

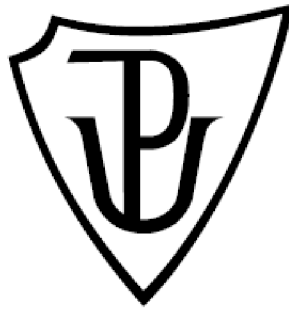
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Martina Sedláková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Vztah míry proliferace keratinocytů a
aktivace aryluhlovodíkového receptoru
mikrobiálními katabolity tryptofanu**

Bakalářská práce

Martina Sedláková

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

Olomouc 2023

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina SEDLÁKOVÁ**
Osobní číslo: **R19888**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vztah míry proliferace keratinocytů a aktivity aryluhlovodíkového receptoru mikrobiálními katabolity tryptofanu**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru metodou reporter gene assay v imortalizovaných keratinocytech
3. Stanovení míry proliferace imortalizovaných keratinocytů
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Jinlei Yu et al: A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019
 - 2) Susan H Smith et al.: Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans, *Journal of Investigative Dermatology*, 2017
 - 3) Murray IA and Perdew GH: How Ah Receptor Ligand Specificity Became Important in Understanding Its Physiological Function, *International journal of molecular sciences*, 2020
 - 4) Vyhlidalova et al: Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization, *International journal of molecular sciences*, 2020
 - 5) Ehrlich A, Kerkvliet N: Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases? *Current opinion in Toxicology* 2, 2017
- Články publikované v odborných periodících

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 5. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 12. března 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Martina Sedláková

Název práce: Vztah míry proliferace keratinocytů a aktivace aryluhlovodíkového receptoru mikrobiálními katabolity tryptofanu

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Keratinocyty jsou buňky epidermální vrstvy *stratum basale*. Hrají roli v mnoha důležitých funkcích kůže, jako příklad lze uvést tvorbu bariéry chránící organismus před vnějším prostředím, včetně ochrany před UV zářením. Tato práce se zabývá vztahem mezi aktivací aryluhlovodíkového receptoru (AhR) mikrobiálními katabolity tryptofanu a mírou proliferace lidských keratinocytů. Nejprve byla provedena Reporter Gene Assay na buněčné linii AhaRaCaT a následně byla provedena Crystal Violet Assay na buněčné linii HaCaT. Po 4 hodinách většina látek vykazovala signifikantní zvýšení aktivace AhR. Po 24 hodinách vykazovalo signifikanci pouze polovina z nich. Na proliferaci měly látky spíše negativní vliv. Signifikantního poklesu proliferace ve srovnání s negativní kontrolou bylo dosaženo pro indol-3-acetamid a tryptamin.

Klíčová slova: aryluhlovodíkový receptor, keratinocyty, tryptofan, proliferace

Počet stran: 37

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Martina Sedláková

Title: A relationship of the proliferation of keratinocytes and arylhydrocarbon receptor activation by microbial catabolites of tryptophan

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract:

Keratinocytes are the cells of the epidermal layer *stratum basale*. They play a role in many important functions of the skin, an example being the barrier protection of the organism from the external environment, including the UV radiation. This work deals with the relationship of the proliferation of keratinocytes and arylhydrocarbon receptor (AhR) activation by microbial catabolites of tryptophan. First, the Reporter Gene Assay was performed on the AhaRaCaT cell line, followed by the Crystal Violet Assay on the HaCaT cell line. After 4 hours, most substances significantly increased AhR activation. After 24 hours, only half of them showed significance. The substances had rather negative effect on proliferation. Two compounds, that significantly decreased proliferation next to the negative control, were indole-3-acetamide and tryptamine.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, keratinocytes, tryptophan, proliferation

Number of pages: 37

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D., s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Martina Sedláková

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za trpělivost, ochotu, odborné znalosti a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při vypracování této práce i při studiu.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární přehled	3
3.1. Kůže.....	3
3.2. Kožní onemocnění	4
3.2.1. Atopická dermatitida	4
3.2.1.1. Patofyziologie.....	5
3.2.1.2. Léčba	6
3.2.2. Psoriáza (lupénka).....	6
3.2.2.1. Patofyziologie.....	7
3.2.2.2. Léčba	8
3.3. Aryluhlovodíkový receptor.....	8
3.3.1. AhR signální dráhy	10
3.3.2. AhR v kůži	11
3.3.3. CYP1A1	11
3.3.4. Role AhR u AD a psoriázy	12
3.4. Tryptofan a jeho metabolity	13
3.4.1. Kyselina indol-3-octová (IAA)	14
3.4.2. Kyselina indol-3-propionová (IPA).....	14
3.4.3. Indol-3-acetamid (IAD)	14
3.4.4. Kyselina indol-3-pyrohroznová (IPY)	14
3.4.5. Kyselina indol-3-mléčná (ILA).....	14
3.4.6. Indol-3-aldehyd (IA)	15
3.4.7. Tryptamin.....	15
3.4.8. Indol	15

3.4.9.	Indol-3-akrylát (IAC).....	15
3.4.10.	Indol-3-ethanol (IET)	15
4.	Materiály a metodika	17
4.1.	Materiály	17
4.1.1.	Biologický materiál	17
4.1.2.	Použité pomůcky	17
4.1.3.	Přístroje	19
4.1.4.	Počítačové programy	19
4.2.	Metodika práce	19
4.2.1.	Příprava média	19
4.2.2.	Pasáž buněk	20
4.2.3.	Počítání buněk	20
4.2.4.	Výsev.....	21
4.2.5.	Příprava zásobních roztoků	21
4.2.6.	Inkubace 24 a 4hodinová	22
4.2.7.	Reporter Gene Assay	22
4.2.8.	Proliferační analýza krystalovou violetí.....	23
5.	Výsledky	24
5.1.	Reporter Gene Assay	24
5.2.	Crystal Violet Assay.....	27
6.	Diskuse	29
7.	Závěr	31
8.	Literatura	32
8.1.	Odborné články a knihy	32
8.2.	Internetové zdroje	37

Seznam symbolů a zkratek

AD	Atopická dermatitida
AhR	Aryluhlovodíkový receptor
AhRR	AhR represor
AhR-DBD	AhR DNA vazebná doména
AhR-LBD	AhR ligand vazebná doména
ARNT	AhR jaderný translokátor
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát
CD	Cluster of differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte associated
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoxid
DRE	Dioxin-responzivní elementy
FBS	Fetální bovinní sérum
FICZ	6-formylindolo(3,2-b) karbazol
Flg	Filaggrin
HAH	Halogenované aromatické uhlovodíky
HSP90	Heat-shock protein 90
HygB	Hygromycín B
IFN γ	Interferon gama
IA	Indol-3-aldehyd
IAA	Kyselina indol-3-octová
IAC	Indol-3-akrylát
IAD	Indol-3-acetamid

IET	Indol-3-etanol
IgE	Imunoglobulin typu E
IL	Interleukin
ILA	Kyselina indol-3-mléčná
IND	Indol
IPA	Kyselina indol-3-propionová
IPY	Kyselina indol-3-pyrohroznová
NAD ⁺	Nikotinamidadeninindinukleotid
NF-κB	Nukleární faktor kappa B
OVOL1	Ovo-like 1 transkripční faktor
PAH	Polyaromatické uhlovodíky
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	Fosfátový pufr
PCB	Polychlorované bifenyly
PCDD	Polychlorované dibenzo-p-dioxiny
RB	Protein retinoblastomu
TAD	Vazebná doména transkripční aktivace na AhR proteinu
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TNF-α	Faktor nádorové nekrózy α
TR	Tryptamin
TSLP	Thymický stromální lymfopoetin
XAP2	X-asociovaný protein 2
XRE	Xenobiotika-responzivní elementy
UVB	Ultrafialové záření typu B

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázek č. 1: Příčný řez kůží (převzato z WikiSkripta)

Obrázek č. 2: Funkční domény AhR (Malorni et al, 2012, upraveno)

Obrázek č. 3: Schéma mikrobiálního katabolismu tryptofanu (Vyhlídalová et al, 2020)

Obrázek č. 4: Rovnice pro výpočet potřebného objemu buněčné suspenze

Obrázek č. 5: Schéma rozložení testovaných látek pro 4h a 24h experimenty

Graf 1: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT 4 h (IA, TR, IND, IAC, IET)

Graf 2: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT 4 h (IAA, IAD, IPA, IPY, ILA)

Graf 3: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT 24 h (IA, TR, IND, IAC, IET)

Graf 4: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT 24 h (IAA, IAD, IPA, IPY, ILA)

Graf 5: Míra proliferace buněčné linie HaCaT inkubované s testovanými indoly

Tabulka č. 1: Navážky pro zásobní 100 mM / 50 mM roztoky

1. Úvod

Kůže je největší orgán lidského těla. Plní dlouhou řadu důležitých funkcí a je první linií obrany organismu před vnějšími vlivy. Keratinocyty jsou buňky epidermální vrstvy *stratum basale*. Hrají roli v mnoha důležitých funkcích kůže, jako příklad lze uvést tvorbu bariéry chránící organismus před vnějším prostředím, včetně ochrany před UV zářením. UVB zářením jsou z tryptofanu generovány ligandy aryluhlovodíkového receptoru (AhR). Tento ligandem aktivovaný transkripční faktor má vliv zejména na metabolismu xenobiotik, ale také hraje roli při proliferaci buněk, embryogenezi, diferenciaci a regulaci imunitní odpovědi. V inaktivní formě se nachází v cytoplazmě, je exprimován skoro všemi buňkami v těle. Dříve se přehlíželo možné terapeutické využití AhR díky jeho účasti na metabolismu xenobiotik a tvorbě genotoxických adduktů zprostředkovaných indukovanými cytochromy P450. Současné poznání však favorizuje terapeutické cílení AhR skrze aktivaci látkami s indolovou strukturou, které jsou vhodnými kandidáty pro modulaci imunitních a zánětlivých reakcí v důsledku evoluční přítomnosti a produkce těchto látek fyziologickou mikrobiotou. Vzhledem k tomu, že atopická dermatitida i psoriáza jsou chronicky zánětlivá kožní onemocnění, dává smysl hledat vhodné aktivátory AhR i mezi mikrobiálními indolovými deriváty.

2. Cíle práce

Teoretická část

Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce

Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Experimentální část

Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru metodou Reporter Gene Assay v imortalizovaných keratinocytech

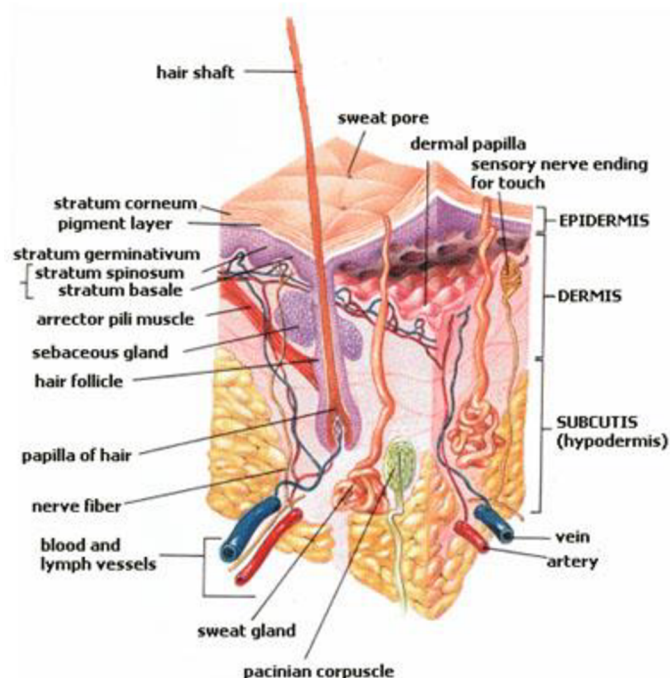
Stanovení míry proliferace imortalizovaných keratinocytů

3. Literární přehled

3.1. Kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla a pokrývá celou jeho vnější plochu. Plní velkou řadu významných funkcí, mezi které například řadíme ochranu organismu před škodlivými vnějšími vlivy, udržování homeostázy, termoregulaci, schopnost organismu vnímat tlak, teplo a bolest, účast při neverbální pachové komunikaci a sekrece keratinu a melaninu.

