

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Martina Leštinská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Důsledky aktivace
aryluhlovodíkového receptoru
methyldoly v nádorové prostatické
linii 22Rv1

Diplomová práce

Bc. Martina Leštinská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2019/2020

Studijní program: Biologie
Forma studia: Prezenční
Obor/kombinace: Molekulární a buněčná biologie (MBB)

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Martina LEŠTINSKÁ**
Osobní číslo: **R190063**
Adresa: **Závořícká 556, Postřelmov, 78969 Postřelmov, Česká republika**
Téma práce: **Důsledky aktivace aryluhlovodíkového receptoru methylindoly v nádorové prostatické línii 22Rv1**
Téma práce anglicky: **The impact of arylhydrocarbon receptor activation by methylindoles in cancer prostate cell line 22Rv1**
Vedoucí práce: **doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

- 1) Vypracování rešerše na téma diplomové práce
- 2) Stanovení exprese cílových genů aryluhlovodíkového a androgenního receptoru metodou qPCR
- 3) Detekce hladiny proteinů aryluhlovodíkového a androgenního receptoru metodou western blotting
- 4) Vypracování diplomové práce a multimediální prezentace k obsahové diplomové práce

Seznam doporučené literatury:

- 1) Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor; Martina Štepankova et al. Molecular Pharmacology, 2018
- 2) Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. Lee JH et al. Trends in microbiology, 2015
- 3) A novel prostate cancer therapeutic strategy using icaritin-activated arylhydrocarbon-receptor to co-target androgen receptor and its splice variants. Sun F et al. Carcinogenesis, 2015.
- 4) Články publikované v odborných periodikách

Podpis vedoucího práce:



Datum:

18.9.2019

Podpis vedoucího pracoviště:



Datum:

20.9.19

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D.

© 2019 Prof. Zdeněk Dvořák, Ph.D. All rights reserved.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Martina Leštinská

Název práce: Důsledky aktivace aryluhlovodíkového receptoru methyldoly v nádorové prostatické linii 22Rv1

Typ práce: Diplomová

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

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

Rok obhajoby práce: 2021

Souhrn: Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který řídí expresi cílových genů, jako je CYP1A1. V roce 2007 byl AhR identifikován jako ligand-dependentní E3 ubikvitin ligáza, která cílí na steroidní receptory a podporuje jejich proteolýzu. Cílem této diplomové práce bylo stanovit hladiny transkriptů vybraných cílových genů AhR a androgenního receptoru (AR) metodou RT-qPCR a následně stanovit množství proteinů AhR a AR pomocí Western blottingu v nádorové prostatické buněčné linii 22Rv1 po aplikaci vybraných methyldolů. Všechny methyldoly kromě 2-methyldolu indukovaly expresi mRNA cílových genů AhR. Na úrovni proteinu došlo k výraznějšímu snížení množství proteinu AR pouze u 3-methyldolu. Při sledování hladin exprese na úrovni proteinu AhR bylo pozorováno mírné zvýšení množství proteinu u 5-methyldolu. Výsledky naznačují, že ostatní methyldoly neměly žádný významný účinek na hladinu proteinu AhR ani AR.

Klíčová slova: Aryluhlovodíkový receptor, androgenní receptor, methyldoly

Počet stran: 51

Počet příloh: 0

Jazyk: CZ

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Martina Leštisnká

Title: The impact of aryl hydrocarbon receptor activation by methylindoles in cancer prostate cell line 22Rv1

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

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

The year of presentation: 2021

Abstract: The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor that regulates expression of target genes such as CYP1A1. In 2007, the AhR was identified as a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase targeting the steroid receptor for proteasomal degradation. The aim of this diploma thesis was to determine the transcripts levels of selected AhR and androgen receptor (AR) target genes by RT-qPCR and then determine the amount of AhR and AR proteins by Western blotting in cancer prostate cell line 22Rv1 after application of selected methylindoles. All methylindoles, except 2-methylindole, induced mRNA expression of AhR target genes. At the protein level, there was a significant reduction of AR protein content only with 3-methylindole. A slight increase in AhR protein level was observed with 5-methylindole treatment. The results suggest that the other methylindoles had a significant effect on protein levels neither AhR nor AR.

Keywords: Aryl hydrocarbon receptor, androgen receptor, methylindoles

Number of pages: 51

Number of appendices: 0

Language: CZ

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Martina Leštinská

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a za čas, který mi věnoval. Poděkovat bych chtěla i celému kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za jejich pomoc a ochotu. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Literární přehled	3
3.1 Androgenní receptor	3
3.1.1 Struktura a signální dráha AR	3
3.1.2 Alternativní varianty sestřihu	5
3.1.3 Ligandy AR	6
3.1.4 AR a rakovina prostaty	7
3.2 Arylhydrovodíkový receptor	9
3.2.1 Signální dráha AhR	9
3.2.2 Ligandy AhR	11
3.2.3 AhR jako ubikvitin ligáza	11
3.3 Indol	15
4. Materiál a přístroje	17
4.1 Biologický materiál	17
4.2 Materiál	17
4.3 Použité chemikálie a roztoky	17
4.3.1 Chemikálie	17
4.3.2 Roztoky	20
4.4 Laboratorní přístroje	20
4.5 Použitý software	21
5. Metodika	22
5.1 Kultivace buněčné linie 22Rv1	22
5.2 Pasážování a počítání buněk	22
5.3 Treatment	22
5.4 MTT test	23
5.5 Izolace RNA	23
5.6 Reverzní transkripce	24
5.7 Real-time PCR	24
5.8 Příprava vzorků pro SDS-PAGE	25
5.9 SDS-PAGE	26
5.10 Western blotting a detekce proteinů	26
6. Výsledky	28
6.1 Vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie 22Rv1	28
6.2 Exprese na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii 22Rv1	29

6.3	Expresse na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii 22Rv1	34
7.	Diskuze	36
8.	Závěr	39
9.	Literatura	40

Seznam symbolů a zkratk

3MC	3-methylcholanthren
ADT	Androgen deprivační terapie
AF1	Aktivační funkce 1
AF2	Aktivační funkce 2
AhR	Aryluhlovodíkový receptor
AhRR	AhR represor
AIP	Ah receptor interacting protein
APC/C	Anafázi podporující komplex/cyklosom
APS	Persíran amonný
AR	Androgenní receptor
ARA9	Ah receptor-activated 9
ARE	Androgen responsive element
AR-FL	Androgenní receptor plné délky
ARNT	Aryluhlovodíkový jaderný translokátor
AR-V	Varianty sestřihu androgenního receptoru
ASD	Androstendion
bHLH	Basic helix-loop-helix
BIC	Bikalutamid
BSA	Bovinní sérový albumin
CDKN1A	Inhibitor cyklin-dependentních kináz 1A
CE	Kryptický exon
CRPC	Kastračně rezistentní karcinom prostaty
CSPC	Kastračně senzitivní karcinom prostaty
CSS	Charcoal stripped serum
CUL4B	Protein cullin 4B
DBD	Doména vázající DNA
DDB1	Protein 1 vázající se k poškozené DNA
dFICZ	6,12-diformylindolo-[3,2-b]-karbazol

DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	5 α -dihydrotestosteron
DRE	Dioxin responsive element
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ENZ	Enzalutamid
ER α	Estrogenní receptor alfa
FICZ	6-formylindolo-[3,2-b]-karbazol
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GnRH	Hormon uvolňující gonadotropiny
GST	Glutation-S-transferáza
HSP	Proteiny teplotního šoku
ICT	Icaritin
KLK3	Kallikrein
LBD	Ligand vazebná doména
LH	Luteinizační hormon
mCRPC	Metastatický kastročně rezistentní karcinom prostaty
MTT	Methylthiazolyldifenyltetrazolium bromid
NLS	Jaderný lokalizační signál
NTD	N-koncová doména
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Karcinom prostaty
PCB	Polychlorované bifenyly
Pol II	RNA polymeráza II
PSA	Prostatický specifický antigen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SDS	Dodecylsírán sodný
SHBG	Globulin vázající pohlavní hormony

TAD	Transaktivační doména
TAF	Faktory spojené s proteinem vázajícím TATA
TBL3	Transducin- β -like 3
TBS	Tris buffered saline
TCDD	2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
TnaA	Tryptofanáza
UBE2C	Ubikvitin konjugující enzym E2
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
XAP 2	X-associated protein 2
XRE	Xenobiotic responsive element
β -NF	β -naftoflavon

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura a organizace genu a proteinu AR.....	4
Obrázek 2: Signální dráha AR.	5
Obrázek 3: Struktura AhR	10
Obrázek 4: Signální dráha AhR.	11
Obrázek 5: E3 ubikvitin ligázová aktivita AhR..	13
Obrázek 6: Struktura testovaných látek.	16
Obrázek 7: Reprezentativní western blot detekce AhR v buněčné linii 22Rv1.....	34
Obrázek 8: Reprezentativní western blot detekce AR v buněčné linii 22Rv1.....	35

Seznam grafů

Graf 1 : Viabilita buněčné linie 22Rv1 stanovená pomocí MTT testu	28
Graf 2 : Expres genu CYP1A1 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.....	29
Graf 3 : Expres genu CYP1B1 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.....	30
Graf 4 : Expres genu AhRR na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.	31
Graf 5 : Expres genu KLK3 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.	32
Graf 6 : Expres genu FKBP5 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.	32
Graf 7 : Expres genu UBE2C na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace.....	33
Graf 8 : Expres genu CDKN1A na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace...	33

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci	24
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro Real-time PCR	25
Tabulka 3: Složení reakční směsi pro Real-time PCR - Custom Assay.....	25
Tabulka 4: Podmínky pro Real-time PCR.....	25
Tabulka 5: Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE	26

1. Úvod

Karcinom prostaty (PC) je jedním z nejčastějších onkologických onemocnění u mužů, jehož výskyt stoupá s věkem. Normální vývoj a růst prostaty závisí na androgenech působících přes androgenní receptor (AR). AR je jaderný receptor, který funguje jako transkripční faktor. Vzhledem ke své rozšířené expresi v mnoha buňkách a tkáních má AR pestré škálu biologických účinků. Inhibice signalizace AR je často primárním cílem terapie rakoviny prostaty.

Arylhydrovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Mezi jeho ligandy patří exogenní i endogenní sloučeniny, kdy řada z nich obsahuje ve své struktuře indol. AhR má důležitou roli v mnoha různých buněčných procesech a zprostředkovává řadu biologických funkcí. Kromě funkce transkripčního faktoru bylo prokázáno, že vykazuje vlastnosti ligand-dependentní E3 ubikvitin ligázy. Ligandem aktivovaný AhR tak může podporovat proteazomální degradaci pohlavních steroidních receptorů. Byla proto testována hypotéza, zda aktivace AhR methylindoly vede k proteazomální degradaci AR a jeho sestřihových variant s následnou restrikcí v expresi AR-kontrolovaných genů.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit hladiny transkriptů vybraných cílových genů AhR a AR metodou RT-qPCR a následně stanovit množství proteinů AhR a AR po 24h expozici buněčné linie jednotlivým methyldolům pomocí Western blottingu.

3. Literární přehled

3.1 Androgenní receptor

Androgenní receptor (AR) (NR3C4, podrodina jaderných receptorů 3, skupina C, gen 4) je členem nadrodiny steroidních a jaderných receptorů. Z této velké rodiny proteinů je známo pouze pět steroidních receptorů obratlovců - estrogenový, progesteronový, androgenní, glukokortikoidní a mineralokortikoidní receptor (Mangelsdorf *et al.*, 1995). AR funguje, stejně jako ostatní steroidní receptory, jako intracelulární transkripční faktor. Funkce AR je regulována vazbou androgenů, které iniciují postupné konformační změny receptoru, což vede k interakcím mezi receptorem a DNA (Gao *et al.*, 2005). Transkripční regulační účinky AR zahrnují dráhy zapojené do buněčného růstu a proliferace, progresu buněčného cyklu, syntézy proteinů a apoptózy (Lin *et al.*, 2001).

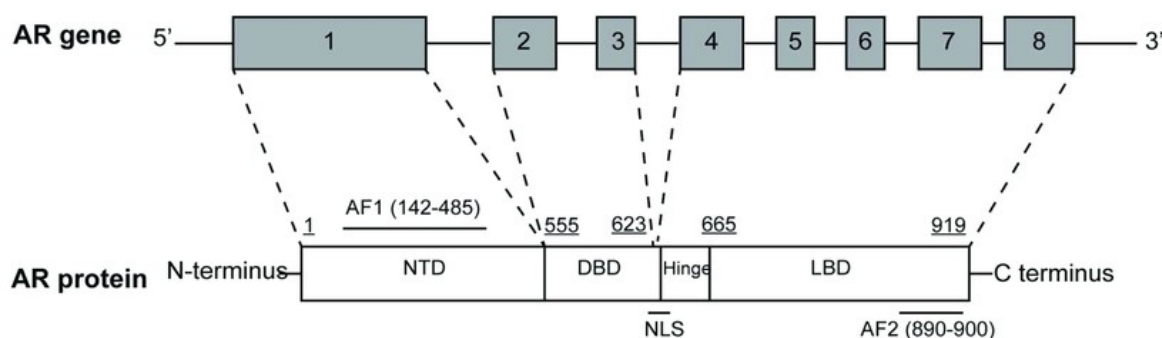
AR je široce exprimován v cílových tkáních, jako je prostata, kosterní svalstvo, játra a centrální nervový systém. AR je aktivován vazbou endogenních androgenů - testosteronu a 5 α -dihydrotestosteronu (DHT) (Keller *et al.*, 1996).

3.1.1 Struktura a signální dráha AR

Gen pro AR byl popsán a charakterizován v roce 1988 (Lubahn *et al.*, 1988). Gen je lokalizován na chromozomu X (Xq11-Xq12) a obsahuje osm exonů (Migeon *et al.*, 1981, Brown *et al.*, 1989), které kódují protein o molekulové hmotnosti 110 kDa skládající se z 920 aminokyselin (Messner *et al.*, 2020). Velikost proteinu však může být díky glutaminovým a glycinovým repetičím v 1. exonu značně variabilní (Hardy *et al.*, 1996). Na N-konci AR, na 58 kodonu, začíná polyglutaminová část (CAG), jejíž počet opakování se pohybuje průměrně kolem 23 glutaminů u normálních jedinců. Expanze repetice na více než 40 opakování způsobuje vzácnou neuromuskulární poruchu, spinální a bulbární svalovou atrofii (Kennedyho nemoc) (La Spada *et al.*, 1991). Oproti tomu nižší počet repetic CAG je spojen se zvýšenou aktivitou a následným zvýšeným rizikem rakoviny prostaty (Hsing *et al.*, 2000).

Stejně jako ostatní členové rodiny jaderných receptorů se AR skládá ze tří hlavních funkčních domén (Obr. 1). N-koncové domény (NTD), která je kódovaná exonem 1, domény vázající DNA (DBD) kódované exony 2 a 3 a C-koncové ligand vazebné domény (LBD), která je kódovaná pěti exony. Mezi doménou vázající DNA a LBD je malá pantová oblast. Všechny tři domény jsou důležité pro funkci receptoru. Byly popsány dvě transaktivační funkce receptoru. N-koncová aktivační funkce 1 (AF1), která je konstitutivně aktivní ve

zkráceném receptoru, který neobsahuje doménu vázající ligand a C-koncová aktivační funkce 2 (AF2), která funguje způsobem závislým na ligandu (McEwan, 2004). Jaderný lokalizační signál (NLS) překlenuje oblast mezi doménou vázající DNA a pantovou oblastí (Zhou *et al.*, 1994).

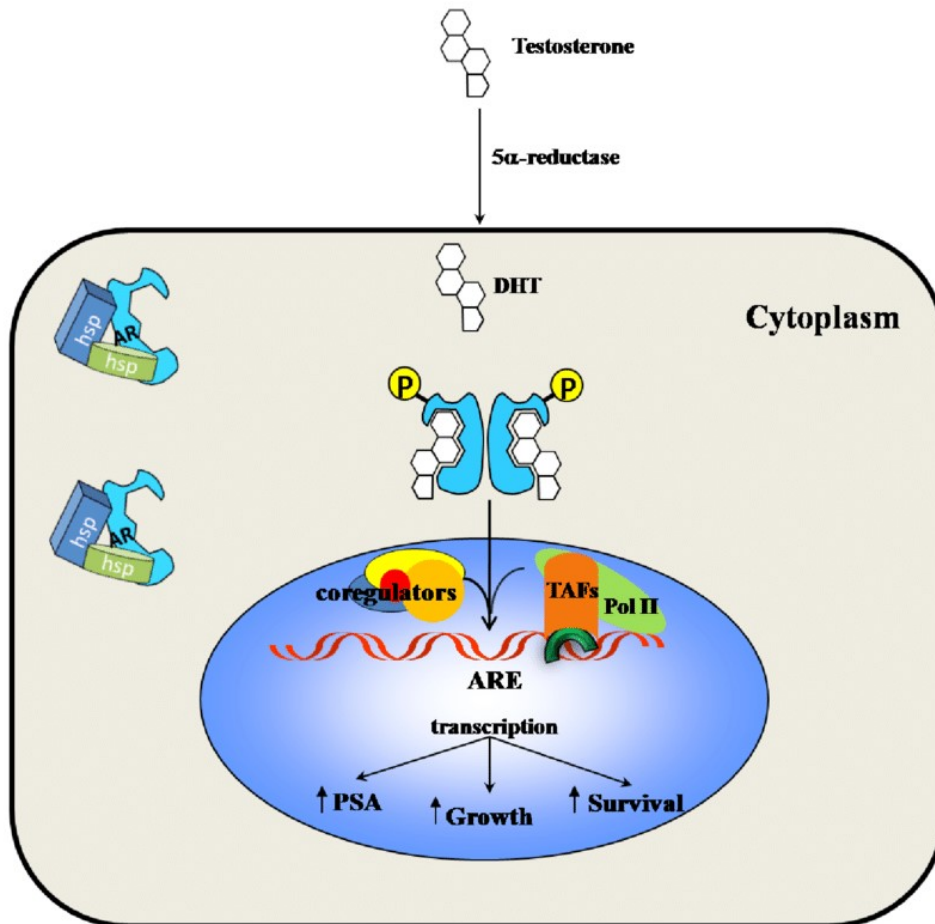


Obrázek 1: Struktura a organizace genu a proteinu AR. Gen AR obsahuje osm exonů: exon 1 kóduje N-koncovou doménu (NTD), obsahující AF1; exony 2 a 3 kódují doménu vázající DNA (DBD); exony 4-8 kódují C-koncovou doménu vázající ligand (LBD), obsahující AF2. Pantová oblast obsahující NLS je kódována 5' oblastí exonu 4 (převzato od Zamagni *et al.*, 2009).

