

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2022**

**Bc. Natália Sirotová**

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



**Charakterizácia novej reportérovej  
bunkovej línie LS174T-AhR-luc na  
stanovenie transkripčnej aktivity  
AhR**

**Diplomová práca**

**Bc. Natália  
Sirotová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

**Vedoucí práce: RNDr. Peter Illés, Ph.D**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Natálie SIROTOVÁ  
Osobní číslo: R20914  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Charakterizace nové reportérové bunkové linie LS174T-AhR-luc na stanovení transkripční aktivity AhR.  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na tému diplomové práce.
2. Zdokonalení se v technikách práce v laboratoriu tkanivových kultur.
3. Charakterizace nové reportérové linie LS174T-AhR-luc:
  - stanovení indukce luciferázové aktivity v závislosti od koncentrace ligandu
  - určení časovo-závislé indukce luciferázové aktivity
  - zjištění schopnosti indukovat luciferázovou aktivitu po kryoprezervaci a počas dlouhodobé kultivace
  - stanovení špecifity a selektivity indukce luciferázové aktivity voči ligandu AhR
4. Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov, spísanie diplomovej práce.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná  
Jazyk zpracování: Slovenština

#### Seznam doporučené literatury:

1. Larijot L. et al. (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 184x2013;9
2. Otárola G. et al. (2017) Aryl hydrocarbon receptor-based bioassays for dioxin detection: thinking outside the box. *Journal of Applied Toxicology* 38: 4378x2013;449
3. Novotná A. et al. (2011) Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of AhR transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental Science & Technology* 45: 101338x2013;10139
4. Vondráček J. et al. (2017): Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-based reporter gene assay. *Environmental Pollution*, 220: 3078x2013;316

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Peter Illés, Ph.D.  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 29. října 2020  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
šéfkaz

L.S.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA HUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENOMIKY  
Štefánikova 27, 782 01 Olomouc – Heřkovice  
tel: +420 583 634 600

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne: 29. října 2020

## **Bibliografická identifikácia**

Meno a priezvisko autora	Natália Sirotová
Názov práce	Charakterizácia novej reportérovej bunkovej línie LS174T-AhR-luc na stanovenie transkripčnej aktivity AhR
Typ práce	diplomová
Pracovisko	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedúci práce	RNDr. Peter Illés Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Kľúčové slová	aryl uhľovodíkový receptor, luciferázová reportérová esej, transkripčná aktivita
Počet strán	64
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

## **Súhrn**

Aryl uhľovodíkový receptor (AhR) je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v celej škále fyziologických procesov. Jedným z široko využívaných nástrojov pri štúdiu transkripčnej aktivity AhR sú luciferázové reportérové systémy.

V predkladanej diplomovej práci bola charakterizovaná nová reportérová bunková línia LS174T-AhR-luc na stanovovanie transkripčnej aktivity AhR. Na základe experimentov bolo zistené, že po aplikácii modelových ligandov AhR došlo k indukcii luciferázovej aktivity, ktorej intenzita bola závislá od koncentrácie ligandov. Bunky LS174T-AhR-luc si zachovali schopnosť inducibility luciferázovej aktivity ako po kryoprezervácii a uchovávaní pri nízkej teplote, tak aj po dlhodobom udržovaní v kultivačnom médiu. Rovnako došlo aj k zachovaniu morfológie buniek v porovnaní s rodičovskou líniou LS174T. Testy využívajúce inhibítor AhR CH-223191 potvrdili, že indukcia luciferázovej aktivity prebiehala špecificky, v dôsledku pôsobenia AhR ligandu. Takisto, aj testovanie vplyvu ligandov vybraných jadrových a steroidných receptorov odhalilo, že indukcia luciferázovej aktivity bola selektívna voči ligandu AhR.

Získané výsledky tak ukázali, že nová reportérová línia LS174T-AhR-luc spĺňa všetky požadované kritériá pre jej úspešné využívanie v experimentálnej praxi.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Natália Sirotová
Title	Characterization of novel reporter cell line LS174T-AhR-luc for the assessment of AhR transcriptional activity
Type of thesis (bachelor, master)	master
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	RNDr. Peter Illés Ph.D.
The year of presentation	2022
Keywords	aryl hydrocarbon receptor, luciferase reporter assay, transcriptional activity
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Slovak

## **Summary**

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that plays a key role in various physiological processes. One of the widely used tools for studying AhR transcriptional activity are luciferase reporter systems.

In the present diploma thesis, a novel reporter cell line for the assessment of AhR transcriptional activity, LS174T-AhR-luc, was characterized. Based on the experiments, it was found that the application of AhR model ligands resulted in the dose-dependent induction of luciferase activity. LS174T-AhR-luc cells retained the inducibility of luciferase activity both, after the cryopreservation and storage at low temperature, and after the long-term maintenance in the culture medium. Morphology of the cells was also preserved compared to parental cell line LS174T. Assays using the AhR inhibitor CH-223191 confirmed that the induction of luciferase activity was a specific result of AhR ligand action. Also, testing the effects of ligands of selected nuclear and steroid receptors revealed that the induction of luciferase activity was selective for the AhR ligand.

The obtained data showed that the novel reporter cell line LS174T-AhR-luc meets all the required criteria for its successful use in experimental practice.

Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracovala samostatne a použitú literatúru som uviedla v zozname literatúry. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 1.8.2022

V prvom rade by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce, RNDr. Petrovi Illésovi, Ph.D., za jeho obrovskú pomoc, vedenie práce a pochopenie. Taktiež by som rada poďakovala laboratóriu molekulárnej farmakológie a toxikológie za ich pomoc a rady pri práci. Ďakujem aj mojej rodine a blízkym priateľom za ich podporu.



## **OBSAH**

<b>ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK</b>	<b>VII</b>
<b>ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK</b>	<b>IX</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 CIELE PRÁCE</b>	<b>2</b>
<b>3 LITERÁRNY PREHĽAD</b>	<b>3</b>
3.1 Aryl uhl'ovodíkový receptor	3
3.2 Štruktúra AhR	4
3.3 Ligandy AhR	4
3.4 Toxicita AhR ligandov	5
3.5 Aktivácia AhR	6
3.6 Koaktivátory a korepresory AhR	8
3.7 Gény regulované AhR	9
3.8 Nekanonické signalizačné dráhy AhR	10
3.9 Ďalšie funkcie AhR	12
3.9.1 Proliferácia buniek	12
3.9.2 Adhézia a migrácia buniek	13
3.9.3 Imunita a zápalové procesy	14
3.9.4 Vývin organizmu	14
3.10 Reportérové bunkové systémy	15
<b>4 MATERIÁL A METÓDY</b>	<b>17</b>
4.1 Biologický materiál	17
4.2 Použité chemikálie a roztoky	17
4.3 Laboratórne pomôcky	18
4.4 Prístroje	19
4.5 Použité metódy	19
4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek	19
4.5.2 Príprava experimentu	19
4.5.3 Nanášanie látok pri luciferázovej reporortérovej eseji a teste cytotoxicity	20
4.5.4 Stanovenie indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie ligandu	20

4.5.5 Zistenie schopnosti indukovať luciferázovú aktivitu po kryoprezervácii a počas dlhodobej kultivácie	21
4.5.6 Stanovenie účinku inhibítora AhR na indukciu luciferázovej aktivity	21
4.5.7 Určenie vplyvu vybraných ligandov na indukciu luciferázovej aktivity	22
4.5.8 Luciferázová reportérová esej	22
4.5.9 Test cytotoxicity (MTT)	23
4.5.10 Mikroskopia	23
<b>5 VÝSLEDKY</b>	<b>24</b>
5.1 Indukcia luciferázovej aktivity	24
5.2 Vplyv kryoprezervácie a dlhodobej kultivácie na luciferázovú aktivitu	28
5.3 Morfológia buniek	30
5.4 Špecifickosť indukcie luciferázovej aktivity	31
5.5 Selektivita indukcie luciferázovej aktivity	33
<b>6 DISKUSIA</b>	<b>35</b>
<b>7 ZÁVER</b>	<b>39</b>
<b>8 LITERATÚRA</b>	<b>41</b>

## ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

3-MC	3-metylcholantrén
9-cis RA	kyselina 9-cis-retinová
AhRR	AhR represor
AIP	AhR-interagujúci proteín
ALD	aldosterón
all-trans RA	kyselina all-trans-retinová
ARNT	AhR jadrový translokátor
BaP	benzo[a]pyrén
BCRP	breast cancer resistance protein
bHLH	basic helix-loop-helix doména
CALUX	chemicky aktivovaná expresia luciferázy
CBP/p300	cAMP response element-binding protein
COX2	cyklooxygenáza 2
CUL4B	cullin 4B ubikvitín ligáza
DBD	doména viažuca DNA
DEX	dexametazón
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetylsulfoxid
ER	estrogénový receptor
ERK1	extracellular signal-regulated kinase 1
EST	estradiol
FAK	fokálna adhezívna kináza
FBS	fetálne bovinné sérum
FICZ	formylindolo[3,2-b]karbazol
GR	glukokortikoidný receptor
GRIP1	glucocorticoid receptor interacting protein 1
GST	glutathion-S-transferáza
HAH	halogénované aromatické uhl'ovodíky
Hsp90	heat shock protein 90
I3C	indol-3-carbinol
IARC	Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny
KLF6	Krüppel-like factor 6
LBD	doména viažuca ligand

MDR1	multidrug resistance 1
MRP	multi-drug resistance-associated proteins
MTT	metyltetrazóliová soľ
NCoA2	nuclear receptor coactivator 2
NF- $\kappa$ B	nukleárny faktor kappa B
NQO1	NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1
OATP	organic anion transporting polypeptide
p/CIP	p300/CBP/cointegrator-associated protein
PBS	fosfátový pufor
PCB	polychlórované bifenyly
PCDD	polychlórované dibenzo-p-dioxíny
PER	periodický cirkadiánný proteín
PON1	paraoxonáza
POP	perzistentné organické zlúčeniny
PPAR	receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátormi
pRB	retinoblastómový proteín
PROG	progesterón
PXR	pregnánový X receptor
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAR	receptor kyseliny retinovej
RIF	rifampicín
RXR	retinový X receptor
SIM	single-minded protein
SRC-1	steroid receptor coactivator 1
T3	3,3',5-trijód-L-tyronín
TAD	transkripčná aktivačná doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxín
TCFD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzofurán
TEST	testosterón
TIF2	transcriptional intermediate factor 2
UGT	UDP-glukoronyl transferáza
VD3	cholecalciferol
XRE	xenobiotický responzívny element

## **ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK**

Obr. 1: Štruktúra aryl uhl'ovodíkového receptoru.

Obr. 2: Schéma signalizačnej dráhy AhR.

Obr. 3: Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ.

Obr. 4: Vplyv škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ na viabilitu buniek LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení.

Obr. 5: Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 4-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ.

Obr. 6: Vplyv kryoprezervácie a dlhodobého pôsobenia nízkej teploty na indukciu luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc.

Obr. 7: Morfológia reportérovej línie LS174T-AhR-luc a línie LS174T, od ktorej bola reportérová línia odvodená.

Obr. 8: Inhibícia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom kombinovanom pôsobení  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD a škály koncentrácií inhibítora CH-223191.

Obr. 9: Vplyv škály koncentrácií inhibítora CH-223191 v kombinácii s  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD na viabilitu buniek LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení.

Obr. 10: Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny.

Tab. 1: Vplyv dlhodobej kultivácie buniek reportérovej línie LS174T-AhR-luc na indukciu luciferázovej aktivity.

# 1 ÚVOD

Aryl uhľovodíkový receptor je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý je zaraďovaný do superrodiny PAS proteínov. AhR plní úlohu v rôznych biologických procesoch, ktoré sú nevyhnutné pre správne fungovanie ľudského organizmu. Je kľúčovým regulátorom rastu a vývinu, zohráva významnú funkciu pri metabolizme xenobiotík a endogénnych látok a podieľa sa na regulácii bunkového cyklu a apoptózy. Transkripčná aktivita tohto jadrového receptora taktiež súvisí so vznikom imunitnej odozvy, zápalových reakcií a karcinogenézy.

AhR, označovaný aj ako xenosenzor, je aktivovaný rôznymi xenobiotikami, medzi ktoré patria napríklad polychlórované bifenyly, polycyklické aromatické uhľovodíky alebo dioxíny. Najznámejším modelovým exogénnym ligandom aryl uhľovodíkového receptora je látka TCDD, ktorá je známa svojou vysokou toxicitou. Senzitivita AhR voči TCDD je druhovo špecifická. Perzistencia tejto zlúčeniny v rôznych orgánoch závisí od intenzity expresie génu pre AhR v cieľových orgánoch. Typickými endogénnymi ligandmi AhR sú okrem často používaného modelového ligandu FICZ aj bilirubín, indirubín, indol a deriváty tryptofánu. AhR je najintenzívnejšie experimentovaný v bunkách pečene, placenty a pľúc a v gastrointestinálnom trakte.

Vhodným prostriedkom na stanovenie transkripčnej aktivity AhR pri štúdiu látok schopných ovplyvňovať expresiu jeho cieľových génov, sú luciferázové reportérové systémy. Tieto experimentálne „in vitro“ modely sú najčastejšie vytvorené tranzientou alebo stabilnou transfekciou cicavčích bunkových línií pomocou vhodne pripraveného reportérového plazmidu. Reportérový plazmid nesie gén pre luciferázu, ktorý je pod kontrolou špecifického AhR-responzívneho elementu. Princíp celej metódy spočíva v tom, že po pôsobení látok s agonistickými účinkami na AhR, dochádza k indukcii expresie reportérového génu pre luciferázu a následnej kvantifikácii produktu.

## 2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému diplomovej práce.
2. Zdokonalenie sa v technikách práce v laboratóriu tkanivových kultúr.
3. Charakterizácia novej reportérovej línie LS174T-AhR-luc:
  - stanovenie indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie ligandu
  - zistenie schopnosti indukovať luciferázovú aktivitu po kryoprezervácii a počas dlhodobej kultivácie
  - stanovenie špecificity a selektivity indukcie luciferázovej aktivity voči ligandu AhR
4. Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov, spísanie diplomovej práce.

## 3 LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1 Aryl uhľovodíkový receptor

Aryl uhľovodíkový receptor (AhR) bol objavený roku 1976 tímom doktora Alana Polanda a označený ako dioxín viažuci proteín (Poland *et al.*, 1976). V súčasnej dobe je definovaný ako ligandom aktivovaný transkripčný faktor. AhR sa radí do superrodiny PAS proteínov. Tento názov označuje proteíny obsahujúce domény typické pre periodický cirkadiánný proteín (PER), AhR jadrový translokátor (ARNT) a single-minded protein (SIM). PER-ARNT-SIM doména, skrátene PAS doména, je špecifická práve schopnosťou reagovať na rôzne endogénne, ale aj exogénne faktory (McIntosh *et al.*, 2010).

Členovia PAS superrodiny hrajú kľúčovú úlohu v rôznych biologických dejoch, ako napríklad detekcia hladiny kyslíka, detekcia redoxného potenciálu, zmeny v cirkadiánnom rytme a kontrola adaptácie na bunkové prostredie. AhR ďalej moduluje biologické procesy, ktoré súvisia s tkanivovou homeostázou a taktiež vznikom patologických stavov siahajúcich od indukcie zápalu až po vznik neoplastických ochorení (Rothhammer *et al.*, 2019). Okrem iného je AhR kľúčovým regulátorom rastu a vývinu, podieľa sa na metabolizme nie len xenobiotík, ale aj endogénnych látok, je významný pri vzniku imunitnej odozvy, regulácii bunkového cyklu a apoptózy.

Aryl uhľovodíkový receptor je produktom génu s rovnomerným názvom, ktorý je prípadne označovaný aj ako bHLHe76. Gén obsahuje 11 exónov a je lokalizovaný na na krátkom ramene chromozómu 7, lokus 15 (7p15). Veľkosť tohto génu je 429 794 bází. Primárny transkript môže podliehať alternatívnemu zostrihu, kedy vzniká až 5 rôznych mRNA. (Bennett *et al.*, 1996). AhR proteín sa skladá z 848 aminokyselín a má veľkosť 96 kDa (Burbach *et al.*, 1992).

Expresia AhR génu je v organizme pomerne vysoká a bežne sa exprimuje v bunkách pľúc, pečene, v črevných bunkách, slezine, ale nachádza sa aj v bunkách placenty a pokožky. AhR sa ďalej vyskytuje v stromálnych bunkách a je exprimovaný aj v lymfocytoch a ostatných bunkách imunitného systému (Tsay *et al.*, 2013).

