

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium regulace transkripční aktivity
androgenního receptoru.**

Disertační práce

Autor: Ondřej Ženata
Studijní program: P1527 Biologie
Studijní obor: 1515V004 Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Olomouc 2019

Tímto prohlašuji, že předložená disertační práce je založena na mém výzkumu, který jsem prováděl na katedře buněčné biologie a genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v letech 2015–2019. Spoluautoři publikací vyjádřili souhlas s publikováním dat uvedených v této práci. Všechny zdroje literatury, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedené v části „Seznam použité literatury“.

.....
Ondřej Ženata

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli doc. Radimu Vrzalovi za cenné rady, pomoc a celkové vedení mého doktorského studia. Dále bych rád poděkoval své rodině, přátelům a všem ostatním za podporu během mého studia. Děkuji.

Data publikovaná v této práci jsou obsažena v následujících publikacích:

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Mycophenolate Mofetil induces c-Jun-N-terminal kinase expression in 22Rv1 cells: an impact on androgen receptor signaling. *Journal of Cancer*, 9, 1915 - 1924. [IF₂₀₁₆ **2.916**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells. *Translational Cancer Research*, 7, 383 - 390. [IF₂₀₁₆ **1.167**]

Ženata O., Dvorak Z., Vrzal R: (2017): Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicol Lett.* 2017 Niv 5;281:10-19. [IF₂₀₁₇ **3.166**]

Ženata O., Panáček A., Kvítek L., Vrzal R: The effect of graphene oxide on signaling of androgen receptor in androgen-dependent and independent prostate cancer cells. **(V recenzním řízení)**

Bibliografická identifikace:

Autor:	Ondřej Ženata
Název:	Studium regulace transkripční aktivity androgenního receptoru.
Typ práce:	Disertační (Ph.D.)
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby:	2019

Abstrakt

Androgenní receptor (AR) patří mezi nejvýznamnější transkripční faktory v lidském těle a je jedním z kritických bodů pro vznik rakoviny prostaty. Jakékoliv narušení jeho signalizace látkami exogenního původu může mít vážné důsledky na lidské zdraví. Mezi studovanými látkami byli: mykofenolát mofetil (MYC), imunosupresivní léčivo; bisfenol S, analog známého endokrinního disruptoru bisfenolu A, který je stále častěji užíván v chemickém průmyslu a v malých dávkách se nachází v potravě; berberin, alkaloid používaný i jako potravní doplněk, a jako poslední studovanou látkou byl grafen oxid, materiál který nalézá stále širší využití snad ve všech oblastech průmyslu, medicínské aplikace nevyjímaje. Sledoval jsem vliv všech čtyř látek na aktivitu androgenního receptoru pomocí metody s reportérovým genem, kvantitativní PCR v reálném čase a metody western blottingu. Celkově jsem došel ke zjištění, že MYC ovlivňuje signalizaci v linii 22Rv1 pomocí indukce JNK54 a JNK46 a navíc zvyšuje jejich citlivost vůči inhibitorům JNK. Bisfenol S potencuje aktivitu AR, ale neovlivňuje expresi cílového genu AR, KLK3 mRNA. Berberin potencoval aktivitu AR a slabě moduloval hladinu KLK3 mRNA a proliferaci 22Rv1, ale jeho účinky byly pozorovatelné ve fyziologicky relevantních koncentracích. Grafen oxid potlačoval indukovanou expresi KLK3 a moduloval translokaci AR. Získaná data mohou mít toxikologický i klinický význam.

Klíčová slova:	androgenní receptor, xenobiotika, KLK3, PSA
Počet stran:	87
Počet příloh:	3
Jazyk:	Čeština

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Ondřej Ženata
Title: The study of regulation of androgen receptor transcriptional activity
Type of thesis: Ph.D.
Department: Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation: 2019

Abstract

The androgen receptor (AR) is one of the most important transcription factors in the human body and is one of the critical factors in the development of prostate cancer. Disruption of its signaling by compounds of exogenous origin can have serious consequences for human health. Among studied compounds were: Mycophenolate mofetil (MYC), an immunosuppressive drug; bisphenol S, an analogue of the known endocrine disruptor bisphenol A, which is increasingly used in the chemical industry and can be found in small quantities in the diet; berberine, an alkaloid used as a food supplement as well as the last studied compound, was graphene oxide, a material that is increasingly used in all areas of industry, medical applications being no exception. I analyzed the effect of all four compounds on the androgen receptor activity using the reporter gene assay, quantitative real-time PCR and western blotting. I demonstrate that MYC affects 22Rv1 signaling by inducing JNK54 and JNK46 and, in addition, increases their sensitivity to JNK inhibitors. Bisphenol S potentiates AR activity but does not affect the target gene of AR, KLK3 mRNA. I showed that Berberine potentiated AR activity and it was a weak modulator of KLK3 mRNA and 22Rv1 proliferation. However, its effects were observable at physiologically relevant concentrations. Graphene oxide attenuated inducible KLK3 mRNA and modulate translocation of AR. The data obtained may have toxicological and clinical implications.

Keywords: androgen receptor, xenobiotics, KLK3, PSA
Number of pages: 87
Number of appendices: 3
Language: Czech

Obsah:

1 Úvod	14
2 Cíl práce	15
3 Androgenní receptor	16
3.1 Struktura androgenního receptoru	16
3.2 Modulační aktivity androgenního receptoru	20
3.2.1 Signální dráha androgenního receptoru	20
3.2.2 Posttranslační modifikace	23
3.2.2.1 Fosforylace	24
3.2.2.2 Acetylace	26
3.2.2.3 Metylace	26
3.2.2.4 Ubiquitinace	27
3.2.2.5 Sumoylace	27
3.2.3 Alternativní sestřih androgenního receptoru	28
3.2.3.1 AR-v7	28
3.2.3.2 AR-v3	29
3.3 Zkoumané látky	31
3.3.1 Bisfenol S	31
3.3.2 Mykofenolát mofetil	31
3.3.3 Berberin	32
3.3.4 Grafen oxid	32
4 Materiál a metodika	33
4.1 Sloučeniny	33
4.2 Buněčné kultury	33
4.3 Test viability (MTT)	34
4.4 Resazurinová assay	34
4.5 Reportérová genový assay	34

4.6 Proliferační assay	35
4.7 qRT-PCR	35
4.8 SDS-PAGE a Western blotting	36
4.9 Meření redukovaného a celkového glutathionu	37
4.10 Annexin V assay	37
4.11 Tomografie	37
4.12 Zeta potenciál	37
4.13 Chromatinová imunoprecipitace	37
4.14 statistická analýza	38
5. Experimentální část	39
5.1 Mykofenolát mofetil indukuje expresi c-Jun-N-koncovou kinázy v 22Rv1: vliv na signalizaci androgenního receptoru	39
5.1.1 Mykofenolát mofetil aktivuje androgenní receptor (AR)	39
5.1.2 MYC moduluje expresi KLK3 a proliferaci prostatických buněk	41
5.1.3 MYC stimuluje DHT závislou AR translokaci v buňkách 22Rv1	42
5.1.4 MYC indukuje expresi JNK	44
5.1.5 MYC má synergistický antiproliferační efekt v kombinaci s JNK inhibitorem	46
5.2 Modulace aktivity androgenního receptoru bisfenolem S	48
5.2.1 Bisfenol S stimuluje indukovanou transkripční aktivitu AR	48
5.2.2 Efekt BPS na genovou expresi AR a proliferační aktivitu v buňkách rakoviny prostaty	49
5.3 Farmakologicky relevantní koncentrace berberinu přechodně stimulují dihydrotestosteronem indukovatelnou luciferázovou aktivitu zprostředkovanou AR v lidských rakovinných buňkách prostaty	51
5.3.1 Berberin moduluje transkripční aktivitu AR a proliferaci buněk rakoviny prostaty	51

5.3.2 Vliv berberinu na aktivitu AR v LNCaP	53
5.3.3 Vliv berberinu na apoptózu v 22Rv1 buňkách	54
5.4 Vliv grafen oxidu na signalizaci androgenního receptoru	56
5.4.1 Vliv GO na viabilitu buněčné linie	56
5.4.2 Vliv GO na aktivitu androgenního receptoru	56
5.4.3 Vliv GO na cílové geny androgenního receptoru	58
5.4.4 Vliv GO na hladinu androgenního receptoru v 22Rv1	60
5.4.5 Modulace translokace AR-FL a AR-V7 pomocí GO v 22Rv1	60
5.4.6 Vliv GO na tvorbu reaktivních forem kyslíku a proliferaci	62
5.4.7 Modulace obohacení KLK3 promotoru androgenním receptorem pomocí GO	63
5.4.8 Modulace exprese cílových genů AR v 22Rv1 a LNCaP grafen oxidem	64
5.4.9 Modulace translokace androgenního receptoru v LNCaP	65
6. Diskuze	67
7. Závěr	75
8. Seznam použité literatury	76
9. Životopis	85

Seznam zkratk:

Ack1	Aktivovaná Cdc42-asociovaná kináza 1
AF-1	Aktivační funkce 1
AF-2	Aktivační funkce 1
AhR	Aryl uhlovodíkový receptor
AIM100	Selektivní inhibitor Ack1
Akt	Serin/threonin kináza
AMK	Aminokyselina
AR	Androgenní receptor
ARD1	N- α -acetyltransferáza 10
ARE	Androgenní responzivní element
AR-FL	Androgenní receptor-celá délka
ARR	Androgenní responzivní oblast
AR-v3	Androgenní receptor-varianta 3
AR-v7	Androgenní receptor-varianta 7
AR-v9	Androgenní receptor-varianta 9
ATAD2	ATPázová rodina obsahující AAA doménu protein 2
Aurora	Aurora kináza A
BER	Berberin
BIRC5	Bakulovirový IAP repetice obsahující protein 5
BPA	Bisfenol A
BPH	benigní hypertrofie prostaty
BPS	Bisfenol S
Brg1	Protein brahma homolog 1
BUB1	Putativní serin/threonin proteinová kináza
CBP	cAMP responzivní element vázající protein
CDC25	Buněčný dělicí cyklus 25A
CDK	Cyklin dependentní kináza
CE	Kryptický exon
CRM1	Údržba chromozomové oblasti 1
CRPC	Rakovina prostaty rezistentní na kastraci
CS	Uhlím zbavené
DAB21P	Tumorový supresor s GTPázovou aktivitou

DAX-1	Jaderný receptor 0B1
DBD	DNA vazebná doména
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DHT	5 α -dihydrotestosteron
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DR3	Přímé repetice 3
E2FI	E2F transkripční faktor 1
EGF	Epidermální růstový faktor
Era	Estrogenní receptor α
FKBP5	FK506 vázající protein 5
GFP	zelený fluorescenční protein
GO	Grafen oxid
GR	Glukokortikoidní receptor
HDAC1	Histonová deacetyláza 1
HSP	Protein teplotního šoku
ChIP	Chromatinová imunoprecipitace
IMPDH	Inosin monofosfát dehydrogenáza
IR3	Obrácené receptice 3
JNK 46	C-Jun N-koncová kináza 1
JNK 54	C-Jun N-koncová kináza 3
JunD	JunD proto onkogen
KDM4B	Lysinová demetylázy 4B
KLK3	Kallikreinová peptidáza 3
KoA	Koaktivátor
KoR	Korepresor
LBD	Ligand vazebná doména
Mdm2	E3 ubiquitin ligáza Mdm2
MR	Mineralokortikoidní receptor
mRNA	mediátorová RNA
mTOR	Cílový protein rapamycinu 1
MYC	Mykofenolát mofetil
NES	Jaderný exportní signál
NF- κ B	Jaderný faktor κ B

NLS	Jaderný lokalizační signál
NTD	N-koncová doména
P/CAF	P300/CBP asociovaný faktor
P300	E1A vazebný protein 300kD
P53	Tumorový supresor p53
PAK6	p21-aktivovaná kináza 6
PI3K	PI3 kináza podjednotka α
PIAS1	Proteinový inhibitor aktivovaného proteinu STAT 1
PIM	Pim-1 onkogen
PLK1	Serin/threonin proteinová kináza 13
PR	Progesteronový receptor
PRMT5	Proteinová argininová metyltransferáza 5
PSA	Prostatický specifický antigen
Pur α	Transkripční aktivační protein Pur α
RIP-140	Protein interagující s jadernými receptory 1
RNF6	Protein prstového prstence 6
Set9	Lysinová N-metyltransferáza 7
SGTA	malý na glutamin bohatý TRP α
SHP	Sirotčí jaderný receptor SHP
Smad	MAD homolog 4
SMRT	Jaderný receptorový korepresor 2
Sp1	Specifický protein 1
SRC-1	Tyrosinová kináza Pp60c-Src
SRD5A	Steroid 5 α -reduktáza
SREBP1	Protein vázající sterolový regulační prvek 1
TAU-1	Transkripční aktivační jednotka 1
TAU-5	Transkripční aktivační jednotka 5
TF	Transkripční faktor
TGIF	TALE homeobox TG-interagující faktor
Tip60	Lyzinová acetyltransferáza 5
TPR	Protein s tetratrikopeptidovou doménou
Twist	Twist rodina BHLH transkripční faktor 1
UBE2C	Ubiquitin konjugující enzym E2C
Vav3	Vav guaninový výměnný faktor 3

Zeb1

Zinkový prst E-box vazebný homeobox 1

1 Úvod:

Androgenní receptor (AR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor nezbytný pro správný vývoj a fungování lidského těla. Bylo prokázáno, že samotný receptor ovlivňuje expresi více než tisíce genů a je důležitým faktorem při vývoji rakoviny prostaty [1]. Jeho hlavními aktivátory jsou androgeny, hormony produkované v lidském těle, z čehož nejvýznamnější je metabolit testosteronu, dihydrotestosteron, který se na AR váže a spouští kaskádu dějů. Nicméně, signalizace AR může být narušena mnoha exogenními látkami (bisfenol A, DDT, metoxychlor,...) [2], což vede k nežádoucím projevům a v konečném důsledku mohou tyto látky napomoci rakovině prostaty. Jelikož na rakovinu prostaty a následky s ní spojené umírá mnoho dospělých lidí (jen ve Švédsku téměř 10% všech případů rakoviny) [3] je přínosné prozkoumat možné efekty látek působících na androgenní receptor.

V chemickém průmyslu, potravinářství a u věcí se kterými denně přicházíme do styku lze nalézt řadu látek u nichž nebyly zjišťovány jejich účinky na lidský organizmus nebo přímo na jaderné receptory. Případně byly testovány pouze v omezené míře. Je proto nezbytné zjistit jejich možné účinky na organizmus a předejít tak riziku onemocnění, které by z toho mohlo plynout. Jedna ze široce používaných látek je bisfenol S (BPS), náhrada za bisfenol A (BPA), který je postupně vytlačován z průmyslu jeho bezpečnějšími variantami. U bisfenolu A sice byla prokázána toxicita a jeho schopnost endokrinní disrupce několika jaderných receptorů v mnoha publikacích [4], ale studie jeho derivátu, BPS, jsou pouze v omezené míře. To stejné platí pro imunosupresivum mykofenolát mofetil, přírodní alkaloid berberin a čím dál častěji používanou průmyslovou sloučeninu grafen oxid. Studie zabývající se účinky těchto látek na jaderné receptory, a převážně na androgenní receptor, jsou pouze limitujícího charakteru.

Z výše zmíněných důvodů je tedy velmi důležité sledovat možné nežádoucí efekty používaných látek na lidský organizmus. Všechny látky, které jsou testovány v této publikaci, jsou denně v kontaktu s miliony lidí a jejich produkce se celosvětově zvyšuje s tím, jak se rozvíjí průmysl. Tato studie tedy přispěje k lepšímu pochopení interakcí daných látek a androgenního receptoru a může vést k bezpečnějšímu užívání látek případně urychlit jejich nahrazení jinými.

2 Cíl práce:

Hlavním cílem této práce je analyzovat vliv různých xenobiotik na aktivitu androgenního receptoru. Jednou z těchto látek je i bisfenol S, známý endokrinní disruptor narušující signalizaci estrogenního receptoru, který je široce používán v průmyslu. Další z vybraných látek je berberin (přírodní látka vyskytující se v jídle a sloužící jako prekurzor ve farmaceutickém průmyslu), látka mykofenolát mofetil (široce používané imunosupresivum) a grafen oxid (jeden z derivátů grafenu, který je stále častěji využíván v průmyslu). Specifické cíle práce jsou:

A) Zjistit vliv těchto látek na transkripční aktivitu androgenního receptoru.

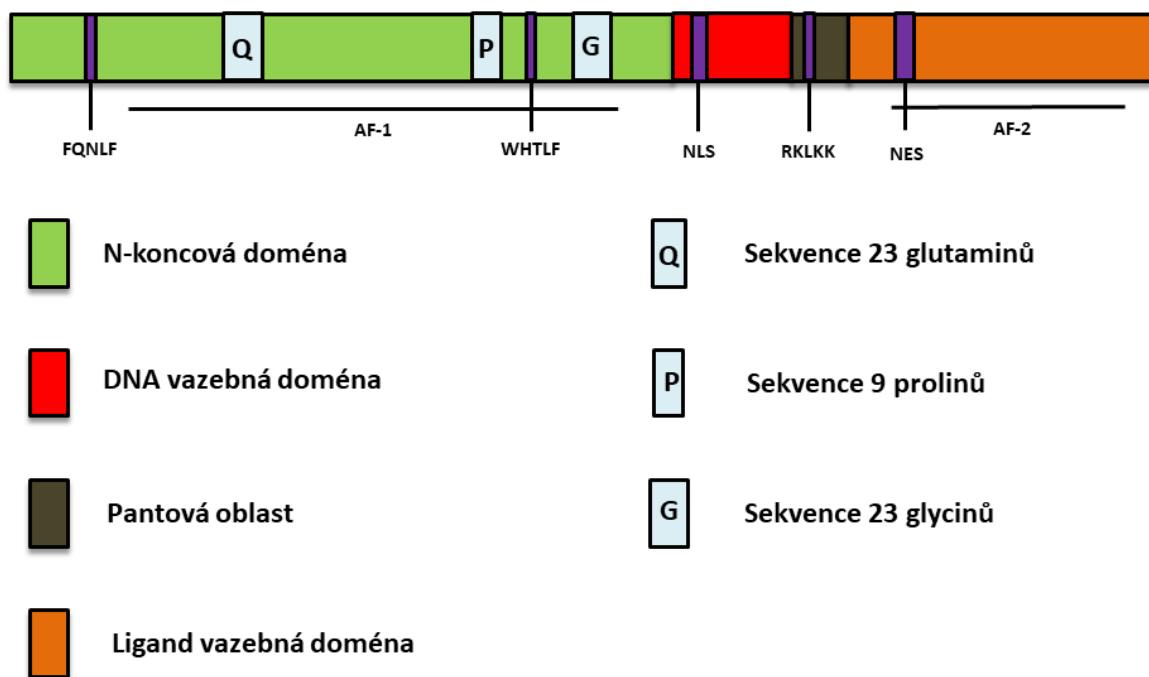
B) Pokusit se objasnit mechanismus jejich působení na androgenní receptor v případě, že bude nalezen jejich efekt na receptor.

3 Androgenní receptor

3.1 Struktura androgenního receptoru

Androgenní receptor (AR, NR3C4) je ligandem aktivovaný transkripční faktor a patří mezi členy rodiny receptorů pro steroidní hormony, do podrodiny 3C společně s glukokortikoidní (GR), mineralokortikoidní (MR) a progesteronovým receptorem (PR) [5]. Vyskytuje se v širokém spektru tkání jako např.: srdce [6], mozek [7], gastrointestinální trakt [8], kůže [9], kosterní svalstvo [10], kostní buňky [11], placenta [12], genitourinární trakt [13] a dokonce i v tukové tkáni [14] a slzném aparátu [15]. Při správném fungování napomáhá AR mužské sexuální diferenciaci a produkci spermií a je také významným faktorem v nervovém systému [7, 16], podporuje růst svalů i hustotu kostí [17, 18], je důležitý pro fungování neutrofilů a imunitního systému [19, 20] a také kardiovaskulárního systému [20].

Lidský gen pro AR je lokalizován na chromozomu X (q11-12) a zaujímá přibližně 180kb, přičemž obsahuje 8 exonů, 7 intronů a 5 skrytých exonů (CE-cryptic exons, uplatňují se u alternativních variant AR), které po translaci a transkripci umožní vznik 110 kDa (920 aminokyselin) proteinu [21-23]. Počet aminokyselin může v literatuře oscilovat, jelikož celkový protein obsahuje glutaminové a glycinové repeticce kódované v exonu 1. Od roku 2012 (předtím měla referenční sekvence 919 aminokyselin) je jako referenční sekvence v NCBI uváděna NM_000044.2, která obsahuje 23 glutaminů i glycinů a celkově má 920 aminokyselin [24, 25]. Výsledný protein, pokud se jedná o jeho plně funkční variantu a ne verzi upravenou alternativním sestřihem, má 4 základní funkční oblasti a to NTD (N-koncová doména), DBD (DNA-vazebná doména), pantovou oblast a LBD (ligand-vazebná doména) [22] viz obrázek č. 1.



Obrázek č. 1: Struktura androgenního receptoru. Sestavená podle informací z informací publikací v kapitole „3.1 Struktura androgenního receptoru“. Nejdůležitější domény a části receptoru jsou vyznačeny. Zobrazena je plná verze AR (AR-FL) s 920 AMK. Obrázek č. 1 sestaven na základě informací z kapitoly „3.1 Struktura androgenního receptoru“.

N-koncová doména (aminokyseliny 1-538) je tvořena exonem 1 a je nezbytná pro transaktivaci AR, což prokázaly pokusy na mutantních receptorech [26]. Ve své části obsahuje tři repetitivní místa, z nichž nejvýznamnější je polyglutaminová část začínající na kodonu 58 (glutamin je tu kódován tripletem CAG). V případě, že je tato oblast výrazněji zkrácena (průměrně obsahuje 23 glutaminů), dochází ke zvyšování transkripční aktivity receptoru a také je zvýšené riziko rakoviny prostaty [25, 27]. Úplná delece této oblasti vede až ke čtyřnásobnému zvýšení aktivity mutantního AR v porovnání s normálním receptorem [28]. Naopak prodlužování repetice (na 40 až 62 opakování) způsobuje, kromě snížené transkripční aktivity, Kennedyho nemoc (degenerativní onemocnění postihující převážně spinální a bulbární periferní motoneurony což vede ke svalové atrofii) [27]. Další repetitivní sekvencí v AR genu je GGC kodon, který kóduje glycin a stejně jako v předešlém případě, pokud je sekvence příliš krátká (průměrně 23 glycinů) dochází ke zvýšení rizika rakoviny prostaty i samotného množství AR, ale nikoliv k jeho větší transaktivaci [29]. Mezi glutaminovými a glycinovými oblastmi leží, na pozicích 373-380, poslední repetitivní oblast androgenního

receptoru a to sekvence devíti prolinů u kterých však nebyly zaznamenány variace v délce [25, 30].

Dále se tu nachází oblast označovaná jako aktivační funkce 1 (AF-1), složená ze dvou podjednotek a to na ligandu závislé TAU-1 (transkripční aktivační jednotka, aminokyseliny 101-360) a na ligandu nezávislé TAU-5 (aminokyseliny 360-528), které jsou nezbytné pro aktivitu AR [21]. Samotná AF-1 funguje jako konstantní aktivátor AR bez přítomnosti ligandu a je zodpovědná za většinu jeho aktivity. Ale pouze po interakci s částí označovanou jako aktivační funkce 2 (AF-2), nacházející se v LBD, je umožněna plná transaktivace receptoru [21, 31]. Kousek před TAU-1 podjednotkou se nachází motiv FQNLF (AMK 23-27), který pomáhá zprostředkovávat interakci s AF-2 a společně s motivem WHTLF (AMK 433-437, náležející pod TAU-5) interagují s LBD a pomáhají stabilizovat komplex receptoru s navázaným ligandem a zpomalují jeho disociaci [32]. Tato vazba mezi NTD a LBD se označuje jako N/C interakce a je nezbytná pro regulaci některých androgeny regulovaných genů, nikoliv však všech [32, 33].

Na konec NTD navazuje DNA vazebná doména (aminokyseliny 539 – 625) tvořená exony 2 a 3, vykazující silnou homologii s DBD ostatních receptorů pro steroidní hormony a zprostředkovávající vazbu AR do DNA. Stejně jako ostatní receptory pro steroidní hormony i AR nasedá jako homodimer (AR/AR) do specifické oblasti na DNA označované jako androgen responzivní element (ARE), což jsou dvě hexamerické sekvence (5'-AGAACA-3') oddělené od sebe třemi bázemi a uspořádané jako převrácené repetice (IR3, nazývaný jako klasický ARE) nebo přímé repetice (DR3, nazývaná jako selektivní ARE) [34, 35]. Právě za vazbu do této sekvence je zodpovědná struktura označovaná jako zinkové prsty, což jsou dva útvary (N-koncový a C-koncový) vázající v sobě zinkový iont přes čtyři cysteiny. N-koncový zinkový prst interaguje přímo s ARE v DNA a za správné rozpoznání responzivního elementu je zodpovědný P box (nasedá do velké drážky), což je oblast pěti aminokyselin (GSCKV), které jsou identické i u PR, GR a MR [36, 37]. V druhém zinkovém prstu se nachází tzv. D-box, který pomáhá zprostředkovat dimerizaci s druhým receptorem (sekvence ARSND) a udržet jejich vazbu po nasednutí do DNA [37].

Za DBD se nachází krátká pantová oblast (aminokyseliny 626 – 667, tvořená částí exonu 4), která slouží ke konformačním změnám AR a je v ní umístěn jaderný lokalizační signál (NLS, sekvence RKLKK) nacházející se mezi aminokyselinami 629 až 633 včetně. Tato sekvence je rozpoznána proteinem importinem- α , který funguje jako receptor rozpoznávající NLS sekvenci, na kterou se váže a napomáhá pak transportu proteinu do jádra.

Mutace uvnitř této sekvence jsou spojeny s rakovinou, sníženým transportem AR do jádra, špatnou vazbou koaktivátorů a rozdílnou transkripční aktivitou mutantních receptorů [38, 39].

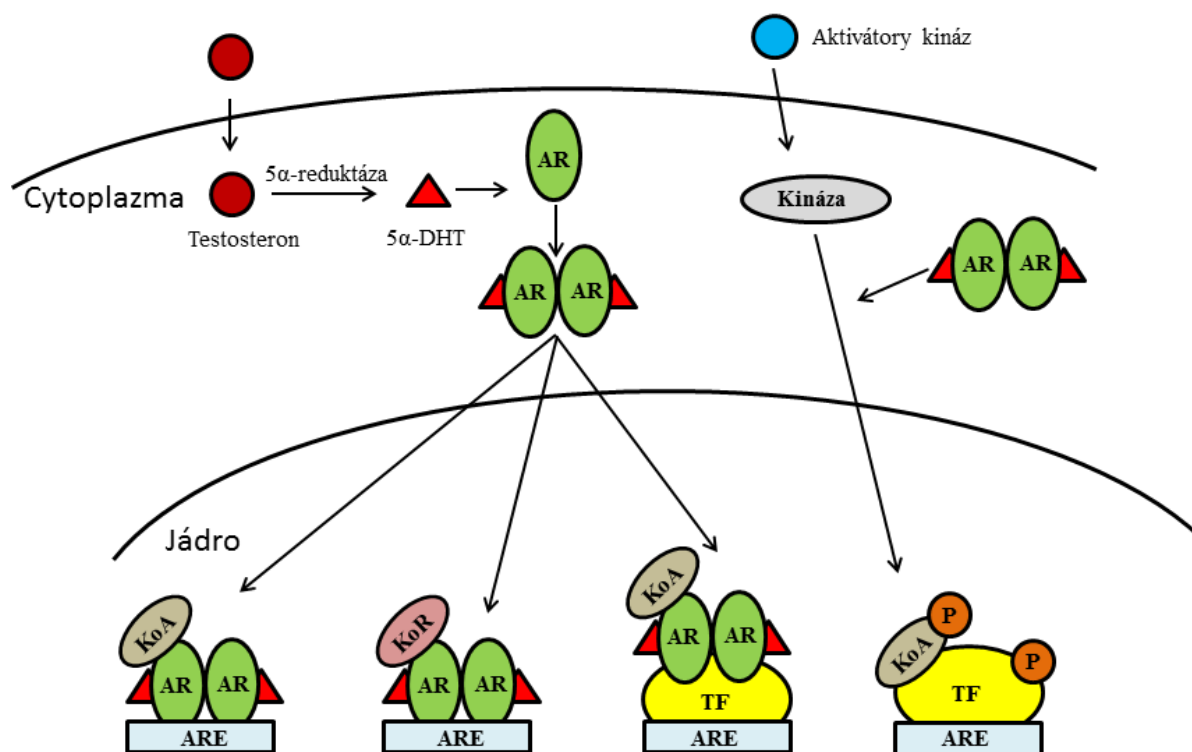
Poslední oblastí v AR je ligand vazebná doména (aminokyseliny 668 až 920, tvořená zbytkem exonu 4 a exony 5-8) do které se vážou jak endogenní tak exogenní ligandy AR a byla dobře charakterizována pomocí krystalografie v roce 2000. Díky tomu víme, že třídimenzionální struktura LBD AR se skládá z jedenácti alfa šroubovic a dvou antiparalelních beta-skládaných listů (viz databáze PDB (<http://www.rcsb.org/>): 1E3G pro AR LBD v komplexu s metribolonem, 1I37 pro dihydrotestosteron a 2AMA pro ligand testosteron) [40-42] a po vazbě ligandu dochází ke konformačním změnám v LBD, kdy vysoce flexibilní alfa šroubovice 12 je stabilizována v poloze překrývající ligand vazebnou kapsu. Tato konformační změna způsobí vytvoření hydrofobní drážky (pomocí šroubovic 3, 4, 5 a 12), která následně interaguje s motivem LXXLL (L-leucin, X-náhodná aminokyselina) přítomných u některých koaktivátorů (RIP-140, SRC-1 nebo CBP) a napomáhá zahájení transaktivace AR [43, 44]. Oblast, která reaguje s AF-1 v NTD se nazývá aktivační funkce 2 (AF-2). Ta po navázání ligandu a výše popsaných konformačních změnách interaguje s motivem FQNLF s stabilizuje tak celý komplex [45]. Poslední důležitou částí ve struktuře androgenního receptoru je jaderný exportní signál (NES) na pozicích 742-817, který je potlačen v přítomnosti ligandu a po disociaci ligandu se stává aktivním a směřuje AR zpět do cytoplazmy. Nicméně přesný mechanismus není doposud znám, ale bylo prokázáno že se jedná o dráhu nezávislou na CRM1 (Chromosome region maintenance 1 což je hlavní receptor pro exportování proteinů pryč z jádra a který se váže do NES) [46].

3.2 Modulace aktivity androgenního receptoru

3.2.1 Signální dráha androgenního receptoru

Androgenní receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor a v případě nepřítomnosti ligandů se nachází převážně v cytoplazmě, zůstává neaktivní a je vázán v heterokomplexu obsahující proteiny teplotního šoku (HSP90, HSP70, HSP56 a HSP27), chaperony a proteiny s tetratrikopeptidovou doménou (TPR; obsahuje ji například protein SGTA – malý na glutamin bohatý TRP α). Zvláště důležitý pro aktivaci receptoru je HSP27, který po navázání ligandu na AR podstupuje fosforylaci na pozici S78 a S82 zprostředkovanou kinázou p38. V důsledku této fosforylace dochází k disociaci HSP90 a celkové translokaci AR do jádra. V případě inhibice fosforylace nebo při použití OGX-427 (inhibitor HSP27) dochází ke zvýšené degradaci AR pomocí proteazomu, snížené transkripční aktivitě a zvýšené apoptóze v případě rakovinné linie LNCaP [47-49].

Po navázání ligandu a disociaci nepotřebných proteinů se AR spojuje s dalším AR do homodimeru a podstupuje translokaci do jádra a dochází k jedné ze čtyř možností (zobrazeno na obrázku č. 2). Buď se homodimer váže na sekvenci ARE, přičemž dochází k vazbě dalších koaktivátorů jako třeba SRC, Vav3, E2FI, Tip60, ATAD2 nebo JunD [50]. Následně dochází k remodelaci chromatinu jeho rozvolněním a tím i možnosti vazby obecných transkripčních faktorů (TFIIA, TFIIB,...) a Pol II čímž je umožněna transkripce cílových genů [22]. Další akcí po navázání ligandu na AR může být také vazba korepresorů, které znemožní vazbu AR na DNA ovlivněním přímo DBD (kalretikulín, ARRI9, DJBP, HBOI), případně mohou zablokovat jiné části AR (ARA67/PATI, DAX-1, PAK6, SMRT, HDAC1, TGIF) a tím snížit expresi cílových genů AR. Také existuje mnoho korepresorů, které sice neinteragují přímo s AR, ale přerušují jeho interakci s koaktivátory (SHP, Akt, Cyklin DI, Smad3/Smad4) a tím vedou ke snížení transkripční aktivitě receptoru [51]. Celkově bylo identifikováno přibližně 170 proteinů fungujících jako koregulátory AR [52]. Třetí možností je, že receptor se sice přímo neváže do ARE, ale interaguje s dalšími transkripčními faktory a moduluje jejich aktivitu [22]. Existuje ovšem ještě možnost mimojaderné dráhy. AR po vazbě ligandu nevstupuje do jádra, ale interaguje s kinázami (Akt, SRC), což vede ke spuštění signalizační kaskády a ovlivnění jiných transkripčních faktorů, bez jakékoliv vazby receptoru do DNA [22, 53].



Obrázek č. 2: Mechanizmy akce AR. AR je přítomen v cytoplasmě ve vazbě s proteiny (HSP, chaperony,...) které zabráňují jeho degradaci. Po vazbě 5 α -dihydrotestosteronu (přeměněného 5 α -reduktázou z testosteronu) nebo jiného ligandu dochází k jeho disociaci z komplexu proteinů a translokaci do jádra, kde reguluje cílové geny mnoha způsoby. 1 - AR se váže do ARE a interaguje s koaktivátory (KoA), poté je umožněna interakce se základními transkripčními faktory a RNA Pol II začíná transkripci, čímž AR působí jako pozitivní regulátor na transkripci genu. 2 - AR se váže do ARE a interaguje s korepresory (KoR) a tím inhibuje transkripci cílových genů. 3 - AR se váže na ostatní transkripční faktory (TF), interaguje s dalšími KoA a umožňuje tak transkripci genů. 4 - AR interaguje s kinázami, čímž spouští celou kinázovou kaskádu vedoucí k fosforylaci dalších transkripčních faktorů a ovlivnění genů. Obrázek č. 2 sestaven na základě informací z kapitoly 3.2.1 „Signální dráha androgenního receptoru“ a práce Shafi A. *et al.* [22].

Nejnámějším ligandem AR je 5 α -dihydrotestosteron (DHT), který vzniká vnitrobuněčnou konverzí z testosteronu 5 α -reduktázou (kódovanou genem SRD5A, typ 1 a 2) v cílových orgánech jako je prostata, kůže nebo játra. Sice samotný testosteron je také agonistou AR, ale s daleko menší potencí než DHT a je důležitý hlavně pro svoji cirkulaci v těle, aby byl přítomen v cílových buňkách, kde dochází k jeho přeměně na DHT. Tohoto se využívá v případě benigní hypertrofie prostaty (BPH), která se léčí podáváním inhibitorů 5 α -reduktázy. Cirkulující testosteron sice vstupuje do buňky, ale většina enzymu je blokována a jeho přeměna na DHT je snížena a AR je aktivován pouze slabě, čímž dochází ke snížení velikosti a funkce prostaty [54, 55]. Kromě testosteronu a DHT se může na AR vázat množství dalších syntetických ligandů, z nichž některé se využívají v terapii jako třeba

bikalutamid (nejvíce efektů je zprostředkováno jeho R-enantiomerem). Jedná se o nesteroidní antiandrogen s dlouhým poločasem eliminace v těle (přibližně jeden týden) z něhož je po podání většina (>95%) vázaná na proteiny v plazmě. Mechanismus účinku jeho funkce je vazba na AR, kde působí jako antagonist a zabraňuje tak akcím zprostředkovaných DHT čehož se využívá při léčbě rakoviny prostaty [56]. Další antagonisté AR se využívají při léčbě metastatické CRPC, jako třeba MDV3100 (enzalutamid) [57] nebo ARN-509 (apalutamid) [58]. Kromě antagonistů se využívá i syntetických agonistů androgenního receptoru. Jedním z nich je i S42, který se ve svalech chová jako agonista, ale v prostatě, hypofýze a játrech jako jeho antagonist, takže s ním lze tkáňově specificky modulovat efekty AR [59].

Jak již bylo zmíněno, androgenní receptor může modulovat genovou expresi celkem čtyřmi způsoby a tím ovlivnit velmi široké spektrum nejrůznějších genů. Pravděpodobně nejznámější gen regulovaný právě pomocí AR v závislosti na množství androgenů je prostatický specifický antigen (PSA nebo také kallikrein-3), což je serinová proteáza, jejíž gen se nachází na chromozomu 19 (19q13.4) společně s dalšími 14ti členy kallikreinové rodiny [60]. Je produkována sekrečními epiteliálními buňkami jako neaktivní 244 aminokyselinový proenzym (proPSA). Po odštěpení sedmi aminokyselin z N-terminálního konce je enzym plně aktivní a je okamžitě cílem inhibitorů proteáz (převážně α 1-antichymotrypsinu) a vylučuje se přímo do lumenu prostaty, kde část podstupuje proteolýzu a cirkuluje v séru jako volný PSA. V případě rakoviny prostaty dochází k narušení bazální vrstvy buněk i procesu inaktivace enzymu a jeho uvolnění do séra, kde může být detekováno její zvýšené množství. Právě z toho důvodu je detekce hladiny PSA užíváno jako biomarkeru rakoviny prostaty [61].

Dalším známým genem regulovaným AR je FKBP5, který kóduje imunofilin. Jedná se o malý protein (51 kDa), který reguluje distribuci receptorů pro steroidní hormony mezi cytosolem a jádrem [62]. Stejně jako v případě PSA je FKBP5 pozitivně regulován množstvím androgenů v případě kultur rakoviny prostaty, ale ve své proximální části promotoru postrádá místo pro vazbu AR. To se nachází až 65 kb od začátku transkripčního místa v pátém intronu, se kterým androgenní receptor interaguje pomocí cAMP responzivní element vázajícího proteinu (CBP) proteinu a dochází k rozvolnění chromatinu následovaného zvýšenou transkripcí genu. Právě díky tomuto rozdílnému mechanismu regulace a časté expresi FKBP5 mimo prostatickou tkáň se jedná o zajímavý cíl výzkumu mechanismu aktivace AR [63].

Samotný androgenní receptor reguluje množství genů ale sám je také cílem mnoha transkripčních faktorů. Nejznámější z nich je Sp1, který je hlavním faktorem v regulaci

expresi AR genu a může se vázat buď na sekvenci 5' GGGCGG 3' lokalizovanou -45 až -40 bp [64] nebo do oblasti přibližně 90 bp rozléhající se v promotoru AR na pozicích -150 až -60, kde je několik možností pro jeho vazbu [65]. Po vazbě do těchto dvou nejčastějších míst, případně dalších příležitostnějších dochází buď k interakci se základními transkripčními faktory (TFIID) anebo vazbě Brg1 (enzym modifikující chromatin) a argininové metyltransferázy (PRMT5), což způsobuje epigenetické modifikace mající pozitivní vliv na expresi AR a růst rakoviny prostaty [66]. Zajímavá je i jistá zpětnovazebná regulace, protože zvýšené množství receptoru může interagovat s Sp1 a inhibovat tak jeho transaktivaci znemožněním vazby do GC boxů [67]. K dalším transkripčním faktorům pozitivně regulujícím AR patří třeba Zeb1 [68], Twist1 [69] nebo SREBP1 [70] a k negativně regulujícím p53 [71], Pur α [69] a také samotný AR, který může regulovat sám sebe jak pozitivně tak negativně [72].

Pro většinu jaderných receptorů je důležitým regulačním faktorem proteazom a s ním spojená jejich degradace. Nicméně, AR není na rozdíl od jiných jaderných receptorů, jako je třeba ER, negativně regulován svými ligandy (ER po navázání ligandu vstupuje do jádra a ovlivňuje genovou expresi, poté je transportován do cytoplazmy a degradován proteazomem) [73]. V jeho případě dochází v přítomnosti androgenů dokonce ke zvyšování množství receptoru [74]. Experimenty s fluorescenčně značeným AR (pomocí GFP- zeleného fluorescenčního proteinu) prokázaly, že po navázání ligandu vstupuje AR do jádra (během 15 – 60 minut) a ovlivňuje expresi cílových genů. Po disociaci ligandu je transportován zpátky do cytoplazmy, kde může znovu dojít k navázání ligandu a následně jeho dalšího působení v jádře, přičemž tento cyklus může vykonat až čtyřikrát [75]. Detailní mechanismus této akce nebyl doposud objasněn, ale data jasně ukazují zapojení mnoha faktorů a rozličných podmínek, které utváří výsledný osud dalšího působení AR.

3.2.2 Posttranslační modifikace

Stejně jako ostatní jaderné receptory i androgenní receptor je cílem mnoha posttranslačních modifikací, které moduluji jeho aktivitu. Cílem této kapitoly není detailně popsat všechny desítky modifikací, které AR podstupuje, ale zaměřit se jen na nejdůležitější. Pro detailnější informace o posttranslačních modifikacích AR doporučují práci od van der Steena [76] nebo Koryakina [77].

3.2.2.1 Fosforylace

Jedna z nejvýznamnějších fosforylací na AR je serin v pozici 81 (S81p), která je zprostředkována pomocí několika cyklín dependentních kináz (CDK) a nejčastěji se tak děje v reakci na androgeny v prostředí, kde zvýšené množství S81p bylo zjištěno i po 8 hodinách od přidání syntetického agonisty (R1881; metribolon) AR, což vedlo ke zvýšenému množství AR a jeho transkripční aktivitě [78]. Další z vlivů spojených s S81p je zvýšená proliferace buněk. Buněčné linie LHS a LAPC4 s mutantním AR (S81A) vykazovali menší proliferaci oproti nemutovaným buňkám [79] a stejného výsledku bylo dosaženo i u linie CWR22Rv1 [80]. Samotnou fosforylací pak zajišťují CDK a to konkrétně CDK1 [81] CDK5 [80] a CDK9, u které je dokázáno, že AR fosforyluje specificky pouze na pozici 81 [79].

Tato fosforylace ovšem není nezbytná pro transkripční aktivitu receptoru, jak dokázaly pokusy na mutantním AR, který měl na pozici 81 alanin místo serinu, takže se zdá, že samotná fosforylace stabilizuje receptor jinými mechanismy, než působením pouze na pozici 81 [81]. Navíc, pokusy s inhibitory CDK na rakovinných liniích (po přidání inhibitoru došlo ke snížení exprese AR a tento efekt byl zvrácen inhibitory proteazomu) a klinickými vzorky od pacientů naznačují, že zvýšená exprese a stabilita AR je jedna z odpovědí na nízkou dávku androgenů v prostředí vedoucí k „na kastraci rezistentní rakovině prostaty“ (CRPC, označuje se tak rakovina prostaty, která pokračuje v růstu i po snížení koncentrace testosteronu v těle) [81, 82]. Reaktivace CRPC je tedy nejspíše spojená s fosforylací S81 i když přesné mechanismy nejsou úplně objasněné a je pravděpodobné, že potencionální inhibitory CDK (jako třeba NU2058) mohou mít terapeutický potenciál [81, 82]. Stejně tak nápomocná může být fosforylace S51, kterou lze využít jako biomarker AR aktivity a CRPC [83].

Defosforylace S81p vede ke snížené translokaci AR, potlačené transkripční aktivitě a je způsobena proteinovou fosfatázou 2A (PP2A), která kromě serinu 81 defosforyluje mnoho dalších míst na AR [84]. Nedávný výzkum odhalil, že DAB2IP (tumorový supresor s GTPázovou aktivitou) může inhibovat buněčný růst zprostředkovaný AR a jeho aktivaci transkripce jeho cílových genů v rakovině prostaty (a to i účinky sestřihových variant AR, které ukazují konstantní aktivaci). Jedním z mechanismů účinků DAB2IP je právě působení na AR přes PP2A, což z obou proteinů dělá další cíle pro terapeutický výzkum [85].

Další důležitá fosforylace AR se nachází na pozici 213 (S213p) a jednou z kináz, které způsobují tuto modifikaci, je Akt. Po aktivaci Akt pomocí PI3K došlo k významnému zvýšení S213p a po použití LY294002, což je inhibitor PI3K, došlo k potlačení S213p [86]. Stejného efektu bylo dosaženo i za použití isosilybinu B (účinkuje na AR svým působením na

Akt, PI3K a Mdm2), který kromě snížené fosforylace způsobil i pokles transkripční aktivity receptoru, inhiboval buněčný růst a translokaci do jádra způsobenou androgenem R1881. Další z účinků bylo snížení poločasu života AR přibližně o polovinu (z 13,8h na 6,8h), což ukazuje na důležitost S213p pro proteinovou stabilitu (tento efekt byl zvrácen inhibitorem proteazomu MG132) [87]. Druhou prokázanou kinázou fosforylující AR v tomto místě je PIM-1 [88]. PIM-1 má dvě izoformy (L – 44 kDa a S – 33 kDa) z nichž každá fosforyluje AR v pozici 213, ale s rozdílnými efekty naznačujícími zapojením kináz ještě v jiném místě a s jinými proteiny. Obě kinázy fosforylují AR na pozici S213, ale PIM-1S zároveň interaguje s Mdm2, který napomáhá degradaci AR (v závislosti na buněčném cyklu). Namísto toho, PIM-1L kromě fosforylace na pozici 213, fosforyluje AR i v pozici T850, což vede k interakci s RNF6 E3 ubiquitin ligázou a ke zvýšené transkripci cílových genů AR v prostředí s nízkým výskytem androgenů. Nicméně, obě PIM-1 izoformy dokáží zvýšit růst rakoviny prostaty v prostředí, kde je nedostatek androgenů [89]. Fosforylace S213p tedy může vést k navzájem opačným efektům podle toho, jakou kinázou (Akt, PIM-1) a za jakých podmínek (jaká část buněčného cyklu a množství androgenů v prostředí) je AR fosforylován.

Ack1 je kináza zajišťující fosforylaci dvou tyrosinů v AR (Y267p a Y363p) a stejně jako v předešlých případech i tahle kináza se významně podílí na růstu rakoviny v prostředí s nízkým výskytem androgenů. V buněčné linii LNCaP byla exprimována konstantně aktivní Ack1 a v případě absence ligandů AR docházelo ke zvýšené vazbě receptoru do promotorové oblasti pro prostatický specifický antigen (PSA) a stejného efektu bylo dosaženo i při použití nízkých dávek androgenů, které předtím nevyvolaly žádný efekt v linii kde Ack1 nebyla konstantně aktivní. Tyto data naznačují, že Ack1 zvyšuje citlivost rakoviny prostaty na androgeny a pomáhá překonat jejich nízké dávky v prostředí a je tak jedním z mechanismů, které usnadňují progresi rakoviny z androgen závislé formy na androgen nezávislý fenotyp [90]. Při použití anti-androgenů, když byla Ack1 konstantně aktivní, nedošlo k ovlivnění transkripční aktivity AR (což podporuje předchozí teorie že Y267p a Y363p nejsou závislé na LBD) a případná terapie by teda měla cílit na samotný Ack1, jelikož v mutantech neschopných fosforylace na pozici 267 a 363 (Y267F a Y363F) nedocházelo k vazbě AR do genu pro PSA. Při použití inhibitoru AIM100 (selektivní inhibitor Ack1) došlo ke snížené proliferaci buněk a oproti kontrolnímu vzorku bylo více buněk v G0/G1 fázi než v S fázi, přičemž epidermální růstový faktor (EGF, fosforylace AR nastává pomocí aktivace Ack1 po reakci na EGF) nedokázal zvrátit účinek inhibitoru [90, 91].

3.2.2.2 Acetylace

K dnešnímu datu byly objeveny pouze čtyři acetylační místa (K618, K630, K632 a K633) na AR a tři poslední se nacházejí v pantové oblasti. Lysin na pozici 618 je modifikován onkoproteinem ARD1, který podporuje tumorigenezi prostaty. Mechanismus působení ARD1 je pomocí tvorby komplexu HSP90/AR/ARD1, následné disociaci AR od HSP90 v cytoplazmě a jeho acetylaci. Receptor s mutací defektní na možnost acetylace (K618R) není schopný disociace z komplexu AR/HSP90, což vedlo ke snížení transkripční aktivity receptoru, růstu buněk a poklesu translokace AR do jádra, zatímco mutace mimikující acetylaci (K618Q) tyto efekty zvýšila [92].

Za modifikaci K630, K632 a K633 odpovídá protein p300 a p/CAF jak prokázaly experimenty se značeným acetátem [93]. Po přidání dihydrotestosteronu (DHT) k buňkám došlo ke zvýšené acetylaci AR a při nadměrné expresi p300 byla jeho transkripční aktivita zvýšená dokonce 9x oproti kontrole, ale po přidání DHT k nadměrně exprimujícím buňkám došlo k poklesu transkripční aktivity přibližně o polovinu [94]. Další možností pro modifikaci těchto míst je Tip60 (histonová acetyltransferáza), která přímo acetyluje AR a při její nadměrné expresi dochází ke zvýšenému výskytu AR v jádře, a to dokonce bez vystavení buněk androgenům. Stejný efekt měla záměna těchto aminokyselin za glutamin, který mimikoval acetylaci. Opačný efekt nastal po snížení exprese Tip60 nebo záměně aminokyselin za arginin, a to i při vystavení buněk androgenům [95, 96]. Je tedy možné, že Tip60 bude hrát důležitou roli při vývoji budoucích léčiv rakoviny prostaty zvláště, když bylo prokázáno, že je nadměrně exprimován v CRPC [97].

3.2.2.3 Metylace

Metylační místa AR se překrývají s acetylačními, jelikož jsou na pozicích K630 a K632 (tedy v sekvenci NLS). V případě mutace pozice 630 na neschopnost metylace (a ani acetylace) nedošlo ke změně transkripční aktivity AR, což prokazuje, že její modifikace není nezbytná, ale v případě snížené exprese Set9 (metyltransferáza zodpovědná za metylaci AR na obou pozicích) došlo k inhibici vazby AR do promotorové oblasti PSA a při její nadměrné expresi došlo k opačnému efektu. Navíc, Set9 podporuje proliferaci a zabraňuje apoptóze v buňkách rakoviny prostaty, a to vše právě přes metylaci lyzinu na pozici 632 [98, 99]. Za demetylaci AR je zodpovědná KDM4B, ale při zablokování její exprese v linii LNCaP došlo ke snížení exprese cílového genu AR (PSA) o 38 % a ke snížení hladiny mRNA došlo i u

dalších cílových genů AR. Je to důsledkem zvýšené degradace receptoru, jelikož KDM4B neplní jen funkci demetylázy, ale zároveň chrání AR před ubiquitinací a jeho směřováním do proteazomu [100]. Tato a další zjištění naznačují, že neaktivovaný AR v cytoplasmě je metylovaný a chráněn proti ubiquitinaci, přičemž po stimulaci androgenem podstupuje demetylaci, následnou acetylaci a translokaci do jádra [76].

3.2.2.4 Ubiquitinace

V případě AR jsou nejdéle známy dvě ubiquitinační místa, která se nachází v LBD na pozicích K845 a K847 a jsou cílem E3 ligázy RNF6 [101]. Monoubiquitinace pomocí RNF6 vede ke zvýšené transkripční aktivitě AR a v případě snížení této ligázy pomocí transfekce siRNA, dochází k signifikantně významnému snížení transkripční aktivity AR. Opačný efekt byl sledován u dalších tří E3 ligáz, která cílí na stejná místa v AR a to MDM3, Skp2 a CHIP, ale na rozdíl od RNF6 tyto ligázy způsobují polyubiquitinaci receptoru a směřují ho tak k degradaci [101-104]. V nedávné době (2017) bylo objeveno třetí ubiquitinační místo AR, které leží mimo LBD, a to v NTD, kde na pozici K311 dochází k ubiquitinaci zatím neznámou E3 ligázou. Tato modulace je kritická pro transkripční aktivitu receptoru a pokud AR neobsahuje LBD nemůže být v této pozici ubiquitinován, což ukazuje na možnou úlohu C-konce receptoru v rozpoznání substrátu pro ligázy. Je tedy velmi pravděpodobné, že existuje další ubiquitinační místo na AR nebo nějaká specifická cesta pro degradaci zkrácených variant [105].

3.2.2.5 Sumoylace

Poslední posttranslační modifikací, která byla u AR prokázána, je sumoylace (přidání malého proteinu na lysin) a jsou za ni zodpovědné dvě E3 ligázy, PIAS1 a PIASxalpha [106]. V AR jsou známy pouze dvě sumoylační místa, a to K386 a K520, z nichž jako důležitější se zdá K386. Mutace v tomto místě (ať už v kombinaci s druhou pozicí nebo ne) vede k téměř trojnásobnému zvýšení transkripce v promotorech obsahující ARE po ošetření buněk androgeny [107]. Opačný efekt nastal v případě buněčné linie VCaP a pomocí nadměrné exprese SUMO 2 (v předchozím případě se jednalo o blokaci SUMO 1 proteinu) bylo dosaženo sedminásobné exprese mRNA pro PSA v porovnání se SUMO 1. Tyto data jasně ukazují, že záleží na druhu SUMO, kterým je AR modifikován a na typu buněk [108]

3.2.3 Alternativní sestřih androgenního receptoru

V kapitole 3.1 byla velmi detailně popsána struktura plné verze androgenního receptoru o celkové délce 920 aminokyselin. Ovšem AR podstupuje alternativní sestřih (jako mnoho dalších proteinů) a existuje více než dvacet zkrácených verzí AR, které byly nalezeny ve vzorcích rakoviny prostaty (PC) u různých pacientů [109, 110]. V této kapitole se podíváme na dvě vybrané varianty, které jsou zajímavé z hlediska své funkce a medicínské terapie a jejich struktura je znázorněna na obrázku č. 3.

3.2.3.1 AR-v7

Nejznámější a nejvíce studovanou variantou AR je zkrácená verze označována jako AR-v7 (někdy také jako AR3) a v porovnání s plnou verzí receptoru dochází k transkripci exonu CE3 lokalizovaného v intronu 3. Výsledný protein má, stejně jako plná verze receptoru, N-koncovou doménu a DBD, ale pantová oblast společně s LBD chybí a jsou nahrazeny krátkou 16ti aminokyselinovou sekvencí (EKFRVGNCKHLKMTRP) tvořenou právě CE3 [109]. Této krátké sekvence se využívá při tvorbě specifických protilátek proti AR-v7 a tato varianta tak slouží jako jeden z markerů pro diagnostiku rakoviny prostaty a její nadměrná exprese je spojována s negativní prognózou pro pacienty [111].

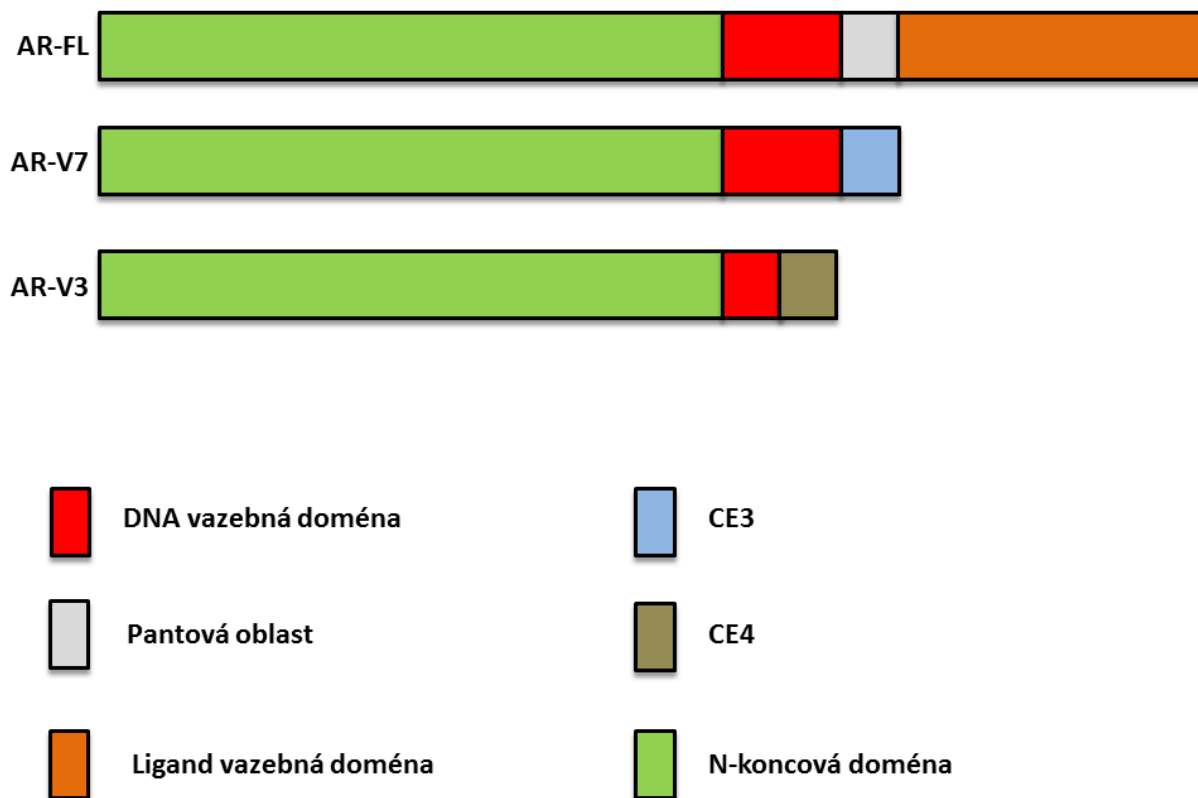
Navzdory tomu, že výslednému proteinu chybí LBD a není možné jej aktivovat pomocí androgenů, zůstává tento receptor konstitutivně aktivní a reguluje expresi mnoha genů. Mnoho z nich se ale nedokáže vrátit zpátky na jejich úroveň exprese jako v případě AR-FL v přítomnosti androgenů [112]. Nicméně, AR-v7 indukuje transkripci genů zahrnutých v buněčném cyklu a pozitivně tak modulovat růst PC v případě nedostatku ligandů AR [113]. Výzkumy totiž naznačují, že alternativní varianty AR (v případě konstitutivně aktivních sestřihů receptoru) jsou většinou odezva PC na snížení androgenů v prostředí, což je jeden ze způsobů léčby rakoviny prostaty. V případě na androgenech závislé PC, můžeme vidět dvojitý efekt. Pokud je v prostředí moc málo nebo naopak hodně androgenů je růst buněk potlačen (ideální je střední koncentrace androgenů, ale koncentrace se liší podle množství receptoru) a dochází tak k expresi genů regulovaných AR-v7 (UBE2C, PLK1, BIRC5, CDC25B, CDC25C,...) a to tím více, čím větší je potlačení AR-FL [113, 114].

