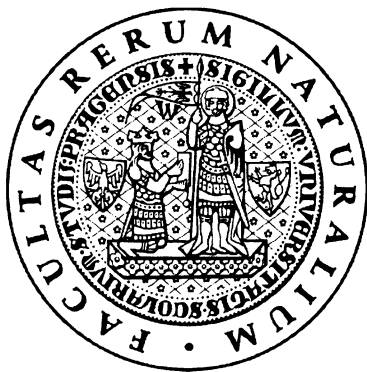


Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie

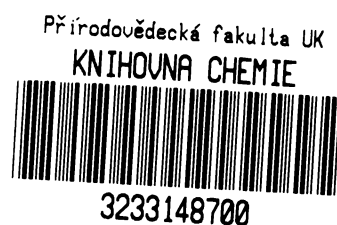


Vliv kancerogenního azobarviva  
Sudanu I na expresi  
biotransformačních enzymů

*Bakalářská práce*

Jan Milichovský  
Školitelka: RNDr. Dagmar Aimová, Ph.D.

Praha 2009



*Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně po vedením školitelky  
RNDr. Dagmar Aimové Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval*

V Praze dne 3.9.2009

Podpis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Michal Kurf', written in a cursive style.

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Dagmar Aimové, Ph.D. za její vedení, důležité rady a také za čas, který mi věnovala v průběhu práce.

Také bych chtěl poděkovat RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D., RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. a RNDr. Věře Kotrbové, Ph.D. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod a přehled literatury	6
1.1 Cytochromy P450	7
1.1.1 Nomenklatura P450	7
1.1.2 Živočišné cytochromy P450 metabolizující xenobiotika	8
1.1.3 Reakční mechanismus P450	9
1.2 Cytochromy P450 rodiny I	12
1.2.1 Cytochrom P450 1A1	12
1.2.2 Cytochrom P450 1A2	13
1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky (Ah receptor)	15
1.3.1 Struktura Ah receptoru	15
1.3.2 AhR signální dráha	16
1.3.3 Ligandy aktivující Ah receptor	17
1.4. Sudan I	19
1.4.1 Metabolismus Sudanu I	19
2. Cíl práce	22
3. Materiál a metody	23
3.1 Použitý materiál	23
3.2 Použité metody	24
3.2.1 Premedikace potkanů	24
3.2.2 Izolace RNA	24
3.2.3 Horizontální elektroforéza na agarose	25
3.2.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA	25
3.2.5 Reverzní transkripce	26
3.2.6 „Real-time“ polymerasová řetězová reakce	27
4. Výsledky	30
4.1 Izolace celkové RNA	30
4.2 Reverzní transkripce a kvantifikace získané RNA	32
5. Diskuse	35
6. Závěr	37
Seznam použité literatury	38

## Seznam použitých zkratek

AhR	receptor aromatických uhlovodíků
AhRR	represor receptoru aromatických uhlovodíků
Arnt	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
A <sub>x</sub>	absorbance při vlnové délce <u>x</u> nm
B[a]P	benzo[a]pyren
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CYP, P450	cytochrom(y) P450
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GSTA1	glutathion-S-transferasa
HAH	halogenované aromatické uhlovodíky
HLH	doména „ <i>helix-loop-helix</i> “
MQ voda	deinizovaná voda
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NQO1	NAD(P)H : chinon oxidoreduktasa; DT-diaforasa
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	doména „ <i>Per-Arnt-Sim</i> “
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	celková ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
TCDD	2,3,7,8 – tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT	UDP-glukoronyltransferasa
UVB	ultrafialové záření v rozsahu 280 – 315 nm
XRE	sekvence „ <i>Xenobiotic Responsive Element</i> “

# 1. Úvod

Současně s rozvojem nových technologií a průmyslu se v životním prostředí začalo hromadit velké množství sloučenin. Tyto látky, se kterými se organismy dříve neselektovaly, se označují jako xenobiotika a mají na zdravotní stav lidského organismu většinou negativní vliv. V zemích Evropské unie a České republiky existuje problém s kontaminací zejména fenolickými látkami, aromatickými aminy a průmyslovými barvivy.<sup>[1]</sup>

Xenobiotika v současnosti zasahují do všech známých tříd chemických látek. Jejich primárním zdrojem je chemický průmysl, sekundárním zdrojem jsou ty lidské činnosti, které využívají produkty zdroje primárního, tedy chemického průmyslu. Rizikové působení xenobiotik na organismus závisí nejen na toxicitě dané sloučeniny, ale i na její koncentraci a době působení.

Způsob vstupu xenobiotika do organismu závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech a zdroji, kde se vyskytuje. Hlavními zdroji těchto látek pro člověka jsou potrava, voda a vzduch. Hlavními fyzikálně-chemickými vlastnostmi ovlivňující toxicitu cizorodé sloučeniny jsou rozpustnost ve vodě, těkavost a reaktivita. Látky lipofilního charakteru mají usnadněn přístup do organismu díky skutečnosti, že v epitelech a membránách je obsaženo velké množství lipidů.<sup>[2]</sup>

Jednou ze skupin xenobiotik jsou i chemické kancerogeny, což je skupina látek, které jsou jedním z faktorů procesu kancerogeneze. Z 90 % je působení chemických kancerogenů (prokázaných u člověka) závislé na tvorbě kovalentních aduktů s DNA, přičemž většina kancerogenů musí být převedena z pre-kancerogenní formy na reaktivnější, ultimativní formu tvořící příslušný adukt. Ačkoliv je většina aduktů a dalších modifikací DNA nalezena a odstraněna reparačními mechanismy, některé adukty často způsobují permanentní mutace v důležitých genech a zapříčiní tak kancerogenní proces. Za nejdůležitější enzymy, které přeměňují pre-kancerogenní formu xenobiotika na formu ultimativní, jsou považovány cytochromy P450.<sup>[3]</sup>

## **1.1 Cytochromy P450**

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) byly objeveny na konci padesátých let v potkaních mikrosomech.[4] Ačkoliv byly nalezeny jak v prokaryotických i eukaryotických organismech (kvasinky, hmyz, houby), většina jich byla nalezena u živočichů.<sup>[1]</sup>

Katalyzují velkou škálu chemických reakcí. Zasahují do metabolismu xenobiotik, biosyntézy steroidních hormonů, vitaminů D, prostaglandinů, mastných kyselin a dalších. Cytochrom P450 se vyvinul procesem divergentní evoluce, kdy z jediného genu archaebakterií z doby před více než 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo velké množství genů u eukaryot a prokaryot. I přes širokou substrátovou specifitu obsahují jednotlivé formy konzervované sekvence oblastí ve vazebném místě pro hem.<sup>[5]</sup>

Forma cytochromu P450 nalezená u archaebakterií byla posléze charakterizována jako vysoce odolný enzym vůči tlaku a teplotě, tedy podmínkám, které panovaly na počátku života na Zemi.<sup>[6]</sup>

„Superrodina“ těchto enzymů získala označení cytochromy pro svou hemoproteinovou strukturu. Přízvisko P450 je odvozeno od slova pigment a dále od faktu, že redukovaný cytochrom P450 v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje neobvyklé absorpční maximum při 450 nm.<sup>[7]</sup>

V eukaryotických buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého i drsného endoplazmatického retikula, ale vyskytují se i v membránách mitochondrií.<sup>[5]</sup>

### **1.1.1 Nomenklatura P450**

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzimech, isoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie primární struktury proteinových molekul.<sup>[5]</sup> Nomenklatura eukaryotických P450 je tvořena následujícím způsobem:<sup>[8]</sup>

- z názvu enzymu cytochrom P450 se utvoří kořen CYP
- formy mající homologii primární struktury vyšší než 40 % se řadí do stejné rodiny, označené arabskou číslicí (např. CYP1)
- formy mající homologii sekvence aminokyselin vyšší než 55 % spadají do stejné podrodiny označené písmenem (např. CYP1A)

- samotná forma se označí přidáním další arabské číslice (např. CYP1A1)

V současnosti je známo 205 rodin P450 u bakterií (z toho 10 rodin u archaebakterií), 61 rodin u nižších eukaryot, 95 rodin u rostlin, 310 rodin u hub a 110 rodin u živočichů. Z těchto „živočišných rodin“ je u savců známo 18 rodin.<sup>19]</sup> U člověka bylo nalezeno 57 isoform (viz. Tabulka 1) a 58 pseudogenů, tedy nefunkčních kopií genu.<sup>[10]</sup>

**Tabulka 1**

Klasifikace lidských forem P450 založená na hlavním substrátu (převzato z <sup>[11]</sup>)

<b>Steroly</b>	<b>Xenobiotika</b>	<b>Mastné kyseliny</b>	<b>Eikosanoidy</b>	<b>Vitamíny</b>	<b>Neznámý substrát</b>
<b>1B1</b>	<b>1A1</b>	<b>2J2</b>	<b>4F2</b>	<b>2R1</b>	<b>2A7</b>
<b>7A1</b>	<b>1A2</b>	<b>4A11</b>	<b>4F3</b>	<b>24A1</b>	<b>2S1</b>
<b>7B1</b>	<b>2A6</b>	<b>4B1</b>	<b>4F8</b>	<b>26A1</b>	<b>2U1</b>
<b>8B1</b>	<b>2A13</b>	<b>4F12</b>	<b>5A1</b>	<b>26B1</b>	<b>2W1</b>
<b>11A1</b>	<b>2B6</b>		<b>8A1</b>	<b>26C1</b>	<b>3A43</b>
<b>11B1</b>	<b>2C8</b>			<b>27B1</b>	<b>4A22</b>
<b>11B2</b>	<b>2C9</b>				<b>4F11</b>
<b>17A1</b>	<b>2C18</b>				<b>4F22</b>
<b>19A1</b>	<b>2C19</b>				<b>4V2</b>
<b>21A2</b>	<b>2D6</b>				<b>4X1</b>
<b>27A1</b>	<b>2E1</b>				<b>4Z1</b>
<b>39A1</b>	<b>2F1</b>				<b>20A1</b>
<b>46A1</b>	<b>3A4</b>				<b>27C1</b>
<b>51A1</b>	<b>3A5</b>				
	<b>3A7</b>				

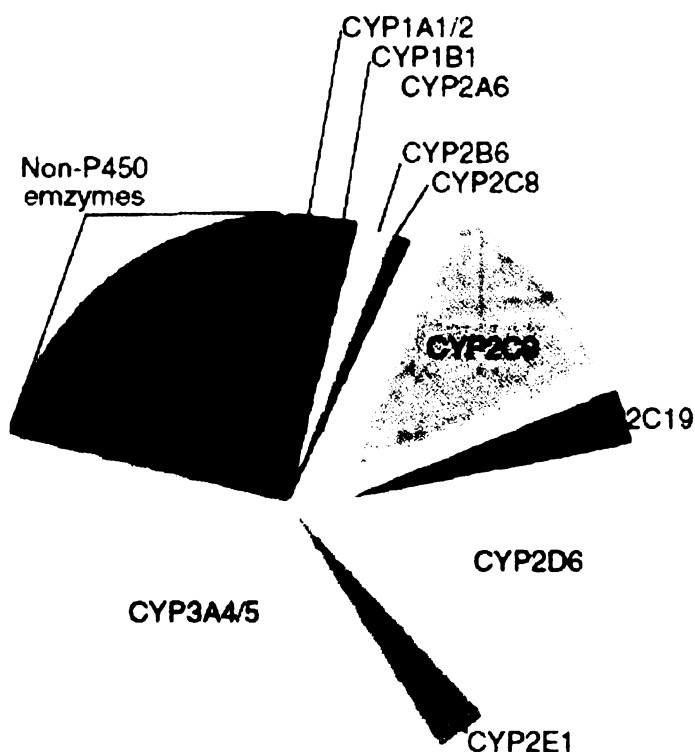
### 1.1.2 Živočišné cytochromy P450 metabolizující xenobiotika

Cytochromy P450 metabolizující xenobiotika v živočišném organismu jsou součástí mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí, což je klíčový enzymový systém první, derivatizační fáze biotransformace cizorodých látek, při které je zaváděním polárních skupin do struktury xenobiotika zvyšována vlastní polarita molekuly.<sup>[3]</sup> Významnost cytochromů P450 pro metabolismus xenobiotik ukazuje obrázek 1.