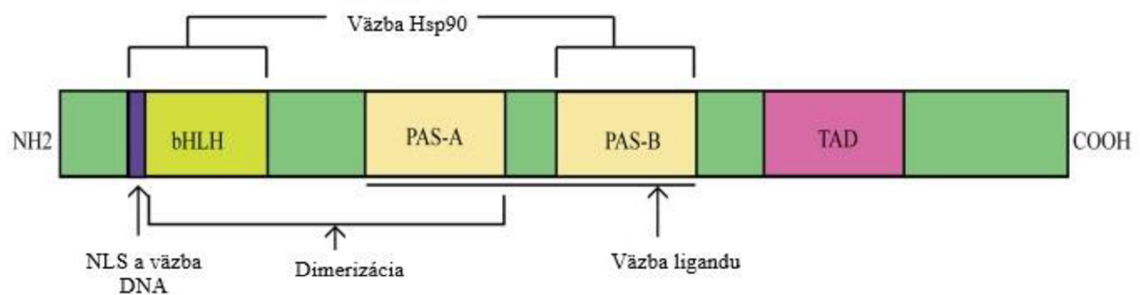
Aj napriek tomu, že funkcie aryl uhľovodíkového receptora a mechanizmy jeho pôsobenia sú pomerne dobre preskúmané, vie sa len málo o AhR géne samotnom. Analýza nukleotidovej sekvencie odhalila, že promótor ľudského AhR génu je bohatý



na GC regióny na 5'konci rovnako ako v oblasti, ktorá nepodlieha translácii. Toto zoskupenie je typické pre tzv. housekeeping gény a gény s absenciou TATA boxu. GC boxy tak slúžia ako väzobné domény pre transkripčný faktor Sp1 (Eguchi *et al.*, 1994).

### 3.2 Štruktúra AhR

Funkčnosť AhR je odvodená najmä od jeho štruktúry, ktorú tvoria viaceré domény, rovnako ako u väčšiny jadrových receptorov (Obr. 1). Receptor pozostáva z basic helix-loop-helix domény (bHLH), obsahuje dve PAS domény a transkripčnú aktivačnú doménu označovanú aj ako TAD (transcriptional activation domain). N-koniec bHLH domény je potrebný pri väzbe na DNA a je označovaný aj ako DNA viažuca doména DBD (DNA-binding domain). Ďalej je táto časť proteínu zodpovedná za väzbu s heat shock proteínom 90 (Hsp90) a dimerizáciu s AhR jadrovým translokátorom ARNT (Ashida *et al.*, 2008). PAS A doména sa účastní pri väzbe s ARNT, zatiaľ čo PAS B doména nesie ligand viažucu doménu LBD (ligand-binding domain), ale je potrebná aj pri interakcii s AhR-interagujúcim proteínom AIP (AhR-interacting protein) a Hsp90. C-koniec receptora je charakterizovaný ako TAD (Abel a Haarmann-Stemmann, 2010).



**Obrázok 1:** Štruktúra aryl uhl'ovodíkového receptora (upravené podľa Zhu *et al.*, 2019)

### 3.3 Ligandy AhR

Ako prvé ligandy aryl uhl'ovodíkového receptora boli identifikované syntetické látky aromatického charakteru. Do tejto skupiny spadajú halogénované aromatické uhl'ovodíky (HAH), polychlórované bifenyly (PCB), polychlórované dibenzo-p-dioxíny (PCDD) a polycyklické aromatické uhl'ovodíky (PAH). Tieto skupiny zahŕňajú látky ako napríklad benzo[a]pyrén (BaP), 2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxín (TCDD), 3-metylcholantrén (3-MC) alebo 2,3,7,8-tetrachlórdibenzofurán (TCDF) (Denison *et al.*, 1988). Bežne sa nachádzajú vo vzduchu alebo v potrave, sú veľmi stabilné a niektoré sa

môžu akumulovať v organizme (napríklad TCDD). Dioxíny a PCB sú ľahko rozpustné v tukoch a tým pádom môžu dosiahnuť vysoké koncentrácie v mastných jedlách, ako sú napríklad mliečne produkty, ryby, mäso a morské plody (Larigot *et al.*, 2018).

Ďalšou skupinou xenobiotík predstavujúcou ligandy AhR sú liečivá. Ide najmä o látky leflunomid, ktorý sa používa pri liečbe reumatoidnej artritídy, flutamid, nimodipín, využívaný ako blokátor vápenatých kanálov, ďalej mexiletín, účinný pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení, a napokon omeprazol, ktorý sa používa pri gastrointestinálnych ťažkostiach (Jin *et al.*, 2012).

Ako AhR ligandy sú taktiež známe aj rôzne prírodné zlúčeniny. Medzi tieto patria flavonoidy ako napríklad kvercetín alebo revestradol, ktoré spadajú do triedy polyfenolov a bežne sa nachádzajú v ovocí a zelenine. Obe látky môžu vykazovať agonistické ale aj antagonistické účinky na AhR (Guyot *et al.*, 2013). Ďalšiu skupinu AhR ligandov tvoria indoly. Jedným z predstaviteľov je indol-3-carbinol (I3C). Tieto látky sa prirodzene vyskytujú v zelenine ako napríklad brokolica alebo ružičkový kel a majú protinádorové účinky, pričom najmä v prípade I3C je časť týchto efektov sprostredkovaná pomocou aktivácie AhR (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998). K derivátom indolu môžeme zaradiť aj skupinu látok, ktoré vznikajú ako výsledok metabolizmu tryptofánu črevnou mikrobiotou. Jedná sa o zlúčeniny tryptamín, indol (Hubbard *et al.*, 2015), skatol (Štěpánková *et al.*, 2018), ale patria sem aj iné deriváty indolu ako napríklad indol-3-acetamid, indol-3-pyruvát, indol-3-akrylát a indol-3-etanol (Vyhlídalová *et al.*, 2020).

Ako endogénne ligandy aryl uhl'ovodíkového receptora boli identifikované látky ako napríklad metabolity indolových zlúčenín, medzi ktoré patria okrem iného tryptofán, tryptamín alebo kyselina indol-3-octová. Indirubín a indigo prezentujú ďalšiu skupinu indolov, ktoré sú za normálnych fyziologických podmienok detekovateľné v ľudskom moči, z čoho vyplýva, že sa bežne nachádzajú v ľudskom organizme a sú silnými agonistami AhR (Adachi *et al.*, 2001). Ďalšie endogénne ligandy sú metabolity vznikajúce endogénnym metabolizmom. Ide o zlúčeniny formyindolo[3,2-b]karbazol (FICZ), metabolity kyseliny arachidonovej (lipoxín A4, niektoré prostaglandíny) metabolity kynurenínovej dráhy, tetrapyroly (bilirubín), hem a biliverdín (Seidel *et al.*, 2001; Sinal a Bend, 1997).

### 3.4 Toxicita AhR ligandov

Dioxíny a PCB sú považované za najtoxickejšie ligandy aryl uhl'ovodíkového

receptoru. Hlavný predstaviteľ dioxínov, TCDD, vzniká pri bieliacich procesoch s použitím chlóru v rôznych priemyselných odvetviach. Avšak vedľajšie produkty spaľovania sú taktiež významným zdrojom TCDD. PCB boli naopak celosvetovo komerčne produkované a ich využitie spočívalo najmä v priemyselných odvetviach pri výrobe transformátorov, kondenzátorov, ale používali sa aj pri výrobe pesticídov, adhezív a farbív.

Viac ako 90% expozície týmito toxikantmi tvorí kontaminované jedlo. Akútnej expozícii vo vysokých dávkach sú vystavení najmä priemyselní pracovníci, kedy, v prípade TCDD, môžu vzniknúť kožné lézie (ako napríklad chlorakné), porfýria alebo môže dôjsť aj k prechodnej hepatotoxicite, periférnej a centrálnej neurotoxicite (Geusau *et al.*, 2001). Chronická expozícia vedie k rozsiahlejším toxickým efektom, ktorými sú napríklad imunotoxicita, vývojové abnormality, dysfunkcia štítnej žľazy, disrupcia steroidných hormónov a negatívny dopad na reprodukciu (Larigot *et al.*, 2018).

Experimenty na zvieratách preukázali taktiež karcinogenitu, ktorá bola dokázaná u pomerne veľkého množstva rôznych druhov. Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (IARC) klasifikovala TCDD ako karcinogén kategórie 1 a PCB ako karcinogény kategórie 2A (pravdepodobná karcinogenita u človeka).

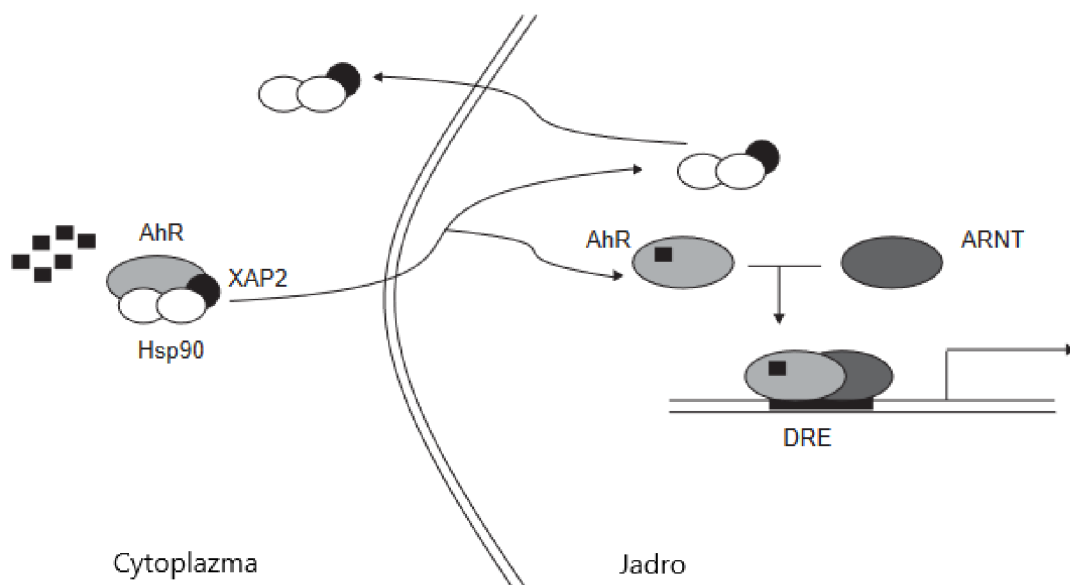
### **3.5 Aktivácia AhR**

Inaktívny aryl uhľovodíkový receptor sa nachádza v cytoplazme vo väzbe s proteínovým komplexom, ktorý sa skladá z diméru 90 kDa heat shock proteínu (Hsp90), AhR-interagujúceho proteínu AIP, tiež známeho ako XAP2, ko-chaperónu p23 a proteínkinázy SRC. Tento chaperónový komplex zaisťuje správne skladanie AhR, zabraňuje jeho degradácii v proteazóme a takisto ho udržuje vo vysoko afinitnom stave k ligandom (Rothhammer a Quintana, 2019).

Jedna z Hsp90 molekúl sa viaže do PAS B oblasti a druhá molekula interaguje s bHLH doménou, ktoré sú zodpovedné za väzbu na DNA a väzbu k ligandu (Kudo *et al.*, 2018). AIP sa podieľa na skladaní a stabilizácii AhR proteínu, posilňuje jeho cytoplazmatickú lokalizáciu, tým že inhibuje interakciu AhR komplexu s importínom  $\beta$ , ktorý je zodpovedný za jeho transport do jadra (Ramadoss *et al.*, 2004). AIP priamo interaguje s Hsp90 a receptorom, taktiež sa ale javí aj ako transkripčný zosilňovač AhR aktivácie. Ko-chaperón p23 chráni AhR pred ubikvitináciou a degradáciou v proteazóme. Rovnako ako AIP, aj p23 posilňuje cytoplazmatickú lokalizáciu inaktívneho receptora (Kudo *et al.*, 2018). Proteínkináza SRC je potrebná k iniciácii

AhR aktivácie prostredníctvom väzby ligandu, ale taktiež sa zúčastňuje pri nekanonických mechanizmoch AhR signalizácie (Hwang *et al.*, 2013).

Po väzbe agonistu, dochádza k disociácii AIP (XAP2) z komplexu, čoho výsledkom je expozícia jadrového lokalizačného signálu. Komplex AHR-ligand je následne transportovaný do jadra (Obr. 2). Tento proces je sprostredkovaný pomocou transportín a importín  $\beta$ -dependentných dráh (Ikuta *et al.*, 2000). Zaujímavosťou je, že interakcia AhR komplexu s importínom  $\beta$  je inhibovaná fosforyláciou cieľových miest AhR pomocou proteínkinázy C, čím nedochádza k transportu do jadra. Tento proces je charakterizovaný ako jeden z regulačných mechanizmov AhR signalizácie (Ikuta *et al.*, 2004).



**Obrázok 2:** Schéma signalizačnej dráhy AhR (upravené podľa Ramadoss *et al.*, 2005)

Po translokácii do jadra AhR tvorí heterodimér s ARNT (tiež známy ako HIF1 $\beta$ ) a celý tento komplex sa viaže do oblasti DNA označovanej ako xenobiotický responzívny element (XRE), ale je možné sa stretnúť aj s označením dioxínový responzívny element (DRE; Obr. 2). AhR represor (AhRR) súťaží s komplexom AhR-ligand o jeho interakciu s ARNT v rámci procesu negatívnej regulácie expresie génov (Sakurai *et al.*, 2017).

Po iniciácii expresie cieľových génov je AhR exportovaný z jadra a podlieha degradácii v proteazóme (Davarinós a Pollenz, 1999). Degradácia je iniciovaná kovalentnou väzbou ubiquitínu. Sú však známe aj ďalšie posttranslačné modifikácie a

jednou z nich je SUMOylácia. Tento proces zvyšuje stabilitu receptora, tým že inhibuje ubikvitináciu, čo však môže následne znižovať jeho transaktivačnú aktivitu (Xing *et al.*, 2012).

Rôzne ligandy môžu aktivovať odlišné skupiny cieľových génov AhR. Bolo dokázané, že v ľudskej bunkovej línii odvodenej od karcinómu pečene revestradol príliš neovplyvňuje expresiu CYP1A1, avšak výrazne aktivuje expresiu génu pre enzým paraoxonáza 1 (PON1), ktorý sa môže podieľať na detoxikácii oxidovaných lipidov. To by vysvetľovalo prospešné účinky revestradolu pri kardiovaskulárnych ochoreniach (Gouédard *et al.*, 2004). Keďže TCDD neovplyvňuje expresiu PON1, je možné sa domnievať, že rôzne ligandy aktivujú rozdielne skupiny génov.

### **3.6 Koaktivátory a korepresory AhR**

Komplex AhR-ARNT indukuje transkripciu cieľových génov v spolupráci s rôznymi koaktivátormi, ktoré sú potrebné na aktiváciu transkripcie určitého génu. Ich funkcia spočíva v remodelácii, preskupovaní a disociácii nukleozómov, čím znižujú ich represný efekt na transkripciu (Goll a Bestor, 2002). Medzi koaktivátory patrí napríklad CBP/p300 (cAMP response element-binding protein), SRC-1 (steroid receptor coactivator 1), p160/bHLH-PAS, NCoA2 (nuclear receptor coactivator 2), GRIP1 (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1), TIF2 (Transcriptional Intermediate Factor 2), p/CIP (p300/CBP/CoIntegrator-associated Protein), ATP-dependentné chromatin remodelujúce komponenty (ATP-dependent chromatin remodeling components), medzi ktoré patrí napríklad BRG-1 (Brahma Related Gene; Beischlag *et al.*, 2002).

Jedným z kľúčových génov aktivovaných samotným AhR je AhR represor (AhRR). Tento proteín je štrukturálne veľmi podobný AhR, ale nedokáže viazať ligandy kvôli absencii PAS B domény na N-terminálnom konci (Baba *et al.*, 2001). Ďalšou štrukturálnou odlišnosťou je C-terminálna doména, ktorá u AhR a ARNT slúži ako transaktivačná doména, u AhRR sa jedná o transrepresnú doménu. Táto oblasť umožňuje väzbu korepresorov, ktoré negatívne regulujú aktivitu AhR a patria medzi ne napríklad ANKRA2, HDAC4 a HDAC5 (Oshima *et al.*, 2007). AhRR ďalej znižuje aktivitu receptora väzbou na ARNT a XRE (Hahn *et al.*, 2009). Tento regulačný proces a proteazomálna degradácia AhR chráni biologické systémy pred následkami nadmernej stimulácie agonistami a zaisťuje kontrolu signalizácie.

### 3.7 Gény regulované AhR

Metabolizmus xenobiotík je sprostredkovaný enzýmami fázy I a II. Ich transport je zaistený enzýmami fázy III, alebo transportérmi. Enzýmy fázy I predstavuje najmä superrodina cytochrómov P450, ktoré katalyzujú reakcie ako napríklad oxidácia, redukcia, dealkylácia a desulfurácia, zatiaľ čo enzýmy fázy II sú zodpovedné za konjugáciu s endogénnym substrátom, čo zvyšuje hydrofilitu metabolitov. Následne dochádza k vylúčeniu pomocou transportérov fázy III (Ashida *et al.*, 2008).

U človeka je superrodina CYP klasifikovaná do jednotlivých rodín označovaných CYP1 až CYP5. Avšak enzýmy, ktoré sú zodpovedné za metabolizmus xenobiotík patria do rodín CYP1, 2, 3 a 4. Expresia vybraných enzýmov rodiny CYP1 je regulovaná práve aryl uhl'ovodíkovým receptorom. Týka sa to najmä enzýmov CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Úroveň expsie CYP1A1 je vyššia v pľúcach, zatiaľ čo CYP1A2 sa nachádza najmä v pečeni. Substráty CYP1A1 a CYP1A2 sú napríklad BaP a heterocyklické amíny. Ich metabolizmom však dochádza k vzniku reaktívnych medziproduktov, ktoré majú karcinogénne účinky (Talaska *et al.*, 2006). CYP1A2 taktiež metabolizuje zlúčeniny zahŕňajúce kofeín, teofylín a fenacetín (Murray *et al.*, 2001). CYP1B1 je exprimovaný najmä v bunkách obličiek, maternice a prostaty. Konvertuje chemické karcinogény do ich aktívnej formy. AhR reguluje expresiu aj aldehyddehydrogenázy 3, ktorá katalyzuje oxidáciu aldehydov na karboxylové kyseliny (Vasiliou *et al.*, 1999).

