

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021**

**Paula Hoffmanová**

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



**Modulácia aktivity androgénového receptora  
vybranými liečivami**

**Bakalárska práca**

**Paula Hoffmanová**

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

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Paula HOFFMANOVÁ  
Osobní číslo: R18643  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Modulácia aktivity androgénneho receptoru vybranými liečivami  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce
2. Stanovenie viability prostatických nádorových líníí
3. Stanovenie aktivity androgénneho receptoru
4. Stanovenie expresie cieľových génov androgénneho receptoru
5. Stanovenie hladiny proteínu androgénneho receptoru
6. Vypracovanie bakalárskej práce a multimediálnej prezentácie k obhajobe bakalárskej práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

1. Hallas Jesper et al: Incidence of Common Cancers in Users of Antimuscarinic Medications for Overactive Bladder: A Danish Nationwide Cohort Study, 2018, Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology
2. Li Dan et al: A magic drug target: Androgen receptor, 2018, Medical Research Review
3. Novotna Aneta et al: Profiling of enantiopure drugs towards aryl hydrocarbon (AhR), glucocorticoid (GR) and pregnane X (PXR) receptors in human reporter cell lines, 2014, Chemico-Biological Interactions
4. Bartonkova et al: Novel Stably Transfected Human Reporter Cell Line AIZ-AR as a Tool for an Assessment of Human Androgen Receptor Transcriptional Activity, 2015, Plos One
5. Kaye A. James et al: Cancer Incidence after Initiation of Antimuscarinic Medications for Overactive Bladder in the United Kingdom: Evidence for Protopathic Bias, 2017, Pharmacotherapy

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 20. dubna 2020  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice  
tel.: +420 585 634 901

## BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Meno a priezvisko autora	Paula Hoffmanová
Názov práce	Modulácia aktivity androgénového receptora vybranými liečivami
Typ práce	Bakalárska práca
Pracovisko	Katedra bunkovej biológie a genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedúci práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Rakovina prostaty je najčastejším typom karcinómu u mužov. Jej výskyt je úzko spojený so zvýšenou aktivitou androgénového receptora (AR), ktorého aktivita je riadená ligandmi rôzneho typu. Ligandy AR sú preto hlavným cieľom mnohých výskumov rakoviny prostaty. Táto práca sa zaoberá štúdiom vplyvu tamsulosinu a tolterodinu na transkripčnú aktivitu androgénového receptora. V počiatku experimentálnej práce bola určená cytotoxicita skúmaných látok na prostatickú bunkovú líniu pomocou MTT testu. Následne bola vykonaná metóda Reporter Gene Assay pre stanovenie aktivity AR v antagonistickom móde, tzn. v prítomnosti endogénneho ligandu, dihydrotestosterónu (DHT). Klúčovými bodmi experimentálnej časti bolo stanovenie expresie cieľových génov AR na úrovni mRNA a hladiny proteínu AR. DHT indukoval expresiu sledovaných génov. Tá však nebola ovplyvnená tamsulosinom, ale po ko-inkubácii s tolterodinom bol preukázaný mierny pokles expresie <i>FKBP5</i> a <i>KLK3</i> po 24 hod pôsobenia a tento trend kopírovali aj výsledky hladiny AR proteínu.</p>
Kľúčové slová	AR, rakovina prostaty, tamsulosin, tolterodin
Počet strán	53
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Paula Hoffmanová
Title	Modulation of androgen receptor activity with selected drugs
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Prostate cancer is the most common carcinoma among man. Its occurrence is closely related to enhanced activity of androgen receptor (AR), which is affected by many ligands of different kinds. Therefore, AR ligands are the main target of prostate cancer research. This thesis deals with the effect of tamsulosin and tolterodine on the transcriptional activity of AR. First, the cytotoxicity of these drugs was tested in prostate cancer cell line and the activity of AR was measured by Reporter Gene Assay in antagonist mode with the endogenous ligand of AR, dihydrotestosterone (DHT). Most important parts of the experimental section were defining the expression of AR target genes and the levels of AR protein. While DHT induced mRNA expression of target genes, tamsulosin had no effect. However, after the co-incubation with tolterodine for 24 hours there was a decrease in the expression of <i>FKBP5</i> and <i>KLK3</i>. This trend was observed at the level of AR protein.</p>
Keywords	AR, prostate cancer, tamsulosin, tolterodine
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Slovak

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D s označením všetkých použitých literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa: .....

.....

Paula Hoffmanová

## **Pod'akovanie**

Rada by som sa pod'akovala môjmu vedúcemu práce, pánovi doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a ochotný prístup. Pod'akovanie taktiež patrí kolektívu Laboratória molekulárnej farmakológie a toxikológie, ale najmä Mgr. Eliške Zgarbovej, za ochotu pomôcť a cenné rady. Pod'akovanie patrí aj mojej rodine, ktorá mi bola veľkou oporou v priebehu celého môjho štúdia.



# OBSAH

1	ÚVOD.....	vii
2	CIEĽ PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNY PREHĽAD .....	3
3.1	Androgénový receptor .....	3
3.2	Štruktúra AR.....	4
3.3	Zmeny dĺžky AR génu.....	6
3.3.1	Varianty AR.....	6
3.3.1.1	AR-V7 .....	6
3.4	Signálna dráha AR.....	7
3.5	Ligandy AR .....	9
3.6	AR a rakovina prostaty .....	10
3.7	Sledované gény .....	12
3.8	Skúmané látky .....	14
4	MATERIÁL A METÓDY.....	16
4.1	Materiál.....	16
4.1.1	Biologický materiál .....	16
4.1.2	Použitý materiál .....	16
4.1.3	Použité chemikálie a roztoky .....	17
4.1.4	Zloženie použitých roztokov .....	20
4.1.5	Zoznam použitých prístrojov .....	21
4.1.6	Zoznam použitých počítačových programov.....	21
4.2	Experimentálne postupy .....	22
4.2.1	Pasáž buniek .....	22
4.2.2	Počítanie a vysadenie buniek na kultivačnú dosku.....	22
4.2.3	Inkubácia s testovanými látkami .....	23
4.2.4	MTT Assay .....	24
4.2.5	Reporter Gene Assay .....	24
4.2.6	Crystal Violet Assay .....	24
4.2.7	Izolácia RNA .....	25
4.2.8	Reverzná transkripcia .....	25
4.2.9	qPCR.....	26
4.2.10	Izolácia proteínov .....	28
4.2.11	Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou .....	28
4.2.12	SDS-PAGE .....	29
4.2.13	Western Blotting (WB).....	30
5	VÝSLEDKY.....	32

5.1	MTT Assay .....	32
5.2	Reporter Gene Assay .....	33
5.3	Expresia cieľových génov AR na úrovni RNA .....	34
5.4	Crystal Violet Assay .....	37
5.5	Expresia na úrovni proteínov .....	38
6	DISKUSIA .....	41
7	ZÁVER.....	44
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	45

## Zoznam symbolov a skratiek

ACS	Americká Onkologická Spoločnosť
ADT	androgén-deprivačná terapia
AF-1	aktivačná funkcia 1
AF-2	aktivačná funkcia 2
AK	aminokyseliny
Akt	serin/threonin kináza
APC	anafázu-podporujúci komplex
APC/C	anafázu-podporujúci komplex/cyklozóm
APP	amyloid beta prekurzorový proteín
APS	persíran amónny
AR	androgénový receptor
ARA70	AR-asociovaný proteín 70
ARE	androgén-responzívny element
AR-FL	androgénový receptor plnej dĺžky
AR-V7	androgénový receptor-variant 7
BSA	bovinný sérový albumín
BSMA	bulbospinálna muskulárna atrofia
CBP	cAMP-responzívny element-viažuci proteín
CDC20	proteín cyklu bunkového delenia 20
CE3	kryptický exón 3
CRPC	kastračne-rezistentná rakovina prostaty
CS-FBS	uhlím filtrované fetálne bovinné sérum
CYP	cytochróm P450
DBD	DNA-väzobná doména
DHT	5 $\alpha$ -dihydrotestosterón

DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	ditiotreitol
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
ERK	extracelulárnym signálom-regulovaná kináza
EtOH	etanol
FBS	fetálne bovinné sérum
FKBP5	FK506-viažuci proteín 5
FOXA1	forkhead box A1
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GATA	GATA transkripčný faktor
GPRC6A	s G-proteínom spojený receptor C6A
GR	glukokortikoidný receptor
GRH	gonadotropín-uvolňujúci hormón
HSP	chaperonové proteíny
CHMR1	cholinergný muskarinový receptor 1
IGF1R	receptor pre inzulínu-podobný rastový faktor 1
KLK2	kallikrein 2
KLK3	kallikrein 3
LB	Laemmliho pufor
LBD	ligand-väzobná doména
LBP	ligand-väzobná kapsa
LH	luteinizačný hormón
MAPK	mitogénom-aktivovaná proteínkináza
MR	mineralokortikoidný receptor
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyyl-2H-tetrazolium bromid
NES	jadrový exportný signál

NLS	jadrový lokalizačný signál
NTD	N-koncová doména
OAB	hyperaktívny močový mechúr
PB	probasin
PBS	fosfátový pufor
PCA3	gén rakoviny prostaty 3
PI3K	fosfoinozítid 3-kináza
PR	progesteronový receptor
PSA	špecifický antigén prostaty
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS	dodecylsírán sodný
SHBG	pohlavné hormóny-viažuci globulín
SLP	pohlavie-limitujúci proteín
SRC1	steroidný receptor 1
SRY	pohlavie-ovplyvňujúca oblasť
TACC2	transformačný kyslý zvinutý proteín 2
Tau	transkripčná aktivačná jednotka 1
Tau-5	transkripčná aktivačná jednotka 5
TIF2	transkripčný faktor 2
UBE2C	ubikvitín-konjugačný enzým E2 C
UT	negatívna kontrola

## **Zoznam obrázkov a grafov**

Obrázok č. 1: Štruktúra androgénového receptora

Obrázok č. 2: Genomická signalizácia AR

Obrázok č. 3: Premena testosterónu na 5 $\alpha$ -dihydrotestosterón

Obrázok č. 4: Reprezentatívne fotografie detekcie proteínov AR-FL a AR-V7 metódou western blot

Graf č. 1: Metabolická aktivita bunkovej línie AIZ-AR

Graf č. 2: Stanovenie aktivity AR v bunkovej línii AIZ-AR

Graf č. 3: Expresia génu FKBP5 v bunkovej línii 22Rv1

Graf č. 4: Expresia génu KLK3 v bunkovej línii 22Rv1

Graf č. 5: Expresia génu UBE2C v bunkovej línii 22Rv1

Graf č. 6: Metabolická aktivita bunkovej línie 22Rv1

Graf č. 7: Expresia AR-V7 na úrovni proteínu v bunkovej línii 22Rv1

Graf č. 8: Expresia AR plnej dĺžky (110 kDa) na úrovni proteínu v bunkovej línii 22Rv1

## Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Farmakokinetické parametre tamsulosinu po ústnom podaní

Tabuľka č. 2: Farmakokinetické parametre tolterodinu po ústnom podaní kapsuly s predĺženým uvoľňovaním

Tabuľka č. 3: Zloženie reakčnej zmesi reverznej transkripcie pre jednu vzorku

Tabuľka č. 4: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *GAPDH*

Tabuľka č. 5: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *FKBP5*

Tabuľka č. 6: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *UBE2C*

Tabuľka č. 7: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *KLK3*

Tabuľka č. 8: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *FKBP5* (KiCqStart® Probe Assay)

Tabuľka č. 9: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *KLK3* (KiCqStart® Probe Assay)

Tabuľka č. 10: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *UBE2C* (KiCqStart® Probe Assay)

Tabuľka č. 11: Časový a teplotný profil PCR reakcie

Tabuľka č. 12: Zloženie deliaceho gélu pre 1 gél s hrúbkou 1,5 mm

Tabuľka č. 13: Zloženie zaostrovacieho gélu pre 1 gél s hrúbkou 1,5 mm

# 1 ÚVOD

Rakovina prostaty je najčastejšie sa vyskytujúcim typom karcinómu u mužov a jej liečba je zameraná na blokovanie aktivácie androgénového receptora (AR) a zníženie produkcie androgénov. Androgénový receptor je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý patrí do rodiny steroidných receptorov. Tie sú lokalizovaný v cytoplazme bunky a po ich aktivácii ligandom dochádza k translokácii do jadra, kde sa viažu do špecifických oblastí DNA cieľových génov, a tým ovplyvňujú ich transkripciu. AR je dôležitou súčasťou mnohých dejov v ľudskom organizme a udržiavaní homeostázy niektorých orgánových sústav. Je tiež exprimovaný v primárnom karcinóme prostaty a v metastázach, kde sa podieľa na proliferácii, diferenciácii a apoptóze buniek. Jeho aktivita je riadená steroidnými hormónmi, a to najmä testosterónom a dihydrotestosterónom. Ligandy AR modulujú jeho transkripčnú aktivitu, a preto sú cieľom mnohých výskumov, ktoré sa zaoberajú problematikou rakoviny prostaty. Problémom liečby tejto rakoviny stále zostáva fakt, že hormón-senzitívna rakovina prostaty obvykle podlieha konverzii na hormón-rezistentnú formu rakoviny, preto je dôležité hľadať vhodné ligandy AR, ktoré budú pôsobiť aj na tento typ rakoviny prostaty. Tamsulosin a tolterodín sú terapeutiká, používané k liečbe benígnej hypertrofií prostaty a hyperaktívneho močového mechúra. Táto práca je zameraná na štúdium ich vplyvu na aktivitu AR a expresiu cieľových génov *FKBP5*, *KLK3* a *UBE2C* na úrovni mRNA. Následne bola monitorovaná hladina AR proteínu, a to v bunkovej línii 22Rv1, ktorá exprimuje 2 varianty AR. Bunky boli vystavené testovaným látkam po dobu 4 a 24 hod v prítomnosti endogénneho ligandu AR, dihydrotestosterónu.



## **2 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom bakalárskej práce bolo zistiť, či vybrané liečivá ovplyvňujú aktivitu androgénového receptora. Teoretická časť práce zahŕňala vypracovanie rešerše k téme bakalárskej práce.

Dosiahnutie experimentálnych výsledkov prebiehalo nasledovne:

Stanovenie aktivity androgénového receptora metódou Reporter Gene Assay

Stanovenie expresie cieľových génov androgénového receptora metódou PCR

Stanovenie hladiny proteínu androgénového receptora metódou Western Blotting

## 3 LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1 Androgénový receptor

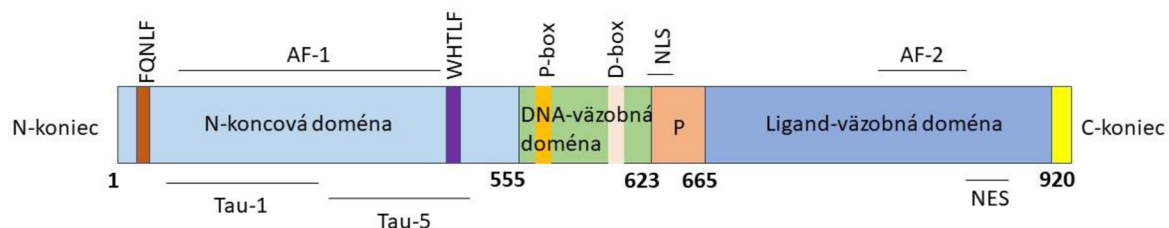
Androgénový receptor (AR) je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý patrí do rodiny steroidných jadrových receptorov, spolu s estrogénovým, progesterónovým, glukokortikoidným a mineralokortikoidným receptorom. AR je dôležitým faktorom pri vývine a udržiavaní zdravého reprodukčného, oporného, kardiovaskulárneho, imunitného a nervového systému. AR je dlhé roky známy vďaka svojej významnej role pri tvorbe rakoviny prostaty u mužov, čo z neho robí esenciálny terapeutický cieľ (Lu NZ *et al.*, 2006).

Gén pre AR je lokalizovaný na chromozóme X v lokuse Xq11-Xq12, zaberá približne 90 kbp DNA, z čoho oblasť, kódujúca proteín, je dlhá 2 757 nukleotidov a obsahuje 8 exónov. Exón 1 kóduje N-koncovú doménu (NTD), exóny 2 a 3 kódujú DNA-väzobnú doménu (DBD) a exóny 4 až 8 kódujú ligand-väzobnú doménu (LBD) androgénového receptora (Germann, 2002). Finálny produkt AR génu kóduje 110-kDa proteín zložený z 920 aminokyselín (Li *et al.*, 2019). Posttranslačné modifikácie AR zahŕňajú zmeny vo všetkých doménach AR: fosforylačné a SUMOylačné miesta sa vyskytujú v NTD, acetylačné a metylačné miesta sú v DBD a ubikvitinačné miesta sú lokalizované prevažne v LBD. Jednotlivé typy posttranslačných modifikácií v normálnych tkanivách regulujú funkciu, stabilitu a štruktúru AR a udržiavajú homeostázu tkanív (Gioeli *et Paschal*, 2012).

Ako všetky steroidné receptory, je AR vo svojej inaktívnej forme lokalizovaný v cytosole, viazaný na chaperónové proteíny (heat shock proteíny = HSP), ako napr. HSP-90, HSP-70 a HSP-40, ktoré chránia AR pred degradáciou (Azad *et al.*, 2015). Po aktivácii AR príslušným ligandom sa HSP uvoľnia z väzby na AR, čím dochádza ku konformačnej zmene, ktorá umožní dimerizáciu AR. Následne je komplex androgén-AR translokovaný do jadra za pomoci príslušných koaktivátorov (Tan ME *et al.*, 2015).

### 3.2 Štruktúra AR

AR obsahuje 3 hlavné domény: N-koncovú doménu (N-terminal domain = NTD), DNA-väzobnú doménu (DNA-binding domain = DBD) a ligand-väzobnú doménu (ligand binding domain = LBD) (Obr. č. 1) (Davies *et al.*, 2008).



**Obrázok č. 1: Štruktúra androgénového receptora.** N-koniec tvorí N-koncová doména (NTD), ktorej súčasťou je aktivačná funkcia 1 (AF-1) a motívy FQNLF a WHTLF. Za NTD sa nachádza DNA-väzobná doména (DBD). C-koniec AR tvorí ligand-väzobná doména, ktorá je od DBD oddelená pantovou oblasťou (P). Súčasťou LBD je aktivačná funkcia 2 (AF-2) (Obrázok prevzatý z: Davey *et Grossmann*, 2016, upravené).

NTD je sekvencia aminokyselín (AK) 1 – 555, ktorá obsahuje 9 – 39 repetícií CAG, kódujúcich glutamín, a 14 – 27 repetícií GGN, kódujúcich glycín. Dĺžka polyglutamínových (Q) a polyglycínových (G) repetícií je v ľudskej populácii vysoko variabilná a môže ovplyvniť konformáciu NTD (Davies *et al.*, 2008).

Ďalšou dôležitou oblasťou NTD je aktivačná funkcia 1 (AF-1), ktorá zodpovedá za transkripčnú aktivitu AR. AF-1 obsahuje 2 hlavné determinanty transkripčnej aktivity AR, transaktivačné jednotky Tau-1 (AK 101 – 360) a Tau-5 (AK 360 – 528), ktoré sú dôležité pre aktivitu kompletného AR. Pred Tau-1 sa nachádza motív FQNLF (AK 23 – 27; phe, gln, asn, leu, phe) a súčasťou Tau-5 je motív WHTLF (AK 433 – 437; trp, his, thr, leu, phe), pričom oba sprostredkujú interakciu medzi NTD a LBD, a tvoria tiež väzobné miesta pre koregulátory AR (Dehm *et al.*, 2007; Hur *et al.*, 2004).

AR sa viaže do oblastí DNA, zvaných androgén-responzívne elementy (ARE), prostredníctvom DNA-väzobnej domény (Obr. č. 1), ktorá je v rámci steroidných receptorov vysoko konzervovaná. DBD je lokalizovaná v pozícii AK 556 – 623, zložená z niekoľkých slučiek a dvoch na seba kolmých  $\alpha$ -helixov, v ktorých N-koniec a okolité slučky formujú 2 zinkové prsty, z ktorých každý obsahuje štyri cysteínové zvyšky, viažuce zinkový ión. S prvým zinkovým prstom je asociovaný  $\alpha$ -helix, ktorý je zanorený do veľkého žliabku DNA sekvencie ARE so svojim P-box (blízkym) motívom (AK 577 – 581; gly, ser, cys, lys, val). P-box je oblasť AK zvyškov, ktorá je lokalizovaná v DNA-rozpoznávajúcom  $\alpha$ -helixe a je nevyhnutná pre špecifické rozpoznanie ARE. Druhý zinkový prst s D-box (vzdialeným) motívom (AK 596 – 600; ala, ser, arg, asn, asp) sprostredkuje

interakciu dvoch AR monomérov (Dalal *et al.*, 2014). Motív zinkových prstov tiež uľahčuje väzbu AR do promótorovej oblasti génov, regulovaných AR, čo umožňuje aktivačným funkciám N-koncovkej domény a LBD aktivovať alebo inhibovať transkripciu týchto génov (Schoenmakers *et al.*, 2000).