Androgeny, jako testosteron, jsou syntetizovány primárně Leydigovými buňkami ve varlatech pod kontrolou luteinizačního hormonu (LH) produkovaného předním lalokem hypofýzy. Sekrece LH je zase regulována hormonem uvolňujícím gonadotropiny (GnRH) (Miller, 1988). Produkovaný testosteron většinou cirkuluje vázaný na globulin vázající pohlavní hormony (SHBG) a albumin (Rosner *et al.*, 1991). Pouze volná forma vstupuje do buněk, kde se testosteron působením enzymu 5 α -reduktázy přeměňuje na účinnější 5 α -redukováný metabolit testosteronu, 5 α -dihydrotestosteron (DHT), který podporuje růst a přežití buněk prostaty (Heinlein *et al.*, 2004).

Podobně jako ostatní steroidní receptory se AR v nepřítomnosti ligandu nachází hlavně v cytoplasmě a je spojen s komplexem proteinů teplotního šoku (Hsp) prostřednictvím interakcí s doménou vázající ligand (Pratt *et Toft*, 1997, Freedman 1998). AR může být aktivován testosteronem nebo dihydrotestosteronem, který má však mnohonásobně vyšší afinitu k AR. Po vazbě agonisty prochází AR řadou konformačních změn. Proteiny tepelného šoku se oddělí od AR a transformovaný AR prochází dimerizací, fosforylací a translokací do jádra, která je zprostředkována jaderným lokalizačním signálem (Zhou *et al.*, 1995). Translokovaný receptor se poté váže na specifické sekvence DNA označované jako ARE (androgen response element), které jsou umístěné v promotorové nebo enhancerové oblasti

cílových genů AR (Kuiper *et al.*, 1993). Následně dochází k remodelaci chromatinu, vazbě dalších transkripčních faktorů a polymerázy II, čímž je umožněna transkripce cílových genů (Heinlein *et al.*, 2002) (Obr.2).



Obrázek 2: Signální dráha AR. Testosteron se přemění na dihydrotestosteron pomocí 5α-reduktázy. K aktivaci AR dochází vazbou ligandu DHT, což indukuje kaskádu událostí, které zahrnují konformační změny a fosforylací receptoru, stejně tak disociaci Hsp, dimerizaci receptoru, nukleární translokaci a vazbu na DNA do ARE. AR receptor interaguje s koregulátory (koaktivátory a korepresory), které moduluji jeho transkripční aktivitu. TAF = faktory spojené s proteinem vázajícím TATA, Pol II = RNA polymeráza II (převzato od Tavassoli, 2009).

Jedním z hlavních cílových genů regulovaných AR je prostatický specifický antigen (PSA), také známý jako kallikrein (KLK3). PSA je serinová proteáza s chymotrypsinovou aktivitou, která je syntetizována jak normálními, tak maligními epiteliálními buňkami lidské prostaty (Heinlein *et al.*, 2004, Joshua *et Gerhard*, 2004). PSA exprimovaný maligními buňkami se však uvolňuje do séra ve zvýšené hladině, což lze detekovat a použít jako snadno

dostupný a relevantní biomarker rakoviny prostaty (Yousef *et al.*, 2001). PSA je však také ovlivněn věkem, velikostí prostaty, zánětem a infekcí (Penney *et al.*, 2011).

Mezi další geny regulované AR patří i FKBP5, který kóduje protein imunofilin (Kang *et al.*, 2008). Jednou z hlavních funkcí FKBP5 je jeho účast na modulaci funkce steroidních receptorů tvorbou komplexu s proteiny tepelného šoku Hsp90/Hsp70 (Davies *et al.*, 2002). FKBP5 může být, stejně tak jako PSA, biomarkerem tumorigeneze (Li *et al.*, 2011).

3.1.2 Alternativní varianty sestříhu

Před více než deseti lety bylo prokázáno, že aktivita AR je také regulována alternativním sestříhem. Varianty sestříhu (AR-V), které postrádají LBD, podporují konstitutivní genovou transkripci v nepřítomnosti androgenních hormonů (Dehm *et al.*, 2011). AR-V mohou vzájemně dimerizovat a fungovat nezávisle na AR plné délky (AR-FL), nebo mohou dimerizovat a pracovat synergicky s AR-FL. Tento proces může probíhat způsobem nezávislým na ligandu, přičemž DBD interagují a tvoří tři možné dimery: heterodimery AR-V/AR-FL, heterodimery AR-V/AR-V nebo homodimery AR-V/AR-V (Zhan *et al.*, 2017). Heterodimerizace AR-V a AR-FL je zprostředkována N/C-koncovými interakcemi a DBD, zatímco homodimerizace je zprostředkována pouze interakcemi DBD (Xu *et al.*, 2015). Bylo zjištěno, že AR-V poskytují rezistenci na současné terapie cílené na AR (Li *et al.*, 2013).

Značná pozornost byla věnována nejhojněji vyskytující se variantě AR-V7 (AR3) kvůli potenciální roli v CRPC (kastračně rezistentní karcinom prostaty). Jeho detekce se stává důležitým biomarkerem u rakoviny prostaty. Na úrovni transkriptu se tato izoforma skládá z exonů 1 až 3, které kódují NTD a DBD a jedinečné sekvence na 3' konci kódované kryptickým exonem (CE3) ve třetím intronu AR. Protein AR-V7 je konstitutivně aktivní a k translokaci do jádra buněk PC nevyžaduje ligand (Hu *et al.*, 2009). AR-V7 je schopen vyvolat expresi genů souvisejících s buněčným cyklem. Jedním z genů buněčného cyklu specificky regulovaných AR-V7 je gen UBE2C (Hu *et al.*, 2012, Cao *et al.*, 2014). UBE2C (ubikvitin konjugující enzym E2) je členem anafázi podporujícího komplexu/cyklosomu (APC/C), který podporuje degradaci několika cílových proteinů v průběhu buněčného cyklu během přechodu z metafáze do anafáze (Lin *et al.*, 2006). Může deaktivovat kontrolní bod M-fáze a zvýšit tak růst buněk. UBE2C je prominentním onkogenem, který je nadměrně exprimován u různých typů solidních nádorů, včetně pozdního stádia rakoviny prostaty (Liu *et al.*, 2015).

Podobně jako u konstitutivně aktivního AR-V7 nezávislého na ligandu, bylo identifikováno několik dalších AR-V, včetně AR-V3, AR^{V567es} (také označovaný jako AR-V12), kterým chybí doména vázající ligand. Kromě toho byly popsány varianty, jako AR-V1 a AR-V9, které jsou aktivovány podmíněně, stejně tak jako AR-FL (Hu *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2011, Jernberg *et al.*, 2017).

3.1.3 Ligandy AR

Ligandy AR jsou převážně klasifikovány jako agonisté nebo antagonisté na základě jejich schopnosti aktivovat nebo inhibovat transkripci cílových genů AR a jako steroidní nebo nesteroidní na základě jejich struktury. Ligandy AR se široce používají v různých klinických aplikacích (Tan *et al.*, 2015).

Dva nejdůležitější endogenní androgeny jsou testosteron a DHT. Androgeny jsou mužské pohlavní hormony, které jsou odpovědné za vývoj mužských pohlavních orgánů během prenatálního vývoje a za růst a vývoj pohlavních orgánů a vývoj sekundárních pohlavních znaků během puberty (MacLean *et al.*, 1993). U dospělých mužů jsou androgeny zodpovědné za udržování spermatogeneze, svalové hmoty a síly, hustoty minerálů v kosti a erythropoézy (Rana *et al.*, 2014). Mezi další endogenní androgeny patří například androstendion (ASD) a dehydroepiandrosteron (DHEA), mezi syntetické pak methyltestosteron, methandienone a nandrolon (Bahrke *et al.*, 2004, Fragkaki *et al.*, 2009).

Jako antiandrogeny se označují ligandy AR, které působí antagonisticky, tím že soutěží s androgeny o vazebná místa AR a vyvolávají konformační změny, které brání optimální transkripční aktivitě (Berrevoets *et al.*, 2002). Strukturně odlišní antagonisté s rozdílnými mechanismy antagonismu indukují buněčnou senescenci, inhibují progresi buněčného cyklu a růst nádoru. Antiandrogeny mohou být jak steroidní, tak nesteroidní (Chen *et al.*, 2009). Mezi steroidní antiandrogeny patří cyproteron acetát, oxendolon a spironolakton. Steroidní antiandrogeny mají kvůli jejich nežádoucím vedlejším účinkům omezené klinické použití. Naopak několik nesteroidních antagonistů AR je široce používáno v nemocnicích k léčbě PC, většina z nich cílí na ligand vazebnou doménu AR (Tan *et al.*, 2015).

Bikalutamid (Bic) je antagonistou první generace. Váže se na LBD, zprostředkovává konformační změnu a interferuje s tvorbou vazebného místa pro koaktivátor, což vede k inhibici transkripce AR. Několik studií ukázalo, že monoterapie Bic zvyšuje dobu přežití bez progresu a snižuje riziko progresu u časně PC (Masiello *et al.*, 2002).

Antagonista druhé generace, Enzalutamid (Enz), se klinicky používá u pacientů s metastatickým kastračně rezistentní karcinomem prostaty (mCRPC) (Merseburger *et al.*, 2015). Sloučenina blokuje interakci AR-androgen, snižuje translokaci AR do jádra, čímž narušuje navázání AR na chromatin a DNA a inhibuje DNA transkripci zprostředkovanou receptorem (Rodriguez-Vida *et al.*, 2015).

Mezi další používané antiandrogeny patří apalutamid, darolutamid a flutamid (Tan *et al.*, 2015, Chi *et al.*, 2019).

3.1.4 AR a rakovina prostaty

Aktivita AR je úzce spjata s rakovinou prostaty (PC), která patří k nejčastějším onkologickým onemocněním mužů středního a vyššího věku. Buňky rakoviny prostaty, stejně jako i normální buňky prostaty, vyžadují pro růst a přežití androgeny (Denmeade *et al.*, 1996). Zejména ze zvyšujícím se věkem hladina androgenů klesá, což se zdá být spojeno se zvýšeným rizikem PC (Pastuszak *et al.*, 2016). Bylo dokonce prokázáno, že nízké hladiny testosteronu jsou prediktivním markerem pro rakovinu prostaty (Mearini *et al.*, 2013). Předpokládá se, že PC přechází z kastračně senzitivního karcinomu prostaty (CSPC) do nádoru rezistentního na androgen deprivaci terapii (ADT) označovaného jako kastračně rezistentní karcinom prostaty (CRPC). CSPC i CRPC mohou metastázovat, což vede k smrtelné, agresivní rakovině (Bousset *et al.*, 2018). Je proto důležité si uvědomit, že exprese AR, jak v CRPC tak v mCRPC, je klíčovým faktorem pro proliferaci nádorů (Lin *et al.*, 2019).

Standardní hormonální terapie PC zahrnuje inhibici signalizace AR pomocí ADT. ADT primárně působí na snížení syntézy androgenů a/nebo narušuje signální osu AR prostřednictvím antiandrogenů (Helsen *et al.*, 2014). Tyto léčebné strategie poskytují zpočátku příznivé výsledky, včetně snížení diagnostického markeru prostatického specifického antigenu (PSA) a regresi růstu nádoru. Avšak v pozdější fázi dochází u většiny případů ke vzniku rezistence a k vývoji CRPC (He *et al.*, 2020). Navzdory velmi nízkým cirkulující hladinám testosteronu v séru je AR signalizace udržována mnoha mechanismy včetně mutací nebo zkrácení AR, amplifikací AR nebo nadměrnou expresí vedoucí ke zvýšené expresi proteinů, změnami v hladinách transkripčních kofaktorů AR a syntézy extragonadálních androgenů (Knudsen, Scher, 2009).

3.2 Arylhydroxidový receptor

Receptor pro aromatické uhlovodíky (arylhydroxidový receptor, AhR) je ligand-dependentní transkripční faktor, který je široce exprimován různými typy buněk v celém těle (Schmidt *et al.*, 1996). AhR je nejvíce exprimován v lidské placentě, následně v plicích, srdci, slinivce břišní a játrech. Jeho nejnižší hladiny exprese jsou v ledvinách, mozku a kosterních svalech (Nan, 2011). AhR je transkribován z vysoce konzervativních sekvencí a hraje regulační roli ve fyziologických procesech různých orgánů (Kaixi *et al.*, 2019).

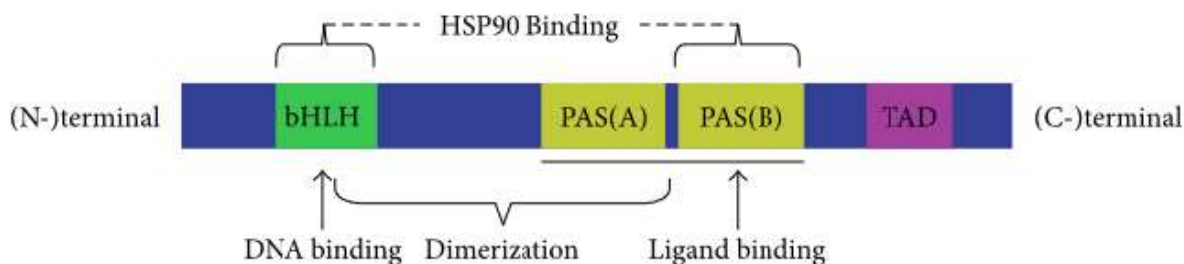
AhR se účastní mnoha buněčných procesů, včetně ontogenetického vývoje některých tkání a orgánů, apoptózy, regulace buněčného cyklu, proliferace a diferenciace (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997, Marlowe, Puga, 2005, Park *et al.*, 2005). AhR také hraje významnou úlohu v indukci a modulaci zánětu, v imunitním systému, ve vývoji nervového systému a cév (Busbee *et al.*, 2013, Stevens *et al.*, 2009, Veldhoen *et al.*, 2008).

AhR byl poprvé objeven počátkem 70. let jako zprostředkovatel toxicity 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (TCDD) (Poland, Knutson, 1982).

Lidský gen pro AhR je lokalizován na chromozomu 7p21, kde kóduje 848 aminokyselin dlouhý polypeptid s molekulovou hmotností 96 kDa (Ema *et al.*, 1994).

3.2.1 Signální dráha AhR

AhR patří do rodiny proteinů Per-Arnt-Sim (PAS) a skládá se ze tří funkčních domén (Bersten *et al.*, 2013). Amino (N-) koncové domény basic helix-loop-helix (bHLH), centrální PAS domény se dvěma degenerovanými opakováními (PAS A a PAS B) a transkripční domény (TAD) v karboxy (C-) koncové oblasti (Fukunaga *et al.*, 1995, Stevens *et al.*, 2009) (Obr. 3). PAS doména AhR zprostředkovává heterodimerizaci se strukturně příbuzným proteinem známým jako arylhydroxidový jaderný translokátor (ARNT), rozpoznání DNA, vazbu ligandu a chaperonové interakce. Vedle domény PAS je doména bHLH, která se podílí na vazbě DNA a podporuje dimerizaci proteinu (Fukunaga *et al.*, 1995). TAD funguje jako mediátor při transkripční aktivaci downstream genů. C-koncová doména je velice variabilní a je zodpovědná za rozdíly v molekulové hmotnosti receptoru v rámci jednoho druhu (např.: u myši) i mezidruhově (Burbach *et al.*, 1992).