Skládá se ze tří anatomicky i funkčně rozdílných částí: epidermis, dermis a hypodermis (Yousef et al, 2017). Další částí kůže jsou takzvané kožní adnexa, mezi které řadíme například vlasy a nehty (www.nzip.cz, 5001, 5. 5. 2023).



Obrázek č. 1: Příčný řez kůží (převzato z www.wikiskripta.eu)

Epidermis (Obrázek č. 1) je nejsvrchnější vrstva kůže a embryonálním původem je tvořena z ektodermu. Převažující buňky jsou keratinocyty, které pocházejí ze *stratum basale* a hrají roli při tvorbě epidermální vodní bariéry a regulaci absorpce vápníku přes aktivaci cholesterolových prekurzorů UVB světlem k tvorbě vitamínu D. Epidermis dělíme na vrstvy: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale*.

Stratum corneum je nejsvrchnější vrstva tvořená keratinem a zrohovatělými šupinami. Její síla je kolem 20 vrstev buněk. Tato vrstva se nejvíce odlišuje svojí tloušťkou podle

místa svého výskytu. Mrtvé keratinocyty zde sekretují látky, které hrají roli v první linii imunitní obrany organismu.

Stratum lucidum je přítomna v oblastech se silnější kůží. Nachází se třeba v dlani nebo na chodidle. Tyto dvě až tři čiré buněčné vrstvy jsou tvořeny transformovaným produktem keratohyalinu: eleidinem.

Stratum granulosum se skládá se z buněk tvaru diamantu s keratohyalinovými a lamelárními granuly. Keratohyalin obsahuje prekurzory, které nakonec crosslinkují nebo se seskupují. Lamelární grana obsahují glykolipidy, které jsou sekterovány na povrch buňky a slouží jako pojivo buněk.

Stratum spinosum obsahuje několik vrstev nepravidelných, mnohostěnných buněk s cytoplazmatickými procesy. Zde můžou být nalezeny i dendritické buňky.

Stratum basale je nejspodnější vrstva oddělena od dermis bazální lamelou, ke které je připojena multiproteinovými komplexy zvanými hemidesmosomy. V této vrstvě se nacházejí melanocyty, a především mitoticky aktivní kmenové buňky, které produkují keratinocyty. Buňky jsou většinou oválného nebo cylindrického tvaru (Bendová, 2010).

Dermis je prostřední kožní vrstva. Vyskytují se zde elastická a kolagenní vlákna, která zajišťují pevnost a pružnost kůže. Dále jsou zde vlákna retikulinová a kotvící fibrily. Zároveň je tato vrstva velmi dobře prokrvena a nachází se zde i mnoho smyslových receptorů (www.nzip.cz, 4783, 5. 5. 2023).

Hypodermis je nejspodnější vrstvou kůže. Spojuje kůži s podkožní vazivovou tkání svalů a kostí. Dle zdroje Lumen Learning se hypodermis sestává z areolární pojivové a tukové tkáně, která uchovává tuk a tím poskytuje organismu izolaci a kůži tlumení. Dále se zde nachází například folikuly vlasů, krevní cévy a smyslové neurony (courses.lumenlearning.com, 3. 4. 2023).

3.2. Kožní onemocnění

3.2.1. Atopická dermatitida

Atopický ekzém, jinak také nazýván atopická dermatitida (AD), je chronické intenzivně svědivé, recidivující zánětlivé onemocnění kůže. Nejčastěji propuká v raném dětství. Ačkoliv se obvykle jedná o epizodické onemocnění střídající exacerbaci a remisi, ve vážných případech může být onemocnění kontinuální. Postihuje kolem 15–30 % dětí a 2–10 % dospělých na světě (U.S. National Library of Medicine 2007, 3.5.2023).

Zhruba u 70 % případů dochází k propuknutí AD v prvních 5 letech života pacienta. U 30 % nemocných se vyskytne i astma a u 35 % senná rýma (Williams, 2005). To může vést přes vznik systémových alergií až k takzvanému atopickému pochodu. Tento pochod začíná vnitřní fází, kdy dítě či dospělý trpí ekzémem, ale bez senzibilizace. V další, vnější, fázi dochází ke zvýšení citlivosti na potravinové a vnější alergeny. Nakonec vzniká přecitlivělost na autologní proteiny a tím vzniká autoimunita. Pokud se AD projeví u dospělých, u zhruba 30 % se jedná o přenos nemoci z dětství. AD s pozdním nástupem (late-onset) se obvykle objevuje u dospělých, u kterých se v dětství neprojevila. Je to závažnější, svědivější a chroničtější podoba AD. Mezi těmito dospělými se vyskytují jedinci bez zvýšené senzibilizace a nemají tak zvýšené IgE, ale mají zvýšenou hladinu interferonu gama (IFN γ), který vzniká stimulací bílých krvinek antigeny (Green et al, 1969). U pacientů je prokázán mírný průběh AD a negativní osobní i rodinná anamnéza. Takový jedinec může, ale nemusí přejít do další fáze nemoci.

Mezi primární příznaky AD řadíme dermatitidu, xerózu, chronický průběh a chronický kožní zánět. Svědění je až sekundární projev, zejména v teple nebo při stresu. AD je velice variabilní, příznaky u různých pacientů se odlišují.

Akutní případy AD se projevují začervenalou kůží s otokem, puchýřky a mokváním. U chronických případů také dochází k zesílení postižené oblasti kůže (leicnifikace).

AD vzniká interakcí více typů faktorů. Většina zdrojů se shoduje, že primárními příčinami jsou genetické předpoklady ke špatnému vývoji kožní bariéry. Tím jsou narušeny některé signalizační dráhy, což má za důsledek zvýšení tvorby IgE a Th2 odpověď. Alergeny díky těmto změnám lépe pronikají bariérou a způsobují senzibilizaci organismu. Ovšem expresi IgE a Th2 odpověď buněk spouští interakce faktorů vnějšího prostředí a genů organismu (Benáková et al, 2010).

3.2.1.1. Patofyziologie

Pro zánětlivé léze AD byly objasněny 2 hypotézy, které se mohou vzájemně doplňovat.

První se týká nerovnováhy adaptivního imunitního systému. Teorie tvrdí, že AD je důsledkem nerovnováhy pomocných T lymfocytů (Th) typů 1, 2, 17 a 22 a regulačních T (T_{reg}) lymfocytů. Při akutním ekzému se rovnováha Th1/Th2 přiklání k Th2 odpovědi. U chronického převažuje Th1 odpověď. Tyto efektorové buňky jsou hlavní součástí imunitní odpovědi (Yang et al, 1998).

Hypotéza kožní bariéry se zaobírá mutacemi v genu pro filaggrin, který kóduje strukturální proteiny vázající v *stratum corneum* a *stratum granulosum* keratinocyty k sobě. U jedinců s touto mutací je zvýšeno riziko výskytu AD. Snížená tvorba filaggrinu je příčinou dysfunkce kožní bariéry a ztráty vody, což způsobuje ekzém. Teorie vysvětluje, že průnik alergenů do kůže je usnadněn, když je kožní bariéra narušena (De Benedetto et al, 2012).

U atopiků jsou vyšší hodnoty neurotransmiterů a nervových růstových faktorů uvolňujících se z nervových zakončení v krvi nebo v kůži, které zesilují a udržují neurogenní zánět vyvolaný imunitními buňkami (Misery et al, 2019). Neurobiologický průzkum naznačuje, že interakce periferních i centrálních nervů s kůží má vliv na homeostázu kůže a protivirové působení.

3.2.1.2. Léčba

AD není možné zcela vyléčit. Existuje několik způsobů léčby a je důležité léčit nejen přímo postižené oblasti, ale důraz se klade i na doprovodnou léčbu, která se volí na míru pacienta podle závažnosti AD aktuálního rozsahu a intenzity onemocnění a mnoha dalších faktorů. Nejdůležitější prevencí je zabránit suchosti kůže. Dále se využívají některá fytofarmaka. Zábaly a spreje se používají pouze v době, kdy je třeba zmírnit stav AD. V akutních stavech bývají využívány kortikosteroidové masti na potlačení zánětu při objevení ekzému nebo při zhoršení již probíhajícího. Jako doplnění povrchové léčby se využívá například fototerapie ultrafialovým světlem typu B (UVB), systematické imunosupresivní léky nebo lokální léčba antibiotiky (Benáková et al, 2010).

3.2.2. Psoriáza (lupénka)

Psoriáza se řadí k neinfekčním autoimunitním chronickým zánětlivým kožním onemocněním a postihuje především kůži. Vzniká v důsledku působení několika vlivů, mezi které řadíme vlivy environmentální a genetické. Objevuje se nejčastěji mezi 15 a 30 lety života a nezávisle na pohlaví. Celosvětově psoriázou trpí zhruba 2 % světové populace (AL-Sariay et al, 2021).

Klinická diagnóza často stačí k potvrzení psoriázy. Biopsie se používá zřídka. Zkoumá se přítomnost začervenalých šupinatých skvrn, plaků a papul, které jsou často svědivé a bolestivé (Rendon a Schäkel, 2019).

Typickým projevem jsou již zmíněné začervenalé šupinaté kožní léze, ale dalšími projevy může být ztlustění kůže, žlutohnědé skvrny pod nehtovou ploténkou a často také postižení

kloubů. Naopak u psoriázy kloubů nemusí mít pacient vůbec žádné kožní příznaky, ale klouby jsou nateklé a zarudlé (Kim et al, 2017). Nejčastější formou nemoci je chronická plaková *psoriasis vulgaris*, kterou trpí odhadem 90 % pacientů. Dále se může projevit například psoriáza inverzní, guttální, pustulární a erythrodermická.

Často jsou projevy psoriázy spojovány s projevy dalších nemocí jako jsou deprese, artritida a lymfomy. Nelze předpovědět, jak bude psoriáza probíhat, ale individuální terapie může zlepšit kvalitu života pacienta a také velice snížit úmrtnost (Weigle a McBane, 2013).

3.2.2.1. Patofyziologie

Psoriáza je nepřímo spuštěna imunitní reakcí s určitou genetickou predispozicí. Jedná se o jediné chronicky zánětlivé onemocnění se souvislostí s HLA-C. U pacientů s alelou HLA-Cw*0602 byl prokázán nástup nemoci v nižším věku a byly pozorovány jisté odlišnosti v klinických rysech nemoci.

Za normálních okolností je proliferujících keratinocytů v kůži kolem 60 %, ale u pacientů s psoriázou proliferuje až 100 %. Doba buněčného cyklu se tím u psoriatických lézí zkrátí na 36 hodin, a kromě kmenových buněk mohou proliferovat i buňky suprabazální (Weinstein et al, 1985).

Dále jsou u psoriázy typické změny exprese keratinů, především keratiny typu I, K16 a K17, který se nachází v nízké koncentraci ve vlasových folikulech.

Ačkoliv je psoriáza spouštěna mnoha faktory, jediným dobře definovaným externím spouštěčem je infekce krku β -hemolytickými streptokoky (Telfer et al, 1992). Toto se projevuje především u postižených, kteří jsou nositeli Cw*0602 alely (Gudjonsson et al, 1990). Superantigeny, které tyto streptokoky produkují, usnadňují migraci T buněk do kůže a indukují expresi CLA (cutaneous lymphocyte associated) antigenu. Imunitní odpověď pravděpodobně zajišťují CD4+ a CD8+ T buňky. Tyto buňky izolované z psoriatických lézí reagují na streptokokové antigeny (Brown et al, 2000).

