

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Jiří Hradil

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Dopad aktivace aryluhlovodíkového
receptoru methyldoly v nádorové
prostatické linii PC-3**

Bakalářská práce

Jiří Hradil

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Jiří HRADIL**
Osobní číslo: **R18645**
Adresa: Černá cesta 47, Olomouc – Klášterní Hradisko, 77900 Olomouc 9, Česká republika
Téma práce: Dopad aktivace aryluhlovodíkového receptoru methylyndoly v nádorové prostatické linii PC-3
Téma práce anglicky: The impact of arylhydrocarbon receptor activation by methylindoles in prostate cancer cell line PC-3
Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Stanovení proliferace a metabolické aktivity prostatické linie PC-3
3. Stanovení exprese cílových genů aryluhlovodíkového receptoru metodou qPCR
4. Detekce hladiny proteinů vybraných cílových genů aryluhlovodíkového receptoru metodou western blotting
5. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

Seznam doporučené literatury:

1. Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor; Martina Stepankova et al. *Molecular Pharmacology*, 2018
2. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. Lee JH et al. *Trends in microbiology*, 2015
3. A novel prostate cancer therapeutic strategy using icaritin-activated arylhydrocarbon-receptor to co-target androgen receptor and its splice variants. Sun F et al. *Carcinogenesis*, 2015.
4. 3,3'-Diindolylmethane Induction of p75NTR-Dependent Cell Death via the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Prostate Cancer Cells. Fatima S Khwaja et al. *Cancer Prevention Research*, 2009
5. Aryl hydrocarbon receptor enhances the expression of miR-150-5p to suppress in prostate cancer progression by regulating MAP3K12. Jingsong Yu et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018
6. Články publikované v odborných periodících

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Jiří Hradil
Název práce:	Dopad aktivace aryluhlovodíkového receptoru methylindoly v nádorové prostatické linii PC-3
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021
Souhrn:	<p>Tato bakalářská práce se zabývá vlivem methylindolů, na aryl uhlovodíkový receptor v buňkách rakoviny prostaty negativní na androgenní receptor. V teoretické části je přiblížena problematika rakoviny prostaty, jejího vzniku, důležitých markerů a léčení. Následující kapitola obsahuje informace o tryptofanu a jeho metabolitech, jejich vzniku a funkce. V experimentální části byl zjištěn dopad methylindolů na aryl uhlovodíkový receptor pomocí metod <i>Reporter Gene Assay</i>, qPCR a detekce proteinů western blottingem.</p>
Klíčová slova:	aryl uhlovodíkový receptor, rakovina prostaty, androgenní receptor, methylindoly
Počet stran:	46
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Jiří Hradil
Title:	The impact of arylhydrocarbon receptor activation by methylindoles in prostate cancer cell line PC-3
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor:	doc. Ing. Radim Vrzal., Ph. D.
The year of presentation:	2021
Summary:	<p>This bachelor thesis deals with the effect of methylindoles, on the aryl hydrocarbon receptor in prostate cancer negative for androgen receptor. The theoretical part describes the issue of prostate cancer, its origin, important markers and treatment. The following section contains information on tryptophan and its metabolites, their formation and function. In the experimental part, the impact of methylindoles on the aryl hydrocarbon receptor was performed using <i>Reporter Gene Assay</i>, qPCR and detection of proteins by western blotting.</p>
Keywords:	aryl hydrocarbon receptor, prostate cancer, androgen receptor, methylindoles
Number of pages:	46
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, dne

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za odborné vedení při psaní teoretické práce či předání zkušeností při zpracovávání experimentů. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Elišce Zgarbové za odborný dohled a své švagrové za korekturu teoretické části.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Rakovina prostaty	3
3.1.1	Markery rakoviny prostaty.....	5
3.1.2	Molekulární markery.....	6
3.1.3	Genomické markery.....	7
3.1.4	Léčba rakoviny prostaty	8
3.1.5	Rakovina prostaty negativní na androgenní receptor	9
3.2	Metabolity tryptofanu.....	11
3.2.1	Metabolity tryptofanu produkované člověkem.....	11
3.2.2	Metabolity tryptofanu produkované bakterií střev	13
3.2.3	Aryl uhlovodíkový receptor.....	16
4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál.....	18
4.2	Seznam použitých chemikálií	18
4.3	Seznam použitých laboratorních přístrojů.....	20
5	Metodika práce	21
5.1	Pasážování buněk a vysetí buněk.....	21
5.2	Treatment	22
5.3	Reporter Gene Assay.....	22
5.4	Stanovení viability pomocí krystalové violeti.....	22
5.5	Izolace RNA	22
5.6	Reverzní transkripce.....	23
5.7	qPCR	23
5.8	Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace.....	24
5.9	SDS-PAGE	25
5.10	Western blotting	26
6	Výsledky	27
6.1	Viabilita	27
6.2	Reporter Gene Assay.....	28
6.3	qPCR	29
6.4	Western blotting	33

7	Diskuze.....	35
8	Závěr.....	38
9	Seznam použité literatury.....	39

Seznam symbolů a zkratek

ADT	androgenní deprivace terapie
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
ALT	aspartát aminotransferáza
AR	androgenní receptor
ARNT	jaderná translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
bHLH	basic-helix-loop-helix motif
CK18	cytokeratin 18
CK8	cytokeratin 8
CNS	centrální nervová soustava
CRPC	kastračně rezistentní karcinom prostaty
CTCs	cirkulující nádorové buňky
ctDNA	cirkulující nádorová DNA
EMT	epiteliálně mezenchymální tranzice
FFPE	fixované formalínem, zalité parafinem
IAA	kyselina indol-3-oxalová
IAcrA	indol akrylát
IAcrGly	indol akryloyl glycin
IAld	indol-3-aldehyd
IGF-1	inzulin like growth factor 1
LAT	L-type Amino Acid Transporter
NEPC	neuroendokrinní rakovina prostaty
NPV	negativní prediktivní hodnota
PAS	Per- Arnt- Sim doména

PCA3	prostate cancer gene 3
PCGEM1	prostate cancer gene expression marker 1
PDGF	destičkový růstový faktor
PIN	prostatická intraepiteální neoplazie
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
Src	tyrozin kináza
TAD	transaktivační doména
TGF- β	transformující růstový faktor β
WHO	World Health Organization

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zdravá žláza prostaty skládající se z luminálních, bazálních a neuroendokrinních buněk.

Obrázek 2: Chemická struktura tryptofanu.

Obrázek 3: Metabolismus tryptofanu za vzniku kynureninu.

Obrázek 4: Metabolity indolů a jejich syntéza.

Obrázek 5: Chemická struktura skatolu (3-methylindolu).

Obrázek 6: Schématická struktura funkčních domén AhR.

Obrázek 7: Reprezentativní Western blot detekce proteinu AhR v buněčné linii PC-3.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava premixu na reverzní transkripci.

Tabulka 2: Příprava mastermixu pro qPCR.

Tabulka 3: Příprava mastermixu pro qPCR při detekci genu CYP1B1.

Tabulka 4: Teplotní profil PCR reakce.

Tabulka 4: Příprava 10% dělicího gelu pro SDS-PAGE.

Tabulka 5: Příprava 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE.

Seznam grafů

Graf 1: Srovnání cytotoxicity methyldolů pomocí krystalové violeti.

Graf 2: Působení methyldolů na aktivitu AhR receptoru.

Graf 3: Působení methyldolů na expresu genu CYP1A1.

Graf 4: Působení methyldolů na expresu genu CYP1B1.

Graf 5: Působení methyldolů na expresu genu AhRR.

Graf 6: Působení methyldolů na expresu genu FKBP5.

Graf 7: Působení methyldolů na expresu genu UBE2C.

Graf 8: Western blot detekce proteinů AhR v buněčné linii PC-3.

1 Úvod

Rakovina prostaty je nejčastějším druhem nekutánní rakoviny, která se vyskytuje u mužů. Její léčba zahrnuje především inhibici aktivity androgenního receptoru, čehož je dosahováno snížením koncentrace mužských pohlavních hormonů – dihydrotestosteronu a testosteronu, které jsou produkovány především varlaty. U některých pacientů však nastává problém, kdy rakovina se stane negativní na androgenní receptor a prolifерuje i dále za nízkých koncentrací mužských pohlavních hormonů. Je možné, že aktivací aryl uhlovodíkového receptoru lze zastavit proliferaci rakovinových buněk a jejich invazivnost.

AhR je transkripční faktor a mezi jeho ligandy patří metabolity tryptofanu. AhR zprostředkovává řadu biologických funkcí např.: metabolismus xenobiotik. Tato bakalářská práce se zabývá studiem vlivu methyldolů na AhR: aktivaci receptoru, expresi genů a produkci proteinů.

2 Cíle práce

- 1 Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
- 2 Stanovení proliferace a metabolické aktivity prostatické linie PC-3.
- 3 Stanovení exprese cílových genů aryl uhlovodíkového receptoru metodou qPCR.
- 4 Detekce hladiny proteinů vybraných cílových genů aryl uhlovodíkového receptoru metodou western blotting.
- 5 Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce.

3 Literární přehled

3.1 Rakovina prostaty

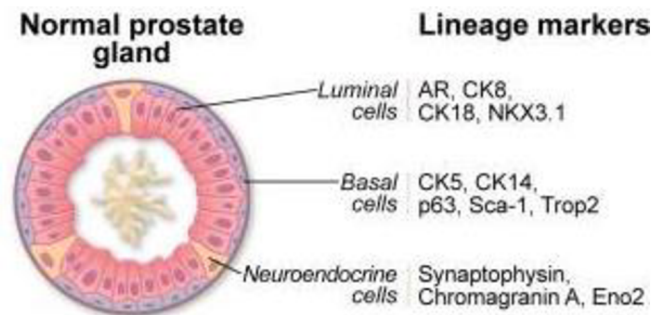
Rakovina prostaty je celosvětově nejčastější druh nekutánní rakoviny u mužů, která ročně čítá 1 600 000 případů z toho 366 000 smrtelných (Torre *et al.*, 2015). Touto nemocí trpí nejčastěji muži afrického původu následováni původem evropským a asijským. I přes pokrok, který ve výzkumu poslední dobou nastal, zůstává kvůli neadekvátním terapiím metastatického karcinomu prostaty či naopak nadměrné péči u benigní formy rakovina významným problémem pro nemocné muže (Wang *et al.*, 2018).

Prostata (předstojná žláza) je největší mužskou přídatnou žlázou reprodukční soustavy. Nachází se u vývodů močového měchýře a obklopuje část močové trubice, do které dodává tekutinu při ejakulaci. Prostata se skládá ze dvou hlavních částí: stromatu a epitelové tkáně. Buňky, které se nachází ve stromatu, se významně podílí na homeostáze celé žlázy, naopak buňky epitelu vykonávají funkci sekrece (Aaron *et al.*, 2016; Alshahrani *et al.*, 2013).

Lidská prostata se podle obsahu tkáně skládá ze tří zón: periferní (zde vzniká přibližně 65–70 % rakovin prostaty), centrální a přechodné (McNeal *et al.*, 1988). Na buněčné úrovni se žláza skládá z pseudostratifikovaného epitelu, který obsahuje lumenální, bazální a neuroendokrinní buňky (van Leenders *et Schalken*, 2003; Shen *et Abate-shen*, 2010). Některé studie usuzují, že rakovina prostaty, která je odvozená od lumenálních buněk, je mnohem agresivnější, a proto tyto buňky předpovídají mnohem horší prognózu (Wang *et al.*, 2013). Jiná studie usuzuje že podtyp rakoviny, která vzniká z buněk bazálních, je agresivnější (Wang *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2015). U neuroendokrinních buněk, kterých je v prostatě malé množství a nachází se na bazální straně, nebylo prokázáno, zdali můžou generovat rakovinu prostaty. Lumenální buňky aktivují androgenní receptor (AR), čímž dochází ke zvýšené expresi cytokeratinu 8 (CK8) a 18 (CK18), kdežto bazální, které jsou zasaženy mezi bazální laminu a lumenální buňky, exprimují vysoké množství CK5 a p63 a malé androgenního receptoru. Neuroendokrinní buňky exprimují markery např.: synaptophysin a chromogranin A, ale neexprimují AR, viz Obrázek 1 (Wang *et al.*, 2018).

Rakovina prostaty může dojít do maligního stádia, kterému předchází vícestupňový proces, začínající jako prostatická intraepiteální neoplazie (PIN). Ta je následována lokalizovaným karcinomem prostaty a dále pokročilým adenokarcinomem, který poté kulminuje ve formě metastatického karcinomu (Shen *et Abate-shen*, 2010). Tento vícestupňový proces, který definuje agresivitu a postup rakoviny prostaty, byl původně definován Donaldem Gleasonem

jako „*the Gleason grading system*“ (1974) a během let se tento proces postupně s následujícími objevy zdokonalil (Epstein *et al.*, 2016). Hlavní rys začínající rakoviny prostaty je její hormonální odpověď, která byla objevena v roce 1941 Charlesem Hugginsem a Clarensem Hodgesem. Ti za tento objev získali ve stejném roce Nobelovu cenu. Zjistili, že kastrace vede ke zpomalení růstu nádoru u pacientů s rakovinou prostaty. Standartní cestou k úspěšné léčbě je v současnosti androgenní deprivace terapie (ADT), která blokuje stejnojmenný receptor. Problémem je však takzvaný kastračně rezistentní karcinom prostaty (CRPC), což je rakovina, jež je imunní vůči kastraci (Bluemn *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Zdravá žláza prostaty skládající se z luminálních, bazálních a neuroendokrinních buněk. Převzato z článku Wang *et al.* (2018). Luminální buňky produkují sekreční proteiny a jsou definovány expresí cytokeratinu 8 a 18 a expresí AR. Bazální buňky exprimují CK5 a p63, kdežto AR pouze málo. Neuroendokrinní buňky exprimují markery např. chromogranin či synaptofyzin.

Další fází rakoviny prostaty je metastatický karcinom, který může být smrtelný. Metastáze nejdříve prorůstají do lymfatických uzlin, které přiléhají k primárnímu nádoru a poté se mohou postupně dostat do orgánu např.: plíce či játra a nakonec kostí. Metastáze, které se nachází právě v kostech, způsobují nesnesitelnou bolest, vyšší hladinu vápníku v krevním řečišti a časté zlomeniny. Všechny tyto příznaky jsou způsobeny osteoblastickými či osteolytickými lézemi. Právě na metastáze v kostech je v posledních letech zaměřen výzkum, jenž se snaží najít vhodnou efektivní léčbu (Datta *et al.*, 2010).

Hlavní roli v metastázích u různých druhů rakovin, a tedy i u rakoviny prostaty hraje epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT), což je proces, kdy epiteliální buňky získávají charakter buněk mezenchymálních (Mittal, 2018). Buňky rakoviny prostaty podstoupí EMT a začnou se šířit jako cirkulující nádorové buňky (CTCs). Poté překonají několik bariér zvětšujících se metastázami v kosti a migrují na povrch kosti přes dutinu kostní dřeně (Body *et al.*, 2010). Buňky CTCs jsou

velice vzácná populace buněk a jsou v centru studií, které se snaží porozumět šíření rakovinových buněk do vzdálených orgánů v těle (Aceto *et al.*, 2015).