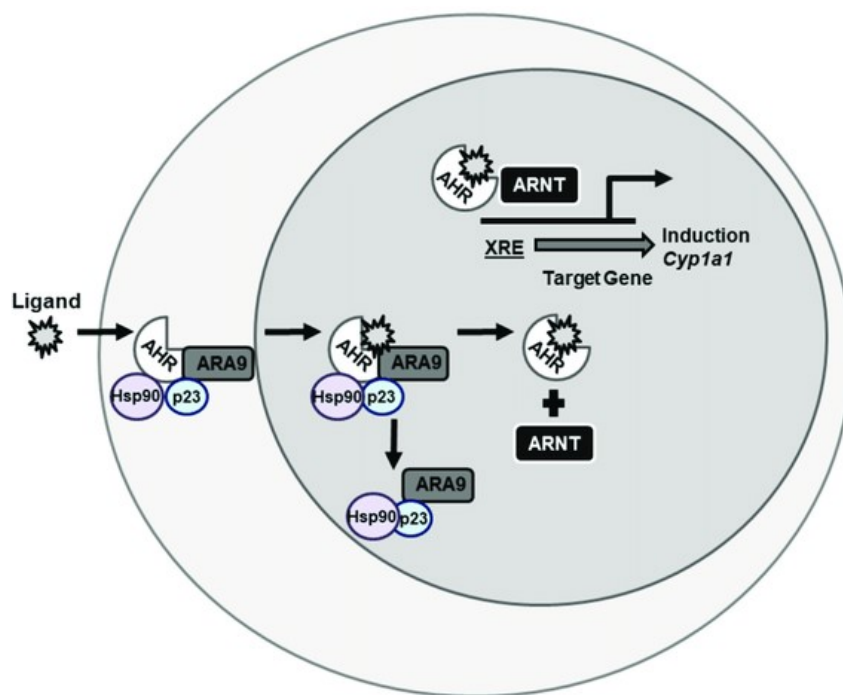


Obrázek 3: Struktura AhR (převzato od Yi et al., 2018).

Při absenci ligandu se AhR nachází v cytoplasmě ve stabilním komplexu se dvěma molekulami chaperonového proteinu teplotního šoku (Hsp90), jednou molekulou proteinu XAP 2 (X-associated protein 2), též nazývaný AIP (Ah receptor interacting protein) nebo ARA9 (Ah receptor-activated 9) a jednou molekulou co-chaperonového proteinu p23 (Beischlag *et al.*, 2008). Protein Hsp90 má v komplexu několik funkcí. Kromě toho, že udržuje receptor ve formě schopné vázat ligand, tak i zabraňuje nevyžádané jaderné translokaci AhR. Co-chaperon p23 stabilizuje interakci AhR-Hsp90 po navázání ligandu, zatímco protein XAP 2 napomáhá translokaci komplexu AhR s navázaným ligandem do jádra (Soshilov *et Denison*, 2008).

Po navázání ligandu podstoupí AhR změnu konformace, která odhalí jeho N-kocovou jadernou lokalizační sekvenci, což usnadní translokaci komplexu do jádra (Soshilov *et Denison*, 2008). Po vazbě strukturně příbuzného jaderného proteinu ARNT dojde k tvorbě heterodimeru AhR-ligand/ARNT, což následně vede k progresivnímu vytěšňování Hsp90 a dalších podjednotek z komplexu AhR (Beischlag *et al.*, 2008, Hankinson, 2005). Tento komplex poté rozpozná specifickou oblast na DNA, označovanou jako DRE (dioxin responsive element), někdy také označovanou jako XRE (xenobiotic responsive element), váže se na její sekvenci (5'-TNGCGTG-3') a spouští transkripci cílových genů (Shen, Whitlock, 1992) (Obr. 4).

Mezi cílové geny AhR patří enzymy metabolismu xenobiotik, jako jsou například cytochromy P450 rodiny 1 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), které mají důležitou roli v první fázi biotransformace (Beedanagari *et al.*, 2010, Beischlag *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2007). Mezi významné geny indukované AhR také řadíme glutation-S-transferázy (GSTA1, GSTM1, GSTK1, GSTP1) a UDP-glukuronosyltransferázy (UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6), které se podílejí na druhé fázi biotransformace (Chen *et al.*, 2005). Dalším z cílových genů je AhR represor (AhRR) (Mimura *et al.*, 1999).



Obrázek 4: Signální dráha AhR. AhR se nachází v cytosolu, kde je udržován v komplexu s chaperonovými proteiny, dokud není navázán ligand. Jakmile se naváže ligand, AhR se přesune z cytoplazmy do jádra a dojde k uvolnění chaperonových proteinů. AhR vytvoří heterodimer s ARNT, který nasedá na oblast XRE a indukuje genovou expresi (převzato od O'Driscoll *et al.*, 2018).

AhRR je protein z bHLH/PAS skupiny. Vykazuje vysokou homologii s AhR, ale kvůli absenci PAS B domény v N-terminální oblasti nemůže vázat ligandy (Mimura *et al.*, 1999). Od AhR a ARNT se AhRR liší tím, že C-koncová doména, která je transaktivační doménou u AhR i ARNT, je u AhRR doménou transrepressivní. To umožňuje vazbu korepresorů, které jsou zapojeny do negativní regulační smyčky pro AhR. AhRR potlačuje aktivitu AhR vazbou na ARNT a XRE (Hahn *et al.*, 2009). Je tedy schopný modulovat transkripci genů závislých na AhR. Tato negativní regulační smyčka a proteazomální degradace AhR chrání biologické systémy před důsledky nadměrné stimulace agonisty a zajišťuje dočasnou kontrolu signalizace (Larigot *et al.*, 2018).

3.2.2 Ligandy AhR

V průběhu let byla objevena řada ligandů AhR, syntetických i přírodních. Identifikace těchto ligandů poskytla lepší znalosti o fyziologických funkcích AhR (Nguyen *et al.*, 2008). Ligandy AhR se mohou značně lišit ve své chemické struktuře a vazebných afinitách. Ty ligandy, které mají vyšší afinitu k receptoru, jsou často považovány za toxičtější. Do těla mohou vstupovat jak vdechováním do plic, tak prostřednictvím kůže (Busbee *et al.*, 2013).

Tyto ligandy jsou obvykle součástí látek znečišťujících životní prostředí. Vedle syntetických ligandů AhR byly objeveny i ligandy přírodní. Ukázalo se, že tyto přírodní sloučeniny jsou méně toxické, ale stále jsou schopné vyvolat reakce prostřednictvím dráhy AhR. Většina přírodních ligandů AhR je přijímaná konzumací potravin a rostlinných léčiv (Busbee *et al.*, 2013).

AhR byl od jeho objevu intenzivně studován z hlediska jeho fyziologického významu pomocí ligandů vytvořených člověkem. Mezi nejlépe charakterizované exogenní ligandy AhR patří široká škála všudypřítomných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a polychlorovaných bifenyly (PCB). Xenobiotikum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) je nejúčinnější ligand AhR, který se váže s vysokou afinitou a stabilitou (Denison *et al.*, 2011). TCDD je také jedním z nejvíce imunotoxických a imunosupresivních ligandů AhR (Busbee *et al.*, 2013).

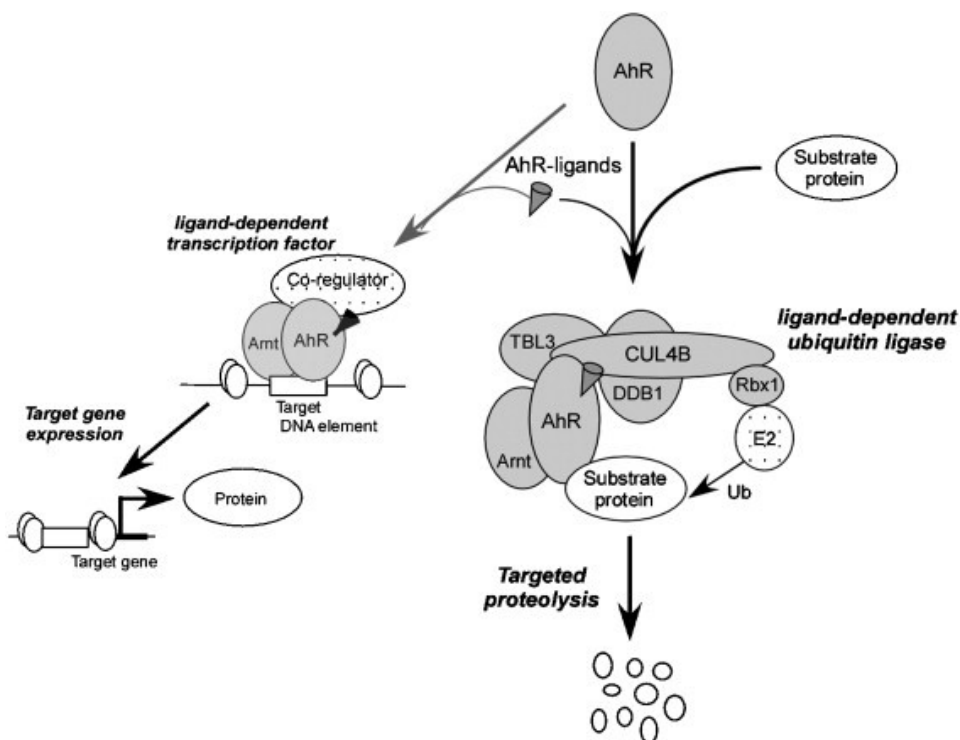
Endogenní ligandy AhR jsou skupinou chemikálií syntetizovaných v organismu, včetně metabolitů kyseliny arachidonové, hemu a tryptofanu (Stockinger *et al.*, 2011, Nguyen *et al.*, 2008). AhR je aktivován pomocí tryptofanových produktů 6-formylindolo-[3,2-b]-karbazol (FICZ) a 6,12-diformylindolo-[3,2-b]-karbazol (dFICZ), které jsou indukovány v kůži UV zářením (Rannug *et al.*, 1987). Za agonistu AhR je také považován metabolit tryptofanu kynurenin (DiNatale *et al.*, 2010). Přirozeně se vyskytující ligandy AhR se nacházejí převážně v rostlinách, jako jsou některé flavonoidy a glukosinoláty (Wall *et al.*, 2012).

3.2.3 AhR jako ubikvitin ligáza

Role AhR jako transkripčního faktoru je velmi dobře popsána. AhR reguluje expresi cílových genů jako je například CYP1A1. Nedávno se však ukázalo, že AhR má dvojí funkci. Kromě toho, že funguje jako transkripční faktor aktivovaný ligandem, Ohtake *et al.* v roce 2007 identifikovali AhR jako ligand dependentní E3 ubikvitin ligázu cílící na substrátové proteiny pro proteazomální degradaci (Ohtake *et al.*, 2007) (Obr 5.).

Komplex CUL4^{AhR} E3 ubikvitin ligázy používá aktivovaný AhR jako adaptérový protein pro rozpoznání substrátu. Komplex obsahuje protein cullin 4B (CUL4B), protein 1 vázající se k poškozené DNA (damaged DNA binding protein 1 – DDB1) a RBX1 společně s podjednotkami regulační částice 19S (19S RP) proteazomu 26S, ARNT a transducin-β-like 3 (TBL3). Tato atypická ligáza se sestavuje a funguje pouze v přítomnosti aktivovaného AhR. Mezi substrátové proteiny komplexu CUL4^{AhR} řadíme steroidní receptory, jako estrogenní receptor alfa (ERα), ERβ a androgenní receptor (Ohtake *et al.*, 2007).

Protinádorová role AhR byla pozorována u nádorů závislých na signalizaci steroidních receptorů, jako je rakovina prostaty a rakovina prsu (Ohtake *et al.*, 2007).



Obrázek 5: E3 ubikvitin ligázová aktivita AhR. AhR s navázaným ligandem sestavuje atypický komplex E3 ubikvitin ligázy CUL4B^{AhR}. AhR slouží jako ligand-dependentní ubikvitin ligáza, stejně tak jako transkripční faktor (převzato od Ohtake *et al.*, 2009).

AR hraje klíčovou roli u rakoviny prostaty, zejména u CRPC. ADT může potlačit hormonálně senzitivní rakovinu prostaty, ve většině případu však dochází ke změnám AR a PC se přizpůsobuje tak, aby přežila i při nízkých hladinách androgenů (Knudsen *et al.*, 2009). U mnoha pacientů mají rozhodující vliv zkrácené sestřihové varianty AR, které přispívají ke vzniku rezistence na ADT. Antiandrogeny které se zaměřují na LBD, tyto varianty nepotlačí (Harris *et al.*, 2019).

Bylo zjištěno, že přírodní prenylflavonoid, icaritin (ICT), může cílit jak na perzistentní AR, tak na AR-V (Sun *et al.*, 2015). ICT inhibuje transkripci cílových genů regulovaných AR, jako je KLK3 a genů regulovaných AR-V, jako je UBE2C a indukuje apoptózu v AR-positivních buňkách PC. ICT podporuje degradaci AR i AR-V prostřednictvím E3 ubikvitin ligázové aktivity AhR a narušuje transaktivaci AR v buňkách PC (Sun *et al.*, 2015).

Bylo prokázáno, že genetické umlčení genu AhR pomocí RNA interference obnovuje stabilitu AR a může částečně obnovit růst nádoru. Vybrané buňky byly transfekovány siRNA

proti AhR (si-AhR). Tato zjištění jasně naznačují zásadní roli AhR aktivovaného ICT při degradaci AR a AR-V v buňkách PC. V klinicky relevantních myších modelech ortopicky implantovaných AR-pozitivními buňkami rakoviny prostaty byl icaritin schopen cílit na AR a AR-V, inhibovat signalizaci AR a růst nádoru bez zjevné toxicity. Tyto výsledky mohou sloužit jako základní kámen pro využití icaritinu jako hlavní sloučeniny léčiv pro léčbu AR-pozitivní PC, zejména pro tu, kde jsou přítomny sestřihové varianty AR (Sun *et al.*, 2015).

Dalším příkladem látky s antiproliferačními a proapoptickými účinky na PC je karbidopa. Karbidopa je inhibítozem DOPA-dekarboxylázy a používá se k léčbě Parkinsonovy choroby (Seeberger *et Hauser*, 2009). Nedávné studie ukázaly, že karbidopa má protirakovinné účinky u mnoho druhů rakoviny, jako je například melanom a rakovina slinivky (Ogura *et al.*, 2017). Její protirakovinný účinek může souviset s aktivací AhR, který je nadměrně exprimován v mnoha nádorech, včetně rakoviny slinivky. Karbidopa aktivuje AhR tím, že slouží jako jeho agonistický ligand, čímž podporuje aktivaci jeho downstream cílových genů a inhibuje růst nádoru (Chen *et al.*, 2020). Thomas *et al.* prokázali, že karbidopa také může zvýšit protirakovinný účinek bikalutamidu v CRPC (Thomas *et al.*, 2012). Molekulární mechanismy odpovědné za protinádorový účinek karbidopy na PC však zůstávají do značné míry nejasné (Chen *et al.*, 2020).

Existuje několik studií popisujících, jak je AR degradován a jaké chemické modifikace proteinu AR tento jev zprostředkovávají. AR může být fosforylován PI3K/AKT, poté polyubikvitinován MDM2 E3 ligázou a degradován proteolyticky 26S proteazomem (Lin *et al.*, 2002). Stejně jako icaritin může podporovat degradaci AR aktivací AhR, tak i karbidopa může aktivovat AhR a inhibovat PC přes AhR zprostředkovanou proteazomální degradaci AR. Tyto studie odhalují novou, dosud neznámou farmakologickou funkci karbidopy, která je relevantní pro použití tohoto léčiva k léčbě PC (Chen *et al.*, 2020).

3.3 Indol

Prokaryota a eukaryota spolu koexistují miliony let a jejich vzájemné interakce mohou být jak prospěšné, tak škodlivé. Mikroorganismy a jejich hostitelé spolu komunikují prostřednictvím řady signálních molekul. (Hughes *et Sperandio*, 2009).

Řada bakterií a některé rostliny produkují velké množství indolů. Indol a jeho deriváty jsou tak široce rozšířeny v trávicím traktu živočichů a v rizosféře (Lee *et al.*, 2015). Indol je pomocí enzymu tryptofanázy (TnaA) syntetizován z tryptofanu řadou grampozitivních a gramnegativních bakteriálních druhů (Evans *et al.*, 1941). Několik rostlin, včetně kukuřice, je schopno produkovat indoly pomocí indol-3-glycerol fosfát lyázy. Kromě toho, kukuřice uvolňuje těkavé sloučeniny, včetně indolu, jako reakci na útok býložravců (Frey *et al.*, 2000). Naproti tomu, živočichové indol syntetizovat nemohou. Hmyz, jako jsou komáři a motýli, indol cítí a ten tak ovlivňuje některé jejich chování (Lee *et al.*, 2015). Navíc pár nedávných studií naznačuje, že indoly mohou mít několik prospěšných účinků také na lidské zdraví. Ovlivňují oxidační stres, zánět střev a vylučování hormonů (Wikoff *et al.*, 2009, Chimere *et al.*, 2014).

