

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**KATEDRA BOTANIKY**

**INTERAKCE VYBRANÝCH DERIVÁTŮ  
PŘÍRODNÍCH LÁTEK  
S ARYLUHLOVODÍKOVÝM A  
GLUKOKORTIKOIDNÍM RECEPTOREM**

Bakalářská práce

**Andrea Francúzová**

Biologie B1501, Biologie - Geografie

Prezenční studium

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

**Olomouc 2015**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. za využití pouze citovaných zdrojů.

V Olomouci dne

.....  
Francúzová Andrea

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D. za jeho cenný čas, trpělivost a vedení při vypracování mé práce.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

**Jméno a příjmení:** Andrea Francúzová

**Název práce:** Interakce vybraných derivátů přírodních látek s aryluhlovodíkovým a glukokortikoidním receptorem

**Typ práce:** Bakalářská práce

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

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

**Rok obhajoby:** 2015

**Abstrakt:** Tato práce je zaměřena na monitoring transkripční aktivity vybraných receptorů pod vlivem syntetických derivátů přírodních látek. V první části práce je teoreticky popsána rodina nukleárních receptorů, a signální dráhy obou testovaných receptorů (aryluhlovodíkového – AhR a glukokortikoidního – GR), společně s jejich strukturou a funkcí. Tyto receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory. V praktické části je za pomoci MTT testu zjišťována cytotoxicita syntetických látek a následně jejich schopnost aktivovat nebo inhibovat transkripční aktivitu receptorů, což je měřeno pomocí metody Gene reporter assay. Zatímco pozitivní kontrola dexamethason (DEX) významně aktivoval GR, žádná z testovaných látek GR neaktivovala. Signifikantní inhibice aktivovaného GR byla zaznamenána pro KAC 36 (100  $\mu$ M). V případě AhR byla zaznamenána signifikantní aktivace pro nejvyšší koncentrace testovaných látek, které dosahovaly méně než 10% aktivace pozitivní kontrolou dioxinem – TCDD. Výjimku tvořila látka KAC 36 (50  $\mu$ M), která dosahovala asi 33% aktivace pozitivní kontroly, TCDD. Všechny testované látky vykazaly statisticky významný inhibiční účinek pro dioxinem aktivovaný AhR. I přes nízkou schopnost látky KAC 36 (100  $\mu$ M) inhibovat aktivitu luciferázy (cca o 10 %), lze soudit, že testované látky působí jako parciální agonisté aryluhlovodíkového receptoru.

**Klíčová slova:** GR, AhR, agonistický mód, antagonistický mód

**Počet stran:** 48

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

**Author's name and surname:** Andrea Francúzová

**Title:** An interaction of selected derivatives of natural compounds with arylhydrocarbon and glucocorticoid receptor

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

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

**The presentation year:** 2015

**Abstract:** This work is focused on transcription activity monitoring of chosen receptors influenced by synthetic derivatives of natural compounds. In the first part of this work, there is described superfamily of nuclear receptors and signaling pathways of both receptors (aryl hydrocarbon – AhR and glucocorticoid – GR) including their structure and function. These receptors are ligand-activated transcription factors. The practice part is dedicated to the detection of cytotoxic effects caused by synthetic compounds using the MTT test, followed by detection of their ability to activate or inhibit transcription activity of receptors measured by Gene reporter assay method. While positive control dexamethason (DEX) significantly activated GR, none of tested compounds did. Significant inhibition of activated GR was measured for KAC 36 (100  $\mu$ M). In the case of AhR, significant activation was detected for the highest concentration of tested compounds with less than 10% activation by positive control dioxin - TCDD. The exception was KAC 36 (50  $\mu$ M), which reached approx. 33% activation by positive control – TCDD. All tested compounds demonstrated statistically significant inhibitory effect for AhR activated by dioxin. Despite of low ability of compound KAC 36 (100  $\mu$ M) to inhibit luciferase activity (approx. for 10 %), it is possible to deduce that the tested compounds work as partial agonist of aryl hydrocarbon receptor.

**Keywords:** GR, AhR, agonistic mode, antagonistic mode

**Number of pages:** 48

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>OBSAH</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1. ÚVOD</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>2.1 JADERNÉ RECEPTORY</b> .....   | <b>11</b> |
| 2.1.1 Glukokortikoidní receptor .....  | 12        |
| 2.1.2 Aryluhlovodíkový receptor .....  | 15        |
| <b>2.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA LÁTEK</b> .....                                     | <b>19</b> |
| 2.2.1 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH LÁTEK .....                               | 19        |
| 2.2.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA SYNTETICKÝCH LÁTEK .....                             | 21        |
| 2.2.3 RECEPTORY POD VLIVEM SYNTETICKÝCH LÁTEK.....                             | 22        |
| <b>3 POUŽITÝ MATERIÁL</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>3.1 TESTOVANÉ LÁTKY</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>3.2 BUNĚČNÉ LINIE</b> .....   | <b>25</b> |
| 3.2.1 AZ-GR.....   | 25        |
| 3.2.2 AZ-AhR.....  | 25        |
| <b>3.3 CHEMIKÁLIE</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>3.4 PŘÍSTROJE</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>4. METODIKA PRÁCE</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>4.1 PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>4.2 ZJIŠŤOVÁNÍ CYTOTOXICITY (MTT TEST)</b> .....                            | <b>28</b> |
| <b>4.3 GENE REPORTER ASSAY</b> .....   | <b>30</b> |
| 4.3.1 Příprava vzorků pro měření.....  | 30        |
| 4.3.2 Měření aktivity receptorů .....  | 31        |
| <b>4.4 MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY</b> .....                                    | <b>32</b> |
| <b>5. VÝSLEDKY</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>5.1 CYTOTOXICITA ZKOUMANÝCH SLOUČENIN</b> .....                             | <b>33</b> |
| <b>5.2 INTERAKCE DERIVÁTŮ S GLUKOKORTIKOIDNÍM<br/>        RECEPTOREM</b> ..... | <b>35</b> |
| <b>5.3 INTERAKCE DERIVÁTŮ S ARYLUHLOVODÍKOVÝM<br/>        RECEPTOREM</b> ..... | <b>37</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.4 SLEDOVÁNÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY .....</b> | <b>39</b> |
| <b>6. DISKUSE .....</b>                        | <b>40</b> |
| <b>7. ZÁVĚR .....</b>                          | <b>42</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY: .....</b>        | <b>43</b> |

## SEZNAM ZKRATEK

| Zkratka   | Význam  |
|-----------|---|
| 10-Cl-BBQ | 10-chloro-7H-benzimidazo[2,1-a]benzo[de]Iso-quinolin-7-one                                |
| FFP-3     | 1-Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone   |
| TCDD      | 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzodioxin   |
| 2-Br-BfQ  | 2-bromovaný benzo[f]quinolin  |
| KAC-42-F  | 2-methoxy-8-(1-((5-phenylpyridin-3-yl)methyl) piperidin-4-yl)quinoline                    |
| DMBA      | 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene  |
| KAC-36-F  | 8-(1-((5-(4-fluorophenyl)pyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)quinolin-2(1 <i>H</i> )-one   |
| KAC-62-F  | 8-(1-((5-(cyclopent-1-en-1-yl)pyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-methoxyquinoline      |
| KAC-38-F  | 8-(1-((5-phenylpyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-3,4-dihydroquinolin-2(1 <i>H</i> )-one |
| AF        | Aktivační funkční doména  |
| Arnt      | Aryluhlovodíkový nukleární translokátor   |
| AhR       | Aryluhlovodíkový receptor   |
| AhRR      | Aryluhlovodíkový receptorový represor   |
| AD        | Autonomně transaktivační doména   |
| bHLH      | basic Helix-loop-Helix  |
| AZ-AhR    | Buněčná linie odvozená od lidského hepatocelulárního karcinomu                            |
| AZ-GR     | Buněčná linie odvozená od lidských rakovinových buněk děložního čípku                     |
| CYP       | Cytochrome P450   |
| DEX       | Dexamethason  |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid  |
| DRE       | Dioxin responsivní element  |
| DTT       | Dithiotreitol   |
| DBD       | DNA vazebná doména  |
| DMEM      | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Kultivační médium)                                    |



|          |  |
|----------|--|
| FBS      | Fetal bovine serum                           |
| PBS      | Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)   |
| GR       | Glukokortikoidní receptor                    |
| GRE      | Glukokortikoidní responzivní element         |
| HSP      | Heat shock protein (protein teplotního šoku) |
| HgB      | Hygromycin B                                 |
| LBD      | Ligand vazebná doména                        |
| MEM NEAA | MEM neesenciální aminokyseliny               |
| MeOH     | Methanol                                     |
| MTT      | Methyltetrazoliová sůl                       |
| RU486    | Mifepriston                                  |
| NR       | Nukleární receptor                           |
| PAS      | Per-Arnt-Sim                                 |
| XRE      | Xenobiotický responzivní element             |

## 1. ÚVOD

V moderní době neustále narůstá snaha syntetizovat nové a nové látky, které kombinací vlastností svých podjednotek mohou nacházet využití především ve farmaceutickém průmyslu. Tyto syntetické látky mohou ovlivňovat organismus mnoha způsoby a je potřeba zjistit, jestli skutečně některým z nich ovlivňují pochody v těle. Jednou z cílových skupin těchto látek mohou být ligandem aktivované transkripční faktory.

Tato práce se věnuje dvěma takovýmto faktorům, a to aryluhlovodíkovému a glukokortikoidnímu receptoru, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi organismu, udržování homeostázi a v mnoha dalších fyziologických dějích. V kontextu s dalšími vlastnostmi látek může být požadována aktivace, ale také inhibice receptorů. Zároveň je důležitým požadavkem u těchto látek eliminovat jejich negativní účinky.

Nejen omezenost přírodních zdrojů ale v některých případech také jejich těžká dostupnost nebo přímá využitelnost vedou k rostoucímu významu syntetických látek. Současně je ale kladen velký důraz na důvěryhodnou analýzu těchto látek na živý organismus tak, aby jejich vliv měl veskrze pozitivní charakter, zatímco negativní vlivy je nutno eliminovat a pokud možno zcela vyloučit. Dalším z důvodů zvyšující se poptávky po syntetických látkách je, že kombinace vlastností jedné syntetizované látky může pokrýt množství vlastností, které by jinak bylo potřeba získat z více přirozených látek. Neposledním faktorem jejich preference může být nižší cena oproti analogicky působícím látkám, které se v přírodě v přirozené formě vykytují.

Vzhledem k tomu, že se jedná o látky nově syntetizované a neprozkoumané, není znám jejich vliv na organismus a tedy ani základní informace o jejich toxicitě. Cílem práce je zjistit, zda na buňky působí cytotoxicky a následně jejich schopnost aktivovat nebo inhibovat receptory.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 JADERNÉ RECEPTORY

Jaderné, neboli nukleární receptory (NR) tvoří třídu ligandem aktivovaných transkripčních faktorů, které když jsou navázány na specifické sekvence DNA, slouží jako zapínače/vypínače pro transkripci v buněčném jádře (Kozstin, 2005). Jedná se o jednu z nejširších tříd transkripčních regulátorů u živočichů (Rechavi et al., 2003). Lidských jaderných receptorů je známo 48 a tyto receptory se podílejí na růstu buněk, vývoji, homostázi a dalších biologických pochodech. Také hrají zásadní roli v případě některých poruch a onemocnění, jako jsou rakovina či metabolická a proliferativní onemocnění (Pawlak et al., 2014)

Členové této skupiny receptorů obsahují N-terminální transaktivační doménu (A/B doména), která je velmi variabilní a obsahuje alespoň jednu přirozeně aktivní transaktivační oblast (AF-1) a několik autonomních transaktivačních domén (AD) (Rechavi et al., 2003). Dále obsahují vysoce konzervovaný zinkový prst jako oblast DNA vazebné domény (DBD) variabilní konzervovanou oblast ligand vazebné domény (LBD) a proměnnou C-koncovou oblast (Kozstin, 2005). Receptor poskytuje přímou vazbu mezi signální molekulou, která řídí transkripční proces, a transkripční odpovědí (Rechavi et al., 2003).

Rozlišujeme 2 typy nukleárních receptorů.

**Typ I – steroidní receptory**, jejichž ligandem je steroidní hormon. V nepřítomnosti hormonu se nachází v komplexu s heat shock proteiny (např. Hsp90), které mají za úkol udržet receptor inaktivní, udržet jeho strukturu a umožnit snadnější navázání ligandu (Vrzal et al., 2004). Do této skupiny patří glukokortikoidní receptor (GR), estrogenový receptor (ER), androgenový receptor (AR) a další (Kaur et al., 2015).

**Typ II – nesteroidní receptory**, které po navázání ligandu heterodimerizují s retinoidním X receptorem (RXR). Před navázáním ligandu jsou receptorové heterodimery v jádru v komplexu především s histondeacetylázami, kterým udržují cílovou DNA v těsně navinuté konformaci a brání vystavení transaktivačním faktorům. Do této skupiny patří receptor thyroïdního hormonu (THR), receptor vitamínu D (DR) a další (Sipes et al., 1997, str.178).

Vyskytují se receptory, u kterých stále není znám jejich fyziologický endogenní ligand. Tyto receptory se nazývají orphan receptory, v překladu receptory sirotčí.

NR vážou malé molekuly, které mohou být nahrazeny strukturními analogy, jako např. léčivý. Tím je možno řídit funkce spojené s různými nemocemi (osteoporóza, rakovina, cukrovka apod.), což je farmakologickým cílem (Rechavi et al., 2003).

### **2.1.1 Glukokortikoidní receptor**

Glukokortikoidní receptor (GR) je členem podskupiny jaderných hormonálních receptorů (společně s receptory thyroidního hormonu, mineralokortikoidního, estrogenového a progesteronového) (Marketon & Sternberg, 2010). Tento receptor se nachází ve všech tkáních a reguluje genovou expresi specifickým způsobem pro jednotlivé buňky (Dvořák & Pavek, 2010).