V psoriatických lézích převládají cytokiny spadající do Th1 skupiny a jsou to IL-12, IFN- γ a TNF- α (Gearing et al, 2010). Jak keratinocyty, tak dendritické buňky mohou v důsledku působení IFN- γ a TNF- α indukovat produkci mnoha dalších cytokinů a růstových faktorů, které ovlivňují produkci výše zmíněných Th1 cytokinů. Cytokinová síť se tímto může stát samoudržujícím procesem, protože produkce IFN- γ dendritickými buňkami je zvýšena vlivem IL-18 a synergicky působícím IL-12, který je rovněž

produkován dendritickými buňkami. IL-17 zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů keratinocyty a tím zvyšuje hladinu T buněk v kůži (Gudjonsson et al, 1990). Hyperproliferaci keratinocytů způsobují autokrinní IL-20, IFN- γ a mnoho dalších cytokinů. Některé, jako např. IFN- γ a IL-15, zvyšují rezistenci keratinocytů k apoptóze, zatímco přesná role TNF- α není jasná.

3.2.2.2. Léčba

Vývoji biologické léčby významně pomohla přítomnost dendritických buněk, cytokinů a T lymfocytů v psoriatických lézích pacientů, protože tato léčiva cílí na specifické zánětlivé dráhy. Aktuálně se biologická léčba zaměřuje na osu IL-23/Th17 a TNF- α signální dráhu (Rendon a Schäkel, 2019). Používají se například komplexně upravené molekuly a receptorové fúzní proteiny například: etanercept, infliximab a adalimumab (Sivamani et al, 2010). Hlavním cílem je zlepšit stav kůže, kloubů a nehtů. Léčba musí být individualizovaná podle rozsahu i typu nemoci, aby byl zajištěn co nejlepší výsledek.

Lokální léčba se využívá u pacientů s psoriázou na méně než 5 % povrchu těla. Dalším kritériem jsou nezasazené genitálie, obličej, chodidla a dlaně. Pro co nejrychlejší ošetření se využívá lokálních kortikosteroidů, u kterých se nedoporučuje dlouhodobé užívání. Dále se využívá analogů vitamínu D3, který mírní symptomy blokací T lymfocytické aktivity přes modulaci proliferace a diferenciaci keratinocytů.

Systematická léčba se provádí u závažnějších případů psoriázy a tam, kde lokální léčba nezabírá. Zahrnuje například fototerapii, použití acitretinu nebo individualizovanou biologickou léčbu. Acitretin je teratogen a vedlejšími účinky je například fotosenzitivita, suchost sliznic nebo gastrointestinální potíže (Kim et al, 2017).

3.3. Aryluhlovodíkový receptor

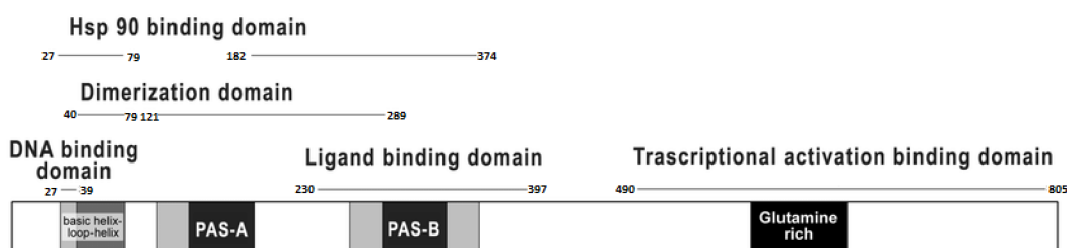
Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor z rodiny bHLH/PAS (basic-Heli-Loop-Helix, Per-Arnt-Sim) pro polyaromatické uhlovodíky, dioxiny a jiná xenobiotika se schopností měnit expresi jistých genů, nebo aktivitu jiných transkripčních faktorů účastnících se buněčné proliferace, apoptózy, diferenciaci a buněčného růstu. Díky stigma o odpovědnosti AhR za toxicitu dioxinů se zanedbávalo jeho terapeutické cílení.

Vliv na modulaci aktivity AhR není výlučně omezen vlivem antropogenních chemikálií. Účinek také má složení potravy a endogenní látky vznikající přirozeně v těle člověka. Je

důležitý v určitých fyziologických procesech jako například embryogeneze nebo vývoj orgánů (Abel a Haarmann-Stemann, 2010).

To, že je AhR konstitutivně exprimován v mnoha tkáních i typech buněk dokazují mnohé studie. U myši a lidí byla bazální exprese AhR pozorována v plicích, slezině, játrech, ale i v primárních a nádorových buňkách a buněčných liniích (Yamamoto et al, 2004).

Lidský gen pro AhR obsahuje 12 exonů, kóduje tedy 848 aminokyselin dlouhý protein a nachází se na chromozomu 7. AhR protein obsahuje 2 hlavní funkční domény (Obrázek č. 2). První doménou je DNA vazebná doména (AhR-DBD) obsahující základní motiv helix-loop-helix (bHLH), která se nachází v N-koncové části proteinu, která specificky pozná a interaguje s dioxin-responzivním elementem (DRE) daného genu a napomáhá při protein-protein interakcích. Skládá se ze 2 α -helixů, mezi kterými je nadšroubovicová smyčka. Dále se na molekule AhR nachází Per-Arnt-Sim (PAS) domény A a B. PAS-A svým zapojením umožňuje vznik heterodimeru s nukleárním translokátorem (ARNT). Vazbu ligandů zajišťuje doména PAS-B, která se označuje jako ligand vazebná doména (AhR-LBD), která se nachází v pozici 230–397 aminokyselin od N-konce proteinu (Vrzal et al, 2004). Myši a potkani sdílejí 85-87 % identitu s lidskou aminokyselinovou sekvencí AhR-LBD. Ovšem onen malý strukturní rozdíl významně ovlivňuje vazbu ligandů. Na C-konci AhR proteinu se nachází vazebná doména transkripční aktivace (TAD), kde ona podobnost myši a lidí je pouze 58 %. Tato oblast zahrnuje menší oblasti bohaté například na prolin, serin, nebo glutamin. Právě oblast bohatá na glutamin je zodpovědná za rozdíly odpovědi AhR na různé ligandy mezi živočišnými druhy (Xu et al, 2021).



Obrázek č. 2: Funkční domény AhR (Malorni et al, 2012, upraveno)

AhR je hlavním senzorem chemických signálů. Úroveň a spektrum genů, které budou indukovány řídí kvalita a trvání aktivace AhR různými ligandy. AhR se hlavně zaměřuje na baterie genů odpovědných za metabolismus planárních molekul, geny související s buněčným cyklem, vývojem a buněčnou diferenciací a geny související s imunitou. Většímu zájmu vědců podléhá i schopnost AhR interagovat s jinými signálními drahami,

jako např. NF- κ B (nukleární faktor kappa B), čímž je umožněna vysoce diferencovaná odpověď (Esser et al, 2013).

3.3.1. AhR signální dráhy

Aryluhlovodíkový receptor v inaktivním stavu v cytoplazmě tvoří komplex s několika chaperonovými proteiny, jako jsou HSP90 (heat-shock protein), P23 (kochaperon HSP90), XAP2 (X-asociovaný protein 2) nebo také c-Src kináza. Po navázání ligandu je komplex disociován a AhR je translokován do buněčného jádra. V případě takzvané kanonické signální dráhy tvoří AhR heterodimer s jaderným translokátorem AhR (ARNT). Vzniklý komplex AhR/ARNT váže xenobiotika-responzivní elementy (XRE) na molekule DNA a tím zprostředkovává expresi určitých tříd genů aktivací transkripčního komplexu. Nekanonické signalizace odkazuje na transkripční funkce AhR nezávislé na XRE místech. Třeba aktivovaný AhR/ARNT komplex se váže přímo s estrogenovými receptory, a to vede až k estrogením účinkům (Ohtake et al., 2003). AhR se může vázat i s jinými jadernými proteiny, jako RelB nebo KLF6. Dochází tak v obou případech k aktivaci exprese downstream genů, které regulují třeba buněčný cyklus nebo diferenciaci buněk. Mohou také sloužit jako koaktivátory mnoha jaderných transkripčních faktorů. Dalším krokem je v obou případech export AhR zpět do cytosolu, kde je degradován. Signální dráha je utlumována AhR represorem (AhRR), kdy tento represor soutěží s AhR o vazbu s jaderným translokátorem AhR (ARNT) (Esser et al, 2013).

Hlavními ligandy AhR jsou nízkomolekulární látky, které můžeme rozdělit na látky přírodní a látky antropogenního původu. Agonisté s vysokou afinitou k AhR jsou z většiny syntetického původu, jako například polychlorované bifenyly (PCB) a dibenzo-p-dioxiny (PCDD) (Denison a Nagy, 2003). Dalšími metabolicky stabilními ligandy jsou nehalogenované polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a halogenované aromatické uhlovodíky (HAH). Tyto látky jsou častými kontaminanty životního prostředí a mnoho z nich vyvolává u laboratorních zvířat karcinogenezi nebo zhoršují reprodukci. Nejznámějším příkladem HAH je látka 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), která je využívána jako modelový ligand pro studium aktivity tohoto receptoru. Předěšlé studie identifikovaly mnoho AhR ligandů strukturně, fyzikálně i chemicky odlišných od výše zmíněných HAH a PAH (Denison et al, 1998). Jako konkrétní příklady těchto odlišných ligandů můžeme uvést například thiabendazol, 1,5-diaminonaftalen nebo 1-metyl-1-fenylhydrazin. Zároveň u výše zmíněného TCDD a dalších HAH platí, že jejich toxicita

stoupá s rostoucí afinitou k AhR (Busbee et al, 2013). Dalšími ligandy jsou látky odvozeny od esenciální aminokyseliny tryptofanu. Mezi tyto látky můžeme řadit například 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ), který svojí vazbou na AhR získává imunomodulační funkci, stejně jako již výše zmíněný TCDD. Důsledky iniciované jadernou translokací AhR aktivovanou TCDD se výrazně odlišují od důsledků aktivací skrze cyklický AMP (cAMP). Jaderné proteiny mohou být u obou variant stejné, ale v komplexu závislém na cAMP mohou podléhat různým konformačním změnám zapříčiněných modulací cAMP. Způsob aktivace skrze cAMP je nezávislý na vazbě exogenního ligandu na AhR a zároveň tato varianta receptoru netvoří komplex AhR/ARNT (Oesch-Bartlomowicz et al, 2005).

3.3.2. AhR v kůži

Jelikož je kůže přímo vystavena vnějším vlivům, je vybavena mnoha různými mechanismy, které jsou schopny reagovat a vnímat vnější prostředí. Chemické signály zpracovává hlavně AhR exprimovaný kožními buňkami. V kůži se také nachází mnoho ligandů tohoto receptoru, které jsou generovány z tryptofanu v reakci na světlo. Jako příklady můžeme uvést FICZ a kyselinu indol-3-octovou (Wei et al, 1999). AhR se podílí na detoxikaci a pigmentaci kůže, její imunitě a buněčné homeostázi. Dále hraje roli i při patofyziologii kůže, včetně pigmentace, fotokarcinogeneze a zánětu. Úroveň exprese AhR se odlišuje podle místa výskytu i druhu organismu. A právě většina buněk epidermis a fibroblastů v dermis mají vysoké hladiny exprese AhR (Esser et al, 2013).

3.3.3. CYP1A1

Cytochrom P450 (CYP) jsou enzymy působící jako monooxygenáza a obsahující hemový kofaktor. Cytochromy P450 byly nalezeny ve všech formách života. U savců hrají cytochromy roli při metabolismu léčiv a xenobiotik, při syntéze steroidních hormonů, v metabolismu vitamínů rozpustných v tucích a v mnoha dalších procesech. Enzymy této genové superrodiny jsou si mezi sebou podobné pouze z určité části, a proto nejsou jasné korelace mezi strukturou a funkcí těchto cytochromů (Hasemann et al, 1995).