Samotný mechanismus akce receptoru nebyl ještě úplně objasněn. Klasická verze AR se váže do DNA ve formě homodimeru (AR-FL/AR-FL), ale u AR-v7 to tak zřejmé není.

V případě metastází CRPC byly oba receptory ve spoustě vzorků nalezeny společně i když AR-v7 byl exprimovaný v daleko menší míře [115] a je tedy možný jeden ze tří způsobů jeho aktivace, kdy se AR-v7 váže ve formě heterodimeru AR-FL/AR-v7 do DNA. V případě snížené exprese normální varianty receptoru (třeba v důsledku léčby, nepřítomnosti AR-FL nebo při použití specifických inhibitorů) dochází k homodimerizaci AR-v7/AR-v7 a vazbě do DNA nebo i vazbě ve formě monomeru, ale přesné mechanismy a ani podmínky vzniku jednotlivých typů vazeb nebyli zatím spolehlivě objasněny [116]. Je tedy zřejmé, že k plnému pochopení funkce a celé signalizace AR-v7 vede ještě dlouhá cesta, ale současný výzkum neustále prokazuje význam AR-v7 v případě PC jako terapeutického cíle, což dokazují i pokusy s niclosamidem. Tento lék byl původně používán jako anthelmintikum, ale byla objevena jeho schopnost účinně inhibovat AR-v7 [117], což vedlo až k několika klinickým testům, které posuzovaly přínos jeho podávání v kombinaci s dalšími léky. Některé z testů jsou již ukončeny (niclosamid s enzalutamidem) a nevedli k pozitivním výsledkům, ale další z nich používající jiné léky nebo jiné podmínky podávání budou teprve ukončeny (většinou v roce 2020) [118].

3.2.3.2 AR-V3

Další varianta AR, která je konstitutivně aktivní a přitahuje tak pozornost mnoha výzkumů, je AR-v3 nebo také označovaná jako AR6. Stejně jako AR-v7 vzniká i tato varianta pomocí exonů, které se v standardní verzi receptoru nevyskytují. Po přepisu exonu 1 a 2 se přepíše CE4, následovaný klasickým exonem 3 a zakončený CE1. Výsledná translace vytvoří protein mající sice nezměněnou NTD, ale obsahující pouze část DBD (obsahuje pouze první zinkový prst) na jejíž konec navazuje 53 jiných aminokyselin [109]. Většina receptorů by v případě poškození DBD nebyla schopná interakce s DNA, ale i přesto tato varianta zůstává konstantně aktivní stejně jako AR-v7 a způsobuje rezistenci PC na léčbu založenou na snížené množství androgenů [119]. Její výskyt v PC je přibližně stejně častý, co se jednotlivých vzorků z pacientů týče jako AR-v7, ale oproti této variantě je exprimována méně asi o 50% (množství exprese mRNA AR-v7 je přibližně 13% všech AR transkriptů, zatímco v případě AR-v3 je to pouze 7%). Je zajímavé, že její exprese je kromě AR-v7 shodná i s expresí AR-v9, což je také alternativní varianta AR, která vykazuje konstantní aktivaci. Může tedy jít o několikastupňovou ochranu před prostředím s nepřítomností androgenů, kde alternativní varianty nahrazují AR-FL a v případě výpadku jedné z nich, je její transkripční aktivita alespoň částečně nahrazena jinou variantou [120].



Obrázek č. 3: Porovnání struktury AR-v7 a AR-v3 s plnou verzí androgenního receptoru. Obě zkrácené varianty AR postrádají LBD a přitom jsou konstitutivně aktivní nezávisle na běžných ligandech AR. Obrázek 3 sestaven na základě informací z kapitoly „3.2.3 Alternativní sestřih androgenního receptoru“.

3.3 Zkoumané látky

V této práci sleduji vliv několika látek na aktivitu androgenního receptoru, a proto se na tyto látky blíže podíváme a přiblížíme si jejich současný výskyt nebo použití.

3.3.1 Bisfenol S

V posledních letech se v průmyslu začíná častěji využívat bisfenolu S (BPS), který má nahrazovat, společně s dalšími deriváty, bisfenol A (BPA) jelikož je prokazatelným endokrinním disruptorem. Mimo jiné přispívá k rozvoji rakoviny [121], obezitě [122], aktivuje pregnanový X receptor [123] a celkově způsobuje řadu nežádoucích efektů. Ale zároveň patří k rozšířené látce, která je velmi důležitá v mnoha odvětvích a proto se hledají její deriváty, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale menší nebo zcela žádný vliv na člověka a přírodu. Již výše zmíněný BPS je jedním z jeho nadějných derivátů, u kterého je centrální propanová skupina nahrazena sulfátovou skupinou. V současnosti se používá v konzervovaných potravinách jako součást polymerů chránících konzervy před korozi [124], také je součástí plastů ze kterých se vyrábí dětské láhve [125], používá se jako aditivum v papírenském průmyslu [126] a má mnoho dalších využití. Kromě toho vykazuje vyšší teplotní stabilitu a odolnost proti slunečnímu záření. Nicméně jeho velké rozšíření a používání ve věcech denní potřeby také umožňují, aby byli lidé vystaveni jeho expozici, přičemž malé dávky BPS byly zaznamenány v moči a mateřském séru [127, 128]. A jelikož stále nebyly detailněji prozkoumány jeho efekty na všechny jaderné receptory (je prokázán slabým aktivátorem $ER\alpha$ [129]), rozhodl jsem se jeho vlastnosti prozkoumat nejen na AR.

3.3.2 Mykofenolát mofetil

Mykofenolát mofetil je imunosupresivum, které působí jako selektivní, nekompetitivní reverzibilní inhibitor inosinmonofosfátdehydrogenázy (IMPDH), která se podílí na *de novo* syntéze guanosinových nukleotidů. Tento efekt je silnější u lymfocytů, jelikož má vyšší afinitu k isoformě II, která je v nich více zastoupena než isoforma I. Toho se využívá k zabránění odmítnutí transplantátu po transplantaci [130]. Sice IMPDH patří mezi hlavní cíl mykofenolátu, tedy potažmo jeho metabolitu mykofenolové kyseliny, ve kterou se mění po orálním podání, ale byla prokázána jeho schopnost modulovat aktivitu aryl uhlovodíkového

receptoru (AhR) a glukokortikoidního receptoru (GR) [131]. Z tohoto důvodu bylo zajímavé sledovat jeho možné účinky na další receptor.

3.3.3 Berberin

Berberin je rozšířená přírodní sloučenina vyskytující se třeba v dřevě obecném (*Berberis vulgaris*), která se již velmi dlouho využívá v nejrůznějším léčitelství. Nejstarší dochovaný důkaz o jeho používání je z dob Asyrské vlády v roce 650 př. n. l. [132]. Chemicky se jedná o kvarterní isochinolinový alkaloid a dnes se používá třeba na léčbu průjmů a gastroenteritidy z důvodu jeho antimikrobiálních vlastností [133]. Je to také důležitá látka pro farmaceutický průmysl, kde slouží k syntéze jeho bioaktivních derivátů [134] a několik studií prokázalo jeho vliv na proteiny zapojené v inhibici růstu rakoviny prostaty jako je p53 [135] a JNK [136]. Proto jsem se rozhodl prozkoumat jeho další možné efekty na rakovinu prostaty a androgenní receptor.

3.3.4 Grafen oxid

Látka budoucnosti, jak mnozí lidé nazývají grafen má široké využití a stále více se dostává do popředí v nejrůznějších odvětvích. Jeden z jeho nejvýznamnějších derivátů je grafen oxid (GO), dvoudimenzionální struktura grafenu s hydroxylovými a epoxidovými skupinami v základní rovině a karboxylovými skupinami na konci molekuly, která začíná nacházet využití jako potencionální nosič léčiv [137]. Ale s případným používáním v medicínských aplikacích se také zvyšuje míra vystavení lidí jeho účinkům. Již bylo prokázáno, že GO poškozuje plazmatickou membránu buněk [138], narušuje protein-proteinové interakce [139], ale jeho použití může být prospěšné v případě zánětu [140]. Prostudovat jeho možné dopady na další metabolické dráhy a transkripční faktory je proto více než žádoucí.

4 Materiál a metodika

4.1 Sloučeniny

Dimetylsulfoxid (DMSO), 5 α -dihydrotestosteron (DHT), berberin, mykofenolát mofetil (MYC), bisfenol S (BPS), grafen oxid (763705; 2 mg/ml vodného roztoku), médium RPMI 1640, fetální bovinní sérum, charcoal-stripped (CS) fetální bovinní sérum (CS-FBS; F6765), kit na proliferační assay (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Grafen oxid s definovanou velikostí částic (50 – 200 nm, 200 – 500 nm, >500 nm – 2mg/ml vodné roztoky; B51211, B51221, B51231) byly zakoupeny od biomade.com. Oligonukleotidové primery použité v RT-PCR byly syntetizovány v Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Light Cycler 480 Probes Master a UPL proby byly zakoupeny od Roche Diagnostic Corporation (Intes Bohemia, Česká republika). Annexin V vazebný pufr a annexin V-CF488A konjugát byly zakoupeny od Biotium (Fermont, USA). Mikrotitrační destičky pro buněčné 3D kultury byly zakoupeny od 300Microns (Karlsruhe, Německo). Kit pro resazurinovou assay byl zakoupen od Canvax (Kórdoba, Španělsko). Kit pro chromatinovou imunoprecipitaci byl zakoupen od Cell Signal Technology (9003; SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit – Magnetic Beads). Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny v nejvyšší možné dostupné kvalitě.

4.2 Buněčné kultury

Lidský karcinom prostaty (LNCaP; No. 89110211) a lidský epiteliální karcinom prostaty (22Rv1; No. 05092802) byly zakoupeny od Public Health England a kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceného o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin. Buněčná linie AIZ-AR (odvozená od 22Rv1, detailně charakterizována v Bartonkova *et al.* [141]) byla kultivována v médiu RPMI 1640 obohaceného o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin. Všechny buněčné linie byly kultivovány v 37°C, 5% CO₂ a absolutní vlhkosti v inkubátoru.

4.3 Test viability (MTT)

Buněčná linie AIZ-AR byla kultivována se vzrůstající koncentrací MYC (0,01–20 µg/ml) anebo s DMSO (0,1%; v/v); případně se vzrůstající koncentrací BER (0,01–50 µM) anebo s DMSO (0,1%; v/v); nebo se vzrůstající koncentrací BPS (0,1–100 µM) anebo s DMSO (0,1%; v/v) po dobu 24h; nebo se vzrůstající koncentrací GO (0,002–20 µg/ml) vždy po dobu 24h. Následně byly buňky opláchnuty PBS, které bylo ihned poté nahrazeno PBS s MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) v koncentraci 0,3 mg/ml. Po 30–40 minutách byl roztok odsát a vzniklé krystaly formazanu rozpuštěny v DMSO. Absorbance byla měřena při 570 nm přístrojem Infinite M200 (TECAN, Rakousko). Testované koncentrace, které nezpůsobily pokles viability větší než 20% byly shledány jako netoxické.

4.4 Resazurinová assay

Buněčná linie AIZ-AR byla kultivována se vzrůstající koncentrací GO (0,002–20 µg/ml) po dobu 24h. Následně byly buňky opláchnuty PBS, které bylo ihned poté nahrazeno roztokem resazurinu v médiu RPMI 1640 (obohaceném o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin) ve finální koncentraci 10% v/v (900 µl roztoku média a 100 µl roztoku resazurinu) a dále se nechaly inkubovat 75 minut v inkubátoru. Poté byl výsledný roztok přenesen do nových černých 96ti jamkových destiček a měřena fluorescence (530 nm pro excitaci a 590 nm pro emisi) na přístroji Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.5 Reportérová genová assay

Pro všechny aplikace této metody byla použita stabilně transfekované linie AIZ-AR vyvinutá z linie 22Rv1, do které byli vloženy tři kopie androgenní responzivní oblasti (ARR) následované jednou kopií ARE z promotorové oblasti PSA [141]. Následně byla buněčná linie AIZ-AR kultivována 16h v 96ti jamkové destičce v médiu s CS-FBS a poté se vzrůstající koncentrací MYC (0,01–20 µg/ml), BER (0,0001–1000 nM), BPS (0,1–100 µM) nebo GO (0,002–20 µg/ml) v přítomnosti DMSO (0,1%; v/v, agonistické uspořádání) a v případě GO vody 1%; v/v,) nebo přítomnosti DHT (100 nM, antagonistické uspořádání). Po kultivaci byly buňky lyzovány a byla změřena luciferázová aktivita přístrojem Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.6 Proliferační assay

Proliferační assay byla provedena podle návodu výrobce s drobnou modifikací. Buňky byly vysety na 96ti jamkové destičky (10 000 buněk na jamku, v případě LNCaP byly destičky předtím ošetřeny poly-D-lysinem) v médiu s CS-FBS a stabilizovány přes noc. Následující den jim bylo vyměněno médium za nové, obsahující MYC s rostoucí koncentrací (0,01 – 20 $\mu\text{g/ml}$), BER (0,0001-1000 nM), BPS (0,1-100 μM) nebo GO (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$) a to v kombinaci s DHT (100 nM, antagonistické uspořádání) nebo obsahovali pouze látku samotnou v přítomnosti DMSO (0,1%; v/v, agonistické uspořádání a v případě GO vody 1%; v/v, agonistické uspořádání) a inkubovány po dobu 24h. Na konci inkubační doby byl aplikován 5-Bromo-2'-deoxy-uridin (BrDu) přímo do jamek a ponechán po dobu 3 hodin. Následně se postupovalo přesně podle návodu výrobce. Absorbance byla měřena při 405 nm a referenční hodnota při 495 nm pomocí Infinite M200Pro (TECAN, Rakousko). Proliferace je dále vyjádřena jako % poměru absorbancí A_{405}/A_{495} mezi vzorky a samotným DHT (u DHT je proliferace nastavena na 100%).

4.7 qRT-PCR

Pro všechny experimenty byly použity primery a proby z Universal Probes Library (UPL; Roche Diagnostic Corporation, Praha, Česká republika). PSA-UPL44, forward: GTGCTTGTGGCCTCTCGT, reverse: CAGCAAGATCACGCTTTTGT, GAPDH-UPL60, forward: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC, reverse: ACGACCAAATCCGTTGACTC; UBE2C-UPL8, forward: GGGCAAAAGGCTACAGCAG, reverse: GCTCCATGGATGGTCCCTA. Všechny experimenty proběhly za následujících podmínek: Celková RNA byla izolována pomocí TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, USA) podle pokynů výrobce. cDNA byla syntetizována z 1000 ng celkové RNA za použití M-MuLV reverzní transkriptázy (M0253S, New England BioLabs) v 42°C po dobu 60 min za použití náhodných hexamerů (S1230, New England BioLabs). qRT-PCR byla provedena na přístroji Light Cycler 480 II (Roche Diagnostic Corporation, Praha, Česká republika). Program pro průběh byl nastaven následovně: aktivační krok při 95°C po dobu 10 min byl následován 45 cykly PCR (denaturace při 95°C po dobu 10 sekund, annealing a elongace 60°C po dobu 30 sekund). Měření bylo uspořádáno v triplikátech. Genová exprese byla normalizována na glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) jako housekeeping gen. Data byla

zpracována pomocí delta-delta metody. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní násobek indukce oproti buňkám s DMSO.

4.8 SDS-PAGE a Western blotting

Celkové proteinové extrakty byly připraveny z 1 jamky 6ti jamkové desky. Po inkubaci byly buňky opláchnuty vychlazeným PBS a seškrábnuty do 1ml PBS a suspenze byla centrifugována (5min, 4°C, 2300g). Pelet byl poté resuspendován v 150µl vychlazeného lyzačního pufru (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; směs proteázových a fosfatázových inhibitorů, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA). Rostok byl promíchán a inkubován 10 min na ledu, poté centrifugován (13 min, 4°C, 15700g). Supernatant byl odebrán a pro stanovení koncentrace proteinů byla použita metoda dle Bratforda. Izolace cytosolické a nukleární frakce byla provedena za použití Nuclear extract kit (Active Motif; 40010) podle pokynů výrobce.

Gel pro SDS-PAGE (10%) byl použit na aparatuře od firmy BioRad přesně podle obecných pokynů za použití a pro přenos proteinů byla použita PVDF membrána. Membrána byla saturována 5% sušeným mlékem bez tuku po dobu 1h při pokojové teplotě v 1x TBS-Tween20 (0,5%). Bloty byly inkubovány s následujícími protilátkami: protilátka proti AR (mouse monoclonal, sc-7305, 441, ředění 1:500, lot H3112 od Santa Cruz Biotechnology), protilátka proti aktinu (mouse monoclonal, 3700S, 8H10D10, ředění 1:1000, Lot 15 od Cell Signaling Technology), protilátka proti p-JNK (rabbit polyclonal, 9251, lot 3, ředění 1:1000 od Cell Signaling Technology), protilátka proti JNK (rabbit polyclonal, 9252, lot 9, ředění 1:1000 od Cell Signaling Technology), a inkubace byla prováděna přes noc při 4°C. Detekce byla provedena pomocí křemové peroxidázy spojené se sekundární protilátkou (Santa Cruz Biotechnology) a Western Sure Premium Chemiluminiscent Substrate (C60429, LiCor). Densitometrická analýza a semikvantifikace byla provedena na C-DiGit Chemiluminiscent Western Blot Scanner (LiCor) a Image Studion Digits software (LiCor). Separace a kvantitativní detekce PSA a UBE2C proteinů byla udělána pomocí Sally Sue Simple Western Systému (procedura detailně popsána v Doricakova et al. [142]). Byly použity následující protilátky: protilátka proti aktinu (mouse monoclonal, 3700S, 8H10D10, ředění 1:1000, Lot 15 od Cell Signaling Technology), protilátka proti PSA (rabbit monocloal, D6B1, 5365S, ředění 1:20, Cell Signaling Technology) a protilátka proti UBE2C (rabbit polyclonal, 14234S, ředění 1:20, Cell Signaling Technology).

4.9 Měření redukovaného a celkového glutathionu

22Rv1 byly inkubovány se vzrůstající koncentrací GO (0,2-20 $\mu\text{g/ml}$), případně bez GO po dobu 24h v médiu s CF-FBS. Poté byl celkový glutation a oxidovaný glutation měřený pomocí GSH/GSSG-Glo Assay kit (Promega, V6611) podle pokynů výrobce a luciferázová aktivita byla měřena pomocí Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.10 Annexin V assay

22Rv1 byly vysety na 12ti jamkovou destičku (400 000 na jamku) v médiu RPMI s CS-FBS. Po stabilizaci přes noc byly buňky inkubovány s BER (1000 nM), DHT (100 nM) a to jak samostatně tak v společně po dobu 24h. Poté bylo postupováno přesně podle návodu výrobce pro Annexin V assay (ChemoMetec, Dánsko). Analýza proběhla na Nucleocounter NC-3000 (ChemoMetec, Dánsko).

4.11 Tomografie

Zobrazení 3D morfologie 22Rv1 (po inkubaci s GO nebo bez něj) byla provedena interferometrickou detekcí použitím holotomografického 3D mikroskopu Nanolive[®] (3D Cell Explorer, Lausane, Švýcarsko) a výsledný obraz byl zpracován pomocí STEVE[®] software (3D Cell Explorer). Každá barva reprezentuje rozdílný index odrazu.

4.12 Zeta potenciál

Grafen oxid byl ředěný ve vodě nebo médiu RPMI s FBS-CS na výslednou koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. Zeta potenciál byl stanoven použitím elektroforetické mobilní metody a měřený pomocí Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). Hydrodynamický průměr byl měřen za 24h při 37°C a 5% CO₂ v atmosféře (simulující podmínky buněčných testů) použitím metody dynamického rozptylu světla pomocí Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě.

4.13 Chromatinová imunoprecipitace

22Rv1 nebo LNCaP byly kultivovány na 60mm Petriho miskách v FBS-CS RPMI přes noc a následující den inkubovány s DMSO, DHT (100 nM) nebo kombinací DHT a GO (0,2 – 20 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 90 min v 37°C. Následně bylo postupováno podle návodu výrobce pro

SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads; Cell Signaling Technology, Leiden, Nizozemsko) s drobnými modifikacemi popsány v Štěpánková *et al.* [143].

Nicméně i tak došlo ještě k dalším drobným modifikacím. V tomto případě jsem použil 20 µg našťipaného chromatinu, který byl resuspendován v 500 µl ChIP pufru a imunoprecipitace byla zahájena přidáním 4 µl AR protilátky (D6F11; Cell Signaling Technology). Další den bylo ke vzorku přidáno 30 µl Protein G Magnetic Beads (roztok magnetických částic) a inkubace probíhala 1 hodinu při 4°C při neustálém míchání. Po separaci magnetických částic pomocí Magnetic Separation Rack 14654 (Cell Signaling Technology) a několikanásobném promytí pufru (podle návodu) byly pelety resuspendovány ve 150 µl ChIP elučního pufru a chromatin byl eluován 30 min při 65°C s třepáním při 1200 RPM na TS-100C Thermo-Shaker (BioSan). Po separaci částic na magnetickém stojánku byl eluovaný chromatin inkubován s ChIP elučním pufrům s 6 µl 5M NaCl a 2 µl proteinázy K 15 min při 65°C na Thermo-Shaker (1200 RPM). Následně byla DNA vyčištěna přes kolonky podle návodu výrobce. qPCR byla provedena na přístroji LightCycler 480 (Roche, Praha, Česká republika) s 2 µl DNA vzorku společně s PCR vodou, SYBR-Green (LightCycler 480 SYBR Green I Master; Roche) a 5 µM simple ChIP Human KLK3 promotorovými primery (32784; Cell Signaling Technology). Program pro PCR reakci byl nastaven následovně: enzymová aktivace při 95°C po dobu 10 min následovaná 40ti cykly denurací s prodlužováním při 95°C, 15 sekund a 65°C, 60 sekund. Produkt PCR reakce byl poté dán na elektroforetickou separaci na 4% agarózovém gelu (pro tento případ byla provedena PCR pouze o 30 cyklech).

4.14 Statistická analýza

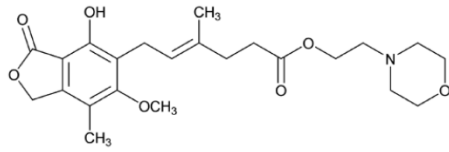
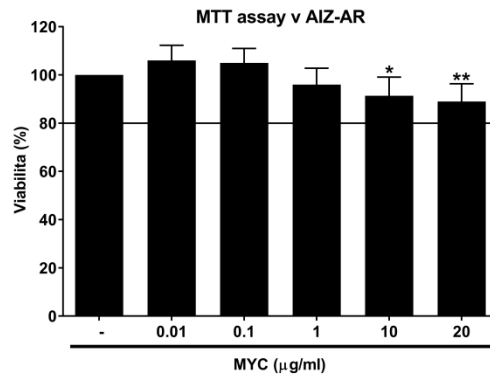
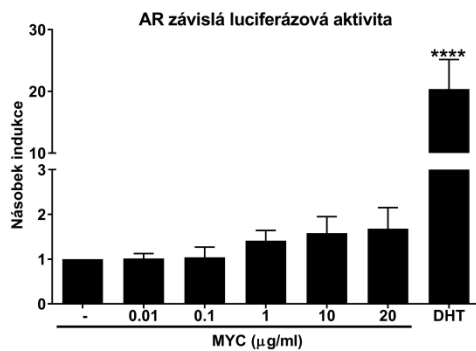
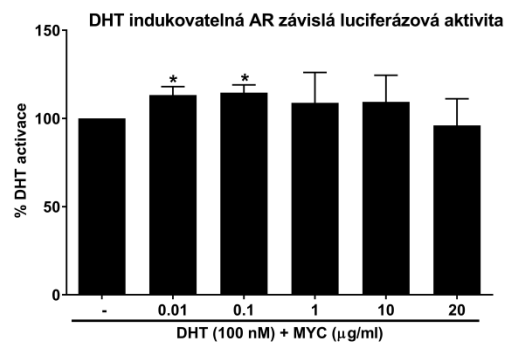
Rozdíly mezi dvěma skupinami byly porovnávány pomocí Studentova nepárového dvojitého t-testu (Student's unpaired two-tailed t-test). Dvoucestná analýza variace s Dunnetovým post hoc testem byla aplikována v případě, že bylo analyzováno více než dvě skupiny. Veškerá statistická analýza byla provedena softwarem GRAPH-PAD PRISM 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Pouze v případě analýzy berberinu byly data zpracovány pomocí Microsoft Excel 2010 (Paired Student's *t*-test). Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

5 Experimentální část

5.1 Mykofenolát mofetil indukuje expresi c-Jun-N-koncovou kinázy v 22Rv1: vliv na signalizaci androgenního receptoru

5.1.1 Mykofenolát mofetil aktivuje androgenní receptor (AR)

V prvním kroku jsem testoval netoxické koncentrace MYC (struktura na obrázku 4A), které by šli použít pro další experimenty. Vybral jsem rozsah, který odpovídal skutečným koncentracím v plazmě [144] a maximum nastavil na 20 µg/ml (62 µM). Pro testování cytotoxicity jsem vybral linii AIZ-AR, schopnou reagovat na aktivaci AR [141]. Pomocí MTT testu jsem zjistil, že viabilita AIZ-AR neklesla pod 10% (obrázek 4B) v žádné použité koncentraci, rozhodlo jsem se pro další experimenty použít celý koncentrační rozsah. V případě agonistického uspořádání dokázal MYC indukovat AR zprostředkovanou luciferázovou aktivitu v rozsahu 1.4 až 1.7x (jako kontrola funkčnosti systému byl použit DHT 100 nM, který aktivitu zvedl 18ti násobně) ale tato aktivace nebyla signifikantní (obrázek 4C). Naopak, v případě antagonistického módu (v přítomnosti DHT) byla luciferázová aktivita zvednuta přibližně o 13% pro dvě nejmenší testované koncentrace a to statisticky významně (obrázek 4D).

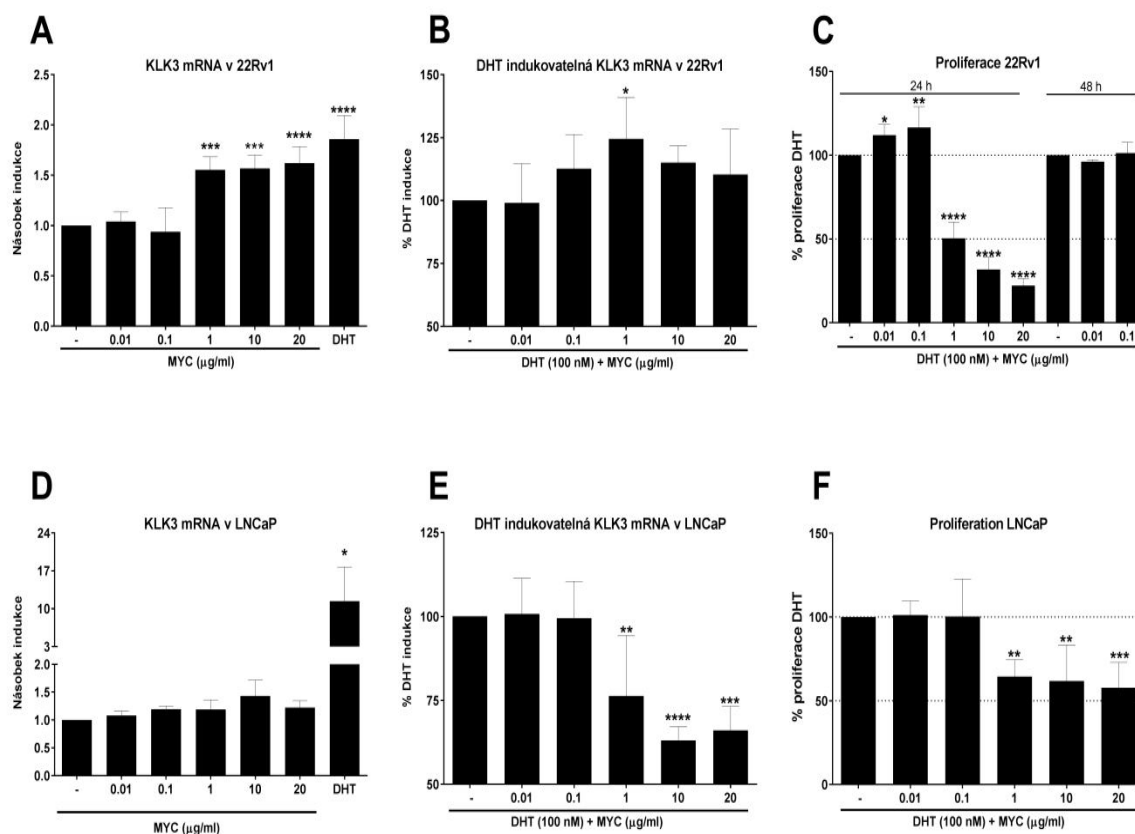
A**Mykofenolát mofetil****B****C****D**

Obrázek č. 4: Viabilita AIZ-AR a aktivace androgenního receptoru. (A) Struktura mykofenolátu mofetilu (MYC). (B) AIZ-AR byly inkubovány s mykofenolátem mofetilem (MYC; 0,01 – 20 µg/ml) anebo s DMSO (0,1% v/v) jako rozpouštědlem po dobu 24h. Poté byl proveden test viability pomocí MTT jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 5ti nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako procenta negativní kontroly (DMSO). (C) AIZ-AR byly inkubovány s MYC (0,01 – 20 µg/ml) a DHT (100 nM) byl použit jako test funkčnosti systému, DMSO (0,1% v/v) jako kontrola a to po dobu 24h. Poté bylo postupováno podle reportérové genové assay popsané v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 5ti experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce AR vůči kontrole (DMSO). (D) AIZ-AR byly inkubovány v kombinaci s MYC (0,01 – 20 µg/ml) a DHT (100 nM) po dobu 24h. Poté bylo postupováno podle reportérové genové assay popsané v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 7mi experimentů a jsou vyjádřena jako procenta z indukce pozitivní kontroly (DHT). *,**,*** (p<0,05; 0,01; 0,001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (B) a (C) nebo od buněk s DHT (D).

5.1.2 MYC moduluje expresi KLK3 a proliferaci prostatických buněk

Důkaz, že MYC zvyšuje AR zprostředkovanou luciferázovou aktivitu mě vedl k prozkoumání neznámějšího cílového genu AR a to KLK3. K tomuto účelu jsem vybral dvě buněčné linie. První z nich je 22Rv1, od které je odvozena stabilní linie AIZ-AR [141]. Pozitivní kontrola (DHT 100 nM) v agonistickém módu indukovala expresi KLK3 pouze slabě (téměř 2x, obrázek 5A) ale statisticky významně, zatímco mykofenolát mofetil přibližně 1,5x ve třech nejvyšších koncentracích což odpovídá přibližně 65% (obrázek 5A) indukci exprese pomocí DHT v agonistickém módu. V případě antagonistického módu došlo ke konzistentnímu pozorování s luciferázovou aktivitou (obrázek 4D) a expresí KLK3 (obrázek 5B), kde došlo o nárůst téměř 25% indukce exprese KLK3 oproti DHT samotnému. Jelikož je prokázáno, že AR ovlivňuje buněčný cyklus rakoviny prostaty, bylo zajímavé zaměřit se i na tuhle možnost. Zjistil jsem, že dvě nejnižší koncentrace MYC (0,01 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$) významně stimuluje proliferaci 22Rv1 za 24h, ale vyšší koncentrace mají inhibiční efekt (obrázek 5C). Důvodem inhibice proliferace při vyšších koncentracích bude pravděpodobně primární cíl MYC a to IMPDH s následným dopadem na buněčný cyklus a tedy i proliferaci buněk. Nicméně se tento efekt nepotvrdil za 48h, což může být také důsledek inhibice IMPDH (obrázek 5C).

Jelikož 22Rv1 prokazatelně exprimují dvě verze AR a to AR-FL a jeho sestřihovou variantu (AR-V7, která je konstitutivně aktivní a postrádá LBD) rozhodl jsem se zopakovat experiment i na další buněčné linii a to LNCaP, která exprimuje pouze AR-FL. Pozitivní kontrola (DHT 100 nM) v tomto případě indukovala expresi KLK3 přibližně 15x, zatímco MYC způsobil nesignifikantní indukci nejvýše 1,4x (obrázek 5D). V přítomnosti DHT (antagonistický mód) jde vidět opačný efekt oproti 22Rv1 buňkám a to statisticky významné snížení mRNA KLK3 pro tři nejvyšší koncentrace a to až o téměř 60% (obrázek 5E). V případě proliferace se neopakovalo zvýšení za 24h pro nejnižší koncentrace, ale pouze pokles (obrázek 5F) pravděpodobně z důvodu inhibice IMPDH. Z hlediska buněčné proliferace se LNCaP projeví jako rezistentnější ve srovnání s 22Rv1 (IC_{50} pro 22Rv1 bylo přibližně 1 $\mu\text{g/ml}$ zatímco pro LNCaP $\text{IC}_{50} > 20\mu\text{g/ml}$).

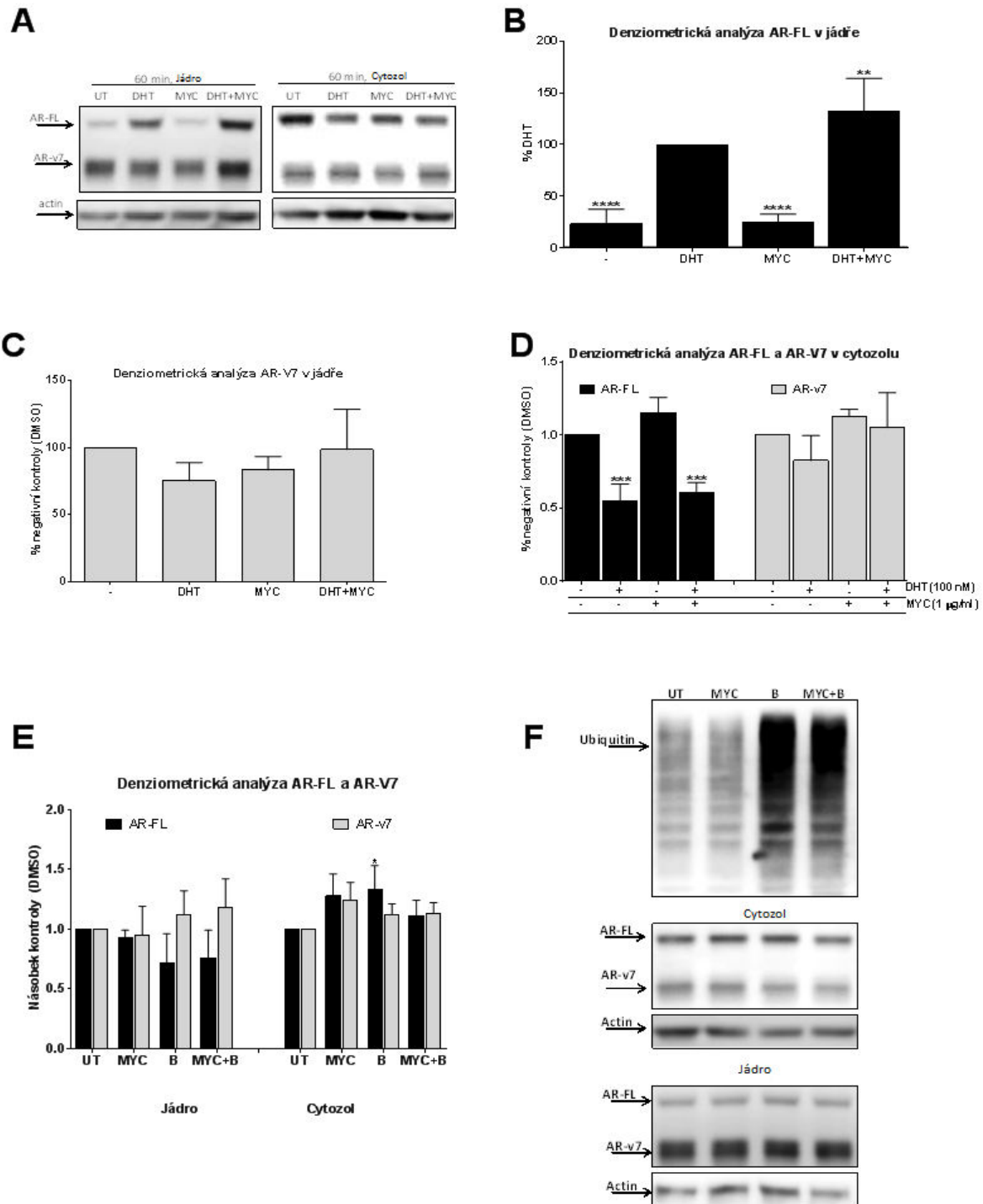


Obrázek č. 5: Vliv mykofenolátu mofetilu na mRNA KLK3 a buněčnou proliferaci. Buněčná linie 22Rv1 nebo LNCaP byla inkubována s mykofenolátem mofetilem (MYC; 0,01 – 20 µg/ml) po dobu 24h bez přítomnosti DHT (A, D) nebo v kombinaci MYC a DHT (B, E) přičemž DMSO bylo použito jako rozpouštědlo a negativní kontrola (A, D). (C) 22Rv1 byly inkubovány s MYC (0,01 – 20 µg/ml) a DHT (100 nM) po dobu 24h nebo s MYC (0,01 a 0,1 µg/ml) a DHT (100 nM) po dobu 48h. (F) LNCaP byly inkubovány s MYC (0,01 – 20 µg/ml) a DHT (100 nM) po dobu 24h. Způsob detekce mRNA KLK3 a provedení detekce proliferace buněk je popsán v kapitole „materiál a metodika“. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek indukce (A, D) nebo jako procenta indukce DHT (B, E) nebo procenta proliferace (C, F). Data jsou průměrem z 5ti po sobě následujících experimentů. *, **, ***, **** (p<0,05; 0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (A, D), nebo od buněk s DHT (B, C, E, F).

5.1.3 MYC stimuluje DHT závislou AR translokaci v buňkách 22Rv1

Jelikož MYC stimuluje ligandem indukovanou luciferázovou aktivitu (obrázek 4D) a expresi mRNA KLK3 (obrázek 5B) bylo zapotřebí blíže prozkoumat tento efekt a jedním z vysvětlení mohla být zvýšená translokace. Použil jsem koncentraci MYC 1 µg/ml, protože se jednalo o nejnižší koncentraci, která v předchozích měřeních způsobovala nějaký efekt. Zjistil jsem, že přítomnost MYC stimuluje dihydrotestosteronem indukovanou translokaci do jádra AR-FL za 60 minut (obrázek 6A a 6B) a zároveň snižuje (i když ne statisticky

významně) množství AR-V7 v jádře. Jelikož obě izoformy exprimované v 22Rv1 byly lehce zvýšeny v cytosolu (obrázek 6A a 6D) a zároveň sníženy v jádře (obrázek 6A a 6C), prověřil jsem dále i možnost, že MYC stimuluje degradaci AR proteazomem. Nicméně, inkubace buněk společně i bortezomibem (inhibitorem proteazomu) neměla žádný efekt na množství proteinu AR (obrázek 6E a 6F).

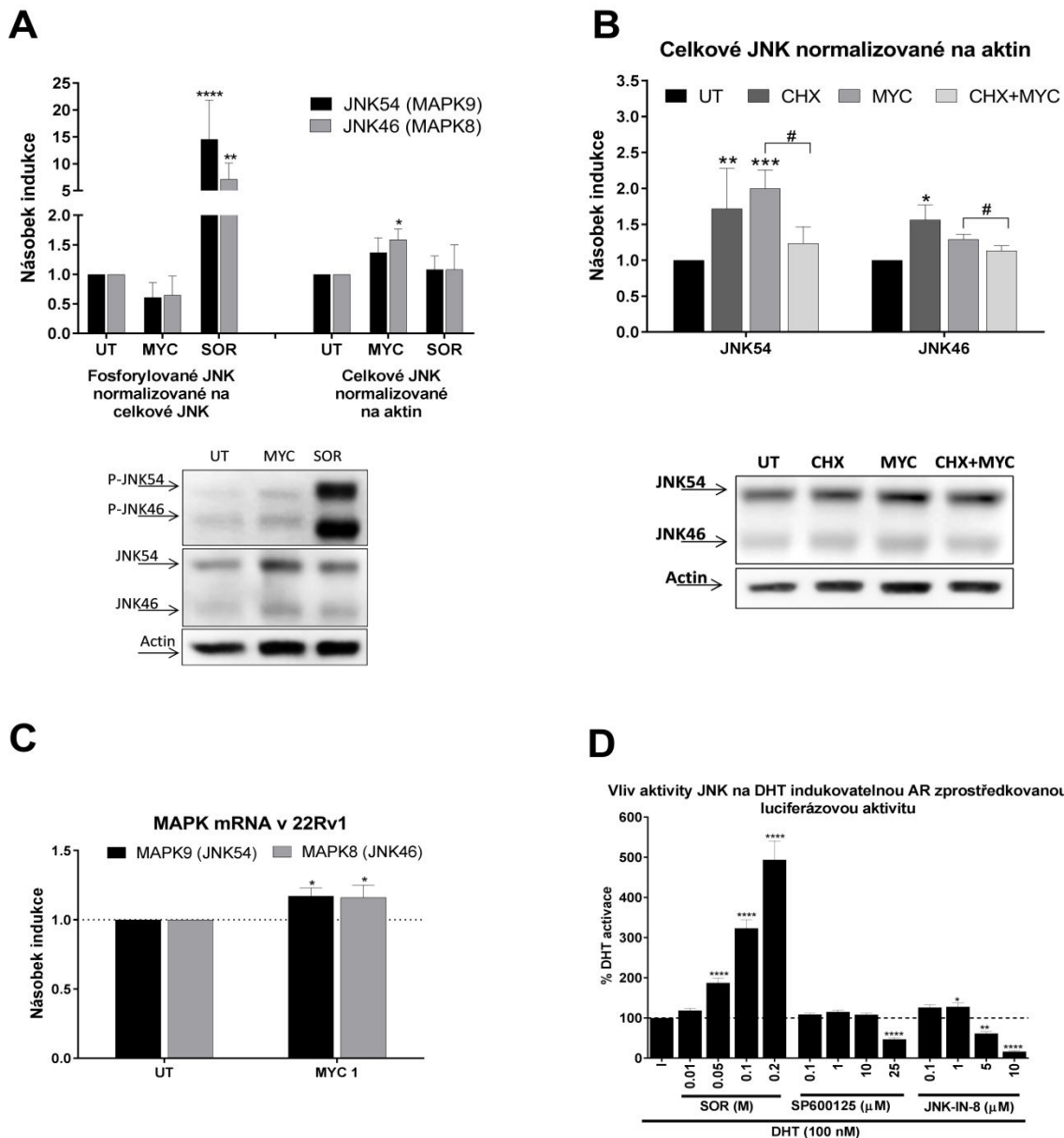


Obrázek č. 6: Vliv MYC na translokaci AR. (A-D) 22Rv1 byly inkubovány po dobu 60 min s mykofenolátem mofetilem (MYC; 1 µg/ml) buď samostatně nebo v kombinaci s DHT (100 nM). (E) 22Rv1 byli inkubovány

s MYC (1 µg/ml) samostatně nebo v kombinaci s Bortezomibem (B; 100 nM) po dobu 60 minut. Poté byla izolována jaderná a cytosolické frakce a provedena detekce AR jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. (A, F) Repräsentativní snímek z western blotu (celkem bylo provedeno 5 experimentů (A) nebo 3 experimenty (F)). Výsledky jsou vyjádřeny jako procenta vůči kontrole DMSO (C, D) nebo DHT (B) nebo jako násobek indukce kontroly (E). *,**,***,**** (p<0,05; 0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (C, D), nebo od buněk s DHT (E).

5.1.4 MYC indukuje expresi JNK

Na základě pozorování v nedávných publikacích [131] jsem zjistil, že MYC moduloval AhR aktivitu v přítomnosti jeho ligandu dioxinu. Navíc, aktivita GR byla inhibována v závislosti na koncentraci MYC v přítomnosti ligandu dexamethasonu. Jelikož jediná látka dokázala ovlivňovat aktivitu tří různých receptorů, zaměřil jsem se na možnost modulace AR skrze posttranslační modifikace pomocí kináz. Jako vhodnou volbou se stala C-Jun N-terminální kináza (JNK), jelikož její inhibice pomocí MYC již byla pozorována [145]. Inkubace buněk s MYC po dobu 30 minut vedla k nesignifikantnímu, ale reprodukovatelnému poklesu fosforylované JNK zatímco celková JNK byla signifikantně zvýšená (obrázek 7A). Naopak sorbitol, prokazatelný aktivátor JNK, zvýšil pouze hladinu fosforylace ale nikoliv celkové množství. Tyto data napovídají, že MYC potlačuje bazální aktivitu JNK, tím že zvyšuje její celkové množství. Abych prokázal původ tohoto efektu, rozhodl jsem se zaměřit na možnou stabilizaci nebo indukci JNK. Při použití inhibitoru proteosyntézy cykloheximidu (CHX) došlo k signifikantnímu potlačení mykofenolátem aktivovaného zvýšení JNK (obrázek 7B), což prokazuje, že se jedná o modulaci transkripce, nikoliv stabilizaci. Další pozorování exprese JNK na úrovni mRNA prokázalo sice malé, ale signifikantní zvýšení hladiny mRNA obou JNK (JNK54 a JNK 46, obrázek 7C). Pro další potvrzení, že JNK skutečně ovlivňuje transkripční aktivitu AR, jsem inkuboval buňky AIZ-AR společně s aktivátorem JNK sorbitolem nebo s inhibitory (SP600125 a JNK-IN-8). Sorbitol zvyšoval luciferázovou aktivitu v závislosti na jeho koncentraci, zatímco oba testované inhibitory měly přesně opačný efekt (obrázek 7D). Přitom je zajímavé, že nízké koncentrace JNK inhibitoru měly na aktivitu AR stimulační účinek, stejně jako MYC (obrázek 4D a 7D).

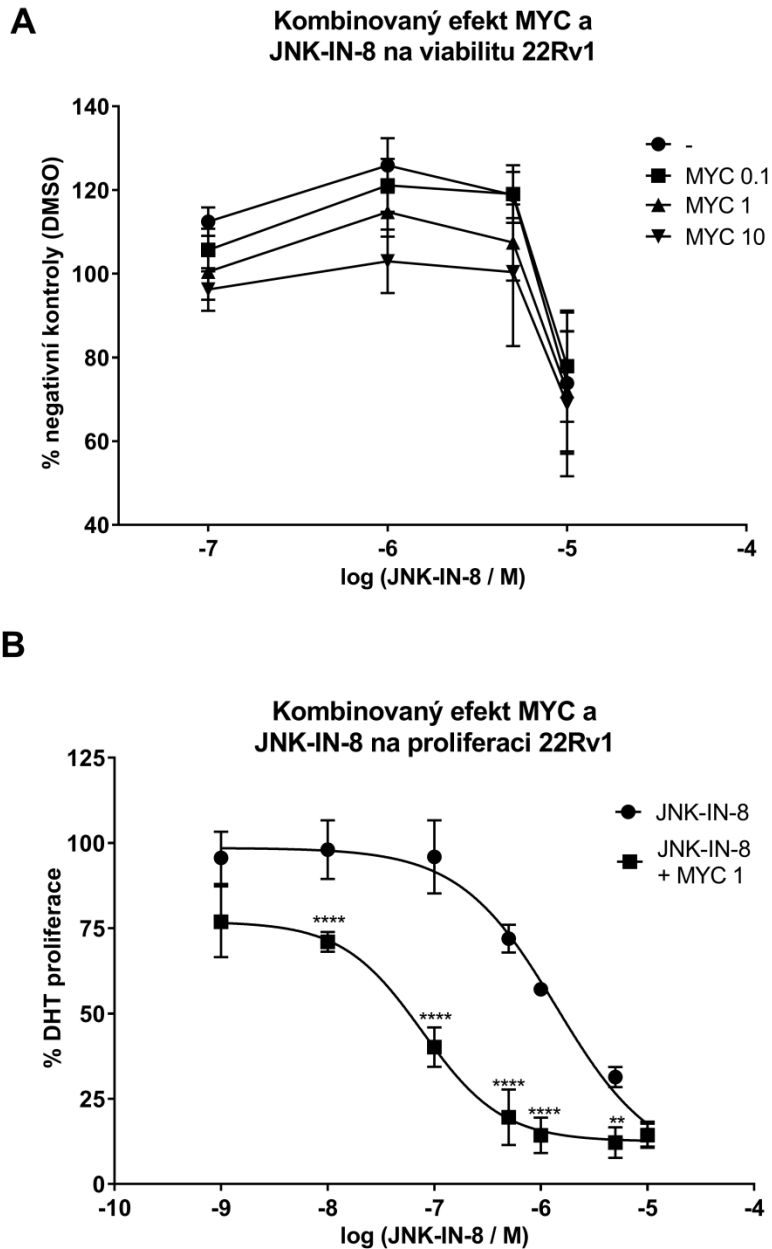


Obrázek č. 7: Vliv MYC na JNK. (A) 22Rv1 byly inkubovány s mykofenolátem mofetilem (MYC; 1 $\mu\text{g/ml}$), DMSO (0,1 % v/v) nebo sorbitolem (SOR; 0,4 M) po dobu 30 minut. Poté byly buňky lyzovány a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Relativní množství fosforylovaných JNK normalizovaných na množství celkových JNK je v levé části a celkové množství JNK normalizovaných oproti aktinu je v pravé části. Data jsou vyjádřena jako násobek indukce vůči negativní kontrole (DMSO). Pod grafem je zobrazen reprezentativní výsledek western blotu (výsledky jsou průměrem ze 6ti nezávislých experimentů). (B) 22Rv1 byly inkubovány s MYC (1 $\mu\text{g/ml}$), cykloheximidem (CHX; 20 $\mu\text{g/ml}$), DMSO (0,1 % v/v) nebo v kombinaci s těmito látkami po dobu 30 minut. Poté byly buňky lyzovány a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Celkové množství JNK proteiny bylo normalizováno na aktin a data jsou vyjádřena jako násobek indukce vůči negativní kontrole (DMSO). Pod grafem je zobrazen reprezentativní výsledek western blotu (výsledky jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů). (C) 22Rv1 byly inkubovány s (MYC; 1 $\mu\text{g/ml}$) nebo DMSO (0,1 % v/v) jako negativní kontrolou. Množství mRNA MAPK9 a MAPK8 bylo po 24h detekováno podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Výsledky jsou vyjádřeny jako

násobek indukce oproti negativní kontrole (DMSO). (D) Linie AIZ-AR byla inkubována s DHT (100 nM) buď samotným nebo v kombinaci se sorbitolem (0,01 – 0,2 M), SP600125 (0,1 – 25 μ M) a JNK-IN-8 (0,1 – 10 μ M) po dobu 24h. Poté byla měřena luciferázová aktivita podle postupu v kapitole „materiál a metodika“. *, **, ***, **** (p<0,05; 0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (A, B, C), nebo od buněk s DHT (D).

5.1.5 MYC má synergistický antiproliferační efekt v kombinaci s JNK inhibitorem

Jelikož MYC indukuje expresi JNK proteinu, rozhodl jsem se zaměřit na možnost ovlivnění viability 22Rv1 pomocí inhibitoru JNK se současným ovlivněním mykofenolátem. V případě MTT testu bylo zjištěno, že JNK inhibitor (JNK-IN8) [146] mírně zvyšoval viabilitu (s výjimkou nejvyšší koncentrace) a přítomnost testovaných koncentrací MYC ji koncentračně závisle snižovala jak je vidět na obrázku č. 8A. Jako další krok jsem sledoval možný vliv na proliferaci. 22Rv1 vykazovaly koncentračně závislou inhibici proliferace způsobenou JNK-IN-8 přičemž IC₅₀ byla přibližně 1425 nM (obrázek 8B). V případě že došlo k vystavení 22Rv1 zároveň MYC a JNK-IN-8, proliferační křivka byla výrazně posunuta k nižším hodnotám. V tomto případě byla IC₅₀ 17x nižší (přibližně 84 nM) za 24h než při použití JNK inhibitoru samotného.

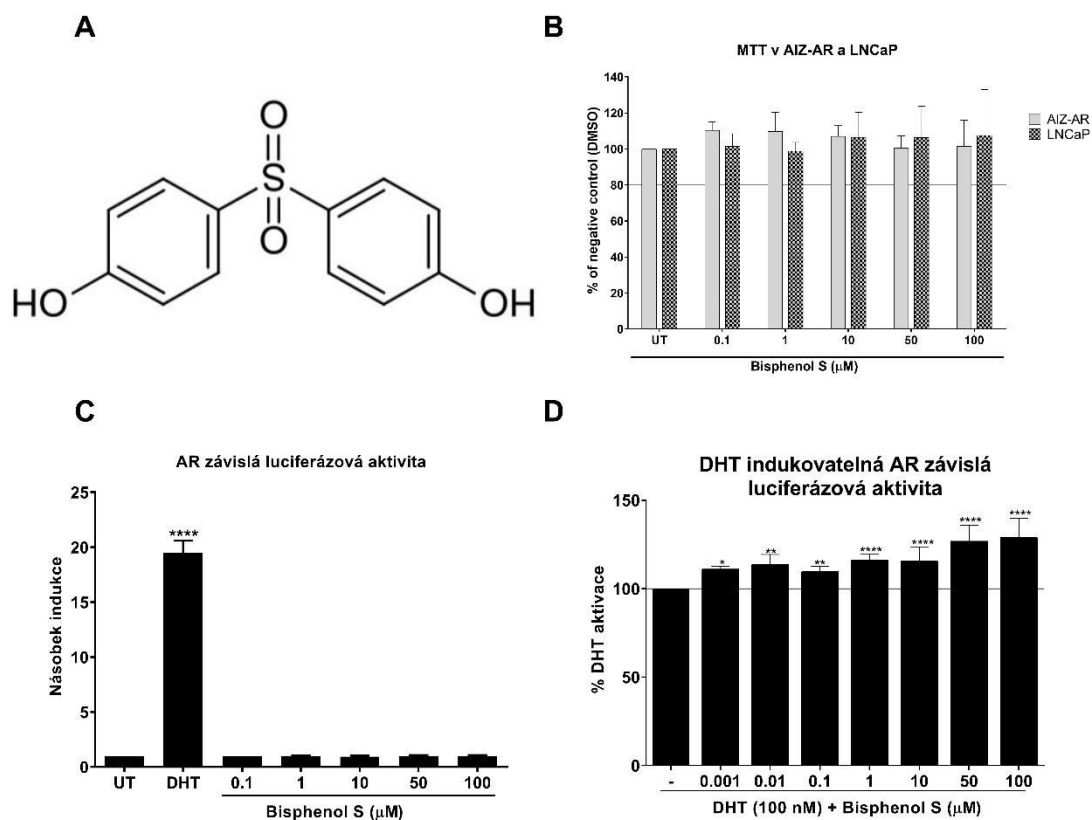


Obrázek č. 8: Vliv MYC a JNK inhibitoru na viabilitu a proliferaci 22Rv1. 22Rv1 byly inkubovány s JNK-IN-8 (0,001 – 10 μ M) samostatně nebo v kombinaci s MYC (1 μ g/ml) nebo DMSO (0,1% v/v) a v případě měření proliferace za přítomnosti DHT (100 nM) po dobu 24h. Poté byla měřena viabilita (A) nebo proliferace (B) podle postupu v kapitole „materiál a metodika“. Výsledky jsou vyjádřeny jako procenta vůči DMSO (A) nebo DHT (B) a jsou výsledkem průměru tří nezávislých experimentů. **,**** ($p < 0,01$; $0,0001$) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (JNK-IN-8 s DHT).

5.2 Modulace aktivity androgenního receptoru bisfenolem S

5.2.1 Bisfenol S stimuluje indukovanou transkripční aktivitu AR

Na začátku bylo potřeba zjistit možnou toxicitu bisfenolu S (BPS; struktura na obrázku 9A), aby poté bylo možné provést reportérovou genovou assay. Pro tento účel jsem provedl MTT test viability pro vzrůstající koncentrace BPS za 24h. Žádná z testovaných koncentrací nesnížila viabilitu pod 80% (obrázek 9B) a proto nebyly považovány za toxické. Jako další krok jsem pozoroval možnou aktivaci AR pomocí metody s reportérovým genem v tzv. „agonistické módu“ (testovaná látka pouze s rozpouštědlem ale bez přítomnosti prokazatelného aktivátoru AR). V tomto případě BPS nevykazoval žádný efekt na AR (obrázek 9C) zatímco DHT indukoval luciferázovou aktivitu 20ti násobně oproti samotným buňkám. Opačný případ nastal v tzv. „antagonistickém módu“, tedy v případě, kdy buňky byly zároveň vystaveny i DHT a zkoumané látce. Již při nejmenší testované koncentraci (0,1 μM BPS) došlo k statisticky signifikantnímu zvýšení luciferázové aktivity, která vykazovala koncentrační závislost a v největší koncentraci (100 μM BPS) dosahovala navýšení přibližně o 25% (obrázek 9D).