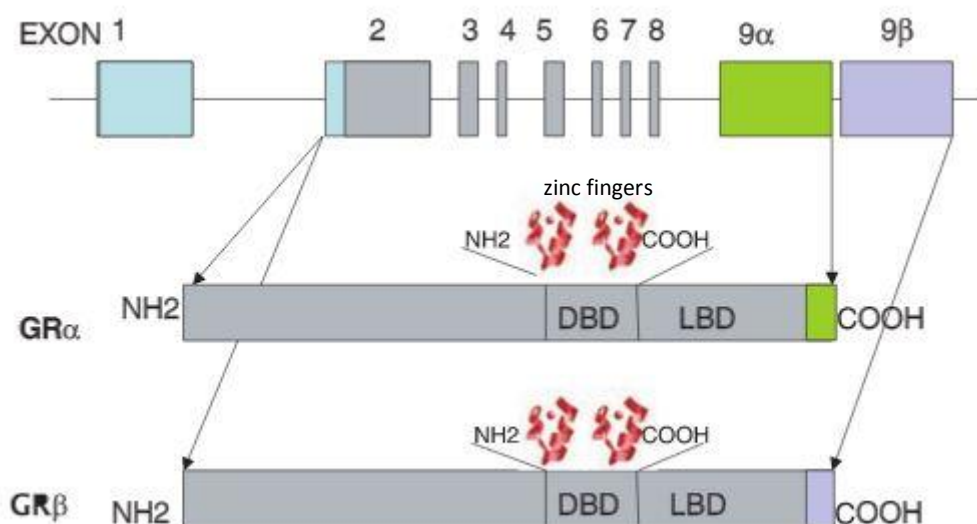
#### **2.1.1.1 *Struktura a stavba receptoru***

Gen pro GR je lokalizován na chromosomu 5q31-32 a skládá se z 9 exonů (Obr. 1). Existuje v řadě sestřihů a podle těchto sestřihů jsou rozlišeny jednotlivé isoformy GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\delta$  a GR $\gamma$ . Funkce posledních 2 ale nejsou stále jisté (McMaster & Ray, 2007). Všechny isoformy jsou generovány z jednoho genu a jedné RNA v alternativních sestřizích (Dvořák & Pavek, 2010).

GR $\alpha$  je transkripčně aktivní isoforma, která váže glukokortikoidy (Novotna et al., 2012). Jedná se o hlavní produkt GR genu (NR3C1) a skládá se ze 777 aminokyselin (Dvořák & Pavek, 2010). Oproti tomu GR $\beta$  neváže ligandy a inhibuje genovou transkripci zprostředkovanou GR $\alpha$  (Novotna et al., 2012), čímž působí jako inhibitor kortikosteroidních účinků a tím se podílí na definování citlivosti cílové tkáně na kortikosteroidy (Dvořák & Pavek, 2010).

GR se stejně, jako všechny steroidní receptory, skládá z několika domén. Tvoří jej imunogenní N-terminální doména, vysoce konzervativní centrální DNA vazebná doména (DBD) se dvěma zinkovými prsty a C-terminální ligand (hormon) vazebná doména (LBD) (McMaster & Ray, 2007; Dvořák & Pavek, 2010). N-terminální doména představuje na hormonu nezávislou aktivační funkční doménu (AF1), která je důležitá při hledání regulačních faktorů, jež jsou důležité v kontrole genové exprese, kterou mohou regulovat pozitivně nebo negativně. Zinkové prsty tvořící DBD jsou důležité v receptorové dimerizaci, jaderné translokaci a pro navázání na glukokortikoidní responsivní element

(GRE) a následnou transaktivaci. LBD se váže na heat shock proteins (HSP), což vede k otevření steroid-vazebné štěrbině a umožňuje steroid navázat do hydrofobní „kapsy“. Tím je indukována konformační změna v hormonálně podmíněné aktivační funkční doméně (AF2) a to umožňuje interagovat s koaktivátory (McMaster & Ray, 2007).



**Obr. 1** Struktura glukokortikoidního receptoru (regiony exonů, které jsou přeloženy, jsou označeny šedými boxy a odlišné isoformy jsou označeny odlišnými barvami - odlišné isoformy jsou tvořeny alternativními sestřihy exonu 9) (převzato z: McMaster & Ray, 2007).

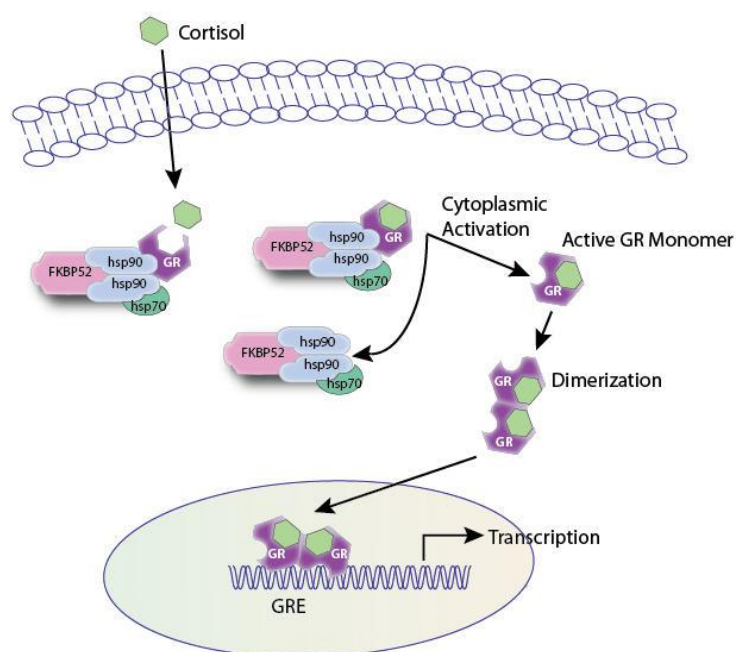
### 2.1.1.2 Aktivace

V nepřítomnosti ligandu, tedy v neaktivní formě, se receptor nachází v cytosolu cílových buněk v komplexu s chaperonovými proteiny, zahrnujícími zejména proteiny teplotního šoku (HSP) hsp90 a hsp70 (Dvořák & Pavek, 2010). Tento komplex je stabilizován interakcí proteinů a udržuje vysokou afinitu receptoru vůči svému ligandu. Molekula GRα na sebe naváže glukokortikoid. Po tomto navázání nastane konformační změna komplexu receptor-ligand, čímž dojde k uvolnění z proteinového komplexu od HSP a molekula receptoru vytváří homodimer s další molekulou GRα (McMaster & Ray, 2007). Takto aktivovaný receptor interaguje s importním translokačním systémem a jde skrz jaderný pór do jádra, kde reguluje genovou expresi (Obr. 2). V jádře se váže na glukokortikoidní responsivní element (GRE) a poté verbuje koaktivátory na DNA, aby se započala transkripce genu (McMaster & Ray, 2007).

Receptory se spojí s cílovým chromatinem, čímž dojde k jeho přeměně. Dochází k transaktivaci promotorů citlivých na glukokortikoidy. Shromáždí se na něm makromolekulární komplexy, které způsobí, že se jeho struktura stává otevřenější

a podporuje další složité sestavy, což vede k přijímání RNA polymerázy II a zahájení transkripce genu (McMaster & Ray, 2007). Poté následuje post-transkripční proces, proteinová translace, posttranslační proces genu a závěrem na proteasomu závisící proteinová degradace receptoru. Všechny tyto procesy se diferencovaně podílejí na regulaci CYP enzymů metabolizujících léky (Dvořák & Pavek, 2010).

GR transkripčně ovládá široké spektrum genů, jako jsou cytokiny, enzymy, receptory, nebo transkripční faktory, kterými jsou např. nukleární faktor kappa B (NF-kappaB), aktivátor protein-1 (AP-1) nebo transformační růstový faktor (TGF). Jejich funkce může být upravena mnohými post-translačními modifikacemi (fosforylace, ubikvitinace apod.) (Dvořák & Pavek, 2010; Kino, 2010).



**Obr. 2 Mechanismus navázání ligandu a zahájení transkripce prostřednictvím GR** (ligand projde membránou a naváže se na receptor, dojde k rozvolnění multiproteinového komplexu, homodimerizaci s druhým GR a transportu do jádra, kde po navázání na GRE je zahájena transkripce příslušného genu) (převzato z: Lund, 2009)

### 2.1.1.3 *Ligand*

Ligand je molekula, která se navazuje na receptor a spouští kaskádu dějů. Může se jednat o hormon, lék apod. Nejvýznamnějšími ligandy glukokortikoidního receptoru jsou glukokortikoidy. Endogenní glukokortikoidy, tedy tělu vlastní přirozené ligandy, ovládají nesčetné množství buněčných a tkáňově specifických funkcí, zejména metabolismus (homeostáza glukózy, proteinů, lipidů, sacharidů), imunitní a zánětlivé regulace, centrální nervovou soustavu (náladu, poznávání, spánek) a programovanou

buněčnou smrt – apoptózu (Dvořák & Pavek, 2010). Jedná se o steroidní hormony syntetizované v kůře nadledvin. Jsou pod kontrolou hypotalamo-hypofýzární-nadledvinové (HPA) osy a jsou produkovány v reakci na stresové faktory, jako jsou patogeny, toxiny i trauma (Dvořák & Pavek, 2010).

Nejdůležitějším fyziologickým ligandem lidského GR je kortizol (Novotna et al., 2012). Fyziologická hladina tohoto hormonu v krvi vykazuje cirkadiánní rytmus - nejvyšší hladiny nastávají v časných ranních hodinách a nejnižší kolem půlnoci. Hladina kortizolu hraje roli při mnohých onemocněních, včetně infekce a deprese a ve spojení s psychickým stresem. Chronicky zvýšená hladina hormonu kortizolu bývá také spojována s mnohými variantami patogenních procesů, včetně imunosuprese a insulinové resistance (Dvořák & Pavek, 2010).

Kromě přirozených glukokortikoidů bylo vyvinuto velké množství exogenních syntetických glukokortikoidů ve farmaceutickém průmyslu, které jsou díky svým vlastnostem využívány pro léčbu autoimunitních a zánětlivých onemocnění (např. alergie, astma, revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, systémový lupus, lupénka) a dalších. Jedná se tedy o hojně využívané léky (Dvořák & Pavek, 2010). Příkladem exogenních ligandů jsou dexamethason (DEX), beklomethason, triamcinolone a další (Novotna et al., 2012).

### **2.1.2 Arylhydroxidový receptor**

Arylhydroxidový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor interagující s příslušnými elementy, které jsou umístěné na 5'konci DNA a regulují promotory vedoucí ke zvýšení transkripce mnoha genů, včetně těch, aktivujících cytochromy P450 (Burbach et al., 2004). AhR řídí transkripci širokého spektra strukturně nepříbuzných genů (Vrzal et al., 2004). AhR byl prvním objevených xenoreceptorem, též nazýván dioxinovým receptorem, protože je aktivován polyaromatickými uhlovodíky a dioxinovými sloučeninami. Nejedná se ovšem o pravý receptor, ale náleží do basic helix-loop-helix/Par-Arnt-Sim (bHLH/PAS) skupiny transkripčních faktorů (Dvořák & Pavek, 2010). Skupina bHLH/PAS je nadčeleď dimerních transkripčních faktorů vyskytujících se téměř u všech eukaryot. Tyto regulátory mají funkci v kritických vývojových procesech, včetně určení pohlaví a vývoji nervového systému a svalů (Jones, 2004).

AhR se nachází v různých lidských tkáních. Nejvyšší úroveň exprese AhR mRNA je v játrech, ledvinách a plicích, nízká úroveň exprese je v mozku, ledvinách a kosterním svalstvu. Přítomnost byla také zaznamenána i v placentě (Jiang, 2010).

Tento receptor je stěžejním faktorem v metabolismu léčiv (Novotna et al., 2011) a hraje důležitou roli v řadě endogenních funkcí, jako je buněčný cyklus a proliferace, podněcování tvorby tumoru, imunitní odpověď, cirkadiánní rytmy, kontrola exprese genů metabolismu lipidů a také působí jako ubikvitin E3 ligáza v procesu degradace proteinů (Dvořák & Pavek, 2010).

#### 2.1.2.1 **Stavba a struktura**

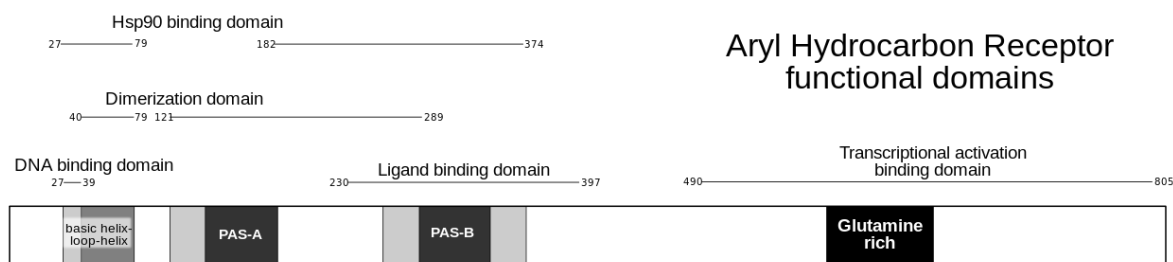
Lidský AhR je lokalizován na 7 chromosomu. Je zde 12 exonů, které kódují 848 aminokyselin dlouhý protein s teoretickou hmotností 96 147 Da (Vrzal et al., 2004).

Jak již bylo zmíněno, jedná se o zástupce bHLH/PAS skupiny. Motiv bHLH je lokalizovaný v N-terminální oblasti a má dvě vysoce konzervované a funkčně odlišné domény, které společně tvoří oblast přibližně 60 aminokyselinových zbytků (Jones, 2004). Krajiní amfipatická  $\alpha$ -šroubovice je základní doména, která se váže do DRE do DNA na hexanukleotidovou sekvenci označovanou jako E box. Doména HLH usnadňuje interakci s dalšími proteinovými jednotkami za vzniku homo- a heterodimerických komplexů (McMaster & Ray, 2007; Jones, 2004). Mezi doménami se nachází spirálovité smyčky (Vrzal et al., 2004).

PAS doména se nachází na C-terminální oblasti od bHLH. Tato doména má délku 260-310 aminokyselin (Jones, 2004). PAS domény obratlovců jsou poskládány ze dvou velmi obdobně složených oblastí zhruba 110 aminokyselin (Goryo et al., 2007), které jsou odděleny cca 150 aminokyselinovými zbytky, a označují se PAS-A a PAS-B (Jones, 2004). Fungují, společně s bHLH jako dimerizační motivy (Goryo et al., 2007). Kromě toho interagují s Hsp90 a PAS-B doména má funkci vazby cizorodých ligandů (Vrzal et al., 2004; Goryo et al., 2007).

Ligand vázající doména (LBD) se nachází v sekvenci 230-431 aminokyselin od N-terminálního konce. Částečně se překrývá s vazebným místem pro Hsp90 (Obr. 3) (Vrzal et al., 2004).