Medzi DBD a LBD sa vyskytuje krátka pantová oblasť v pozícii 624 až 665 AK, ktorá v rámci steroidných receptorov nie je konzervovaná. N-koncová časť pantovej oblasti je dôležitou súčasťou jadrového lokalizačného signálu AR (NLS), ktorý je esenciálny pre naviazanie proteínu importin- $\alpha$  a umožňuje translokáciu AR do jadra. Mutačné štúdie preukázali, že NLS je tvorený dvoma oblasťami, jedna sa nachádza v pantovej oblasti a druhá je lokalizovaná v oblasti druhého zinkového prstu DBD (Zhou *et al.*, 1994). V neprítomnosti ligandu je funkcia NLS prevážaná ďalším dôležitým signálom, a tým je jadrový exportný signál (NES, AK 742 – 817). Ten sa vyskytuje v LBD a zabezpečuje export receptora z jadra do cytoplazmy (Saporita *et al.*, 2003). Delécia v prvej časti NLS (AK 629 – 633, arg, lys, leu, lys, lys) vedie k zníženej schopnosti receptora viazať sa do DNA, ktorá má za následok rýchlejší pohyb receptora medzi jednotlivými responzívnymi elementami, čo v konečnom dôsledku vedie k nárastu jeho transkripčnej aktivity. Mutácie v tejto oblasti majú výrazný vplyv na jadrovú translokáciu, stabilitu receptora, transaktiváciu a väzbu do DNA. (Haelens *et al.*, 2007; Tanner *et al.*, 2010). Pantová oblasť AR má tiež dôležitú úlohu pri regulácii väzby do DNA, sprostredkovaní väzby koaktivátorov/korepresorov (Schoenmakers *et al.*, 1999; Clinckemalie *et al.*, 2012).

Karboxylový koniec AR (Obr. č. 1), rovnako ako aj iných steroidných receptorov, obsahuje LBD, a to v pozícii AK 666 až 920. Tá je zložená z 11  $\alpha$ -helixov, ktoré vytvárajú zanorenú hydrofóbnu hormón-viažucu kapsu, a 2 antiparalelných  $\beta$ -skladaných listov. Po naviazaní agonistov dochádza k formovaniu miesta aktivačnej funkcie 2 (AF-2), ktorá tvorí hydrofóbnu žliabok, dôležitý pre asociáciu s koaktivátormi, a tým aj zosilnenie aktivity AR. AF-2, na rozdiel od AF-1, pre svoju aktivitu vyžaduje väzbu ligandu. Štruktúrny vzťah AF-2 je kompatibilný s konformáciou koaktivátorov, ktoré majú obvykle motív LXXLL (leu, X, X, leu, leu; X = akákoľvek aminokyselina), a tiež s oblasťami NTD s motívom FXXLF (phe, X, X, leu, phe) a WXXLF (trp, X, X, leu, phe), vďaka čomu dochádza k stabilizácii kompletného transkripčného aparátu AR (Li *et al.*, 2019).

### 3.3 Zmeny dĺžky AR génu

Na rozdiel od vysoko konzervovaných oblastí DBD a LBD, NTD vykazuje genetické zmeny a polymorfizmus, ktorý ovplyvňuje reguláciu AR-responzívnych génov. Polymorfizmus veľkosti AR je sčasti spôsobený mikrosatelitovou trojnukleotidovou repetíciou v exóne 1, kódujúcou polyglutamínovú oblasť (Choong *et Wilson*, 1998). Znížený počet glutamínových repetícií vedie k zvýšeniu transkripčnej aktivity AR, a tým aj zvýšenej afinite k androgénom, čo môže pre pacienta znamenať vyššie riziko tvorby rakoviny prostaty (Coetzee *et Ross*, 1994). Naopak úplná delécia tejto repetitívnej oblasti spôsobuje až štvornásobnú redukciu aktivity AR v porovnaní s bežnou formou receptora (Callewaert *et al.*, 2003).

Predĺženie polyglutamínovej oblasti až na 40 – 62 CAG repetícií spôsobuje vzácne gonozomálne recesívne ochorenie, Kennedyho syndróm, tiež označovaný ako bulbospinálna svalová atrofia (bulbospinal muscular atrophy = BSMA). BSMA je neurodegeneratívne ochorenie, ktoré postihuje výlučne mužov, ženy sú asymptomatickými prenášačkami tejto choroby. Medzi typické prejavy BSMA patrí pomaly sa rozvíjajúce ochabovanie svalov, ktoré zahŕňa tvárové svaly, bulbárne svaly a svaly končatín (Zajac *et Fui*, 2012; Finsterer, 2010).

#### 3.3.1 Varianty AR

Aberácie v zostrihu AR génu boli prvýkrát identifikované v prípade vrodeného syndrómu necitlivosti na androgény (Ris-Stalpers *et al.*, 1990). Pri rakovine prostaty boli izoformy AR popísané na bunkovej línii 22Rv1, v ktorých je exprimovaný AR v plnej dĺžke, a tiež skrátaná forma AR (75 – 80 kDa) (Tepper *et al.*, 2002). Zostrihnuté varianty AR boli neskôr objavené aj vo vzorkách pacientov s kastročne-rezistentnou formou rakoviny, v ktorých bola expresia týchto foriem AR dvadsaťnásobne vyššia v porovnaní so vzorkami hormón-senzitívnej formy rakoviny (Hu *et al.*, 2009). V súčasnosti bolo identifikovaných približne 22 zostrihnutých foriem AR, ktoré sú charakteristické stratou C-koncovkej časti, vrátane LBD, čo vedie k aktivácii ligand-nezávislej signálnej dráhy AR, kedy zostáva receptor konštitutívne aktívny (Dehm *et Tindall*, 2011; Lu *et Luo*, 2013). Amplifikácie AR génu je možné detegovať fluorescenčnou hybridizáciou *in situ* (FISH) v celých tkanivách alebo v cirkulujúcich nádorových bunkách (Podolak *et al.*, 2017).

##### 3.3.1.1 AR-V7

Skrátaná varianta AR-V7, niekedy označovaná aj ako AR3, je doposiaľ najlepšie opísanou a biologicky významnou formou mutantného AR (Nakazawa *et al.*, 2014). V porovnaní s AR plnej dĺžky, môže AR-V7 indukovať expresiu odlišných skupín génov, ako napr. expresiu regulačných génov bunkového cyklu (*UBE2C*), zatiaľ čo bežný AR uprednostňuje expresiu génov spojených s metabolizmom a diferenciáciou buniek (Sobhani *et al.*, 2021).

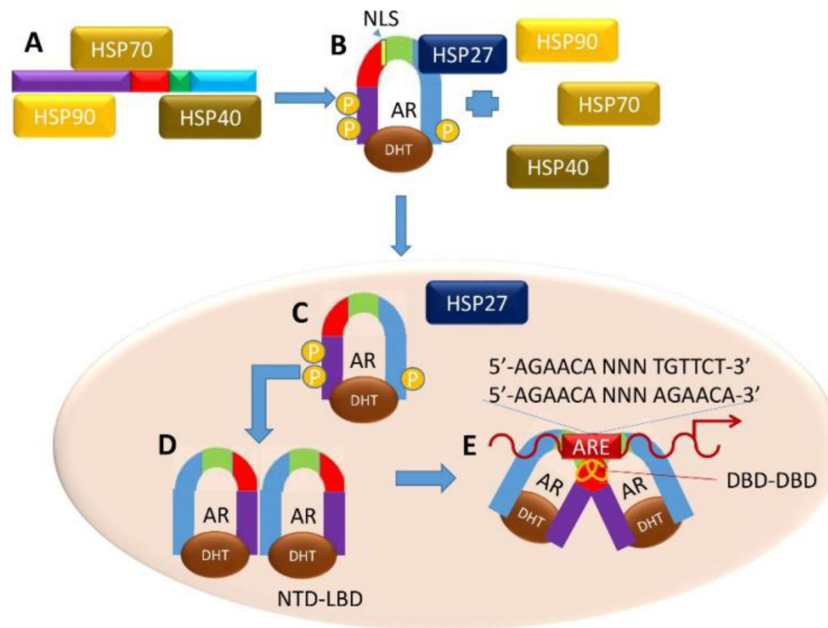
AR-V7 mRNA je kódovaná exónmi 1, 2 a 3 génu pre AR, za nimi nasleduje skrytý exón 3 (cryptic exon 3 = CE3), pričom k C-koncu exónu 3 je pridaných 16 AK. CE3 sa vyskytuje v intróne 3, spolu s polyadenylačným signálom, ktorý reguluje zostrih AR-V7. Finálny proteín AR-V7 má zachovanú NTD a DBD, je však skrátenejší o LBD. Napriek tomu je AR-V7 konštitutívne aktívny a pre svoju translokáciu do jadra nádorových buniek nevyžaduje väzbu ligandu (Hu *et al.*, 2009). Prítomnosť AR-V7 varianty v nádorových bunkách CRPC a absencia LBD je tiež spojená s rezistenciou voči enzalutamidu a abirateronu. Enzalutamid je inhibítor signálnej dráhy AR, ktorý cieľi na oblasť LBD. Abirateron je inhibítor CYP 17A1, ktorý znižuje koncentráciu androgénov v nadobličkách a v rakovinových bunkách. Z dôvodu absencie LBD v AR-V7 je teda terapeutický účinok enzalutamidu a abirateronu pri liečbe CRPC znížený (Antonarakis *et al.*, 2014).

### 3.4 Signálna dráha AR

Mechanizmus pôsobenia AR po väzbe ligandu môže byť dvojakého typu: genomický (závislý na väzbe do DNA) alebo negenomický (nezávislý na väzbe do DNA).

**Genomická signálna dráha AR (Obr. č. 2):** Pri väzbe ligandu do LBD, AR podlieha konformačným zmenám, pri ktorých dochádza k uvoľneniu AR monoméru z komplexu s HSP-90, -40 a -70 a naviazaniu HSP-27 (Centenera *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2005). Predpokladá sa, že tieto konformačné zmeny indukujú fosforyláciu AR, čo vedie k intramolekulárnej interakcii medzi NTD a LBD, ktorá odhalí jadrový lokalizačný signál, viaže importin- $\alpha$  a umožňuje translokáciu AR do jadra (van Royen *et al.*, 2012; Nadal *et al.*, 2017).

V jadre dochádza k interakciám medzi DBD dvoch AR monomérov, viažucich ligand. Dva monoméry AR sa viažu prostredníctvom D-boxu v DBD a P-boxy oboch AR monomérov sa viažu do cieľovej sekvencie DNA, androgén-responzívnych elementov (ARE) (Centenera *et al.*, 2008). ARE sú sekvencie DNA, dlhé ~15 bp, nachádzajúce sa v promótorovej oblasti cieľových génov AR, ktoré sú zapojené do procesov bunkovej proliferácie a apoptózy (Chen CD *et al.* 2004). Sekvencie ARE pozostávajú z dvoch hexanukleotidových sekvencií, ktoré sú oddelené tromi ľubovoľnými nukleotidmi (označenie N), a môžu byť dvojakého typu: klasické a špecifické. Klasická sekvencia ARE (5'-AGAACA-NNN-TGTTCT-3') je spoločná pre jadrové receptory I. triedy, kam patrí aj GR, MR a PR (Shaffer *et al.*, 2004). Špecifická sekvencia ARE (5'-AGAACA-NNN-AGAACA-3') sa vyskytuje napr. u génov *PB* (probasin) alebo *SLP* (pohlavie-limitujúci proteín) (Rennie *et al.*, 1993; Verrijdt *et al.*, 2002).