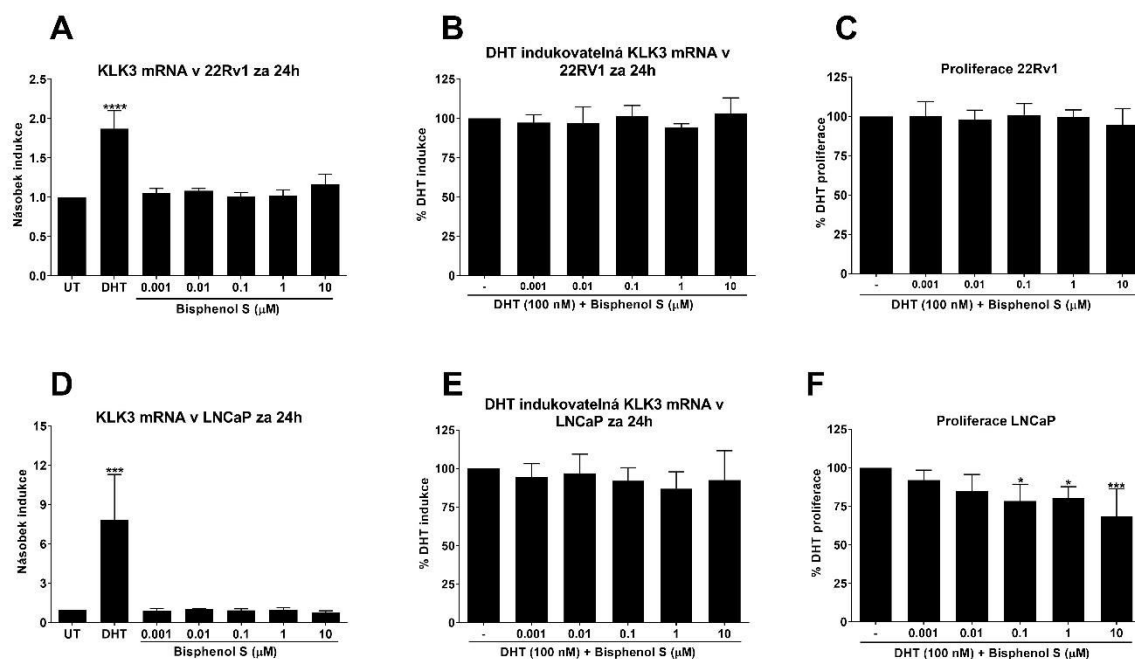
Obrázek č. 9: Vliv bisfenolu S na aktivitu AR. (A) Struktura bisfenolu S. (B) AIZ-AR a LNCaP byly inkubovány s bisfenolem S (0,1 – 100 μM) a DMSO (0,1% v/v) jako kontrolou po dobu 24h. Poté byla

provedena MTT detekce viability podle postupu v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou vyjádřena jako procenta negativní kontroly. (C, D). AIZ-AR byly inkubovány s bisfenolem S (BPS; 0,1 – 100 μ M) a DMSO (0,1% v/v) jako kontrolou (C) nebo v kombinaci s DHT (100 nM) (D) po dobu 24h. Poté byla provedena reportérová genová assay podle postupu v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou vyjádřena jako násobek indukce oproti negativní kontrole (DMSO) (C) nebo jako procenta aktivace vzorku s pozitivní kontrolou (DHT, 100 nM) (D). *,**,**** (p<0,05; 0,01; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (B, C), nebo od buněk s DHT (D).

5.2.2 Efekt BPS na genovou expresi AR a proliferační aktivitu v buňkách rakoviny prostaty

Jelikož BPS má synergistický účinek společně s DHT na AR (obrázek 9D), rozhodl jsem se zjistit, jestli je tento efekt přenesen i na jeho cílový gen KLK3. Zaměřil jsem se na 22Rv1 (ze kterých je linie AIZ-AR) odvozena a zatímco pozitivní kontrola DHT zvýšila expresi mRNA KLK3 1,9x, tak BPS nevykazoval žádný efekt (obrázek 10A) což je v korelaci s agonistickým módem pro luciferázovou aktivitu (obrázek 9C). Nicméně, v případě antagonistického módu nedošlo k zopakování efektu (obrázek 10B) a BPS neměl žádný vliv na hladinu mRNA KLK3.

Protože v buňkách 22Rv1 se vyskytuje nejen klasická verze AR (AR-FL) ale i jeho zkrácené verze postrádající LBD a patří tedy k buňkám na androgenech nezávislých, rozhodl jsem se pro porovnání použít i linii LNCaP, která obsahuje pouze AR-FL. V této linii DHT indukoval expresi mRNA KLK3 průměrně 8mi násobně ale stejně jako v případě 22Rv1 neměl BPS v agonistickém ani antagonistickém módu žádný pozorovatelný efekt (obrázek 10D a 10E). Přestože se pozorovaný synergismus BPS a DHT na luciferázovou aktivitu neprojevil na hladině cílového genu AR, pořád tu byla možnost vlivu na proliferaci. U androgenního receptoru bylo prokázáno zapojení do regulace buněčného cyklu stejně tak i jeho vliv na proliferaci buněk [147], proto jsem použil kit na zjištění proliferace pomocí inkorporace 5-Bromo-2'-deoxyuridinu do DNA proliferujících buněk. V případě 22Rv1 neměl BPS v kombinaci s DHT žádný efekt na jejich proliferaci (obrázek 10C), ale u buněčné linie LNCaP došlo ke koncentračně závislému potlačení proliferace v přítomnosti BPS a DHT (obrázek 10F).



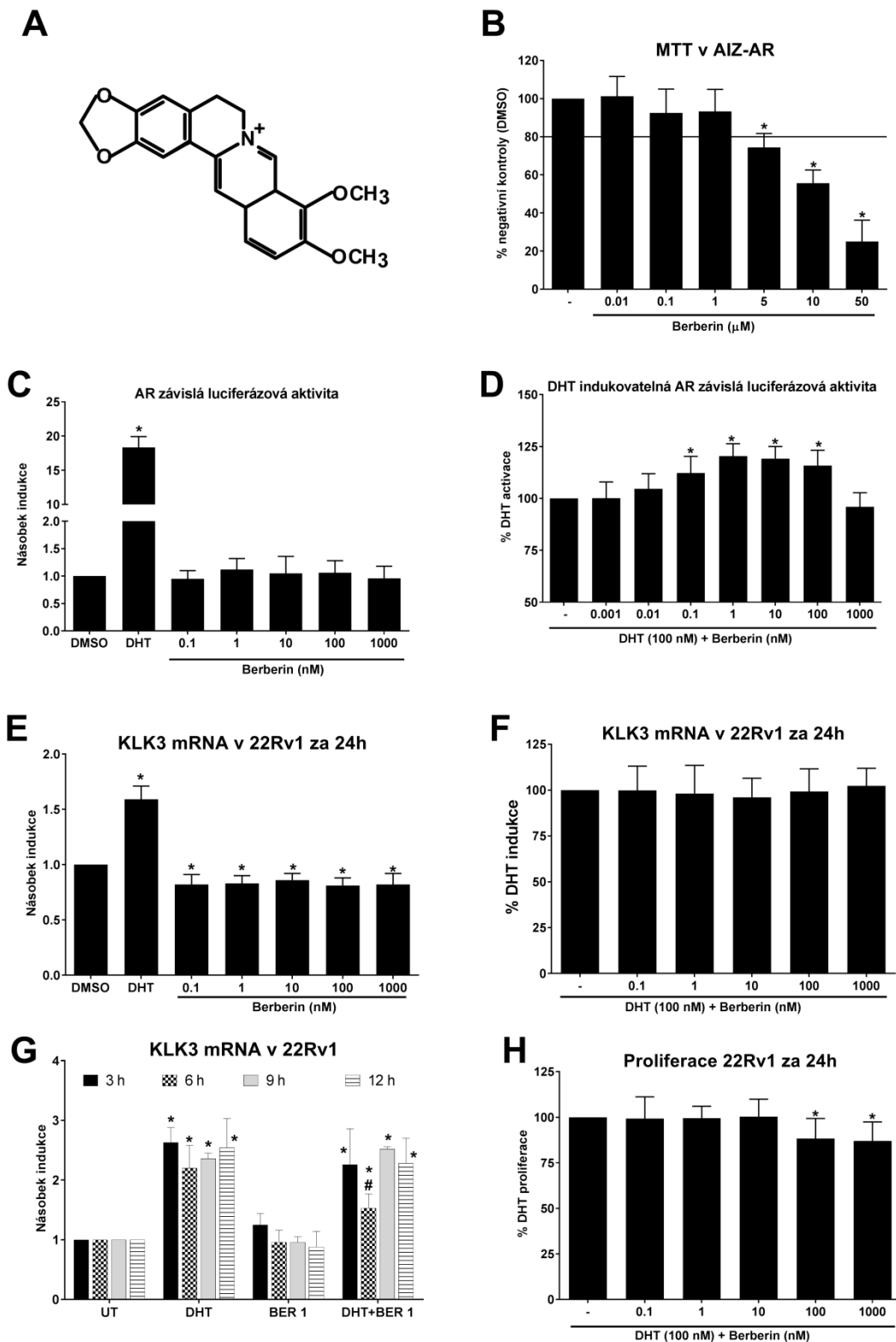
Obrazek č. 10: Vliv bisfenolu S na cílové geny AR a proliferační aktivitu v rakovině prostaty. 22Rv1 (A, B, C) nebo LNCaP (D, E, F) byly inkubovány s bisfenolem S (BPS; 0,1 – 100 μM) (A, D) nebo současně (B, C, E, F) s DHT (100 nM) anebo s DMSO (0,1% v/v) jako negativní kontrolou. Množství mRNA KLK3 (A, B, D, E) byly po 24h detekovány podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek indukce oproti negativní kontrole (DMSO) (A, D) normalizované na expresi GAPDH ze tří nezávislých experimentů. Výsledky pro D a E jsou vyjádřeny jako procenta pozitivní kontroly (DHT) normalizované na expresi GAPDH ze tří nezávislých experimentů. Detekce proliferace (C, F) byla provedena podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“ a výsledky jsou vyjádřeny jako procenta DHT proliferace, přičemž se jedná o průměr ze čtyř nezávislých experimentů. *, **, *** ($p < 0,05$; 0,01; 0,001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (A, D) nebo od buněk s DHT (F).

5.3 Farmakologicky relevantní koncentrace berberinu přechodně stimulují dihydrotestosteronem indukovatelnou luciferázovou aktivitu zprostředkovanou AR v lidských rakovinných buňkách prostaty

5.3.1 Berberin moduluje transkripční aktivitu AR a proliferaci buněk rakoviny prostaty

Jako první bylo potřeba určit netoxické koncentrace berberinu (struktura na obrázku 11A). K tomu jsem použil linii AIZ-AR (odvozenou od 22Rv1) a MTT test viability, přičemž za 24h koncentrace nad 5 μ M klesly pod mnou stanovenou hranici 80% a byly tedy z dalšího testování vyloučeny (obrázek 11B) a maximální použitá koncentrace pro další experimenty byla 1000 nM. Pomocí metody s reportérovým genem, která sledovala schopnost berberinu modulovat transkripční aktivitu AR pomocí exprese luciferázy nedošlo při použití samotného berberinu k žádné aktivaci AR (obrázek 11C), přičemž DHT dosahoval až 20ti násobné indukce oproti vzorku pouze s DMSO. Naopak v antagonistickém módu, tedy kombinaci DHT s berberinem došlo k synergistickému účinku a zvýšení transkripční aktivity receptoru přibližně o 20% (obrázek 11D).

Jako další věc jsem zjišťoval, jestli se tento efekt přenáší i na cílový gen androgenního receptoru KLK3. Pro tyto účely jsem použil 22Rv1, od kterých jsou AIZ-AR použité při genové reportérové assay odvozené. V tomto případě neměl berberin společně s DHT vliv na expresi KLK3 (obrázek 11F), ale při jeho samotném použití došlo ke statisticky významnému poklesu hladiny mRNA KLK3 přibližně o 20% (obrázek 11E) a to již při nejnižší použité koncentraci (0,1 nM), nicméně tento pokles nebyl koncentračně závislý. Jelikož mRNA pro KLK3 může mít jiný čas degradace než exogenní luciferáza, sledoval jsem i kratší časy (obrázek 11G), kde se myšlenka potvrdila. Došlo k významné změně hladiny mRNA KLK3 za 6h v případě kombinace berberinu s DHT. Kratší nebo delší čas neměl na jeho hladinu žádný efekt. Dále jsem se rozhodl, že když berberin ovlivňuje hladinu mRNA pro KLK3, prostudovat i jeho možné zapojení do proliferace rakovinných buněk. Zjistil jsem malý, ale významný pokles proliferace 22Rv1 pro dvě nejvyšší koncentrace (100 a 1000 nM) za 24h (obrázek 11H).

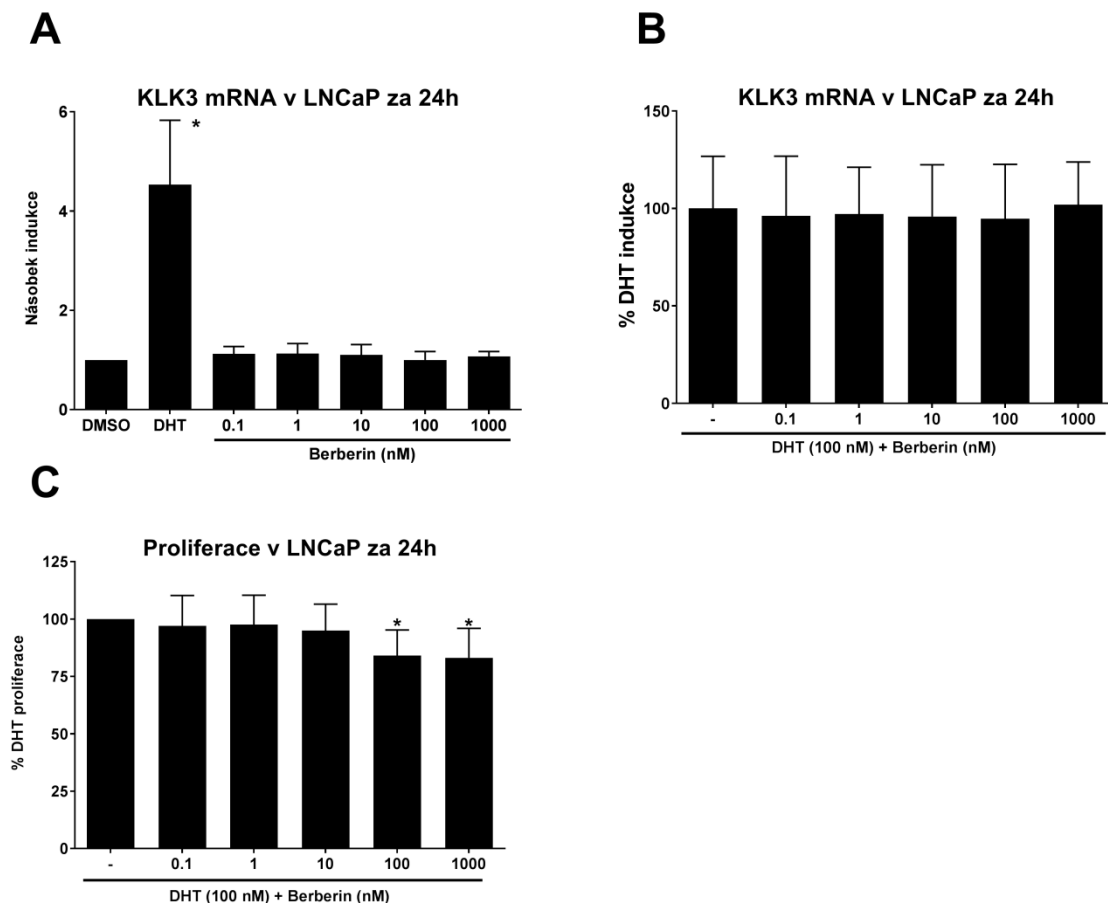


Obrázek č. 11: Vliv berberinu na aktivitu androgenního receptoru v 22Rv1 (A) Struktura berberinu (BER). (B) AIZ-AR byly inkubovány s berberinem (BER; 0,01 – 50 μM) anebo s DMSO (0,1% v/v) jako negativní kontrolou po dobu 24h. AIZ-AR byly inkubovány s BER (0,01 – 1 μM) samotným (C) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (D) po dobu 24h a poté byla změřena luciferázová aktivita podle postupu popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 5ti (C) nebo 7mi (D) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena

jako násobek aktivace AR proti negativní kontrole (DMSO) (C), nebo jako procenta pozitivní kontroly (DHT) (D). 22Rv1 byli inkubováni s BER (0,01 – 1 μ M) samotným (E) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (F) po dobu 24h a poté byla změřena exprese mRNA KLK3 podle postupu popsání v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 4 (E, F) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce mRNA KLK3 proti negativní kontrole (DMSO) (E), nebo jako procenta indukce mRNA KLK3 pozitivní kontroly (DHT) (F) a data byla normalizována na množství exprese mRNA pro GAPDH. (G) 22Rv1 byly inkubovány s BER (1 nM) anebo s DHT (100 nM) případně v kombinaci obou látek po dobu 3, 6, 9 a 12h a DMSO bylo použito jako negativní kontrola. Data jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce mRNA pro KLK3 oproti negativní kontrole (DMSO) a jsou normalizována na expresi GAPDH. (H). 22Rv1 byly inkubovány s BER (0,1 – 1000 nM) v kombinaci s DHT (100 nM) po dobu 24h a poté byla změřena proliferace podle postupu popsání v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 3 nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako procenta proliferace oproti buňkám s DHT. *, ($p < 0,05$) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (B, C, E, G), nebo od buněk s DHT (D, H). #, ($p < 0,05$) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od buněk s DHT (G).

5.3.2 Vliv berberinu na aktivitu AR v LNCaP

Jelikož všechny předchozí experimenty byly prováděny v buněčné linii 22Rv1, které kromě AR-FL exprimují prokazatelně i AR-V7 a jejich aktivace AR je tedy konstantní a nezávislá na androgenech, rozhodl jsem se otestovat případný vliv berberinu i na buněčné linii LNCaP, která exprimuje pouze AR-FL. Nicméně, základní hladina mRNA KLK3 nebo indukovaná pomocí DHT nebyla berberinem ovlivněna (obrázek 12A a 12B) stejně jako v případě 22Rv1. V případě proliferace došlo také k jejímu poklesu pro dvě nejvyšší koncentrace (100 a 1000 nM) přibližně o 20% (obrázek 12C).

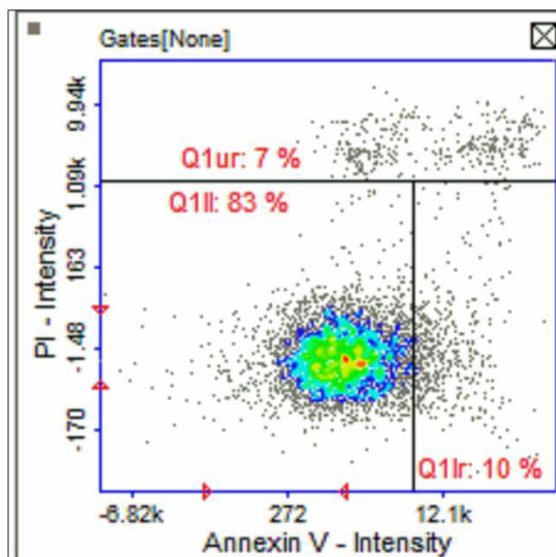


Obrázek č. 12: Vliv berberinu na aktivitu androgenního receptoru v na androgenech závislých buňkách. LNCaP byly inkubovány s berberinem (BER; 0,1 – 1000 nM) samotným (A) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (B) po dobu 24h a poté byla změřena mRNA pro KLK3 podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 3 (A, B) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce mRNA pro KLK3 proti negativní kontrole (DMSO) (A), nebo jako procenta indukce mRNA pro KLK3 pozitivní kontroly (DHT) (B) a data byla normalizována na množství exprese mRNA GAPDH. (C) LNCaP byly inkubovány s berberinem (BER; 0,1 – 1000 nM) a DMSO jako negativní kontrolou po dobu 24h. Poté byla změřena proliferace podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 3 (C) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako procenta proliferace DHT. *, ($p < 0,05$) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (DMSO) (A) nebo od buněk s DHT (C).

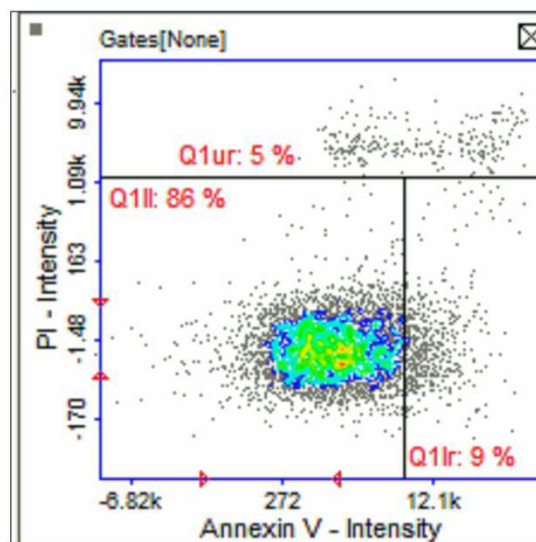
5.3.3 Vliv berberinu na apoptózu v 22Rv1 buňkách

V obou prostatických rakovinných liniích došlo k statisticky signifikantnímu snížení proliferace pro dvě nejvyšší použité koncentrace. Z důvodu možného vysvětlení těchto událostí, jsem se zaměřil na prozkoumání možnosti ovlivnění apoptózy berberinem. Sledoval jsem intenzitu Annexinu V (detailní postup Annexin V assay je v kapitole „materiál a metodika“), který je používán jako marker apoptózy. Ve vzorcích, kde byl přítomen berberin, a to jak samotný (obrázek 13 část BER) nebo v kombinaci s DHT (obrázek 13 část

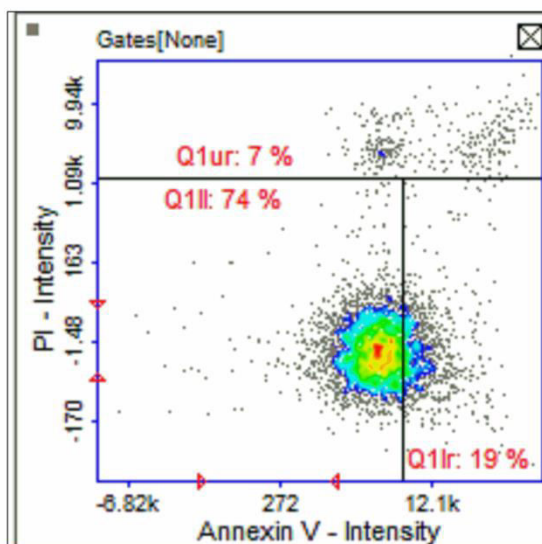
BER+DHT), došlo k výraznějšímu barvení pomocí V-CF488A a posunu oproti vzorkům negativní kontroly (obrázek 13 část UT) a vzorku pouze s DHT (obrázek 13 část DHT), což naznačuje větší množství brzkých apoptotických událostí (obrázek 13; pravý sektor v každém obrázku). Jelikož však tento efekt nebyl ovlivněn DHT, domnívám se, že v něm není zapojen androgenní receptor.



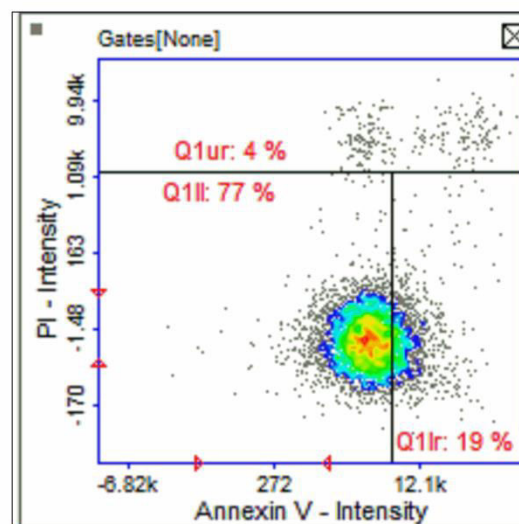
UT



DHT



BER



BER + DHT

Obrázek č. 13: Vliv berberinu na signál Annexinu V v 22Rv1. 22Rv1 byly inkubovány s berberinem (BER; 1 000 nM) samotným (BER) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (BER+DHT) po dobu 24h a poté byla měřena Annexin V assay podle postupu popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou vyjádřena jako intenzita propium jodidu vůči intenzitě Annexinu V-CF488A v populaci buněk.

5.4 Vliv grafen oxidu na signalizaci androgenního receptoru

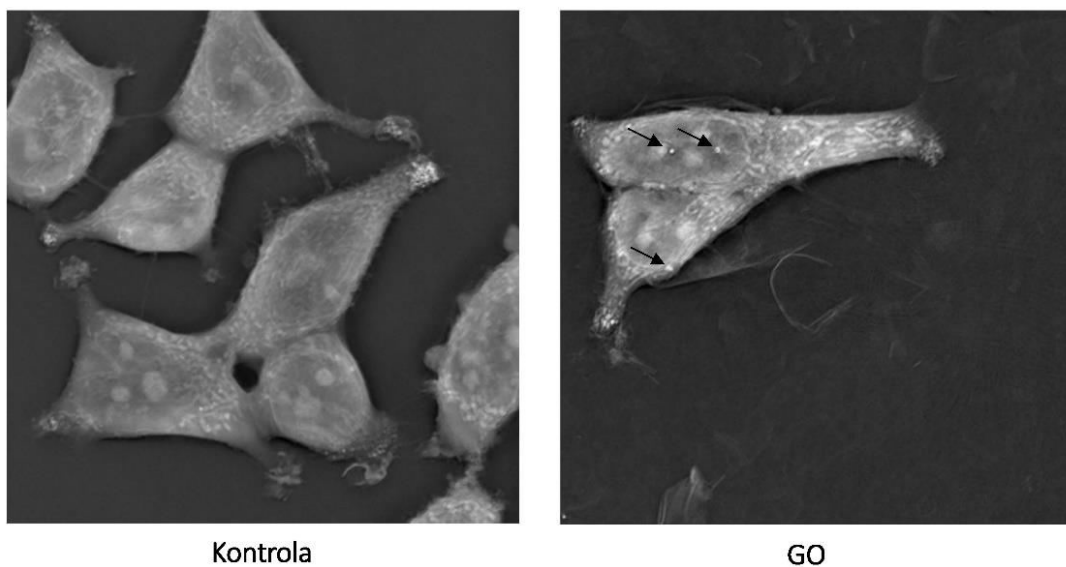
5.4.1 Vliv GO na viabilitu buněčné linie

Již několikrát bylo popsáno, že GO proniká dovnitř buněk a může měnit morfologii, případně spouštět kaskádu dějů [148], proto jsem se jako první zaměřil na ověření této informace i u buněk, které jsem se chystal použít. Za pomoci přístroje pro holotomografii (3D Cell Explorer) jsem provedl vizualizaci buněk ve 3D a jak je vidět na obrázku č. 14A, oproti kontrolním buňkám jsou pozorovatelné morfologické změny a bílé tečky, které jsou pravděpodobně shluky částic GO akumulované uvnitř buněk. Jako další jsme provedli měření zeta potenciálu GO částic a jejich hydrodynamického průměru kvůli jejich lepší charakterizaci v rámci používaného média (obrázek č. 14B).

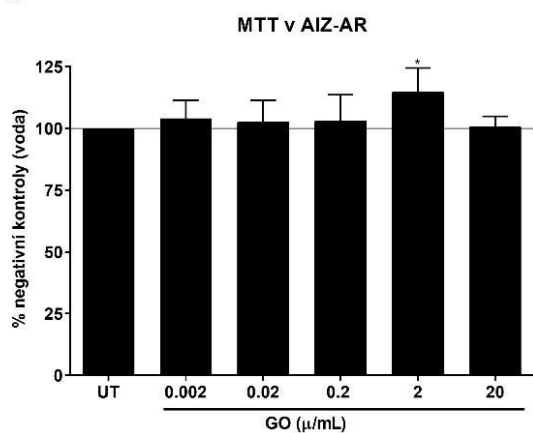
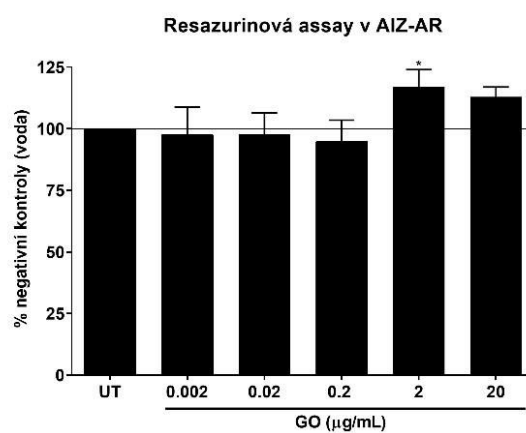
Nakonec bylo ještě třeba určit možnou toxicitu GO a stanovit rozsah koncentrací pro práci. K tomu účelu jsem použil dvě metody, MTT a resazurinovu assay, jelikož bylo popsáno, že GO může spontánně redukovat MTT a tak ovlivnit výsledné měření [149]. Jak je vidět na obrázku č. 14C a D, nikde nedochází k poklesu viability a pouze pro koncentraci 2 µg/ml dochází k malému ale statisticky signifikantnímu zvýšení viability přibližně o 15%.

5.4.2 Vliv GO na aktivitu androgenního receptoru

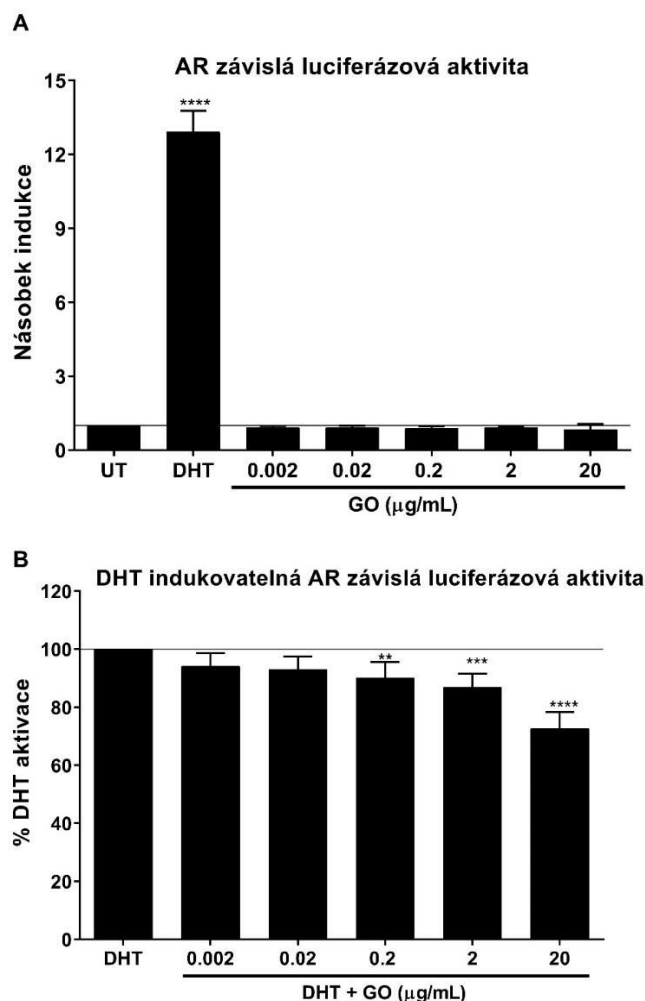
Použitím metody s reportérovým genem, která sledovala schopnost grafen oxidu modulovat transkripční aktivitu AR pomocí exprese luciferázy nedošlo v případě samotného GO k žádné aktivaci AR (obrázek 15A), ale pozitivní kontrola v tomto (DHT 100 nM) dosahovala až 13ti násobné indukce oproti vzorku pouze s vodou. Opačný efekt nastal v případě kombinace GO s DHT, kde pro tři nejvyšší koncentrace došlo k signifikantnímu snížení DHT indukované luciferázové aktivity (obrázek 15B), což ukazuje na možnost modulace AR pomocí GO.

A**B**

	Z-potenciál, mV		Hydrodynamický průměr, nm	
	Zásobní roz. (voda)	Buněčná linie (medium)	Zásobní roz. (voda)	Buněčná linie (medium)
GO (SigmaAldrich/Merck)	-33.9	-6.0	65.29	5.033

C**D**

Obrázek č. 14: Vliv grafen oxidu na viabilitu buněčné linie (A) Vizualizace buněk pomocí holotomografie. V případě GO (20 µg/ml) jsou vidět shluky částic (bílé tečky označené šipkami). (B) Zeta potenciál použitých částic. AIZ-AR byly inkubovány s grafen oxidem (0,002-20 µg/ml) po dobu 24h a poté měřeny metodou MTT (C) nebo resazurinovou metodou (D). Data jsou průměrem ze tří experimentů a byly vyhodnoceny pomocí jednorozměrného ANOVA testu *, ($p < 0,05$). Chybové úsečky jsou zobrazeny jako standardní odchylka od průměru (SEM).

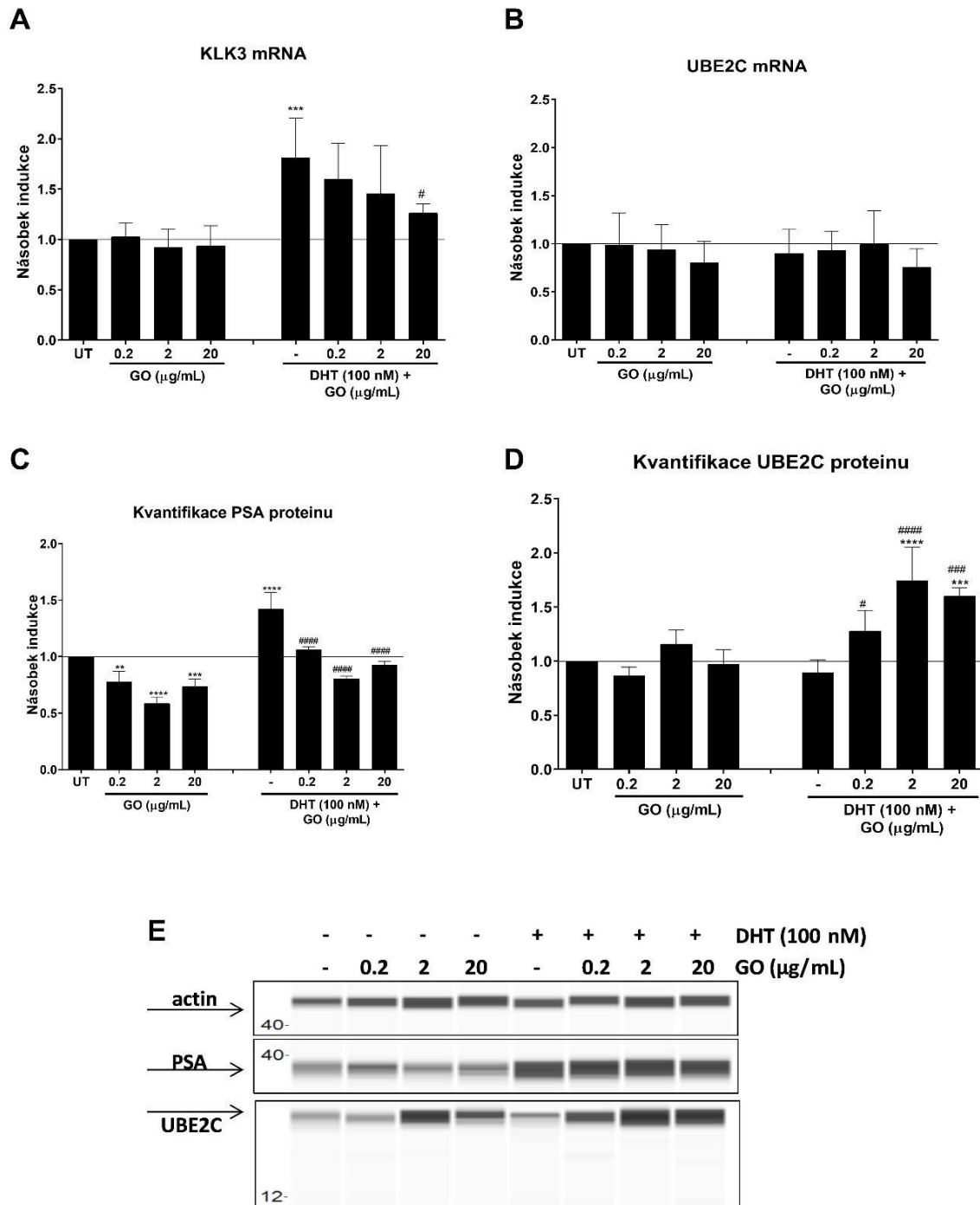


Obrázek č. 15: Vliv grafen oxidu na aktivitu androgenního receptoru AIZ-AR byly inkubovány s grafen oxidem (0,002-20 μg/ml) samotným (A) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (B) po dobu 24h a poté byla změřena luciferázová aktivita podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 5ti (A a B) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek aktivace AR proti negativní kontrole (voda) (A), nebo jako procenta pozitivní kontroly (DHT) (B). **,***,**** (p<0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda) (A), nebo od buněk s DHT (B).

5.4.3 Vliv GO na cílové geny androgenního receptoru

Jelikož při předchozích pokusech GO signifikantně modulovat aktivitu AR pomocí změny v indukovatelné aktivitě luciferázy, rozhodnul jsem se zaměřit na cílové geny androgenního receptoru. Protože v buněčné linii 22Rv1 jsou přítomny dvě verze AR, analyzoval jsem hladinu KLK3 (kontrolovaná plnou verzí AR) a hladinu UBE2C (kontrolovaná AR-V7) [150], ale nezjistil jsem žádný efekt GO na hladinu mRNA UBE2C (obrázek č. 16B). Hladina mRNA KLK3 také nebyla ovlivněna, ale v případě indukované exprese KLK3 pomocí DHT došlo k jejímu signifikantnímu snížení (obrázek č. 16A). Na základě těchto zjištění jsem se rozhodnul sledovat možný efekt i na translační úrovni.

V případě PSA došlo k mírnému, ale signifikantnímu poklesu proteinu (obrázek č. 16C levá část). Pokud byla hladina PSA indukována pomocí DHT, došlo k terminaci tohoto navýšení již s nejnižší použitou koncentrací (obrázek č. 16C pravá část). V případě UBE2C, kde na úrovni mRNA nebyla pozorována žádná změna (obrázek č. 16B) však došlo překvapivě k navýšení množství proteinu v přítomnosti DHT (obrázek č. 16D).



Obrázek č. 16: Vliv grafen oxidu na cílové geny androgenního receptoru. 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 μg/ml) samotným (A a B levá část grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (A a B pravá část grafu) po dobu 24h a poté byla změřena mRNA pro KLK3 nebo UBE2C podle postupu popsáno v kapitole

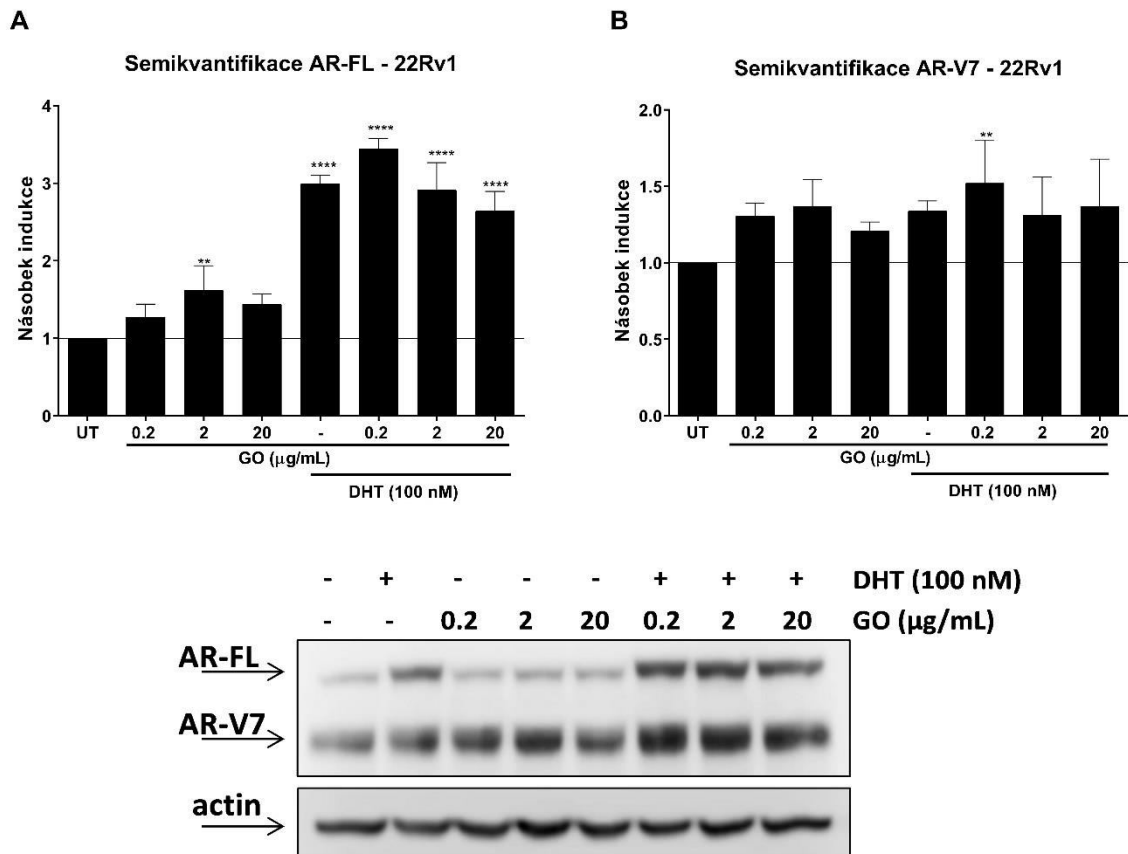
„materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 5ti (KLK3) nebo 7mi (UBE2C) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce mRNA KLK3 a UBE2C proti negativní kontrole (voda). Data byla normalizována na množství exprese mRNA GAPDH. (C, D) 22Rv1 byly inkubovány se vzrůstající koncentrací grafen oxidu (0,002-20 µg/ml) (C a D levá část grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (C a D pravá část grafu) po dobu 24h. Poté byly buňky lyzovány a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“ pomocí přístroje Sally Sue. Data jsou vyjádřena jako násobek indukce vůči negativní kontrole (voda). (E) Reprezentativní výsledek detekce proteinů pomocí Sally Sue. Výsledky jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů. **, ***, **** (p<0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda). #, ###, #### (p<0,05; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od buněk s DHT. Data byly statisticky vyhodnoceny pomocí jednorozměrného ANOVA testu.

5.4.4 Vliv GO na hladinu androgenního receptoru v 22Rv1

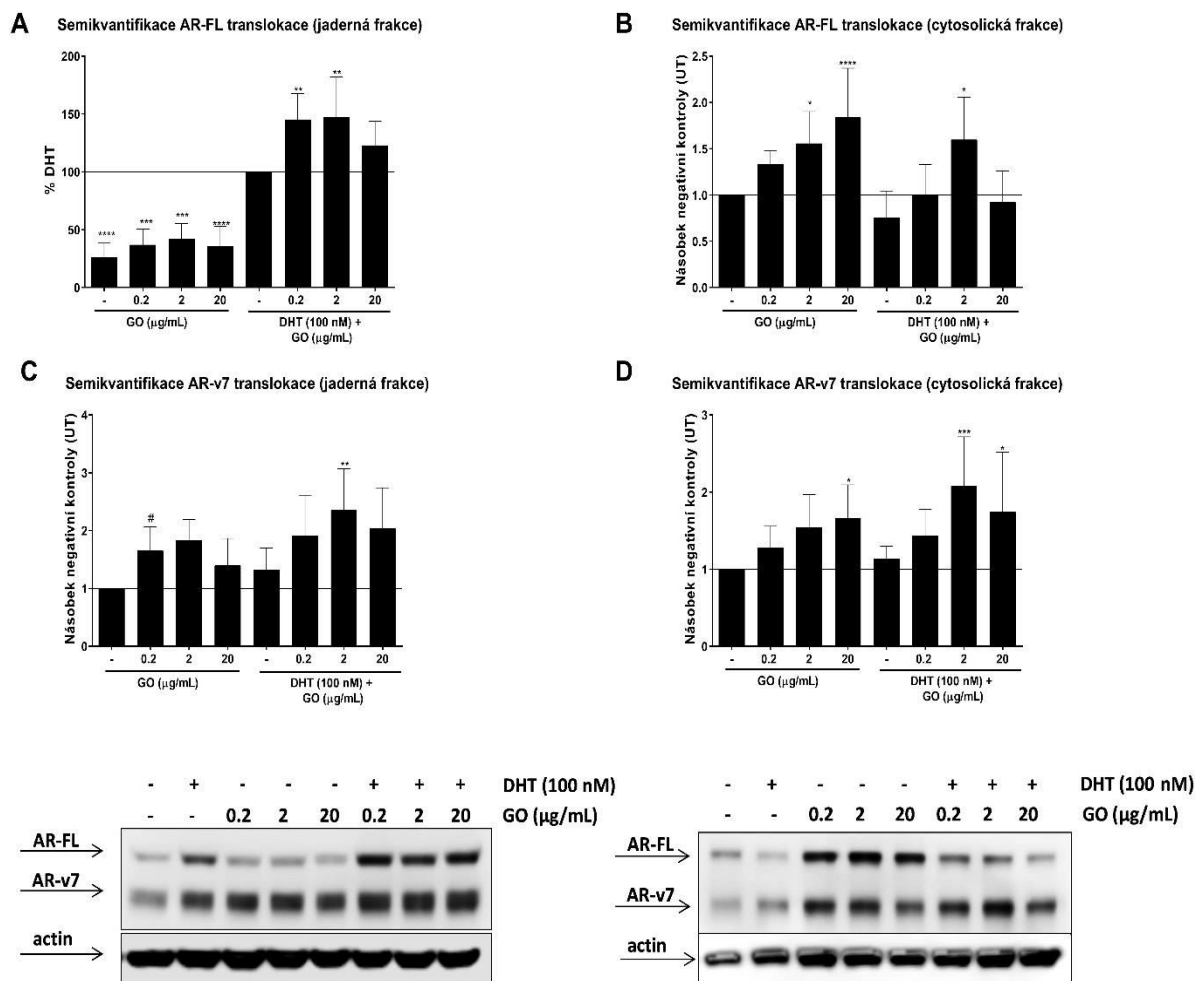
Po měření exprese cílových genů obou variant AR jsem se rozhodnul analyzovat, zdali GO ovlivňuje samotný AR a tím se jeho efekt může přenášet i na cílové geny receptoru. Grafen oxid slabě, nicméně signifikantně, zvyšuje množství AR-FL přibližně o 50 % (obrázek č. 17A levá část), ale v přítomnosti DHT dochází k mírnému avšak nesignifikantnímu poklesu pro dvě nejvyšší koncentrace (obrázek č. 17A pravá část). Zkrácená verze receptoru, AR-V7, je pouze mírně zvýšena působením GO za přítomnosti DHT pro nejnižší použitou koncentraci (obrázek č. 17B). Zbytek koncentrací (ať už za přítomnosti DHT nebo bez) ukazoval nárůst množství AR-V7, ale nikoliv signifikantně. Spodní část obrázku č. 17 ukazuje reprezentativní výsledek detekce proteinů.

5.4.5 Modulace translokace AR-FL a AR-V7 pomocí GO v 22Rv1

Nedílnou součástí signalizace AR je jeho translokace do jádra a zpuštění transkripce nebo inhibice transkripce cílových genů. Protože je pomocí GO pozměněná transkripce, izoloval jsem od sebe cytosolickou a nukleární frakci, kde jsem detekoval množství AR. Jak je vidět na obrázku č. 18A, samotný grafen oxid má jen minimální efekt na translokaci AR-FL, ale téměř o 50% zvyšuje jeho translokaci po stimulaci DHT. V cytosolu GO zvyšoval množství AR-FL až dvojnásobně v závislosti na použité koncentraci (obrázek č. 18B levá část) a potlačoval efekt DHT obrázek č. 18B pravá část). Množství AR-V7 v jaderné frakci bylo jen mírně zvýšeno působením GO a tento efekt byl mírně zvýšen působením DHT (obrázek č. 18C). V cytosolické frakci došlo ke koncentračně závislému zvýšení množství AR-V7 po působení grafen oxidu samotného (obrázek č. 18D levá část) a v případě, že byl přítomen i DHT byl tento efekt lehce stimulován (obrázek č. 18D pravá část).



Obrázek č. 17: Vliv grafen oxidu na množství AR-FL a AR-V7. 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 µg/ml) samotným (A a B levá polovina grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (A a B pravá polovina grafu) po dobu 24h. Poté byly buňky lyzovány a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce AR-FL a AR-V7 proti negativní kontrole (voda). Data jsou normalizována na expresi aktinu. **,**** (p<0,01; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda). Pod grafy je zobrazen reprezentativní výsledek detekce proteinů.



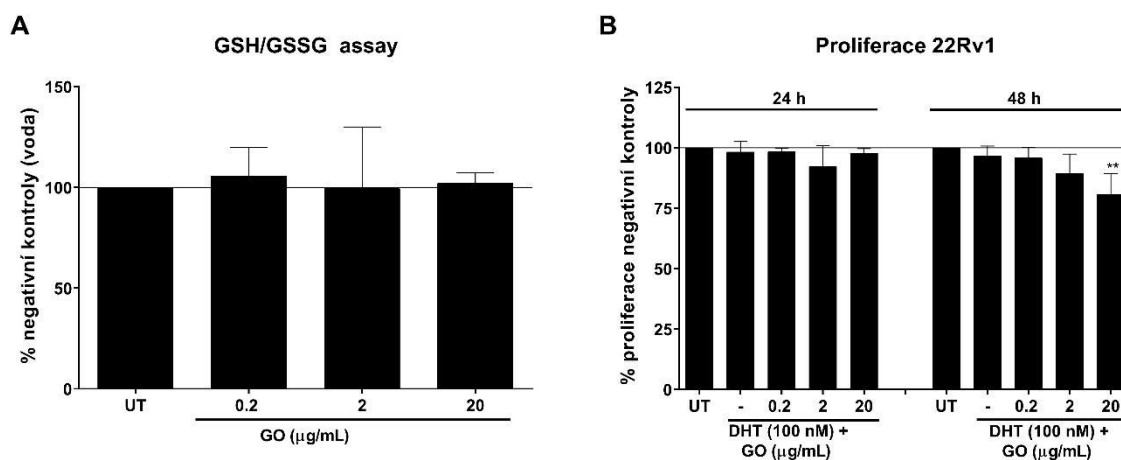
Obrázek č. 18: Translokace AR-FL a AR-V7. 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 µg/ml) samotným (A, B, C a D levá polovina grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (A, B, C a D pravá polovina grafu) po dobu 24h. Poté byla izolována jaderná a cytosolická frakce jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“ a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 8mi nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce (B, C a D) AR-FL a AR-V7 proti negativní kontrole (voda) nebo jako procenta indukce oproti pozitivní kontrole (DHT). Data jsou normalizována na expresi aktinu. *, **, ***, **** (p<0,05; 0,01; 0,001; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda). #, (p<0,05) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od buněk s DHT. Pod grafy je zobrazen reprezentativní výsledek detekce proteinů.

5.4.6 Vliv GO na tvorbu reaktivních forem kyslíku a proliferaci

Jelikož vlivem grafen oxidu došlo k poklesu mRNA pro KLK3, což koreluje i s poklesem hladiny proteinu (obrázek č. 16A a C), jedna z možností jak vysvětlit tento jev je tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které by mohly ovlivňovat stabilitu PSA. A protože pomocí holotomografie (obrázek č. 16A) je GO detekován uvnitř buněk (jádro i cytosol), může přispívat k vytváření oxidativního stresu. K tomuto jsem použil metodu pro měření množství redukované a oxidované formy glutathionu, důležitého

antioxidantu, jehož poměr se při oxidačním stresu změní. Nicméně za 24h nedošlo k žádné změně (obrázek č. 19A).

Dalším zajímavým zjištěním byl nález signifikantního zvýšení hladiny UBE2C proteinu v kombinaci GO a DHT (obrázek č. 16). Jelikož UBE2C participuje v buněčném dělení, vyvstala potřeba ověřit, zda bude nějakým způsobem ovlivněna proliferace. Zatímco morfologie buněk byla změněná (obrázek č. 14A), samotná proliferace 22Rv1 nebyla ovlivněna za 24h a vykazovala jen mírný signifikantní koncentračně závislý pokles za 48h pro nejvyšší použitou koncentraci (obrázek č. 19B).

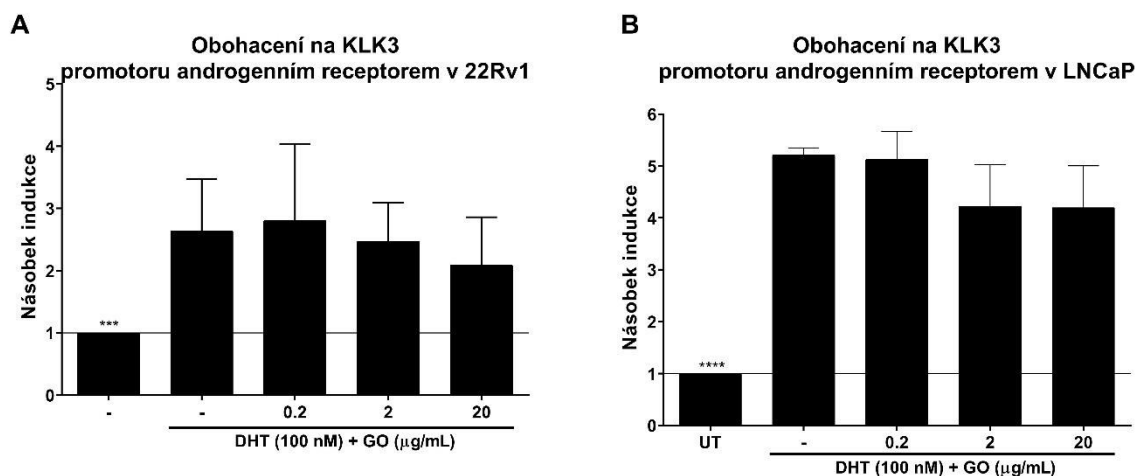


Obrázek č. 19: Proliferace 22Rv1 a GSH/GSSG assay (A) 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 µg/ml) samotným po dobu 24h. Poté byla provedena GSH/GSSH luciferázová assay jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. (B) 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,002-20 µg/ml) a DHT (100 nM) po dobu 24h nebo 48h a poté byla provedena proliferační assay jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 3 (GSH/GSSH assay) nebo 4 (proliferační assay) nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako procenta negativní kontroly (A, voda) nebo jako procenta proliferace vůči DHT (B). . **, (p<0,01) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda).

5.4.7 Modulace obohacení KLK3 promotoru androgenním receptorem pomocí GO

Pomocí předchozích experimentů jsem prokázal že GO moduluje hladinu AR proteinu. Další z kroků v objasnění mechanismu bylo použití metody chromatinové imunoprecipitace. Sledoval jsem možnost navýšení vazby AR do promotorové oblasti KLK3 genu, ale v případě buněčné linie 22Rv1 došlo jen k mírnému, nesignifikantnímu poklesu v případě kombinace GO a DHT, přičemž samotný DHT dokázal zvýšit vazbu AR přibližně 2,5x (obrázek č. 20A). Protože linie 22Rv1 je na androgenech nezávislá, obsahuje i variantu AR-v7, a nevyžaduje tak pro aktivaci cílových genů ligandy AR, rozhodl jsem se použít v experimentu i linii LNCaP, která obsahuje pouze AR-FL a je definována jako na

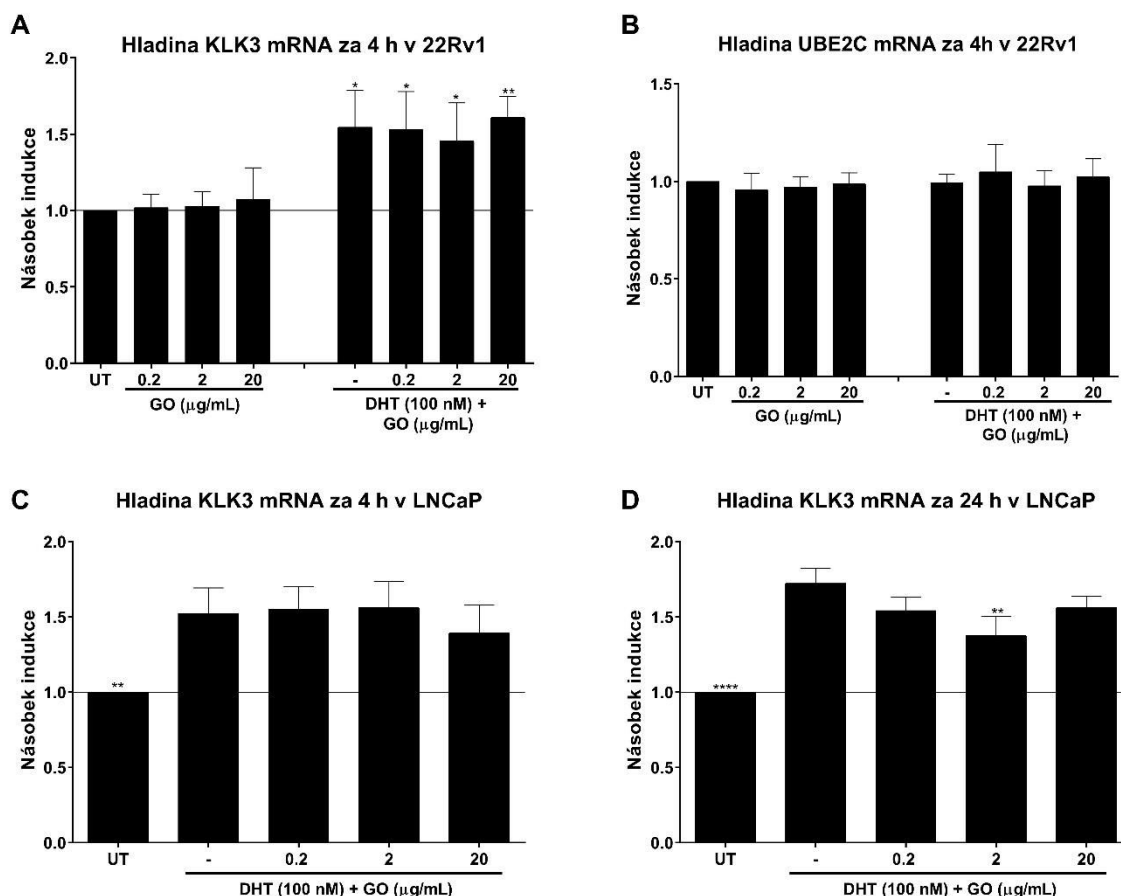
androgenech závislá rakovinná buněčná linie. Obohacení KLK3 promotoru v LNCaP po působení DHT bylo průměrně 5ti násobné, ale přítomnost grafen oxidu vedla, stejně jako v případě 22Rv1, pouze k mírnému nesignifikantnímu snížení (obrázek č. 20B).