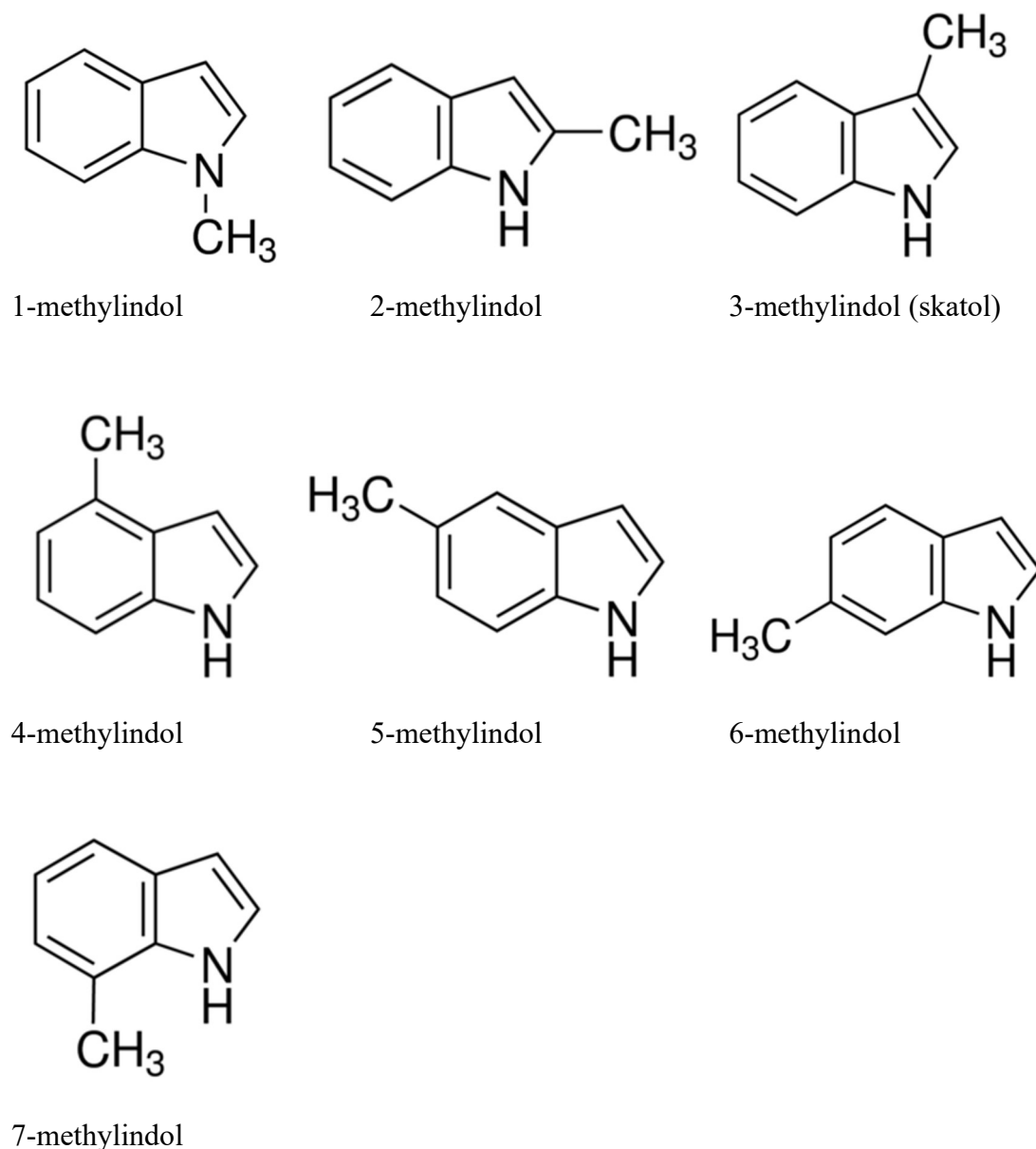
V lidském intestinálním traktu je přítomna různorodá škála přibližně 10^{14} komenzálních bakterií, některé z nich jsou zásadní pro asimilaci živin a jsou důležité pro vývoj vrozeného imunitního systému (Bansal *et al.*, 2010, Hooper *et Gordon*, 2001). Bakterie kolonizují povrch živočišných a rostlinných buněk a zabraňují invazi patogeních bakterií (Hancock *et al.*, 2012). Koncentrace indolů se pohybuje v myším a v lidském střevě okolo 250-1100 μM . Mimoto jsou deriváty indolů, jako indoxyl sulfát, indol-3-propionová kyselina, isatin a 5-hydroxyindol, přítomny v krvi, periferních tkáních, moči a dokonce i v mozkové tkáni v koncentracích až 10-200 μM (Lee *et al.*, 2015).

Řada sloučenin obsahujících ve své struktuře indol byla popsána jako endogenní ligandy lidského AhR. Mezi endogenní ligandy AhR řadíme například indol-3-carbinol, indole-3-acetonitril, tryptamin, 3-methylindol (skatol), indigo a indirubin (Hubbard *et al.*, 2015).

Do skupiny málo prozkoumaných indolových derivátů patří různé formy methyl- a methoxyindolů. Jejich aktivační/inhibiční potenciál vůči AhR byl zkoumán v nedávné studii (Stepankova *et al.*, 2018). Pomocí reporter gene assay v agonistickém módu nebo v antagonistickém módu (v přítomnosti TCDD) a měření hladin mRNA CYP1A1 byl zkoumán účinek vybraných methylindolů a methoxyindolů na transkripční aktivitu AhR. Byly identifikováni vysoce účinní agonisté AhR jako 4-methylindol, 6-methylindol

a 7-methoxyindol. Avšak testované sloučeniny měly v porovnání s dioxinem mnohem nižší potenci. Oproti tomu podstatné antagonistické odpovědi byly dosaženy 3-methylindolem, 2,3-di-methylindolem a 2,3,7-tri-methylindolem (Stepankova *et al.*, 2018).

Tato diplomová práce byla zaměřena na to, zda aktivace AhR monometylovanými indoly (Obr. 6.) povede k ovlivnění aktivity AR na úrovni cílových genů a samotného proteinu.



Obrázek 6: Struktura testovaných látek (převzato z PubChem).

4. Materiál a přístroje

4.1 Biologický materiál

- adherentní buněčná linie lidského karcinomu prostaty 22Rv1 (ECACC 05092802)

4.2 Materiál

- 6 jamkové kultivační destičky (TPP)
- 96 jamkové bílé destičky pro PCR (Roche)
- 96 jamkové kultivační destičky (TPP)
- Automatické pipety o rozsahu 0,1-2,5 μ l, 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Assistant)
- Filtrační papír pro Western blotting (Bio-Rad)
- Folie pro PCR (Roche)
- Krycí sklíčka 22x22 mm (Menzel Gläser)
- Kultivační láhve o obsahu 25 cm², 75 cm² a 150 cm² (TPP)
- Mikrozkušavky o objemech 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml (BIOplastics)
- Multikanálové pipety o rozsahu 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 30-300 μ l (Eppendorf)
- Petriho miska 100 mm (TPP)
- Plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky (TPP)
- Plastové špičky o rozsahu 0,1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- PVDF membrána (Thermo Scientific)
- Sterilní sérologické pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- Škrabka na buňky (TPP)
- Zkušavky o objemech 15 ml a 25 ml (TPP)

4.3 Použité chemikálie a roztoky

4.3.1 Chemikálie

- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049)
- 10x Tris/glycine buffer (Bio-Rad, 1610734)
- 10x Tris/glycine/SDS buffer (Bio-Rad, 1610732)

- 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (ULTRA Scientific, 48599)
- 20x TBS buffer (Thermo Scientific, 28358)
- 40% roztok akrylamid-bisakrylamid (Bio Basic, 007)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, A2153)
- Bradfordovo činidlo, 5x (Serva, 39222.03)
- dNTP (Takara)
 - dATP (4026)
 - dCTP (4028)
 - dGTP (4027)
 - dTTP (4029)
- Deionizovaná voda
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, D8418)
- Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, L3771)
- Ethanol (Penta, 71380-11000)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, F6178)
- Fosfátový pufr (Biosera, LM-S2041)
- Chemiluminiscenční substrát WesternSure PREMIUM (Li-COR):
 - Luminol Enhancer Solution (293688)
 - Stable Peroxide Solution (293689)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, C2432)
- Inhibitor Rnáz (New England Biolabs, M0307L)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, I9516)
- Laemmlí Sample Buffer (Bio-Rad, 1610737)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, G8540)
- LighCycler 480 Probes Master (Roche, 04887301001)
- Methanol (Penta, 603-001-00-X)
- M-MuLV reverzní traskriptáza (New England Biolabs, M0253L)
- Monometylované indoly:
 - 1-methylindol (Sigma-Aldrich, 193984-5G)
 - 2-methylindol (Sigma-Aldrich, M51407-25G)
 - 3-methylindol (Sigma-Aldrich, M51458-5G)
 - 4-methylindol (Energy Chemicals, 18096-32-5)
 - 5-methylindol (Sigma-Aldrich, 222410-1G)

- 6-methylindol (Sigma-Aldrich, 246328-1G)
 - 7-methylindol (Sigma-Aldrich, M51490-1G)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED) (Bio Basic, TB0508)
- Náhodné primery 6 (New England Biolabs, S1230S)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, M7145)
- Persíran amonný (Sigma-Aldrich, A3678)
- Ponceau S (Biotium, 22001)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, 161-0374)
- Primery pro GAPDH (Generi Biotech):
 - forward: 5' CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC 3'
 - reverse: 5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3'
- Primery pro CYP1A1 (Generi Biotech):
 - forward: 5' CCAGGCTCCAAGAGTCCA 3'
 - reverse: 5' GATCTTGGAGGTGGCTGCT 3'
- Primery pro CYP1B1 (Generi Biotech):
 - forward: 5'CACTGCCAACACCTCTGTCTT 3'
 - reverse: 5' CAAGGAGCTCCATGGACTCT 3'
- Primery pro KLK3 (Generi Biotech):
 - forward: 5'GTGCTTGTGGCCTCTCGT 3'
 - reverse: 5' CAGCAAGATCACGCTTTTGT 3'
- Próby Custom Assay:
 - AHRR (Roche, 144178)
 - CDKN1A (Roche, 142319)
 - FKBP5 (Roche, 113932)
 - UBE2C (Roche, 103241)
- Próby Universal Probe Library (Roche)
 - próba č. 20 pro CYP1B1 (04686934001)
 - próba č. 33 pro CYP1A1 (04687663001)
 - próba č. 44 pro KLK3 (04688040001)
 - próba č. 60 pro GAPDH (04688589001)
- Protilátky:
 - primární protilátka AhR, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-133088)

- primární protilátka AR, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-7305)
- primární protilátka β -aktin, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778)
- sekundární protilátka anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, 7076S)
- Pufr pro M-MuLV reverzní transkriptázu (New England Biolabs, B0253S)
- Re-blot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore, 2504)
- Resolving gel buffer (Bio-Rad, 161-0798)
- Roztok methylnitrocelulózy (Sigma-Aldrich, M2128)
- RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, RNB2356)
- Stacking gel buffer (Bio-Rad, 161-0799)
- Sušené mléko (Laktino)
- Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc., TR118)
- Triton X-100 (Serva, 37240)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, T6146)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
- Voda bez RNáz (Sigma-Aldrich, W4502)

4.3.2 Roztoky

- Migrační pufr: 100 ml 10x Tris/glycine/SDS buffer + 900 ml dH₂O
- Transferový pufr: 100 ml 10x Tris/glycine buffer + 200 ml methanol + 700 ml dH₂O
- TBS/Tween: 50 ml 20x TBS buffer + 0,5 ml Tween 20 + 950 ml dH₂O

4.4 Laboratorní přístroje

- Analytické váhy ABS-80-4N (Kern)
- Blotovací aparatura Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf)
- Elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- Hlubokomrazicí box MDF U53V (Sanyo)
- Chladnička (Gorenje)
- Inkubátor Mitre 400 (Conterm)

- Kývačka MR-12 (Biosan)
- Laminární box Labculture ® (ESCO)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-COR)
- Light Cyclor 480 II (Roche)
- Mikroskop (Novel Optics)
- Minikývačka MR-1 (Biosan)
- Přístroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic)
- Sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelinelectronic)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan)
- Spektrofotometr Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- Svářečka fólií (Eta)
- Termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02-n (Major Science)
- Vodní lázeň LCB22D (LabTech)
- Vortex Reax Top (Heidolph)
- Zdroj napětí MP-500V (Cleaver Scientific Ltd.)

4.5 Použitý software

- Image Studio Digits Ver 3.1 (Li-COR)
- i-control 1.11 (Tecan)
- Light Cyclor 480 SW 1.5 (Roche)
- Microsoft Excel (Microsoft)

5. Metodika

5.1 Kultivace buněčné linie 22Rv1

Adherentní buněčná linie 22Rv1 byla kultivována v kultivační plastové láhvi s RPMI, do kterého bylo přidáno 5 ml L-glutaminu, 50 ml fetálního bovinního séra a 5 ml neesenciálních aminokyselin. Láhev byla umístěna v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO₂.

5.2 Pasážování a počítání buněk

Pasážování buněk bylo provedeno zhruba každé tři dny ve sterilním prostředí. Láhev byla přenesena z inkubátoru do laminárního boxu, staré kultivační médium bylo odsáto a adherované buňky byly promyty roztokem PBS. Roztok PBS byl následně odsát a na celou vnitřní plochu láhve byl aplikován 1 ml 0,25% roztoku trypsinu. Láhev byla uzavřena a přenesena do inkubátoru. Buňky byly vystaveny působení trypsinu po dobu 3 minut. Poté co došlo k přerušení buněčných kontaktů s povrchem lahve a mezi buňkami navzájem, bylo k buňkám přidáno 9 ml nového média. Buněčná suspenze byla promíchávána pomocí sérologické pipety, aby byly odstraněny zbylé shluky buněk. Homogenní suspenze byla poté přenesena do sterilní 50ml zkumavky. Následně bylo odebráno 10 µl suspenze, která byla v mikrozkušavce smíchána s 90 µl roztoku trypanové modři. Takto vytvořená směs byla připravena k následnému počítání buněk.

Na Bürkerovu komůrku přikrytou krycím sklíčkem bylo nanášeno 10 µl připraveného roztoku. Bylo provedeno počítání živých buněk pod mikroskopem v 5 náhodně vybraných čtvercových polích v horní i dolní oblasti. Bylo vypočítáno průměrné množství buněk v 1 ml suspenze.

Pro metodu MTT byla použita 96 jamková destička, kde bylo vyseto 50 000 buněk na jamku ve 100 µl. Pro metody Real-time PCR a Western blotting byly buňky vysety na 6 jamkovou destičku, tak aby v jedné jamce byl jeden milion buněk ve 2 ml média.

5.3 Treatment

Druhý den po vyšetí buněk bylo staré médium odsáto a na buňky byly aplikovány testované látky rozpuštěné v médiu. Výsledné koncentrace testovaných látek byly 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹, 50 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹ pro MTT test; 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹

pro Real-time PCR a Western blotting. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton-X100 pro MTT test a TCDD pro Real-time PCR a Western blotting, jako negativní kontrola byl v obou případech použit DMSO. Buňky byly vystaveny testovaným látkám po dobu 24 hodin při 37 °C.

5.4 MTT test

Životaschopnost buněčné linie 22Rv1 byla po aplikaci testovaných látek hodnocena pomocí MTT testu. Po 24h inkubaci byl obsah 96 jamkové destičky vyklepnut do výlevky a zbytek média byl vysušen buničinou. Pomocí multikanálové pipety bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l roztoku MTT. Roztok byl připraven smícháním 1 ml zásobního roztoku MTT (3 mg/ml) předehřátého na 37 °C s 9 ml média. Destička byla následně umístěna na 30 minut do inkubátoru. Po ukončení inkubace byl obsah destičky znovu vyklepnut do výlevky. Vzniklé fialové krystalky redukovaného MTT byly rozpuštěny přidáním 50 μ l dimethylsulfoxidu. Absorbance roztoku byla stanovena na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 570 nm.

Stanovení životaschopnosti buněk bylo provedeno v triplikátu pro každou testovanou látku ve 3 experimentech.

5.5 Izolace RNA

Po 24 h inkubace bylo staré médium vyklepnuto do výlevky, buňky byly promyty 1 ml vychlazeného PBS. Poté byl do každé jamky aplikován 1 ml TriReagentu a pomocí škrabky byly buňky seškrabány z povrchu kultivačních destiček a přeneseny do 1,5ml plastových zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno 200 μ l chloroformu a obsah byl 1 minutu protřepáván. Poté se vzorky nechaly 7 minut odstát. Vzorky byly centrifugovány při 13 000 otáček \times min^{-1} po dobu 15 minut při 4 °C. Po centrifugaci došlo k oddělení jednotlivých fází. Z horní fáze bylo přeneseno 500 μ l každého vzorku do nových 1,5ml plastových zkumavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 500 μ l isopropanolu. Zkumavky byly zvortexovány a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly opět centrifugovány při 13000 otáček \times min^{-1} při 4 °C po dobu 13 minut. Supernatant byl odstraněn a vysrážená RNA na dně zkumavky byla promyta 1 ml 75% ethanolu vychlazeným na -20 °C. Opět byla provedena centrifugace při 13 000 otáček \times min^{-1} po dobu 5 minut při 4 °C. Supernatant byl znovu vylit a pelet promyt 1 ml 75% ethanolu. Vzorky byly opět centrifugovány při 13 000 otáček \times min^{-1} po dobu 5 minut při 4 °C. Ethanol byl vyklepnut a otevřené zkumavky

byly umístěny do termobloku vyhřátého na 65 °C na 1 minutu. Ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl vody zbavené ribonukleáz. Uzavřené zkumavky byly inkubovány 5 minut při teplotě 65 °C v termobloku. Následně byly propipetovány a zchlazeny na ledu. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop.

