezi nejvýznamnější z nich lze zařadit polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny, dibenzofurany a polychlorované bifenyly (PCB). Tyto látky mohou vznikat spalováním v různých průmyslových procesech, při zpracování papíru a dřevní hmoty, nebo v chemickém průmyslu chlorací fenolů (Denison *et al.*, 2011; Stejskalová *et al.*, 2011; Dietrich a Kaina, 2010;

Beischlag *et al.*, 2008; Denison a Nagy, 2003). Třídou nejsilnějších vysoko-afinitních AhR ligandů reprezentují zejména metabolicky stabilnější HAU, jejichž vazebná afinita je v rozmezí pM až nM, zatímco většina metabolicky méně stabilních PAU se váže s relativně nižší afinitou, v rozmezí nM až μM (Denison a Nagy, 2003). Některé PAU mohou ovšem aktivovat AhR i ve velmi nízkých pikomolárních koncentracích, jako např. indeno[1,2,3-*c,d*]pyren nebo benzo[*k*]fluoranthen (Machala *et al.*, 2001).

Bylo zjištěno, že kromě řady výše uvedených sloučenin, které jsou považovány za významné induktory AhR signální dráhy, existuje mnoho přírodních látek, které mohou také působit jako exogenní ligandy AhR, a tak aktivovat expresi jeho cílových genů (Dietrich a Kaina, 2010; Beischlag *et al.*, 2008; Denison a Nagy, 2003). Významným zdrojem těchto přirozeně se vyskytujících ligandů může být potrava (Stejskalová *et al.*, 2011). Mezi nejvýznamnější přirozeně se vyskytující dietární ligandy můžeme zařadit flavonoidy, karotenoidy, indoly (indol-3-karbinol), kurkumin, kvercetin, berberin a další AhR agonisty. Většina těchto látek se zdá být relativně slabými AhR ligandy. (Denison *et al.*, 2011; Stejskalová *et al.*, 2011; Dietrich a Kaina, 2010; Beischlag *et al.*, 2008; Denison a Nagy, 2003). Mezi exogenní agonisty či částečné agonisty AhR lze v neposlední době zařadit i syntetické polyaromatické látky jako jsou například syntetické flavonoidy (flavony), například α - a β -naftoflavon, nebo některá farmaka a pesticidy (Stejskalová *et al.*, 2011).

Strukturně odlišnou skupinu aktivátorů AhR představují potenciální endogenní ligandy. Do této kategorie látek můžeme zařadit sloučeniny, které jsou syntetizovány v těle vyšších organismů (Stejskalová *et al.*, 2011). Zástupce vysoko-afinitních endogenních ligandů se nepodařilo dodnes s jistotou identifikovat. Příkladem těchto látek jsou indigoidy (indigo a indirubin), metabolity kyseliny arachidonové neboli eikosanoidy (lipoxin A4, prostaglandiny), metabolity hemu (bilirubin, biliverdin, hemin) a především metabolity tryptofanu (Dietrich a Kaina, 2010; Denison a Nagy, 2003). Deriváty tryptofanu, jako jsou kynurenin, a zejména 6-formylindolo[3,2-*b*]karbazol (FICZ), patří mezi hlavní kandidátní endogenní AhR ligandy, které jsou v současné době studovány především díky své možné úloze v regulaci diferenciaci a funkcí buněk imunitního systému (Esser *et al.*, 2009).

Do dnešní doby bylo identifikováno více než čtyři sta exogenních AhR ligandů. Jedním z nejsilnějších známých agonistů AhR je 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-*p*-dioxin (TCDD), který je také využíván jako modelový ligand aktivace AhR. Obecně je přijímán názor, že toxicita TCDD a jemu strukturně podobných sloučenin je přímým důsledkem aktivace AhR (Dietrich a Kaina, 2010). TCDD je látka metabolicky inertní a není v organismu aktivována na genotoxické metabolity. Nicméně, je známo, že působí jako jeden z nejsilnějších nádorových promotorů v jaterní tkáni, ačkoli nádorově promoční efekt TCDD se zatím spolehlivě objasnit nepodařilo. TCDD indukuje zvýšenou expresi genů zodpovědných za metabolizaci xenobiotik

a endogenních hormonů, a má řadu toxických účinků, jako je hepatotoxicita, imunosuprese, teratogenita a karcinogeneze (Stejskalová *et al.*, 2011).

Mezi další modelové ligandy AhR reprezentující skupinu PAU patří B[a]P. Působí jako silný karcinogen na laboratorní zvířata a existuje řada důkazů pro podobné účinky B[a]P i na člověka. Je chemicky a biologicky inertní. Teprve po metabolické aktivaci se z něj stává látka s karcinogenními účinky. Reaktivní metabolity B[a]P jsou schopny interagovat s makromolekulárními strukturami buňky, včetně DNA, a iniciovat transformaci buněk (Lu *et al.*, 2011).

Bylo zjištěno, že AhR by mohl být aktivován také nezávisle na přítomnosti ligandu. Některé látky, které nejsou kompetitivně vázány na AhR, totiž mohou indukovat AhR dependentní genovou expresi. A to cestou metabolické přeměny na ligand, nebo ovlivněním jiné buněčné dráhy vedoucí k aktivaci AhR. Mezi tyto látky řadíme například omeprazol, thiabendazol, myristicin, karbaryl, kofein, pyridiny, nikotin a další (Denison a Nagy, 2003; Beischlag *et al.*, 2008). AhR může být také regulován pomocí signálů, jako je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Nicméně fyziologické a toxikologické důsledky aktivace AhR bez vazby ligandu jsou nejasné (Dietrich a Kaina, 2010).

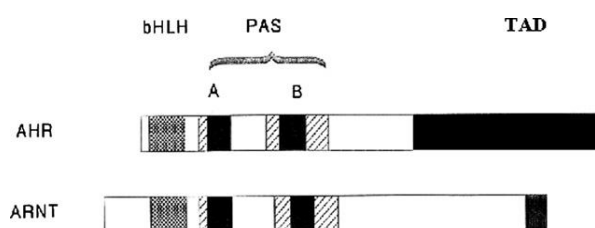
Důležitou roli v aktivaci a distribuci AhR v *in vitro* podmínkách hraje buněčná denzita. Při nízké hustotě buněk byl AhR lokalizován přednostně v jádře, při poloviční hustotě byl lokalizován rovnoměrně, v jádře i cytosolu, a v konfluentní populaci buněk byl AhR lokalizován zejména v cytoplazmě (Ikuta *et al.*, 2006). Bylo prokázáno, že denzita buněk ovlivňuje nejen lokalizaci AhR uvnitř buňky, ale také transkripční aktivaci AhR. Lokalizace a aktivita AhR daná buněčnou hustotou může být regulována maskováním sekvence pro jaderný export (NES). Pokud je sekvence maskována, je export AhR z jádra inhibován. Změna lokalizace AhR vyvolaná změnou hustoty buněk se jeví jako významný děj v biologické roli AhR (Ikuta *et al.*, 2006), který může přispívat ke kontrole odpovědi AhR na environmentální a fyziologické signály (Ikuta *et al.*, 2004).

Ačkoli jsou toxické a biologické účinky ligandů AhR dobře zdokumentovány, přesto přesné biochemické děje zodpovědné za odlišné účinky těchto sloučenin stále nejsou objasněny (Denison a Nagy, 2003). PAU mohou hladinu AhR ovlivňovat různě, v závislosti na povaze specifického ligandu, a na jednotlivém typu buněk nebo tkáni. Navíc, environmentální kontaminanty v reálných podmínkách nikdy nepůsobí jako chemické individuum, ale vždy účinkují jako směsi (Harper *et al.*, 2006). B[a]P například hladinu mRNA v buněčné kultuře myších embryonálních fibroblastů snižuje, zatímco 7, 12 -dimethylbenz[a]anthracen zvyšuje hladinu AhR mRNA i proteinu v potkaních játrech (*in vivo*) více než 25-krát. Opačné efekty pozorované v těchto systémech ukazují, že neexistuje jednoduchý universální mechanismus,

který by vysvětloval všechny varianty regulace ligandem aktivovaného AhR (Harper *et al.*, 2006).

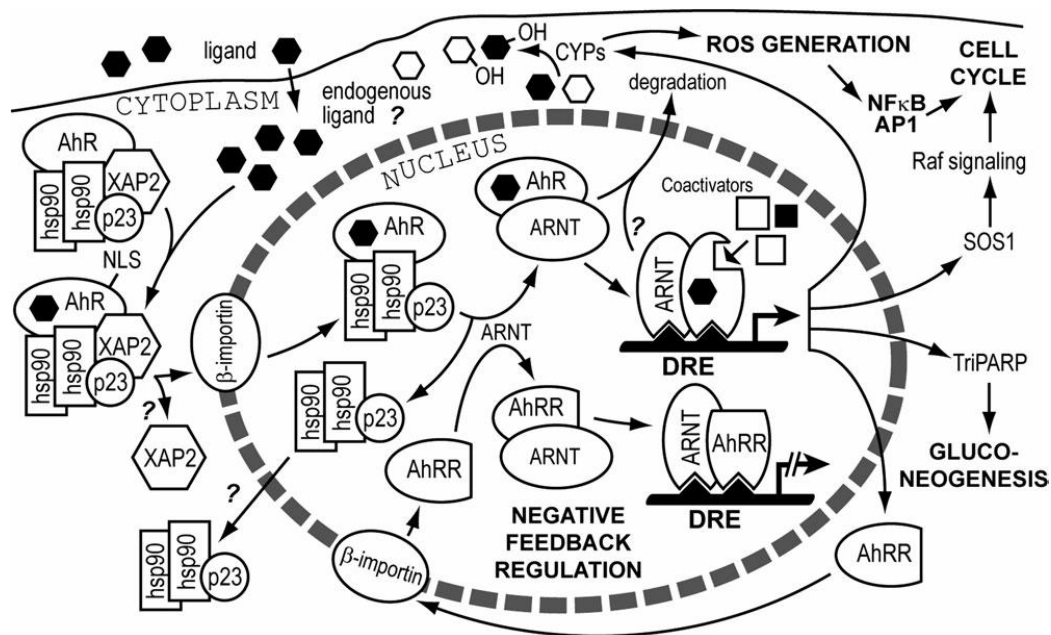
2.2 Regulace exprese a aktivace AhR

AhR patří do bHLH/PAS (*basic-helix-loop-helix/Period-Arnt-Sim*) rodiny transkripčních faktorů (Barouki *et al.*, 2007; McIntosh *et al.* 2010; Dietrich a Kaina, 2010). Z této rodiny proteinů je u obratlovců pouze AhR aktivován vazbou ligandu (Dietrich a Kaina, 2010). Proteiny obsahující PAS doménu se podílejí především na regulaci odpovědi organismu na environmentální změny. U savců jsou tyto proteiny zahrnuty do drah regulujících odpověď na hypoxii, cirkadiánní rytmy a toxické látky, jako je dioxin (McIntosh *et al.*, 2010). Funkční domény AhR a ARNT jsou uvedeny na Obr. 1.



Obrázek 1: Funkční domény AhR a ARNT (Hankinson, 2005).

(TAD...transkripční aktivační doména)



Obrázek 2: Klasický mechanismus AhR dependentní aktivace genové exprese (Denison *et al.*, 2011).

Aktivace AhR vyžaduje vazbu ligandu a následný přesun komplexu z cytoplazmy do buněčného jádra (Obr. 2). TCDD a další ligandy (agonisté) AhR vstupují do cílových buněk pomocí difuze, většina z nich je totiž lipofilní povahy, a tak snadno procházejí buněčnou membránou. Zde se specificky vážou na cytosolový AhR. Receptor se v cytosolu nachází v inaktivním stavu jako součást multiproteinového komplexu skládajícího se ze dvou molekul proteinu teplotního šoku 90 (hsp90), X-asociovaného proteinu 2 (XAP2; ARA9; známý také jako protein interagující s AhR – AIP), a ko-chaperonového proteinu p23. Po vazbě ligandu dochází ke konformační změně receptoru, čímž se odhalí N-terminální jaderná lokalizační sekvence (NLS) usnadňující přesun AhR proteinového komplexu s navázaným ligandem do jádra, a pravděpodobně dojde i k oddělení XAP2 proteinu. Následuje přesun proteinového komplexu do jádra. Zde dochází k vazbě AhR na strukturálně příbuzný jaderný protein ARNT (jaderný translokátor pro AhR), který byl identifikován v jaderném extraktu, jako další komponenta nutná pro vazbu AhR na DNA, a vede k vytlačení chaperonových proteinů hsp90 a p23 z proteinového komplexu (Denison *et al.*, 2011; Beischlag *et al.*, 2008).

Vzniklý heterodimer AhR s navázaným ligandem a ARNT se váže na odpovídající rozpoznávací místo na DNA - specifický responzivní element (označovaný jako DRE, XRE nebo AhRE) vyskytující se v promotoru cílového genu (Denison a Nagy, 2003). To vede k rozvolnění chromatinové struktury nukleosomů, interakci AhR s ko-aktivátory, zvýšení přístupnosti promotorové oblasti dalším transkripčním faktorům a následné aktivaci transkripce

cílových genů. Mezi nejvýznamnější geny regulované AhR patří geny kódujících enzymy I. a II. fáze biotransformace, kam patří zejména cytochromy P450 (CYP), chinonreduktasy (NQO1), aldehyddehydrogenasy (ALDH), glutation-S-transferasy a UDP-glukuronosyltransferasa (Denison *et al.*, 2011; Nebert *et al.*, 2000). Mezi další cílové geny AhR jsou však také řazeny geny kódující proteiny regulující buněčný cyklus, proliferaci a diferenciaci (*TGF-β2*, *IL-1β*, *PAI-2*, *p27^{Kip1}*, *jun-B*). (Mimura a Fujii-Kuriyama, 2003), DNA-polymerasa κ , nebo geny regulující apoptózu - *Bax* (Ikuta *et al.*, 2004).

Genová transkripce je ukončena disociací celého komplexu ligand : AhR : ARNT z responzivního DRE elementu a exportem AhR z jádra zpět do cytosolu zprostředkovaným pomocí N-terminální jaderné sekvence. V cytosolu dochází využitím ubiquitinu k označení AhR pro degradaci a jeho následné degradaci v proteasomu (Denison a Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2011).

Ah receptor také aktivuje transkripci represoru pro AhR (AhRR). Represor postrádá transaktivační doménu, a tak se uplatňuje v negativní regulaci AhR pomocí zpětnovazebné smyčky. AhRR dimerizuje s ARNT za vzniku neaktivního transkripčního komplexu AhRR : ARNT, který se váže do DRE oblasti, čímž brání vzniku funkčního dimeru AhR : ARNT, který by se vázal do DRE a spouštěl transkripci genů (Denison *et al.*, 2011).

Jak již bylo zmíněno, důležitou roli v transkripci genů aktivovaných AhR hraje specifický dioxinový responzivní element (DRE) známý také jako xenobiotický responzivní element (XRE), který se nachází v zesilovači promotoru cílového genu. Tato regulační oblast obsahuje typickou sekvenci 5'-GCGTG-3' (Mimura a Fujii-Kuriyama 2003; Dietrich a Kaina, 2010). Identifikace těchto elementů pomohla k odhalení nových genů regulovaných pomocí AhR (Beischlag *et al.*, 2008).

2.3 Funkce Ah receptoru

AhR je transkripční faktor, který je fylogeneticky velmi starý (Harper *et al.*, 2006). Expres AhR a jeho dimerizačního partnera ARNT byla nalezena u všech studovaných obratlovců. Studie provedené u bezobratlých organismů odhalily analogy těchto proteinů a poskytly informace o klíčových mechanismech regulujících expresi AhR během vývoje. Homology savčích AhR/ARNT byly identifikovány u *Caenorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster*, modelových organismů hojně využívaných ve vývojových studiích. U *C. elegans* se nachází homolog označovaný AhR-1 a jeho dimerizační partner, protein AhA-1, které se podílejí na vývoji nervového systému. *D. melanogaster* obsahuje homology protein Spineless a Tango, které kontrolují vývoj tykadel a končetin (Bock a Köhle 2006; Harper *et al.*, 2006).

AhR hraje důležitou roli během ontogenetického vývoje organismu (Wang *et al.*, 2004), včetně podílu na vývoji zárodečných buněk myši (vajíček) nebo vaskulárních struktur plodu (Ikuta *et al.*, 2004). Deregulace vývojových funkcí AhR může vést k projevu teratogenních účinků jeho toxických ligandů, jako je např. rozštěp patra (Bock a Köhle, 2006).

AhR se podílí na regulaci mnoha fyziologických procesů v organismu (Bock a Köhle, 2006). Fyziologické děje jsou zřejmě regulovány využitím endogenních ligandů (Wang *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2006). Existence endogenních fyziologických ligandů AhR byla zkoumána aktivací AhR signální dráhy v nepřítomnosti exogenního ligandu. U AhR^{-/-} myši byla potvrzena funkce AhR ve fyziologických procesech během vývoje organismu. AhR^{-/-} modely vykazovaly řadu fyziologických změn a vývojových abnormalit (Beischlag *et al.*, 2008), mj. byla odhalena role AhR při vývoji jater, uzavírání žilní spojky a v imunitním systému (Beischlag *et al.*, 2008).

AhR hraje zásadní roli v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci (Bock a Köhle, 2006), a také buněčného cyklu a apoptózy (Nebert *et al.*, 2000). AhR zprostředkovaná exprese CYP1A1 byla nalezena v mnoha typech buněk během buněčné diferenciaci (Nebert *et al.*, 2000). AhR spolupracuje s mnoha signálními molekulami zodpovědnými za přežití buňky a udržení buněčné proliferace. Jednou z těchto molekul je nukleární faktor NF-κB, který interaguje s AhR přímo pomocí podjednotky p65/RelA, v lidské buněčné linii odvozené od karcinomu prsu MCF-7. Tato interakce vede k transaktivaci proto-onkogenu *c-myc* a nabízí tak možný mechanismus, kterým AhR může přispět ke zvýšení proliferace a karcinogenezi v prsní tkáni (Barouki *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že AhR má také anti-proliferativní aktivitu, která je způsobena alespoň z části interakcí AhR s nádorovým supresorovým proteinem pRB vedoucí k bloku buněčného cyklu (Puga *et al.*, 2002).

V případě poškození buňky může aktivovaný AhR blokovat postup buněčného cyklu z G₁ do S fáze tvorbou komplexu s retinoblastomovým proteinem RB1 (AhR-RB1). Tento komplex následně vazbou blokuje transkripční faktor E2F, který se tak nemůže vázat do promotoru genů S-fáze buněčného cyklu a spouštět jejich transkripci (Puga *et al.*, 2009). Fosforylaci proteinu RB pomocí cyklin-dependentní kinas 2 (Cdk2-cyklin E) může být dosaženo uvolnění E2F z komplexu a spuštění transkripce genů specifických pro přechod G1/S. AhR může bránit transkripci genů specifických pro přechod G1/S také spuštěním exprese genu *Cdkn1a* vazbou do jeho XRE. Vznikající protein p21^{CIP1} je inhibítoem kinázové aktivity cyklin-dependentní kinas 2 (Cdk2-cyklin E). Inhibice kinas 2 vede k zablokování buněčného cyklu (Bock a Köhle, 2006).