Obrázek č. 20: Chromatinová imunoprecipitace (A a B). 22Rv1 a LNCaP byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 µg/ml) v přítomnosti DHT (100 nM) po dobu 90 min. a následně byla provedena chromatinová imunoprecipitace assay jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem z 9ti (22Rv1) nebo 5ti (LNCaP) nezávislých experimentů.

5.4.8 Modulace exprese cílových genů AR v 22Rv1 a LNCaP grafen oxidem

Chromatinová imunoprecipitace neukázala žádný vliv GO na obohacení promotoru KLK3 v 22Rv1 nebo LNCaP, ale jelikož LNCaP jsou na androgenech závislá buněčná linie, rozhodl jsem se prozkoumat, zdali má GO stejný efekt na cílové geny jako v případě 22Rv1 a to i za kratší časový interval. V případě 22Rv1 však neměl GO žádný vliv na KLK3 a ani na cílový gen AR-v7 (UBE2C) za 4h (obrázek č. 21 A a B) a je tedy zřejmé, že zprostředkovaný efekt trvá delší čas. Stejných dat bylo dosaženo i v případě buněčné linie LNCaP, kde za 4h nebyla pozorována žádná změna způsobená GO (obrázek č. 21C), ale za 24h došlo ke slabému, avšak signifikantnímu snížení DHT modulované exprese mRNA KLK3 pro druhou nejvyšší koncentraci GO (2 µg/ml) a efekt GO v LNCaP je tedy podobný jako v případě 22Rv1 (obrázek č. 21D a obrázek č. 16).

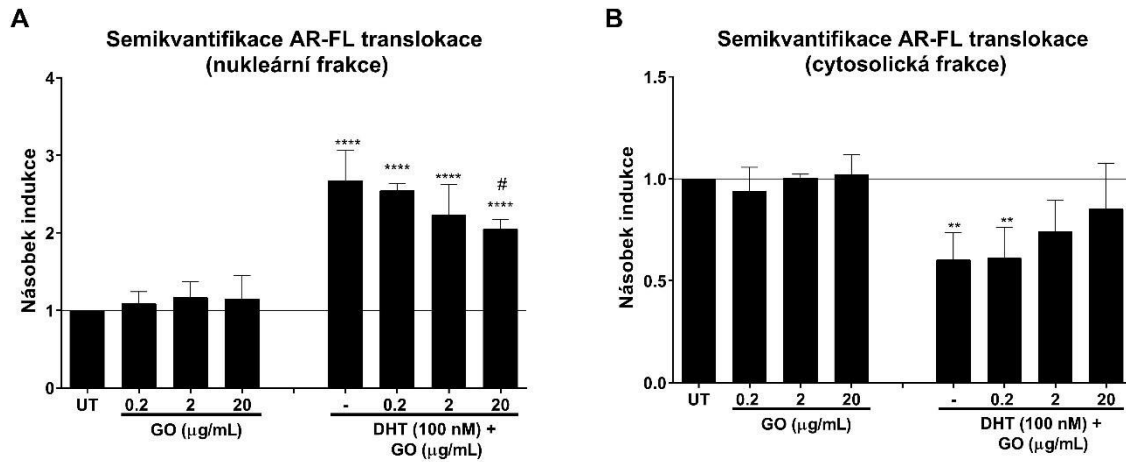


Obrázek č. 21: Vliv grafen oxidu na cílové geny AR v 22Rv1 a LNCaP . (A a B) 22Rv1 byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 $\mu\text{g/ml}$) samotným (A a B levá část grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (A a B pravá část grafu) po dobu 4h a poté byla změřena mRNA pro KLK3 nebo UBE2C podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 3 nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce mRNA KLK3 a UBE2C proti negativní kontrole (voda). Data byla normalizována na množství exprese mRNA GAPDH. (C, D) LNCaP byly inkubovány se vzrůstající koncentrací grafen oxidu (0,2-20 $\mu\text{g/ml}$) za přítomnosti DHT (100 nM) po dobu 4h (C) nebo 24h (D) a poté byla změřena mRNA podle postupu popsaného v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou vyjádřena jako násobek indukce vůči negativní kontrole (voda). Výsledky jsou průměrem ze 3 nezávislých experimentů. *,**,**** ($p < 0,05$; 0,01; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda v případě A a B) nebo od buněk s DHT (C a D).

5.4.9 Modulace translokace androgenního receptoru v LNCaP

Jako poslední krok detekce efektů GO na AR jsem zjišťoval, zdali grafen oxid může modulovat translokaci AR v LNCaP tak jako v případě 22Rv1. Samotná přítomnost grafen oxidu nevedla k žádné změně v množství AR (obrázek č. 22 A a B – levá strana). Pokud byl přítomen i DHT, lze sledovat koncentračně závislý pokles množství AR v jádře (obrázek č.

22A – pravá strana) což je komplementární ke koncentračně závislému potlačení DHT indukovatelnému poklesu AR-FL v cytosolu (obrázek č. 22 B – pravá strana).



Obrázek č. 22: Translokace AR-FL v LNCaP v přítomnosti GO (A a B) LNCaP byly inkubovány s grafen oxidem (0,2-20 μg/ml) samotným (A a B levá polovina grafu) nebo za přítomnosti DHT (100 nM) (A a B pravá polovina grafu) po dobu 24h. Poté byla izolována jaderná a cytosolická frakce jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“ a následovala detekce proteinů, jak je popsáno v kapitole „materiál a metodika“. Data jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů a jsou vyjádřena jako násobek indukce AR-FL proti negativní kontrole (voda). Data jsou normalizována na expresi aktinu. **,**** (p<0,01; 0,0001) - značí statisticky významně odlišnou hodnotu od kontrolních buněk (voda).

6 Diskuze

V předkládané práci se zabývám vlivem čtyř sloučenin na aktivitu androgenního receptoru. První z látek je imunosupresivní lék mykofenolát mofetil, který se projevil jako silný induktor KLK3 mRNA v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1, kdy dosáhl při nejvyšší mnou použité koncentraci (20 $\mu\text{g/ml}$) přibližně 80% indukce zprostředkované DHT, přirozeným ligandem AR. Nicméně tento efekt nebyl pozorován v LNCaP, což je na androgenech závislá buněčná linie a může tedy souviset právě s expresí transkripční varianty AR-v7. V případě přítomnosti DHT a zároveň MYC došlo u 22Rv1 pouze k mírnému signifikantnímu navýšení množství mRNA KLK3 (přibližně o 25%) zatímco u LNCaP byl pozorován signifikantní opačný efekt, a to pokles hladiny KLK3 mRNA indukované pomocí DHT o přibližně 80%. Stejný efekt měl MYC na obě buněčné linie v případě proliferace, a to její snížení, přičemž hodnota IC50 u 22Rv1 byla nižší oproti LNCaP (cca 1 $\mu\text{g/ml}$ oproti více jak 20 $\mu\text{g/ml}$), což ukazuje 22Rv1 jako daleko citlivější na antiproliferační efekty mykofenolátu. Jako možné vysvětlení lze opět brát v potaz přítomnost AR-v7, která má povětšinou protektivní účinky a podporuje proliferaci [151]. Přitom podle kritérií dr. Duna [152] patří, podle našich zjištění, LNCaP mezi velmi odolné a 22Rv1 mezi středně citlivé co se reakce na MYC týče. Důvodem by mohla být právě zkrácená varianta AR, kterou linie obsahuje. AR-v7 je hojně přítomná v CRPC [153].

Jako další jsem zjistil, že MYC podporuje translokaci AR-FL do jádra v přítomnosti DHT, ale samostatně nemá žádný vliv, přičemž translokace AR-v7 zůstává nezměněná. Také zvyšuje expresi MAPK8 a MAPK9 (JNK46/54), což vede k jejich zvýšené hladině, ale zároveň ke sníženému množství jejich fosforylovaných verzí. Tyto výsledky jsou shodné s prací Dr. Andreucciho, který prokázal snížení fosforylace NF- κ B a JNK v lidských ledvinových proximálních tubulárních buňkách po aplikaci mykofenolové kyseliny (použití koncentrace MYC byla v rozmezí 16 – 160 $\mu\text{g/ml}$) [145].

Pro vysvětlení rozdílných efektů MYC v 22Rv1 a LNCaP může být mnoho důvodů. Primárním cílem MYC je IMPDH II, kde působí inhibičně a ovlivňuje tak syntézu nových purinů a jelikož je stejná exprese tohoto enzymu v obou buněčných liniích [154], je možné se domnívat, že jde o jeden z efektů zprostředkovaných přímo vlivem na AR (který je klíčovým v regulaci růstu rakoviny prostaty), případně na jeho variantu (22Rv1 obsahují AR-v7).

Sice je MYC používán jako inhibitor syntézy purinů, ale bylo prokázáno, že moduluje mnoho buněčných drah ovlivněním exprese genů nebo právě změnou fosforylace. Jedním

z efektů MYC je snížení množství fosforylovaného PI3K, AKT a mTOR pozorovaného v buněčné linii AGS (odvozená od adenokarcinomu žaludku) a společně s nimi bylo ovlivněno i mnoho regulátorů buněčného cyklu jako CDK4, BUB1 nebo Aurora. Stejně tak myši, do nichž byly vpraveny AGS xenografty měli po aplikaci MYC výrazně nižší nádory [152]. Dalším významným zjištěním je, že mnoho kináz a fosfatáz se podílí na regulaci exprese AR-v7 [155]. A jelikož nejen tato práce potvrzuje vliv na fosforylaci dalších proteinů (konkrétně MAPK8 a MAPK9 v našem případě) může právě tohle být vysvětlení zvýšené citlivost 22Rv1.

Tyto data potvrzují příznivé protinádorové účinky mykofenolátu, a navíc se otevírá možnost monitorování hladiny IMPDH II v nádorech a následné použití MYC pro léčbu onkologicky nemocných pacientů (převážně s rakovinou prostaty), jelikož mykofenolát je již odzkoušený lék a nejsou nutné nové klinické studie pro posouzení bezpečnosti. Tohle prokazují i retrospektivní studie na pacientech, kteří používali mykofenolát a měli snížené riziko malignity [156]. Stejně tak by mohlo jít o nový způsob podpůrné léčby, kdy by se využívalo více látek najednou. V tomto případě tedy např. kombinace mykofenolátu a dalšího protinádorového léčiva, třeba EPI, což je nová slibně vyhlížející sloučenina cílící pouze na část aktivační funkce 1 androgenního receptoru bez jakýchkoliv dalších vedlejších efektů [157].

Další zajímavé závěry přinesly i výsledky výzkumu prováděné na bisfenolu S coby bezpečné náhradě za svého předchůdce bisfenol A (BPA). Jelikož se jedná o široce používanou látku v průmyslu a naneštěstí je uvolňována i do jídla a pití, bylo nutné prozkoumat její efekty na jaderné receptory. Pro tuto práci jsem ovšem z článku vybral pouze data, týkající se androgenního receptoru (zbytek dat na ostatních receptorech je publikován v článku) [158].

Samotný BPS neaktivoval androgenní receptor, ale v kombinaci s DHT došlo ke stimulaci aktivity AR přibližně o 25 % pro nejvyšší použitou koncentraci (100 μ M). Zajímavým faktem ovšem je, že BPS dokázal sice slabě, ale signifikantně stimulovat aktivitu AR i při nejnižší použité koncentraci (10 nM), která se přibližuje hladinám běžným v populaci (0,37 μ g/l což je přibližně 1,48 nM) [159]. Tento efekt se však nepřenesl na cílový gen pro AR a to jak v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1 tak na androgenech závislé linii LNCaP. Jediný další vliv BPS byl pozorován na proliferaci, kde v linii LNCaP došlo ke koncentračně závislému snížení proliferace, a to o více než 25 %. Tento jev však nebyl potvrzen v linii 22Rv1, což může být dáno přítomností AR-v7, který tak může chránit před účinky BPS. Jedno z vysvětlení, proč nebyla pozorována žádná změna v hladině mRNA

KLK3 je ten, že zatímco došlo k modulaci aktivity AR za přítomnosti DHT (obrázek č. 9D) a stejně tak k poklesu proliferace (obrázek č. 10F) výsledný produkt genu KLK3 se žádným způsobem nepodílí na buněčném cyklu a efekt BPS může směřovat k jiným genům.

Tyto teorie navíc podporuje zjištění, že BPS reaguje se čtyřmi koregulačními proteiny AR a s dalšími dvanácti nereaguje [160] a jelikož v LNCaP není žádná další varianta AR, může tímto způsobem docházet k modulaci jeho aktivity, která pak ovlivňuje proliferaci této buněčné linie. V případě 22Rv1 i když je ovlivněn AR-FL, tak AR-v7 neobsahující ligand vazebnou doménu může nahradit sníženou expresi genů, což mé výsledky podporují. Zajímavým faktem také je, že moje zjištění je v rozporu s výzkumem dr. Rosenmai [161]. Ve své práci použil buňky z vaječníku čínského křečka transfekované plazmidem s AR a reportérovým genem, přičemž následně zjistil že, BPS vykazuje slabou inhibici aktivity androgenního receptoru. Jedním z možných vysvětlení je nevhodnost použitého systému, jelikož buňky křečka jsou více vzdálené reálnému chování AR a BPS v lidském těle než námi použitá buněčná linie 22Rv1. V každém případě to ale ukazuje na slabinu používání reportérových linií, protože i když v našem případě došlo k synergistickému efektu na aktivitu AR, tak tyto výsledky nebyly potvrzeny na cílovém genu a v případě proliferace byl efekt opačný. Dobrou zprávou ovšem je, že společně s jeho dalšími efekty na mnou zkoumané jaderné receptory [158] a daty, které naměřily ostatní výzkumné skupiny lze říci, že BPS vykazuje mnohem méně interakcí s ligandy-aktivovanými receptory než BPA.

Předposlední studovanou sloučeninou v mé práci je berberin, hojně se vyskytující přírodní sloučenina, s níž přichází do styku mnoho lidí v jídle nebo v rámci potravinových doplňků a důležitý prekurzor ve farmacii. Z důvodu vysoké toxicity berberinu (již při koncentraci 5 μM docházelo k poklesu viability o více než 20%) jsem používal koncentrace nanomolární, které tak lépe odpovídají fyziologické koncentraci jaké lze dosáhnout. Samotný berberin v našem systému s reportérovým genem nedokázal modulovat aktivitu AR zatímco pozitivní kontrola zvýšila luciferázovou aktivitu téměř 20x oproti kontrolním buňkám. Opačná situace však nastala v přítomnosti DHT, kde docházelo k pozitivní modulaci aktivity androgenního receptoru a signifikance byla zaznamenána již při 0,1 nM, přičemž nejvyšší použité koncentrace působili spíše inhibičně (obrázek č. 11D). Tento efekt se ovšem nepřenáší na cílový gen AR KLK3 a to jak v buněčné linii 22Rv1 tak v případě LNCaP. Jediný efekt měl berberin samotný, a to snížení bazální hladiny mRNA pro KLK3 v 22Rv1 přibližně o 10% bez zjevného efektu závislého na koncentraci, jelikož maximální odezvy bylo dosaženo nejspíše již nejnižší možnou koncentrací (100 pM). Nicméně proliferace byla snížena, sice slabě ale signifikantně, pro obě použité linie což odpovídá pozorování, které

provedl dr. Li, že berberin potlačuje signalizaci AR v rakovině prostaty a indukuje apoptózu. Dokonce podle jeho zjištění dochází ke snížení množství PSA a AR, ale při 100 μM koncentraci, která je z reálného *in vivo* hlediska nemožná [162]. Zvýšenou apoptózu jsem prokázal také pomocí měření intenzity Annexinu V a to ve fyziologicky mnohem relevantnějších koncentracích (obrázek č. 13).

Další výzkumy zjišťující farmakokinetiku pracovali se skupinami dobrovolníků, jimž orálně podávali berberin, došly k rozdílným plazmatickým koncentracím (přibližně 1000x) [163, 164]. Je tedy otázkou, proč se dosažené výsledky tak liší a jestli výzkumné týmy použily správnou metodiku. Důležité také je, že mnoho pozitivních výsledků, které jsou berberinu přisuzovány při použití v myších xenograftech, bylo dosaženo subkutánní nikoliv orální cestou, což zajisté hraje významnou roli v distribuci i metabolismu látky [162]. Další otázkou je, zda inhibice proliferace, stejně tak zvýšená apoptóza, není jen důsledkem jiných efektů nezávislých na AR a zda tedy berberin skutečně ovlivňuje AR (jelikož ovlivnění aktivity v našem systému vneseného genu nemusí reflektovat realitu). Je nutné poznamenat, že zvýšení luciferázové aktivity není nejvyšší pro nejvyšší použitou koncentraci berberinu což, kdyby tomu tak bylo, by mohlo odpovídat jejímu hromadění a případně inhibici její degradace, ale je vrácena na úroveň, kterou indukoval DHT. Tohle tedy spíše podporuje teorii, že berberin působí na AR případně na proteiny ho ovlivňující než jako falešně pozitivní výsledek. Jedním z vysvětlení může být, že berberin působí na kinázu podobně, jako bylo prokázáno u environmentálního polutantu bisfenolu A, který spouští expresi a fosforylaci p53 na pozici S15, což vede k inhibici buněčného cyklu [165]. Podobná data byla naměřena i LNCaP, kde berberin silně indukoval expresi p53, ale tento efekt nebyl přítomen v linii PC-3, která je sice také odvozena z rakoviny prostaty, ale neobsahuje žádný AR, což jen podporuje teorii o působení berberinu skrz AR [135]. Je tedy možné, že berberin ovlivňuje aktivitu kináz jejichž cílem je AR, který je sám silně fosforylovaný (viz obrázek č. 2). Přesný mechanismus jsem sice neobjasnil, ale jako jeden z mála autorů pracuji s fyziologicky relevantními koncentracemi, které stále ukazují možné benefity berberinu případně naději pro jeho deriváty, které by mohly vykazovat lepší účinky. Navíc, jedná se o přírodní látku, kterou lze zakoupit jako potravní doplněk, takže v případě použití berberinu v podpůrné terapii by nebylo nutné zahajovat klinické testy pro zjištění jeho bezpečnosti.

Posledním cílem mého výzkumu se stal grafen oxid, nadějný derivát grafenu, označovaného často jako materiál budoucnosti. Důvodem pro studování této látky bylo potvrzení nebo vyvrácení, zdali může fungovat jako lipofilní nosič pro androgeny a modulovat tak signalizaci androgenního receptoru. Podobná modulace aktivity jaderného

receptoru byla totiž pozorována v případě signalizace AhR v buněčné linii PLHC-1 odvozené z ryby živoroděnky lesklé (*Poeciliopsis lucida*) [166], kde GO fungoval jako nosič pro lipofilní látky a zvyšoval tak signalizaci zprostředkovanou AhR. Jedná se o důležité zjištění, jelikož mnoho polutantů ve vodním prostředí je zároveň i ligandy aryl uhlovodíkového receptoru a GO tak může přispět ke zvýšení toxicity pro některé vodní živočichy. Otázkou tedy zůstává, zda je tohoto grafen oxid schopen i u AR a může se tedy chovat jako endokrinní disruptor v případě signalizace zprostředkované androgenním receptorem.

Jako první věc jsem stanovil vhodný koncentrační rozsah GO pro použití v dalších exoerimentech. Vycházel jsem z článku o vlivu grafen oxidu na AhR signalizaci, kde nejvyšší použitá koncentrace byla 16 µg/ml, proto jsem koncentrační rozsah použitý v mém případě zvolil v rozmezí 0,002-20 µg/ml GO pro možnost posouzení koncentračně závislých efektů. Kromě standardně používané MTT metody pro stanovení viability jsem použil i resazurinovou assay, jelikož vlivem GO může docházet k samovolné redukci MTT na formazan čímž dochází ke zkreslování výsledků [149]. V mém případě ovšem nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi výsledky z obou metod (obrázek č. 14C a D) a dokonce došlo k mírnému avšak signifikantnímu navýšení viability pro druhou nejvyšší použitou koncentraci (2 µg/ml). Tyhle výsledky tedy mohou poukazovat na stejnou toxicitu GO jak v případě lidských buněk, tak buněk živoroděnky lesklé, kdy nejvyšší koncentrace vykazovaly zajímavé efekty (potenciační účinek na indukci cytochromu CYP1A1 ligandy ahR a tím zvýšení účinné koncentrace AhR agonistů, ...), ale nikoliv toxicitu, která by znemožňovala experimenty. Mimo jiné bylo pozorováno, že grafen oxid proniká dovnitř buněk A549 (plicní buňky)[148]. V mém případě po použití holotomografického zobrazení 3D modelu buňky je zřejmé, že částice GO do buněk nejen pronikají (obrázek č. 14A, bílé tečky označené černými šipkami v jádře i cytoplazmě), ale celková morfologie buněk je změněná oproti kontrolní skupině, což ukazuje na stejné výsledky chování částic, ke kterým došli ostatní výzkumné skupiny.

Jako další jsem zjistil, že GO v přítomnosti DHT způsobuje koncentračně závislý pokles DHT indukované AR zprostředkované luciferázové aktivity a tento efekt je přenášen i na cílový gen pro AR-FL a to KLK3. Silnější efekt dokonce vykazuje cílový produkt mRNA pro KLK3 protein PSA, který je již při nejnižší použité koncentraci snížen zpět na bazální úroveň. Opačný efekt nastává v případě proteinu UBE2C, který je regulován variantou AR-v7 [167], a to zvýšení jeho hladiny. Ovlivnění genové exprese KLK3 pomocí nanočástic je v souladu s poznatky literatury, kde GO a GO funkcionalizovaný vanilinem vykazovaly imunomodulační efekty v buněčné linii THP-1 skrz změněnou transkripci genů a ovlivnění oxidačního stresu [168]. Ovlivnění genové exprese však bylo pozorováno i u jiných

nanočástic, jako třeba stříbra, došlo ke snížení produkce aflatoxinu B1 snížením transkripce genů [169].

Jedním z vysvětlení této skutečnosti (ovlivnění exprese mRNA a proteinu) může být ovlivnění hladiny receptorů, která by v případě zvýšení nebo snížení mohla ovlivnit i transkripci cílových genů. Nicméně, výsledky nepřinesli jednoznačnou odpověď. V případě AR-v7 došlo k mírnému a povětšinou nesignifikantnímu zvýšení a v případě AR-FL byl výsledek ještě slabší, ale stále signifikantní. Je tedy pravděpodobné, že ovlivnění cílových genů AR nebude způsobeno změnou množství receptoru samotného. Protože v případě zvýšení jeho množství lze logicky očekávat zvýšení transkripce i translace, a ne potlačení efektu DHT až na bazální úroveň.

Dalším z možných vysvětlení snížené úrovně cílových mRNA a proteinů může být změna v translokaci receptoru a tím i ovlivnění množství receptoru, který se může vázat na ARE. Výsledky byly v rozporu s očekáváním, jelikož kombinace DHT a GO naopak translokaci zvyšovala o 50% a samotný grafen oxid také stimuloval translokaci AR-FL i když nesignifikantně. Tímto tedy dochází ke zvyšování množství receptoru v jádře, který se může vázat na příslušnou sekvenci v promotorové oblasti cílových genů a nevysvětluje to mnou pozorovaný pokles hladiny cílového genu. V případě cytosolické frakce došlo ke koncentračně závislému zvýšení množství AR-FL, což koreluje s jeho celkovým zvýšeným množstvím. Je tedy možné, že podstatná část nově syntetizovaného AR je vlivem GO zadržováno v cytoplazmě a to koncentračně závislým způsobem. Zbytek je pravděpodobně translokován do jádra, což se ukazuje jeho mírně zvýšeným množstvím. Stejný efekt GO byl pozorován i v případě AR-v7 a to navýšení jeho množství v cytoplazmě i v jádře po použití GO samotného nebo kombinace GO a DHT.

Jelikož předchozí experimenty nevysvětlily koncentračně závislý pokles cílových genů AR-FL a AR-v7, zaměřil jsem se na možnost detekce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) způsobených GO, protože například v případě lidských keratinocytů indukuje jejich tvorbu a to následně ovlivňuje biochemismus buňky [170] nebo může změnit profil mastných kyselin a způsobit poškození plazmatické membrány u kvasinek (*Pichia pastoris*) [171]. Je tedy více než dost důkazů, že GO ovlivňuje biochemické dráhy uvnitř buňky a vliv na transkripci nebo případně stabilitu proteinu by se tu mohl vyskytovat. Nicméně, použití GSH/GSSG metody pro detekci redukované a oxidované formy glutathionu nevedlo k žádnému výsledku. Stejných dat bylo dosaženo i při zjištění proliferace buněčné linie 22Rv1 s malým rozdílem, jelikož za 48h při nejvyšší použité koncentraci byl zaznamenán mírný, ale signifikantní pokles proliferace.

Jedním z možných vysvětlení je i to, že AR je sice do jádra translokován a my tak můžeme pozorovat jeho navýšení v nukleární frakci, ale neváže se do promotorové oblasti cílových genů nebo se dokonce váže v menším množství a tím dochází k potlačení indukce exprese genů což se může z logiky věci projevit na proteinu. Chromatinová imunoprecipitace, kterou jsem sledoval obohacení AR v KLK3 promotoru, však neukázala žádné zvýšení obohacení, ale naopak slabé nesignifikantní snížení. Jelikož experiment byl proveden na buněčné linii 22Rv1, která je na androgenech nezávislá, zopakoval jsem chromatinovou imunoprecipitace i na linii LNCaP, která je na androgenech závislá a obsahuje pouze AR-FL. Zde jsem obdržel stejné výsledky jako v případě 22Rv1, pouze indukce obohacení KLK3 promotoru pomocí DHT byla logicky vyšší (2,5x v případě 22Rv1 a 5x v případě LNCaP). Nicméně, celkově nedošlo k žádným průkazným výsledkům v případě LNCaP a měření kratších časů také nevedlo k nějaké změně (obrázek č. 21A a C), byť jsem předpokládal že GO může spouštět kaskádu rychlých dějů, které časem vymizí.

Výše uvedená data naznačují, že se nejspíš jedná o ovlivnění převážně AR-v7, protože nebyla zaznamenána žádná změna exprese cílových genů v linii, která jej neobsahuje a stejně tak měření translokace v LNCaP vedlo ke opačným výsledkům jako na linii 22Rv1 (obrázek č. 18 a 22). Se vzrůstající koncentrací GO za přítomnosti DHT lze vidět sníženou translokaci AR do jádra, zatímco jeho množství se v cytosolu vrací téměř na bazální úroveň.

Získaná data nám v případě 22Rv1 z části poskytují možnost považovat grafen oxid za lipofilního nosiče. Pokud GO skutečně na sebe váže DHT a usnadňuje jeho vstup (či ho přímo navázaný na sobě vnáší do buňky) vysvětlovalo by to zvýšené množství AR-FL pro nejnižší koncentraci (které je pozitivně modulováno DHT), přičemž vyšší koncentrace už mohou působit spíše inhibičně a stejně tak i zvýšenou translokaci do jádra (větší množství receptoru i dostupného ligandu). Může se tedy částečně jednat o stejný mechanismus jako v případě AhR u *Poeciliopsis lucida*, kde GO funguje jako lipofilní nosič [166]. Tato teorie je ovšem v rozporu se získanými daty na linii LNCaP, kde docházelo k opačnému efektu na translokaci, a to bez ovlivnění exprese cílového genu a stejně tak to nevysvětluje snížení genové exprese u 22Rv1.

Vysvětlením můžou být další pozorované efekty GO. Bylo prokázáno, že grafen oxid již za 1h dokázal indukovat fosforylaci p38 a JNK v endoteliálních buňkách [172] a stejný mechanismus by se tedy mohl uplatňovat v prostatických buňkách. Mimo jiné je známo, že JNK je důležitý faktor v regulaci rakoviny prostaty, podílí se na apoptóze rakovinných buněk a fosforyluje AR na pozici S650, což negativně reguluje jeho aktivitu [173]. Další možností, jak vysvětlit získaná data tedy může být, že GO opravdu z části funguje jako lipofilní nosič.

V případě 22Rv1 je tedy navázaný DHT snadněji dostupný pro AR a my pozorujeme jeho nárůst v jaderné frakci, přičemž tato modulace je snížena pro nejvyšší koncentraci, která zase může většinu volného DHT vázat na sebe (jelikož se mění jenom koncentrace GO a nikoliv DHT). Nárůst celkového množství AR-FL v přítomnosti pouze GO může být ovlivněn dalšími mechanismy, které se nepodařilo odhalit. Ovšem po vstupu AR do jádra nemusí dojít k transkripci cílových genů, jak je vidět po použití metody chromatinové imunoprecipitace. Obohacení na promotoru KLK3 má spíše sestupný charakter, avšak signifikance nebyla prokázána. Nicméně samotný AR může být poté fosforylován JNK na pozici S650, kterou by aktivoval GO a tím by mohlo docházet k negativní regulaci cílových genů.

Vysvětlením, proč se tato data nepodařila tak jasně zopakovat na linii LNCaP, kde KLK3 je jen mírně ovlivněn, může být právě přítomnost AR-v7 a tím i větší citlivost na GO (stejný efekt větší citlivost oproti očekávání jsem pozoroval i v případě mykofenolátu mofetilu). Translokace v linii LNCaP také vykazovala opačný efekt, než byl pozorován v případě 22Rv1, nicméně cílový gen nebyl tak silně ovlivněn. Je tedy možné, že i přes snížené množství AR v jádře, stále zůstalo povětšinou dostačující množství na udržení bazální i indukované transkripční hladiny KLK3.

Všechna tato data ukazují nové zjištění ohledně regulace transkripční aktivity androgenního receptoru a poskytují tak relevantní informace, které mají farmakotoxikologický charakter, ale pro jejich detailní objasnění bude potřeba ještě dalších experimentů.

..

7 Závěr

Tato práce se zabývá vlivem léku (mykofenolát mofetil), potravního doplňku (berberin) a látek významných v průmyslu (grafen oxid, bisfenol S) na aktivitu androgenního receptoru.

Hlavní zjištění plynoucí z této práce jsou:

- Mykofenolát mofetil indukuje JNK 54 a JNK46 což ovlivňuje signalizaci androgenního receptoru v 22Rv1.
- Mykofenolát mofetil zvyšuje citlivost 22Rv1 na inhibitory JNK.
- Bisfenol S neovlivňuje cílový gen AR (KLK3) a společně se slabou modulací dalších jaderných receptorů se jeví jako bezpečnější náhrada bisfenolu A.
- Berberin ve fyziologicky relevantních koncentracích potlačuje proliferaci nádorových prostatických buněk.
- Grafen oxid potlačuje indukovanou expresi KLK3 a potencuje ligandem aktivovanou translokaci do jádra v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1

8 Seznam použité literatury

1. Jin, H.J., J. Kim, and J. Yu, *Androgen receptor genomic regulation*. *Transl Androl Urol*, 2013. **2**(3): p. 157-177.
2. Luccio-Camelo, D.C. and G.S. Prins, *Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011. **127**(1-2): p. 74-82.
3. Riihimaki, M., et al., *What do prostate cancer patients die of?* *Oncologist*, 2011. **16**(2): p. 175-81.
4. Vrzal, R., et al., *Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes*. *Toxicol Lett*, 2015. **238**(1): p. 43-53.
5. Lu, N.Z., et al., *International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: Glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors*. *Pharmacological Reviews*, 2006. **58**(4): p. 782-797.
6. Marsh, J.D., et al., *Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes*. *Circulation*, 1998. **98**(3): p. 256-261.
7. Sheridan, P.J., *Androgen Receptors in the Brain - What Are We Measuring*. *Endocrine Reviews*, 1983. **4**(2): p. 171-178.
8. Waliszewski, P., et al., *Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas*. *Journal of Surgical Oncology*, 1997. **64**(1): p. 3-11.
9. Bonne, C., et al., *Androgen Receptor in Human-Skin*. *British Journal of Dermatology*, 1977. **97**(5): p. 501-503.
10. Smith, P., et al., *Localization of Steroid-Hormone Receptors in the Pelvic Muscles*. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 1993. **50**(1): p. 83-85.
11. Abu, E.O., et al., *The localization of androgen receptors in human bone*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997. **82**(10): p. 3493-3497.
12. McCormick, P.D., et al., *Evidence for an Androgen Receptor in the Human-Placenta*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1981. **140**(1): p. 8-13.
13. Sajjad, Y., et al., *Expression of androgen receptors in upper human fetal reproductive tract*. *Human Reproduction*, 2004. **19**(7): p. 1659-1665.
14. Joyner, J., L. Hutley, and D. Cameron, *Intrinsic regional differences in androgen receptors and dihydrotestosterone metabolism in human preadipocytes*. *Hormone and Metabolic Research*, 2002. **34**(5): p. 223-228.
15. Sullivan, D.A. and J.A. Edwards, *Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjogren's syndrome*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1997. **60**(3-4): p. 237-245.
16. Davison, S.L. and R. Bell, *Androgen physiology*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2006. **24**(2): p. 71-77.
17. Sinnesael, M., et al., *Androgen Receptor (AR) in Osteocytes Is Important for the Maintenance of Male Skeletal Integrity: Evidence From Targeted AR Disruption in Mouse Osteocytes*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012. **27**(12): p. 2535-2543.
18. Vanderschueren, D., et al., *Androgens and bone*. *Endocrine Reviews*, 2004. **25**(3): p. 389-425.
19. Lai, J.J., et al., *Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems Lessons from Conditional AR Knockout Mice*. *American Journal of Pathology*, 2012. **181**(5): p. 1504-1512.
20. Rana, K., R.A. Davey, and J.D. Zajac, *Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models*. *Asian Journal of Andrology*, 2014. **16**(2): p. 169-177.

21. Monaghan, A.E. and I.J. McEwan, *A sting in the tail: the N-terminal domain of the androgen receptor as a drug target*. Asian Journal of Andrology, 2016. **18**(5): p. 687-694.
22. Shafi, A.A., A.H.E. Yen, and N.L. Weigel, *Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **140**(3): p. 223-238.
23. Tilley, W.D., M. Marcelli, and M.J. Mcphaul, *Expression of the Human Androgen Receptor Gene Utilizes a Common Promoter in Diverse Human Tissues and Cell-Lines*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(23): p. 13776-13781.
24. Giovannucci, E., et al., *The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(7): p. 3320-3323.
25. Gottlieb, B., et al., *The Androgen Receptor Gene Mutations Database: 2012 Update*. Human Mutation, 2012. **33**(5): p. 887-894.
26. Simental, J.A., et al., *Transcriptional Activation and Nuclear Targeting Signals of the Human Androgen Receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(1): p. 510-518.
27. Laspada, A.R., et al., *Androgen Receptor Gene-Mutations in X-Linked Spinal and Bulbar Muscular-Atrophy*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 77-79.
28. Callewaert, L., et al., *Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **306**(1): p. 46-52.
29. Ding, D.C., et al., *Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action*. Prostate, 2005. **62**(2): p. 133-139.
30. Gerber, H.P., et al., *Transcriptional Activation Modulated by Homopolymeric Glutamine and Proline Stretches*. Science, 1994. **263**(5148): p. 808-811.
31. Goto, K., et al., *Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between two distinct subnuclear compartments*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003. **85**(2-5): p. 201-208.
32. He, B., J.A. Kempainen, and E.M. Wilson, *FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(30): p. 22986-22994.
33. Wilson, E.M., *Analysis of Interdomain Interactions of the Androgen Receptor*. Androgen Action: Methods and Protocols, 2011. **776**: p. 113-129.
34. Shaffer, P.L., et al., *Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(14): p. 4758-4763.
35. Denayer, S., et al., *The Rules of DNA Recognition by the Androgen Receptor*. Molecular Endocrinology, 2010. **24**(5): p. 898-913.
36. Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz, *Steroid-Hormone Receptors - Many Actors in Search of a Plot*. Cell, 1995. **83**(6): p. 851-857.
37. Zilliacus, J., et al., *Structural Determinants of DNA-Binding Specificity by Steroid-Receptors*. Molecular Endocrinology, 1995. **9**(4): p. 389-400.
38. Cutress, M.L., et al., *Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor*. Journal of Cell Science, 2008. **121**(7): p. 957-968.
39. Haelens, A., et al., *The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor*. Cancer Research, 2007. **67**(9): p. 4514-4523.
40. Matias, P.M., et al., *Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor - Implications for pathogenic gene mutations*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(34): p. 26164-26171.
41. Sack, J.S., et al., *Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(9): p. 4904-4909.

42. De Jesus-Tran, K.P., et al., *Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity*. *Protein Science*, 2006. **15**(5): p. 987-999.
43. Heery, D.M., et al., *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptor*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 733-736.
44. Torchia, J., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 677-684.
45. Dubbink, H.J., et al., *Androgen receptor ligand-binding domain interaction and nuclear receptor specificity of FXXLF and LXXLL motifs as determined by L/F swapping*. *Molecular Endocrinology*, 2006. **20**(8): p. 1742-1755.
46. Saporita, A.J., et al., *Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(43): p. 41998-42005.
47. Veldscholte, J., et al., *Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors*. *Biochemistry*, 1992. **31**(32): p. 7422-30.
48. Zoubeidi, A., et al., *Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity*. *Cancer Research*, 2007. **67**(21): p. 10455-10465.
49. Paul, A., et al., *The Cochaperone SGTA (Small Glutamine-rich Tetratricopeptide Repeat-containing Protein Alpha) Demonstrates Regulatory Specificity for the Androgen, Glucocorticoid, and Progesterone Receptors*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(22): p. 15297-15308.
50. Culig, Z., *Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer*. *J Cell Physiol*, 2016. **231**(2): p. 270-4.
51. Wang, L., C.L. Hsu, and C. Chang, *Androgen receptor corepressors: an overview*. *Prostate*, 2005. **63**(2): p. 117-30.
52. Heemers, H.V. and D.J. Tindall, *Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(7): p. 778-808.
53. Migliaccio, A., G. Castoria, and F. Auricchio, *Analysis of androgen receptor rapid actions in cellular signaling pathways: receptor/Src association*. *Methods Mol Biol*, 2011. **776**: p. 361-70.
54. Thompson, I.M., et al., *Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(8): p. 529-34.
55. Muller, R.L., et al., *Serum testosterone and dihydrotestosterone and prostate cancer risk in the placebo arm of the Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events trial*. *Eur Urol*, 2012. **62**(5): p. 757-64.
56. Goa, K.L. and C.M. Spencer, *Bicalutamide in advanced prostate cancer. A review*. *Drugs Aging*, 1998. **12**(5): p. 401-22.
57. Mukherji, D., C.J. Pezaro, and J.S. De-Bono, *MDV3100 for the treatment of prostate cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(2): p. 227-33.
58. Rathkopf, D.E., et al., *Safety and Antitumor Activity of Apalutamide (ARN-509) in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with and without Prior Abiraterone Acetate and Prednisone*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(14): p. 3544-3551.
59. Min, L., et al., *A novel synthetic androgen receptor ligand, S42, works as a selective androgen receptor modulator and possesses metabolic effects with little impact on the prostate*. *Endocrinology*, 2009. **150**(12): p. 5606-16.
60. Yousef, G.M. and E.P. Diamandis, *The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 184-204.
61. Balk, S.P., Y.J. Ko, and G.J. Bubley, *Biology of prostate-specific antigen*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(2): p. 383-91.

62. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4597-600.
63. Magee, J.A., et al., *Direct, androgen receptor-mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element*. Endocrinology, 2006. **147**(1): p. 590-8.
64. Faber, P.W., et al., *Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. The role of Sp1*. J Biol Chem, 1993. **268**(13): p. 9296-301.
65. Chen, S., et al., *Functional role of a conformationally flexible homopurine/homopyrimidine domain of the androgen receptor gene promoter interacting with Sp1 and a pyrimidine single strand DNA-binding protein*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(1): p. 3-15.
66. Deng, X., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 functions as an epigenetic activator of the androgen receptor to promote prostate cancer cell growth*. Oncogene, 2017. **36**(9): p. 1223-1231.
67. Verras, M., et al., *The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 967-75.
68. Graham, T.R., et al., *Reciprocal regulation of ZEB1 and AR in triple negative breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(1): p. 139-47.
69. DePrimo, S.E., et al., *Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0032.
70. Huang, W.C., H.E. Zhou, and L.W.K. Chung, *Androgen Receptor Survival Signaling Is Blocked by Anti-beta 2-microglobulin Monoclonal Antibody via a MAPK/Lipogenic Pathway in Human Prostate Cancer Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(11): p. 7947-7956.
71. Alimirah, F., et al., *Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53*. Neoplasia, 2007. **9**(12): p. 1152-1159.
72. Cai, C.M., et al., *Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1*. Cancer Cell, 2011. **20**(4): p. 457-471.
73. Alarid, E.T., N. Bakopoulos, and N. Solodin, *Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: A novel component in autologous down-regulation*. Molecular Endocrinology, 1999. **13**(9): p. 1522-1534.
74. Yeap, B.B., R.G. Krueger, and P.J. Leedman, *Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells*. Endocrinology, 1999. **140**(7): p. 3282-3291.
75. Tyagi, R.K., et al., *Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(8): p. 1162-74.
76. van der Steen, T., D.J. Tindall, and H. Huang, *Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(7): p. 14833-59.
77. Koryakina, Y., H.Q. Ta, and D. Gioeli, *Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences*. Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(4): p. T131-45.
78. Gioeli, D., et al., *Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29304-14.
79. Gordon, V., et al., *CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(12): p. 2267-80.
80. Hsu, F.N., et al., *Regulation of androgen receptor and prostate cancer growth by cyclin-dependent kinase 5*. J Biol Chem, 2011. **286**(38): p. 33141-9.
81. Chen, S., et al., *Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15969-74.
82. Rigas, A.C., C.N. Robson, and N.J. Curtin, *Therapeutic potential of CDK inhibitor NU2058 in androgen-independent prostate cancer*. Oncogene, 2007. **26**(55): p. 7611-9.

83. Russo, J.W., et al., *Phosphorylation of androgen receptor serine 81 is associated with its reactivation in castration-resistant prostate cancer*. *Cancer Lett*, 2018. **438**: p. 97-104.
84. Yang, C.S., et al., *Ligand binding to the androgen receptor induces conformational changes that regulate phosphatase interactions*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(9): p. 3390-404.
85. Wu, K., et al., *The role of DAB2IP in androgen receptor activation during prostate cancer progression*. *Oncogene*, 2014. **33**(15): p. 1954-63.
86. Lin, H.K., et al., *Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7200-5.
87. Deep, G., et al., *Isosilybin B causes androgen receptor degradation in human prostate carcinoma cells via PI3K-Akt-Mdm2-mediated pathway*. *Oncogene*, 2008. **27**(28): p. 3986-98.
88. Ha, S., et al., *Phosphorylation of the androgen receptor by PIM1 in hormone refractory prostate cancer*. *Oncogene*, 2013. **32**(34): p. 3992-4000.
89. Linn, D.E., et al., *Differential regulation of androgen receptor by PIM-1 kinases via phosphorylation-dependent recruitment of distinct ubiquitin E3 ligases*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(27): p. 22959-68.
90. Mahajan, N.P., et al., *Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(20): p. 8438-43.
91. Mahajan, K., et al., *Effect of Ack1 tyrosine kinase inhibitor on ligand-independent androgen receptor activity*. *Prostate*, 2010. **70**(12): p. 1274-85.
92. DePaolo, J.S., et al., *Acetylation of androgen receptor by ARD1 promotes dissociation from HSP90 complex and prostate tumorigenesis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(44): p. 71417-71428.
93. Fu, M., et al., *p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20853-60.
94. Fu, M., et al., *Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(23): p. 8563-75.
95. Gaughan, L., et al., *Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 25904-13.
96. Shiota, M., et al., *Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus*. *Prostate*, 2010. **70**(5): p. 540-54.
97. Halkidou, K., et al., *Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development*. *Oncogene*, 2003. **22**(16): p. 2466-77.
98. Ko, S., et al., *Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by Set9 methyltransferase*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(3): p. 433-44.
99. Gaughan, L., et al., *Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(4): p. 1266-79.
100. Coffey, K., et al., *The lysine demethylase, KDM4B, is a key molecule in androgen receptor signalling and turnover*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(8): p. 4433-46.
101. Xu, K., et al., *Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(4): p. 270-82.
102. Rees, I., et al., *The E3 ubiquitin ligase CHIP binds the androgen receptor in a phosphorylation-dependent manner*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1764**(6): p. 1073-9.
103. Lin, H.K., et al., *Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase*. *EMBO J*, 2002. **21**(15): p. 4037-48.
104. Li, B., et al., *Skp2 regulates androgen receptor through ubiquitin-mediated degradation independent of Akt/mTOR pathways in prostate cancer*. *Prostate*, 2014. **74**(4): p. 421-32.
105. McClurg, U.L., et al., *Identification of a novel K311 ubiquitination site critical for androgen receptor transcriptional activity*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(4): p. 1793-1804.

106. Nishida, T. and H. Yasuda, *PIAS1 and PIASx α function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41311-7.
107. Kaikkonen, S., et al., *SUMO-specific protease 1 (SENP1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(3): p. 292-307.
108. Rytinki, M., et al., *Dynamic SUMOylation is linked to the activity cycles of androgen receptor in the cell nucleus*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(20): p. 4195-205.
109. Cao, S., Y. Zhan, and Y. Dong, *Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(12): p. T199-T210.
110. Dehm, S.M. and D.J. Tindall, *Alternatively spliced androgen receptor variants*. Endocrine-Related Cancer, 2011. **18**(5): p. R183-R196.
111. Chen, X., et al., *Overexpression of nuclear AR-V7 protein in primary prostate cancer is an independent negative prognostic marker in men with high-risk disease receiving adjuvant therapy*. Urol Oncol, 2018. **36**(4): p. 161 e19-161 e30.
112. Hu, R., W.B. Isaacs, and J. Luo, *A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities*. Prostate, 2011. **71**(15): p. 1656-67.
113. Hu, R., et al., *Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(14): p. 3457-62.
114. Chan, S.C., et al., *Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(12): p. 5880-97.
115. Lu, C. and J. Luo, *Decoding the androgen receptor splice variants*. Transl Androl Urol, 2013. **2**(3): p. 178-186.
116. Antonarakis, E.S. and J. Luo, *Prostate cancer: AR splice variant dimerization-clinical implications*. Nat Rev Urol, 2015. **12**(8): p. 431-3.
117. Liu, C., et al., *Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(12): p. 3198-3210.
118. Sobhani, N., et al., *Current status of androgen receptor-splice variant 7 inhibitor niclosamide in castrate-resistant prostate-cancer*. Invest New Drugs, 2018. **36**(6): p. 1133-1137.
119. Dehm, S.M., et al., *Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5469-77.
120. Kallio, H.M.L., et al., *Constitutively active androgen receptor splice variants AR-V3, AR-V7 and AR-V9 are co-expressed in castration-resistant prostate cancer metastases*. Br J Cancer, 2018. **119**(3): p. 347-356.
121. Jia, B., et al., *Toxicological effects of bisphenol A exposure-induced cancer cells migration via activating directly integrin beta1*. Chemosphere, 2018. **220**: p. 783-792.
122. Grun, F. and B. Blumberg, *Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **8**(2): p. 161-71.
123. Sui, Y., et al., *Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(3): p. 399-405.
124. Vinas, P., et al., *Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(1): p. 115-125.
125. Simoneau, C., et al., *Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2011. **28**(12): p. 1763-8.

126. Liao, C., F. Liu, and K. Kannan, *Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(12): p. 6515-22.
127. Liao, C., et al., *Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(12): p. 6860-6.
128. Liu, J., et al., *Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum*. Environ Sci Technol, 2017. **51**(4): p. 2456-2463.
129. Grignard, E., S. Lapenna, and S. Bremer, *Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(5): p. 727-31.
130. Carr, S.F., et al., *Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27286-90.
131. Vrzal, R., et al., *The effects of drugs with immunosuppressive or immunomodulatory activities on xenobiotics-metabolizing enzymes expression in primary human hepatocytes*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(5): p. 1088-99.
132. Karimov, A., *Berberis Alkaloids*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1993(4): p. 481-506.
133. Xiao, C.W., et al., *Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against Microsporium canis -induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism*. BMC Complement Altern Med, 2015. **15**: p. 177.
134. Chen, W.H., et al., *Synthesis of linked berberine dimers and their remarkably enhanced DNA-binding affinities*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005. **15**(10): p. 2689-2692.
135. Choi, M.S., et al., *Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells*. International Journal of Oncology, 2009. **34**(5): p. 1221-1230.
136. Hur, J.M. and D. Kim, *Berberine inhibited radioresistant effects and enhanced anti-tumor effects in the irradiated-human prostate cancer cells*. Toxicol Res, 2010. **26**(2): p. 109-15.
137. Zhao, H., et al., *Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering*. Drug Discov Today, 2017. **22**(9): p. 1302-1317.
138. Sun, C., et al., *Graphene Oxide Nanosheets Stimulate Ruffling and Shedding of Mammalian Cell Plasma Membranes*. Chem, 2016. **1**(2): p. 273-286.
139. Feng, M., et al., *Potential disruption of protein-protein interactions by graphene oxide*. J Chem Phys, 2016. **144**(22): p. 225102.
140. Lee, S.W., et al., *Graphene oxide polarizes iNKT cells for production of TGF beta and attenuates inflammation in an iNKT cell-mediated sepsis model*. Scientific Reports, 2018. **8**.
141. Bartonkova, I., A. Novotna, and Z. Dvorak, *Novel Stably Transfected Human Reporter Cell Line AIZ-AR as a Tool for an Assessment of Human Androgen Receptor Transcriptional Activity*. Plos One, 2015. **10**(3).
142. Dorcakova, A., et al., *Differential effects of the enantiomers of tamsulosin and tolterodine on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017. **390**(1): p. 49-59.
143. Stepankova, M., et al., *Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor*. Mol Pharmacol, 2018. **93**(6): p. 631-644.
144. Pescovitz, M.D., et al., *Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics*. Clin Transplant, 2000. **14**(3): p. 179-88.
145. Andreucci, M., et al., *Mycophenolic acid inhibits the phosphorylation of NF-kappaB and JNKs and causes a decrease in IL-8 release in H2O2-treated human renal proximal tubular cells*. Chem Biol Interact, 2010. **185**(3): p. 253-62.
146. Zhang, T., et al., *Discovery of Potent and Selective Covalent Inhibitors of JNK*. Chemistry & Biology, 2012. **19**(1): p. 140-154.
147. Schiewer, M.J., M.A. Augello, and K.E. Knudsen, *The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012. **352**(1-2): p. 34-45.
148. Liao, Y., et al., *Reduced graphene oxide triggered epithelial-mesenchymal transition in A549 cells*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15188.

149. Worle-Knirsch, J.M., K. Pulskamp, and H.F. Krug, *Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays*. Nano Lett, 2006. **6**(6): p. 1261-8.
150. Cao, B., et al., *Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy*. Oncotarget, 2014. **5**(6): p. 1646-56.
151. Wang, S., et al., *Expression of Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7) in Circulated Tumor Cells and Correlation with Drug Resistance of Prostate Cancer Cells*. Med Sci Monit, 2018. **24**: p. 7051-7056.
152. Dun, B., et al., *Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anticancer activities of mycophenolic acid*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(12): p. 2880-6.
153. Hu, R., et al., *Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 16-22.
154. Floryk, D. and T.C. Thompson, *Antiproliferative effects of AVN944, a novel inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitor, in prostate cancer cells*. Int J Cancer, 2008. **123**(10): p. 2294-302.
155. Li, Y., et al., *AR-v7 protein expression is regulated by protein kinase and phosphatase*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33743-54.
156. Robson, R., et al., *Prospective registry-based observational cohort study of the long-term risk of malignancies in renal transplant patients treated with mycophenolate mofetil*. Am J Transplant, 2005. **5**(12): p. 2954-60.
157. Yang, Y.C., et al., *Targeting Androgen Receptor Activation Function-1 with EPI to Overcome Resistance Mechanisms in Castration-Resistant Prostate Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(17): p. 4466-77.
158. Zenata, O., Z. Dvorak, and R. Vrzal, *Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines*. Toxicol Lett, 2017. **281**: p. 10-19.
159. Lehmler, H.J., et al., *Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2014*. ACS Omega, 2018. **3**(6): p. 6523-6532.
160. Perera, L., et al., *Binding of bisphenol A, bisphenol AF, and bisphenol S on the androgen receptor: Coregulator recruitment and stimulation of potential interaction sites*. Toxicol In Vitro, 2017. **44**: p. 287-302.
161. Rosenmai, A.K., et al., *Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives?* Toxicological Sciences, 2014. **139**(1): p. 35-47.
162. Li, J., et al., *Berberine suppresses androgen receptor signaling in prostate cancer*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(8): p. 1346-56.
163. Li B, Z.M., Bao L., *Study on the pharmacokinetics of berberine after oral administration in human being*. Journal of Harbin Medical University, 1996. **29**:382-5.
164. Spinozzi, S., et al., *Berberine and its metabolites: relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects*. J Nat Prod, 2014. **77**(4): p. 766-72.
165. Bilancio, A., et al., *Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation*. Oncotarget, 2017. **8**(70): p. 115620-115631.
166. Lammel, T., P. Boisseaux, and J.M. Navas, *Potentiating effect of graphene nanomaterials on aromatic environmental pollutant-induced cytochrome P450 1A expression in the topminnow fish hepatoma cell line PLHC-1*. Environ Toxicol, 2015. **30**(10): p. 1192-204.
167. Shimizu, Y., et al., *Androgen Receptor Splice Variant 7 Drives the Growth of Castration Resistant Prostate Cancer without Being Involved in the Efficacy of Taxane Chemotherapy*. J Clin Med, 2018. **7**(11).
168. Gurunathan, S., et al., *Differential Immunomodulatory Effect of Graphene Oxide and Vanillin-Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles in Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1)*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).

169. Deabes, M.M., et al., *Impact of Silver Nanoparticles on Gene Expression in Aspergillus Flavus Producer Aflatoxin B1*. Open Access Maced J Med Sci, 2018. **6**(4): p. 600-605.
170. Pelin, M., et al., *Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: the role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase*. Nanoscale, 2018. **10**(25): p. 11820-11830.
171. Zhang, M., et al., *Graphene oxide induces plasma membrane damage, reactive oxygen species accumulation and fatty acid profiles change in Pichia pastoris*. Ecotoxicol Environ Saf, 2016. **132**: p. 372-8.
172. Lim, M.H., et al., *Graphene oxide induces apoptotic cell death in endothelial cells by activating autophagy via calcium-dependent phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases*. Acta Biomater, 2016. **46**: p. 191-203.
173. Shah, K. and N.A. Bradbury, *Kinase modulation of androgen receptor signaling: implications for prostate cancer*. Cancer Cell Microenviron, 2015. **2**(4).

9 Životopis

Osobní informace:

Jméno a příjmení:	Ondřej Ženata
Datum narození:	14. 12. 1990
Bydliště:	Tererovo náměstí 920/2, 77900 Olomouc
E-mail:	zenataOndrej@seznam.cz
Současné pracoviště:	Katedra buněčné a genetiky Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého v Olomouci Šlechtitelů 27 783 71 Olomouc

Vzdělání:

Doktorské studium (2015 – současnost):

Doktorský studijní program Molekulární a buněčná biologie na katedře buněčné biologie a genetiky. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. Téma disertační práce: Studium regulace transkripční aktivity androgenního receptoru (školitel: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D).

Magisterské studium (2013 – 2015):

Magisterský navazující studijní program Molekulární a buněčná biologie na katedře buněčné biologie a genetiky. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. Téma magisterské práce: Tkáňově specifické rozdíly v regulace exprese biotransformačního enzymu UGT2B7 receptorem pro vitamín D (školitel: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D).

Bakalářské studium (2010 – 2013):

Bakalářský studijní program Molekulární a buněčná biologie na katedře buněčné biologie a genetiky. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. Téma bakalářské práce:

Úloha receptoru pro vitamín D v expresi biotransformačního enzymu UGT2B7(školitel: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D).

Výuka:

Praktikum z buněčné biologie 2

Buněčná biologie 2 cvičení

Výzkumné stáže:

Krátká výzkumná stáž (3 měsíce) na Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Friedrich-Schiller Universität Jena, Jena 07740, Německo

Účast na projektech:

P303/12/G163 Centrum interakcí potravních doplňků s léčivy a nutrigenetiky. Grantová agentura České republiky (2012 – 2018)

Studentský projekt IGA UP – PrF 2017-004, 2018-005 a 2019–003 Univerzity Palackého v Olomouci

Publikace:

Vrzal R. , **Ženata O.** , Vrzalová (Dořičáková) A. , Dvořák Z. : (2015) Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes. *Toxicol Lett.* 238. 43 - 53 [IF₂₀₁₄**3.262**]

Vrzal R. , **Ženata O.** , Bachleda P. , Dvořák Z. : (2015) The effects of drugs with immunosuppressive or immunomodulatory activities on xenobiotics-metabolizing enzymes expression in primary human hepatocytes. *Toxicology in Vitro.* 29. 1088 - 1099 [IF₂₀₁₄**2.903**]

Ženata O., Vrzal R. (2017): Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget*, 8, 35390 - 35402. [IF₂₀₁₅**5.008**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2017): Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicol Lett.* 5;281:10-19. [IF₂₀₁₇**3.166**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells. *Translational Cancer Research*, 7, 383 - 390. [IF₂₀₁₆ 1.167]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Mycophenolate Mofetil induces c-Jun-N-terminal kinase expression in 22Rv1 cells: an impact on androgen receptor signaling. *Journal of Cancer*, 9, 1915 - 1924. [IF₂₀₁₆ 2.916]

Příspěvek na konferenci:

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R.: The impact of mycophenolate mofetil on androgen receptor activity in prostate cancer cells 22Rv1. 18th European Congress of Endocrinology (ECE) 2016, Munich, Germany, 28 – 31 May 2016, e-poster.