Medzi enzýmy fázy II regulované AhR patria UDP-glukoronosyl transferázy, označované ako UGT, a glutathion-S-transferázy (GST). V prípade UGT ide najmä o enzýmy UGT1A1, UGT1A4 a UGT1A6. Bežne sú exprimované v bunkách pečene, obličiek, v bunkách tenkého a hrubého čreva, v pľúcach a mozgu. Expresia týchto enzýmov je indukovaná polycyklickými aromatickými uhl'ovodíkmi a halogénovanými aromatickými uhl'ovodíkmi (Erichsen *et al.*, 2008). Mechanizmus účinku UGT enzýmov spočíva v konjugácii xenobiotika s UDP-glukoronovou kyselinou.

Ďalšou skupinou enzýmov sú glutathion-S-transferázy. AhR reguluje expresiu GSTA1 a GSTA2. Glutathionové reakcie výrazne zvyšujú rozpustnosť xenobiotík, čo uľahčuje ich následnú elimináciu. Enzýmy fázy II sú však regulované aj inými receptormi ako napríklad PXR alebo PPAR (Xu *et al.*, 2005).

Keďže metabolity II. fázy biotransformácie sú hydrofilné, nemôžu byť pasívne transportované z bunky. Na elimináciu xenobiotík sú potrebné transportéry fázy III. AhR reguluje expresiu MDR1 (multi-drug resistance 1), proteínov MRP (multi-drug

resistance-associated proteins), BCRP (breast cancer resistance protein) a OATP (organic anion-transporting polypeptide) (Jigorel *et al.*, 2006)

Okrem enzýmov metabolizmu xenobiotík ovplyvňuje AhR expresiu rôznych ďalších enzýmov a proteínov. Jedným z nich je NAD(P)H chinón oxidoreduktáza 1 (NQO1), ktorá zohráva dôležitú úlohu pri bunkovej adaptácii na stres (Ross a Siegel, 2017). Ďalej ide o už spomenutý AhR represor, cyklooxygenázu 2 (COX2), syntázu kyseliny aminolevulínovej a inhibitor cyklín-dependentnej kinázy p27kip (Beischlag *et al.*, 2008).

### 3.8 Nekanonické signalizačné dráhy AhR

Aryl uhl'ovodíkový receptor môže regulovať génovú expresiu aj pomocou mechanizmov, ktoré nie sú podmienené priamou väzbou AhR na XRE. Takéto regulačné dráhy sú označované ako nekanonické. Príkladom je interakcia AhR s estrogénovým receptorom (ER), čoho výsledkom je vznik komplexu AhR-ER a jeho väzba na estrogénový responzívny element DNA. K tomuto javu môže dochádzať v prípade neprítomnosti ER ligandov (Ohtake *et al.*, 2003). Podobná interakcia bola pozorovaná aj v prípade retinoblastómového proteínu (pRB), kedy môže dôjsť k nahradeniu receptoru kyseliny retinovej (RAR) v aktívnom komplexe aryl uhl'ovodíkovým receptorom (Hankinson, 2005). Tieto mechanizmy sú výsledkom interakcie AhR s KLF6 (Krüppel-like factor 6), ktorý sprostredkováva väzbu AhR na DNA sekvencie iné než XRE, ktoré sú zároveň rozpoznávané KLF6 (Wilson *et al.*, 2013). Okrem spomenutých príkladov, bola zistená interakcia AhR s glukokortikoidným receptorom GR. Ligandy AhR, ako napríklad BaP a IND (indeno[1,2,3-cd]pyrén) samé o sebe neaktivujú GR, ale majú synergické účinky v prípade aktivácie GR dexametazónom. Dexametazón opäť neaktivuje AhR, avšak má supresné účinky na transaktiváciu AhR prostredníctvom PAH. Z toho vyplýva, že aktivovaný aryl uhl'ovodíkový receptor a GR vytvárajú komplex a dochádza k vzájomnému crosstalku (Wang *et al.*, 2009).

Ďalším významným faktom je, že AhR sa môže zapájať do ubikvitinácie v komplexe s E3 ubikvitín ligázou, čím indukuje proteazomálnu degradáciu cieľových proteínov. Konkrétne, komplex AhR-ligand asociuje s komplexom cullin 4B ubikvitín ligázou (CUL4B), čo dáva vzniku CUL4B-AhR komplexu, ktorý určuje k degradácii ER (Ohtake *et al.*, 2007). Podobné mechanizmy kontrolujú degradáciu aj iných transkripčných faktorov, ako sú napríklad p53, MYC, FOS, OCT4 a HIF1 $\alpha$  (Mejia-

Garcia *et al.*, 2015). Je však nutné poznamenať, že aktivita E3 ubikvitín ligázy súťaží s transkripčnou aktivitou AhR, čo závisí na dostupnosti a funkčnosti ARNT. To znamená, že keď je úroveň ARNT nízka, alebo dochádza k jeho inhibícii, aktivita AhR ako E3 ubikvitín ligázy sa zvyšuje (Luecke-Johansson *et al.*, 2017). Ďalšími transkripčnými faktormi kontrolovanými AhR sú NF $\kappa$ B a STAT proteíny, ktoré hrajú dôležitú úlohu v regulácii imunitných odpovedí organizmu (Vogel *et al.*, 2014). AhR taktiež interaguje s Wnt/ $\beta$ -katenínom a výrazne moduluje jeho aktivitu. Na druhej strane, tieto transkripčné faktory taktiež ovplyvňujú AhR signalizáciu. Napríklad  $\beta$ -katenín pôsobí ako koaktivátor tohto receptora (Vaas *et al.*, 2014).

Bolo zistené, že po expozícii TCDD prudko vzrastá intracelulárna koncentrácia vápnika, ktorý sa uvoľňuje nie len z endoplazmatického retikula, ale prechádza do bunky aj z extracelulárneho prostredia. Pôsobenie TCDD taktiež vedie k aktivácii proteínkinázy SRC, tým že ju uvoľní z AhR komplexu (Tomkiewicz *et al.*, 2013). Tieto procesy môžu byť sprevádzané aktiváciou fokálnej adhéznej kinázy (FAK) a následnou modifikáciou adhézných vlastností buniek (Diry *et al.*, 2006). Aktivácia SRC môže mať taktiež za následok fosforyláciu MAP kináz, ERK1 a ERK2. Všetky tieto procesy môžu ovplyvňovať reguláciu patofyziologických procesov, ako je napríklad zápal (Larigot *et al.*, 2018).

AhR-indukovaný nárast koncentrácie vápnika, okrem iného, spôsobuje aktiváciu proteínkinázy C, ktorá fosforyluje serínové zvyšky cytosolických enzýmov a fosfolipázu A2, čoho výsledkom je produkcia kyseliny arachidonovej. Paralelná aktivácia MAP kináz vedie k transkripcii cyklooxygenázy 2 (COX2). COX2 využíva kyselinu arachidonovú na produkciu prostaglandínov, ktoré sú zodpovedné za zápalové reakcie (Matsumura, 2009).

V neposlednom rade sa môže AhR podieľať na interakciách s transkripčnými a epigenetickými regulátormi, ktoré majú vplyv na celý genóm. Medzi tieto patria positive transcription elongation factor (P-TEFb), SWI/SNF chromatín remodelujúci komplex a transkripčný aktivátor BRG1, tiež známy ako SMARCA4 (Wang *et al.*, 2004). Ďalšou významnou úlohou AhR je kontrola dlhých nekódujúcich RNA, mikroRNA, retrotranspozónov, rôznych represných mechanizmov a kontrola acetylácie a metylácie histónov. Tieto procesy však ešte nie sú dostatočne preskúmané a vyžadujú si podrobnejšie štúdium (Liu *et al.*, 2018).



### 3.9 Ďalšie funkcie AhR

Najpodstatnejšou úlohou aryl uhl'ovodíkového receptora je sprostredkovanie náležitej odpovede na prítomnosť xenobiotík tým, že je indukovaný ich metabolizmus a eliminácia prostredníctvom syntézy enzýmov I., II. a III. fázy biotransformácie. Tento proces slúži k ochrane organizmu pred xenobiotikami po ich expozícii. Okrem tejto schopnosti sa však AhR účastní mnohých iných bunkových procesov.

#### 3.9.1 Proliferácia buniek

Jedným z mimoriadnych aspektov AhR biológie je jeho schopnosť iniciovať alebo inhibovať bunkovú proliferáciu. Napríklad u myši, v ktorých bola pomocou genetickej modifikácie deaktivovaná expresia AhR génu (AhR knock-out, AhR KO), embryonálne fibroblasty preukázali menší rast a akumuláciu v G2/M fáze bunkového cyklu (Elizondo *et al.*, 2000).

V ľudskej bunkovej línii odvodenej od karcinómu pečene (HepG2) komplex AhR-siRNA znižuje hladinu cyklínu D1 a E, rovnako ako množstvo CDK2/4 cyklín-dependentných kináz, čo má za následok inhibíciu prechodu z G1 do S fázy bunkového cyklu. Tento proces podporuje pre-proliferáciu úlohu receptora (Abdelrahim *et al.*, 2003).

TCDD môže taktiež ovplyvňovať expresiu génov, ktoré sa podieľajú na regulácii bunkového cyklu (JunB a JunD; Weiss *et al.*, 2008) alebo sú zapojené do bunkovej proliferácie (TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , PAI-2) v súvislosti so zápalovými procesmi (Kim *et al.*, 2012).

V ľudskej línii odvodenej od rakoviny prsníka (MCF-7) AhR fyzicky interaguje s NF- $\kappa$ B cez jeho podjednotku RelA (Tian *et al.*, 1999), čoho výsledkom je transaktivácia c-myc protonkogénu. V závislosti na bunkovom cykle, je spúšťaná expresia JunD a následne cyklínu A za účasti TCDD-aktivovaného AhR prostredníctvom ARNT-independentnej dráhy. Cyklín A je dôležitý pri blokovaní inhibície bunkového kontaktu a podpore proliferácie (Weiss *et al.*, 2008).

Avšak bolo taktiež zistené, že AhR môže mať aj anti-proliferatívne účinky, a to prostredníctvom stimulácie transkripcie génu nádorového supresoru p27Kip1, ktorý bol exprimovaný v neproliferujúcich pečenejších bunkách alebo vo fetálnom týmuse (Puga *et al.*, 2000).

Aryl uhl'ovodíkový receptor zároveň reguluje funkciu pre-proliferatívneho faktoru E2F. E2F faktory môžu byť inhibované priamou interakciou s pRb a ich funkcia

taktiež závisí na prítomnosti koaktivátorov p300. AhR ich ovplyvňuje tromi možnými mechanizmami. Prvú možnosť predstavuje sprostredkovanie fyzickej interakcie medzi AhR a pRB pomocou TCDD, čoho výsledkom je väzba tohto komplexu na E2F a zastavenie bunkového cyklu (Huang a Elferink, 2005). Ďalej môže TCDD stimulovať interakciu medzi AhR a p300, čo vedie k disociácii p300 od E2F (Marlowe *et al.*, 2004). Posledným mechanizmom je priama inhibičná interakcia medzi AhR a E2F, čo môže mať potenciálne negatívne dôsledky na obnovu kmeňových buniek (Laiosia *et al.*, 2016).

Celkovo je však vplyv AhR aktivity na bunkovú proliferáciu závislý na bunkovom type, fáze bunkového cyklu a na vývojovom štádiu. Receptor vykazuje tumor supresorovú aktivitu v črevných bunkách a adenómoch hypofýzy, zatiaľ čo v karcinómoch hlavy, krku a pľúc sa správa ako promótor tumorigenézy (Chang *et al.*, 2007).

### **3.9.2 Adhézia a migrácia buniek**

Aryl uhl'ovodíkový receptor okrem už spomínaných javov ovplyvňuje aj adhézne procesy, čo zahŕňa interakcie medzi jednotlivými bunkami a interakcie s extracelulárnou matrix. Bunková hustota taktiež zohráva dôležitú úlohu pri kompartmentalizácii AhR a nízka hustota vedie k nukleárnej lokalizácii receptora (Ikuta *et al.*, 2004). Tieto interakcie sú veľmi dôležité pri metastatických procesoch.

AhR KO modely potvrdzujú vplyv AhR na bunkovú migráciu. Imortalizovaná bunková línia prsných fibroblastov, izolovaná z AhR KO myši, vykazovala nižšiu migráciu. Tento proces súvisí so zvýšenou formáciou cytoskeletárnych vlákien a zníženou tvorbou lamelipodii (Mulero-Navarro *et al.*, 2005). Taktiež bola pozorovaná inhibícia signálnych dráh, čo viedlo k slabšej aktivácii FAK, proteínkinázy B (PKB/Akt), ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) a Rac-1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1).

Zahrnutie AhR do bunkovej mobility a plasticity bolo taktiež dokázané v štúdiách založených na pôsobení xenobiotík. Expozícia TCDD ľudskými MCF-7 alebo HepG2 bunkami, spôsobilo morfologické zmeny, ako napríklad vzhľad lamelipodia, čo zapríčinilo väčšiu bunkovú adhéziu a motilitu. Tento proces je asociovaný s reorganizáciou cytoskeletu, hlavne redistribúciou aktínu a vinculinu a aktiváciou FAK a SRC kináz (Diry *et al.*, 2006).

### 3.9.3 Imunita a zápalové procesy

AhR je zapojený do mnohých imunitných a zápalových procesov, ako sú napríklad kardiovaskulárne ochorenia (Yi *et al.*, 2018), skleróza multiplex (Zorlu *et al.*, 2019), reumatoidná artritída, depresie, obezita (Chaves *et al.*, 2018) a alergické reakcie. Okrem iného zohráva AhR významnú úlohu v kontrole adaptívnej imunity, tým že moduluje diferenciáciu T-lymfocytov a pôsobí na antigén prezentujúce bunky, ktoré sú častým prvotným cieľom environmentálnych, ale aj endogénnych ligandov AhR. U myši s deléciou AhR v dendrických bunkách bola zistená zmenená intestinálna morfogénéza, čím dochádzalo k zníženej diferenciácii Panethových buniek, čo viedlo k dysfunkcii epiteliálnej bariéry (Rothhammer *et al.*, 2019). Ďalšou významnou úlohou AhR je jeho ochranná funkcia v zápalových ochoreniach čriev, ako je napríklad Krohnova choroba alebo ulcerózna kolitída, ktoré sú asociované s intestinálnou imunodeficienciou (Monteleone *et al.*, 2011).

V neskorších výskumoch bolo pozorované, že u myši s indukovanou kolitídou, FICZ negatívne ovplyvňuje funkciu črevnej mukóznej bariéry, tým že aktivuje AhR, čo vedie k supresii expresie IL-6 a kladínu 2 (Ma *et al.*, 2018). Kladín 2 je kľúčový regulátor transportu vody v proximálnych tubuloch obličiek a v črevných bunkách. Narušenie jeho expresie vedie k rôznym patologickým stavom, ako je napríklad zápal, fibróza alebo dokonca karcinogénéza (Venugopal *et al.*, 2019).

### 3.9.4 Vývin organizmu

Úlohy aryl uhľovodíkového receptora vo vývinových procesoch boli stanovené najmä na AhR KO modeloch, ktoré predstavujú hlavne myši. Bolo pozorované, že AhR KO myš vykazuje vývinové abnormality, ktoré potvrdzujú úlohu receptora v samičej fertilitate (Abbott *et al.*, 1999), perinatálnom raste (Mimura *et al.*, 1999), regulácii krvného tlaku a produkcii periférnych lymfocytov (Lahvis a Bradfield, 1998). Taktiež bola u tohto modelu zistená zvýšená náchylnosť ku vzniku kolitídy (Wang *et al.*, 2018).

U AhR KO myši sa ďalej vyvinuli poruchy ako napríklad srdcová hypertrofia (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997), kožné lézie, tvorba obličkových kameňov, portálna vaskulárna hypertrofia (Schmidt *et al.*, 1996) a pylorická hyperplázia (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997). Myši taktiež vykazovali systematickú perzistenciu *ductus venosus*, ktorá sa bežne po narodení uzatvára a po dvoch mesiacoch atrofuje (Lahvis *et al.*, 2005). Táto abnormalita vedie k zmenšeniu pečene, zlúčenej s portálnou fibrózou a zvýšenou akumuláciou lipidov (Lee *et al.*, 2010).

V AhR KO myšiach môže taktiež dochádzať k defektom oka, kedy ide primárne o horizontálny pendulárny nystagmus, ktorý je asociovaný s defektmi ukladania myelínu na optickom nerve a so zápalom (Juricek *et al.*, 2017). Podobné defekty myelínu boli taktiež identifikované v periférnom nervovom systéme (Shackleford *et al.*, 2018).

Napriek týmto poznatkom je nutné si uvedomiť odlišnosti medzi jednotlivými druhmi cicavcov. AhR KO fenotypy sú druhovo špecifické a fyziologické nálezy identifikované u myši, nemusia byť nutne prítomné aj u iných modelov.