**Obr. 3** Struktura Arylhydrovodíkového receptoru (Dahl, 2015)

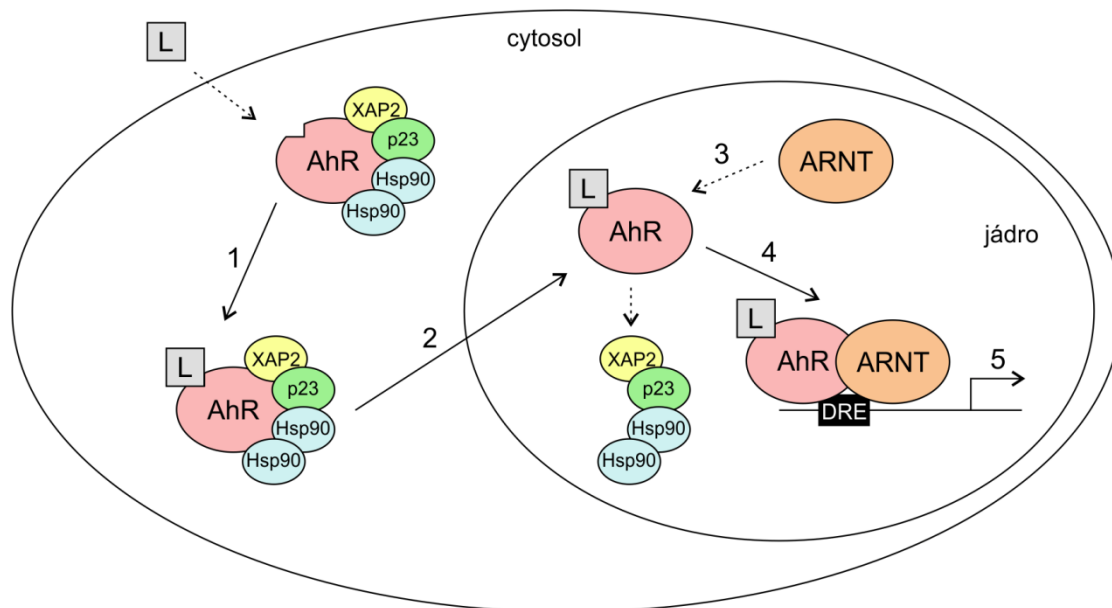
### 2.1.2.2 *Aktivace*

V klidovém stavu, bez ligandu, se AhR, stejně jako GR, nachází asociovaný v cytosolu (Coumailleau, et al, 1995) v multiproteinovém heterotetramerním komplexu (Kumar, 2001). Tento komplex zahrnuje 2 molekuly Hsp90 chaperonů (proteiny teplotního šoku 90 kDa), AhR asociovaný-protein XAP2 (Fujisawa et al., 2013) (také označovaný AIP nebo ara9) a p23 (ko-chaperonový protein 23 kDa) (Denison et al., 2002). Hsp90 je chaperonový proteinový systém, který udržuje receptor v konformaci, která usnadňuje vazbu ligandu a zároveň zabraňuje předčasné transkripční aktivaci. Ko-chaperonový protein p23 je zapojen do správného skládání a stabilizace AhR (Vrzal et al., 2004).

Vazba ligandu vede k vyvolání konformační změny AhR a předpokladem je, že způsobuje expozici jaderného lokalizačního signálu a umožňuje nukleární translokaci AhR s navázaným ligandem (Goryo et al., 2007). Vazbou ligandu zároveň dochází po translokaci do jádra ke shození Hsp90 a XAP2 (Kumar, 2001). Po přesunu dochází k heterodimerizaci s jiným bHLH/PAS proteinem – nukleární translokátor Ah receptoru (ARNT) (Obr. 4) (Kumar, 2001). Tento heterodimerický komplex se váže na specifické oblasti DNA, které se označují dioxin/xenobiotic responsivní elementy (DRE/XRE), čímž spouští genovou expresi (Vrzal et al., 2004) a je aktivována transkripce např. CYP1A1, CYP1A2 a AhRR (Fujisawa et al., 2013).

Po vystavení ligandu a nukleárním transportu je AhR protein degradován. AhR obsahuje jaderný exportní signál (NES), který je důležitý pro odstranění receptoru z jádra. Po exportu zpět do cytoplazmy je receptor rozložen kalpainy a proteazomovým systémem (Maryam Ghotbaddini, 2014). AhR reguluje expresi Ah receptorového represoru (AhRR), který se nachází v jádře. Je schopný komunikovat s ARNT, ale dimery těchto proteinů nejsou transkripčně aktivní. Slouží tedy jako negativní zpětná vazba pro AhR (Vrzal et al., 2004).

AhR reguluje geny zahrnuté do metabolismu léčiv (Novotna et al., 2011). Cílové geny tohoto receptoru zahrnují rodinu genů cytochromů P450-1 (CYP1), které kódují enzymy zodpovědné za aktivaci chemických karcinogenů. Aktivace AhR vede k indukci CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 genů, které kódují enzymy metabolizující polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) do mutagenních meziproductů (Maryam Ghotbaddini, 2014).



**Obr. 4 Schéma aktivace AhR** (1. Vazba ligandu 2. Translokace do jádra 3. Heterodimerizace 4. Navázání na DRE/XRE 5. Expres příslušného genu) (Vlastní vyhotovení na základě informací uvedených v textu)

### 2.1.2.3 *Ligand*

AhR je členem skupiny orphan (sirotčích) receptorů, což znamená, že dodnes nebyl identifikován žádný fyziologický endogenní ligand. Jeho existence je ovšem podporována různými pozorováními, která odhalují reakce AhR-dependentní odpovědi, aniž by byl přítomen exogenní ligand (Vrzal et al., 2004).

I přesto má tento receptor velké množství endogenních i exogenních ligandů. Ty mají lipofilní charakter (Novotna et al., 2011), díky čemuž vstoupí do buňky prostou difúzí (Goryo et al., 2007). Nejvýraznější charakteristikou ligandů je, že jsou to organické molekuly s planárními aromatickými kruhy (Goryo et al., 2007). Mezi endogenní ligandy jsou řazeny bilirubin, biliverdin, indirubin, indol, deriváty tryptofanu a deriváty kyseliny arachidonové. Exogenních ligandů je velké množství. Mezi syntetickými se jedná zejména o dioxiny (často je AhR také nazýván dioxinový receptor (Coumailleau, et al, 1995)), polycyklické aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované

aromatické sloučeniny. Z přírodních látek jsou to resveratrol, berberin, flavonoidy apod. (Novotna et al., 2011). Největší expozice AhR ligandů pochází z potravy. Jako slabé AhR ligandy působí přirozeně se vyskytující složky (flavonoidy, karotenoidy, fenoly). V poslední době byly také nalezeny v extraktech z celé řady různých druhů ovoce, zeleniny, bylin a čajů (Vrzal et al., 2004).

Jeden z nejdůležitějších agonistů AhR je TCDD (2,3,7,8-tetrachloro-dibenzodioxin) – prototyp velké rodiny vysoce toxických kontaminantů přírodního prostředí (Burbach et al., 2004). Dalším typickým AhR ligandy jsou PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky). Oba ligandy vyvolávají množství toxických efektů, včetně rakoviny, imunosuprese a narušení endokrinního systému (Vrzal et al., 2004).

Klasické exogenní ligandy AhR jako je TCDD, 3-methylcholanthren (3-MC) apod. sdílí několik společných strukturních rysů – jsou hydrofóbní, planární nebo ko-planární molekuly polycyklické struktury. I přesto je několik nepolycyklických a neplanárních látek (např. omeprazole, thiabendazole), které také aktivují AhR, ačkoliv velmi slabě (Vrzal et al., 2004).

## **2.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA LÁTEK**

Struktury, které jsou součástí syntetických sloučenin testovaných v rámci této bakalářské práce, vykazují určitou biologickou aktivitu a to jak ve své přirozené formě vyskytující se v přírodě, zejména v rostlinách, tak jako součást nově syntetizovaných sloučenin. Vzhledem k tomu, že součástí těchto sloučenin jsou stále se opakující heterocykly quinolin, piperidin a pyridin, bude následující text věnován těmto strukturám.

### **2.2.1 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH LÁTEK**

Quinolin (chinolin) se získává izolací z kůry stromu chinovníku. Tento vždyzelený strom rostoucí například v Andách nebo Indonésii umožňuje izolaci mnoha alkaloidů, z nich několik je derivátů quinolinu, konkrétně se jedná např. o chinin, chinidin, cinchonin a cinchonidin. Chinin a cinidin nachází terapeutické uplatnění. Chinin svým přímým působením na centrální nervovou soustavu má antipyretické, analgetické, lokálně anestetické i sympatikolytické vlastnosti a zvyšuje citlivost dělohy na dráždění. Také působí jako protoplazmatický jed a brzdí fermentativní životní procesy, díky čemuž se uplatňuje při odstraňování původců infekčního onemocnění (např. malárie). Druhou terapeuticky využívanou látkou je chinidin, který mimořádně silně působí na srdeční sval

a díky tomu bývá aplikován při srdeční arytmii a tachykardii. Rostlina také bývá pro svůj obsah alkaloidů složkou chinové tinktury (Kresánek & Krejča, 1977, str. 664).

Alkaloidy quinolinových derivátů se také nachází v routě vonné, která byla pro své schopnosti využívána již ve starověku. Tato rostlina působí spasmolyticky, díky čemuž nachází uplatnění při dysmenorrhoei (bolestivé menstruaci), žaludečních bolestech nervového původu či jako choleretikum (zvyšuje vylučování žluči). Mimo to má také silné sedativní účinky. Kromě vnitřního užití se používá také na hojení ran, při kožních chorobách nebo se také přidává do přípravků na ovlivnění akomodačních schopností očí (Kresánek & Krejča, 1977, str. 530).

Deriváty pyridinu nalezneme v přírodě v mnoha formách. Skočec obecný je rostlina, kterou již staří Egypťané využívali pro léčebné účely a olej z této rostliny využívali pro hojení ran. Stejně tak Řekové používali olej jako lék pro zevnější užití. Tato rostlina obsahuje ricin, který je vysoce toxický. Lisováním semen za studena ovšem se získává ricinový olej, který je třeba ještě převarit s vodou pro odstranění toxických bílkovin apod. Tento olej má následně mnohé využití. Mimo jiné se využívá jako pokrmový olej nebo v kosmetice. Jeho vliv na organismus je ovšem působení jakožto laxativum v tenkém střevě, díky čemuž je používán jako kvalitní projímadlo (Kresánek & Krejča, 1977, str. 514).

Známým derivátem pyridinu je nikotin, který se nachází v listech tabáku a působí na cholinergní nervy, tedy na takové, kde jako mediátor působí acetylcholin a navozuje akční potenciál. Cholinergní synapse se nachází u obratlovců a to ve všech excitačních nervosvalových spojeních a na mnoha dalších místech v nervové soustavě (Stuart, 1987, str. 63; 8, str. 1307).

Významným derivátem pyridinu je vitamín B6, nebo také pyridoxin (Vodrážka, 2002, str. 192). Tento vitamín se podílí na mnoha metabolických funkcích a pomáhá v metabolismu bílkovin, tuků i sacharidů. Je kofaktorem mnoha enzymatických reakcí (Abdulmajeed et al., 2015; Kim & Cho, 2014), má zásadní roli v normálním fungování a vývoji mozku (Albersen et al., 2015) a podílí se i na zdraví kostí (Fratoni & Brandi, 2015). Působí jako terapeutické činidlo při léčbě diabetu mellitu, epilepsii a kardiovaskulárních onemocněních (Abdulmajeed et al., 2015), vykazuje vysoké antioxidační účinky a je také účinný hydroxylový radikál (TAŞ et al., 2014). Nachází se například ve fazolích, obilovinách nebo hnědé rýži (Kim & Cho, 2014).

Piperidin se nachází v černém pepři, ovšem jen v malém množství. V léčitelství se moc nevyužívá, příležitostně ovšem jako stomachika (podporuje chuť k jídlu) (Kresánek & Krejča, 1977, str. 675).

## 2.2.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA SYNTETICKÝCH LÁTEK

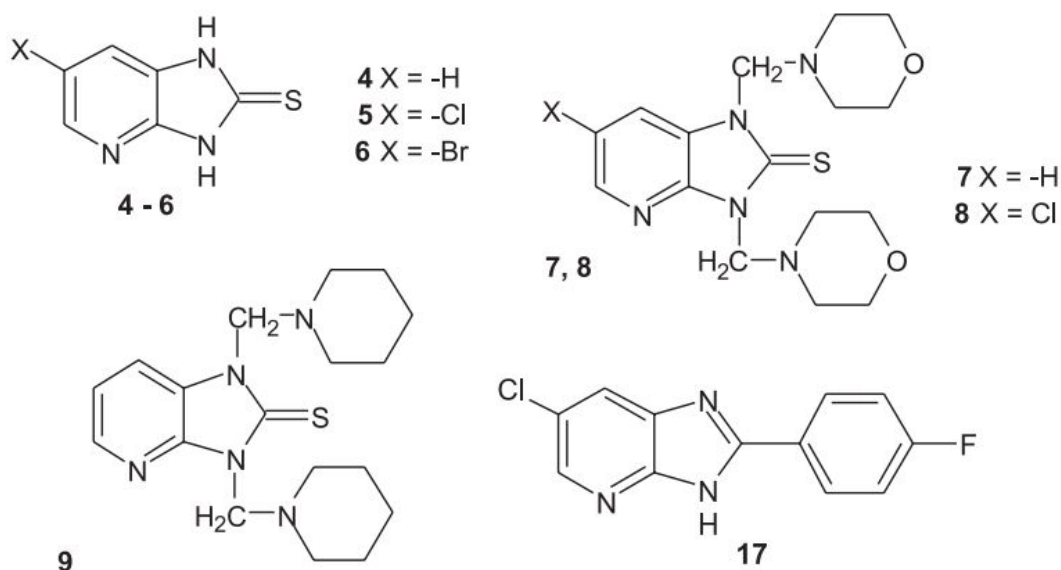
Deriváty pyridinu, piperidinu a quinolinu jsou často vyhledávány pro mnoho ze svých účinků. Modifikací phenothiazinů záměnou benzenových jader byly syntetizovány anaphenothiaziny, což jsou typy obsahující heterocyklické kruhy pyridinu nebo quinolinu. Některé z těchto látek prokázaly imunopresivní a protirakovinné účinky u deseti typů lidských rakovinových buněčných linií. Mimo to byla naměřena také vysoká antioxidační aktivita (Jeleň et al., 2015).