**Obrázok č. 2: Genomická signalizácia AR.** (A) Po väzbe ligandu na AR sa HSP proteíny uvoľnia, (B) AR tvorí monoméry N-C monoméry, (C) AR monoméry sú translokované do jadra, (D) kde tvoria NTD-LBD homodiméry. (E) Oba homodiméry tvoria DNA-závislý DBD-DBD homodimér a viažu sa do ARE cieľových génov AR (Obrázok prevzatý z: Messner *et al.*, 2020, upravené).

Pri väzbe do DNA, AR dimér tvorí komplex s rôznymi transkripčnými koregulátormi prostredníctvom oblastí AF-1 a AF-2. Doposiaľ bolo identifikovaných viac ako 150 koregulátorov AR. Koaktivátory ARA70 a filamín A stabilizujú komplex androgén-AR a uľahčujú jadrovú translokáciu (Heemers *et Tindall*, 2007). Koaktivátor steroidných receptorov 1 (SRC1) a transkripčný faktor TIF2 interagujú s AF-2 a kontrolujú aktivitu AR, spolu s mnohými ďalšími transkripčnými faktormi ako GATA, FOXA1, SRY proteín a pod (Obinata *et al.*, 2017). Medzi korepresory AR patrí napr. kalretikulín, ktorý interaguje s DBD a bráni väzbe do DNA, čím inhibuje transkripčnú aktivitu AR (Heemers *et Tindall*, 2007). Väčšina koregulátorov sú enzýmy, ako histón-acetyltransferáza, metyltransferáza a kinázy, ktoré napomáhajú transkripcii cieľových génov prostredníctvom chromatinových a histónových modifikácií (Wolf *et al.*, 2008).

AR reguluje expresiu génov, ktoré sú zapojené do rôznych funkcií: regulácia bunkového cyklu (gény *UBE2C*, *TACC2*), modulácia PI3K (gén *FKBP5*), sekrečné proteíny (gény *KLK3*, *KLK2*), rastové stimulatory (gény *IGF1R*, *APP*) a pod. Aktivácia transkripcie vyžaduje obsadenie ako promótorovej oblasti, tak aj oblasti zosilovačov, komplexom AR, koaktivátorov a RNA polymerázy II. Naopak represia transkripcie vyžaduje naviazanie komplexu iba do oblasti promótoru, ako je to napr. pri géne *CHRM1*, kedy AR priamo potláča expresiu génu aj v absencii androgénov (Shang *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 2007).

**Negenomická signálna dráha AR:** Komplex androgén-AR, prostredníctvom aktivácie druhého posla, interaguje s kinázami ERK, Akt a MAPK. Po vystavení buniek androgénom sa odozva tejto signálnej dráhy dostaví v rádoch sekúnd až minút, čo by nebolo možné pri väzbe do DNA. Negenomická signálna dráha, ktorú sprostredkováva GPRC6A receptor spriahnutý s G-proteínom, a ktorý fosforyluje ERK kinázu po väzbe testosterónu, bola identifikovaná v prostatických bunkách (Pi *et al.*, 2010).

### 3.5 Ligandy AR

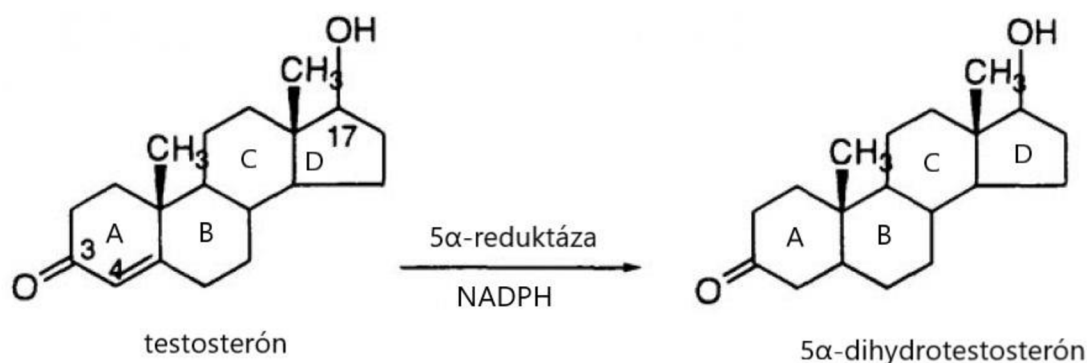
Ligandy AR boli indentifikované pomocou *in vitro* väzobných alebo reporter gene esejí, prevažne sú klasifikované ako agonisti alebo antagonisti AR, v závislosti od ich schopnosti aktivovať alebo inhibovať transkripciu génov, kontrolovaných AR. Vo všeobecnosti sa tieto ligandy viažu do ligand-väzobnej kapsy (LBP) v ligand-väzobnej doméne (LBD) AR proteínu. LBP je endogénne väzobné miesto pre ligandy AR. Mutácie v tejto oblasti obvykle inaktivujú antagonisty AR, ktoré cieľia na LBP, a často dochádza k ich konverzii na agonistov (Taplin *et al.*, 1995). Pri väzbe ligandu do ligand-väzobnej kapsy (LBP), podlieha receptor dôležitým konformačným zmenám, ktoré významne modifikujú pozíciu  $\alpha$ -helixov LBD, čím sa dokáže receptor prispôbiť jednotlivým ligandom (Cantin *et al.*, 2007). Dvoma hlavnými endogénnymi ligandmi AR sú androgény, testosterón a dihydrotestosterón (DHT). Ich funkcia bola prvýkrát popísaná v roku 1889 francúzskym fyziológom Charlesom Edwardom Brown-Sequardom (Heemers *et Tindall*, 2007).

Syntéza testosterónu je pod kontrolou osy hypotalamus-hypofýza-semenníky. Hypotalamus produkuje gonadotropín-uvolňujúci hormón (GRH), ktorý pôsobí na adenohipofýzu, a tá následne produkuje luteinizačný hormón (LH). LH cirkuluje v krvi, viaže sa na LH receptory v Leydigových bunkách semenníkov, kde reguluje aktivitu P450scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme), enzým, ktorý indukuje syntézu testosterónu z cholesterolu. Približne 90 % testosterónu je produkovaných Leydigovými bunkami, zvyšok je produkovaný v kôre nadobličiek, v pečeni a u žien vo vaječníkoch (Heemers *et Tindall*, 2007).

Testosterón cirkuluje v sére viazaný na pohlavné hormóny-viažuci globulín (SHBG) a albumín, pričom do buniek rakoviny prostaty sa dostáva testosterón voľný (Rosner *et al.*, 1991; Baker, 2002). Vnútri bunky je testosterón redukovaný na jeho účinnejšiu formu 5 $\alpha$ -dihydrotestosterón (DHT), reakcia je katalyzovaná enzýmom 5 $\alpha$ -reduktáza za prítomnosti kofaktoru NADPH (Obr. č. 3). Malé množstvo testosterónu (~ 0,2 %) môže byť konvertované na estradiol enzýmom aromatáza (Johansen, 2004).



DHT sa od testosterónu líši absenciou jednej dvojitej väzby v kruhu A, čo dvojnásobne zvyšuje jeho afinitu k AR a päťnásobne znižuje rýchlosť disociácie v porovnaní s testosterónom (Grino *et al.*, 1990).



**Obrázok č. 3: Premena testosterónu na 5α-dihydrotestosterón.** Reakciu katalyzuje enzým 5α-reduktáza za prítomnosti kofaktoru NADPH (Obrázok prevzatý z Ogino *et al.*, 2016, upravený).

### 3.6 AR a rakovina prostaty

Androgénový receptor je exprimovaný v primárnom karcinóme prostaty a v metastázach, kde reguluje veľké množstvo bunkových dejov ako proliferácia, apoptóza, diferenciácia. V bunkách karcinómu prostaty je jeho aktivita regulovaná steroidnými a peptidovými hormónmi (Culig *et Santer*, 2014).

Rakovina prostaty je najčastejšie diagnostikovaným typom zhubného nádoru u mužov, čo ju stavia do stredu záujmu mnohých experimentálnych a klinických výskumov. V súčasnosti existuje viacero liečebných postupov, ktoré závisia od patologického stavu a štádia ochorenia, expresie špecifického antigénu prostaty (prostate specific antigen = PSA) a celkového zdravotného stavu pacienta. Pre rozlíšenie potenciálne neškodnej alebo agresívnej formy rakoviny prostaty bolo vyvinutých množstvo experimentálnych metód, ktorých cieľom je identifikovať rakovinové biomarkery (Culig *et Santer*, 2014).

Diagnostika rakoviny prostaty je založená na meraní hladiny PSA z krvi. PSA je glykoproteínová serínová proteáza, vylučovaná epiteliálnymi bunkami prostaty, napomáha pohyblivosti spermii prostredníctvom degradácie proteínov semenogelin I a II (Lilja, 1985). Aj keď je PSA orgánovo-špecifickým biomarkerom, jeho zvýšená hladina nemusí byť spôsobená iba rakovinovým bujnením, z toho dôvodu musí byť diagnostika doplnená ďalšími testami, ako napr. PCA3 (prostate cancer gene 3) test z moču, digitálne rektálne vyšetrenie a pod (Ferro *et al.*, 2016). Zvýšená hladina PSA v sére môže indikovať nadmernú aktivitu AR. Podľa Americkej Onkologickej Spoločnosti (ACS), je hodnota PSA nad 4 ng·ml<sup>-1</sup> udávaná ako abnormálna a títo pacienti ďalej podstupujú biopsiu prostaty (Hoffman, 2011).

Väčšina malých nádorov prostaty je odstránená pomocou radikálnej prostatektómie. Liečba nádorov, ktoré nemôžu byť odstránené operatívne alebo rádioterapiou, je zameraná na zníženie hladiny androgénov alebo blokovanie AR (Culig *et al.*, 2014).

Androgén-deprivačná terapia (ADT) je založená na znížení produkcie androgénov a/alebo užívaní antiandrogénov, ktoré sa viažu do LBD a kompetitívne blokujú aktiváciu AR androgénmi. V počiatočnej liečbe rakoviny prostaty boli steroidné antiandrogény, ako napr. cyproterónacetát, spironolaktón, magnesterolacetát a medroxyprogesterón, bežne používanou alternatívou. Vďaka ich štruktúrnej podobnosti s androgénmi, dokážu blokovať aktivitu androgénov a zmierniť vývin rakoviny prostaty. Nevýhodou steroidných antiandrogénov je interakcia s inými steroidnými receptormi, ktorá vedie k hepatotoxicite, kardiovaskulárnym a iným neželaným vedľajším účinkom, ktoré obmedzujú ich používanie (Liu *et al.*, 2014).