Po první fázi následuje fáze konjugační, během které jsou na polární funkční skupiny vytvořené během fáze derivatizační vázány malé hydrofilní molekuly, díky čemuž jsou cizorodé látky snadněji vylučovány z organismu.<sup>[3]</sup> Avšak hydrofilnější metabolity pocházející z první nebo druhé fáze biotransformace mohou být naopak toxickejší než původní látky, dochází tedy naopak k aktivaci xenobiotika. Metabolicky je aktivována nejen řada léčiv, ale též 98 % genotoxických kancerogenů.<sup>[12]</sup> Metabolismu cizorodých



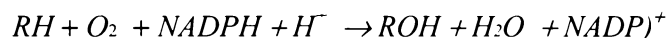
látek se účastní hlavně tři rodiny, a to CYP1, CYP2 a CYP3, v menší míře také rodina CYP4<sup>[13]</sup>



Obrázek 1  
**Účast hlavních forem cytochromu P450 na I. metabolické fázi komerčně dostupných léků v roce 2003 (převzato z <sup>[14]</sup>)**

### 1.1.3 Reakční mechanismus P450

Samotný cytochrom P450 je externí monooxidase, tedy takovým typem enzymu, který katalyzuje inkorporaci jednoho atomu molekulárního kyslíku do struktury substrátu s paralelní redukcí druhého kyslíkového atomu na vodu. Monooxidasy jsou děleny do dvou skupin - vnitřních a vnějších monooxidas. Vnitřní monooxidasy vyžadují na redukcí jednoho atomu molekulárního kyslíku na vodu dva redukční ekvivalenty od substrátu, zatímco vnější monooxidasy vyžadují externí redukční činidlo.<sup>[7]</sup> Enzymový komplex cytochromu P450 katalyzuje tuto reakci za využití NADPH, přičemž celkovou reakci lze zapsat schématem



kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt.<sup>[8]</sup> Podrobnější schéma reakčního cyklu ukazuje obrázek 2 a text vysvětluje jednotlivé kroky: <sup>[15]</sup>

1. V první fázi je ion železa hexakoordinován a nachází se v oxidačním čísle III (ferri forma) a převážně v nízkospinovém stavu.

2. Ve fázi druhé je šestý ligand železa vytlačen navázaným substrátem (RH). Ion železa se dostává do vysokospinového stavu.

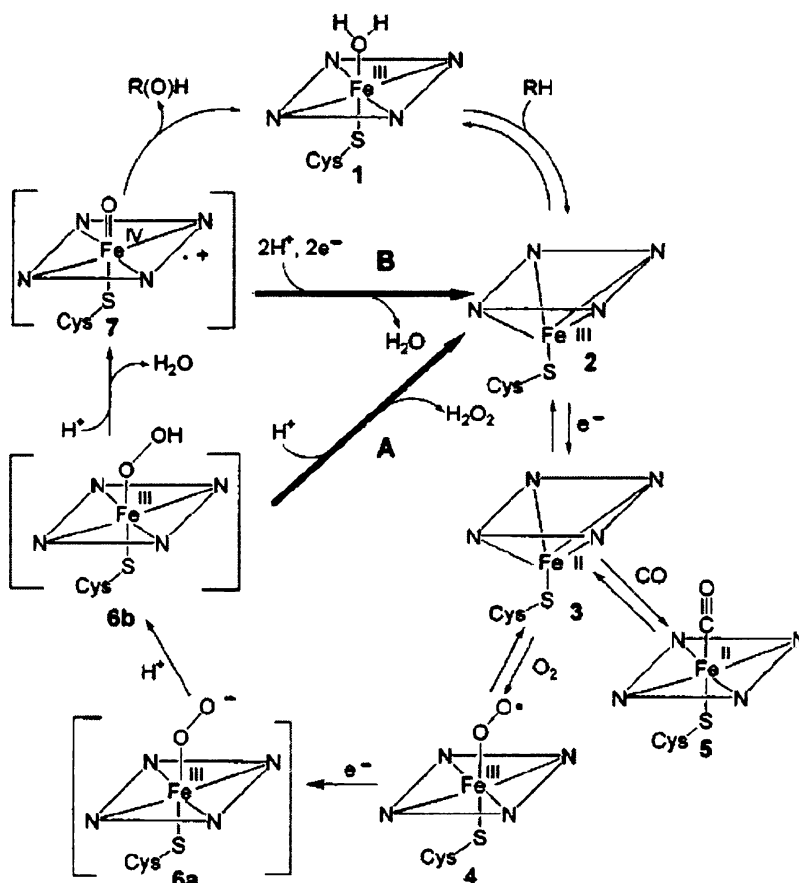
3. Ve fázi třetí je ion železa redukován z oxidačního čísla III na oxidační číslo II (tedy z ferri formy na ferro formu) přijmem elektronu od NADPH: cytochrom P450 reduktasy. Na tuto formu se mohou vázat molekuly jako O<sub>2</sub> nebo CO.

4. Po navázání kyslíku získá ion železa znovu oxidační číslo III a vzniká superoxidový komplex.

5. Paralelní krok vystihuje vazbu oxidu uhelnatého, která vrátí železo do nízkospinové formy, avšak nezmění ferro formu centrálního atomu železa na ferri formu. Tento komplex již nemůže vázat kyslík, oxid uhelnatý tedy způsobí inhibici P450.

6. Tato fáze dělená do dvou částí zahrnuje druhou redukci hemového železa, při které je dodán elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy nebo od cytochromu b<sub>5</sub>. Touto redukcí vzniká peroxidový anion (6a), který je schopný přijmout proton za vzniku hydroxyperoxidového aniontu.(6b)

7. Následuje vazba dalšího protonu na kyslík hydroxylové skupiny a tím dochází k heterolytickému štěpení peroxidové vazby. Uvolní se molekula vody a vzniká oxo-ferryl



Obrázek 2  
**Reakční cyklus P450.**  
(Bližší popis v textu. Převzato z [13])

porfyrinový radikálový intermediát. Ten inkorporuje atom kyslíku do struktury uhlovodíkového substrátu, čímž vzniká hydroxylovaný produkt a nativní forma P450.

Existují i dvě alternativní cesty mechanismu pro případ méně reaktivního substrátu:

A. Pokud se na formu 6b naváže proton na dosud neprotonizovaný kyslík, vzniká peroxid vodíku a současně forma P450 s atomem železa ve ferro formě.

B. Pokud forma 7 přijme dva elektrony a dva protony, uvolní se druhá molekula vody a forma P450 označená (2) – tento děj je označován jako oxidasová reakce P450.

Tímto mechanismem v principu probíhá nejen majoritně katalyzovaná hydroxylace, ale i další reakce, jako například N-, O-, S-dealkylace, nitro- a azo-redukce, epoxidace a dehydrogenace.

## 1.2 Cytochromy P450 rodiny 1

Cytochromy P450 1. rodiny mají velký význam v I., derivatizační fázi xenobiotik, zejména u sloučenin s charakteristickou strukturou, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické nitrosloučeniny (a jejich deriváty) a také aromatické aminy a amidy jako kofein a další. Většina substrátů pro tuto rodinu P450 se vyznačuje tím, že se jedná o planární molekuly, které jsou složeny ze dvou či více aromatických, případně heterocyklických kruhů, ve kterých se často vyskytuje dusík jako část heterocyklu nebo jako součást funkčních skupin. Svou biotransformační aktivitou mohou enzymy CYP1 rodiny přispívat ke vzniku metabolicky aktivních mutagenů a karcinogenů.<sup>[16]</sup>

Indukce exprese biotransformujících enzymů rodiny CYP1 je kontrolována prostřednictvím Ah receptoru („*Aryl Hydrocarbon receptor*“), avšak u ryby druhu *Danio rerio* byl objeven člen podrodiny CYP1D, u něhož nemá indukce skrze klasické induktory AhR dráhy (například TCDD) žádný efekt.<sup>[17]</sup>

U člověka jsou známy tři isoformy cytochromu P450 rodiny 1. Jsou to CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. V játrech je konstitutivně významněji zastoupen je pouze CYP1A2 (viz též tab. 2).<sup>[16]</sup>

### Tabulka 2

Relativní exprese cytochromů CYP1A podrodiny na úrovni mRNA v některých mimojaterních tkáních ve srovnání s játry (převzato z<sup>[18]</sup>)

Enzym	Tenké střevo	Ledviny	Plíce	Placenta	Játra
CYP1A1	+	+	+++ <sup>a</sup> +/-	++/++	++
CYP1A2	-	-	+/-	+ <sup>b</sup> /-	+++

+++ = orgán s vysokou expresí; ++ = průměrná exprese; + = nízká exprese; - = nedetekovatelná exprese; +/- = protichůdné údaje

<sup>a</sup> kuřáci, +/- u nekuřáků

<sup>b</sup> exprese v prvním trimestru těhotenství

### 1.2.1 Cytochrom P450 1A1

Lidský CYP1A1 je lokalizován primárně v extrahepatálních tkáních ve velmi nízkých konstitutivních koncentracích, avšak je vysoce inducibilní v mnoha orgánech zejména polycyklickými aromatickými uhlovodíky jako například benzo[a]pyrenem a halogenovanými aromatickými uhlovodíky, mezi něž patří již zmíněný TCDD.<sup>[18]</sup>