Deriváty pyridinu mají inhibiční účinky na bakterie a plísňe. Tyto deriváty se tedy využívají jako desinfekce. Pyridiniové soli se nachází např. v očních kapkách jakožto desinfekce, cetylpyridiniová sůl se využívá jako ochranný prostředek proti nemoci z potravin, jako je salmonela, nebo snižuje bakteriální kontaminaci u drůbeže, masa, ryb, čerstvého ovoce a zeleniny (Marek et al., 2015; Rodriguez-Mortales et al., 2005).

Quinolin a jeho deriváty mají mnoho rozmanitých chemických a farmakologických vlastností. Kupříkladu chinin se využívá pro léčbu malárie. Jiné látky obsahující quinolin vykazují protizánětlivé účinky (Saadatmandzadeh, 2014).

Také heterocykly s piperidinovou kostrou jsou atraktivní cíle organické syntézy vzhledem k jejich farmakologické aktivitě a širokému výskytu v přírodě. Piperidiny a jejich deriváty představují základní jednotku širokého spektra alkaloidů a biologicky aktivních látek. Na základě toho tvoří piperidinové jádro základ mnoha molekul léčiv, jako jsou antihistamika, antibakteriální léčiva nebo antituberkulotika (Elavarasan et al., 2014).

Další biologická aktivita jedné z těchto látek je pozorovatelná u imidazol[4,5-b]pyridinových derivátů, mezi nimiž se nachází Noberastin (antihistaminikum), Sulmazole (antagonista receptoru pro adenosin), jež se využívá jako lék zvyšující srdeční činnost (EMBL-EBI, 2015) nebo Tetanoprazol u kterého byla zjištěna proti vředová aktivita a inhibice protonové pumpy. Mnoho dalších derivátů imidazol[4,5-b]pyridinu má antidepresivní, protirakovinné, antimikrobiální účinky, nebo mohou být využity při léčbě diabetu a hyperlipidémie, případně při neurodegenerativních poruchách, jako je například roztroušená skleróza (Nowicka, 2015).



**Obr. 5** Příklady strukturálních vzorců derivátů pyridinu (4 antidepresivní účinky, 5 + 6 – protirakovinné účinky, 7 + 8 – antimikrobiální aktivita, 9 – možnost léčby diabetu, 17 – antibakteriální vliv) (převzato z Nowicka, 2015)

Tetrazole[5'1':2,3] [1,3,4]thiadezapino[7,6-b]**quinoline** působí jako inhibitor aldózových reduktáz, čímž působí pozitivně při komplikacích diabetu (Jeleň et al., 2015).

### 2.2.3 RECEPTORY POD VLIVEM SYNTETICKÝCH LÁTEK

Některé z derivátů quinolinu, pyridinu i piperidinu byly testovány na GR, AhR nebo i na jiný receptor.

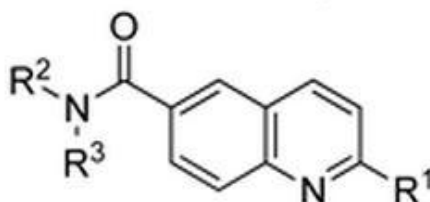
Mezi benzopyrano-quinolinovými deriváty byl 10-methoxy-5-(2-propenyl)-2,5-dihydro-2,2,4-trimethyl-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]**quinoline** (AL-438) objeven jako silný agonista s vysokou specifitou ke GR v *in vitro* podmínkách. Specificita byla testována pokusem o navázání na progesteronový receptor, ke kterému byla afinita velmi nízká (Chopra, 2009). Derivát quinolinu se ukázal ve více případech jako agonista GR. [(5Z)-5-[(2-fluoro-3-methylphenyl)methylene]2,5-dihydro-10-methoxy-2,2,4-trimethyl-1H-(1)benzopyrano[3,4-f]**quinolin-9-ol**] (LGD-5552) se účinně váže na receptor a silně potlačuje expresi zánětlivých genů. Vedlejší účinky této látky jsou v porovnání s glukokortikoidy téměř zanedbatelné a může poskytovat bezpečnější terapeutické okno (López et al., 2008).

V případě aryluhlovodíkového receptoru působily deriváty quinolinu taktéž agonisticky. Důkazem bylo testování aza-polycyklických aromatických látek, z nichž nejvyšší agonistickou aktivitu vykazoval 2-bromovaný benzo[f]**quinolin** (2-Br-BfQ)

(Saeki et al., 2008). Silný AhR ligand je 10-chloro-7H-benzimidazo[2,1-a]benzo[de]Iso-**quinolin**-7-one (10-Cl-BBQ), který není cytotoxický vůči proliferujícím T buňkám a může být využit k léčbě imunitních onemocnění (Punj et al., 2014).

1-Furan-2-yl-3-**pyridin**-2-yl-propenone (FFP-3) je necytotoxickým antagonistou AhR. Tato látka má chemopreventivní vliv na DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene) indukovanou genotoxicitu. FFP-3 inhibuje genovou expresi a enzymovou aktivitu CYP1A1 a CYP1B1, které jsou indukovány právě DMBA. Tato sloučenina zároveň inhibuje translokaci AhR do jádra (Hwang et al., 2008). V případě GR nebyla aktivita pozorována.

Pro piperidin nebyly nalezeny žádné záznamy ohledně jejich aktivace či inhibice GR nebo AhR. Deriváty této látky ovšem ovlivňují jiné receptory. Byla měřena antagonistická aktivita série 2-amino a 2-methoxy quinoline-6-karboxamid derivátů na metabotropní glutamátový receptor typu 1 (mGluR1). Z testovaných sloučenin jich 13 vykázalo již při koncentraci 10 $\mu$ M inhibiční hodnoty vyšší než 40 %. Významný vliv na inhibiční aktivitu měl N-Ethyl-2-(**piperidin**-yl)**quinoline**-6-karboxamid a to 76,6 %. Za tuto významnost může hydrofobní cyklický amid (R1 – v tomto případě piperidin) a malá velikost sekundárního amidu (R2 – v tomto případě ethyl + R3 – v tomto případě vodík)(Kim et al., 2014).



Obr. 6 Struktura 2-substitovaných quinolin-6-karboxamidů (Převzato z Kim et al., 2014)

Další receptorové ovlivnění vykazuje (3R)-7-hydroxy-N-[(1S)-1-[[[(3R,4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dimethyl-1-**piperidin**yl]methyl]-2-methoxypropyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3-**isoquinolin**-carboxamid (JDTic). Tato látka je vysoce afinitní ke Kappa-opioidnímu receptoru ( $\kappa$ R), jehož vysoká exprese je lokalizovaná v části mozku spravující emoční a stresovou odpověď. JDTic jako selektivní antagonist tohoto receptoru blokuje stresem vyvolanou odpověď chování. Má ovšem dlouhodobý účinek (dávka působí až 21 dní) a byly u něj objeveny negativní účinky, hledá se tedy alternativa bez nepříznivých účinků a s krátkodobým účinkem, která by mohla být potenciálním lékem pro mnoho psychických chorob (Casal-Domingues et al., 2014).

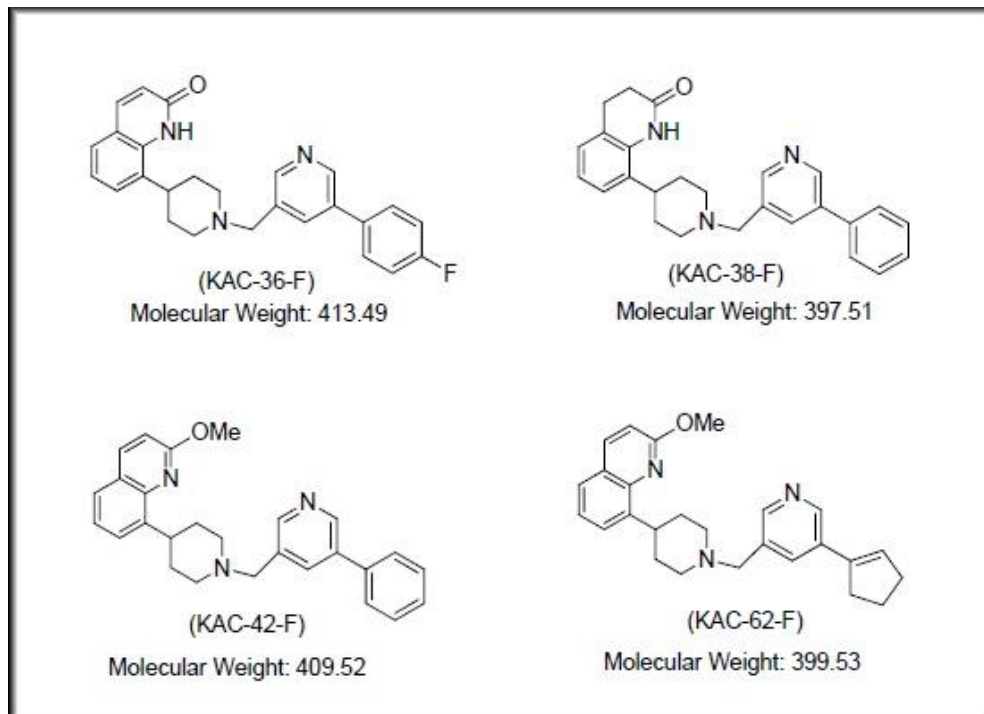
### 3 POUŽITÝ MATERIÁL

#### 3.1 TESTOVANÉ LÁTKY

V této práci jsou testovány 4 synteticky vytvořené látky (Obr. 7), které byly poskytnuty doktorem Nisar Ullahem ze Saudské Arábie. Látky byly testovány na schopnost ovlivnit aktivitu vybraných receptorů. Deriváty jsou složeny z heterocyklických sloučenin a součástí všech je piperidin, pyridin, quinolin a mimo heterocykly také alkanový zbytek methyl.

Testované deriváty jsou označeny zkratkami.

- KAC-36-F 8-(1-((5-(4-fluorophenyl)pyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)quinolin-2(1H)-one
- KAC-38-F 8-(1-((5-phenylpyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one
- KAC-42-F 2-methoxy-8-(1-((5-phenylpyridin-3-yl)methyl) piperidin-4-yl)quinoline
- KAC-62-F 8-(1-((5-(cyclopent-1-en-1-yl)pyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-methoxyquinoline



Obr. 7 Chemický vzorec testovaných derivátů.



## **3.2 BUNĚČNÉ LINIE**

### **3.2.1 AZ-GR**

Pro možnost testování reakce GR na syntetické látky vznikla potřeba vytvoření spolehlivého, selektivního, citlivého a vysoce propustného nástroje umožňujícího detekci ligandů glukokortikoidního receptoru. Za tímto účelem byla zkonstruována buněčná linie s reportérovým genem luciferázou, AZ-GR. Tato linie je odvozena od HeLa buněk, což jsou lidské rakovinové buňky děložního čípku. Ty byly stabilně transfekovány reportérovým plasmidem, který zahrnuje 3 kopie GRE, který byl vložen proti směru luciferázového reportérového genu. AZ-GR buňky vykazovaly vysokou specifitu a citlivost vůči glukokortikoidům, velice nízkou také vůči mineralokortikoidům. Na estrogeny, gestageny nebo androgeny nebyly pozorována žádné reakce. Kryokonzervace nijak neovlivnila funkčnost této linie. Byla tak sestrojena stabilně stransfektovaná linie AZ-GR, která umožňuje měření transkripční aktivity GR (Novotna et al., 2012).

### **3.2.2 AZ-AhR**

Protože má AhR mnoho důležitých funkcí v organismu, vznikla i zde potřeba sestrojít silný a spolehlivý nástroj pro identifikaci AhR ligandů a aktivátorů. Pomocí HepG2 buněk, což jsou buňky lidského hepatocelulárního karcinomu, byla zkonstruována buněčná linie AZ-AhR. Buňky karcinomu byly transferovány plasmidem nesoucím několik AhR vazebných míst proti směru genu luciferázy. Buněčná linie byla testována léčbou různých AhR ligandů a odpovědí byla na dávce a času závislá indukce luciferázové aktivity. Po zmrazení a roztátí byla reportérová AZ-AhR buněčná linie plně funkční a citlivá na AhR ligandy. Byla tedy sestrojena stabilně transferovaná linie AZ-AhR reportérového genu, která umožňuje měřit transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (Novotna et al., 2011).

### 3.3 CHEMIKÁLIE

Chemikálie a látky využité při testování jsou společně s dodavateli uvedenými v tabulce.

**Tab. 1 Dodavatelé využívaných prostředků (v abecedním pořadí podle prostředků)**

|                                      |                             |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| ATB (Penicilin/Streptomycin)         | Sigma-Aldrich (P433)        |
| ATP                                  | Sigma-Aldrich               |
| Buněčné linie HepG2 a HeLa           | ECACC                       |
| Casy Ton                             | Roche AG                    |
| CoA                                  | Sigma-Aldrich               |
| DEX                                  | Sigma-Aldrich               |
| D-Luciferin                          | Sigma-Aldrich (L9504)       |
| DMEM                                 | Sigma-Aldrich (D6546)       |
| DMSO                                 | Lach-Ner (PP/2012/07253)    |
| DTT                                  | Sigma-Aldrich               |
| EDTA                                 | Sigma-Aldrich               |
| FBS                                  | Sigma-Aldrich               |
| HygB                                 | Sigma-Aldrich               |
| Lyzační pufr                         | Promega (E3971)             |
| MEM NEAA                             | Sigma-Aldrich (M7145)       |
| MeOH                                 | Sigma-Aldrich (65542)       |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | Sigma-Aldrich               |
| MTT                                  | Sigma-Aldrich               |
| PBS (pH 7.4)                         | Gibco (10010-015)           |
| Pufr-trisacetát                      | Sigma-Aldrich               |
| Resveratrol                          | Sigma-Aldrich               |
| RU486                                | Sigma-Aldrich               |
| TCDD                                 | LgcStandards (CIL-ED-901-c) |
| Triton                               | Sigma-Aldrich (N150)        |
| Trypsin                              | Sigma-Aldrich               |

Některé z látek uvedených v tabulce byly využity pro přípravu kultivačního média a substrátu.