Příloha 1

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Mycophenolate Mofetil induces c-Jun-N-terminal kinase expression in 22Rv1 cells: an impact on androgen receptor signaling. *Journal of Cancer*, 9, 1915 - 1924. [IF₂₀₁₆ **2.916**]

Research Paper

Mycophenolate Mofetil induces c-Jun-N-terminal kinase expression in 22Rv1 cells: an impact on androgen receptor signaling

Ondrej Zenata, Zdenek Dvorak, Radim Vrzal✉

Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtitelu 27, Olomouc, CZ-783 71, Czech Republic

✉ Corresponding author: Email: radim.vrzal@email.cz (RV). Department of Cell Biology and Genetic, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Slechtitelu 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420-58-5634904; Fax.: +420-58-5634901

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.11.03; Accepted: 2018.02.17; Published: 2018.04.27

Abstract

Mycophenolate Mofetil (MYC) is a transplant drug used to prevent rejection in heart and kidneys transplant patients. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), an enzyme involved in *de novo* synthesis of guanosine nucleotides, was considered as a primary target for MYC. Recently, we described that MYC activates aryl hydrocarbon receptor and it antagonizes glucocorticoid receptor. Here we describe an androgen receptor (AR) as another off-target for MYC.

We found that MYC increased basal and dihydrotestosterone (DHT)-inducible AR-dependent luciferase activity in AIZ-AR cells. In the same manner it induced or augmented mRNA level of KLK3 (prostate specific antigen; PSA) in 22Rv1 cells. Herein it displayed a hormetic effect on proliferation activity, since it significantly stimulated proliferation in lower concentrations but inhibited in higher (>1 µg/ml) concentrations in the presence of DHT. In contrast, MYC suppressed DHT-inducible KLK3 mRNA expression and cell proliferation in androgen-dependent LNCaP cells. MYC augmented DHT-inducible nuclear translocation of AR and increased the expression of MAPK8/9 (JNK46/54) resulting in the drop of their phosphorylation status. Moreover, MYC sensitized DHT-treated 22Rv1 cells to JNK-IN-8 mediated growth inhibition with the drop of IC₅₀ from 1425 nM to 84 nM within 24 hrs. In conclusion, we suggest that, castrate-resistant prostate cancers progression might be retarded with the combination of MYC and chemical JNK inhibitors, involving AR-dependent mechanism.

Key words: 22Rv1, LNCaP, JNK, proliferation, Mycophenolate

Introduction

Mycophenolate Mofetil (MYC) (Figure 1A) is an immunosuppressive drug inhibiting the inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), the rate limiting enzyme in the *de novo* synthesis of guanosine nucleotides [1]. It is used in the prevention of rejection of heart and kidney transplants due to the higher affinity for IMPDH II isoform, which is present primarily in lymphocytes. Mycophenolate Mofetil is administered orally and it undergoes rapid absorption and hydrolysis to mycophenolic acid (MPA) by liver and plasma esterases. Thereafter, it is almost completely metabolized to glucuronides by

UGT1A9 and UGT2B7 [2]. Intravenous or per oral administration of 500 mg MYC resulted in statistically indistinguishable C_{max} around 10 µg/ml within approx. 2 hrs [3]. Thus, these or actually lower systemic concentrations can be expected in patients treated with this immunosuppressant.

While IMPDH inhibition is probably the main target of MYC/MPA, compounds itself probably targets other cellular components. Recently, we found that MYC activated aryl hydrocarbon receptor (AhR) in dose-dependent manner and it antagonized AhR as well as glucocorticoid receptor (GR) activation by

appropriate ligands *in vitro* [4]. Moreover, it was described that several factors involved in cell proliferation or cell cycle regulation are strongly down-regulated upon MPA treatment [5]. As the proliferation is undesirable process of cancer cells and many tumors have up-regulated IMPDH [6, 7], off-target use of this compound for cancer treatment offers itself. In the study by *Dun et al.* it was found that gastric adenocarcinoma (AGS), gastric carcinoma (NCI-N87), colorectal adenocarcinoma (HCT-8), ovarian adenocarcinoma (A2780) and pancreatic adenocarcinoma (BxPC-3) were highly sensitive to MYC treatment [5]. The use of MYC can be expected for the prostate cancer treatment as another inhibitor of IMPDH II, compound AVN944, was found to induce cell cycle arrest and cell death in 4 prostate cancer cell lines, particularly LNCaP, 22Rv1, DU145 and PC-3 [8]. Based on this and our above mentioned observation of the action of MYC towards ligand-activated transcription factors, the nuclear receptors, we decided to investigate the effect of MYC on the activity of androgen receptor (AR) in recently established AR-responsive cell line (AIZ-AR), which was derived from prostate cancer cell line 22Rv1 [9]. In addition, we compared this androgen-independent (22Rv1) and androgen-dependent (LNCaP) cell lines.

Materials and methods

Compounds and reagents

Dimethylsulfoxide (DMSO), dihydrotestosterone (DHT), Mycophenolate Mofetil (MYC), Proliferation assay kit (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III) and Charcoal-stripped Fetal Bovine Serum (CS-FBS; F6765) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Oligonucleotide primers used in RT-PCR reactions were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). LightCycler 480 Probes Master was from Roche Diagnostic Corporation (Intes Bohemia, Czech Republic). All other chemicals were of the highest quality commercially available.

Cell Cultures

Human Caucasian prostate carcinoma (LNCaP; No. 89110211) and human prostate carcinoma epithelial cell line (22Rv1; No. 05092802) were purchased from Public Health England and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of charcoal-stripped fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate. Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

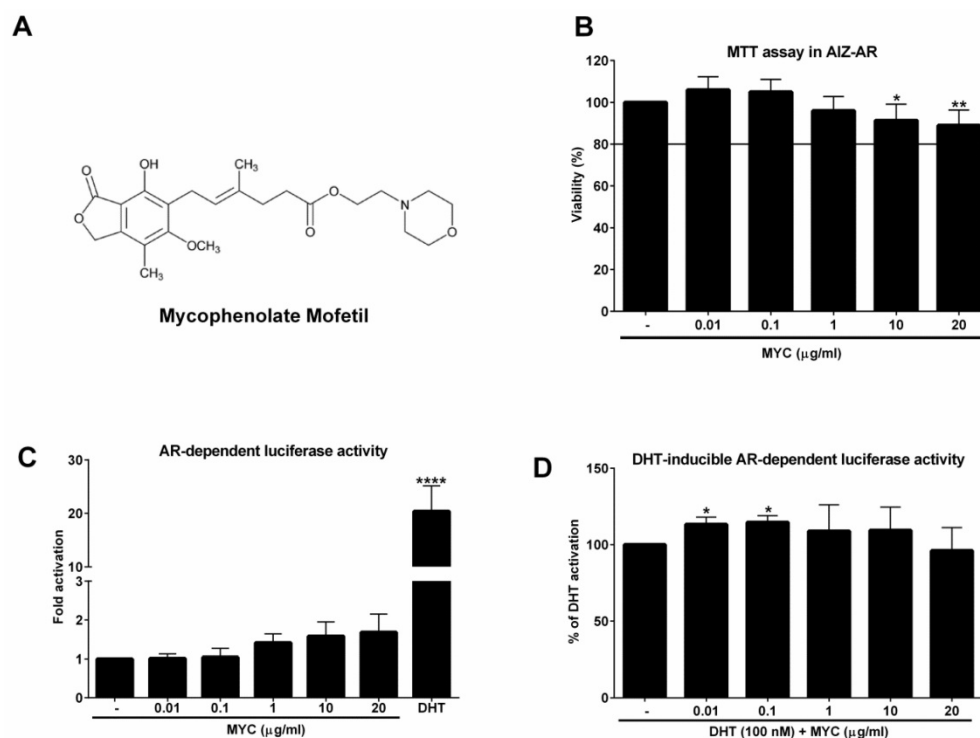


Figure 1: The viability of AIZ-AR cells and the activation of androgen receptor (AR) The structure of Mycophenolate Mofetil (MYC). (B) AIZ-AR cells were treated incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 0.01-20 µg/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) as a vehicle for control for 24 h. Thereafter, MTT assay was performed as described in *Materials and Methods* section. The data are the mean ± SD from 5 consecutive cell passages and are expressed as % of negative control (DMSO). AIZ-AR cells were incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 0.01-20 µg/ml) in the absence (C) or presence (D) of DHT (100 nM) and/or DMSO (0.1% v/v) for 24 h. Thereafter, gene reporter assay was performed as described in *Materials and Methods* section. The data are the mean ± SD from 5 (C) or 7 (D) consecutive cell passages independent experiments and are expressed as fold activation of AR over DMSO-treated cells (C) or as a % of positive control (DHT) (D). *, **, **** - value is significantly different from untreated cells (DMSO) (C) or DHT-treated cells (D) ($p < 0.05, 0.01, 0.0001$).

Cell viability assay (MTT)

Cell line AIZ-AR was treated with increasing concentrations of MYC (0.01-20 µg/ml) and/or DMSO (0.1%; v/v) for 24 hrs. Thereafter, the medium was replaced by PBS with MTT (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in final concentration of 0.3 mg/ml. The solution was discarded after 30-40 minutes of incubation and replaced by DMSO for dissolution of the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm with Infinite M200 (TECAN, Austria). Tested concentrations causing decline in viability no greater than 20% were considered as non-toxic for further experiments.

Gene reporter assay

For the assessment of AR transcriptional activity, we employed recently established stably transfected gene reporter cell line AIZ-AR (derived from 22Rv1 cells) [9]. Following the plating in medium with CS-FBS, cells were stabilized for 16 h and then treated with MYC (0.01-20 µg/ml) in the absence (Agonist setting) or presence (Antagonist setting) of dihydrotestosterone (DHT; 100 nM) and/or vehicle (DMSO; 0.1% v/v) for 24 hrs in medium with CS-FBS. After the treatments, cells were lysed and luciferase activity was measured with Infinite M200 (TECAN, Austria).

Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The total RNA was isolated using *TRI Reagent*[®] (Molecular Research Center, USA). cDNA was synthesized from 1000 ng of total RNA using M-MuLV Reverse Transcriptase (M0253S, New England BioLabs) at 42 °C for 60 min in the presence of random hexamers (S1230, New England BioLabs). qRT-PCR was carried out on Light Cycler 480 II apparatus (Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic). The levels of KLK3 and GAPDH mRNAs were determined using primers and probes from Universal Probes Library (UPL; Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic) as follows: KLK3 (PSA) - UPL 44, forward: GTGCTTGTTGGCCTC TCGT, reverse: CAGCAAGATCACGCTTTTGT; GAPDH - UPL 60, forward: CICTGCTCCCTGTTCCG AC, reverse: ACGACCAAATCCGTTGACTC. The following program was used for monitoring the expression of both genes: an activation step at 95 °C for 10 min was followed by 45 cycles of PCR (denaturation at 95 °C for 10 s; annealing with elongation at 60 °C for 30 s). The measurements were performed in triplicates. Gene expression was normalized per *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) as a housekeeping gene. Data were processed with the delta-delta method. Results are

expressed as fold induction over DMSO- treated cells.

Proliferation assay

Proliferation assay was used according to the manufacturer recommendations with minor modifications. Briefly, cells were seeded at the density of 10000 cells per well into 96-well plate (pre-coated with poly-D-lysine for LNCaP) in medium with CS-FBS and stabilized overnight. Next day, the cells were treated with dihydrotestosterone (DHT) alone or together with increasing concentrations of Mycophenolate Mofetil (0.01, 0.1, 1, 10, 20 µg/ml) for 24 hrs. At the end of treatment, solution with 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrDu) was applied directly into the well for additional 3 hrs. Thereafter, we followed strictly the procedure from manufacturer guide. At the end, the absorbance at 405 nm and reference at 495 nm were measured with Infinite M200Pro (Tecan, Austria). The proliferation capacity was expressed as % of the ratios of absorbances A_{405}/A_{495} between the sample and DHT, i.e. DHT was set to 100%.

SDS-PAGE and Western blotting

Total protein extracts were prepared from 1 well of 6-well plate dish. Cells were washed once with ice-cold PBS and scraped into 1 ml of PBS. The suspension was centrifuged (2,300x g/5 min/4°C) and the pellet was resuspended in 150 µl of ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7.2; anti-protease and anti-phosphatase cocktails, 1% (v/v) Triton X-100; 1% (v/v) sodium deoxycholate; 5 mM EDTA). The mixture was vortexed and incubated for 10 min on ice and then centrifuged (15,700x g/13 min/4°C). Supernatant was collected and the protein content was determined by the Bradford reagent.

Isolation of cytosolic and nuclear extract was performed with the use of Nuclear extract kit (Active Motif; 40010) according to the manufacturer's protocol.

SDS-PAGE gels (10%) were run on a BioRad apparatus according to the general procedure followed by the protein transfer onto PVDF membrane. The membrane was saturated with 5% non-fat dried milk for 1 h at room temperature in 1x TBS-Tween20 (0.5%). Blots were probed with primary antibodies against AR (mouse monoclonal, sc-7305, 441, diluted 1:500, lot H3112) and actin (mouse monoclonal, sc-47778, C4, lot K1414), both purchased from Santa Cruz Biotechnology and with p-JNK (rabbit polyclonal, 9251, lot 3, diluted 1:1000), JNK (rabbit polyclonal; 9252, lot 9, diluted 1:1000), both purchased from Cell Signaling Technology, overnight at 4°C. Chemiluminescence detection was performed using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and Western

Sure Premium Chemiluminescent Substrate (C60429, LiCor). Densitometric analyses were performed with the C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner and Image Studio Digits software, both from LiCor.

Statistical Analysis

Differences between the groups were compared using the Student's unpaired two-tailed t-test. Two-way analysis of variance with a Dunnett's post hoc test was applied to the data if more than two groups were analysed. All of the statistical analyses were performed using GRAPH-PAD PRISM 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A P-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Mycophenolate Mofetil activates androgen receptor

As a first step, we investigated if MYC can activate androgen receptor in recently developed AR-responsive cell line [9]. To this purpose, we had to determine the non-toxic concentrations of MYC in this cell line. We chose the range which corresponds to plasma concentrations [3] with the maximal concentration set to 20 µg/ml (approx. 62 µM). Since the viability of cells was not decreased by more than 10% at highest concentrations (Figure 1B) we could use full range of concentrations for further experiments. In the Agonist setting, the positive control DHT (100 nM) induced the androgen receptor (AR)-dependent luciferase activity (18-fold) which served as a proof of the functionality of the system. MYC induced the activity as well (1.4-1.7 fold), however insignificantly (Figure 1C). In the Antagonist setting, i.e. in the presence of DHT, we observed significant approx. 13% increase of luciferase activity above DHT alone for 0.01 and 0.1 µg/ml concentrations (Figure 1D). All other concentrations were without significant effect.

Mycophenolate Mofetil modulates KLK3 expression and proliferation of prostate cells

The finding of increased AR-dependent luciferase activity led us to focus on the expression of one of the most known AR target genes, KLK3 (prostate specific antigen, PSA). First, we monitored the expression of KLK3 mRNA in 22Rv1, which the AIZ-AR cell line was derived from. The positive control (DHT) induced KLK3 mRNA significantly (Figure 2A) but the average fold induction did not exceed 2-fold. Mycophenolate mofetil induced significantly KLK3 mRNA to approx. 1.5-fold for 3 highest concentrations (Figure 2A). This induction corresponds to almost 65% of induction caused by

DHT. An interesting and consistent observation with gene reporter assay (Figure 1D) we made when we co-treated 22Rv1 cells with MYC and DHT. The presence of MYC significantly stimulated the KLK3 mRNA induction over DHT alone by almost 25 % for MYC concentration of 1 µg/ml (Figure 2B). Since the cell cycle of prostate cancer cells is modulated by AR, we further focused on monitoring the proliferative activity of 22Rv1 cells. We observed that concentrations 0.01 and 0.1 µg/ml significantly stimulated proliferation of cells but higher concentrations had the inhibitory effect (Figure 2C). While two lowest concentrations reflected the pattern observed in DHT-inducible KLK3 mRNA expression, the other three (starting from 1 µg/ml) are probably high enough to inhibit the primary target of MYC, inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) with consequent impact on short-lived proteins involved in cell cycle, i.e. the proliferation. Since two lowest concentrations stimulated proliferation above control, we further monitored this effect for longer period of time, 48 hrs. However, no effect was observed for these two concentrations (Figure 2C).

It is known that 22Rv1 cells have two forms of AR, one being full length (AR-FL) and second one truncated missing ligand-binding domain (AR-v7). Therefore, we decided to compare AR-independent cells (22Rv1) with AR-dependent cells (LNCaP), which lack AR-v7 isoform. Positive control induced KLK3 mRNA in average 15-fold (Figure 2D), while MYC slightly but insignificantly induced KLK3 1.4-fold over control cells. In the presence of DHT, we observed opposite effect on inducible KLK3 mRNA in contrast to 22Rv1 cells, i.e. the decrease in mRNA level (Figure 2E). Monitoring the proliferation of LNCaP cells revealed a pattern similar with the inducible KLK3 mRNA. The comparison of these two cell lines revealed lower anti-proliferative activity of MYC in LNCaP cells (IC₅₀ > 20 µg/ml) than in 22Rv1 cells (IC₅₀ ~ 1.0 µg/ml) (Figure 2F, C).

Mycophenolate mofetil stimulates DHT-dependent AR translocation in 22Rv1 cells

Since MYC stimulated DHT-mediated AR-dependent luciferase activity (Figure 1D) as well as KLK3 mRNA induction (Figure 2B), we decided to further investigate this effect. We monitored AR translocation in the presence of MYC. We used MYC at concentration of 1 µg/ml as this was the lowest threshold concentration causing any effect in our previous assays. We found that the presence of MYC stimulated DHT-induced translocation of full length version of AR (AR-FL) into the nucleus after 60 minutes (Figure 3A, B). Moreover, MYC also reduced

nuclear level of truncated form of AR (AR-v7) as well (Figure 3A, C). Since AR-FL/AR-v7 isoforms were slightly increased in cytosolic fraction upon MYC treatment (Figure 3A, D) with simultaneous decrease in nucleus (Figure 3A, C), we considered an idea of MYC-stimulated degradation of AR isoforms by proteasome. However, co-treatment of MYC with proteasome inhibitor bortezomib had no effect on protein level of any AR isoforms, suggesting no involvement of proteasome in this process (Figures 3E, F).

Mycophenolate Mofetil induces JNK expression

We based our further investigation on our recent publication [4]. Here we found that MYC activated and inhibited AhR activity in the presence of dioxin. Moreover, activity of GR was inhibited concentration-dependently by MYC in the presence of glucocorticoid receptor ligand, dexamethasone. Since the likelihood of one compound being a ligand of three different receptors with limited overlapping spectra of ligands is low in general, we focused on the idea of ligand-independent co-stimulation of AR activity by kinase event. We focused on c-Jun N-terminal kinase (JNK) as similar observation for MYC and JNK was already published [10, 11].

Treatment of 22Rv1 cells with MYC for 30 minutes revealed mild reproducible decrease of phospho status of JNKs while total JNKs were elevated (Figure 4A). Sorbitol, a JNK activator significantly induced the phosphorylation while had no effect on total JNK protein level. This finding suggested that MYC suppressed basal JNK activity by increasing total level of JNK. In order to investigate the origin of this effect, we focused on determination of either stabilization or induction of JNKs. An experiment with proteosynthesis inhibitor, cycloheximide (CHX), revealed that CHX significantly suppressed MYC-induced increase of JNKs. This suggested transcriptional event. Monitoring the expression at mRNA level revealed mild but significant induction of expression of JNK54 (MAPK9) and JNK46 (MAPK9) (Figure 4C). To further confirm that either activation or inhibition of JNK affects transcription activity of AR, we treated AIZ-AR cells with JNK activator sorbitol or JNK inhibitors (SP600125 and JNK-IN-8). Sorbitol dose-dependently increased while both tested inhibitors decreased the AR-dependent luciferase activity (Figure 4D). It is worth to notice that lower concentrations of JNK inhibitors had mild co-stimulating effect on AR-mediated luciferase activity similarly like MYC (Figure 1D).

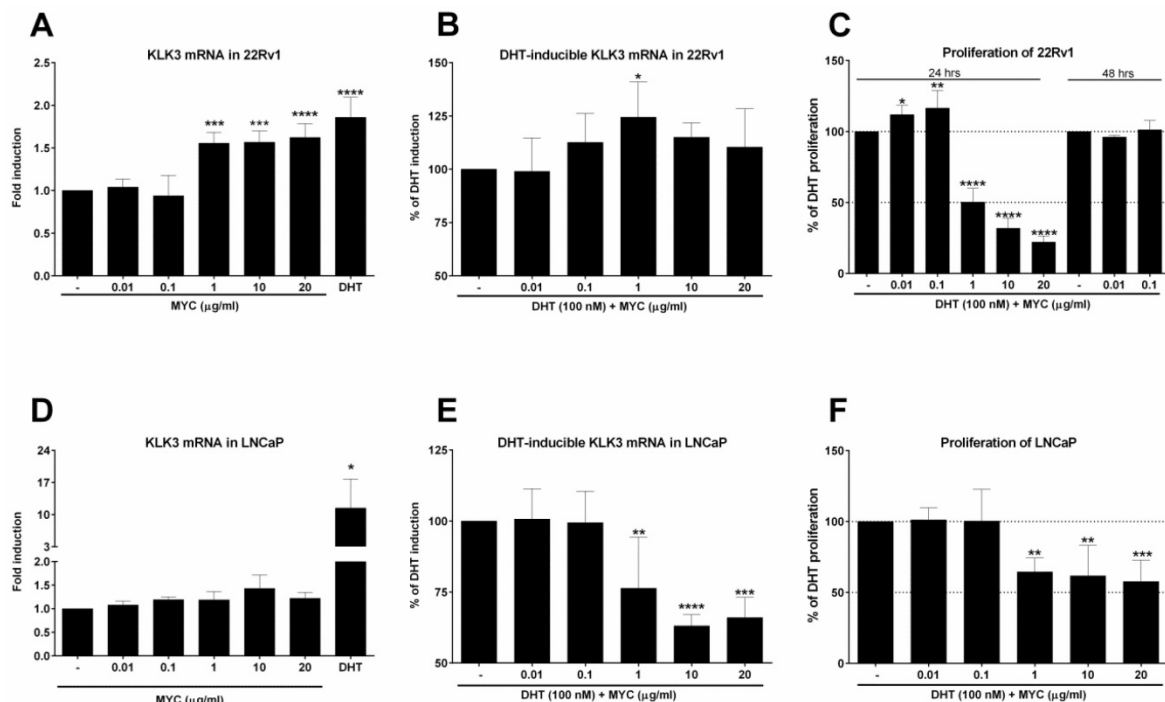


Figure 2: The effect of Mycophenolate Mofetil on KLK3 mRNA and cellular proliferation 22Rv1 or LNCaP cells were treated for 24 h with Mycophenolate Mofetil (MYC; 0.01-20 $\mu\text{g/ml}$) in the absence (A, D) or presence (B, E) of DHT (100 nM) and/or DMSO as a vehicle for negative control. Thereafter KLK3 mRNA was determined as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells \pm SD (A) or as % of DHT induction \pm SD (B). The data are mean from 5 consecutive cell passages and were normalized per GAPDH mRNA levels. *, **, ***, **** - value is significantly different from DMSO-treated cells (A, D) or DHT-treated cells (B, E) ($p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$). (C) 22Rv1 cells were treated in the presence of DHT (100 nM) for 24 hrs with MYC (0.01-20 $\mu\text{g/ml}$) or for 48 hrs with MYC (0.01, 0.1 $\mu\text{g/ml}$). (F) LNCaP cells were treated in the presence of DHT (100 nM) with MYC (0.01-20 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hrs. Thereafter, detection of proliferation was measured as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as % of DHT proliferation from 4 (C) and 5 (F) consecutive passages. *, **, ***, **** - value is significantly different from DHT-treated cells ($p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$).

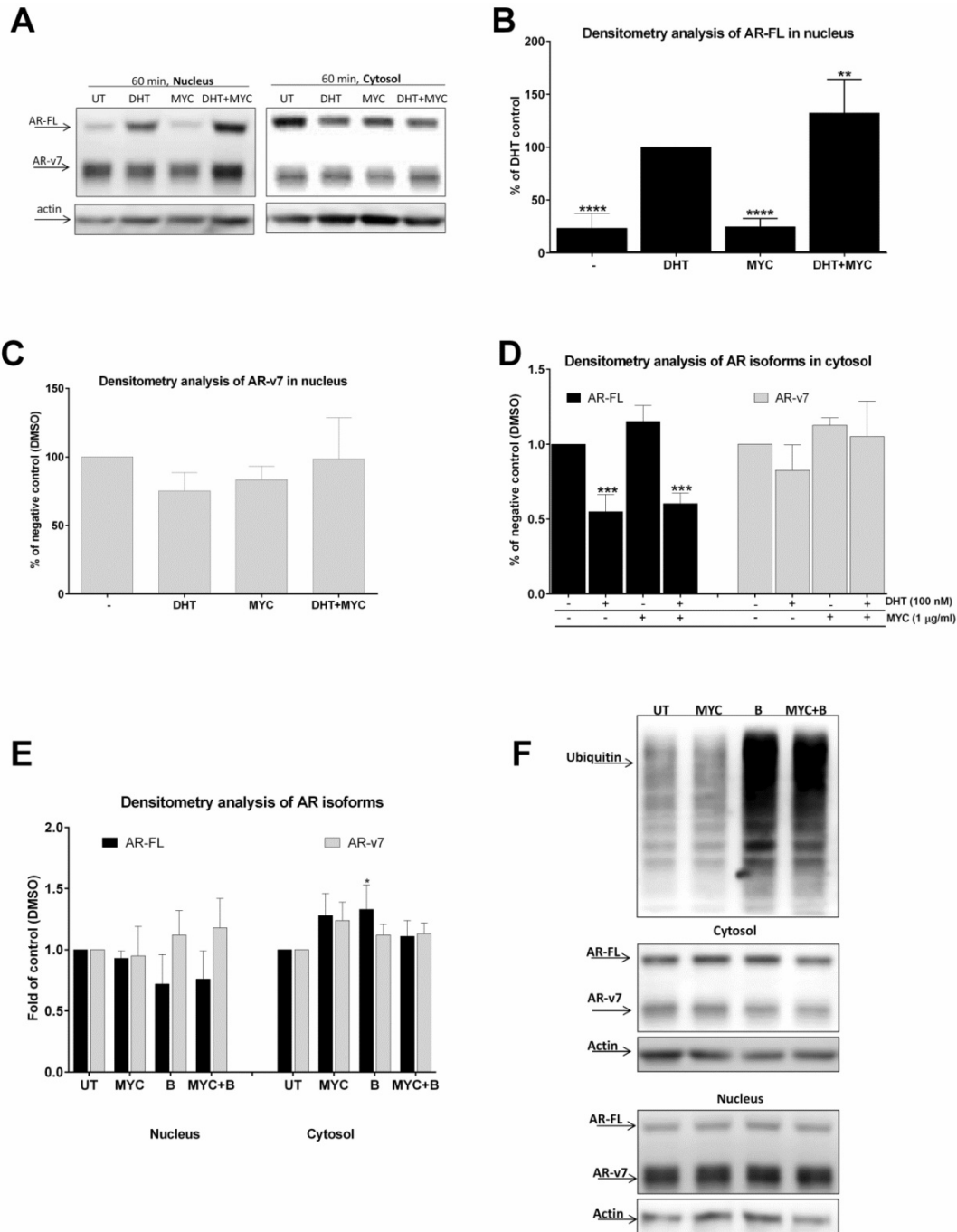


Figure 3: The effect of MYC on translocation of AR (A-D) 22Rv1 cells were treated incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 1 µg/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) and/or DHT (100 nM) for 60 minutes. Thereafter, cytosolic and nuclear fractions were isolated as described in *Materials and Methods* section; semi-quantitation was performed with LiCOR scanner. (A) One representative western blot of 5 consecutive passages is shown. (E) 22Rv1 cells were treated incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 1 µg/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) and/or Bortezomib (B; 100 nM) for 60 minutes. Thereafter, cytosolic and nuclear fractions were isolated as described in *Materials and Methods* section; semi-quantitation was performed with LiCOR scanner. (F) One representative western blot of 3 independent experiments is shown. *, **, ***, **** - value is significantly different from DHT-treated cells (B) or DMSO-treated cells (D, E) ($p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$).

Mycophenolate Mofetil has synergistic antiproliferative effect with JNK inhibitor

Since MYC induced JNK protein, we focused on idea of MYC-induced sensitization of 22Rv1 cells with consequent higher impact on viability of these cells when co-treated with JNK inhibitors. By employing

MTT assay, we observed nothing but additive effect of tested concentrations of MYC in the presence of JNK inhibitor, JNK-IN-8 (Figure 5A). Similar data we obtained with reversible JNK inhibitor SP600125 (*data not shown*). However, we have noticed that presence of DHT had protective effect as increased viability was

observed in DHT-plus rather than DHT-free medium (*data not shown*). However, this protective effect of DHT was observed for JNK activator, sorbitol, as well (*data not shown*). This suggests that no matter of JNK activation or inhibition, DHT has protective effect on viability of 22Rv1 cells.

In the next step, we monitored the proliferation of 22Rv1 cells co-treated with MYC and JNK inhibitor, JNK-IN-8 [12]. Proliferation of 22Rv1 cells was concentration-dependently inhibited by JNK-IN-8

with observed IC₅₀ approx. 1425 nM (Figure 5B). When we combined JNK-IN-8 with MYC, the presence of two lowest concentrations (0.01 and 0.1 µg/ml) had no effect on the proliferation (*data not shown*) similarly like on the viability (Figure 5A). However, the presence of MYC at 1 µg/ml shifted the proliferation curve to lower values with the drop of IC₅₀ to approx. 84 nM within 24 hrs (Figure 5B). That represents a 17-fold lower IC₅₀ than for JNK inhibitor alone.

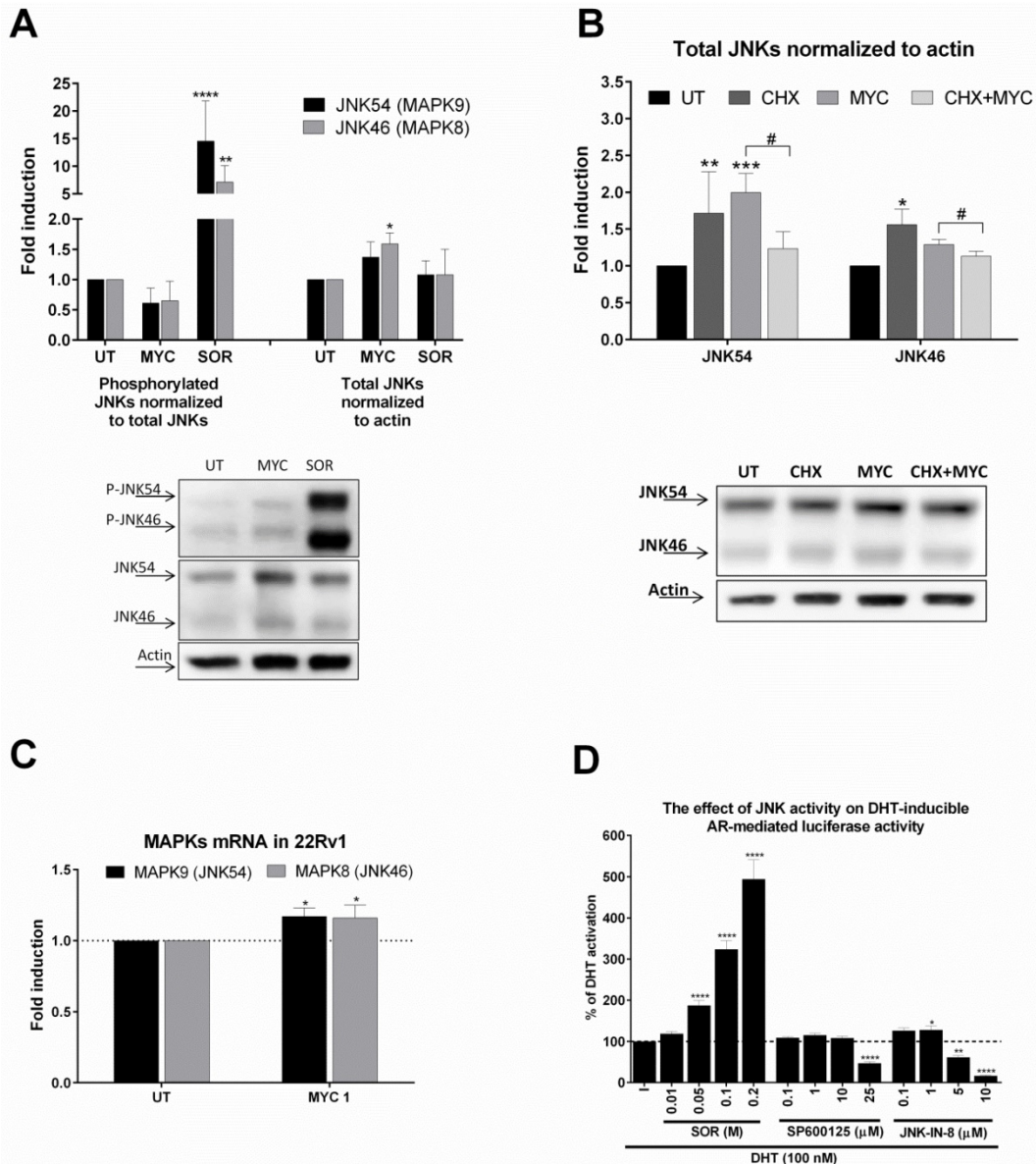


Figure 4: The effect of MYC on JNKs status (A) 22Rv1 cells were incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 1 µg/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) or Sorbitol (SOR; 0.4 M) for 30 minutes. Thereafter, total protein lysate was isolated as described in *Materials and Methods* section with subsequent protein detection and semi-quantitation performed with LiCOR scanner. Phosphorylated JNKs normalized to total JNKs protein (left side of A) and total JNKs normalized to actin (right side of A). One representative western blot of 6 independent experiments is shown in lower part of A. (B) 22Rv1 cells were incubated with Mycophenolate Mofetil (MYC; 1 µg/ml), cycloheximide (CHX; 20 µg/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) or combination of both for 30 minutes. Thereafter, total protein lysate was isolated as described in *Materials and Methods* section with subsequent protein detection and semi-quantitation performed with LiCOR scanner. Total JNKs were normalized to actin and data are expressed as fold induction over negative control (DMSO). One representative western blot of 4 independent experiments is shown in lower part of B. (D) AIZ-AR cell line was treated with DHT (100 nM) in the presence or absence of Sorbitol (0.01-0.2 M), SP600125 (0.1-25 µM), JNK-IN-8 (0.1-10 µM) for 24 hrs. Thereafter luciferase activity was monitored as described in *Materials and Methods* section. *, **, ***, **** - value is significantly different from DMSO-treated cells (A,B,C) or DHT-treated cells (D) (p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001). # - significant difference between two groups (p < 0.05)

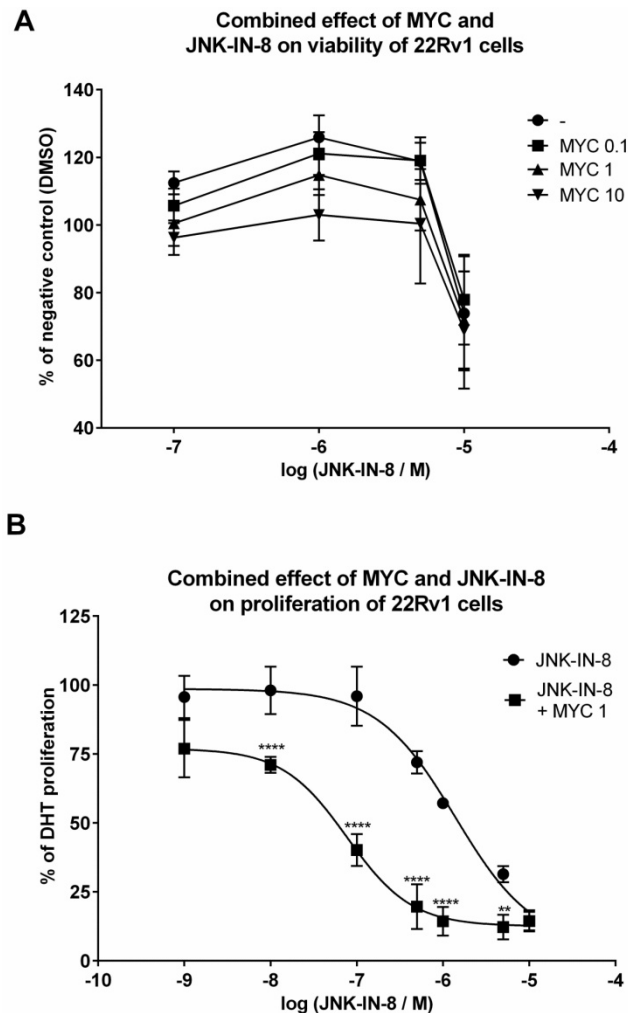


Figure 5: The effect of MYC and JNK inhibitor co-treatment on viability and proliferation 22Rv1 cells were treated JNK-IN-8 (0.001-10 μ M) and/or with Mycophenolate Mofetil (MYC; 1 μ g/ml) and/or DMSO (0.1% v/v) in the presence of DHT for 24 hrs. Thereafter, viability (A) or proliferation (B) were performed as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as % of viability for DMSO (A) or % of DHT proliferation (B) from 3 consecutive passages. *, **** - value is significantly different from JNK-IN-8-treated cells only ($p < 0.01, 0.0001$).

Discussion

In the current study, we investigated the effect of immunosuppressive drug, Mycophenolate Mofetil (MYC) on the activity of androgen receptor (AR) in prostate cancer cell lines. We found that MYC slightly activated androgen receptor in androgen-independent cells 22Rv1 and induced AR-target gene expression (KLK3 mRNA) herein while this was not observed in AR-dependent cells (LNCaP). The combination of MYC and DHT synergistically stimulated KLK3 mRNA induction in 22Rv1 cells while the opposite, i.e. the suppression was observed in LNCaP cells. Mycophenolate had anti-proliferative effect in both cell lines with IC50s more than 20-times lower for androgen-independent

(22Rv1) than dependent (LNCaP) cells. This finding shows androgen-independent (but AR positive) cells as more sensitive to anti-proliferative effect of Mycophenolate Mofetil. Moreover, we found that MYC stimulated DHT-inducible translocation of AR-FL to nucleus and induced MAPK8/9 (JNK46/54) expression, which resulted in the decrease of JNKs' phosphorylation status. The decline of phosphorylation is consistent with the study performed in proximal tubule cell line (HK-2) [10]. In that report, the inhibition of hydrogen peroxide-induced phosphorylation of JNK by MYC was described in the concentration range between 50-500 μ M (approx. 16-160 μ g/mL).

The primary molecular target of MYC was always considered IMPDH, particularly isoform II for which mycophenolic acid (active form of MYC) is 5-fold more potent inhibitor than for isoform I [1]. However, our recent study suggested that this compound can affect other molecular targets like ligand-activated transcription factors (AhR, GR) [4]. In stably transfected HeLa cells responsive for glucocorticoid receptor, we observed strong antagonistic behavior of MYC in the presence of ligand dexamethasone. In addition, we observed dose-dependent activation of AhR and synergistic action with AhR ligand dioxin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. However, probably due to IMPDH inhibition at higher concentrations, the dose-response curves had reversed-U shape profile [4]. More or less the same as for AhR, we can now see for DHT-stimulated AR activation as well as for KLK3 mRNA expression in 22Rv1 cells, an *in vitro* model of castrate-resistant prostate cancer (CRPC). The reason why KLK3 mRNA goes down at higher concentrations of MYC is likely due to the insufficient number of nucleotides as IMPDH inhibition takes place.

There may be many reasons for different behavior of LNCaP and 22Rv1 cells upon MYC treatment. One among many would be the different expression level of IMPDH II. Different profiles of inducible KLK3 mRNA expression level might suggest such a scenario. If there was higher level of IMPDH II in 22Rv1 than in LNCaP cells, then the decline in KLK3 mRNA would be faster for LNCaP cells than 22Rv1 cells. However, this scenario is out of question as equal levels of IMPDH II were detected in LNCaP as well as 22Rv1 cells [8].

Among other plausible mechanisms of MYC action belongs the ability to change the expression of adhesion molecules. There are several studies which investigated this phenomenon. One of the first studies revealed MYC-triggered downregulation of E-selectin and P-selectin expression on endothelial cell

membranes [13]. It also significantly inhibited lipopolysaccharide/interferon-gamma-stimulated expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and MHC-II on monocytes [14]. Another important adhesion molecule NCAM (neural cell adhesion molecule) was decreased in the presence of MYC in neuroblastoma cells [15]. This suggested an increased risk of tumor metastasis since several studies revealed an inverse correlation between NCAM expression and tumor invasiveness [16-18]. Surprisingly, treatment of human colon adenocarcinoma cell line WiDr with MYC prevented the attachment to E-selection and blocked binding to endothelium [19]. In DU-145 prostate cancer cell line, MYC blocked dose-dependently (0.1-1 μ M ~0.04-0.4 μ g/ml) adhesion of these cells in monolayer adhesion assay probably via increased expression of beta1 integrins like CD49a, CD49b, CD49e [20]. This study indicated that MYC possessed anti-tumor activity particularly to prostate cells. The disturbance of other cell machinery components was already described in prostate cancer cells after incubation with another IMPDH inhibitor, AVN944 [8]. Here, more pronounced induction of pro-apoptotic Bok, cyclin E and decrease of cyclin A proteins, was observed after 2 days at 5 μ M of AVN944 in 22Rv1 cells than in LNCaP cells. While this may be partially addressed to rapid decline in the expression of some key molecules with short half-life in the cells due to the IMPDH inhibition, other proteins are increased as a reaction on the presence of MYC in order to deal with the IMPDH inhibition.

Based on recent study by Dun et al., it is clear that MYC affects many cellular pathways either by the change in expression or phosphorylation status [5]. A dramatic reduction of phosphorylated PI3K, AKT and mTOR were observed in AGS (human Caucasian gastric adenocarcinoma) cell line *in vitro*. Moreover, many cellular regulators like CDK4, BUB1 or Aurora A were reduced as well. Consistently, mice treated with MYC and bearing AGS xenografts had significantly smaller tumors [5]. These data provide a proof of beneficial effect of MYC as anticancer drug apparently without adverse immunosuppressive effect, which would be expected for immunosuppressant. This also suggests that monitoring the IMPDH expression level in tumors might be used as a prognostic marker for justification the repurposing use of Mycophenolate Mofetil for treatment of cancer patients, particularly those with prostate cancer. Since there is a great knowledge about this compound, no new clinical trials must be performed in order to assess the safety of this drug. Moreover, the retrospective studies which monitored the treatment of patients with MYC found usually no

association with increased risk of post-transplant malignancies in registry or multi-center studies [21, 22]. In addition, there was a trend to lower incidence/risk of malignancies.

In our study, we show that MYC has anti-proliferative effect on prostate cancer cells 22Rv1 and LNCaP. However, the second one seems to be more resistant than the first one. In accordance with criteria by Dun et al., we may consider LNCaP as very resistant (IC₅₀ > 20 μ g/ml) and 22Rv1 as intermediately sensitive (0.5 μ g/ml < IC₅₀ < 20 μ g/ml). This is quite surprising, as cell line (22Rv1) regularly used as *in vitro* model of CRPC should display quite opposite behavior, i.e. the resistance, as pure logic suggests. Since DHT-inducible KLK3 mRNA profile was similar with that of proliferation, we may suggest that AR-v7 variant is an important factor standing beyond our observations in 22Rv1 cells. This variant was demonstrated to be present commonly in CRPC samples [23, 24] and it is considered as emerging mechanism by which prostate cancer escapes. However, this truncated variant might be also the Achilles heel similarly like it seems to be the greatest advantage of CRPC. One thing which is relatively intensively studied towards AR-v7 is the regulation of its expression. Recent paper revealed that multiple kinases or phosphatases may affect the expression level of AR-v7 [25]. This is extremely important as new therapeutic strategies against CRPC may arise. Moreover, this also emphasizes that inhibition of AR-v7 activity rather than AR-FL may be more important for defeating CRPC. We contribute with this work to this general phenomenon, where alternative pathways should be inhibited in order to slow down cancer progression. It is clear that in order to defeat CRPC, one compound won't be enough. However, right combination of some promising drugs, like galeterone [26] or INK-128 [27] with Mycophenolate Mofetil might represent a viable strategy against CRPC.

In conclusion, we demonstrate that well-known immunosuppressant Mycophenolate Mofetil affects androgen receptor-mediated signaling *in vitro* and this differs between two types of commonly used prostate cancer cell models. Together with many other studies revealing general change in expression of adhesion molecules or components of cell cycle machinery by MYC, we suggest to consider Mycophenolate Mofetil as a good candidate that may be repurposed for anticancer therapy, particularly for prostate cancer patients.

Acknowledgement

This work was supported by the grant from the Czech Science Foundation P303/12/G163.

Competing Interests

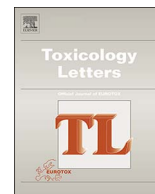
The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268: 27286-90.
- Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2005; 33: 139-46.
- Pescovitz MD, Conti D, Dunn J, Gonwa T, Halloran P, Sollinger H, et al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clinical transplantation*. 2000; 14: 179-88.
- Vrzal R, Zenata O, Bachleda P, Dvorak Z. The effects of drugs with immunosuppressive or immunomodulatory activities on xenobiotics-metabolizing enzymes expression in primary human hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015; 29: 1088-99.
- Dun B, Xu H, Sharma A, Liu H, Yu H, Yi B, et al. Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anticancer activities of mycophenolic acid. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013; 6: 2880-6.
- Fellenberg J, Bernd L, Delling G, Witte D, Zahlten-Hinguranage A. Prognostic significance of drug-regulated genes in high-grade osteosarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2007; 20: 1085-94.
- Fellenberg J, Kunz P, Sahr H, Depeweg D. Overexpression of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II mediates chemoresistance to human osteosarcoma cells. *PLoS one*. 2010; 5: e12179.
- Floryk D, Thompson TC. Antiproliferative effects of AVN944, a novel inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitor, in prostate cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008; 123: 2294-302.
- Bartonkova I, Novotna A, Dvorak Z. Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS one*. 2015; 10: e0121316.
- Andreucci M, Faga T, Lucisano G, Uccello F, Pisani A, Memoli B, et al. Mycophenolic acid inhibits the phosphorylation of NF-kappaB and JNKs and causes a decrease in IL-8 release in H2O2-treated human renal proximal tubular cells. *Chemico-biological interactions*. 2010; 185: 253-62.
- Olejarczyk W, Bryk D, Zapolska-Downar D, Malecki M, Stachurska A, Sitkiewicz D. Mycophenolic acid attenuates the tumour necrosis factor-alpha-mediated proinflammatory response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF-kappaB and ROS pathways. *European journal of clinical investigation*. 2014; 44: 54-64.
- Zhang T, Inesta-Vaquera F, Niepel M, Zhang J, Ficarro SB, Machleidt T, et al. Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK. *Chemistry & biology*. 2012; 19: 140-54.
- Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, et al. Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transplant immunology*. 1998; 6: 251-9.
- Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP. Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal cord*. 2003; 41: 610-9.
- Blaheta RA, Bogossian H, Beecken WD, Jonas D, Hasenberg C, Makarevic J, et al. Mycophenolate mofetil increases adhesion capacity of tumor cells in vitro. *Transplantation*. 2003; 76: 1735-41.
- Owens GC, Orr EA, DeMasters BK, Muschel RJ, Berens ME, Kruse CA. Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat CNS-1 glioma. *Cancer Res*. 1998; 58: 2020-8.
- Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, et al. Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1994; 58: 116-22.
- Blaheta RA, Hundemer M, Mayer G, Vogel JU, Kornhuber B, Cinatl J, et al. Expression level of neural cell adhesion molecule (NCAM) inversely correlates with the ability of neuroblastoma cells to adhere to endothelium in vitro. *Cell communication & adhesion*. 2002; 9: 131-47.
- Leckel K, Beecken WD, Jonas D, Oppermann E, Coman MC, Beck KF, et al. The immunosuppressive drug mycophenolate mofetil impairs the adhesion capacity of gastrointestinal tumour cells. *Clinical and experimental immunology*. 2003; 134: 238-45.
- Engl T, Makarevic J, Relja B, Natsheh I, Muller I, Beecken WD, et al. Mycophenolate mofetil modulates adhesion receptors of the beta1 integrin family on tumor cells: impact on tumor recurrence and malignancy. *BMC cancer*. 2005; 5: 4.
- David KM, Morris JA, Steffen BJ, Chi-Burris KS, Gotz VP, Gordon RD. Mycophenolate mofetil vs. azathioprine is associated with decreased acute rejection, late acute rejection, and risk for cardiovascular death in renal transplant recipients with pre-transplant diabetes. *Clinical transplantation*. 2005; 19: 279-85.
- Robson R, Cecka JM, Opelz G, Budde M, Sacks S. Prospective registry-based observational cohort study of the long-term risk of malignancies in renal transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005; 5: 2954-60.
- Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009; 69: 16-22.
- Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009; 69: 2305-13.
- Li Y, Xie N, Gleave ME, Rennie PS, Dong X. AR-v7 protein expression is regulated by protein kinase and phosphatase. *Oncotarget*. 2015; 6: 33743-54.
- Kwegyir-Afful AK, Ramalingam S, Purushottamachar P, Ramamurthy VP, Njar VC. Galeterone and VNPT55 induce proteasomal degradation of AR/AR-V7, induce significant apoptosis via cytochrome c release and suppress growth of castration resistant prostate cancer xenografts in vivo. *Oncotarget*. 2015; 6: 27440-60.
- Jiang SJ, Wang S. Dual targeting of mTORC1 and mTORC2 by INK-128 potentially inhibits human prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015; 36: 8177-84.

Příloha 2

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2017): Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicol Lett.* 5;281:10-19. [IF₂₀₁₇ **3.166**]



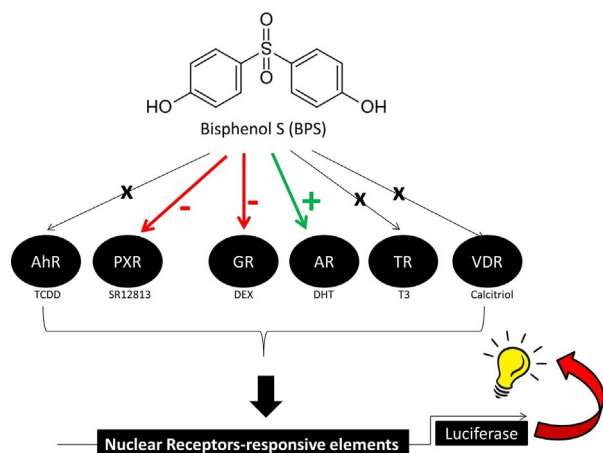
Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines

Ondrej Zenata, Zdenek Dvorak, Radim Vrzal*

Department of Cell Biology Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtitelu 27, Olomouc, CZ-783 71, Czech Republic



GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

GR
PXR
AHR
VDR
AR

ABSTRACT

Bisphenol S (BPS) is heat-stable structural analog of bisphenol A (BPA), a known endocrine disruptor. Due to the effort to replace BPA with BPS, it is essential to know if BPS is suitable non-toxic replacement without reported deleterious effects of BPA. Since most of the BPA effects are ascribed to its ability to activate nuclear receptors, we screened some prominent members of this family in order to confirm or refute some recent findings.

We found that BPS insignificantly activated aryl hydrocarbon receptor (AhR) in reporter gene assay and no induction of AhR target gene CYP1A1 was observed in human hepatocytes (HH). BPS was able to act like an antagonist of pregnane X receptor (PXR) in reporter gene assay, but the expression of PXR target gene CYP3A4, was only moderately affected in HH. While BPS antagonized dexamethasone-inducible glucocorticoid receptor (GR)-dependent luciferase activity in reporter gene assay ($IC_{50} = 52 \mu\text{M}$), it was not able to antagonize dexamethasone effects on GR-target genes, including GILZ, NFKBIA and IL-6. Synergistic effect of BPS (range 0.001–100 μM) and DHT (100 nM) was observed at androgen receptor (AR) activity level only.

In conclusion, we show that BPS had only limited effect on tested nuclear receptors. Moreover, sub-micromolar concentrations of BPS affected activated AR. Thus, due to the low levels of exposure for humans, BPS is probably of no regulatory concern. However, further investigation should delineate possible impact on male/female development or sexual functions.

* Corresponding author.

E-mail addresses: zenataOndrej@seznam.cz (O. Zenata), radim.vrzal@email.cz, radim.vrzal@upol.cz (R. Vrzal).

1. Introduction

Bisphenol S (BPS) is an alternative and more heat-stable analog of bisphenol A (BPA), which has been demonstrated to produce some deleterious effects, e.g. development of diabetes, atherosclerosis, triglyceride accumulation or cancers (Grun and Blumberg, 2007; Keri et al., 2007; Marmugi et al., 2012; Sui et al., 2012). This compound has two phenolic rings joined together by sulphur in the structure (Fig. 1A). It is already in use in canned soft drinks or canned foods as a stabilizer (Gallart-Ayala et al., 2011; Vinas et al., 2010). However, even though it is claimed to be safer than BPA due to the higher temperature stability and resistance to sunlight, the concerns about its safety were arisen, especially after it was detected in human urine (Liao et al., 2012). Moreover, recent study detected BPS in maternal and cord sera (0.03–0.12 ng/mL ~ 0.12–0.48 nM) (Liu et al., 2017). Due to the structural similarity with BPA, the appropriate studies on its toxicity must be carried out. As its predecessor BPA, which has been linked to increased risk of obesity probably due to the alteration of several metabolic functions, many studies tried to identify potential impact of BPS as well. One of the mechanisms of metabolic dysregulation is carried out by the ligand-activated transcription factors, nuclear receptors. It is well-known, that some of these, e.g. glucocorticoid receptor (GR), thyroid hormone receptor (TR) or pregnane X receptor (PXR) play significant role in glucose and lipid homeostasis (Kuo et al., 2013; Moreau et al., 2009; Prieur et al., 2005).

Several recent studies tried to identify if BPS can affect the activities of some nuclear receptors. Among these, many focused primarily on estrogen receptor alpha (ER α) as many environmental pollutants possess some weak estrogenic activity. Bisphenol S is not an exception as weak activation of ER α was observed with similar EC50s in the range of 1.75–4.2 μ M (Grignard et al., 2012; Kuruto-Niwa et al., 2005; Teng et al., 2013) by different studies.

In the second place, either anti- or pro-androgenic activity of environmental pollutants is in the area of interest due to the possible impact of these compounds on development. In the case of BPS, no effect was observed on metribolone (R1881)-activated androgen receptor (AR)-dependent luciferase activity for 10 and 30 μ M concentrations (Teng et al., 2013). In recent study, BPS was not identified as agonist or antagonist of AR or GR receptors in contrast to BPA or bisphenol F (Roelofs et al., 2015). However, this study was performed in yeast cells. Weak androgenic activity was assessed for BPS (estimated EC50 ~ 71 μ M) in PALM cells (genetically modified prostatic PC-3 cells with stably transfected hAR and reporter) where 10 μ M concentrations reached 15% of maximal activity assayed by metribolone (Molina-Molina et al., 2013). Another study identified BPS as a weak compound with anti-androgenic effect with IC50 estimated nearly to 100 μ M (Rosenmai et al., 2014).

To our knowledge, no study tried to identify the effect of BPS on activity of human thyroid hormone receptor (TR). However, interference with thyroid hormone action might be expected since the zebrafish embryos exposed to BPS for 75 days had decreased plasma levels of triiodothyronine and thyroxine (Naderi et al., 2014). These declines were observed for 10 and 100 μ g/l concentrations (equals to 0.04–0.4 μ M). Moreover, the use of thyroid hormone receptor antagonist, amiodarone, attenuated the stimulatory action of BPS on two neuroendocrine-related genes, *kiss1r* and *lh β* , in zebrafish during embryonic and larval development (Qiu et al., 2016). Recent crystallographic study revealed that BPS forms the complex with transthyretin hormone binding sites (Zhang et al., 2016). Thus, interference with thyroid hormone transportation was suggested.

A few studies investigated the effect of BPS on PXR since BPA was found to activate PXR and induce CYP3A4 (Sui et al., 2012; Vrzal et al., 2015). These studies observed no activation of human PXR by BPS up to 10 μ M (Molina-Molina et al., 2013), 20 μ M (Sui et al., 2012) or 100 μ M (Peyre et al., 2014) in reporter gene assays. However, nobody studied this compound in antagonist setting, i.e. in the presence of PXR true

ligand.

Regarding the effect of bisphenol S on vitamin D receptor (VDR) activity, there is just one study, which screened BPS toward the ability to activate Gal4-reporter system with ligand-binding domain of VDR (Teng et al., 2013). No activation was observed. However, recent cross-sectional study brought the evidence that environmental exposure to BPS predecessor, BPA, may alter circulating level of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] in adults (Johns et al., 2016) and negative correlation between BPA and 25(OH)D levels was observed (Erden et al., 2014).

The objective of this study was to investigate the potential effect of BPS on activity of selected steroid and nuclear receptors in transfected cell lines by reporter gene assays and to confirm or refute the previous observations, which may sometimes differ among laboratories and it is thus difficult to draw any general conclusion. Positive findings were further studied by PCR, western blotting or proliferation assay. Since the effect of BPS on ER activity seems to be consistent and reproducible among studies already published, we did not test ER activity in this study.

2. Materials and methods

2.1. Compounds and reagents

Dimethylsulfoxide (DMSO), dihydrotestosterone (DHT), bisphenol S (BPS), 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH) $_2$ D $_3$], triiodothyronine (T3), dexamethasone (DEX), Charcoal-stripped Fetal Bovine Serum (CS-FBS; F6765) and Proliferation assay kit (5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling and Detection Kit III) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was from Anaways (formerly known as LGC Standards). Oligonucleotide primers used in RT-PCR reactions were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). LightCycler 480 Probes Master was from Roche Diagnostic Corporation (Intes Bohemia, Czech Republic). All other chemicals were of the highest quality commercially available.