Přítomnost tohoto enzymu na proteinové úrovni byla prokázána v játrech, plicích, tenkém střevě, placentě, ledvinách, kůži, plicích a mozku<sup>[5, 19, 20]</sup> Exprese CYP1A1 na úrovni mRNA byla, mimo orgánů uvedených v tabulce 2 (na předcházející straně), prokázána také v hrtanu a tlustém střevě.<sup>[21, 22]</sup>

Hladina mRNA pro tento enzymu může být zvýšena mnoha vlivy. Působením záření UVB lze zvýšit tuto hladinu v keratinocytech, zvýšení bylo pozorováno v placentách těhotných kouřících žen.<sup>[23, 24]</sup>

Indukce CYP1A1 prostřednictvím kouření je závažná především v plicích, neboť vyšší aktivita CYP1A1 zde následně může vést k tvorbě většího množství reaktivních metabolitů schopných reagovat s DNA, a tím se zvýší pravděpodobnost vzniku rakoviny plic. Indukce skrze kouření vykazuje rozdíl mezi oběma pohlavími, neboť vyšší nárůst exprese CYP1A1, stejně jako hladiny DNA aduktů, byl zjištěn u pacientek s rakovinou plic.<sup>[25]</sup>

Tento enzym je polymorfní a dosud u něj bylo identifikováno 15 alel,<sup>[26]</sup> které ovlivňují jeho funkci nebo aktivitu genu. Zvýšený podíl alely CYP1A1\*2A byl nalezen u pacientů s rakovinou štítné žlázy.<sup>[27]</sup>

## 1.2.2 Cytochrom P450 1A2

Lidská forma CYP1A2 je lokalizována primárně v jaterní tkáni a pro své relativně nejvyšší zastoupení v organismu je považována za hlavní metabolický aktivátor heterocyklických aromatických aminů. Zastoupení tohoto enzymu v játrech se může mezi jedinci lišit až šedesátinásobně.<sup>[28]</sup> CYP1A2 byl na proteinové úrovni nalezen také v plicích, mozku, prostatě a gastrointestinálním traktu. Na úrovni mRNA byl nalezen v kůži.<sup>[19, 29, 30, 31]</sup>

CYP1A2 (viz obrázek 3) metabolizuje řadu klinicky důležitých léků (kofein, tizanadin), ze zmíněné skupiny aromatických aminů například N–heterocyklické aminy, které se nalézají například v mase grilovaném na dřevěném uhlí.<sup>[32]</sup>

V potkaních jaterních mikrosomech byla prokázána role tohoto enzymu jako antioxidantního enzymu. Indukce pomocí TCDD vedla v mikrosomech ke snížení produkce peroxidu vodíku, který vznikal hlavně působením enzymů CYP2E1 a CYP1A1.<sup>[29]</sup>



Obrázek 3

**Struktura lidského mikrosomálního CYP1A2 v komplexu s  $\alpha$ -naftoflavonem získaná rentgenovou difrakcí (převzato z <sup>[32]</sup>)**

Gen kódující tento protein je velmi konzervovaný a i přes značný počet možných alel, kterých bylo identifikováno 36, nebyla nalezena žádná běžně vyskytující se alela významně pozměňující genovou expresi nebo enzymovou aktivitu.<sup>[26, 34]</sup> Alela CYP1A2\*1F prokázala vyšší inducibilitu a zrychlení metabolismu kofeinu v závislosti na kouření a podávání omeprazolu.<sup>[35]</sup> Zajímavostí z hlediska transkripce je alela CYP1A2\*7 s mutací 3533 G>A. Místo, kde se změna nachází, podmiňuje správný průběh sestřihu RNA a může tak způsobit právě jeho abnormální průběh a vést k expresi zkráceného proteinu postrádajícího enzymovou aktivitu.<sup>[36]</sup>

## 1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky (Ah receptor)

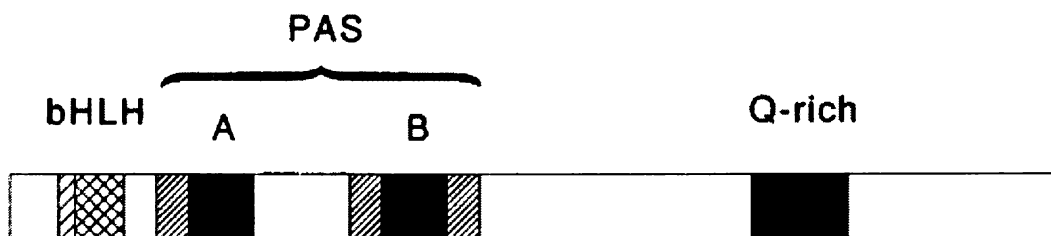
Ah receptor je ligandem aktivovatelný transkripční faktor vystupující v biologických odpovědích vůči halogenovaným aromatickým sloučeninám, polycyklickým aromatickým uhlovodíkům, flavonoidům a dalším látkám.. AhR kontroluje expresi genů kódujících enzymy první fáze metabolismu xenobiotik, jako např. enzymy CYP1A podrodiny, avšak také enzymy druhé fáze tohoto metabolismu, mezi něž patří NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa (NQO1), glutathion-S-transferasa A1 (GSTA1) a UDP-glukoronosyltransferasy (UGT).<sup>[37, 38]</sup> V současnosti se ukazuje, že AhR kontroluje i expresi genů, jejichž produkty nejsou ve spojitosti s metabolismem xenobiotik, jako jsou interleukin-1b, interleukin-2 a jaderné transkripční faktory c-fos, Jun-B a Jun-D.<sup>[39]</sup>

AhR byl objeven v polovině sedmdesátých let v pokusech s TCDD.<sup>[40]</sup> Mechanismus signalizační dráhy byl později objasňován na modelu indukce CYP1A1.<sup>[37]</sup>

### 1.3.1 Struktura Ah receptoru

AhR a další člen AhR signalizační dráhy, Amt („*aryl nuclear translocator*“), patří do rodiny bazických „*helix-loop helix*“ (bHLH) transkripčních faktorů, přičemž AhR je jediný člen aktivovaný ligandem.<sup>[41]</sup>

Samotný protein obsahuje 3 hlavní domény ukázané na obrázku 4:<sup>[38, 42, 43]</sup>



Obrázek 4

**Funkční domény myšího AhR** (Bližší popis v textu. Převzato z <sup>[42]</sup>)

- bHLH doména je lokalizovaná blízko N-konce. Je zodpovědná za dimerizaci, ale i vazbu Hsp90 a vazbu k DNA. Je zde také obsažena sekvence NLS („*nuclear localization signal*“), která společně se sekvencí

NES („*nuclear export signal*“) obsaženou v bHLH a PAS doméně umožňuje v případě aktivace vstup AhR do jádra.

– PAS doména, umístěná blízko C konce bHLH domény, je zodpovědná za vazbu ligandu, Hsp90 a dimerizaci. PAS doména sestává ze dvou opakujících se vysoce evolučně konzervovaných úseků o délce přibližně 50 aminokyselin, známých jako PAS A a PAS B. Tyto úseky jsou od sebe odděleny málo konzervovaným úsekem asi 150 aminokyselin.

PAS doména nese své jméno podle tří proteinů, ve kterých je byla také nalezena – Per („*Drosophilla period protein*“), Arnt a Sim („*Drosophilla single – minded protein*“). Proteiny obsahující PAS doménu náleží do PAS rodiny. O AhR se také referuje jako o bHLH – PAS proteinu.

– C-terminální doména je odpovědná za transkripční aktivitu. Tato doména obsahuje oblast bohatou na glutamin.

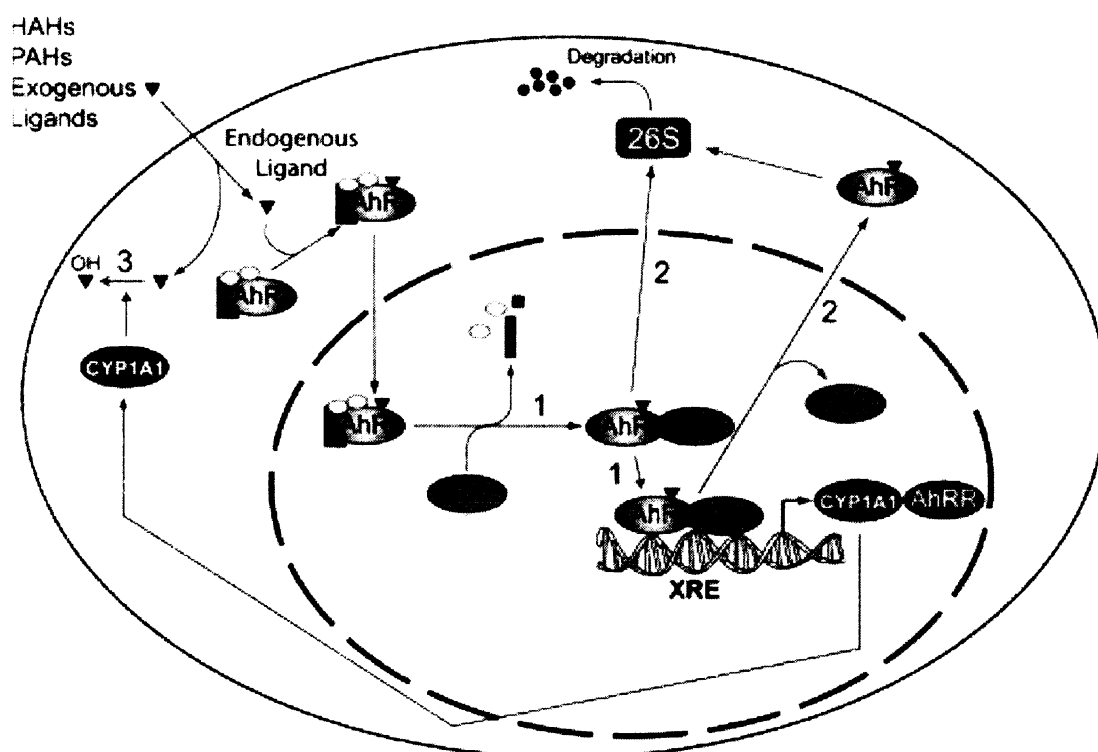
### 1.3.2 AhR signalizační dráha

Neaktivovaný AhR je přítomen v cytoplazmě v komplexu s dvěma chaperony Hsp90 („*heat shock protein*“ o velikosti 90 kDa), proteinem p23 a proteinem XAP2 (známého také pod označením ARA9 a AIP). Jak ukazuje obrázek 5, AhR po aktivaci ligandem vstupuje do jádra, disociuje z komplexu, vytváří heterodimer s Arnt proteinem a váže se specificky na promotorová místa genů. Arnt není jen partner nutný pro vazbu na DNA, ale nejspíš je potřebný i pro disociaci cytoplasmatických chaperonů. Vazná místa na DNA se nazývají XRE („*Xenobiotic responsive element*“) a sestávají z nukleotidů 5'- T/G TGCGTG A/C C/G A/T A/G G/C -3', přičemž pentanukleotidové sekvence 5'-GCGTG-3' je nutná pro vazbu heterodimeru AhR-Arnt a okolní nukleotidy jsou důležité pro aktivaci transkripce. Sekvence XRE jádra není symetrická a *in vitro* studie naznačují vazbu Arnt na triplet GTG a AhR na 5' konec pentanukleotidové sekvence.<sup>[37, 38, 41, 44]</sup>