#### **Příprava kultivačního média:**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| DMEM                                 | 500 ml |
| FBS (-20°C)                          | 50 ml  |
| MEM NEAA                             | 5 ml   |
| ATB (Penicilin/Streptomycin) (-20°C) | 5 ml   |

### **Příprava substrátu pro měření luciferázy:**

|                                       |                              |
|---------------------------------------|------------------------------|
| D-Luciferin                           | 5 mg                         |
| ATP                                   | 9,6 mg                       |
| CoA                                   | 6,83 mg                      |
| DTT                                   | 168 mg                       |
| Pufr-trisacetát 1M (pH 7,8)           | 1,32 ml                      |
| EDTA                                  | 1,23 mg (v 6,6 ml 0,5M EDTA) |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 30,3 mg                      |

Vše doplnit do 30 ml destilované vody.

### **3.4 PŘÍSTROJE**

Práce by se neobešla bez využití potřebných přístrojů. Pro počáteční přípravu jednotlivých koncentrací bylo potřeba vytvořit homogenní suspenze sloučenin, k čemuž byla využita čistička ultrazvuková Bandelin Sonorex RK 31 H. Pro každý experiment bylo potřebné spočítat množství buněk v ml suspenze, k tomu sloužil přístroj CASY TT od firmy Roche AG. Flow-box (Safe Fast Top) byl využit pro práci vyžadující sterilní prostředí. Pro měření absorbance a luciferázové aktivity byl použit spektrofotometr Infinite M200 od firmy Tecan Trading AG. K mražení buněk na -80°C byl využit hlubokomrazicí skříňový box SANYO MDF-U53V. Látky byly inkubovány v inkubátoru Mitre 4000 (Conterm).

## 4. METODIKA PRÁCE

U testovaných sloučenin byla zjišťována cytotoxicita a schopnost aktivace/inhibice vybraných receptorů pro zmíněné buněčné linie. Pro možnost opakovaných pokusů byly buňky neustále pasážovány.

### 4.1 PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK

Pasážovány byly buňky v kultivačních lahvích. Tento proces byl využíván k naředění buněk, aby se nepřemnožily v kultivačním médiu (viz kapitola 3) a měly dostatek prostoru i živin ke svému růstu. Práce probíhala sterilně ve flow-boxu.

Buňky se nacházely v kultivačních lahvích o ploše 75 cm<sup>2</sup>. Z lahví bylo odsáto staré kultivační médium a vrstvy buněk byly omyty 6 ml sterilního fosfátového pufru (PBS). Následně byl do lahví k buňkám přidán 1 ml 0,25% trypsinu, který byl předeheřt na teplotu 37°C. Po jeho přidání byly kultivační láhve uzavřeny a enzym působil na buňky v inkubátoru po dobu 3 minut. Jeho vlivem došlo k odadherování buněk ode dna kultivační lahve. Po vytažení z inkubátoru bylo přidáno 9 ml kultivačního média rozehřátého na 37°C a buňky byly pomocí pipety resuspendovány, čímž bylo zabráněno jejich shlukování a byla vytvořena homogenní suspenze.

Ze suspenze bylo odebráno 100  $\mu$ l a přidáno 10 ml CasyTonu. Tento roztok byl vložen do přístroje CASY, který určil počet živých buněk. Díky tomuto údaji bylo odebráno ze vzniklé suspenze určité množství, které bylo po přidání kultivačního média (do objemu 15 ml) vráceno do inkubátoru. Na víkend byl celkový objem navýšen na 25 ml a do kultivační lahve bylo přidáno antibiotikum Hygromycin B (HygB) o finální koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup>. Pasážování bylo prováděno vždy v pondělí, středu a pátek.

### 4.2 ZJIŠŤOVÁNÍ CYTOTOXICITY (MTT TEST)

Před zahájením samotných testů ohledně aktivace/inhibice receptorů bylo potřeba zjistit, zda testované deriváty nevykazují toxicitu vůči použitým buněčným liniím. Pomocí MTT (methyltetrazoliová sůl) byla zjišťována cytotoxicita látek. Pomocí této metody bylo možné stanovit netoxické rozmezí koncentrací.

Opět byl využit přístroj CASY pro spočítání buněk. Pro testování byly využity 96 jamkové destičky. Do každé destičky bylo sterilně přidáno množství suspenze odpovídající 20 000 buněk, které bylo doplněno kultivačním médiem, předeheřtým na teplotu 37°C,

do objemu 200  $\mu\text{l}$  na jamku. Pomocí multikanálové pipety byla destička naplněna buněčnými liniemi a následně stabilizována do druhého dne po dobu 24 hodin při teplotě 37°C.

Následující den bylo staré kultivační médium odsáto a nahrazeno přehřátým kultivačním médiem s určitými koncentracemi testovaných látek (viz tab. 1). První a poslední řada kultivační destičky byla využita pro negativní a pozitivní kontrolu. Jako negativní kontrola byl využit metanol (MeOH) o koncentraci 0,1%; v/v, ve kterém byly látky rozpuštěny. Na místo pozitivní kontroly byl použit triton, který prokazatelně působí cytotoxicky i při nízkých koncentracích. Veškerý postup byl prováděn sterilně ve flow-boxu. Destičky byly poté uzavřeny a do dalšího dne inkubovány 24 hodin při 37°C.

|        |                   |        |                   |
|--------|-------------------|--------|-------------------|
| MeOH   | 0,01%; v/v        |        | 0,1 $\mu\text{M}$ |
|        | 0,1 $\mu\text{M}$ | KAC 62 | 1 $\mu\text{M}$   |
| KAC 42 | 1 $\mu\text{M}$   |        | 10 $\mu\text{M}$  |
|        | 10 $\mu\text{M}$  |        | 0,1 $\mu\text{M}$ |
|        | 0,1 $\mu\text{M}$ |        | 1 $\mu\text{M}$   |
| KAC 38 | 1 $\mu\text{M}$   | KAC 36 | 10 $\mu\text{M}$  |
|        | 10 $\mu\text{M}$  |        | 100 $\mu\text{M}$ |
|        |                   | Triton | 2%                |

**Obr. 8 Testované deriváty a použité koncentrace** (rozložení odpovídá rozložení 96 jamkové destičce - pro každý vzorek 6 jamek).

Poslední den již nebylo třeba sterilní prostředí. Destičky byly po vytažení z inkubátoru vyklepány do výlevky. Kapky kultivačního média zachycené na okrajích jamek byly osušeny buničinou. Do jamek byl po 200  $\mu\text{l}$  nepipetován roztok MTT, o koncentraci 0,3  $\text{mg.l}^{-1}$ , přehřátý na 37°C. Na 30 minut byly destičky vloženy do inkubátoru, kde setrávaly při teplotě 37°C. Princip této metody je založen na tom, že v živých buňkách fungují mitochondriální dehydrogenázy, které redukují MTT

na formazan, jež mění barvu ze žluté na fialovou. Mrtvé buňky tuto schopnost ztrácí. Proto narůstající intenzita zbarvení vzorku značí vyšší viabilitu. Destičky byly vyklepnuty a kapky MTT zachycené na okrajích opět osušeny buničinou. Do každé jamky bylo napipetováno 50  $\mu$ l neředěného dimethylsulfoxidu (DMSO), který rozpouští fialové krystaly redukovaného MTT. Doba působení DMSO byla za občasného protřepávání cca 5 minut. Následně je pomocí spektrofotometru měřena absorbance.

Pomocí programu Tecan I-Control (Infinite 200) měříme absorbanci světla redukovanými krystaly MTT, při vlnové délce 570 nm. U pozitivní kontroly by měla být pozorovatelná maximální propustnost světla a minimální absorbance, protože triton viabilitu buněk maximálně snižuje. Čím nižší absorbance světla je naměřena, tím vyšší je toxicita testovaných látek. Při negativní kontrole (MeOH) přežily prakticky všechny buňky a proto je propustnost tohoto vzorku minimální – MTT je redukováno živými buňkami, změni barvu a zabraňuje světlu průchod.

### **4.3 GENE REPORTER ASSAY**

Testování aktivity receptorů bylo prováděno nepřímo měřením luciferázové aktivity, která s aktivitou receptorů přímo koreluje. Buněčné linie, na kterých byly látky testovány, byly uzpůsobeny tak, že místa pro vazbu receptorů jsou umístěna před genem pro luciferázovou aktivitu. Navázání ligandu na receptor a nasednutí na DNA tedy spouštělo transkripci luciferázového genu a následnou indukci luciferázy. Testována byla aktivace i inhibice receptorů testovanými deriváty.

#### **4.3.1 Příprava vzorků pro měření**

V případě agonistického i antagonistického módu probíhá postup velmi obdobně. Ve druhém kroku se ovšem liší. Příprava vzorků probíhá sterilně ve flow-boxu.

První den byly, stejně jako v předešlém případě, spočítány buňky a společně s kultivačním médiem napipetovány do 96 jamkových destiček po 200  $\mu$ l o množství 20 000 buněk na jamku. Poté byly inkubovány při 37°C do druhého dne.

##### **4.3.1.1 Agonistický mód**

V této fázi byla testována schopnost vybraných derivátů o různých koncentracích, nakolik jsou schopné aktivovat receptory.

Druhý den bylo staré kultivační médium odstraněno a do destiček bylo k buňkám přidáno nové předeřáté kultivační médium společně s testovanými deriváty o vybraných koncentracích. Jako negativní kontrola byl u obou buněčných linií využit MeOH, který nijak receptory neovlivňuje. V případě testování AZ-GR buněčné linie je jako pozitivní kontrola použit dexamethason (DEX) o koncentraci 100nM a v případě AZ-AhR buněčné linie je touto kontrolou TCDD o koncentraci 5nM. Tyto látky působí jako aktivátory GR, respektive AhR. Po přidání média a látek jsou destičky vloženy do inkubátoru, kde zůstávají při teplotě 37°C 24 hodin.

#### **4.3.1.2 Antagonistický mód**

V případě antagonistického módu byla měřena schopnost látek inhibovat již aktivované receptory.

Druhý den bylo, stejně jako v předchozím případě, odstraněno staré kultivační médium, a do jamek bylo přidáno nové předeřáté kultivační médium společně s vybranými deriváty o určitých koncentracích. U buněčné linie AZ-GR byl do média přidán DEX o koncentraci 100nM, který receptory aktivuje, u buněčné linie AZ-AhR plní tento úkol TCDD o koncentraci 5nM. Z tohoto důvodu byly tyto látky také použity jako negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola posloužil v případě buněčné linie AZ-GR DEX společně s RU486 o koncentraci 5 $\mu$ M, u buněčné linie AZ-AhR byl k TCDD přidán Resveratrol o koncentraci 100 $\mu$ M. Tyto látky působily antagonisticky vůči DEX/TCDD a inhibovali aktivitu receptorů. Destičky byly také inkubovány při teplotě 37°C po dobu 24 hodin.

#### **4.3.2 Měření aktivity receptorů**

Samotné měření je stejné u obou buněčných linií, v případě agonistického i antagonistického módu. Staré médium bylo z destiček vyklepnuto a jamky byly omyty PBS. Do každé jamky bylo přidáno 22  $\mu$ l lyzačního pufru pro AZ-GR buněčnou linii a 30  $\mu$ l lyzačního pufru pro AZ-AhR buněčnou linii. Poté byly buňky vloženy na 20 minut do -80°C. Po uplynutí dané doby se nechaly buňky s pufrem roztát při pokojové teplotě.

Pro měření luciferázové aktivity bylo potřeba přidat substrát (viz kapitola 3). U AZ-GR buněčné linie bylo přepipetováno 20  $\mu$ l každého vzorku do černé destičky, kde bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu. V případě AZ-AhR linie byly přepipetovány 3  $\mu$ l,

a přidáno 30  $\mu$ l substrátu. Pomocí I-Control byla měřena luminiscence určující aktivitu luciferázy.

#### **4.4 MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY**

Po ukončení testování receptorů bylo třeba ověřit, zda výsledky, zejména z měření v antagonistickém uspořádání, nejsou dány pouze schopností látek inhibovat luciferázovou aktivitu, bez vlivu na receptory samotné. První den byly vysety buňky z linie AZ-AhR na Petriho misku a při teplotě 37°C byly inkubovány po dobu 24 hodin.

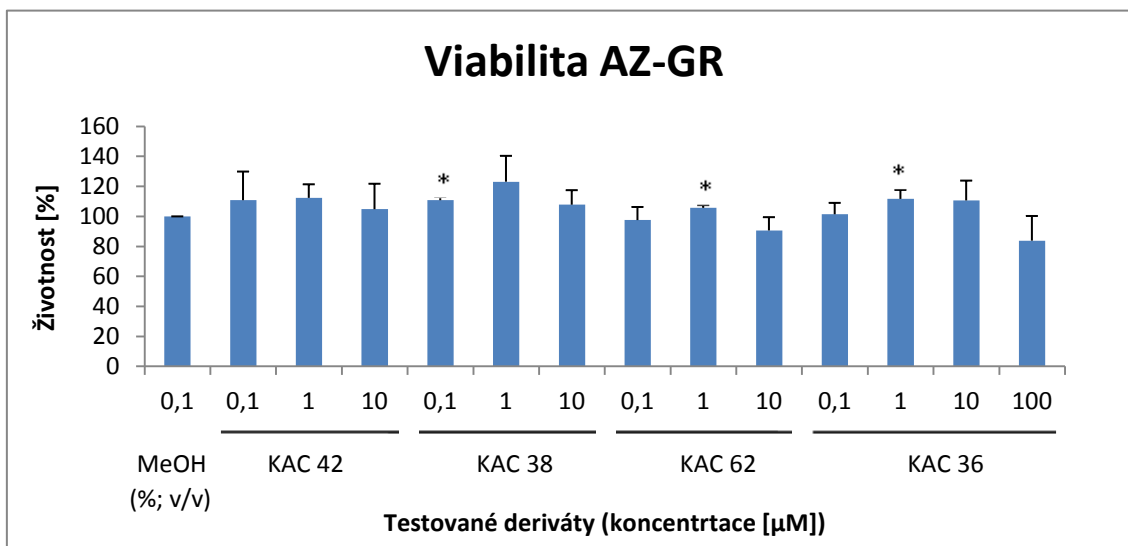
Po uplynutí doby bylo staré médium z misky odstraněno a bylo přidáno 8 ml kultivačního média společně s 8  $\mu$ l TCDD. Opět byly nechány 24 hodin při teplotě 37°C v inkubátoru. Poslední den bylo médium odlito, místo něj přidáno 7 ml lyzačního pufru a vzorek byl vložen do -80°C po dobu 20 minut. Po roztátí při pokojové teplotě byl seškrabán a přenesen do centrifugační zkumavky, kde byl smíchán s lyzačním pufrům. Vzniklý TCDD lyzát byl rozdělen do mikrozkušavek – na 1 ml TCDD lyzátu připadal 1  $\mu$ l nejvyšší použité koncentrace námi testovaných látek. V jedné ze zkumavek zůstal kontrolní vzorek čistého TCDD lyzátu. Vzniklé vzorky byly po 20  $\mu$ l přepipetovány do černé destičky a po přidání 30  $\mu$ l substrátu byla měřena luciferázová aktivita. Pokud hodnoty testovaných látek odpovídaly hodnotě TCDD lyzátu, byly výsledky Gene reporter assay dány schopností látek aktivovat/inhibovat receptory.