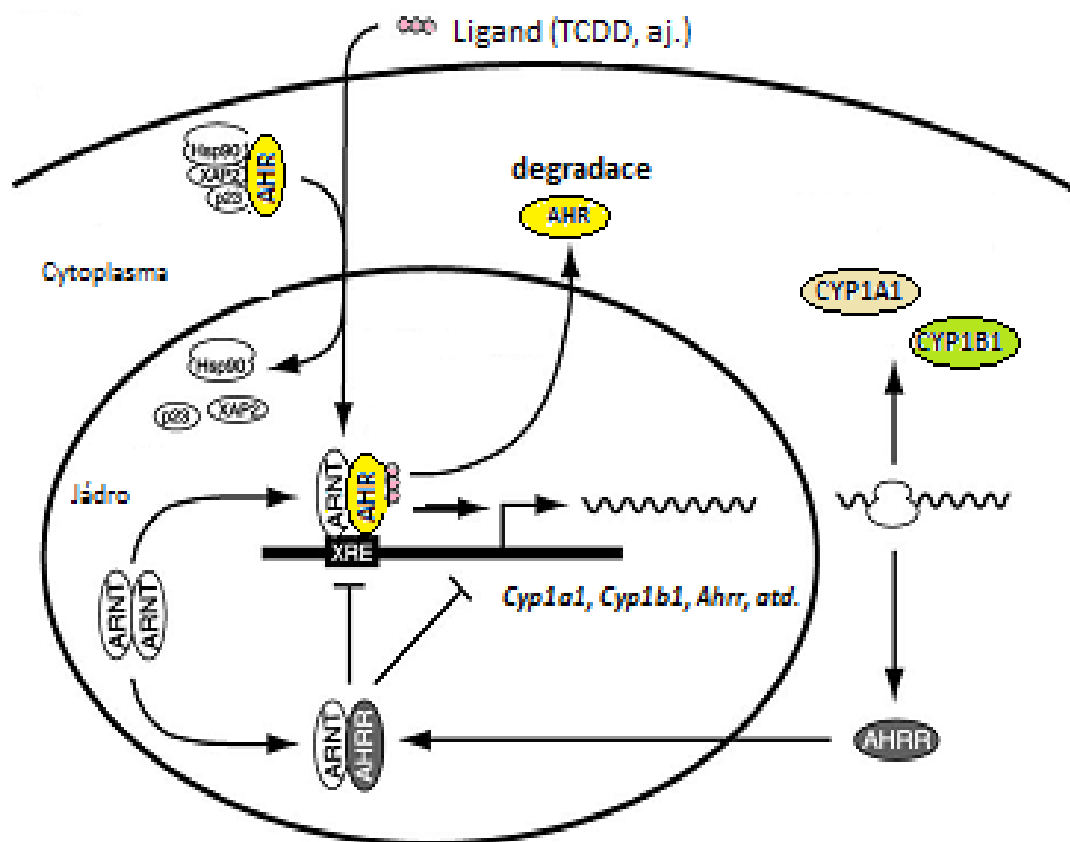
Apoptóza může být spuštěna mnoha vnějšími i vnitřními signály buňky, mezi které lze zahrnout aktivaci tzv. receptorů smrti, snížení exprese růstových faktorů nebo oxidativní stres. Oxidativní stres je v buňce vyvolán působením reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou vznikat např. metabolizací substrátů pomocí cytochromů P450. Oxidativní stres může způsobit

poškození DNA vyvolávající indukci apoptózy, závisle nebo nezávisle na proteinu p53. AhR a AhR-dependentní enzymy se podílejí jak na vzniku oxidativního stresu, tak na ochraně buňky před ním (Nebert *et al.*, 2000).

2.4 AhR a regulace transkripce Cyp1 rodiny; Metabolismus B[a]P a příbuzných sloučenin

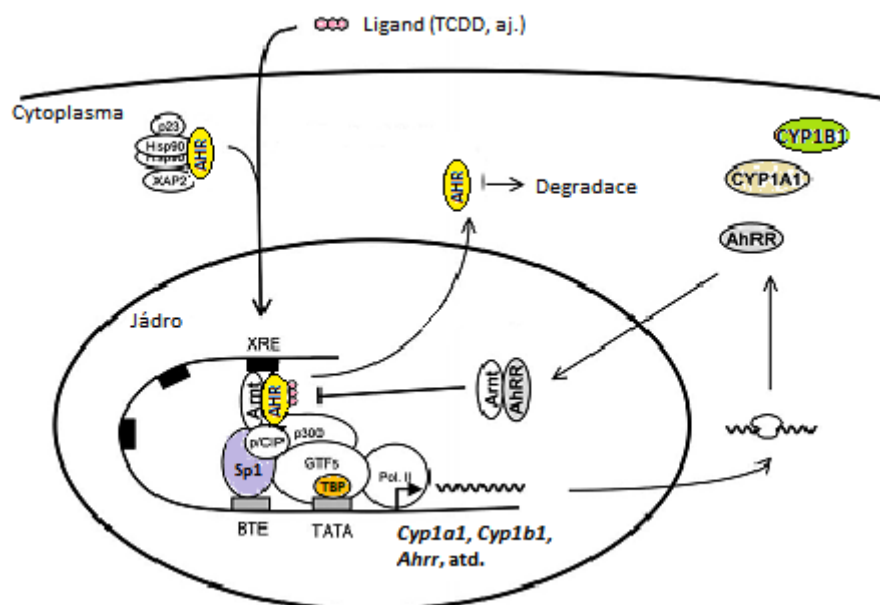
Jednou z hlavních rolí AhR je regulace enzymů CYP1 rodiny (Bock a Köhle, 2006). Mnohé substráty těchto enzymů jsou zároveň jako ligandy AhR (Nebert *et al.*, 2004). Toxické látky tedy mohou prostřednictvím AhR indukovat metabolizační enzymy, a jejich prostřednictvím i svůj vlastní metabolismus, čímž mohou být odstraněny z organismu (Beischlag *et al.*, 2008). U savců patří do CYP1 rodiny tři enzymy CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1, které jsou zodpovědné nejen za detoxifikaci, ale i metabolickou aktivaci mnoha environmentálních kontaminantů, především PAU, jako je B[a]P nebo aromatických aminů obsažených v produktech hoření (Nebert *et al.*, 2004; Beedanagari *et al.*, 2010; Bock a Köhle, 2006). Enzymy CYP1 rodiny mohou metabolizovat PAU za vzniku reaktivních intermediátů, které se kovalentně vážou na DNA a proteiny, a vytvářejí s nimi stabilní adukty. Ty vznikají tkáňově specificky, mají mutagenní účinky a přispívají ke zvýšenému riziku vzniku a rozvoje nádorů (Nebert *et al.*, 2004; Uno *et al.*, 2005; Beischlag *et al.*, 2008).

CYP1A1 je inducibilní enzym jehož exprese po indukci AhR ligandy byla nalezena v mnoha tkáních zahrnujících jaterní buňky, endoteliální buňky cév, epiteliální buňky pokožky a trávicího traktu, buňky plodu a embrya (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005). Bylo dokázáno, že exprese genu *CYP1A1* je indukována působením dioxinu a jiných PAU. Zvyšuje se po vazbě ligandem aktivovaného AhR na XRE v promotoru tohoto genu, jak je ukázáno na Obr. 3 (Mimura a Fujii-Kuriyama, 2003). Sekvence XRE genu *CYP1A1* jsou lokalizovány v zesilovači promotoru na 5'-konci genu (Hankinson, 2005).



Obrázek 3: Mechanismus transkripční aktivace AhR dependentních genů (například *CYP1A1*, *CYP1B1*) (upraveno podle Mimura a Fujii-Kuriyama, 2003).

Pro iniciaci transkripce *CYP1* genů je vyžadována vazba dalších ko-aktivátorů, jako jsou například proteiny TBP a Sp-1 vázající se na TATA box a BTE (základní transkripční element / GC box) v promotoru genu, nebo p300, p/CIP a další obecné transkripční faktory (GTFs). K nim přisedá RNA-polymerasa II (Pol II) dotvářející komplex nutný k zahájení transkripce cílových genů (Obr. 4). GC box a XRE sekvence se často objevují v promotoru genů indukovaných xenobiotiky, což naznačuje, že tyto elementy pravděpodobně společně zvyšují inducibilní expresi těchto genů (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005). Bazální hladina *CYP1A1* je většinou velmi nízká (Nebert *et al.*, 2004; Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).



Obrázek 4: Model signální dráhy AhR (upraveno podle Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).

Vysoké hodnoty konstitutivní exprese *CYP1A2* byly nalezeny v savčí jaterní tkáni. Lidský a potkaní gen *CYP1A2* je inducibilní v játrech, gastrointestinálním traktu, pankreatu, epitelu nosu, mozku a plicích (Murray *et al.*, 1997; Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005; Uno *et al.*, 2005).

Lidský gen *CYP1B1* byl objeven relativně nedávno ve srovnání s geny *CYP1A1* a *CYP1A2*, které byly zkoumány více než dvacet let (Uno *et al.*, 2005). Sekvenční analýza potvrdila 40% homologii enzymu *CYP1B1* s enzymy *CYP1A1* a *CYP1A2* (Murray *et al.*, 1997). *CYP1B1* vykazuje na rozdíl od *CYP1A1* značnou bazální aktivitu. Vysoké hodnoty jeho bazální exprese lze nalézt zejména v endoteliálních buňkách cév, kůře nadledvinek, ledvinách, plicích, trávicím traktu, buňkách imunitního systému, ale také v pohlavních žlázách (vaječníky, varlata), prsní a prostatické tkáni a děloze. (Zhang *et al.*, 2003; Uno *et al.*, 2005; Sissung *et al.*, 2006). Vysoká hladina *CYP1B1* proteinu byla pozorována i v mnoha nádorových tkáních (kolon, plíce, ledviny, močový měchýř), i v nádorech regulovaných steroidními hormony (prostata, prsní tkáň, děloha a vaječníky). To naznačuje, že *CYP1B1* může hrát zásadní endogenní roli v nádorových buňkách, a může se podílet na vývoji a progresi nádoru (Nebert *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že *CYP1B1* je účinná estrogenhydrolasa, je schopen 4-hydroxylace estradiolu na 4-hydroxyestradiol, který se významně podílí na vývoji nádoru v hormonální tkáni, a na tvorbě DNA aduktů (Murray *et al.*, 1997; Sissung *et al.*, 2006). Exprese *CYP1B1* pouze v nádorových tkáních by mohla poskytnout molekulární cíl pro výzkum nových protinádorových léčiv, které by byly selektivně aktivovány přímo v nádoru (Murray *et*

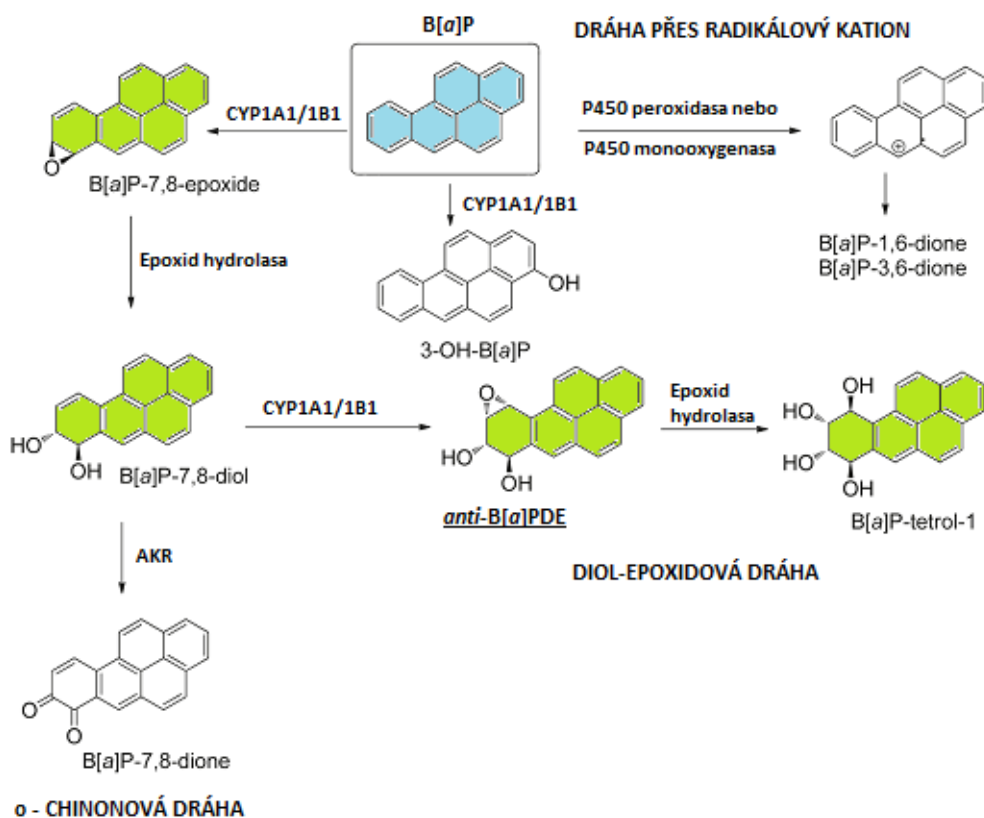
al., 1997). Naopak nízká konstitutivní exprese *CYP1B1* je např. v játrech a trávicím traktu, kde je však detekovatelná po působení PAU (Uno *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že *CYP1B1* je, stejně jako *CYP1A1*, značně katalyticky aktivní v aktivaci prokarcinogenů na karcinogenní metabolity, které zvyšují genotoxickou a oxidativní zátěž v buňce a způsobují iniciaci buněčné transformace v savčích pohlavních žlázách a plicní tkáni. (Sissung *et al.*, 2006). Lidský *CYP1B1* protein exprimovaný v kvasinkách byl schopen metabolizovat řadu domnělých lidských karcinogenů. (Murray *et al.*, 1997; Nebert *et al.*, 2004). V nedávné době bylo odhaleno nejméně šest genetických polymorfismů v lidském genu *CYP1B1*, které mohou přispívat k různé citlivosti jedinců k nádorovým onemocněním (Shimada *et al.*, 1999; Sissung *et al.*, 2006).

Míra exprese *CYP1A1* a *CYP1B1* se v mnoha tkáních liší, přesto inducibilní exprese obou genů je zprostředkována aktivací AhR pomocí TCDD a dalších PAU (Obr. 3). Inducibilní exprese lidského a potkaního genu *CYP1B1* je navíc, kromě hlavního transkripčního faktoru AhR, regulována dalšími drahami a transkripčními faktory, jako jsou transkripční faktor Sp1, transkripční faktor CREB využívající (cAMP) responzivní element, či estrogenní receptor (ER) (Zhang *et al.*, 2003; Sissung *et al.*, 2006). Zesilovací region promotoru *CYP1B1* genu se skládá ze tří XRE sekvencí a jedné E-box domény. Transkripce *CYP1B1* genu může být regulována i epigeneticky, methylací či acetylací histonů v promotoru genu (Sissung *et al.*, 2006).

PAU jsou aktivovány na reaktivní metabolity pomocí enzymů I. fáze (oxido-redukční enzymy) jako jsou CYP1, a detoxikovány enzymy I. i II. fáze (konjugační enzymy) (Uno *et al.*, 2005). V experimentech s myším *CYP1A1*^{-/-} modelem bylo dokázáno, že po orální expozici B[a]P došlo k úhynu těchto myší, zatímco zvýšená exprese *CYP1A1* vedla k ochraně wild-type myší před toxickými účinky B[a]P pomocí účinného detoxikačního mechanismu *CYP1A1* působícího ve střevní sliznici a játrech (Bock a Köhle, 2006), přestože předchozí studie prováděné *in vitro* a na buněčných kulturách naznačovaly, že hlavním enzymem podílejícím se na metabolické aktivaci B[a]P je *CYP1A1*. Ze studií provedených na *CYP1A1*^{-/-} a wild-type *CYP1A1* myších, kterým byl denně orálně podáván B[a]P vyplynulo, že poškození imunitního systému a tvorba B[a]P-DNA aduktů v játrech, tenkém střevě, slezině a kostní dřeni, byla mnohem vyšší v *CYP1A1*^{-/-} myších modelech. Navíc celkové vyloučení B[a]P bylo v *CYP1A1*^{-/-} myších znemožněno. Tyto výsledky u zkoumaných zvířat potvrdily, že *CYP1A1* má ve střevě a/nebo játrech důležitější roli v detoxikaci B[a]P než při jeho aktivaci (Uno *et al.*, 2005). Na detoxikaci a odstranění B[a]P z organismu má hlavní vliv enzym *CYP1A1*, ačkoli v jeho nepřítomnosti hraje důležitou roli *CYP1B1*. Navíc *CYP1B1* se zdá být odpovědný za metabolickou aktivaci B[a]P ve slezině a kostní dřeni, což může vést v nepřítomnosti *CYP1A1* k poškození imunitního systému (Uno *et al.*, 2005). Ačkoli *CYP1B1* sdílí pouze 40% homologii

s ostatními členy CYP1 rodiny, bylo zjištěno, že se podílí na metabolické aktivaci PAU podobnou, nebo dokonce vyšší mírou než CYP1A1 (Kim *et al.*, 1998).

B[a]P představuje modelový PAU, který má silné karcinogenní účinky na laboratorní zvířata. Z tohoto důvodu byl studován jeho vliv i na člověka, a byly zjištěny podobné efekty. Proto byl v nedávné době Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikován jako lidský karcinogen (Lu *et al.*, 2011). V mnoha studiích provedených u savců, bylo prokázáno, že B[a]P má cytotoxické, teratogenní, genotoxické, mutagenní a karcinogenní účinky. B[a]P se významně podílí na karcinogenezi plic a vzniku aterosklerózy u kuřáků. Je to sloučenina biologicky a chemicky inertní, aby byl schopen interagovat s DNA a proteiny v buňce, vyžaduje metabolickou aktivaci na reaktivní derivát (Lu *et al.*, 2011). B[a]P je jednou z hlavních toxických látek obsažených v cigaretovém kouři, výfukových plynech a produktech nedokonalého spalování organické hmoty. Jeho toxické intermediáty mohou být spojeny se vznikem nádorových onemocnění (Beedanagari *et al.*, 2010; Bock a Köhle, 2006). Prvním krokem metabolizace PAU pomocí enzymů CYP1A1 a CYP1B1 je oxidace (Beedanagari *et al.*, 2010). B[a]P je metabolizován třemi hlavními dráhami (Obr. 5) (Lu *et al.*, 2011).



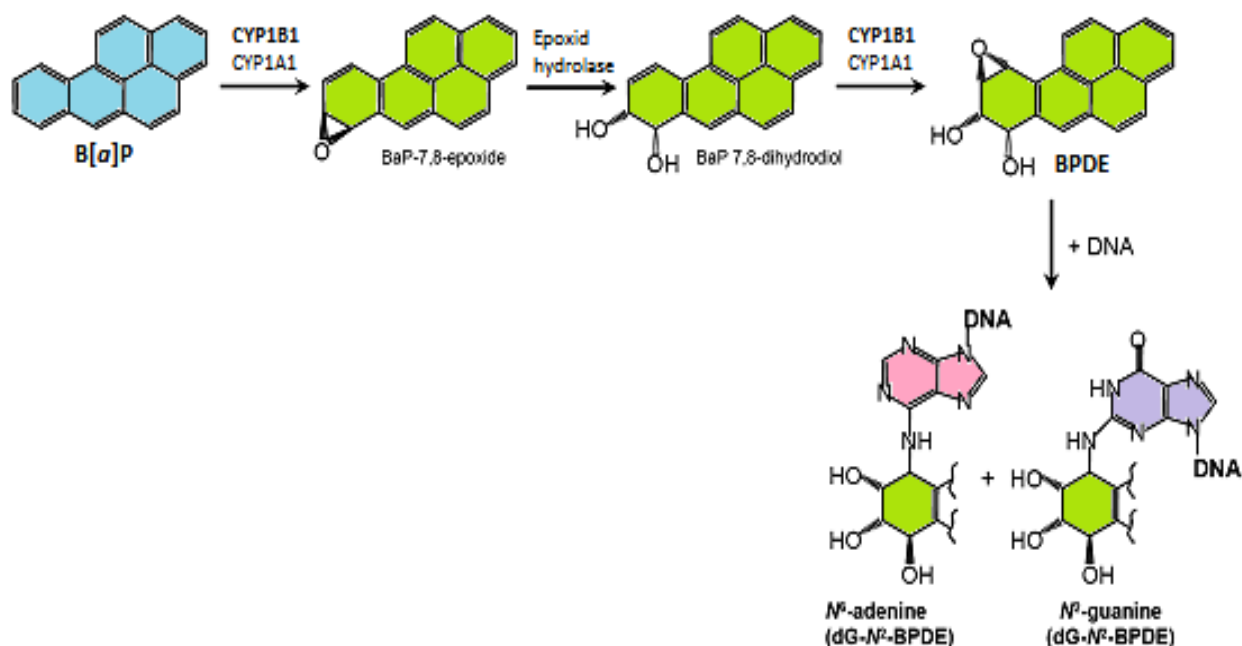
Obrázek 5: Hlavní metabolizační dráhy B[a]P (upraveno podle Lu *et al.*, 2011).