Aktivita AhR je v jádře regulována hlavně pomocí AhRR (AhR represor), který je také členem bHLH rodiny proteinů a je exprimován konstitutivně (například srdce, mozek) i indukibilně (například plíce).<sup>[44]</sup> Mechanismus účinku AhRR byl dříve vysvětlován pomocí tvorby nefunkčního komplexu s Arnt nebo také vazby k DNA ve stejných místech, na které se váže AhR. Avšak zvýšená exprese Arnt nezmírnila represi spojenou s AhRR,



což ukázalo nezávislost předpokládané regulace. Při dalším pokusu byla zvýšená exprese Arnt doplněna o expresi mutantní formy AhRR, která nebyla schopna se vázat k DNA, ale ani v tomto případě se neprojevila inhibice. Navíc bylo ukázáno, že mechanismem regulace není ani přímá degradace AhR prostřednictvím AhRR, a že represor nezasahuje do transportu aktivovaného receptoru do jádra. Předpokládá se tedy, že AhR a AhRR kompetují o limitující kofaktor, nebo se regulace uskutečňuje protein-proteinovými interakcemi.<sup>[45]</sup>



Obrázek 5

**Mechanismus AhR signální dráhy a její regulace:**

- 1) dimerizace AhR s Arnt s disociací chaperonů Hsp90, p23 a XAP2; vazba komplexu AhR-Arnt na XRE a následná transkripční aktivita
- 2) Proteolytická degradace aktivovaného AhR zprostředkovaná 26S proteosomem
- 3) Metabolické odbourání ligandů AhR indukované aktivovanou formou AhR (převzato a upraveno z <sup>[44]</sup>)

### 1.3.3 Ligandy aktivující Ah receptor

Klasické vysokoafinitní ligandy AhR v modelu CYP1A1, jako TCDD, B[a]P nebo  $\alpha$ -naftoflavon sdílejí několik strukturálních podobností. Jsou to hydrofobní, planární nebo koplánární polycyklické molekuly. Ale byly nalezeny molekuly neodpovídající těmto

strukturním motivům. Mezi nimi figurují benzimidazoly, jako omeprazol používaný v léčbě žaludečních vředů, a karotenoidy.<sup>[46]</sup>

Existence endogenního ligandu v souvislosti s AhR zůstává jednou z hlavních nevyřešených otázek. Důkaz o přítomnosti endogenních agonistů u vyšších eukaryot ukazují pokusy s AhR aktivitou na buněčných kulturách. U kultur s vyřazeným genem pro CYP1A1, které nebyly vystaveny působení exogenních aktivátorů, byla zjištěna zvýšená tvorba heterodimeru AhR-Arnt s následnou transkripční aktivitou. Ale v buněčných kulturách s aktivní formou cytochromu P450 aktivita AhR velmi poklesla, což naznačuje možnost existence takového endogenního substrátu, který je zároveň substrátem CYP1A1. Zjištěná zvýšená aktivita AhR u buněk s deaktivovaným enzymem tak zřejmě vznikla nahromaděním této látky.<sup>[47]</sup>

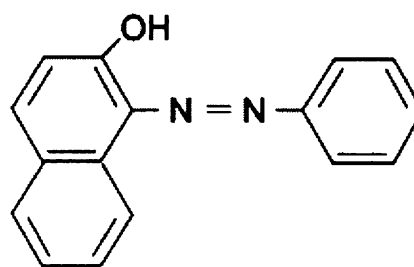
Ačkoliv nebyl identifikován endogenní ligand s vysokou afinitou, bylo nalezeno mnoho ligandů s nízkou afinitou. Tato skupina ligandů zahrnuje tetrapyroly, produkty vznikající UV rozpadem tryptofanu, sloučeniny obsahující indol, steroly a metabolity mastných kyselin.<sup>[44]</sup>

Jedním z dalších popsaných aktivátorů AhR je také cAMP, který však nepůsobí stejným mechanismem jako výše uvedené ligandy. AhR aktivovaný cAMP sice přechází do jádra, neváže se však s Arnt, nedochází tedy k tvorbě heterodimeru AhR-Arnt zodpovědného za potenciaci toxických efektů některých xenobiotik. Takto aktivovaný AhR se váže na XRE sekvenci 5'-GCGTG-3', ale je schopen se vázat i na mutovanou sekvenci 5'-GCGCG-3', se kterou dioxinem indukovaný komplex AhR-Arnt není schopen interagovat. Zmíněný fakt, že v této formě není přítomen vázaný Arnt vede k hypotéze o vyšší afinitě k jinému dimerizačnímu partnerovi. Zajímavým efektem cAMP je snížení indukce CYP1A1 zprostředkované dioxinem o 30-50 %. Funkce cAMP jako dalšího represoru dioxinem indukované AhR dráhy, nebo jeho zapojení do větší sítě propojující cAMP a AhRR, u něhož existují rozpory ohledně jeho mechanismu působení, však nemůže být kvůli malému množství relevantních informací řádně vysvětlena.<sup>[48]</sup>

## 1.4 Sudan I

Sudan I (obr. 6), synonymně nazývaný mnoha jmény (C.I. Solvent Yellow 14, Oil Orange), systematickým názvoslovím 1-(fenyloazo)-2-naftol, patří mezi azobarviva.

Jedná se o barvivo používané dříve jako potravinářské barvicí aditivum. V roce 1975 ho Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („*International Agency for Research of Cancer*“)



Obrázek 6  
**Sudan I** (převzato z <sup>[49]</sup>)

klasifikovala jako karcinogen pro potkany a myši,

načež ho zařadila do skupiny 3, jako látku „neklasifikovatelnou jako lidský karcinogen“, pro nedostatek relevantních dat. Přesto doporučila nepoužívat barvivo jako potravinářské aditivum.<sup>[50]</sup> V roce 2001 ho pracovní skupina Komise pro klasifikaci a označování nebezpečných látek EU označila jako kožní alergen pro člověka. V roce 2005 Evropský úřad pro kontrolu potravin potvrdil ve své rešeršní studii genotoxicitu a pravděpodobnou karcinogenitu tohoto barviva pro lidský organismus.<sup>[51]</sup> Toto barvivo je stále používáno v barvených materiálech, jako jsou rozpouštědla, benzíny, tuky, vosky, plastické hmoty, tiskařské barvy, boty a podlahy.<sup>[52]</sup>

### 1.4.1 Metabolismus Sudanu I

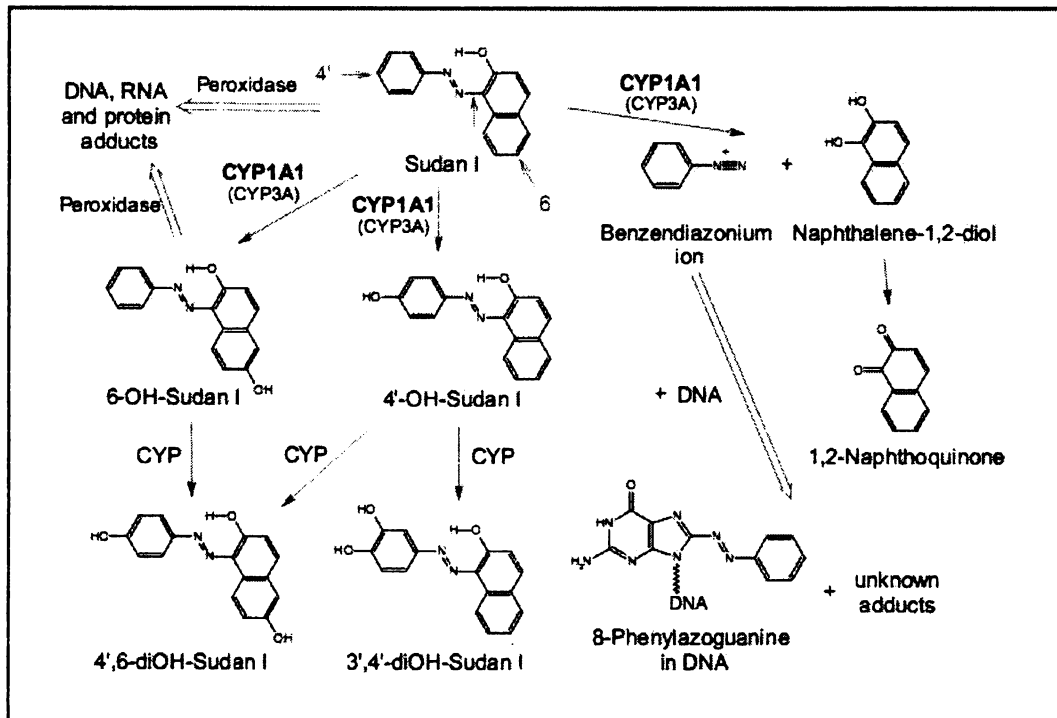
Sudan I je znám jako karcinogen pro myši a potkany, u kterých vyvolává po subkutánním podání nádory jater a močového měchýře.<sup>[52]</sup> V podmínkách *in vitro* byla zjištěna participace potkaních jaterních mikrosomů na oxidaci barviva, vznik benzendiazoniového iontu a tvorba radikálových produktů, které se vážaly na nukleové kyseliny a proteiny.<sup>[53]</sup>

Později byly detekovány další produkty mikrosomální oxidace Sudanu I, přičemž jako majoritní produkt byl identifikován 1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftol (4'-OH-Sudan I) a 1-(fenyloazo)naftalen-2,6-diol (6'-OH-Sudan I). Minoritní produkty byly identifikovány jako 1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol(3',4'di-OH-Sudan I) a 1-[(4-

hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol (4',6'di-OH-Sudan I). Srovnání oxidace Sudanu I mikrosomálními systémy člověka, potkana, králíka a minipraseť vedlo ke zjištění, že zatímco při použití králíčích a miniprasečích mikrosomů vznikalo nejvíce 6'-OH-Sudanu I, u potkaních a lidských byl majoritním produktem oxidace 4'-OH-Sudan I,. Použitím

specifických induktorů a inhibitorů u cytochromů P450 purifikovaných z potkaních byla prokázána význačná role potkaního CYP1A1 pro metabolismus Sudanu I v tomto modelovém organismu.<sup>[52]</sup>

CYP1A1 byl identifikován i v lidských mikrosomech jako hlavní enzym metabolizující Sudan I. Tento enzym byl v játrech detekován použitím polyklonálních protilátek proti potkanímu CYP1A1 a také proteinovým sekvenováním N-konce, které ukázalo shodu s lidským rekombinantním CYP1A1.