Jakmile buňky rakoviny prostaty obsadí kostní dřev začnou měnit tvar kosti až způsobí zlomy a tím podpoří vlastní životnost a růst nádoru. Sekrece růstových faktorů (endotelin 1, adrenomedullin, fibroblastové růstové faktory, růstové faktory odvozené z krevních destiček, kostní morfogenetické proteiny) stimuluje aktivitu osteoblastu, který formuje novou kost pomocí parakrinní signalizace (Body *et al.*, 2015). Navíc nádorem sekretované proteázy např.: matrix metaloproteinázy, prostatický specifický antigen (PSA) a urokinázový plasminogenový aktivátor, podporují sekreci růstových faktorů osteoblastu jako např. transformující růstový faktor β (TGF- β), IGF-1 (inzulin like growth factor 1) a PDGF (destičkový růstový faktor). Aktivované osteoblasty indukují RANKL, což jsou transmembránové proteiny. Jejich zvýšená koncentrace poté vede k hypokalcemii, což má za následek uvolnění parathyroidního hormonu. Všechny tyto faktory pomáhají růstu a životaschopnosti rakovinových buněk, které zase produkují proteiny, jako je parathormonu podobný protein, který řídí osteoblast, produkci RANKL a negativní regulaci osteoprotegerinu, což vede k aktivaci osteoklastu (Halle *et al.*, 2015). Ve výsledku je růst buněk rakoviny prostaty v kosti dynamickým procesem remodelování kosti a interakcí mezi rakovinovými buňkami, osteoblastem a osteoklastem (Wang *et al.*, 2018).

3.1.1 Markery rakoviny prostaty

Podle World Health Organization (WHO) je biomarker látka, struktura nebo proces, který může být měřen za účelem předpovědi určitého výsledku či nemoci. Dále analyzováním biomarkeru získáváme kompletní informaci o brzkém vývoji nádoru a díky tomu je možné individualizovat léčbu. Biomarkery jsou úspěšné v diagnóze rakovin, předpovědi nebo sledování odpovědi organismu na léčivo a také k analýze jejího ústupu (Strimbu *et Tavel*, 2010).

Biomarkery jsou nejčastěji klasifikovány podle jejich aplikace. Screening či biomarkery, které odhalí nemoc v brzkém stádiu, dokážou detekovat rakovinu prostaty během asymptomatické fáze. *Diagnostické biomarkery* mohou zjistit probíhající nemoc u pacientů, kteří jsou příznakoví, kdežto *prognostické biomarkery* předpovídají průběh a rychlost rozšíření rakoviny. Jako poslední stojí *náhradní biomarkery*, jež suplují klinické koncové body či měří klinické benefity, tedy jestli se stav pacienta zlepšuje či zhoršuje. Ideální diagnostické biomarkery mají vysokou specifitu, citlivost, jsou jednoduché k použití atd. (Meera *et al.*, 2014)

3.1.2 Molekulární markery

Molekulární markery jsou stanovitelné z krve, moči či tkáně. Mezi molekulární markery rakoviny prostaty, které lze stanovit z krve, patří například prostatický specifický antigen (PSA), cirkulující nádorové buňky (CTC), cirkulující nádorová DNA (ct DNA), 4Kscore test atd. (Kohaar *et al.*, 2019).

PSA, jehož velikost je 33 kDa, patří mezi serinové proteázy a je kódován genem KLK3, který leží na dlouhém raménku 19. chromozomu. Jeho sekrece probíhá v epitelu prostaty a objev prostatického specifického antigenu patří mezi mezník ve zkoumání rakoviny prostaty. Nejdříve byl však tento biomarker charakterizován jako marker lidského semene, a poté poprvé tím doktora T. Ming Chu, kteří PSA purifikovali a charakterizovali, zjistili, že se jedná o látku specifickou pro prostatu (Wang *et al.*, 1979; Ornstein *et al.*, 2000). I přes nejčastější užívání tohoto biomarkeru se stále diskutuje o jeho 100% účinnosti v předpovědi možného výskytu rakoviny prostaty, jelikož chybí dostatečná data z náhodně udělaných pokusů a také chybí nedostatečná specifita mezi benigní a maligní formou (Khan *et al.*, 2004).

V praxi je 65 % – 95 % celkového PSA (total PSA - tPSA) navázáno na proteázové inhibitory, kdežto molekuly, které nejsou ve vazbě s proteiny, se nazývají volné PSA (freePSA - fPSA). Nízký poměr fPSA/tPSA je charakteristický pro rakovinu prostaty, a proto se PSA začal používat jako primární screeningová metoda kvůli nestabilitě jeho molekulárních forem (Khan *et al.*, 2004).

Zajímavostí může být odlišný průběh u afroamerických mužů s nově diagnostikovanou rakovinou prostaty, která měla při počátečním měření větší koncentraci séra PSA než u bělochů, což korespondovalo s velikostí nádoru v jejich tělech při stejné léčbě. Tato rozdílnost může poukazovat na nestejný průběh nemoci u odlišných ras. Je proto důležité vzhledem k uvedenému problému snažit se nalézt markery, které by byly použity i u jiných ras a měly u nich užitek (Moul *et al.*, 1995).

Cirkulující nádorové buňky, které se nachází u pacientů s pokročilým stádiem rakoviny prostaty, mohou být detekovány v krvi či kostní dřeni (Morgan *et al.*, 2007). Se zlepšujícími se technikami sekvenování a testováním krevní plazmy se cirkulující nádorové buňky a cirkulující nádorová DNA stávají slibnými tekutými biopsiemi v rámci onkologie. Tyto testy, které jsou minimálně invazivní, monitorují nádor (např.: genom) a předběžnou, či již naordinovanou léčbu. Vyšetření nazývaní se *Cellsearch*, které je založeno na detekci a výpočtu cirkulujících nádorových buněk pomocí imunomagnetického zachytu a fluorescenci, je nejčastější platforma

uznaná úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Tento test predikuje celkovou či postupnou možnost přežití při metastatické fázi rakoviny prostaty. Molekulární analýza CTC je přirovnávána k primární nádorové tkáni či metastázám, a proto vykazuje skutečný stav rakoviny (de Bono *et al.*, 2008).

Alternativou ke zmiňovaným markerům může být ct-DNA/cf-DNA neboli cirkulující nádorová DNA, což je malý fragment nukleové kyseliny, který je uvolňován z nádorových buněk. Podle jedné ze studií, která použila CancerSEEK test u pacientů, kteří jsou diagnostikováni nemetastatickou rakovinou, má tento krevní test založený na sledování mutací cf-DNA a množství cirkulujících proteinů v krvi až 99% specifitu. Právě díky tomu je cirkulující nádorová DNA klasifikována jako biomarker (Cohen *et al.*, 2018).

I přes to že mají tyto techniky mnoho výhod, množství ct-DNA a CTC je malé a jejich korelace s věkem není stále stanovena, což může způsobit nadměrnou léčbu a zbytečnou finanční zátěž (Kohaar *et al.*, 2019).

Mezi biomarkery, které jsou stanovitelné z moči, patří například prostate cancer gene 3 (PCA3), který exprimuje nekódující RNA. PCA3 byl objeven díky rozdílnosti transkriptomu normální a nádorové prostatické tkáně, ve které je overexprimován (Bussemakers *et al.*, 1999). Mezi další objevené dlouhé nekódující RNA patří prostate cancer gene expression marker 1 (PCGEM1), avšak pouze PCA3 byl přítomný prakticky ve všech rakovinách prostaty (Schalken *et al.*, 2003). Na základě několika studií, které tento biomarker zkoumaly na velkém množství mužů, byl PCA3 nalezen jako jeden z nejlepších pro diagnózu rakoviny prostaty. Whitman a kol. také zjistili, že PCA3 stanovitelný z moči může předpovědět objem a velikost nádoru a tím zabránit prostatektomii (Whitman *et al.*, 2008).

Další způsob sledování prostatických markerů je pomocí testu ProMark, který využívá přímo prostatickou tkáň. Tato metoda založená na zkoumání proteinů předpovídá rakovinu u ještě zdravých pacientů. Tento test vyhodnocuje osm proteinových markerů a využívá k tomu automatizovanou, kvantitativní imunofluorescenční analýzu na FFPE (fixované formalínem a zalité parafinem) tkáních.

3.1.3 Genomické markery

Mezi genomické markery patří různé technologie či nástroje, které dokážou předpovídat pravděpodobnost počáteční pozitivní biopsie, zredukovat jejich zbytečné opakování, rozpoznat nádor podle rizika, klasifikovat možné rozšíření a monitorovat odpověď na jednotlivé zákroky a klinické postupy (Meera *et al.*, 2014).

Mezi takové biomarkery patří ConfirmMDx, který umí vyhodnotit pravděpodobnost výskytu rakoviny prostaty. Tento test methylačního markeru je založen na zkoumání tkáně a její epigenetickou změnu v oblasti nádorové léze, aby poté zredukoval počet opakování biopsií (Wojno *et al.*, 2014). Tato analýza identifikuje hypermethylační vzorec CpG ostrůvků a promotorových regionů tří genů (GSTP1, APC, RASSF) u mužů po negativní biopsii. ConfirmMDx dosáhl 88-90 % NPV (negativní prediktivní hodnota), což je hodnota, která je definována jako pravděpodobnost, že člověk netrpí konkrétní nemocí po negativním testu (Partin *et al.*, 2014).

Mezi další genomické markery patří Decipher, což je analýza, která poskytuje informace o pravděpodobnosti vzniku metastáz. Test měří úroveň RNA exprese u 22 odlišných genů, které byly vybrány na základě unikátních vzorů exprese u brzkých metastatických případů (Karnes *et al.*, 2013). Tyto geny jsou zapojeny do důležitých biologických procesů např.: buněčná proliferace, diferenciace, adheze a signalizační dráhy regulující imunitní odpověď. Výsledkem tohoto testu je hodnota od 0 do 1; se zvyšujícím se číslem stoupá také větší pravděpodobnost výskytu metastáz (Mohler *et al.*, 2016). Díky Decipheru se zvýšila přesnost předpovědi objevu metastáz u rakoviny po dobu 10 let (Karnes *et al.*, 2013).

3.1.4 Léčba rakoviny prostaty

Výběr vhodné léčby rakoviny prostaty závisí na stupni jejího vývoje, fázi, věku pacienta a mnoha dalších faktorech. Jednotlivé typy mohou být rozděleny dle Gleasonova skóre do následujících kategorií: nízké, střední a vysoké riziko (Rodrigues *et al.*, 2012). U rakovin nízkého rizika dochází k potlačení rozvoje nádoru pouhým lékařským dohledem, kdy bylo prokázáno, že radikálnější léčba (radioterapie, prostatotektomie) má stejný výsledek jako pouhý monitoring; mortalita nevykazuje výrazné odlišnosti (Wilt *et al.*, 2017). U rakoviny s vysokým rizikem je zapotřebí využít agresivní léčbu. Největší výzvou je tedy rakovina se středním rizikem, jelikož u pacientů dochází k velkým odchylkám odpovědi organismu na jednotlivé léčebné procedury. Několik výzkumných laboratoří již navrholo tento typ rozlišit do detailněji popsaných subtypů, čímž by mohlo dojít k rychlejšímu stanovení vhodné léčby (Serrano *et al.*, 2016). Souběžně dochází i k prozkoumání biomarkerů, které mohou předpovědět agresivitu a vývoj rakoviny.

Pro pacienty, kterým je poskytnuta léčba a nadále dochází k rozvoji nádoru, je využita hormonální terapie, která se nazývá androgen deprivation therapy (ADT). Cílem je potlačit koncentraci mužským pohlavních hormonů (androgenů) v těle, či zastavení jejich přenášení k rakovinovým buňkám. Mezi androgeny patří především testosteron a dihydrotestosteron,

kteře jsou produkovány varlaty a v menším množství i nadledvinami. Hormonální terapie dokáže výrazně zpomalit rakovinu prostaty, avšak nedokáže ji sama o sobě zastavit, a proto se využívá například s radioterapií. U metastatického karcinomu se využívá ADT spolu s chemoterapiemi a může dále zahrnovat buď chirurgickou kastraci nebo častěji využívanou chemickou kastraci, která využívá látky, jejíž cílem je androgenní receptor regulovaný osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny (např.: gonadotropní hormony, androgenní antagonisté, CYP17A1 inhibitory) (Wang *et al.*, 2018).

Ikdyž většina pacientů snáší hormonální terapii dobře, rakovina se nachází nadále prakticky u všech případů a vyvíjí se v kastračně rezistentní rakovinu prostaty (CRPC; castrate-resistant prostate cancer). CRPC je rakovina prostaty, která roste i přes nízkou hladinu testosteronu v krvi. Tento typ je léčen pomocí chemoterapie využívající taxany a v posledních letech dochází k rozvoji jiných druhů léčby jako jsou například anti-androgenní terapie zahrnující látky enzalutamid, abirateron, apalutamid a další (Vaishampayan *et al.*, 2017). Tyto látky patří mezi androgenní antagonisty a blokuji tedy syntézu androgenů a tím zvyšují šanci přežití pacientů i s pokročilejším stádiem rakoviny (Beer *et al.*, 2014). Některé experimentální terapie dokážou oddálit či zcela zredukovat fraktury kostí či kompresi míchy. Cílem těchto látek je proces diferenciaci kostních buněk a patří mezi ně například kyselina zoledronová, atrasentan nebo radioaktivní látky např.: radium-223 (Body *et al.*, 2015).

3.1.5 Rakovina prostaty negativní na androgenní receptor

Jak již bylo zmíněno, androgenní receptor je molekulárním cílem pro látky, které se podílejí na inhibici jeho aktivity. Zásadní problém nastává v případě, kdy je rakovina prostaty negativní na tento receptor. S touto diagnózou dochází u valné většiny pacientů k rychlému šíření nádoru a následné smrti (Formaggio *et al.*, 2021) U rakoviny negativní na androgenní receptor (AR-) dochází u buněk ke změně jejich základních rysů. Rozdílnost mezi jednotlivými typy je však stále nedefinovaná, jelikož nejsou dostatečně odlišitelné morfologické a molekulární vlastnosti rakovinových buněk (Beltran *et al.*, 2014).

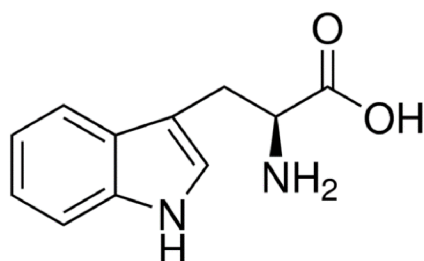
Nejnámější a také nejprozkoumanějším subtypem AR- rakoviny prostaty je takzvaná neuroendokrinní rakovina prostaty (NEPC). V tomto případě dochází k expresi neuroendokrinních a bazálních proteinů za ztráty exprese lumenálních a epitelálních markerů, které regulují androgenní receptor (Beltran *et al.*, 2014). NEPC se většinou vyvíjí z androgen pozitivních adenokarcinomů procesem transdiferenciaci lumenálních buněk (Zou *et al.*, 2017). Inaktivace jaderného proteinu p53 zvyšuje expresi neuroendokrinních markerů a zároveň snižuje odpověď buňky na abirateron (Zheng *et al.*, 2003). Dále dochází k expresi neuronálního

transkripčního faktoru BRN2. Aktivita tohoto faktoru je snížena aktivitou androgenního receptoru – AR je supresorem. BRN2 také reguluje aktivitu SOX2 faktoru, který ovlivňuje plasticitu buněk. Cílem studií je tedy inhibice faktorů buněčné plasticity (např.: SOX2), což má za následek reexpresi androgenního receptoru (Bishop *et al.*, 2017). Některé látky, které tuto vlastnost mají, byly již prozkoumány a patří mezi ně například azacytidin, který blokuje metylaci DNA (Kleb *et al.*, 2016).