První metabolická cesta zahrnuje jednoelektronovou oxidaci B[a]P katalyzovanou P450 peroxidasou nebo monooxygenasou vedoucí ke vzniku B[a]P radikálu na uhlíku C6. Tento kationtový radikál je vysoce reaktivní a podílí se na tvorbě depurinovaných DNA aduktů (Lu *et al.*, 2011). Nakonec podstupuje monooxygenaci za vzniku 6-hydroxy-B[a]P, který autooxiduje na konečný B[a]P-3,6-dion a B[a]P-1,6-dion (Lu *et al.*, 2011).

V druhé metabolické dráze je B[a]P podroben monooxygenaci cytochromem P450 za vzniku série epoxidů. Funkční epoxidová skupina je mikrosomální epoxidhydrolasou přeměněna na dvě hydroxylové skupiny. B[a]P-7,8-dihydrodiol je dále opět monooxygenován cytochromy P450 1A1/1B1 na dihydrodiol-epoxidový metabolit *anti*-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren (BPDE). Tento metabolit může být dále hydrolyzován epoxidhydrolasou na B[a]P-tetrol-1 (Obr. 5) (Lu *et al.*, 2011). Zároveň je však BPDE vysoce reaktivní a je schopen reagovat s nukleofilní skupinou proteinů nebo DNA. Váže se na dusík guaninu, a vytváří tak kovalentní adukt na DNA (Obr. 6) (Dietrich a Kaina, 2010). Tato dráha vedoucí k dihydrodiol-epoxidům je nejvíce studována a pravděpodobně je zodpovědná za nádorově iniciační účinky B[a]P. Schopnost aduktů vytvářet mutace dále závisí na konformaci aduktu uvnitř DNA helixu, a schopnosti opravného systému identifikovat toto poškození. DNA adukty jsou vysoce stereospecifické. Jen jeden enantiomer (optický izomer) z páru může mít karcinogenní vlastnosti (Baird *et al.*, 2005). Dalšími souvisejícími metabolity generovanými CYP1 enzymy jsou 3-hydroxy B[a]P, nebo B[a]P-7,8-dihydrodiol a B[a]P-9,10-dihydrodiol (Lu *et al.*, 2011).

Třetí metabolická dráha B[a]P zahrnuje oxidaci B[a]P-7,8-dihydrodiolu na katechol pomocí dihydrodioldehydrogenasy patřící do superrodiny lidských aldo-keto reduktas (AKR). Katechol následně podléhá autooxidaci na B[a]P-7,8-dion (chinon), který může sám tvořit adukty s DNA, nebo je pomocí elektronů redukován opět na katechol. Cyklus přeměny chinonu na katechol a zpět vede ke vzniku ROS a oxidativnímu stresu vedoucímu k poškození DNA (Lu *et al.*, 2011).

In vitro studie využívající syntetické PAU a HAU metabolity přinesly důkazy o schopnosti vazby individuálních metabolitů na DNA. Poškození DNA bránící postupu polymerasy může pomoci objasnit, jak adukty přispívají ke vzniku mutací. Vazba PAU na DNA je esenciálním dějem iniciujícím tumorigenezi, nicméně mnoho otázek týkajících se vzniku nádoru zůstává zatím nezodpovězeno (Baird *et al.*, 2005).



Obrázek 6: Metabolická aktivace B[a]P na BPDE a následná tvorba DNA-aduktu (upraveno podle Aimová *et al.*, 2008).
(BPDE ...benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid)

2.5 Zánět a AhR, regulace Cyp1 rodiny zánětlivými faktory

Zánět je obranná reakce organismu na poškození způsobené různými faktory jako jsou například toxiny nebo patogenní mikroorganismy (bakterie, viry a houby) (Musah *et al.*, 2012; Morgan, 2009). Zánětlivá odpověď je spuštěna pomocí vrozené imunity a lze ji rozdělit na akutní a chronickou. Akutní zánět je krátkodobá fyziologická reakce organismu doprovázená horečkou, která má pro jedince spíše terapeutické účinky. Naopak chronický zánět je dlouhodobá reakce, která má pro organismus spíše patologické účinky (Aggarwal *et al.*, 2006). Chronický zánět je spojován s řadou chorob, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes, artritida, plicní a autoimunitní onemocnění, karcinogeneze (Aggarwal *et al.*, 2006). Zánět hraje klíčovou roli v karcinogenezi plic, ovlivňuje buněčnou transformaci, proliferaci, invazivitu a angiogenezi. Ze studií provedených u kuřáků vyplývá, že kouřením indukovaný zánět plic významně zvyšuje riziko vzniku nádorů plic (Smith *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008).

Imunitní odpověď je spuštěna aktivací například toll-like receptorů (TLR) na povrchu buněk imunitního systému vazbou patogenních komponent jako jsou nekrotické části buněk nebo bakteriální endotoxin LPS. Po rozpoznání těchto látek dojde k řetězci událostí, které vedou k uvolnění zánětlivých mediátorů z imunitních buněk s cílem eliminovat patogen (Morgan *et al.*, 2009). Mezi mediátory zánětu řadíme zejména prozánětlivé cytokiny jako interleukin-1 β

(IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), a faktor nekrotizující nádory α (tumor necrosis factor α / TNF- α), vazoaktivní aminy (histamin), lipidové mediátory (prostaglandiny), peptidy a oxid dusnatý (Morgan, 2009; Tao a Kobzik, 2001; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Stresovými podněty spouštějícími zánětlivou odpověď mohou být kromě cytokinů i mnohé hormony, jako např. glukokortikoidy z kůry nadledvinek, nebo glukagon z pankreatu, které mají potenciál regulovat cytochromy P450 během zánětu (Morgan, 2000).

Na průběhu zánětlivé reakce se podílejí také zánětlivé enzymy jako (COX-2) nebo (iNOS) (Aggarwal *et al.*, 2006). Exprese genů pro oba enzymy je pod kontrolou transkripčního faktoru NF- κ B a je regulována mnoha růstovými faktory, onkogeny a cytokiny; nejvýznamnější cytokiny indukující iNOS jsou TNF- α , IL-1 β a IFN- γ (Aggarwal *et al.*, 2006).

COX-2 je indukibilní isoforma enzymu prostaglandinsynthasy (Ptgs 2), která se podílí na přeměně kyseliny arachidonové na prostaglandiny. Tyto biologicky aktivní lipidy mohou regulovat patologické procesy, jako je rozvoj karcinogeneze nebo zánětlivé reakce, ale i onemocnění jako trombóza, artritida a aterosklerosa (Allaj *et al.*, 2013). Enzym COX-2 hraje zásadní roli v regulaci růstu a progresu mnoha nádorů, jeho zvýšená hladina byla nalezena v nádoru prsu, plicním adenokarcinomu, epitelálních nádorech, jícnu a dalších nádorových tkáních (Aggarwal *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). K indukci COX-2 mohou přispívat i některé AhR ligandy, bylo prokázáno, že např. kombinace B[a]P a TNF- α významně zvyšovala expresi COX-2 a produkci prostaglandinů v plicních epitelálních buňkách potkana (Umannová *et al.*, 2011).

iNOS je klíčový enzym generující z aminokyseliny L-argininu NO, který hraje důležitou roli v imunitní reakci. Účastní se obrany hostitele proti patogenům, zabíjí mikroorganismy a nitrosyluje makromolekuly, čímž přispívá k pozitivní regulaci zánětu (Aggarwal *et al.*, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007). Velké množství NO je produkováno zejména alveolárními makrofágy po aktivaci zánětlivými stimuly. Bylo však zjištěno, že po působení zánětlivých cytokinů IFN- γ a/nebo IL-1 β , jsou i alveolární epitelální buňky typu II (AEII) schopny produkovat NO, podílejí se tedy na zánětlivé odpovědi plic na inhalované patogeny (Punjabi *et al.*, 1994). iNOS je stejně jako COX-2 zapojena do mnoha buněčných pochodů ovlivňujících nádorovou transformaci buněk (Aggarwall *et al.*, 2006). NO působí cytotoxicky, podporuje působení cytostatik a pozitivně reguluje nádorovou transformaci (Aggarwall *et al.*, 2006). B[a]P významně zvyšuje hladinu iNOS indukovanou pomocí TNF- α (Umannová *et al.*, 2011).

Makrofágy za normálních podmínek v buňce produkují reaktivní formy kyslíku (ROS), které mají ochrannou funkci a slouží k zabití invadujícího patogenu (Aggarwal *et al.*, 2006). ROS (superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál) vznikají při redukcí atmosferického kyslíku, který je rozpuštěn uvnitř buňky, na vodu (Nebert *et al.*, 2000). Zvýšená produkce ROS,

například při chronické zánětlivé reakci, může způsobovat oxidační stres, tedy oxidační poškození DNA, které přispívá ke vzniku a vývoji mnoha onemocnění včetně nádorové iniciace (Nebert a Dalton, 2006; Vondráček *et al.*, 2011). ROS mohou měnit signální transdukční dráhy a indukovat změny v odpovědi transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1 na stres v buňce (Aggarwal *et al.*, 2006).

Transkripce genů aktivovaných během zánětu je regulována mnoha signálními drahami zahrnujícími NF- κ B, AP-1, STAT3 a C/EBP (Beischlag *et al.*, 2008). Lokální i systémový zánět v plicích epitelálních buňkách vedou k aktivaci NF- κ B dráhy, jejíž dlouhodobým působením dochází k poškození plic (Cheng *et al.*, 2007). Podjednotky rodiny NF- κ B p50/RelA jsou v neaktivní formě udržovány v cytoplasmě interakcí s inhibítozem NF- κ B (I κ B α). Ten zabraňuje vazbě importinu, a transportu dimeru do jádra. Translokace je umožněna aktivací I κ B kinasy (IKK) vazbou ligandu na toll-like receptor, která vede ke zvýšení aktivity I κ B kinasy (IKK). Komplex IKK následně fosforyluje inhibitor I κ B α , který je ubiquitinylován a degradován v proteasomu. Uvolněný dimer p50/RelA vstupuje do jádra, kde spouští transkripci NF- κ B cílových genů (Beischlag *et al.*, 2008).

Důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi hraje AhR (Monteleone *et al.*, 2011). Podíl řady enzymů, včetně enzymů regulovaných AhR, na detoxikaci a eliminaci xenobiotik může být během akutního nebo chronického zánětu významně snížen (Aitken *et al.*, 2006, Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Ze studií zkoumajících vliv prozánětlivých cytokinů na aktivitu AhR a expresi jeho cílových genů, zejména detoxikačních enzymů rodiny CYP1, vyplývá, že zánět a infekce obecně vedou k redukcí exprese a/nebo aktivity enzymů CYP1A1 a CYP1A2 (Morgan, 2000; Aitken *et al.*, 2006). To bylo pozorováno jak na klasických zvířecích modelech ovlivněných LPS, tak například v lidských hepatocytech (Richardson a Morgan, 2005; Garbel-Chaloin *et al.*, 2013). Snížená exprese těchto enzymů může vést k potlačení nebo naopak posílení terapeutických či toxických účinků xenobiotik a léčiv (Morgan, 1997; Morgan, 2000; Garbel-Chaloin *et al.*, 2013). Snížení exprese CYP1A1 a CYP1A2 je pravděpodobně regulováno na úrovni transkripce. Za vyvolání funkční represe genu CYP1A1 (hladiny mRNA a aktivity enzymu) během zánětlivé odpovědi je pravděpodobně zodpovědná antagonistická interakce mezi AhR a transkripčním faktorem NF- κ B aktivovaným vazbou cytokinu v promotoru genu CYP1A1 (Morgan, 2000; Ke *et al.*, 2001; Beischlag *et al.*, 2008). Interakce AhR se zánětlivými signálními drahami tak může hrát významnou roli v imunitní dysfunkci, deregulaci metabolismu xenobiotik a karcinogenezi (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Zatímco AhR indukovaná exprese CYP1A1 je v zánětlivých podmínkách snížena, exprese CYP1B1 indukovaná ligandy AhR (TCDD a B[a]P) je v jaterních buňkách potkana a plicních epitelálních buňkách po působení TNF- α významně posílena (Umannová *et al.*, 2008; 2011).

Při poškození epitelu trávicího traktu vedoucímu k zánětlivé odpovědi byla indukována exprese *CYP1B1* v jícnu potkana (Devlin *et al.*, 2009). Na posílení exprese *CYP1B1* v podmínkách zánětu se pravděpodobně bude podílet kromě AhR další signální dráha (Umannová *et al.*, 2011; Vondráček *et al.*, 2011). Úloha AhR v regulaci zánětu není jednoznačná, mimo jiné závisí na typu tkáně (Fardel, 2013). AhR ligandy mohou indukovat sekreci prozánětlivých cytokinů jako IL-1 β , IL-6 a TNF- α u různých typů buněk, především u primárních makrofágů. Produkce IL-6 a TNF- α indukovaná LPS byla výrazně snížena v myších AhR^{-/-} makrofázích ve srovnání s wild-type makrofágy (Fardel, 2013; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Z řady studií však také vyplývá, že AhR může naopak zeslabovat zánětlivou odpověď *in vivo*. Buňky získané z bronchoalveolární laváže plic AhR^{-/-} myši produkovaly více prozánětlivých cytokinů a indukce zánětu byla v plicích této myši posílena (Thatcher *et al.*, 2007). Některé AhR ligandy (TCDD a další) mohou suprimovat produkci prozánětlivých cytokinů. Pro- nebo protizánětlivé účinky AhR ligandů mohou záviset na druhu ligandu i na typu ovlivňovaných buněk (Vondráček *et al.*, 2011). Mechanismus odpovědný za protizánětlivé působení ligandů AhR může zahrnovat inhibiční účinek interakce AhR s NF- κ B (Tian *et al.*, 2002). Molekulárních mechanismů, kterými AhR a jeho ligandy mohou regulovat produkci cytokinů je několik. Klasická AhR signální dráha spočívá v aktivaci XRE v promotoru genu odpovídajícího cytokinu a spuštění jeho transkripce, AhR však navíc může přímo interagovat s dalšími transkripčními faktory jako Stat1, NF- κ B apod. a tím ovlivňovat produkci cytokinů (Fardel, 2013).

2.6 Modely plicních buněk použité v diplomové práci (linie MH-S, RLE-6TN)

Dýchací trakt představuje snadnou cestu pro potenciálně infekční mikroorganismy a škodlivé látky pocházející z inhalovaného vzduchu (McRitchie *et al.*, 2000). Plicní epitel vytváří fyzikální bariéru mezi vnějším prostředím a hostitelem, která ho chrání před škodlivými účinky vdechnutých částic a patogenů (Cheng *et al.*, 2007). Za snadnou a efektivní výměnu plynů (O₂ a CO₂) v plicích jsou zodpovědné plicní sklípky (alveoli). Právě zde dochází k propojení vnitřního prostředí organismu s environmentálními kontaminantami z životního prostředí (Mason, 2006). První obrannou linii v plicních sklípcích tvoří alveolární epiteliální buňky, které syntetizují a sekretují plicní surfaktanty; alveolární makrofágy a malé množství alveolární tekutiny (McRitchie *et al.*, 2000; Mason, 2006). Alveolární epitel je složen ze dvou hlavních typů buněk (pneumocytů), alveolární epiteliální buňky typu I a typu II. Buňky I. typu pokrývají 95 % povrchu plicního sklípku a slouží jako hlavní prostředek pro výměnu plynů a obsahují všechny pumpy a iontové kanály pro transcelulární transport sodíku. Buňky typu II

jsou studovány více než třicet let, mají odlišnou morfologii a pokrývají 5 % povrchu alveolu. Slouží jako progenitorové buňky plicního epitelu a jsou odpovědné za obnovu plicního epitelu při jeho poškození. Produkují surfaktanty, tj. směs fosfolipidů, lipidů a proteinů snižující povrchové napětí a usnadňující rozpoznání a eliminaci patogenů, hrají tedy významnou roli ve vrozené imunitě organismu (Mason, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007). Epiteliální buňky mohou prostřednictvím produkce cytokinů a chemokinů fungovat jako senzory invaze mikroorganismů (McRitchie *et al.*, 2000; Fehrenbach, 2000). Účinky inhalovaných environmentálních částic vedly u experimentálních zvířat ke změnám plicního epitelu a vzniku zánětu. Ze studií provedených *in vitro* bylo zjištěno, že částice jako oxid titaničitý (TiO₂), oxid křemičitý (SiO₂), zbytky ze spalování ropy a další toxické částice obsažené ve vzduchu mohou v alveolárních makrofázích i plicních epiteliálních buňkách indukovat produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou makrofágový zánětlivý protein (MIP-2), TNF α , IL-8 a IL-6 (Tao a Kobzik, 2001). Vhodným modelem pro studium vlivu zánětlivých faktorů na aktivaci promutagenů jsou buňky RLE-6TN, plicní alveolární epiteliální buňky typu II izolované z potkana F344. Bylo zjištěno, že dlouhodobá expozice plicního epitelu aromatickými uhlovodíky může vést k indukci zánětlivé odpovědi, chronickému zánětu a poškození plic u linie RLE-6TN. Vysoké dávky JP-8 (směs alifatických a PAU) indukují tvorbu vysoké hladiny ROS, prodlouženou aktivaci NF- κ B a zvýšenou expresi TNF- α a IL-8 (Boulares *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2006). Na základě těchto skutečností byla linie RLE-6TN využita v této práci pro studium indukce zánětlivých markerů, enzymů podílejících se na metabolické aktivaci B[a]P a tvorby B[a]P metabolitů po působení směsi zánětlivých mediátorů produkovaných modelovou buněčnou linií odvozenou od alveolárních makrofágů.