### **3.10 Reportérové bunkové systémy**

Z dôvodu nadmernej produkcie a akumulácie PAHs a halogénovaných uhl'ovodíkov v prírode, dochádza k ohrozeniu zdravia človeka a ostatných živočíšnych druhov. Tieto kontaminanty, medzi ktoré spadajú dioxíny, furány, PCB a podobné zlúčeniny, sú označované ako perzistentné organické zlúčeniny (POP) podľa Štokholmského dohovoru o perzistentných organických látkach (Porta a Zumeta, 2002). Z dôvodu už spomenutých toxických účinkov týchto zlúčenín je potrebná presná detekcia týchto toxikantov v prírode.

Environmentálne polutanty, ako napríklad TCDD, sa bežne nachádzajú v nízkych koncentráciách od pár femtogramov na gram v pôdnych vzorkách, po pár nanogramov na liter v kvapalných vzorkách. Chemická analýza je spravidla veľmi precízna a citlivá, avšak napriek moderným technikách je finančne a časovo náročná. Okrem iného, chemická analýza nedokáže poskytnúť informácie o biologickej odozve toxikantov, čo sa týka pôsobenia buď iba jednej látky samostatne, alebo kombinácie viacerých látok, ktoré môžu vzájomne interagovať a spôsobovať komplexnú odozvu organizmu (Mascarelli, 2012). V záujme predísť týmto komplikáciám sa na detekciu začali využívať tzv. bioeseje, ktoré sú založené na kvantifikácii schopnosti určitých látok aktivovať aryl uhl'ovodíkový receptor.

V 80. rokoch 20. storočia boli vytvorené nové generácie reportérových bunkových línií, ktoré vykazovali prirodzene vysokú expresiu AhR. Princíp ich fungovania bol založený na aktivácii reportérového konštruktú, ktorý bol do ľudských rakovinových buniek vnesený pomocou vektoru. Vektor niesol reportérový gén, najčastejšie gén pre luciférazu, ktorého expresia bola regulovaná špecifickými AhR responzívnymi elementami. V prvých reportérových líniách bola expresia luciferázy kontrolovaná štyrmi kópiami XRE z promótoru CYP1A1 génu a takýto systém

dovoľoval detekciu TCDD už v koncentrácií od 0,1 pM (Garrison *et al.*, 1996). Tieto línie sú označené ako tzv. CALUX bioeseje a využívajú chemicky aktivovanú luciferázovú expresiu. Ide o rekombinantné bunkové línie, obsahujúce stabilne transfekovaný gén pre luciferázu, ktorého expresia je responzívna voči určitému toxikantu (napríklad dioxín-responzívna luciferáza). Pôsobenie TCDD alebo iných ligandov AhR na túto bioesej vedie k indukcii expsie luciferázy, ktorej intenzita priamo koreluje s celkovou koncentráciou AhR agonistov vo vzorke (Otarola *et al.*, 2017).

Zatiaľ čo CALUX bioeseje sú neustále predmetom záujmu, boli vyvinuté aj ďalšie línie založené na rovnakom princípe, ale využívajúce iné detekčné faktory. Bioesej CAFLUX bola vytvorená nahradením luciferázového génu génom GFP (green fluorescent protein) a umožňovala analýzu v živých bunkách (Nagy *et al.*, 2002). SEAP bioeseje sú zase založené na sekrécii alkalickéj fosfatázy, ktorá zohráva úlohu reportérového génu. Fast-track metóda umožňovala detekciu nanomolárneho množstva TCDD v časovom intervale dvoch hodín, ak bola vzorka nanosená hneď po vysadení buniek (Kasai *et al.*, 2005). Napokon, dnes často využívanou bioesejou je DR-EcoScreen, ktorá je založená na aktivácii siedmych XRE, čo vedie k zvýšenej senzitivite reportérového systému (Kojima *et al.*, 2015).

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

Nová reportérová línia LS174T-AhR-luc, ktorá bola pripravená stabilnou transfekciou bunkovej línie odvodenej od ľudského adenokarcinómu hrubého čreva LS174T (kat. č. ECACC 87060401), pomocou reportérového plazmidu pGL-4.27-DRE (Novotná *et al.*, 2011).

### 4.2 Použité chemikálie a roztoky

- kultivačné médium DMEM-FBS: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540), 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS; Fetal Bovine Serum) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, kat. č. 11140-035)
- kultivačné médium DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, kat. č. D6546) s prídavkom 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  antibiotika hygromycínu B (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-29067), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, kat. č. G8540), 50 ml fetálneho bovinného séra (FBS; Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, kat. č. F6178) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, kat. č. 11140-035)
- 0,25% trypsín-EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. T4049)
- 0,04% roztok trypanovej modrej v  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, kat. č. T6146)
- fosfátový pufo (PBS, Gibco, kat. č. 10010031)
- oktylfenol etoxylát (Triton X-100, Serva, kat. č. 37240)
- dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, kat. č. D8418)
- metyltetrazóliová soľ (MTT, Sigma-Aldrich, kat. č. M2128)
- lyzačný pufo (Promega, kat. č. E3971)
- substrát pre luciferázu: 5 mg D-luciferín (Sigma-Aldrich, kat. č. L9504), 9,6 mg adenzín-5'-trifosfát (ATP, Sigma-Aldrich, kat. č. A6419), 6,83 mg koenzým A (CoA, Sigma-Aldrich, kat. č. C4282), 168 mg dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, kat. č. 43819), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufo 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, kat. č. T8280), 1,23 mg kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA, Sigma-Aldrich, kat. č. E6511), 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, kat. č. M5921) doplnené do 30 ml destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$

- Ligandy AhR: 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxín (TCDD, Ultra Scientific), 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ, Sigma-Aldrich, kat. č. SML1489)
- Ligandy vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny: rifampicín (RIF, Sigma-Aldrich, kat. č. R3501), trijódtyronín (T3, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-231968), vitamín D3 (VD3, Sigma-Aldrich, kat. č. PHR1237), kyselina all-trans retinová (all-trans RA, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-200898), kyselina 9-cis retinová (9-cis RA, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-205589), aldosterón (ALD, Sigma-Aldrich, kat. č. A9477), dexametazón (DEX, Sigma-Aldrich, kat. č. D1756), estradiol (EST, Sigma-Aldrich, kat. č. E1024), progesterón (PROG, Sigma-Aldrich, kat. č. P0130), testosterón (TEST, Sigma-Aldrich, kat. č. T1500)
- Inhibítor AhR: 1-Methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH-223191, Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-293991)

#### 4.3 Laboratórne pomôcky

- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 30 – 300 µl (Eppendorf)
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
- pipetor FastPette (Labnet)
- sterilné plastové pipety s objemami 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- plastové kultivačné fľaše (TPP)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- 96 jamková biela doštička na meranie luminiscencie (NUNC)
- Petriho misky (TPP)
- mikroskúmavky s objemami 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- plastové skúmavky s objemami 15 ml, 50 ml a 60 ml (TPP)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky
- buničina (Tork)

#### **4.4 Prístroje**

- laminárny box Labculture (ESCO)
- inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm)
- svetelný mikroskop (Novel Optics)
- inverzný mikroskop IX73 (Olympus)
- vortex Reax top (Heidolph)
- zariadenie na meranie luminiscencie Infinite 200 (Tecan)
- skriňový mraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- trepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- aspirátor FTA-1 (Biosan)
- vodný kúpeľ LCB 22D (Daihan Labtech)

#### **4.5 Použité metódy**

##### **4.5.1 Kultivácia a pasážovanie buniek**

Kultivácia buniek LS174T-AhR-luc prebiehala v sterilnom prostredí pri teplote 37 °C, v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95%. Bunky sa nachádzali v plastovej kultivačnej fľaši v DMEM-FBS kultivačnom médiu. Pred pasážovaním buniek boli kultivačné médium, fosfátový pufr (PBS) a 0,25% trypsín-EDTA ohriate na teplotu 37 °C vo vodnom kúpeli. Kultivačná fľaša obsahujúca bunky bola prenesená do laminárneho boxu a médium bolo odsaté. Bunky sa nechali opatrne premývať 5 ml PBS. Následne bolo PBS odsaté a k bunkám bol pridaný 1 ml 0,25% trypsínu-EDTA. Pôsobenie trypsínu prebiehalo v inkubátore po dobu 4 minút pri teplote 37 °C. Kultivačná fľaša bola opäť prenesená do laminárneho boxu a trypsinizácia bola ukončená pridaním 9 ml kultivačného média. Rozsuspendovanie buniek bolo prevedené pomocou pipetora a následne boli bunky prenesené do sterilnej plastovej skúmavky. 2 ml bunkovej suspenzie boli odobrané a vrátené späť do kultivačnej fľaše. Objem bol doplnený 13 ml kultivačného média a bunky boli uložené späť do inkubátora. Pasážovanie bolo prevedené každé 3 až 4 dni.

##### **4.5.2 Príprava experimentu**

Pri príprave experimentu sa spočiatku postupovalo ako pri pasážovaní buniek. Kultivačná fľaša bola prenesená do laminárneho boxu a kultivačné médium bolo odsaté. Bunky sa opatrne premyli PBS a po odsatí fosfátového pufru bol na bunky aplikovaný



0,25% trypsín-EDTA. Kultivačná fľaša bola umiestnená do inkubátora, kde prebiehala trypsinizácia po dobu 4 minút pri teplote 37 °C. Po uplynutí tejto doby bola fľaša opäť premiestnená do laminárneho boxu a bunky boli rozsuspendované 9 ml kultivačného média. Suspenzia buniek bola premiestnená do sterilnej plastovej skúmavky. 10 µl bunkovej suspenzie bolo prenesených do 0,5 ml mikroskúmavky. Mimo laminárny box bolo do skúmavky pridaných 90 µl trypanovej modrej a suspenzia bola premiešaná. 10 µl bolo nanosených na Bürkerovu komôrku a bunky boli spočítané pod mikroskopom v 10 štvorcoch, z ktorých bola následne stanovená priemerná hodnota. Výsledná hodnota určovala počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie a na základe tohto parametru bola bunková suspenzia nariadená kultivačným médiom tak, aby sa v 1 jamke kultivačnej doštičky nachádzalo 40 000 buniek. Následne bola táto bunková suspenzia nanosená pomocou multikanálovej pipety do jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky. Doštička sa umiestnila do inkubátora, kde boli bunky ponechané pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a atmosfére 5% CO<sub>2</sub> do nasledujúceho dňa.

#### **4.5.3 Nanášanie látok pri luciferázovej reportérovej eseji a teste cytotoxicity**

Potrebné reagensy určené na daný typ experimentu boli rozpustené v DMSO a následne nariadené na požadovanú koncentráciu. Tieto parametre zodpovedali jednotlivým typom experimentov. Pred nanášaním na kultivačnú doštičku boli dané roztoky 1000-krát riedené DMEM-FBS kultivačným médiom do požadovanej konečnej koncentrácie.

Následne bola 96-jamková kultivačná doštička prenesená do laminárneho boxu, médium bolo z jednotlivých jamiek odsaté a na bunky boli nanášané požadované roztoky. Doštička bola opäť umiestnená do inkubátora, kde boli bunky kultivované po požadovanú dobu v závislosti od typu experimentu.

#### **4.5.4 Stanovenie indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie ligandu**

Ako modelové ligandy boli použité zlúčeniny 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxín (TCDD) a 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ), ktoré boli rozpustené v DMSO a následne riedené na potrebné koncentrácie. V prípade TCDD išlo o koncentrácie 0,01 µmol·l<sup>-1</sup>, 0,05 µmol·l<sup>-1</sup>, 0,1 µmol·l<sup>-1</sup>, 0,5 µmol·l<sup>-1</sup>, 1 µmol·l<sup>-1</sup>, 5 µmol·l<sup>-1</sup>, 10 µmol·l<sup>-1</sup>, 25 µmol·l<sup>-1</sup>, 50 µmol·l<sup>-1</sup>, ktoré boli 1000-krát nariadené do kultivačného média DMEM-FBS na výsledné koncentrácie 0,01 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,05 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1

$\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $25\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zásobné roztoky FICZ sa pohybovali v rozsahu koncentrácií od  $0,001\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,005\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,01\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následne boli zásobné roztoky riedené do kultivačného média DMEM-FBS v konečných koncentráciách  $0,001\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,005\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,01\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola bolo použité DMEM-FBS kultivačné médium s obsahom 0,1% DMSO. Testované látky boli nanášané do jednotlivých jamiek v objeme  $200\text{ }\mu\text{l}$  v triplikátoch.

V prípade paralelného experimentu určeného na MTT test boli použité rovnaké koncentrácie oboch ligandov. Na normalizáciu výsledkov slúžilo DMEM-FBS s prídavkom 2% Tritonu X-100.

Následne bola 96-jamková doštička umiestnená do inkubátoru, kde boli bunky ponechané 24 hodín pri teplote  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosti a v atmosfére 5%  $\text{CO}_2$ . V prípade zisťovania schopnosti buniek indukovať luciferázovú aktivitu po krátkodobom pôsobení ligandov, bola inkubačná doba skrátená na 4 hodiny.

#### **4.5.5 Zistenie schopnosti indukovať luciferázovú aktivitu po kryoprezervácii a počas dlhodobej kultivácie**

Bunky LS174T-AhR-luc boli zmrazené za použitia 10% DMSO a umiestnené do mraziaceho boxu po dobu 5 mesiacov pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následne boli bunky rozmrazené a kultivované do dvadsiatej pasáže, pričom každú piatu pasáž bol prevedený experiment. Bunky boli kultivované v 3 kultivačných fľašiach a na kultivačnú doštičku boli nanášané bunky zo všetkých troch fliaš (tri nezávislé experimenty).

Modelové ligandy AhR (TCDD a FICZ) boli nanášané v kvadruplikátoch, pričom v prípade TCDD išlo o výslednú koncentráciu  $10\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a v prípade FICZ  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Obe látky boli riedené do kultivačného média DMEM-FBS. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO. Kultivačné médium s testovanými látkami bolo na doštičku nanášaná v objeme  $200\text{ }\mu\text{l}$ .

Po aplikácii látok na bunky, bola kultivačná doštička umiestnená do inkubátora ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosť, 5%  $\text{CO}_2$ ), kde bunky pretrvali po dobu 24 hodín.

#### **4.5.6 Stanovenie účinku inhibítora AhR na indukciu luciferázovej aktivity**

Špecifický inhibítor TCDD-indukovanej aktivity AhR, CH-223191, bol rozpustený v DMSO a zriedený na koncentrácie  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1$

mmol·l<sup>-1</sup>, 10 mmol·l<sup>-1</sup> a 50 mmol·l<sup>-1</sup>. Následne bol 1000-krát riedený kultivačným médiom DMEM-FBS, s prídavkom 10 nmol·l<sup>-1</sup> TCDD. Výsledné koncentrácie boli 1 nmol·l<sup>-1</sup>, 10 nmol·l<sup>-1</sup>, 100 nmol·l<sup>-1</sup>, 1 μmol·l<sup>-1</sup>, 10 μmol·l<sup>-1</sup> a 50 μmol·l<sup>-1</sup>. Ako negatívna kontrola bolo použité DMEM-FBS s DMSO (0,1%) a ako pozitívna kontrola slúžilo kultivačné médium s prídavkom 10 nmol·l<sup>-1</sup> TCDD. Testované látky boli na bunky nanášané v kvadruplicátoch, pričom použitý objem bol 200 μl.

Paralelne s týmto experimentom prebiehal aj test cytotoxicity MTT, kedy boli látky nanášané na kultivačnú doštičku v rovnakých koncentráciách ako v prípade luciferázovej reportérovej eseje. Na normalizáciu výsledkov slúžilo opäť DMEM-FBS s prídavkom 2% Tritonu X-100.

Následne boli kultivačné doštičky umiestnené späť do inkubátora, kde boli ponechané po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C, vlhkosti 95% a v atmosfére 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.5.7 Určenie vplyvu vybraných ligandov na indukciu luciferázovej aktivity**

Ligandy vybraných jadrových receptorov (RIF, T3, VD3, all-trans RA 9-cis RA) a receptorov pre steroidné hormóny receptorov (ALD, DEX, EST, PROG a TEST) boli rozpustené v DMSO a nariadené na počiatočné koncentrácie 10 μmol·l<sup>-1</sup>, 100 μmol·l<sup>-1</sup>, 1 mmol·l<sup>-1</sup> a 10 mmol·l<sup>-1</sup>. Tieto roztoky boli následne 1000-krát riedené do kultivačného média DMEM-FBS na výsledné koncentrácie 10 nmol·l<sup>-1</sup>, 100 nmol·l<sup>-1</sup>, 1 μmol·l<sup>-1</sup> a 10 μmol·l<sup>-1</sup>. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO a funkciu pozitívnej kontroly plnilo DMEM-FBS s prídavkom TCDD v koncentrácii 10 nmol·l<sup>-1</sup>. Jednotlivé látky boli na bunky nanášané v kvadruplicátoch v objeme 200 μl.

Následne boli kultivačné doštičky opätovne umiestnené do inkubátora (37 °C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>), kde bunky pretrvali do nasledujúceho dňa.

#### **4.5.8 Luciferázová reportérová esej**

Luciferázová reportérová esej je chemiluminiscenčná technika určená na kvantitatívnu detekciu aktivity určitej promótorovej regulačnej oblasti, prípadne celého promótoru. Princípom je oxidácia D-luciferínu v prítomnosti ATP, kyslíku a horečnatých iónov pomocou enzýmu luciferázy. Vzniká fluorescenčný produkt, ktorý môže byť kvantifikovaný meraním emitovaného svetla (Smale, 2010).