Mezi reakce katalyzované CYP1A1 patří hydroxylace aromatického kruhu, což je charakteristický znak karcinogeneze tvorbou vysoce reaktivních produktů. Tyto produkty mohou dále způsobit onkogenní mutace u pokusných zvířat a lidí (Androutsopoulos et al, 2009).

CYP1A1 se účastní první fáze metabolismu xenobiotik a léčiv. Mezi látky metabolizované CYP1A1 patří řada aktivátorů AhR, jako jsou flavonoidy, některé metabolity tryptofanu a metabolity kyseliny arachidonové (Murray a Perdew, 2020).

3.3.4. Role AhR u AD a psoriázy

Kůže se brání proti velkému množství škodlivých vnějších i vnitřních látek produkcí mnoha senzorů, mezi které receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem i AhR (Omiecinski et al, 2011) Právě AhR je totiž spojován s epidermální diferenciací, fotostárnutím i imunomodulací.

U pacientů s atopickou dermatitidou a psoriázou se nachází polymorfismus pro AhR gen. Určité genotypy AhR, rs2066853 a rs10249788, představují riziko pro vznik suché kůže a jejich kombinací riziko roste (Furue et al, 2019).

U atopické dermatitidy se vyskytuje aberace genu pro filaggrin (Flg). Tato mutace se vyskytuje u mnoha etnických skupin a není jediná. Také se u pacientů s atopickou dermatitidou vyskytuje mnoho genů náchylnosti, například Ovo-like 1 (OVOL1), který u savců kóduje transkripční faktor C2H2 obsahující motiv zinkových prstů a je možné, že OVOL1 řídí expresi proteinů kožní bariéry. Studie z roku 2017 zjistila, že OVOL1 reguluje expresi Flg a že expresi OVOL1 zvyšuje aktivace AhR, a tedy lze soudit, že AhR upreguluje Flg právě přes OVOL1 (Tsuji et al, 2017). V kůži pacientů s atopickou dermatitidou byla pozorována nižší úroveň jaderné translokace OVOL1. V *in vitro* modelu atopické kůže a v lidských epidermálních keratinocytech ošetřených cytokinem IL-4 došlo k blokaci jaderné translokace OVOL1, která byla částečně obnovena pomocí FICZ (6-Formylindolo[3,2-b]carbazole) a podobný výsledek byl zajištěn i s látkou Glyteer (klinicky využívaný sojový dehet). Proto by zaměření na AhR–OVOL1–Flg dráhu mohlo poskytnout novou léčbu atopické dermatitidy (Tsuji et al, 2017).

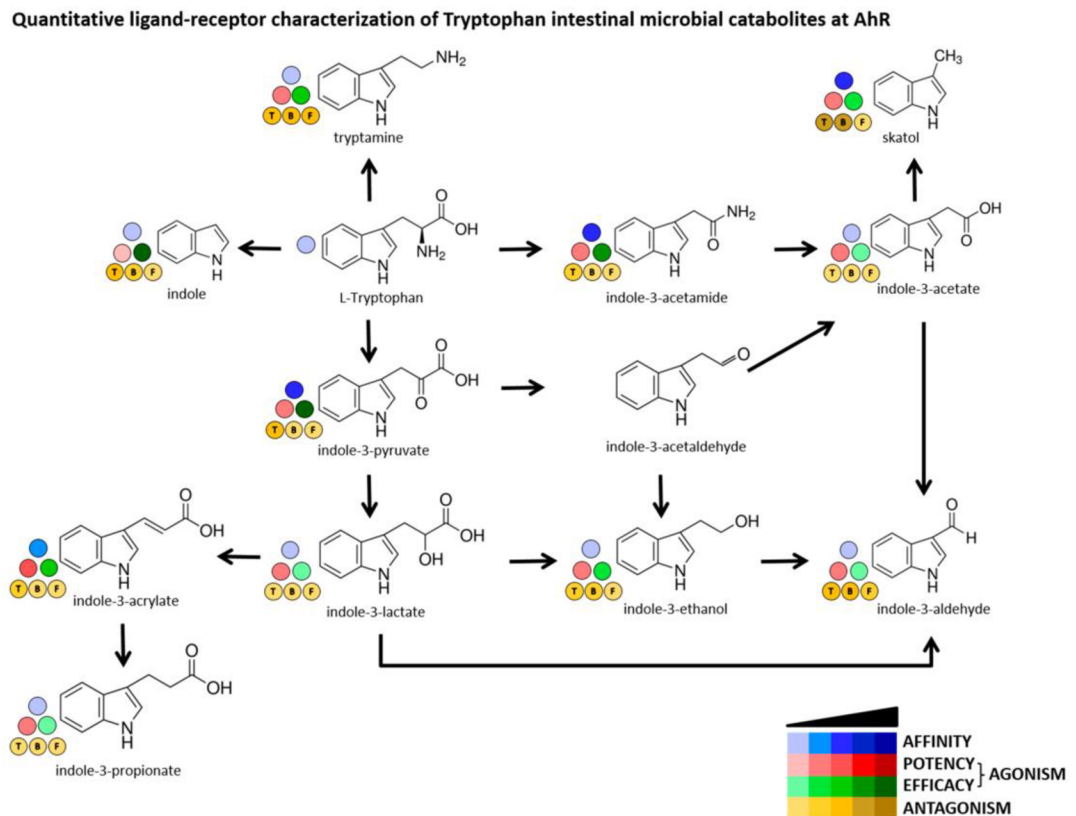
V psoriatických placích je AhR přítomen a reguluje terminální diferenciaci T lymfocytů i keratinocytů a jejich zánětlivou odpověď. *In vivo* i *in vitro* model prokázaly, že při deficitu AhR je zvýšená citlivost k prozánětlivým podnětům a nekontrolovaný rozvoj zánětu. U myši s AhR deficitem došlo ve srovnání s kontrolami k psoriatickému zánětu a k zvýšené produkci IL-17 a IL-22 v modelu psoriázy indukovaném imiquimodem. Dysregulace keratinocytů a fibroblastů byla rovněž u tohoto myšího modelu pozorována (Nogueira et al, 2022). Mnohé studie prokázaly, že za exacerbaci zánětu je zodpovědný deficit AhR v nehematopoetických buňkách, včetně keratinocytů, nikoliv v buňkách

hematopoetických. Imiquimodem indukovaný psoriatický zánět zlepšila intraperitoneální injekce FICZ (Furue et al, 2019).

3.4. Tryptofan a jeho metabolity

Tryptofan je jednou z esenciálních aminokyselin tvořících proteiny, kterou si tělo neumí vytvořit, a proto ji musí přijímat v potravě. Může být distribuován do krve k tvorbě proteinů nebo může být degradován v játrech kynureninovou cestou. Tryptofan je i prekurzorem pro serotonin, niacin, rovněž je důležitý k syntéze nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺) (Moffett et al, 2003).

Střevní bakterie produkují mnoho metabolitů, ale hlavními jsou sekundární žlučové kyseliny, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a ovšem katabolity tryptofanu. K dnešku jich bylo identifikováno mnoho. Velké množství těchto katabolitů (Obrázek č. 3) je na bázi indolu a jejich hlavním cílem bývá AhR (Vyhlídalová et al, 2020). Následuje krátký výčet zajímavostí o jednotlivých indolech.



Obrázek č. 3: Schéma mikrobiálního katabolismu tryptofanu (Vyhlídalová et al, 2020)

3.4.1. Kyselina indol-3-octová (IAA)

IAA je jedním z nejčastějších rostlinných auxinů a metabolitem v lidském těle. Je derivátem indolu, který je nejčastěji produkován aktivitou bakterií. U savců také dochází k endogenní produkci IAA, a to dvěma způsoby: dekarboxylací tryptaminu nebo oxidativní deaminací tryptofanu. V nízkých koncentracích se nachází i v moči, ale pokud je pacient postižen fenylketonurií, koncentrační hladina IAA je zvýšena. (PubChem, Indole-3-acetic acid, 2023).

3.4.2. Kyselina indol-3-propionová (IPA)

IPA vzniká deaminací tryptofanu bakteriemi symbioticky žijícími v trávicím traktu ptáků i savců. Tento produkt tryptofanu se dále nepřeměňuje. Díky této vlastnosti může být vynikající ochranou proti volným radikálům zodpovědných za oxidační stres (Poeggeler et al, 1999).

3.4.3. Indol-3-acetamid (IAD)

IAD je metabolitem hub, bakterií a rostlin. V lidských střevech vzniká jako meziprodukt při syntéze IAA. V prvním kroku této syntézy je tryptofan přeměněn na IAD pomocí tryptofan-2-monooxygenázy. IAD je ve druhém kroku hydrolyzován a vzniká již zmíněné IAA (Lehmann et al, 2010).

3.4.4. Kyselina indol-3-pyrohroznová (IPY)

Aromatická kyselina IPY je keto analogem tryptofanu. Je také prekurzorem některých mikrobiálních agonistů AhR odvozených od tryptofanu a sama IPY aktivuje AhR. IPY reakcí ve vodném roztoku tvoří řadu dalších AhR agonistů (Bittinger et al, 2003) jako například kyselina indol-3-mléčná. IPY je syntetizována deaminací tryptofanu nebo působením transamináz pro aromatické aminokyseliny. Bylo prokázáno, že IPY zabráňuje poškození HaCaT buněk UVB zářením (Aoki et al, 2018).

3.4.5. Kyselina indol-3-mléčná (ILA)

Přírodním produktem *Agrobacterium tumefaciens* a dalších organismů je kyselina indol-3-mléčná (ILA). Váže volné radikály a brání produkci interleukinu 6 (IL-6), indukovanou UVB a je agonistou lidského AhR. Dále indukuje pokles cAMP v lidských monocytech (Sakurai et al, 2019). Bylo prokázáno, že při koncentracích 1, 5, a 20 μM byla ILA výrazně protizánětlivá vůči stimulaci IL-1 β (Meng et al, 2020).

3.4.6. Indol-3-aldehyd (IA)

Za přítomnosti tryptofanu a aminotransferázy pro aromatické aminokyseliny produkuje střevní mikroflóra indol-3-aldehyd. Tento produkt aktivuje odpověď hostitele na xenobiotika přes aktivaci AhR. IA vytěsňuje FICZ z vazby na AhR a podporuje jadernou translokaci (Vyhlídalová et al, 2020). IA podporuje homeostázu střevního epitelu a tím potencionálně omezuje systémový zánět, který vzniká v závislosti na zvyšujícím se věku (Puccetti et al, 2022).

3.4.7. Tryptamin

Tryptamin (TR) se vyskytuje u lidí, myši i rostlin. Lze ho řadit mezi indolové alkaloidy (PubChem, Tryptamine, 2023). Vzniká dekarboxylací tryptofanu. Degradací TR za přítomnosti monoamin oxidázy (MAO) je tvořen prekurzor FICZ, indol-3-acetaldehyd, což naznačuje, že TR je zdrojem FICZ. Tato přeměna je nezávislá na přítomnosti UV záření na rozdíl od vzniku FICZ přímo z tryptofanu. Prostřednictvím svého monoaminoxidázového systému endogenně přeměněný TR aktivuje AhR (Vikström et al, 2012).

3.4.8. Indol

Indol (Ind) je heterocyklická organická sloučenina obsahující pyrrolový a benzenový kruh. V *E.coli* je produkován pomocí tryptofanázy, která může reverzibilně měnit tryptofan na indol, pyruvát a amoniak. Indol slouží jako signální molekula a reguluje i bakteriální fyziologii, tvorbu spór, rezistenci k antibiotikům a dalším. Indol byl potvrzen jako extracelulární signál k aktivaci specifických genů *E. coli* (Lee & Lee, 2010).

3.4.9. Indol-3-akrylát (IAC)

IAC je produkován střevními mikroorganismy přímou transformací tryptofanu nebo částečně kynureninovou cestou. Hraje roli při udržování homeostázy střev a systémové imunity. Může potenciálně ovlivnit i výskyt a rozvoj nemocí jako například obezita či nádory a zánětlivá onemocnění střev. Může podporovat diferenciaci a funkci protizánětlivých makrofágů a dalších regulačních buněk, ale i vrozených lymfoidních buněk (ILC3) produkujících IL-22 (Su et al, 2022).