Alveolární makrofágy představují jedny z nejdůležitějších imunitních buněk tvořících první obrannou linii v lidských plicích a jsou odpovědné za aktivaci zánětlivé odpovědi vedoucí k odstranění patogenu (Sharma *et al.*, 2007; Rubovitch *et al.*, 2007). Alveolární makrofágy se vyskytují v těsné blízkosti plicních epiteliálních buněk, mohou s nimi interagovat a spolupracovat na imunitní odpovědi (Rubovitch *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že jak alveolární makrofágy, tak alveolární epiteliální buňky izolované z plic dospělého potkana produkovaly TNF- α po stimulaci LPS *in vitro* (Tao a Kobzik, 2001). LPS je endotoxin z buněčné stěny gram-negativních bakterií používaný jako model bakteriální infekce, která je doprovázena systémovými projevy zánětu (McRitchie *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2007). Alveolární makrofágy a alveolární epiteliální buňky spolu interagují v odpovědi na toxické částice a tato interakce je spojena se zvýšenou aktivací transkripčního faktoru NF- κ B a produkcí prozánětlivých cytokinů (Tao a Kobzik, 2001). K akutnímu poškození a onemocnění plic, které je částečně indukováno TNF- α uvolňovaného alveolárními makrofágy, mohou alveolární epiteliální buňky typu II aktivně přispívat produkcí chemoatraktantů. Ty přitahují neutrofilů do

místa poškození či zánětu (Sharma *et al.*, 2007). Ze studií provedených na ko-kulturách alveolárních makrofágů s alveolárními epiteliálními buňkami RLE-6TN vyplývá, že mezibuněčné interakce mezi těmito buňkami jsou důležitým faktorem ovlivňujícím prozánětlivou odpověď plic indukovanou prachovými částicemi z ovzduší. Bylo zjištěno, že kontakt RLE-AM je nezbytný pro zvýšenou produkci cytokinů a posílení prozánětlivé odpovědi indukované prachovými částicemi. Ko-kultivace AM-RLE může sloužit jako užitečný *in vitro* model pro studium biologických účinků toxických částic rozptýlených ve vzduchu (Tao a Kobzik, 2001). V rámci této práce byla pro indukci tvorby směsí zánětlivých mediátorů pomocí LPS izolovaného z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (významného plicního patogenu), jako vhodný model, použita buněčná linie myších alveolárních makrofágů (AM), označovaná MH-S (Mbawuike a Herscowitz, 1989).

3 Materiál a metody

3.1 Buněčné modely a kultivační podmínky

Pro přípravu kondiciovaného média obsahujícího zánětlivé faktory produkované makrofágy byla použita buněčná linie MH-S (ATCC), odvozená od myších alveolárních makrofágů. Tato buněčná linie byla získána z bronchoalveolární laváže myši Balb/cJ a následnou imortalizací buněk virem SV40. Vzniklá imortalizovaná adherentní buněčná linie MH-S si uchovává morfologii alveolárních makrofágů a je schopná aktivace pomocí lipopolysacharidu (LPS) (Mbawuike a Herscowitz, 1989).

Pro studium epiteliálních buněk byl zvolen model RLE-6TN (ATCC), buněčná linie odvozená od alveolárních epiteliálních buněk typu II potkana F344. Po izolaci byly buňky imortalizovány genem T-antigenem SV40, čímž byly získány 2 imortalizované netumorigenní buněčné linie RLE-6T a RLE-6TN. PCR analýza genomové DNA odhalila, že gen pro T-antigen je přítomen pouze v linii RLE-6T, z čehož vyplývá, že linie RLE-6TN pravděpodobně vznikla spontánní imortalizací a je tedy T-antigen negativní (Driscoll *et al.*, 1995).

Buňky MH-S byly kultivovány v růstovém médiu DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), se zvýšeným obsahem glukosy (4,5g/l), bez fenolové červeně, s L-glutaminem a s přidavkem 10% inaktivovaného fetálního telecího séra (FBS) se sníženým obsahem endotoxinů (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko).

Buňky byly pěstovány na kultivačních miskách (S = 60,1 cm², TPP, Trasadingen, Švýcarsko) umístěných v inkubátoru při teplotě 37°C, vlhkosti vzduchu 95% a atmosféře 5% CO₂. Buňky byly pasážovány dvakrát týdně. Po odsátí použitého média byly buňky od povrchu

uvolněny pomocí škrabky, resuspendovány v čerstvém médiu a následně naředěny na požadovanou koncentraci. Pro vlastní přípravu kondiciovaného média byly buňky vysévány v hustotě 10 000 buněk/cm² do kultivačního média na Petriho misky (S = 9,2 cm², TPP, Trasadingen, Švýcarsko), kde rostly 24 h. Následně byly ovlivněny pomocí LPS získaného z buněčné stěny gram-negativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* po dobu 24 h (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Tato látka měla aktivovat makrofágy ke zvýšené produkci zánětlivých mediátorů do okolního růstového média (McRitchie *et al.*, 2000; Rubovitch *et al.*, 2007). Lipopolysacharid, který byl použit k aktivaci makrofágů, byl použit ve výsledné koncentraci 1 μg/ml. Po 24 h bylo kondiciované médium odsáto z kultivačních misek, zcentrifugováno (200g, 5 min, 25 °C) a uchováno při -80 °C.

Buňky RLE-6TN byly kultivovány v růstovém médiu Ham's F12 s 2mM L-glutaminem bez antibiotik (Live Technologies, Praha, ČR) s přidavkem extraktu z bovinní hypofýzy (10 μg/ml) (Sigma P1476), insulínu (5 μg/ml) (Sigma I9278), růstového faktoru podobného insulínu (IGF, 2,5 ng/ml) (Sigma I3769), transferinu (1,25 μg/ml) (Sigma T-8158), myšního epidermálního růstového faktoru (mEGF, 2,5 ng/ml) (BD 354001) a s 5% FBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko).

Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích (S = 75 cm², TPP, Trasadingen, Švýcarsko) umístěných v inkubátoru při teplotě 37 °C, vlhkosti vzduchu 95% a atmosféře 5% CO₂. Buňky byly pasážovány dvakrát týdně. Po odstranění starého média byly opláchnuty roztokem PBS (phosphate buffered saline), následně byly od povrchu kultivační lahve uvolněny působením trypsinu s přidavkem EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko). Následně byly resuspendovány v čerstvém médiu a naředěny na požadovanou hustotu. Pro experimenty byly buňky vysévány v hustotě 30 000 buněk/cm² do připraveného kultivačního média na Petriho misky (S = 9,2 cm², TPP, Trasadingen, Švýcarsko), kde rostly 48 h při teplotě 37 °C, vlhkosti vzduchu 95% a atmosféře 5% CO₂. Potom byly ovlivněny příslušnými zkoumanými látkami, jak je podrobněji uvedeno ve výsledkové části práce.

3.2 Experimentální design

Buňky RLE-6TN byly v pokusech exponovány následujícím způsobem. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Praha, ČR), který byl použit také jako rozpouštědlo pro přípravu roztoku B[a]P. Buňky byly inkubovány s B[a]P (Ehrenstorfer, Augsburg, Německo) ve výsledné koncentraci 1 μM, a to buď samostatně, nebo v přítomnosti zánětlivých mediátorů. Ty byly na plicní buňky aplikovány v kondiciovaném médiu získaném z MH-S makrofágů aktivovaných LPS, a to v poměru 25 % kondiciovaného média a 75 % kultivačního média. Tento poměr byl stanoven na základě předběžných

experimentů. K vyvolání zánětlivé reakce v buňkách byl v některých experimentech také využit, jako pozitivní kontrola, modelový prozánětlivý cytokin TNF- α (Sigma-Aldrich, Praha, ČR), o výsledné koncentraci 20 ng/ml zvolené na základě předchozích experimentů prováděných na pracovišti (Umannová *et al.*, 2011). Po skončení expozice (6 nebo 24 h) byly buňky sklizeny a byly z nich připraveny buněčné lyzáty na analýzu metodou Western blotting; byla izolována mRNA pro analýzu genové exprese pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR). Dále byly také připraveny buněčné pelety a médium pro analýzu metabolitů B[a]P na kapalinovém chromatografu metodou LC/MS/MS a pelety buněk pro stanovení množství B[a]P-adtů metodou P³²-postlabeling, využívající značení nukleotidů radioizotopem fosforu P³².

3.3 Použité metody

Pro stanovení hladiny proteinů v celkových buněčných lyzátech byl použit Western blotting. K určení hladiny mRNA v buňkách byla použita qRT-PCR. Pro identifikaci metabolitů B[a]P vznikajících při metabolizaci v buňkách, bylo využito kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS). Vlastní stanovení metabolitů bylo provedeno spolupracující laboratoří na Oddělení chemie a toxikologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství (VÚVeL) v Brně, RNDr. Jiřím Nečou. Stanovení množství BPDE-DNA aduktů bylo provedeno P³²-postlabeling metodou využívající značení nukleotidů radioizotopem fosforu P³² v Laboratoři genetické toxikologie na Oddělení genetické ekotoxikologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR (ÚEM AV ČR) v Praze, vedené Ing. Janem Topinkou, DrSc.

3.3.1 Western blotting

Western blotting je imunodetekční semikvantitativní metoda sloužící k detekci proteinů. Je založena na elektroforéze, přenosu rozdělených proteinů na membránu a jejich následné detekci specifickou protilátkou.

Buňky byly po expozici studovanou látkou sklizeny a za použití lyzačního pufru z nich byly připraveny buněčné lyzáty. Z Petriho misek bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly opláchnuty studeným PBS. Následně byl přidán lyzační roztok složený z 1% SDS s přísadkou inhibitorů proteas (Protease Inhibitor Mix G) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a fosfatas (fluorid sodný (NaF), orthovanadát sodný (Na₃VO₄) (Fluka, Praha, ČR). Celkové buněčné lyzáty byly poté 10 min inkubovány na ledu, 10 min zahřáty na 90 °C a opět ochlazeny na ledu. Pak byly vzorky zcentrifugovány a sonikovány ultrazvukem. Celková koncentrace proteinů byla určena pomocí komerčního testu Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Následně byl přidán 1% β -merkapt ethanol

a 0,01% bromfenolová modř. Pro separaci jednotlivých proteinů ve vzorku bylo do všech jamek gelu nanášeno vždy stejné množství proteinu (20 µg/jamka).

Pro rozdělení proteinů byla využita elektroforetická separace (SDS-PAGE elektroforéza), která využívá principu dělení látek podle jejich mobility ve stejnosměrném elektrickém poli, kde rychlost pohybu částic je přímo úměrná jejich velikosti. Proteiny byly nanášeny do 4% zaostřovacího gelu, kde se mohly zarovnat na stejné výchozí pozici, aby se mohly následně rozdělit v 10% polyakrylamidovém gelu. Gel byl umístěn do vertikální elektroforetické vany mini VE (Hoefer, Holliston, MAS, USA) obsahující pufr složený z (200mM glycin; 25mM Tris; 3,5mM SDS) o pH = 8,3. Následoval přenos proteinů z gelu na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) pomocí mokrého přenosu/blotování v blotovací komoře naplněné transferovým puffem (192mM glycin; 25mM Tris, 20 obj. % methanol) za průchodu elektrického proudu. Nespecifická místa na membránách byla následně blokována jednu hodinu v roztoku 2,5% odtučněného mléka v promývacím puffu (5M NaCl; 2M Tris, 10% Tween, pH = 7,4) o pH = 7,2. Dále byly membrány inkubovány s primární protilátkou (Tab. 1) při 4 °C přes noc. Poté byly membrány opláchnuty v promývacím puffu a jednu hodinu inkubovány se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou (Tab. 2) při laboratorní teplotě. Po opětovném promytí v promývacím puffu byly membrány inkubovány 5 minut s chemiluminiscenčním substrátem (ECL Plus, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), které po reakci s křenovou peroxidasou produkoval chemiluminiscenční záření. Detekce byla provedena na rentgenový film pomocí automatického vyvolávače AGFA Curix 60 (Gevaert N. V., Belgie). Jako kontrola správného nanášení všech proteinů na gel sloužil β -aktin. Rovnoměrné přenesení proteinů na membránu bylo ověřeno jejím obarvením v 0,15% roztoku amidové černi s roztokem kyseliny octové, methanolu a vody v poměru 1:3:6.

Protein	Dodavatel, katalogové číslo	Ředění	Původ
Cox-2	Santa Cruz, sc-1747	1 : 500	králík
CYP1A1	Daiichi Pure Chemicals, 423635	1 : 1000	koza
CYP1B1	BD Pharmingen, 458511	1 : 3000	králík
IκBα	Santa Cruz, sc-203	1 : 1000	králík
iNOS	BD Biosciences, 610431	1 : 2000	myš
Fosfo-p53	Cell Signaling, cs-9284	1: 3000	králík
β-aktin	Sigma-Aldrich, A5441	1 : 5000	myš

Tabulka 1: Primární protilátky použité pro detekci proteinů.

Typ protilátky	Dodavatel, katalogové číslo	Koncentrace
anti-myší	Amersham NA 931	1 : 3000
anti-králičí	Amersham NA 934V	1 : 3000
anti-kozí	Santa Cruz sc-2020	1 : 5000

Tabulka 2: Sekundární protilátky použité pro detekci primárních protilátek.

3.3.2 Izolace RNA a qRT-PCR

Z buněk ovlivněných zkoumanou látkou byla izolována celková RNA s využitím komerční sady NucleoSpin RNA II Purification kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo), kdy bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Po odstranění média byly buňky opláchnuty studeným PBS a přidavkem lyzačního pufru zlyzovány. Centrifugací buněčného lyzátu přes kolonu s filtrem (11 000g /1min) došlo k odstranění nečistot. RNA byla poté precipitována ethanolem a zachycena na koloně. Pro efektivnější působení rDNasy k odstranění DNA ze vzorku byla RNA odsolena. Po deaktivaci DNasy došlo k vysušení a promytí membrány kolony. RNA byla eluována z kolony pomocí vody bez RNas. Koncentrace získané RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop při vlnové délce 260 nm.

Polymerázová řetězová reakce je metoda sloužící k rychlé a snadné amplifikaci specifických úseků DNA. Pro metodu kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (qRT-PCR) byla použita komerční sada SuperScript[®] III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA) umožňující jednokrokovou qRT-PCR. Při PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR) je nejprve DNA templát potřebný pro amplifikaci získán reverzní transkripcí z mRNA. Reverzní transkripce proběhla spolu s vlastní amplifikační reakcí v jednom kroku. Pro amplifikaci a detekci byl použit termocykler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Reakční směs pro qRT-PCR byla připravena podle návodu přiloženého ke komerční soupravě a její celkový objem činil 20 µl. Jednotlivé kroky/ podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 4.

Pomocí qRT-PCR byly detekovány hladiny mRNA genů *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Ptgs2* (kódující COX-2) a *Tnf* (kódující TNF- α). Sekvence specifických primerů a prób (nebo jejich identifikační UPL čísla) jsou uvedeny v Tab. 3. Byly použity dvojitě značené sondy (próby) z univerzální knihovny prób (Universal Probe Library, Roche Diagnostics, Mannheim, SRN), nebo próby syntetizované na zakázku (VBC Genomics, Vídeň, Rakousko). Jako referenční gen byl použit gen kódující velkou podjednotku RNA polymerázy II (*Polr2a*).

Gen	Identifikace genu	Sekvence primerů a prób	
<i>Cyp1a1</i>	NM_012541	F	5'-ATGTCCAGCTCTCAGATGATAAGGTC-3'
		R	5'-ATCCCTGCCAATCACTGTGTCTAAC-3'
		P	5'-CCAGGTACATGAGGCTCCAAGAGATAGC-3'
<i>Cyp1b1</i>	NM_012940	F	5'-CTCATCCTCTTTACCAGATACCCG-3'
		R	5'-GACGTATGGTAAGTTGGGTTGGTC-3'
		P	5'-CTCATGCAGGGCAGGCGGTCCCTCCCC-3'
<i>Ptgs2</i>	NM_017232	F	5'-CTACACCAGGGCCCTTCC-3'
		R	5'-TCCAGAACTTCTTTTGAATCAGG-3'
		P	# 5
<i>Tnf</i>	NM_012675.2	F	5'-GCCCAGACCCTCACACTC-3'
		R	5'-CCACTCCAGCTGCTCCTC T-3'
		P	# 119
<i>Polr2a</i>	XM_343922.3	F	5'-CCAAGTTCAACCAAGCCATT-3'
		R	5'-AGACTGAGCAGCCAAAGCTC-3'
		P	# 80

Tabulka 3: Sekvence primerů a prób použitých pro qRT-PCR

(F) levý primer; (R) pravý primer; (P) próba

Krok	Délka kroku	Teplota
Reverzní transkripce	15 min	50 °C
Iniciační krok	2 min	90 °C
Cyklování (40 cyklů)	1. Denaturace dsDNA	15 s
	2. Navázání primerů (annealing),	30 s
	3. Elongace (extenze)	

Tabulka 4: Reakční podmínky qRT-PCR

Pro vyhodnocení relativního množství RNA/genu ve vzorku, byl v každém cyklu amplifikace, po odštěpení fluorescenčního zhášedce na 3'- konci próby DNA-polymerasou, detekován fluorescenční signál. Ten odpovídal množství PCR produktů, a byl nepřímo úměrný Ct (*threshold cycle*) parametru. Ct je cyklus amplifikace, ve kterém hodnota fluorescence reakce překoná prahovou fluorescenci (threshold). Výsledná relativní exprese genů (R) byla vypočítána komparativní metodou, podle vztahu $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, jak je uvedeno v literatuře (Livak a Schmittgen, 2001).

3.3.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS)

Chromatografické metody patří mezi separační techniky sloužící k rozdělení a analýze sloučenin obsažených ve směsích. LC/MS/MS je vysoce selektivní a senzitivní metoda vhodná například pro analýzu léčiv, sloučenin obsažených v životním prostředí a jejich metabolitů (Petrovič *et al.*, 2005). Tato metoda umožňuje shromažďovat kvantitativní i strukturní informace, a nabízí univerzální nástroj pro provedení většiny profilovacích studií metabolitů (Theodoridis *et al.*, 2012). Byly stanoveny jak metabolity B[a]P obsažené v plicích alveolárních buňkách RLE-6TN, tak metabolity B[a]P vyloučené po metabolizaci do růstového média, ve kterém byly buňky kultivovány. Vlastní stanovení bylo provedeno spolupracujícím pracovištěm Oddělení chemie a toxikologie VÚVeL, Brno.

Pro analýzu metabolitů obsažených v buňkách byly buňky sklizeny do 1,5 ml zkumavek, promyty pomocí fosfátového pufru (PBS) a zcentrifugovány (200g/5min). Metabolity B[a]P byly z buněčného peletu získány dvojnásobnou extrakcí za použití 2 x 700 µl octanu ethylatého. Extrakty byly smíchány a rozpouštědlo bylo odfoukáno proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl methanolu a alikvot o objemu 10 µl byl nadávkován do HPLC kolony.

Pro izolaci B[a]P a jeho metabolitů z kultivačního média byla využita extrakce na pevné fázi (SPE). Extrakce byla provedena na SPE kolonkách (Sigma-Aldrich, Praha, ČR), naplněných nepolárním polymerem s hydrofilní modifikací (HLB, 30 mg, 1 ml) umožňující zadržení nepolárních i polárních sloučenin. SPE kolonky byly nejdříve vyčištěny (aktivovány) promytím 1 ml methanolu a následně ekvilibrovány promytím 1 ml vody. Po nanesení 2 ml kultivačního média byly kolonky promyty 1 ml vody (přečištění vzorku) a sledované analyty byly z kolonky eluovány 1,5 ml methanolu. Rozpouštědlo bylo odfoukáno proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 50 µl methanolu. Do HPLC kolony bylo nadávkováno 5 µl vzorku.