3.2 Metabolity tryptofanu

Tryptofan (Trp), viz Obrázek 2 je esenciální aminokyselina, která hraje důležitou roli při mnoha fyziologických procesech v lidském těle. Mezi tyto procesy patří růst buněk a jejich údržba, kde Trp slouží jako stavební kámen proteinů. Dále koordinuje odpověď organismu na příjem stravy jako signální molekula či neurotransmitter (Červenka *et al.*, 2017). Koncentrace tryptofanu v těle je závislá na množství a typu jednotlivých složek jídla, jež je člověkem přijímána a také na metabolických cestách, kterých se Trp účastní. Malá frakce veškerého tryptofanu v těle je využívána k syntéze proteinů a k produkci neurotransmiterů např.: serotonin, nebo neuromodulátorů např.: tryptamin (Schwarcz *et Stone*, 2017). Větší část, asi 95 %, se využívá v kynureninové cestě, což je metabolická dráha, jejíž hlavní podstatou je tvorba nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD^+) při současné degradaci Trp (Le Floc'h *et al.*, 2011).

Tryptofan je jedna z 20 proteinogenních aminokyselin. Na rozdíl od ostatních koluje v krvi a plazmě navázaná na albumin a jen 10-20 % tryptofanu se zde nachází volně. Mezi faktory, které ovlivňují vazbu mezi Trp a albuminem, patří například neesterifikované mastné kyseliny. (Pardridge, 1979; Smith *et Pogson*, 1980).



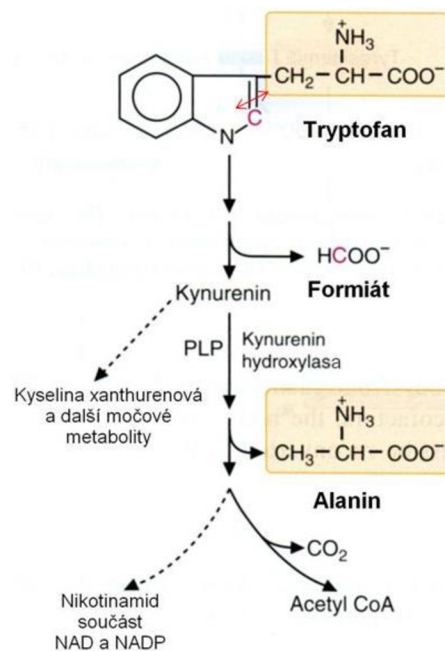
Obrázek 2: Chemická struktura L-tryptofanu. Převzato z internetového portálu Sigma Aldrich.

3.2.1 Metabolity tryptofanu produkované člověkem

Lidský organismus není schopný syntetizovat tryptofan, a proto je důležité jej získávat z vhodné stravy (Council, 1989). Nejvíce tryptofanu můžeme najít v čokoládě, vajíčkách, mléčných produktech a mase. Většina tryptofanu je využita v jedné z mnoha metabolických cest, jejíž produktem je například serotonin, tryptamin, indol, kynurenin a NAD^+ (Bender, 1983; Badawy, 2017). Trp a všechny ostatní neutrální aminokyseliny jsou transportovány pomocí takzvaných LAT (L-type Amino Acid Transporter) transportérů, které se ve velkém množství nachází po celém těle. Malá část tryptofanu je využita ve střevech, kdežto více Trp prochází metabolismem v játrech. Zbytek tryptofanu spolu s produkty degradace v játrech je

transportován do tkání jako je kosterní svalstvo, mozek a srdce (Boado *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2016).

Více než 95 % Trp je využito v kynureninové cestě za účelem syntézy NAD^+ a dalších látek viz Obrázek 3 (Bender, 1983). Jedním z hlavních kroků tohoto metabolismu je přeměna na N-formylkynurenin, kdy je k degradaci tryptofanu zapotřebí TDO (tryptofan 2,3-dioxygenáza) (Kanai *et al.*, 2009). Kynureninová cesta může produkovat neurotoxické či neuroprotektivní látky, což je zapříčiněno enzymy, které se účastní jednotlivých chemických reakcí. Kynurenin (Kyn) je obvykle hydroxylován za vzniku 3-hydroxykynureninu a dále přeměněn na 3-hydroxyantranilickou kyselinu. Konečným produktem je poté NAD^+ (Chen *et al.*, 2009; Nishizuka *et al.*, 1963).



Obrázek 3: Metabolismus tryptofanu za vzniku kynureninu. Převzato z knihy *Essentials of Medical Biochemistry With Clinical Cases* od N.V. Bhagavan (2011).

Dalším produktem, který vzniká sérií reakcí z Kyn je kynureninová kyselina (Kyna), která byla nejdříve objevena v psí moči, avšak ve větších koncentracích byla naměřena například ve střevech, žluči a v lidských slinách (Turski *et al.*, 2013). Dále ji můžeme najít i v některých potravinách, kdy nejvíce se nachází ve včelím medu, brokolici a některých druzích brambor. Kyna je také ve vysokých koncentracích zastoupena v léčivých bylinách, kde především slouží k léčbě střevních obtíží (Turski *et al.*, 2009; Turski *et al.*, 2011). Dále může být syntetizována jaterními buňkami, které syntetizují enzym aspartát aminotransferázu (ALT), jež je analogem

k mitochondriální ALT (označované jako GOT2 či KAT4) a produkuje právě Kyn reakcí transaminace Kyn (Glavin *et al.*, 1989).

FICZ neboli 6-formylindolo[3,2-b]karbazol je důležitým produktem tryptofanu, který byl poprvé izolován jako světlem indukovaný ligand aryl uhlovodíkového receptoru (Rannug *et al.*, 1995). Formuje se díky kontaktu slunečního světla s kůží a aktivací aryl uhlovodíkového receptoru a exprese CYP1A (Bergander *et al.*, 2004). Pro syntézu FICZ v buňkách je nepostradatelné UV záření a také peroxid vodíku. FICZ v kombinaci s UV světlem dokáže indukovat oxidativní stres a kožní toxicitu (Smirnova *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2015). Jedinou nevýhodou tohoto ligandu AhR receptoru je jeho špatná in vitro syntéza, kdy ještě nebyla vynalezena optimalizovaná technika, která by dokázala FICZ produkovat v řádech gramů. (Janosik *et al.*, 2018)

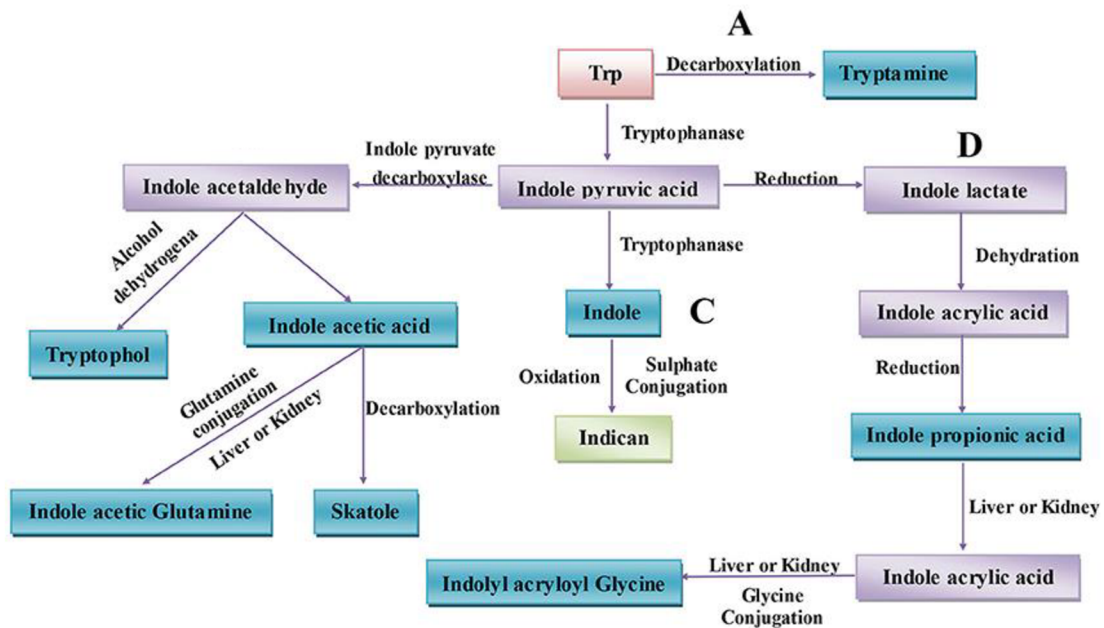
Dalším metabolitem tryptofanu je serotonin. Serotonin neboli 5-hydroxytryptamin je známý neurotransmitter CNS (centrální nervová soustava) a zapojuje se do několika základních dějů jako jsou spánek, bolest, emoce, pozornost atd. Přibližně 5 % jeho celkové tělesné koncentrace se vyskytuje v mozku, avšak většina je uložena a syntetizována ve střevech. (Spohn *et Mawe*, 2017). V mozku slouží tryptofan jako prekurzor pro serotonin. Tryptofan hydroxyláza, enzym limitující rychlost metabolických drah, není však nasycen fyziologickými koncentracemi Trp, a proto se předpokládá, že značná část serotoninu je vytvářena i díky transportu Trp do mozku (Pardridge, 1998; Silber *et Schmitt*, 2010). Asi 95 % se nachází v gastrointestinálním traktu, kde hraje důležitou roli v pohyblivosti a sekrečních mechanismech (Le Floc'h *et al.*, 2011).

3.2.2 Metabolity tryptofanu produkované bakterií střev

Bakterie střev mají významný podíl na zdraví hostitele, a to především na imunitní homeostázi a odpovědi střev. Nejnovější studie usuzují, že změny v populaci mikrobiot mohou ovlivnit imunitní systém modulací Trp metabolismu. Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) zprostředkovává regulaci výše uvedených procesů pomocí metabolitů tryptofanu, což je výhodné pro homeostázi střevního traktu. Spolu s metabolity tryptofanu produkovanými bakterií střev (indoly, skatoly, tryptamin) se mezi ligandy AhR řadí i endogenní metabolity (kynurenin, kynureninová kyselina, xantureninová kyselina). Faktory, jako jsou věk, stres, probiotika a různé nemoci, mohou výrazně změnit interakce mezi metabolity Trp a střevním imunitním systémem (Gao *et al.*, 2018).

Mezi nejčastěji zastoupený metabolit patří indol a jeho deriváty. Indol je katabolizován enzymem tryptofánázou, jejíž aktivita je vyvolaná přítomností Trp či potlačena cukrem glukózou. Mezi druhy bakterií, které dokáží produkovat indoly patří například *E.coli*, *Proteus vulgaris*, či *Achromobacter liquefaciens* (Keszthelyi *et al.*, 2009). U indolů bylo také prokázáno, že fungují jako signální molekuly, které mohou regulovat pohyblivost bakterií, formaci biofilmu, rezistenci k antibiotikům či virulenci (Li *et Young*, 2013). V prasečích střevech byla odebrána maximální koncentrace indolů, jež byla rovna hodnotě přibližně 0,12 mM. Takto vysoká koncentrace se hlavně nachází v distální části slepého střeva, kde se nachází většina bakterií, kdežto v zadní části bylo izolováno zásadně menší množství metabolitů tryptofanu (Knarreborg *et al.*, 2002). U lidí je nejvíce indolu detekováno ve výkalech, kde se nachází v koncentraci od 0,25 do 1,1 mM, což naznačuje, že epiteliální buňky střev jsou vystaveny indolům (Bansal *et al.*, 2010). Indol je přítomný ve zdravých savčích střevech a má pozitivní vliv na jejich fungování a je považován za jeden z nejefektivnějších metabolitů ve srovnání s ostatními molekulami. Je totiž výhodným signálem pro epiteliální buňky, kdy může zlepšit střevní zánět (Bansal *et al.*, 2010; Davis, 2014).

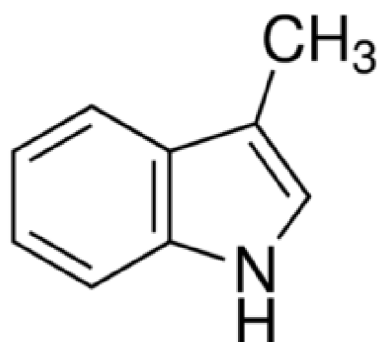
Ve střevech může být část Trp katabolizována za vzniku derivátu indolů, mezi které patří kyselina indol-3-octová (IAA), indol-3-aldehyd (IAld), indol akryloyl glycin (IAcrGly), indol laktát či indol akrylát (IAcrA) viz Obrázek 4 (Keszthelyi *et al.*, 2009). Několik bakterií (*E.coli*, *Bacteroides*, *Clostridia*) umí přeměnit tryptofan na tryptamin a indol pyruvát, jehož konečným produktem je poté IAA, indol laktát či IAcrA (Smith *et Macfarlane*, 1997). IAA může poté reagovat v játrech s glutaminem a produkovat indolyl acetyl glutamin nebo oxidovat na IAld (De Mello *et al.*, 1980). Indolyl propionát může konvertovat na IAcrA a ten spolu s glycin v játrech a ledvinách vytváří IAcrGly (Keszthelyi *et al.*, 2009). Efekt metabolitů tryptofanu na střevní mikrobiom a homeostázi byl již několikrát prokázán a některé druhy bakterií dokážou zastavit zánět střev podporou střevní bariéry epiteliálních buněk (Hasnain *et al.*, 2013).



Obrázek 4: Metabolity indolů a jejich syntéza. Převzato z článku od Gao *et al.* (2018).

Skatol neboli 3-methylindol (Obrázek 5), je dalším metabolitem Trp produkovaný střevní mikroflórou, jehož prekurzorem je IAA. Skatol je syntetizován z IAA procesem dekarboxylace, avšak jeho koncentrace je v porovnání s ostatními molekulami nízká. Tento trend je dán tím, že na rozdíl od ostatních metabolitů je 3-methylindol produkován pomocí dvou kroků, které vyžadují rozdílné bakteriální organismy. Koncentrace skatolu je úzce spjata se zdravým hostitelem. Ve výkalech se obvykle nachází přibližně 5 $\mu\text{g/g}$ výkalů, kdežto u lidí, kteří trpí zažívacími obtížemi, je to kolem 80 až 100 $\mu\text{g/g}$ (Yokoyama *et Carlson*, 1979).

Tryptamin, stejně jako skatol, je produkovaný dekarboxylací Trp. Tento děj je charakteristický pro rostlinou říši, na druhou stranu vzácný pro bakterie. *Ruminococcus gnavus* je jeden z mála zástupců, který dokáže tryptamin syntetizovat. I když je pro bakterie tato vlastnost neobvyklá, minimálně 10 % lidské populace podle Human Microbiome Project obsahuje alespoň jeden druh bakterie, který kóduje dekarboxylázu v mikrobiomu střev (Williams *et al.*, 2004). Tryptamin je neurotransmitter, jehož hlavní funkcí je mobilita střev, které je úzce spjata s homeostází (Włodarska *et al.*, 2015). Dále dokáže redukovat invazi endogenních patogenů (*Salmonella enterica*) či napomáhá signalizaci, které ovlivňuje příjem živin přes lumen střev (Davis, 2014; Williams *et al.*, 2014).

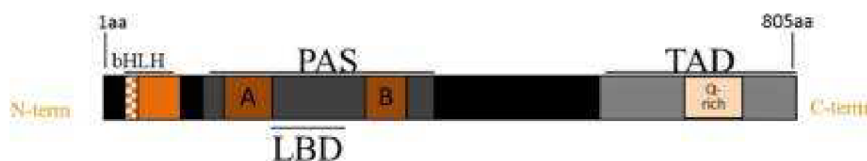


Obrázek 5: Chemická struktura skatolu (3-methylindolu). Převzato z internetových stránek Sigma Aldrich.