2.2. Cell cultures

Human embryonal kidney cells Hek293T (PHE; Public Health England – no. 85120602), AZ-GR (derived from human cervical carcinoma cells HeLa; PHE no. 08011102), PZ-TR and AZ-AhR (derived from human hepatocyte carcinoma cells HepG2; PHE no. 85011430) and IZ-VDR (derived from human colon adenocarcinoma LS180; PHE no. 87021202) were cultured in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. Human prostate carcinoma epithelial cell line (22Rv1; No. 05092802), its derivative AIZ-AR and human caucasian prostate carcinoma (LNCap; No. 89110211) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO $_2$ in a humidified incubator.

2.3. Human hepatocytes

Human liver tissue was obtained from two sources: (i) from multi-organ donors LH61 (male; 64 years), LH63 (male; 68 years), LH64 (male; 73 years), LH71 (male; 58 years); tissue acquisition protocol was in accordance with the requirements issued by local ethical commission in the Czech Republic – the use of the of liver cells was approved by “Ethical committee at the Faculty Hospital Olomouc”, and it was in accordance with Transplantation law 285/2002 Sb; “Ethical committee at the Faculty Hospital Olomouc” waived the authors from obtaining written consent from the next of kin, regarding human hepatocytes. We are associated with the University Hospital and the Faculty of Medicine Palacky University in Olomouc; (ii) short-term human hepatocytes in monolayer Batch Hep200529 (female; 26 years), Hep200538 (female;

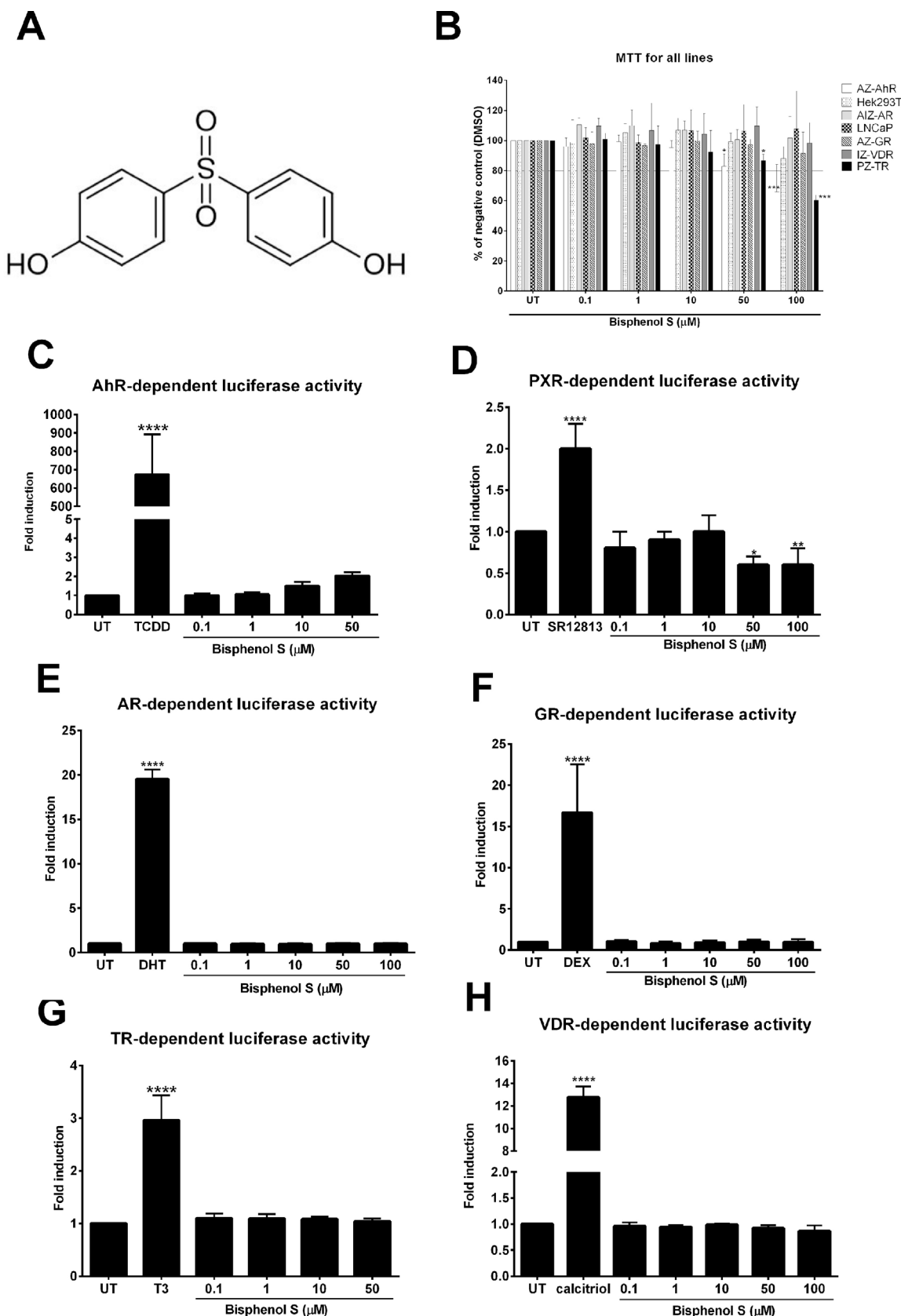


Fig. 1. The effect of bisphenol S on activation of studied receptors.

A) Structure of bisphenol S; B) AZ-AhR, Hek293T, AIZ-AR, LNCaP, AZ-GR, PZ-TR and IZ-VDR cells were treated with bisphenol S (BPS; 0.1–100 μ M) and/or DMSO (UT; 0.1% v/v) as a vehicle for control for 24 h. Thereafter, MTT assay was performed as described in *Materials and Methods* section. The data are the mean \pm SD from at least 3 independent biological experiments (minimum 4 technical replicates each sample) and are expressed as% of negative control, DMSO. C–H) the activities of receptors was monitored in appropriate cell lines (see *Materials and Methods* section) with increasing concentration of BPS or appropriate activator for given receptor for 24 h. Thereafter, reporter gene assay was performed as described in *Materials and Methods* section. The data are the mean \pm SD from at least 4 independent biological experiments (minimum 4 technical replicates each sample) and are expressed as fold induction over DMSO-treated cells. *, **, ***, **** – value is significantly different from untreated cells (UT) – p < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001.

Table 1
Primer sequences with appropriate UPL probe numbers.

Gene Symbol	Forward primer	Reverse Primer	UPL probe number
GAPDH	CTCTGCTCCTCTGTTCCGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC	60
CYP1A1	CCAGGCTCCAAGAGTCCA	GATCTTGGAGGTGGCTGCT	33
CYP3A4	TGTGTTGGTGAGAAATCTGAGG	CTGTAGGCCCCAAAGACG	38
KLK3 (PSA)	GTGCTTGTGGCCTCTCGT	CAGCAAGATCAGGCTTTTGT	44
GILZ (TSC22D3)	CCGTTAAGCTGGACAACAGTG	ATGGCCTGTTGATCTTGT	36
IL6	ACCGGGAACGAAAGAGAAG	GAAGGCAACTGGACCGAAG	133
NFKBIA	GCTGATGTCAATGCTCAGGA	ACACCAGGTCAGGATTTTGC	86

64 years) (Biopredic International, Rennes, France). Cells were plated into collagen-coated dishes in hormonally and chemically defined medium (Pichard-Garcia et al., 2002) consisting of the mixture of William's E and Ham's F-12 [1:1(v/v)]. After seeding, cells were stabilized for 24 h before the treatment in a serum-free medium. Cultures were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

2.4. Cell viability assay (MTT)

Cell lines Hek293T, AZ-AhR, AIZ-AR, LNCaP, IZ-VDR, AZ-GR and PZ-TR were treated with increasing concentrations of BPS (0.1–100 µM) and/or DMSO (0.1%; v/v) for 24 h. Thereafter, the medium was replaced by PBS with MTT (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in final concentration of 0.3 mg/ml. The solution was discarded after 30–40 min of incubation and replaced by DMSO for dissolution of the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm with Infinite M200 (TECAN, Austria). Tested concentrations which decreased the viability significantly to 80% or less were considered as toxic and were not used for further experiments.

2.5. Reporter gene assays

For assessment of transcriptional activities of studied receptors, the following cell lines were used:

- AZ-AhR, which was derived from HepG2 cells transfected with a construct containing several AhR binding sites upstream of luciferase reporter gene (Novotna et al., 2011).
- AIZ-AR, which was derived from 22Rv1 cells transfected with a construct containing three copies of androgen response regions (ARRs) followed by a single copy of androgen response element (ARE) from the promoter region of human prostate specific antigen (PSA) gene (Bartonkova et al., 2015).
- PZ-TR, which was derived from human hepatocarcinoma HepG2 cells transfected with a construct containing two copies of tandem thyroid responsive elements (TREs) (Illes et al., 2015).
- AZ-GR, which was derived from HeLa cells transfected with a construct containing several GR response elements upstream of a luciferase reporter gene (Novotna et al., 2012).
- IZ-VDR, which was derived from human colon adenocarcinoma LS180 cells, stably transfected with a construct containing three copies of vitamin D response elements VDRE-I from the human CYP24A1 promoter (Bartonkova et al., 2016).
- Transiently transfected human embryonal kidney Hek293T cells for assessment of PXR transcriptional activity. A chimera p3A4-luc reporter construct containing the basal promoter (+362/+53) with proximal PXR response element and the distal xenobiotic responsive enhancer module (+7836/+7208) of the CYP3A4 gene 5'-flanking region inserted to pGL3-Basic reporter vector was used together with expression plasmid for human wt-PXR, pSG5-PXR (kindly provided by Dr. S.Kliwer—University of Texas, Dallas, USA). The plasmids were transiently transfected to Hek293T cells by lipofection (FuGENE HD) with 300 ng/well of p3A4-luc reporter and 100 ng/well of wt-PXR into 24-well plates.

Following the plating in medium with CS-FBS (for AIZ-AR, PZ-TR, IZ-VDR, Hek293T) or regular FBS (AZ-GR, AZ-AhR), cells were stabilized for 16 h and then treated with BPS (0.1–100 µM) in the absence (Agonist setting) or presence (Antagonist setting) of dihydrotestosterone (DHT; 100 nM) or triiodothyronine (T3, 20 nM) or calcitriol (1,25(OH)₂D₃, 75 nM) or SR12813 (10 µM) or dexamethasone (DEX, 100 nM) or TCDD (5 nM), respectively and/or vehicle (DMSO; 0.1% v/v) for 24 h. After the treatments, cells were lysed and luciferase activity was measured with Infinite M200 (TECAN, Austria). Effective concentrations reaching 50% of maximum luciferase induction (EC50s) or inhibitory concentrations (IC50s) were calculated in GraphPad Prism 6.05.

2.6. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The total RNA was isolated using TRI Reagent® (Molecular Research Center, USA) and the quality was monitored as A₂₆₀/A₂₈₀ ratio. cDNA was synthesized from 1000 ng of total RNA using M-MuLV Reverse Transcriptase (M0253S, New England BioLabs) at 42 °C for 60 min in the presence of random hexamers (S1230, New England BioLabs). qRT-PCR was carried out on Light Cycler 480 II apparatus (Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic). The levels of mRNAs were determined using primers and probes from Universal Probes Library (UPL; Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic) (Table 1). The following program was used for monitoring the expression of both genes: an activation step at 95 °C for 10 min was followed by 45 cycles of PCR (denaturation at 95 °C for 10 s; annealing with elongation at 60 °C for 30 s). The measurements were performed in triplicates. Gene expression was normalized per glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene. Data were processed by the delta-delta method. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells.

2.7. Proliferation assay

Proliferation assay was used according to the manufacturer recommendations with minor modifications. Briefly, cells were seeded at the density of 10000 cells per well into 96-well plate (pre-coated with poly-D-lysine for LNCaP) in RPMI with CS-FBS and stabilized overnight. Next day, the cells were treated with dihydrotestosterone (DHT) alone or together with increasing concentrations of Bisphenol S (0.001–10 µM) for 24 h. At the end of treatment, the solution with 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrDu) was applied directly into the wells for additional 3 h. Thereafter, we followed strictly the procedure from manufacturer guide. At the end, the absorbances at 405 nm and reference at 495 nm were measured with Infinite M200Pro (Tecan, Austria). The proliferation capacity was expressed as% of the ratios of absorbances A₄₀₅/A₄₉₅ for DHT and sample, i.e. DHT was set to 100%.

2.8. SDS-PAGE and western blotting

The complete procedure from protein extracts preparation until the final protein detection of CYP3A4 and actin was described elsewhere

(Vrzal et al., 2015). Primary antibodies against $\kappa\text{B-}\alpha$ (sc-203, rabbit polyclonal; 1:500 dilution) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Chemiluminescence detection was performed using Western Sure Premium Chemiluminescent Substrate (C60429, LiCor). Densitometric analyses were performed with the C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner and Image Studio Digits software, both from LiCor.

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed by using GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The differences in luciferase assay, mRNA, proliferation and protein expression following incubation with the compounds investigated compared with the respective vehicle controls were tested by using ANOVA with Dunnett's post hoc test; $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. The effect of bisphenol S on nuclear receptors-mediated transcriptional activities

At the beginning, we had to set the non-toxic concentrations range for following gene reporter activities. To this purpose, the cell lines were treated with increasing concentrations of BPS for 24 h and then, MTT assay was performed. Bisphenol S decreased significantly the viability of AZ-AhR and PZ-TR cell to less than 80% for highest concentration (100 μM) (Fig. 1B). Therefore, this concentration was excluded for further testing in reporter gene assays and concentration of 50 μM was used as the highest. The viabilities of other tested cell lines were not significantly affected by 100 μM concentration of BPS (Fig. 1B). Thus, for these cell lines, the full range of concentrations, i.e. up to 100 μM , was used.

In the first step, we monitored the ability of Bisphenol S to activate the appropriate receptors in so-called "Agonist setting/mode". The luciferase activity dependent on AhR was weakly but insignificantly induced by 10 and 50 μM concentrations of BPS (Fig. 1C). However, next to positive control TCDD, it was negligible. In the case of PXR, we observed significant decrease of PXR-dependent luciferase activity by 35 and 45% for 50 and 100 μM concentrations, respectively (Fig. 1D). Ligand and activator of PXR, SR12813, increased the activity almost twice. Bisphenol S did not affect basal luciferase activities dependent on AR, GR, TR or VDR while positive controls in these systems, namely dihydrotestosterone, dexamethasone, triiodothyronine or calcitriol increased luciferase activities, respectively (Fig. 1E–H).

Since the compound can act as agonist or antagonist towards the nuclear receptor, we further tested the ability of BPS to antagonize the effect of true ligand for given receptor in so-called "Antagonist setting". In the TCDD-inducible AhR-dependent assay, there was no effect of BPS (Fig. 2A). In the Antagonist setting for PXR, we observed the same behavior as in the Agonist setting (Fig. 2B). There was a decrease of SR12813-inducible PXR-dependent luciferase activity by 34 and 43% for 50 and 100 μM concentrations, respectively. Combination of BPS with DHT dose-dependently increased DHT-inducible AR-dependent luciferase activity by 10–30% (Fig. 2C). This was significant for all tested concentrations of BPS next to DHT alone. Surprisingly, dexamethasone-inducible GR-dependent luciferase activity was significantly decreased by 39 and 54% with 50 and 100 μM concentrations of BPS, respectively (Fig. 2D). The calculated IC₅₀ was 52 μM (range 34–79 μM). The activities of two last receptors (TR, VDR) exposed to their ligands were not affected by the presence of BPS (Fig. 2E, F).

Due to the findings in reporter gene assays, we further focused on closer investigation of the effect of BPS on affected receptors.

3.2. The effect of BPS on AhR- and PXR-target genes expression in human hepatocytes

Since we observed mild induction of luciferase activity in reporter assay driven by AhR (Fig. 1C) and decline in reporter assay driven by PXR (Figs. 1D, 2B), we further investigated the potential impact of BPS on expression levels of genes for biotransformation enzymes regulated by AhR or PXR in the most appropriate in vitro cellular model, primary culture of human hepatocytes. This model was chosen due to the a) appropriate signaling mechanisms which are not disrupted as usually in cancer cells; b) high expression levels of biotransformation enzymes which may affect BPS disposition; c) high expression and functional levels of AhR and especially PXR.

First, we monitored the mRNA level of the most sensitive target gene controlled by AhR, CYP1A1. While positive control TCDD induced CYP1A1 mRNA from 42-fold (LH63) to 832-fold (LH64), BPS did not display any dose-related effect (Fig. 3A). The variability in the mRNA can be ascribed to genotypic and phenotypic uniqueness of the hepatocytes donors.

Second, we measured the CYP3A4 mRNA as it is controlled by PXR. Positive control Rifampicin (RIF) induced mRNA from 10-fold (LH63) to 47-fold (LH64) but there was no reproducible effect of BPS on CYP3A4 mRNA in human hepatocytes (Fig. 3B). Additionally, since we observed antagonistic behavior of BPS towards PXR (Fig. 2B), we treated human hepatocytes with PXR ligand we used in reporter gene assay, SR12813, in combination with BPS. The data from three different cultures demonstrated interindividual modulation of PXR-dependent CYP3A4 mRNA expression by BPS (Fig. 3C). Similar modulatory effect was observed at CYP3A4 protein level (Fig. 3D).

3.3. The effect of BPS on AR-target genes expression and proliferation activity in prostate cancer cells

The second interesting finding, we made in reporter gene assay, was that of BPS synergistic effect with DHT on AR-mediated luciferase activity (Fig. 2C). This suggested that BPS co-stimulated AR activation. Therefore, we monitored the effect of BPS in the same Agonist as well as Antagonist setting but at the level of expression of AR-target gene, KLK3. Since we observed DHT-inducible AR-dependent luciferase activity increase already at 1 and 10 nM, we excluded two highest concentrations (50 and 100 μM) and replaced them with the lower ones in order to use the concentrations closer to the human exposure levels. First, we monitored the expression of KLK3 in 22Rv1 cells, the AIZ-AR cells were derived from. While positive control DHT increased KLK3 mRNA approx. 1.9-times (Fig. 4A), BPS was without any effect. In contrast to Antagonist setting in reporter gene assay, no observable effect was seen at DHT-inducible KLK3 mRNA (Fig. 4B). Since 22Rv1 cells are androgen-nonsensitive due to the presence of both full-length and truncated AR forms, we further employed the LNCaP cell line with full-length AR only for comparison. In these cells, DHT induced KLK3 mRNA approx. 8-times, but BPS in the Agonist setting had no effect on KLK3 mRNA expression (Fig. 4D). In the Antagonist setting, BPS had no effect on DHT-inducible KLK3 mRNA expression (Fig. 4E) similarly like in the 22Rv1 cells.

Since we have observed synergistic activity of DHT and BPS in reporter gene assay on AR-dependent luciferase activity, we further verified if BPS could affect proliferation of prostate cell as AR is known to regulate cell cycle, i.e. it has an impact on cell proliferation (Schiewer et al., 2012). To this purpose, we employed assay using incorporating of 5-Bromo-2'-deoxy-uridine into the DNA of proliferating cells. First, we monitored the effect on AR-independent cells, 22Rv1. The presence of BPS in combination of DHT had no effect on proliferation activity of 22Rv1 cells (Fig. 4C). In contrast, BPS dose-dependently suppressed the proliferation of androgen-sensitive LNCaP in the presence of DHT (Fig. 4F).

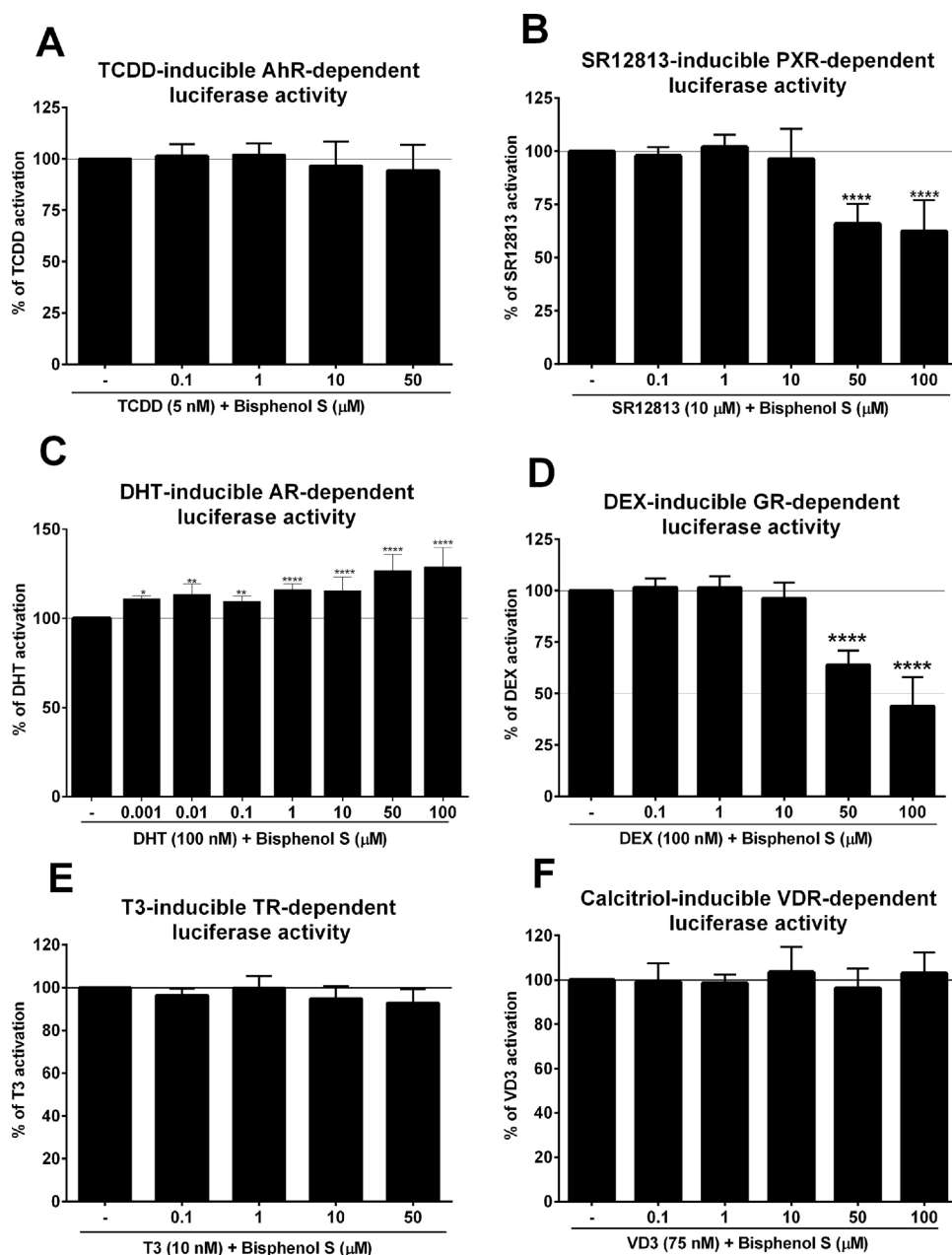


Fig. 2. The effect of bisphenol S on inducible activation of studied receptors. Cell lines cells were treated with bisphenol S (BPS; 0.1–100 μM) and adequate ligand for given receptor, i.e. TCDD (5 nM; for AhR) or SR1213 (10 μM; for PXR) or DHT (100 nM; for AR) or DEX (100 nM; for GR) or T3 (10 nM; for TR) or calcitriol (75 nM; vor VDR) for 24 h. Thereafter, reporter gene assay was performed as described in *Materials and Methods* section. The data are the mean \pm SD from at least 5 independent biological experiments (minimum 4 technical replicates each sample) and are expressed as% of positive control, i.e. appropriate activator for given assay. **, **** – value is significantly different from appropriate ligand-treated cells – $p < 0.01$, 0.0001.

3.4. The effect of BPS on GR-target gene expression in HeLa cells

One of the interesting finding from reporter gene assays was the weak antagonistic activity of BPS on glucocorticoid receptor (GR) (Fig. 2D). We further verified if the change in activity of GR is translated into the change of GR-target genes expression. We chose human cervical carcinoma cells, HeLa, since AZ-GR cell were derived from this cell line. We monitored the expression of three GR-target genes, namely GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), NFKBIA (nuclear factor kappa B inhibitor alpha) and IL-6 (interleukin 6). Dexamethasone induced GILZ mRNA in average 12-fold and the presence of BPS displayed dual behavior since 10 μM concentration significantly decreased mRNA to 70% of DEX (Fig. 5A), while 100 μM concentration significantly synergized the induction. The mRNA level of IL-6 was significantly repressed by DEX (to 80% of untreated control) but BPS had no further effect (Fig. 5B). The level of NFKBIA mRNA was increased in the presence of DEX to 2.6-fold over untreated cells and the combination with BPS had no impact except the 100 μM concentration (Fig. 5C). The

protein level of IκB-α was induced in average 1.4-times after 48 h by DEX but again, BSP had no apparent impact on protein level (Fig. 5D, E).

4. Discussion

Bisphenol S was suggested as adequate and safe alternative for Bisphenol A, which was demonstrated to possess estrogenic activity. Several studies demonstrated lower activity of BPS towards several nuclear receptors in comparison to BPA. Our intention was to either confirm or to disprove these findings.

In the current study we investigated the effect of bisphenol S on activity of several ligand-activated transcription factors, which regulate plethora of genes with impact in endogenous metabolism, cell growth, immune response, biotransformation and other cellular events. We found that this compound insignificantly activated AhR and decreased inducible activity of GR and PXR. Moreover, BPS co-stimulated activity of AR in the presence of DHT and inhibited proliferation of prostate

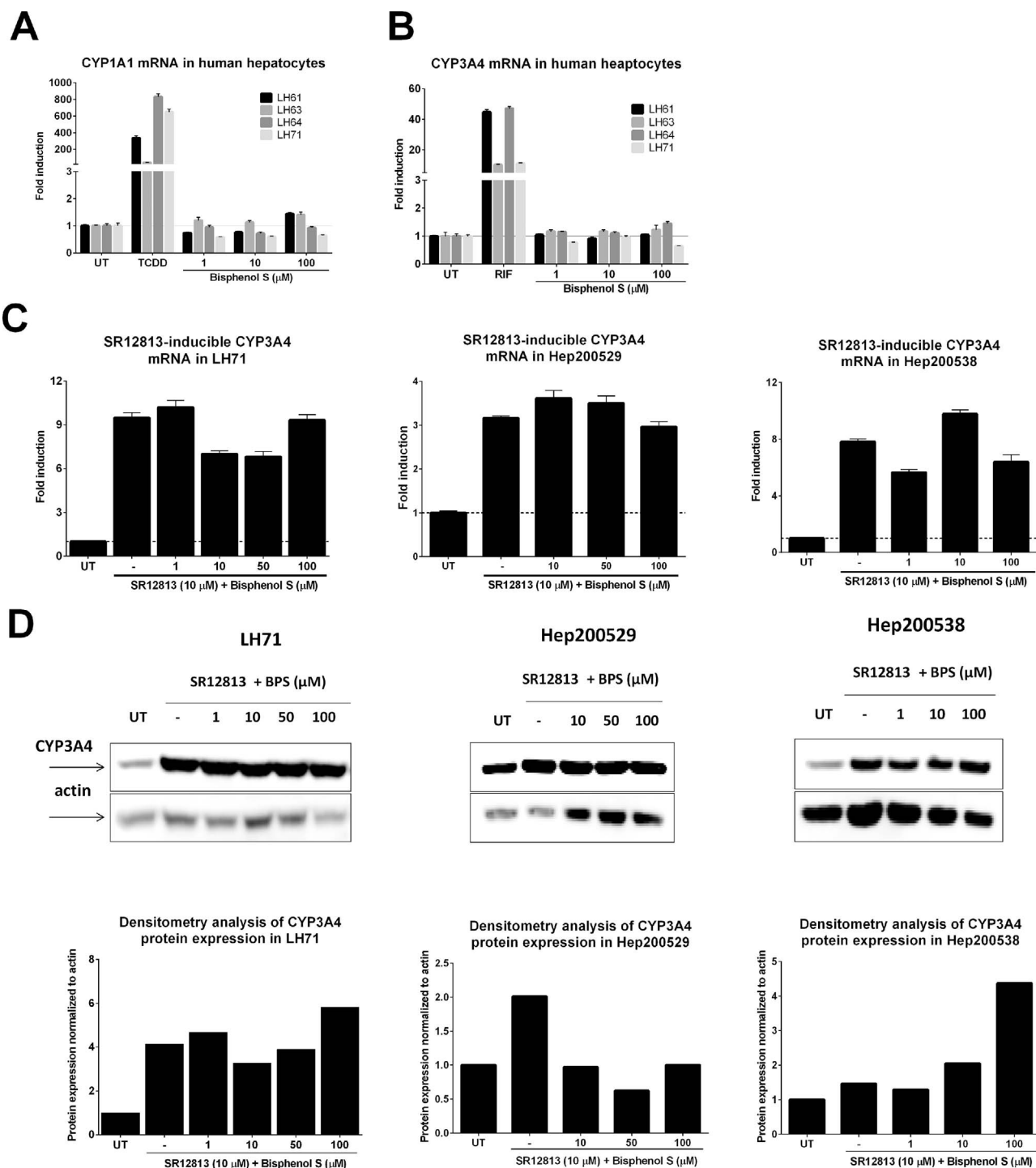


Fig. 3. The effect of bisphenol S on basal and inducible expression of selected cytochromes P450. Primary cultures of human hepatocytes were treated with bisphenol S (BPS; 0.1–100 μM) and/or DMSO (UT; 0.1% v/v) or TCDD (5 nM) (A) or Rifampicin (RIF; 10 μM) (B) as a vehicles for 24 h. C) Primary cultures of human hepatocytes were treated with bisphenol S (BPS; 0.1–100 μM) and SR12813 (10 μM) for 24 h. Thereafter CYP1A1 (A), CYP3A4 (B, C) and GAPDH (A–C) mRNAs were determined as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells ± SD normalized per GAPDH mRNA levels from 3 technical replicates. D) Three primary cultures of human hepatocytes were treated with bisphenol S (BPS; 0.1–100 μM) and SR12813 (10 μM) for 48 h. Thereafter, cells were processed as described in *Materials and Methods* section. Densitometry analysis together with immunoblots is shown (each sample from 1 technical/biological replicate).

androgen-sensitive LNCaP cells. Other receptors, TR, VDR were not affected by the BPS doses tested in the study. Modulatory effect of BPS was observed in human hepatocytes co-treated with PXR ligand, SR12813. We observed no effect of BPS on DEX-inducible NFκBIA but dual effect at GILZ mRNA expression in HeLa cells (Fig. 5A).

Due to the higher impact on viability of AZ-AhR, we could not use higher than 50 μM concentration for BPS (Fig. 1). Since the statistical

test ANOVA did not find the significance, we conclude that BPS is not capable to activate AhR up to this concentration. This is in contrast with bisphenol A (BPA), which we observed to activate AhR in the very same cell line even at 10 μM (Vrzal et al., 2015). Thus, BPS is less effective than BPA for AhR activation in this assay.

At the level of PXR, BPS displayed different behavior in contrast to BPA, since BPS significantly decreased basal PXR activity (Fig. 1D) but

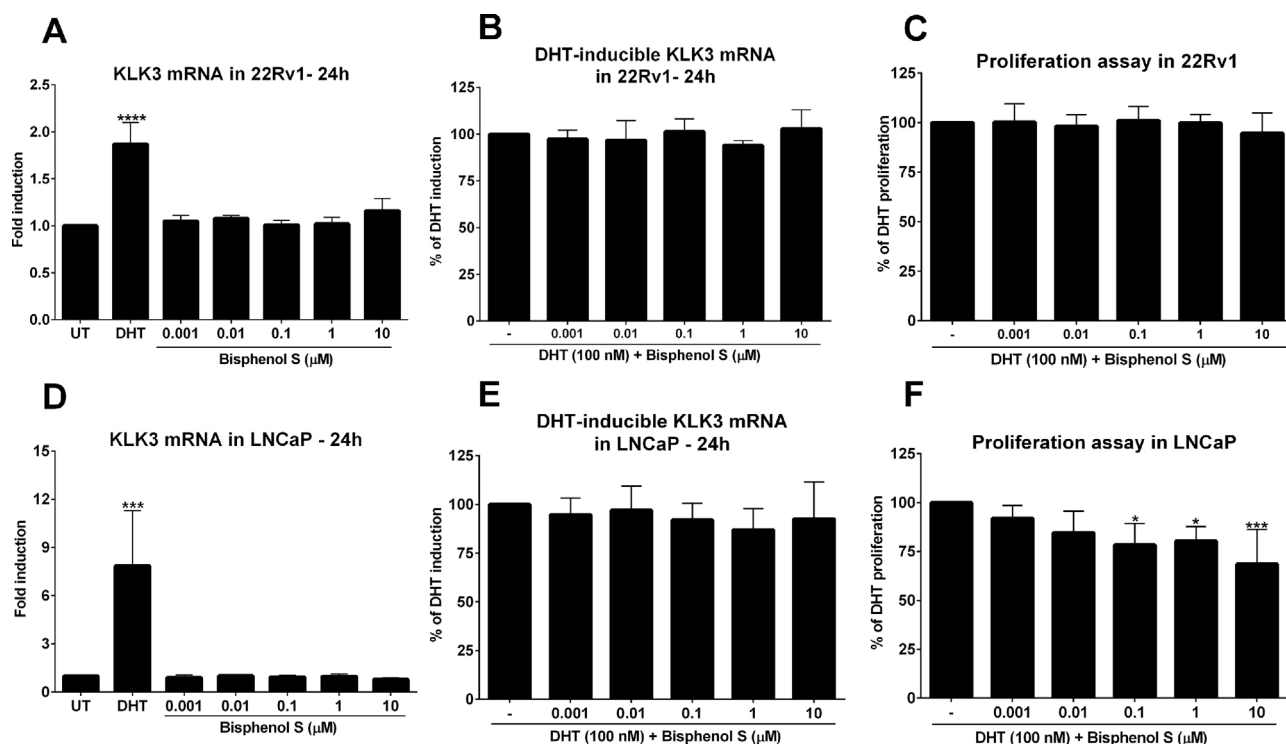


Fig. 4. The effect of bisphenol S on activity of androgen receptor in prostate cancer cell lines.

22Rv1 (A,B,C) or LNCaP (D,E,F) cells were treated for 24 h with bisphenol S (BPS; 0.001–10 μM) in the absence (A,D) or presence (B, C, E, F) of DHT (100 nM) and/or DMSO as a vehicle for negative control. Thereafter KLK3 and GAPDH mRNAs were determined as described in *Materials and Methods* section (A, B, D, E). Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells \pm SEM normalized per GAPDH mRNA levels from at least 3 independent biological experiments (minimum 3 technical replicates each sample) (A, D). In the antagonist setting, results are expressed as % of positive control (DHT) \pm SEM from at least 3 independent biological experiments (minimum 3 technical replicates each sample). Detection of proliferation (C, F) was measured as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as % of DHT proliferation \pm SEM from at least 4 independent biological experiments (minimum 6 technical replicates each sample). *, ***, **** – value is significantly different from UT-treated cells (A,D) or DHT-treated cells (B, C, E, F) ($p < 0.05, 0.001, 0.0001$).

BPA activated PXR comparably with its ligand rifampicin and induced CYP3A4 at mRNA as well as protein level (Vrzal et al., 2015). The basic difference between this work and other studies focusing on BPS activity towards PXR is the finding of antagonist-like behavior of BPS (Figs. 1D and 2B). While this effect was observed in reporter gene assay, there was only mild modulation of the PXR-driven expression of CYP3A4 in human hepatocytes to certain extent. This is probably the result of inter-individual variability among hepatocytes donors. Lower antagonist-like behavior in comparison with reporter gene assay might be attributed to metabolism of BPS, as it is important to have on mind that human hepatocytes are metabolically competent cells, unlike Hek293T cells, where reporter gene assay with co-transfected PXR was performed. Thus, metabolism of BPS might be responsible for such irreproducible pattern. BPS was found to be conjugated to glucuronide and sulfate in HeparG (considered as good approximation of human hepatocytes) (Le Fol et al., 2015) and recent study identified the UGT1A9 as the main responsible enzyme for BPS glucuronidation (Gramec Skledar et al., 2015). Due to the lack of UGT1A9 expression in Hek293T cells, we may anticipate that BPS metabolism in hepatocytes abolishes its PXR-directed antagonist behavior. However, UGT1A9 inhibition or genetic polymorphism might strengthen this antagonism of BPS. Thus, chemical modification of hydroxy groups of BPS with non-glucuronidated functional groups might pave the route to true PXR antagonist. This would be beneficial, since PXR activation results in some undesirable outcomes such as adverse drug interactions due to CYP induction with consequence of transplant rejection (cyclosporine) (Ruschitzka et al., 2000), loss of drug efficacy (Curran and Ribera, 2011), acetaminophen toxicity in a PXR-dependent manner (Guo et al., 2004) or induction of hepatic steatosis (Hoekstra et al., 2009; Lee et al., 2008). Thus, adverse PXR-dependent interactions might be avoided if suitable antagonist would exist.

Another interesting finding we observed at GR activity level, where BPS antagonized DEX-activated GR in reporter gene assay with IC50 approx. 52 μM (Fig. 2D). This is less than for BPA, for which we found IC50 approximately 66 μM (Vrzal et al., 2015). However, the expected antagonism of BPS was demonstrated only partially at the level of mRNA of one GR-controlled gene. While inducible genes, like GILZ and NFkBIA were induced by DEX, BPS was not able to antagonize DEX action to such an extent like in reporter gene assay (compare Figs. 2D vs. 5A). However, while there is just couple of GREs in reporter stably transfected to HeLa cells, there is much larger promoter region where other factors might interact. Especially when BPS was demonstrated to activate estrogen receptor alpha (Teng et al., 2013) up to 10 μM and estrogens were demonstrated to downregulate GILZ (Tynan et al., 2004; Whirledge and Cidlowski, 2013). Thus, GILZ mRNA level is in this case combination of at least two effects, one mediated by GR and second mediated by ERα. However, this does not explain the synergism at 100 μM concentration. Moreover, in general we can observe the mild strengthen effect of BPS on activated GR-controlled mRNAs of its target genes. Possibly, some BPS-triggered cellular event outweighs its antagonist-like behavior for GR.

One last thing worth of mention in this study is the stimulative activity of BPS on DHT-induced AR activity (Fig. 2C) and the suppression of proliferation in the presence of BPS observed in androgen-sensitive cells, LNCaP (Fig. 4F). However, the first mentioned effect was not translated into the change of AR-target gene expression, KLK3 (Fig. 4B, E). This may not be surprising since protein product of KLK3 gene, PSA, does not contribute to cell cycle progression. Nevertheless, we may anticipate that the synergistic activity of BPS on DHT-inducible AR-dependent luciferase activity may have promoter-specific impact on cell cycle regulating genes which stand beyond the effect on proliferation observed in LNCaP cells, especially when no cytotoxic effect

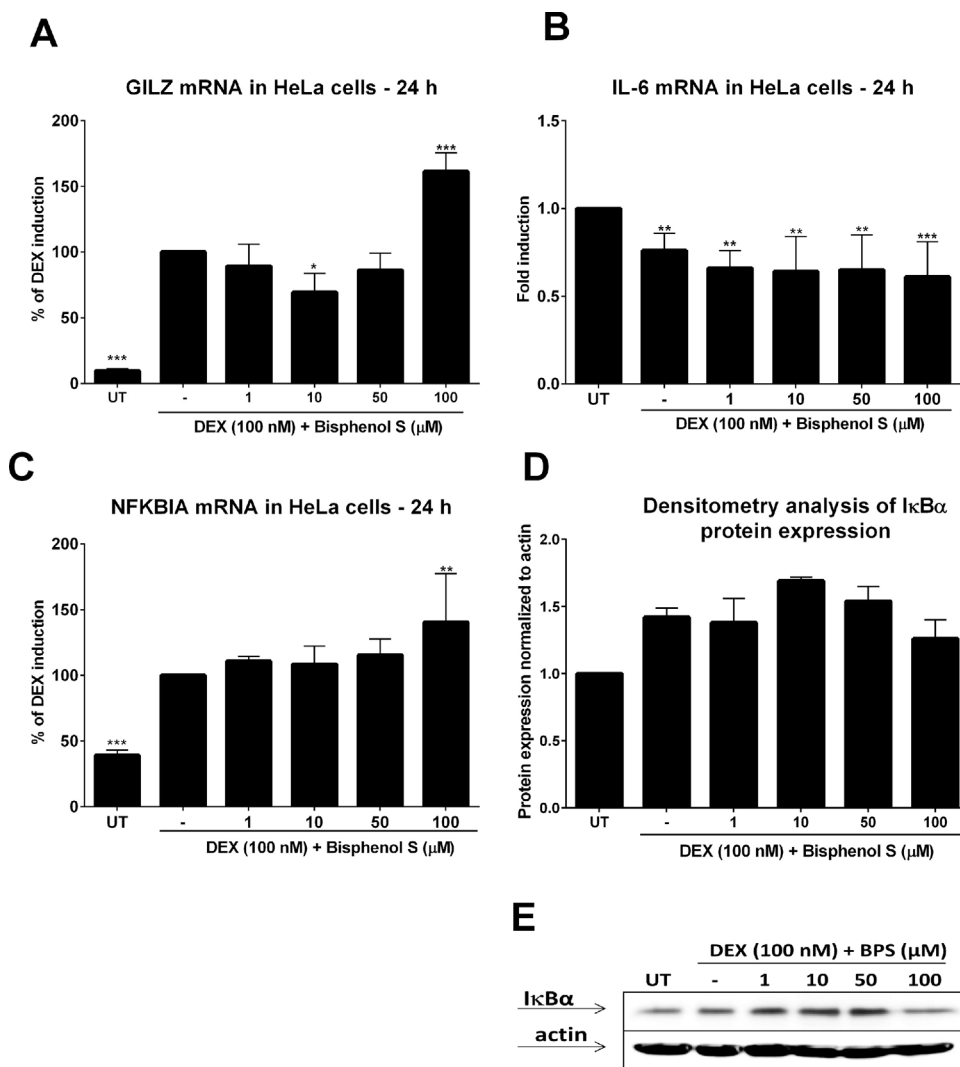


Fig. 5. The effect of bisphenol S on inducible expression of GR-regulated genes.

HeLa cells were treated with increasing concentrations of bisphenol S (BPS; 1–100 μM) in the presence of dexamethasone (DEX; 100 nM) for 24 h (mRNA) or 48 h (protein). Thereafter GILZ, NFKBIA, IL6 and GAPDH mRNAs were determined as described in *Materials and Methods* section. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells ± SEM from at least 5 independent biological experiments (minimum 3 technical replicates each sample). (B) or % of DEX induction (A, C) normalized per GAPDH mRNA levels. The data are the mean ± SEM from at least 4 independent biological experiments (minimum 3 technical replicates each sample). *, **, *** – value is significantly different from DMSO – (B) or DEX-treated cells (A, C) ($p < 0.05, 0.01, 0.001$) (A, B); Densitometry analysis of IκBα (D) protein expression from two-independent experiments (cell passages; 1 technical replicate each sample) with representative western blots (E).

of BPS was observed (Fig. 1B). Moreover, recent study, which investigated the interactions of coregulatory peptides with BPS at AR complexes using Micro Array for Real-time Coregulator Nuclear Receptor Interaction Assays provided the evidence that BPS interacts positively with 4 (AR being among them) and negatively with 12 peptides of AR complex (Perera et al., 2017). This might explain our observation in 22Rv1-derived (AIZ-AR) cells. The reason why we did not observe the change in proliferation of 22Rv1 in contrast to LNCaP cells might be, among many other things, the presence of truncated variant of androgen receptor, AR-v7. Its dimerization ability was described to be required for transactivation of target genes and for providing the castration-resistant cell growth (Xu et al., 2015). No effect of BPS on cell proliferation in 22Rv1 cells, an in vitro model of castration-resistant prostate cancer, supports our hypothesis. In addition, our finding in reporter gene assay is in contrast to Chinese hamster ovary cells transiently transfected with plasmids for AR and reporter, where weak anti-androgenic activity was described (Rosenmai et al., 2014). Thus, our study only emphasizes the need to confirm observations in human cellular models as cellular background of different species with exogenously transfected vectors and reporters may produce quite opposite results.

In general, bisphenol S possess weak activity towards certain receptors. However, we found co-stimulative effect of BPS on activated androgen receptor in nanomolar range, which is comparable with the concentrations found in some maternal and cord sera (Liu et al., 2017). Thus, long-term low-level exposure to BPS from environment should,

however, be investigated further in context of activated androgen receptor in order to confirm or disprove our finding and delineate effect, if any, on male/female sexual development and function. Overall our data suggest that BPS is of no regulatory concern at the current exposure levels.

Conflict of interest statement

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Czech Science Foundation P303/12/G163.

References

- Bartonkova, I., Novotna, A., Dvorak, Z., 2015. Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS One* 10, e0121316.
- Bartonkova, I., Grycova, A., Dvorak, Z., 2016. Profiling of vitamin D metabolic intermediates toward VDR using novel stable gene reporter cell lines IZ-VDR and IZ-CYP24. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 1211–1222.
- Curran, A., Ribera, E., 2011. HIV and TB coinfection: using adjusted doses of lopinavir/ritonavir with rifampin. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 1115–1118.
- Erden, E.S., Genc, S., Motor, S., Ustun, I., Ulutas, K.T., Bilgic, H.K., Oktar, S., Sungur, S., Erem, C., Gokce, C., 2014. Investigation of serum bisphenol A, vitamin D, and parathyroid hormone levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome.

- Endocrine 45, 311–318.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2011. Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their derivatives in canned food and beverages. *J. Chromatogr. A* 1218, 1603–1610.
- Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Masic, L., Finel, M., 2015. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica* 45, 511–519.
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S., 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of bisphenol A and bisphenol S. *Toxicol. In Vitro* 26, 727–731.
- Grun, F., Blumberg, B., 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 161–171.
- Guo, G.L., Moffit, J.S., Nicol, C.J., Ward, J.M., Aleksunes, L.A., Slitt, A.L., Kliewer, S.A., Manautou, J.E., Gonzalez, F.J., 2004. Enhanced acetaminophen toxicity by activation of the pregnane X receptor. *Toxicol. Sci.* 82, 374–380.
- Hoekstra, M., Lammers, B., Out, R., Li, Z., Van Eck, M., Van Berkel, T.J., 2009. Activation of the nuclear receptor PXR decreases plasma LDL-cholesterol levels and induces hepatic steatosis in LDL receptor knockout mice. *Mol. Pharm.* 6, 182–189.
- Illes, P., Brtko, J., Dvorak, Z., 2015. Development and characterization of a human reporter cell line for the assessment of thyroid receptor transcriptional activity: a case of organotin endocrine disruptors. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7074–7083.
- Johns, L.E., Ferguson, K.K., Meeker, J.D., 2016. Relationships between urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations and vitamin D levels in U.S. adults: national health and nutrition examination survey (NHANES), 2005–2010. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4062–4069.
- Keri, R.A., Ho, S.M., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S., 2007. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 24, 240–252.
- Kuo, T., Harris, C.A., Wang, J.C., 2013. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380, 79–88.
- Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., Terao, Y., 2005. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 121–130.
- Le Fol, V., Ait-Aissa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868.
- Lee, J.H., Zhou, J., Xie, W., 2008. PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks. *Mol. Pharm.* 5, 60–66.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.B., Nakata, H., Kannan, K., 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6860–6866.
- Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E.K., Dinu, I., Martin, J.W., 2017. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2456–2463.
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priyenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G., Mselli-Lakhal, L., 2012. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55, 395–407.
- Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J.M., Real, M., Fernandez, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136.
- Moreau, A., Teruel, C., Beylot, M., Albalea, V., Tamasi, V., Umbdenstock, T., Parmentier, Y., Sa-Cunha, A., Suc, B., Fabre, J.M., Navarro, F., Ramos, J., Meyer, U., Maurel, P., Vilarem, M.J., Pascussi, J.M., 2009. A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte. *Hepatology* 49, 2068–2079.
- Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat. Toxicol.* 148, 195–203.
- Novotna, A., Pavek, P., Dvorak, Z., 2011. Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10133–10139.
- Novotna, A., Pavek, P., Dvorak, Z., 2012. Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 842–847.
- Perera, L., Li, Y., Coons, L.A., Houtman, R., van Beuningen, R., Goodwin, B., Auerbach, S.S., Teng, C.T., 2017. Binding of bisphenol A, bisphenol AF, and bisphenol S on the androgen receptor: coregulator recruitment and stimulation of potential interaction sites. *Toxicol. In Vitro* 44, 287–302.
- Peyre, L., Rouimi, P., de Sousa, G., Helies-Toussaint, C., Carre, B., Barcellini, S., Chagnon, M.C., Rahmani, R., 2014. Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: a focus on their potential involvement in non-alcoholic fatty liver disease. *Food Chem. Toxicol.* 70, 9–18.
- Pichard-Garcia, L., Gerbal-Chaloin, S., Ferrini, J.B., Fabre, J.M., Maurel, P., 2002. Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. *Methods Enzymol.* 357, 311–321.
- Prieur, X., Huby, T., Coste, H., Schaap, F.G., Chapman, M.J., Rodriguez, J.C., 2005. Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5. *J. Biol. Chem.* 280, 27533–27543.
- Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L., 2016. Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. *Endocrinology* 157, 636–647.
- Roelofs, M.J., van den Berg, M., Bovee, T.F., Piersma, A.H., van Duursen, M.B., 2015. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology* 329, 10–20.
- Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B.M., Wedebye, E.B., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? *Toxicol. Sci.* 139, 35–47.
- Ruschitzka, F., Meier, P.J., Turina, M., Luscher, T.F., Noll, G., 2000. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 355, 548–549.
- Schiewer, M.J., Augello, M.A., Knudsen, K.E., 2012. The AR dependent cell cycle: mechanisms and cancer relevance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 34–45.
- Sui, Y., Ai, N., Park, S.H., Rios-Pilier, J., Perkins, J.T., Welsh, W.J., Zhou, C., 2012. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ. Health Perspect.* 120, 399–405.
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B.A., Jetten, A.M., Austin, C.P., Tice, R.R., 2013. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 203, 556–564.
- Tynan, S.H., Lundeen, S.G., Allan, G.F., 2004. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 225–239.
- Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N., Hernandez-Cordoba, M., 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 115–125.
- Vrzal, R., Zenata, O., Dorcakova, A., Dvorak, Z., 2015. Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 238, 43–53.
- Whirlledge, S., Cidlowski, J.A., 2013. Estradiol antagonism of glucocorticoid-induced GILZ expression in human uterine epithelial cells and murine uterus. *Endocrinology* 154, 499–510.
- Xu, D., Zhan, Y., Qi, Y., Cao, B., Bai, S., Xu, W., Gambhir, S.S., Lee, P., Sartor, O., Flemington, E.K., Zhang, H., Hu, C.D., Dong, Y., 2015. Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes. *Cancer Res.* 75, 3663–3671.
- Zhang, J., Begum, A., Brannstrom, K., Grundstrom, C., Iakovleva, I., Olofsson, A., Sauer-Eriksson, A.E., Andersson, P.L., 2016. Structure-based virtual screening protocol for in silico identification of potential thyroid disrupting chemicals targeting transthyretin. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11984–11993.

Příloha 3

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells. *Translational Cancer Research*, 7, 383 - 390. [IF₂₀₁₆ 1.167]



Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells

Ondrej Zenata, Zdenek Dvorak, Radim Vrzal

Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtitelu 27, Olomouc, Czech Republic

Contributions: (I) Conception and design: R Vrzal, O Zenata; (II) Administrative support: None; (III) Provision of study materials or patients: None; (IV) Collection and assembly of data: O Zenata; (V) Data analysis and interpretation: O Zenata, R Vrzal; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Radim Vrzal. Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Slechtitelu 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic. Email: radim.vrzal@email.cz.

Background: Herbal medicines containing berberine have a wide spectrum of usage. However, the effect on androgen receptor (AR) activity at plasmatic relevant concentrations is omitted. Therefore, the effect of berberine on AR activity in prostate cancer cell lines was investigated.

Methods: We used the reporter gene assay (RGA) and polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring the activity of AR. Moreover, we monitored the proliferation of two prostate cancer cell lines treated with Berberine.

Results: Berberine significantly potentiated dihydrotestosterone (DHT)-inducible AR-dependent luciferase activity in RGA. It also significantly decreased basal KLK3 mRNA level in 22Rv1 cells, but DHT-inducible KLK3 mRNA was not affected in androgen-independent (22Rv1) or androgen-dependent (LNCaP) cells. Proliferation of both cell lines was significantly inhibited by 100 and 1,000 nM concentrations in similar manner and Berberine increased Annexin V staining, suggesting an apoptotic event.

Conclusions: Berberine inhibits proliferation of prostatic cell lines at pharmacologically reachable concentrations but with no apparent link to androgen receptor-driven target gene expression.

Keywords: KLK3; LNCaP; 22Rv1; 3D culture

Submitted Nov 10, 2017. Accepted for publication Feb 26, 2018.

doi: 10.21037/tcr.2018.03.31

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tcr.2018.03.31>

Introduction

Berberine (*Figure 1A*) is a quaternary isoquinoline alkaloid which is used as a remedy for the treatment of diarrhea and gastroenteritis due to its anti-motility and antimicrobial activities (1). It is sold as dietary supplement with content of Berberine usually ranging from 400 to 1,000 mg per capsule (e.g., Swanson, Dr. Whitaker, aSquared Nutrition). Among many described biological effects, the antineoplastic activity attracts the attention. It was described to be effective against pancreatic cancer cells, breast cancer cells or prostate cancer cells (2-4). One of the first studies demonstrated the decline in the viability of androgen-dependent as well

independent cells upon Berberine treatment as a result of inhibition of cyclins expression and activation of caspases (4). Following studies confirmed this observation and extended the knowledge about other molecular targets involved in the anti-growth activity of Berberine, like p53 (5) or c-Jun N-terminal kinase (JNK) (6). Among molecular targets of Berberine, androgen receptor (AR) was also demonstrated (7). By employing reporter gene assay, it was demonstrated that Berberine inhibited dose-dependently ligand-independent AR-dependent luciferase activity after 6 h for concentrations from 25–100 μ M in 22Rv1 cells and ligand-dependent AR-dependent expression of KLK3 mRNA (prostate specific

antigen; PSA) in LNCaP cells after 24 h (7). Moreover, downregulation of PSA and androgen receptor protein were demonstrated as well.

The common thing for all these studies is relatively high concentration of Berberine. Even though Berberine inhibited LNCaP xenografts in nude mice after daily i.p. injection of 5 mg/kg, the plasma concentrations in mice were not established. Moreover, concentrations which cause more than 20% decline in viability of cells *in vitro* are difficult to be connected with AR action especially when apoptotic events are triggered at these concentrations. Thus, the AR-dependence in human subjects is in question.

Pharmacokinetics of Berberine was determined in rats, where oral administration of 90 mg/kg led to C_{MAX} equal to 29 ng/mL (corresponds to approx. 86 nM) with T_{MAX} 1 h, but then it dropped down (8). Studies in human volunteers demonstrated variable pharmacokinetic profiles. In one study, single oral dose of 300 mg of Berberine resulted in $C_{max} = 394.7 \pm 155.4$ μ g/L (approx. 1.17 ± 0.46 μ M) with $T_{max} = 2.37 \pm 0.04$ h in healthy human male volunteers (9). In another study, 500 mg orally administered Berberine chloride led to C_{max} of 1.4 nM in healthy volunteers (10). However, plasma levels of Berberine were higher approx. 3-times in hypercholesterolemic subjects after daily chronic administration of Berberine chloride at 15 mg/kg of body weight. Thus, with similar initial dose, concentration in plasma may vary in 3 orders of magnitude among human volunteers. In another study, daily administration of 1.2 g for 2 weeks resulted in average plasma concentration 0.19 mg/L (approx. 565 nM) (11). If we accept as the upper limit the maximal concentration from the study by Li *et al.* (9), then the maximal reachable systemic concentration of Berberine does not exceed 1 μ M after single oral administration. Thus, higher concentrations may not be of clinical relevance. Since there was described that some compounds targeting steroid receptors may display a hormetic effect (12), it is worth to know if submicromolar concentrations of Berberine may display such a behavior or provide regular monotonic dose-response. To this purpose, we decided to investigate the effect of Berberine in low submicromolar concentrations, which more reflect real *in vivo* situations, on androgen receptor activity and proliferation in prostate cancer cell lines.

Methods

Compounds and reagents

Dimethyl sulfoxide (DMSO), dihydrotestosterone (DHT),

Berberine, proliferation assay kit (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III), Charcoal-stripped fetal bovine serum (FBS; F6765) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Oligonucleotide primers used in RT-PCR reactions were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). Annexin V binding buffer and Annexin V-CF488A conjugate were from Biotium (Fremont, USA). LightCycler 480 Probes Master was from Roche Diagnostic Corporation (Intes Bohemia, Czech Republic). Microtiter plates for 3D cell culture were obtained from 300Microns (Karlsruhe, Germany). All other chemicals were of the highest quality commercially available.

Cell cultures

Human Caucasian prostate carcinoma (LNCaP; No. 89110211) and human prostate carcinoma epithelial cell line (22Rv1; No. 05092802) were purchased from Public Health England. Both cell lines and stably transfected cell line AIZ-AR (derived from 22Rv1) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of charcoal-stripped fetal bovine serum, 100 U/mL streptomycin, 100 μ g/mL penicillin, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

Cell viability assay (MTT)

Cell line AIZ-AR was treated with increasing concentrations of BER (0.01–50 μ M) and/or DMSO (0.1%; v/v) for 24 h. Thereafter, the medium was replaced by PBS with MTT (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in final concentration of 0.3 mg/mL. The solution was discarded after 30–40 minutes of incubation and replaced by DMSO for dissolution of the formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm with Infinite M200 (TECAN, Austria). Tested concentrations causing decline in viability no greater than 20% were considered as non-toxic for further experiments.