Analyty obsažené v médiu jsou přítomny i ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou a sulfátem. Proto byl alikvot vzorků média před SPE extrakcí podroben enzymatické a chemické hydrolýze. Pro enzymovou hydrolýzu byla použita směs enzymů obsahující β-glukuronidasu a arylsulphatasu (Merck, Darmstadt, Německo). Vzorek kultivačního média byl rozdělen na dvě části, z nichž jedna byla podrobena enzymové a druhá chemické hydrolýze. V 1 ml média bylo upraveno pH pomocí kyseliny octové na hodnotu 5,6 a přidán 1 ml 0,2 M octanu sodného o pH 5,1. K takto upravenému médiu bylo přidáno 20 µl enzymové směsi. Vzorky byly inkubovány přes noc (16 hodin) při 37 °C. Po inkubaci byl vzorek ochlazen a aplikován na SPE kolonu. Ve druhé části média byly konjugované metabolity hydrolyzovány chemicky pomocí kyseliny chlorovodíkové. K 1 ml média bylo přidáno 200 µl 1

M HCl. Směs byla inkubována 1 hodinu při 90 °C. Po ochlazení byl vzorek aplikován na SPE kolonu.

Separace a analýza metabolitů obsažených ve vzorcích byla provedena pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS). Kapalinový chromatograf Agilent 1200 (Agilent Technologies, Německo) se skládal z binární pumpy, vakuového degaseru, automatického dávkovače vzorků a termostatu kolon. Pro separaci byla použita kolona Supelcosil LC-PAH o rozměrech 3 x 150 mm s velikostí 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Analyty byly z kolony eluovány gradientem methanolu ve vodě: 0-34 min., 40-88% methanol. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, kolona byla vyhřívána na 45 °C. Analyty byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies, USA). Pro ionizaci sloučenin byla použita chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI), měření bylo provedeno v pozitivním módu.

Hmotnostní spektrometr 6410 Triple Quadrupole LC/MS/MS využívá pro realizaci MS/MS experimentu kolizní celu na bázi hexapólu, který z možných uspořádání představuje optimum z hlediska transmise a fokusace iontu. Nejdůležitější charakteristikou kolizní cely v trojitém kvadrupólu v uspořádání LC/MS/MS je rychlost prováděných MS/MS experimentů. Trojitý kvadrupol může pracovat v několika režimech, pro kvantifikaci analytů, zejména v oblasti nízkých koncentrací, je ale nejvhodnější tzv. MRM režim, neboli Multiple-Reaction Monitoring. V tomto režimu první kvadrupól propouští vždy jeden vybraný iont s charakteristickou hodnotou m/z pro daný analyt (nejčastěji molekulový ion), v kolizní cele dochází k jeho fragmentaci, a druhý kvadrupól pak propouští charakteristický produktový iont. Jeden pár prekurzorového/produktového iontu se označuje jako tzv. MRM přechod. Pro kvantifikaci sledovaných analytů byly zvoleny následující MRM přechody. Pro dihydrodioly byl zvolen MRM přechod s hodnotou m/z 269,1 → 239,1, pro díony m/z 283,1 → 226,1 a pro hydroxy-B[a]P m/z 269,1 → 239,1.

3.3.4 Analýza DNA aduktů

Množství DNA-aduktů bylo stanoveno pomocí metody P³²-postlabeling využívající značení nukleotidů radioizotopem fosforu P³² Laboratoří genetické ekotoxikologie ÚEM AV ČR. Tato metoda je vhodná pro stanovení DNA aduktů nesubstituovaných PAU. Pro analýzu DNA-aduktů byla použita buněčná linie RLE-6TN, buňky byly sklizeny do 1,5 ml zkumavek, promyty pomocí fosfátového pufru (PBS) a zcentrifugovány (200g/ 5min). Pro analýzu byl využit buněčný pelet, ze kterého byla izolována DNA. Vzorky DNA byly poté štěpeny směsí mikrokokálních endonukleas a slezinových fosfodiesteras 4 h při 37 °C. Značené DNA adukty

byly poté rozlišeny dvojdimenzionální chromatografií na tenké vrstvě (TLC). Jako mobilní fáze byly použity následující látky: první rozpouštědlo 1M fosfát sodný o pH = 6,8; následně směs látek 3,8M lithium formiát a 8,5M močovina o pH = 3,5 a následně rozpouštědlo připravené z 0,8M chloridu lithného, 0,5M Tris a 8,5M močoviny o pH = 8,0.

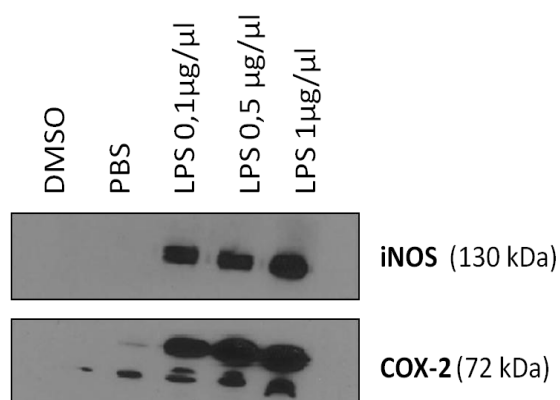
Autoradiografie (metoda sloužící k identifikaci, lokalizaci a měření množství radioaktivních látek ve zkoumaných objektech) byla provedena pomocí expozice na rentgenové filmy při -80 °C po dobu 6, 24 a 92 h. Radioaktivita spotu odpovídajícího aduktu BPDE-DNA byla měřena pomocí kapalínového scintilačního počítače. Tento přístroj slouží k detekci jednotlivých částic nebo kvant energie emitovaných radioaktivní látkou.

K určení přesného množství DNA v každém vzorku byly alikvoty DNA enzymového digestu (1 µg DNA hydrolysat) podrobeny analýze HPLC na reverzních fázích s následnou UV-detekcí, pomocí které byl analyzován obsah nukleotidů ve vzorku; současně tato metoda poskytovala kontrolu čistoty DNA. Množství detekovaných DNA aduktů bylo poté vyjádřeno jako počet aduktů na 10^8 nukleotidu. Jak vzorky, tak standardy pro BPDE-DNA adukty byly měřeny v triplicátech pro kontrolu variability mezi jednotlivými opakováními. Standardy sloužily k normalizaci naměřených hodnot DNA-aduktů.

4 Experimentální část

4.1 Stanovení aktivace alveolárních makrofágů (MH-S) za použití LPS; příprava kondiciovaného média

Interaktivní účinky B[a]P a směsi zánětlivých mediátorů byly studovány na modelové linii plicních epitelálních buněk RLE-6TN. Pro získání směsi zánětlivých mediátorů byla použita modelová buněčná linie MH-S odvozená od myších alveolárních makrofágů. Buněčná linie MH-S byla aktivována pomocí lipopolysacharidu (LPS) izolovaného z povrchu gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, s cílem stimulovat makrofágy k tvorbě prozánětlivých cytokinů. Po indukci MH-S buněk pomocí LPS byla metodou Western blotting stanovena změna hladiny enzymů iNOS a COX-2, které se podílejí na zánětlivých procesech a exprese jejich genů je po indukci zánětlivými cytokiny významně posílena (Aggarwal *et al.*, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007). Expozice MH-S buněk 0,1; 0,5 a 1 μg/μl LPS po dobu 24 h vedla k výraznému zvýšení hladiny enzymů iNOS a COX-2 ve srovnání s kontrolním neovlivněným vzorkem (DMSO) (Obr. 7), což potvrzuje aktivaci myších alveolárních makrofágů MH-S k produkci zánětlivých mediátorů.



Obrázek 7: Indukce enzymů iNOS a COX-2 po 24-hodinové inkubaci s testovanou látkou (LPS o koncentraci 0,1; 0,5 a 1 μg/μl) v porovnání s kontrolním vzorkem (DMSO) u buněčné linie MH-S. Fosfátový pufr (PBS) byl použit jako rozpouštědlo LPS - negativní kontrola. Na obrázku jsou uvedeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých opakování stanovených metodou Western blotting.

Po ověření aktivace MH-S buněk z nich bylo připraveno kondiciované médium. MH-S buňky byly aktivovány LPS (1 μg/μl; tato koncentrace způsobovala maximální indukci iNOS)

po dobu 24 h. Poté bylo médium sesbíráno z kultivačních misek, smícháno dohromady a zcentrifugováno. Je známo, že buňky MH-S uvolňují do média řadu zánětlivých cytokinů a dalších mediátorů, zejména po aktivaci LPS (Chen *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008). Takto připravené kondiciované médium bylo dále využito jako model pro simulaci zánětlivých podmínek. Objem kondiciovaného média, které bylo použito pro ovlivnění alveolárních epiteliálních buněk, tvořil vždy ¼ objemu kultivačního média, ve kterém alveolárních epiteliální buňky rostly. Tento poměr byl zvolen na základě výsledků předběžných experimentů.

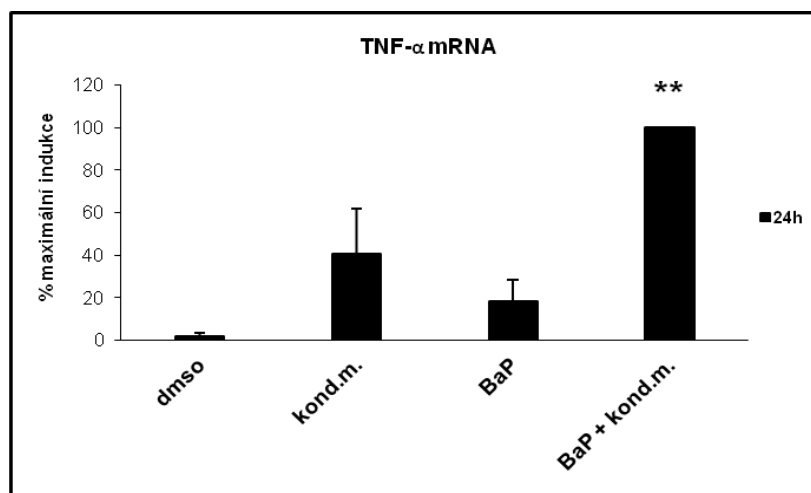
4.2 Potvrzení aktivace zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN pomocí kondiciovaného média - detekce indukce exprese genů *Tnf* (TNF- α), *Ptgs2* (COX-2) a stanovení degradace *I κ B α*

Aktivace zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN kondiciovaným médiem byla stanovena pomocí analýzy aktivity signální dráhy NF- κ B podílející se na zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou např. TNF- α , IL-6 a IL-1 β během zánětlivé odpovědi. Byla provedena detekce hladiny mRNA prozánětlivého cytokinu TNF- α produkovaného buňkami RLE-6TN v zánětlivých podmínkách. Ovlivnění buněk RLE-6TN kondiciovaným médiem po dobu 24 h vedlo k nárůstu hladiny TNF- α mRNA oproti kontrole. Ve srovnání s expozicí buněk RLE-6TN kondiciovaným médiem, došlo po expozici buněk RLE-6TN 1 μ M B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem ke statisticky významnému zvýšení hladiny TNF- α mRNA (Obr. 8). Tím bylo potvrzeno, že kombinované působení B[a]P a zánětlivých mediátorů výrazně posiluje indukci hladiny TNF- α mRNA.

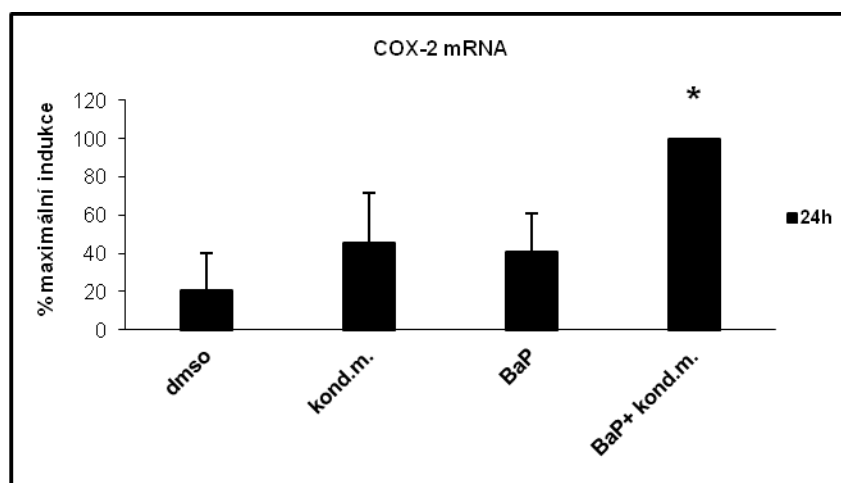
V našich experimentech bylo dále ukázáno, že expozice buněk RLE-6TN samotným 1 μ M B[a]P nebo kondiciovaným médiem po dobu 24 h vedla k mírnému zvýšení hladiny COX-2 mRNA oproti kontrole. K výraznému nárůstu hladiny COX-2 mRNA v buňkách RLE-6TN opět došlo po 24-hodinovém působení kondiciovaného média v kombinaci s 1 μ M B[a]P (Obr. 9). Analýza hladiny proteinu COX-2 pomocí metody Western blotting prokázala, že k posílení indukce hladiny tohoto enzymu došlo po působení kondiciovaného média, nebo jeho kombinace s 1 μ M B[a]P již po 6 h a zvýšená hladina byla pozorována i po 24-hodinové inkubaci (Obr. 10).

Konečně, pomocí metody Western blotting byla prokázána degradace inhibitoru NF- κ B (*I κ B α*), čímž byla potvrzena aktivace signální dráhy NF- κ B v zánětlivých podmínkách v buňkách RLE-6TN. Po 6-hodinové inkubaci buněk RLE-6TN s kondiciovaným médiem nebo

kombinací kondiciovaného média s 1 μ M B[a]P docházelo v obou případech k výraznému snížení hladiny proteinu I κ B α (Obr. 10).

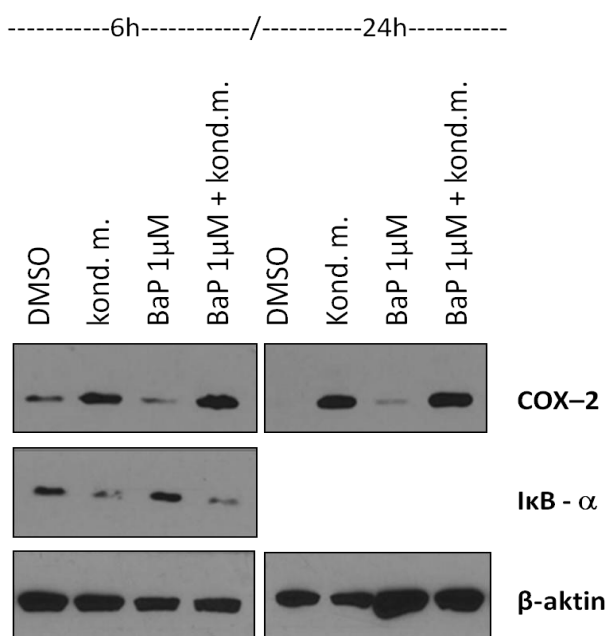


Obrázek 8: Změna hladiny TNF- α mRNA po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1 μ M B[a]P; kondiciovaným médiem a jejich kombinací) u buněčné linie RLE-6TN. Graf udává relativní hladinu mRNA jednotlivých genů uvedenou v procentech maximální indukce. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symbol (**) udává statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) hladiny TNF- α mRNA mezi skupinou ovlivněnou pouze kondiciovaným médiem a buňkami ovlivněnými kombinací B[a]P s kondiciovaným médiem. Stanovení statistické významnosti bylo provedeno statistickou analýzou ANOVA za využití Tukeyova testu.



Obrázek 9: Změna hladiny COX-2 mRNA po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1 μ M B[a]P; kondiciovaným médiem a jejich kombinací) u buněčné linie RLE-6TN. Graf udává relativní hladinu mRNA jednotlivých genů uvedenou v procentech maximální indukce. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří

nezávislých opakování. Symbol (*) udává statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) hladiny COX-2 mRNA mezi skupinou ovlivněnou pouze kondiciovaným médiem a buňkami ovlivněnými kombinací B[a]P s kondiciovaným médiem. Stanovení statistické významnosti bylo provedeno statistickou analýzou ANOVA za využití Tukeyova testu.

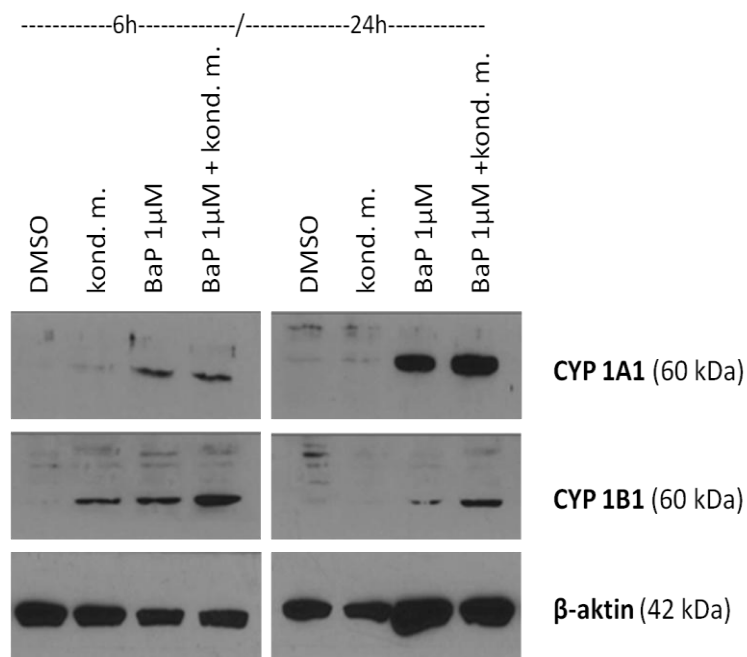


Obrázek 10: Změny hladiny proteinů COX-2 a IκBα po 6- a 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1μM B[a]P; kondiciovaným médiem a jejich kombinací) u buněčné linie RLE-6TN. Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní výsledky tří nezávislých opakování.