3.2.3 Aryl uhlovodíkový receptor

Aryl uhlovodíkový receptor (AhR) (Obrázek 6) je lokalizovaný v cytosolu a patří mezi transkripční faktory, které regulují metabolismus xenobiotik. Mezi jeho funkce řadíme opravu DNA, imunitní odpověď, regulaci buněčného cyklu a proliferace či regulaci nádoru (Kolluri *et al.*, 2017). Jeho exogenními ligandy jsou například polyaromatické uhlovodíky, furany, rostlinné polyfenoly, alkaloidy atd. Mezi endogenní ligandy patří eikosanoidy, kyselina kynureninová a několik látek, jež obsahují ve své struktuře indoly (Stepankova *et al.*, 2018).

Inaktivovaný aryl uhlovodíkový receptor interaguje v cytosolu s tyrosin kinázou (Src) stejně jako s dvěma molekulami HSP90, chaperonem p23 a specifickými proteiny (Enan *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2000). V aktivní formě disociuje z vazby s chaperonovými proteiny a tvoří dimer s jaderným translokátorem (ARNT). Tento heterodimer aktivuje expresi genů díky interakci s XRE elementy, které se nachází na jejich promotorových oblastech (Gu *et al.*, 2000). Některé studie zjistily, že nadměrná exprese receptoru může podporovat karcinogenezi při absenci exogenního ligandu. Je asociovaná s prudkou proliferací a diferenciací v určitých tkáních (Wang *et al.*, 1998). Aktivaci AhR dochází k fosforylaci proteinu Src, který je následně schopen fosforylovat androgenní receptor a tím indukovat jeho aktivitu, což by mohl být klíčový mechanismus pro potlačení kastrozně rezistentního karcinomu prostaty (Su *et al.*, 2013).



Obrázek 6: Schématická struktura funkčních domén AhR. Převzato z článku od Ghotbaddini *et al.* (2018). AhR protein obsahuje několik domén, které jsou důležité pro jeho transkripční aktivitu. Patří mezi ně: basic-helix-loop-helix (bHLH) motif, dvě Per- Arnt- Sim (PAS) domény (PAS-A a PAS-B) a transaktivační doména (TAD) bohatá na glutamin.

I když je rakovina prostaty ADT rezistentní, je i tak stále závislá na androgenním receptoru (Seruga *et al.*, 2011). Několik mechanismů bylo navrženo k udržení receptorové signalizace AR např.: mutace, které by nahradily tento receptor, zvýšená steroidogeneze u rakovinových buněk či změny koncentrací mezi koaktivátory a korepresory proteinů (Agoulnik *et al.*, 2006). AhR má vliv na transkripční aktivitu AR a navázaný na ARNT interaguje s androgenním receptorem a jako jediný je schopný zvýšit jeho aktivitu v nepřítomnosti exogenního ligandu (Kollara *et Brown*, 2009; Kollara *et Brown*, 2010). Agonista AhR TCDD dokáže inhibovat proliferaci rakovinových buněk závislou právě na tomto receptoru (Barnes-Ellerbe *et al.*, 2004). Koaktivace AhR a androgenního receptoru pomocí TCDD a dihydrotestosteronu snižuje koncentraci proteinů AR. Tento objev nás přivádí k schopnosti AhR podporovat proteolýzu AR (Morrow *et al.*, 2005; Ohtake *et al.*, 2009). Aryl uhlovodíkový receptor také reguluje růst buněk rakoviny prostaty, které nejsou závislé na AR, avšak tento objev ještě nebyl plně prozkoumán (Ikuta *et al.*, 2000). Mezi buněčné linie, které jsou AR nezávislé patří například PC-3, která byla izolovaná z metastází v kostech (Kaighn *et al.*, 1979). PC-3 tedy neexprimuje AR či PSA, a proto proliferuje v androgen deprivačním médiu. Na rozdíl od jiných buněčných linií jako např.: LNCaP, PC-3 má vyšší migrační schopnost a její nádory jsou invazivnější a agresivnější (Sheng *et al.*, 2011). V některých studiích ověřili, že aryl uhlovodíkový receptor moduluje proliferaci buněk rakoviny prostaty při absenci androgenního receptoru. PC-3 právě tento receptor neobsahuje, avšak má stále aktivní AhR signalizaci, která udržuje růst těchto buněk v kultivačních podmínkách. Nicméně je zajímavé, že interakce AhR s CDK4 a cyklinem D1 v rámci buněčného cyklu, vedla k redukci AhR/CDK4/cyclin D1 komplexu v přítomnosti AhR ligandu (TCDD) a tím došlo k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1. Schopnost AhR regulovat buněčný cyklus v rakovině prostaty negativní na AR, může být potenciálním cílem pro léčbu AR negativních rakovin prostaty (Richmond *et al.*, 2014).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- buněčná linie PC-3 (ECACC 90112714) adenokarcinomu prostaty

4.2 Seznam použitých chemikálií

- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, kat. č. T4049)
- 0,5% roztok krystalové violeti (Sigma Aldrich, kat.č. PONDELI)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid (Bio Basic, kat. č. 0007)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, kat. č. 459844)
- bovinní sérový albumin (Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- Bradfordovo činidlo, 5x koncentrované (Serva, kat. č. 39222.03)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D8418)
- dNTP nukleosidtrifosfáty (Takara)
 - dATP (kat. č. 4026)
 - dCTP (kat. č. 4028)
 - dGTP (kat. č. 4027)
 - dTTP (kat. č. 4029)
- dodecylsírán sodný (BioRad, kat. č. 1610302)
- ethanol (Sigma Aldrich, kat. č. 459844)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, kat. č. F6178)
- fosfátový pufr PBS (Gibco, kat. č. 10010031)
- chloroform (Sigma Aldrich, kat. č. C2432)
- inhibitor ribonukleáz (New England BioLabs, kat. č. M0307L)
- isopropanol (Sigma Aldrich, kat. č. I9516)
- komerční kultivační médium RPMI-1640 (Sigma Aldrich, kat. č. R8758)
- Laemmlí Sample Buffer, 2x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 1610737)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, kat. č. F6178)
- methanol (Lach-Ner, kat. č. 20038-AT0)
- migrační pufr Tris-glycin-SDS, 10x koncentrovaný (Bio Basic, kat. č. A0031)
- neesenciální aminokyseliny (Gibco, kat. č. 11140-035)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, kat. č. 26616)
- persíran amonný (Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
- Ponceau S. Rouge (Sigma Aldrich, kat. č. P7170)

- primery pro PCR (Sigma Aldrich)
 - GAPDH
 - forward 5' GAAGGAAATGAATGGGCAGC 3'
 - reverse 5' TCTAGGAAAAGCATCACCCG 3'
 - CYP1A1
 - forward 5' GGAAGTGTATCGGTGAGACC 3'
 - reverse 5' CATAGATGGGGGTCATGTCC 3'
 - UBE2C
 - forward 5' CCACAGTGAAGTTCCTCACG 3'
 - reverse 5' GTTGGGTTCTCCTAGAAGGC 3'
 - FKBP5
 - forward 5' TCCAAGACTCAGATGATGCC 3'
 - reverse 5' GGCACCCTGTAGTTATTTGC 3'
 - AhRR
 - forward 5' GAGATGAAAATGAGGAGCGC 3'
 - reverse 5' TTTTACTTTTGCATCCGCGG 3'
- primer pro PCR (Roche)
 - CYP1B1
 - forward 5' ACGTACCGGCCACTATCACT 3'
 - reverse 5' CTCGAGTCTGCACATCAGGA 3'
- próby (Sigma Aldrich)
 - AhRR [6FAM]AAACCCAGAGCAGACACCGCAGCCA[OQA]
 - CYP1A1 [6FAM]GCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCA[OQA]
 - FKBP5 [6FAM]AAGTGTGTGTGGGGAGGGGAAGGGT[OQA]
 - GAPDH [6FAM]ACTAACCCTGCGCTCCTGCCTCGAT[OQA]
 - UBE2C [6FAM]ACCCCAACGTGGACACCCAGGGTAA[OQA]
- próba (Roche)
 - próba č. 20 – CYP1B1
- pufr do dělicího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 161-0798)
- pufr do zaostřovacího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 161-0799)
- random primers 6 (New England BioLabs, kat. č. S1230S)
- reakční pufr pro M-MuLV reverzní transkriptázu (New England BioLabs, kat. č. B0253S)

- Re-Blot Plus Strong Solution, 10x koncentrovaný (MilliporeSigma, kat. č. 2504)
- Reporter Lysis Buffer (Promega, kat. č. E3971)
- reverzní transkriptasa M-MuLV (New Englands BioLabs, kat. č. M0253L)
- RNase free water (Sigma Aldrich, kat. č. W4502)
- sušené mléko (Laktino)
- TEMED (Bio Basic, kat. č. TB0508)
- transferový pufr Tris-glycinový, 10x koncentrovaný (Bio Basic, kat. č. A0029)
- TriReagent (Sigma Aldrich, kat. č. T9424)
- Triton X-100 (Serva, kat. č. 37240)
- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)

4.3 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- aparatura pro western blotting Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- digitální mikroskop (Novel Optics)
- elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- chladnička (Gorenje)
- inkubátor Mitre 4000 (Conterm)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- laminární box Labculture® (ESCO)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-Cor Biosciences)
- Light Cycler 480 II (Roche)
- mikrocentrifuga 5414 R (Eppendorf)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- přístroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic)
- sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- stolní centrifuga Z 100M (Hermle)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- vodní lázeň LCB22D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)
- zdroj napětí MP-500V (Clever Scientific Ltd.)

5 Metodika práce

V praktické části bakalářské práce byly testovány buňky nádorové linie rakoviny prostaty PC-3 metodami: Reporter Gene Assay, barvení pomocí krystalové violeti, qPCR a western blot. Buňky byly udržovány v jim přirozeném stavu v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti. Ke kultivaci bylo připraveno kultivační médium RPMI-1640, do kterého bylo přidáno 50 ml fetálního bovinního séra (FBS), 5 ml glutaminu (2 mmol. l⁻¹) a 5 ml roztoku 1% neesenciálních aminokyselin.

5.1 Pasážování buněk a vysetí buněk

Po uběhnutí 3–4 dnů dochází k vyčerpání živin v kultivační lahvi a je nutné je doplnit a zároveň zredukovat populaci buněk. Tento proces začíná předehřátím média RPMI-1640 ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Buněčná linie, jež se nachází v kultivační lahvi je přenesena do laminárního boxu, aby vše proběhlo ve sterilních podmínkách a bylo zamezeno kontaminaci linie. Staré kultivační médium bylo odsáto pomocí odsávačky. Buňky, které byly stále přilnuté na kultivační lahvi, jsem promyl 5 ml PBS (fosfátový pufr), který jsem následně odsál. Trypsin, jež patří mezi proteázy a dokáže buňky z povrchu pustit, byl přidán v objemu 1 ml do kultivační lahve. Ta je přenesena na 4 minuty do inkubátoru. Po uplynutí stanovené doby byla reakce zastavena přidáním média. Pomocí sérologické pipety a 10ml nástavce byly buňky resuspendovány. Následně byl objem lahve přenesen do 50ml plastové zkumavky, z které bylo odebráno 10 µl do 0,5ml zkumavky. Poté dochází k počítání buněk a do lahve se vrátilo podle hustoty potřebné množství suspenze, ke které je přidáno médium, aby celkový objem tvořil 24 ml. K počítání buněk dochází v Bürkerově komůrce pod mikroskopem. Do 0,5ml zkumavky bylo tedy odebráno 10 µl buněčné suspenze a k té bylo přidáno 90 µl 0,4% trypanové modři. Část obsahu byla přepipetována na Bürkerovu komůrku a počet buněk byl spočítán pod mikroskopem. Po spočítání bílých buněk, které jsou živé, jelikož nepropustí barvivo do intracelulárního prostoru, je konečné číslo dosazeno do vzorce $Y = (a \cdot 1000) / (n \cdot V)$ (a = součet buněk z deseti čtverců, n = počet opakování, V = objem suspenze), aby byl počet převeden na 1 ml buněčné suspenze. Na metodu Reporter Gene Assay je potřeba 20000 buněk na jednu jamku v 96jamkové destičce. U zjišťování viability také dochází k vysívání buněk na 96jamkovou destičku, avšak s tím rozdílem, že je potřeba 25000 buněk na jednu jamku. Celkově je tedy potřeba 7,5 milionů buněk na provedení celého experimentu. U qPCR a western blotu je zapotřebí buněk mnohem více. Na jednu jamku je potřeba 1,5 milionů buněk a celý experiment byl vysíván na tři 6jamkové destičky. Po vysetí byly destičky přeneseny do inkubátoru s následnou stabilizací buněk po dobu 24 h při 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti.

5.2 Treatment

Po uběhnutých 24 hodinách byly destičky z inkubátoru přeneseny do laminárního boxu. Obsah destiček byl pomocí odsávačky odsát a nahrazen médiem, ve kterém byly rozpuštěny testované látky (1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol) o koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM a 100 μM . U metod qPCR a western blot nebyly použity testované látky 1-methylindol a 2-methylindol a ostatní byly využity pouze v koncentracích 1 μM , 10 μM a 100 μM . Jako negativní kontrola (UT) bylo použito dimethylsulfoxid v RPMI v poměru 1:1000 a jako pozitivní kontrola 10nM 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD).

5.3 Reporter Gene Assay

Tato metoda testuje transkripční aktivitu AhR měřením aktivity luciferázy, kdy po přidání luciferázy a ATP dojde k enzymatické reakci a vzniká luminiscenční záření, které je detekovatelné a zároveň přímo úměrné transkripční aktivitě aryl uhlovodíkového receptoru. 96jamková destička byla po 24hodinovém treatmentu vyjmuta z inkubátoru, obsah jamek byl odebrán a zbytek usušen na buničině. Do každé jamky bylo poté multikanálovou pipetou přidáno 30 μl lyzačního pufru, který byl připraven z 5x Reporter Lysis Buffer s dH_2O v poměru 1:4. Destička byla následně uzavřena v -80°C . Další den byla destička vyndána z mrazničky a přenesena na kývačku, kde postupně lyzát roztál. Následně bylo do každé jamky bílé destičky přeneseno 6 μl lyzátu a 30 μl substrátu. Deska byla poté vložena do přístroje Tecan (Infinite M200). Byla změřena luminiscence a zpracovány výsledky.

5.4 Stanovení viability pomocí krystalové violeti

Po vyjmutí 96jamkové destičky z inkubátoru byl obsah jamek vyprázdněn a promyt pomocí PBS a usušen na buničině. Do každé jamky bylo napipetováno 60 μl krystalové violeti. Destička byla následně přenesena na kývačku po dobu 1 h při pokojové teplotě a frekvenci kmitání 35 kmitů za minutu. Deska byla poté 4x promyta PBS a znovu pořádně vysušena buničinou. Před vložením desky do přístroje bylo do každé jamky přidáno 200 μl methanolu s následným kmitáním na kývačce o frekvenci 20 kmitů za minutu. Po vložení do přístroje byla měřena absorbance o vlnové délce 595 nm.

5.5 Izolace RNA

Po ukončení treatmentu byly jamky promyty PBS s následným přidáním 1 ml trizolu. Obsah jamek byl přepipetován do 1,5ml plastových zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno 200 μl chloroformu a z celým obsah bylo třepáno mezi dvěma stojánky. Následná inkubace oddělila jednotlivé fáze. Zkumavky byly přeneseny do centrifugy (13000 rpm, 4°C , 15 minut).