5.6 Reverzní transkripce

Podle naměřené koncentrace RNA byly připraveny vzorky pro reverzní transkripci tak, aby v každém vzorku o objemu 5 µl bylo přítomno 1 000 ng izolované RNA. Ke každému vzorku byl přidán 1 µl náhodných primerů (100 pmol·µl⁻¹). Vzorky byly inkubovány 5 minut při 65 °C, poté byly zchlazeny na ledu a krátce zcentrifugovány. Ke každému objemu bylo přidáno 6 µl reakční směsi (Tabulka 1). Vzorky byly opět krátce zcentrifugovány a inkubovány 1 hodinu při 42 °C. Následovala inkubace při 65 °C 10 minut. Vzorky byly po dobu 2 minut ponechány na ledu. Získaná cDNA byla 10x naředěna přidáním 108 µl vody a zvortexována.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [µl]
M-MuLV reverzní transkriptáza	0,6
Inhibitor RNáz	0,3
dNTP (10mM stock)	0,6
Reakční pufr (10x koncentrovaný)	1,2
Voda	3,3
Celkem	6

5.7 Real-time PCR

Příprava reakčních směsí pro Real-time PCR probíhala dvěma způsoby. Expres genů GAPDH, CYP1A1, CYP1B1 a KLK3 byla studována za použití sond Universal Probe Library (UPL). Směs primerů byla připravena smícháním 25 µl forward primeru (F), 25 µl reverse primeru (R) a doplněna 450 µl vody. Pro detekci exprese UBE2C, AHRR, FKBP5 a CDKN1A byly použity komerční roztoky RealTime Ready Assay obsahující jak primery, tak UPL sondu. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny dle tabulek 2 a 3. Bílá 96 jamková destička byla umístěna na led a do každé jamky bylo napipetováno 8 µl reakční směsi a 2 µl vzorku cDNA. Destička s napipetovanými vzorky byla přelepena folií a centrifugována při

1 500 otáček x min⁻¹ po dobu 3 minut. Měření probíhalo na přístroji Light Cycler. Podmínky amplifikace byly nastaveny dle Tabulky 4.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro Real-time PCR

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [μl]
Probes Master (2x koncentrovaný)	5
UPL sonda	0,2
Primery (F+R)	0,8
Voda	2
Celkem	8

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro Real-time PCR - Custom Assay

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [μl]
Probes Master (2x koncentrovaný)	5
RealTime Ready Assay (UPL sonda + primery)	0,5
Voda	2,5
Celkem	8

Tabulka 4: Podmínky pro Real-time PCR

Formát detekce	Mono color Hydrolysis Probe/UPL Probe		
Celkový objem	10 μl		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	10 minut	1
Amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
Chlazení	40	30 s	1

5.8 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Obsah 6 jamkové kultivační destičky byl po 24 h inkubace vyklepnut, promyt 1 ml vychlazeného PBS a znovu vyklepnut. Poté byl opět přidán 1 ml PBS na jamku a obsah jamek byl pomocí škrabky přemístěn do 1,5ml zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány při 3 000 otáček x min⁻¹ při 4 °C po dobu 3 minut. PBS bylo odpipetováno a k peletu bylo přidáno 50 μl lyzačního pufru. Vzorky byly propipetovány, zvortexovány, sonikovány

a následně centrifugovány při 13 000 otáček $\times \text{min}^{-1}$ při 4 °C po dobu 5 minut. Poté byl supernatant obsahující proteiny přenesen do nových 1,5ml mikrozkušavek.

Celková koncentrace proteinů byla měřena pomocí metody Bradfordové. Pro vytvoření kalibrační křivky byla použita voda a roztoky BSA o koncentraci 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jednotlivé vzorky byly měřeny v duplikátu v 96 jamkové destičce. Do každé jamky bylo k 10 μl vzorku přidáno 200 μl Bradfordova činidla. Absorbance roztoků byla změřena spektrofotometricky při vlnové délce 586 nm.

Vzorky byly připraveny tak, aby roztok o objemu 30 μl obsahoval 40 μg proteinu. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 15 μl 2x LB pufru. Vzorky byly denaturovány v termobloku po dobu 5 minut při 95 °C a zchlazeny na ledu.

5.9 SDS-PAGE

Podložní (1,5 mm) a krycí skla byla očištěna ethanolem a upevněna do stojanu. Byl připraven polyakrylamidový gel, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5. Chemikálie APS a TEMED byly přidány jako poslední těsně před nalitím gelu. Po ztuhnutí byl gel vyjmut ze stojánku a přemístěn do elektroforetické cely, která byla naplněna migračním pufrem. Do první jamky byly aplikovány 2 μl standardu molekulové hmotnosti, do dalších jamek pak 27 μl každého vzorku. Elektroforetická cela byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí, kde byl nastaven konstantní proud pro dva gely na 30 mA, který byl poté zvýšen na 60 mA.

Tabulka 5: Složení dělicího a zaostrovacího gelu pro SDS-PAGE

Reagencie	Dělicí gel (10%)	Zaostrovací gel (4%)
4x running gel buffer (Tris/HCl, pH 8,8)	2,5 ml	-
4x stacking gel buffer (Tris/HCl, pH 6,8)	-	1 ml
dH ₂ O	4,9 ml	2,56 ml
40% solution akrylamid/ bisakrylamid	2,5 ml	0,4 ml
10% roztok SDS	100 μl	40 μl
10% APS	100 μl	40 μl
TEMED	10 μl	16 μl

5.10 Western blotting a detekce proteinů

PVDF membrána byla rehydratována v methanolu, 2x po 5 minutách promyta v dH₂O a poté umístěna do transferového pufru. Proteiny byly přeneseny na membránu pomocí Semi-

dry blotovací aparatury. Přenos probíhal za konstantního proudu 380 mA po dobu 1,5 h. Po skončení přenosu byla membrána s proteiny 2x promyta v dH₂O, barvena 5 minut Ponceau S a následně opět promyta v dH₂O. Poté byla vysušena a oříznuta.

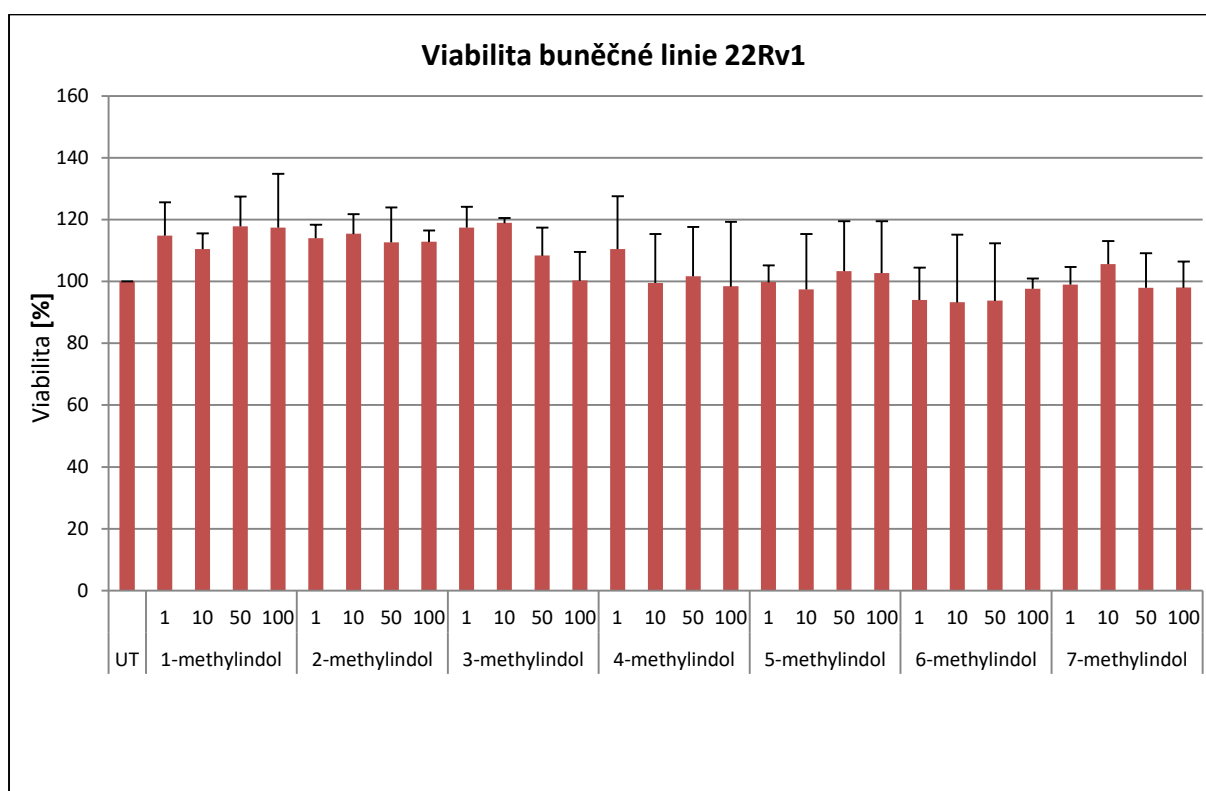
Membrána byla rehydratována v methanolu, promyta v dH₂O a umístěna do 5% roztoku nízkotučného mléka v TBS/Tween a inkubována 1 h na kývačkách. Následně byla inkubována v roztoku 5% BSA v TBS/Tween pufru s primární protilátkou přes noc na kývačce ve 4 °C. Primární protilátky pro AhR a AR byly ředěny 1:500, β-aktin 1:3000. Následující den byla membrána promyta v roztoku TBS/Tween (3x po 5 minutách). Membrána byla inkubována v 2,5% roztoku nízkotučného mléka v TBS/Tween se sekundární protilátkou 45 minut. Sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:2500. Po inkubaci byla membrána promyta v roztoku TBS/Tween (3x po 5 minutách). Následně byl připraven chemiluminiscenční substrát (luminol substrát + luminol enhancer v poměru 1:1), kterým byla membrána polita a inkubována 5 minut. Po uplynutí této doby byla membrána umístěna na skener Li-COR a byla provedena detekce.

6. Výsledky

6.1 Vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie 22Rv1

Nejprve byla stanovena viabilita buněk v přítomnosti vybraných monomethylovaných indolů. Jednalo se konkrétně o 1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol. Látky byly aplikovány v koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jejich cytotoxicita byla stanovena po 24 h inkubace pomocí MTT testu. Výsledky byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm.

Po ošetření buněk jednotlivými methylindoly nedošlo u žádné látky k poklesu viability buněk pod 90 % vůči negativní kontrole (Graf 1). Výsledky ukazují, že žádná testovaná sloučenina nemá významný cytotoxický účinek na buněčnou linii 22Rv1.

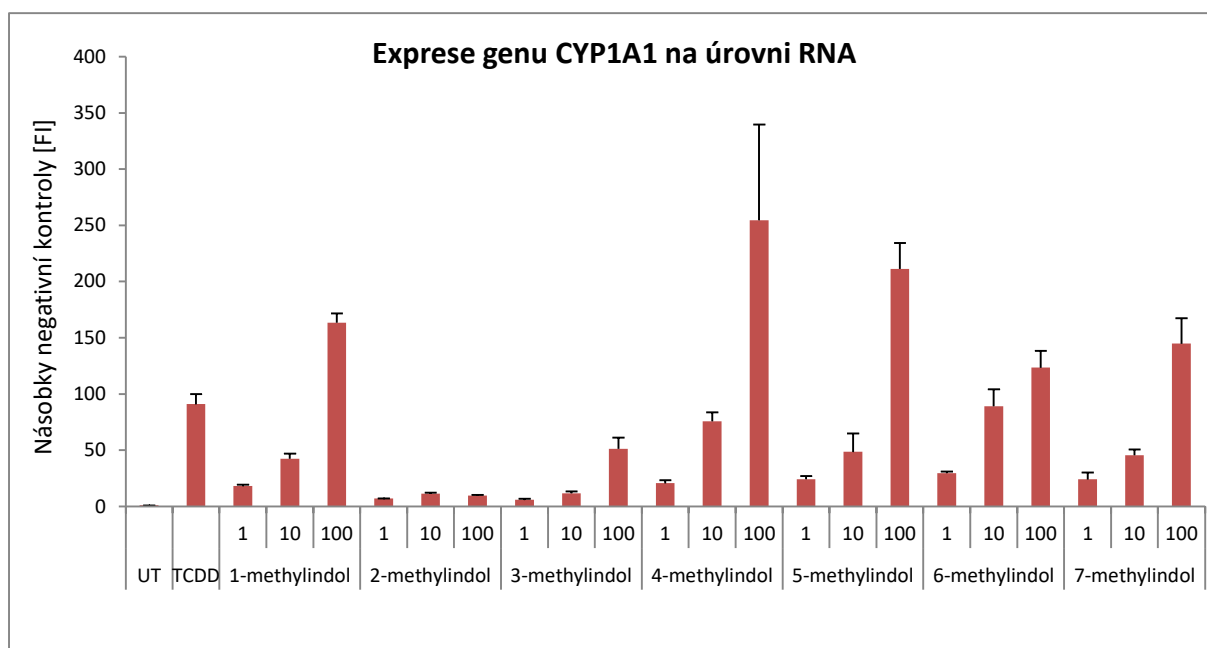


Graf 1: Viabilita buněčné linie 22Rv1 stanovená pomocí MTT testu. Buněčná linie byla inkubována s vybranými methylindoly o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 h. Výsledky jsou vztaženy k negativní kontrole UT, která představuje 100% viabilitu. Data jsou průměrem 3 nezávislých experimentů.

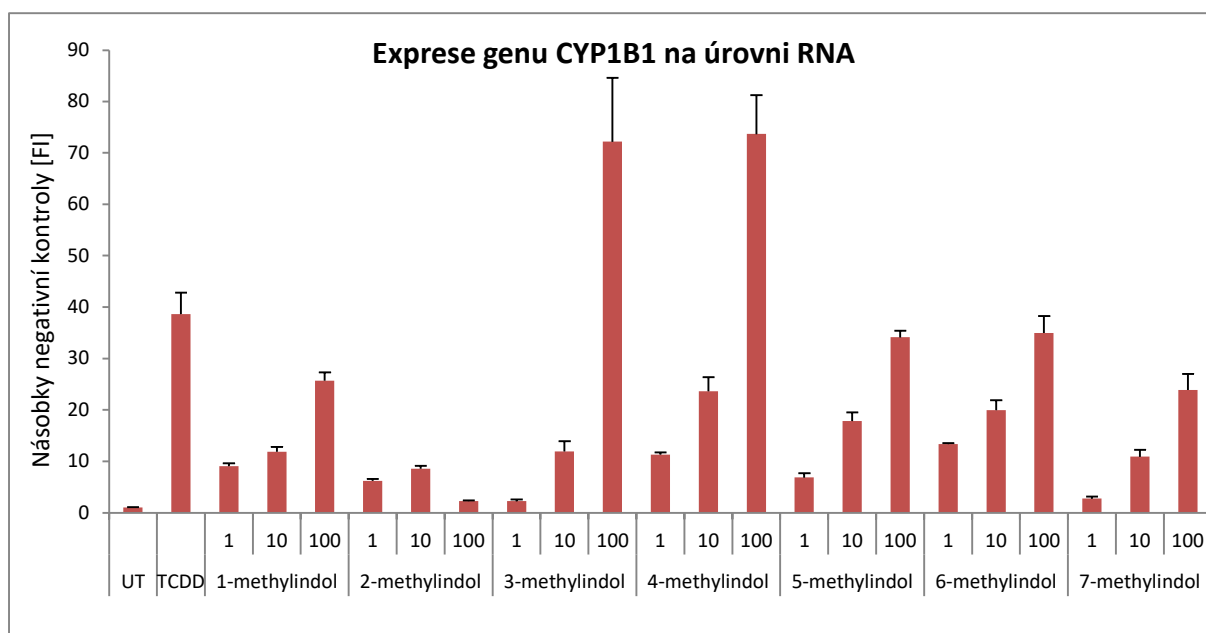
6.2 Expresa na úrovni RNA po 24 h v buněčné linii 22Rv1

Byla sledována exprese na úrovni RNA u typických cílových genů AhR - CYP1A1, CYP1B1 a AhRR. Hladina mRNA těchto genů byla stanovena pomocí RT-qPCR po 24h inkubaci buněčné linie 22Rv1 s 1-methylindolem, 2-methylindolem, 3-methylindolem, 4-methylindolem, 5-methylindolem, 6-methylindolem a 7-methylindolem o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Data jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly UT. Kvůli značné mezi-experimentální variabilitě jsou výsledky prezentovány na jednom vybraném reprezentativním experimentu.

Z grafu je patrné, že u většiny testovaných látek dochází s narůstající koncentrací ke zvyšování úrovně genové exprese CYP1A1 (Graf 2). Koncentračně závislý efekt není pozorovatelný u 2-methylindolu. U všech methylindolů kromě 2- a 3-methylindolu dosahovala indukce hodnot srovnatelných či převyšujících pozitivní kontrolu, TCDD, která byla 90 násobek (FI, fold induction) negativní kontroly.