## 5. VÝSLEDKY

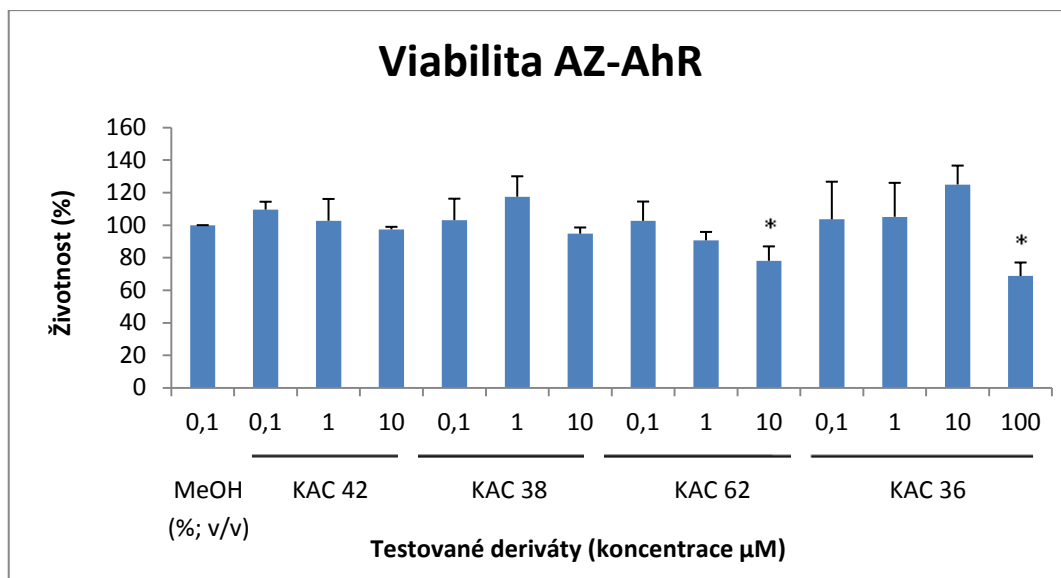
### 5.1 CYTOTOXICITA ZKOUMANÝCH SLOUČENIN

Pomocí MTT testu byla testována viabilita buněčných linií při působení určitých koncentrací zkoumaných derivátů. Díky tomu bylo určeno netoxické koncentrační rozmezí.



**Obr. 9 Viabilita buněk AZ-GR linie při působení vybraných přírodních derivátů o rozdílných koncentracích.** (Syntetické látky byly v různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AZ-GR a po 24 hodinách inkubace byla měřena jejich viabilita prostřednictvím měření světelné absorpance. Procenta viability jsou vztažena k negativní kontrole MeOH.\* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ). Hodnoty jsou průměrem čtyř měření.)

U AZ-GR buněčné linie nebyl pozorován žádný výrazný pokles životnosti buněk (Obr. 9). Jak je vidět v grafu, hodnoty životnosti se drží převážně kolem 100 % a žádná z hodnot neklesla pod 80 %. Statisticky nevýznamné snížení bylo pozorováno pouze pro KAC 36 100 μM, proto všechny testované koncentrace vybraných derivátů mohou být použity pro další metodu – Gene reporter assay.

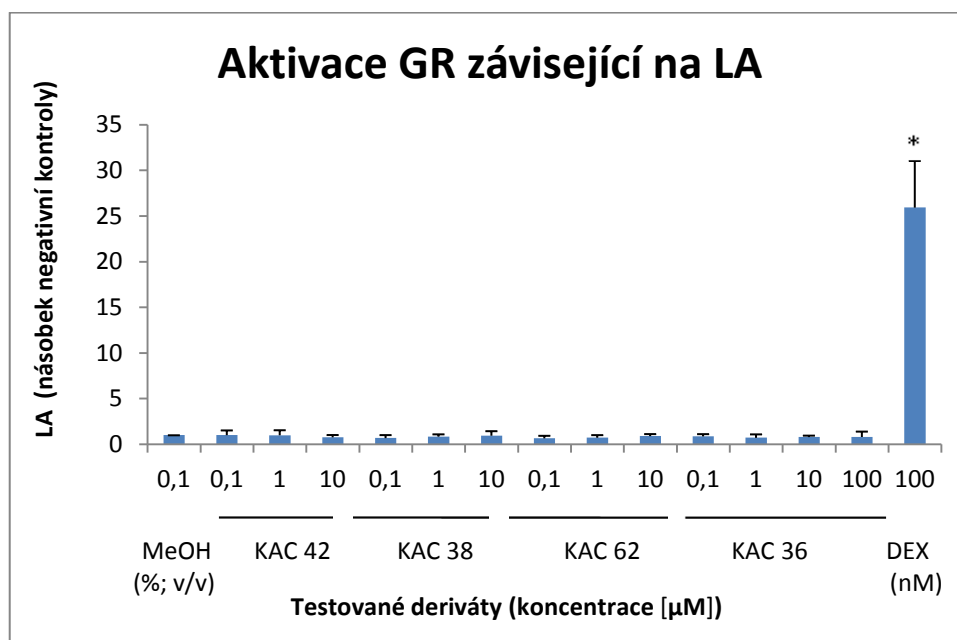


**Obr. 10 Viabilita buněk AZ-AhR linie při působení vybraných přírodních derivátů o rozdílných koncentracích.** (Syntetické látky byly v různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AZ-AhR a po 24 hodinách inkubace byla měřena jejich viabilita prostřednictvím měření světelné absorpance. Procenta viability jsou vztaženy k negativní kontrole MeOH.\* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ). Hodnoty jsou měřeny průměrem čtyř měření.)

U AZ-AhR buněčné linie ovšem jisté poklesy životnosti pozorovatelné jsou (Obr. 10). U KAC 42 se hodnoty pohybují na stejné úrovni, látka tedy neovlivňuje životnost v žádné použité koncentraci. U KAC 38 10  $\mu\text{M}$  (viabilita 94 %) došlo k nepatrnému poklesu viability, který ovšem není statisticky významný. Přesto při následujících testech byla použita nižší koncentrace. Oproti tomu KAC 62 10  $\mu\text{M}$  (viabilita 78 %) a KAC 36 100  $\mu\text{M}$  (viabilita 69 %) statisticky významně snižují životnost buněk v dané buněčné linii. Proto při dalších testech byly také použity nižší maximální koncentrace.

## 5.2 INTERAKCE DERIVÁTŮ S GLUKOKORTIKOIDNÍM RECEPTOREM

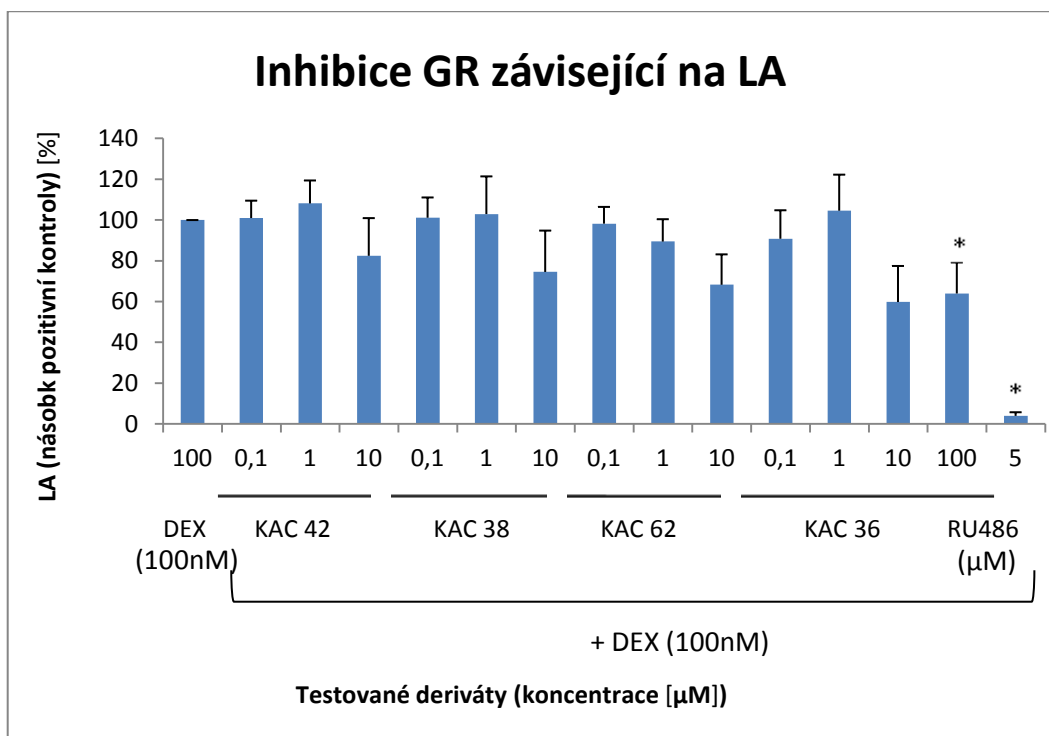
Měřením luciferázové aktivity (LA) byla nepřímo měřena aktivace receptorů. Míru úrovně aktivace určoval poměr luciferázové aktivity v daném vzorku ve vztahu k negativní kontrole.



**Obr. 11** Míra aktivace GR v závislosti na míře luciferázové aktivity. (Do 96 jamkové destičky byly k buněčné linii AZ-GR vysety syntetické látky o různých koncentracích a po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita, určující míru aktivace GR. Hodnoty jsou průměrem tří měření a jsou udány vzhledem k negativní kontrole MeOH. \* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ .)

Jako první krok byla testována schopnost látek aktivovat GR. Z grafu (Obr. 11) lze vyčíst, že žádná z látek signifikantně neaktivuje GR. Poměry v grafu jsou udány vzhledem k negativní kontrole, tedy MeOH. Hodnoty luciferázové aktivity u testovaných derivátů se neodlišují od hodnoty negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola byl použit syntetický glukokortikoid dexamethason (DEX) o koncentraci 100 nM, který signifikantně zvýšil luciferázovou aktivitu, což je obrazem aktivace GR (Obr. 11).

Druhým krokem bylo testování, zda dané látky inhibují aktivaci GR v přítomnosti pozitivní kontroly DEX

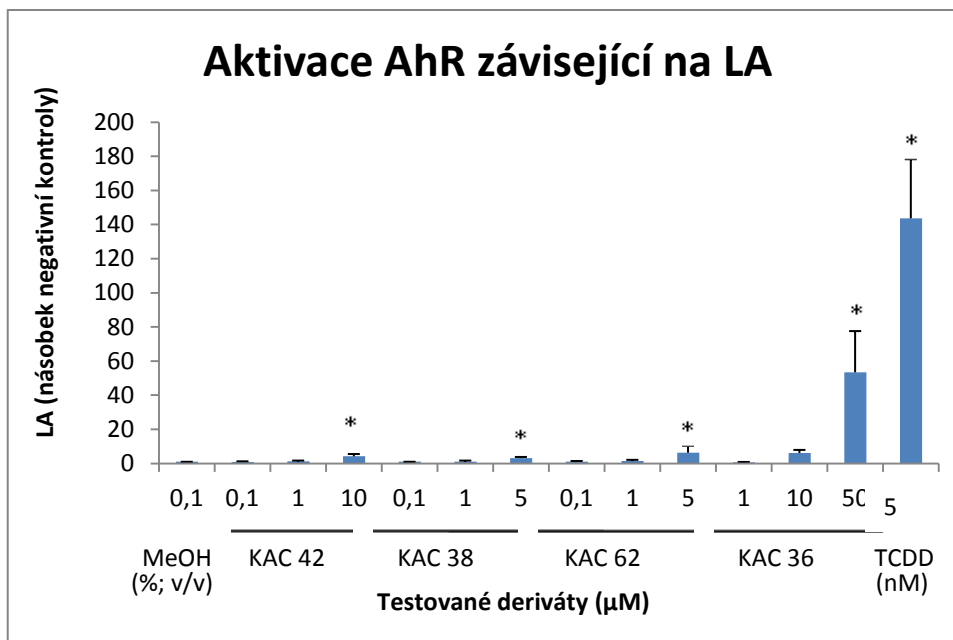


**Obr. 12 Míra inhibice GR v závislosti na míře luciferázové aktivity.** (Syntetické látky o rozličných koncentracích byly vysety k buněčné linii AZ-GR s aktivovaným GR pomocí DEX do 96 jamkové destičky a po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita, určující míru inhibice GR testovanými látkami. Hodnoty jsou průměrem tří měření a jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly DEX. \* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ .)

Jak zobrazuje obr. 12, inhibice receptoru je nejvýraznější jen u nejvyšších použitých koncentrací, v případě KAC 36 u posledních dvou nejvyšších koncentrací, protože zde, jakožto u jediného vzorku, byla použita i koncentrace 100 μM. Všechny ostatní vzorky vykazují hodnoty kolem 100 %. Určitý pokles aktivity je viditelný i u nižších koncentrací, ovšem tyto výsledky nejsou statisticky významné, protože nebyly prokázány T-testem. Nejmenší inhibiční účinek vykazuje KAC 42 při koncentraci 10 μM (82 %). Pouze u KAC 36 100 μM (64 %) byla prokázána pomocí T-testu statistická významnost, lze tedy říci, že KAC 36 100 μM částečně snižuje aktivaci GR. U ostatních látek se lze pouze domnívat, studentův T-test hypotézu neprokázal. Uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly (DEX). Jako pozitivní kontrola byla využita látka s GR antagonistickým chováním (RU486 o koncentraci 5 μM) – inhibovala aktivaci GR a tím dochází k nulové expresi luciferázy a nízkému signálu.

