

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2024**

**Jana Novotná**

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



**Studium vlivu bromovaných derivátů indolu na  
aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a  
pregnanového X receptoru v lidských buněčných  
liniích**

**Bakalářská práce**

**Jana Novotná**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana NOVOTNÁ**  
Osobní číslo: **R20711**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Studium vlivu bromovaných derivátů indolu na aktivitu aryluhlodíkového receptoru a pregnanového X receptoru v lidských buněčných liniích**  
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na zadané téma – aktivace AhR, PXR, role v patofyziologii, sloučeniny s indolovou strukturou
2. Stanovení cytotoxického působení vybraných sloučenin *in vitro*
3. Stanovení transkripční aktivity receptorů AhR a PXR v přítomnosti vybraných derivátů metodou reporter gene assay
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:

Dvořák Z, Pouliková K, Mani S. Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Med Chem.* 2021 Apr 5;215:113231. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113231. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33582577.

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

Stepankova M, Bartonkova I, Jiskrova E, Vrzal R, Mani S, Kortagere S, Dvorak Z. Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol.* 2018 Jun;93(6):631-644. doi: 10.1124/mol.118.112151. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29626056; PMCID: PMC5941192.

Vyhliadalova, B. et al. (2020) Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21072614

Dvořák, Z. et al. (2020) Targeting the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Mol Med* 12, e11621. 10.15252/emmm.201911621

Dvorak, Z. et al. (2020) Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends Pharmacol Sci* 41, 900-908. 10.1016/j.tips.2020.09.013

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 27. března 2022  
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2024

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 29. února 2024

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Jana Novotná

**Název práce:** Studium vlivu bromovaných derivátů indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru v lidských buněčných liniích

**Typ práce:** Bakalářská

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky

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

**Rok obhajoby práce:** 2024

**Klíčová slova:** Aryl uhlovodíkový receptor, pregnanový X receptor, indol, bromované deriváty indolu, MTT, gene reporter assay

**Počet stran:** 57

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

**Abstrakt:** Bakalářská práce se zabývá účinkem bromovaných derivátů indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru (AhR) a pregnanového X receptoru (PXR) v lidských buněčných liniích. Teoretická část je věnovaná jaderným receptorům, konkrétně aryl uhlovodíkovému a pregnanovému X receptoru, kde je podrobněji rozepsána jejich signalizace, ligandy a fyziologické a patofyziologické procesy spojené s těmito receptory. Další kapitola je věnována indolu a jeho halogenovaným derivátům. Praktická část se zaměřuje na studium transkripční aktivity AhR a PXR v přítomnosti vybraných bromovaných derivátů indolu. Z výsledků vyplývá, že všechny studované látky jsou schopné aktivace obou receptorů, avšak s různou účinností a potencí. Nejvyšší aktivaci AhR po 4 h působení způsobuje 6-bromindol a 7-bromoindol, zatímco po 24 h působení byl AhR nejvíce aktivován 5-bromindolem a 6-bromindolem. Nejnižší hohnoty  $EC_{50}$  (okolo  $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byly pozorovány u bromoindolu v poloze 4, 6 a 7 po 4 hodinách inkubace. Co se týče PXR, nejvyšší aktivace po 24 h inkubace byla zaznamenána u 7-bromindolu, u něhož byla pozorována nejvyšší účinnost i potence.

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Jana Novotná

**Title:** Effects of brominated indole derivatives on the activity of the aryl hydrocarbon receptor and pregnane X receptor in human cell lines

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics

**Supervisor:** Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2024

**Keywords:** Aryl hydrocarbon receptor, pregnane X receptor, indole, brominated indole derivatives, MTT, gene reporter assay

**A number of pages:** 57

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

**Abstract:** The bachelor's thesis deals with the effect of brominated indole derivatives on the activity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and pregnane X receptor (PXR) in human cell lines. The theoretical part delves into nuclear receptors, specifically focusing on the aryl hydrocarbon receptor and the pregnane X receptor, where their signaling, ligands and physiological and pathophysiological processes associated with these receptors are discussed in detail. The next chapter is devoted to indole and its halogenated derivatives. The practical part of this thesis focuses on the study of the transcriptional activity of AhR and PXR in the presence of selected brominated indole derivatives. The results show that all the studied substances are capable of activating both receptors, but with different degrees of efficiency and potency. The highest activation of AhR after 4 h of treatment was caused by 6-bromindole and 7-bromindole, whereas after 24 h 5-bromindole and 6-bromindole exhibited the highest activation of AhR. The lowest  $EC_{50}$  values (around  $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) were observed for bromindole at positions 4, 6 and 7 after 4 hours of incubation. Regarding PXR, the highest activation after 24 h of incubation was observed for 7-bromindole, for which the highest efficiency and potency were observed.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Anety Vrzalové, Ph.D. a to za použití literárních zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne:.....

.....

Jana Novotná

### **Poděkování**

Tímto bych moc ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Anetě Vrzalové, Ph.D. za skvělé vedení, veškeré rady a ochotu s čímkoli kdykoli pomoci. Další poděkování patří také mojí milované rodině, která mě po celou dobu studia bezmezně podporovala.



# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
3.1	Jaderné receptory .....	3
3.1.1	Aryl uhlovodíkový receptor .....	4
3.1.1.1	Signalizace AhR.....	5
3.1.1.2	Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s AhR.....	7
3.1.1.3	Ligandy AhR.....	9
3.1.2	Pregnanový X receptor.....	12
3.1.2.1	Signalizace PXR.....	12
3.1.2.2	Ligandy PXR.....	14
3.1.2.3	Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s PXR .....	15
3.2	Metabolismus tryptofanu a deriváty indolu .....	17
3.2.1	Bromované deriváty indolu.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>21</b>
4.1	Materiál .....	21
4.1.1	Biologický materiál.....	21
4.1.2	Testované látky .....	21
4.1.3	Chemikálie a použité roztoky.....	21
4.1.4	Složení použitých roztoků.....	23
4.1.5	Laboratorní pomůcky a přístroje .....	23
4.2	Metody .....	24
4.2.1	Kultivace buněk .....	24
4.2.2	Trypsinizace a pasážování buněk.....	24
4.2.3	Počítání a vysazení buněk na 96-jamkové desky .....	25
4.2.4	Příprava testovaných látek .....	25
4.2.5	MTT test.....	26
4.2.6	Gene reporter assay .....	27
4.2.7	Transfekce buněk .....	28
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>30</b>
5.1	Stanovení cytotoxického působení vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody MTT .....	30
5.2	Stanovení transkripční aktivity AhR v přítomnosti vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody reporter gene assay.....	33
5.3	Stanovení transkripční aktivity PXR v přítomnosti vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody reporter gene assay.....	40
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>43</b>

<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>51</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecná stavba jaderných receptorů .....	4
Obrázek 2: Stavba aryl uhlovodíkového receptoru.....	5
Obrázek 3: Signální dráha AhR .....	7
Obrázek 4: Stavba pregnanového X receptoru .....	12
Obrázek 5: Signální dráha PXR.....	13
Obrázek 6: Metabolismus tryptofanu .....	17
Obrázek 7: Chemická struktura indolu .....	18
Obrázek 8: Chemická struktura vybraných bromovaných derivátů indolu .....	20

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přehled zástupců exogenních a endogenních ligandů .....	11
Tabulka 2: Ředění roztoků testovaných látek.....	26
Tabulka 3: Příprava transfekční směsi.....	29

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Stanovení cytotoxického působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci.....	31
Graf 2: Stanovení cytotoxického působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci.....	31
Graf 3: Stanovení cytotoxického působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci.....	32
Graf 4: Stanovení cytotoxického působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci.....	32
Graf 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení indolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	35
Graf 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení indolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	35
Graf 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	36
Graf 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	36
Graf 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	37
Graf 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR.....	37
Graf 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	38
Graf 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR.....	38
Graf 13: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR..	39
Graf 14: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR.....	39
Graf 15: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T.....	41
Graf 16: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T.....	41
Graf 17: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T.....	42
Graf 18: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T.....	42

# 1 ÚVOD

Změna exprese cílových genů může vést k různým fyziologickým i patofyziologickým účinkům v závislosti na specifických funkcích příslušných genů. Jaderné receptory hrají klíčovou roli například v regulaci metabolismu, reprodukce, imunitní odpovědi a v řadě dalších biologických procesů. V buňce, jak už sám název napovídá, jsou tyto receptory přítomny v buněčném jádře, popřípadě v cytoplasmě, ze které jsou po navázání ligandu do jádra přemístěny. Zástupci jaderných receptorů sdílí obdobnou strukturu, složenou z pěti až šesti domén, které jsou rozmístěny od N-konce po C-konec receptoru. Tato práce se zabývá dvěma jadernými receptory, a to aryl uhlovodíkovým receptorem (AhR) a pregnanovým X receptorem (PXR). Jedná se o ligandem aktivované transkripční faktory, jejich ligandy jsou jak exogenní, tak endogenní látky. Mezi ligandy AhR a PXR patří také indolové deriváty. Indol a jeho deriváty se přirozeně vyskytují v lidském těle. Ve střevním mikrobiomu vzniká indol za pomoci střevních bakterií z tryptofanu. Tato bakalářská práce se věnuje studiu bromovaných derivátů indolu a sleduje, jak modifikace na indolovém jádře ovlivňují transkripční aktivitu AhR a PXR.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na zadané téma - aktivace AhR, PXR, role v patofyziologii, sloučeniny s indolovou strukturou
2. Stanovení cytotoxického působení vybraných sloučenin *in vitro*
3. Stanovení transkripční aktivity receptorů AhR a PXR v přítomnosti vybraných derivátů metodou reporter gene assay
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Jaderné receptory

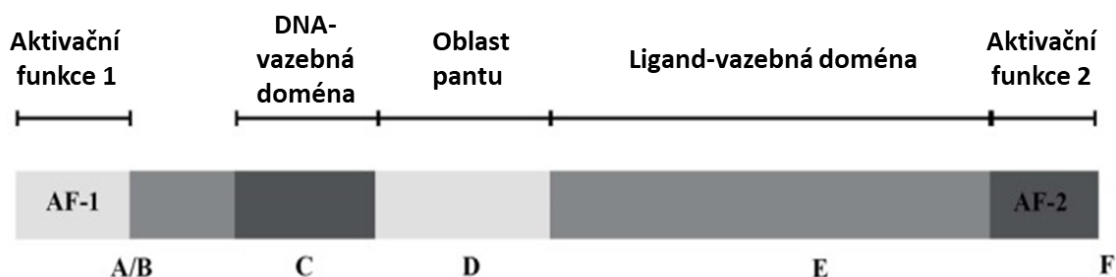
Jaderné receptory jsou součástí velké nadrodiny evolučně příbuzných DNA-vazebných transkripčních faktorů, které řídí procesy zapojené do široké škály fyziologických jevů, jako kontrola embryonálního vývoje, buněčné dělení a udržování homeostázy. Sekvenováním lidského genomu bylo identifikováno 48 jaderných receptorů (Germain *et al.*, 2006). Tyto receptory dělíme do tří podčeledí na steroidní, nesteroidní a sirotčí receptory. Steroidní receptory, mezi které řadíme estrogenový (ER), progesteronový (PR), androgenní (AR) a glukokortikoidní (GR) receptor tvoří po navázání ligandu homodimery (Zuo *et Wan*, 2017). Nesteroidní receptory vytváří heterodimery s retinoidními X receptory (RXR), dělíme je do dvou skupin na permisivní a nepermisivní, což jsou termíny používané k popisu chování receptorů v reakci na vazbu ligandu a následnou regulaci genů (Evans *et Mangelsdorf*, 2014). Receptor pro vitamín D (VDR), thyroïdní receptor (TR) a receptor kyseliny retinové (RAR) patří mezi nepermisivní receptory, jejich heterodimery jsou aktivovány pouze pomocí ligandu, který je specifický pro partnerský jaderný receptor. Jaderní X receptor (LXR), receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPAR) a pregnanový X receptor (PXR) řadíme mezi receptory permisivní, k jejich aktivaci musí být přítomny oba ligandy jak ligand specifickým pro RXR, tak i ligand, který je specifický pro partnerský jaderný receptor (Zuo *et Wan*, 2017).

Sirotčí receptory jsou takové receptory, u kterých nebyly doposud objeveny jejich přirozené endogenní ligandy. Vážou širokou škálu strukturně nepříbuzných sloučenin, které mají obvykle nižší afinitu a účinnost než ligandy známých jaderných receptorů. Pokud dojde k objevení jejich endogenního ligandu, používá se pro ně termín adoptované osířelé receptory (Dvořák *et al.*, 2020a).

Zástupci jaderných receptorů sdílí podobnou strukturu, která se skládá z pěti až šesti domén označených A-F, které jsou rozmístěny od N-konce po C-konec receptoru (Obrázek 1). A/B doména vyskytující se na N-konci se vyznačuje velkou rozmanitostí a díky její vysoké mobilitě dosud nebyla zcela objasněna její terciální struktura. A/B doména obsahuje transkripční aktivační funkci označovanou jako AF-1 (Activation Function-1), která je nezávislá na ligandu. Tyto domény jsou cílem postranslačních modifikací, nejčastěji u nich dochází k fosforylacím, díky těmto změnám získávají



receptory různé funkční vlastnosti. DNA-vazebná doména (DBD) neboli C oblast je u všech jaderných receptorů prakticky identická, obsahuje podobné strukturní prvky a aminokyselinovou sekvenci napříč různými jadernými receptory. Prostřednictvím této domény jaderné receptory rozpoznávají a vážou specifické DNA sekvence nazývané responzivní elementy (REs) (Germain *et al.*, 2006; Pawlak *et al.*, 2012). Oblast pantu taktéž označovaná jako D doména spojuje DBD a ligand-vazebnou doménu (LBD) a umožňuje tak rotaci DBD domény. Největší doménou je LBD neboli E oblast, která zodpovídá za navázání ligandu a dimerizaci receptoru. LBD se skládá ze čtyř strukturně rozdílných, avšak funkčně propojených částí: dimerizační oblasti, kapsy vázající ligand, oblasti pro navázání koregulátoru a šroubovice s aktivační funkcí AF-2 (Activation Function-2) (Germain *et al.*, 2006). U některých jaderných receptorů se na C- konci E domény vyskytuje koncová F doména, jejíž struktura a funkce není díky velké variabilitě sekvencí příliš známá (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

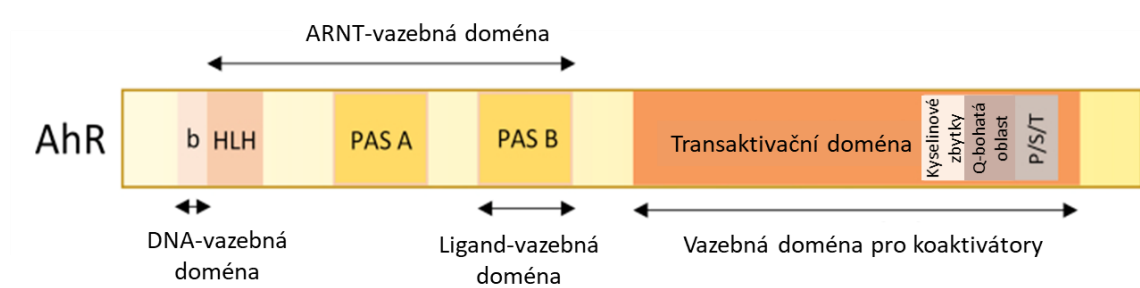


Obrázek 1: Obecná stavba jaderných receptorů (převzato z Pawlak *et al.*, 2012)

### 3.1.1 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) taktéž známý pod názvem dioxinový receptor řadíme mezi ligandy aktivovaný transkripční faktor, který je schopný stimulovat transkripci v reakci na dané xenobiotikum. AhR je schopen díky rozmanitému vazebnému místu vázat širokou škálu strukturně odlišných chemických sloučenin. Mezi jeho ligandy řadíme jak přirozeně se vyskytující endogenní ligandy, tak i environmentální polutanty a syntetické látky (Denison *et Nagy*, 2003). AhR je ve velkém množství exprimován především v játrech, ledvinách, plicích, brzlíku, střevech a kůži (Puga *et al.*, 2009; Esser *et al.*, 2013). AhR je složen ze tří základních funkčních domén: bHLH (basic Helix-Loop-Helix), PAS (Period-ARNT-Single minded) a transaktivační domény

(Obrázek 2). Doména bHLH zprostředkovává tvorbu dimeru s ARNT (AhR jaderný translokátor), komunikaci s chaperonovými proteiny a vazbu do DNA. Dále obsahuje také sekvence, které mají důležitou roli při jaderném importu a exportu. Doména PAS je složena ze dvou strukturálních repetitivních jednotek A a B, kde PAS A se podílí na dimerizaci s ARNT a PAS B zprostředkovává navázání ligandu. Transaktivace doména přítomná na C-konci receptoru je složena ze tří subdomén, a to domény obsahující kyselinové zbytky, oblasti bohaté na glutamin a oblasti bohaté na aminokyseliny serin, treonin a prolin. Prostřednictvím transaktivace domény dochází k interakcím koaktivátorů a korepresorů s receptorem (Larigot *et al.*, 2018).