Graf 2: Expresa genu CYP1A1 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a methylindoly o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.

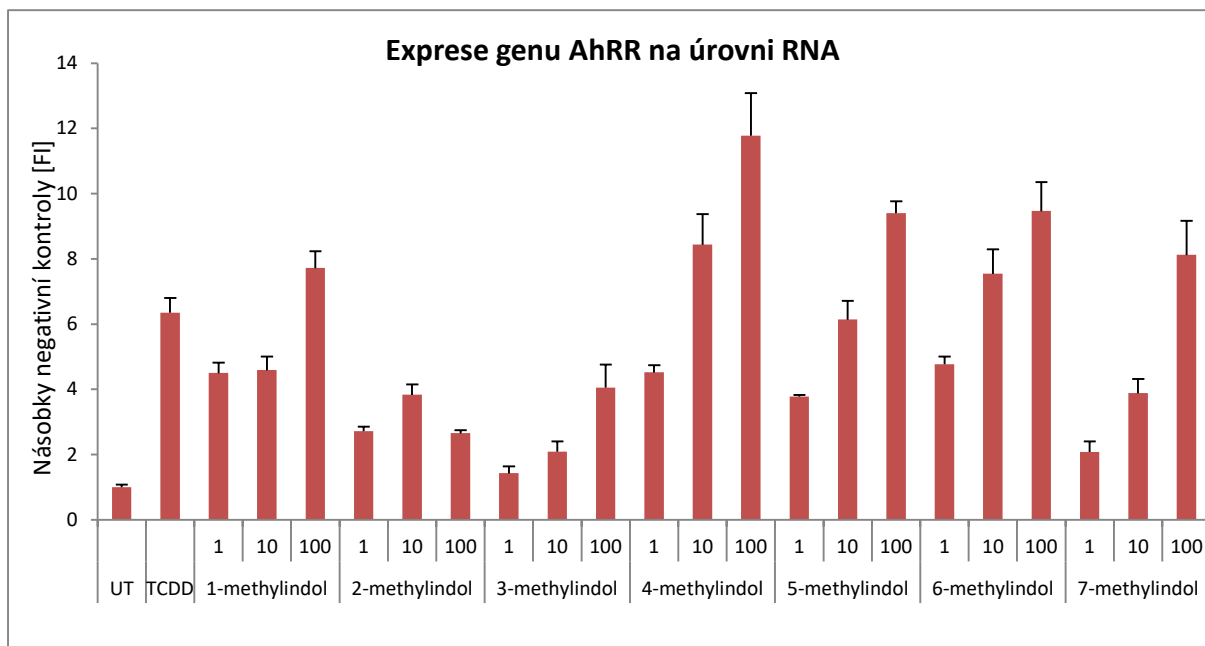


Graf 3: Expresse genu CYP1B1 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a methylindoly o koncentracích $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.

Při studiu exprese mRNA genu CYP1B1 (Graf 3) byly pozorovány podobné změny jako v případě CYP1A1. Výrazného indukčního účinku bylo dosaženo u 3- a 4-methylindolu, které intenzitou přesáhly TCDD, jehož indukce dosahovala 39 násobku oproti negativní kontrole. Indukce exprese nebyla koncentračně závislá pro 2-methylindol. Indukce 5- a 6-methylindolu při nejvyšší koncentraci dosahovala podobných hodnot jako TCDD.

Gen pro AhRR (Graf 4) vykazoval podobný expresní profil jako CYP1A1 (Graf 2), tzn. s výjimkou 2- a 3-methylindolu byly indukce pro ostatní monomethylindoly srovnatelné s TCDD.

Z výše prezentovaných dat vyplývá, že všechny indoly kromě 2-methylindolu koncentračně závisle indukují expresi genů kontrolovaných AhR.



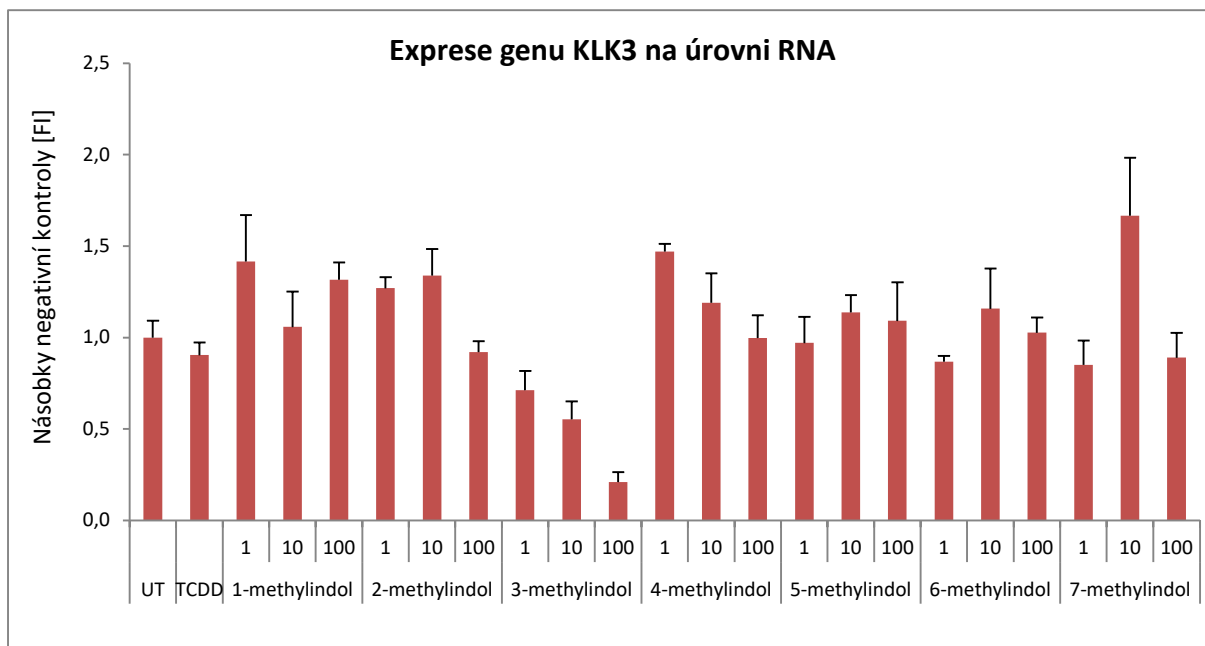
Graf 4: Expresse genu AhRR na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, 5 nmol·l⁻¹) a methylindoly o koncentracích 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.

Pomocí RT-qPCR byla také stanovena exprese genů regulovaných AR - KLK3, FKBP5, UBE2C a CDKN1A.

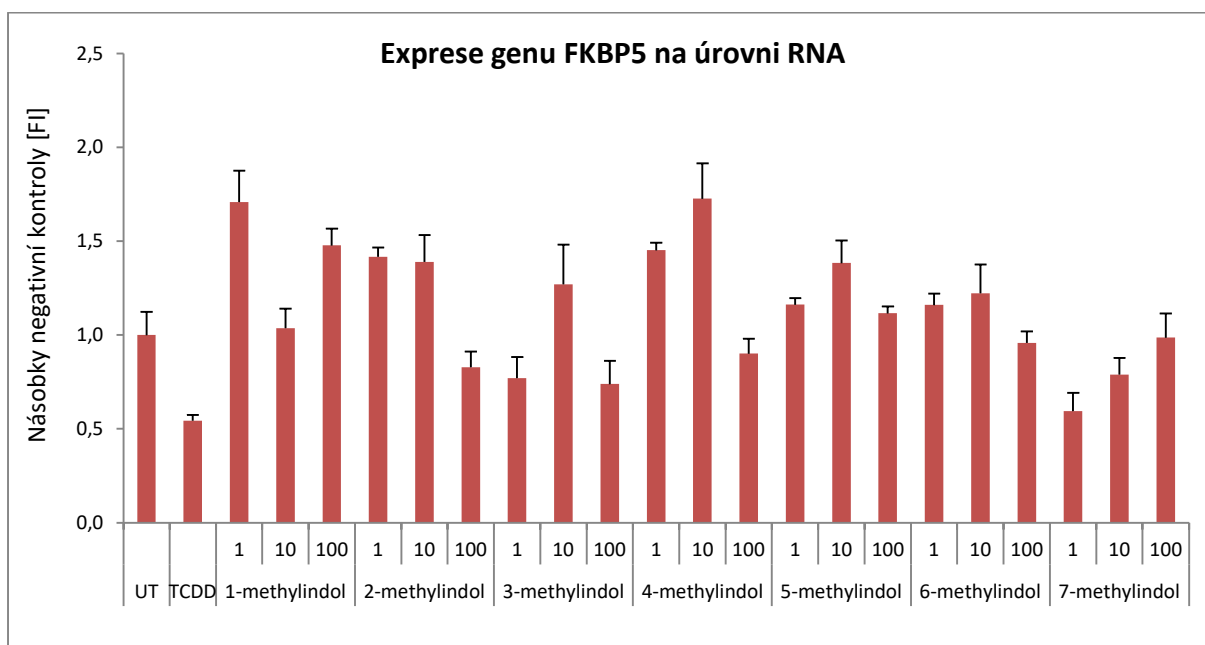
V případě mRNA genu KLK3 nebyla ve většině případů pozorována výraznější změna exprese po aplikaci methylindolů kromě 3-methylindolu, jehož použití vedlo ke koncentračně závislému poklesu exprese v rozsahu 20-80 % oproti negativní kontrole (Graf 5). Modelová látka, TCDD, jež byl použit v původní práci, kde byl poprvé účinek AhR na AR popsán (Ohtake et al., 2007) vyvolal jen mírný pokles.

Při sledování vlivu methylindolů na expresi FKBP5 (Graf 6) a UBE2C (Graf 7) bylo možné pozorovat u většiny látek pouze mírné změny v expresi mRNA. V případě genu FKBP5 se pohybovaly hodnoty indukce exprese v řádu jednotek (0,6-1,7) a v případě genu UBE2C v rozmezí 0,6-2,4 násobku negativní kontroly. Vyšší stupeň nehomogenity v expresi UBE2C byl zaznamenán pro 1- až 4-methylindol.

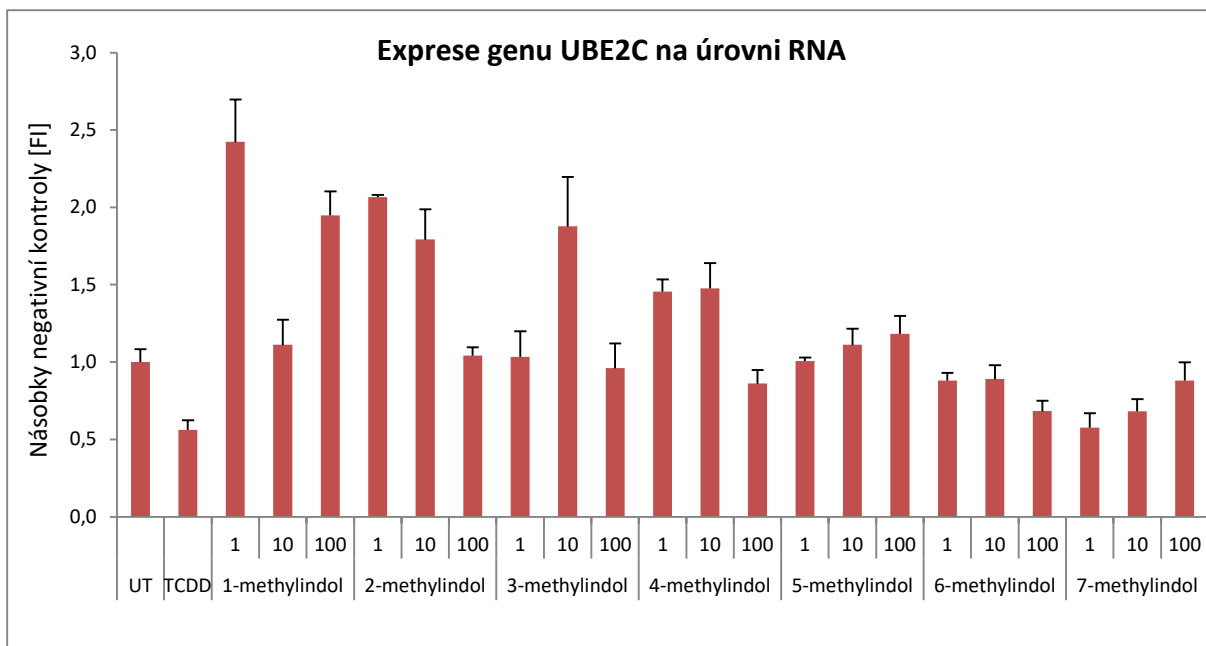
Významně koncentračně závislé zvýšení hladiny mRNA CDKN1A bylo pozorováno u 3-, 4- a 5- methylindolu (Graf 8). U 7-methylindolu došlo k mírnému snížení exprese mRNA CDKN1A u koncentrací 1 a 10 µmol·l⁻¹. Nemonotonní zvýšení exprese bylo pozorováno u 1- methylindolu. Indukce TCDD byla srovnatelná s negativní kontrolou.



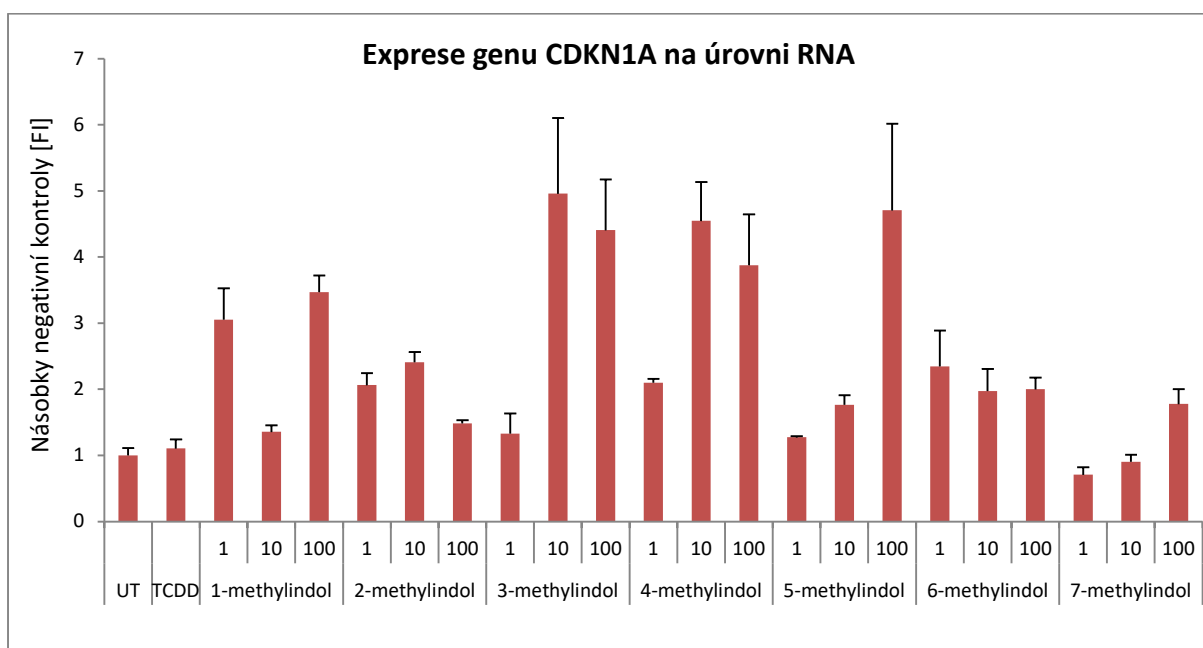
Graf 5: Expressie genu KLK3 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, 5 nmol·l⁻¹) a methylindoly o koncentracích 1 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹ a 100 μmol·l⁻¹ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.



Graf 6: Expressie genu FKBP5 na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, 5 nmol·l⁻¹) a methylindoly o koncentracích 1 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹ a 100 μmol·l⁻¹ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.



Graf 7: Expressé genu UBE2C na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, 5 nmol·l⁻¹) a methylindoly o koncentracích 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.

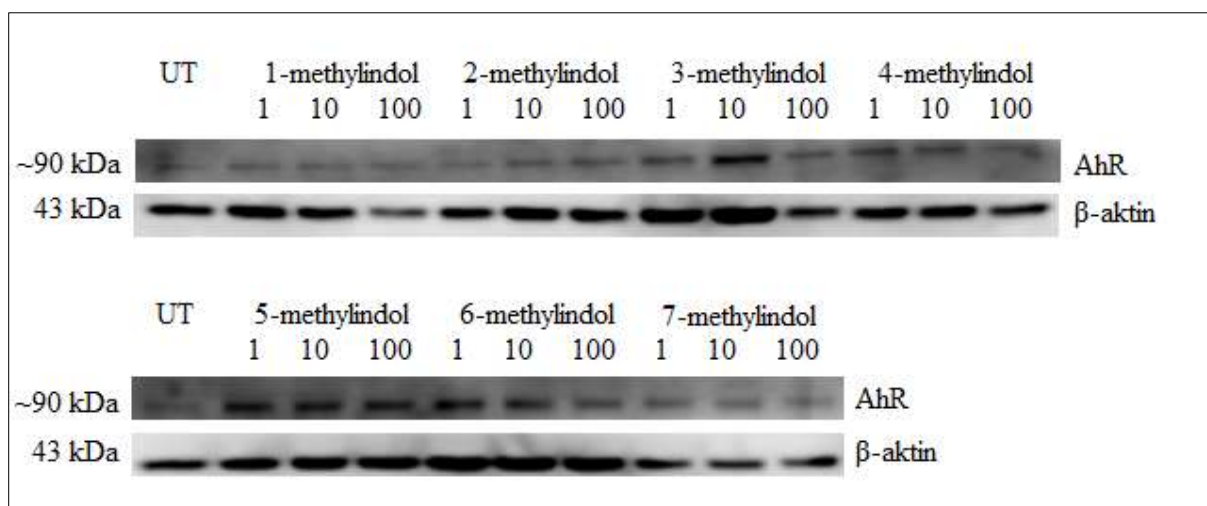


Graf 8: Expressé genu CDKN1A na úrovni RNA v buněčné linii 22Rv1 po 24 h inkubace. Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD, 5 nmol·l⁻¹) a methylindoly o koncentracích 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹ po dobu 24 h. Data byla normalizována na expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy) jako housekeeping genu a jsou vyjádřena jako násobky negativní kontroly - FI.