3.4.10. Indol-3-ethanol (IET)

IET je metabolitem *Saccharomyces cerevisiae*, auxinem a rostlinným metabolitem. IET také bývá označováno jako tryptophol (PubChem, Tryptophol, 2023). Prvním krokem

syntézy je deaminace tryptofanu. Vzniklý indol-3-pyruvát (IPY) je dále dekarboxylován indolpyruvátdekarboxylázou. Tento další produkt je alkoholdehydrogenázou přeměněn na tryptophol (Dickinson et al, 2003). IET hraje roli při modulaci integrity střevní bariéry. (Scott et al, 2020).

4. Materiály a metodika

4.1. Materiály

4.1.1. Biologický materiál

- Buněčná linie lidských imortalizovaných keratinocytů HaCaT (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Německo)
- Responzivní buněčná linie AhaRaCaT odvozená z HaCaT linie
- FBS (fetální bovinní sérum, Sigma-Aldrich, F7524)

4.1.2. Použité pomůcky

- 96 jamková průhledná destička (TPP)
- 96 jamková bílá destička k měření luciferázy (NUNC)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Plastové špičky k pipetám
- Buničina (Tork)
- Parafilm M (Bemis)
- Kultivační lahev 5 ml (TPP)
- Kultivační lahev 25 ml (TPP)
- Kultivační lahev 75 ml (TPP)
- Petriho misky (TPP)
- Nitrilové rukavice
- Multikanálové pipety (Eppendorf)
- Kartonová krabička na vzorky do -20 °C
- Plastové mikrozukmavky o objemech 0,5 a 1,5 ml (BIOplastics)
- Falkonky o objemech 15 a 50 ml (TPP)
- Sérologické pipety (Labnet)
- Použité chemikálie

- Hygromycin B, 50 mg/ml (Santa cruz Biotechnology, sc-29067)
- Reporter Lysis 5x Buffer (Promega, E4030, ředěn v poměru 1:4 dH₂O)
- Neesenciální mastné kyseliny (Sigma Aldrich, M7145)
- FICZ (Sigma Adrich, SML1489)
- DMSO (Sigma, D4540)
- PBS (Serana, BDL-001)
- DMEM (Sigma Aldrich, D6546-500ML)
- Trypsin 0,25% - EDTA in HBSS (Biosera, MS00CY100B)
- Indol (Sigma-Aldrich, I3408-25G)
- Tryptamin (Sigma-Aldrich, 193747-10G)
- Indol-3-aldehyd (Sigma-Aldrich, 129445-5G)
- Kyselina indol-3-octová (Sigma-Aldrich, I3750)
- Indol-3-akrylát (Na⁺, trans, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-272496)
- Indol-3-acetamid (Sigma-Aldrich, 286281-1G)
- Kyselina indol-3-pyrohroznová (Sigma-Aldrich, I7017-1G)
- Indol-3-etanol (Sigma-Aldrich, T90301-5G)
- Kyselina indol-3-mléčná (Sigma-Aldrich, I5508-250MG-A)
- Kyselina indol-3-propionová (Sigma-Aldrich, 57410-25G-F)
- Methanol (Penta Chemicals, 21210-20005)
- Trypanová modř (Sigma, T9650)
- Crystal Violet 1% (Sigma-Aldrich, V5265-500ML, 0,1% roztok byl připraven naředěním v poměru 1:9 dH₂O)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025)
- L-Glutamin (Serana, RGL-001)
- D-Luciferin (Sigma Aldrich, L9504-50MG)

- substrát pro Firefly luciferázu [5 mg D-luciferinu; 10 mg ATP; 5 mg koenzymu A; 168 mg DTT; 1,32 ml Tris-acetátu (1M, pH 7,8); 1,23 mg/6,6 µl 0,5 M EDTA; 3,03 mg/1,23 ml 100 mM MgSO₄ · 7 H₂O]

4.1.3. Přístroje

- spektrofotometr Infinite M-200 (Tecan)
- vortex Reax top (Heidolph)
- třepačka MR-12 (Biosan)
- vodní lázeň LCB-11D (Labtech)
- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- inverzní mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- inkubátor CO₂ NB-203XL (N-Biotek)
- Labculture Class II A2 Biological Safety Cabinet (ESCO)
- Odsávačka Flask-Trap 1 (Biosan)
- chladnička s mrazákem (Whirlpool)

4.1.4. Počítačové programy

- I-Control
- Microsoft excell

4.2. Metodika práce

První polovina experimentální části byla věnována sledování aktivity různých indolů vůči AhR v buněčné linii AhaRaCaT. K tomu byla využita metoda Reporter Gene Assay. Dále byly provedeny testy viability buněčné linie HaCaT metodou Crystal Violet Assay.

4.2.1. Příprava média

Do média DMEM bylo ve sterilním prostředí přidáno 5 ml neesenciálních mastných kyselin, 5 ml L-glutaminu a 50 ml FBS. Poté bylo médium promícháno překlápěním a uchováno v chladničce k dalšímu použití. Před každým použitím bylo médium ohřáto ve vodní lázni na laboratorní teplotu.

4.2.2. Pasáž buněk

Buňky linie HaCaT i AhaRaCaT byly rozmrazeny a přeneseny na 25 cm² kultivační lahev s 5 ml živného média. Kultivační lahev byla popsána a vložena do inkubátoru. Buněčná kultura byla průběžně kontrolována a médium bylo měněno podle potřeby.

Pasáž buněk byla provedena tak, že bylo do 50 ml falkony odebráno depletované (vyčerpané) médium, které bylo uchováno pro další postup. Adherentní kultura byla opláchnuta 5 ml PBS, které bylo následně odsáto. Po omytí byla kultura vystavena 1 ml trypsinu, aby došlo k uvolnění buněk ze dna kultivační lahve. Takto připravená lahev byla umístěna na 10 minut do inkubátoru. Po uplynutí času byla lahev vyjmuta z inkubátoru, zkontrolována a přenesena do flowboxu. Do lahve bylo přidáno 8 ml média a lahev byla promyta opakovaným pipetováním buněčné suspenze. Tato suspenze byla dále přepipetována do čisté 15 ml falkony. Z této falkony bylo odebráno 20 µl buněčné suspenze do čisté 0,5ml mikrozkuřavky. Tato mikrozkuřavka byla přenesena k inverznímu mikroskopu. Zde bylo ke 20 µl suspenze přidáno 80 µl trypanové modři a objem byl propipetován. Ze vzniklé suspenze bylo 10 µl přeneseno do Bürkerovy komůrky překryté krycím sklíčkem. Takto připravená komůrka byla vložena do mikroskopu a bylo provedeno počítání buněk v suspenzi.

Do kultivační lahve byly pipetovány 2 ml zbylé buněčné suspenze a bylo přidáno 15 ml média. Tato kultivační lahev byla umístěna zpět do inkubátoru. Buněčné linie byly udržovány až 25 pasáží a pasážování bylo prováděno ve dvou až tří denních intervalech. Každá kultivační lahev byla použita maximálně 3x.

Na víkend bylo k buněčné linii AhaRaCaT přidáno antibiotikum Hygromycin B ve čtyřtisícinovém množství než celkový obsah živného média v kultivační lahvi (200 µg/mL finální koncentrace). Tím bylo zajištěno, že si linie AhaRaCaT udrží reportérový konstrukt.

4.2.3. Počítání buněk

V Bürkerově komůrce bylo počítáno množství buněk v jednotlivých políčkách. Následně bylo podle vzorce (Obrázek č. 4) vypočítáno, jaký objem suspenze bude třeba k vysetí požadovaného množství buněk na mikrotitrační destičky.

$$\left[\frac{x_1 + x_2 + x_n}{n} \right] * r = b$$

Obrázek č. 4: Rovnice pro výpočet potřebného objemu buněčné suspenze (x-počet buněk v políčku Bürkerovy komůrky, n-počet políček, r-faktor ředění, b-počet buněk · 10⁴ v 1 ml buněčné suspenze)

4.2.4. Výsev

Výsev byl proveden na 96ti jamkovou mikrotitrační destičku. Do každé jamky bylo pipetováno 20 tisíc buněk. Podle výpočtu z výše uvedeného vzorce byl pipetován potřebný objem suspenze do čisté 50 ml falkony. K tomuto objemu byl přidán objem média, kterým naředíme suspenzi, abychom měli požadované množství buněk na 1 ml. Celkový objem média spotřebovaného na 1 destičku je zhruba 10 ml. Připravená suspenze byla promíchána překlápěním. Do každé jamky bylo pipetováno 100 µl této suspenze. Najednou byly vysazeny 4 destičky a po výsadbě byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin.

4.2.5. Příprava zásobních roztoků

Tabulka č. 1: Navážky pro zásobní 100 mM / 50 mM roztoky

Název	Zkratka	Navážka v g na 0,1ml 100 mM roztoku	Poznámka
Kyselina indol-3-octová	IAA	0,0018	-
Indol-3-aldehyd	IA	0,0015	-
Kyselina indol-3-pyrohroznová	IPY	0,0019	-
Indol-3-acetamid	IAD	0,0017	-
Kyselina indol-3-propionová	IPA	0,002	-
Kyselina indol-3-mléčná	ILA	0,0021	-
Indol-3-akrylát	IAC	0,0021	maximum 50 mM
Indol	IND	0,0012	-
Tryptamin	TR	0,0016	-
Indol-3-ethanol	IET	0,0016	-
Zásobní roztoky jsou připravovány v DMSO			

Zásobní roztoky byly připravovány nové každý týden, tedy nebylo připraveno více jak 100 µl roztoku najednou. Podle tabulky č. 1 bylo naváženo požadované množství pro 100 µl roztoku. Z těchto roztoků byly dále připravovány další o nižší koncentraci. Mezi každým ředěním byly roztoky promíchány na vortexu. V dalším kroku byly od každé látky připraveny koncentrace 50, 10 a 1 mM kromě Indol-3-akrylát (IAC), kde maximální možná koncentrace byla 50 mM.

4.2.6. Inkubace 24 a 4hodinová

Inkubace byla provedena 2. den po výsevu destiček. Bylo použito dříve odebrané depletované médium. Každý pracovní roztok byl pipetován v poměru 600 μ l depletovaného média a 0,6 μ l zásobního roztoku. Ve stejném poměru byly pipetovány i kontrolní látky DMSO a FICZ (10 mM). Takto připravené roztoky byly vortexovány a pipetovány na vysazenou destičku tak, že nejprve byl odsáto médium a následně bylo připipetováno 100 μ l pracovního roztoku. Všechny látky byly pipetovány ve 3 opakováních na destičku podle schématu níže (Obrázek č. 5). Na každou destičku bylo nanášeno 5 zkoumaných látek, pozitivní a negativní kontrola. Takto připravené destičky byly vloženy do inkubátoru na 4 nebo 24 hodin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													100
B													50
C													10
D													1
E													
F													
G													
H													
	100	50	10	1		1	10	50	100		FICZ	DMSO	

Obrázek č. 5: Schéma rozložení testovaných látek pro 4h a 24h experimenty

Zastavení inkubace bylo provedeno vyklepnutím destiček do výlevky. Dále bylo přidáno 25 μ l PBS k promytí. Následně byl PBS vyklepnut do výlevky.

4.2.7. Reporter Gene Assay

Po ukončení doby inkubace buněčné linie AhaRaCaT a proplachu PBS bylo pipetováno 25 μ l 1x Reporter Lysis Buffer na jamku, destičky byly zalepeny a vloženy do mrazáku. (-78 °C) minimálně na 30 minut. Následně byly destičky vyjmuty z mrazáku a umístěny na laboratorní třepačku, kde byly nechány, dokud nerozmrzly. K měření byly použity bílé mikrotitrační destičky, do kterých bylo pipetováno 6 μ l lyzátu z rozmražené destičky a 30 μ l substrátu. Obě složky byly promíchány krouživým pohybem destičky po stole a přiměřeným poklepáním po krajích destičky. Dále byla destička vložena do spektrofotometru Tecan M-200, kde byla měřena luminiscence.