Po opatrném vyndání zkumavek z centrifugy byla horní fáze přenesena do nově popsané 1,5ml zkumavky. Do každé z nich bylo napipetováno 500 μ l isopropanolu a následně promícháno pomocí stolního vortexu. Po 10minutové inkubaci byla zkumavka dána do centrifugy (13000 rpm, 4 °C, 13 minut). Po centrifugaci je z každé zkumavky vylit supernatant a pelet promyt vychlazeným 75% ethanolem s následnou centrifugací (13000 rpm, 4 °C, 10 minut). Celý tento krok byl zopakován ještě jednou a následně byl pelet vysušen na stole po dobu 3 minut. K peletu byla přidána RNase free water (50 μ l). Zkumavky jsou poté vloženy do termobloku a inkubovány při 65 °C po dobu 5 minut. Nakonec byla změřena koncentrace pomocí Nanodropu.

5.6 Reverzní transkripce

Byly připraveny vzorky, aby se v každé zkumavce nacházelo 5 μ l reakční směsi a 1000 ng RNA. Ke každému vzorku byl přidán 1 μ l Random Primers (100 pmol/ μ l). Zkumavky s RNA jsou dány do termobloku po dobu 5 minut při teplotě 65 °C. Ke každému vzorku je přidáno 6 μ l premixu, viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Příprava premixu na reverzní transkripci.

Reagencie	Objem [μ l]
M-MuLV	0,6
RNase inhibitor	0,3
dNTP (10 mM)	0,6
10x Reaction Buffer	1,2
deionizovaná voda	3,3

Následuje inkubace v termobloku po dobu 1 h při teplotě 42 °C a inkubace v 65 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly poté rychle přeneseny na led a inkubovány po dobu 2 minut a naředěny 48 μ l ddH₂O.

5.7 qPCR

Nejdříve byl připraven roztok primerů, kdy do 1,5ml plastové zkumavky bylo přidáno 80 μ l ddH₂O, 10 μ l forward primeru a 10 μ l reverse primeru. Poté je připraven mastermix, viz Tabulka 2 s 10% rezervou. Na detekci genu CYP1B1 byl použit jiný set pro qPCR. Forward a reverse primer byl smíchán s vodou v objemech: 10 μ l Fw primeru, 10 μ l Rev primeru a 180 μ l ddH₂O. Mastermix byl připraven viz Tabulka 3.

Tabulka 2: Příprava mastermixu pro qPCR.

Reagencie	Objem [μ l] na jednu jamku
KiCqStart Probe qPCR Ready Mix	5
Fw+Rev primer	0,3
próba (10 μ M)	0,2
deionizovaná voda	2,5

Tabulka 3: Příprava mastermixu pro qPCR při detekci genu CYP1B1.

Reagencie	Objem [μ l] na jednu jamku
UPL	0,2
Fw+Rev primer	0,8
Probes Master	5
deionizovaná voda	2

Na dno bílé 96jamkové destičky, která byla položena na ledě, bylo napipetováno 2 μ l vzorku, popřípadě 2 μ l ddH₂O pro NTC. Následně bylo do každé jamky napipetováno 8 μ l mastermixu. Deska byla překryta fólií a dána do centrifugy (1500 rpm, 4 °C). Po centrifugaci byla deska dána do cykléru, ve kterém proběhla PCR reakce viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Teplotní profil PCR reakce.

Počet cyklů		Čas	Teplota [°C]
1x	počáteční denaturace	2–3 min	95
30–45x	denaturace	10 s	95
	elongace	30–60 s	60

5.8 Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace

6jamková destička byla po 24 hodinách treatmentu vyndána z inkubátoru a promyta pomocí PBS. Dále do každé jamky byl napipetován 1 ml PBS, seškrábnut a přenesen do 1,5ml plastové zkumavky. Kvůli stabilitě proteinů bylo nadále pracováno se vzorky na ledu. Každá zkumavka byla zcentrifugována (4000 rpm, 4 °C, 5 min). Supernatant byl odpipetován a k obsahu bylo přidáno 80 μ l lyzačního pufru. Všechny zkumavky byly promíchány pomocí vortexu, sonifikovány. Poslední krok byl proveden celkem 2x. Následně proběhla centrifugace

(13200 rpm, 4 °C, 15 min). Supernatant byl odebrán do nových 1,5ml plastových zkumavek. U všech vzorků byla změřena koncentrace pomocí Bradfordova činidla. Všechny vzorky byly 5x zředěny a napipetovány do 96jamkové destičky po 10 µl. Následně byla napipetována kalibrační křivka BSA o koncentracích 0,2; 0,4; 0,6 mg/ml. Ke všem jamkám bylo přidáno 200 µl Bradfordova činidla.

5.9 SDS-PAGE

Izoláty proteinů byly připraveny do nových plastových zkumavek, aby v každých 20µl roztoku bylo 24 µg proteinů. Dále bylo ke každému vzorku přidáno 20 µl koncentrovaného LB pufru. Následně proběhla denaturace v termobloku při teplotě 95 °C po dobu 5 min.

Poté byl připraven dělicí a zaostřovací gel pro SDS-PAGE viz Tabulka 4; viz Tabulka 5.

Tabulka 4: Příprava 10% dělicího gelu pro SDS-PAGE.

Reagencie	Objem
40% AA	2,5 ml
ddH ₂ O	4,9 ml
4x pufr do dělicího gelu, pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tabulka 5: Příprava 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE.

Reagencie	Objem
40% AA	0,4 ml
ddH ₂ O	2,56 ml
4x pufr do zaostřovacího gelu, pH 6,8	1 ml
10% SDS	40 µl
APS	30 µl
TEMED	4 µl

Dělicí gel byl převrstven isopropanolem, následovala jeho polymerace po dobu 20 minut. Následně byl isopropanol odstraněn, skla byla promyta deionizovanou vodou, lehce osušena a mezi skla byl napipetován zaostřovací gel, do nějž byl vložen hřebínek. Polymerace probíhala

přibližně 30 minut. Skla byla vyjmuta a dána do ledničky. Další den byl gel vložen do elektroforetické komůrky, vyjmut hřebínek a nalit migrační pufr. Do jednotlivých jamek byly aplikovány vzorky a komůrka připojena k proudu (15 mA).

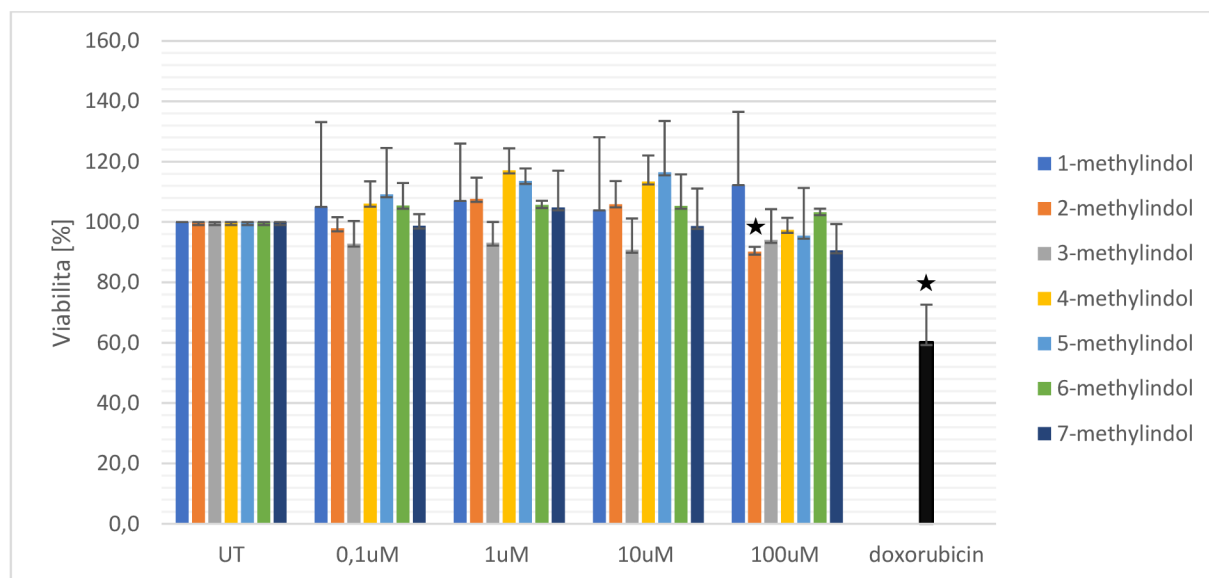
5.10 Western blotting

Ještě před skončením elektroforézy byla připravena PVDF membrána, která byla hydratována v methanolu a poté 3x opláchnuta v deionizované vodě a přesunuta do transfer pufru. Elektroforéza byla následně vypnuta přibližně 0,5 cm před dojetím do konce skla a migrační pufr byl zpátky přenesen do láhve. Zaostrovací gel byl pomocí plastové špachtle odstraněn a dělicí gel přesunut do transfer pufru. Následně byla sestavena blotovací aparatura, kdy na elektrodu byly podle následujícího pořadí umístěny: 2x filtrační papír, membrána, gel, 2x filtrační papír. Vše bylo uhlazeno válečkem a přiklopeno víkem. Na zdroji napětí bylo nastaveno 380 mA, 1,5 h. Po uběhnuté době byl vypnut zdroj a kazeta rozebrána. Membrána byla dvakrát opláchnuta deionizovanou vodou a obarvena v Ponceau S., znovu opláchnuta deionizovanou vodou a nepotřebné okraje byly ořezány. Následně byla membrána přenesena pomocí pinzety do 5% roztoku sušeného mléka v TBS/Tween na 1 h. Mezitím byly do 5% BSA naředěny primární protilátky vůči AhR v poměru 1:500 u aktinu 1:2000. Po ukončení inkubace v roztoku sušeného mléka byla membrána inkubována v lednici přes noc v roztoku 5% BSA s primárními protilátkami. Další den byla membrána promyta pomocí TBS/Tween a inkubována v 5% roztoku sušeného mléka se sekundárními protilátkami v poměru 1:2000 po dobu 1 h. Následně byla membrána přenesena na sklo, na ni byl napipetován substrát a proběhla 5minutová inkubace. Membrána byla přenesena do kazety a proběhla detekce proteinů.

6 Výsledky

6.1 Viabilita

Pomocí krystalové violeti byla zjištěna cytotoxicita jednotlivých látek a srovnána s UT a doxorubicinem. Bylo zapotřebí otestovat, zdali methylyndoly jsou toxické pro buněčnou linii PC-3. Buňky byly vystaveny působení 1-methylyndolu, 2-methylyndolu, 3-methylyndolu, 4-methylyndolu, 5-methylyndolu a 6-methylyndolu o koncentracích 0,1; 1; 10 a 100 μM . Výsledky byly poté vyhodnoceny spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm,

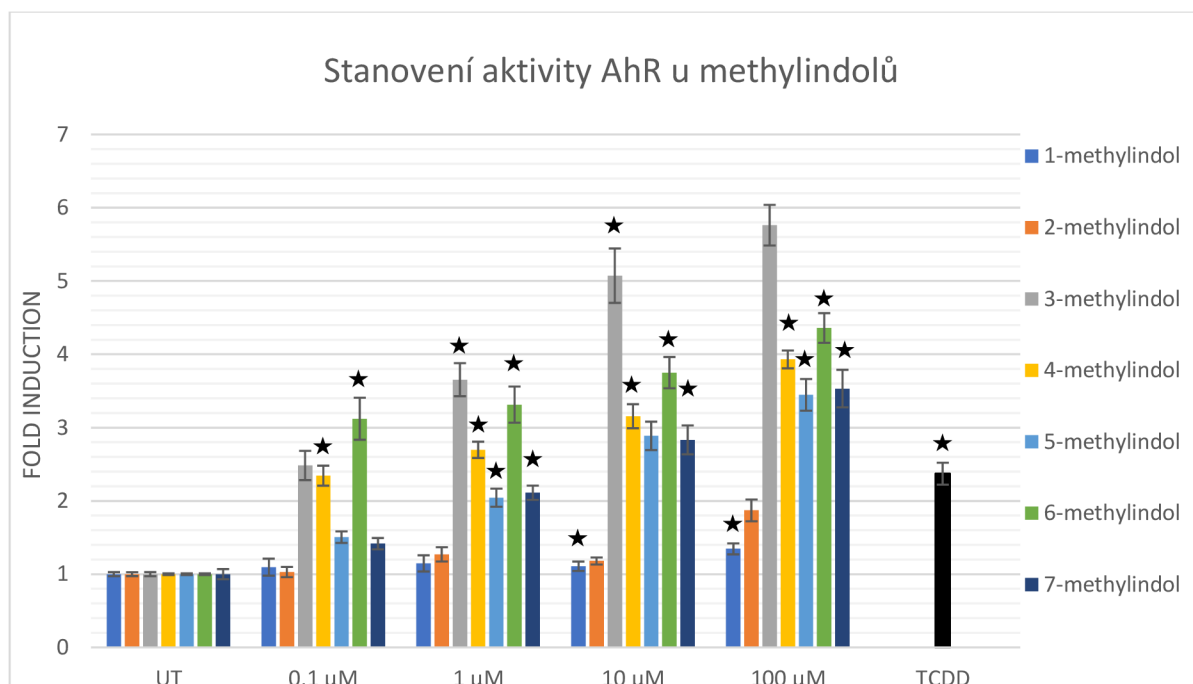


Graf 1: Srovnání cytotoxicity methylyndolů pomocí krystalové violeti. Tento graf znázorňuje procentuální viabilitu buněčné linie PC-3 po vystavení působení methylyndolů o koncentracích 0,1; 1; 10; 100 μM a doxorubicinu (20 μM) po dobu 24 h. Výsledky jsou vztaženy vzhledem k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$).

Většina testovaných indolů signifikantně nesnižovala viabilitu ve srovnání s negativní kontrolou (Graf 1), pouze 2-methylyndol, ale jen o cca 8 % ve 100 μM koncentraci. Znamé cytotoxické agens, doxorubicin, však snížil signifikantně viabilitu na cca 55% při koncentraci 20 μM . Všechny výše testované koncentrace mohly být dále použity pro testování aktivace AhR v PC-3 prostatické linii.

6.2 Reporter Gene Assay

Buněčná linie PC-3 stabilně transfekovaná reportérovým plazmidem responzivním na aktivaci AhR byla vystavena působení methyldolů o koncentracích 0,1; 1; 10 a 100 μM po dobu 24 h. Reporter Gene Assay stanovuje pomocí luciferázy aktivitu AhR, který je přítomný v této buněčné linii.