Po 24-hodinovej inkubácii bol obsah kultivačnej doštičky vyliaty a osušený buničinou. Jednotlivé jamky boli premyté 100 μl PBS a po opätovnom vyliatí a osušení

bolo do jamiek pridaných 20  $\mu\text{l}$  lyzačného pufru, ktorý bol riedený 5-krát pomocou deionizovanej vody. Následne bola doštička umiestnená do mraziaceho boxu ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), kde bola ponechaná po dobu minimálne 45 minút. Po uplynutí tejto doby sa nechala doštička rozmraziť a z každej jamky bolo odobraných 10  $\mu\text{l}$  lyzátu. Lyzát bol prepitovaný do bielej 96 jamkovej doštičky, následne bolo pridaných 40  $\mu\text{l}$  luciferázového substrátu a prebehlo meranie luminiscencie na spektrofotometri Infinite 200. Namerané hodnoty luminiscencie boli stanovené ako FOLD indukcie vzťahnuté na negatívnu kontrolu, ktorú predstavovalo 0,1% DMSO.

#### **4.5.9 Test cytotoxicity (MTT)**

MTT test je využívaný na meranie metabolickej aktivity buniek, čo slúži ako faktor viability, bunkovej proliferácie a cytotoxicity. Tento typ experimentu je založený na redukcii žltej metyltetrázoliovkej soli na fialový formazán. Reakcia je sprostredkovaná pomocou NAD(P)H-dependentnej oxidoreduktázy, ktorá je prítomná v životaschopných bunkách. Následne sú fialové kryštály formazánu rozpustené vhodným rozpúšťadlom a je meraná absorbanca výsledného farebného roztoku. Vo všeobecnosti platí, že čím je roztok tmavší, tým väčší je počet živých, metabolicky aktívnych buniek (Berridge a Tan, 1993).

Po 24-hodinovej inkubácii buniek s danými látkami, bol obsah kultivačnej doštičky opatrne vyliaty a doštička bola jemne osušená buničinou. Následne sa do každej jamky napipetovalo multikanálovou pipetou 100  $\mu\text{l}$  PBS a po krátkom premytí, bola doštička opäť vyliata a osušená. Do jednotlivých jamiek sa pridalo 100  $\mu\text{l}$  MTT, riedeného do kultivačného média DMEM-FBS na výslednú koncentráciu 0,1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Doštička bola umiestnená do inkubátoru ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosť, 5%  $\text{CO}_2$ ), kde bola ponechaná po dobu 20 minút. Po uplynutí tejto doby bol obsah doštičky opäť vyliaty a vzniknuté kryštály boli rozpustené v 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Následne prebehlo meranie na spektrofotometri Infinite 200 pri vlnovej dĺžke 570 nm. Viabilita buniek bola stanovená percentuálne vzhľadom na negatívnu kontrolu, ktorá predstavovala 100%.

#### **4.5.10 Mikroskopia**

Mikroskopické pozorovania bunkových línií LS174T a LS174T-AhR-luc boli uskutočnené pomocou inverzného mikroskopu IX73 (Olympus). Mikrofotografie boli zaznamenané digitálnou kamerou DP23 (Olympus) a spracované pomocou softvéru cellSens (Olympus). Bunky v dvadsiatej pasáži boli pozorované priamo v kultivačnej fľaši v natívnom stave.

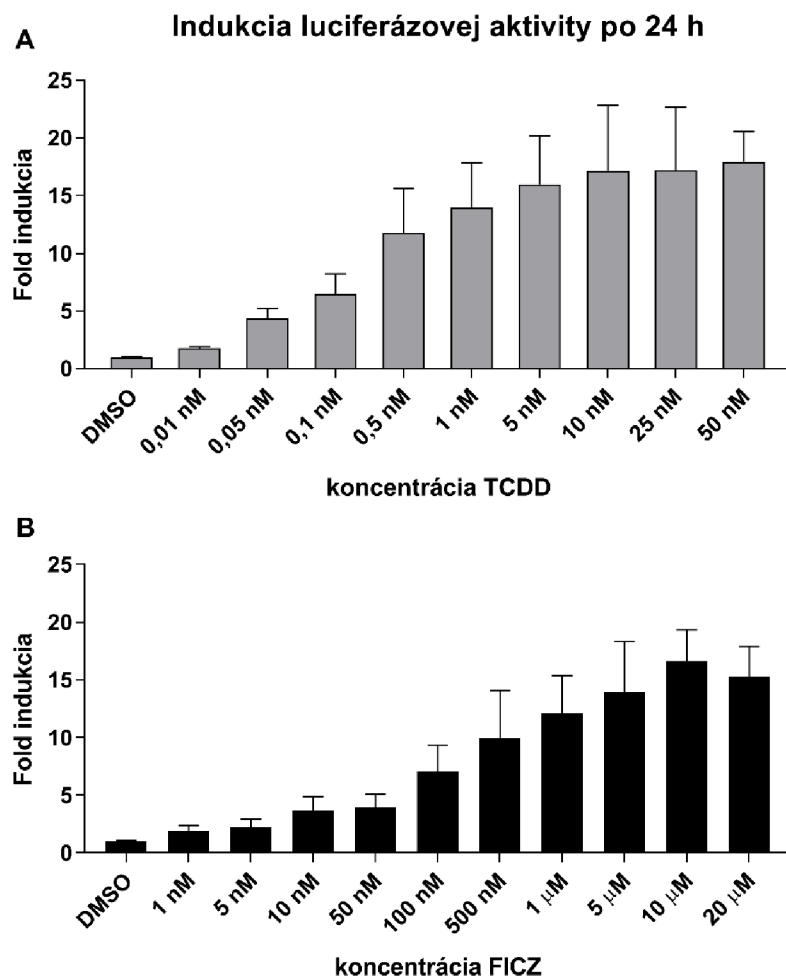
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Indukcia luciferázovej aktivity

Prvým krokom pri charakterizovaní novej reportérovej línie LS174T-AhR-luc bolo stanovenie miery indukcie luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie ligandu. Na bunky boli aplikované roztoky modelového ligandu TCDD v koncentráciách  $0,01 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V prípade endogénneho ligandu FICZ boli použité koncentrácie  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO. Po 24 hodinách pôsobenia TCDD a FICZ prebehla lýza buniek a k bunkovému lyzátu bol pridaný substrát pre luciferázu. Namerané hodnoty luminiscencie boli prepočítané vo vzťahu k negatívnej kontrole a výsledná aktivita luciferázy bola stanovená ako FOLD indukcia. Hodnoty uvádzané v grafoch na Obr. 3 sú priemerom šiestich nezávislých experimentov.

Z nameraných hodnôt po 24-hodinovom pôsobení TCDD bolo možné pozorovať, že s nárastom koncentrácie TCDD, dochádzalo k nárastu FOLD indukcie (Obr. 3A). Maximálna hodnota luciferázovej aktivity,  $17,92 \pm 2,64$  FOLD, bola nameraná pri najvyššej použitej koncentrácii  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Minimálna detekovateľná hodnota luciferázovej aktivity  $1,77 \pm 0,16$  FOLD, bola zistená pri najnižšej použitej koncentrácii  $0,01 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako referenčná hodnota bola stanovená koncentrácia  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pri ktorej dosahovala luciferázová aktivita  $17,18 \pm 5,61$  FOLD.

Rovnako aj v prípade pôsobenia endogénneho ligandu FICZ, bola opäť pozorovaná závislosť indukcie luciferázovej aktivity na zvyšujúcej sa koncentrácii FICZ. Maximálna hodnota  $16,60 \pm 2,73$  FOLD bola zaznamenaná pri koncentrácii  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , ktorá bola zároveň stanovená ako referenčná hodnota (Obr. 3B). Pri najvyššej použitej koncentrácii došlo k miernemu poklesu luciferázovej aktivity na hodnotu  $15,27 \pm 2,63$  FOLD. Najnižšia hodnota  $1,93 \pm 0,45$  FOLD bola zaznamenaná pri koncentrácii  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

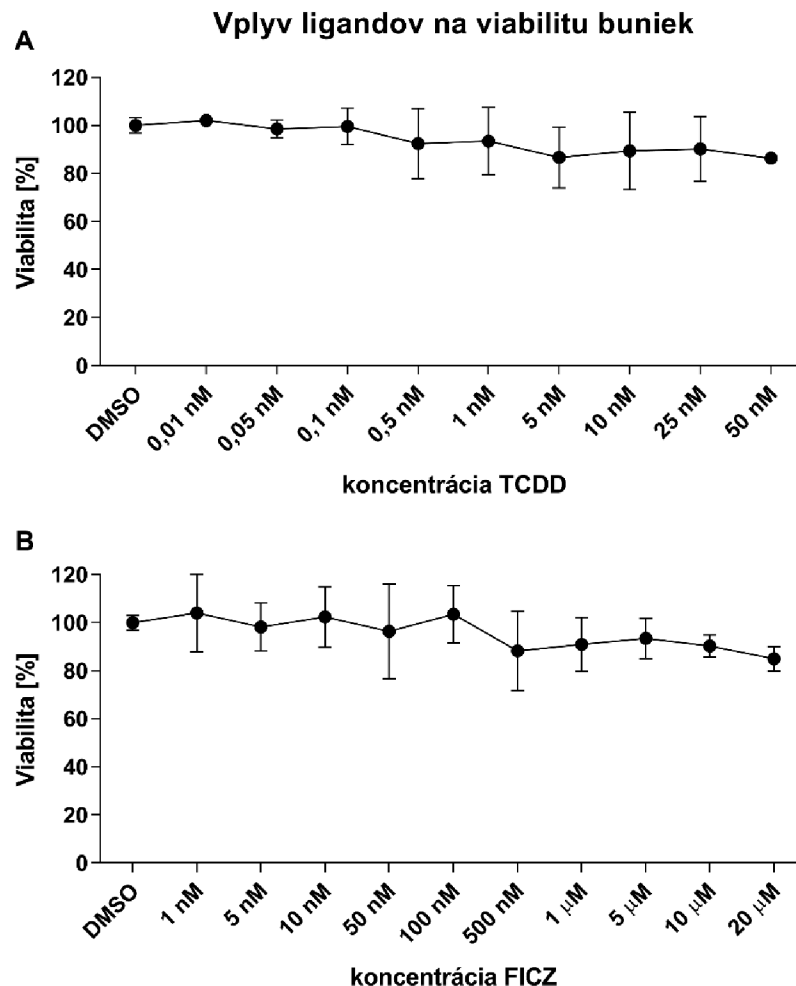


**Obrázok 3:** Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}$  =  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Pre vylúčenie možnosti cytotoxického vplyvu použitých koncentrácií ligandov na transkripčnú aktivitu AhR v bunkách reportérovej línie LS174T-AhR-luc, bola v paralelných experimentoch sledovaná viabilita buniek pomocou MTT testu. Rovnako ako v predchádzajúcom experimente, boli bunky počas 24 hodín vystavené pôsobeniu TCDD v koncentráciách  $0,01 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a FICZ, kedy sa jednalo o koncentrácie  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola slúžilo kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO. Po ukončení inkubácie boli kryštály formazánu, vzniknuté redukciou metyltetrazóliovej soli, rozpustené v DMSO a bola

zmeraná absorbancia výsledného roztoku. Zaznamenané hodnoty boli percentuálne prepočítané vo vzťahu k negatívnej kontrole, ktorá predstavovala 100%. Grafy na Obr. 4 reprezentujú priemerné hodnoty výsledkov šiestich nezávislých experimentov.

Z výsledkov vyplýva, že ako v prípade pôsobenia TCDD, tak aj v prípade FICZ došlo iba k miernemu poklesu viability na hodnoty  $86,34 \pm 1,93\%$  (TCDD; Obr. 4A) a  $85,07 \pm 5,18\%$  (FICZ; Obr. 4B) viability kontrolných buniek. V oboch prípadoch bol pokles viability závislý od koncentrácie ligandov a najnižšie hodnoty boli zaznamenané pri najvyšších koncentráciách ligandov  $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (TCDD), resp.  $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (FICZ). Z týchto zistení je možné usudzovať, že použité koncentrácie TCDD a FICZ nemajú výraznejší cytotoxický vplyv na bunky LS174T-AhR-luc.



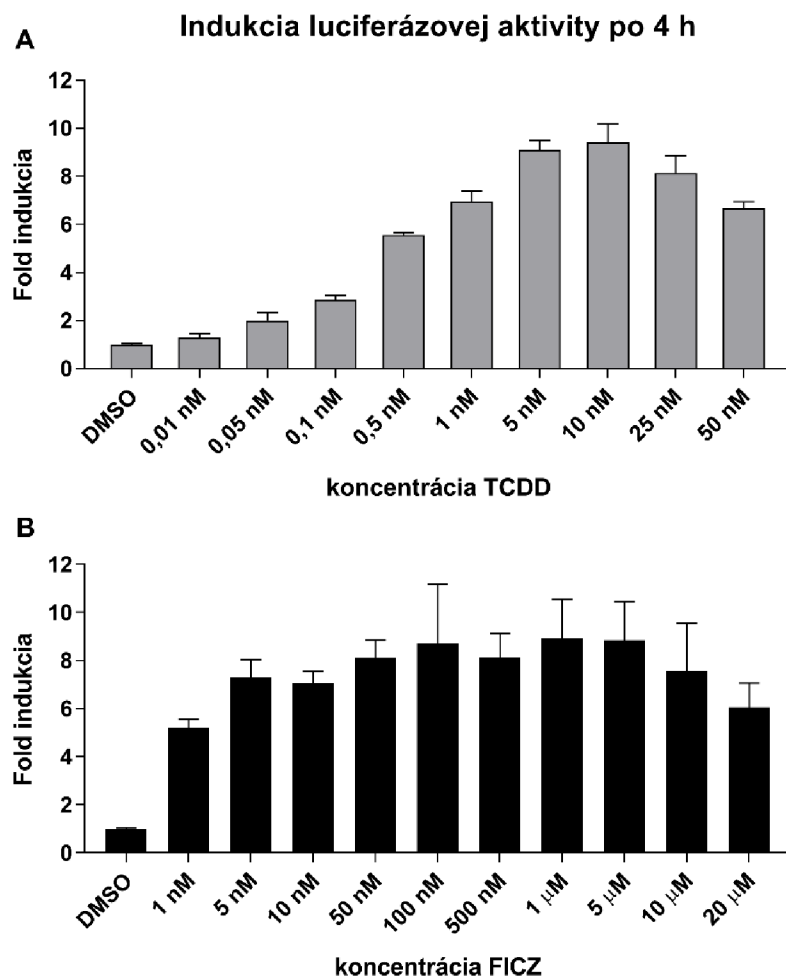
**Obrázok 4:** Vplyv škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ na viabilitu buniek LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}$  =  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

V experimentálnej praxi sa často stretávame s potrebou sledovania transkripčnej aktivity AhR v kratších časových intervaloch ako po 24-hodinovom pôsobení, hlavne u látok, ktoré v bunkách podliehajú rýchlemu metabolizmu. Na určenie vhodnosti novej reportérovej línie LS174T-AhR-luc pre takýto typ experimentov, bolo preto nevyhnutné otestovať schopnosť indukcie luciferázovej aktivity po krátkodobom pôsobení ligandov. Pri 4-hodinovej inkubácii s modelovými ligandmi TCDD a FICZ boli na bunky LS174T-AhR-luc aplikované koncentrácie 0,01 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,05 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,1 nmol·l<sup>-1</sup>, 0,5 nmol·l<sup>-1</sup>, 1 nmol·l<sup>-1</sup>, 5 nmol·l<sup>-1</sup>, 10 nmol·l<sup>-1</sup>, 25 nmol·l<sup>-1</sup> a 50 nmol·l<sup>-1</sup> v prípade TCDD a 1 nmol·l<sup>-1</sup>, 5 nmol·l<sup>-1</sup>, 10 nmol·l<sup>-1</sup>, 50 nmol·l<sup>-1</sup>, 100 nmol·l<sup>-1</sup>, 500 nmol·l<sup>-1</sup>, 1 μmol·l<sup>-1</sup>, 5 μmol·l<sup>-1</sup>, 10 μmol·l<sup>-1</sup>, 20 μmol·l<sup>-1</sup> v prípade FICZ. Po uplynutí 4 hodín bola prevedená lýza buniek a luciferázová reportérová esej. Hodnoty uvádzané v grafoch na Obr. 5 sú priemerom troch nezávislých experimentov.

Po inkubácii buniek LS174T-AhR-luc s TCDD bolo možné pozorovať nárast luciferázovej aktivity v závislosti od koncentrácie ligandu, podobne ako pri 24-hodinovom pôsobení. Avšak maximálna hodnota FOLD indukcie, ktorá predstavovala hodnotu 9,43 ± 0,74 FOLD, bola zaznamenaná pri koncentrácii 10 nmol·l<sup>-1</sup> (Obr. 5A). Následne došlo k miernemu poklesu na 8,14 ± 0,71 FOLD pri koncentrácii 25 nmol·l<sup>-1</sup> a 6,66 ± 0,28 FOLD pri najvyššej použitej koncentrácii 50 nmol·l<sup>-1</sup>.