4.3 Stanovení hladiny proteinů CYP1 rodiny podílejících se na metabolizaci B[a]P v zánětlivých podmínkách v buněčné linii RLE-6TN

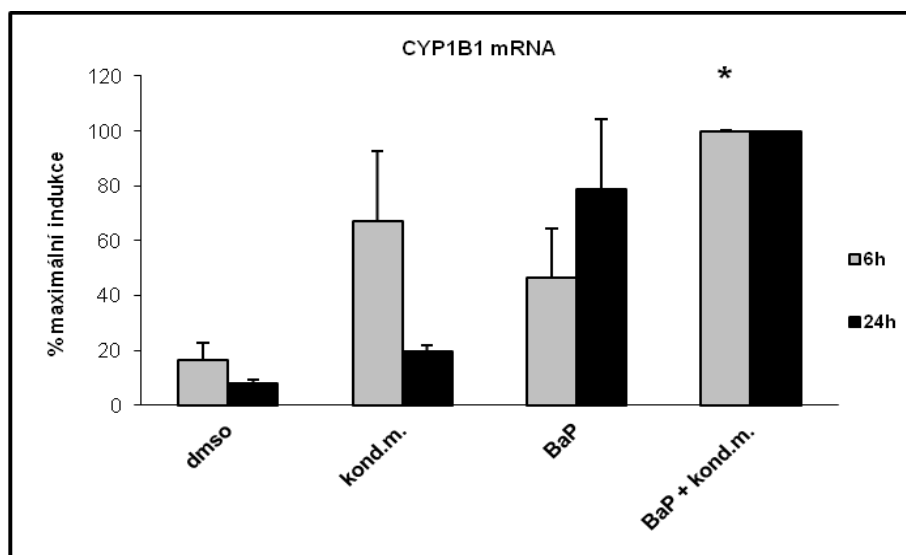
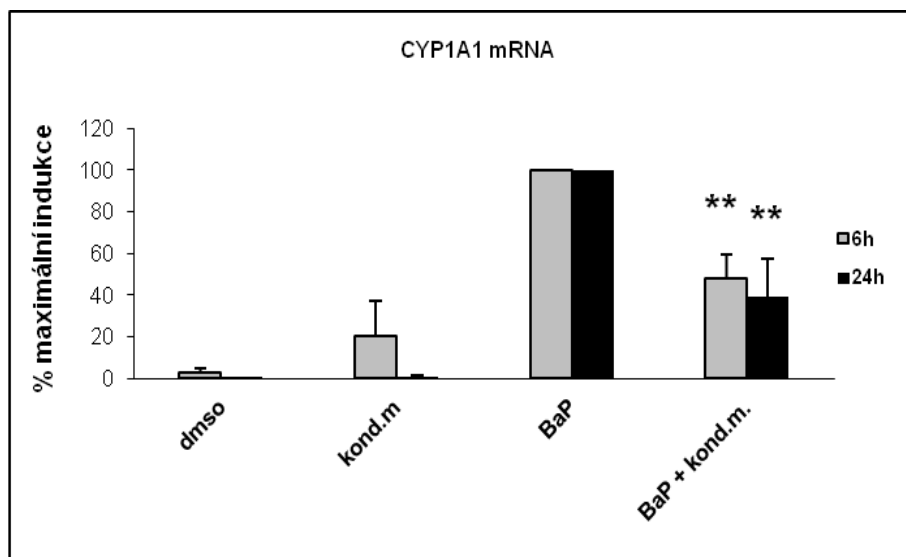
Hlavními enzymy regulovanými AhR, které se podílejí na biotransformaci PAU, jako je B[a]P, jsou CYP1A1 a CYP1B1. Pomocí metody Western blotting bylo prokázáno, že expozice buněk RLE-6TN pouze 1μM B[a]P po dobu 6 a 24 h vedla k indukci mírně zvýšené hladiny CYP1A1 už po 6 h, a k výraznějšímu posílení hladiny proteinu CYP1A1 po 24 h inkubace oproti negativní kontrole (DMSO). Hladina enzymu CYP1B1 byla po 6- i 24-hodinové inkubaci s 1μM B[a]P mírně zvýšena oproti kontrolnímu vzorku (DMSO) (Obr. 11). Při použití kombinace B[a]P a kondiciovaného média po dobu 6 a 24 h nedocházelo k žádným změnám hladiny CYP1A1 v porovnání se samotným 1μM B[a]P. Naopak indukce CYP1B1 byla po

působení B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem posílena po 6- i 24-hodinové inkubaci oproti samotnému B[a]P (Obr. 11).



Obrázek 11: Změny hladin enzymů CYP1A1 a CYP1B1 po 6- a 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1µM B[a]P; kondiciované médium a jejich kombinace) v buněčné linii RLE-6TN. Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní výsledky tří nezávislých opakování.

Následně byla detekce hladiny enzymů CYP1A1 a CYP1B1 v buňkách RLE-6TN ověřena i na úrovni mRNA pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR). Z výsledků vyplývá, že exprese genu *CYP1A1* byla jak po 6-, tak 24-hodinové inkubaci buněk s 1µM B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem výrazně snížena oproti samotnému 1µM B[a]P (Obr. 12). Naopak expozice B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem po dobu 6 h vedla ke statisticky významnému zvýšení exprese genu *CYP1B1* v buňkách RLE-6TN, oproti samotnému B[a]P. Mírně zvýšená hladina CYP1B1 mRNA byla pozorována i po 24-hodinové inkubaci buněk s B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem oproti samotnému B[a]P, rozdíl však nebyl statisticky významný (Obr. 12). Změna hladiny CYP1B1 mRNA v buňkách ovlivněných B[a]P a jeho kombinací s kondiciovaným médiem odpovídala změnám CYP1B1 na úrovni proteinu indukovaným za stejných podmínek (Obr.11 a 14).



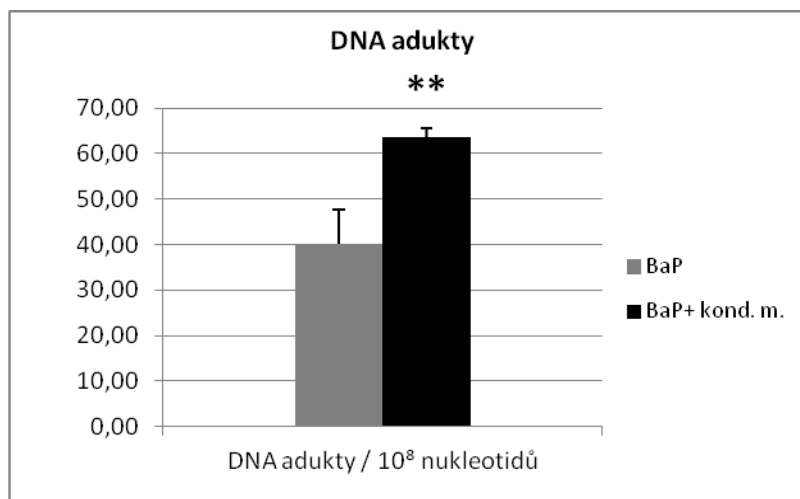
Obrázek 12: Detekce hladiny genů CYP1A1 a CYP1B1 po 6- a 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1 μ M B[a]P, kondiciované médium nebo jejich kombinace) u buněčné linie RLE-6TN. Graf udává relativní hladinu mRNA jednotlivých genů uvedenou v procentech maximální indukce. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky nejméně ze tří nezávislých opakování. Symboly (*; **) udávají statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$; $P < 0,01$) hladiny CYP1A1 i CYP1B1 mRNA mezi skupinou ovlivněnou pouze B[a]P a buňkami ovlivněnými kombinací B[a]P s kondiciovaným médiem. Stanovení statistické významnosti v grafu CYP1A1 bylo provedeno statistickou analýzou ANOVA, za využití Tukeyova testu. Ke stanovení statistické významnosti pro graf CYP1B1 bylo využito neparametrického testu Mann-Whitney.

4.4 Vliv kondiciovaného média v kombinaci s B[a]P na metabolickou aktivaci B[a]P a tvorbu DNA aduktů spojenou s poškozením DNA

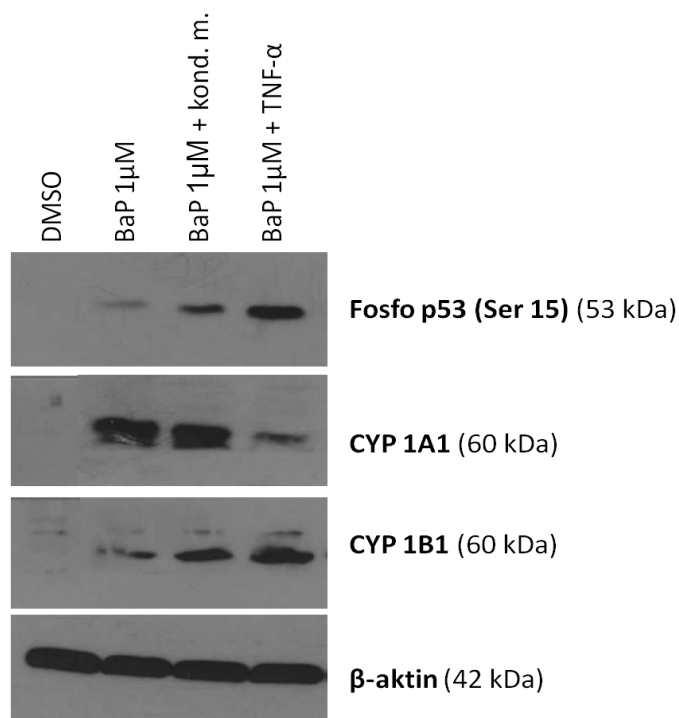
Prozánětlivý cytokin TNF- α výrazně posiluje tvorbu stabilních dihydrodiol-epoxidových aduktů B[a]P s DNA v alveolárních epiteliálních buňkách typu II (AEII), což vede ke zvýšené akumulaci a fosforylaci nádorového supresoru p53, a k indukci apoptózy (Umannová *et al.*, 2008; 2011). Protože zvýšená produkce DNA aduktů může souviset s deregulací exprese hladiny enzymů rodiny CYP1, byl dále stanoven vliv zánětlivých podmínek (simulovaných působením kondiciovaného média) na tvorbu BPDE aduktů na DNA. V paralelních experimentech byla dále stanovena indukce CYP1 enzymů a fosforylace proteinu p53 na Ser15. Pro potvrzení účinků kondiciovaného média byl jako pozitivní kontrola použit TNF- α (20 ng/ml), jehož účinky byly již dříve popsány v naší laboratoři (Umannová *et al.*, 2008; 2011).

P³²-postlabeling analýzou bylo zjištěno, že expozice buněk RLE-6TN 1 μ M B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem po dobu 24 h vedla ke zvýšené tvorbě B[a]P-DNA-adyktů v porovnání s tvorbou DNA-adyktů indukovanou samotným 1 μ M B[a]P (Obr. 13), což korespondovalo se zvýšenou expresí CYP1B1 mRNA i proteinu po inkubaci buněk s kombinací B[a]P a kondiciovaného média oproti samotnému B[a]P (Obr. 12 a 14). Zvýšená tvorba DNA aduktů vedla k posílení aktivace p53 detekované jako fosforylace na Ser15, což bylo prokázáno metodou Western blotting za použití specifické protilátky proti této posttranslační modifikaci proteinu p53 (Obr. 14). Hladina fosfo-p53 byla po ovlivnění buněk RLE-6TN kombinací B[a]P a kondiciovaného média po dobu 24 h výrazně posílena oproti působení samotného 1 μ M B[a]P. V kombinaci TNF- α s 1 μ M B[a]P po dobu 24 h docházelo k ještě výraznějšímu posílení exprese proteinu p53, než při použití 1 μ M B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem.

Hladina proteinu CYP1B1 korelovala s hladinou proteinu p53. Po ovlivnění buněk kombinací B[a]P s kondiciovaným médiem po dobu 24 h došlo ke zvýšení exprese CYP1B1, ve srovnání s indukcí samotným B[a]P. Jako pozitivní kontrola bylo opět použito TNF- α , který výrazně posiloval vliv B[a]P na indukci CYP1B1 (Obr. 14). Rozdílné účinky měly kondiciované médium a TNF- α na hladinu CYP1A1. TNF- α snižoval jeho indukci, zatímco kondiciované médium hladinu proteinu CYP1A1 neovlivnilo (Obr. 14).



Obrázek 13: Vliv kondiciovaného média v kombinaci s B[a]P na tvorbu DNA aduktů po 24-hodinové inkubaci u buněčné linie RLE-6TN. Graf udává množství DNA aduktů vztažené na 10⁸ nukleotidů. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symbol (**) udává statisticky významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi adukty vytvořenými B[a]P a kombinací B[a]P s kondiciovaným médiem. Stanovení statistické významnosti bylo provedeno statistickou analýzou ANOVA, za využití Tukeyova testu.



Obrázek 14: Změny hladin proteinu p53 fosforylovaného na Ser15; CYP1A1; CYP1B1 po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1μM B[a]P; B[a]P a kondiciované médium; B[a]P

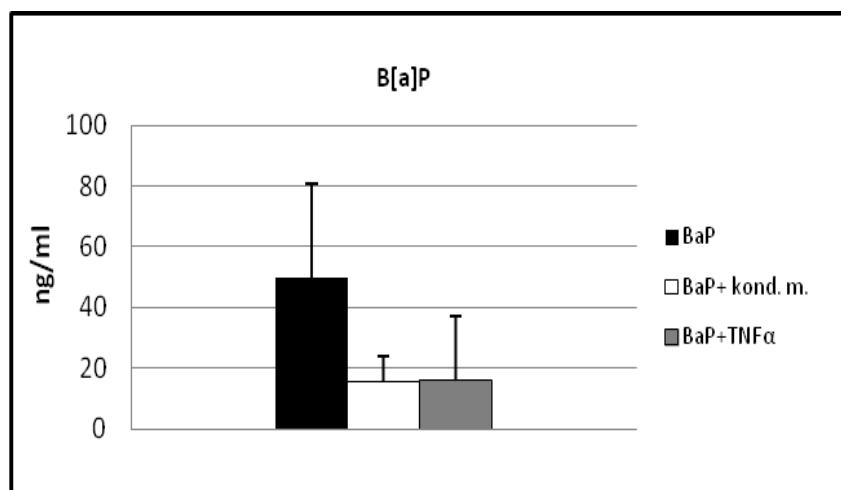
a TNF- α (20 ng/ml)) v buněčné linii RLE-6TN. Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní výsledky tří nezávislých opakování.

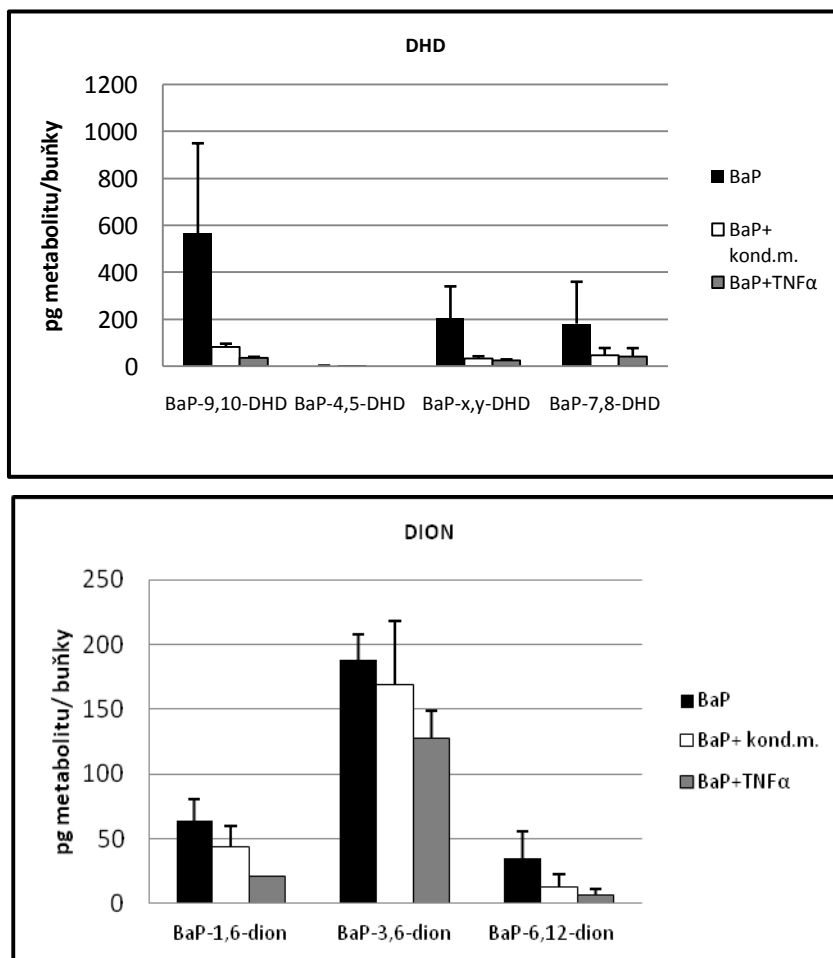
4.5 Detekce hladiny metabolitů B[a]P v buňkách RLE-6TN pomocí LC/MS/MS

4.5.1 Metabolity B[a]P v buňkách

Hlavní metabolizační dráha, která byla studována v této práci, je dráha vedoucí k tvorbě vysoce reaktivních dihydrodiol-epoxidů. Diol-epoxydy jsou jedny z nejreaktivnějších metabolitů vytvářející adukty na DNA a indukující mutagenní a tumorigenní účinky v cílové tkáni (Baird *et al.*, 2005).

Po inkubaci buněk RLE-6TN s 1 μ M B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem po dobu 24 h došlo ke snížení hladiny B[a]P a jeho metabolitů dihydrodiolů (DHD) a chinonů (DION) oproti expozici samotným B[a]P (Obr. 15), což naznačuje zrychlení metabolismu B[a]P, a může přispívat také ke vzniku většího množství reaktivního metabolitu BPDE právě touto dráhou. Kondiciované médium mělo velmi podobný účinek jako modelový prozánětlivý cytokin TNF- α .



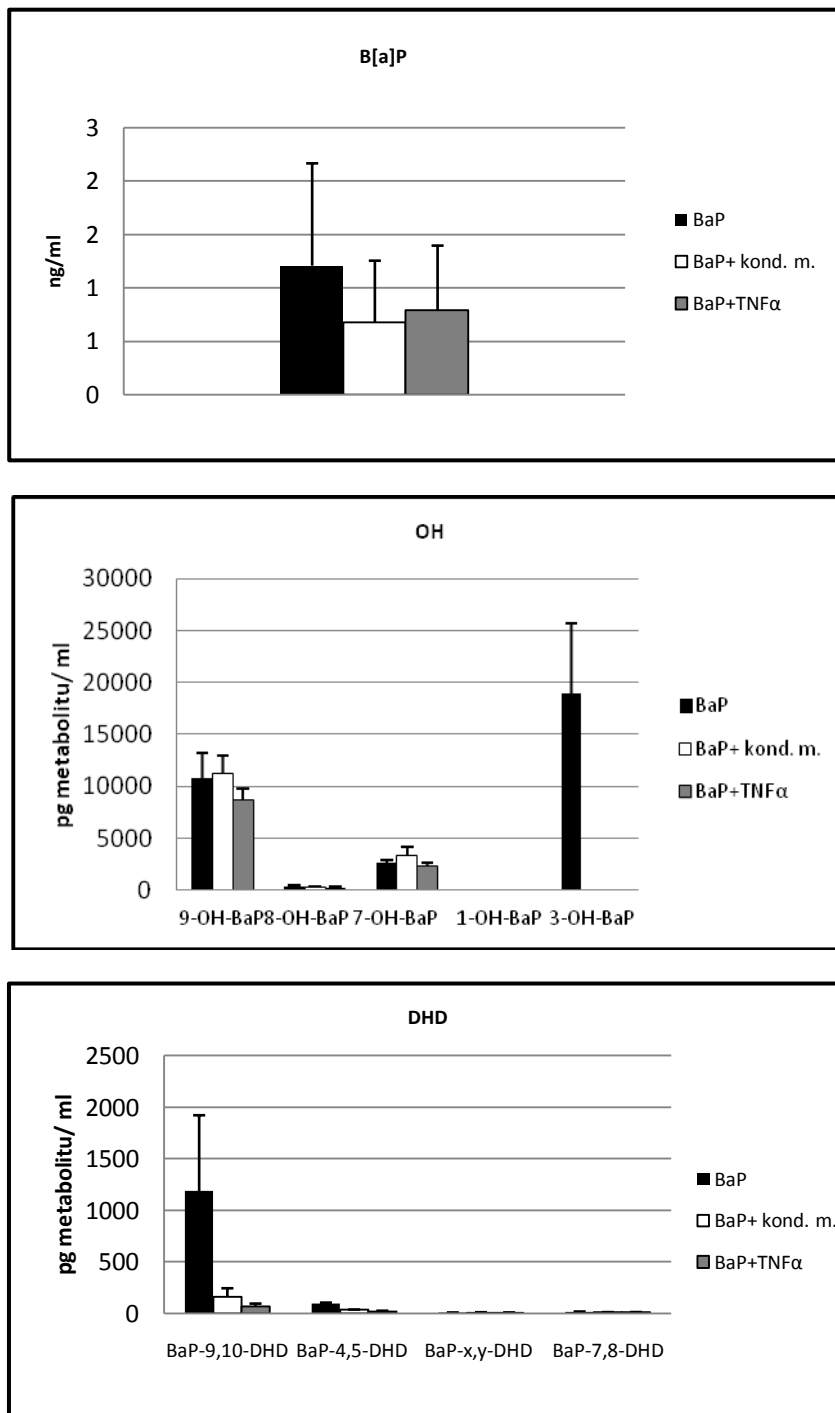


Obrázek 15: Stanovení množství B[a]P a jeho metabolitů (dihydrodiolů a chinonů) po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1 μ M B[a]P; B[a]P + kondiciované médium; B[a]P + TNF- α (20 ng/ml)) v buněčné linii RLE-6TN. Hladina stanovovaného metabolitu je určena v pg/buňky. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. (Metabolit B[a]P-x,y-DHD byl klasifikován na BaP-4,5-DHD).