Obrázek 2: Stavba aryl uhlovodíkového receptoru (převzato z Larigot *et al.*, 2018)

### 3.1.1.1 Signalizace AhR

AhR může aktivovat hned několik signalizačních drah. Nejlépe charakterizovaná je dráha genomická, kterou dále dělíme na kanonickou a nekanonickou. U kanonické dráhy je AhR při absenci ligandu součástí cytosolického multiproteinového komplexu, skládajícího se z heat shock proteinů 90, ko-chaperonových proteinů p23 a proteinu interagujícího s AhR (AIP- AhR interacting protein). Chaperonové proteiny chrání AhR před proteozomální degradací a udržují ho ve správně formě pro následnou vazbu ligandu. Ligand přítomný v cytosolu se váže na vazebné místo receptoru, po jeho navázání komplex disociuje a receptor se přemísťuje do buněčného jádra, kde dochází k dimerizaci AhR s ARNT. Vytvořený heterodimer AhR-ARNT se váže na dioxinové responzivní elementy (DRE), taktéž označované jako xenobiotické responzivní elementy (XRE) v enhancerové oblasti cílových genů, aby rekrutoval komponenty obecného transkripčního aparátu a indukoval jejich expresi. Specifická sekvence tohoto vazebného místa je 5'-GCGTG-3' (Swanson *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 2012). Po transkripční aktivaci se AhR uvolňuje z DNA a je okamžitě exportován z jádra zpátky do cytosolu,

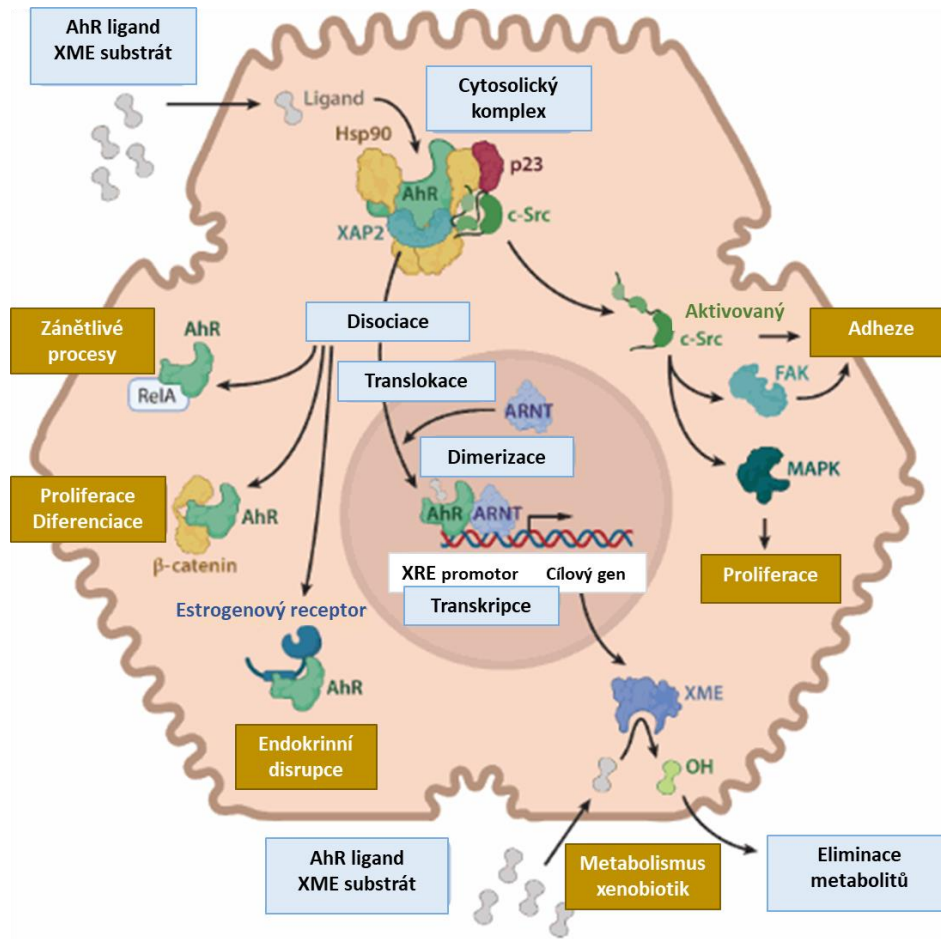
kde je degradován pomocí ubiquitinu skrze proteosomovou dráhu 26S (Jackson *et al.*, 2015).

Mezi cílové geny AhR řadíme mnoho detoxikačních genů kódující enzymy první fáze biotransformace, cytochromy P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A5, CYP1B1 a CYP2S1 a enzymy druhé fáze biotransformace: UDP-glukuronyltransferáza UGT1A6, NADPH dependentní chinon oxidoreduktáza1, aldehyddehydrogenáza ALDH3A1 a glutathion-S-transferázy (GSTs) (Puga *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2015). Jedním z klíčových cílových genů aktivovaných v genomické dráze je také AhR represor (AhRR), který se nachází na lidském chromozomu 5p15.3. AhRR je členem rostoucí nadrodiny transkripčních faktorů bHLH/PAS a byl identifikován jako cílový gen pro transkripční faktor AhR-ARNT. AhR a AhRR představují regulační smyčku přenosu xenobiotického signálu, kde aktivovaný AhR v heterodimeru s ARNT aktivuje expresi genu AhRR, který následně inhibuje funkci AhR (Baba *et al.*, 2001). K inhibici dochází prostřednictvím kompetice aktivovaného AhR s AhRR o interakci s ARNT, následkem čehož je omezena dostupnost ARNT pro vazbu s AhR (Mimmura *et al.*, 1999).

Průběh nekanonické dráhy je zpočátku stejný jako u dráhy kanonické, nejprve dochází k aktivaci AhR navázáním ligandu a jeho přemístění z cytoplazmy do buněčného jádra. (Jackson *et al.*, 2015). Zde dochází k vytvoření heterodimeru, heterodimerizačním partnerem může být ARNT, popřípadě i jiné proteiny, jako například KLF6 (Krüppel-like factor 6) (Wright *et al.*, 2017), NF- $\kappa$ B (nukleární faktor- $\kappa$ B),  $\beta$ -katenin, ER- $\alpha$  (estrogenový receptor- $\alpha$ ) (Larigot *et al.*, 2018), nebo NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (Jackson *et al.*, 2015). Vzniklé heterodimery se váží do jiných specifických sekvencí než XRE, tyto sekvence jsou označovány jako NC-XRE (non-consensus XRE) a sestávají se z 5'-GGGA-3' tetranukleotidového motivu. V rámci nekanonické dráhy dochází například k expresi PAI-1 nebo p21<sup>CIP1</sup> genů (Wright *et al.*, 2017).

Kromě genomické dráhy bylo v poslední době objeveno i mnoho negenomických drah, kde po působení ligandu, konkrétně TCDD (2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin) dochází k nárůstu intracelulární koncentrace vápenatých iontů, což vede k aktivaci proteinkinázy C, která fosforyluje serinový zbytek cytosolického enzymu fosfolipázy A2 s následnou produkcí kyseliny arachidonové. Dále probíhá také aktivace tyrosinkinázy Src, která je doprovázena aktivací MAP kináz, jež vede k transkripci cyklooxygenázy 2, která využívá kyseliny arachidonovou k produkci prostaglandinů způsobujících zánět.

Tyto pochody se následně sbíhají a regulují patofyziologické procesy, jako je zánět, ke kterým v průběhu signalizace dochází (Matsumura, 2009; Larigot *et al.*, 2018).



Obrázek 3: Signální dráha AhR (převzato z Larigot *et al.*, 2022)

### 3.1.1.2 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s AhR

Aryl uhvodíkový receptor byl původně identifikován jako environmentální senzor xenobiotik, v současné době však bylo zjištěno, že se mimo to účastní i mnoha dalších klíčových procesů, jako je vývoj, buněčné dělení, imunita, udržování homeostázy, metabolismus, zánět nebo odolnost vůči stresu (Lin *et al.*, 2022). Terapeutické zaměření na tento receptor by potenciálně mohlo mít důležitou roli při léčbě autoimunitních, nádorových a degenerativních onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) (Rothhammer *et Quintana*, 2019).

AhR se účastní regulace buněčného cyklu a diferenciace buněk. Kde inhibuje buněčný cyklus přímou indukcí inhibitoru cyklin-dependentní kinázy p27<sup>KIP1</sup>

(Kolluri *et al.*, 1999). Dále také řídí expresi okamžitých protoonkogenů c-jun a junD v hepatomových buňkách Hepa-1 u myši (Hoffer *et al.*, 1996).

AhR se podílí na regulaci vrozené a získané imunity. Je exprimován celou řadou imunitních buněk, např. Th17 (T-helper 17) lymfocyty, T-regulačními lymfocyty (Treg lymfocyty). Aktivace AhR v Th17 lymfocytech vede k produkci cytokininu interleukinu 22 (IL-22), který je spojován s protizánětlivými procesy. Aktivace AhR navíc moduluje diferenciaci T lymfocytů a funkci Treg lymfocytů, což přispívá k buněčné odpovědi vyvolané antigenem (Sondermann *et al.*, 2023).

NF- $\kappa$ B je transkripční faktor, který hraje důležitou roli v různých buněčných procesech, zahrnujících vrozenou a získanou imunitu, buněčné dělení a apoptózu. Transkripčně aktivní dimery NF- $\kappa$ B jsou vytvořeny kombinatorickým spojením pěti podjednotek: p50, p52, c-Rel, RelA a RelB, které sdílejí homologní prvek RHR (Rel Homology Region). Tento prvek je zodpovědný za vazbu DNA, inhibitorů, dimerizaci a jadernou lokalizaci. Dimery NF- $\kappa$ B s transkripčním aktivačním potenciálem jsou často inhibovány třídou inhibičních proteinů I $\kappa$ B, které vytváří stabilní komplexy, které nejsou schopné vázat DNA. Látky jako jsou cytokininy TNF- $\alpha$  a IL-1 jsou schopné tyto inhibitory degradovat a NF- $\kappa$ B uvolnit. Volný NF- $\kappa$ B pak vstupuje do jádra, váže příbuzné sekvence DNA v genových enhancerových oblastech a aktivuje transkripci (Huang *et al.*, 2005). AhR může vytvářet komplexy s podjednotkou RelB a ovlivňovat tak aktivaci cílových genů zapojených do zánětu, jako je interleukin-8 (IL-8). Tato aktivace následně vede ke změně funkce imunitních buněk a produkci prozánětlivých cytokininů, což ovlivňuje celkovou imunitní odpověď a zánětlivé procesy v těle (Vogel *et Matsumura*, 2009).

AhR je jedním z klíčových senzorů metabolitů produkovaných střevním mikrobiomem, který reguluje slizniční imunitní systém a funkci střevní bariéry (Vrzalová *et al.*, 2022). Řídí regeneraci střevních epiteliálních buněk (IEC), zabraňuje růstu maligních nádorů, zprostředkovává protizánětlivé účinky tvorbou intraepiteliálních lymfocytů (IEL) a mění polarizaci vrozených lymfoidních buněk (ILC) za účelem kontroly střevních patogenů, jako je např. *Citrobacter rodentium* (Rothhammer *et Quintana*, 2019).

Kromě toho může AhR také regulovat poločas rozpadu určitých transkripčních faktorů. Bylo zjištěno, že AhR působí jako ubiquitin-E3-ligáza, která zahajuje

ubiquitinaci a proteozomem řízenou degradaci cílových proteinů. Tato funkce soupeří s transkripční aktivitou AhR, která závisí na dostupnosti a funkci ARNT. Pokud dojde ke snížení hladiny ARNT, aktivita ubiquitin-E3-ligázy se zvýší (Rothhammer *et al.*, 2019).

Kromě fyziologických procesů je AhR zapojeno i do velkého množství patofyziologických procesů. Podílí se na vzniku onemocnění způsobených imunitními či zánětlivými procesy, jako je astma, zánětlivá onemocnění střev, revmatoidní artritida, psoriáza, nebo atopická dermatitida. Mezi nejznámější zánětlivá onemocnění střev řadíme Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Psoriáza je zánětlivé kožní onemocnění, které se projevuje odlupováním pokožky. Bylo zjištěno, že agonisté AhR snižují psoriatický zánět, naopak antagonisté zánět zvyšují (Bogaard *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022). Pro léčbu psoriázy byl nedávno vyvinut lék tapinarof, který je ligandem AhR (Bissonnette *et al.*, 2023).

Aryl uhlovodíkový receptor je také často spojován s karcinogenezí. Navzdory tomu, že AhR působí jako nádorový supresor, podílí se zároveň i na indukci, proliferaci, migraci a invazi nádorů. AhR je aktivován a nadměrně exprimován v lidských nádorech prsu. Současné studie potvrzují přítomnost AhR v cytoplasmě i jádře v mnohem větším množství, než u nerakovinných tkání prsu. AhR by tedy mohl být velmi slibným cílem léčiv proti tomuto typu rakoviny (Baker *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2022).

### 3.1.1.3 Ligandy AhR

Aryl uhlovodíkový receptor je aktivován velkým množstvím ligandů, dělíme je do dvou hlavních skupin na exogenní a endogenní ligandy. Mezi exogenní ligandy AhR patří environmentální polutanty, léčiva a látky obsažené v potravě (Sládková *et al.*, 2023). Environmentální polutanty, jsou látky, které znečišťují životní prostředí, do této skupiny řadíme nehalogenované polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), jako je benzo(a)pyren, antracen a 3-methylcholantren, dále sem patří halogenované aromatické uhlovodíky (HAHs), jako jsou dioxiny, dibenzofurany a bifenyly. Metabolicky stabilnější halogenované aromatické uhlovodíky jsou nejúčinnější skupinou AhR ligandů s vazebnou afinitou v rozmezí  $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , metabolicky méně stabilní polycyklické aromatické uhlovodíky se vážou s mnohem nižší afinitou v rozmezí  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Denison *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2022).

Největší množství AhR ligandů, které indukují, nebo inhibují signální dráhy AhR, se do těla dostává skrze potravu. Výtažky z některé zeleniny, nebo rostlinných materiálů indukují aktivitu CYP1A1 (Denison *et Nagy*, 2003). Největší skupinou přirozeně se vyskytujících AhR ligandů v potravě jsou flavonoidy jako quercetin, chrysin, diosmin, genistein nebo tangeritin. Flavonoidy jsou hojně obsaženy v ovoci a ovocných šťávách, vínu, zelenině, kakau či čaji (Denison *et Nagy*, 2003; Van der Heiden *et al.*, 2009). Mezi další skupiny látek obsažené v potravě řadíme alkaloidy jako berberin, nebo indoly, kam patří např. indol-3-karbinol, který se vyskytuje v brukvovité zelenině, jako je brokolice nebo růžičková kapusta (Lin *et al.*, 2022).

V současné době existuje nemalá skupina klinicky schválených léčiv, která působí jako agonisté AhR, patří sem například: raloxifen, lansoprazol, omeprazol, flutamid, sulindac atd. (Baker *et al.*, 2020).

Mezi endogenní ligandy AhR řadíme látky syntetizované lidským tělem a lidskou střevní a kožní mikroflórou (Sládeková *et al.*, 2023). Patří sem například indigo a indirubin, což jsou látky, které se za normálních fyziologických podmínek vyskytují v lidské moči, dále metabolity kyseliny arachidonové: lipoxin A4 a prostaglandiny, nebo tetrapyrrolová barviva: hemin, bilirubin a biliverdin (Denison *et Nagy*, 2003; Stepankova *et al.*, 2018). Další velkou skupinu endogenních ligandů AhR představují mikrobiální metabolity. Velké množství těchto ligandů vzniká z tryptofanu v důsledku nejrůznějších biologických a fyzikálně-chemických procesů (Lin *et al.*, 2022). Tryptofan je aromatická esenciální aminokyselina, která se do těla dostává s potravou. U lidí je tryptofan metabolizován prostřednictvím kynureninových a serotoninových drah, které vedou k tvorbě kynureninu, melatoninu a serotoninu. V kůži dochází díky působení UV záření k přeměně tryptofanu na jeho fotooxidační produkty FICZ (6-formylindolo[3,2-b]karbazol) a dFICZ (6,12-diformylindolo[3,2-b]karbazol) (Denison *et Nagy*, 2003; Comai *et al.*, 2020). Dalším důležitým metabolitem tryptofanu je indol, který je produkován převážně střevními bakteriemi, jako je *Escherichia Coli*. Indol může působit jako agonista i antagonist AhR (Denison *et Nagy*, 2003). Mezi další střevní katabolity tryptofanu náleží skatol, tryptamin, indol-3-pyruvát, indol-3-laktát, indol-3-acetát, indol-3-acetamid, indol-3-aldehyd, indol-3-propionát, indol-3-akrylát atd. (Vyhlídalová *et al.*, 2020a).

Tabulka 1: Přehled zástupců exogenních a endogenních ligandů

	Zdroj		Zástupci
<b>Exogenní ligandy</b>	Environmentální polutanty	HAHs	bifenyly
			dibenzofurany
			dioxiny
		PAHs	antracen
			benzo(a)pyren
	Potrava	Flavonoidy	3-methylcholantren
			chrysin
			diosmin
			genistein
			quercetin
		tangeritin	
	Alkaloidy	berberin	
	Indoly	indol-3-karbinol	
	Léčiva		flutamid
			lansoprazol
		omeprazol	
		raloxifen	
		sulindac	
<b>Endogenní ligandy</b>	Metabolismus hostitele	bilirubin	
		biliverdin	
		hemin	
		indigo	
		indirubin	
		lipoxin A4	
		prostaglandiny	
		indol	
	Mikroflóra	indol-3-acetát	
		indol-3-atetamid	
		indol-3-akrylát	
		indol-3-aldehyd	
		indol-3-laktát	
		indol-3-propionát	
		indol-3-pyruvát	
		skatol	
		tryptamin	
		tryptamin	
	Deriváty tryptofanu	dFICZ	
		FICZ	
		kynurenin	
		melatonin	
serotonin			

Převzato z Denison *et al.*, 2003; Van der Heiden *et al.*, 2009; Stepankova *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2020; Vyhliďalová *et al.*, 2020a; Lin *et al.*, 2022



### 3.1.2 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor (PXR), také známý pod názvem steroidní a xenobiotický receptor (SXR), je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který reguluje expresi enzymů první a druhé fáze biotransformace a lékových transportérů nezbytných pro eliminaci xenobiotik. PXR je členem nadrodiny jaderných receptorů a je kódován genem NR1I2 (Zhang *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2020). Lidský gen NR1I2 je umístěn na chromozomu 3, přesněji v místě lokusu 3q11-3q13.3 a skládá se z 10 exonů (Bautista-Olivier *et Elizondo*, 2022). Poprvé byl PXR objeven u myši v roce 1998, poté následoval objev lidského PXR (hPXR) (Zhang *et al.*, 2008). PXR je v lidských tkáních hojně exprimován především v játrech, tenkém a tlustém střevě, dvanáctníku, konečníku a žlučníku, v menší míře v plicích, žaludku, děloze, vaječnicích nebo nadledvinách (Xing *et al.*, 2020; Bautista-Olivier *et Elizondo*, 2022). Struktura PXR je podobná ostatním jaderným receptorům (Obrázek 4), skládá se z AF-1 (Activation Function-1) domény na N- konci, na kterou je napojena DNA-vazebná doména (DBD), která obsahuje motivy dvou zinkových prstů. DBD zprostředkovává interakce se specifickými DNA sekvencemi označovanými jako hormonální responzivní elementy a podílí se na dimerizaci PXR. DBD a LBD spojuje oblast pantu, jejíž flexibilita umožňuje vazbu různých ligandů. Ligand vazebná doména (LBD) na C-konci je složena z pětivláknového antiparalelního  $\beta$ -skládaného listu a třívrstvého  $\alpha$ -helixu. Tato doména zajišťuje navázání ligandu a dimerizaci receptoru s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ). Součástí LBD je AF-2 oblast (Activation Function-2), krátká šroubovice, která zodpovídá za vazbu transkripčních koregulatorů (Zhang *et al.*, 2008; Bautista-Olivier *et Elizondo*, 2022).