4.2.8. Proliferační analýza krystalovou violetí

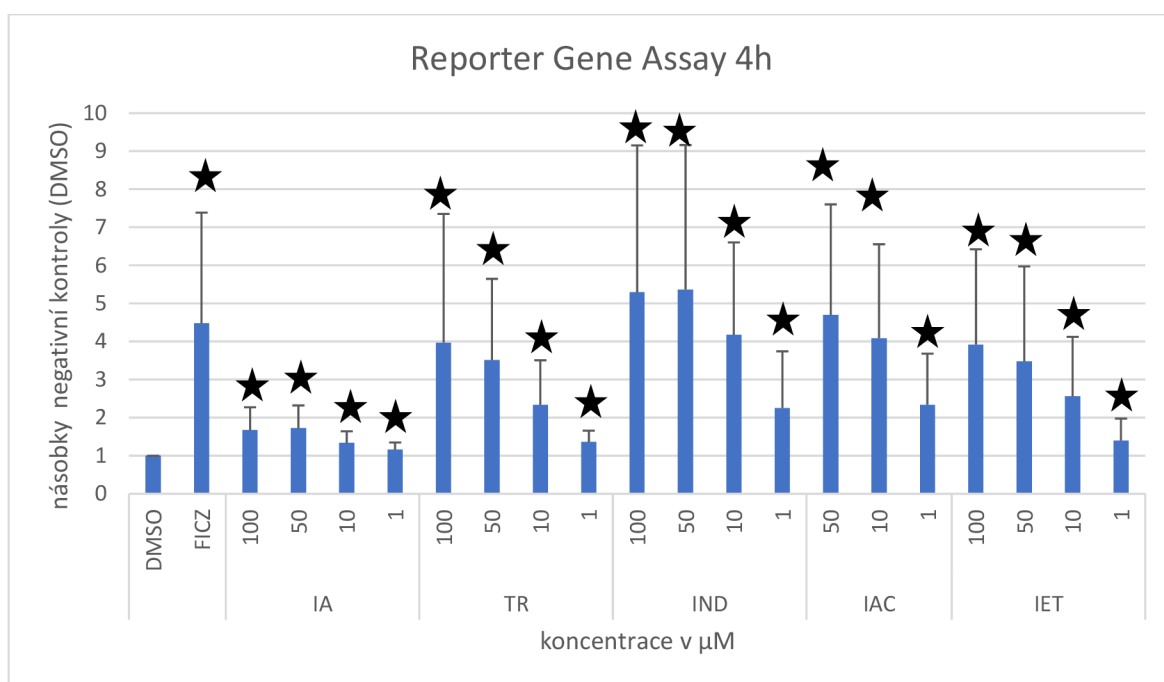
K proliferační analýze krystalovou violetí byla využita původní buněčná linie HaCaT. Buněčná linie byla zpasážována a do každé jamky bylo vysazeno odhadem 5 tisíc buněk. Inkubace probíhala ve 3 po sobě jdoucích 24hodinových intervalech, tedy bylo 3krát odsáto médium z destičky a znovu byl pipetován čerstvý pracovní roztok. Byly pipetovány pouze roztoky připraveny z nejvyšších koncentrací zásobních roztoků. Po uplynutí 72 hodin byla inkubace zastavena a byla stanovena cytotoxicita pomocí Crystal Violet Assay.

Nejprve bylo vyklepnuto staré médium z destiček a ty byly osušeny na buničině. Poté byly destičky promyty 60 μ l PBS a opět vyklepnuty a osušeny. V dalším kroku bylo přidáno 60 μ l 0,1% roztoku krystalové violeti. Tyto destičky byly umístěny na třepačku při laboratorní teplotě na 30 minut. Po dokončení inkubace byly destičky opatrně vyklepnuty a osušeny na buničině. Následně byly destičky promývány PBS a sušeny na buničině, dokud pouštěly barvu. Po promytí bylo do každé jamky přidáno 100 μ l methanolu k rozpuštění barviva. Nakonec byly destičky měřeny spektrofotometrem Tecan M-200 při 595 nm s použitím programu I-Control.

5. Výsledky

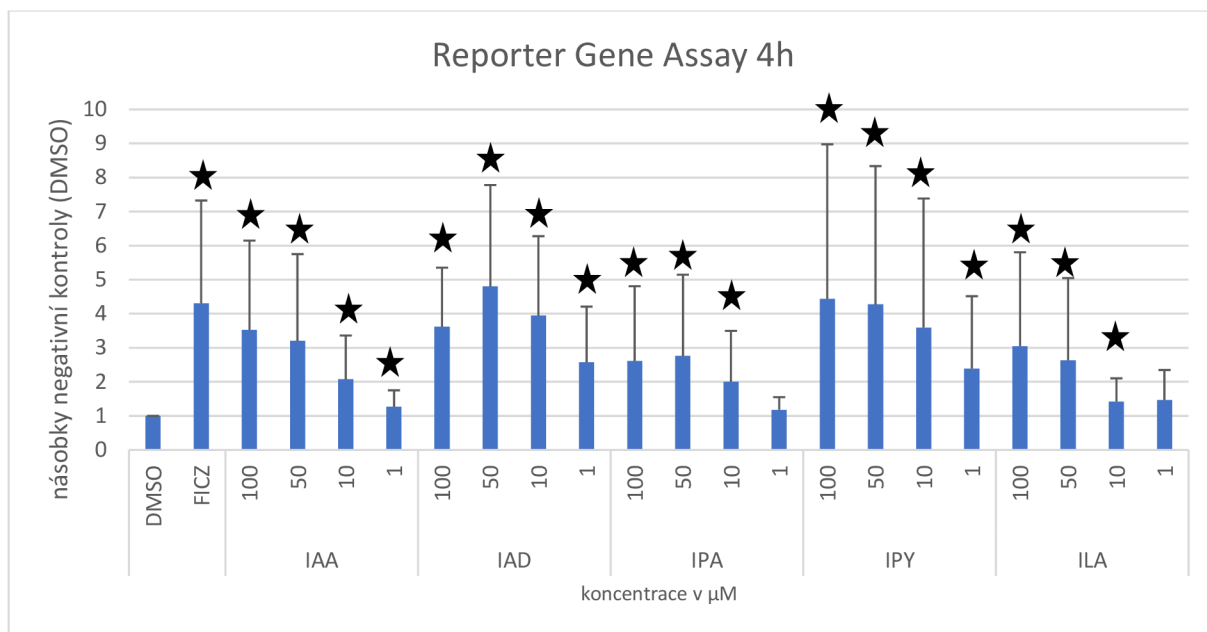
5.1. Reporter Gene Assay

Stabilně transfekovaná linie odvozená od immortalizovaných keratinocytů HaCaT nesoucí AhR responzivní element fúzovaný s reportérovým genem pro luciferázu (AhaRaCaT) byla inkubována s vybranými indoly po dobu 4 a 24 hodin.



Graf č. 1: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT. Testované indoly (1-100 µM) byly inkubovány po dobu 4h s linií AhaRaCaT. Výsledky jsou průměrem ze 14 nezávislých experimentů a jsou vyjádřeny v procentech negativní kontroly (DMSO, 0,1% v/v) a Studentovým t-testem byly určeny statisticky významné hodnoty (*; $p < 0,05$).

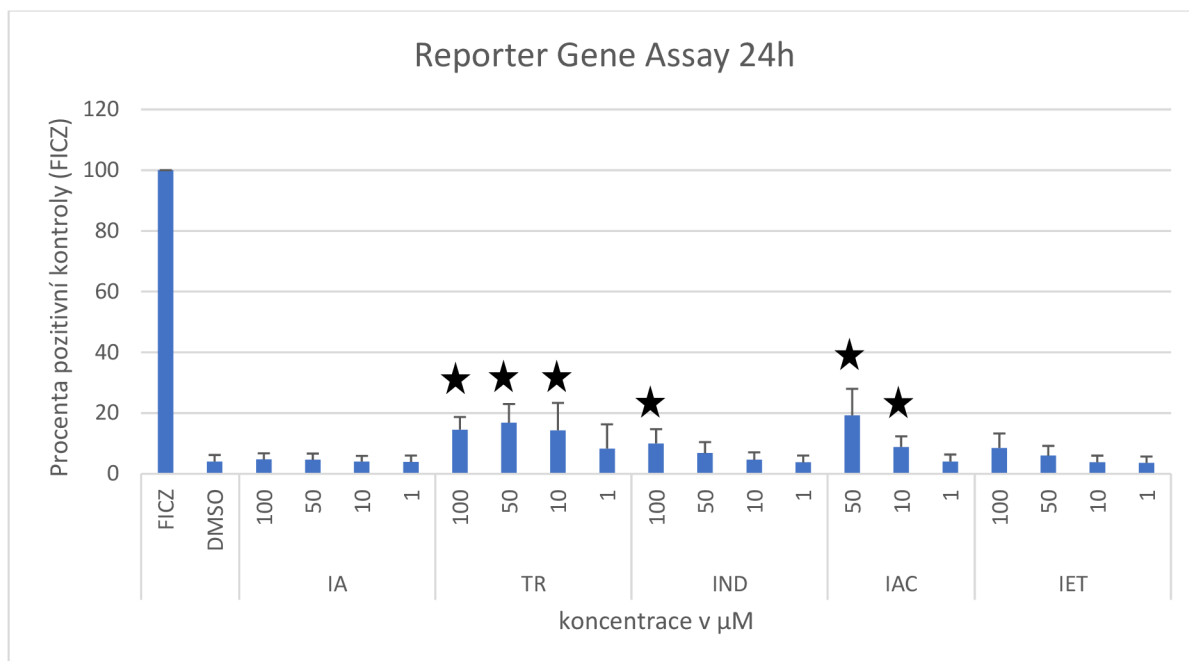
V první skupině testovaných látek byl zřetelný signifikantní koncentračně závislý nárůst na AhR-závislé luciferázové aktivity pro většinu testovaných látek (Graf č.1). S výjimkou IA dosahovala indukce pro 100 µM koncentrace srovnatelných hodnot s pozitivní kontrolou FICZ o koncentraci 10 µM. Hodnota FICZ dosahovala v průměru téměř 4,5násobku hodnoty DMSO. Nejvyšších hodnot indukce dosahoval indol v koncentracích 50 a 100 µM, kdy hodnoty lehce přesáhly pětínásobek negativní kontroly. Všechny hodnoty byly určeny jako statisticky významné.



Graf č. 2: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT. Testované indoly (1-100 μM) byly inkubovány po dobu 4h s linií AhaRaCaT. Výsledky jsou průměrem ze 14 nezávislých experimentů a jsou vyjádřeny v procentech negativní kontroly (DMSO, 0,1% v/v) a Studentovým t-testem byly určeny statisticky významné hodnoty (*; $p < 0,05$).