Obrázek 7  
Schéma metabolismu Sudanu I (převzato z <sup>[55]</sup>)

Použitím <sup>32</sup>P-postlabeling analýzy bylo také zjištěno, že z metabolitů Sudanu I vznikaly v játrech DNA adukty.<sup>[54]</sup> Jak je zřejmé z obrázku 7, reaktivní metabolit *in vivo* byl identifikován jakožto benzendiazoniový ion a jako DNA adukt 8-(fenylazo)guanin, který byl již předtím detekován *in vitro*. Tento adukt může být odpovědný za vznik kancerogenního procesu.<sup>[55]</sup>

V močovém měchýři potkanů vystavených působení Sudanu I byly také nalezeny DNA adukty, avšak odlišné od aduktu nalezeného v játrech. Adukty v DNA močového měchýře vznikají jedoelektronovými oxidacemi peroxidasami.<sup>[3]</sup>

Také byly zkoumány metabolické produkty tohoto barviva vzniklé působením lidské střevní mikroflóry. Detekován byl anilin a 1-amino-2-naftol, patřící do skupin aromatických aminů, které jsou známé svou toxicitou.<sup>[56]</sup>

## 2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- izolovat celkovou RNA z orgánů potkanů premedikovaných Sudanem I
- převést RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA s využitím náhodných hexamerů jakožto primerů
- pomocí real-time PCR kvantifikovat původní obsah mRNA enzymů CYP1A1 a CYP1A2 v orgánech potkanů premedikovaných Sudanem I relativně vůči kontrolnímu genu ( $\beta$ -aktin)
- výsledky porovnat s již dříve provedeným stanovením relativního množství sledovaných mRNA v orgánech potkanů nepremedikovaných Sudanem I.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

<b>Lech-Ner</b> ČR	isopropanol
<b>Penta</b> ČR	chloroform
<b>Lachema</b> ČR	ethanol
<b>Fermentas</b> Kanada	RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, DNA marker λ DNA EcoRI + Hind III
<b>Top-Bio</b> ČR	PCR Ultra H <sub>2</sub> O, PCR agarosa, PCR vkládací pufr
<b>Invitrogen</b> USA	Trizol® Reagent, SYBR® Green II RNA gel stain
<b>Bio Basic Inc.</b> Kanada	Tris (Base) [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] kyselina boritá, EDTA
<b>Applied Biosystem</b> USA	TaqMan® Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG) TaqMan Gene Expression Assay (specifické pro CYP1A1 a CYP1A2)
<b>Linde</b> Německo	Kapalný dusík
<b>British Drug Houses</b> UK	Sudan I

## **3.2 Použité metody**

### **3.2.1 Premedikace potkanů**

Potkanům kmene Wistar byl podáván intraperitonálně Sudan I rozpuštěný v kukuřičném oleji v dávce 20 mg/kg váhy jednou denně po dobu tří dnů. Po uplynutí 24 hodin od podání poslední dávky byly potkani zabiti zlomením vazů, byly vyjmuty jejich orgány a uloženy do mrazícího boxu do -80 °C.

### **3.2.2 Izolace RNA**

Při izolaci byly použity rukavice bez prášku a bylo pracováno ve flow-boxu (Labox BIO 126). Špičky s filtrem, mikrozkuřavky Eppendorf, špachtle a pinzety byly sterilizovány při teplotě 130 °C po dobu šesti hodin. Trizol<sup>®</sup> Reagent byl uchováván v lednici, ethanol a isopropanol v mrazícím boxu při -20 °C, chlorofom při laboratorní teplotě.

Vzorek tkáně byl homogenizován v třecí misce s použitím kapalného dusíku, následně byl převeden do 1 ml Trizolu tak, aby objem homogenizovaného vzorku byl maximálně 10 % objemu použitého Trizolu. Vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, poté k němu bylo přidáno 200 µl chloroformu a byl protřepán v ruce po dobu 15 sekund. Následovala inkubace po dobu 3 minut při laboratorní teplotě. Po této inkubaci byl vzorek odstředěn v centrifuze 5415R (Eppendorf) při 12 000 RPM (tj. 13 000 g) při teplotě 4 °C po dobu 15 minut.

Po centrifugaci byla odebrána horní bezbarvá fáze do nové mikrozkuřavky Eppendorf a k ní bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu. Od této chvíle byla mikrozkuřavka udržována na chladícím stojánku. Vzorek byl inkubován po dobu 10 minut v lednici. Poté následovala centrifugace při 12 000 RPM (13 000 g) při teplotě 4 °C po dobu 10 minut.

Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta přidáním 1 ml 75% ethanolu. Vzorek byl krátce vortexován na Vortexu Rx<sup>3</sup> a poté centrifugován při 7 400 RPM (5 600 g) při teplotě 4 °C po dobu 5 minut.

Po centrifugaci byl odebrán ethanol a vzorek byl několik minut sušen při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 70 µl PCR Ultra H<sub>2</sub>O. Vzorek byl protřepán a na 3 minuty



vložen do ohřívače bloků VLM LS 1 o teplotě 55 °C k rozpuštění RNA. Vzorky RNA byly následně rozděleny na alikvoty a uskladněny v mrazícím boxu při teplotě -80 °C.

### 3.2.3 Horizontální elektroforéza na agarose

Elektroforéza se používá pro analytické dělení biologických látek. Nabité částice se dělí v elektrickém poli na základě odlišné elektroforetické pohyblivosti. Pro dělení nukleových kyselin se používá agarosový gel. Pohyb velkých molekul je zpomalen tím, že obtížněji tímto gelem pronikají.<sup>[57]</sup>

Byla připravena 1% (w/v) agarosa ve 40 ml 1xTBE pufru (10x konc. – pH 8.0; 0,89 M Tris, 0,89 M kyseliny borité, 0,02 M EDTA). Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Po ochlazení byl gel přelit do elektroforetické vaničky a následně byl do chladnouceho gelu vložen hřeben k vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí byl hřeben odstraněn a vanička s gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury Uvitec, která byla naplněna elektrodovým 1xTBE pufrem. Do jamek byly nanášeny vzorky smíšené s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří, ředěno 1:4). Do jedné z jamek byly vždy nanášeny 3 µl λ-markeru. Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 110 V při použití zdroje ES 03 (Labio).

Po skončení elektroforézy byl gel umístěn do barvicí lázně obsahující 50 ml 0,5xTBE pufru s 5 µl SYBR<sup>®</sup> Green II RNA gel stain. V této lázni byl gel ve tmě třepán po dobu 30 minut. Pak byl gel umístěn na transiluminátor Dark Reader (Clare Chemical Research) pro vizualizaci RNA.

### 3.2.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

7 µl rozpuštěného vzorku izolované celkové RNA bylo naředěno MQ vodou na celkový objem 500 µl. Jako referenční vzorek byla použita MQ voda. Absorpční spektrum bylo změřeno na spektrofotometru E8453 (Hewlett Packard) v rozsahu 220-340 nm s použitím křemenných kyvet.

Koncentrace RNA byla zjištěna dle vzorce

$$c = (A_{260} - A_{320}) \times \text{ředění} \times 0,04$$

tedy v našem případě

$$c = \frac{(A_{260} - A_{320}) \times 70 \times 0,04}{A_{280} - A_{320}}$$

Čistota byla spočtena dle poměru

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

### 3.2.5 Reverzní transkripce

Tato metoda slouží k syntéze cDNA z RNA použitím reverzní transkriptasy. Použití náhodných hexamerů zvyšuje výtěžek reakce oproti použití oligo-dT primerů. M-MULV reverzní transkriptáza (z viru Moloneyho myší leukémie) má nižší RNasovou aktivitu, než jiná, také často používaná, transkriptáza AMV z viru ptačí myeloblastozy.<sup>[58]</sup>

Při práci byly použity rukavice bez prášku a bylo pracováno ve flow-boxu (Labox BIO 126). Špičky s filtrem, mikrozkušavky Eppendorf a pinzety byly sterilizovány při teplotě 130 °C po dobu šesti hodin.

Do mikrozkušavek Eppendorf byl pipetován 1 µl náhodných hexamerů (0.2 µg/µl), množství vzorku RNA odpovídající 1 µg, případně 3 µg RNA a objem byl doplněn na 14 µl MQ vodou.

Byla též připravena kontrola neobsahující vzorek RNA. Mikrozkušavky byly během práce drženy na chladící podložce.

Vzorky byly poté promíchány jemným poklepáním na stěnu mikrozkušavky, krátce centrifugovány na centrifuze GMC LAB a inkubovány 5 minut při 70 °C (rozvolnění sekundárních struktur RNA) v Thermocycleru TECHNE. Poté byly ochlazeny na ledu a opět krátce centrifugovány. Následně k nim byl přidáno 7 µl předem připravené směsi, která obsahovala (na jeden vzorek):

pufř (5x konc.)	4 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
inhibitor RNas (20 u/ µl)	1 µl

Poté byly vzorky promíchány, krátce centrifugovány, inkubovány 5 min při teplotě 25 °C, ochlazeny na ledu a opět krátce centrifugovány. Z každé mikrozkušavky (tedy i kontroly) byly odebráno 2 µl do čisté mikrozkušavky Eppendorf jako negativní kontrola bez

reverzní transkriptasy. Následně byl do každé z „původních“ mikrozkušavek přidán 1  $\mu$ l reverzní transkriptasy (200 u/ $\mu$ l).

Následně byly mikrozkušavky se vzorky, kontrolou a negativními kontrolami bez reverzní transkriptasy vloženy do Thermocycleru TECHNE, kde byly nastaveny následující reakční podmínky:

5 °C po dobu 10 minut (nasednutí náhodných hexamerů)

42 °C po dobu 42 minut (prodlužování cDNA)

70 °C po dobu 10 minut (deaktivace reverzní transkriptasy)

Získaná cDNA byla uskladněna v mrazicím boxu při -20 °C.