Vhodnou alternatívou liečby rakoviny prostaty, ktorá nahradila steroidné antiandrogény, sa stali nesteroidné antiandrogény prvej generácie, ako napr. flutamid, nilutamid alebo R-bikalutamid. Antiandrogény prvej generácie majú nízku afinitu k AR a v klinickej praxi sa používajú v kombinácii s agonistami a antagonistami LH-uvoľňujúceho hormónu, k liečbe pokročilej rakoviny prostaty. Problémom antiandrogénov prvej generácie je, že môžu vyvolať mutácie AR, pri ktorých sa budú viazať na mutovaný AR ako parciálny agonisti (Ning *et al.*, 2013). V prípade mutovanej formy AR sa preto začali používať antiandrogény druhej generácie, ako napr. enzalutamid, ktoré boli v liečbe efektívnejšie (Ning *et al.*, 2013). Napriek tomu sa pri používaní enzalutamidu rovnako objavili rezistenčné mutácie AR, a preto je dôležité nájsť nové antagonisty AR, schopné bojovať proti rezistencii mutačných foriem AR (El-Amm *et al.*, 2013).

Cieľové miesta malých molekúl ligandov sú lokalizované takmer po celom AR proteíne. Okrem LBD, ktorá je cieľom spomínaných antiandrogénov, sú predmetom výskumu aj oblasti NTD a DBD. Prvým inhibítorom, cieleným na NTD a DBD, bol EPI-001, ktorý sa kovalentne viaže do NTD a bráni interakcii medzi jednotlivými proteínmi, potrebnými k transkripčnej aktivite AR (Andersen *et al.*, 2010).

Problémom však zostáva, že takmer všetkým pacientom sa po čase vyvinie kastrocačne-rezistentná rakovina prostaty (castration-resistant prostate cancer = CRPC), ktorá bola kedysi dezinterpretovaná ako androgén-nezávislá forma rakoviny prostaty (Watson *et al.*, 2015). Neskôr, pri porovnaní vzoriek nádorov pred a po vývine kastrocačne rezistentnej formy rakoviny, sa zistilo, že hladina expresie AR bola omnoho vyššia v hormón-rezistentnom nádore v porovnaní s hormón-senzitívnym nádorom od rovnakého pacienta (Edwards *et al.*, 1995). Nasledujúce štúdie objasnili, že zvýšenie expresie AR spôsobuje progres rakoviny prostaty z hormón-senzitívnej na hormón-rezistentnú formu, indukuje konverziu z antagonistu na agonistu a mení usporiadanie koaktivátorov (Chen *et al.*, 2004). Tieto poznatky v konečnom dôsledku poukazujú na fakt,

že potlačenie aktivity AR je významným liečebným krokom nie len pri skorej forme rakoviny, ale aj neskorej kastračne-rezistentnej forme rakoviny prostaty (Li *et al.*, 2019).

Pre výskum rakoviny prostaty je dostupných niekoľko androgén-senzitívnych bunkových línií, ktoré sa líšia proliferáciou po pôsobení prirodzených alebo syntetických androgénov (Culig *et al.*, 2014). V tejto práci bola použitá bunková línia 22Rv1, androgén-pozitívna bunková línia, ktorá reaguje na dihydrotestosterón (DHT) a vylučuje PSA (Sramkoski *et al.*, 1999).

### 3.7 Sledované gény

#### 1. *FKBP5*

*FKBP5* gén sa u človeka nachádza na krátkom ramienku chromozómu 6 (lokus 6p21.31) a kóduje 51-kDa proteín, ktorý patrí do rodiny imunofilínov, modulujúcich distribúciu steroidných receptorov medzi jadrom a cytoplazmou (Davies *et al.*, 2002). V oblasti blízkeho promótora génu *FKBP5* chýba väzobné miesto pre AR, to sa vyskytuje v oblasti zosilovačov intrónu 5, lokalizované 65 kb za iniciačným miestom transkripcie. AR interaguje s CBP (cAMP-responzívny element-viažuci proteín) a komplex AR-CBP sa viaže do vzdialenej oblasti zosilovačov, kde prostredníctvom histón acetyltransferázovej aktivity dekondukuje chromatín, čo vedie k transkripcii génu (Magee *et al.*, 2006).

Proteín FKBP5 je zapojený do mnohých signálnych dráh, vrátane hormonálnej signalizácie, kde má dôležitú úlohu pri tvorbe rakoviny a chemorezistencie (Ratajczak *et al.*, 2003). Na rozdiel od signalizácie GR, PR a MR, kedy FKBP5 proteín znižuje ich aktivitu, v prípade AR dochádza k zvýšeniu jeho transkripčnej aktivity (Ni *et al.*, 2010). V porovnaní s mRNA *PSA*, mRNA *FKBP5* lepšie odzrkadľuje koncentráciu a aktivitu androgénov v karcinóme prostaty po androgén-deprivačnej terapii (Mostaghel *et al.*, 2007).

#### 2. *KLK3*

*KLK* gény sú lokalizované na dlhom ramienku chromozómu 19 (lokus 19q13, pre *KLK3* lokus 19q13.33) a kódujú celkom 15 serínových proteáz, ktoré sa zúčastňujú rôznych fyziologických procesov, ako skvapalnenie spermy a olupovanie kože (Wang *et al.*, 2018). *KLK3* kóduje špecifický antigén prostaty (PSA), alebo kallikrein 3 (KLK3), enzým, sekretovaný epiteliálnymi bunkami a vnútornými bunkami prostaty (Kornberg *et al.*, 2018). V blízkom promótore *KLK3* génu boli identifikované 2 ARE, prvý v pozícii -170 (ARE1), druhý v pozícii -394 (ARE2) (Riegman *et al.*, 1991; Cleutjens *et al.*, 1996). Neskoršie štúdie

objavili tretí ARE v pozícii -4,136 (ARE3), ktorý výrazne ovplyvňuje transkripciu *KLK3* po indukcii androgénmi (Schuur *et al.*, 1996).

Zvýšená hladina PSA je často používaným biomarkerom rakoviny prostaty, avšak vyskytuje sa aj pri infekciách prostaty, traume, nezhubnej hyperplazii prostaty, ejakulácii, ultrasonografii a kateterizácii močovodu (Marks *et Bostwick*, 2008). Iba malá časť koncentrácie PSA, prítomnej v sperme, môže byť detegovaná aj v krvnom obehu. Rakovina prostaty je histologicky charakterizovaná porušením bazálnej vrstvy buniek. Aj keď sa predpokladá, že zvýšená hladina PSA v sére je spôsobená porušením usporiadania prostatických buniek, presný molekulárny mechanizmus stále nie je jasne definovaný (Balk *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2009).

### 3. *UBE2C*

Ubikvitinácia je dôležitým bunkovým mechanizmom cielej degradácie proteínov, ktoré sa zúčastňujú mnohých bunkových procesov, najmä bunkového cyklu, transkripcie, apoptózy a pod. (Kerscher *et al.*, 2006). Ubikvitinácia prebieha prostredníctvom ubikvitinačných enzýmov, ktoré označia molekulu, určenú na degradáciu, mnohými molekulami ubikvitínu. Označené molekuly sú následne degradované v 26S proteazóme (Kimura *et Tanaka*, 2010; Hicke *et al.*, 2005).

*UBE2C* sa zúčastňuje bunkového delenia reguláciou prechodu bunky z metafázy do anafázy degradáciou sekurínu. Úzko spolupracuje s anafázu-podporujúcim komplexom/cyklozóm (APC/C), je potrebný k deštrukcii mitotických cyklínov a katalyzuje disociáciu kontrolných molekúl mitotického vretienka z komplexu APC/C (Stegmeier *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2007). Zvýšená expresia *UBE2C* uvoľňuje bunku z kontrolných bodov mitotického vretienka, čo umožňuje bunke opätovný vstup do mitózy (Wickliffe *et al.*, 2011).

Gén *UBE2C* je lokalizovaný na dlhom ramienku chromozómu 20 (lokus 20q13.12) a kóduje 19-kDa ubikvitín-konjugačný enzým. Proteín CDC20 (cyklus bunkového delenia 20 = cell division cycle 20), aktivátor APC (anafázu-podporujúci komplex = anaphase promoting complex), podporuje expresiu *UBE2C* na transkripčnej úrovni, pričom celkovo je známych 7 transkripčných variantov tohto génu (Kim *et Yu*, 2011; Nath *et al.*, 2011). Zvýšená expresia *UBE2C* bola identifikovaná najmä v kastrovne-rezistentnej forme rakoviny prostaty a ukázalo sa, že je pod kontrolou AR-V7 varianty (Hu *et al.*, 2012).

### 3.8 Skúmané látky

#### 1. Tamsulosin

IUPAC názov: 5-[(2R)-2-[2-(2-etoxyfenoxy)etylamo]propyl]-2-metoxybenzensulfonamid

Tamsulosin je selektívnym antagonistom  $\alpha$ -1A- a  $\alpha$ -1D-adrenoreceptorov. Tie sprostredkujú kontrakciu hladkej svaloviny prostaty. Inhibuje  $\alpha$ -adrenoreceptory, lokalizované v hladkých svaloch krčka močového mechúra a prostaty, čo vedie k relaxácii týchto svalov a zlepšuje prúdenie moču u mužov s benígnou hypertrofiou prostaty (Dunn *et al.*, 2002). Tamsulosin je dobre vstrebávaný po ústnom podaní a v organizme cirkuluje pevne viazaný na plazmatické proteíny, najmä na  $\alpha$ <sub>1</sub>-kyslý glykoproteín (Koiso *et al.*, 1996). V pečeni dochádza k jeho deetylácii a oxidatívnej deaminácii postranných reťazcov prostredníctvom cytochrómov P450, najmä izofóriem CYP 3A4 a CYP 2D6, a vylučovaný je močom ako neaktívny konjugovaný produkt (Piascik *et Abel*, 2017).

Tamsulosin sa používa k liečbe symptómov benígnej hypertrofii prostaty, zápale prostaty a pomáha pri vylúčení obličkových kameňov. Ako liečivo je dostupný na lekárske predpis vo forme tvrdej kapsuly s riadeným uvoľňovaním a s obsahom účinnej látky 0,4 mg, čo zodpovedá odporúčanej dennej dávke. Prehľad farmakokinetických parametrov tamsulosinu pre dávku 0,2 mg je uvedený v Tab. č. 1 (Matsushima *et al.*, 1998).