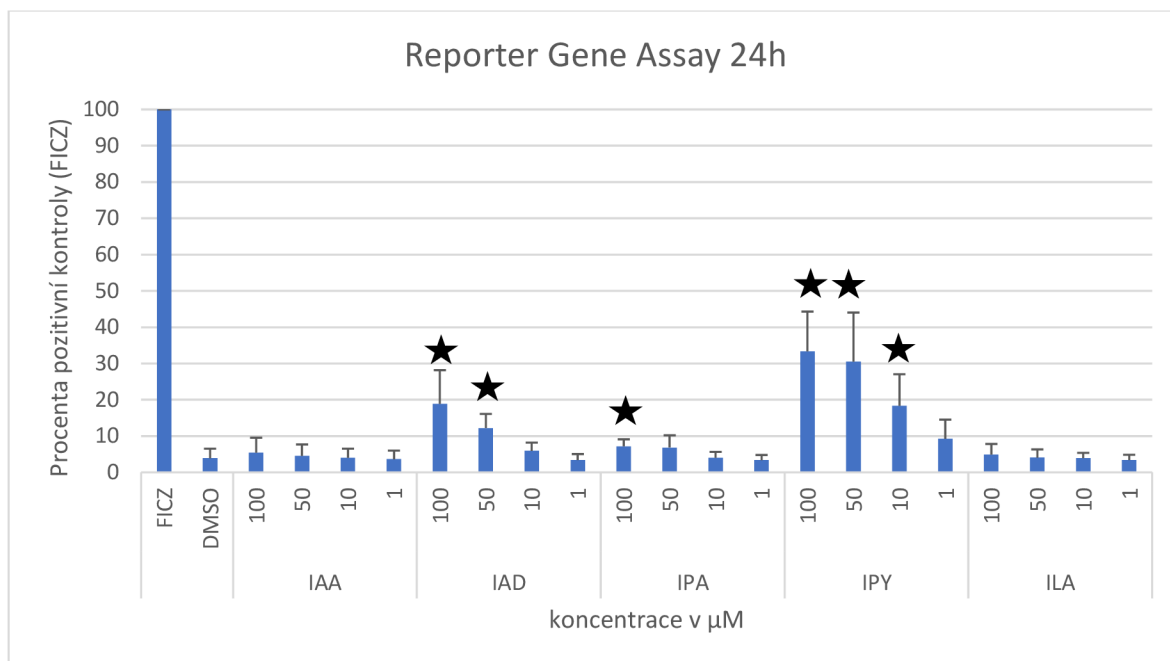
V druhé sérii testovaných indolů vykazovaly všechny látky rovněž koncentračně závislou indukci luciferázové aktivity, která byla srovnatelná s pozitivní kontrolou (Graf č.2). Výjimku tvořil IPA, který dosáhl saturace již v koncentraci 10 μM a která se pohybovala přibližně na polovině indukce pozitivní kontrolou (FICZ, 10 μM). Všechny hodnoty mimo 1 μM ILA a IPA byly vyhodnoceny jako statisticky významné.

Výsledky 4hodinového experimentu prokazují, že vybrané mikrobiální katabolity tryptofanu indukují na AhR-závislou luciferázovou aktivitu ve stabilně transfekovaných keratinocytech.



Graf 3: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT. Testované indoly (1-100 µM) byly inkubovány po dobu 24h s linií AhaRaCaT. Výsledky jsou průměrem ze 6 nezávislých experimentů a jsou vyjádřeny jako procento pozitivní kontroly, kterou byl FICZ (10 µM). Studentovým t-testem byly určeny statisticky významné hodnoty (*; $p < 0,05$).

První série testovaných látek vykazovala významně nižší hodnotu indukce luciferázové aktivity ve srovnání s FICZ (průměrně 30tinasobek negativní kontroly) za 24 h. TR, IND a IAC, signifikantně indukovaly AhR-závislou luciferázovou aktivitu, IA a IET nikoliv. Druhá série látek vykazovala podobný trend, tzn. indukovala výrazně nižší hodnotu luciferázové aktivity ve srovnání s FICZ (graf č.4). Statisticky významnou aktivitu po 24hodinové inkubaci vykazoval IPY, IAD a IPA.

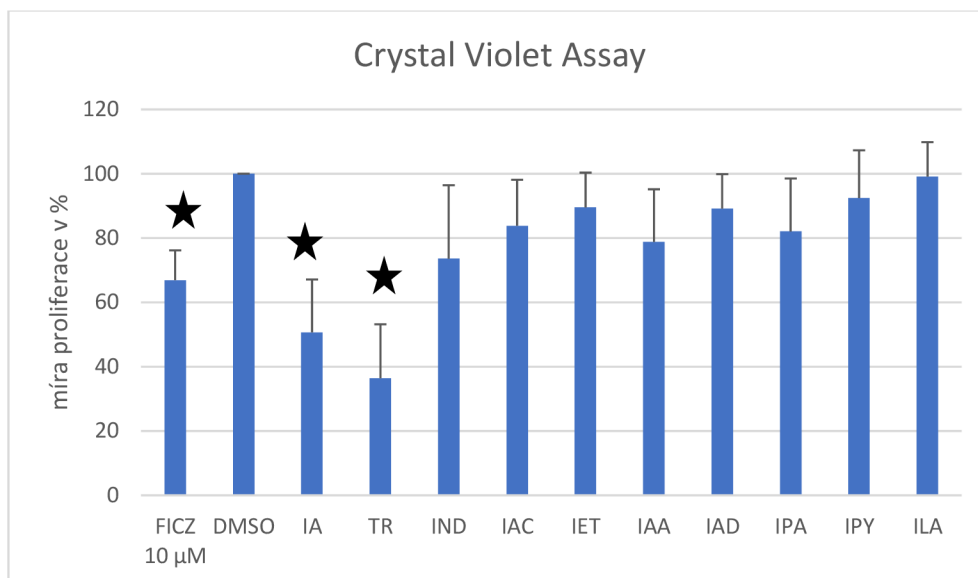


Graf 4: Na AhR-závislá luciferázová aktivita buněčné linie AhaRaCaT. Testované indoly (1-100 µM) byly inkubovány po dobu 24h s linií AhaRaCaT. Výsledky jsou průměrem ze 6 nezávislých experimentů a jsou vyjádřeny jako procento pozitivní kontroly, kterou byl FICZ (10 µM). Studentovým t-testem byly určeny statisticky významné hodnoty (*; $p < 0,05$).

Výsledky z 24hodinového experimentu naznačují, že žádná z testovaných látek není schopna dosáhnout maximální indukce pozorované pro FICZ.

5.2. Crystal Violet Assay

Míra vlivu testovaných látek na proliferaci keratinocytů byla testována v parentální HaCaT linii pomocí metody krystalové violeti. Cílem bylo zjistit, zda aktivace AhR vybranými indoly může mít vliv na proliferaci.



Graf 5: Míra proliferace buněčné linie HaCaT inkubované s testovanými indoly. HaCaT buňky byly inkubovány s testovanými látkami (100 μM , výjimka IAC o 50 μM) po 24h intervalech v celkové době 72 hodin. Výsledky jsou vyjádřeny jako % negativní kontroly (DMSO, 0,1% v/v). Studentovým t-testem byly určeny statisticky významné hodnoty (*; $p < 0,05$).

Výsledky proliferace ukázaly, že modelový ligand AhR, FICZ, signifikantně potlačil proliferaci ve srovnání s negativní kontrolou (Graf č. 5). Podobného statisticky významného účinku bylo dosaženo i pro IA a TR, až cca 50% a 60% poklesu, v tomto pořadí. Snad s výjimkou ILA, kdy nebyl pozorován pokles ve srovnání s DMSO, všechny ostatní testované látky mírně potlačily proliferaci.

6. Diskuse

Cílem této práce bylo zjistit vztah mezi mírou proliferace lidských keratinocytů a aktivitou aryluhlovodíkového receptoru v přítomnosti mikrobiálních katabolitů tryptofanu. V první části byla testována míra aktivace aryluhlovodíkového receptoru (AhR) na AhR-responzivní buněčné linii AhaRaCaT vybranými katabolytryptofanu. Celkem bylo testováno 10 látek o 4 různých koncentracích (1, 10, 50 a 100 μM) po dobu 4 a 24 hodin. Ve druhé části byl zkoumán vliv roztoků o nejvyšších koncentracích (100 μM , u IAC 50 μM) na proliferaci buněčné linie HaCaT, která byla vystavena tomuto působení s 24hodinovou periodou po dobu 72 hodin.

Z výsledků Reporter Gene Assay můžeme vyvodit, že 4hodinová inkubace AhaRaCaT linie s metabolity tryptofanu měla na nárůst AhR-závislé luciferázové aktivity větší vliv než 24hodinové vystavení těmito látkám. Přesněji u 4hodinových experimentů se toto týkalo všech testovaných látek, u 24hodinových pouze 4. Zajímavým překvapením je však skutečnost, že proliferace byla aktivací AhR spíše potlačena, jak je patrné nejen pro sledované látky, ale i pro modelový ligand, FICZ.

Katabolity tryptofanu mohou být využity při léčbě některých kožních nemocí jako je například atopická dermatitida. Například výzkum Fang et al. (2022) naznačuje, že na ose střevo-kůže, *Bifidobacterium longum* CCFM1029 upreguloval metabolismus tryptofanu, produkoval IA k potlačení imunitní reakce zprostředkované AhR, čímž byly symptomy AD zmírněny. Výzkum Fang et al. dále naznačuje možné využití dalších metabolitů tryptofanu. Dle výzkumu Yu et al. (2019) je v kůži postižené atopickým ekzémem významně snižená koncentrace IA, která hraje roli v regulaci atopické dermatitidy. V atopických lézích je oslabena metabolická dráha tryptofanu. Důvodem může být suchý a na živiny chudý povrch kůže. Z výsledků jeho studie vyplývá, že při stimulaci atopické tkáně IA dochází k výraznému snížení exprese thymického stromálního lymfopoetinu (TSLP) a až vymizení zánětu v kožních lézích. Mé výsledky ukázaly, že testované modelové AhR ligandy, včetně výše zmíněného IA, spíše potlačují proliferaci buněčné linie HaCaT (Graf č.5). Nicméně, aktivace AhR byla působením IA nejmenší ze všech testovaných látek. Tyto výsledky tak naznačují, že IA má v lidských keratinocytech jiný molekulární cíl než AhR, skrz který potlačuje proliferaci. Jistý nesoulad mezi touto *in vitro* studií a *in vivo* (Fang et al., 2022) lze přisoudit jednak mezidruhovým rozdílům (myši vs lidský AhR), případně specifickému prostředí buněk imunitního systému, které byly přítomny v *in vivo* studii, nikoliv však v této.

Aoki et al. (2014) tvrdí, že IPY z testovaných aromatických pyrohroznových kyselin (kys. fenylpyrohroznová a kys. 4-hydroxyfenylpyrohroznová) nejsilněji aktivovalo AhR *in vitro* i *in vivo*, což souhlasí s mými výsledky Reporter Gene Assay, kdy IPY vykazoval u 4hodinových experimentů druhé nejvyšší hodnoty AhR-závislé luciferázové aktivity a u 24hodinových dokonce nejvyšší hodnoty. Dále by se daly aromatické pyruváty využít při zmírnění závažnosti kožních lézí, snižují totiž cytotoxicitu v HaCaT buňkách ozářených UVB a snižují expresi mRNA IL-6 a IL-1 β .

Dle Vyhlídalová et al. (2020) jsou IAA, ILA, IPA a IA agonisty s nízkým účinkem. IET, IAC a TR jsou agonisty AhR se středním účinkem a IAD a IPY jsou agonisty s vysokým účinkem. Mé výsledky 24hodinové expozice buněčné linie AhaRaCaT se shodují s tímto rozdělením. Zatímco ve zmíněném výzkumu byla použita linie AZ-AHR, která je odvozena z jaterní tkáně, já použila linii odvozené z kůže. Dalším rozdílem byla koncentrace testovaných látek, která v mých experimentech byla maximálně 100 μ M. U experimentů na hepatocytech byly nejvyšší použité koncentrace 1 mM pro indol, ostatní látky byly testovány v koncentraci 200 μ M. Odlišná byla i doba vystavení buněčných linií působení vybraných indolů. V mých experimentech jsem využila časové úseky 4 a 24 hodin na rozdíl od experimentů na hepatocytech, které byly inkubovány pouze v jednom časovém úseku, a to 24 hodin (Vyhlídalová et al, 2020).