### 3.2.6 „Real-time“ polymerasová řetězová reakce

Tato metoda v principu vedle PCR využívá 5' nukleasovou aktivitu DNA polymerasy a fluorescence. TaqMan sonda (krátký řetězec RNA nebo DNA) má na 5' konci fluorescenční barvivo (zde FAM<sup>TM</sup>) a na 3' konci zhasací barvivo (zde NFQ<sup>TM</sup>). Blízkost obou těchto prvků potlačuje vznik fluorescence. Pokud však sonda hybridizuje s úsekem DNA nebo RNA ve vzorku, je postupně její 5' konec odštěpován DNA polymerasou skrze její 5' nukleázovou aktivitu, čímž se uvolní fluorescenční barvivo. Nárůst fluorescence je detekován jen v případě komplementarity sondy s hledanou sekvencí.<sup>[59]</sup>

Bylo pracováno ve flow-boxu (MB 120). Vzorky cDNA byly 10x zředěny MQ vodou, stejně jako kontroly z reverzní transkripce, přičemž následně bylo 5  $\mu$ l takto zředěných vzorků pipetováno do 0,2 ml mikrozkušavek Eppendorf. Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 15  $\mu$ l předem připravené směsi, která obsahovala (na jeden vzorek):

MQ voda	4 $\mu$ l
Taqman Gene Expression Assay	1 $\mu$ l
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (No AmpErase <sup>®</sup> UNG)	10 $\mu$ l

Poté byly vzorky vloženy do Real time cycleru Rotor Gene 2000, kde byly nastaveny pomocí programu Rotor Gene 5 nastaveny následující podmínky následující podmínky:

50 °C po dobu 2 minut (nasednutí primerů a sond)

95 °C po dobu 10 minut (aktivace DNA polymerasy)

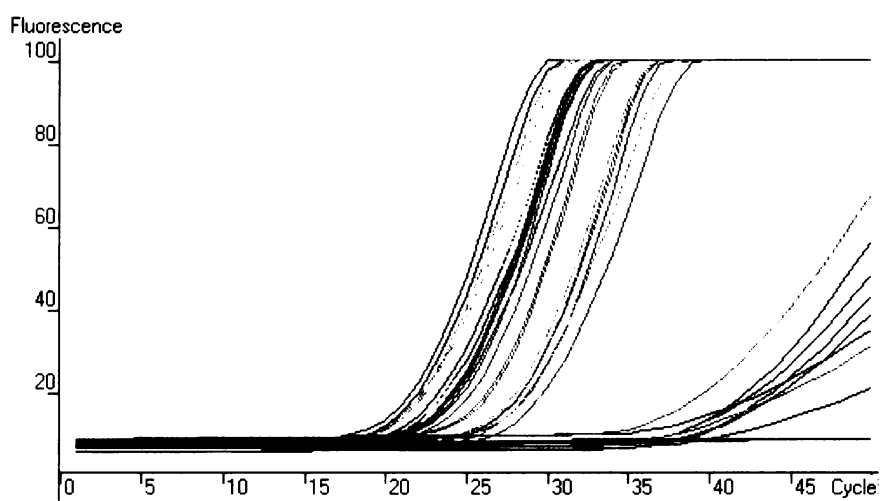
poté bylo nastaveno 50 cyklů těchto parametrů

95 °C po dobu 15 sekund (rozvolnění DNA)

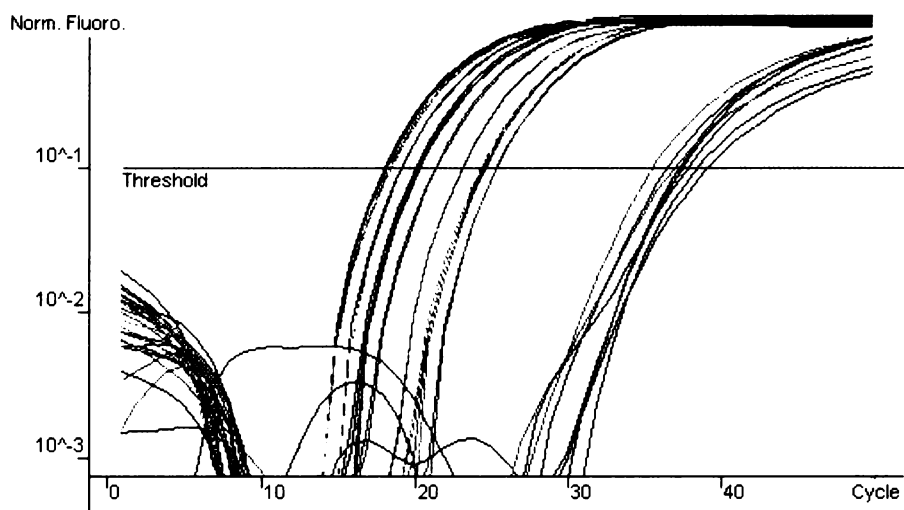
60 °C po dobu 60 sekund (hybridizace sond, prodlužování DNA)

Pro vyhodnocení byl použit program Rotor Gene 5, který určil hodnoty  $C_T$ , tedy přibližné číslo cyklu, ve kterých křivky protínají linii „treshold“ (linie se signifikantním nárůstem detekce signálu – viz obrázek 8).

**A**



**B**



Obrázek 8

Amplifikační graf (A) v lineárním zobrazení, (B) v logaritmickém zobrazení s vyznačenou linií „treshold“

Tyto hodnoty byly statisticky zpracovány, což pro každý analyzovaný vzorek tkáně zahrnovalo<sup>[59a]</sup>:

- ze dvou naměřených hodnot  $C_T$  (pro paralelní stanovení) byl vypočten průměr  $C_T(1A1)$ ,  $C_T(1A2)$  a  $C_T(\beta - aktin)$  vyjadřující expresi daného genu.

- odečtením hodnot průměrů  $C_T$  genu referenčního ( $\beta$ -aktin) od průměrů  $C_T$  pro sledované enzymy byly stanoveny hodnoty relativního  $C_T$ , tedy exprese sledovaného enzymu v porovnání s genem referenčním, dle vzorce (pro CYP1A1)

$$\Delta C_T = C_T(1A1) - C_T(\beta - aktin)$$

- pro kvantifikaci exprese genů CYP1A1 a 1A2 byly odebírány vzorky ze 3 zvířat, pro každou tkáň byla tedy následně určena průměrná relativní exprese sledovaných genů jakožto průměr  $\overline{\Delta C_T}$  a směrodatná odchylka.

- Míra indukce exprese genů CYP1A1 a 1A2 ve vzorcích tkáně odebrané z potkanů premedikovaných Sudanem I oproti tkáni potkanů nepremedikovaných byla vyjádřena jakožto násobek kontroly ze vzorce

$$2^{-\Delta\Delta\bar{C}_T} = 2^{-(\overline{\Delta\bar{C}_T}^{(Sudan\ I)} - \overline{\Delta\bar{C}_T}^{(kontrola)})}$$

## 4. Výsledky

Pro kvantifikaci mRNA pro CYP1A1 a CYP1A2 bylo nutné nejprve izolovat celkovou RNA z tkání potkanů premedikovaných Sudanem I. Následně byly preparáty celkové RNA pomocí reverzní transkriptasy s použitím náhodných hexamerů jako primerů převedeny na komplementární DNA, která byla nakonec analyzována použitím metody „real-time“ PCR s využitím specifických komerčních sond.

### 4.1 Izolace celkové RNA

Z vybraných tkání potkanů premedikovaných Sudanem I byla izolována celková RNA s využitím přípravku Trizol<sup>®</sup> Reagent založeném na metodě vyvinuté Chomczynskim a Sacchim.<sup>[60]</sup> Výtěžek byl zjišťován elektroforézou vzorků v horizontálním uspořádání a měřením absorpčních spekter. Na elektroforéze by v případě nedegradované RNA měly být viditelné 2 proužky rRNA (28S a 18S), v absorpčním spektru měl být pozorován nárůst absorbance v oblasti 260 nm bez výrazného nárůstu absorbance při 280 nm.

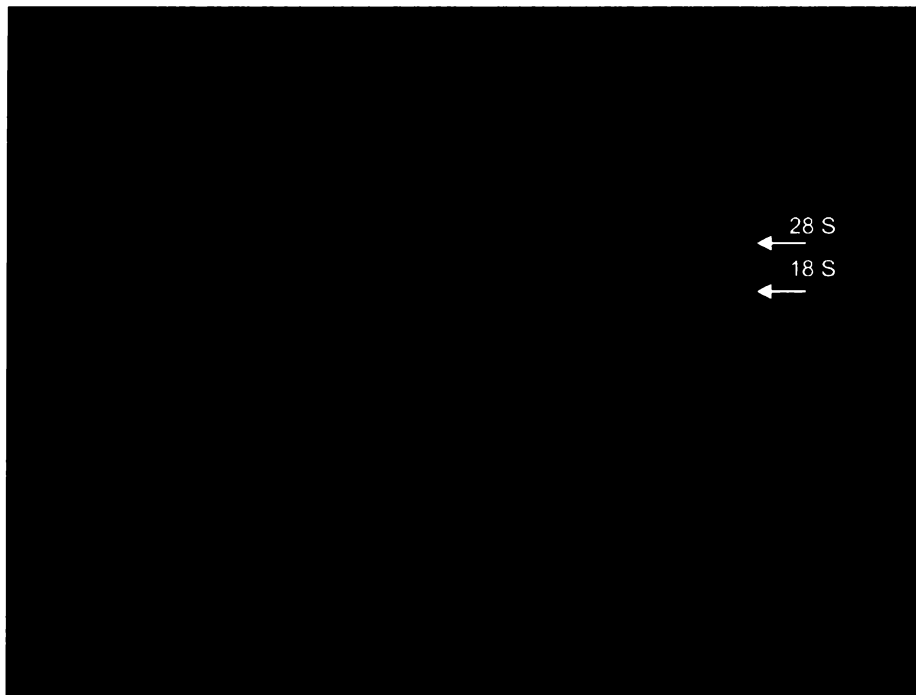
Nejprve byla izolace prováděna s homogenizací pomocí homogenizátoru IKA<sup>®</sup> T10a Basic Ultra Turrax<sup>®</sup> avšak postup s tímto krokem nevedlo k požadovanému výtěžku zjištěnému jak elektroforézou (nebyly viditelné proužky RNA), tak měřením absorpčních spekter (nebyl pozorován pík v oblasti 260 nm). Právě okamžik homogenizace za tepla, i když v Trizolu, jsme považovali za jeden z možných kritických kroků.

Proto byla nejdříve navržena optimalizace homogenizace vzorku zmrazeného kapalným dusíkem pomocí tloučku v keramické misce.

Použití homogenizace tkáně v kapalném dusíku již vedlo ke spektrofotometrickému stanovení nukleových kyselin ve výsledném preparátu, ale RNA pomocí elektroforézy detekována nebyla. Proto bylo testováno, zda nedošlo k degradaci vzorku vlivem např. kontaminovaných či jinak degradovaných chemikálií – v dalším experimentu byl k izolaci použit Trizol<sup>®</sup> Reagent a také PCR Ultra H<sub>2</sub>O zapůjčené ze spolupracující laboratoře RNDr. Součka (SZÚ), avšak se stejným výsledkem.