Po 4-hodinovom pôsobení FICZ, sa namerané hodnoty luciferázovej aktivity pohybovali v rozmedzí od 5,22 ± 0,34 FOLD pri najnižšej testovanej koncentrácii (1 nmol·l<sup>-1</sup>), po 8,94 ± 1,61 FOLD, ktorá bola dosiahnutá pri koncentrácii 1 μmol·l<sup>-1</sup> (Obr. 5B). Rovnako ako v prípade použitia TCDD, pri najvyšších koncentráciách FICZ bol taktiež pozorovaný mierny pokles intenzity luciferázovej aktivity, a to na hodnotu 7,56 ± 1,99 FOLD pri koncentrácii 10 μmol·l<sup>-1</sup> a 6,05 ± 1,02 FOLD pri najvyššej použitej koncentrácii 20 μmol·l<sup>-1</sup>.





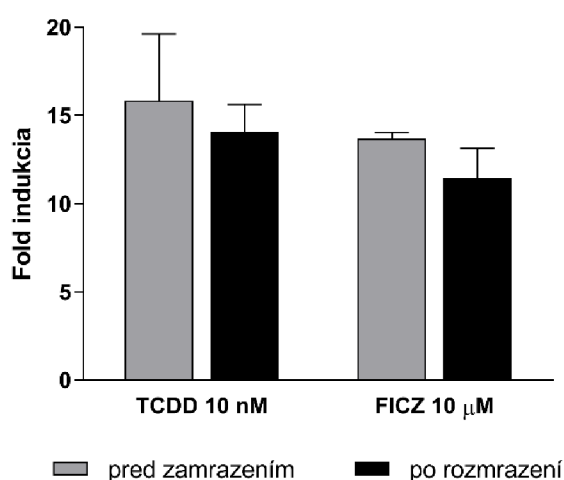
**Obrázok 5:** Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 4-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov TCDD a FICZ. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}$  =  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 5.2 Vplyv kryoprezervácie a dlhodobej kultivácie na luciferázovú aktivitu

Ďalším dôležitým parametrom pri charakterizovaní reportérovej línie LS174T-AhR-luc je zachovanie si schopnosti reagovať na prítomnosť ligandu indukciou luciferázovej aktivity po kryoprezervácii a dlhodobom uchovávaní buniek pri nízkych teplotách. V bunkách LS174T-AhR-luc bola zmeraná luciferázová aktivita po 24-hodinovom pôsobení TCDD v koncentrácii  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a FICZ v koncentrácii  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následne boli bunky zmrazené a po dobu 5 mesiacov uskladnené pri teplote  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po uplynutí tohto časového intervalu boli bunky rozmrazené a v 5. pasáži bolo meranie luciferázovej aktivity zopakované. Graf na Obr. 6 zobrazuje priemerné hodnoty výsledkov troch nezávislých experimentov.

Z výsledkov bolo možné pozorovať mierny pokles inducibility luciferázovej aktivity po kryoprezervácii v prípade použitia oboch ligandov (Obr. 6). V prípade TCDD hodnota indukcie poklesla z  $15,83 \pm 3,81$  FOLD na hodnotu  $14,07 \pm 1,57$  FOLD. Pri použití FICZ bola pred zmrazením zaznamenaná hodnota  $13,70 \pm 0,35$  FOLD a po rozmrazení  $11,48 \pm 1,66$  FOLD. Aj keď došlo k miernemu poklesu hodnôt, bunky reportérovej línie LS174T-AhR-luc si zachovali schopnosť indukcie luciferázovej aktivity aj po kryoprezervácii a dlhodobom uchovávaní pri nízkych teplotách.

**Indukcia luciferázovej aktivity po kryoprezervácii**



**Obrázok 6:** Vplyv kryoprezervácie a dlhodobého pôsobenia nízkej teploty na indukciu luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc. Luciferázová aktivita bola meraná po 24-hodinovom pôsobení TCDD a FICZ. nM =  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M} = \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Okrem zmrazovania, rozmrazovania a pôsobenia nízkych teplôt, môže na funkčnosť bunkového reportérového systému vplyvať aj dlhodobé udržiavanie buniek v kultivačnom médiu. A preto bol aj v bunkovej líni LS174T-AhR-luc sledovaný vplyv dlhodobej kultivácie na schopnosť indukovať luciferázovú aktivitu. V každej piatej pasáži boli na bunky LS174T-AhR-luc aplikované modelové ligandy TCDD v koncentrácii  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a FICZ v koncentrácii  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Po 24-hodinovom pôsobení bola v bunkovom lyzáte stanovená luciferázová aktivita. Táto procedúra bola opakovaná až do dvadsiatej pasáže a celkové trvanie experimentu bolo 49 dní. Priemerné hodnoty výsledkov troch nezávislých experimentov sú uvedené v Tab. 1.

**Tabuľka 1:** Vplyv dlhodobej kultivácie buniek reportérovej línie LS174T-AhR-luc na indukciu luciferázovej aktivity

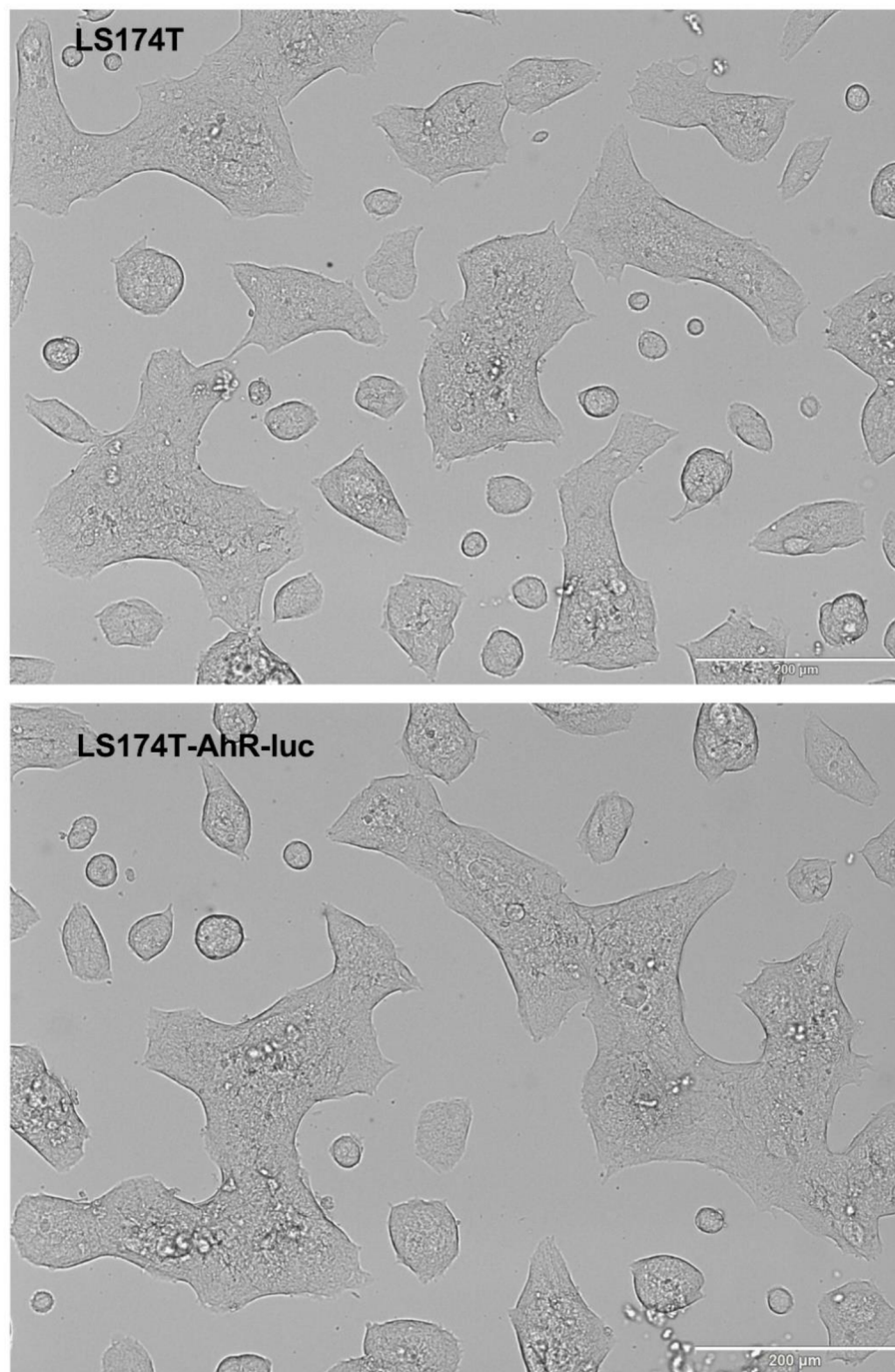
<b>Číslo pasáže</b>	<b>Počet dní v kultúre</b>	<b>TCDD 10 nM [fold ± SD]</b>	<b>FICZ 10 µM [fold ± SD]</b>
5	14	14,07 ± 1,57	11,48 ± 1,66
10	24	15,56 ± 2,16	11,36 ± 0,45
15	35	12,45 ± 6,02	12,08 ± 5,94
20	49	17,74 ± 5,85	17,75 ± 5,87

Na základe výsledkov pozorovaní bolo zistené, že v prípade pôsobenia TCDD došlo najprv k miernemu poklesu indukcie v 15. pasáži na hodnotu  $12,45 \pm 6,02$  FOLD, avšak v 20. pasáži bol zaznamenaný nárast luciferázovej aktivity, a to na hodnotu  $17,74 \pm 5,85$  FOLD, čo zároveň predstavuje aj najvyššiu nameranú indukciu (Tab. 1). Po aplikácii FICZ bol pozorovaný postupný nárast luciferázovej aktivity z počiatočnej hodnoty  $11,48 \pm 1,66$  FOLD, ktorá bola nameraná v 5. pasáži, až na hodnotu  $17,75 \pm 5,87$  FOLD, zaznamenanú v 20. pasáži (Tab. 1). Z výsledkov je zrejmé, že výkyvy hodnôt indukcie luciferázovej aktivity neboli nijako dramatické a že dlhodobé pasážovanie buniek tak nemalo negatívny vplyv na inducibilitu luciferázovej aktivity v bunkách reportérovej línie LS174T-AhR-luc.

### 5.3 Morfológia buniek

Princípom konštrukcie stabilne transfekovanej reportérovej línie je vkladanie novej genetickej informácie do buniek. Jedným z možných dôsledkov tohto procesu je zmena fyziologických vlastností buniek, čo veľmi často vedie k zmene ich morfológie a ku komplikáciám pri adherencii buniek.

Pri porovnaní buniek stabilne transfekovanej reportérovej línie LS174T-AhR-luc s bunkami LS174T, od ktorých bola reportérová línia odvodená, neboli pozorované žiadne zmeny v morfológii buniek ani v ich schopnosti prichytávať sa o podklad a vytvárať monovrstvy (Obr. 7). Tieto vlastnosti zostali zachované aj po dvadsiatich pasážach, z čoho vyplýva, že stabilná transfekcia nemala žiadny účinok na morfológiu buniek.



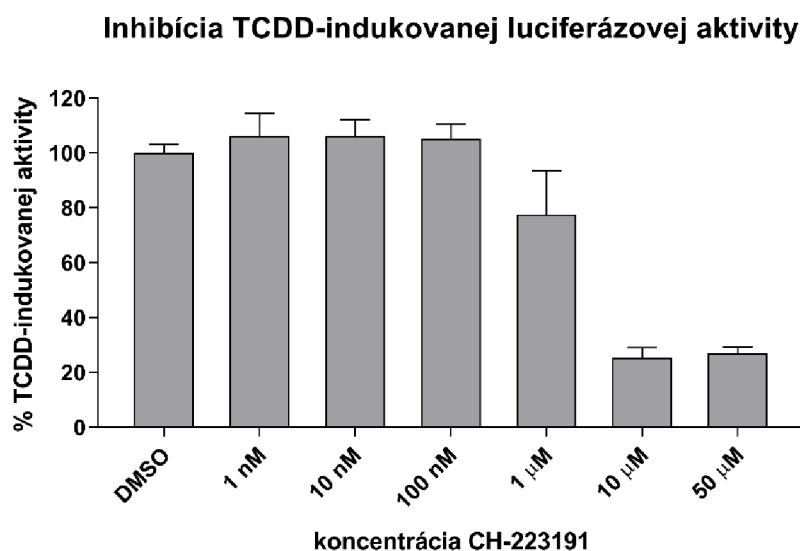
**Obrázok 7:** Morfológia reportérovej línie LS174T-AhR-luc a línie LS174T, od ktorej bola reportérová línia odvodená. Bunky oboch línií sa nachádzajú v dvadsiatej pasáži.

#### 5.4 Špecifickosť indukcie luciferázovej aktivity

Schopnosť buniek LS174T-AhR-luc reagovať špecificky na agonistov AhR, bola stanovená pomocou selektívneho inhibítora TCDD-indukovanej aktivity AhR, CH-223191. CH-223191 bol na bunky aplikovaný v koncentráciách  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to vždy v kombinácii s  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$

TCDD, ako modelovým ligandom. Ako negatívna kontrola slúžilo kultivačné médium obsahujúce 0,1% DMSO a ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s prídavkom  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD. Po 24 hodinách inkubácie boli bunky zlyzované a k lyzátu bol pridaný substrát pre luciferázu. Namerané hodnoty luminiscencie boli prepočítané a percentuálne vzťahované k pozitívnej kontrole, ktorá predstavovala 100%. Hodnoty uvádzané v grafe na Obr. 8 sú priemerom výsledkov štyroch nezávislých experimentov.

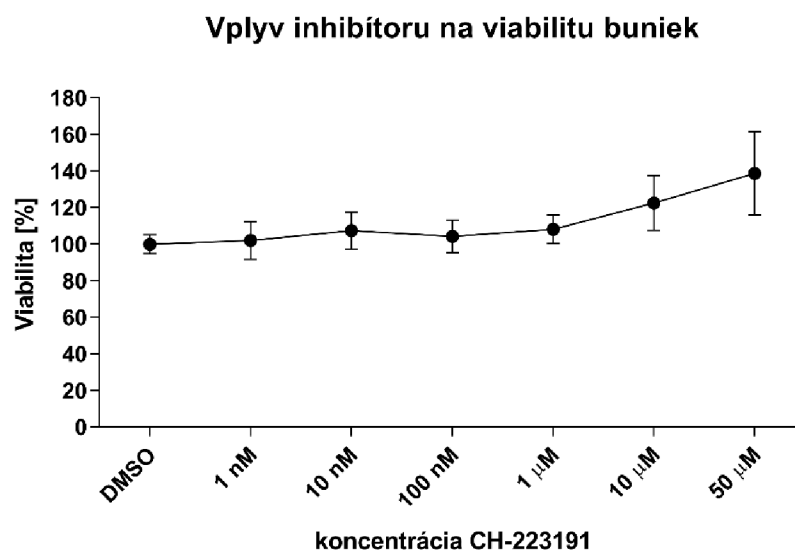
Z nameraných údajov je možné pozorovať, že po aplikácii inhibítora došlo k poklesu luciferázovej aktivity indukovanej TCDD (Obr. 8). Inhibícia luciferázovej aktivity bola závislá od koncentrácie inhibítora, najvyšší inhibičný účinok bol zaznamenaný pri koncentrácii  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy hodnota luciferázovej aktivity dosahovala iba  $25,5 \pm 3,7\%$ . Pri najvyššej použitej koncentrácii ( $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) poklesla úroveň TCDD-indukovanej luciferázovej aktivity na  $27,0 \pm 2,2\%$ . Z týchto zistení vyplýva, že k poklesu indukcie luciferázovej aktivity došlo v dôsledkom špecifickej inhibície transkripčnej aktivity AhR prostredníctvom selektívneho inhibítora CH-223191. To znamená, že reportérová línia LS174T-AhR-luc bola schopná špecificky reagovať na modelový ligand AhR, TCDD.



**Obrázok 8:** Inhibícia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom kombinovanom pôsobení  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD a škály koncentrácií inhibítora CH-223191. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}$  =  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na určenie možného cytotoxického vplyvu inhibítora na transkripčnú aktivitu AhR v bunkách LS174T-AhR-luc, boli prevedené paralelné experimenty, v ktorých bola pozorovaná viabilita buniek pomocou MTT testu. Reportérové bunky boli počas 24 hodín vystavené kombinovanému pôsobeniu TCDD ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a CH-223191 v koncentráciách  $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO. Po prevedení MTT testu boli namerané výsledky prepočítané a percentuálne vzťahnuté k negatívnej kontrole. Graf na Obr. 9 znázorňuje priemerné hodnoty štyroch nezávislých experimentov.

Z výsledkov experimentov vyplýva, že po aplikácii TCDD v kombinácii s použitými koncentraciami CH-223191 nebol pozorovaný žiadny cytotoxický efekt na bunky LS174T-AhR-luc (Obr. 9). Naopak, pri vyšších koncentráciách ( $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) došlo k miernemu nárastu viability. Je teda zrejmé, že použitie inhibítora CH-223191 nemalo negatívny účinok na transkripčnú aktivitu AhR.