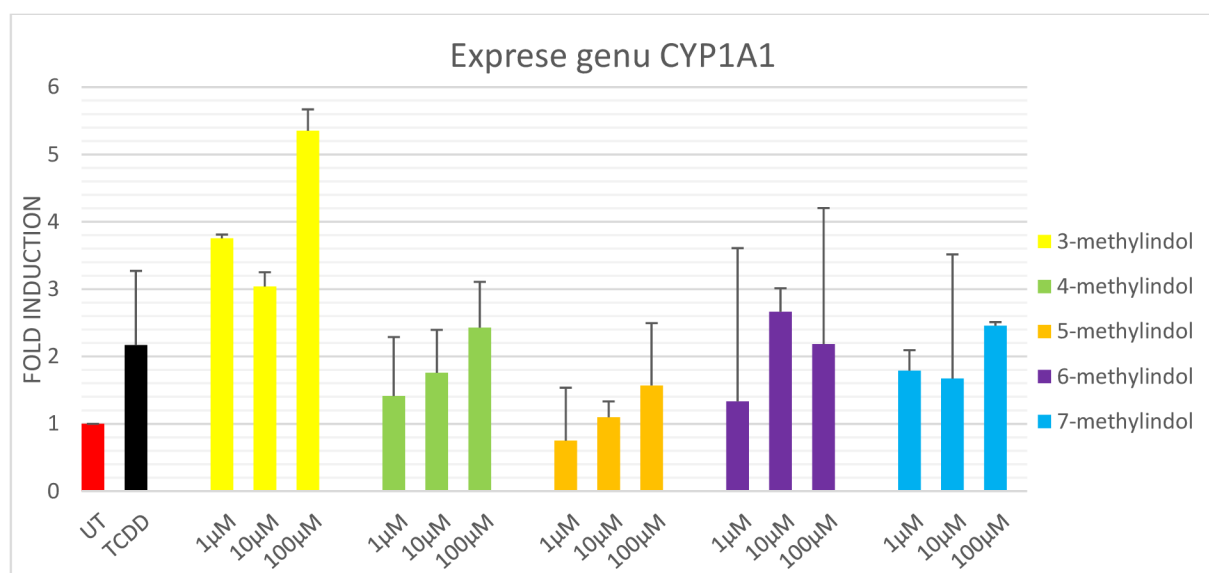
Graf 2: Působení methyldolů na aktivitu AhR receptoru. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methyldolů o koncentracích 0,1; 1; 10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla stanovena aktivita luciferázy, která je přímo úměrná aktivitě aryl uhlovodíkového receptoru. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$).

Pozitivní kontrola TCDD indukoval cca 2,2 násobný růst luciferázové aktivity, který byl vyhodnocen jako signifikantní. U 1-methyldolu a 2-methyldolu nedocházelo k výrazné aktivaci AhR, proto nebyly tyto dvě sloučeniny dále použity pro navazující experimenty. U ostatních monomethyldolů docházelo k výrazné aktivaci AhR, srovnatelné či vyšší jako pro TCDD, viz Graf 2. Nejsilnějším aktivátorem AhR byl 3-methyldol, který byl v 100nM koncentraci stejně účinný jako TCDD (10 nM) a v 100 μM koncentraci indukoval až 6krát. Pro další experimenty byly testovány již jen 3 nejvyšší koncentrace monomethyldolů.

6.3 qPCR

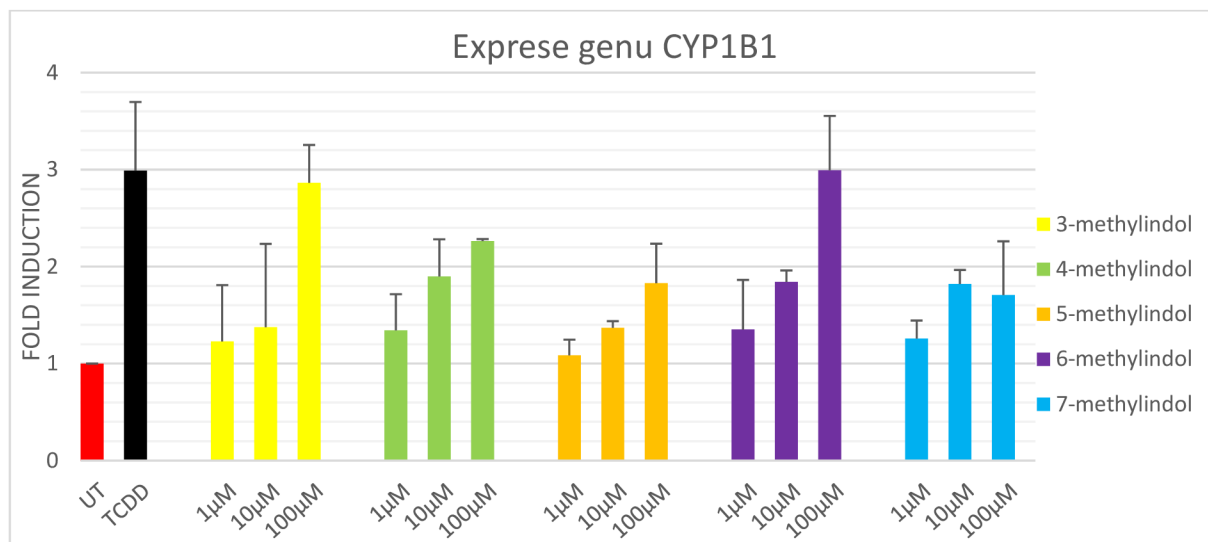
Byla sledována exprese u cílových genů AhR – CYP1A1, CYP1B1 a AhRR a genů AR – FKBP5 a UBE2C. Výše hladiny exprese byla stanovena pomocí qPCR, kdy PC-3 linie byla vystavena látkám 3-methylindol (3-MI), 4-methylindol (4-MI), 5-methylindol (5-MI), 6-methylindol (6-MI) a 7-methylindol (7-MI) o koncentracích 1; 10 a 100 μM po dobu 24 h. Veškerá data jsou vztahena k negativní kontrole UT.

U genu CYP1A1, který je pod kontrolou AhR, všechny monomethylindoly indukovaly do jisté míry expresi viz Graf 3. Zatímco pozitivní kontrola TCDD indukoval cca 2krát, ostatní indoly vykazují podobnou míru indukce s výjimkou 3-methylindolu, který indukoval 3-5krát a 5-methylindolu, jehož indukční potenciál byl nejnižší.



Graf 3: Působení methylindolů na expresu genu CYP1A1. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla stanovena exprese genu CYP1A1 pomocí qPCR. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou zastoupeny reprezentativním experimentem.

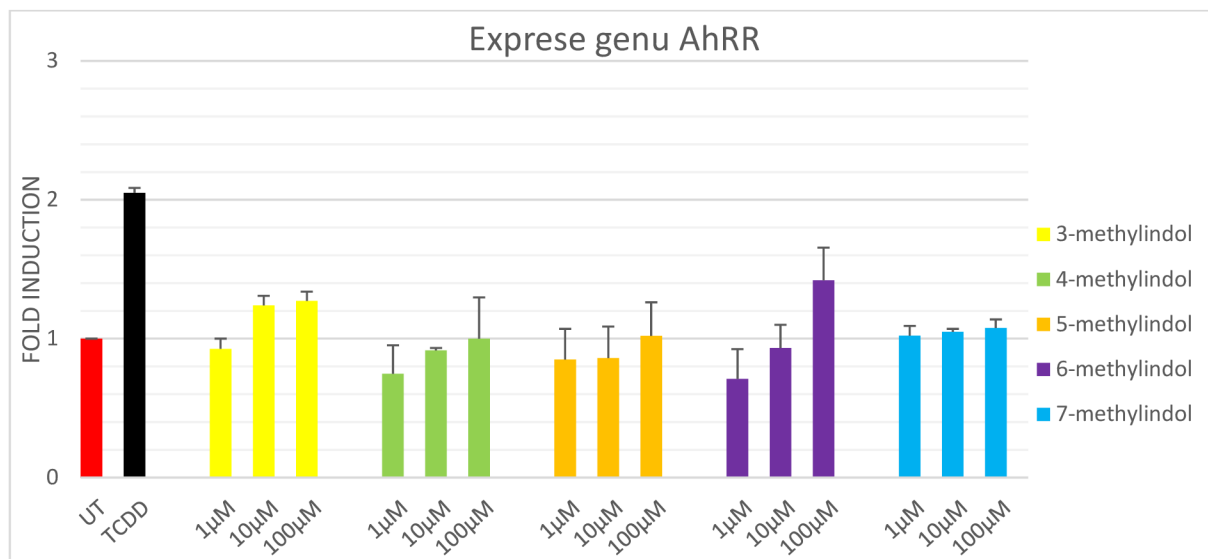
U genu CYP1B1, který je také pod kontrolou AhR, byly pozorovány podobné trendy jako u genu CYP1A1 viz Graf 4. U všech testovaných látek byla pozorovatelná zvyšující se exprese se zvyšující se koncentrací kromě 7-methylindolu. U skatolu v koncentraci 100 μM a 6-methylindolu dochází k indukci, která se přibližně vyrovná indukci vyvolanou TCDD.



Graf 4: Působení methyldolů na expresu genu CYP1B1. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methyldolů o koncentracích 1;10 a 100 µM po dobu 24 h. Následně byla stanovena exprese genu CYP1B1 pomocí qPCR. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou zastoupeny reprezentativním experimentem.

Posledním testovaným genem pod kontrolou AhR je AhRR. Oproti dříve uvedeným genům CYP1A1 a CYP1B1, zde nedochází k indukci srovnatelné s modelovým ligandem TCDD, viz Graf 5. Mírná indukce byla zaznamenána pro 3- a 6- methyldol.

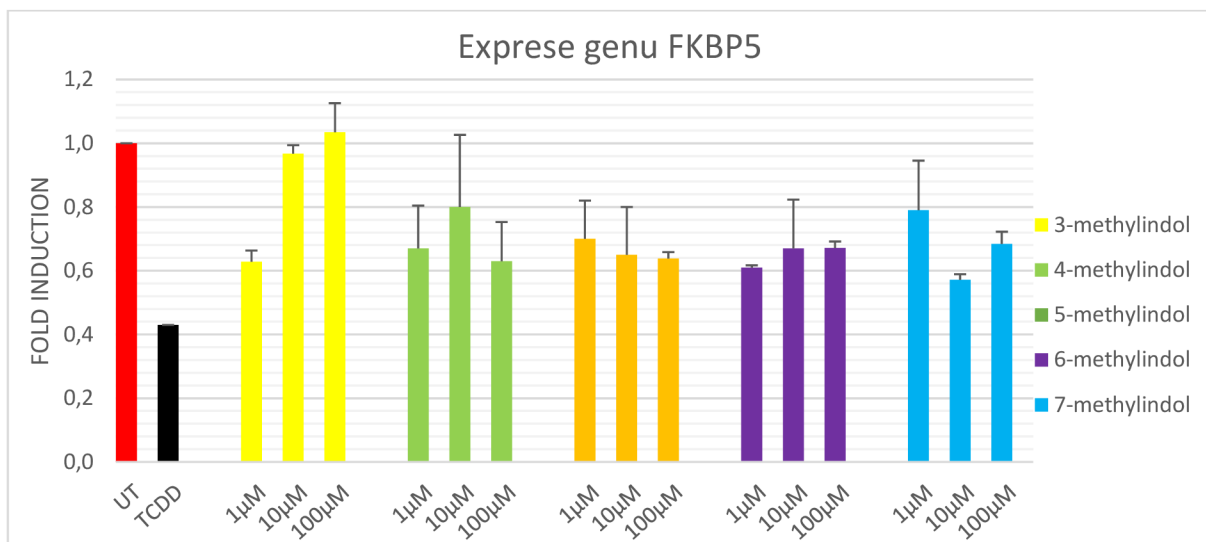
Z uvedených dat vyplývá, že všechny testované methyldoly jsou schopny koncentračně závisle indukovat geny kontrolované AhR. Jedině u AhRR docházelo k menší indukci exprese.



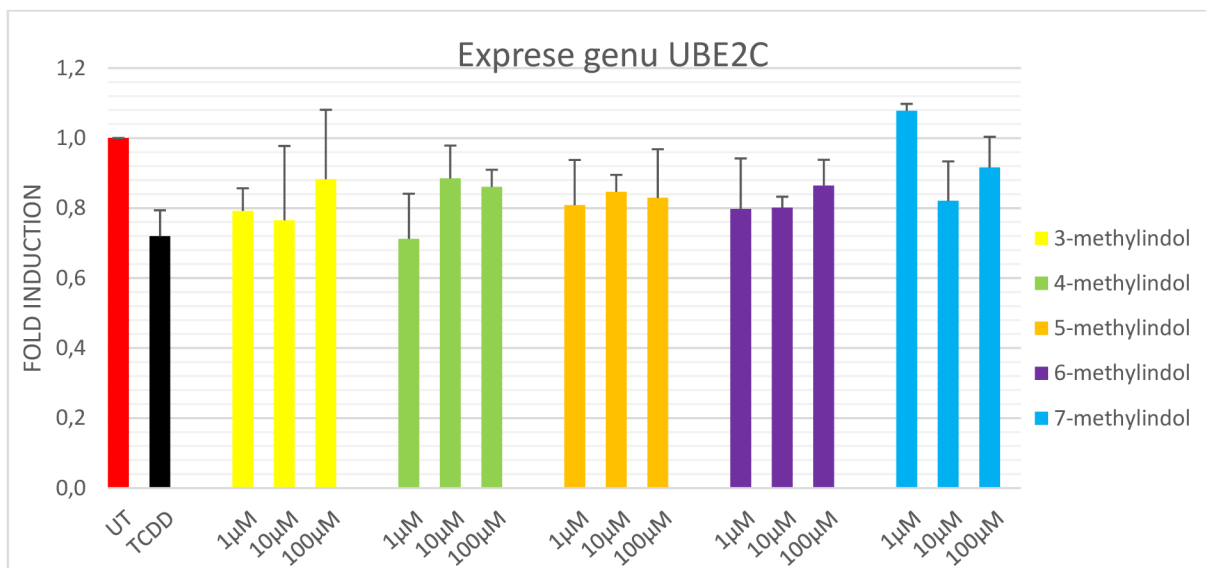
Graf 5: Působení methylindolů na expresu genu AhRR. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla stanovena exprese genu AhRR pomocí qPCR. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou zastoupeny reprezentativním experimentem.

Pomocí qPCR byla stanovena i exprese genů, které jsou regulovány primárně AR – KLK3, FKBP5, UBE2C, aby se zjistilo, jakou roli hraje AhR aktivace v expresi těchto genů v nepřítomnosti AR.

KLK3 gen nebyl vůbec exprimován v PC-3 linii, což naznačuje, že je tedy výhradně kontrolován androgenním receptorem. U FKBP5 a UBE2C byly pozorovány pouze menší změny v expresi. Oba byly downregulovány TCDD. V případě FKBP5 se hodnoty násobku negativní kontroly pohybovaly kolem v rozmezí 0,6-0,8 pro 4- až 7-methylindol, viz Graf 6. Skatol oproti tomu snížil FKBP5 expresi jen v nejnižší koncentraci, zatímco ve vyšších neměl na expresi vliv. U genu UBE2C byl pro všechny testované methylindoly pozorován pokles o cca 20 % vůči negativní kontrole, viz Graf 7.



Graf 6: Působení methylindolů na expresu genu FKBP5. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla stanovena exprese genu FKBP5 pomocí qPCR. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou zastoupeny reprezentativním experimentem.