Dle článku Puga et al (2002) může AhR v nepřítomnosti exogenního ligandu podpořit progresi buněk buněčným cyklem. Inhibice G1 fáze 5L hepatomových buněk potkana vykazuje vyšší hladinu inhibitoru cyklin-dependentní kináza 2 (CDK2), p27KIP1. CDK2 aktivita je nutná pro postup do S fáze cyklu a inhibicí se buněčný cyklus zastaví. Jedním z cílů CDK2 je fosforylace proteinu retinoblastomu (RB), který může tvořit proteinové komplexy a AhR. Koexprese AhR a RB snižuje aktivitu promotoru cyklinu A, expresi cyklinu A a potlačuje expresi a aktivitu CDK2. Tímto způsobem lze alternativně zastavit buněčný cyklus přes AhR s RB jako koaktivátorem. Je tedy pravděpodobné, že dočasná aktivace AhR metabolity tryptofanu působí podobným mechanismem. Pokles proliferace HaCaT linie pro IA a TR může pravděpodobně zahrnovat i jiné mechanismy než AhR aktivaci, která byla, zejména pro IA, skoro zanedbatelná.

Metody použité v této práci mají svoje limity. Nedají nám úplnou představu, a proto by bylo vhodné dále provést navazující experimenty k hlubšímu poznání týkající se aktivace AhR.

7. Závěr

V této práci se zabývám vztahem mezi aktivací AhR katabolity tryptofanu a mírou proliferace lidských keratinocytů. Testovala jsem vliv různých koncentrací vybraných indolových látek na AhR-responzivní buněčnou linii AhaRaCaT a na původní buněčnou linii imortalizovaných keratinocytů HaCaT. Nejprve jsem provedla Reporter Gene Assay na buněčné linii AhaRaCaT, kdy jsem danou linii vystavila po dobu 4 nebo 24 hodin roztokům indolů (Indol, Tryptamin, Indol-3-aldehyd, Kyselina indol-3-octová, Indol-3-akrylát, Indol-3-acetamid, Indol-3-etanol, Kyselina indol-3-mléčná, Kyselina indol-3-propionová, Kyselina indol-3-pyrohroznová) o koncentracích 1, 10, 50 a 100 μM . Výjimkou byl Indole-3-acrylát, kde jsem použila koncentrace 1, 10 a 50 μM . Po uplynutí požadované doby působení indolů jsem stanovila, jaký vliv mají tyto látky na aktivaci AhR. Dále jsem provedla Crystal Violet Assay, kdy jsem buněčnou linii HaCaT vystavila po dobu 72 hodin s 24hodinovou periodou působení 100 μM roztokům látek s výjimkou Indol-3-akrylát, kdy byla použita koncentrace 50 μM . Z naměřených dat jsem určila, že vybrané indoly mírně potlačují proliferaci HaCaT buněk. Aktivace AhR má tak spíše negativní vliv na proliferaci keratinocytů. Cíle práce byly splněny.

8. Literatura

8.1. Odborné články a knihy

- ABEL, Josef; HAARMANN-STEMMANN, Thomas. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. 2010.
- AL-SARIAY, Ahmed H., et al. GENETIC STUDY OF PSORIASIS DISEASE: A REVIEW. *Plant Archives*, 2021, 21.1: 2046-2048.
- ANDROUTSOPOULOS, Vasilis P.; TSATSAKIS, Aristidis M.; SPANDIDOS, Demetrios A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer*, 2009, 9: 1-17.
- AOKI, Reiji, et al. Indole-3-pyruvic acid, an aryl hydrocarbon receptor activator, suppresses experimental colitis in mice. *The Journal of Immunology*, 2018, 201.12: 3683-3693.
- AOKI, Reiji, et al. Protective effect of indole-3-pyruvate against ultraviolet b-induced damage to cultured HaCaT keratinocytes and the skin of hairless mice. *PLoS One*, 2014, 9.5: e96804.
- BENÁKOVÁ, MUDr Nina, et al. Léčba atopické dermatitidy/ekzému u dospělých. *Medicína pro praxi*, 2010, 7.5: 221-228.
- BENDOVÁ, Hana. *Anatomie a fyziologie kůže*, 2010
- BITTINGER, Mark A.; NGUYEN, Linh P.; BRADFIELD, Christopher A. Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular pharmacology*, 2003, 64.3: 550-556.
- BROWN, Dean W., et al. Skin CD4+ T cells produce interferon- γ in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. *Journal of investigative dermatology*, 2000, 114.3: 576-580.
- BUSBEE, Philip B., et al. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition reviews*, 2013, 71.6: 353-369.
- DE BENEDETTO, Anna; KUBO, Akiharu; BECK, Lisa A. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization?. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132.3: 949-963.

- DENISON, Michael S., et al. Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. *Molecular Biology Approaches to Toxicology*, 1998, 393-410.
- DENISON, Michael S.; NAGY, Scott R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2003, 43.1: 309-334.
- DICKINSON, J. Richard; SALGADO, L. Eshantha J.; HEWLINS, Michael JE. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278.10: 8028-8034.
- DVOŘÁK, Zdeněk; POULÍKOVÁ, Karolína; MANI, Sridhar. Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 215: 113231.
- ESSER, Charlotte, et al. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. In: *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 677-691. (26+32)
- FANG, Zhifeng, et al. Bifidobacterium longum mediated tryptophan metabolism to improve atopic dermatitis via the gut-skin axis. *Gut Microbes*, 2022, 14.1: 2044723.
- FURUE, Masutaka; HASHIMOTO-HACHIYA, Akiko; TSUJI, Gaku. Aryl hydrocarbon receptor in atopic dermatitis and psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.21: 5424.
- GEARING, A. J. H., et al. Cytokines in skin lesions of psoriasis. *Cytokine*, 1990, 2.1: 68-75.
- GREEN, Jon A.; COOPERBAND, Sidney R.; KIBRICK, Sidney. Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes. *Science*, 1969, 164.3886: 1415-1417.
- GUÐJÓNSSON, Jóhann E., et al. HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118.2: 362-365.
- HASEMANN, Charles A., et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*, 1995, 3.1: 41-62.

- KIM, Whan B.; JEROME, Dana; YEUNG, Jensen. Diagnosis and management of psoriasis. *Canadian Family Physician*, 2017, 63.4: 278-285.
- HASEMANN, Charles A., et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*, 1995, 3.1: 41-62.
- LEE, Jin-Hyung; LEE, Jintae. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS microbiology reviews*, 2010, 34.4: 426-444.
- LEHMANN, Thomas, et al. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production?. *European journal of cell biology*, 2010, 89.12: 895-905.
- MALORNI, Livia, et al. Biological and Toxicological responses to dioxins exposures. *ARCHIVE of ISSUES*, 2012, 1.
- MENG, D. I., et al. Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* is anti-inflammatory in the immature intestine. *Pediatric research*, 2020, 88.2: 209-217.
- MISERY, Laurent, et al. Current pharmaceutical developments in atopic dermatitis. *Current opinion in pharmacology*, 2019, 46: 7-13.
- MOFFETT, John R.; NAMBOODIRI, MA ARYAN. Tryptophan and the immune response. *Immunology and cell biology*, 2003, 81.4: 247-265.
- MURRAY, Iain A.; PERDEW, Gary H. How ah receptor ligand specificity became important in understanding its physiological function. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21.24: 9614.
- NOGUEIRA, Sofia, et al. Tapinarof for the treatment of psoriasis. *Dermatologic Therapy*, 2022, e15931.
- OESCH-BARTLOMOWICZ, Barbara, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102.26: 9218-9223.
- OHTAKE, Fumiaki, et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 2003, 423.6939: 545-550.

- OMIECINSKI, Curtis J., et al. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological sciences*, 2011, 120.suppl_1: S49-S75.
- POEGGELER, Burkhard, et al. Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. *Brain research*, 1999, 815.2: 382-388.
- PUC CETTI, Matteo, et al. Pharmaceutically Active Microbial AhR Agonists as Innovative Biodrugs in Inflammation. *Pharmaceuticals*, 2022, 15.3: 336.
- PUGA, Alvaro; XIA, Ying; ELFERINK, Cornelis. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chemico-biological interactions*, 2002, 141.1-2: 117-130.
- RENDON, Adriana; SCHÄKEL, Knut. Psoriasis pathogenesis and treatment. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.6: 1475.
- SAKURAI, Takuma; ODAMAKI, Toshitaka; XIAO, Jin-zhong. Production of indole-3-lactic acid by bifidobacterium strains isolated from human infants. *Microorganisms*, 2019, 7.9: 340.
- SCOTT, Samantha A.; FU, Jingjing; CHANG, Pamela V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117.32: 19376-19387.
- SIVAMANI, Raja K., et al. Biological therapy of psoriasis. *Indian Journal of Dermatology*, 2010, 55.2: 161.
- SU, Xiaomin; GAO, Yunhuan; YANG, Rongcun. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites maintain gut and systemic homeostasis. *Cells*, 2022, 11.15: 2296.
- TELFER, Nicholas R., et al. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Archives of dermatology*, 1992, 128.1: 39-42.
- TSUJI, Gaku, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell death & disease*, 2017, 8.7: e2931-e2931.
- VIKSTRÖM BERGANDER, Linda, et al. Tryptamine serves as a proligand of the AhR transcriptional pathway whose activation is dependent of monoamine oxidases. *Molecular Endocrinology*, 2012, 26.9: 1542-1551.
- VRZAL, Radim; ULRICHOVÁ, Jitka; DVORÁK, Zdenek. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and

- pathophysiological conditions. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2004, 148.1: 3-10.
- VYHLÍDALOVÁ, Barbora, et al. Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. International journal of molecular sciences, 2020, 21.7: 2614.
- WEI, Yu-Dan; RANNUG, Ulf; RANNUG, Agneta. UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. Chemico-biological interactions, 1999, 118.2: 127-140
- WEIGLE, Nancy; MCBANE, Sarah. Psoriasis. American family physician, 2013, 87.9: 626.
- WEINSTEIN, Gerald D.; MCCULLOUGH, Jerry L.; ROSS, Priscilla A. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. Journal of Investigative Dermatology, 1985, 85.6: 579-583.
- WILLIAMS, Hywel C. A 10-year-old girl with atopic dermatitis reports itching that has recently become re-lentless, resulting in sleep loss. Her mother has been reluctant to treat the girl with topical corticosteroids, because she was told that they damage the skin, but she is ex-hausted and wants relief for her child. How should the problem be managed?. N Engl J Med, 2005, 352: 2314-24.
- XU, Xiaoting, et al. Species-specific differences in aryl hydrocarbon receptor responses: how and why?. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22.24: 13293.
- YAMAMOTO, Junko, et al. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. Life sciences, 2004, 74.8: 1039-1049.
- YANG, Derek D., et al. Differentiation of CD4⁺ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. Immunity, 1998, 9.4: 575-585.
- YOUSEF, Hani; ALHAJJ, Mandy; SHARMA, Sandeep. Anatomy, skin (integument), epidermis. 2017.
- YU, Jinlei, et al. A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2019, 143.6: 2108-2119. e12.

8.2. Internetové zdroje

- Lumen Learning – Simple Book Production [online]. [cit. 03.04.2023]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/hypodermis/>
- Národní zdravotnický informační portál [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2023 [cit. 05.05.2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/5001>
- Národní zdravotnický informační portál [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2023 [cit. 05.05.2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4783>
- PubChem. – Indole-3-acetic acid. [online]. [cit. 20.04.2023] Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/indole-3-acetic%20acid>
- PubChem. – Tryptamine. [online]. [cit. 20.04.2023] Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1150>
- PubChem. – Tryptophol. [online]. [cit. 20.04.2023] Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10685#section=Depositor-Supplied-Synonyms>
- WikiSkripta – Kůže [online]. [cit. 03.04.2023] Dostupné z <https://www.wikiskripta.eu/w/K%C5%AF%C5%BEE#/media/Soubor:Skin.jpg>
- U.S. National Library of Medicine – Atopic eczema in children: Management of atopic eczema in children from birth up to the age of 12 years [online]. National Center for Biotechnology Information [cit. 03.05.2023] Dostupné z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204322/>