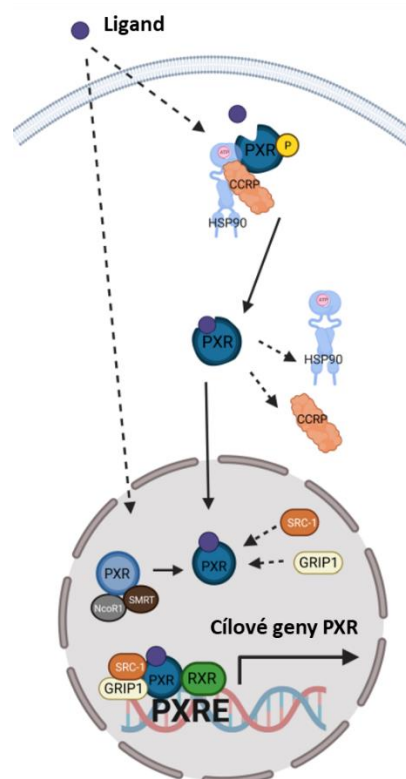
Obrázek 4: Stavba pregnanového X receptoru (převzato z Xing *et al.*, 2020)

#### 3.1.2.1 Signalizace PXR

PXR se v neaktivní formě vyskytuje v cytosolu v komplexu s heat shock proteiny 90 a cytoplazmatickým retenčním proteinem CAR (CCRP), po vazbě ligandu se tyto proteiny oddělí a receptor se přemísťuje do buněčného jádra. Cestou dochází pomocí transaktivačních domén AF-1 a AF-2 k navázání koaktivátorů na specifické geny. Poté

co se PXR dostane do jádra, váže se s retinoidním X receptorem  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) a vytváří komplex s koaktivátorem steroidního receptoru 1 (SRC-1). Koaktivátory posilují vazbu zinkových prstů přítomných v DBD se specifickými DNA sekvencemi v promotorové části cílových genů, dále aktivují sekundární koaktivátory a enzymy asociované s chromatinem jako je histon acetyltransferáza (HAT). HAT vytváří multiproteinový koaktivační komplex, který přeskupuje chromatin cílových genů a napomáhá tak vniknutí transkripčních prvků RNA polymerázy II (Bautista-Olivier *et* Elizondo, 2022; Sayaf *et al.*, 2022). Nově vzniklý PXR-RXR komplex se váže do vazebných míst obsahujících odlišné strukturní motivy např. DR (direct repeats)-3, DR-4, DR-9, DR-14, DR-19, ER (everted repeats)-6 a ER-8 (Xing *et al.*, 2020).

Mezi cílové geny PXR patří zejména geny kódující detoxikační enzymy první fáze biotransformace, cytochromy P450: CYP2B6, CYP2B9, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 a CYP3A7, enzymy druhé fáze biotransformace: UGTs, GSTs, sulfotransferázy (SULTs) a také transportéry: proteiny multilékové rezistence (MDRs), proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí (MRPs) a polypeptidy transportující organické ionty (OATPs) (Zhang *et al.*, 2008; Buchman *et al.*, 2018).



Obrázek 5: Signální dráha PXR (převzato z Rakateli *et al.*, 2023)

### 3.1.2.2 Ligandy PXR

Ačkoli je PXR známý především díky své aktivaci xenobioty (látkami cizorodými pro tělo, jako jsou léky a toxiny z životního prostředí), reaguje také na některé endogenní ligandy, což jsou molekuly přirozeně produkované v těle. Mezi endogenní ligandy pro PXR patří: žlučové kyseliny, prekurzory žlučových kyselin, estrogeny nebo vitamín K2 (Zhang *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2020a). Původně byl PXR popsán jako sirotčí jaderný receptor, v dnešní době jej díky objevu endogenních ligandů řadíme mezi adoptované sirotčí receptory (Dvořák *et al.*, 2020a).

Exogenní ligandy PXR jsou strukturně velmi odlišné látky, v současnosti je jich známo několik set, řadíme sem především léčiva, doplňky stravy, přírodní i syntetické sloučeniny, látky znečišťující životní prostředí a metabolity vznikající při metabolismu střevní mikroflórou (Zhang *et al.*, 2008, Nieves *et al.*, 2022). Léčiva tvoří největší část PXR ligandů, patří sem antibiotika: rifampicin, rifaximin, sulfadimidin, antiretrovirotika: ritonavir, lopinavir, antineoplastika: cyklofosfamid, taxol, tamoxifen, antimykotika: klotrimazol, antidepresiva: hyperforin, imunosupresiva, barbitutáty, sedativa a mnoho dalších (Zhang *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2022). Běžně používané rostlinné látky mohou také aktivovat PXR, jedná se například o výtažky z třezalky tečkované, pepřovníku opojného, pelyňku ročního či pryskyřice gugul obsahující gugulipid, který snižuje hladinu celkového cholesterolu v séru (Staudinger *et al.*, 2006). Mezi metabolity vznikající při metabolismu L-tryptofanu střevní mikroflórou řadíme skatol (Vyhlídalová *et al.*, 2020b), indol-3-acetát nebo indol-3-propionát. Konkrétně u indol-3-propionátu bylo zjištěno, že je ligandem myšího PXR, reguluje funkci střevní bariéry a snižuje střevní zánět prostřednictvím PXR (Venkatesh *et al.*, 2014). Další skupinou PXR ligandů jsou látky znečišťující životní prostředí, jako organochlorové pesticidy, polybromované difenylethery, ftaláty či bisfenoly (Zhang *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2020a).

Je také důležité zmínit, že lidský a myší PXR je aktivován rozdílnými ligandy, např. lidský receptor je aktivován rifampicinem, zatímco myší receptor je aktivován pregnenolonkarbonitrem. (Dvořák *et al.*, 2020a)

Exogenní ligandy PXR mohou mít toxické účinky na organismus a z toho důvodu je mnohem výhodnější, při hledání nových léčiv (např. pro léčbu IBD), aby agonistou PXR byl endogenní ligand, který je upraven tak, aby měl vyšší účinnost. Na základě studie Venkatesh *et al.* (2014) byla navržena hypotéza, že synergickou vazbu derivátů indolu do rozsáhlé PXR domény vázající ligandy, lze chemicky napodobit s vyšší

účinností a nižší tkáňovou toxicitou pomocí syntetických derivátů. Koncept napodobování endogenních metabolitů (tzv. microbial metabolite mimicry) je novým přístupem, který je možné využít k objevu nových, účinnějších chemických látek a léčiv, které aktivují PXR a potlačují zánět. Příkladem je synergický derivát indolu a kyseliny indol-3-propionové FKK6 (Felix Kopp Kortagere 6), který se váže přímo na PXR, indukuje v buňkách expresi cílového genu specifického pro PXR a významně potlačuje prozánětlivé buňky produkující cytokiny a tím potlačuje zánět (Dvořák *et al.*, 2020b).

### 3.1.2.3 Fyziologické a patofyziologické procesy spojené s PXR

Pregnanový X receptor je označován jako xenosenzor, který se podílí na regulaci enzymů metabolizujících léčiva. Mimo to řídí také expresi genů účastnících se metabolismu lipidů, sacharidů, cholesterolu, vitamínu D a žlučových kyselin (Zhou *et al.*, 2009). Aktivace PXR ovlivňuje hned několik klíčových biochemických drah včetně glukoneogeneze,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, homeostázy cholesterolu a lipogeneze (Moreau *et al.*, 2008). V neposlední řadě hraje PXR také důležitou roli při vývoji specifických forem rakoviny (Pondugula *et Mani*, 2013).

PXR zásadně ovlivňuje metabolismus lipidů, aktivace PXR u myši vede ke zvýšené indukci transportéru mastných kyselin Cd36 a následné akumulaci triglyceridů v játrech a vzniku steatózy jater. Cd36 je transkripčním cílem PXR a funguje jako společný cíl osířelých jaderných receptorů v jejich regulaci lipidové homeostázy (Zhou *et al.*, 2008). Aktivovaný PXR také snižuje  $\beta$ -oxidaci a ketogenezi, což je proces, kterým prostřednictvím rozkladu mastných kyselin dochází k tvorbě ketolátek, které jsou pro tělo alternativní formou energie (Zhang *et al.*, 2008). PXR se rovněž podílí na metabolismu glukózy. Aktivace PXR inhibuje expresi glukózy-6-fosfatázy a fosoenolpyruvátcarboxykinázy, což jsou dva hlavní enzymy glukoneogeneze (Bhalla *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2007). V metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin působí PXR jako senzor pro kyselinu lithocholovou, což je sekundární žlučová kyselina. Žlučové kyseliny jsou finálními katabolickými produkty metabolismu cholesterolu, jsou nezbytné pro tvorbu žluči, vstřebávání cholesterolu a vitamínů rozpustných v tucích, jejich nadměrné množství však může být toxické. Například nadměrné množství kyseliny lithocholové způsobuje cholestázu. Cílovým genem PXR podílejícím se na detoxifikaci žlučových kyselin je enzym druhé fáze biotransformace SLUT2A (Sonoda *et al.*, 2002).

Jak již bylo výše zmíněno, PXR se účastní i metabolismu vitamínů rozpustných v tucích. Vitamín K2 moduluje prostřednictvím PXR expresi osteoblastických kostních markerů a podílí se tak na udržování kostní homeostázy (Tabb *et al.*, 2003). Vitamín D pomocí cílových genů PXR, CYP24 a CYP3A4, udržuje kostní homeostázu a účastní se správného vývinu kostí. Aktivace PXR některými léky může být zodpovědná za urychlení katabolismu vitamínu D prostřednictvím upregulace CYP3A4 a CYP24, což vede k nedostatku vitamínu D a následně k osteopenii nebo osteomalacii (Zhang *et al.*, 2008). Vitamín E aktivuje PXR a řídí tak exogenní škodlivé geny, které jsou zapojené do jeho vlastního metabolismu (Lv *et al.*, 2022).

Vedle fyziologických procesů je PXR zapojeno i do celé řady patofyziologických procesů. Bylo prokázáno, že exprese PXR má ochrannou funkci při zánětlivých onemocněních střev (IBD), způsobených DSS (dextranem sulfátem sodným), mezi které řadíme především Crohnovu chorobu a ucelózní kolitidu. Velkou roli zde hraje NF- $\kappa$ B, což je důležitý regulátor zánětu a imunitní odpovědi. Aktivace PXR inhibuje aktivitu NF- $\kappa$ B, expresi jeho cílových genů a tím chrání před vznikem onemocnění (Shah *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). PXR také zmírňuje zánět prostřednictvím negativní regulace TLR4 (Toll-like receptor 4) (Huang *et al.*, 2018), IL-6, STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) a TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) signálních drah (Kotiya *et al.*, 2016).

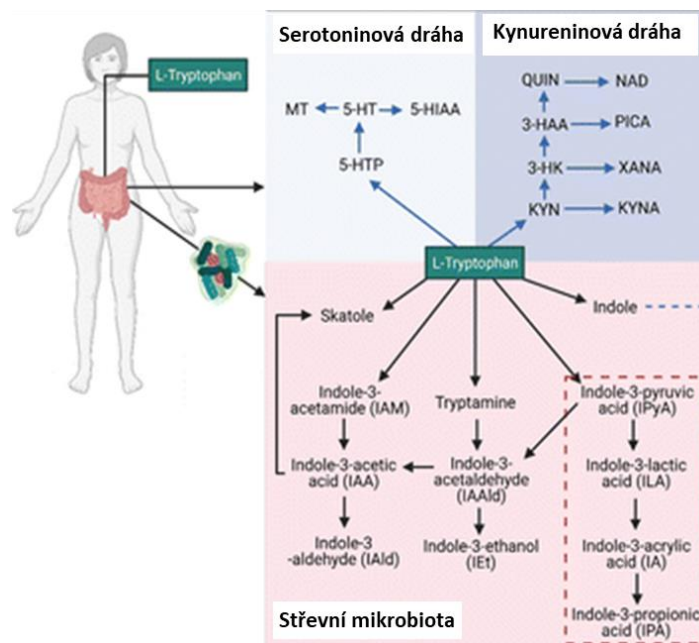
Dále se pregnanový X receptor účastní aterosklerózy, což je chronické zánětlivé onemocnění cévních stěn. Studie naznačují, že nedostatek PXR u myši tlumí rozvoj aterosklerózy, která může vznikat v důsledku poklesu exprese Cd36 a sníženého vychytávání lipidů v makrofázích (Sui *et al.*, 2011).

Mimo jiné bylo zjištěno, že pregnanový X receptor inhibuje buněčnou proliferaci a tumorigenezi buněk karcinomu tlustého střeva zastavením buněčného cyklu v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi regulací drah p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a E2F/Rb (Ouyang *et al.*, 2010). PXR je rovněž důležitým regulátorem regenerace jater. Účastní se proliferace hepatocytů modulací aktivity STAT3, čímž zajišťuje konstantní obnovu buněk (Dai *et al.*, 2008).

### 3.2 Metabolismus tryptofanu a deriváty indolu

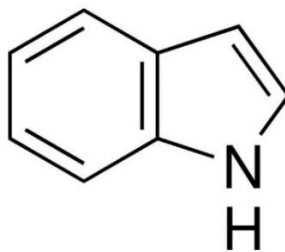
Ve střevním mikrobiomu vzniká indol z L-tryptofanu, což je esenciální aminokyselina, která se do těla dostává s potravou. Jeho tvorba je zajištěna pomocí enzymu tryptofanázy, který je tvořen střevními bakteriemi (Takayama *et al.*, 2021). Tyto bakterie mohou být jak grampozitivní, tak i gramnegativní, patří sem například rody *Clostridium*, *Bacteroides*, dále *Escherichia coli* nebo *Proteus Vulgaris* (Tennoune *et al.*, 2022).

L-tryptofan je v organismu metabolizován prostřednictvím dvou hlavních cest, a to serotoninovou a kynureninovou cestou. Serotoninová dráha přeměňuje L-tryptofan na neurotransmitter serotonin pomocí tryptofanhydroxyláz a 5-hydroxytryptofandekarboxyláz. Tato dráha se vyskytuje ve střevních epiteliálních enterochromafinních buňkách, kožních epidermálních Merkelových buňkách a různých oblastech mozku. V odlišných oblastech mozku se serotonin dále přeměňuje na N-acetylserotonin a spánkový hormon melatonin (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998; Dvořák *et al.*, 2021). Kynureninová dráha přeměňuje L-tryptofan na kynurenin, reakce je katalyzovaná pomocí indolamin-2,3-dioxygenázy a tryptofan-2,3-dioxygenázy. Tato metabolická dráha využívá většinu dostupného tryptofanu, který se nakonec přemění na kyselinu pikolinovou a nikotinamidadenindinukleotid (Seok *et al.*, 2018; Dvořák *et al.*, 2021).



Obrázek 6: Metabolismus tryptofanu (Převzato z Nieves *et al*, 2022)

Tryptofan může být také střevní mikroflórou přímo nebo nepřímo přeměněn na několik indolu příbuzných sloučenin, včetně indol-3-pyruvátu, indol-3-laktátu, indol-3-propionátu, indol-3-acetamidu, indol-3-akrylátu, indol-acetaldehydu, indol-3-acetátu, indol-3-aldehydu, indol-3-acetaldehydu a skatolu. Indol je heterocyklická aromatická sloučenina, která má bicyklickou strukturu (Obrázek 7). Po chemické stránce je to bezbarvá krystalická pevná látka s výraznou vůní. Indolové jádro je důležitou součástí mnoha přírodních a syntetických molekul s významnou biologickou aktivitou (Kaushik *et al.*, 2013). Indol a jemu příbuzné sloučeniny zprostředkovávají komunikaci mezi bakteriemi, ovlivňují antibiotickou rezistenci, faktory virulence a tvorbu biofilmu. Dále mají také příznivé účinky při zánětlivých onemocněních. V nadměrných koncentracích indol ovlivňuje CNS, kde vykazuje negativní vliv na emoční chování (Tennoune *et al.*, 2022).