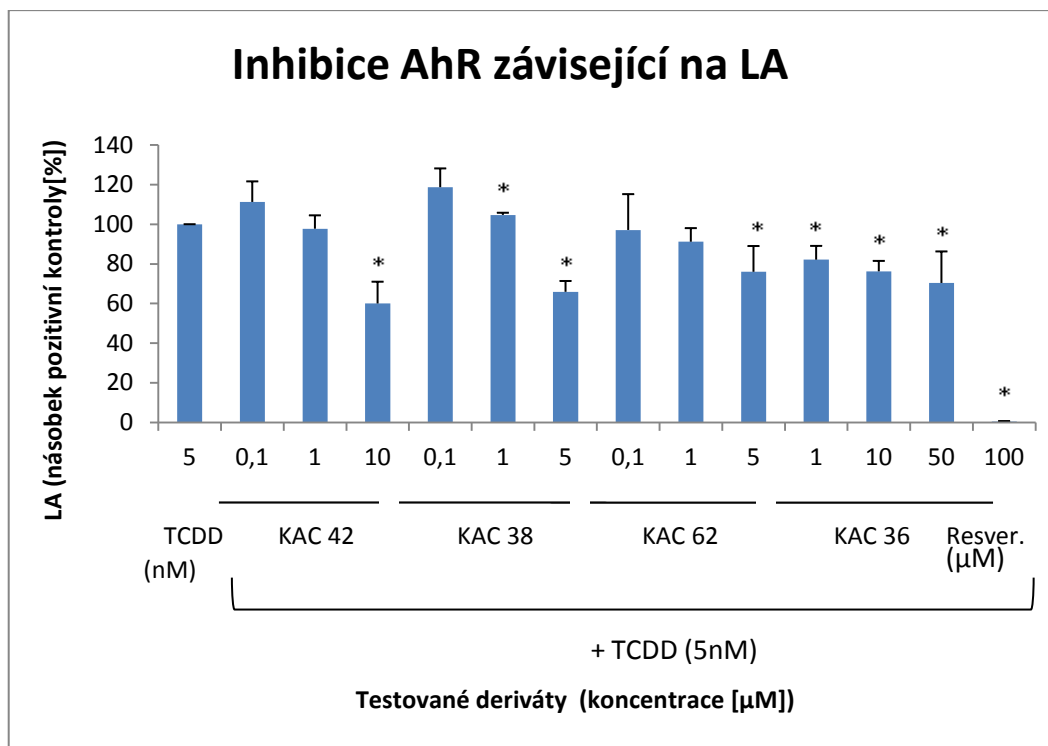
### 5.3 INTERAKCE DERIVÁTŮ S ARYLUHLOVODÍKOVÝM RECEPTOREM

Použitím stejné metodiky – tedy nepřímé měření aktivace/inhibice receptorů pomocí luciferázové aktivity – byly získány výsledky i pro AZ-AhR buněčnou linii.



**Obr. 13** Míra aktivace AhR v závislosti na míře luciferázové aktivity. ((Do 96 jamkové destičky byly k buněčné linii AZ-AhR vysety syntetické látky o různých koncentracích a po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita, určující míru aktivace AhR. Hodnoty jsou průměrem tří měření a jsou udány vzhledem k negativní kontrole MeOH. \* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ).)

Oproti AZ-GR buněčné linii je změna v aktivaci receptorů pozorovatelná. Nepatrně je viditelné zvýšení aktivity u KAC 42 10  $\mu\text{M}$  (4x), KAC 38 5  $\mu\text{M}$  (3x), a KAC 62 5  $\mu\text{M}$  (6x). Všechna tato zvýšení se jeví jako statisticky významná. Další zvýšení lze vidět neprokazatelně u KAC 36 10  $\mu\text{M}$  (6x) a KAC 36 50  $\mu\text{M}$  (53x), kdy statistická významnost byla prokázána pomocí studentova T-testu. U této buněčné linie jsou použity nižší koncentrace látek, než u AZ-GR, důvodem je naměření toxicity pomocí MTT testu (viz obr. 10).

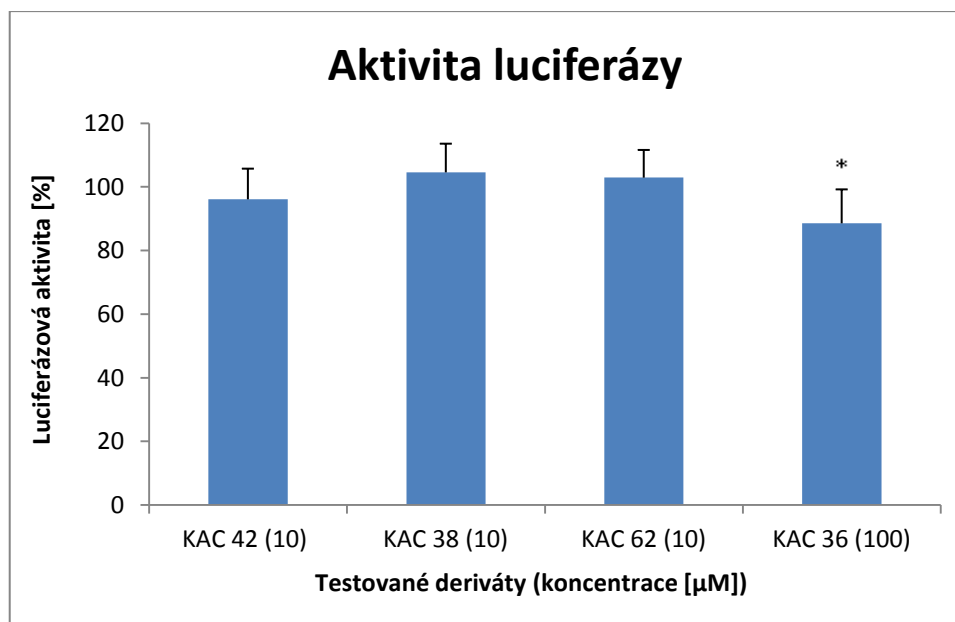


**Obr. 14** Míra inhibice AhR v závislosti na míře luciferázové aktivity. (Syntetické látky o rozličných koncentracích byly vysety k buněčné linii AZ-AhR s aktivovaným AhR pomocí TCDD do 96 jamkové destičky a po 24 hodinové inkubaci byla měřena luciferázová aktivita, určující míru inhibice AhR testovanými látkami. Hodnoty jsou průměrem tří měření a jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly TCDD. \* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ).

Při testování antagonistického módu, tedy schopnosti látek snížit aktivitu receptoru, je zřetelné snižování aktivity AhR (Obr. 14). Takový účinek vyvolávaly ty látky, jež ve stejné koncentraci ovlivňovaly aktivitu při testování agonistického módu. Hodnoty jsou uváděny jako procenta pozitivní kontroly (TCDD). Negativní kontrolou byl Resveratrol o koncentraci 100 μM. KAC 42 10 μM (59,9 %) vykazuje největší snížení. Dále měly inhibiční účinek KAC 38 5 μM (65,9 %), KAC 62 5 μM (76 %) a KAC 36 10 μM (76,2 %) a 50 μM (70,3 %). Statisticky významný pokles byl prokázán pomocí studentova T-testu.

## 5.4 SLEDOVÁNÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY

Poslední měření pomáhá zhodnotit předchozí výsledky.



**Obr. 15 Indukce luciferázy u nejvyšších koncentrací testovaných derivátů.** (Pomocí luciferázy obsahující lyzátu byla měřena schopnost látek inhibovat samotný enzym luciferázu bez vlivu na receptory. Měření proběhlo pouze jedenkrát a výsledky jsou vztaženy k luciferázové aktivitě za působení lyzátu z TCDD-indukovaných AZ-AhR buněk. \* označuje signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ).

Testované látky byly inkubovány s luciferázu obsahujícím lyzátem (Obr. 15) za účelem prokázat, že dané látky neinhibují aktivitu enzymu, ale vykazují antagonistické chování vůči AhR/GR. Výsledky měření byly hodnoceny procentuálně k lyzátu z TCDD-indukovaných AZ-AhR buněk, kde byla luciferázová aktivita hodnocena jako 100%. Testované látky vykazují hodnoty okolo 100 %, tedy je pravděpodobné, že nemají vliv na luciferázovou aktivitu. Pouze u KAC 36 100µM je viditelné nepatrné snížení luciferázové aktivity, která byla snížena na 88 %. T-test vyhodnotil toto snížení jako statisticky významné.

## 6. DISKUSE

Tato práce se věnuje ovlivňování aryluhlovodíkového a glukokortikoidního receptoru, které jsou důležité v mnoha fyziologických pochodech a podle situace je potřeba tyto receptory aktivovat nebo inhibovat. Vše záleží na okolnostech a problému daného organismu. Byly testovány látky KAC 42, KAC 38, KAC 62 a KAC 36 (struktury viz Obr. 7) na buněčných liniích HepG2 a HeLa.

Látky při testování na ovlivnění GR nevykázaly žádnou cytotoxicitu ani agonistickou aktivitu, což je důležitou informací pro další výzkum. Pokud by některá z látek měla být využita jako léčivo, není třeba se obávat interakce s jinými léčivy ovlivňující aktivitu glukokortikoidního receptoru. Antagonistická aktivita, která byla zaznamenána u všech látek v nejvyšších koncentracích, by mohla být využita pro léčbu stresu a podobných psychických stavů, vyžadujících snížení glukokortikoidů v krvi (Wang et al., 2015). Problémem ovšem je, že ačkoliv u KAC 36 100  $\mu\text{M}$ , kromě toho, že zde byla zaznamenána 20% cytotoxicita (nesignifikantní), která mohla výsledky ovlivnit, tak buněčné linie, na kterých byly látky testovány, nezahrnují metabolismus celého těla, a tedy v celém organismu by pokles aktivity receptorů mohl klesnout podstatně méně. Informace o této inhibici tedy může být zajímavá pro další výzkum, při tvorbě nových syntetických látek, ovšem jako léčiva jsou látky pro svou antagonistickou aktivitu nevyužitelná, protože inhibice nebyla dostatečná. Dalším důvodem jejich nevyužitelnosti je fakt, že pro jakékoliv vyvolání účinků byla potřeba vysoká koncentrace látek – při aplikaci na organismus by byla potřebná příliš velká koncentrace.

Při testování vlivu na aryluhlovodíkový receptor byla zaznamenána rozmanitější data. U téměř všech je ovšem potřeba počítat s korelací na cytotoxicitu, ačkoliv signifikantní byla pouze pro KAC 62 (10  $\mu\text{M}$ ) a KAC 36 (100  $\mu\text{M}$ ) a naměřena byla také pro KAC 38, ale hodnota cytotoxicity byla nízká a nesignifikantní. V případě KAC 42 10  $\mu\text{M}$  došlo ovšem k antagonistické aktivitě, která snížila aktivitu receptoru na 59 % v porovnání se samotným TCDD, což by již mohlo být považováno za významnou inhibici, která může být nadále zájmem výzkumu. Podobné inhibice dosáhla sloučenina FFP-3 při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , která inhibovala AhR aktivovaný pomocí DMBA a aktivita jeho působením klesla zhruba na 50 % oproti DMBA. Obě z antagonisticky působících látek – KAC 42 i FFP-3 – obsahují pyridin (viz 2.2.3).



Agonistická aktivita v nejvyšších koncentracích se ukázala být prakticky zanedbatelná, ovšem u KAC 36 50 $\mu$ M se aktivace receptoru dostala na 53x vyšší hodnotu oproti metanolu, což je hodnota která odpovídá zhruba 1/3 aktivace pomocí TCDD. Takové hodnotě odpovídá také omeprazol při koncentraci 100 $\mu$ M (Jin et al., 2014), což může být velmi důležitá informace pro další výzkum. Ačkoliv KAC 36 100  $\mu$ M snižoval životnost buněk na 69 %, je tato agonistická aktivita srovnatelná se známým a využívaným lékem, a proto by měla být tato látka dále testována. Jako velmi silný agonista se ukázal také 2-Br-BfQ nebo 10-Cl-BBQ, které při koncentraci 10nM vyvolal indukci luciferázy ve stejných hodnotách jako TCDD o koncentraci 1nM (Pun jet al., 2014). Tyto sloučeniny obsahovaly mimo jiné quinolin, což je spojuje s KAC 42. Společnou strukturou KAC 42 a omeprazolu je pyridin. Tato informace by mohla být užitečná při další syntéze nových látek.

Kromě schopnosti aktivace byla u této sloučeniny prokázána také schopnost inhibice AhR, což ovšem může zahrnovat mírný cytotoxický účinek v kombinaci se schopností látky inhibovat aktivitu samotné luciferázy bez ohledu na aktivaci receptoru. Pro další výzkum bude významnější využít nižší koncentraci testované sloučeniny KAC 36 a to 10 $\mu$ M, protože při této koncentraci vykazovala látka stejný inhibiční účinek na AhR, nevykazovala ovšem žádnou cytotoxicitu.

## 7. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala vlivu nově syntetizovaných sloučenin KAC 42, KAC 38, KAC 62 a KAC 36 na aryluhlovodíkový a glukokortikoidní receptor, které mají důležitou roli v organismu. Byla testována jejich cytotoxicita pomocí MTT testu a agonistický a antagonistický vliv pomocí Gene reporter assay, tedy metodou založenou na měření luciferázy. Jednotlivá měření měla trvání tří dnů. Hodnoty uvedené v bakalářské práci jsou průměrem několika měření (ve většině případů se jedná o průměr tří měření). Vliv na GR byl testován pomocí buněčné linie HeLa. Vliv na AhR byl testován pomocí buněčné linie HepG2.

V případě GR žádná z testovaných látek neprojevila schopnost tento receptor aktivovat a jen sloučenina KAC36 vykazala antagonistické chování při nejvyšší koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (cca 36%). Při potenciálním využití této látky jako léčiva se není třeba obávat interakcí s jinými léčivy skrze daný receptor. U AhR byla významná antagonistická aktivita KAC 42 10  $\mu\text{M}$  (cca 40%) a významná agonistická aktivita pro KAC 36 50  $\mu\text{M}$  (cca 1/3 aktivace dioxinem).

Cíle práce byly splněny – byla otestována cytotoxicita i aktivita receptorů. Některé z výsledků mohou být předmětem dalšího výzkumu, ohledně vlivu této aktivity na fyziologické pochody v tělech organismů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

### PUBLIKACE:

ABDULMAJEED, N.A. a H.S. Alnahdi, N.O. Ayas, A.M. Mohamed. Amelioration of cardiotoxic impacts of diclofenac sodium by vitamin B complex. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences*. 2015, roč. 19, č. 4, s. 671-81 [cit. 2015-04-17].