Gene reporter assay

Stably transfected gene reporter cell line AIZ-AR, which was derived from 22Rv1 cells transfected with a construct containing 3 copies of androgen response regions (ARRs) followed by a single copy of androgen response element (ARE) from the promoter region of human PSA (KLK3)

gene (Bartonkova, 2015). Following the plating, cells were stabilized for 16 h and then treated with BER (0.001–1,000 nM) in the absence (Agonist setting) or presence of dihydrotestosterone (DHT; 100 nM) (Antagonist setting) and/or vehicle (DMSO; 0.1% v/v) for 24 h. After the treatments, cells were lysed and luciferase activity was measured with Infinite M200 (TECAN, Austria).

Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The total RNA was isolated using TRI Reagent® (Molecular Research Center, USA). cDNA was synthesized from 1,000 ng of total RNA using M-MuLV Reverse Transcriptase (M0253S, New England BioLabs) at 42 °C for 60 min in the presence of random hexamers (S1230, New England BioLabs). qRT-PCR was carried out on Light Cycler 480 II apparatus (Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic). The levels of KLK3 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAs were determined using primers and Universal Probes Library (UPL; Roche Diagnostic Corporation, Prague, Czech Republic) probes as follows: KLK3 (PSA)-UPL 44, forward: GTGCTTGTTGGCCTCTCGT, reverse: CAGCAAGATCACGCTTTTGT; GAPDH-UPL 60, forward: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC, reverse: ACGACCAAATCCGTTGACTC. The following program was used for monitoring the expression of all genes: an activation step at 95 °C for 10 min was followed by 45 cycles of PCR (denaturation at 95 °C for 10 s; annealing with elongation at 60 °C for 30 s). The measurements were performed in triplicates. Gene expression was normalized per GAPDH as a housekeeping gene. Data were processed by the delta-delta method. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells.

Proliferation assay

Proliferation assay was performed according to the manufacturer recommendations with minor modifications. Briefly, cells were seeded at the density of 10,000 cells per well into 96-well plate (for LNCaP pre-coated with poly-D-lysine; for 3D culture with microcavities each with 300 µm in diameter) and stabilized overnight. Next day, the cells were treated with dihydrotestosterone (DHT) alone or together with increasing concentrations of Berberine (0.1–1,000 nM) for 24 h. At the end of treatment, cells were washed with PBS and the solution with 5-Bromo-

2'-deoxy-uridine (BrDu) was applied for 3 h. Thereafter, we followed strictly the procedure from manufacturer guide. At the end, the absorbance at 405 nm and reference 495 nm were measured with Infinite M200Pro (Tecan, Austria). The proliferation capacity was calculated as % of the ratio of absorbances A_{405}/A_{495} for DHT control sample and for other samples, i.e., DHT sample was set to 100%.

Annexin V assay

Annexin V assay was performed according to the manufacturer recommendations (ChemoMetec). Briefly, 22Rv1 cells were seeded at the density of 4×10^5 cells per well into 12-well plate in RPMI medium supplemented with Charcoal-stripped serum. After overnight stabilization, cells were treated with dihydrotestosterone (DHT; 100 nM), Berberine (1,000 nM), combination of both and/or DMSO (0.1%, v/v) for 24 h. Thereafter, cells were harvested by trypsinization, counted and approx. 3×10^5 cells were resuspended in Annexin V binding buffer, to which Annexin V-CF488A and Hoechst 33342 were added. After incubation at 37 °C for 15 min, cells were spun down twice and each time the pellet was resuspended in Annexin V binding buffer, lastly supplemented with propidium iodide and immediately analyzed by Nucleocounter NC-3000 (ChemoMetec; Denmark).

Statistical analysis

All values were subjected to Paired Student's *t*-test. All statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2010. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

First, we determined the non-toxic concentrations of BER in recently developed AR-responsive cell line (AIZ-AR) (13) for the purpose of monitoring activity of AR. The viability significantly dropped below our personally set 80% threshold for concentration of 5 µM within 24 h (Figure 1B). Therefore, we further used concentrations no higher than 1,000 nM. In reporter gene assay, there was no activation of AR by BER next to positive control DHT (100 nM) (Figure 1C) but there was significant approx. Twenty percent increase of DHT-inducible AR-dependent luciferase activity above DHT when co-incubated with BER (Figure 1D). Based on this finding, we further focused on the expression of AR target gene, KLK3. We used 22Rv1 cells, which

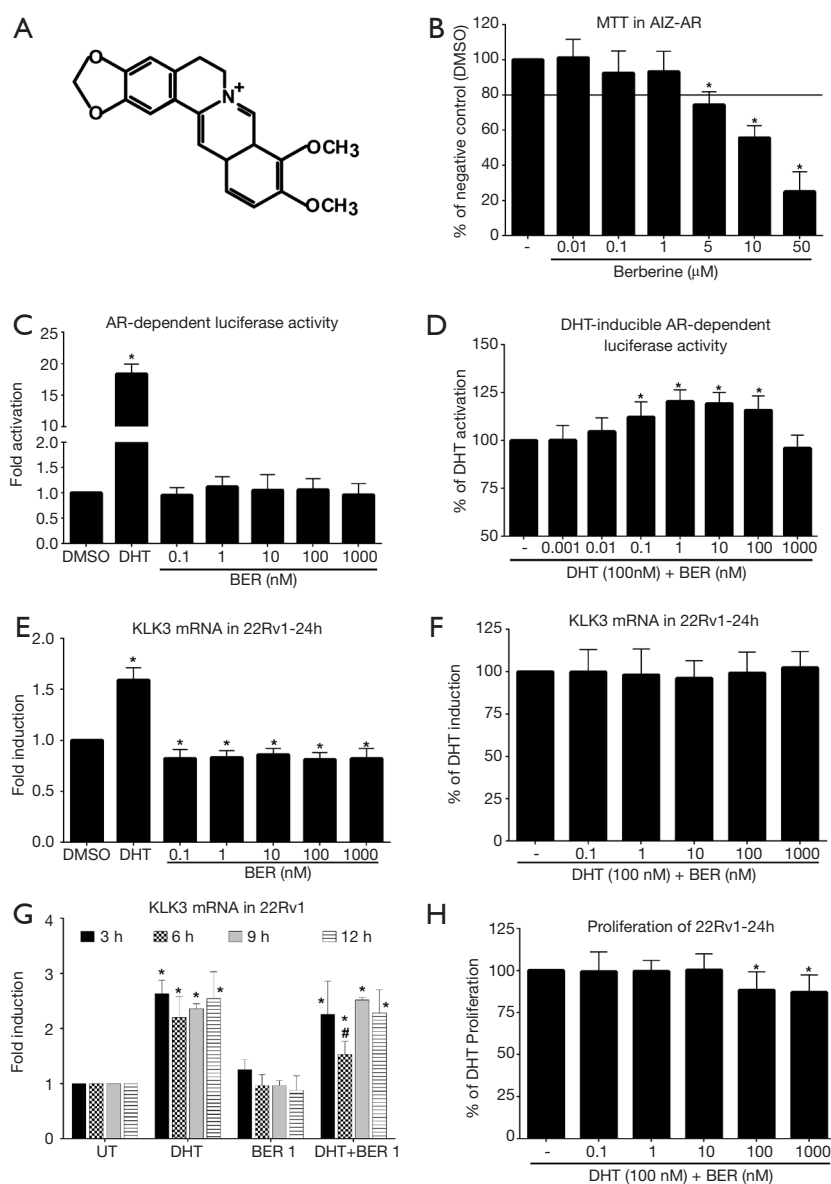


Figure 1 The effect of Berberine on androgen receptor activity in androgen-independent cells. The structure of Berberine (BER) (A). MTT assay performed on AIZ-AR cells treated with BER (0.01–50 μM) and/or dimethyl sulfoxide (DMSO) (0.1% v/v) as a vehicle for control for 24 h (B). Gene reporter assay of AIZ-AR cells incubated with BER (0.1–1,000 nM) in the absence (C) or presence (D) of dihydrotestosterone (DHT) (100 nM) and/or DMSO (0.1% v/v) for 24 h. The data are the mean ± SEM from 5 (C) or 7 (D) independent experiments and are expressed as fold activation of AR over DMSO-treated cells (C) or as a % of positive control (DHT) (D). KLK3 mRNA expression in 22Rv1 cells incubated with BER (0.1–1,000 nM) in the absence (E) or presence (F) of DHT (100 nM) and/or DMSO (0.1% v/v) for 24 h. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells ± SEM (E) or as % of DHT induction ± SEM (F). The data are mean from at least 4 consecutive cell passages and were normalized per GAPDH mRNA levels (E,F). 22Rv1 cells were treated for 3, 6, 9 and 12 h with Berberine (1 nM) and/or DHT (100 nM) and/or DMSO as a vehicle for positive or negative control, respectively. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells ± SEM. The data are mean from at least 4 consecutive cell passages and were normalized per GAPDH mRNA levels (G). Proliferation assay performed in 22Rv1 cells in the presence of DHT (H). Results are expressed as a % of DHT treated cells. *, value is significantly different from DMSO-treated cells ($P < 0.05$) (B,C,E,G) or DHT (D,H). #, value is significantly different from DHT-treated cells ($P < 0.05$) (G).

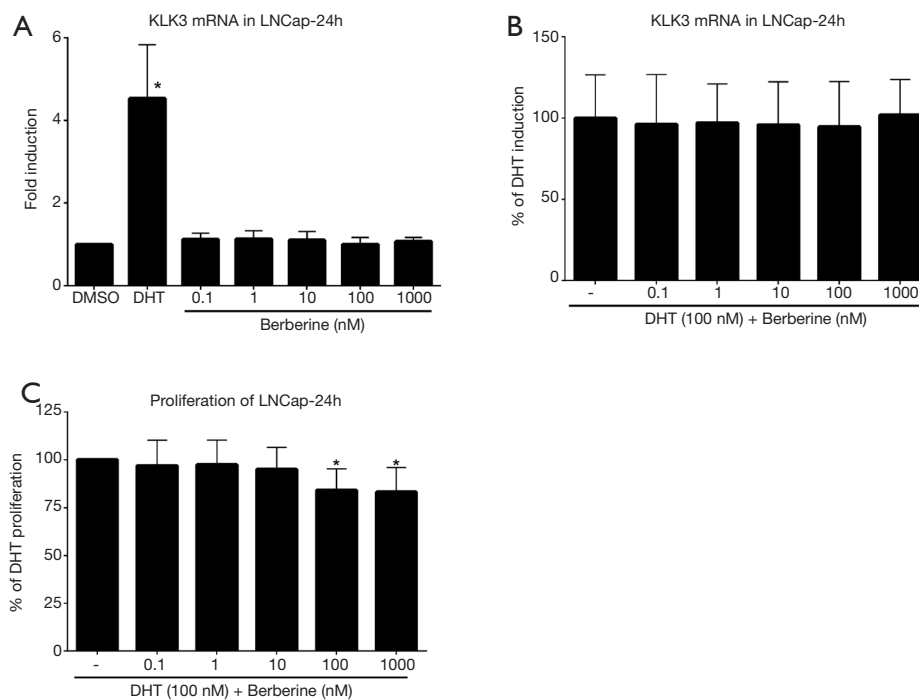


Figure 2 The effect of Berberine on androgen receptor activity in androgen-dependent cells. LNCaP cells were treated for 24 h with Berberine (0.1–1,000 nM) in the absence (A) or presence (B,C) of DHT (100 nM) and/or DMSO as a vehicle for negative control. Results are expressed as fold induction over DMSO-treated cells \pm SEM (A), as % of DHT induction \pm SEM (B) or as % of DHT proliferation \pm SEM from 3 independent cell passages. The data in A, B were normalized per GAPDH mRNA levels. *, value is significantly different from DMSO-treated cells (A) or DHT-treated cells ($P < 0.05$). DHT, dihydrotestosterone; DMSO, dimethyl sulfoxide.

AIZ-AR was derived from. While the positive control DHT induced significantly KLK3 mRNA, Berberine significantly decreased the basal level of KLK3 mRNA about 20% independently of the dose (*Figure 1E*). However, Berberine had no effect on DHT-inducible mRNA level of KLK3 (*Figure 1F*). Since KLK3 mRNA may undergo different stabilization/degradation in contrast to exogenous luciferase in longer time, we monitored DHT-inducible KLK3 mRNA in shorter periods of time in the presence of Berberine (*Figure 1G*). We observed significantly attenuated DHT-inducible AR-dependent KLK3 mRNA in the presence of Berberine after 6 hrs. Shorter or longer duration of treatment had no effect on inducible KLK3 mRNA.

Since there was mild but significant synergism of DHT and Berberine on AR activity in reporter gene assay, we tested if this finding can be connected to proliferation of 22Rv1 cells. We observed mild but significant decline of proliferation for concentrations 100 and 1,000 nM (*Figure 1H*). This is in contrast to expected AR co-activation.

Due to the known observations, which suggested different behavior of cells either in 2D or 3D culture model (14-16), we performed the proliferation assay in the 3D culture [technology based on the presence of microcavities (300Microns, Germany)] plates to compare 2D and 3D outputs. However, proliferation in 3D layout followed the same pattern as in the case of 2D culture (data not shown).

Since all experiments so far were performed in androgen-independent prostate cell line, we monitored the KLK3 expression and cellular proliferation in the presence of Berberine in androgen-dependent cell line, LNCaP. However, basal or DHT-inducible KLK3 mRNA as well as proliferation profiles were almost identical with 22Rv1 cells (*Figure 2*), i.e., no difference was observed.

In order to find a possible reason of lower proliferation activity in the presence of Berberine, we considered a triggering of an apoptotic event. Therefore, we further focused on measuring the Annexin V intensity, a marker of apoptosis. We observed that Berberine increased Annexin V-CF488A staining next to DMSO or DHT, suggesting

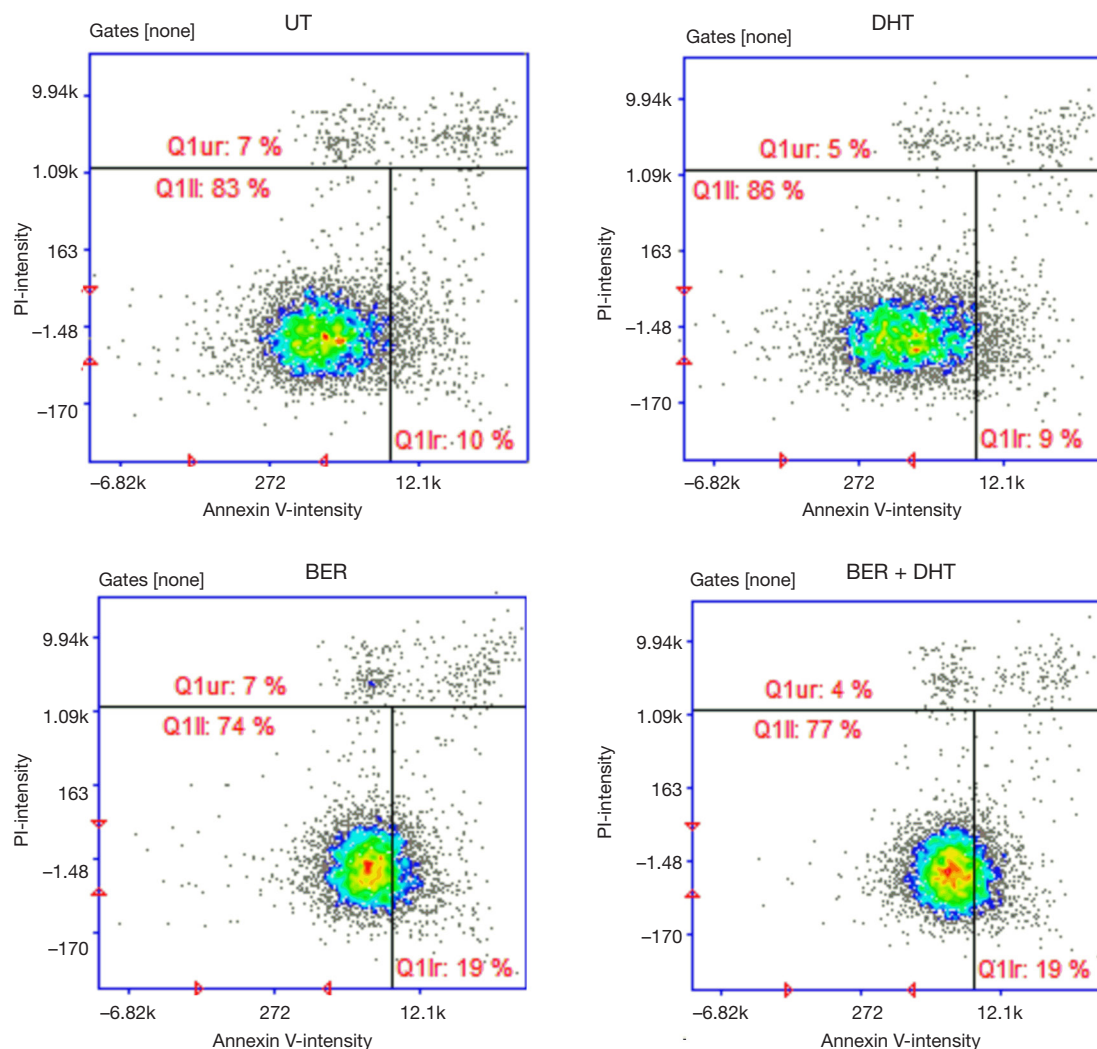


Figure 3 The effect of Berberine on Annexin V signal in androgen-independent cells. 22Rv1 cells were treated for 24 h with Berberine (1,000 nM) in the absence or presence of DHT (100 nM) and/or DMSO as a vehicle for negative control. Results are expressed as propidium iodide intensity versus Annexin V-CF488A intensity of the cell population. BER, Berberine; DHT, dihydrotestosterone; DMSO, dimethyl sulfoxide.

an early apoptotic event (*Figure 3*; right sector in each sub-figure). Since this effect was unaffected by DHT, it can be concluded that it does not involve androgen receptor.

Discussion

In the current paper we investigated the effect of natural alkaloid Berberine at pharmacologically relevant concentrations towards androgen receptor activity and its relation to proliferation of prostate cancer cell lines. We observed stimulation of dihydrotestosterone-inducible AR-mediated luciferase activity by Berberine in the range

of concentrations 0.1–100 nM (*Figure 1D*). However, the presence of Berberine did not affect inducible level of AR-target gene, *KLK3*, in androgen-dependent (LNCaP) or independent cells (22Rv1) (*Figures 1F,2B*). Monitoring the proliferation revealed mild inhibition of proliferation for 100 and 1,000 nM concentrations of Berberine, which is in accordance with literature (7). Similarly, proliferation of 22Rv1 cells in 3D cell culture displayed the same but weaker pattern as in 2D culture (data not shown). Moreover, we demonstrated an initiation of apoptosis, measured as increased intensity of Annexin V staining.

Berberine is a natural compound with many biological

activities, some of them beneficial for human subjects. However, the benefits are always needed to be connected with the dose/concentration. Two publications, which focused on the pharmacokinetics of Berberine in human volunteers after single oral dose administration, found controversial results as similar orally given doses (which can be obtained with commercially available dietary supplements) resulted in the different maximal plasmatic concentrations which differed approximately 1,000-times (9,10). Thus, there is a question if orally given Berberine can display such huge number of beneficial effects, which are often attributed to its use, if the dose/concentration would be in nanomolar range. Positive findings, which are often reported for Berberine using mice with xenografts as *in vivo* model close to cancer patients, usually administer Berberine subcutaneously, which is quite different route of exposure from oral administration and it is unlikely to be applied for cancer patients.

The study by Li *et al.* demonstrated that high doses of Berberine (up to 100 μ M) can inhibit viability of prostate cancer cells and *KLK3* induction after 6 h (7). Moreover, they demonstrated induction of apoptosis and decline in PSA as well as AR protein content. However, used concentrations were too high to have any implication on real *in vivo* situation. A study, which measured pharmacokinetics of 200 mg/kg orally administered Berberine in rats, described the higher amount of Berberine in some tissues next to plasma (17). However, in any case the concentrations did not exceed 1 μ M and consequently any higher concentration tested may not be of clinical relevance. Nevertheless, even the use of submicromolar concentrations, we used in our study, may give some relevant answers. The anticancer effect of Berberine can happen in low concentrations as we demonstrated by proliferation assay (*Figure 1H*) and by Annexin V assay (*Figure 3*). Possibly, the real *in vivo* effect may be stronger in longer periods and with repeated dosing, especially for human subjects.

The main question which rises from our observation is: Does Berberine have any significant impact on prostate cancer in concentrations found in plasma? Based on our data, we might conclude that the synergistic action of nanomolar concentrations of Berberine with DHT-inducible AR-dependent activity probably represents a false positive result of our reporter assay. The interaction of AR with sole response element without the remaining distal parts as in the case of interaction with the full promoter of *KLK3* gene, can certainly give different results. Moreover, an accumulation of luciferase enzyme unlike *KLK3* mRNA

(undergoing stabilization/degradation processes) can be one of the plausible explanations. On the other hand, luciferase activity statistically higher for combination of DHT and Berberine next to DHT alone (*Figure 1D*) might reflect an intracellular event, which was triggered by Berberine. Such event might be the transient activation of extracellular signal regulated kinase (ERK) via binding of Berberine to EGFR. This rapid activation was observed for environmental pollutant bisphenol A (18), which triggered expression and phosphorylation of p53 protein at ser15 residue and resulted in the cell cycle arrest. This is consistent with our data from proliferation assay and with the observation where Berberine strongly induced p53 expression in AR-positive LNCaP cells but not in AR-negative PC-3 cells at concentrations comparable with those used in our work (5). Thus, there might be an interaction of Berberine-activated kinase with AR, which we observed at AR-activity level but not at AR-target gene expression level probably due to the reasons mentioned above. Since AR was demonstrated to interact with certain type of kinases at cellular membrane and this interaction was a driving force for the development of peptides mimicking the receptor sequences responsible for these interactions (19), it can be speculated [in the context of above mentioned study (5)] that Berberine would be a suitable supportive treatment in AR-positive cancers.

In conclusion, Berberine has anti-proliferative effect on androgen-independent as well as dependent prostate cancer cells in nanomolar concentrations which links relevant plasmatic concentrations found in human subjects with its anti-cancer activity.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by the grant from Czech Science Foundation GACR P303/12/G163.

Footnote

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Xiao CW, Ji QA, Wei Q, et al. Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporium canis*-induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:177.

2. Pinto-Garcia L, Efferth T, Torres A, et al. Berberine inhibits cell growth and mediates caspase-independent cell death in human pancreatic cancer cells. *Planta Med* 2010;76:1155-61.
3. Kim JB, Yu JH, Ko E, et al. The alkaloid Berberine inhibits the growth of Anoikis-resistant MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *Phytomedicine* 2010;17:436-40.
4. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:296-308.
5. Choi MS, Oh JH, Kim SM, et al. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2009;34:1221-30.
6. Hur JM, Kim D. Berberine inhibited radioresistant effects and enhanced anti-tumor effects in the irradiated-human prostate cancer cells. *Toxicol Res* 2010;26:109-15.
7. Li J, Cao B, Liu X, et al. Berberine suppresses androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10:1346-56.
8. Liu M, Su X, Li G, et al. Validated UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin, simvastatin hydroxy acid and berberine in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of simvastatin combined with berberine after oral administration in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;1006:8-15.
9. Li B, Zhang M, Bao L. Study on the pharmacokinetics of berberine after oral administration in human being. *Journal of Harbin Medical University* 1996;29:382-5.
10. Spinozzi S, Colliva C, Camborata C, et al. Berberine and its metabolites: relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects. *J Nat Prod* 2014;77:766-72.
11. Zeng X, Zeng X. Relationship between the clinical effects of berberine on severe congestive heart failure and its concentration in plasma studied by HPLC. *Biomed Chromatogr* 1999;13:442-4.
12. Fagin D. Toxicology: The learning curve. *Nature* 2012;490:462-5.
13. Bartonkova I, Novotna A, Dvorak Z. Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS One* 2015;10:e0121316.
14. Fischbach C, Kong HJ, Hsiong SX, et al. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:399-404.
15. Sung KE, Su X, Berthier E, et al. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PLoS One* 2013;8:e76373.
16. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* 2015;33:1837-43.
17. Tan XS, Ma JY, Feng R, et al. Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats. *PLoS One* 2013;8:e77969.
18. Bilancio A, Bontempo P, Donato MD, et al. Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. *Oncotarget* 2017;8:115620-31.
19. Migliaccio A, Castoria G, de Falco A, et al. Polyproline and Tat transduction peptides in the study of the rapid actions of steroid receptors. *Steroids* 2012;77:974-8.

Cite this article as: Zenata O, Dvorak Z, Vrzal R. Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells. *Transl Cancer Res* 2018;7(2):383-390. doi: 10.21037/tcr.2018.03.31

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium regulace transkripční aktivity
androgenního receptoru.**

Autoreferát disertační práce

P1527 Biologie

Ondřej Ženata

Olomouc 2019

Tímto prohlašuji, že předložená disertační práce je založena na mém výzkumu, který jsem prováděl na katedře buněčné biologie a genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v letech 2015–2019. Spoluautoři publikací vyjádřili souhlas s publikováním dat uvedených v této práci. Všechny zdroje literatury, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedené v části „Seznam použité literatury“.

Ph.D. kandidát: **Mgr. Ondřej Ženata**

Katedra buněčné biologie a genetiky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká republika

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

Katedra buněčné biologie a genetiky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká republika

Oponenti:

Autoreferát disertační práce byl zaslán

Obhajoba práce se koná na Přírodovědecké fakultě, University Palackého v Olomouci

.....

Disertační práce je přístupná v knihovně přírodovědecké fakulty University Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká republika.

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli doc. Radimu Vrzalovi za cenné rady, pomoc a celkové vedení mého doktorského studia. Dále bych rád poděkoval své rodině, přátelům a všem ostatním za podporu během mého studia. Děkuji.

Prezentovaný výzkum v této práci byl podpořen grantem z grantové agentury České republiky P303/12/G163 a studentských grantů IGA UP – PrF 2017-004, 2018-005 a 2019–003.

Souhrn

Androgenní receptor (AR) patří mezi významné transkripční faktory v lidském těle a je jedním z kritických bodů pro vznik rakoviny prostaty. Jakékoliv narušení jeho aktivity látkami exogenního původu může mít vážné důsledky na lidské zdraví. Mezi studovanými látkami byly: mykofenolát mofetil (MYC), imunosupresivní léčivo; bisfenol S, náhrada známého endokrinního disruptoru bisfenolu A; berberin, alkaloid používaný i jako potravní doplněk a jako poslední studovanou látkou byl grafen oxid, materiál, který nalézá stále širší využití snad ve všech oblastech průmyslu, medicínské aplikace nevyjímaje. Sledoval jsem vliv všech čtyř látek na aktivitu androgenního receptoru pomocí metody s reportérovým genem, kvantitativní PCR v reálném čase a metody western blottingu. Celkově jsem došel ke zjištění, že MYC ovlivňuje signalizaci AR v linii 22Rv1 pomocí indukce JNK54 a JNK46 a navíc zvyšuje jejich citlivost vůči inhibitorům JNK. Bisfenol S potencuje aktivitu AR, ale neovlivňuje cílový gen AR, KLK3 mRNA. Berberin potencuje aktivitu AR a slabě moduluje hladinu KLK3 a proliferaci 22Rv1, ale jeho účinky byly pozorovatelné ve fyziologicky relevantních koncentracích. Grafen oxid potlačoval indukovanou expresi KLK3 a moduloval translokaci AR. Získaná data mohou mít toxikologický i klinický význam.

Summary

The androgen receptor (AR) is one of the most important transcription factors in the human body and is one of the critical factors in the development of prostate cancer. Disruption of its regulation by exogenous compounds can have serious consequences for human health. Among studied compounds were: Mycophenolate mofetil (MYC), an immunosuppressive drug; bisphenol S, a substitute of the known endocrine disruptor bisphenol A; berberine, an alkaloid use as a food supplement and the last studied compound was chosen graphene oxide, a material that is increasingly used in all areas of industry, medical applications being no exception. I analyzed the effect of all four compounds on the androgen receptor activity using the reporter gene assay, quantitative real-time PCR and western blotting. I demonstrated that MYC affected AR signaling in 22Rv1 by inducing JNK54 and JNK46 and, in addition, it increased their sensitivity to JNK inhibitors. Bisphenol S potentiated AR activity but did not affect the target gene of AR, KLK3 mRNA. I showed that Berberine potentiated AR activity and it was a weak modulator of KLK3 mRNA and 22Rv1 proliferation. However, its effects were observable at physiologically relevant concentrations. Graphene oxide attenuated inducible KLK3 mRNA and modulated translocation of AR. The data obtained may have toxicological and clinical implications.

Obsah	
1 Cíle práce	7
2 Úvod	7
3 Zkoumané látky	8
4 Materiál a metodika	10
4.1 Sloučeniny	10
4.2 Buněčné kultury	10
4.3 Test viability (MTT)	10
4.4 Resazurinová assay	11
4.5 Reportérová genový assay	11
4.6 Proliferační assay	11
4.7 qRT-PCR	12
4.8 SDS-PAGE a Western blotting	12
4.9 Měření redukovaného a celkového glutathionu	13
4.10 Annexin V assay	13
4.11 Tomografie	14
4.12 Zeta potenciál	14
4.13 Chromatinová imunoprecipitace	14
4.14 statistická analýza	15
5 Výsledky a diskuze	16
5.1 Mykofenolát mofetil indukuje expresi c-Jun-N-koncovou kinázy v 22Rv1: vliv na signalizaci androgenního receptoru	16
5.2 Modulační aktivita androgenního receptoru bisfenolem S	21
5.3 Farmakologicky relevantní koncentrace berberinu přechodně stimulují dihydrotestosteronem indukovatelnou luciferázovou aktivitu zprostředkovanou AR v lidských rakovinných buňkách prostaty	23
5.4 Vliv grafen oxidu na signalizaci androgenního receptoru	27
6 Závěr	34
7 Seznam použité literatury	35
8 Publikační činnost	37

1 Cíle práce:

Hlavním cílem této práce je analyzovat vliv několika různých xenobiotik na aktivitu androgenního receptoru. Jednou z těchto látek je i bisfenol S, analog a náhrada známého endokrinního disruptoru bisfenolu A (BPA), který narušuje signalizaci estrogenního receptoru a který je široce používán v průmyslu. Další z vybraných látek je berberin (přírodní látka vyskytující se v některých rostlinách a sloužící jako prekurzor ve farmaceutickém průmyslu), látka mykofenolát mofetil (široce používané imunosupresivum) a grafen oxid (jeden z derivátů grafenu, který je stále častěji využíván v průmyslu). Specifické cíle práce jsou:

A) Zjistit vliv těchto látek na transkripční aktivitu androgenního receptoru.

B) Pokusit se objasnit mechanismus jejich působení na androgenní receptor v případě, že bude nalezen jejich efekt na receptor.

2 Úvod:

Androgenní receptor (AR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor nezbytný pro správný vývoj a fungování lidského těla. Bylo prokázáno, že samotný receptor ovlivňuje expresi více než tisíce genů a je důležitým faktorem při vývoji rakoviny prostaty [1]. Jeho hlavními aktivátory jsou androgeny, hormony produkované v lidském těle, z čehož nejvýznamnější je metabolit testosteronu, dihydrotestosteron, který se na AR váže a spouští kaskádu dějů. Nicméně, signalizace AR může být narušena mnoha exogenními látkami (bisfenol A, DDT, metoxychlor,...) [2], což vede k nežádoucím projevům a v konečném důsledku mohou tyto látky napomoci rakovině prostaty. Jelikož na rakovinu prostaty a následky s ní spojené umírá mnoho dospělých lidí (jen ve Švédsku téměř 10% všech případů rakoviny) [3] je přínosné prozkoumat možné efekty látek působících na androgenní receptor.

V chemickém průmyslu, potravinářství a u věcí se kterými denně přicházíme do styku, lze nalézt řadu látek, u nichž nebyly zjišťovány jejich účinky na lidský organizmus nebo přímo na jaderné receptory. Případně byly testovány pouze v omezené míře. Je proto nezbytné zjistit jejich možné účinky na organizmus a předejít tak riziku onemocnění, které by z toho mohlo plynout. Jedna ze široce používaných látek je bisfenol S (BPS), náhrada za bisfenol A (BPA), který je postupně [4] vytlačován z průmyslu jeho bezpečnějšími variantami (např. BPS, BPF, BPAF,...). U bisfenolu A sice byla prokázána toxicita a jeho schopnost endokrinní disrupce několika jaderných receptorů v mnoha publikacích [5], ale studie jeho

derivátu, BPS, jsou pouze v omezené míře. To stejné platí pro imunosupresivum mykofenolát mofetil, přírodní alkaloid berberin a čím dál častěji používanou průmyslovou sloučeninu grafen oxid. Studie zabývající se účinky těchto látek na jaderné receptory, a převážně na androgenní receptor, jsou pouze limitujícího charakteru.

Z výše zmíněných důvodů je tedy velmi důležité sledovat možné nežádoucí efekty používaných látek na lidský organizmus. Všechny látky, které jsou testovány v této publikaci, jsou denně v kontaktu s miliony lidí a jejich produkce se celosvětově zvyšuje s tím, jak se rozvíjí průmysl. Tato studie tedy přispěje k lepšímu pochopení interakcí daných látek a androgenního receptoru a může vést k bezpečnějšímu užívání látek případně urychlit jejich nahrazení jinými.

3 Zkoumané látky:

V této práci sleduji vliv několika látek na aktivitu androgenního receptoru, a proto se na tyto látky blíže podíváme a přiblížíme si jejich současný výskyt nebo použití.

Bisfenol S

V posledních letech se v průmyslu začíná častěji využívat bisfenolu S (BPS), který má nahrazovat, společně s dalšími deriváty, bisfenol A (BPA) jelikož je prokazatelným endokrinním disruptorem. Mimo jiné přispívá k rozvoji rakoviny [6], obezitě [7] a celkově způsobuje řadu nežádoucích efektů. Ale zároveň patří k rozšířené látce, která je velmi důležitá v mnoha odvětvích, a proto se hledají její deriváty, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale menší nebo zcela žádný vliv na člověka a přírodu. Již výše zmíněný BPS je jedním z jeho nadějných derivátů, u kterého je centrální propanová skupina nahrazena sulfátovou skupinou. V současnosti se používá v konzervovaných potravinách jako součást polymerů chránících konzervy před korozi [8], také je součástí plastů ze kterých se vyrábí dětské láhve [9], používá se jako aditivum v papírenském průmyslu [10] a má mnoho dalších využití. Kromě toho vykazuje vyšší teplotní stabilitu a odolnost proti slunečnímu záření. Nicméně jeho velké rozšíření a používání ve věcech denní potřeby také umožňují, aby byli lidé vystaveni jeho expozici, přičemž malé dávky BPS byly zaznamenány v moči a mateřském séru [11, 12]. A jelikož stále nebyly detailněji prozkoumány jeho efekty na všechny jaderné receptory (je prokázáným aktivátorem ER α [13]), rozhodl jsem se jeho vlastnosti prozkoumat nejen na AR.

Mykofenolát mofetil

Mykofenolát mofetil je imunosupresivum, které působí jako selektivní, nekompetitivní reverzibilní inhibitor inosinmonofosfát-dehydrogenázy (IMPDH), která se podílí na *de novo* syntéze guanosinových nukleotidů. Tento efekt je silnější u lymfocytů, jelikož má vyšší afinitu k isoformě II, která je v nich více zastoupena než isoforma I. Toho se využívá k zabránění odmítnutí transplantátu po transplantaci [14]. Sice IMPDH patří mezi hlavní cíl mykofenolátu, tedy potažmo jeho metabolitu mykofenolové kyseliny, ve kterou se mění po orálním podání, ale byla prokázána jeho schopnost modulovat aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru (AhR) a glukokortikoidního receptoru (GR) [15]. Z tohoto důvodu bylo zajímavé sledovat jeho možné účinky na další receptor.

Berberin

Berberin je rozšířená přírodní sloučenina vyskytující se třeba v dřevě albu obecném (*Berberis vulgaris*), která se již velmi dlouho využívá v nejrůznějším léčitelství. Nejstarší dochovaný důkaz o jeho používání je z dob Asyrské vlády v roce 650 př. n. l. [16]. Chemicky se jedná o kvarterní isochinolinový alkaloid a dnes se používá třeba na léčbu průjmu a gastroenteritidy z důvodu jeho antimikrobiálních vlastností [17]. Je to také důležitá látka pro farmaceutický průmysl, kde slouží k syntéze jeho bioaktivních derivátů [18] a několik studií prokázalo jeho vliv na proteiny zapojené v inhibici růstu rakoviny prostaty jako je p53 [19] a JNK [20]. Proto jsem se rozhodl prozkoumat jeho další možné efekty na rakovinu prostaty a androgenní receptor.

Grafen oxid

Látka budoucnosti, jak mnozí lidé nazývají grafen má široké využití a stále více se dostává do popředí v nejrůznějších odvětvích. Jeden z jeho nejvýznamnějších derivátů je grafen oxid (GO), dvoudimenzionální struktura grafenu s hydroxylovými a epoxidovými skupinami v základní rovině a karboxylovými skupinami na konci molekuly, která začíná nacházet využití jako potencionální nosič léčiv [21]. Ale s případným používáním v medicínských aplikacích se také zvyšuje míra vystavení lidí jeho účinkům. Již bylo prokázáno, že GO poškozují plazmatickou membránu buněk [22], narušuje protein-proteinové interakce [23], ale jeho použití může být prospěšné v případě zánětu [24]. Prostudovat jeho možné dopady na další metabolické dráhy a transkripční faktory je proto více než žádoucí.

4 Materiál a metodika

4.1 Sloučeniny

Dimetylsulfoxid (DMSO), 5 α -dihydrotestosteron (DHT), berberin, mykofenolát mofetil (MYC), bisfenol S (BPS), grafen oxid (763705; 2 mg/ml vodného roztoku), médium RPMI 1640, fetální bovinní sérum, charcoal-stripped (CS) fetální bovinní sérum (CS-FBS; F6765), kit na proliferační assay (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Grafen oxid s definovanou velikostí částic (50 – 200 nm, 200 – 500 nm, >500 nm – 2mg/ml vodné roztoky; B51211, B51221, B51231) byly zakoupeny od biomade.com. Oligonukleotidové primery použité v RT-PCR byly syntetizovány v Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Light Cycler 480 Probes Master a UPL proby byly zakoupeny od Roche Diagnostic Corporation (Intes Bohemia, Česká republika). Anexin V vazebný pufr a anexin V-CF488A konjugát byly zakoupeny od Biotium (Fermont, USA). Mikrotitrační destičky pro buněčné 3D kultury byly zakoupeny od 300Microns (Karlsruhe, Německo). Kit pro resazurinovou assay byl zakoupen od Canvax (Kórdoba, Španělsko). Kit pro chromatinovou imunoprecipitaci byl zakoupen od Cell Signal Technology (9003; SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit – Magnetic Beads). Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny v nejvyšší možné dostupné kvalitě.

4.2 Buněčné kultury

Lidský karcinom prostaty (LNCaP; No. 89110211) a lidský epiteliální karcinom prostaty (22Rv1; No. 05092802) byly zakoupeny od Public Health England a kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceného o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin. Buněčná linie AIZ-AR (odvozená od 22Rv1, detailně charakterizována v Bartonkova *et al.* [25]) byla kultivována v médiu RPMI 1640 obohaceného o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin. Všechny buněčné linie byly kultivovány v 37°C, 5% CO₂ a absolutní vlhkosti v inkubátoru.

4.3 Test viability (MTT)

Buněčná linie AIZ-AR byla kultivována se vzrůstající koncentrací MYC (0,01–20 μ g/ml); případně se vzrůstající koncentrací BER (0,01–50 μ M); nebo se vzrůstající koncentrací BPS (0,1–100 μ M) anebo s DMSO jako negativní kontrolou (0,1%; v/v) po dobu 24h; nebo se vzrůstající koncentrací GO (0,002–20 μ g/ml) vždy po dobu 24h. Následně byly

buňky opláchnuty PBS, které bylo ihned poté nahrazeno PBS s MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) v koncentraci 0,3 mg/ml. Po 30-40 minutách byl roztok odsát a vzniklé krystaly formazanu rozpuštěny v DMSO. Absorbance byla měřena při 570 nm přístrojem Infinite M200 (TECAN, Rakousko). Testované koncentrace, které nezpůsobily pokles viability větší než 20% byly shledány jako netoxické.

4.4 Resazurinová assay

Buněčná linie AIZ-AR byla kultivována se vzrůstající koncentrací GO (0,002-20 µg/ml) po dobu 24h. Následně byly buňky opláchnuty PBS, které bylo ihned poté nahrazeno roztokem resazurinu v médiu RPMI 1640 (obohaceném o 10% fetálního bovinního séra a 2 mM L-glutamin) ve finální koncentraci 10% v/v (900 µl roztoku média a 100 µl roztoku resazurinu) a dále se nechaly inkubovat 75 minut v inkubátoru. Poté byl výsledný roztok přenesen do nových černých 96ti jamkových destiček a měřena fluorescence (530 nm pro excitaci a 590 nm pro emisi) na přístroji Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.5 Reportérová genová assay

Pro všechny aplikace této metody byla použita stabilně transfekované linie AIZ-AR vyvinutá z linie 22Rv1, do které byli vloženy tři kopie androgenní responzivní oblasti (ARR) následované jednou kopií ARE z promotorové oblasti KLK3 [25]. Následně byla buněčná linie AIZ-AR kultivována 16h v 96ti jamkové destičce v médiu s CS-FBS a poté se vzrůstající koncentrací MYC (0,01-20 µg/ml), BER (0,0001-1000 nM), BPS (0,1-100 µM) nebo GO (0,002-20 µg/ml) v přítomnosti DMSO (0,1%; v/v, agonistické uspořádání a v případě GO vody 1%; v/v,) nebo přítomnosti DHT (100 nM, antagonistické uspořádání). Po kultivaci byly buňky lyzovány a byla změřena luciferázová aktivita přístrojem Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.6 Proliferační assay

Proliferační assay byla provedena podle návodu výrobce s drobnou modifikací. Buňky byly vysety na 96ti jamkové destičky (10 000 buněk na jamku, v případě LNCaP byly destičky předtím ošetřeny poly-D-lysinem) v médiu s CS-FBS a stabilizovány přes noc. Následující den jim bylo vyměněno médium za nové, obsahující MYC s rostoucí koncentrací (0,01 – 20 µg/ml), BER (0,0001-1000 nM) , BPS (0,1-100 µM) nebo GO (0,002-20 µg/ml) a to v kombinaci s DHT (100 nM, antagonistické uspořádání) nebo obsahovali pouze látku samotnou v přítomnosti DMSO (0,1%; v/v, agonistické uspořádání a v případě GO vody 1%;

v/v, agonistické uspořádání) a inkubovány po dobu 24h. Na konci inkubační doby byl aplikován 5-Bromo-2'-deoxy-uridin (BrDu) přímo do jamek a ponechán po dobu 3 hodin. Následně se postupovalo přesně podle návodu výrobce. Absorbance byla měřena při 405 nm a referenční hodnota při 495 nm pomocí Infinite M200Pro (TECAN, Rakousko). Proliferace je dále vyjádřena jako % poměru absorbancí A_{405}/A_{495} mezi vzorky a samotným DHT (u DHT je proliferace nastavena na 100%).

4.7 qRT-PCR

Pro všechny experimenty byly použity primery a proby z Universal Probes Library (UPL; Roche Diagnostic Corporation, Praha, Česká republika). PSA-UPL44, forward: GTGCTTGTGGCCTCTCGT, reverse: CAGCAAGATCACGCTTTTGT, GAPDH-UPL60, forward: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC, reverse: ACGACCAAATCCGTTGACTC; UBE2C-UPL8, forward: GGGCAAAAGGCTACAGCAG, reverse: GCTCCATGGATGGTCCCTA. Všechny experimenty proběhly za následujících podmínek: Celková RNA byla izolována pomocí TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, USA) podle pokynů výrobce. cDNA byla syntetizována z 1000 ng celkové RNA za použití M-MuLV reverzní transkriptázy (M0253S, New England BioLabs) v 42°C po dobu 60 min za použití náhodných hexamerů (S1230, New England BioLabs). qRT-PCR byla provedena na přístroji Light Cycler 480 II (Roche Diagnostic Corporation, Praha, Česká republika). Program pro průběh byl nastaven následovně: aktivační krok při 95°C po dobu 10 min byl následován 45 cykly PCR (denaturace při 95°C po dobu 10 sekund, annealing a elongace 60°C po dobu 30 sekund). Měření bylo uspořádáno v triplicátech. Genová exprese byla normalizována na glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) jako housekeeping gen. Data byla zpracována pomocí delta-delta metody. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní násobek indukce oproti buňkám s DMSO.

4.8 SDS-PAGE a Western blotting

Celkové proteinové extrakty byly připraveny z 1 jamky 6ti jamkové desky. Po inkubaci byly buňky opláchnuty vychlazeným PBS a seškrábnuty do 1ml PBS a suspenze byla centrifugována (5min, 4°C, 2300g). Pelet byl poté resuspendován v 150 μ l vychlazeného lyzačního pufru (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,2; směs proteázových a fosfatázových inhibitorů, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA). Roztok byl promíchán a inkubován 10 min na ledu, poté centrifugován (13 min, 4°C, 15700g). Supernatant byl odebrán a pro stanovení koncentrace proteinů byla použita metoda dle Bratforda. Izolace cytosolické a nukleární

frakce byla provedena za použití Nuclear extract kit (Active Motif; 40010) podle pokynů výrobce.

Gel pro SDS-PAGE (10%) byl použit na aparatuře od firmy BioRad přesně podle obecných pokynů za použití a pro přenos proteinů byla použita PVDF membrána. Membrána byla saturována 5% sušeným mlékem bez tuku po dobu 1h při pokojové teplotě v 1x TBS-Tween20 (0,5%). Bloty byly inkubovány s následujícími protilátkami: protilátka proti AR (mouse monoclonal, sc-7305, 441, ředění 1:500, lot H3112 od Santa Cruz Biotechnology), protilátka proti aktinu (mouse monoclonal, 3700S, 8H10D10, ředění 1:1000, Lot 15 od Cell Signaling Technology), protilátka proti p-JNK (rabbit polyclonal, 9251, lot 3, ředění 1:1000 od Cell Signaling Technology), protilátka proti JNK (rabbit polyclonal, 9252, lot 9, ředění 1:1000 od Cell Signaling Technology), a inkubace byla prováděna přes noc při 4°C. Detekce byla provedena pomocí křenové peroxidázy spojené se sekundární protilátkou (Santa Cruz Biotechnology) a Western Sure Premium Chemiluminiscent Substrate (C60429, LiCor). Denzitometrická analýza a semikvantifikace byla provedena na C-DiGit Chemiluminiscent Western Blot Scanner (LiCor) a Image Studion Digits software (LiCor). Separace a kvantitativní detekce PSA a UBE2C proteinů byla udělána pomocí Sally Sue Simple Western Systému (procedura detailně popsána v Doricakova et al. [26]). Byly použity následující protilátky: protilátka proti aktinu (mouse monoclonal, 3700S, 8H10D10, ředění 1:1000, Lot 15 od Cell Signaling Technology), protilátka proti PSA (rabbit monoclonal, D6B1, 5365S, ředění 1:20, Cell Signaling Technology) a protilátka proti UBE2C (rabbit polyclonal, 14234S, ředění 1:20, Cell Signaling Technology).

4.9 Měření redukovaného a celkového glutathionu

22Rv1 byly inkubovány se vzrůstající koncentrací GO (0,2-20 µg/ml), případně bez GO po dobu 24h v médiu s CF-FBS. Poté byl celkový glutation a oxidovaný glutation měřený pomocí GSH/GSSG-Glo Assay kit (Promega, V6611) podle pokynů výrobce a luciferázová aktivita byla měřena pomocí Infinite M200 (TECAN, Rakousko).

4.10 Annexin V assay

22Rv1 byly vysety na 12ti jamkovou destičku (400 000 na jamku) v médiu s CS-FBS. Po stabilizaci přes noc byly buňky inkubovány s BER (1000 nM), DHT (100 nM) a to jak samostatně, tak v společně po dobu 24h. Poté bylo postupováno přesně podle návodu výrobce pro Annexin V assay (ChemoMetec, Dánsko). Analýza proběhla na Nucleocounter NC-3000 (ChemoMetec, Dánsko).

4.11 Tomografie

Zobrazení 3D morfologie 22Rv1 (po inkubaci s GO nebo bez něj) byla provedena interferometrickou detekcí použitím holotomografického 3D mikroskopu Nanolive[®] (3D Cell Explorer, Lausane, Švýcarsko) a výsledný obraz byl zpracován pomocí STEVE[®] software (3D Cell Explorer). Každá barva reprezentuje rozdílný index odrazu.

4.12 Zeta potenciál

Grafen oxid byl ředěný ve vodě nebo médiu RPMI s FBS-CS na výslednou koncentraci 20 µg/ml. Zeta potenciál byl stanoven použitím elektroforetické mobilní metody a měřený pomocí Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). Hydrodynamický průměr byl měřen za 24h při 37°C a 5% CO₂ v atmosféře (simulující podmínky buněčných testů) použitím metody dynamického rozptylu světla pomocí Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě.

4.13 Chromatinová imunoprecipitace

22Rv1 nebo LNCaP byly kultivovány na 60mm Petriho miskách v FBS-CS RPMI přes noc a následující den inkubovány s DMSO, DHT (100 nM) nebo kombinací DHT a GO (0,2 – 20 µg/ml) po dobu 90 min v 37°C. Následně bylo postupováno podle návodu výrobce pro SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads; Cell Signaling Technology, Leiden, Nizozemsko) s drobnými modifikacemi popsány v Štěpánková *et al.* [27].

Nicméně i tak došlo ještě k dalším drobným modifikacím. V tomto případě jsem použil 20 µg naštípaného chromatinu, který byl resuspendován v 500 µl ChIP pufru a imunoprecipitace byla zahájena přidáním 4 µl AR protilátky (D6F11; Cell Signaling Technology). Další den bylo ke vzorku přidáno 30 µl Protein G Magnetic Beads (roztok magnetických částic) a inkubace probíhala 1 hodinu při 4°C při neustálém míchání. Po separaci magnetických částic pomocí Magnetic Separation Rack 14654 (Cell Signaling Technology) a několikanásobném promytí pufru (podle návodu) byly pelety resuspendovány ve 150 µl ChIP elučního pufru a chromatin byl eluován 30 min při 65°C s třepáním při 1200 RPM na TS-100C Thermo-Shaker (BioSan). Po separaci částic na magnetickém stojánku byl eluovaný chromatin inkubován s ChIP elučním pufrům s 6 µl 5M NaCl a 2 µl proteinázy K 15 min při 65°C na Thermo-Shaker (1200 RPM). Následně byla DNA vyčištěna přes kolonky podle návodu výrobce. qPCR byla provedena na přístroji LightCycler 480 (Roche, Praha, Česká republika) s 2 µl DNA vzorku společně s PCR vodou, SYBR-Green (LightCycler 480 SYBR Green I Master; Roche) a 5 µM simple ChIP Human KLK3

promotorovými primery (32784; Cell Signaling Technology). Program pro PCR reakci byl nastaven následovně: enzymová aktivace při 95°C po dobu 10 min následovaná 40ti cykly denurací s prodlužováním při 95°C, 15 sekund a 65°C, 60 sekund. Produkt PCR reakce byl poté dán na elektroforetickou separaci na 4% agarózovém gelu (pro tento případ byla provedena PCR pouze o 30 cyklech).

4.14 Statistická analýza

Rozdíly mezi dvěma skupinami byly porovnávány pomocí Studentova nepárového dvojitého t-testu (Student's unpaired two-tailed t-test). Dvoucestná analýza variace s Dunnetovým post hoc testem byla aplikována v případě, že bylo analyzováno více než dvě skupiny. Veškerá statistická analýza byla provedena softwarem GRAPH-PAD PRISM 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Pouze v případě analýzy berberinu byly data zpracovány pomocí Microsoft Excel 2010 (Paired Student's *t*-test). Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

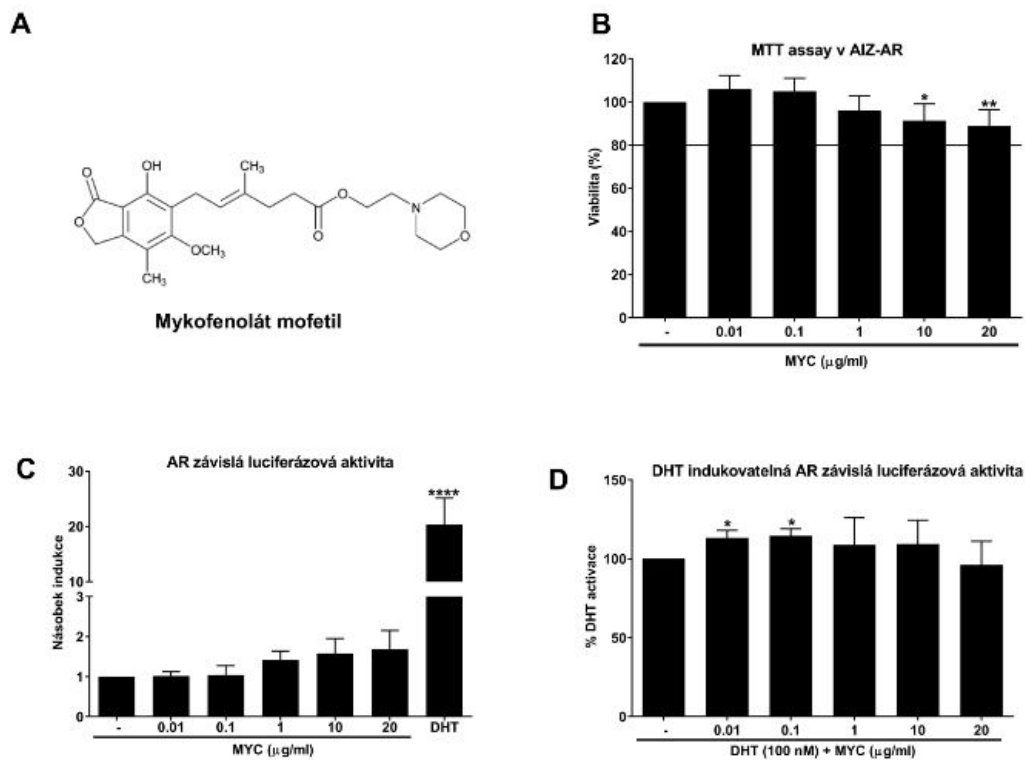
5 Výsledky a diskuze

5.1 Mykofenolát mofetil indukuje expresi c-Jun-N-koncovou kinázy v 22Rv1: vliv na signalizaci androgenního receptoru

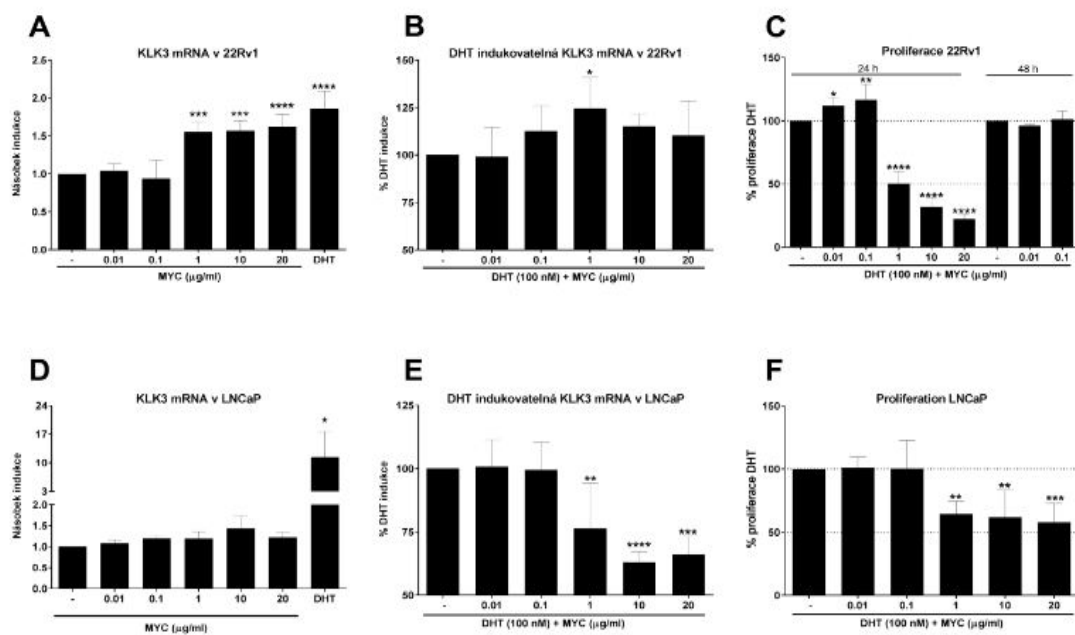
Mykofenolát mofetil se projevil jako silný induktor KLK3 mRNA v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1, kdy dosáhl při nejvyšší mnou použité koncentraci (20 $\mu\text{g/ml}$) přibližně 80% indukce zprostředkované DHT, přirozeným ligandem AR. Nicméně tento efekt nebyl pozorován v LNCaP, což je na androgenech závislá buněčná linie a může tedy souviset právě s expresí transkripční varianty AR-v7. V případě, že byl zároveň přítomen i DHT byl efekt na cílový gen AR (KLK3) vlivem MYC velmi malý (25% nárůst u 22Rv1) a u LNCaP byl pozorován pokles o 80%. Dále MYC působil inhibičně na proliferaci obou sledovaných linií. Zajímavým faktem je, že podle práce dr. Duna [28] se 22Rv1 řadí mezi odolné buňky a v mé práci se jeví jako citlivější (IC50 cca 1 $\mu\text{g/ml}$ oproti více jak 20 $\mu\text{g/ml}$ pro LNCaP). Důvodem by mohla být právě zkrácená varianta AR (AR-v7), kterou linie obsahuje a která by mohla být cílem mykofenolátu.

Také jsem prokázal, že MYC napomáhá translokaci AR do jádra a zvyšuje celkové množství MAPK8 a MAPK9 (JNK46/54), ale snižuje jejich fosforylovanou formu. Tyto výsledky jsou shodné s prací Dr. Andreucciho, který prokázal snížení fosforylace NF- κ B a JNK v lidských ledvinových proximálních tubulárních buňkách po aplikaci mykofenolové kyseliny [29]. Navíc, použití kombinace inhibitoru JNK kináz a MYC vedlo k senzitivizaci buněk a snadnější inhibici jejich proliferace.