**Obrázok 9:** Vplyv škály koncentrácií inhibítora CH-223191 v kombinácii s  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD na viabilitu buniek LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M} = \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

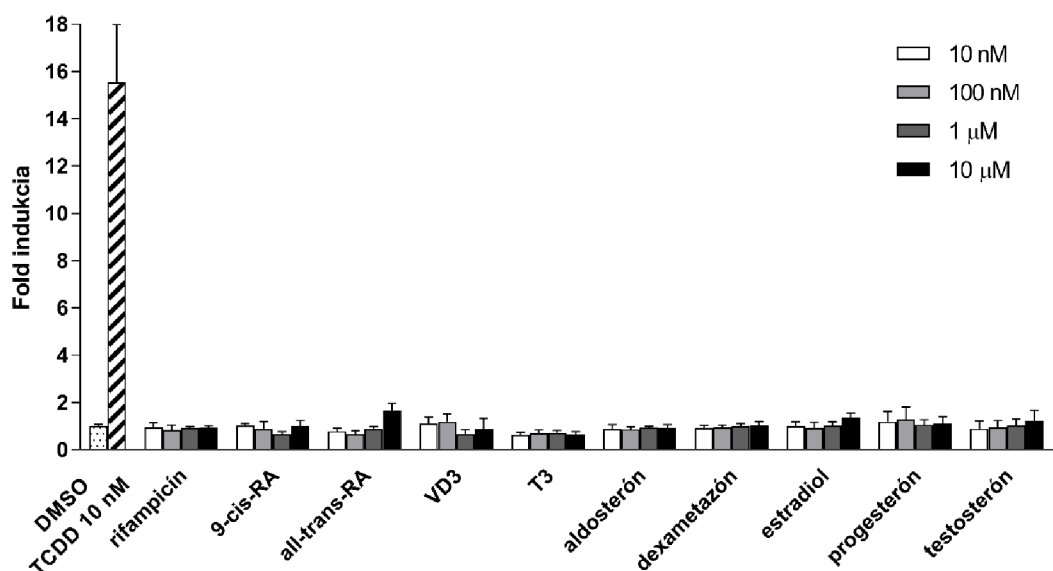
### 5.5 Selektivita indukcie luciferázovej aktivity

Schopnosť reportérových buniek LS174T-AhR-luc reagovať selektívne iba na agonistov AhR bola stanovená pomocou modelových ligandov vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny. Bunky LS174T-AhR-luc boli vystavené

pôsobeníu rifampicínu, kyseliny 9-cis-retinovej (9-cis-RA), kyseliny all-trans-retinovej (all-trans-RA), cholekalciferolu (VD3), 3,3',5-trijód-L-tyronínu (T3), aldosterónu, dexametazónu, estradiolu, progesterónu a testosterónu. Všetky ligandy boli použité v koncentráciách  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola slúžilo kultivačné médium s prídavkom 0,1% DMSO a ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium obsahujúce TCDD v koncentrácii  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Po 24-hodinovej inkubácii bola prevedená luciferázová reportérová esej. Údaje uvádzané v grafe na Obr. 10 predstavujú priemerné hodnoty výsledkov troch nezávislých experimentov.

Po aplikácii ligandov vybraných receptorov bolo možné pozorovať, že ani v jednom prípade nedošlo k výraznejšiemu nárastu luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc (Obr. 10). Výnimku tvorila pozitívna kontrola TCDD ( $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), kedy indukcia luciferázovej aktivity dosahovala hodnotu  $15,56 \pm 2,41 \text{ FOLD}$ . Na základe týchto zistení je preto možné tvrdiť, že schopnosť indukcie luciferázovej aktivity v novej reportérovej línii LS174T-AhR-luc bola vysoko selektívna iba pre agonistov AhR.

#### Vplyv agonistov vybraných receptorov na indukciu luciferázovej aktivity



**Obrázok 10:** Indukcia luciferázovej aktivity v bunkách LS174T-AhR-luc po 24-hodinovom pôsobení škály koncentrácií ligandov vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny. nM =  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\mu\text{M} = \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 6 DISKUSIA

Jednými zo sofistikovaných a široko rozšírených metód na štúdium transkripčnej aktivity AhR sú génové reportérové eseje. Jedná sa o bunkové experimentálne modely, ktoré sú odvodené od bunkových línií ich tranzientnou alebo stabilnou transfekciou pomocou príslušného reportérového plazmidu. Tento plazmid nesie potrebné AhR responzívne sekvencie DNA a reportérový gén. Ako reportérový gén je najčastejšie využívaný gén pre luciferázu. Stabilná transfekcia je časovo pomerne náročný proces s relatívne vysokými nákladmi na spotrebu materiálu, ale poskytuje celú škálu výhod oproti tranzientnej transfekcii. V prvom rade sa jedná o fakt, že bunky nie je nutné podrobiť transfekcii pred každým experimentom, čo znižuje nielen náklady na materiál, ale výrazne skraca čas potrebný na jednotlivé experimenty. Zároveň stabilná transfekcia zaručuje vysokú citlivosť celej eseje a spoľahlivú reproducibilitu výsledkov (Novotná *et al.*, 2011). V neposlednom rade, pri využívaní stabilne transfekovaných reportérových systémov nie je potrebná dodatočná normalizácia výsledkov vzhľadom k prípadným rozdielom v efektívite transformácie.

Niekoľko desaťročí boli študované signalizačné dráhy AhR hlavne v kontexte s jeho úlohou v metabolizme a odbúravaní xenobiotík. Hlavným orgánom v rámci organizmu, kde sa tieto procesy odohrávajú, je pečeň. Nie je preto prekvapením, že v pečeni bola zaznamenaná aj najvyššia úroveň expresie AhR. Bunky pečene preto predstavujú ideálny materiál pre štúdium transkripčnej aktivity AhR, čo bolo prakticky využité aj pri konštrukcii reportérových bunkových línií (Novotná *et al.*, 2011). V posledných rokoch sa však upriamila pozornosť na štúdium úlohy AhR v črevnom trakte, hlavne v súvislosti s účinkami metabolitov črevnej mikrobioty. Keďže expresia AhR je pomerne vysoká aj v bunkách tráviaceho traktu, čoraz častejšie sa ako modelové objekty využívajú bunkové línie odvodené od črevných buniek. Výnimkou nie je ani konštrukcia reportérových bunkových línií, určených na štúdium transkripčnej aktivity AhR. Hlavná výhoda takýchto „in vitro“ systémov spočíva v tom, že pri experimentoch cielených na zisťovanie úlohy AhR v tráviacom trakte, sú schopné zabezpečiť podmienky viac kompatibilné s prirodzenými podmienkami, ako pri použití systémov odvodených od iných typov buniek.

Novotná *et al.* (2011) vytvorili a charakterizovali reportérovú bunkovú líniu AZ-AhR. Jedná sa o líniu odvodenú od buniek ľudského hepatokarcinómu, HepG2,



ktoré boli stabilne transfekované reportérovým plazmidom pGL-4.27-DRE. Rovnaký reportérový plazmid bol použitý aj pri konštrukcii novej stabilne transfekovanej reportérovej línie LS174T-AhR-luc, ktorá je derivátom buniek ľudského kolorektálneho adenokarcinómu, LS174T. Podobne, ako v prípade bunkovej línie AZ-AhR, aj bunky LS174T-AhR-luc veľmi senzitivne reagovali na prítomnosť modelového ligandu TCDD. V oboch prípadoch došlo k indukcii luciferázovej aktivity už pri koncentráciách TCDD pohybujúcich sa v rozmedzí jednotiek až desiatok  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Avšak, u buniek AZ-AhR dosahovali maximálne hodnoty indukcie luciferázovej aktivity viac ako 1000 FOLD (Novotná *et al.*, 2011), na rozdiel od línie LS174T-AhR-luc, kde maximálna hodnota nepresahovala 20 FOLD.

V prípade testovania cytotoxicity bol u buniek LS174T-AhR-luc zistený iba mierny pokles viability pri najvyšších použitých koncentráciách TCDD ( $10 - 50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pokles však nebol natoľko výrazný, aby ovplyvnil výsledky luciferázovej reportérovej eseje. Pre porovnanie, Sul *et al.* (2009) študovali cytotoxické účinky TCDD na líniu N2a, ktorá je odvodená od buniek ľudského neuroblastómu. Testované koncentrácie TCDD sa pohybovali od  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V prípade najnižšej sledovanej koncentrácie TCDD bol, podobne ako v našom prípade, pozorovaný iba mierny pokles viability buniek. S narastajúcou koncentráciou TCDD sa však cytotoxický efekt zvyšoval.

Testovanie buniek AZ-AhR po kryoprezervácii nepreukázalo žiadny výrazný pokles luciferázovej aktivity (Novotná *et al.*, 2011), zatiaľ čo v bunkách LS174T-AhR-luc došlo k jej miernemu zníženiu. Rozdiely v hodnotách luciferázovej aktivity pred zamrazením a po rozmrazení však boli natoľko nízke, že to nemalo žiadny negatívny vplyv na funkčnosť reportérovej línie. Rovnako, aj opakované pasážovanie a dlhodobé udržiavanie buniek v kultivačnom médiu neovplyvnilo stabilitu luciferázovej aktivity, či už v bunkách LS174T-AhR-luc, alebo v línii AZ-AhR (Novotná *et al.*, 2011). Navyše, bunky LS174T-AhR-luc si počas celej 49-dňovej kultivácie zachovali nezmenenú morfológiu.

Špecifickosť indukcie luciferázovej aktivity v bunkách línie LS174T-AhR-luc bola dokázaná prostredníctvom selektívneho inhibítora TCDD-indukovanej aktivity AhR, CH-223191. Ako sa očakávalo, so zvyšujúcou sa koncentráciou inhibítora došlo k poklesu intenzity luciferázovej aktivity. Je však pozoruhodné, že pri koncentrácii CH-223191  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  predstavovala hodnota luciferázovej aktivity  $25,48 \pm 3,70\%$  z pozitívnej kontroly, avšak pri najvyššej použitej koncentrácii ( $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bola

luciferázová aktivita  $27,04 \pm 2,22\%$ . To síce nepredstavuje veľký rozdiel, ale mohlo by to súvisieť s výsledkami získanými pomocou MTT testu, kedy bol pozorovaný nárast viability buniek v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie CH-223191. Pri najvyššej koncentrácii dosahovala viabilita buniek hodnotu  $138,72 \pm 23,00\%$  z viability kontrolných buniek. Tento jav mohol byť spôsobený potenciálnymi proliferačnými účinkami CH-223191. Podobné zistenie bolo publikované v štúdiu Choi *et al.* (2011), kde po pôsobení CH-223191 v koncentrácii  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo k výraznému zvýšeniu viability buniek. To viedlo autorov k domnienke, že tento selektívny inhibítor AhR by mohol podporovať proliferáciu buniek.

Celkovú charakterizáciu novej reportérovej línie LS174T-AhR-luc doplnili experimenty využívajúce modelové ligandy vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny. Ukázalo sa, že ani jeden z testovaných ligandov nebol schopný indukovať luciferázovú aktivitu v bunkách LS174T-AhR-luc. Tieto výsledky ukazujú, že v reportérovej línii nedochádza k nešpecifickej krížovej aktivácie expresie génu pre luciferázu prostredníctvom iných ligandov, čo svedčí o vysokej selektivitě bunkovej línie voči agonistom AhR.

Existujú rôzne ďalšie štúdie zameriavajúce sa na výskum AhR signalizácie s využitím odlišných intestinálnych bunkových línií. Marinelli *et al.* (2019) použili bunkovú líniu HT-29, ktorá je odvodená od ľudského adenokarcinómu hrubého čreva. Tieto bunky sú zaujímavé tým, že vykazujú charakteristiky diferencovanej intestinálnej bunky. Vyznačujú sa veľkou podobnosťou s enterocytmi v tenkom čreve a sú preto vhodným modelom hlavne na štúdium transportu xenobiotík a endogénnych zlúčenín (Martinez-Maqueda *et al.*, 2015). Marinelli *et al.* (2019) bunky HT-29 stabilne transfekovali pomocou reportérového plazmidu obsahujúceho tri kópie XRE motívu a využili na sledovanie vplyvu butyrátu na transkripčnú aktivitu AhR.

V štúdiu Beukema *et al.* (2022), bola opäť použitá črevná bunková línia HT-29, avšak transfekcia prebiehala pomocou reportérového plazmidu obsahujúceho Lucia luciferázu. Tento modifikovaný reportérový gén, vyznačujúci sa až 1000 krát vyšším luminiscenčným signálom v porovnaní s klasickou luciferázou, bol pod kontrolou responzívneho elementu pre ARNT. Po aktivácii AhR došlo k jeho dimerizácii s ARNT, čo viedlo k sekrécii luciferázového reportérového proteínu Lucia. V tejto štúdiu boli na bunky HT29-Lucia™ AhR aplikované vzorky tráveniny zo slepého čreva, ktoré boli izolované z myši živených vybranými pektínmi.

Na štúdium AhR mechanizmov je často používaná bunková línia Caco-2. Táto línia je odvodená od buniek ľudského adenokarcinómu hrubého čreva. V štúdií Champion *et al.* (2013) bol do týchto buniek tranzientne vnesený luciferázový plazmid pomocou lipofekcie. Experiment sa zameriaval na vplyv zápalových faktorov na expresiu AhR a úlohu NF $\kappa$ B.

Nakoľko dané štúdie sa nezaoberali priamo charakterizáciou bunkových línií, nebolo možné porovnať citlivosť a stabilitu jednotlivých línií s bunkovou líniou LS174T-AhR-luc. Na základe prezentovaných výsledkov je však možné tvrdiť, že bunková línia LS174T-AhR-luc je vhodná ako na štúdium metabolizmu xenobiotík a environmentálnych faktorov, tak aj na výskum v oblasti črevnej mikrobioty.

## 7 ZÁVER

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo charakterizovať novú reportérovú bunkovú líniu LS174T-AhR-luc. V literárnom prehľade bol podrobnejšie opísaný aryl uhľovodíkový receptor a jeho mechanizmus pôsobenia, ako aj funkcie AhR, či už na úrovni bunky, alebo celého organizmu. Zároveň bola časť literárneho prehľadu venovaná problematike reportérových bunkových systémov.

V experimentálnej časti boli bunky LS174T-AhR-luc podrobené viacerým testom, ktorých účelom bolo určenie funkčnosti nového experimentálneho modelového systému. Pomocou luciferázovej reportérovej eseje bola určená závislosť indukcie luciferázovej aktivity od koncentrácie ligandu. Tento trend bolo možné pozorovať ako po 24-hodinovom pôsobení modelových ligandov TCDD a FICZ, tak aj po ich 4-hodinovej aplikácii. Po krátkodobej expozícii bol výraznejší nárast luciferázovej aktivity zaznamenaný už pri nižších koncentráciách ligandov, naopak, po aplikácii najvyšších testovaných koncentráciách došlo u oboch ligandov k miernemu poklesu schopnosti buniek indukovať luciferázovú aktivitu. Maximálne hodnoty luciferázovej aktivity dosahovali v prípade TCDD  $17,92 \pm 2,64$  FOLD po 24-hodinovom pôsobení a  $9,43 \pm 0,74$  FOLD po 4-hodinovej aplikácii. Po pôsobení endogénneho ligandu FICZ boli zaznamenané maximálne hodnoty  $16,60 \pm 2,73$  FOLD pre dlhodobé pôsobenie a  $8,94 \pm 1,61$  FOLD pre krátkodobé pôsobenie. Na základe získaných výsledkov boli stanovené referenčné hodnoty oboch ligandov na  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pre TCDD a  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pre FICZ. MTT testy preukázali, že testované koncentrácie použitých ligandov TCDD a FICZ nemali výrazný vplyv na viabilitu buniek.

Z výsledkov ďalej vyplýva, že kryoprezervácia a dlhodobé uchovávanie buniek (5 mesiacov) pri nízkej teplote ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) nemali v bunkách LS174T-AhR-luc žiadny výrazný vplyv na inducibilitu luciferázovej aktivity. Reportérová bunková línia taktiež pretrvala plne funkčná aj po dvadsiatich pasážach a 49 dňoch udržiavania v kultivačnom médiu. Rovnako neboli pozorované žiadne morfológické zmeny v porovnaní s parentálnou líniou LS174T, a to ani po dlhodobej kultivácii buniek.

Po pôsobení selektívneho inhibítora TCDD-indukovanej aktivity AhR, CH-223191, v kombinácii s  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TCDD došlo, podľa očakávania, k poklesu luciferázovej aktivity, ktorý bol najvýraznejší pri najvyšších použitých koncentráciách inhibítora. Toto zistenie svedčí o špecifickej odpovedi reportérovej línie na prítomnosť ligandu TCDD.

V neposlednom rade, výsledky experimentov hodnotiacich vplyv ligandov vybraných jadrových receptorov a receptorov pre steroidné hormóny na bunky LS174T-AhR-luc ukázali, že pôsobenie ani jedného z ligandov nevyvolalo indukciu luciferázovej aktivity, z čoho vyplýva, že nová reportérová bunková línia je vysoko selektívna voči agonistom AhR.

Na základe všetkých týchto zistení môžeme konštatovať, že nová reportérová línia LS174T-AhR-luc poskytuje vysoko špecifický a selektívny „in vitro“ model na štúdium transkripčnej aktivity AhR a spĺňa všetky parametre potrebné na úspešné zavedenie do experimentálnej praxe.