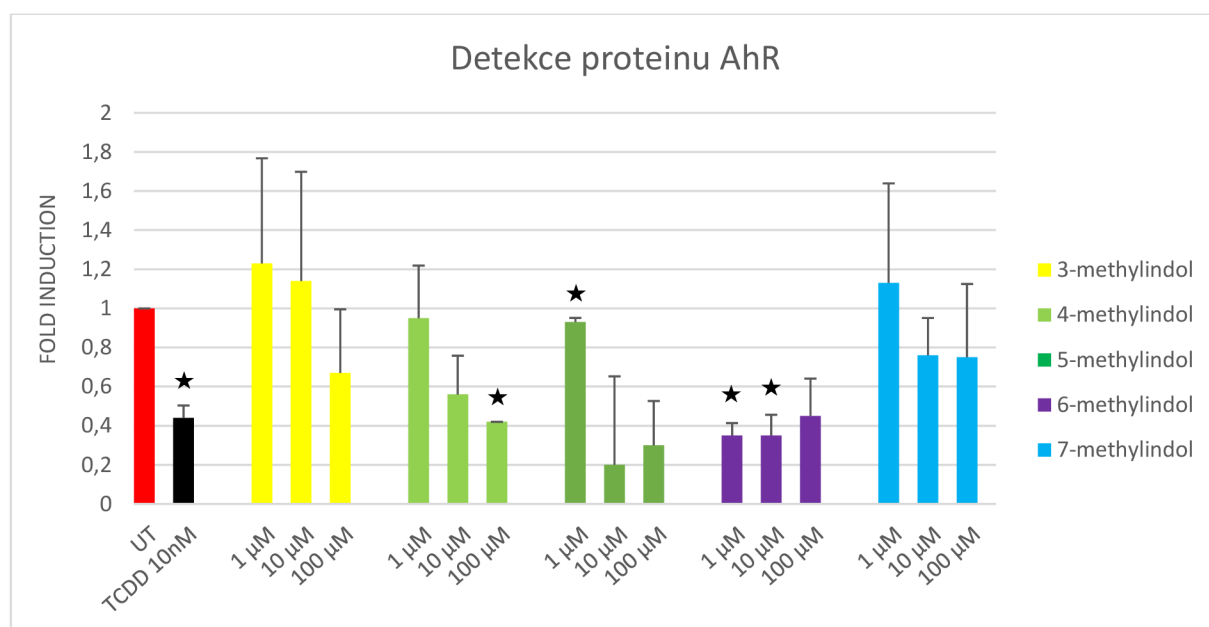


Graf 7: Působení methylindolů na expresu genu UBE2C. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla stanovena exprese genu UBE2C pomocí qPCR. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou zastoupeny reprezentativním experimentem.

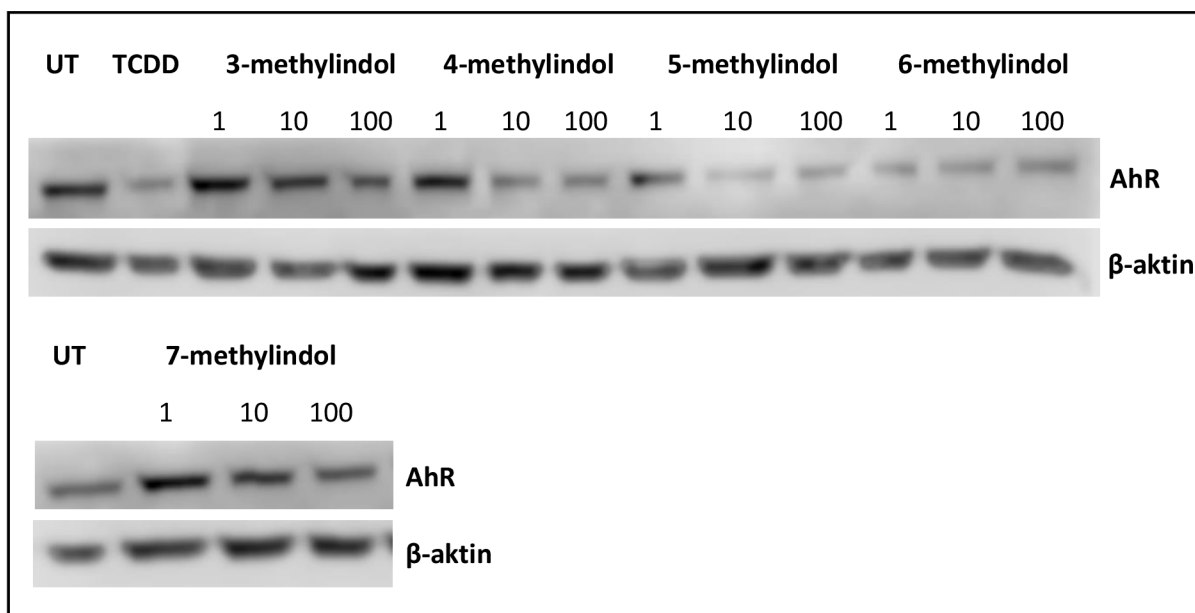
6.4 Western blotting

Po stanovení exprese u vybraných genů byla pomocí Western blottingu detekována hladina proteinu AhR. Mezi testované látky patřily: 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol o koncentracích 1; 10 a 100 μM . Výsledky jsou průměrem dvou experimentů.

Při detekování proteinu aryl uhlovodíkového receptoru byla nejvyšší hladina přítomna u 3-methylindolu, který v koncentracích 1 μM a 10 μM přesahoval UT (negativní kontrola) cca o 22 a 17 %. Další látkou, jejíž hodnota přesahovala negativní kontrolu, byl 7-methylindol o koncentraci 1 μM . U všech látek kromě 5- a 6-methylindolu byl pozorovatelný úbytek proteinů se zvyšující se koncentrací, viz Graf 8 a Obrázek 7.



Graf 8: Western blot detekce proteinů AhR v buněčné linii PC-3. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μM po dobu 24 h. Následně byla detekována hladina proteinů AhR pomocí Western blottingu. Výsledky jsou násobkem negativní kontroly UT, která představuje hodnotu 1. TCDD byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou průměrem 2 nezávislých experimentů. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$).



Obrázek 7: Reprezentativní Western blot detekce AhR v buněčné linii PC-3. Buněčná linie PC-3 byla vystavena působení methylindolů o koncentracích 1;10 a 100 μ M po dobu 24 h. Následně byla detekována hladina proteinů AhR pomocí Western blottingu. Pro verifikaci byla provedena detekce β -aktinu.

7 Diskuze

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem methylindolů na aryl uhlovodíkový receptor v buňkách rakoviny prostaty negativní na androgenní receptor. Androgenní receptor je důležitým molekulárním cílem pro léčiva, která se podílejí na inhibici jeho aktivity. Aryl uhlovodíkový receptor patří mezi transkripční faktory, u kterých byla v počátcích jejich studia popsána regulace metabolismu xenobiotik. Mezi jeho další popsané funkce patří oprava DNA, imunitní odpověď atd.

Na začátku experimentů bylo nutné detekovat viabilitu PC-3 pomocí krystalové violeti. Při mém měření byl největší úbytek viability u 1-methylindolu (10 μM), kde oproti UT klesla viabilita o 10 %, avšak tato hodnota nebyla signifikantní. V experimentu Stepankova *et al.* (2018), který využíval buněčnou linii LS180, jež byla izolována z tlustého střeva, se provedl MTT test u mono-methylindolů v koncentracích od 1 nM do 200 μM při 24hodinovém treatmentu, byl největší pokles viability 20 %. Srovnání obou experimentů vykazuje nízkou toxicitu všech testovaných látek. V experimentu Khwaja *et al.* (2009) pracovali s buněčnou linií PC-3 a sledovali účinek látek ketorolak, indomethacin, etodolak, 5-methylindol-3-acetát, indol 3-karbinol a diindolylmethan. Po 48hodinovém treatmentu srovnali viabilitu těchto látek při koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mmol/l. Zjistili, že při nejvyšší testované koncentraci u ketorolaku a diindolylmethanu dochází k téměř 100% smrti buněk, kdežto u ostatních látek přežilo při nejvyšší koncentraci alespoň 60 % (5-methylindol-3-acetát) a více. Látky využívané v tomto článku měly po 48hodinovém treatmentu vyšší cytotoxicitu, což ale může korelovat s časovým rozhraním, kdy v mém experimentu probíhal treatment pouze 24 h. Zajímavým faktem nicméně zůstává, že diindolylmethan byl popsán jako koaktivátor AhR a induktor CYP1A1. Při koncentraci 10 μM nebyla pozorována signifikantní indukce, avšak při vyšších koncentracích (50 μM , 100 μM) byla hladina CYP1A1 mRNA výrazně vyšší a u 100 μM koncentrace dokonce přesahovala hodnotu TCDD (1 nM) (Chen *et al.*, 1998). Něco podobného jsem pozoroval pro vybrané indoly, zejména 3-methylindol (Graf 3).

Dalším krokem v mé bakalářské práci bylo ověření aktivace AhR pomocí Reporter Gene Assay. Tato metoda využívá plazmid obsahující reportérový gen izolovaný ze světlušek, který je vložen do dceřiných buněk PC-3, které dostaly pojmenování PAhRC3. Buňky byly inkubovány po dobu 24 h. Největší aktivaci AhR způsobily skatol, 4-methylindol a 6-methylindol. Ve srovnání s výzkumem Stepankova *et al.* (2018), kde probíhala inkubace s methylindoly v koncentrační řadě 100 nM, 1; 5; 10; 50; 100 a 200 μM v 8 a 24hodinových cyklech, se shodujeme s vysokou aktivitou AhR při inkubaci s 4-methylindolem a 6-methylindolem, avšak

v mém experiment navíc dosáhl vysoké indukce skatol. U všech testovaných látek tak dochází k výrazně vyšší aktivaci AhR po delší době inkubace. V experimentu Amakura *et al.* (2016) detekovali aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru molekulami, které jsou obsaženy v jídle. Tryptamin, který je metabolitem tryptofanu stejně jako 3-methylindol, vykazoval vysokou aktivaci AhR při koncentraci ~ 10000 nM v buněčné linii myších jater H1L6.1c2. Dále v uvedené studii detekovali, že z aminokyselin a jejich derivátů, pouze molekuly, které obsahovaly indol, aktivovali AhR (Amakura *et al.*, 2016).

Další byla sledována hladina exprese vybraných genů AhR a AR, kdy PC-3 buňky byly inkubovány 24 hodin s methylindoly v koncentracích 1; 10 a 100 μ M. Měřila se exprese genů CYP1A1, CYP1B1, AhRR, FKBP5, UBE2C a KLK3. Při měření exprese CYP1A1, což je gen, který má důležitou roli v první fázi biotransformace stejně jako CYP1B1 a AhRR, byla viditelně nejvyšší hodnota pozorována u skatolu, kdežto nejnižší u 5-methylindolu. U 3- a 4-methylindolu byla pozorovatelná závislost exprese na koncentraci. Ve výzkumu Stepankova *et al.* (2018), kde byly buňky inkubovány s testovanými látkami po dobu 24 hodin při koncentraci 200 μ M, bylo zjištěno, že nejvyšší expresi indukují 4-, 5- a 6-methylindoly, což nekoresponduje s mými výsledky. To může být dáno použitím rozdílných buněčných linií a koncentrací testovaných látek. V diplomové práci Mgr. Leštinské (2021), byla použita buněčná linie 22Rv1, která obsahuje androgenní i aryluhlovodíkový receptor. K nejvyšší expresi CYP1A1 docházelo u 4-methylindolu, jehož hladina přesahovala TCDD až 2x při koncentraci 100 μ M. V mém experimentu se stejná látka ve stejné koncentraci rovnala TCDD. U 3-methylindolu až 7-methylindolu byla pozorovaná nejvyšší exprese CYP1A1 pro koncentraci 100 μ M, což jsem pozoroval i v mé bakalářské práci. U CYP1B1 genu byla v obou pracích doložena koncentrační závislost methylindolů na genové expresi. U buněk 22Rv1 přesahovaly 3-methylindol a 4-methylindol násobek negativní kontroly TCDD, kdežto u PC-3 buněk nepřesáhla tuto hladinu ani jedna látka. U AhRR byl u obou linií dokázán vliv koncentrační řady na expresi genu. Lze tedy říct, že methylindoly mají větší vliv na expresi těchto tří genů u buněčné linie 22Rv1 než PC-3. Při detekci FKBP5 a UBE2C nebyla v mé bakalářské práci změřena hladina exprese vyšší ku negativní kontrole, kdežto v diplomové práci Mgr. Leštinské ano. V buněčné linii 22Rv1 docházelo k indukci u všech látek i všech koncentrací u obou zmíněných genů. V buněčné linii PC-3 byla hladina exprese u genu FKBP5 snížena u 4- až 7- methylindolu ve všech koncentracích v průměru o 40 % a u UBE2C byla hladina snížena mírně, přibližně o 20 %. Tato data tedy naznačují, že testované indoly potlačují

expresi FKBP5 a mírně i UBE2C v nepřítomnosti androgenního receptoru a mohou tedy ovlivňovat i jinou signální dráhu zapojenou do regulace exprese FKBP5 a UBE2C.

Další částí byla detekce proteinu AhR pomocí Western blottingu. Oproti qPCR se testované látky nelišily, ani v koncentracích. Ve většině případů kromě 1 μ M a 10 μ M 3-methylindolu a 1 μ M 7-methylindolu dochází k downregulaci. Dále s narůstající koncentrací methylindolů (kromě 5- a 6-methylindolu) docházelo k úbytku AhR proteinu a tedy jejich degradaci. V diplomové práci Mgr. Leštinské byl největší nárůst proteinu sledován u 5-methylindolu, kdežto v mé práci to byl 3-methylindol, a u ostatních methylindolů nebyl pozorován výrazný vliv na AhR v buněčné linii 22Rv1. Lze tedy říct, že závisí na použité buněčné linii v případě detekce proteinu AhR, jak bude reagovat na přítomnost AhR aktivátorů.

8 Závěr

V této bakalářské práci byla dokázána výrazná aktivace aryl uhlovodíkového receptoru látkami: 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol o koncentracích 1; 10; 100 μM pomocí metody Reporter Gene Assay a také jejich nízká cytotoxicita na buněčnou linii PC-3. Ta neobsahuje androgenní receptor, a proto nedocházelo k expresi nad rámec negativní kontroly u genů FKBP5 a UBE2C. Látky však indukovaly geny, které jsou pod kontrolou AhR a to CYP1A1, CYP1B1 a AhRR, jež jsou důležité komponenty metabolismu xenobiotik. Dále byla ověřena koncentrační závislost methylindolů na expresi genů CYP1A1, CYP1B1, AhRR, kdy se zvyšující se koncentrací testovaných látek docházelo k výraznější expresi.

Při Western blottingu byla zjištěna koncentrační závislost methylindolů na hladině proteinu, kdy na rozdíl od qPCR se zvyšující se koncentrací docházelo k degradaci AhR proteinu. Pouze u 1 μM a 10 μM 3-methylindolu a 1 μM 7-methylindolu byla exprese vyšší než u UT (negativní kontrola).

9 Seznam použité literatury

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. 2016. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288.
- Agoulnik IU, Weigel NL. 2006. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem* 99: 362–372.
- Alshahrani, S., McGill, J., & Agarwal, A. 2013. Prostatitis and male infertility. *Journal of Reproductive Immunology*, 100(1), 30–36.
- Amakura, Y., Tsutsumi, T., Yoshimura, M., Nakamura, M., Handa, H., Matsuda, R., Teshima, R., & Watanabe, T. 2016. Detection of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by Some Chemicals in Food Using a Reporter Gene Assay. *Foods (Basel, Switzerland)*, 5(1), 15.
- Badawy A. A. B. 2017. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. *Neuropharmacology* 112 (Pt B), 248–263.
- Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., and Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 228–233.
- Barnes-Ellerbe S, Knudsen KE, Puga A. 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol Pharmacol* 66: 502–511.
- Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, Iversen P, Bhattacharya S, Carles J, Chowdhury S, et al. 2014. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 371: 424–433.
- Beltran, H., Tomlins, S., Aparicio, A., Arora, V., Rickman, D., Ayala, G., Huang, J., True, L., Gleave, M. E., Soule, H., Logothetis, C., & Rubin, M. A. 2014. Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(11), 2846–2850.
- Bender D. A. 1983. Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: A mechanism for the pellagragenic action of leucine. *Br. J. Nutr.* 50, 25–32.
- Bergander, L. et al. 2004. Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2b]carbazole. *Chem Biol Interact* 149, 151–164.
- Bhagavan N.V. 2011: *Essentials of Medical Biochemistry With Clinical Cases*. Elsevier Books, Amsterdam, Netherlands.
- Bishop JL, Thaper D, Vahid S, Davies A, Ketola K, Kuruma H, et al. 2017. The master neural transcription factor BRN2 is an androgen receptor-suppressed driver of neuroendocrine differentiation in prostate. *Cancer Disco.* 54–71.
- Bluemn EG, Coleman IM, Lucas JM, Coleman RT, Hernandez-Lopez S, Tharakan R, Bianchi Frias D, Dumpit RF, Kaipainen A, Corella AN, et al. 2017. Androgen receptor pathway independent prostate cancer is sustained through FGF signaling. *Cancer Cell* 32: 474–489 e476.