4.5.2 Metabolity B[a]P v médiu po hydrolýze konjugátů

Po metabolizaci B[a]P jsou v buňce jeho metabolity převedeny konjugačními reakcemi pomocí enzymů II. fáze biotransformace na hydrofilní sloučeniny. Ty jsou následně pomocí ABC transportérů vyloučeny z buněk do média. V médiu byl po dekonjugaci stanovován obsah nezmetabolizovaného B[a]P a jeho metabolitů, zejména hydroxylovaných metabolitů (OH) a dihydrodiolů (DHD). Po inkubaci buněk s 1 μ M B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem po dobu 24 h došlo ke snížení hladiny parentální látky B[a]P a především DHD (zejména B[a]P-9,10-DHD) ve srovnání s buňkami ovlivněnými samotným B[a]P po dobu 24 h. Výsledky stanovené v buněčném médiu potvrzují efekty sledované v buňkách. Naopak, v kombinaci

B[a]P s kondiciovaným médiem nedocházelo ke snížení hladiny hydroxylovaných metabolitů (OH), s výjimkou 3-OH-B[a]P (Obr. 16). TNF- α sloužil jako pozitivní kontrola ke kondiciovanému médiu a opět měl velmi podobné účinky.



Obrázek 16: Stanovení množství B[a]P a jeho metabolitů - hydroxy-B[a]P (OH) a dihydrodiolů (DHD) po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami (1 μ M B[a]P; B[a]P a kondiciované médium; B[a]P a TNF- α (20 ng/ml)) v buněčné linii RLE-6TN. Hladina stanoveného

metabolitu byla určena v pg/ ml. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. (Metabolit B[a]P-x,y-DHD klasifikován na BaP-4,5-DHD).

5 Diskuse

AhR je transkripční faktor, který po aktivaci vazbou ligandu reguluje genovou expresi řady cílových genů (Dietrich a Kaina, 2010) kontrolujících, jak fyziologické funkce a řadu důležitých buněčných dějů (proliferaci, diferenciaci, buněčný cyklu a apoptózu), tak odpověď organismu na toxické environmentální polutanty (Harper *et al.*, 2006). Aktivace AhR řadou environmentálních kontaminantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), zejména B[a]P, vede k indukci genů kódujících biotransformační enzymy (Dietrich a Kaina, 2010). AhR reguluje zejména cytochromy P450 rodiny 1 (CYP1) (Bock a Köhle, 2006). Jejich působením dochází nejen k detoxikaci a vyloučení toxických látek z organismu, ale také k jejich aktivaci na genotoxické metabolity (Beischlag *et al.*, 2008; Dietrich a Kaina, 2010). U saveců byly identifikovány tři enzymy patřící do rodiny 1, CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 (Nebert *et al.*, 2004; Bock a Köhle, 2006; Beedanagari *et al.*, 2010). Exprese CYP1A1 a CYP1B1 je indukována aktivací AhR prostřednictvím PAU a HAU, jako jsou např. TCDD a B[a]P (Zhang *et al.*, 2003; Mimura a Fujii-Kuriyama, 2003; Sissung *et al.*, 2006). Tyto enzymy se podílejí na metabolizaci PAU za vzniku reaktivních intermediátů, které se kovalentně vážou na DNA a proteiny, a vytvářejí s nimi stabilní adukty. Ty mají mutagenní účinky a přispívají ke zvýšenému riziku vzniku a rozvoje karcinogeneze (Nebert *et al.*, 2004; Uno *et al.*, 2005; Beischlag *et al.*, 2008).

AhR, kromě regulace procesu iniciace, promoce a progresu karcinogeneze, hraje také důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi, zejména zánětlivé reakce (Monteleone *et al.*, 2011). Chronický zánět je spojován s řadou chorob, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes, artritida, plicní a autoimunitní onemocnění, karcinogeneze (Aggarwal *et al.*, 2006). Zánět hraje klíčovou roli v karcinogenezi plic, ovlivňuje buněčnou transformaci, proliferaci, invazivitu a angiogenezi (Smith *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Podíl řady enzymů, včetně enzymů regulovaných AhR, na detoxikaci a eliminaci xenobiotik může být během zánětu významně ovlivněn (Aitken *et al.*, 2006, Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013).

Environmentální kontaminanty z životního prostředí se vdechnutím dostávají do organismu, kde jsou jim vystaveny plicní alveoly (Mason, 2006). První obrannou linií v plicích sklípících tvoří alveolární epiteliální buňky a alveolární makrofágy (McRitchie *et al.*, 2000; Mason, 2006), proto byly v této práci zvoleny právě tyto plicní buněčné modely pro studium indukce zánětlivých markerů, enzymů podílejících se na metabolické aktivaci B[a]P, a tvorby B[a]P metabolitů. Pro indukci tvorby směsí zánětlivých mediátorů pomocí LPS izolovaného z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, byla jako vhodný model, použita buněčná linie myších alveolárních makrofágů (AM), označovaná MH-S (Mbawuike a Herscowitz, 1989). Některé zánětlivé mediátory mohou být makrofágy produkovány v detekovatelném množství i

bez aktivace, konstitutivně, například IL-1 (Mbawuike a Herscowitz, 1989; Zhong *et al.*, 2008). Nicméně po stimulaci LPS je produkce zánětlivých cytokinů, jako je TNF- α do okolního média výrazně posílena (McRitchie *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007).

Enzymy iNOS a COX-2 se podílejí na zánětlivých procesech a jejich hladina je po indukcii zánětlivými cytokiny významně zvýšena (Aggarwal *et al.*, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007). Proto byly v první části práce využity pro ověření aktivace buněk MH-S. iNOS je klíčový enzym generující z aminokyseliny L-argininu NO, který hraje důležitou roli v imunitní reakci. Účastní se obrany hostitele proti patogenům, zabíjí mikroorganismy a nitrosyluje makromolekuly, čímž přispívá k pozitivní regulaci zánětu (Aggarwal *et al.*, 2006; Rubovitch *et al.*, 2007). Velké množství NO je produkováno zejména alveolárními makrofágy po aktivaci zánětlivými stimuly (Punjabi *et al.*, 1994). COX-2 je hlavním enzymem odpovědným za produkci prostaglandinů, které hrají zásadní roli v regulaci patogeneze zánětu a nádoru plic (Lee *et al.*, 2008).

V této práci bylo prokázáno, že LPS zvyšoval hladinu obou výše zmíněných enzymů v buňkách MH-S (Obr. 7), což potvrdilo aktivaci myších alveolárních makrofágů k produkci zánětlivých mediátorů. Z takto aktivovaných makrofágů bylo poté připraveno kondicionované médium, ve kterém jsme předpokládali obsah směsi různých cytokinů a dalších zánětlivých markerů produkovaných aktivovanými makrofágy (jako jsou např. produkty COX-2), a které sloužilo v dalších experimentech jako model zánětlivých podmínek. Cílem bylo využít tento přístup k potvrzení dřívějších výsledků publikovaných hostitelskou laboratoří, které prokázaly, že po působení prozánětlivého cytokinu TNF- α dochází k posílení metabolické aktivace B[a]P (Umannová *et al.*, 2008; 2011). Klíčovou otázkou tedy bylo, zda má toto médium obsahující komplexní směs zánětlivých mediátorů podobné účinky jako samotný prozánětlivý cytokin.

Alveolární makrofágy se vyskytují v těsné blízkosti plicních epiteliálních buněk a mohou s nimi spolupracovat na imunitní odpovědi (Rubovitch *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že jak alveolární makrofágy, tak alveolární epiteliální buňky izolované z plic dospělého potkana produkovaly TNF- α po stimulaci LPS *in vitro* (Tao a Kobzik, 2001). Kontakt mezi epiteliálními buňkami a buňkami imunitního systému je nezbytný např. pro zvýšenou produkci cytokinů a posílení prozánětlivé odpovědi plic indukované prachovými částicemi z ovzduší (Tao a Kobzik, 2001). Bylo také zjištěno, že dlouhodobá expozice plicního epitelu aromatickými uhlovodíky může vést k indukcii zánětlivé odpovědi, chronickému zánětu a poškození plic u linie RLE-6TN (Espinoza *et al.*, 2006). Vysoké dávky JP-8 (směs alifatických uhlovodíků a PAU) indukují tvorbu vysoké hladiny ROS, prodlouženou aktivaci NF- κ B a zvýšenou expresi TNF- α a IL-8 (Boulares *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2006). Zvýšená metabolická aktivace PAU v zánětlivých podmínkách může přispět k iniciaci nádorových onemocnění a karcinogenezi plic (Driscoll *et al.*, 1995).

Na základě těchto skutečností byla využita buněčná linie RLE-6TN, plicní alveolární epiteliální buňky typu II izolované z potkana F344, pro studium indukce zánětlivých mediátorů, enzymů podílejících se na metabolické aktivaci B[a]P a tvorby jeho metabolitů, včetně DNA aduktů, po působení směsi zánětlivých mediátorů produkovaných modelovou buněčnou linií odvozenou od alveolárních makrofágů.

Signální dráha NF- κ B hraje klíčovou roli ve zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů jako TNF- α , IL-6 a IL-1 β během zánětu. TNF- α produkovaný plicními alveolárními makrofágy je klíčovým cytokinem kontrolujícím zánětlivou reakci v alveolárních buňkách typu II (AEII) (Driscoll *et al.*, 1997). Detekcí zvýšené hladiny prozánětlivého cytokinu TNF- α produkovaného buňkami RLE-6TN v zánětlivých podmínkách (kondiciované médium) byla potvrzena aktivní signální dráha NF- κ B, a tím také aktivace zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN. Významné zvýšení hladiny TNF- α mRNA bylo pozorováno po působení kondiciovaného média v kombinaci s B[a]P (Obr. 8). To naznačuje, že chronická zánětlivá reakce v kombinaci s působením PAU může zesilovat produkci prozánětlivých cytokinů v AEII buňkách.

COX-2 hraje zásadní roli v regulaci patogeneze zánětu a nádoru plic (Lee *et al.*, 2008). K indukci COX-2 mohou přispívat i některé AhR ligandy a bylo prokázáno, že např. kombinace B[a]P a TNF- α významně zvyšovala expresi COX-2 a produkci prostaglandinů v plicních epiteliálních buňkách potkana (Umannová *et al.*, 2011). V experimentech v rámci této práce bylo prokázáno, že také kondiciované médium i jeho kombinace s B[a]P významně zvyšovaly hladinu COX-2 u buněk RLE-6TN, a to jak na úrovni proteinu (Obr. 10), tak i na úrovni mRNA (Obr. 9). Získaná data naznačují, že zvýšená aktivace COX-2 a produkce prostaglandinů indukovaná zánětlivými mediátory v kombinaci s PAU může posílit toxické účinky PAU v plicní tkáni.

Aktivace signální dráhy NF- κ B v buňkách RLE-6TN byla dále potvrzena detekcí degradace inhibitoru NF- κ B (I κ B α) po působení kondiciovaného média i jeho kombinace s B[a]P pomocí metody Western blotting (Obr. 10). Aktivovaný transkripční faktor mohl být transportován do jádra a tam spouštět transkripci cílových genů (*Tnf*, *Ptgs2*).

Dále byla studována hladina proteinů CYP1 rodiny podílejících se na metabolizaci B[a]P v zánětlivých podmínkách u buněčné linie RLE-6TN. Hlavními AhR dependentními enzymy, které se podílejí na biotransformaci B[a]P jsou CYP1A1 a CYP1B1. Ze studií zkoumajících vliv prozánětlivých cytokinů na aktivitu AhR a expresi jeho cílových genů, zejména detoxikačních enzymů rodiny CYP1, vyplývá, že zánět a infekce obecně vedou k redukci exprese a/nebo aktivity enzymů CYP1A1 a CYP1A2 (Morgan, 2000; Aitken *et al.*, 2006). Za vyvolání funkční represe genu *CYP1A1* (hladiny mRNA a aktivity enzymu) během zánětlivé odpovědi je pravděpodobně zodpovědná antagonistická interakce mezi AhR

s transkripčním faktorem NF- κ B aktivovaným vazbou cytokinu, v promotoru genu *CYP1A1* (Morgan, 2000; Ke *et al.*, 2001; Beischlag *et al.*, 2008).

Ve studii Umannová *et al.* (2008) bylo prokázáno, že zánět může ovlivňovat expresi enzymů, které jsou zahrnuty v metabolické aktivaci a detoxifikaci prokarcinogenů. TNF- α významně měnil hladinu CYP1 enzymů v jaterních epiteliálních buňkách, inhiboval indukci CYP1A1 a posiloval expresi CYP1B1 a tvorbu kovalentních DNA aduktů závislou především na CYP1B1. Podobné efekty byly pozorovány i v plicních epiteliálních buňkách u linie RLE-6TN, kde TNF- α snižoval hladinu CYP1A1 a významně zvyšoval B[a]P indukovanou expresi CYP1B1; kombinace B[a]P s TNF- α vedla k výraznému zvýšení produkce BPDE-DNA aduktů (Umannová *et al.*, 2011). Bylo tedy navrženo, že TNF- α se může podílet na deregulaci exprese jednotlivých forem CYP1 rodiny v buňkách ovlivněných B[a]P, který je sám účinným AhR ligandem, a následně tak může modifikovat tvorbu DNA aduktů (Umannová *et al.*, 2008).

Na základě studie Umannová *et al.*, 2011 věnující se vlivu TNF- α na vznik genotoxických metabolitů B[a]P poškozujících DNA a produkci prozánětlivých mediátorů, které jsou regulovány CYP1 enzymy, byl v této práci studován vliv B[a]P a kombinace B[a]P s kondiciovaným médiem na hladinu metabolizačních enzymů CYP1A1 a CYP1B1 v buňkách RLE-6TN. Inkubace buněk pouze s B[a]P po dobu 6 a 24 h vedla k indukci zvýšené hladiny proteinu CYP1A1 (Obr. 11), nicméně při použití kombinace B[a]P a kondiciovaného média nedocházelo k žádným výrazným změnám hladiny CYP1A1 v porovnání se samotným B[a]P (Obr. 11). Detekcí CYP1A1 mRNA bylo nicméně zjištěno, že kombinace B[a]P a kondiciovaného média vedla k výraznému snížení hladiny CYP1A1 mRNA oproti samotnému B[a]P (Obr. 12). Rozdílné účinky kondiciovaného média na indukci CYP1A1 proteinu a mRNA by mohly částečně souviset s rozdílnou stabilitou mRNA a proteinu. Je známo, že stabilita CYP1A1 mRNA významně ovlivňuje hladinu CYP1A1 proteinu (Chu *et al.*, 2009).

Hladina CYP1B1 (mRNA i proteinu) byla po působení kondiciovaného média v kombinaci s B[a]P naopak významně posílena oproti samotnému B[a]P (Obr. 11 a 12). Kondiciované médium tedy výrazně zvyšovalo hladinu CYP1B1 indukovanou B[a]P. Zvýšená hladina enzymu CYP1B1 indukovaná PAU v některých nádorech, stejně jako jeho významná role v karcinogenitě některých PAH indikuje, že tento enzym by mohl hrát zásadní roli v metabolické aktivaci B[a]P na jeho karcinogenní metabolity (Baird *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 1999), zvláště v zánětlivých podmínkách, kdy je exprese CYP1A1 a CYP1A2 potlačena Umannová *et al.*, 2008. Během této práce bylo prokázáno, že metabolizace B[a]P enzymem CYP1B1 byla v zánětlivých podmínkách simulovaných směsí zánětlivých mediátorů výrazně posílena. Na posílení exprese *CYP1B1* v podmínkách zánětu se pravděpodobně bude podílet kromě AhR další signální dráha (Umannová *et al.*, 2011; Vondráček *et al.*, 2011).

TNF- α se může podílet na deregulaci exprese jednotlivých forem CYP1 rodiny v buňkách ovlivněných B[a]P, který je sám účinným AhR ligandem, a následně tak může modifikovat tvorbu DNA aduktů (Umannová *et al.*, 2008). Při použití kondiciovaného média obsahujícího směs zánětlivých mediátorů byla pozorována obdobná deregulace hladiny CYP1 enzymů v buňkách inkubovaných s B[a]P. Interakce AhR se zánětlivými signálními drahami tak může hrát významnou roli v imunitní dysfunkci, deregulaci metabolismu xenobiotik a karcinogenezi (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013).

Dřívější práce publikované hostitelským pracovištěm naznačují, že prozánětlivý cytokin TNF- α , ověřený model zánětlivého prostředí, výrazně posiluje tvorbu stabilních dihydrodiol-epoxidových aduktů B[a]P s DNA v jaterních epitelálních buňkách nebo AEII buňkách, což vede ke zvýšené aktivaci proteinu p53 a indukci apoptózy (Umannová *et al.*, 2008; 2011). Byl proto studován vliv kondiciovaného média na tvorbu DNA-aduktů indukovanou metabolity B[a]P. P³²-postlabeling analýzou bylo zjištěno, že hladina DNA aduktů stanovená v buňkách RLE-6TN ovlivněných kombinací B[a]P a kondiciovaného média byla statisticky významně zvýšena oproti samotnému B[a]P (Obr. 13), což také odpovídalo zvýšené hladině enzymu CYP1B1 (Obr. 14). Působením směsi zánětlivých mediátorů (použitím kondiciovaného média) dochází tedy ke zvýšené metabolické aktivaci B[a]P, pravděpodobně enzymem CYP1B1, což vede k vyššímu vzniku reaktivních metabolitů a následně k vyšší tvorbě stabilních BPDE-DNA-aduktů.

Ve studiích provedených u savců bylo prokázáno, že B[a]P má cytotoxické, teratogenní, genotoxické, mutagenní a karcinogenní účinky, které se však projeví, až po jeho metabolické aktivaci na reaktivní derivát, který je schopen interagovat s DNA a proteiny v buňce (Baird *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2011). B[a]P je metabolizován třemi hlavními drahami. V této práci byla studována dráha vedoucí k dihydrodiol-epoxidům, která je pravděpodobně zodpovědná za nádorově iniciační účinky B[a]P (Lu *et al.*, 2011). B[a]P je touto cestou metabolizován nejprve monooxygennační reakcí cytochromy P450 (CYP1A1/1B1) za vzniku série epoxidů. Funkční epoxidová skupina je epoxidhydrólou následně přeměněna na dvě hydroxylové skupiny. Vznikají tak dihydrodioly; například B[a]P-7,8-dihydrodiol, který je dále monooxygenován cytochromy P450 1A1/1B1 na metabolit *anti*-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro B[a]P (BPDE), který je vysoce reaktivní a je schopen interagovat s nukleofilní skupinou DNA, a způsobovat vznik mutací vedoucích ke karcinogenezi (Xue a Warshawsky, 2005; Lu *et al.*, 2011). Některé metabolity B[a]P vznikající jako produkty dráhy vedoucí k tvorbě dihydrodiol-epoxidů nebo přes radikálový kation B[a]P byly proto stanoveny v buňkách RLE-6TN, i v médiu, s cílem stanovit účinek směsi zánětlivých mediátorů na metabolismus B[a]P.