## 8 LITERATÚRA

- Abbott B.D., Schmid J.E., Pitt J.A., Buckalew A.R., Wood C.R., Held G.A., Diliberto J.J. (1999): Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 155, 62–70.
- Abdelrahim M., Smith R., Safe S. (2003): Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Molecular Pharmacology* 63, 1373–1381.
- Abel J., Haarmann-Stemmann T. (2010): An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Biological Chemistry* 391, 1235–1248.
- Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller C.A., Kato T., Saeki K., Matsuda T. (2001): Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31475–31478.
- Ashida H., Nishiumi S., Fukuda I. (2008): An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4, 1429–1447.
- 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, 33101–33110.
- Beischlag T.V., Morales J.L., Hollingshead B.D., Perdew G.H. (2008): The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 18, 207–250.
- Beischlag T.V., Wang S., Rose D.W., Torchia J., Reisz-Porszasz S., Muhammad K., Nelson W.E., Probst M.R., Rosenfeld M.G., Hankinson O. (2002): Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Molecular and Cellular Biology* 22, 4319–4333.
- Bennett P., Ramsden D.B., Williams A.C. (1996): Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Journal of Clinical Pathology* 49, M12–M16.
- Berridge M., Tan A. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron

transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 474–482.

- Beukema M., Jermendi E., Oerlemans M.M.P., Logtenberg M.J., Akkerman R., An R., van der Berg M.A., Zoetetal E.G., Koster T., Kong C., Faas M.M., Schols H.A., de Vos P. (2022): The level and distribution of methyl-esters influence the impact of pectin on intestinal T cells, microbiota, and Ahr activation. *Carbohydrate Polymers* 286, 119280.
- Burbach K.M., Poland A., Bradfield C.A. (1992): Cloning of the Ah receptor cDNA reveals a distinctive ligand activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89, 8185–8189.
- Denison M.S., Fisher J.M., Whitlock J.P. (1988): The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *Journal of Biological Chemistry* 263, 17221–17224.
- Diry M., Tomkiewicz C., Koehle C., Coumoul X., Bock K.W., Barouki R., Transy C. (2006): Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 5570–5574.
- Eguchi H., Hayashi S., Watanabe J., Gotoh O., Kawajiri K. (1994): Molecular cloning of the human AH receptor gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203, 615–622.
- Elizondo G., Fernandez-Salguero P., Sheikh M.S., Kim G.Y., Fornace A.J., Lee K.S., Gonzalez F.J. (2000): Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Molecular Pharmacology* 57, 1056–1063.
- Erichsen T.J., Ehmer U., Kalthoff S. Lankisch T.O., Müller T.M., Munzel P.A., Manns M.P., Strassburg Ch.P. (2008): Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230, 252–260.
- Fernandez-Salguero P.M., Ward J.M., Sundberg J.P., Gonzalez F.J. (1997): Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Veterinary Pathology* 34, 605–614.
- Garrison P.M., Tullis K., Aarts J., Brouwer A., Giesy J.P., Denison M.S. (1996): Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. *Fundamental and Applied Toxicology* 30, 194–203.

- Geusau A., Abraham K., Geissler K., Sator M.O., Stingl G., Tschachler E. (2001): Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environmental Health Perspectives* 109, 865–869.
- Giannone J.V., Li W., Probst M., Okey A.B. (1998): Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochemical Pharmacology* 55, 489–497.
- Goll M.G., Bestor T.H. (2002): Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes & Development* 16, 1739–1742.
- Gouédard C., Barouki R., Morel Y. (2004): Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5209–5222.
- Guyot E., Chevallier A., Barouki R., Coumoul X. (2013): The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discovery Today* 18, 479–486.
- Hahn M.E., Allan L.L., Sherr D.H. (2009): Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochemical Pharmacology* 77, 485–497.
- Hankinson O. (2005): Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 379–386.
- Heath-Pagliuso S., Rogers W.J., Tullis K., Seidel S.D., Ceniñ P.H., Brouwer A., Denison M.S. (1998): Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry (Moscow)* 37, 11508–11515.
- Huang G., Elferink C.J. (2005): Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest. *Molecular Pharmacology* 67, 88–96.
- Hubbard T.D., Murray I.A., Bisson W.H., Lahoti T.S., Gowda K., Amin S.G., Patterson A.D., Perdew G.H. (2015): Adaptation of the human Aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports* 5, 12689



- Hwang, S.J., Hwang Y.J., Yun M.O., Kim J.H., Oh G.S., Park J.H. (2013): Indoxyl 3-sulfate stimulates Th17 differentiation enhancing phosphorylation of c-Src and STAT3 to worsen experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicology Letters* 220, 109–117.
- Champion S., Sauzet C., Bremond P., Benbrahim K., Abraldes J., Seree E., Barr Y., Villard P.H. (2013): Activation of the NFκB pathway enhances AhR expression in intestinal Caco-2 cells. *ISRN Toxicology* 1–7.
- Chang J.T., Chang H., Chen P.H., Lin S.L., Lin P. (2007): Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research* 13, 38–45.
- Chaves Filho A.J.M., Lima C.N.C., Vasconcelos S.M.M., de Lucena D.F., Maes M., Macedo D. (2018): IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: a potential pathophysiological link between depression and obesity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 80, 234–249.
- Choi E.-Y., Lee H., Dingle R.W.C., Kim K.B., Swanson H.I. (2011): Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology* 81, 3–11.
- Ikuta T., Kobayashi Y., Kawajiri K. (2004): Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19209–19216.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., Kawajiri, K. (2004): Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 545–550.
- Ikuta, T., Tachibana T., Watanabe J., Yoshida M., Yoneda Y., Kawajiri K. (2000): Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biochemistry* 127, 503–509.
- Jigorel E., Le Vee M., Boursier-Neyret C., Parmentier Y., Fardel O. (2006): Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 1756–1763.

- Jin U., Lee S., Safe S. (2012): Aryl hydrocarbon receptor (AHR)-active pharmaceuticals are selective AHR modulators in MDA-MB-468 and BT474 breast cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343, 333–341.
- Juricek L., Carcaud J., Pelhaitre A., Riday T.T., Chevallier A., Lanzini J., Auzeil N., Laprévotte O., Dumont F., Jacques S., Letourneur F., Massaad C., Agulhon C., Barouki R., Beranek M., Coumoul X. (2017): AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Scientific Reports* 7, 9794.
- Kasai A., Hiramatsu N., Meng Y., Yao J., Maeda S., Kitamura M. (2005): Fast-track DRESSA: a bioassay for fast, sensitive, and selective detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical Biochemistry* 337, 84–88.
- Kim M.J., Pelloux V., Guyot E., Tordjman J., Bui L.-C., Chevallier A., Forest C., Benelli C., Clément K., Barouki R. (2012): Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environmental Health Perspectives* 120, 508–514.
- Kojima H., Takeuchi S., Iida M., Nakayama S.F., Shiozaki T. (2015): A sensitive, rapid, and simple DR-EcoScreen bioassay for the determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in environmental and food samples. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Kudo I., Hosaka M., Haga A., Tsuji N., Nagata Y., Okada H., Fukuda K., Kakizaki Y., Okamoto T., Grave E., Itoh H. (2018): The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *Journal of Biochemistry* 163, 223–232.
- Lahvis G.P., Bradfield C.A. (1998): Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochemical Pharmacology* 56, 781–787.
- Lahvis G.P., Pyzalski R.W., Glover E., Pitot H.C., McElwee M.K., Bradfield C.A. (2005): The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Molecular Pharmacology* 67, 714–720.
- Laiosa M.D., Tate E.R., Ahrenhoerster L.S., Chen Y., Wang D. (2016): Effects of developmental activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-

Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on long-term self-renewal of murine hematopoietic stem cells. *Environmental Health Perspectives* 124, 957–965.

- Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. (2018): AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7, 1–9.
- Lee J.H., Wada T., Febbraio M., He J., Matsubara T., Lee M.J., Gonzalez F.J., Xie W. (2010): A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139, 653–663.
- Liu K.Y., Wang L.T., Hsu S.H. (2018): Modification of epigenetic histone acetylation in hepatocellular carcinoma. *Cancers* 10, 8.
- Luecke-Johansson S., Gralla M., Rundqvist H., Caifeng Ho J., Johnson R.S., Gradin K., Poellinger L. (2017): A molecular mechanism to switch the aryl hydrocarbon receptor from a transcription factor to an E3 ubiquitin ligase. *Molecular and Cellular Biology* 37, e00630–16.
- Ma Y., Wang Q., Yu K., Fan X., Xiao W., Cai Y., Xu P., Yu M., Yang H. (2018): 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole induced aryl hydrocarbon receptor activation prevents intestinal barrier dysfunction through regulation of claudin-2 expression. *Chemico-Biological Interactions* 288, 83–90.
- Marinelli L., Martin-Gallausiaux C., Bourhis J.-M., Beguet-Crespel F., Blottiere H.M., Lapaque N. (2019): Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports* 9, 643.
- Marlowe J.L., Knudsen E.S., Schwemberger S., Puga A. (2004): The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29013–29022.
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. (2015): The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models. *Springer*.
- Mascarelli A. (2012): Environmental concerns and more stringent laws are providing opportunities for environmental toxicologists. *Nature* 483, 363–365.
- 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, 608–626.

- McIntosh B.E., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. (2010): Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual Review of Physiology* 72, 625–645.
- Mejia-Garcia A., Gonzalez-Barbosa E., Martinez-Guzman C., Torres-Ramos M.A., Rodriguez M.S., Guzman.Leon S., Elizondo G. (2015): Activation of AHR mediates the ubiquitination and proteasome degradation of c-Fos through the induction of Ubcm4 gene expression. *Toxicology* 337, 47–57.
- 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, 20–25.
- Monteleone I., Rizzo A., Sarra M., Sica G., Sileri P., Biancone L., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G. (2011): Aryl hydrocarbon receptor-induced signals upregulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 141, 237–248.
- Mulero-Navarro S., Pozo-Guisado E., Pérez-Mancera P.A., Alvarez-Barrientos A., Catalina-Fernández I., Hernández-Nieto E., Sáenz-Santamaria J., Martínez N., Rojas J.M., Sánchez-García I., Fernández-Salguero P.M. (2005): Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model. *Journal of Biological Chemistry* 280, 28731–28741.
- Murray S., Odupitan A.O., Murray B.P., Boobis A.R., Edwards R.J. (2001): Inhibition of human CYP1A2 activity in vitro by methylxanthines: potent competitive inhibition by 8-phenyltheophylline. *Xenobiotica* 31, 135–151.
- Nagy S.R., Sanborn J.R., Hammock, B.D., Denison M.S. (2002). Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of ah receptor agonists. *Toxicological Sciences* 65, 200–210.
- Natividad J.M., Agus A., Planchais J., Lamas B., Jarry A.Ch., Martin R., Michel M., Chong-Nguyen C., Roussel R., Straube M., Jegou S., McQuitty C., Le Gall M., da Costa G., Lecornet E., Michaudel Ch., Modoux M., Glodt J., Bridonneau Ch., Sovran B., Dupraz L., Bado A., Richard M.L., Langella P., Hansel B., Launay J-M., Xavier R.J., Duboc H., Sokol H. (2018): Impaired aryl

hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome. *Cell Metabolism* 28, 737–749.

- Novotna A., Pavek P., Dvorak Z. (2011): Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental Science & Technology* 45, 10133–10139.
- Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2007): Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566.
- Ohtake F., Takeyama K., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2003): Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Oshima M., Mimura J., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y. (2007): Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364, 276–282.
- Otarola G., Castillo H., Marcellini S. (2017): Aryl hydrocarbon receptor-based bioassays for dioxin detection: Thinking outside the box. *Journal of Applied Toxicology* 38, 437–449.
- Poland A., Glover E., Kende A.S. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 251, 4936–4946.
- Porta M., Zumeta E. (2002): Implementing the Stockholm Treaty on Persistent Organic Pollutants. *Occupational and Environmental Medicine* 59, 651–652.
- Puga A., Maier A., Medvedovic M. (2000): The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 60, 1129–1142.
- Ramadoss P., Marcus C., Perdew G.H. (2005): Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1, 9–21.

- Ramadoss P., Petrusis J.R., Hollingshead B.D., Kusnadi A., Perdew G.H. (2004): Divergent roles of hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2) in human versus mouse Ah receptor complexes. *Biochemistry* 43, 700–709.
- Ross D., Siegel D. (2017): Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ<sub>10</sub> metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Frontiers Physiology* 8.
- Rothhammer V., Quintana F.J. (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 19, 184–197.
- Sakurai S., Shimizu T., Ohto U. (2017): The crystal structure of the AhRR-ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry* 292, 17609–17616.
- Seidel S.D., Winters G.M., Rogers W.J., Ziccardi M.H., Li V., Keser B., Denison M.S. (2001): Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 15, 187–196.
- Shackleford G., Sampathkumar N.K., Hichor M., Weill L., Meffre D., Juricek L., Laurendeau I., Chevallier A., Ortonne N., Larousserie F., Herbin M., Bièche I., Coumoul X., Beranek M., Baulieu E.-E., Charbonnier F., Pasmant E., Massaad C. (2018): Involvement of Aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 115, 1319–1328.
- Schmidt J.V., Su G.H., Reddy J.K., Simon M.C., Bradfield C.A. (1996): Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93, 6731–6736.
- Sinal C.J., Bend J.R. (1997): Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Molecular Pharmacology* 52, 590–599.
- Smale S.T. (2010): Luciferase assay. *Cold Spring Harbor Protocols* 5, 1–3.
- 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.

- Sul D., Kim H.-S., Cho E.-K., Lee M., Kim H.S., Jung W.-W., Hwang K.W., Park S.-Y. (2009): 2,3,7,8-TCDD neurotoxicity in neuroblastoma cells is caused by increased oxidative stress, intracellular calcium levels, and tau phosphorylation. *Toxicology* 255, 65–71.
- Talaska G., Ginsburg D., LaDow K., Puga A., Dalton T., Warshawsky D. (2006): Impact of Cyp1a2 or Ahr gene knockout in mice: implications for biomonitoring studies. *Toxicology Letters* 162, 246–249.
- Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. (1999): Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 510–515.
- Tomkiewicz C., Herry L., Bui L.-C., Métayer C., Bourdeloux M., Barouki R., Coumoul X. (2013): The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene* 32, 1811–1820.
- Tsay J.J., Tchou-Wong K.M., Greenberg A.K., Pass H., Rom W.N. (2013): Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Research* 33, 1247–1256.
- Vaas S., Kreft L., Schwarz M., Braeuning A. (2014): Cooperation of structurally different aryl hydrocarbon receptor agonists and  $\beta$ -catenin in the regulation of CYP1A expression. *Toxicology* 325, 31–41.
- Vasiliou V., Reuter S.F., Williams S., Puga A., Nebert D.W. (1999): Mouse cytosolic class 3 aldehyde dehydrogenase (Aldh3a1): gene structure and regulation of constitutive and dioxin-inducible expression. *Pharmacogenetics* 9, 569–580.
- Venugopal S., Anwer S., Szászi K. (2019): Claudin-2: roles beyond permeability functions. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 565.
- Vogel C.F., Khan E.M., Leung P.S., Gershwin M.E., Chang W., Wu D., Haarmann-Stemann T., Hoffmann A., Denison M.S. (2014): Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor-kappaB. *Journal of Biological Chemistry* 289, 1866–1875.
- Vyhldalova B., Krasulova K., Pecinkova P., Marcalikova A., Vrzal R., Zemankova L., Vanco J., Travnicek Z., Vondracek J., Karasova M., Mani S., Dvorak Z. (2020): Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the Aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2614.

- Wang Q., Yang K., Han B., Sheng B., Yin J., Pu A., Li L., Sun L., Yu M., Qiu Y., Xiao W., Yang H. (2018): Aryl hydrocarbon receptor inhibits inflammation in DSS-induced colitis via the MK2/p-MK2/TTP pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 41, 868–876.
- Wang S., Ge K., Roeder R. G., Hankinson O. (2004): Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13593–13600.
- Wang S.-H., Liang C.-T., Liu Y.-W., Huang M.-C., Huang S.-C., Hong W.-F., Su J.-G. J. (2009): Crosstalk between activated forms of the aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor. *Toxicology* 262, 87–97.
- Weiss C., Faust D., Schreck I., Ruff A., Farwerck T., Melenberg A., Schneider S., Oesch-Bartlomowicz B., Zatloukalová J., Vondráček J., Oesch F., Dietrich C. (2008): TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A. *Oncogene* 27, 2198–2207.
- Wilson S. R., Joshi A. D., Elferink C. J. (2013): The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 345, 419–429.
- Xing X., Bi H., Chang A.K., Zang M.-X., Wang M., Ao X., Li S., Pan H., Guo Q., Wu H. (2012): SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination. *Journal of Cellular Physiology* 227, 3812–3819.
- Xu C., Li C.Y., Kong A.N. (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* 28, 249–268.
- Yi T., Wang J., Zhu K., Tang Y., Huang S., Shui X., Ding Y., Chen C., Lei W. (2018): Aryl hydrocarbon receptor: a new player of pathogenesis and therapy in cardiovascular diseases. *Biomed Research International* 6058784.
- Zhu K., Meng Q., Zhang Z., Yi Z., He Y., Zheng J., Lei W. (2019): Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy. *Molecular Medicine Reports* 20, 4763–4773.
- Zorlu N., Hoffjan S., Haghikia A., Deyneko I.V., Epplen J.T. (2019): Evaluation of variation in genes of the arylhydrocarbon receptor pathway for an association with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 334, 576979.