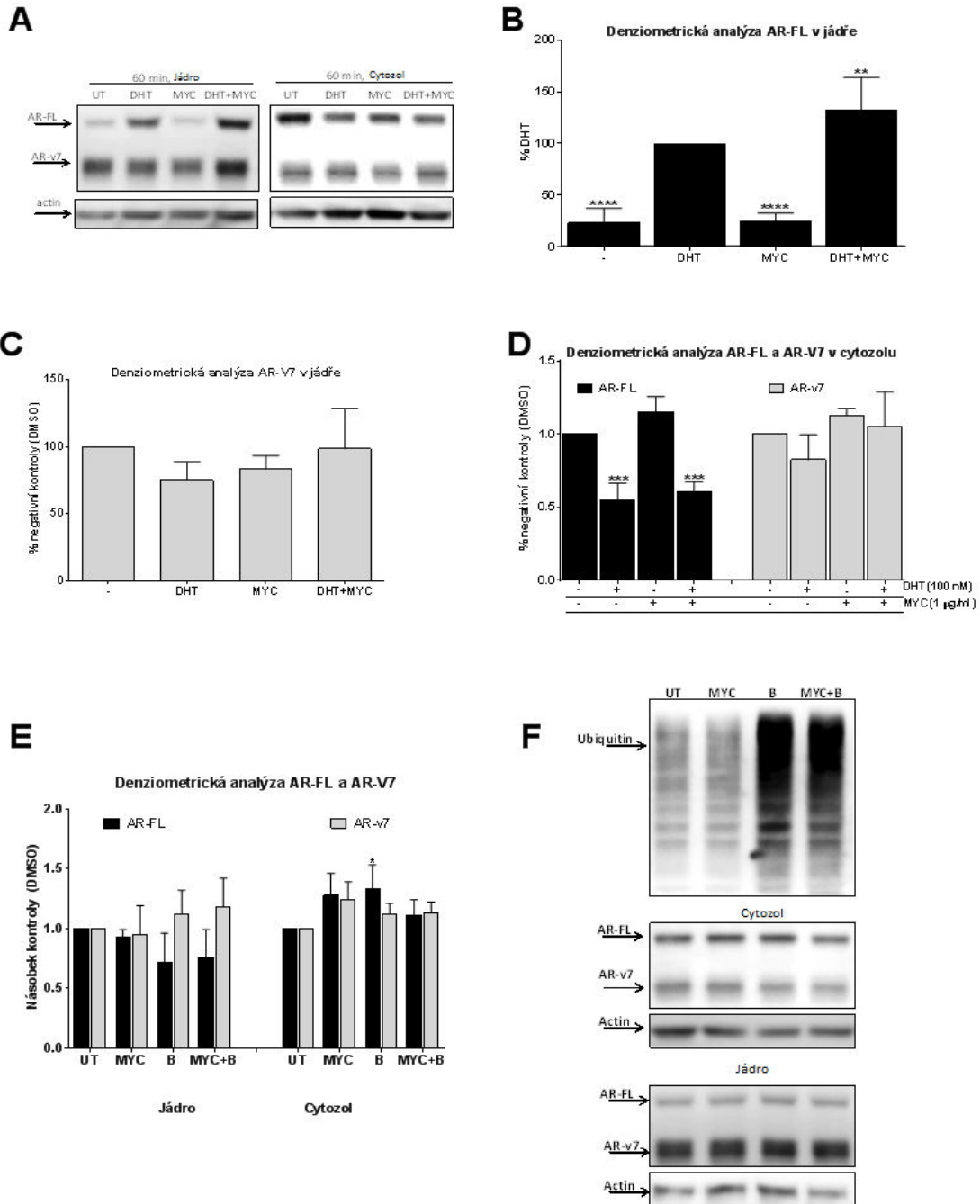
Ve výsledku jsem prokázal, že MYC ovlivňuje signalizaci zprostředkovanou androgenním receptorem *in vitro* a to v rozdílné míře u dvou běžně používaných modelů rakoviny prostaty. Společně s dalšími výzkumy lze předpokládat, že mykofenolát mofetil je dobrý kandidát na na podpůrnou terapii při léčbě rakoviny prostaty.



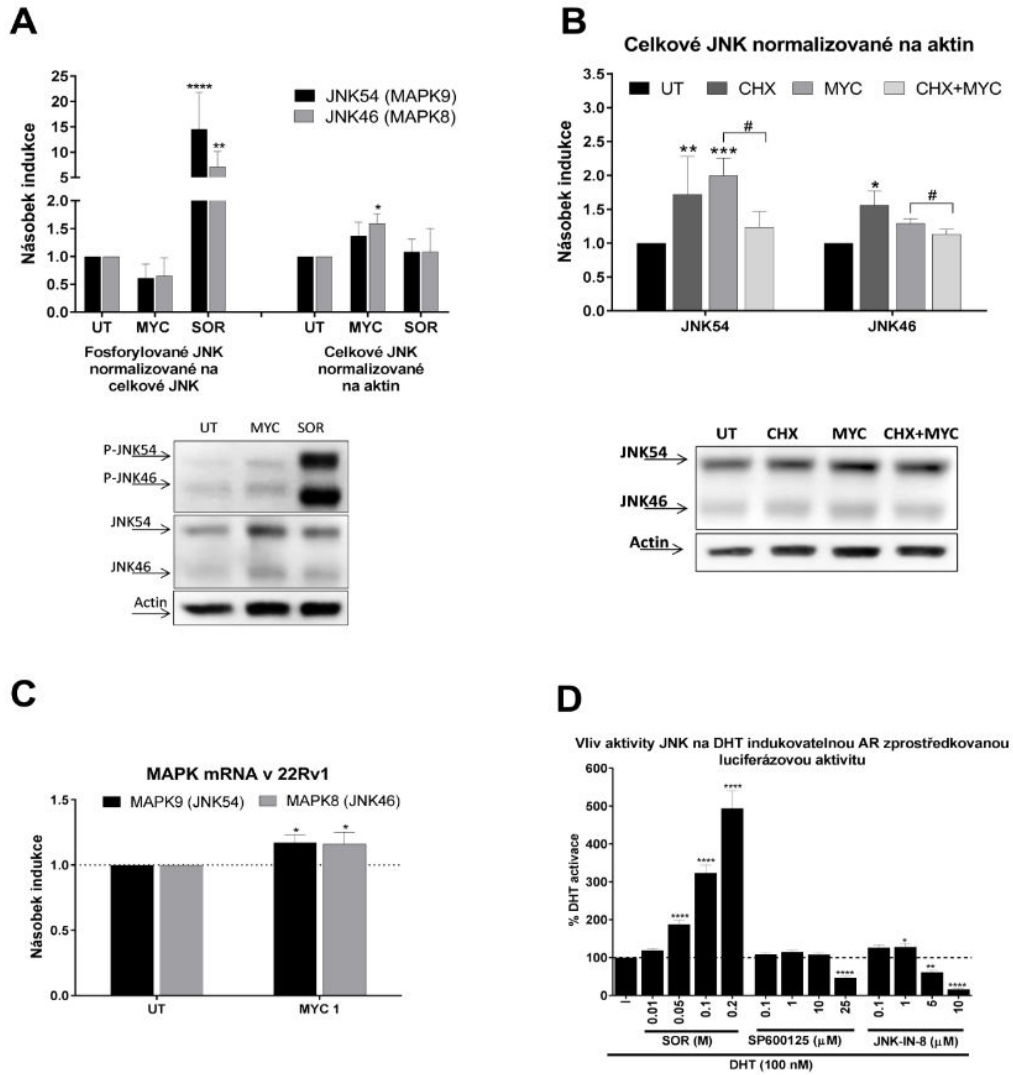
Obrázek č. 1: Viabilita AIZ-AR a aktivace androgenního receptoru



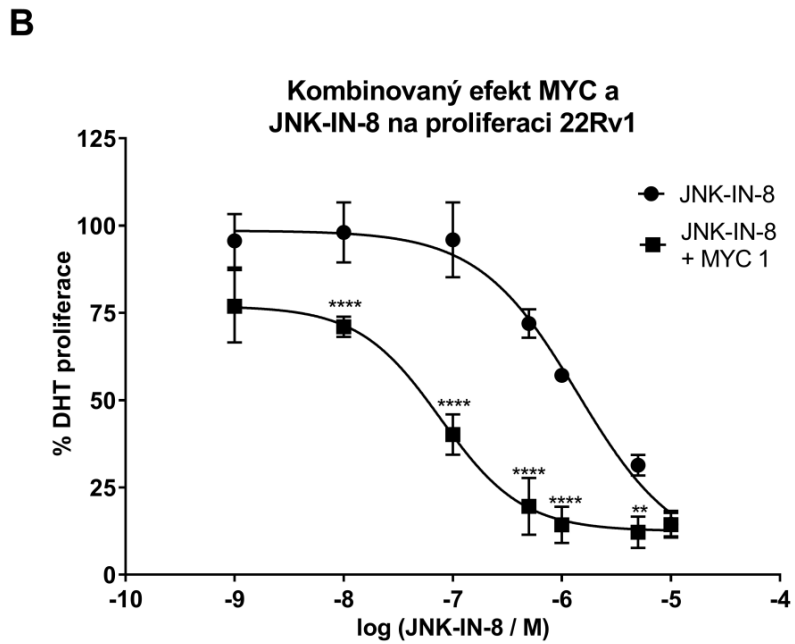
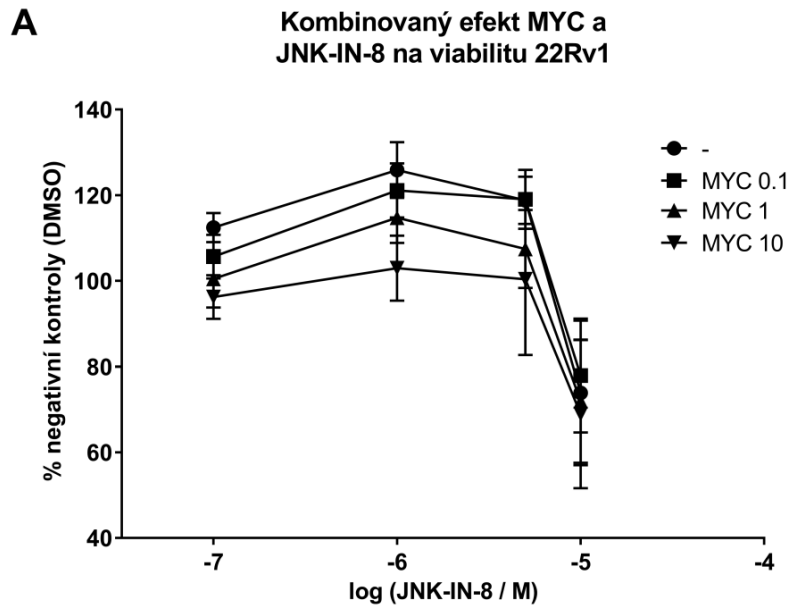
Obrázek č. 2: Vliv mykofenolátu mofetilu na mRNA KLK3 a buněčnou proliferaci



Obrázek č. 3: Vliv MYC na translokaci AR



Obrázek č. 4: Vliv MYC na JNK

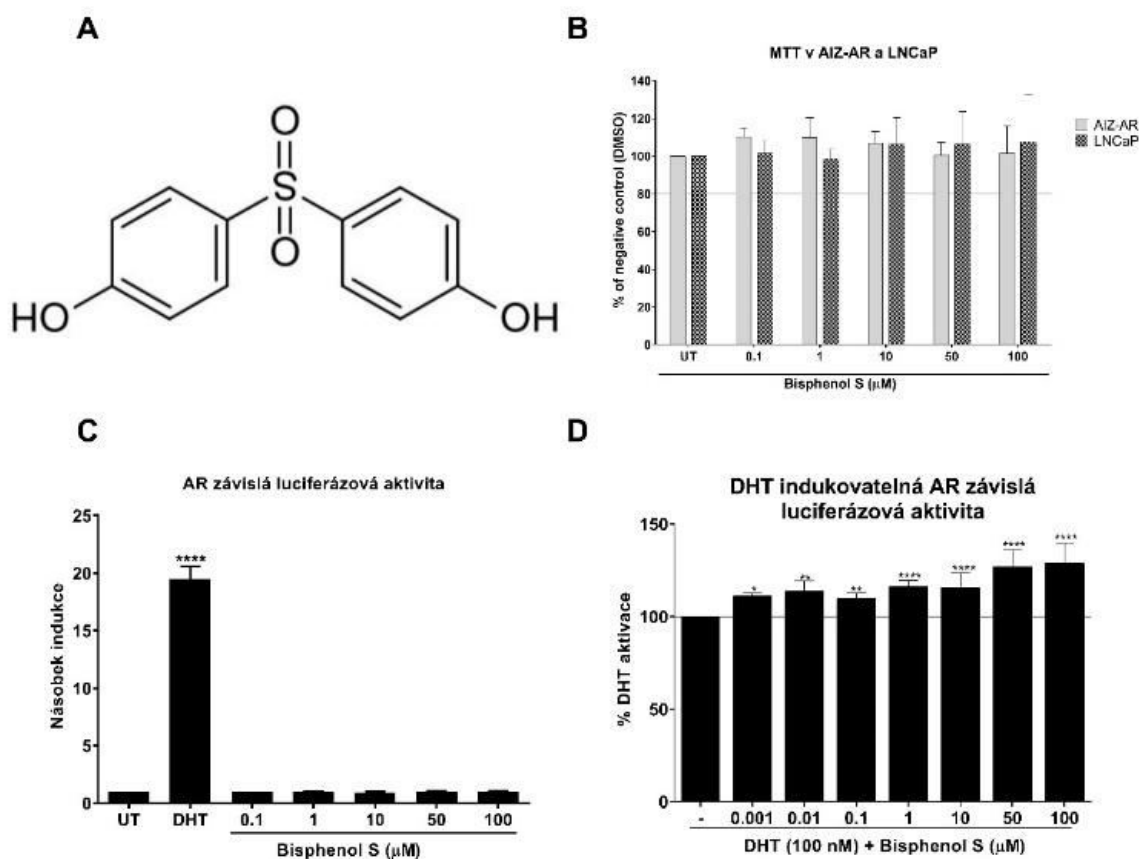


Obrázek č. 5: Vliv MYC a JNK inhibitoru na viabilitu a proliferaci 22Rv1

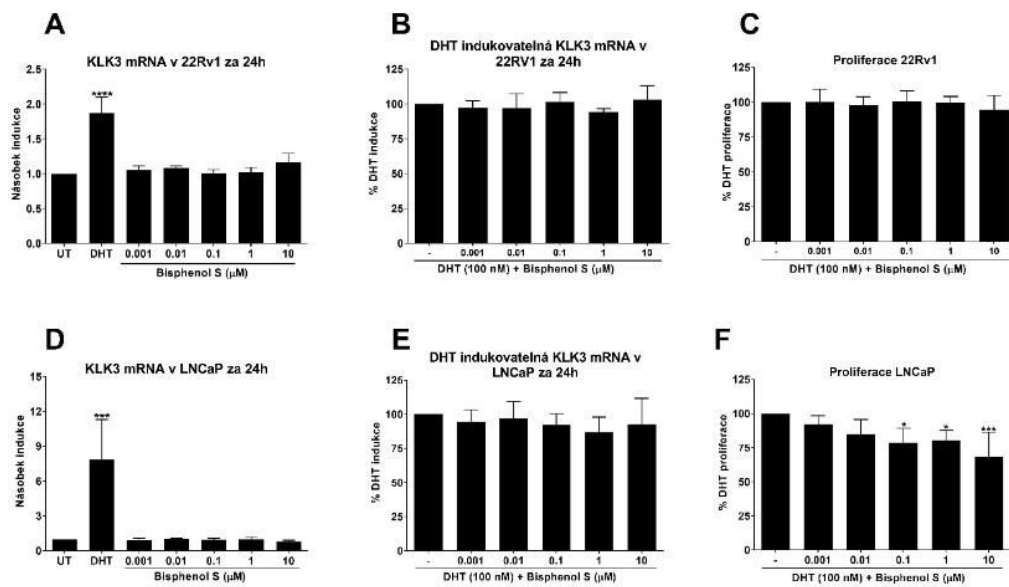
5.2 Modulace aktivity androgenního receptoru bisfenolem S

Bisfenol S (BPS) je strukturním a termostabilním analogem bisfenolu A (BPA), který patří mezi známé endokrinní disruptory. Jelikož je tlak na nahrazení BPA jeho analogy, bylo by dobré znát jejich vliv na signalizaci receptorů, a protože nejvíce efektů je zprostředkováno právě přes jaderné receptory, zaměřil jsem se na na prozkoumání několik hlavních členů této superrodiny [30] a v předkládané práci se zaměřuji na androgenní receptor.

Nicméně, jediným efektem BPS na androgenní receptor byl synergistický účinek na jeho aktivitu, který začínal již při koncentraci 1nM, ale výsledný efekt se nepřenesl na cílový gen KLK3. Pouze na androgenech závislá buněčná linie LNCaP vykazovala mírné snížení proliferace za 24h. Ve výsledku jsem tedy prokázal, že BPS má pouze omezené účinky na androgenní receptor a jeho užívání se jeví jako bezpečnější než v případě BPA.



Obrázek č. 6: Vliv bisfenolu S na aktivitu AR



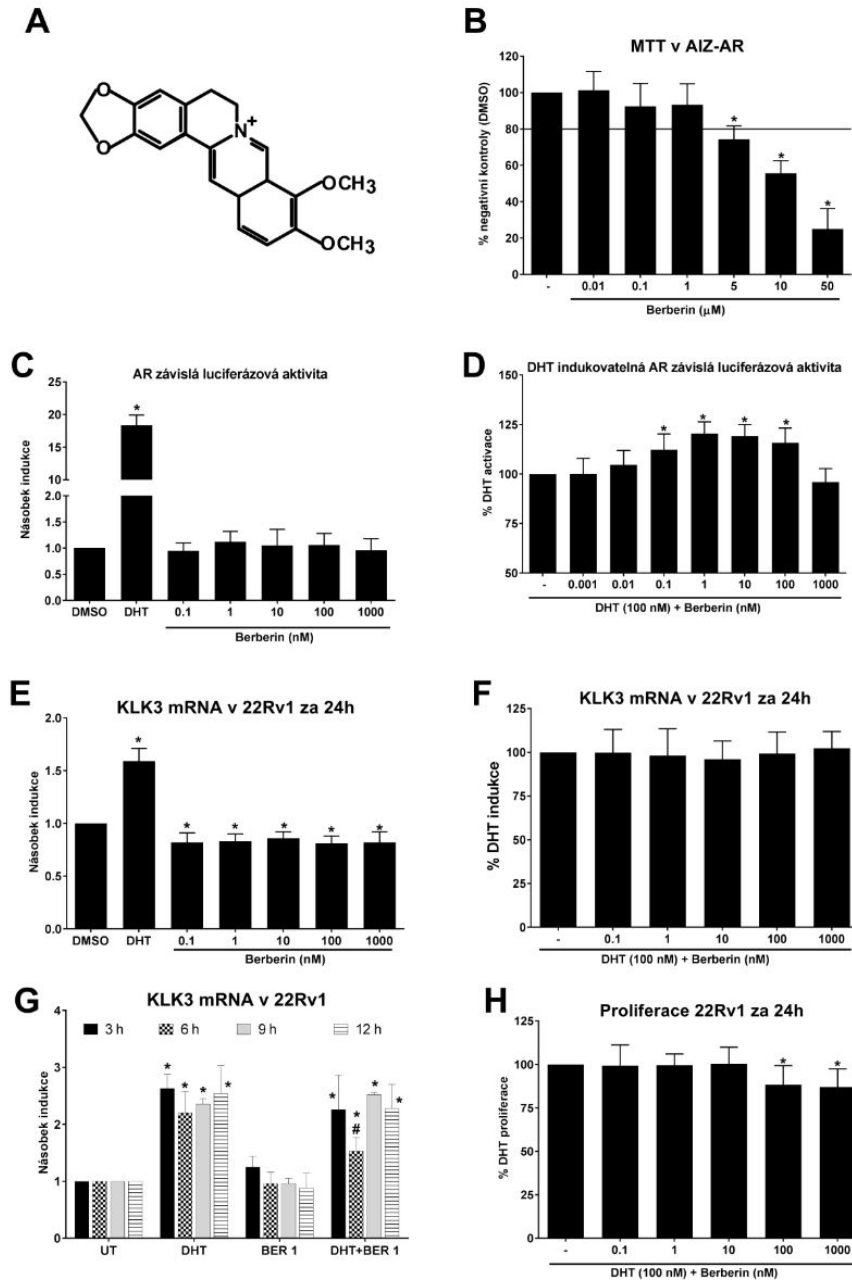
Obrázek č. 7: Vliv bisfenolu S na cílové geny AR a proliferační aktivitu v rakovině prostaty

5.3 Farmakologicky relevantní koncentrace berberinu přechodně stimuluji dihydrotestosteronem indukovatelnou luciferázovou aktivitu zprostředkovanou AR v lidských rakovinných buňkách prostaty

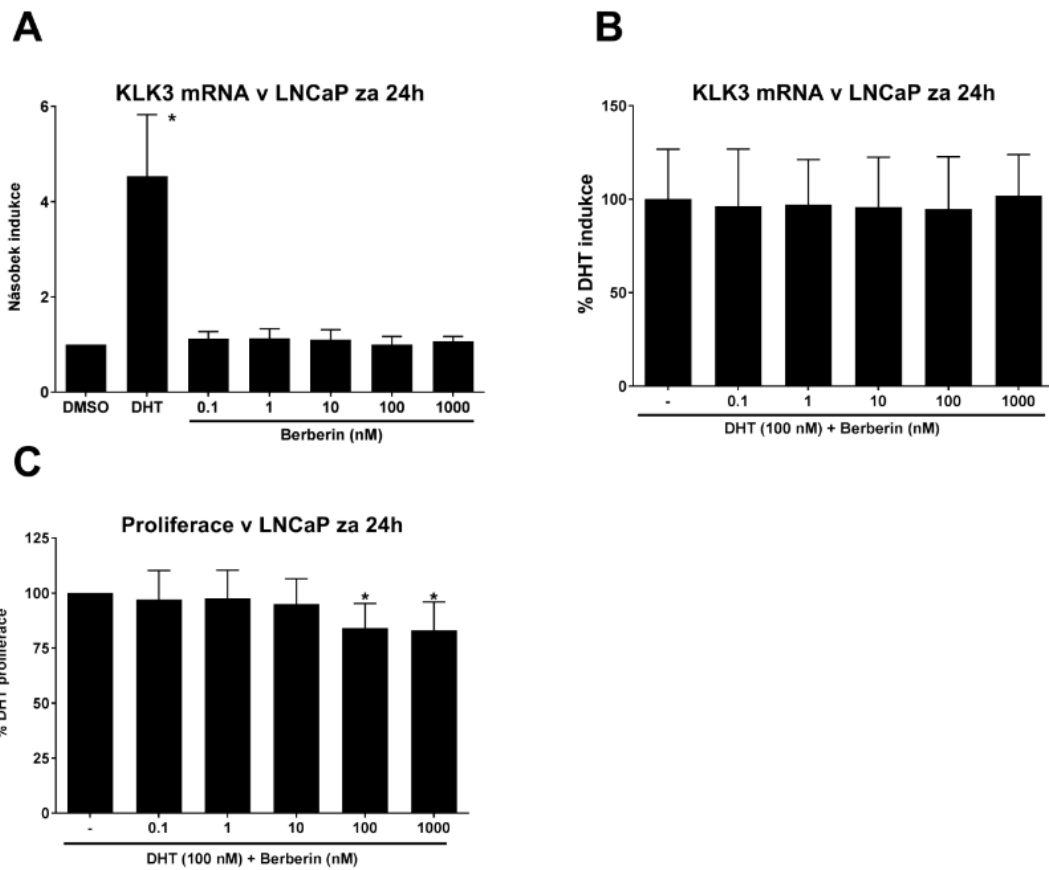
Berberin je látkou vyskytující se v širokém množství různých rostlinných léčiv nebo potravních doplňků, ale jeho účinek na aktivitu androgenního receptoru není známý v plazmaticky relevantních koncentracích. Proto jsme prozkoumal jeho vliv na karcinom prostaty.

Berberin dokázal signifikantně potencovat aktivitu androgenního receptoru zprostředkovanou DHT v systému s reportérovým genem a naproti tomu cílový gen AR, KLK3, byl ve výsledku snížen v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1. Druhá studovaná linie, na androgenech závislá, LNCaP však nebyla berberinem ovlivněná na úrovni mRNA pro KLK3 a stejný efekt nastal i v případě kombinace DHT a berberinu u 22Rv1. Obě linie však vykazovaly značnou citlivost v případě proliferace, která byla silně redukována pro nejvyšší použité koncentrace a to 100 a 1000 nM. Tohle snížení proliferace bylo doprovázeno zvýšením barvením pomocí Anexinu V, což naznačuje zvýšený počet apoptotických událostí.

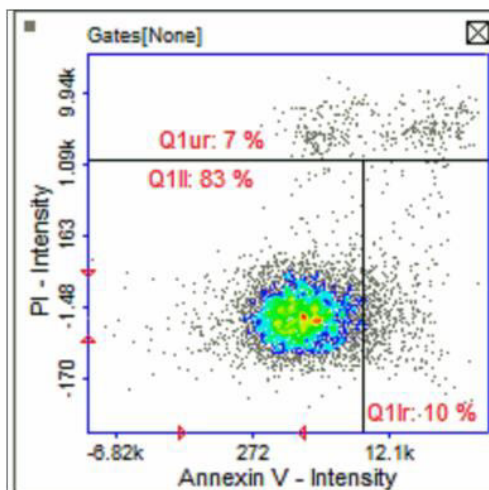
Z dosažených dat je tedy zřejmé, že berberin inhibuje proliferaci prostatických buněčných linií ve farmakologicky dosažitelných koncentracích, ale bez přímé vazby na cílový gen AR.



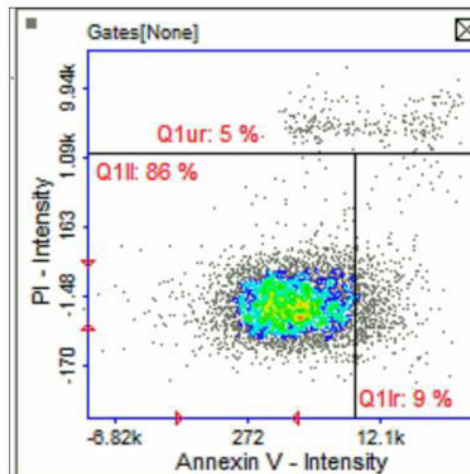
Obrázek č. 8: Vliv berberinu na aktivitu androgenního receptoru v 22Rv1



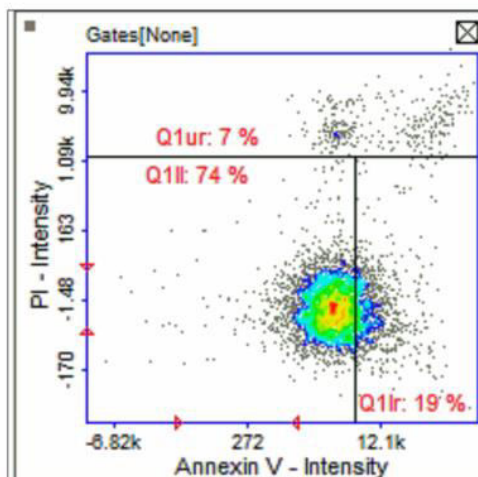
Obrázek č. 9: Vliv berberinu na aktivitu androgenního receptoru v na androgenech závislých buňkách



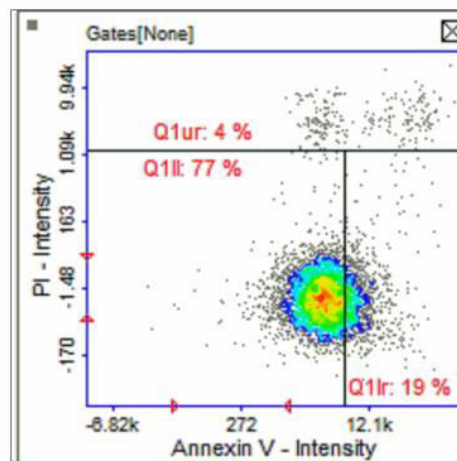
UT



DHT



BER



BER + DHT

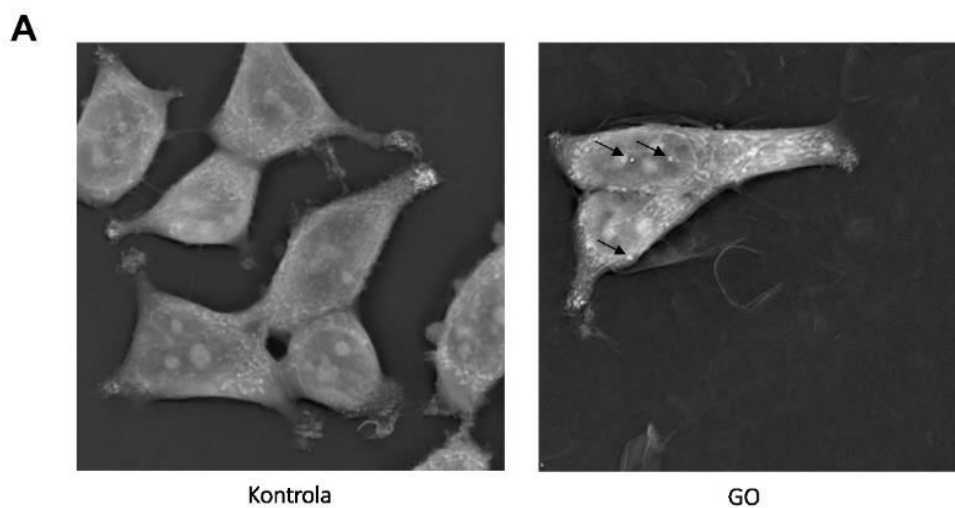
Obrázek č. 10: Vliv berberinu na signál Annexinu V v 22 Rv1

5.4 Vliv grafen oxidu na signalizaci androgenního receptoru

Grafen oxid (GO) je oxidovaná forma grafenu, která nachází stále širší uplatnění v různých oblastech průmyslu, medicínu nevylučuje. V mém experimentu dokázal koncentračně závisle snižovat aktivitu androgenního receptoru měřenou reportérovým genem v přítomnosti DHT, přičemž se tento efekt přenášel i na cílový gen KLK3 a také na protein. Silnějšího efektu bylo dosaženo na proteinu PSA než na jeho mRNA, kde již při nejnižší použité koncentraci GO došlo k snížení hladiny proteinu na bazální úroveň. Cílový gen pro AR-v7 (UBE2C) byl ovlivněn pouze na úrovni proteinu, a nikoliv na úrovni mRNA.

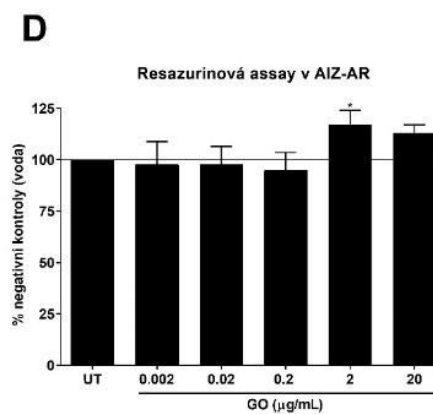
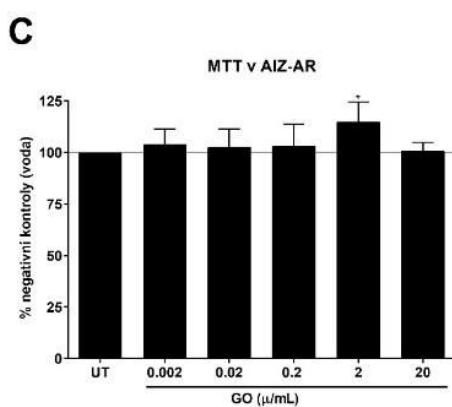
Jedním z vysvětlení těchto efektů GO na cílové geny AR, může být jeho schopnost ovlivnit translokaci samotného AR, která je ovšem v rozporu s předpoklady zvýšená a stejně tak dochází k mírnému zvýšení samotného množství receptoru. Nicméně, přestože GO prokazatelně proniká dovnitř buněk a mění jejich morfologii, měření oxidačního stresu v buňce bylo bezezměny a proliferace byla snížena jen minimálně, a to až za dobu 48h.

Chromatinová imunoprecipitace neukázala žádné obohacení v promotorové oblasti vyjma rozdílu mezi UT a DHT, ale nikoliv působením GO a lze tedy spekulovat, zdali navázaný receptor do promotorové oblasti transkripci spouští, ale zda ji spíše neinhibuje. Experimenty s na androgenech závislou buněčnou linií přinesli LNCaP přinesly důkaz, že není na působení GO tolik citlivá a pozorované efekty mohou souviset převážně s AR-v7, který je v 22Rv1 přítomen. Hladina mRNA pro KLK3 byla v LNCaP ovlivněna minimálně, ale translokace byla snížena koncentračně závisle.

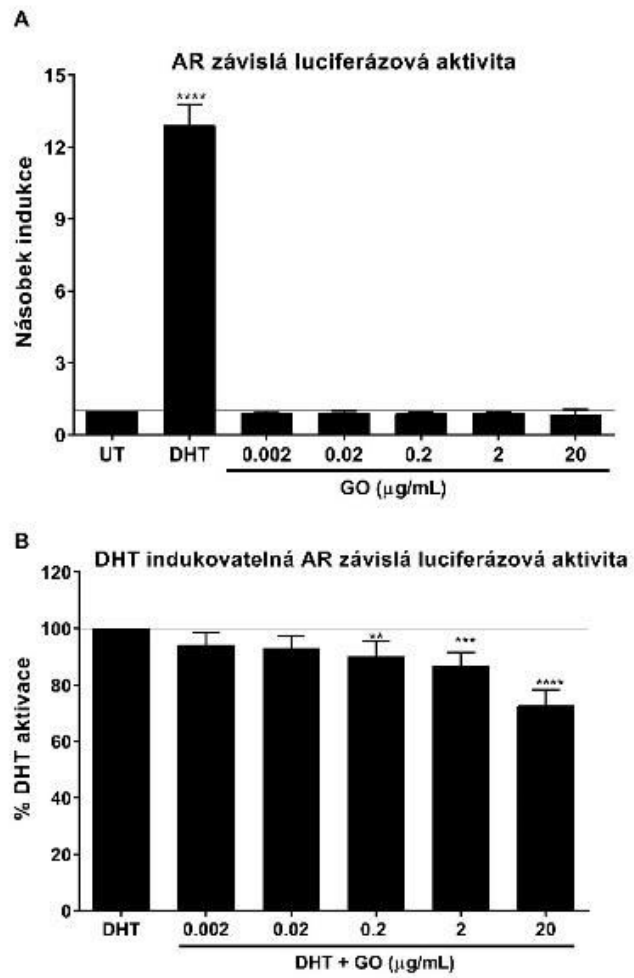


B

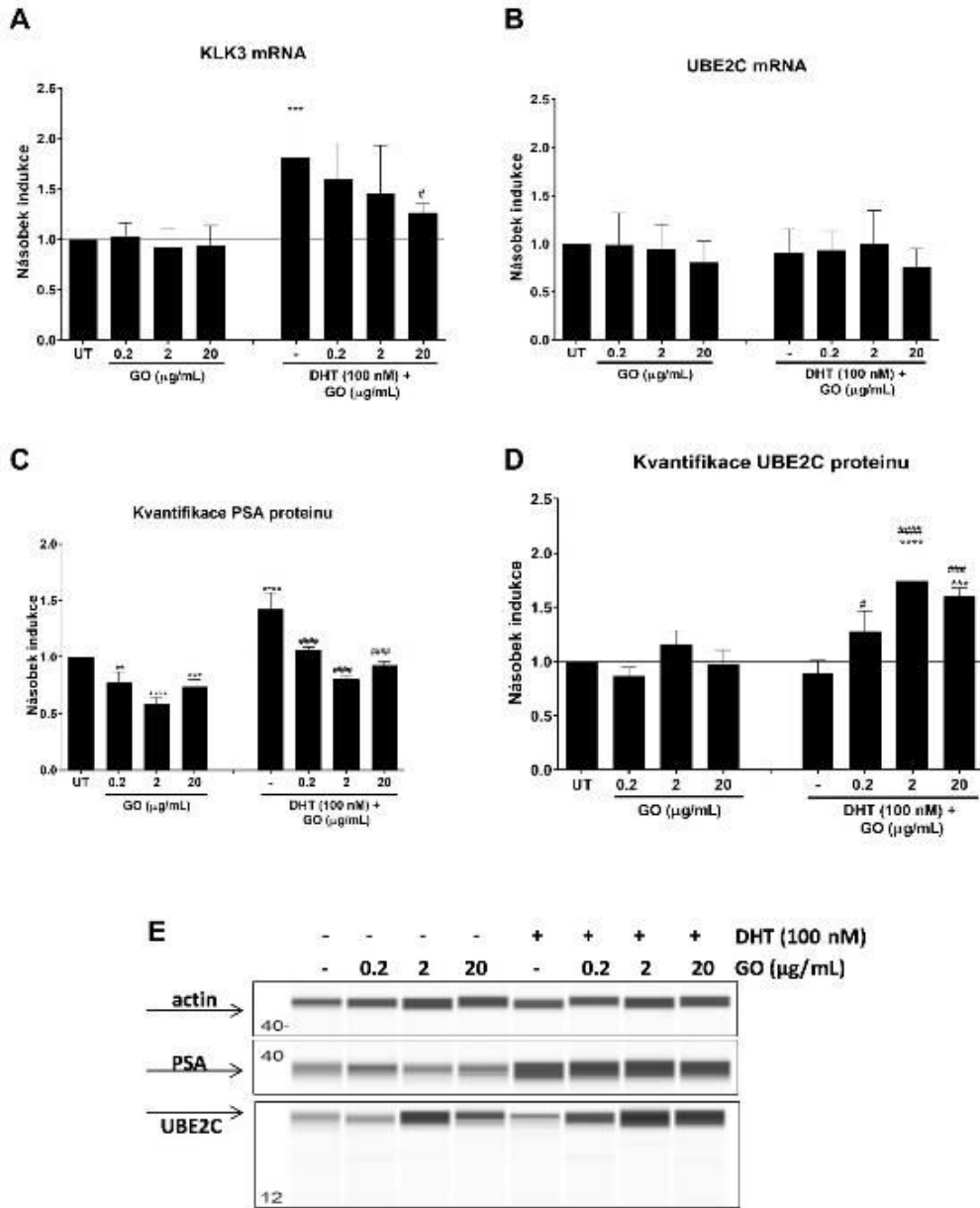
	Z-potenciál, mV		Hydrodynamický průměr, nm	
	Zásobní roz. (voda)	Buněčná linie (medium)	Zásobní roz. (voda)	Buněčná linie (medium)
GO (SigmaAldrich/Merck)	-33.9	-6.0	65.29	5.033



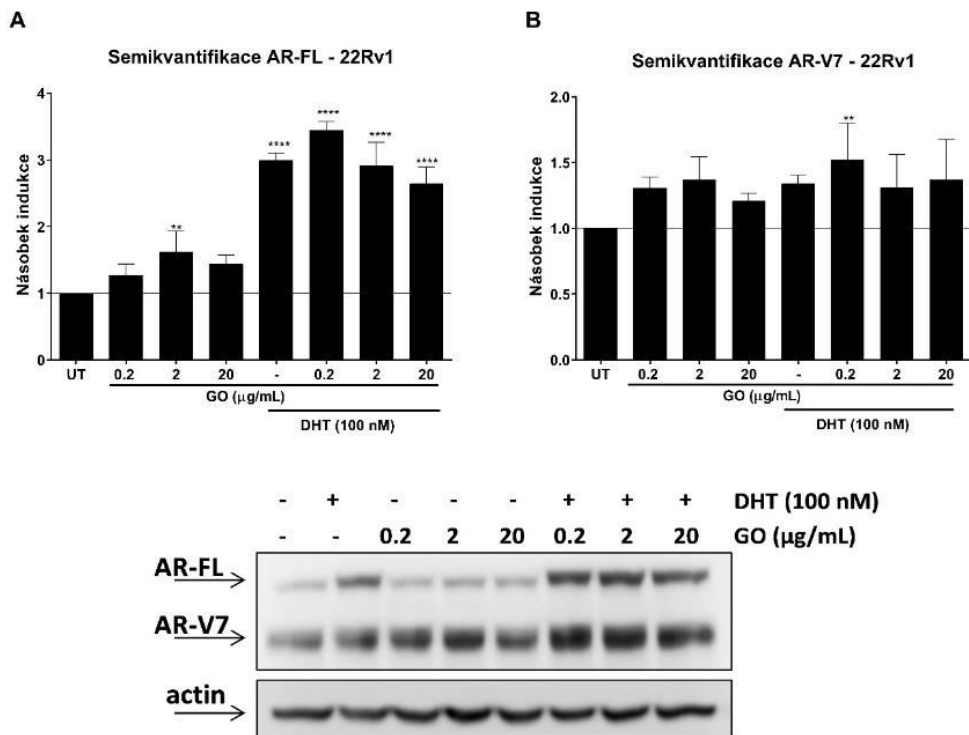
Obrázek č. 11: Vliv grafen oxidu na viabilitu buněčné linie



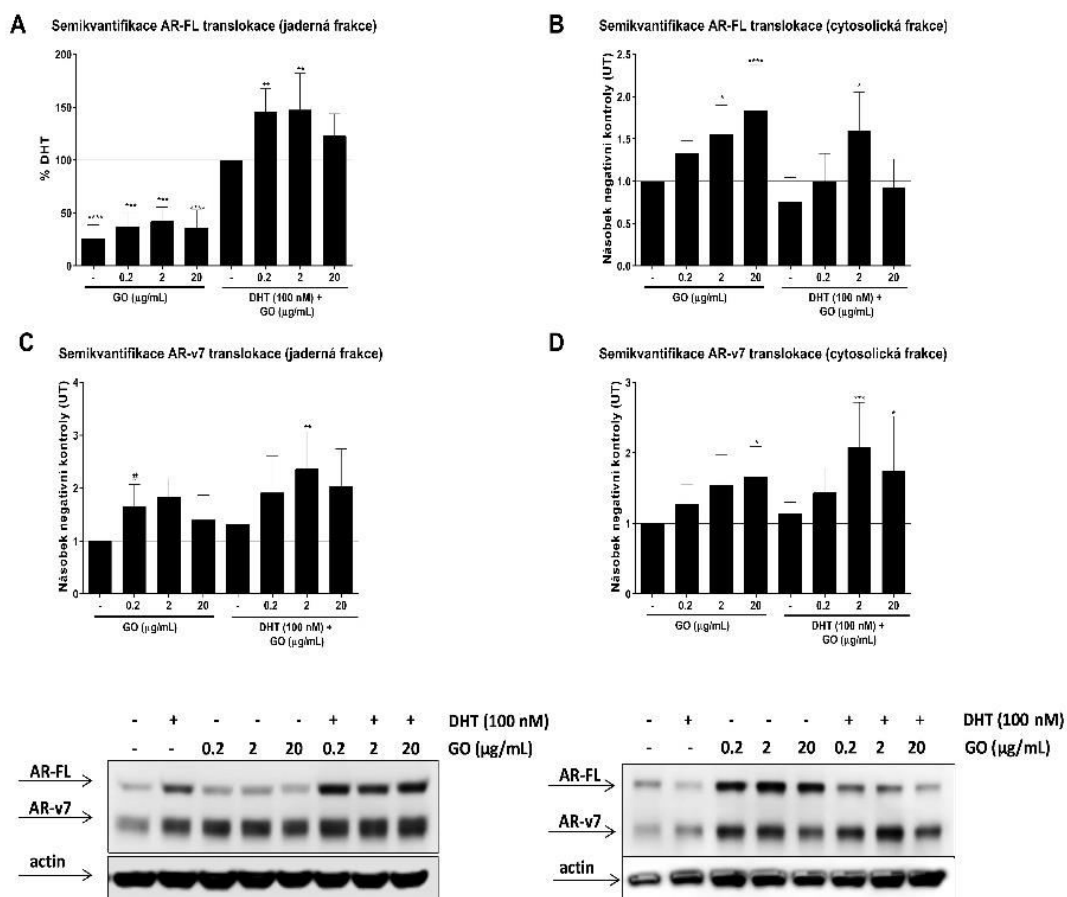
Obrázek č. 12: Vliv grafen oxidu na aktivitu androgenního receptoru



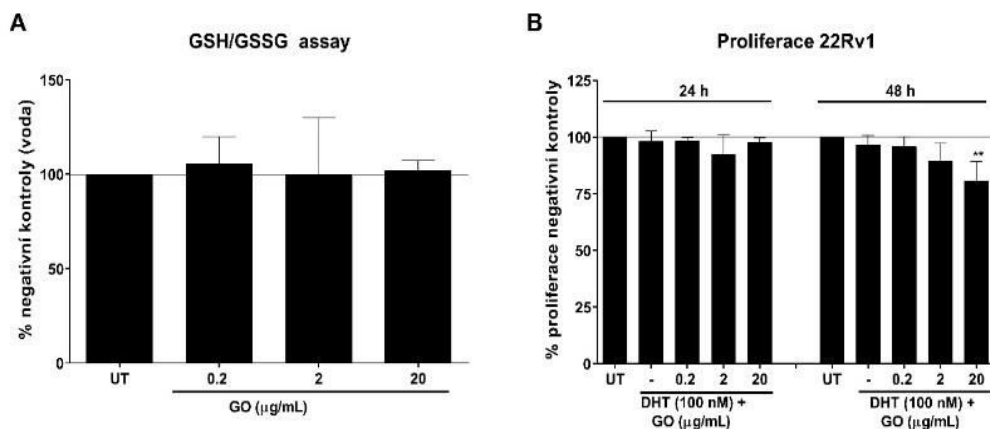
Obrázek č. 13: Vliv grafen oxidu na cílové geny androgenního receptoru



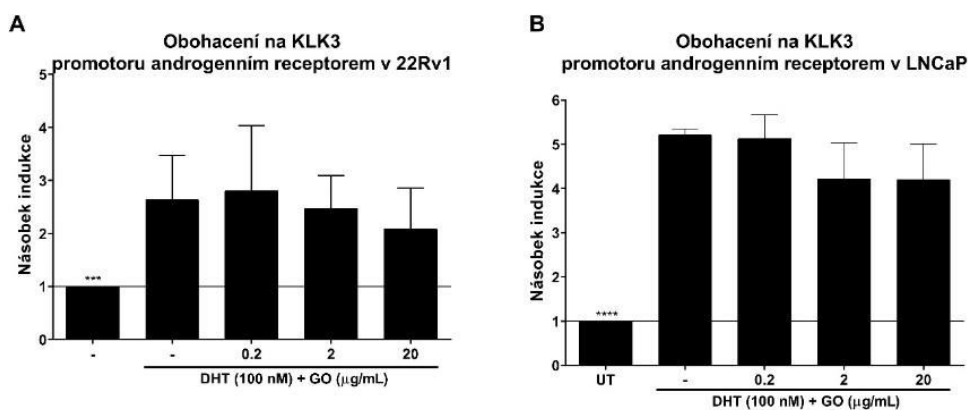
Obrázek č. 14: Vliv grafen oxidu na množství AR-FL a AR-V7



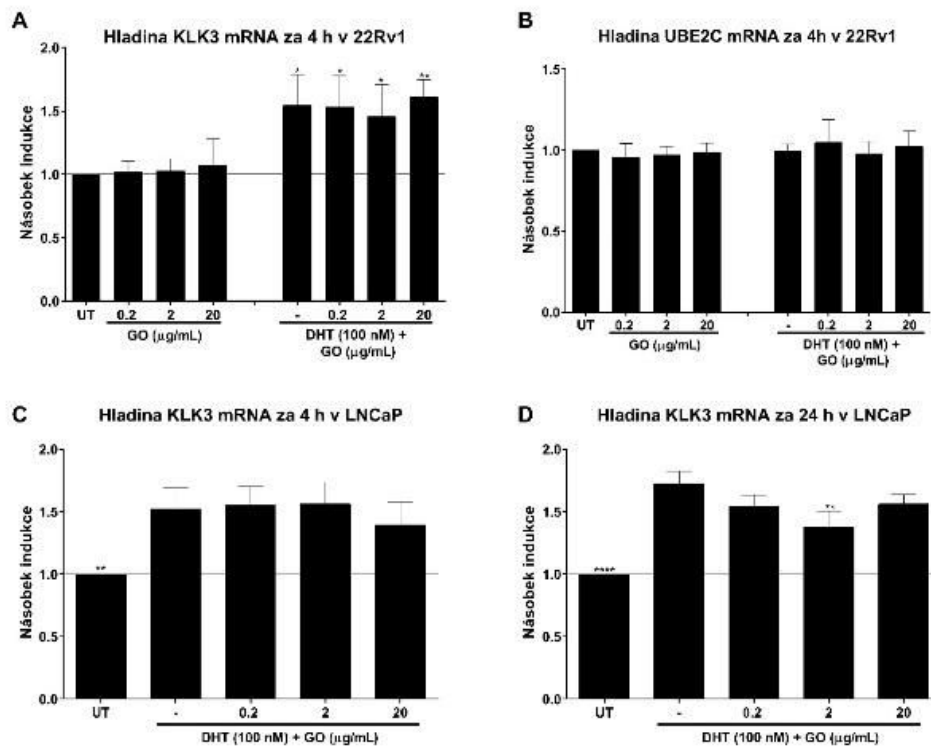
Obrázek č. 15: Translokace AR-FL a AR-V7



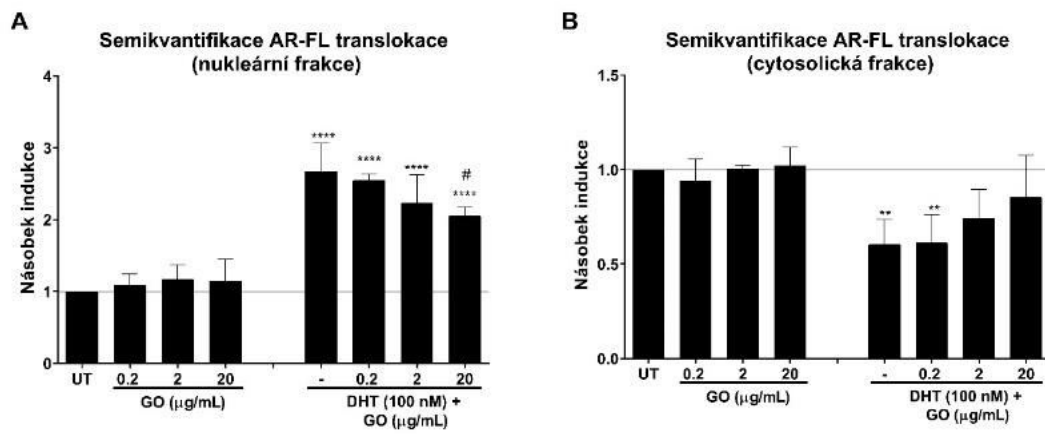
Obrázek č. 16: Proliferace 22Rv1 a GSH/GSSG assay



Obrázek č. 17: Chromatinová imunoprecipitace



Obrázek č. 18: Vliv grafen oxidu na cílové geny AR v 22Rv1 a LNCaP



Obrázek č. 19: Translokace AR-FL v LNCaP v přítomnosti GO

6 Závěr

Tato práce se zabývá vlivem léku (mykofenolát mofetil), potravního doplňku (berberin) a látek významných v průmyslu (grafen oxid, bisfenol S) na aktivitu androgenního receptoru. Hlavní zjištění plynoucí z této práce jsou:

- Mykofenolát mofetil indukuje JNK 54 a JNK46 což ovlivňuje signalizaci AR v 22Rv1.
- Mykofenolát mofetil zvyšuje citlivost 22Rv1 na inhibitory JNK.
- Bisfenol S neovlivňuje cílový gen AR (KLK3) a společně se slabou modulací dalších jaderných receptorů se jeví jako bezpečnější náhrada bisfenolu A.
- Berberin ve fyziologicky relevantních koncentracích potlačuje proliferaci nádorových prostatických buněk.
- Grafen oxid potlačuje indukovanou expresi KLK3 a potencuje ligandem aktivovanou translokaci do jádra v na androgenech nezávislé buněčné linii 22Rv1

7 Seznam použité literatury

1. Jin, H.J., J. Kim, and J. Yu, *Androgen receptor genomic regulation*. *Transl Androl Urol*, 2013. **2**(3): p. 157-177.
2. Luccio-Camelo, D.C. and G.S. Prins, *Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011. **127**(1-2): p. 74-82.
3. Riihimaki, M., et al., *What do prostate cancer patients die of?* *Oncologist*, 2011. **16**(2): p. 175-81.
4. Abu, E.O., et al., *The localization of androgen receptors in human bone*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997. **82**(10): p. 3493-3497.
5. Vrzal, R., et al., *Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes*. *Toxicol Lett*, 2015. **238**(1): p. 43-53.
6. Jia, B., et al., *Toxicological effects of bisphenol A exposure-induced cancer cells migration via activating directly integrin beta1*. *Chemosphere*, 2018. **220**: p. 783-792.
7. Grun, F. and B. Blumberg, *Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007. **8**(2): p. 161-71.
8. Vinas, P., et al., *Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **397**(1): p. 115-125.
9. Simoneau, C., et al., *Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011. **28**(12): p. 1763-8.
10. Liao, C., F. Liu, and K. Kannan, *Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues*. *Environ Sci Technol*, 2012. **46**(12): p. 6515-22.
11. Liao, C., et al., *Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures*. *Environ Sci Technol*, 2012. **46**(12): p. 6860-6.
12. Liu, J., et al., *Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum*. *Environ Sci Technol*, 2017. **51**(4): p. 2456-2463.
13. Grignard, E., S. Lapenna, and S. Bremer, *Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S*. *Toxicol In Vitro*, 2012. **26**(5): p. 727-31.
14. Carr, S.F., et al., *Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(36): p. 27286-90.
15. Vrzal, R., et al., *The effects of drugs with immunosuppressive or immunomodulatory activities on xenobiotics-metabolizing enzymes expression in primary human hepatocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2015. **29**(5): p. 1088-99.
16. Karimov, A., *Berberis Alkaloids*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1993(4): p. 481-506.
17. Xiao, C.W., et al., *Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporum canis*-induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism*. *BMC Complement Altern Med*, 2015. **15**: p. 177.
18. Chen, W.H., et al., *Synthesis of linked berberine dimers and their remarkably enhanced DNA-binding affinities*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**(10): p. 2689-2692.
19. Choi, M.S., et al., *Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells*. *International Journal of Oncology*, 2009. **34**(5): p. 1221-1230.
20. Hur, J.M. and D. Kim, *Berberine inhibited radioresistant effects and enhanced anti-tumor effects in the irradiated-human prostate cancer cells*. *Toxicol Res*, 2010. **26**(2): p. 109-15.

21. Zhao, H., et al., *Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering*. Drug Discov Today, 2017. **22**(9): p. 1302-1317.
22. Sun, C., et al., *Graphene Oxide Nanosheets Stimulate Ruffling and Shedding of Mammalian Cell Plasma Membranes*. Chem, 2016. **1**(2): p. 273-286.
23. Feng, M., et al., *Potential disruption of protein-protein interactions by graphene oxide*. J Chem Phys, 2016. **144**(22): p. 225102.
24. Lee, S.W., et al., *Graphene oxide polarizes iNKT cells for production of TGF beta and attenuates inflammation in an iNKT cell-mediated sepsis model*. Scientific Reports, 2018. **8**.
25. Bartonkova, I., A. Novotna, and Z. Dvorak, *Novel Stably Transfected Human Reporter Cell Line AIZ-AR as a Tool for an Assessment of Human Androgen Receptor Transcriptional Activity*. Plos One, 2015. **10**(3).
26. Dorcakova, A., et al., *Differential effects of the enantiomers of tamsulosin and tolterodine on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017. **390**(1): p. 49-59.
27. Stepankova, M., et al., *Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor*. Mol Pharmacol, 2018. **93**(6): p. 631-644.
28. Dun, B., et al., *Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anticancer activities of mycophenolic acid*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(12): p. 2880-6.
29. Andreucci, M., et al., *Mycophenolic acid inhibits the phosphorylation of NF-kappaB and JNKs and causes a decrease in IL-8 release in H2O2-treated human renal proximal tubular cells*. Chem Biol Interact, 2010. **185**(3): p. 253-62.
30. Zenata, O., Z. Dvorak, and R. Vrzal, *Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines*. Toxicol Lett, 2017. **281**: p. 10-19.

8 Publikační činnost

Publikace:

Vrzal R. , **Ženata O.** , Vrzalová (Dořičáková) A. , Dvořák Z. : (2015) Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes.. *Toxicol Lett.* 238. 43 - 53 [IF₂₀₁₄**3.262**]

Vrzal R. , **Ženata O.** , Bachleda P. , Dvořák Z. : (2015) The effects of drugs with immunosuppressive or immunomodulatory activities on xenobiotics-metabolizing enzymes expression in primary human hepatocytes. *Toxicology in Vitro.* 29. 1088 - 1099 [IF₂₀₁₄**2.903**]

Ženata O., Vrzal R. (2017): Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget*, 8, 35390 - 35402. [IF₂₀₁₅**5.008**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Mycophenolate Mofetil induces c-Jun-N-terminal kinase expression in 22Rv1 cells: an impact on androgen receptor signaling. *Journal of Cancer*, 9, 1915 - 1924. [IF₂₀₁₆**2.916**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2018): Pharmacologically relevant concentrations of berberine transiently stimulate dihydrotestosterone-inducible androgen receptor-mediated luciferase activity in human prostate cancer cells. *Translational Cancer Research*, 7, 383 - 390. [IF₂₀₁₆**1.167**]

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R. (2017): Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicol Lett.* 5;281:10-19. [IF₂₀₁₇**3.166**]

Příspěvek na konferenci:

Ženata O., Dvořák Z., Vrzal R.: The impact of mycophenolate mofetil on androgen receptor activity in prostate cancer cells 22Rv1. 18th European Congress of Endocrinology (ECE) 2016, Munich, Germany, 28 – 31 May 2016, e-poster