Další optimalizace, zvolené na základě dostupných protokolů, byly uplatněny právě na metodu elektroforézy. Používaný TAE pufr byl nahrazen TBE pufrem a jako vizualizační barva byla SYBR Safe<sup>™</sup> nahrazena barvou SYBR<sup>®</sup> Green II RNA gel stain. Bylo zjištěno, že právě díky této barvě bylo možno vizualizovat separované molekuly RNA na

elektroforéze (viz obrázek 9), barvivo SYBRSafe™ i přes deklaraci výrobce vizualizaci RNA neumožňovalo.



Obrázek 9

**Elektroforéza preparátů celkové RNA izolované z ledvin a plic potkanů premedikovaných Sudanem I**

Aplikované vzorky zleva: DNA  $\lambda$ -marker, 3x RNA z ledvin, 3x RNA z plic

Čistota a koncentrace byla stanovena pomocí měření absorpčních spekter a dle vzorců uvedených v kapitole 3.2.3. Tyto údaje ukazuje tabulka 3

Tabulka 3

**Spektrofotometrické určení čistoty a koncentrace získané RNA**

Vzorky byly před měřením absorpčních spekter 70x ředěny, vzorek „Játra 2“ 140x

Vzorek	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	Čistota	c (RNA) [ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ]
Játra 1	0,6822	0,4180	0,0005	1,63	1,90
Játra 2	0,5980	0,3708	0,0026	1,62	3,33
Játra 3	0,7859	0,4517	-0,0035	1,73	2,20
Plíce 1	0,1402	0,1004	0,0386	1,64	0,28
Plíce 2	0,1112	0,0780	0,0173	1,55	0,26
Plíce 3	0,1151	0,0840	0,0358	1,65	0,22
Ledviny 1	0,2335	0,1560	0,0244	1,59	0,59
Ledviny 2	0,1742	0,1224	0,0329	1,58	0,40

Ledviny 3	0,1178	0,0783	0,0170	1,64	0,28
Testes 1	0,0833	0,0494	-0,1000	1,23	0,51
Testes 2	0,0782	0,0490	0,0059	1,68	0,20
Testes 3	0,0790	0,0496	0,0070	1,68	0,20
Střeva 1	0,0926	0,0579	0,0093	1,71	0,23
Střeva 2	0,1049	0,0639	0,0068	1,72	0,10
Střeva 3	0,0155	0,0061	-0,038	1,21	0,15
Srdce 1	0,4493	0,2637	0,0025	1,71	1,25
Srdce 2	0,0819	0,0492	0,0083	1,80	0,21
Srdce 3	0,0529	0,0244	-0,0135	1,75	0,19

## **4.2 Reverzní transkripce a kvantifikace získané RNA**

Ze získané RNA byla následně pomocí reverzní transkripce připravena cDNA. Transkripce byla provedena jen u vzorků plic, jater a ledvin, neboť u ostatních tkání nebyla elektroforézou prokázána přítomnost RNA.

Nejprve byly k „real-time“ PCR použity vzorky cDNA získané reverzní transkripcí z 1 µg RNA. Tyto vzorky však vykazovaly příliš nízký obsah cDNA, a to zejména pro CYP1A1, a proto připravena a následně analyzována cDNA ze 2 µg (plíce), popřípadě ze 3 µg RNA (játra, ledviny).

Nejdříve byly všechny vzorky vždy charakterizovány z hlediska obsahu β-aktinu, který by měl být ve všech tkáních exprimován ve stejném množství, proto se využívá jakožto referenční gen. Následně byly vzorky analyzovány z hlediska exprese sledovaných genů, tedy CYP1A1 resp. CYP1A2.

Mezivýsledky statistického zpracování dat, jehož postup je popsán v kapitole 3.2.6, jsou zobrazeny v tabulkách 4 a 5.

Výslednou míru indukce je možno vidět v tabulce 6. Expese CYP1A1 byla signifikantně zvýšena v játrech a plicích ( $P < 0,001$ ), kdežto CYP1A2 byl indukován v ledvinách a v plicích, jednalo se však o nárůst nesignifikantní ( $P < 0,1$ ).

Tabulka 4

**Míra exprese genů pro CYP1A1, CYP1A2 a standardního genu (β-aktin) ve vzorcích tkání potkanů vyjádřená jakožto průměr  $C_T \pm$  chyba ze dvou paralelních stanovení**  
S – vzorek získaný z orgánu potkana premedikovaného Sudanem I; K – kontrolní orgán z nepremedikovaného potkana; (\*) – byla použita hodnota jediného  $C_T$

Vzorky	$C_T(\beta - \text{aktin})$	$C_T(1A1)$	$C_T(1A2)$
S – Játra 1	19,74 ± 0,08	20,70 ± 0,05	14,83 ± 0,08



S – Játra 3	20,23 ± 0,04	20,52 ± 0,01	14,95 ± 0,06
K – Játra 1	22,22 ± 0,03	28,67 ± 0,00	17,00 ± 0,03
K – Játra 2	20,64 ± 0,08	27,03 ± 0,08	15,57 ± 0,03
K – Játra 3	19,75 ± 0,20	26,02 ± 0,04	14,58 ± 0,12
S – Plíce 1	19,26 ± 0,03	24,40 ± 0,00	31,70 ± 0,13
S – Plíce 2	20,44 ± 0,02	25,86 ± 0,05	32,49 ± 0,09
S – Plíce 3	18,19 ± 0,04	22,99 ± 0,08	28,16 ± 0,03
K – Plíce 1	15,31 ± 0,00	25,96 ± 0,31	30,33 ± 1,09
K – Plíce 2	15,42 ± 0,01	25,95 ± 0,02	27,94 ± 0,22
K – Plíce 3	14,70 ± 0,02	24,97 ± 0,05	29,07 ± 0,03
S – Ledviny 1	25,47 ± 0,02	30,53 ± 0,06	30,91 ± 0,04
S – Ledviny 2	24,68 ± 0,06	28,67 ± 0,10	35,78 ± 0,00 (*)
S – Ledviny 3	24,49 ± 0,06	28,13 ± 0,07	36,10 ± 1,41
K – Ledviny 1	17,92 ± 0,23	21,45 ± 0,36	32,75 ± 0,58
K – Ledviny 2	19,57 ± 0,04	23,98 ± 0,00	33,14 ± 0,06
K – Ledviny 3	17,99 ± 0,07	22,90 ± 0,05	31,81 ± 0,36

Tabulka 5

Expresie genů pro CYP1A1 a 1A2 v jednotlivých vzorcích tkání z potkanů premedikovaných Sudanem I vztažená vůči genu standardnímu.

Vzorek	$\Delta C_T(\text{CYP1A1})$	$\Delta C_T(\text{CYP1A2})$
S – Játra 1	0,96	-4,91
S – Játra 2	0,48	-4,91
S – Játra 3	0,29	-5,28
K – Játra 1	6,45	-5,22
K – Játra 2	6,39	-5,07
K – Játra 3	6,27	-5,17
S – Plíce 1	5,14	12,44
S – Plíce 2	5,42	12,05
S – Plíce 3	4,80	9,97
K – Plíce 1	10,65	15,02
K – Plíce 2	10,53	12,52
K – Plíce 3	10,27	14,37

S – Ledviny 1	5,06	5,44
S – Ledviny 2	3,99	11,1
S – Ledviny 3	3,64	11,61
K – Ledviny 1	4,03	14,83
K – Ledviny 2	4,41	13,57
K – Ledviny 3	4,91	14,38

Tabulka 6

**Indukce exprese genů pro CYP1A1 a CYP1A2 v orgánech potkanů premedikovaných Sudanem I v porovnání s potkany nepremedikovanými. Míra indukce je vyjádřena jakožto násobek kontroly. Dále je ukázána přibližná velikost kritické hodnoty Studentova t-testu**

Enzym	Orgán	$\overline{\Delta C_T^{(SudanI)}} + SD$	$\overline{\Delta C_T^{(kontrola)}} + SD$	Míra indukce $2^{-\Delta\Delta C_T}$	
CYP1A1	Játra	0,58 ± 0,35	6,37 ± 0,07	55,33	P < 0,001
	Plíce	5,12 ± 0,31	10,48 ± 0,16	41,07	P < 0,001
	Ledviny	4,23 ± 0,74	4,45 ± 0,36	1,16	P < 0,1
CYP1A2	Játra	-5,03 ± 0,21	-5,15 ± 0,06	0,92	P < 0,1
	Plíce	11,49 ± 1,33	13,97 ± 1,30	5,58	P < 0,1
	Ledviny	9,38 ± 3,43	14,07 ± 0,67	25,81	P < 0,1

## 5. Diskuse

Předkládaná bakalářská práce navazuje na předchozí studie ohledně Sudanu I vypracované v této laboratoři. Dosud provedené metabolické studie ukázaly, že v detoxikaci Sudanu I hrají důležitou roli mikrosomální enzymy; nejdůležitějším detoxifikačním enzymem pro Sudan I je u člověka i potkana CYP1A1. V jeho aktivaci na reaktivní metabolity poškozující DNA se pak uplatňují zejména peroxidasy (viz též obr. 7, str. 20)

Jelikož se v případě CYP1A1 jedná o enzym inducibilní, bylo sledováno, zda premedikace potkanů Sudanem I vede ke změnám exprese tohoto enzymu a dalších enzymů inducibilních prostřednictvím téhož receptoru (AhR). Dosud byla studována indukce pouze na úrovni exprese proteinů a příslušné enzymové aktivity, a to u obou zástupců CYP1A podrodiny a také DT-diaforasy (NQO1). Pomocí immunoblottingu bylo zjištěno, že v jaterní tkáni vlivem Sudanu I narůstá obsah CYP1A1, nikoli však CYP1A2. V ostatních orgánech byla sledována exprese obou zástupců CYP1A podrodiny zároveň; indukce exprese CYP1A1/2 byla zaznamenána v plicích, slezině a ledvinách. Aktivita CYP1A1 stanovená jakožto mikrosomální oxidace Sudanu I byla signifikantně zvýšena v ledvinách, játrech a plicích. Mikrosomální deethylace 7-ethoxyresofurinu, tj. stanovení specifické aktivity CYP1A1/2, byla zvýšena především v ledvinách a játrech. Exprese a aktivita NQO1 byla prokazatelně zvýšena zejména v plicích, v menší míře pak v játrech, srdci a slezině.<sup>[61]</sup>

Kvantifikací mRNA pro CYP1A1 v játrech potkanů se v souvislosti se Sudanem I již zabývala práce Refata a kol.<sup>[62]</sup> Potkani kmene Wistar byli podrobena dávkování 40 mg/kg o stejném časovém rozložení jako v našem případě. Po premedikaci Sudanem I bylo metodou „real-time“ PCR detekováno 1500x vyšší množství mRNA tohoto enzymu než u potkanů kontrolních. Indukce v jiných orgánech zkoumána nebyla.