Obrázek 7: Chemická struktura indolu (Převzato ze stránek firmy Sigma-Aldrich)

Halogenované deriváty indolu jsou látky, které obsahují indolové jádro, na které jsou v různých pozicích navázány halogeny jako chlór, fluor, brom a jód. Vlastnosti těchto látek se liší podle typu a pozice navázaných substituentů. Několik prací poukazuje na možné využití halogenovaných indolů v antimikrobiálních a antivirových strategiích proti různým patogenům tvořících biofilm, díky němuž se stávají velmi odolnými vůči působení vnějších vlivů. Například byly sledovány antimikrobiální a antiviruletní vlastnosti halogenovaných derivátů na potravinový patogen *Vibrio parahaemolyticus*, který je celosvětově považován za významnou příčinu gastroenteritidy způsobené mořskými plody. Bylo zjištěno, že 4-jodindol, 7-jodindol, 4-chlorindol a 7-chlorindol efektivně zamezují růstu buněk planktonu, tvorbě biofilmu, bakteriální motilitě, inhibují aktivitu proteáz a produkci indolu. Všechny studované látky v této studii jsou syntetické deriváty indolu, které byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a Combi-blocks (Sathiyamoorthi *et al.*, 2021). V další studii bylo zjištěno, že syntetický derivát indolu 7-fluorindol snižuje tvorbu faktorů virulence u *Pseudomonas aeruginosa*, patřící

k obávaným původcům nemocničních nákaz, kdy u pacientů může kolonizovat dýchací cesty, močový a pohlavní systém (Lee *et al.*, 2012). Účinek halogenovaných indolů byl sledován také na *Serratia marcescens*, který je oportunním původcem infekcí dýchacích cest, infekcí močových cest a septikemie. Látky 5-fluorindol a 6-fluorindol inhibovaly produkci pigmentu prodigiosinu, tvorbu biofilmu a pohyblivost bakterií. Obě studované látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Sethupathy *et al.*, 2020). Látky 6-bromindol, 7-bromindol, 4-fluorindol, 5-jodindol a 7-jodindol vykazovaly vysoký ochranný účinek na ochranu krevet před vibriózou, hlavní chorobou v akvakultuře. Bylo pozorováno snížení tvorby biofilmu, bakteriální motility a mírně snížená aktivita proteáz. Všechny studované látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Zhang *et al.*, 2022). Dále bylo zjištěno, že mnohé halogenované deriváty indolu mají biocidní účinky (Rajasekharan *et al.*, 2019).

### 3.2.1 Bromované deriváty indolu

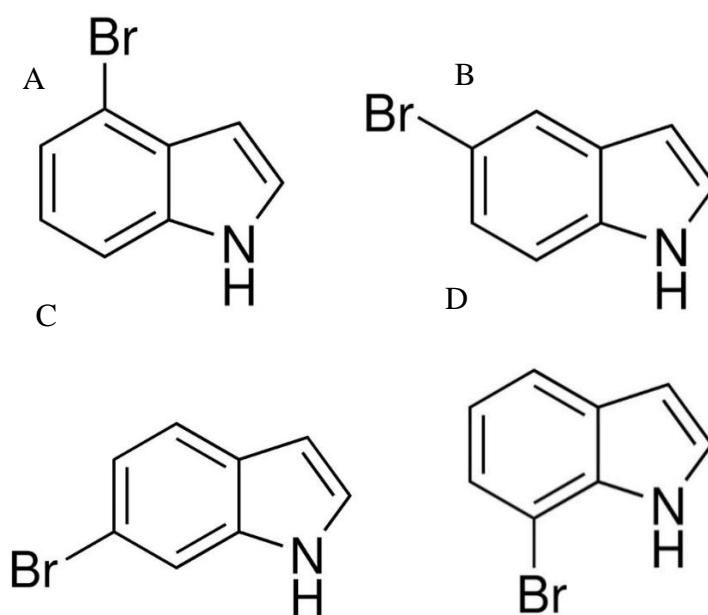
Velké množství přirozeně se vyskytujících bromovaných derivátů indolu bylo izolováno z mořských bezobratlých živočichů, jako jsou mechovci, houbovci, pláštěnci či lárkovci (Suárez-Castillo *et al.*, 2006). Bromované deriváty indolu patří mezi přímé ligandy a agonisty AhR, které se váží na receptor a stimulují jeho genovou expresi. Ve studii DeGroot *et al.* (2015) bylo studováno 8 přirozeně se vyskytujících mořských bromovaných indolů, konkrétně se jednalo o 2,4,6-tribrom-3-(methylthio)indol; 2,3,4,6-tetrabromindol; 6-brom-2,3-bis(methylthio)indol; 2,4,5,6-tetrabrom-3-(methylthio)indol; 4,5,6-tribrom-2-(methylthio)indol; 4,5,6-tribrom-2,3-bis(methylthio)indol; 4,6-dibrom-2-(methylsulfinyl)-3-(methylthio)indol a 3-acetyl-4,6-dibrom-2,3-dihydro-1H-indol-3-karboxylovou kyselinu. Všechny tyto látky byly izolovány z červené řasy *Laurencia brongniartii*. Bylo zjištěno, že všechny studované sloučeniny stimulují aktivitu reportérového luciferázového genu a indukují vyšší aktivitu luciferázy při 4h inkubaci než při 24h inkubaci, což značí, že se jedná o přechodné aktivátory AhR.

Bromované deriváty indolu vykazují protizánětlivou aktivitu, která je založena na inhibici oxidu dusnatého (NO) a TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) v makrofázích RAW264.7 stimulovaných liposacharidy a prostaglandinu E2 (PGE2) ve fibroblastech 3T3 ccl-92 stimulovaných ionoforem vápníku. Bylo zjištěno, že extrakt obsahující 6-bromindol a 6-bromisatin značně inhibuje translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B



v makrofázích RAW264.7 stimulovaných liposacharidy (Ahmad *et al.*, 2017). Dále byla u bromovaného derivátu indolu izolovaného z mořského plže *Dicathais orbita*, 6-bromisatinu objevena schopnost indukce apoptózy a zástavy buněčného cyklu v nádorových kolorektálních buněčných liniích (Esmaeelian *et al.*, 2013).

Tato bakalářská práce se zaměřuje na bromované deriváty indolu substituované v poloze 4, 5, 6 a 7, konkrétně se jedná o 4-bromindol, 5-bromindol, 6-bromindol a 7-bromindol (Obrázek 8).



Obrázek 8: Chemická struktura vybraných bromovaných derivátů indolu: 4-bromindol (A), 5-bomindol (B), 6-bromindol (C), 7-bromindol (D) (Převzato ze stránek firmy Sigma-Aldrich)

## **4 MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Biologický materiál**

- LS174T (ATCC, CL-188; 7 000 3535)- adherentní buněčná linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva.
- LS174T-AhR- stabilně transfekovaná buněčná linie připravená stabilní transfekcí buněčné linie LS174T plazmidem pGL-4.27-DRE nesoucí gen rezistence na hygromycin B.
- LS174T- buněčná linie transientně transfekovaná plazmidem pSG5-hPXR a reportérovým vektorem p3A4-luc.

#### **4.1.2 Testované látky**

- Indol
- 4-Bromindol
- 5-Bromindol
- 6-Bromindol
- 7-Bromindol

#### **4.1.3 Chemikálie a použité roztoky**

- 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, LGC Standards)
- Adenosin-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, A6419)
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- D- luciferin (Sigma-Aldrich, L9504)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO, Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, 43819)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose (DMEM, Sigma-Aldrich, D6429)

- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline- (PBS, SERANA, BDL-001)
- Fetální bovinní sérum, charcoal stripped (FBS CS, Sigma-Aldrich, F6765)
- Fetální bovinní sérum, regulární (FBS, Sigma-Aldrich, M5921)
- FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Promega, E2312)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, M5921)
- Hygromycin B (Santa Cruz Biotechnology, SC-29067)
- Koenzym A (CoA, Sigma Aldrich, C4780)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, E6511)
- L-glutamin (SERANA, RGL-001)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT, Sigma-Aldrich, M2128)
- Neesenciální aminokyseliny (NEAA, Sigma-Aldrich, M7145)
- Optimem (Sigma-Aldrich, D6546)
- Tris-acetát (Sigma-Aldrich, T8280)
- Triton X-100 (Serva, 37240)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, T6146)
- Trypsin-EDTA 0,25% (Biosera, LM-T1720)
- Reporter Lysis 5x Buffer (Promega, E397A)
- Rifampicin (RIF, Sigma-Aldrich, R3501)
- Roztok antibiotik (penicilin, streptomycin, Sigma-Aldrich, P4333)

#### 4.1.4 Složení použitých roztoků

- Médium pro kultivaci buněk
  - 500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose (DMEM)
  - 50 ml Fetální bovinní sérum (FBS)
  - 5 ml  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Neesenciálních aminokyselin (NEAA)
  - 5 ml  $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  L-glutaminu
  - 5 ml Antibiotika (penicilin, streptomycin (10 mg/ml))
  
- Substrát pro luciferázu
  - 5 mg D-Luciferinu
  - 10 mg Adenosin-5'-trifosfátu (ATP)
  - 5 mg koenzymu A (CoA)
  - 168 mg Dithiotreitolu (DTT)
  - 1,32 ml  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-acetátu (pH 7,8)
  - 1,23 mg/6,6  $\mu\text{l}$   $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA
  - 3,03 mg/1,23 ml  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - Doplněno do 30 ml destilovanou vodou
  
- Lyzační pufr pro Reporter gene assay
  - 40 ml Reporter Lysis 5x Buffer
  - 10 ml destilované vody

#### 4.1.5 Laboratorní pomůcky a přístroje

- $\text{CO}_2$  inkubátor (N-Biotek, NB-203XL)
- Hlubokomrazicí box (Green Line)
- Chladnička (Gorenje)

- Laboratorní kývačka (Biosan, Shaker-Rocker MR-12)
- Laminární flowbox (Esco Labculture, Class II Type A2)
- Mikroskop (Olympus, NIB-100)
- Odsávačka (Biosan, FTA-1)
- Spektrofotometr (Tecan, Infinite M200)
- Vodní lázeň (LabTech, LCB11D)
- Vortex (Heidolph, Reax top)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kultivace buněk

Obě použité buněčné linie LS174T i LS174T-AhR byly kultivovány v plastové kultivační lahvi v DMEM médiu obohaceném o 10 % FBS, neesenciální aminokyseliny, L-glutamin a antibiotika- penicilin a streptomycin. U buněčné linie LS174T-AhR bylo navíc každou třetí pasáž do média přidáváno selekční antibiotikum hygromycin B o finální koncentraci 0,2 mg·ml<sup>-1</sup>. Lahve byly uloženy v inkubátoru při 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> a vysoké vzdušné vlhkosti.

### 4.2.2 Trypsinizace a pasážování buněk

Do vodní lázně předehřáté na 37 °C bylo vloženo kultivační médium DMEM, které je jinak uchovávané v lednici. Z mrazáku byl vytáhnut trypsin a rozmražen při pokojové teplotě. Kultivační lahev s buňkami byla vyjmuta z inkubátoru a stav buněk byl zkontrolován pod mikroskopem. Vše bylo přemístěno do laminárního boxu, kde probíhá práce za sterilních podmínek. Pomocí odsávačky bylo z lahve odsáto médium, poté bylo přidáno 5 ml PBS, pro opláchnutí, které bylo následně také odsáto. Pomocí automatické pipety byl přidán 1 ml enzymu trypsinu, který byl nakláněním lahve rovnoměrně rozmístěn po celém dnu. Kultivační lahev byla uzavřena a vložena na 5 min do inkubátoru. Působením trypsinu dochází k přerušování vazeb mezi buňkami a oddělení buněk od povrchu lahve. Účinek trypsinu byl zastaven přidáním 9 ml kultivačního média a buňky byly rozsuspendovány pomocí nasávání a opětovného vypouštění sérologickou

pipetou. Tímto způsobem byly buňky připravené na počítání a vysazení na 96-jamkové desky.

#### **4.2.3 Počítání a vysazení buněk na 96-jamkové desky**

Pro počítání buněk se nejčastěji používá Trypan Blue Exclusion Assay, která spočívá v tom, že živá buňka po kontaktu s barvivem zůstává díky funkčnosti membrány, která zabrání průniku barviva neobarvená. Kdežto mrtvé buňky mají tuto funkci narušenou a dochází tak k jejich zabarvení. Při počítání buněk se využívá tzv. Bürkerova komůrka, což je systém 9 velkých čtverců ohraničených trojitými čarami. Každý z těchto čtverců je dále pomocí dvojitých čar rozdělen na 16 malých čtverců.

Bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  připravené buněčné suspenze a smícháno s 90  $\mu\text{l}$  Trypanové modři, směs byla dobře promíchána a nanesena na Bürkerovu komůrku. Komůrka byla umístěna pod mikroskop a byly spočítány živé buňky v pěti velkých čtvercích ve vrchní části komůrky a následně v pěti velkých čtvercích ve spodní části komůrky. Z hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a vynásoben  $1 \cdot 10^5$ , vzniklá hodnota vyjadřovala množství buněk v 1 ml.

Pro MTT test bylo na 96-jamkové desky vyseto 40 000 buněk na 1 jamku obsahující 200  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Pro gene reporter assay AhR receptoru bylo vyseto 80 000 buněk na 1 jamku obsahující 200  $\mu\text{l}$  média pro 4hodinový test a 40 000 buněk na 1 jamku pro 24hodinový test. Pro gene reporter assay PXR receptoru bylo vyseto 30 000 buněk na jamku obsahující 200  $\mu\text{l}$  média pro 24hodinový test. Takto připravené desky byly vloženy na 24 h do inkubátoru.

#### **4.2.4 Příprava testovaných látek**

Z testovaných látek, 4-bromindol, 5-bromindol, 6-bromindol a 7-bromindol, byly připraveny roztoky o koncentraci  $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Jejich postupným ředěním byly připraveny zásobní roztoky, jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Jako rozpouštědlo bylo použito DMSO. Zásobní roztoky byly před aplikací na 96-jamkové desky 1000x naředěny pomocí DMEM média, jejich finální koncentrace jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1).

Pro MTT test, neboli test pro hodnocení cytotoxicity, byly všechny látky rozpuštěny a naředěny na požadované koncentrace v DMEM médiu. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO, jako pozitivní kontrola sloužil 2% Triton X-100. U gene reporter assay pro stanovení transkripční aktivity AhR receptoru byla každá látka rozpuštěna a naředěna na požadovanou koncentraci v depletovaném DMEM médiu. Depletované médium je buňkami částečně natrávené médium, které se získává odběrem z kultivační lahve před pasážováním, nebo při výměně média. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola sloužilo  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD. U gene reporter assay pro stanovení transkripční aktivity PXR receptoru byly všechny látky naředěny na požadovanou koncentraci v DMEM médiu, které obsahovalo charcoal stripped FBS sérum. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO, jako pozitivní kontrola sloužil  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  rifampicin.

Tabulka 2: Ředění roztoků testovaných látek

Koncentrace zásobních roztoků	Koncentrace 1 000x zředěných roztoků
$200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
$10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
$1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$

#### 4.2.5 MTT test

Je test životaschopnosti buněk, který je založen na aktivitě mitochondriální dehydrogenázy, která je funkční pouze v neporušených, tedy živých buňkách. Při inkubaci buněk s MTT roztokem dochází pomocí dehydrogenáz k přeměně žluté methyltetrazoliové soli (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) na fialově zbarvený formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan). Množství vytvořeného formazanu je přímo úměrné viabilitě buněk.

První den bylo na 96-jamkovou desku vyseto 40 000 buněk na 1 jamku, každá jamka obsahovala 200  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Buňky byly vysety v tetraplikátu. Takto připravené desky byly na 24 h uloženy do inkubátoru. Po 24 h byly desky vytaženy

z inkubátoru, pomocí odsávačky bylo odsáto přebytečné médium a následně aplikovány předem připravené látky. Jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMSO, jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton X-100. Po aplikaci látek byly desky opět uloženy na 24 h do inkubátoru. Po inkubaci byl obsah desek vyklepnut do výlevky a desky osušeny pomocí buničiny. Poté byly jamky promyty 100  $\mu$ l nesterilního PBS, které bylo následně taktéž vyklepnuto a desky opět osušeny buničitou vatou. Dále bylo pomocí multikanálové pipety do jamek napipetováno 100  $\mu$ l MTT roztoku. Desky byly inkubovány cca 20 min v inkubátoru při 37°C a po vytvoření modrofialových krystalů byl obsah desek opět vyklepnut. Nakonec bylo přidáno 70  $\mu$ l DMSO, ve kterém byly krystaly jemným protřepáním rozpuštěny a vzorky byly podrobeny spektrofotometrické analýze. Destičky byly vloženy do spektrofotometru Infinite M200, který pomocí programu I-Controll stanovil absorbanci v každé jamce při vlnové délce 570 nm. Ze získaných hodnot byla stanovena viabilita buněk.

#### **4.2.6 Gene reporter assay**

Je metoda, která se využívá ke stanovení transkripční aktivity receptoru. Transkripční aktivita je měřena pomocí aktivity enzymu luciferázy. Díky luciferáze dochází pomocí monooxygenační reakce k přeměně D-Luciferinu na oxyluciferin a vzniku světelné energie, která se následně měří. Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná aktivitě receptoru.

Pomocí luciferázové eseje byla stanovována transkripční aktivita u dvou receptorů a to u AhR a PXR receptoru. U AhR receptoru byla použita stabilně transfekovaná buněčná linie LS174T-AhR, která již obsahuje reportérový vektor pGL-4.27-DRE, který je nezbytný pro vazbu aktivovaného receptoru na promotorovou oblast, což způsobí expresi genu pro enzym luciferázu. U PXR receptoru byla použita buněčná linie LS174T, u které bylo nutné nejprve provést transfekci, jejíž postup je popsán v kapitole 4.2.7 Transfekce buněk.