- Bluemn, E. G., Coleman, I. M., Lucas, J. M., Coleman, R. T., Hernandez-Lopez, S., Tharakan, R., Bianchi-Frias, D., Dumpit, R. F., Kaipainen, A., Corella, A. N., Yang, Y. C., Nyquist, M. D., Mostaghel, E., Hsieh, A. C., Zhang, X., Corey, E., Brown, L. G., Nguyen, H. M., Pienta, K., Ittmann, M., Nelson, P. S. 2017. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. *Cancer cell*, 32(4), 474–489.e6.
- Boado R. J., J. Y. Li, M. Nagaya, C. Zhang, W. M. Pardridge. 1999. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 12079–12084.
- Body JJ, Casimiro S, Costa L. 2015. Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. *Nat Rev Urol* 12: 340–356.
- Brandt B., Junker R., Griwatz C., Heidl S., Brinkmann O., Semjonow A., Assmann G., Zanker K.S. 1996. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Res.* 56:4556–4561.
- Bussemakers M.J., van Bokhoven A., Verhaegh G.W., Smit F.P., Karthaus H.F., Schalken J.A., Debruyne F.M., Ru N., Isaacs W.B. 1999. Dd3: A new prostate specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 59:5975-5979.
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z. & Ruas, J. L. Kynurenines. 2017. Tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*: 357.
- Cohen J.D., Li L., Wang Y., Thoburn C., Afsari B., Danilova L., Douville C., Javed A.A., Wong F., Mattox A., et al. 2018. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359: 926–930.
- Council N. R. 1989. Recommended Dietary Allowances: 10th Edition. The National Academies Press.
- Datta K, Muders M, Zhang H, Tindall DJ. 2010. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncol* 6: 823–836.
- Davis, R. E. 2014. Exploring the Effects of Gut-Derived Microbial Metabolites on Expression of SPI-1 Genes and Antimicrobial Resistance in Salmonella Typhimurium [D]. College Station, TX: Texas A&M University.
- de Bono J.S., Scher H.I., Montgomery R.B., Parker C., Miller M.C., Tissing H., Doyle G.V., Terstappen L.W., Pienta K.J., Raghavan D. 2008. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 14:6302–6309.
- De Mello, M. P., De Toledo, S. M., Haun, M., Cilento, G., and Duran, N. 1980. Excited indole-3-aldehyde from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. Reaction with and energy transfer to transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* 19, 5270–5275.
- Enan E, Matsumura F . 1996. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol*, 52(10): 1599–612.
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, Grading C. 2016. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason

- Grading of Prostatic Carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* 40: 244–252.
- Formaggio, N., Rubin, M.A. & Theurillat, JP. 2021. Loss and revival of androgen receptor signaling in advanced prostate cancer. *Oncogene* 40, 1205–1216.
- Gao, J., Xu, K., Liu, H., Liu, G., Bai, M., Peng, C., Li, T., & Yin, Y. 2018. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 13.
- Ghotbaddini, M., Moultrie, V., & Powell, J. B. 2018. Constitutive Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in Prostate Cancer Progression. *Journal of cancer treatment & diagnosis*, 2(5), 11–16.
- Glavin G. B., R. Bose, C. Pinsky. 1989. Kynurenic acid protects against gastroduodenal ulceration in mice injected with extracts from poisonous Atlantic shellfish. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13, 569–572.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40: 519–61.
- Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. 2005. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 65: 7554–7560.
- Harris, W., Mostaghel, E., Nelson, P. et al. 2009. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Rev Urol* 6, 76–85.
- Hasnain, S. Z., Tauro, S., Das, I., Tong, H., Chen, A. C. H., Jeffery, P. L., et al. 2013. IL 10 Promotes production of intestinal mucus by suppressing protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in goblet cells. *Gastroenterology* 144, 357.e359–368.e359.
- Chen Y, G. J. Guillemin. 2009. Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. *Int. J. Tryptophan Res.* 2, 1–19.
- Chen, I., McDougal, A., Wang, F., & Safe, S. 1998. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis*, 19(9), 1631–1639.
- Ikuta T, Tachibana T, Watanabe J, Yoshida M, Yoneda Y, et al. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem* 127: 503–509.
- Janosik, T. et al. 2018. Chemistry and Properties of Indolocarbazoles. *Chem Rev* 118, 9058–9128.
- Kanai M., H. Funakoshi, H. Takahashi, T. Hayakawa, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Na amur. 2009. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain* 2, 8.
- Karnes R.J., Bergstrahl E.J., Davicioni E., Ghadessi M., Buerki C., Mitra A.P., Crisan A., Erho N., Vergara I.A., Lam L.L., et al. 2013. Validation of a genomic classifier that predicts metastasis following radical prostatectomy in an at risk patient population. *J.Urol.* 190:2047–2053.

- Keszthelyi, D., Troost, F. J., and Masclee, A. A. 2009. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 1239–1249.
- Khan M.A., Sokoll L.J., Chan D.W., Mangold L.A., Mohr P., Mikolajczyk S.D., Linton H.J., Evans C.L., Rittenhouse H.G., Partin A.W. 2014. Clinical utility of proapsa a and “benign” psa when percent free psa is less than 15%. *Urology* 64:1160–1164.
- Kleb B, Estecio MR, Zhang J, Tzelepi V, Chung W, Jelinek J, et al. 2016. Differentially methylated genes and androgen receptor re-expression in small cell prostate carcinomas. *Epigenetics.* 184–93.
- Knarreborg, A., Beck, J., Jensen, M. T., Laue, A., Agergaard, N., and Jensen, B. B. 2002. Effect of non-starch polysaccharides on production and absorption of indolic compounds in entire male pigs. *Anim. Sci.* 74, 445–453.
- Kohaar, I., Petrovics, G., & Srivastava, S. 2019. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1813.
- Kollara A, Brown TJ. 2009. Modulation of aryl hydrocarbon receptor activity by four and a half LIM domain 2. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1182–1188.
- Kollara A, Brown TJ. 2010. Four and a half LIM domain 2 alters the impact of aryl hydrocarbon receptor on androgen receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118: 51–58.
- Kolluri SK, Jin UH, Safe S. 2017. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Arch Toxicol* 91:2497–2513.
- Le Floc’h, N., Otten, W. & Merlot, E. 2011. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* 41, 1195–1205.
- Leštinská M. 2021. Důsledky aktivace aryluhlovodíkového receptoru methylindoly v nádorové prostatické linii 22Rv1. Diplomová práce. Univerzita Palackého, Olomouc.
- Li, G., and Young, K. D. 2013. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology* 159, 402–410.
- McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. 1988. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12: 897–906.
- Meera Nair, Sardul Singh Sandhu and Anil K. Sharma. 2014. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer”, *Current Cancer Drug Targets* 14(5): 477-504.
- Meyer BK, Petrulis JR, Perdew GH. 2000. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones* 5(3): 243–54.
- Mittal V. 2018. Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annu Rev Pathol* 13: 395–412.

- Mohler J.L., Armstrong A.J., Bahnson R.R., D'Amico A.V., Davis B.J., Eastham J.A., Enke C.A., Farrington T.A., Higano C.S., Horwitz E.M., et al. 2016. Prostate cancer, version 1.2016. *J. Natl. Compreh. Cancer Netw.* 14:19–30.
- Morgan T.M., Lange P.H., Vessella R.L. 2007. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. *Front. Biosci.*: 3000–3009.
- Morrow D, Qin C, Smith R 3rd, Safe S. 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88: 27–36.
- Moul J.W., Sesterhenn I.A., Connelly R.R., Douglas T., Srivastava S., Mostofi F.K., McLeod D.G. 1995. Prostate-specific antigen values at the time of prostate cancer diagnosis in african american men. *JAMA.* 274:1277–1281.
- Nishizuka Y., O. Hayaishi. 1963. Enzymic synthesis of niacin nucleotides from 3 hydroxyanthranilic acid in mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 238, 483–485.
- Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. 2009. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol* 77: 474–484.
- Ornstein D.K., Englert C., Gillespie J.W., Pawletz C.P., Linehan W.M., Emmert-Buck M.R., Petricoin E.F.. 2002. 3rd Characterization of intracellular prostate-specific antigen from laser capture microdissected benign and malignant prostatic epithelium. *Clin. Cancer Res.*6:353–356.
- Pardridge WM. 1983. Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier. *Physiol Rev* 63:1481–1535.
- Pardridge WM. 1998. Blood–brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 23: 635–644.
- Park, S. L. et al. 2015. The Tryptophan-Derived Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazole Is a Nanomolar UVA Photosensitizer in Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 135, 1649–1658.
- Partin A.W., L. Van Neste, E.A. Klein. 2014. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J Urol*, 192, pp. 1081-1087
- Pontillo CA, García MA, Peña D, et al. 2011. Activation of c-Src/HER1/ STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Toxicol Sci.* 120(2): 284–96.
- Rannug, U. et al. 1995. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chemistry & Biology* 2, 841–845.
- Richmond, O., Ghotbaddini, M., Allen, C., Walker, A., Zahir, S., & Powell, J. B.. 2014. The aryl hydrocarbon receptor is constitutively active in advanced prostate cancer cells. *PLoS one*, 9(4), e95058.
- Rodrigues G, Warde P, Pickles T, Crook J, Brundage M, Souhami L, Lukka H. 2012. Pre treatment risk stratification of prostate cancer patients: a critical review. *Can Urol Assoc J* 6: 121–127.

- S.N. Spohn, G.M. Mawe. 2017. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling the gut and beyond, *Nature reviews Gastroenterol. Hepatol*: 412–420.
- Seruga B, Tannock IF. 2011. Chemotherapy-based treatment for castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 29: 3686–3694.
- Shen MM, Abate-Shen C. 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24: 1967–2000.
- Shipitsin M., Small C., Choudhury S., Giladi E., Friedlander S., Nardone J., Hussain S., Hurley A.D., Ernst C., Huang Y.E., et al. 2014. Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. *Br. J. Cancer*. 1201–1212.
- Schalken J.A., Hessels D., Verhaegh G. 2003. New targets for therapy in prostate cancer: Differential display code 3 (dd3(pca3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 62:34–43.
- Schwarcz, R. & Stone, T. W. 2017. The kynurenine pathway and the brain: challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 112, 237–247.
- Silber BY, Schmitt JAJ. 2010. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 387–407.
- Smirnova, A. et al. 2016. Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ. *Chem Res Toxicol* 29, 75–86.
- Smith BA, Sokolov A, Uzunangelov V, Baertsch R, Newton Y, Graim K, Mathis C, Cheng D, Stuart JM, Witte ON. 2015. A basal stem cell signature identifies aggressive prostate cancer phenotypes. *Proc Natl Acad Sci* 112: E6544–E6552.
- Smith SA, Pogson CI. 1980. The metabolism of L-tryptophan by isolated rat liver cells. Effect of albumin binding and amino acid competition on oxidation of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem J* 186: 977–986.
- Smith, E. A., and Macfarlane, G. T. 1997. Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. *Microb. Ecol.* 33, 180–188.
- Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., & Dvorak, Z. 2018. Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular pharmacology*, 93(6), 631–644.
- Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., & Dvorak, Z. 2018. Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular pharmacology*, 93(6), 631–644.
- Strimbu, Kyle; Tavel, Jorge. 2010. What are biomarkers?, *Current Opinion in HIV and AIDS*: 463-466.
- Su B, Gillard B, Gao L, et al. 2003. Src controls castration recurrence of CWR22 prostate cancer xenografts. *Cancer Med*. December; 2(6): 784–92.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z., & Huang, J. 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668–1679.

- Turski M. P., M. Turska, P. Paluszkiwicz, J. Parada-Turska, G. F. Oxenkrug. 2013. Kynurenic acid in the digestive system: New facts, new challenges. *Int. J. Tryptophan Res.* 6, 47–55.
- Turski M. P., M. Turska, W. Zgrajka, D. Kuc, W. A. Turski. 2009. Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids* 36, 75–80.
- Turski M. P.M. Turska, W. Zgrajka, M. Bartnik, T. Kocki, W. A. Turski. 2011. Distribution, synthesis, and absorption of kynurenic acid in plants. *Planta Med.* 77, 858–864.
- Vaishampayan U, Montgomery RB, Gordon MS, Smith DC, Barber K, de Haas Amatsaleh A, Thapar N, Chandhasin C, Perabo F, Chi KN. 2017. 794PEPI-506 (ralaniten acetate), a novel androgen receptor (AR) N-terminal domain (NTD) inhibitor, in men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): phase 1 update on safety, tolerability, pharmacokinetics and efficacy. *Ann Oncol* 28.
- van Leenders GJ, Schalken JA. 2003. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 46 Suppl: S3–S10.
- Wang M.C., Valenzuela L.A., Murphy G.P., Chu T.M. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Investig. Urol.* 17:159–163.
- Wang W, Smith R, Safe S. 1998. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: modulation of hormone-induced cell cycle enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 356(2): 239–48.
- Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, Shen MM. 2013. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nat Cell Biol* 15: 274–283.
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*, 32(17-18), 1105–1140.
- Whitman E.J., Groskopf J., Ali A., Chen Y., Blase A., Furusato B., Petrovics G., Ibrahim M., Elsamanoudi S., Cullen J., et al. 2008. Pca3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J. Urol.* 180:1975–1978.
- Williams, B. B., Van Benschoten, A. H., Cimermancic, P., Donia, M. S., Zimmermann, M., Taketani, M., et al. 2014. Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe* 16, 495–503.
- Wilt TJ, Jones KM, Barry MJ, Andriole GL, Culkin D, Wheeler T, Aronson WJ, Brawer MK. 2017. Follow-up of prostatectomy versus observation for early prostate cancer. *N Engl J Med* 377: 132–142.
- Wlodarska, M., Luo, C., Kolde, R., D'hennezel, E., Annand, J. W., Heim, C. E., et al. 2017. Indoleacrylic acid produced by commensal peptostreptococcus species suppresses inflammation. *Cell Host Microbe* 22, 25.e26–37.e26.
- Wojno K.J., Costa F.J., Cornell R.J.. 2014. Reduced rate of repeated prostate biopsies observed in ConfirmMDx clinical utility field study. *Am Health Drug Benefits*, 7 pp. 129-134.

Yokoyama, M. T., and Carlson, J. R. 1979. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 173–178.

Zhang XQ, Kondrikov D, Yuan TC, Lin FF, Hansen J, Lin MF. 2003. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha signaling is involved in androgen depletion-induced neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene.* 6704–16.

Zou M, Toivanen R, Mitrofanova A, Floch N, Hayati S, Sun Y. et al. 2017. Transdifferentiation as a mechanism of treatment resistance in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Disco.* 736–49.

Internetové zdroje

Sigma Aldrich. [online] [navštíveno 22. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/51145>

Sigma Aldrich. [online] [navštíveno 23. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/search/83-34-1>