6.3 Exprese na úrovni proteinu po 24 h v buněčné linii 22Rv1

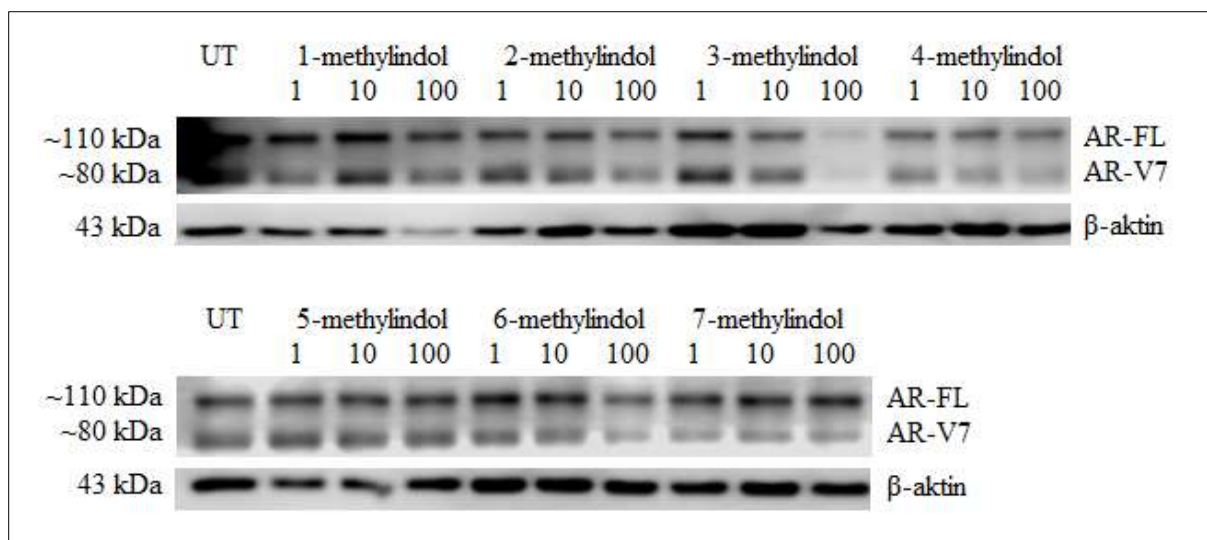
Po stanovení exprese na úrovni RNA byly pomocí Western blottingu detekovány hladiny proteinů. Na úrovni proteinu byla sledována exprese AhR a AR. Bylo sledováno působení 1-methylindolu, 2-methylindolu, 3-methylindolu, 4-methylindolu, 5-methylindolu, 6-methylindolu a 7-methylindolu o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky jsou prezentovány na jednom vybraném experimentu z šesti detekcí.

Při sledování hladin exprese na úrovni proteinu AhR (~90 kDa) bylo pozorováno mírné zvýšení množství proteinu u 5-methylindolu ve všech jeho koncentracích (Obr. 7). Ostatní methylindoly neměly žádný významný účinek na hladinu proteinu.



Obrázek 7: Reprezentativní western blot detekce AhR v buněčné linii 22Rv1. Buněčná linie byla inkubována 24 h s negativní kontrolou UT (roztok DMSO) a monomethylindoly o koncentracích 1, 10 a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Detekován byl AhR, jehož molekulová hmotnost byla odhadnuta na 90 kDa. Pro verifikaci byla provedena detekce β -aktinu (43 kDa).

Protein AR byl detekován ve dvou verzích. Ve variantě AR-FL, jehož molekulová hmotnost byla odhadnuta na 110 kDa a jeho zkrácené verzi AR-V7 o molekulové hmotnosti 80 kDa (Obr. 8). Při použití 3-methylindolu při koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo ke snížení množství proteinu v obou jeho variantách. V ostatních případech nebyla pozorována žádná výrazná změna.



Obrázek 8: Reprezentativní western blot detekce AR v buněčné linii 22Rv1. Buněčná linie byla inkubována 24 h s negativní kontrolou UT (roztok DMSO) a monomethylindoly o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Detekovány byly dvě varianty AR, jejichž molekulová hmotnost byla odhadnuta na 80 a 110 kDa. Pro verifikaci byla provedena detekce β -aktinu (43 kDa).

7. Diskuze

Tato diplomová práce se zabývá aktivací AhR monomethylindoly a následným ovlivněním AR a jeho sestříhové varianty na úrovni cílových genů a samotného proteinu. AhR je ligand-dependentní transkripční faktor, který se podílí na regulaci několika genů, včetně genů pro enzymy metabolizující xenobiotika, jako jsou isoformy cytochromu P450 1A1 a 1B1. Kromě toho bylo prokázáno, že AhR moduluje funkce jiných transkripčních faktorů. Novou roli AhR jako ligand-dependentní ubikvitin E3 ligázy, která asociuje s estrogenovými nebo androgenními receptory (ER α a AR) a podporuje jejich proteolýzu, popsal ve své studii Ohtake *et al.* (Ohtake *et al.*, 2007).

Autoři použili prostatickou buněčnou linii LNCaP, která byla inkubovaná po dobu 3 h v přítomnosti/ nepřítomnosti DHT (10 nmol \cdot l $^{-1}$), 3MC (1 μ mol \cdot l $^{-1}$) a MG132 (10 μ mol \cdot l $^{-1}$). Při aktivaci AhR pomocí 3MC bylo pozorováno drastické snížení hladin proteinu AR beze změn na úrovni mRNA pro AR. Ostatní agonisté AhR (konkrétně β -naftoflavon (β -NF, 1 μ mol \cdot l $^{-1}$), látky znečišťující životní prostředí jako jsou TCDD (10 nmol \cdot l $^{-1}$) a benzo[a]pyren (100 nmol \cdot l $^{-1}$) a endogenní metabolit indirubin (10 nmol \cdot l $^{-1}$) byli podobně účinní při degradaci proteinů AR. Degradace indukovaná ligandem AhR a funkční represe pohlavních steroidních receptorů byla zrušena v přítomnosti inhibitoru proteazomu MG132 (10 μ mol \cdot l $^{-1}$) (Ohtake *et al.*, 2007).

Bylo prokázáno, že účinek expozice TCDD (10 μ mol \cdot l $^{-1}$) na aktivitu AhR a AR byl rozdílný v buňkách androgen-senzitivních (LNCaP) a androgen-rezistentních (C4-2). AhR i AR proteiny byly rezistentní na degradaci po expozici TCDD v buňkách C4-2. Naproti tomu TCDD indukoval jadernou lokalizaci androgenního receptoru a expresi KLK3 v buňkách LNCaP. Tato indukce byla doprovázena sníženou hladinou AhR a AR proteinu. Buňky citlivé na androgeny mají podstatně více cytoplazmatického komplexu AhR než buňky androgen rezistentní (C4-2). To může být příčina rozdílných odpovědí na expozici TCDD (Ghotbaddini *et Powell*, 2015).

Rakovina prostaty je jedním z nejčastějších typů rakoviny u mužů. Růst prostaty je závislý na androgenech, které aktivují androgenní receptor v nádorových buňkách (Denmeade *et al.*, 1996). AR tak hraje klíčovou roli ve vývoji PC a proto může být downregulace AR účinným prostředkem k léčbě PC a to i ve fázi CRPC.

U přírodní látky icaritinu a léčiva karbidopy bylo prokázáno, že tyto látky mohou inhibovat růst AR-pozitivních buněk PC degradací proteinů AR a AR-V7 přes AhR-zprostředkovanou proteazomální degradaci (Sun *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2020). Studie Sun

et al. sledovala, zda icaritin může ovlivnit stabilitu AR a AR-V7. Experimenty byly prováděny v buněčných liniích LNCaP (androgen-senzitivní) a C4-2, CWR22Rv1 (androgen-rezistentní) v přítomnosti 10 nmol·l⁻¹ DHT pro LNCaP nebo v CSS (charcoal stripped serum) s 1 nmol·l⁻¹ DHT pro C4-2 a CWR22Rv1 nebo pouze v CSS. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO. Buňky byly vystaveny působení icaritinu o koncentracích 10, 30 a 50 μmol l⁻¹ po dobu 24 h. Hladiny proteinů byly následně detekovány pomocí Western blottingu. Ve všech případech došlo k poklesu hladin proteinu AR a AR-V7, k výraznému poklesu došlo i u PSA a UBE2C (Sun *et al.*, 2015). Snížená hladina proteinu AR a PSA byla pozorována také v buněčné linii LNCaP po 24h inkubaci s karbidopou o koncentracích 10, 50 a 100 μmol·l⁻¹ (Chen *et al.*, 2020).

V předkládané diplomové práci bylo sledováno, zda podobné výsledky nebudou pozorovatelné i u monomethylindolů. K tomuto účelu byla použita adherentní buněčná linie lidského karcinomu prostaty 22Rv1. Jako pozitivní kontrola byl použit modelový ligand AhR, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Vybrány byly 1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol o různých koncentracích (1 μmol·l⁻¹, 10 μmol·l⁻¹ a 100 μmol·l⁻¹). Některé z těchto látek, konkrétně 4-methylindol a 6-methylindol byly popsány jako nejúčinnější agonisté AhR v reportérové linii hepatocelulárního karcinomu (Stepankova *et al.*, 2018). Bylo prokázáno, že skatol (3-methylindol), produkt bakteriální fermentace tryptofanu ve střevě, je parciálním agonistou lidského AhR a induktorem CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 v lidských buněčných liniích a hepatocytech (Rasmussen *et al.*, 2016, Stepankova *et al.*, 2018, Vyhlídalová *et al.*, 2020).

Buněčná linie 22Rv1 ošetřená monomethylindoly vykazovala koncentračně závislé zvýšené hladiny mRNA cílových genů AhR, což značí jeho aktivaci. Většina testovaných látek výrazně indukovala genovou expresi CYP1A1, CYP1B1 a AhRR. Koncentračně závislý efekt nebyl pozorovatelný u 2-methylindolu. V případě mRNA genu CYP1A1 bylo pozorováno nejvýraznější zvýšení hladin mRNA u 1-, 4-, 5-, 6- a 7-methylindolu. V tomto bodě moje výsledky korespondují (snad s výjimkou 1-methylindolu) s daty z linií LS180 (Stepankova *et al.*, 2018) a HepaRG (Vyhlídalová *et al.*, 2019) a to i přes to, že jsem použila nižší koncentrace monomethylindolů.

Prostatický specifický antigen (PSA), také známý jako kallikrein-3 (KLK3), je téměř výhradně produkován buňkami prostaty. V současnosti je klinicky nevýznamnějším markerem karcinomu prostaty (Penney *et al.*, 2011). V případě mRNA genu KLK3 byla pozorována výrazná změna u 3-methylindolu, jehož použití vedlo ke koncentračně závislému poklesu exprese (Graf 5). Při sledování vlivu methylindolů na expresi FKBP5 a UBE2C

nebyla pozorována u většiny látek výrazná změna v expresi mRNA. CDKN1A (inhibitor cyklin-dependentních kináz 1A), hraje důležitou roli v řízení progresu buněčného cyklu a může se podílet na p53/TP53 zprostředkované inhibici buněčné proliferace v reakci na poškození DNA (Bianco *et al.*, 2014). Navíc, jeho exprese je rovněž regulována androgenním receptorem (Lu, *et al.*, 2000). Významně koncentračně závislé zvýšení hladiny mRNA genu CDKN1A bylo pozorováno u 3-, 4- a 5- methylindolu (Graf 8). To by mohlo naznačovat genotoxický účinek daných indolů.

U buněčné linie 22Rv1 bylo na úrovni proteinu zaznamenáno výraznější snížení proteinu AR pouze při ošetření buněk 3-methylindolem. U proteinu AhR byl prokázán mírný nárůst hladin proteinu pouze u 5-methylindolu.

Výsledky tak naznačují, že kromě 3-methylindolu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ neměly ostatní monomethylindoly výrazný vliv na expresi proteinu AR a AhR v buněčné linii 22Rv1. 3-methylindol aktivuje AhR a je možné, že ten následně vytváří komplex CUL4^{AhR} , který cílí na AR a následně podporuje jeho degradaci. Toto však bude třeba potvrdit v následných studiích. Jedinou další známou sloučeninou s indolovým skeletem, která snižovala množství proteinu AR je indirubin a to v podstatně nižší koncentraci ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a v buněčné linii LNCaP (Othake *et al.*, 2007). Pro potvrzení získaných výsledků by bylo vhodné provést další experimenty s adekvátní koncentrací DHT, který aktivuje a stabilizuje AR, popřípadě použít jinou nádorovou prostatickou buněčnou linii, protože jak naznačují nejen moje výsledky, ale i výsledky jiných autorů (Ghotbaddini *et Powell*, 2015), je vliv ligandů AhR na stabilitu a aktivitu AR značně závislý na konkrétní linii.

8. Závěr

V této diplomové práci bylo sledováno, zda aktivace AhR monomethylindoly povede k ovlivnění aktivity AR na úrovni cílových genů a samotného proteinu v nádorové prostatické buněčné linii 22Rv1. Konkrétně se jednalo o 1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol a 7-methylindol o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V experimentální části byly pomocí RT-qPCR stanoveny hladiny transkriptů vybraných cílových genů AhR a AR po 24h inkubaci s vybranými methylindoly. Většina methylindolů s narůstající koncentrací indukovala expresi mRNA cílových genů AhR - CYP1A1, CYP1B1 a AhRR. Koncentračně závislý efekt nebyl pozorovatelný u 2-methylindolu. Při sledování genů regulovaných AR byly u většiny methylindolů pozorovány pouze mírné změny v expresi mRNA. Výraznější pokles exprese byl zaznamenán po aplikaci 3-methylindolu u genu KLK3, kdy došlo ke snížení hladiny mRNA o 20-80 % oproti negativní kontrole.

Následně byly pomocí Western blottingu stanoveny hladiny proteinů AhR a AR. Na úrovni proteinu AhR bylo pozorováno pouze mírné zvýšení množství proteinu u 5-methylindolu ve všech jeho koncentracích. U proteinu AR došlo po aplikaci 3-methylindolu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ke snížení množství proteinu AR v obou jeho variantách. V ostatních případech nebyla pozorována žádná výrazná změna. Výsledná data naznačují schopnost 3-methylindolu ovlivnit aktivitu a stabilitu AR.

9. Literatura

- Bahrke M.S., Yesalis C.E. (2004): Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol.*614–620
- Bansal T., Alaniz R.C., Wood T.K., Jayaraman A. (2010): The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*107(1):228-233
- Beedanagari S.R., Taylor R.T., Feng Wang P.B., Nickerson D.W., Hankinson O (2010): Role of Epigenetic Mechanisms in Differential Regulation of the Dioxin-Inducible Human CYP1A1 and CYP1B1 Genes. *Mol Pharmacol.* 78(4): 608–616
- Beischlag T.V., Morales J.L., Hollingshead B.D., Perdew G.H. (2008): The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 18(3): 207–250.
- Berrevoets C.A., Umar A., Brinkmann A.O. (2002): Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. *Molecular and Cellular Endocrinolog.* vol. 198, no. 1–2, pp 97-103
- Bersten D.C., Sullivan A.E., Peet D.J., Whitelaw M.L.(2013): bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 13:827–841.
- Bianco S., Jangal M., Garneau D. a Gévry N. (2014): LRH-1 controls proliferation in breast tumor cells by regulating CDKN1A gene expression. *Oncogene.* vol. 34, p 4509–4518
- Bousset L., Rambur A., Fouache A., Bunay J., Morel L., Lobaccaro J.A., Baron S., Trousson A., de Jousineau C. (2018): New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and Specific Role of Liver X Receptors. *Int. J. Mol. Sci.*19:2545
- Brown C.J., Goss S.J., Lubahn D.B., Joseph D.R., Wilson E.M., French F.S. (1989): Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11–12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet.* 44: 264–9

- Burbach K.M., Poland A., Bradfield C.A. (1992): Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:8185–9
- Busbee P.B., Rouse M., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2013): Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev*.71(6): 353–369
- Cao B., Qi Y., Zhang G., Xu D., Zhan Y., Alvarez X. (2014): Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget*.5:1646–1656
- Davies T.H., Ning Y.M., Sanchez E.R. (2002): A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem*. 277:4597–4600
- Dehm S.M., Tindall D.J. (2011): Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer*. 18:R183–96
- Denison M.S., Soshilov A.A., He G., Degroot D.E., Zhao B. (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological Sciences*. vol. 124, no. 1, pp. 1–22
- Denmeade S.R., Lin X.S., Isaacs J.T. (1996): Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*. 28: 251–65
- DiNatale B.C., Murray I.A., Schroeder J.C., Flaveny C.A., Lahoti T.S., Laurenzana E.M., Omiecinski C.J., Perdew G.H. (2010): Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences*. vol. 115, no. 1, pp. 89–97
- Ema M., Matsushita N., Sogawa K., Ariyama T., Inazawa J., Nemoto T., Ota M., Oshimura, M., Fujii-Kuriyama Y. (1994): Human arylhydrocarbon receptor: functional expression and chromosomal assignment to 7p21. *J Biochem*. 116,845-51
- Evans W.C., Richard W., Handley C., Happold F.C. (1941): The tryptophanase-indole reaction: Some observations on the production of tryptophanase by *Esch. coli*; in

particular the effect of the presence of glucose and amino acids on the formation of tryptophanase. *Biochem J.* 35(1-2):207-12

Fernandez-Salguero P.M., Ward J.M., Sundberg J.P., Gonzalez F.J. (1997): Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol.* 34(6): p. 605-14.