**Tabuľka č. 1: Farmakokinetické parametre tamsulosinu po ústnom podaní**

Parameter	Dávka 0,2 mg
C <sub>max</sub> [ng·ml <sup>-1</sup> ]	12,8 ± 2,2
T <sub>max</sub> [h]	1,6 ± 0,6
AUC [ng·hr·ml <sup>-1</sup> ]	85,5 ± 15,8
t <sub>1/2</sub> [h]	5,25 ± 0,93
CL <sub>oral</sub> [l·h <sup>-1</sup> ]	2,61 ± 0,49

Legenda:

C<sub>max</sub> = maximálna dosiahnutá koncentrácia v plazme

T<sub>max</sub> = čas pre dosiahnutie C<sub>max</sub>

AUC = plocha pod krivkou koncentrácie liečiva v krvi

t<sub>1/2</sub> = biologický polčas eliminácie

CL<sub>oral</sub> = clearance po ústnom podaní (množstvo plazmy alebo krvi, ktoré sa očistí od danej látky za jednotku času)

## 2. Tolterodin

IUPAC názov: 2-[(1R)-3-[di(propan-2-yl)amino]-1-fenylpropyl]-4-metylfenol

Tolterodin je syntetický kompetitívny antagonist muskarínových receptorov, ktorý pôsobí najmä na subtypy M2 a M3. Po ústnom podaní je tolterodin metabolizovaný v pečeni na jeho vysoko farmakologicky aktívny derivát 5-hydroxymetyltolterodin, a to oxidáciou a N-dealkyláciou prostredníctvom dvoch izoforiem cytochrómov P450, CYP 2D6 a CYP 3A4 (Postlind *et al.*, 1998). Obe formy kompetitívne blokujú muskarínové receptory, čím inhibujú väzbu acetylcholínu. Cholinergné muskarínové receptory sprostredkujú kontrakciu močového mechúra a vylučovanie slín zo slinných žliaz. Dávnejšia štúdia však potvrdila, že tolterodin má vysokú afinitu a špecifitu pre muskarínové receptory *in vivo* a vykazuje vyšší inhibičný účinok na kontrakciu svalov močového mechúra, než na sekréciu slinných žliaz (Nilvebrant *et al.*, 1997).

Tolterodin sa používa pri znížení symptómov hyperaktívneho močového mechúra, zvyšuje jeho funkčnú kapacitu, znižuje kontrakciu močového mechúra a nutkanie k močeniu. Na Slovensku je ako liečivo dostupný pod názvom Detrusitol® SR od firmy Upjohn, viazaný na lekársky predpis vo forme tvrdých kapsúl s predĺženým uvoľňovaním a s obsahom účinnej látky 4 mg. Prehľad farmakokinetických parametrov je uvedený v Tab. č. 2 (Detrol, RxList, 26.7.2021).

**Tabuľka č. 2: Farmakokinetické parametre tolterodinu po ústnom podaní kapsuly s predĺženým uvoľňovaním**

Parameter	Dávka 5 mg
$C_{\max}$ [ng·ml <sup>-1</sup> ]	1,3 ± 0,8
$T_{\max}$ [h]	2 – 6
AUC [ng·hr·ml <sup>-1</sup> ]	6,7
$t_{1/2}$ [h]	8,4 ± 3,2
$CL_{\text{oral}}$ [l·h <sup>-1</sup> ]	5,7 ± 3,8

Legenda:

$C_{\max}$  = maximálna dosiahnutá koncentrácia v plazme

$T_{\max}$  = čas pre dosiahnutie  $C_{\max}$

AUC = plocha pod krivkou koncentrácie liečiva v krvi

$t_{1/2}$  = biologický polčas eliminácie

$CL_{\text{oral}}$  = clearance po ústnom podaní (množstvo plazmy alebo krvi, ktoré sa očistí od danej látky za jednotku času)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

- Reporterová bunková línia AIZ-AR odvodená od epiteliálnej bunkovej línie ľudského karcinómu prostaty 22Rv1. Bunková línia AIZ-AR vznikla transfekciou bunkovej línie 22Rv1 reportérovým plazmidom p3ARR/ARE-luc2P/minP/hygro, ktorý obsahuje 3 kópie androgén-responzívnej oblasti (ARR), za ňou nasleduje 1 kópia androgén-responzívneho elementu (ARE) z promótorovej oblasti génu pre ľudský špecifický antigén prostaty (PSA) (Bartonková *et al.*, 2015)
- Adherentná bunková línia ľudského epiteliálneho karcinómu prostaty 22Rv1 (ECACC 105092802)

#### 4.1.2 Použitý materiál

- 6-jamkové kultivačné dosky (Techno Plastic Products)
- 96-jamkové kultivačné dosky (Techno Plastic Products)
- 96-jamkové biele dosky pre meranie luminiscencie (NUNC)
- 96-jamkové PCR dosky (Roche)
- automatické pipety 0,1 – 2,5  $\mu$ l, 0,5 – 10  $\mu$ l, 2 – 20  $\mu$ l, 10 – 100  $\mu$ l, 20 – 200  $\mu$ l, 100 – 1 000  $\mu$ l (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- filtračný papier pre western blotting (BioRad)
- fixka WesternSure® Pen (LI-COR)
- fólia pre PCR (Roche)
- hrebienok (BioRad)
- kultivačná fľaša s obsahom 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> a 150 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products)
- krycie sklíčka 22x22mm (Manzel Gläser)
- multikanálová pipeta 30-300  $\mu$ l (Eppendorf)
- nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- Petriho misky (Techno Plastic Products)
- plastová bunková škrabka (Techno Plastic Products)
- plastové mikrocentrifugačné skúmavky s objemom 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOPlastics)
- plastové centrifugačné skúmavky s objemom 15 ml a 50 ml (Techno Plastic Products)
- plastové stojany na skúmavky (Techno Plastic Products)
- plastové špičky 0,1 – 10  $\mu$ l, 10 – 200  $\mu$ l, 100 – 1 000  $\mu$ l (Eppendorf)

- plastové špičky s filtrom 100 – 1 000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- PVDF membrána (Thermo Scientific)
- sérologické pipety 0,1 – 2 ml, 1 – 5 ml, 1 – 10 ml, 1 – 25 ml (Techno Plastic Products)
- sklá pre western blotting 1,5 mm Mini-PROTEAN® (BioRad)

#### 4.1.3 Použité chemikálie a roztoky

- 4× koncentrovaný pufo do deliaceho gélu (BioRad, kat. č. 161-0798)
- 4× koncentrovaný pufo do zaostrovacieho gélu (BioRad, kat. č. 161-0799)
- 5× koncentrované Bradfordovo činidlo (Serva, kat. č. 39222.03)
- 5× koncentrovaný lyzačný pufo pre luciferázu Reporter Lysis Buffer (Promega, N112A)
- 10× koncentrovaný migračný pufo Tris/Glycin/SDS (BioRad, kat. č. 1610732)
- 10× koncentrovaný reakčný pufo pre reverznú transkriptázu M-MuLV (New England BioLabs, kat. č. B0253S)
- 10× koncentrovaný reblotačný pufo Re-blot Plus Strong Solution (MalliporeSigma, 2504)
- 10× koncentrovaný transferový pufo Tris/Glycin (BioRad, kat. č. 1610771)
- 20× koncentrovaný Tris Buffered Saline (Thermo Scientific, kat. č. 28358)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, kat. č. T4049)
- 1% Crystal Violet solution (Sigma Aldrich, V5265)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid (Sigma Aldrich, kat. č. A2792)
- 96% etanol (Lach-ner, kat. č. 20025-A99)
- Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (Sigma Aldrich, kat. č. A2383)
- antibiotikum hygromycin B 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (ChemCruz®, kat. č. 29067)
- bovinný sérový albumín (Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- bromfenolová modrá (Sigma Aldrich, B0126)
- Coenzyme A sodium salt hydrate (Sigma Aldrich, kat. č. C4780)
- chemiluminiscenčný substrát Western Sure Premium Chemiluminiscent Substrate:
  - Stable Peroxide Solution (LI-COR, kat. č. 826-13462)
  - Luminol Enhancer Solution (LI-COR, kat. č. 826-13460)
- chlorid sodný (Supelco, kat. č. 7647-14-5)
- deionizovaná voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )
- deoxyribonukleotidtrifosfáty, zásobný roztok s koncentráciou 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 
  - dATP (2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate) (TaKaRa, kat. č. 4026)
  - dCTP (2'-deoxycytidine 5'-triphosphate) (TaKaRa, kat. č. 4028)
  - dGTP (2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) (TaKaRa, kat. č. 4027)
  - dTTP (thymidine 5'-triphosphate) (TaKaRa, kat. č. 4029)



- DL-Ditiotreitol, DTT (Sigma Aldrich, kat. č. 43819)
- dodecylsírán sodný, SDS (Sigma Aldrich, kat. č. L3771)
- dihydrotestosterón (Sigma Aldrich, A8380)
- dimetylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D8418)
- doxorubicin (20 mmol·l<sup>-1</sup> zásobný roztok) (Abcam, kat. č. ab234039)
- D-luciferín (Sigma Aldrich, kat. č. L9504)
- EDTA (kyselina etylendiaminotetraoctová (Sigma Aldrich, kat. č. E9884)
- fetálne bovinné sérum – (bežné, regular)-FBS (Sigma Aldrich, kat. č. F7524)
- fetálne bovinné sérum, charcoal stripped – CS-FBS (Sigma Aldrich, kat. č. F6765)
- fosfátový pufor komerčný (SERANA, kat. č. BDL-001)
- glycerol (Lach-ner, kat. č. 40058-AT0)
- HEPES (Sigma Aldrich, kat. č. H3375)
- hybridizačná sonda UPL č. 60 pre *GAPDH* (Roche, kat. č. 417447)
- hybridizačná sonda UPL č. 44 pre *KLK3* (Roche, kat. č. 117800)
- hydrolyzačné próby pre KiCqStart® ReadyMix™ (Sigma Aldrich)
  - *FKBP5*: 5' [6FAM]AAGTGTGTGTGGGGAGGGGAAGGGT[0QA]
  - *KLK3*: 5' [6FAM]TGGGTCGGCACAGCCTGTTTCATCC[0QA]
  - *UBE2C*: 5' [6FAM]ACCCCAACGTGGACACCCAGGGTAA[0QA]
- chloroform (Sigma Aldrich, kat. č. C2432)
- inhibitor fosfatáz (Roche, kat. č. 04 906 837 001)
- inhibitor proteáz (Thermo Scientific, kat. č. 78430)
- inhibitor ribonukleáz (New England BioLabs, kat. č. M0307L)
- izopropanol (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0)
- Isorapid sprej (SchafferoVá s.r.o., kat. č. OC21025)
- KiCqStart® Probe qPCR ReadyMix™ (Sigma Aldrich, kat. č. KCQS04)
- komerčné médium RPMI-1640 (Sigma Aldrich, kat. č. R0883)
- kyselina octová (Lach-ner, kat. č. 10047-A80)
- L-glutamín (Sigma Aldrich, kat. č. F6178)
- marker molekulovej hmotnosti Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, kat. č. 1610374)
- metanol (Penta Chemicals Unlimited, kat. č. 21210-20005)
- MTT činidlo (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma Aldrich, kat. č. M2128)
- neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich, kat. č. M7145)
- náhodné primery (New England BioLabs, kat. č. S1230S)
- persírán amónny, APS (Sigma Aldrich, kat. č. A3678)