Na 96-jamkovou desku bylo první den pro AhR receptor vyseto 40 000 buněk na jamku pro 24hodinový experiment a 80 000 buněk na jamku pro 4hodinový experiment. Pro PXR receptor bylo vyseto 30 000 buněk na jamku pro 24hodinový experiment. Každá jamka obsahovala 200  $\mu$ l kultivačního média a buňky byly vysety v pentaplikátu. Takto připravené desky byly vloženy na 24 h do inkubátoru. Po 24hodinové inkubaci byly desky



vyjmuty z inkubátoru a pomocí odsávačky bylo odsáto přebytečné médium. Následně byly aplikovány předem připravené látky. U AhR receptoru bylo jako negativní kontrola použito 0,1% DMSO, jako pozitivní kontrola sloužilo  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD. U PXR receptoru bylo jako negativní kontrola taktéž použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola sloužil  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  rifampicin. Po aplikaci látek byly desky vloženy na 4 h nebo 24 h do inkubátoru. Po uplynuté době byl obsah desek vyklepnut a desky osušeny pomocí buničiny. Následně byly jamky promyty  $80 \text{ }\mu\text{l}$  nesterilního studeného PBS a opět vyklepnuty do výlevky. Dále bylo do jamek napipetováno  $30 \text{ }\mu\text{l}$  lyzačního pufru a desky byly vloženy na cca 20-30 min do hlubokomrazícího boxu při teplotě  $-80^\circ\text{C}$ . Po uplynuté době byly desky rozmrazeny na laboratorní kývačce. Pomocí multikanálové pipety bylo z každé jamky odebráno  $6 \text{ }\mu\text{l}$  lyzátu a přepipetováno na bílou nebo černou 96-jamkovou desku. Bílá deska byla použita pro stanovení transkripční aktivity AhR receptoru, černá deska byla využita pro stanovení transkripční aktivity PXR receptoru. K lyzátu bylo do každé jamky přidáno  $30 \text{ }\mu\text{l}$  substrátu pro luciferázu. Destičky byly vloženy do Infinite M200 a pomocí programu I-Controll byla změřena intenzita luminiscence.

#### **4.2.7 Transfekce buněk**

Buněčnou linii LS174T bylo nutné před provedením luciferázové eseje transfekovat pomocí reportérového plasmidu p3A4-luc a expresního vektoru pSG5-hPXR za použití lipofekčního činidla FuGENE<sup>®</sup> HD. Objemy jednotlivých složek transfekční směsi jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2).

Nejprve byly buňky zpasažovány a spočítány. Následně byl do mikrozkušavky napipetován Optimem a FuGENE<sup>®</sup> HD, směs byla inkubována po dobu 5 min. Do další mikrozkušavky bylo napipetováno DNA. Po uplynutí inkubační doby byla směs obsahující Optimem a FuGENE<sup>®</sup> HD přemístěna do zkumavky s DNA. Takto vzniklá směs byla inkubována po dobu 15-20 min. Během inkubace byla do transfekčních zkumavek připravena buněčná suspenze o koncentraci 30 000 buněk na jamku. Po ukončení inkubační doby byla směs přemístěna do předem připravené buněčné suspenze, obsah byl pečlivě promíchán a připraven na vysévání na 96-jamkové desky.

Tabulka 3: Příprava transfekční směsi

	1 jamka	270 jamek
Buněčná linie LS174T	30 000	8 100 000
Médium	200 $\mu\text{l}$	54 000 $\mu\text{l}$
Optimem	6,5 $\mu\text{l}$	1 800 $\mu\text{l}$
FuGENE <sup>®</sup> HD	0,4 $\mu\text{l}$	108 $\mu\text{l}$
Reporter o koncentraci 1,02 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g}$	27 $\mu\text{g} = 26,5 \mu\text{l}$
PXR o koncentraci 0,73 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,033 $\mu\text{g}$	9 $\mu\text{g} = 12,33 \mu\text{l}$

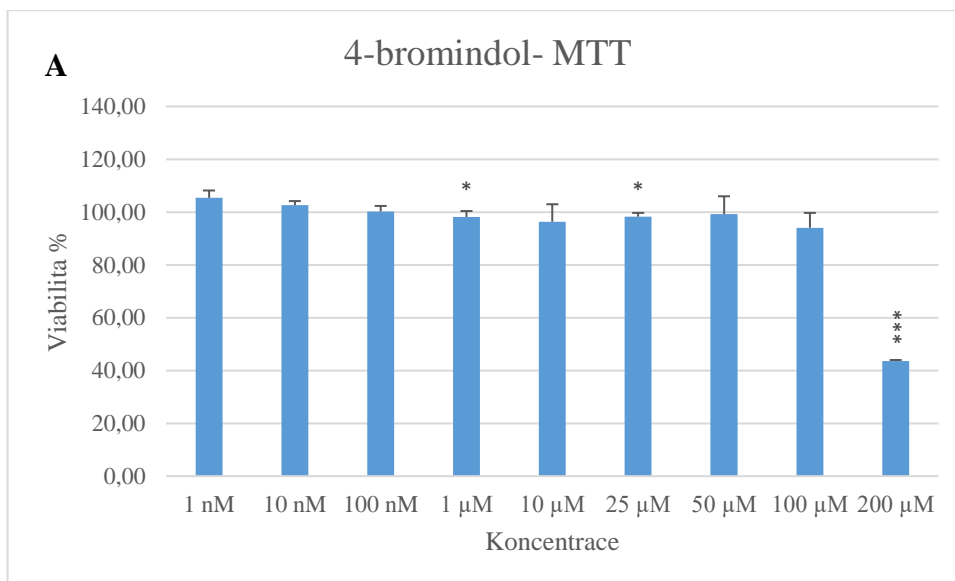
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení cytotoxického působení vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody MTT

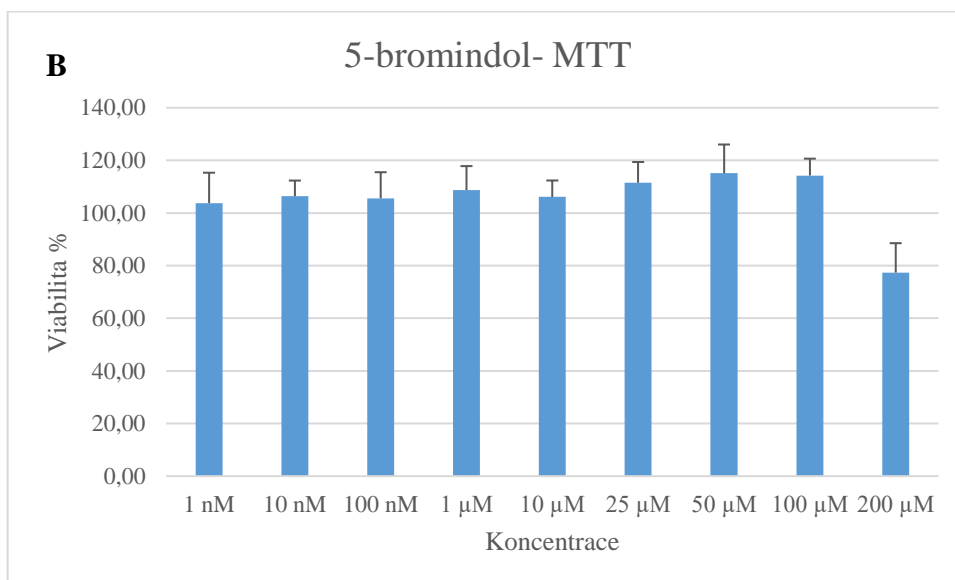
Pomocí MTT testu byla stanovena viabilita buněk LS174T po 24 h působení 4-bromindolu, 5-bromindolu, 6-bromindolu a 7-bromindolu. Všechny látky byly studovány v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMSO, jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton X-100. Na základě výsledků byly sestaveny grafy závislosti viability na koncentraci, všechny grafy jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů. Viabilita buněk byla vztažena k negativní kontrole, která odpovídala 100 % životnosti.

U buněčné linie LS174T vystavené 24 h působení 4-bromindolu, došlo u nejvyšší  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace k poklesu viability na hodnotu  $43,58 \pm 0,4 \%$ , tato koncentrace má tedy značné cytotoxické účinky (Graf 1). U ostatních koncentrací se viabilita pohybovala okolo 100 %. Viabilita buněčné linie LS174T po 24 h inkubace s 5-bromindolem klesla u nejvyšší  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace na  $77,35 \pm 11,2 \%$  (Graf 2). U ostatních koncentrací se životnost pohybovala nad hranicí 100 %. Obdobně působil i 6-bromindol, kde viabilita buněk u největší  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace činila  $82,64 \pm 1,6 \%$  (Graf 3). Nižší koncentrace vykazovaly životnost nad 100 %. Po 24 h působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T došlo u  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace k poklesu životnosti na  $51,74 \pm 16,6 \%$  a u  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace klesla životnost na hodnotu  $74,20 \pm 19,6 \%$  (Graf 4). Zbylé koncentrace vykazovaly hodnotu viability okolo 100 %.

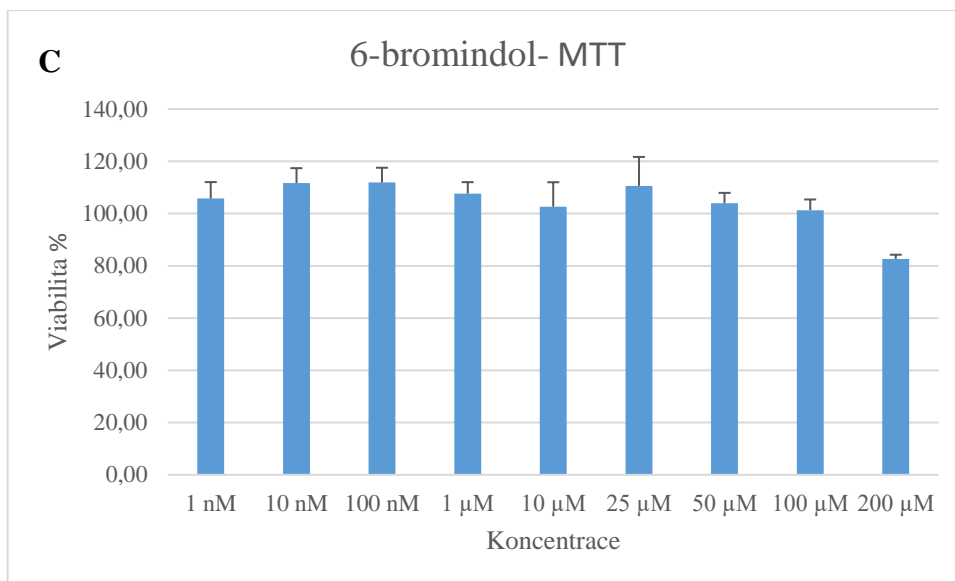
Z výsledků je tedy patrné, že vybrané bromované deriváty indolu s výjimkou nejvyšší koncentrace ( $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) u 4-bromindolu a 7-bromindolu, u kterých došlo k 50% poklesu viability, nemají větší cytotoxické účinky. Sloučeniny tak mohly být dále podrobeny studiu transkripční aktivity AhR a PXR.



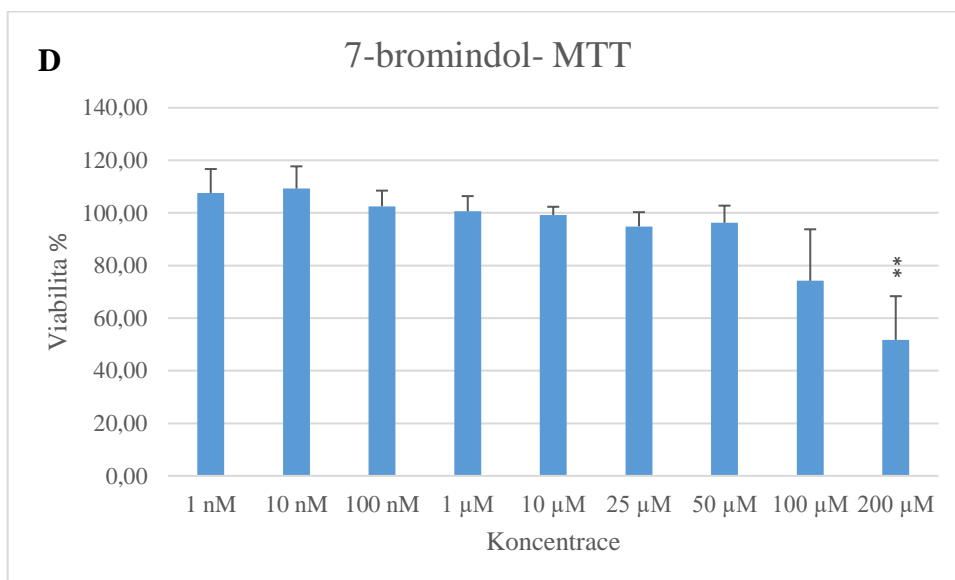
Graf 1: Stanovení cytotoxického působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci. 4-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky významné hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Graf 2: Stanovení cytotoxického působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci. 5-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky významné hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Graf 3: Stanovení cytotoxického působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci. 6-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky významné hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Graf 4: Stanovení cytotoxického působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T po 24hodinové inkubaci. 7-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky významné hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5.2 Stanovení transkripční aktivity AhR v přítomnosti vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody reporter gene assay

Pomocí metody reporter gene assay byla stanovena transkripční aktivita AhR po 4 h a 24 h působení 4-bromindolu, 5-bromindolu, 6-bromindolu a 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. Působení bromovaných derivátů indolu bylo srovnáváno s účinky indolu. Všechny látky byly studovány v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako pozitivní kontrola bylo použito  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD, v jeho přítomnosti činila účinnost 100 %. Jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMSO. Z naměřených hodnot relativní luminiscence byly vypočítány hodnoty násobku indukce, které byly vztaženy k negativní kontrole. Na základě výsledků byly sestaveny grafy závislosti % maximální indukce k TCDD na koncentraci, všechny grafy jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů.

Z výsledků byla dále také stanovena hodnota  $EC_{50}$ , což je koncentrace dané látky, při které je docíleno 50 % maximálního účinku. Hodnoty  $EC_{50}$  byly vypočítány v programu GraphPad Prism 9 ve spolupráci s vedoucí bakalářské práce. Výsledky z jednotlivých experimentů s odpovídajícími koncentracemi byly vloženy do softwaru, zlogaritmovány a pomocí speciální funkce pro výpočet  $EC_{50}$  byly stanoveny průměrné hodnoty  $EC_{50}$  za 4 h a 24 h.

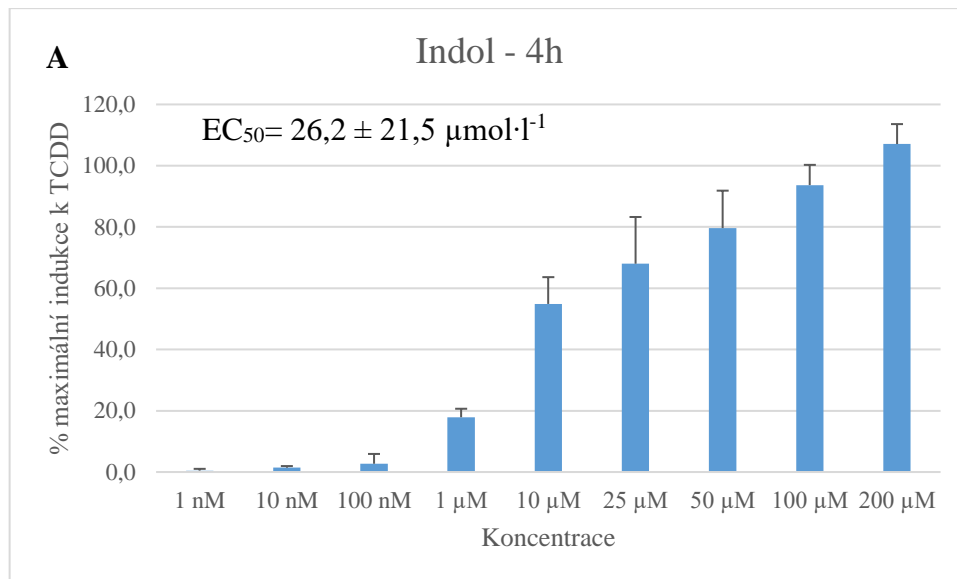
U buněčné linie LS174T-AhR, vystavené 4 h působení indolu, byl s rostoucí koncentrací pozorován nárůst transkripční aktivity AhR (Graf 5). Nejvyšší indukce byla tedy naměřena u  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, jejíž hodnota činila  $107,1 \pm 2,5 \%$ . Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena na  $26,2 \pm 21,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U 4-bromindolu byl pozorován pokles v účinnosti, nejvyšší hodnoty se pohybovaly okolo 50 % (Graf 7). U  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace bylo na rozdíl od indolu zaznamenáno snížení účinnosti, ta činila pouze  $20,3 \pm 6,5 \%$ , a to z toho důvodu, že  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace 4-bromindolu vykazuje značné cytotoxické účinky. Hodnota  $EC_{50}$  byla určena na  $1,69 \pm 0,67 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U 5-bromindolu bylo největšího účinku dosaženo u  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, kde indukce činila  $108,3 \pm 5,8 \%$  (Graf 9). Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena na  $30,5 \pm 26,7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nejvyšší transkripční aktivita AhR byla pozorována u 6-bromindolu, kde se indukce pěti koncentrací ( $10, 25, 50, 100$  a  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pohybovala okolo 100 % (Graf 11). Největší aktivita byla naměřena u  $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, která činila  $115 \pm 15,8 \%$ . Hodnota  $EC_{50}$  byla určena na  $1,21 \pm 0,40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Poslední sledovanou látkou byl 7-bromindol,

jehož transkripční aktivita byla v porovnání s 6-bromindolem nižší (Graf 13). U 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace byla zaznamenána nejvyšší účinnost a to  $92,8 \pm 11,2 \%$ . Hodnota  $\text{EC}_{50}$  činila  $1,82 \pm 1,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

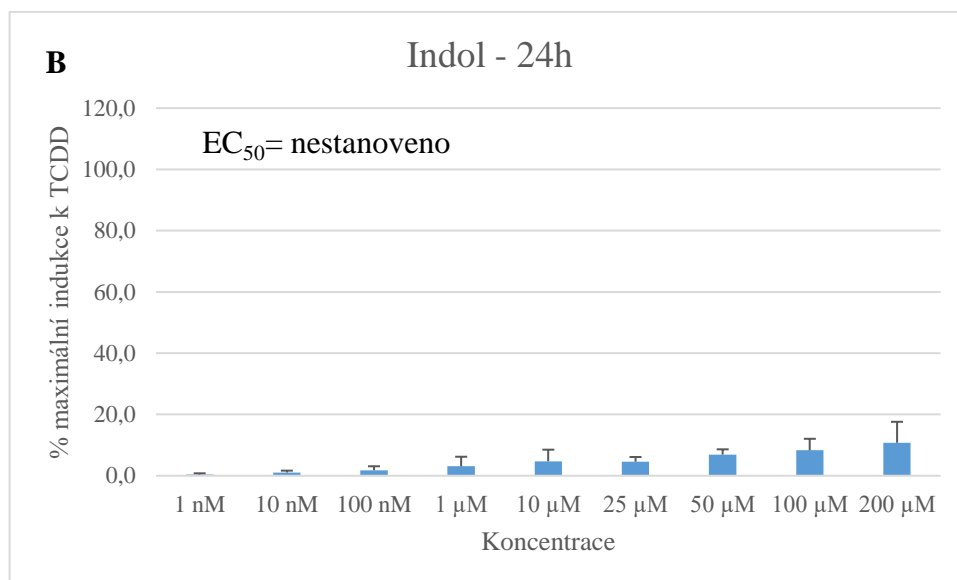
Z výsledků tedy vyplývá, že nejnižší transkripční aktivitu v porovnání s indolem vyvolává 4-bromindol, naopak u 6-bromindolu a 7-bromindolu byla zaznamenána nejvyšší transkripční aktivita AhR a nejvyšší potence (nejnižší hodnoty  $\text{EC}_{50}$ ).