Fragkaki A.G., Angelis Y.S., Koupparis M., Tsantili-Kakoulidou A., Kokotos G., Georgakopoulos C. (2009): Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* 74:172–197

Freedman L.P. (1998): *Molecular biology of steroid and nuclear hormone receptors.* Birkhauser, Boston, MA

Frey M., Stettner C., Pare P.W., Schmelz E.A., Tumlinson J.H., Gierl A. (2000): An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(26):14801-14806

Fukunaga B.N., Probst M.R., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. (1995): Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* 270:29270–8

Gao W., Bohl C.E., Dalton J.T. (2005): Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem Rev.* 105(9): 3352–3370

Hahn M.E., Allan L.A., Sherrb D.H. (2009): Regulation of Constitutive and Inducible AHR Signaling: Complex Interactions Involving the AHR Repressor. *Biochem Pharmacol.* 77(4): 485–497

Hancock R.E. Nijnik A., Philpott D.J. (2012): Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 243–254

Hankinson O. (2005): Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 433(2):379-86

Hardy D.O., Scher H.I., Bogenreider T., Sabbatini P., Zhang Z.F., Nanus D.M., Catterall J.F. (1996): Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4400–4405

- Harris W.P., Mostaghel E.A., Nelson P.S., Montgomery B. (2009): Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 6, 76–85
- He L., Fang H., Chen C., Wu Y., Wang Y., Ge H., Wang L., Wan Y., He H. (2020): Metastatic castration-resistant prostate cancer: Academic insights and perspectives through bibliometric analyses. *Medicine*.99:e19760
- Heinlein C.A., Chang C. (2002): Androgen Receptor (AR) Coregulators. *Endocr. Rev.* 23:175
- Heinlein C.A., Chang C. (2004): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 25: 276–308
- Helsen C., Van den Broeck T., Voet A., Prekovic S., Van Poppel H., Joniau S., Claessens F. (2014): Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer*.21:T105–T118
- Hooper L.V., Gordon J.I. (2001): Commensal host– bacterial relationships in the gut. *Science.* 292:1115–1118
- Hsing A.W., Gao Y.T., Wu G, Wang X., Deng J., Chen Y.L., Sesterhenn I.A., Mostofi F.K., Benichou J., Chang C. (2000): Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res.*5111–5116
- Hu R., Dunn T.A., Wei S., Isharwal S., Veltri R.W., Humphreys E., Han M., Partin A.W., Vessella R.L., Isaacs W.B., G. Bova S., Luo J. (2009): Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.*69:16–22
- Hu R., Isaacs W.B., Luo J. (2011): A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate.* 71, 1656– 1667
- Hu R., Lu C., Mostaghel E., Yegnasubramanian S., Gurel M., Tannahill C. (2012): Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen

receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 72:3457–3462

Hu W., Sorrentino C., Denison M.S., Kolaja K., Fielden M.R. (2007): Induction of Cyp1a1 Is a Nonspecific Biomarker of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation: Results of Large Scale Screening of Pharmaceuticals and Toxicants in Vivo and in Vitro. *Molecular Pharmacology.* 71 (6) 1475-1486

Hubbard T.D, Murray I.A., Perdew G.H. (2015): Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug metabolism and disposition.* 43:1522–1535

Hughes D.T. et Sperandio V. (2009): Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 6(2): 111–120

Chen S., Beaton D., Nguyen N., Senekeo-Effenberger K., Brace-Sinnokrak E., Argikar U., Rimmel R.P., Trottier J., Barbier O., Ritter J.K, Tukey R.H. (2005): Tissue-specific, inducible, and hormonal control of the human UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) locus. *J Biol Chem.* 280,37547-57

Chen Y., Clegg N.J., Scher H.I. (2009): Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *The Lancet. Oncology.* 10(10), 981–991

Chen Z., Cai A., Zheng H., Huang H., Sun R., Cui X., Ye W., Yao Q., Chen R., Kou L. (2020): Carbidopa suppresses prostate cancer via aryl hydrocarbon receptor-mediated ubiquitination and degradation of androgen receptor. *Oncogenesis.* 9, 49

Chi K.N., Agarwal N., Bjartell A., Chung B.H., Pereira de Santana Gomes A.J., Given R., Soto A.J., Merseburger A.S., Özgüroglu M., Uemura H., Ye D., Deprince K., Naini V., Li J., Cheng S., Yu M.K., Zhang K., Larsen J.S., McCarthy S., Chowdhury S., (2019): Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 381:13–24

Chimerel C., Emery E., Summers D.K., Keyser U., Gribble F.M., Reimann F. (2014) Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. *Cell Reports.* 9, 1202–1208

- Jernberg E., Bergh A., Wikstrom P. (2017): Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocr Connect* . 6(8): R146–R161
- Joshua K., Gerhard C. (2004): Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *Journal of cellular biochemistry*. 93(2):233-41
- Kaixi Z., Meng Q., Zhi Z., Tao Y., Yuan H., Jing Z., Wei L. (2019): Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy. *Molecular Medicine Reports*. 20(6):4763-4773
- Kang C.B., Hong Y., Dhe-Paganon S., Yoon H.S. (2008): FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*. 16:318–325
- Keller E.T., Ershler W.B., Chang Ch. (1996): The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Frontiers in Bioscience*. 1, d59-71
- Knudsen K.E., Scher H.I. (2009): Starving the addiction: new opportunities for durable suppression of AR signaling in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 15:4792–8
- Kuiper G.G.J.M., de Ruiter P.E., Trapman J., Boersma W.J.A., Grootegoed J.A., Brinkman A.O. (1993): Localization and hormonal stimulation of phosphorylation sites in the LNCaP cell androgen receptor. *Biochem J*. 291:95–101
- La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K.H. (1991): Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 352:77–79
- Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. (2018): AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 7: 1–9
- Lee J-H, Wood T.K., Lee J. (2015): Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends in Microbiology*. Volume 23, ISSUE 11, P707-718
- Li L., Lou Z., Wang L. (2011): The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *Br J Cancer*. 104(1): 19–23

- Li Y., Chan S.C., Brand L.J., Hwang T.H., Silverstein K.A., Dehm S.M. (2013): Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.*73:483–489
- Lin H.K., Wang L., Hu Y.C., Altuwaijri S., Chang C. (2002): Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *The EMBO J.* 21:4037-4048
- Lin H-K, Yeh S., Kang H-Y, Chang C. (2001): Akt supresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:7200–7205
- Lin J., Raoof D.A., Wang Z., Lin M.Y., Thomas D.G., Greenson J.K., Giordano T.J., Orringer M.B., Chang A.C., Beer D.G., Lin L. (2006): Expression and effect of inhibition of the ubiquitin-conjugating enzyme E2C on esophageal adenocarcinoma. *Neoplasia.* 8:102–1071
- Lin T.T., Chen Y.H., Wu Y.P., Chen S.Z., Li X.D., Lin Y.Z., Chen S.H., Zheng Q.S., Wei Y., Xu N., Xue X-Y. (2019): Risk factors for progression to castration-resistant prostate cancer in metastatic prostate cancer patients. *J. Cancer.*10:5608–5613
- Liu G., Sprenger C., Wu P-J., Sun S., Uo T., Haugk K., Epilepsia K.S., Plymate S. (2015): MED1 mediates androgen receptor splice variant induced gene expression in the absence of ligand. *Oncotarget.* 6:288-304
- Lu S., Jenster G., Epner D.E. (2000): Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. *Mol Endocrinol.* 14(5):753-60
- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S., Wilson E.M. (1988): Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science.* 240:327
- Luecke-Johansson S., Gralla M., Rundqvist H., Caifeng Ho J., Johnson R.S., Gradin K., Poellinger L. (2017): A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol.* 37(13): e00630-16

- MacLean H.E., Chu S., Warne G.L., Zajac J.D. (1993): Related individuals with different androgen receptor gene deletions. *J Clin Invest.* 91:1123–8
- Mangelsdorf D.J, Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995): The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell.* 83(6): 835–839
- Marlowe J.L. a Puga A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 96(6): p. 1174-84
- Masiello D., Cheng S., Bubley G.J., Lu M.L., Balk S.P. (2002): Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J. Biol. Chem.* 277:26321–26326
- McEwan I.J. (2004): Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer.* 11: 281–93
- Mearini L., Zucchi A., Nunzi E., Villirillo T., Bini V., Porena M. (2013): Low serum testosterone levels are predictive of prostate cancer. *World J. Urol.*31:247–252
- Merseburger A.S., Haas G.P., Klot C.A. (2015): An update on enzalutamide in the treatment of prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.*7:9–21
- Messner E.A., Steele T.M., Tsamouri M.M., Hejazi N., Gao A.C.,Mudryj M., Ghosh P.M. (2020): The Androgen Receptor in Prostate Cancer: Effect of Structure, Ligands and Spliced Variants on Therapy. *Biomedicines.* 8(10): 422
- Migeon B.R., Brown T.R., Axelman J., Migeon C.J. (1981): Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 6339–43
- Miller W.L. (1988): *Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis.* *Endocr. Rev.* 9:295
- Mimura J., Ema M., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. (1999): Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13(1): 20–25

- Nan Z. (2011): The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *J Cardiovasc Dis Res.* 2(2): 91–95
- Nguyen L.P. a Bradfield C.A. (2008): The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem Res Toxicol.* 21(1): 102–116
- O'Driscoll C. A. a Mezrich J. D. (2018): The Aryl Hydrocarbon Receptor as an Immune-Modulator of Atmospheric Particulate Matter-Mediated Autoimmunity. *Frontiers in Immunology.* 9:2833
- Ogura J., Miyauchi S., Shimono K., Yang S., Gonchigar S., Ganapathy V., Bhutia J.D. (2017): Carbidopa is an activator of aryl hydrocarbon receptor with potential for cancer therapy. *Biochem J.* 474 (20): 3391–3402
- Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2007): Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature.* 446:562–566
- Ohtake F., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2009): AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochemical Pharmacology.* 474-484
- Park K.T., Mitchell K.A., Huang G., Elferink C.J. (2005): The Aryl Hydrocarbon Receptor Predisposes Hepatocytes to Fas-Mediated Apoptosis. *Molecular Pharmacology.* 67 (3) 612-622
- Pastuszak A.W., Rodriguez K.M., Nguyen T.M., Khera M. (2016): Testosterone therapy and prostate cancer. *Transl. Androl. Urol.* 5:909–920
- Penney K.L., Schumacher F.R., Kraft P., Mucci L.A., Sesso H.D., Ma J., Niu Y., Cheong J.K., Hunter D.J., Stampfer M.J., Hsu S.I. (2011): Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis.* 32(6): 853–859
- Poland A., Knutson J.C.(1982): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:517–554
- Pratt W.B., Toft D.O. (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306

- Rasmussen M.K., Balaguer P., Ekstrand B., Daujat-Chavanieu M. a Gerbal-Chaloin S. (2016): Skatole (3-methylindole) is a partial aryl hydrocarbon receptor agonist and induces CYP1A1/2 and CYP1B1 expression in primary human hepatocytes. *PLOS One* 11:e0154629
- Rana K., Davey R.A., Zajac J.D. (2014): Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl.* 16:169–77
- Rannug A., Rannug U., Rosenkranz H.S., Winqvist L., Westerholm R., Agurell E., Grafström A.K. (1987): Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem.* 262:15422–15427
- Rodriguez-Vida A., Galazi M., Rudman S., Chowdhury S., Sternber C.N. (2015): Enzalutamide for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Des. Dev. Ther.*9:3325–3339
- Rosner W., Hryb D.J., Khan M.S., Nakhla A.M., Romas N.A. (1991): Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40: 813–20
- Seeberger L.C.et Hauser R.A. (2009): Levodopa/carbidopa/entacapone in Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 9:7, 929-940
- Shen E.S. a Whitlock J. P. Jr. (1992): Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem.* 267:6815–6819
- Schmidt J.V., Bradford C.A.(1996): Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:55-89
- Soshilov A. a Denison M.S. (2008): Role of the Per/Arnt/Sim Domains in Ligand-dependent Transformation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem.* 283(47): 32995–33005
- Stepankova M., Bartonkova I., Jiskrova E., Vrzal R., Mani S., Kortagere S., Dvorak Z. (2018): Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology.* 93 (6) 631-644

- Stevens E.A., Mezrich J.D., Bradfield C.H.A. (2009): The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 127(3): 299–311
- Stockinger B., Hirota K., Duarte J., Veldhoen M. (2011): External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Seminars in Immunology*. vol. 23, no. 2, pp. 99–105
- Sun F., Indran I.R., Zhang Z.W., Tan M.H.E., Li Y., Lim Z.L.R., Hua R., Yang C.H., Soon F-F., Li J., Xu H.E., Cheung E., Yong E-L. (2015): A novel prostate cancer therapeutic strategy using icaritin-activated arylhydrocarbon-receptor to co-target androgen receptor and its splice variants. *Carcinogenesis*. 36(7): 757–768
- Tan M., Li J., Xu H., Melcher K., Yong E. (2015): Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 36, 3–23
- Tao Y, Jinxia W, Kaixi Z, Yaoliang T, Shian H, Xiaorong S, Yuanlin D, Can C, Wei L (2018): Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research Internationa*. 2018:6058784
- Tavassoli (2009): Androgen Receptor Modulation by non-Androgenic Factors and the Basal Transcription Factor TAF1.
- Thomas C., Wafa L.A., Lamoureux F., Cheng H., Fazli L., Gleave M.E., Rennie P.S. (2012): Carbidoopa enhances antitumoral activity of bicalutamide on the androgen receptor-axis in castration-resistant prostate tumors. *Prostate*. 72, 875–885
- Veldhoen M., Hirota K., Westendorf A.M., Buer J., Dumoutier L., Renauld J.C., Stockinger B. (2008): The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 453:106–109
- Vyhlídalová B., Krasulová K., Pečinková P., Marcalíková A., Vrzal R., Zemánková L., Vančo J., Trávníček Z., Vondráček J., Karasová M., Mani S., Dvořák Z. (2020): Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci*. 21(7): 2614
- Vyhlídalová B., Poulíková K., Bartoňková I., Krasulová K., Vančo J., Trávníček Z., Mani S., Dvořák Z. (2019): Mono-methylindoles induce CYP1A genes and inhibit CYP1A1 enzyme activity in human hepatocytes and HepaRG cells. *1; 313: 66–76*

Wall R.J, He G., Denison M.S., Congiu C., Onnis V., Fernandes A., Bell D.R., Rose M., Rowlands J.C., Balboni G., Mellora I.R. (2012): Novel 2-amino-isoflavones exhibit aryl hydrocarbon receptor agonist or antagonist activity in a species/cell-specific context. *Toxicology*. vol. 297, no. 1–3, pp. 26–33

Wikoff W.R., Anfora A.T., Liu J., Schultz P.G., Lesley S.A., Peters E.C., Siuzdaka G. (2009): Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(10):3698-3703

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 Ch-D., Dong Y. (2015): Androgen Receptor Splice Variants Dimerize to Transactivate Target Genes. *Cancer Res*. 75:3663–3671

Yousef G.M., Diamandis E.P. (2001): The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev*. 22(2):184–204

Zamagni A., Cortesi M, Zanoni M., Tesei A. (2019). Non-nuclear AR Signaling in Prostate Cancer. *Frontiers in Chemistry*. 7:651

Zhan Y., Zhang G., Wang X., Qi Y., Bai S., Li D., Ma T., Sartor O., Flemington E.K., Zhang H., Lee P., Dong Y. (2017): Interplay between Cytoplasmic and Nuclear Androgen Receptor Splice Variants Mediates Castration Resistance. *Mol. Cancer Res*. 15:59–68

Zhou Z.X., Sar M., Simental J.A., Lane M.V., Wilson E.M. (1994): A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem*. 269: 13115–23

Zhou Z-X, Kempainen J.A., Wilson E.M. (1995): Identification of three proline directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 9:605–615