ALBERSEN, Monique, Marjolein BOSMA, Judith J. M. JANS, Floris C. HOFSTEDÉ, Peter M. VAN HASSELT, Monique G. M. DE SAIN-VAN DER VELDEN, Gepke VISSER a Nanda M. VERHOEVEN-DUIF. Vitamin B6 in Plasma and Cerebrospinal Fluid of Children. *PLoS ONE*. 2015, roč. 10, č. 3, s. 1-11 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0120972.

BURBACH, Kristine M., Alan POLAND a Christopher A. BRADFIELD. Cloning of the Ah-Receptor cDNA Reveals a Distinctive Ligand-Activated Transcription Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992, roč. 89, č. 17, s. 8185-8189 [cit. 2015-03-18].

CASAL-DOMINGUEZ, Joseph J., Daniel FURKERT, Mehrnoosh OSTOVAR, Linnea TEINTANG, Mary J. CLARK, John R. TRAYNOR, Stephen. M. HUSBANDS a Sarah J. BAILEY. Characterization of BU09059: A Novel Potent Selective  $\kappa$ -Receptor Antagonist. *ACS Chemical Neuroscience*. 2014-03-19, vol. 5, issue 3, s. 177-184. DOI: 10.1021/cn4001507.

COUMAILLEAU, P., L. POELLINGER, J.-A. GUSTAFSSON a M. L. WHITELAW. Definition of a Minimal Domain of the Dioxin Receptor That Is Associated with Hsp90 and Maintains Wild Type Ligand Binding Affinity and Specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 1995-10-20, vol. 270, issue 42, s. 25291-25300 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1074/jbc.270.42.25291.

DENISON, Michael S, Alessandro PANDINI, Scott R NAGY, Enoch P BALDWIN a Laura BONATI. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*. 2002, vol. 141, 1-2, s. 3-24 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1016/S0009-2797(02)00063-7.

DVORAK, Zdenek a Peotr PAVEK. Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metabolism Reviews*. 2010, vol. 42, issue 4, s. 621-635 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.3109/03602532.2010.484462.

ELAVARASAN, Thangasamy, Durairaj Peter BHAKIARAJ, Mannathusamy GOPALAKRISHNAN, Linnea TEINTANG, Mary J. CLARK, John R. TRAYNOR, Stephen. M. HUSBANDS a Sarah J. BAILEY. Synthesis, Spectral Analysis, In Vitro Microbiological Evaluation, and Molecular Docking Studies of Some Novel 1-(1-Aryl-1 H-tetrazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)ethanone Derivatives: A Novel Potent Selective  $\kappa$ -

Receptor Antagonist. *ISRN Organic Chemistry*. 2014, vol. 2014, issue 3, s. 1-9 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1155/2014/120173.

FRATONI, Valentina a Maria BRANDI. B Vitamins, Homocysteine and Bone Health. *Nutrients*. 2015, vol. 7, issue 4, s. 2176-2192. DOI: 10.3390/nu7042176.

FUJISAWA, Nozomi, Yusuke K. KAWAI, Shouta M. M. NAKAYAMA, Yoshinori IKENAKA, Hideaki YAMAMOTO a Mayumi ISHIZUKA. Dioxin Sensitivity-Related Two Critical Amino Acids of Arylhydrocarbon Receptor May Not Correlate with the Taxonomy or Phylogeny in Avian Species. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2013, vol. 75, issue 12, s. 1577-1583 [cit. 2015-03-09]. DOI: 10.1292/jvms.13-0179.

GLASS-HOLMES, Mashunté, Byron J. AGUILAR, Richard D. GRAGG, Selina Darling-Reed DARLING-REED a Carl B. GOODMAN. Synthesis and antiproliferative activity in vitro of new 2-thioxoimidazo[4,5-B]pyridine derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2015, roč. 72, č. 1, s. 101-11 [cit. 2015-04-18].

GORYO, Kenji, Ai SUZUKI, Carlos A. Del CARPIO, Kazuhiro SIIZAKI, Eisuke KURIYAMA, Yoshinori MIKAMI, Koshi KINOSHITA, Ken-ichi YASUMOTO, Agneta RANNUG, Akira MIYAMOTO, Yoshiaki FUJII-KURIYAMA a Kazuhiro SOGAWA. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, vol. 354, issue 2, s. 396-402 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.227.

HWANG, Yong Pil, Eun Hee HAN, Jae Ho CHOI, Hyung Gyun KIM, Kyung Jin LEE, Tae Cheon JEONG, Eung Seok LEE, Hye Gwang JEONG, Siva Kumar KOLLURI, Nancy I. KERKVLIT, Thomas FORSTHUBER, Wan-Ching YEN, Lin ZHI, Andrés NEGRO-VILAR a Jeffrey N. MINER. Chemopreventive effects of Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-inducible genotoxicity: A New Class of Rapidly Metabolized Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands that Induce AhR-Dependent Tregs and Prevent Murine Graft-Versus-Host Disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, vol. 228, issue 3, s. 343-350 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.taap.2007.12.018.

JELEŃ, Małgorzata, Eugenia I. BAVAVEA, Maria PAPPA, Angeliki P. KOUROUNAKIS, Beata MORAK-MŁODAWSKA a Krystian PLUTA. Synthesis of quinoline/naphthalene-containing azaphenothiazines and their potent in vitro antioxidant properties. *Medicinal Chemistry Research*. 2015, vol. 24, issue 4, s. 1725-1732 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1007/s00044-014-1247-y.

JIANG, Y.-z., K. WANG, R. FANG a J. ZHENG. Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2010-07-20, vol. 58, issue 8, s. 679-685 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1369/jhc.2010.955955.

- JIN, Un-Ho, Syng-Ook LEE, Catherine PFENT a Stephen SAFE. The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer*. 2014, vol. 14, issue 1, s. 498-. DOI: 10.1186/1471-2407-14-498.
- JONES, Susan. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*. 2004, vol. 5, issue 6, s. 226-. DOI: 10.1186/gb-2004-5-6-226.
- JOTHIVEL, S., Jibon KOTOKY a S. KABILAN. Crystal structure of 1-(2-chloroacetyl)-3,3-dimethyl-2,6-di- p -tolylpiperidin-4-one. *Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications*. 2015, vol. 71, issue 3, o173-o174. DOI: 10.1107/S2056989015002613.
- KIM, Younghee, Jiwon SON, Juhyeon KIM, Du-Jong BAEK, Yong Sup LEE, Eun Jeong LIM, Jae Kyun LEE, Ae Nim PAE, Sun-Joon MIN a Yong Seo CHO. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Substituted Quinoline 6-Carboxamides as Potential mGluR1 Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2014, vol. 62, issue 6, s. 508-518 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1248/cpb.c13-00945.
- KIM, Young-Nam a Youn-Ok CHO. Evaluation of vitamin B 6 intake and status of 20- to 64-year-old Koreans. *Nutrition Research and Practice*. 2014, vol. 8, issue 6, s. 688-. DOI: 10.4162/nrp.2014.8.6.688.
- KINO, Tomoshige. The Glucocorticoid receptor. In: *Brain Immune Media Ltd*. 2010 [cit. 2015-04-01].
- KUMAR, M. B. The Q-rich Subdomain of the Human Ah Receptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, vol. 276, issue 45, s. 42302-42310 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1074/jbc.M104798200.
- LÓPEZ, Francisco J., Robert J. ARDECKY, Bruce BEBO, Khalid BENBATOUL, Louise DE GRANDPRE, Sha LIU, Mark D. LEIBOWITZ, Keith MARSCHKE, Jon ROSEN, Deepa RUNGTA, Humberto O. VIVEROS, Wan-Ching YEN, Lin ZHI, Andrés NEGRO-VILAR a Jeffrey N. MINER. LGD-5552, an Antiinflammatory Glucocorticoid Receptor Ligand with Reduced Side Effects, in Vivo. *Endocrinology*. 2008, vol. 149, issue 5, s. 2080-2089 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1210/en.2007-1353.
- MAREK, Jan, David MALINAK, Rafael DOLEZAL, Ondrej SOUKUP, Marketa PASDIOROVA, Martin DOLEZAL a Kamil KUČA. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*. 2015, vol. 20, issue 3, s. 3681-3696 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.3390/molecules20033681.
- MARYAM GHOTBADDINI, Joann B. Powell. Cancer-promoting and Inhibiting Effects of Dietary Compounds: Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *Biochemistry*. 2014, vol. 03, issue 02, s. - [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.4172/2167-0501.1000131.

MCMMASTER, Andrew a David W. RAY. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Experimental Physiology*. 2007, vol. 92, issue 2, s. 299-309 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1113/expphysiol.2006.036194

NOVOTNA, Aneta, Petr PAVEK a Zdenek DVORAK. Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, vol. 47, issue 5, s. 842-847 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.10.003.

NOVOTNA, Aneta, Petr, PAVEK a Zdenek DVORAK. Novel Stably Transfected Gene Reporter Human Hepatoma Cell Line for Assessment of Aryl Hydrocarbon Receptor Transcriptional Activity: Construction and Characterization. *Environmental Science*. 2011, vol. 45, issue 23, s. 10133-10139 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1021/es2029334.

NOWICKA, Anna, Hanna LISKIEWICZ, Wanda P. NAWROCKA, WIETRZYK a ZUBIAK. Synthesis and antiproliferative activity in vitro of new 2-thioxoimidazo[4,5-B]pyridine derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2015, roč. 72, č. 1, s. 101-11 [cit. 2015-04-18].

PAWLAK, Alicja, Leon STRZADALA a Wojciech KALAS. Non-genomic effects of the NR4A1/Nur77/TR3/NGFIB orphan nuclear receptor. *Steroids*. 2015, vol. 95, s. 1-6 [cit. 2015-04-14]. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.12.020.

PUNJ, Sumit, Prasad KOPPARAPU, Hyo Sang JANG, Jessica L. PHILLIPS, Jamie PENNINGTON, Diana ROHLMAN, Edmond O'DONNELL, Patrick L. IVERSEN, Siva Kumar KOLLURI, Nancy I. KERKVLIT, Thomas FORSTHUBER, Wan-Ching YEN, Lin ZHI, Andrés NEGRO-VILAR a Jeffrey N. MINER. Benzimidazoisoquinolines: A New Class of Rapidly Metabolized Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands that Induce AhR-Dependent Tregs and Prevent Murine Graft-Versus-Host Disease. *PLoS ONE*. 2014-2-19, vol. 9, issue 2, e88726- [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0088726.

RECHAVI, Marc Robinson, Hector Escrivá GARCIA a Vincent LAUDET. The nuclear receptor superfamily. *Journal of cell science*. 2003, č. 116 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1242/jcs.00247.

RODRIGUEZ-MORALES, S, R COMPADRE, R CASTILLO, P BREEN a C COMPADRE. 3D-QSAR, Synthesis, and antimicrobial activity of 1-Alkylpyridinium Compounds as Potential Agents to Improve Food Safety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2005, vol. 40, issue 9, s. 840-849. DOI: 10.1016/j.ejmech.2005.02.012.

SAADATMANDZADEH, Mohammad, Mohammad RAHIMIZADEH, Hossein ESHGHI a Mojtaba SANKIAN. Synthesis and docking analysis of new heterocyclic system of tetrazolo[5',1': 2,3][1,3,4]thiadiazepino [7,6-b]quinolines as aldose reductase inhibitors. *Iranian Journal Of Basic Medical Sciences*. 2014, roč. 17, č. 9, s. 679-84 [cit. 2015-04-18].

SAEKI, Ken-ichi, Tomonari MATSUDA, Taka-aki KATO, Katsuya YAMADA, Takaharu MIZUTANI, Saburo MATSUI, Kiyoshi FUKUHARA a Naoki MIYATA. Activation of the Human Ah Receptor by Aza-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Halogenated Derivatives. *Biological*. 2003, vol. 26, issue 4, s. 448-452. DOI: 10.1248/bpb.26.448.

TAŞ, Sibel, Emre SARANDÖL a Melahat DIRICAN. Vitamin B6 Supplementation Improves Oxidative Stress and Enhances Serum Paraoxonase/Arylesterase Activities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Scientific World Journal*. 2014, vol. 2014, issue 6, s. 1-7. DOI: 10.1155/2014/351598.

VRZAL, Radim, Jitka ULRICHOVÁ a Zdeněk DVOŘÁK. AROMATIC HYDROCARBON RECEPTOR STATUS IN THE METABOLISM OF XENOBIOTICS UNDER NORMAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS. *Biomed* [online]. 2004, č. 148 [cit. 2015-03-23].

WANG, Zi-Jun, Xue-Qiong ZHANG, Xiang-Yu CUI, Su-Ying CUI, Bin YU, Zhao-Fu SHENG, Sheng-Jie LI, Qing CAO, Yuan-Li HUANG, Ya-Ping XU a Yong-He ZHANG. Glucocorticoid receptors in the locus coeruleus mediate sleep disorders caused by repeated corticosterone treatment. *Scientific Reports*. 2015-3-24, vol. 5, s. 9442- [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1038/srep09442.

WEBSTER MARKETON, Jeanette I. a Esther M. STERNBERG. The Glucocorticoid Receptor: A Revisited Target for Toxins. *Toxins*. 2010, vol. 2, issue 6, s. 1357-1380 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.3390/toxins2061357.

## **KNIŽNÍ ZDROJE:**

KRESÁNEK, Jaroslav a Jindřich KREJČA. *Atlas léčivých rostlín a lesných plodov*. 1. vyd. Martin: Osveta, 1977. ISBN 70-084-77.

SIPES, I. Glenn, Charlene A. MCQUEEN a A. Jay GANDOLFI. *Comprehensive toxicology*. 1st ed. New York: Pergamon, 1997-2002, 14 v. ISBN 044450868614.

STUART, Malcolm. *The encyclopedia of herbs and herbalism*. London: Black Cat, 1987. ISBN 07-481-0012-1.

VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.

VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.

## **INTERNETOVÉ ZDROJE:**

DAHL, Jeff. AhR Functional Domains. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Aryl\\_hydrocarbon\\_receptor#/media/File:AHR\\_functional\\_domains.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Aryl_hydrocarbon_receptor#/media/File:AHR_functional_domains.svg)

EMBL-EBI. CHEBI:34988 - sulmazole. In: *ChEBI* [online]. 2014 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=34988>

CHOPRA, Arvind. [(11C)]10-Methoxy-5-(2-propenyl)-2,5-dihydro-2,2,4-trimethyl-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinoline. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [online]. 2004 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22972/>

L. KOZSTIN, Dorina. Nuclear Hormone Receptors. In: *Theoretical and Computational Biophysics Web* [online]. 2005 [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: [http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro\\_DNA/ster\\_horm\\_rec/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec/)