Po 24 h působení byla transkripční aktivita AhR u všech látek výrazně nižší než po 4 hodinovém působení a hodnoty  $\text{EC}_{50}$  nebylo možné u těchto látek stanovit, popř. jsou uvedené hodnoty pouze orientační. U indolu a 4-bromindolu se maximální účinnost pohybovala kolo 20 % (Graf 6, Graf 8). Podobně na tom byl i 7-bromindol, u kterého byla zaznamenána maximální indukce při koncentraci 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , která činila  $27,8 \pm 5 \%$  (Graf 14). Hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla určena na  $10,5 \pm 0,20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na rozdíl od indolu, látky 5-bromindol a 6-bromindol vykazovaly mnohem vyšší míru transkripční aktivity, a to díky přítomnosti bromového substituentu, který molekulu stabilizuje a sloučenina tak není tak snadno a rychle metabolizována. U 5-bromindolu bylo největšího účinku dosaženo u 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, kde indukce činila  $76,8 \pm 13,3 \%$  (Graf 10). Hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla stanovena na  $47,5 \pm 6,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . 6-bromindol vykazoval nejvyšší indukci při koncentraci 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a to konkrétně  $71 \pm 22 \%$  a jeho hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla  $325 \pm 374 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf 12).

Z pozorování tedy plyne, že indol, 4-bromindol a 7-bromindol aktivují AhR po 24 h působení pouze minimálně. Naopak vyšší koncentrace 5-bromindolu a 6-bromindolu vykazují mnohem větší transkripční aktivitu.

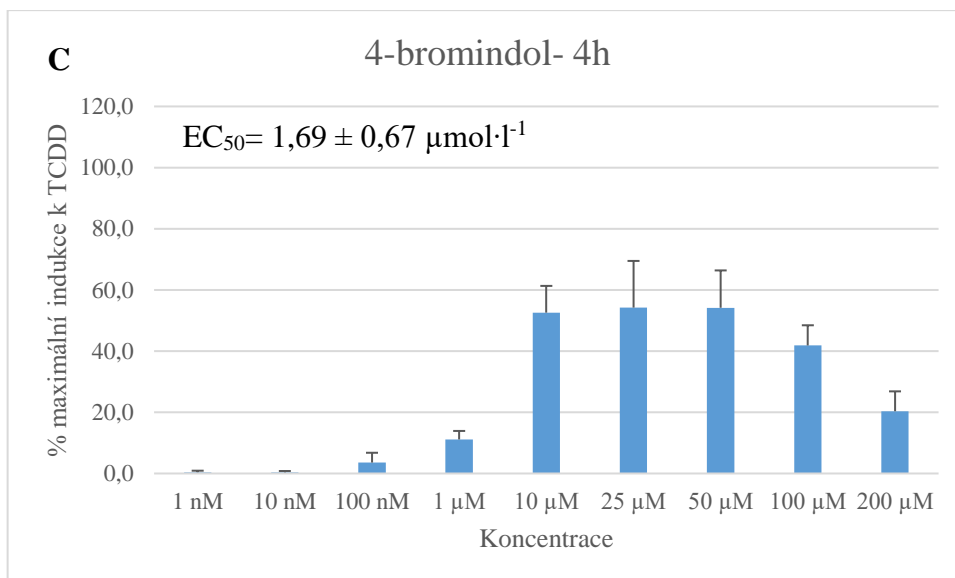


Graf 5: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení indolu na buněčnou linii LS174T-AhR. Indol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací 1 μmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>.

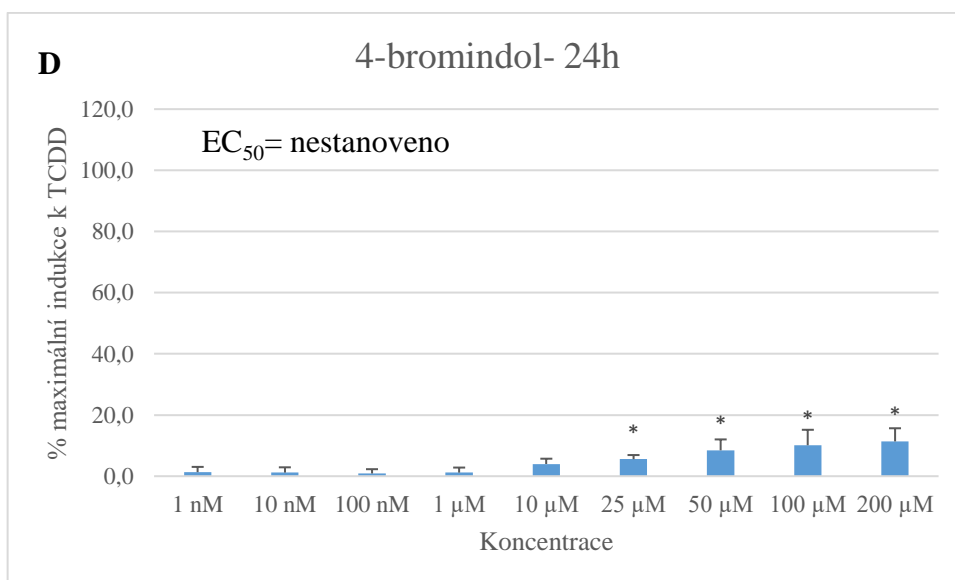


Graf 6: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení indolu na buněčnou linii LS174T-AhR. Indol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací 100 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>.

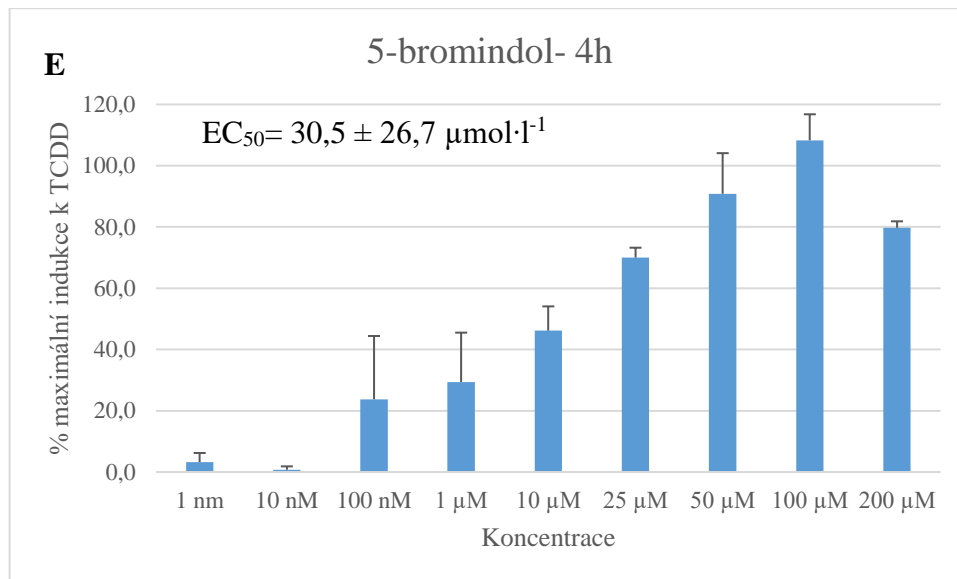




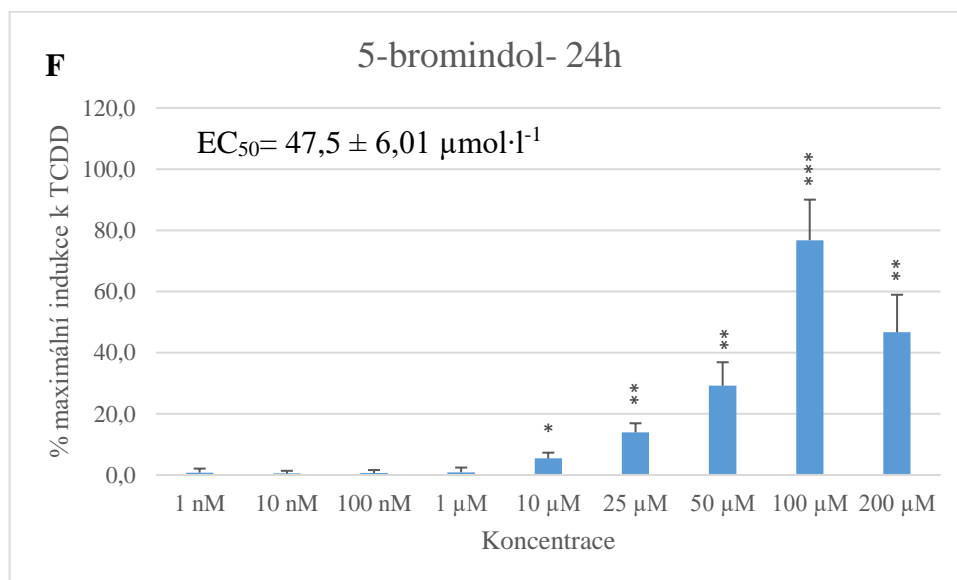
Graf 7: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 4-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



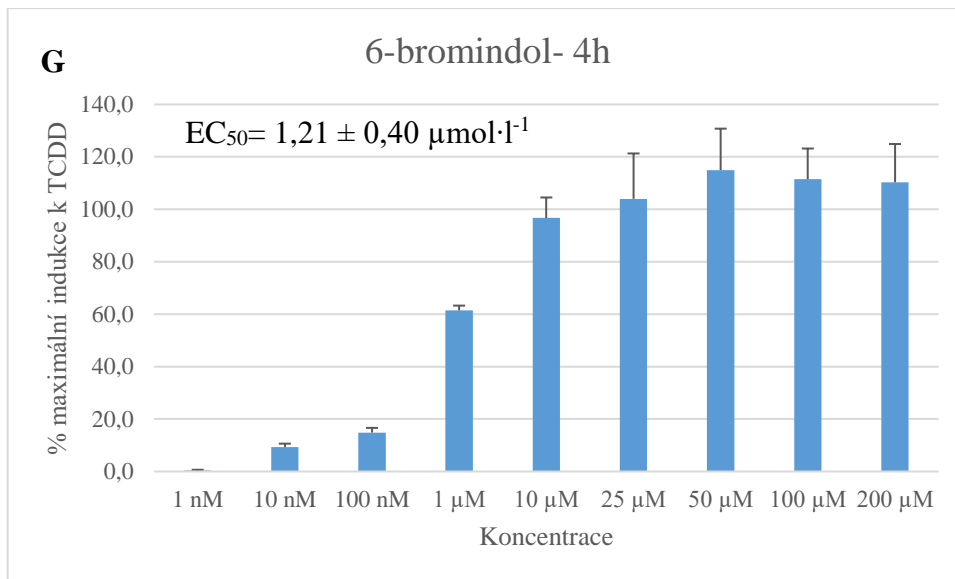
Graf 8: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 4-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



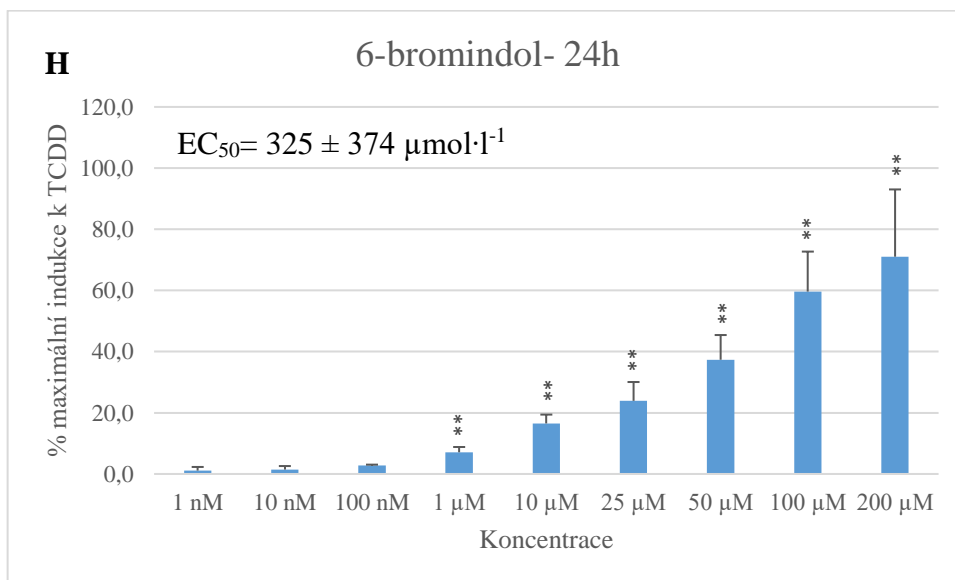
Graf 9: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 5-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



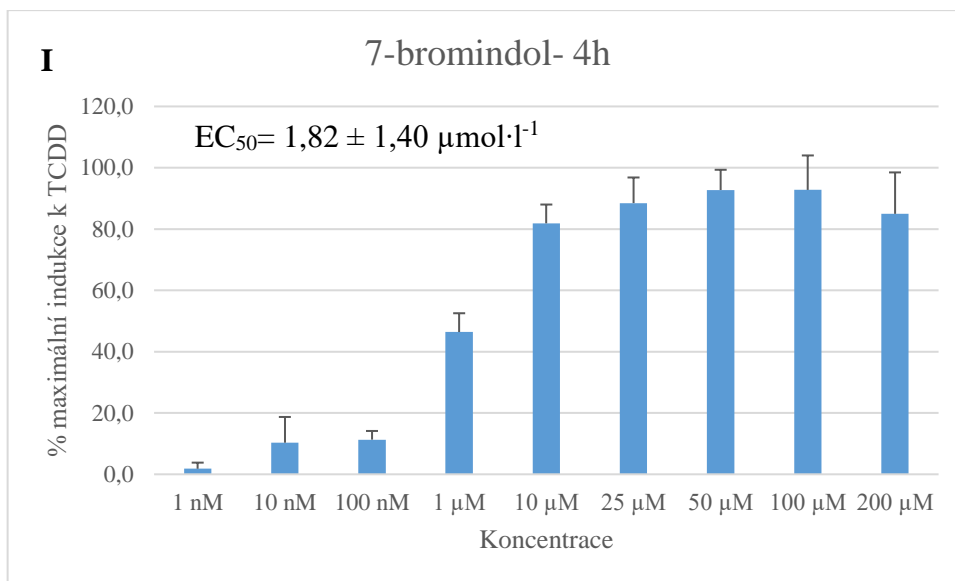
Graf 10: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 5-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



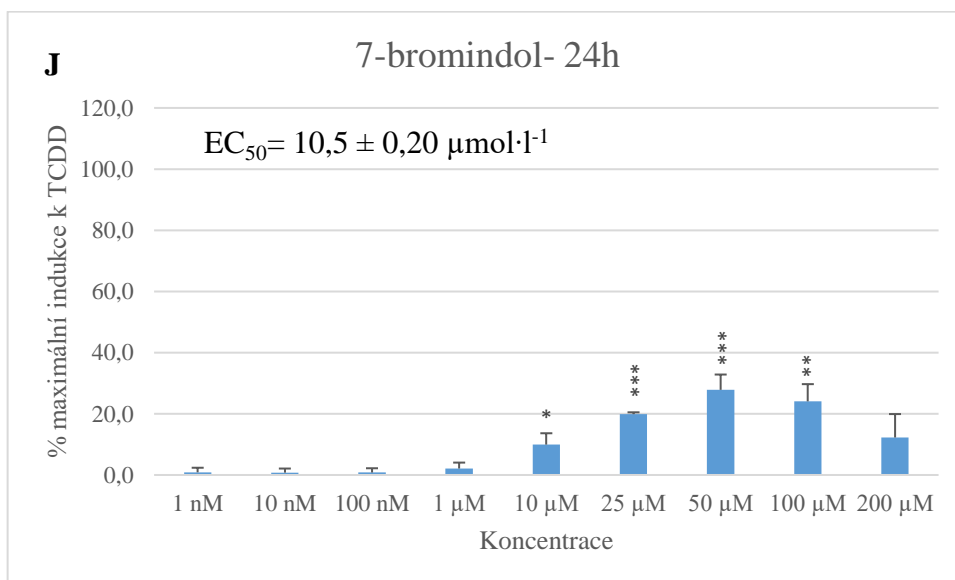
Graf 11: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 6-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací 10 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>.



Graf 12: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 6-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



Graf 13: Stanovení transkripční aktivity AhR po 4hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 7-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu. Statisticky signifikantní hodnoty byly zaznamenány u koncentrací 100 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>.