- Ponceau S (Sigma Aldrich, kat. č. P3504)
- próba Custom Assay pre FKBP5 (Roche)
- próba Custom Assay pre UBE2C (Roche)
- primery pre PCR (Sigma Aldrich)
  - *GAPDH*
    - forward: 5'-CTCTGCTCCTCCTCTTCGA-3'
    - reverse: 5'-ACGACCAAATCCGTTCACTC-3'
  - *FKBP5*
    - forward: 5'-TCCAAGACTCAGATGATGCC-3'
    - reverse: 5'-GGCACCTGTAGTTATTTGC-3'
  - *KLK3*
    - forward: 5'-ACTGCATCAGGAACAAAAGC-3'
    - reverse: 5'-GGAGGCTCATATCGTAGAGC-3'
  - *UBE2C*
    - forward: 5'-CCACAGTGAAGTTCCTCACG-3'
    - reverse: 5'-GTTGGGTTCTCCTAGAAGGC-3'
- protilátky:
  - primárna protilátka AR, mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-7305)
  - primárna protilátka  $\beta$ -aktín, mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-47778)
  - sekundárna protilátka anti-mouse (Cell Signaling Technology, kat. č. 7076S)
- reakčný pufor LightCycler 480 Probes Master (Roche, 43798220)
- reverzná transkriptáza M-MuLV (New England BioLabs, Kat. č. M0253L)
- R-tamsulosin a R-tolterodin boli darované farmaceutickou firmou FARMAK a.s., Olomouc (Doricakova *et al.*, 2017)
- síran horečnatý heptahydrát (Lachema, kat. č. 304)
- sušené mlieko (Laktino)
- TEMED (N,N,N', N'-Tetrametyl etylendiamin) (Sigma Aldrich, kat. č. 1107320100)
- Tris (Bio Basic Canada Inc., TB0194)
- Triton X-100 (Serva, kat. č. 37240)
- TRIReagent (Molecular Research Center, kat. č. TR 118)
- trypanová modrá (Sigma Aldrich, kat. č. T6146)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)
- voda zbavená nukleáz (Invitrogen, kat. č. 10977-035)

#### 4.1.4 Zloženie použitých roztokov

1× TBS/Tween pufor: 50 ml 20× TBS, 950 ml dH<sub>2</sub>O, 0,5 ml Tween 20

2× vzorkovací pufor (Loading Buffer, LB): 2,5 ml 4× zaostrovací pufor , 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerol, 2 mg bromfenolová modrá, 0,31 g DTT, doplniť do 10 ml dH<sub>2</sub>O

0,1 % Crystal Violet činidlo: 1 ml 1% Crystal Violet Solution, 10 ml dH<sub>2</sub>O

10% SDS: 10 g SDS, 100 ml dH<sub>2</sub>O

APS: 1g APS, 10 ml dH<sub>2</sub>O

Kultivačné médium CS-FBS: 500 ml RPMI-1640, 50 ml CS-FBS, 5 ml L-glutamínu, 5 ml neesenciálnych aminokyselín

Kultivačné médium regular-FBS: 500 ml RPMI-1640, 50 ml FBS, 5 ml L-glutamínu, 5 ml neesenciálnych aminokyselín

Luciferázový substrát: 5 mg D-luciferin, 10 mg ATP, 5 mg Coenzym A, 168 mg DTT, 1,32 ml Tris-acetát (1M, pH 7,8), 1,23 mg/ 6,6 µl 0,5M EDTA, 3,03 mg/ 1,23 ml 100mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

Lyzačný pufor na proteíny (zásobný roztok): 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100

Lyzačný pufor na proteíny (výsledný): 10 ml Lyzačný pufor na proteíny (zásobný), 1 tableta inhibítor fosfatáz, 1 tableta inhibítor proteáz

Migračný pufor: 900 ml dH<sub>2</sub>O, 100 ml 10× Tris/Glycine/SDS Buffer

MTT činidlo (zásobný roztok): odvážiť MTT a rozpustiť v potrebnom objeme PBS tak, aby výsledná koncentrácia bola 3 mg·ml<sup>-1</sup>

Ponceau S: 0,5 g Ponceau S, 5 ml kyseliny octovej, 100 ml dH<sub>2</sub>O

Re-blot pufor: 18 ml dH<sub>2</sub>O, 2 ml 10× Re-blot Plus Strong Solution

Transferový pufor: 100 ml 10× Tris/Glycine Buffer, 200 ml metanolu, 700 ml dH<sub>2</sub>O

Tris-acetát: podľa potrebného objemu sa rozpustí Tris vo vode a pH sa upraví kyselinou octovou

#### **4.1.5 Zoznam použitých prístrojov**

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- aparátúra pre western blotting Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- centrifúga 5810 R (Eppendorf)
- centrifúga 5415 R (Eppendorf)
- chemiluminiscenčný skener Li-COR C-DiGit™ (Li-Cor Biosciences)
- chladnička (Gorenje)
- elektroforetická komora Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Biorad)
- inkubátor CO<sub>2</sub> NB-203XL (N-BIOTEK)
- inverzný mikroskop (Novel Optics)
- laminárny box Class II Type A2 (ESCO)
- minicentrifúga FVL-2400N (Biosan)
- minitrepačka MR-1 (Biosan)
- mraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- odsávač Flask-Trap 1 (Biosan)
- prístroj na výrobu ľadu F100 Compact (Icematic)
- spektrofotometer Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- spektrofotometer NanoDrop Lite (Thermo Scientific)
- termoblok Dry Bath Incubator MD-02N (MajorScience)
- termocyklér Light Cycler 480 II (Roche)
- trepačka MR-12 (Biosan)
- ultrazvuková čistička (Bandelin electronic)
- vodný kúpeľ LCB-11D (Daihan LabTech)
- vortex (Labnet)
- zdroj jednosmerného napätia Enduro (Labnet)

#### **4.1.6 Zoznam použitých počítačových programov**

- LightCycler ® SW 1.5.0 SP4
- Image Studio Digits, Li-COR
- Software i-Control k spektrofotometru Tecan M200

## **4.2 Experimentálne postupy**

V experimentálnej časti práce boli, v závislosti na charaktere experimentu, použité dve bunkové línie: 22Rv1 a AIZ-AR. Pre experimenty MTT Assay a Reporter Gene Assay bola použitá bunková línia AIZ-AR, pre zvyšné experimenty bola použitá bunková línia 22Rv1. Obe bunkové línie boli kultivované v plastových kultivačných fľašiach v inkubátore pri teplote 37°C, 95% vlhkosti a 5% CO<sub>2</sub>. Na kultiváciu oboch bunkových línií bolo použité bežné FBS médium (ďalej ako regular-FBS). Experimenty pre MTT Assay prebiehali s použitím dvoch typov živného média – regular-FBS médium a charcoal stripped FBS médium (ďalej ako CS-FBS), ich zloženie bolo popísané v bode 4.1.4. Zvyšné experimenty prebiehali s použitím CS-FBS média, ktoré obsahovalo fetálne bovinné sérum, filtrované aktívnym uhlím, čím došlo k výraznému zníženiu steroidných hormónov. V prípade bunkovej línie AIZ-AR bolo do kultivačnej fľaše k bunkám raz týždenne aplikované antibiotikum hygromycin B v koncentrácii 0,2 mg·ml<sup>-1</sup>.

### **4.2.1 Pasáž buniek**

Na pasáž buniek bolo použité kultivačné médium regular-FBS, fosfátový pufor (ďalej ako PBS) a trypsín. Všetky komponenty boli pred kontaktom s bunkami predhriate vo vodnom kúpeli na 37°C a vložené do laminárneho boxu. Kultivačná fľaša s bunkami bola vybratá z inkubátora a pod mikroskopom bola skontrolovaná morfológia a prípadná kontaminácia buniek. Následne bola kultivačná fľaša vydezinfikovaná a umiestnená do laminárneho boxu. Médium z kultivačnej fľaše bolo odsaté a bunky na vnútornom povrchu kultivačnej fľaše boli jemne premyté 5 ml PBS. Následne bolo PBS odsaté a bol pridaný 1 ml trypsínu. Kultivačná fľaša bola umiestnená do inkubátora na cca 2 min, kým sa bunky nezačali uvoľňovať od povrchu fľaše. Po uvoľnení buniek bolo pridaných 8 ml regular-FBS média, bunková suspenzia bola zhomogenizovaná pipetou a prepipetovaná do 50ml centrifugačnej skúmavky. Zvyšok bunkovej suspenzie, ktorý nebol použitý v experimente, bol prenesený do kultivačnej fľaše a doplnený regular-FBS médium do 15 ml. Kultivačná fľaša bola umiestnená do inkubátora.

### **4.2.2 Počítanie a vysadenie buniek na kultivačnú dosku**

Vysadeniu buniek na kultivačnú dosku predchádza počítanie koncentrácie buniek. Z centrifugačnej skúmavky s bunkovou suspenziou po pasáži bolo odobratých 10 µl bunkovej suspenzie do 0,5ml mikrocentrifugačnej skúmavky a pridaných 90 µl trypanovej modrej. Vzniknutá suspenzia bola jemne vortexovaná a z nej bolo aplikovaných 10 µl na Bürkerovu komôrku. Mŕtve bunky sa po pridaní trypanovej modrej zafarbili, kdežto živé bunky ostali nezafarbené. Pod mikroskopom bol spočítaný počet živých buniek v desiatich štvorcoch komôrky a prepočítaný na počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie. Z výsledku bol vypočítaný objem bunkovej suspenzie potrebný na vysádzanie buniek. Pre MTT Assay a Reporter Gene Assay boli bunky vysádzané do jamiek v troch opakovaniach na 96-jamkové kultivačné dosky tak, aby bolo v každej jamke približne

50 000 buniek v 100  $\mu\text{l}$  média, pričom pre MTT Assay boli použité oba typy kultivačného média a pre Reporter Gene Assay bolo použité CS-FBS médium. Počas experimentov Crystal Violet Assay boli bunky vysádzané do jamiek v štyroch opakovaníach na 96-jamkové kultivačné dosky tak, aby každá jamka obsahovala približne 25 000 buniek v 100  $\mu\text{l}$  CS-FBS média. Vysádzanie buniek pre stanovenie expresie cieľových génov androgénového receptoru prebiehalo na 6-jamkové kultivačné dosky tak, aby bolo v každej jamke približne 1 milión buniek v 2 ml CS-FBS média. V každom experimente boli kultivačné dosky po vysatí buniek inkubované 24 hodín.

#### 4.2.3 Inkubácia s testovanými látkami

Po uplynutí inkubačnej doby nasledovala výmena kultivačného média za nové médium s testovanými látkami, negatívnou a pozitívnou kontrolou. Pred aplikáciou jednotlivých roztokov bolo z jamiek kultivačnej dosky opatrne odsaté staré kultivačné médium.