Inkubace buněk RLE-6TN s B[a]P v kombinaci s kondiciovaným médiem vedla snížení hladiny samotného B[a]P i dihydrodiolů a chinonů oproti expozici buněk samotným B[a]P

(Obr. 15). To naznačilo, že působením zánětlivých mediátorů došlo ke zrychlení metabolismu B[a]P v zánětlivých podmínkách, včetně vzniku většího množství reaktivního metabolitu BPDE právě dihydrodiol-epoxidovou dráhou. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě metabolitů stanovovaných v médiu.

6 Závěr

Ah receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který zprostředkovává široké spektrum biologických a toxických účinků svých ligandů v mnoha tkáních a živočišných druzích (Denison a Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2011). Podílí se na regulaci mnoho buněčných procesů. Jednou z jeho hlavních rolí je však regulace cytochromů P450, enzymů rodiny (CYP1), které jsou zodpovědné nejen za detoxikaci, ale i metabolickou aktivaci mnoha environmentálních kontaminantů, jako je B[a]P. AhR hraje důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi, zejména zánětlivých reakcí (Monteleone *et al.*, 2011). Studie zkoumající vliv prozánětlivých cytokinů na aktivitu AhR a expresi jeho cílových genů ukazují, že podíl řady enzymů regulovaných AhR, na detoxikaci a eliminaci xenobiotik, může být v podmínkách zánětlivé reakce významně ovlivněn (Aitken *et al.*, 2006; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2013). Toxické metabolity B[a]P mohou významně ovlivňovat funkce plicních buněk či interagovat s nukleofilní skupinou DNA, a způsobovat vznik stabilních aduktů a dalších typů poškození DNA mutací, které vedou ke karcinogenezi (Xue a Warshawsky, 2005; Lu *et al.*, 2011).

V rámci diplomové práce bylo prokázáno, že kondiciované médium připravené aktivací alveolárních makrofágů MH-S pomocí LPS, které obsahuje účinnou směs prozánětlivých cytokinů a dalších zánětlivých mediátorů, lze využít jako vhodný model indukce zánětlivé reakce v plicních epiteliálních buňkách *in vitro*. Kondiciované médium v plicních alveolárních buňkách RLE-6TN aktivovalo tvorbu zánětlivých mediátorů a posilovalo indukci CYP1B1, jednoho z hlavních enzymů podílejících se na bioaktivaci B[a]P na toxické reaktivní metabolity. Působením zánětlivých mediátorů docházelo v modelu AEII buněk k posílení tvorby stabilních BPDE aduktů, které mohou způsobovat další poškození DNA, a přispívat tak k iniciaci tvorby nádorů v plicní tkáni. Zesílená tvorba DNA aduktů souvisela také s pozorovanou zvýšenou fosforylací nádorového supresoru p53. Analýzou B[a]P metabolitů bylo potvrzeno, že působením zánětlivých mediátorů došlo k urychlení jeho metabolismu. Bylo tak prokázáno, že jak metabolizace B[a]P, tak tvorba DNA aduktů, katalyzované pravděpodobně zejména enzymem CYP1B1, je výrazně posílena v zánětlivých podmínkách simulovaných kondiciovaným médiem. Podobně jako v případě působení modelového prozánětlivého cytokinu TNF- α , je v případě působení směsi prozánětlivých mediátorů pozorováno posílení zánětlivé odpovědi v buňkách RLE-6TN a zvýšená bioaktivace a genotoxicita B[a]P. Tyto výsledky naznačují, že chronický zánět, který vede k lokálnímu zvýšení produkce zánětlivých mediátorů v plicní tkáni, může ovlivnit metabolismus PAU a následně posilovat genotoxické působení PAU v AEII buňkách. Výsledky práce budou využity v další činnosti laboratoře a budou součástí připravované publikace.

7 Seznam použité literatury

- Aggarwal, B. B.**, Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K. a Sethi, G. (2006). "Inflammation and cancer: how hot is the link?" *Biochem Pharmacol* **72**(11): 1605-21.
- Aimová, D.**, Poljaková, J., Kotrbová, V., Moserová, M., Frei, E., Arlt, V. M. a Stiborová, M. (2008). "Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2." *Interdiscip Toxicol* **1**(2): 160-8.
- Aitken, A. E.**, Richardson, T. A. a Morgan, E. T. (2006). "Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 123-49.
- Allaj, V.**, Guo, C. a Nie, D (2013). "Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer." *Cell Biosci* **3**(1): 8.
- Baird, W. M.**, Hooven, L. A. a Mahadevan, B. (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." *Environ Mol Mutagen* **45**(2-3): 106-14.
- Barouki, R.**, Coumoul, X. a Fernandez-Salguero, P. M. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." *FEBS Lett* **581**(19): 3608-15.
- Beedanagari, S. R.**, Taylor, R. T. a Hankinson, O. (2010). "Differential regulation of the dioxin-induced Cyp1a1 and Cyp1b1 genes in mouse hepatoma and fibroblast cell lines." *Toxicol Lett* **194**(1-2): 26-33.
- Beischlag, T. V.**, Morales, J. Luis, Hollingshead, B. D. a Perdew, G. H. (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**(3): 207-50.
- Bock, K. W. a Köhle C.** (2006). "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions." *Biochem Pharmacol* **72**(4): 393-404.
- Boulares, A. H.**, Contreras, F. J., Espinoza, L. A. a Smulson, M. E. (2002). "Roles of oxidative stress and glutathione depletion in JP-8 jet fuel-induced apoptosis in rat lung epithelial cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **180**(2): 92-9.
- Denison, M. S. a Nagy S. R.** (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 309-34.
- Denison, M. S.**, Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E. a 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.

Dietrich, C. a Kaina B. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth." *Carcinogenesis* **31**(8): 1319-28.

Driscoll, K. E., Carter, J. M., Iype, P. T., Kumari, H. L., Crosby, L. L., Aardema, M. J., Isfort, R. J., Cody, D., Chestnut, M. H., Burns, J. L. a LeBoeuf, R. A. (1995). "Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**(7): 516-27.

Espinoza, L. A., Tenzin, F., Cecchi, A. O., Chen, Z. Witten, M. L. a Smulson, M. E. (2006). "Expression of JP-8-induced inflammatory genes in AEII cells is mediated by NF-kappaB and PARP-1." *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(4): 479-87.

Esser, C., Rannug, A. a Stockinger, B (2009). "The aryl hydrocarbon receptor in immunity." *Trends Immunol* **30**(9): 447-54.

Fardel, O. (2013). "Cytokines as molecular targets for aryl hydrocarbon receptor ligands: implications for toxicity and xenobiotic detoxification." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **9**(2): 141-52.

Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respir Res* **2**(1): 33-46.

Fujii-Kuriyama, Y. a Mimura J. (2005). "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1): 311-7.

Gerbal-Chaloin, S., Iankova, I, Maurel, P. a Daujat-Chavanieu, M. (2013). "Nuclear receptors in the cross-talk of drug metabolism and inflammation." *Drug Metab Rev* **45**(1): 122-44.

Hankinson, O. (2005). "Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor." *Arch Biochem Biophys* **433**(2): 379-86.

Harper, P. A., Riddick, D. S. a Okey, A. B. (2006). "Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor." *Biochem Pharmacol* **72**(3): 267-79.

Chen, C. Y., Peng, W. H., Tsai, K. D. a Hsu, S. L. (2007). "Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages." *Life Sci* **81**(23-24): 1602-14.

Cheng, D. S., Han, W., Chen, S. M., Sherrill, T. P., Chont, M., Park, G. Y., Sheller, J. R,

- Polosukhin, V. V., Christman, J. W., Yull, F. E. a Blackwell, T. S. (2007). "Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway." *J Immunol* **178**(10): 6504-13.
- Chu, W. C.**, Hong, W. F., Huang, M. C., Chen, F. Y., Lin, S. C., Liao, P. J. a Su, J. G. (2009). "1-Nitropyrene stabilizes the mRNA of cytochrome P450 1a1, a carcinogen-metabolizing enzyme, via the Akt pathway." *Chem Res Toxicol* **22**(12): 1938-47.
- Ikuta, T.**, Kobayashi, Y. a Kawajiri, K (2004). "Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **279**(18): 19209-16.
- Ke, S.**, Rabson, A. B., Germino, J. F., Gallo, M. A. a Tian, Y. (2001). "Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide." *J Biol Chem* **276**(43): 39638-44.
- Kim, J. H.**, Stansbury, K. H., Walker, N. J., Trush, M. A., Strickland, P. T. a Sutter, T. R. (1998). "Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1." *Carcinogenesis* **19**(10): 1847-53.
- Lee, J. M.**, Yanagawa, J., Peebles, K. A., Sharma, S. Mao, J. T. a Dubinett, S. M. (2008). "Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment." *Crit Rev Oncol Hematol* **66**(3): 208-17.
- Livak, K. J. a Schmittgen T. G.** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lu, D.**, Harvey, R. G., Blair, I. A. a Penning, T. M. (2011). "Quantitation of benzo[a]pyrene metabolic profiles in human bronchoalveolar (H358) cells by stable isotope dilution liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." *Chem Res Toxicol* **24**(11): 1905-14.
- Ma, C.**, Marlowe, J. L. a Puga, A. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways." *Exs* **99**: 231-57.
- Machala, M.**, Vondráček, J., Bláha, L., Cigánek, M. a Neča, J. (2001). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay." *Mutat Res* **497**(1-2): 49-62.
- Mason, R. J.** (2006). "Biology of alveolar type II cells." *Respirology* **11** Suppl: S12-5.
- Mbawuiké, I. N. a Herscovitz, H. B.** (1989). "MH-S, a murine alveolar macrophage cell line: morphological, cytochemical, and functional characteristics." *J Leukoc Biol* **46**(2): 119-27.

- McIntosh, B. E.,** Hogenesch, J. B. a Bradfield, C. A. (2010). "Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation." *Annu Rev Physiol* **72**: 625-45.
- McRitchie, D. I.,** Isowa, N., Edelson, J. D., Xavier, A. M, Cai, L., Man, H. Y., Wang, Y. T., Keshavjee, S. H., Slutsky, A. S. a Liu, M. (2000). "Production of tumour necrosis factor alpha by primary cultured rat alveolar epithelial cells." *Cytokine* **12**(6): 644-54.
- Mimura, J. a Fujii-Kuriyama, Y.** (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." *Biochim Biophys Acta* **1619**(3): 263-8.
- Monteleone, I.,** Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F. a Monteleone, G. (2011). "Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract." *Gastroenterology* **141**(1): 237-48, 248 e1.
- Morgan, E. T.** (1997). "Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection." *Drug Metab Rev* **29**(4): 1129-88.
- Morgan, E. T.** (2001). "Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?" *Drug Metab Dispos* **29**(3): 207-12.
- Morgan, E. T.** (2009). "Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics." *Clin Pharmacol Ther* **85**(4): 434-8.
- Morgan, E. T.,** Goralski, K. B., Piquette-Miller, M., Renton, K. W., Robertson, G. R., Chaluvadi, M. R., Charles, K. A, Clarke, S. J., Kacevska, M., Liddle, C., Richardson, T. A., Sharma, R. a Sinal, C. J. (2008). "Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer." *Drug Metab Dispos* **36**(2): 205-16.
- Murray, G. I.,** Taylor, M. C., McFadyen, M. C., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D. a Melvin, W. T. (1997). "Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1." *Cancer Res* **57**(14): 3026-31.
- Musah, S.,** DeJarnett, N. a Hoyle, G. W. (2012). "Tumor necrosis factor-alpha mediates interactions between macrophages and epithelial cells underlying proinflammatory gene expression induced by particulate matter." *Toxicology* **299**(2-3): 125-32.
- Nebert, D. W. a Dalton, T. P.** (2006). "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **6**(12): 947-60.
- Nebert, D. W.,** Dalton, T. P., Okey, A. B. a Gonzalez, F. J. (2004). "Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer." *J Biol Chem* **279**(23): 23847-50.

- Nebert, D. W.**, Roe, A. L, Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y. a Dalton, T. P. (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **59**(1): 65-85.
- Petrovic, M.**, Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S. a D. Barcelo, D. (2005). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review." *J Chromatogr A* **1067**(1-2): 1-14.
- Puga, A.**, Xia, Y. a Elferink, C. (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 117-30.
- Punjabi, C. J.**, Laskin, J. D., Pendino, K. J., Goller, N. L., Durham, S. K. a Laskin, D. L. (1994). "Production of nitric oxide by rat type II pneumocytes: increased expression of inducible nitric oxide synthase following inhalation of a pulmonary irritant." *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**(2): 165-72.
- Richardson, T. A. and Morgan, E. T.** (2005). "Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice." *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2): 703-9.
- Rubovitch, V.**, Gershnel, S. a Kalina, M. (2007). "Lung epithelial cells modulate the inflammatory response of alveolar macrophages." *Inflammation* **30**(6): 236-43.
- Sharma, A. K.**, Fernandez, L. G., Awad, A. S, Kron, I. L. a Laubach, V. E. (2007). "Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**(1): L105-13.
- Shimada, T.**, Watanabe, J., Kawajiri, K., Sutter, T. R., Guengerich, F. P., Gillam, E. M. a Inoue, K. (1999). "Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants." *Carcinogenesis* **20**(8): 1607-13.
- Sissung, T. M.**, Price, D. K., Sparreboom, A. a Figg, W. D. (2006). "Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention." *Mol Cancer Res* **4**(3): 135-50.
- Smith, C. J.**, Perfetti, T. A. a King, J. A. (2006). "Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers." *Inhal Toxicol* **18**(9): 667-77.
- Stejskalová, L.**, Dvořák, Z. a Pávek, P. (2011). "Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art." *Curr Drug Metab* **12**(2): 198-212.

- Tao, F. a Kobzik, L.** (2002). "Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release." *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(4): 499-505.
- Thatcher, T. H.,** Maggirwar, S. B., Baglole, C. J., Lakatos, H. F., Gasiewicz, T. A, Phipps, R. P. a Sime, P. J. (2007). "Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB." *Am J Pathol* **170**(3): 855-64.
- Theodoridis, G. A.,** Gika, H. G., Want, E. J. a Wilson, I. D. (2012). "Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review." *Anal Chim Acta* **711**: 7-16.
- Tian, Y.,** Rabson, A. B. a Gallo, M. A. (2002). "Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 97-115.
- Umannová, L.,** Machala, M., Topinka, J., Nováková, Z., Milcová, A., Kozubík, A. a Vondráček, J. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha potentiates genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression." *Mutat Res* **640**(1-2): 162-9.
- Umannová, L.,** Machala, M., Topinka, J., Schmuczerová, J., Krčmář, P., Neča, J., Šujanová, K., Kozubík, A. a Vondráček, J. (2011). "Benzo[a]pyrene and tumor necrosis factor-alpha coordinately increase genotoxic damage and the production of proinflammatory mediators in alveolar epithelial type II cells." *Toxicol Lett* **206**(2): 121-9.
- Uno, S.,** Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J. a Nebert, D. W. (2006). "Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate." *Mol Pharmacol* **69**(4): 1103-14.
- Vondráček, J.,** Umannová, L. a Machala, M. (2011). "Interactions of the aryl hydrocarbon receptor with inflammatory mediators: beyond CYP1A regulation." *Curr Drug Metab* **12**(2): 89-103.
- Xue, W. a Warshawsky, D.** (2005). "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review." *Toxicol Appl Pharmacol* **206**(1): 73-93.
- Zhang, L.,** Zheng, W. a Jefcoate, C. R. (2003). "Ah receptor regulation of mouse Cyp1B1 is additionally modulated by a second novel complex that forms at two AhR response elements." *Toxicol Appl Pharmacol* **192**(2): 174-90.

Zhong, L., Roybal, J., Chaerkady, R., Zhang, W., Choi, K., Alvarez, C. A., Tran, H., Creighton, C. J., Yan, S., Strieter, R. M., Pandey A, Kurie, J. M (2008). "Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of the lung cancer microenvironment." *Cancer Res* **68**(17): 7237-45.

8 Seznam použitých zkratek

1A1/1B1	enzymy CYP1A1/CYP1B1
AE II	alveolární epitelální buňky typu II
Aha-1	dimerizační partner AhR-1 u bezobratlých
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky, Ah receptor
AhR ^{-/-}	deficientní na AhR /knockout AhR
AhR-1	homolog AhR u bezobratlých
AhRR	represeur pro AhR
AIP	protein interagující s AhR (ARA9, XAP2)
AKR	aldo-keto reduktasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AM	alveolární makrofág
AP-1	transkripční faktor
ARNT	jaderný translokátor receptoru pro aromatické uhlovodíky
ATCC	Americká databáze tkáňových kultur
B[a]P	benzo[a]pyren
Bax	protein regulující apoptózu
bHLH/PAS	<i>basic-helix-loop-helix/Period-Arnt-Sim</i>
BPDE	<i>anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cdk2	cyklin-dependentní kinasa 2
<i>Cdkn1a</i>	gen kódující protein p21 ^{CIP1}
<i>c-myc</i>	proto-onkogen
COX-2	cyklooxygenasa-2/ prostaglandinsynthasa (Ptgs 2)
CREBP	protein vázající se na element zodpovědný za odezvu na cAMP
CYP/Cyp	cytochromy P450
Cyp1	rodina 1 cytochromů p450
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE/XRE/AhRE	responzivní element pro AhR
E2F	transkripční faktor
EDTA	kyselinu ethylendiamintetraoctovou
EGF	epidermální růstový faktor
ER	estrogenní receptor
FBS	fetální telecí sérum

FITZ	6-formylindolo[3,2- <i>b</i>]karbazol
HAU	halogenované aromatické uhlovodíky
hsp90	protein teplotního šoku 90
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IFN- γ	interferon γ
IGF	růstový faktor podobný insulinu
I κ B	inhibitor NF- κ B
IKK	I κ B kinasa
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin-6
iNOS	inducibilní NO-synthasa
I κ B- α	inhibitor NF- κ B
JP-8	směs alifatických a PAU
<i>jun-B</i>	gen regulující buněčnou diferenciaci a proliferaci
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LPS	bakteriální endotoxin
MCF-7	buněčné linie odvozené od karcinomu prsu
MH-S	buněčná linie odvozená od myších alveolárních makrofágů
MIP-2	makrofágový zánětlivý protein
MRM	multiple reaction monitoring/ režim využívaný při práci s trojitým kvadrupólem
NES	sekvence pro jaderný export
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NLS	jaderná lokalizační sekvence
NO	oxid dusnatý
NQO1	chinonreduktasa
p23	ko-chaperonový protein
p27 ^{Kip1}	gen regulující buněčný cyklus
p300, p/CIP	obecné transkripční faktory (GTFs)
p53	protein p53
p65/RelA	podjednotka NF- κ B
PAI-2	gen regulující buněčnou diferenciaci a proliferaci
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
PCB	polychlorované bifenyly
Pol II	RNA-polymerasa II

pRB/RB1	retinoblastomový protein
qRT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase
RLE-6TN	buněčná linie odvozená od potkaních epiteliálních alveolárních buněk typu II / (AE II)
ROS	reaktivních forem kyslíku
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
Sp-1	koaktivátorový protein, transkripční faktor
SPE	extrakce na pevné fázi
STAT3	transkripční faktor
TAD	transkripční aktivační doména
TATA box/ BTE	základní transkripční element / GC box v promotoru genu
TBP	koaktivátorový protein vázající se do promotoru genu
TCDD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzo- <i>p</i> -dioxin
TGF- β 2	transformující růstový faktor β 2
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TLR	toll-like receptor
TNF- α	faktor nekrotizující nádory α (tumor necrosis factor α)
UDP	uridindifosfát
XAP2	protein asociovaný s virem hepatitidy B X 2 (AIP; ARA9)