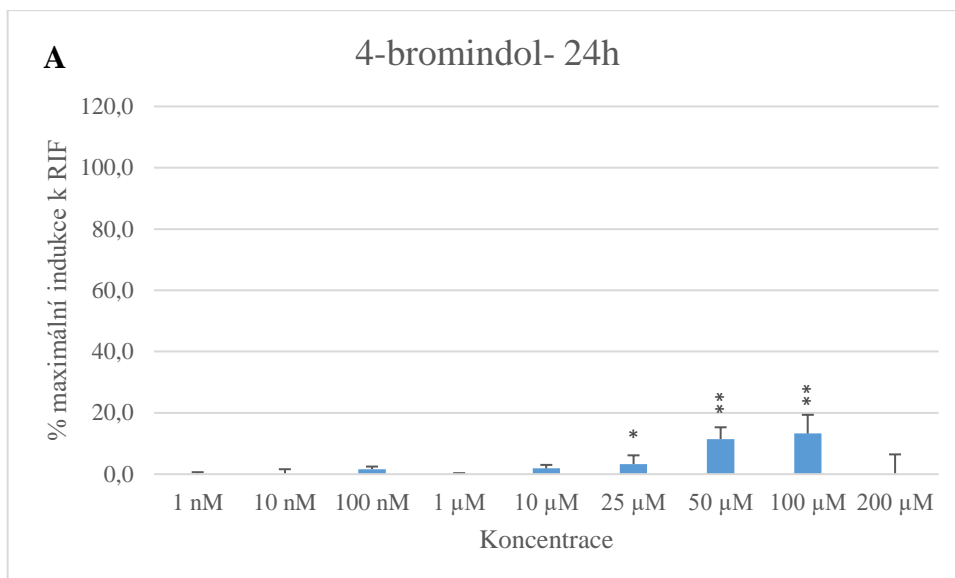


Graf 14: Stanovení transkripční aktivity AhR po 24hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T-AhR. 7-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

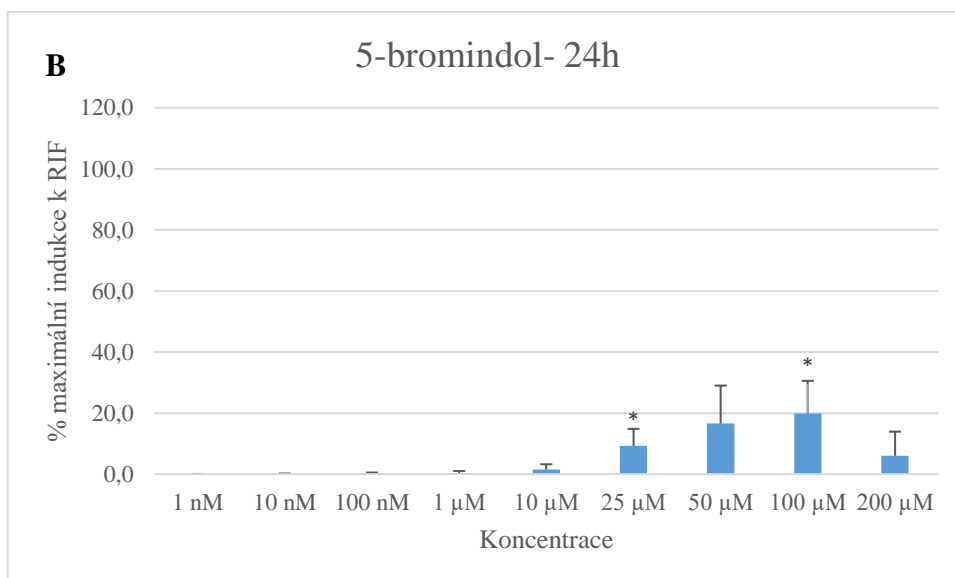
### **5.3 Stanovení transkripční aktivity PXR v přítomnosti vybraných bromovaných derivátů indolu pomocí metody reporter gene assay**

Pomocí metody reporter gene assay byla stejně jako u AhR stanovena transkripční aktivita PXR v přítomnosti 4-bromindolu, 5-bromindolu, 6-bromindolu a 7-bromindolu. Všechny látky byly studovány v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako pozitivní kontrola byl použit  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  RIF, v jeho přítomnosti činila indukce 100 %. Jako negativní kontrola sloužilo 0,1% DMSO. Na základě výsledků byly sestaveny grafy závislosti % maximální indukce k RIF na koncentraci, všechny grafy jsou výsledkem tří na sobě nezávislých experimentů.

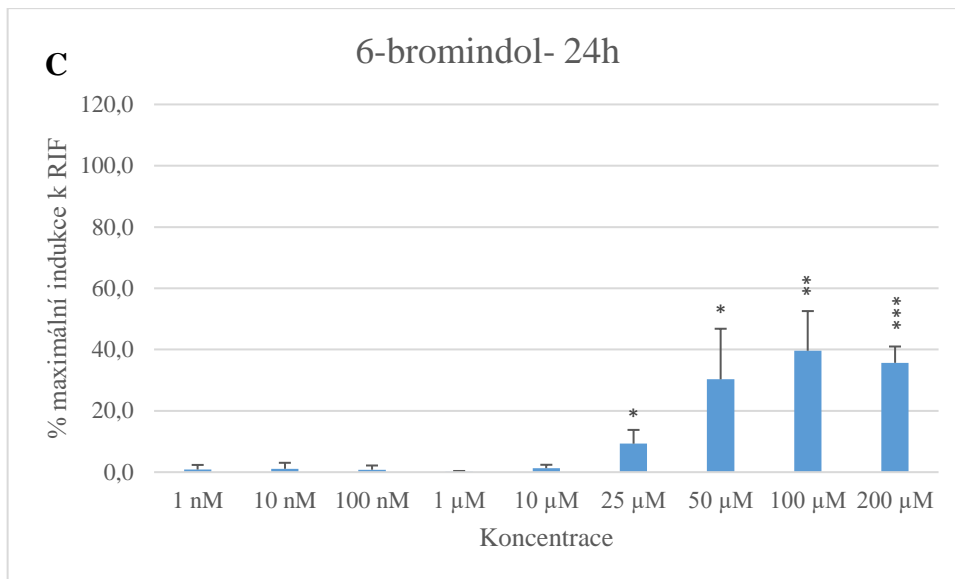
Transkripční aktivita PXR byla stanovena po 24hodinovém působení daných látek na buněčnou linii LS174T. U 4-bromindolu a 5-bromindolu se hodnoty maximální účinnosti pohybovaly okolo 20 % (Graf 15, Graf 16). Mírně vyšší hodnoty byly zaznamenány u  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace 6-bromindolu, kde účinnost činila  $39,6 \pm 12,9 \%$  (Graf 17). Nejvyšší aktivitu však vykazoval 7-bromindol, jehož účinnost při  $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci byla  $102,1 \pm 17,5 \%$  a hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla  $1,2 \pm 0,08 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf 18). Z výsledků je patrné, že substituce bromem v poloze sedm výrazně zvyšuje účinnost i potenci a 7-bromoindol tedy významně ovlivňuje transkripční aktivitu PXR.



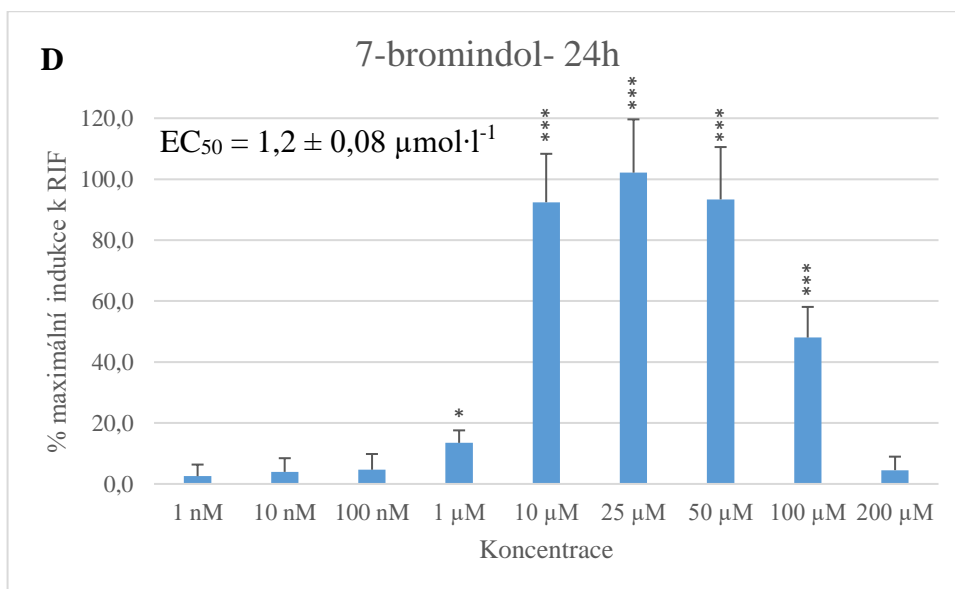
Graf 15: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 4-bromindolu na buněčnou linii LS174T. 4-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Graf 16: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 5-bromindolu na buněčnou linii LS174T. 5-bromindol byl studován v koncentracích  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Graf 17: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 6-bromindolu na buněčnou linii LS174T. 6-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



Graf 18: Stanovení transkripční aktivity PXR po 24hodinovém působení 7-bromindolu na buněčnou linii LS174T. 7-bromindol byl studován v koncentracích 1 nmol·l<sup>-1</sup>-200 μmol·l<sup>-1</sup>. Graf byl vytvořen jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí studentova ttestu a \* jsou označeny statisticky signifikantní hodnoty (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

## 6 DISKUZE

V lidském gastrointestinálním traktu hraje mikrobiom zásadní roli při udržování správné funkce střev hostitele. Narušení rovnováhy vztahu mezi hostitelem a mikrobiomem vede ke vzniku různých onemocnění, včetně zánětlivých onemocnění střev, kardiovaskulárních a jaterních onemocnění, obezity, cukrovky apod. Střevní bakteriální metabolity zahrnují širokou škálu sloučenin. Důležitou skupinou těchto látek jsou deriváty tryptofanu, v dnešní době bylo identifikováno nepřeborné množství těchto sloučenin, mnoho z nich je považováno za ligandy a agonisty AhR a PXR (Vyhlídalová *et al.*, 2020; Vrzalová *et al.*, 2022).

Tato bakalářská práce byla zaměřena na sledování transkripční aktivity aryl uhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru v přítomnosti bromovaných derivátů indolu, konkrétně se jednalo o 4-bromindol, 5-bromindol, 6-bromindol a 7-bromindol. Pro studium transkripční aktivity těchto receptorů byla použita adherentní buněčná linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva LS174T. Při zkoumání transkripční aktivity AhR byla aplikována stabilně transfekovaná buněčná linie LS174T-AhR. U PXR bylo nutné buněčnou linii LS174T před každou aplikací transfekovat.

Nejprve byla pomocí MTT testu stanovena viabilita buněk LS174T po 24 h působení vybraných látek. Z výsledků bylo zjištěno, že vybrané bromované deriváty indolu s výjimkou nejvyšší koncentrace ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) u 4-bromindolu a 7-bromindolu, u kterých došlo k 50% poklesu viability, nemají větší cytotoxické účinky.

Následně byly sloučeniny podrobeny studiu transkripční aktivity AhR a PXR pomocí metody reporter gene assay. Po 4 h působení byla zaznamenána nejvyšší transkripční aktivita AhR u 6-bromindolu, kde se účinnost pěti koncentrací (10, 25, 50, 100 a  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pohybovala okolo 100 % a hodnota  $EC_{50}$  odpovídala  $1,21 \pm 0,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Podobných výsledků bylo dosaženo i v bakalářské práci Zátopková (2023), kde po 4 h působení byla taktéž zaznamenána nejvyšší transkripční aktivita AhR u derivátu oxindolu substituovaného v pozici 6. 6-chlor-2-oxindol vykazoval nejvyšší účinnost při koncentraci  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to 103 %. Hodnota  $EC_{50}$  6-chlor-2-oxindolu v porovnání s 6-bromindolem činila  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U 6-brom-2-oxindolu v bakalářské práci Příkryl (2023) byla největší aktivita stejně jako u 6-bromindolu naměřena při koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zde se však účinnost pohybovala pouze okolo 70 % a hodnota  $EC_{50}$  tak byla mírně vyšší  $4,40 \pm 2,03 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Naopak látka 6-fluorindol



vykazovala pouze slabou indukci AhR, která při  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci činila pouze 12,5 % (Růžičková, 2023). 4-bromindol ve srovnání s 4-fluorindolem pozorovaným v bakalářské práci Růžičková (2023) vykazoval nižší účinnost, avšak hodnoty  $\text{EC}_{50}$  jsou si velmi podobné  $1,69 \pm 0,67 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u 4-bromindolu a  $1,99 \pm 0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u 4-fluorindolu. U 5-bromindolu bylo největšího účinku dosaženo u  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, kde indukce činila 108,3 %. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla stanovena na  $30,5 \pm 26,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . 5-fluorindol vykazoval pouze slabou indukci AhR, která při  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci činila pouze 11 % a hodnotu  $\text{EC}_{50}$  tak nebylo možné stanovit (Růžičková, 2023). Všechny 2-oxindoly substituované halogenovaným derivátem v pozici 5, konkrétně šlo o 5-chlor-2-oxindol (Zátopková, 2023), 5-fluor-2-oxindol a 5-brom-2-oxindol (Přikryl, 2023), způsobily zvýšení transkripční aktivity AhR a jejich hodnoty  $\text{EC}_{50}$  byly  $25,7 \pm 9,10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $11,4 \pm 2,03 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2,33 \pm 1,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U 7-bromindolu, byla nejvyšší účinnost zaznamenána u  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace a to 92,8 %. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  činila  $1,82 \pm 1,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V porovnání s 7-fluorindolem byla indukce nižší, 7-fluorindol způsobil indukci 109 % již při koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což se projevilo i nižší hodnotou  $\text{EC}_{50}$   $0,15 \pm 0,005 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hodnota  $\text{EC}_{50}$  u 7-chlor-2-oxindolu byla naopak v porovnání s 7-bromindolem vyšší a činila  $4,9 \pm 3,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Zátopková, 2023).

Ve studii Stepankova *et al.* (2018) byla sledována transkripční aktivita AhR po 8 h a 24 h působení methylyndolů a methoxyindolů na stabilně transfekovanou buněčnou linii AZ-AhR. Studované látky byly aplikovány v koncentracích  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ - $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na základě této studie byly látky 4-methylyndol, 6-methylyndol a 7-methoxyindol stanoveny jako účinní agonisté AhR s relativní efektivitou 134 %, 91 % a 80 %.

Po 24hodinovém působení látek byla transkripční aktivita AhR u všech sloučenin výrazně nižší, než po 4 h. 4-bromindol po 24 h inkubace aktivoval AhR pouze minimálně s maximální indukcí okolo 20 %. Pokles aktivity byl pozorován i u 4-fluorindolu, kde však ve srovnání s 4-bromindolem byla maximální účinnost vyšší, činila 48,1 % (Růžičková, 2023). Stejně tak 7-bromindol aktivoval AhR pouze slabě. Maximální indukce byla pozorována při koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a činila 27,8 %. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  byla určena na  $10,5 \pm 0,20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Podobných výsledků bylo dosaženo i v bakalářské práci Zátopková (2023), kde maximální účinnost 7-chlor-2-oxindolu činila 37 % a to u nejvyšší  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace. Naopak 7-fluorindol v bakalářské práci Růžičková (2023)

vykazoval vysokou míru aktivace AhR, kde po působení látky při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla maximální indukce 134,7 %. Vyšší koncentrace 5-bromindolu a 6-bromindolu vykazovaly mnohem vyšší transkripční aktivitu. Nejvyššího účinku u 5-bromindolu bylo dosaženo u  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace, kde indukce činila 76,8 %. 6-bromindol vykazoval nejvyšší účinnost při koncentraci  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a to 71 %. Podobná účinnost byla pozorována u derivátů 2-oxindolu substituovaných chlorem nebo bromem v poloze 5 a 6 (Zátopková, 2023; Příkryl, 2023). Opačně tomu bylo u 5-fluorindolu a 6-fluorindolu, které aktivovaly AhR pouze minimálně s maximální účinností okolo 10 % (Růžičková, 2023). Lze tedy říci, že substituce bromem v polohách 5 a 6 je prospěšná pro stabilizaci indolového skeletu, což vede pravděpodobně ke zpomalení metabolismu sloučeniny.

Transkripční aktivita PXR byla měřena po 24 h působení bromovaných derivátů indolu na buněčnou linii LS174T. Látky 4-bromindol, 5-bromindol a 6-bromindol aktivovaly PXR s poměrně nízkou účinností. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u 7-bromindolu, jehož účinnost při  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci byla 102,1 % a hodnota  $\text{EC}_{50}$  činila  $1,2 \pm 0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Podobné výsledky byly zjištěny i v bakalářské práci Růžičková (2023), kde 7-fluorindol aktivoval PXR při maximální  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci s účinností 79,6 %. 7-chlor-2-oxindol v bakalářské práci Zátopková (2023) taktéž vykazoval schopnost vyvolat vyšší transkripční aktivitu PXR v porovnání se substitucí chlorem v poloze 5 a 6. Z těchto výsledků vyplývá, že substituce indolového skeletu halogenem v poloze 7 výrazně zvyšuje transkripční aktivitu PXR a jedná se tedy o účinné agonisty tohoto receptoru. 7-bromindol významně aktivoval po 4 hodinách také AhR, z čehož vyplývá, že se jedná o duálního agonistu těchto receptorů.

V práci Vyhlídalová *et al.* (2020b) byla sledována transkripční aktivita PXR po 24hodinovém působení mono-methylovaných indolů na buněčnou linii LS180. Studované methylyndoly substituované v pozicích 1-7 byly aplikovány v koncentracích  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  -  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Všechny studované látky vyvolaly na dávce závislou aktivaci PXR. Relativní účinnost 4-methylyndolu činila 111 %, u 5-methylyndolu činila 49 %, u 6-methylyndolu byla stanovena na 70 % a relativní účinnost 7-methylyndolu byla 34 %.