Úkolem předkládané práce bylo kvantifikovat mRNA pro CYP1A1 a CYP1A2 v játrech i extrahepatálních tkáních potkanů premedikovaných Sudanem I metodou real-time PCR. Stanovení hladin příslušných mRNA v játrech, ledvinách a plicích potvrdilo indukci CYP1A1 prostřednictvím zvýšeného množství mRNA v játrech a dále také v plicích. Obdobným mechanismem, tedy zvýšenou expresí genu, dochází také k indukci CYP1A2 v ledvinách a v menší míře také v plicích.

S ohledem na výše uvedené poznatky a na základě výsledků získaných v této práci je tedy možno konstatovat, že premedikace Sudanem I vede u potkanů k selektivní indukci

CYP1A1 a/nebo CYP1A2 v různých tkáních, a to zvýšením exprese příslušného genu, zprostředkovaném zřejmě Ah-receptorem. Jelikož působením CYP1A1 dochází k detoxikaci Sudanu I, opakovaná expozice Sudanu I tedy zřejmě vede k oslabování jeho toxických účinků.

## 6. Závěr

V rámci předkládané bakalářské práce byla izolována celková RNA z orgánů potkanů premedikovaných azobarvivem Sudanem I. Tato RNA byla poté převedena na cDNA pomocí reverzní transkriptasy s použitím náhodných hexamerů jako primerů. Použitím specifických sond pomocí metody „real-time PCR“ bylo změřeno relativní zastoupení mRNA enzymů v premedikované tkáni vůči genu s konstantní expresí ( $\beta$ -aktin). Porovnáním s výsledky získanými pro nepremedikované potkany bylo zjištěno, že Sudan I vyvolal indukci exprese CYP1A1 v játrech a plicích, (55- resp. 41násobné množství mRNA oproti kontrole) kdežto CYP1A2 v ledvinách a plicích (26- resp. 6násobné množství oproti kontrole).

## Seznam použité literatury

1. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. listy* 98, 876-890.
2. Knejzlík, Z., Káš J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. listy* 94, 913-918.
3. Stiborová, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Multioborový sborník "Otevřená věda"* (<http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>)
4. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386
5. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. listy* 93, 229-237
6. McLean, M. A., Maves, A. S., Weiss, K. E., Krepich, S., Sligar, S. G. (1998) Characterization of a Cytochrome P450 from the Acidothermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 166-172
7. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol.* 124, 128-145
8. Zuber, R., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism, *J. Cell. Mol. Med.* 6, 189-198
9. <http://drnelson.utm.edu/p450stats.Feb2008.htm> (ke dni 8.4.2009)
10. <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html> (ke dni 8.4.2009)
11. Guengerich, F. P., Wu, Z. L., Bartleson C. J. (2005) Function of human cytochrome P450s: Characterization of the orphans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 465-469
12. Stiborová, M. (2002) Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chem. listy* 96, 784-791
13. Murray, G. I. (2000) The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy, *J. Pathol.* 192, 419-26.
14. Guengerich, F. P. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases, *Mol. Interv.* 3, 194-204.
15. Kadkhodayan, S., Coulter, E. D., Maryniak, D. M., Bryson, T. A. & Dawson, J. H. (1995) Uncoupling oxygen transfer and electron transfer in the oxygenation of camphor analogues by cytochrome P450-CAM. Direct observation of an intermolecular isotope effect for substrate C-H activation, *J. Biol. Chem.* 270, 28042-28048.

16. Lewis, D. F., Lake, B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S., Guengerich, F. P. (1999) Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102, *Toxicology* 139, 53-79.
17. Goldstone, J. V., Jönsson, M. E., Behrendt, L., Woodin, B. R., Jenny, M. J., Nelson D. R., Stegeman, J. J. (2009) Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD, *Arch. Biochem. Biophys.* 482, 7-16
18. Pávek, P., Dvořák, Z. (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues, *Curr. Drug Metab.* 9, 129-143
19. Draushuk, A. T., McGarrigle, B. P., Larsen, K. E., Stegeman, J. J., Olson, J. R. (1998) Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture, *Carcinogenesis* 19, 1361-1368
20. Miksys, S. L., Tyndale, R. F. (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain, *J. Psychiatry Neurosci.* 27, 406-415
21. Sarikaya, D., Bilgen, C., Kamataki, T., Topcu, Z. (2006) Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level, *Biopharm. Drug Dispos.* 27, 353-359
22. Mercurio, M. G., Shiff, S. J., Gaibraith R. A., Sassa S. (1995) Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 350-355
23. Katiyar, S. K., Matsui M. S., Mukhtar, H. (2000) Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1, *J. Invest. Dermatol.* 114, 328-333
24. Whyatt, R. M., Garte, S. M., Cosma, G., Bell D. A., Jedrychowski, W., Wahrendorf, J., Randall M. C., Cooper, T. B., Ottman, R., Tang, D., Tsai, W. Y., Dickey, C. P., Manchester, D. K., Crofts, F., Perera, F. P. (1995) CYP1A1 messenger RNA levels in placental tissue as a biomarker of environmental exposure, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 147-153
25. Mollerup, S., Ryberg, D., Hewer, A., Phillips D. H., Haugen, A. (1999) Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients, *Cancer Res.* 59, 3317-3320
26. <http://www.cypalleles.ki.se/> (ke dni 25.6.2009)
27. Bufalo, N. E., Leite, J. L., Guilhen, A. C. T., Morari, E. C., Granja, F., Assumpcao, L. V. M., Ward, L. S. (2006) Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants, *Endocr. Relat. Cancer.* 13, 1185-1193

28. Turesky, R. J., Constable, A., Richoz, J., Varga, N., Markovic, J., Martin, M. V., Guengerich, F. P. (1998) Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2, *Chem. Res. Toxicol.* *11*, 925 - 936
29. Shertzer, H. G., Clay, C. D., Genter, M. B., Schneider, S. N., Nebert, D. W., Dalton, T. P. (2004) CYP1A2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsoms, *Free Radic. Biol. Med.* *35*, 605-617
30. Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Wolski, P-M, Gundert-Remy, U. (2006) Characterisation of the xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination, *Toxicol. Lett.* *164*, 278-288
31. Swanson, H.I. (2004) Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective, *Chem. Biol. Interact.* *149*, 69-79
32. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okeys, A. B., Gonzales, F.J. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in enviromental toxicity and cancer, *J. Biol. Chem.* *279*, 23847-23850
33. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2HI4> (ke dni 28.6.2009)
34. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphism on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeipgenetic and clinical aspects, *Pharmacol. Ter.* *116*, 496-526
35. Sachse, C., Brockmüller, J., Bauer, S., Roots, I. (1999) Functional significance of a C -> A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with coffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.* *47*, 445 - 449
36. Allorge, D., Chevalier, D., Lo-Guidice, J. M., Cauffiez, C., Suard, F., Baumann, P., Eap, C. B., Broly, F. (2003) Identification of novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene, *Br. J. Clin. Pharmacol.* *56*, 341 - 344
37. Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis, *Toxicol. Lett.* *120*, 1-7
38. Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological fuctions mediated by the aryl hydrocarbon receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* *464*, 207-212
39. Kung, T., Murphy, K. A., White, L. A. (2009) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism, *Biochem. Pharmacol.* *77*, 536-546
40. Polland, A., Glover, E. (1976) Sterespecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol, *J. Biol. Chem.* *251*, 4936-4946



41. Köhle, C., Bock, K. W. (2007) Coordinate regulation of phase I and II xenobiotic metabolism by the Ah receptor and Nrf2, *Biochem. Pharmacol.* 73, 1853-1862
42. Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor, *J. Biol. Chem.* 270, 29270-29278
43. Jones, S. (2004) An overview of the basic-helix-loop-helix proteins, *Genome Biol.* 5, 226
44. Mitchell, K. A., Elferink C. J. (2009) Timing is everything: Consequences of transient and sustained AhR activity, *Biochem. Pharmacol.* 77, 947-956
45. Evans, B. R., Karchner, S. I., Allan, L. L., Pollenz, R. S., Tanguay, R. L., Jenny, M. J., Sherr, D. H., Hahn, M. E. (2008) Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: Role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol. Pharmacol.* 73, 387-398
46. Delescluse, C., Lemaire, G., de Soussa, G., Rahmani, R. (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?, *Toxicology* 153, 73-82
47. Chang, C. Y., Puga, A. (1998) Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor, *Mol. Cell Biol.* 18, 525-535
48. Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., Oesch, F. (2005) Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: Divergent signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. U S A.* 102, 9218-9223
49. Møller, P., Wallin, H. (2000) Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene, *Mutat. Res.* 462, 13-30
50. Sudan I (1974) *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* Vol. 8, 225
51. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission to Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU, *The EFSA Journal* 263, 1-71
52. Martinek, V., Stiborová, M. (2002) Metabolism of carcinogenic azo dye Sudan I by rat, rabbit, minipig and human hepatic microsomes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 1883-1898
53. Stiborová, M., Anzenbacher, P. (1992) Carcinogenic non.aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) is oxidized by rat liver microsomal cytochrome P-450 to metabolite binding to macromolecules (nucleic acids and proteins), *Collect. Czech. Chem. Commun.* 57, 1537-1546

54. Stiborová, M., Martinek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I is potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxification by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes, *Cancer Res.* 62, 5678-5684
55. Stiborová, M., Martinek, V., Schmeiser, H.H., Frei, E. (2006) Modulation of CYP1A1-mediated oxidation of carcinogenic azo dye Sudan I and its binding to DNA by cytochrome b<sub>5</sub>, *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27, 35-39
56. Xu, H., Heinze, T.M., Chen, S., Cerniglia, C. E., Chen, H. (2007) Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dye (Sudan dyes) by human intestinal microflora, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7759-7762
57. Voet, D., Voet, J. G. (1995) *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha
58. Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193
59. Manuál k TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems (2002)
- 59a. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression, *Methods* 25, 386-401
60. Manuál k Trizol Reagent<sup>®</sup>, Invitrogen (2007)
61. Dračinská H. (2005) Study on metabolism of industrial carcinogens and their effects on expression of biotransformation enzymes, *Dizertační práce PřF UK*, 68-69
62. Refat, N. A., Ibrahim, Z. S., Moustafa, G. G., Sakamoto, K. Q., Ishizuka M., Shoichi, F. (2008) The induction of cytochrome P450 1A1 by Sudan dyes, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 77-84