## 7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje studiu bromovaných derivátů indolu substituovaných v poloze 4, 5, 6 a 7, konkrétně se jedná o 4-bromindol, 5-bromindol, 6-bromindol a 7-bromindol. U těchto látek bylo pozorováno, jak ovlivňují transkripční aktivitu AhR a PXR. Nejprve byla prostřednictvím MTT testu ověřena cytotoxicita daných látek na buněčnou linii LS174T. Kromě nejvyšší koncentrace ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) u 4-bromindolu a 7-bromindolu nebyla u těchto látek cytotoxicita zaznamenána. Dále byla pomocí metody reporter gene assay stanovována míra aktivace AhR a PXR receptoru. Na základě výsledků jsme dospěli k závěru, že všechny studované látky jsou schopny aktivovat oba dva receptory, míra aktivace se však u jednotlivých látek značně liší. Z výsledků je patrné, že po 4 h inkubace největší aktivaci AhR způsobuje 6-bromindol a 7-bromindol, jedná se o látky s vysokou účinností a především vysokou potencií. Po 24 h inkubace AhR nejvíce aktivovaly látky 5-bromindol a 6-bromindol. PXR receptor byl po 24 h inkubace nejvíce aktivován 7-bromindolem, u něhož byl zaznamenán významný účinek na transkripční aktivitu AhR a jedná se tedy pravděpodobně o duálního agonistu.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AF-1	activation function 1
AF-2	activation function 2
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AhRR	AhR represor
AIP	AhR- interacting protein
ALDH	aldehyddehydrogenáza
AR	androgenní receptor
ARNT	AhR jaderný translokátor
ATP	adenosin-5'-trifosfát
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	cytoplazmatický retenční protein CAR
Cd36	diferenciační skupina 36
c-jun	transkripční faktor Jun
CNS	centrální nervová soustava
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CoA	koenzym A
c-Rel	podjednotka jaderného faktoru κB
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA-vazebná doména
dFICZ	6,12-diformylindolo[3,2-b]karbazol
dH <sub>2</sub> O	dionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxid
DR	direct repeats

DRE	dioxinový responzivní element
DSS	dextran sulfát sodný
DTT	dithiotreitol
EC <sub>50</sub>	poloviční maximální efektivní koncentrace
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	estrogenový receptor
ER	everted repeats
FBS CS	fetální bovinní sérum, charcoal stripped
FBS	fetální bovinní sérum
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]karbazol
FKK6	Felix Kopp Kortagere 6
GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutathion-S-transferázy
HAHs	halogenované aromatické uhlovodíky
HAT	histon acetyltransferáza
hPXR	lidský PXR
IBD	zánětlivá onemocnění střev
IEC	střevní epiteliální buňky
IEL	intraepiteliální lymfocyty
IL	interleukin
ILC	vrozené lymfoidní buňky
I $\kappa$ B	inhibiční proteiny NF- $\kappa$ B
jun-D	transkripční faktor JunD
KLF6	Krüppel-like factor 6
LBD	ligand-vazebná doména
LS174T	buněčná linie odvozená od karcinomu tlustého střeva

LXR	játerní X receptor
MDR	proteiny multilékové rezistence
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	heptahydrát síranu hořečnatého
MRP	proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
NC-XRE	non-consensus XRE
NEAA	neesenciální aminokyseliny
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NR1I2	jaderný receptor podrodiny 1, skupiny I, člen 2
NRF2	nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OATP	polypeptidy transportující organické ionty
p21 <sup>CIP1</sup>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p23	protein 23
p27 <sup>KIP1</sup>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p50	podjednotka jaderného faktoru κB
p52	podjednotka jaderného faktoru κB
PAHs	nehalogenované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PAS	Period-ARNT-Single minded
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGE2	prostaglandin E2
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PR	progesteronový receptor
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor kyseliny retinové

RelA	podjednotka p65 jaderného faktoru $\kappa$ B
RelB	podjednotka jaderného faktoru $\kappa$ B
REs	responzivní elementy
RHR	Rel Homology Region
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
SLUT	sulfotransferázy
SRC-1	koaktivátor steroidního receptoru 1
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SXR	steroidní a xenobiotický receptor
TCDD	2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Th	T-helper lymfocyty
TLR4	toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TR	thyroidní receptor
Treg	T-regulační lymfocyty
UGT	UDP-glukuronyltransferázy
VDR	receptor pro vitamín D
XRE	xenobiotický responzivní element

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmad, T. B., Rudd, D., Smith, J., Kotiw, M., Mouatt, P., Seymour, L. M., Liu, L., Benkendorff, K. (2017). Anti-Inflammatory Activity and Structure-Activity Relationships of Brominated Indoles from a Marine Mollusc. *Marine Drugs* **15** (5), 133.

Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *Journal of Biological Chemistry* **276** (35), 33101-33110.

Baker, J. R., Sakoff, J. A., McCluskey, A. (2020). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) as a breast cancer drug target. *Medicinal Research Reviews* **40** (3), 972-1001.

Bautista-Olivier, C. D., Elizondo, G. (2022). PXR as the tipping point between innate immune response, microbial infections, and drug metabolism. *Biochemical Pharmacology* **202**, 115147.

Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L., Kemper, J. (2004). Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. *Journal of Biological Chemistry* **279** (43), 45139-45147.

Bissonnette, R., Saint-Cyr Proulx, E., Jack, C., Maari C. (2023). Tapinarof for psoriasis and atopic dermatitis: 15 years of clinical research. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **37** (6), 1093-1094.

Buchman, C. D., Chai, S. C., Chen, T. (2018). A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **14** (6), 635-647.

Comai, S., Bertazzo, A., Brughera, M., Crotti S. (2020). Chapter Five-Tryptophan in health and disease. *Advances in Clinical Chemistry* **95**, 165-218.

Dai, G., He, L., Bu, P., Wan, Y.-J. Y. (2008). Pregnane X receptor is essential for normal progression of liver regeneration. *Hepatology* **47** (4), 1277-1287.

DeGroot, D. E., Franks, D. G., Higa, T., Tanaka, J., Hahn, M. E., Denison, M. S. (2015). Naturally occurring marine brominated indoles are aryl hydrocarbon receptor ligands/agonists. *Chemical Research in Toxicology* **28** (6), 1176-1185.

Denison, M. S., Nagy, S. R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43**, 309-334.

Dvořák, Z., Kopp, F., Costello, C. M., Kemp, J. S., Li, H., Vrzalová, A., Štěpánková, M., Bartoňková, I., Jiskrová, E., Poulíková, K., Vyhlídalová, B., Nordstroem, L. U., Karunaratne, C. V., Ranhotra, H. S., Mun, K. S., Naren, A. P., Murray, I. A., Perdew, G. H., Brtko, J., Toporova, L., Schön, A., Wallace, B. D., Walton, W. G., Redinbo, M. R., Sun, K., Beck, A., Kortagere, S., Neary, M. C., Chandran, A., Vishveshwara, S., Cavalluzzi, M. M., Lentini, G., Cui, J. Y., Gu, H., March, J. C., Chatterjee, S., Matson, A., Wright, D., Flannigan, K. L., Hirota, S. A., Sartor, R. B., Mani, S. (2020b). Targeting



the pregnane X receptor using microbial metabolite mimicry. *EMBO Molecular Medicine* **12** (4), e11621.

Dvořák, Z., Poulíková, K., Mani, S. (2021). Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* **215**, 113231.

Dvořák, Z., Sokol, H., Mani, S. (2020a). Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends in pharmacological sciences* **41** (12), 900-908.

Esmaeliani, B., Benkendorff, K., Johnston, M. R., Abbott, C. A. (2013), Purified brominated indole derivatives from *Dicathais orbita* induce apoptosis and cell cycle arrest in colorectal cancer cell lines. *Marine Drugs* **11** (10), 3802-3822.

Esser, C., Bargaen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., Krutmann, J. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars in Immunopathology* **35** (6), 677-91.

Evans, R. M., Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **157** (1), 255-266.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* **58** (4), 685-704.

Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D., Cenijn, P. H., Brouwer, A., Denison, M. S. (1998). Activation of the Ah Receptor by Tryptophan and Tryptophan Metabolites. *Biochemistry* **37** (33), 11508-11515.

Hoffer, A., Chang, C. Y., Puga, A. (1996). Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and - independent pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141** (1), 238-247.

Huang, D., B., Vu, D., Ghosh, G. (2005). NF- $\kappa$ B RelB Forms an Intertwined Homodimer. *Structure* **13** (9), 1365-1373.

Huang, K., Mukherjee, S., DesMarais, V., Albanese, J. M., Rafti, E., Draghi, A., Maher, L. A., Khanna, K. M., Mani, S., Matson, A. P. (2018). Targeting the PXR/TLR4 signaling pathway to reduce intestinal inflammation in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research* **83**, 1031-1040.

Jackson, D. P., Joshi, A. D., Elferink, C. J. (2015). Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs. *Toxicology Research* **4** (5), 1143-1158.

Kaushik, N. K., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C. H., Verma, A. K., Choi, E. H. (2013). Biomedical importance of indoles. *Molecules* **18** (6), 6620-6662.

Kodama, S., Moore, R., Yamamoto, Y., Negishi, M. (2007). Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *The Biochemical Journal* **407** (3), 373-381.

- Kolluri, S. K., Weiss, K., Koff, A., Göttlicher, M. (1999). p27<sup>Kip1</sup> induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes & Development* **13**, 1742-1753.
- Kotiya, D., Jaiswal, B., Ghose, S., Kaul, R., Datta, K., Tyagi, R. K. (2016). Role of PXR in hepatic cancer: its influences on liver detoxification capacity and cancer progression. *PLoS ONE* **11** (10), e0164087.
- Larigot, L., Benoit, L., Koual, M., Tomkiewicz, C., Barouki, R., Coumoul, X. (2022). Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Diverse Ligands and Functions: An Exposome Receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **62**, 383-404.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* **7**, 1-9.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, M. H., Kim, J. A., Lee, J. (2012). 7-Fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* **329** (1), 36-44.
- Lin, L., Dai, Y., Xia, Y. (2022). An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* **244**, 114845.
- Lo, R., Matthews, J. (2012). High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. *Toxicological Sciences* **130** (2), 349-361.
- Lv, Y., Luo, Y-Y., Ren, H-W., Li, C-J., Xiang, Z-X., Luan, Z-L. (2022). The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology* **13**, 959902.
- Matsumura, F. (2009). The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical Pharmacology* **77** (4), 608-626.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development* **13** (1), 20-25.
- Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P., Pascussi, J. M. (2008). Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular Pharmaceutics* **5** (1), 35-41.
- Nieves, K. M., Hirota, S. A., Flannigan, K. L. (2022). Xenobiotic receptors and the regulation of intestinal homeostasis: harnessing the chemical output of the intestinal microbiota. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **322** (2), G268-G281.
- Ouyang, N., Ke, S., Eagleton, N., Xie, Y., Chen, G., Laffins, B., Yao, H., Zhou, B., Tian, Y. (2010). Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells. *British Journal of Cancer* **102** (12), 1753-1761.

Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B. (2012). General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **12**, 486-504.

Pondugula, S. R., Mani, S. (2013). Pregnane xenobiotic receptor in cancer pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Letters* **328**, 1-9.

Příkryl, Jakub. Studium účinků vybraných derivátů oxindolu na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a pregnanového x receptoru v *in vitro* lidských buněčných modelech. Olomouc, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Puga, A., Ma, C., Marlowe, J. L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology* **77** (4), 713-722.

Rajasekharan, S. K., Lee, J. H., Ravichandran, V., Kim, J. C., Park, J. G., Lee, J. (2019). Nematicidal and insecticidal activities of halogenated indoles. *Scientific Reports* **9** (1), 1-4.

Rakateli, L., Huchzermeier, R., van der Vorst, E. P. C. (2023). AhR, PXR and CAR: From Xenobiotic Receptors to Metabolic Sensors. *Cells* **12** (23), 2752.

Robinson-Rechavi, M., Escrivá Garcia, H., Laudet V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* **116** (4), 585-586.

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

Růžicková, Veronika. Vliv vybraných fluorovaných derivátů indolu na aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru a pregnanového X receptoru v lidských buněčných liniích. Olomouc, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Sathiyamoorthi, E., Faleye, O. S., Lee, J. H., Raj, V., Lee, J. (2021). Antibacterial and antibiofilm activities of chloroindoles against *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology* **12**, 714371.

Sayaf, K., Zanotto, I., Russo, F. P., Gabbia, D., De Martin, S. (2022). The nuclear receptor PXR in chronic liver disease. *Cells* **11** (1), 61.

Seok, S. H., Ma, Z. X., Feltenberger, J. B., Chen, H., Chen, H., Scarlett, C., Lin, Z., Satyshur, K. A., Cortopassi, M., Jefcoate, C. R., Ge, Y., Tang, W., Bradfield, C. A., Xing, Y. (2018). Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *The Journal of Biological Chemistry* **293** (6), 1994-2005.

Sethupathy, S., Sathiyamoorthi, E., Kim, Y. G., Lee, J. H., Lee, J. (2020). Antibiofilm and antivirulence properties of indoles against *Serratia marcescens*. *Frontiers in Microbiology* **11**, 584812.

Shah, Y. M., Ma, X., Morimura, K., Kim, I., Gonzalez, F. J. (2007). Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF- $\kappa$ B target gene expression. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **292** (4), G1114 -G1122.

- Sládeková, L., Mani, S., Dvořák, Z. (2023). Ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor AhR: Facts and myths. *Biochemical Pharmacology* **213**, 115626.
- Sondermann, N. C, Faßbender, S., Hartung, F., Hätälä, A. M., Rolfes, K. M., Vogel, C. F. A., Haarmann-Stemmann T. (2023). Functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway. *Biochemical Pharmacology* **208**, 115371.
- Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J., Barwick, J., Guzelian, P., Evans, R. M. (2002). Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *The Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** (21), 13801-13806.
- Staudinger, J. L., Ding, X., Lichti, K. (2006). Pregnane X receptor and natural products: beyond drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2** (6), 847-857.
- Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., Dvorak, Z. (2018). Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* **93**, 631-644.
- Suárez-Castillo, O. R., Beiza-Granados, L., Meléndez-Rodríguez, M., Álvarez-Hernández, A., Morales-Ríos, M. S., Joseph-Nathan, P. (2006) Synthesis of Bromoindole Alkaloids from *Laurencia brongniartii*. *Journal of Natural Products* **69** (11), 1596-1600.
- Sui, Y., Xu, J., Rios-Pilier, J., Zhou, C. (2011). Deficiency of PXR decreases atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* **52** (9), 1652-1659.
- Swanson, H. I., Tullis, K., Denison, M. S. (1993). Binding of transformed Ah receptor complex to a dioxin responsive transcriptional enhancer: evidence for two distinct heteromeric DNA-binding forms. *Biochemistry* **32**, 12841-12849.
- Tabb, M. M., Sun, A., Zhou, Ch., Grün, F., Errandi, J., Romero, K., Pham, H., Inoue, S., Mallick, S., Lin, M., Forman, B. M., Blumberg, B. (2003). Vitamin K2 Regulation of Bone Homeostasis Is Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor SXR. *The Journal Of Biological Chemistry* **278** (45), 43919-43927.
- Takayama, K., Maehara, S., Tabuchi, N., Okamura, N. (2021). Anthraquinone-containing compound in rhubarb prevents indole production via functional changes in gut microbiota. *Journal of Natural Medicines* **75** (1), 116-128.
- Tennoune, N., Andriamihaja, M., Blachier, F. (2022). Production of Indole and Indole-Related Compounds by the Intestinal Microbiota and Consequences for the Host: The Good, the Bad, and the Ugly. *Microorganisms* **10** (5), 930.
- van den Bogaard E. H., Esser, Ch., Perdew, G. H. (2021). The aryl hydrocarbon receptor at the forefront of host-microbe interactions in the skin: A perspective on current knowledge gaps and directions for future research and therapeutic applications. *Experimental Dermatology* **30** (10), 1477-1483.
- Van der Heiden, E., Bechoux, N., Muller, M., Sergent, T., Schneider, Y. J , Larondelle, Y., Maghuin-Rogister, G., Scippo, M. L. (2009). Food flavonoid aryl hydrocarbon

receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays. *Analytica Chimica Acta* **637** (1-2), 337-345.

Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A. P., Qiu, Z., Maher, L., Redinbo, M. R., Phillips, R. S., Fleet, J. C., Kortagere, S., Mukherjee, P., Fasano, A., Le Ven, J., Nicholson, J. K., Dumas, M. E., Khanna, K. M., Mani, S. (2014). Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* **41** (2), 296-310.

Vogel, C. F. A., Matsumura, F. (2009). A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF- $\kappa$ B family. *Biochemical Pharmacology* **77**(4), 734-745.

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

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

Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., Mani, S., Dvořák, Z. (2020a). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2614.

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

Xing, Y., Yan, J., Niu, Y. (2020). PXR: a center of transcriptional regulation in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10** (2), 197-206.

Zátopková, Tereza. Studium účinku chlorovaných derivátů oxindolu na aktivitu xenobiotických receptorů AhR a PXR v *in vitro* lidských buněčných modelech. Olomouc, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

Zhang, B., Xie, W., Krasowski, M. D. (2008). PXR: A xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* **9** (11), 1695-1709.

Zhang, S., Yang, Q., Defoirdt, T. (2022). Halogenated Indoles Decrease the Virulence of *Vibrio campbellii* in a Gnotobiotic Brine Shrimp Model. *Microbiology Spectrum* **10** (5), e02689-22.

Zhou, C., Verma, S., Blumberg, B. (2009). The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nuclear Receptor Signaling* **7**, e001.

Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., Kuruba, R., He, J., Lee, J. H., Khadem, S., Ren, S., Li, S., Silverstein, R. L., Xie, W. (2008). Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR. *Gastroenterology* **134** (2), 556-567.

Zuo, H., Wan, Y. (2017). Nuclear Receptors in Skeletal Homeostasis. *Current Topics in Developmental Biology* **125**, 71-107.