- a) V experimente MTT Assay boli zásobné roztoky testovaných látok riedené v kultivačnom médiu 1 000 $\times$  a na bunky boli aplikované vo výslednej koncentrácii 1, 10, 50 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pozitívna kontrola bola pripravená zriedením 20% tritonu 10 $\times$  v kultivačnom médiu. Negatívna kontrola bola pripravená zriedením DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000.
- b) Pre Reporter Gene Assay boli zásobné roztoky testovaných látok riedené v kultivačnom médiu 1 000 $\times$  a na bunky boli aplikované v nasledujúcich koncentráciách: tamsulosin v koncentrácii 0,01; 0,1; 1; 10 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , tolterodin v koncentrácii 0,001; 0,01; 0,1; 1 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do každej skúmavky s testovanými látkami bol pridaný ligand androgénového receptora DHT s výslednou koncentráciou 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pozitívna kontrola bola pripravená zriedením DHT (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zásobný roztok) a DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000. Negatívna kontrola bola pripravená zriedením DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:500.
- c) Experiment Crystal Violet Assay bol vykonaný s testovanou látkou tolterodin, ktorej zásobný roztok bol riedený v kultivačnom médiu 1 000 $\times$ , na bunky bola látka aplikovaná v koncentrácii 0,01; 0,1 a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . K testovanej látke bol do každej skúmavky pridaný DHT s výslednou koncentráciou 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Negatívna kontrola bola pripravená zriedením DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:500. Pozitívne kontroly boli pripravené dve, prvá bola pripravená zriedením DHT a DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000, pričom výsledná koncentrácia DHT bola 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Druhá pozitívna kontrola bola pripravená zriedením DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000 a doxorubicinu s výslednou koncentráciou 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pripravené roztoky boli pipetované do 96-jamkovej dosky s bunkami po 100  $\mu\text{l}$  na jamku.

d) Pre stanovenie expresie cieľových génov androgenového receptoru boli testované látky riedené v kultivačnom médiu 1 000×, na bunky boli aplikované v nasledujúcich koncentráciách: tamsulosin v koncentrácii 0,1, 1, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a tolterodin v koncentrácii 0,01, 0,1, 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  spoločne s DHT s výslednou koncentráciou 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pozitívna kontrola bola pripravená riedením DMSO a DHT v kultivačnom médiu v pomere 1:1 000, pričom výsledná koncentrácia DHT bola 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Negatívna kontrola bola pripravená riedením DMSO v kultivačnom médiu v pomere 1:500. Pripravené roztoky boli pipetované do 6-jamkovej kultivačnej dosky s bunkami po 2 ml na jamku.

#### **4.2.4 MTT Assay**

Vysadenie buniek na kultivačnú dosku a inkubácia s testovanými látkami boli popísané v bode 4.2.2 a 4.2.3. Po skončení 24-hodinovej inkubácie buniek s testovanými látkami nasledovala aplikácia MTT činidla, zriedeného v PBS na výslednú koncentráciu 0,3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Kultivačná doska bola vybratá z inkubátora a médium bolo opatrne vyklepané do odtoku. K bunkám do jednotlivých jamiek kultivačnej dosky bolo aplikovaných 100  $\mu\text{l}$  MTT činidla a bunky boli inkubované cca 30 min, kým sa nevytvorili kryštáliky, pozorovateľné ako modré sfarbenie. Pre rozpustenie kryštálikov bolo pridaných 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Výsledky testu boli odmerané pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 570 nm.

#### **4.2.5 Reporter Gene Assay**

Vysadenie buniek na kultivačnú dosku a inkubácia s testovanými látkami boli popísané v bode 4.2.2 a 4.2.3. Časový interval experimentov pre Reporter Gene Assay bol zvolený na 4 hod a 24 hod. Po skončení inkubácie buniek bolo médium vyklepané a k bunkám bolo aplikovaných 25  $\mu\text{l}$  1× lyzačného pufru pre luciferázu do každej jamky. Kultivačné dosky boli uložené na 20 – 30 min do mraziaceho boxu (-80 °C). Po uplynutí tejto doby boli kultivačné dosky rozmrazené miešaním na trepačke asi 20 min. Následne bolo z kultivačných dosiek aplikovaných 20  $\mu\text{l}$  lyzátu buniek do čistých kultivačných dosiek, určených na meranie luminiscencie. K lyzátu bolo pridaných 50  $\mu\text{l}$  substrátu pre luciferázu a experiment bol vyhodnotený pomocou spektrofotometra, meriaceho chemiluminiscenciu.

#### **4.2.6 Crystal Violet Assay**

Stanovenie cytotoxicity pomocou Crystal Violet Assay bolo vykonané pre testovanú látku tolterodin. Vysadenie buniek na kultivačnú dosku a inkubácia buniek s testovanou látkou boli popísané v bode 4.2.2 a 4.2.3. Po uplynutí 24-hodinovej inkubačnej doby bolo kultivačné médium opatrne vyklepané do odtoku. Jednotlivé jamky boli premyté 30  $\mu\text{l}$  PBS, po vyklepaní PBS bolo k bunkám pridaných 60  $\mu\text{l}$  0,1% Crystal Violet solution a kultivačné dosky boli inkubované 1 – 1,5 h na trepačke. Následne bolo Crystal Violet solution vyklepané a jamky boli 5× premyté

60  $\mu$ l PBS. Po premytí bolo aplikovaných 200  $\mu$ l metanolu a výsledok experimentu bol odmeraný pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 595 nm.

#### **4.2.7 Izolácia RNA**

Izolácii RNA z buniek predchádza kultivácia a inkubácia buniek s testovanými látkami, tento postup bol popísaný vyššie. Po skončení 4 a 24-hodinovej inkubácie buniek bol do každej jamky s bunkami aplikovaný 1 ml TRIReagentu špičkou s filtrom. Bunkovou škrabkou bol lyzát buniek v každej jamke zoškrabaný z povrchu kultivačnej dosky a prepipetovaný do 1,5ml mikrocentrifugačných skúmaviek. K lyzátu bolo pridaných 200  $\mu$ l chloroformu, skúmavky boli 60 s intenzívne miešané a následne sa nechali stáť 10 min pri laboratórnej teplote. Následne boli skúmavky centrifugované 15 min pri najvyšších otáčkach a 4°C, čím sa bunkový lyzát v skúmavkách rozdelil na vodnú fázu a organickú fázu. Vodná fáza bola odobratá do čistých mikrocentrifugačných skúmaviek, k nej bolo pridaných 500  $\mu$ l izopropanolu, skúmavky boli vortexované a nechali sa stáť približne 8 min pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby boli skúmavky centrifugované 13 min pri najvyšších otáčkach a pri 4°C, čím došlo k vytvoreniu bieleho precipitátu RNA na dne skúmaviek. Izopropanol bol zo skúmaviek vyliaty a biely precipitát RNA bol 2 $\times$  premytý 1 ml 75% etanolu. Po premytí bol etanol vyliaty, precipitát v skúmavkách bol vysušený v termobloku 30 s pri 65°C a k precipitátu bolo pridaných 30  $\mu$ l vody bez nukleáz. Skúmavky sa nechali 5 min inkubovať v termobloku pri 65°C, aby sa RNA dobre rozpustila vo vode. Koncentrácia izolovanej RNA bola odmeraná na Nanodrope a skúmavky boli uchovávané v mraziacom boxe pri -80°C.

#### **4.2.8 Reverzná transkripcia**

Vzorky RNA pre reverznú transkripciu boli pripravené do čistých mikrocentrifugačných skúmaviek tak, aby každá vzorka obsahovala 1 000 ng RNA v 5  $\mu$ l roztoku. K jednotlivým vzorkám RNA bol pridaný 1  $\mu$ l náhodných primerov (Random Primers) s koncentráciou 100 pmol $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup> a skúmavky boli inkubované v termobloku 5 min pri 65°C. Mikrocentrifugačné skúmavky boli následne ochladené v ľade a krátko premiešané v centrifúge. Ku každej vzorke bolo pridaných 6  $\mu$ l reakčnej zmesi, pripravenej podľa tabuľky č. 3, a skúmavky boli opäť krátko premiešané v centrifúge. Vzorky boli inkubované 1 hod pri 42°C a následne 10 min pri 65°C. Po inkubácii boli vzorky ochladené v ľade 2 min, vzniknutá cDNA bola 10 $\times$  zriedená pridaním 108  $\mu$ l vody bez nukleáz, vzorky boli premiešané a uchovávané v mraziacom boxe pri -80°C.



**Tab. č. 3: Zloženie reakčnej zmesi reverznej transkripcie pre jednu vzorku**

Položka	Objem [ $\mu$ l]
Reverzná transkriptáza M-MuLV	0,6
Inhibítor ribonukleáz	0,3
dNTP (10 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> zásobný roztok)	0,6
10 $\times$ reakčný pufor	1,2
Voda zbavená nukleáz	3,3
Celkom:	6,0

#### 4.2.9 qPCR

Kvantitatívna PCR vzoriek bola vykonaná pomocou primerov pre 4 gény: *GAPDH*, *FKBP5*, *UBE2C* a *KLK3*. Reakčné zmesi pre jednotlivé gény boli pripravené do mikrocentrifugačných skúmaviiek podľa daného zloženia (viď tab. 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10). Následne boli reakčné zmesi prepipetované do PCR dosiek po 8  $\mu$ l na jamku a do každej jamky boli pridané 2  $\mu$ l vzorky DNA. PCR dosky boli prelepené fóliou, premiešané v centrifúge po dobu 3 min pri 4°C a vložené do termocykléra. Časť experimentov bola vykonaná pomocou odlišnej PCR reakčnej zmesi (KiCq®Start Probe qPCR ReadyMix) z dôvodu ukončenia predaja pôvodne používaných chemikálií.

**Tab. č. 4: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *GAPDH***

Položka	Objem [ $\mu$ l]
Probes Master	5,0
UPL 60	0,2
F+R primer pre <i>GAPDH</i> (5 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	0,8
Voda zbavená nukleáz	2,0

**Tab. č. 5: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *FKBP5***

Položka	Objem [ $\mu$ l]
Probes Master	5,0
Custon Assay <i>FKBP5</i>	0,5
Voda zbavená nukleáz	2,5

**Tab. č. 6: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *UBE2C***

<b>Položka</b>	<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>
Probes Master	5,0
Custon Assay <i>UBE2C</i>	0,5
Voda zbavená nukleáz	2,5

**Tab. č. 7: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *KLK3***

<b>Položka</b>	<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>
Probes Master	5,0
UPL 44	0,2
F+R primer pre <i>KLK3</i> ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,8
Voda zbavená nukleáz	2,0

**Tab. č. 8: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *FKBP5* (KiCqStart® Probe Assay)**

<b>Položka</b>	<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>
KiCqStart Probe qPCR ReadyMix	5,0
F+R primer pre <i>FKBP5</i> ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,3
Próba	0,2
Voda zbavená nukleáz	2,5

**Tab. č. 9: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *KLK3* (KiCqStart® Probe Assay)**

<b>Položka</b>	<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>
KiCqStart Probe qPCR ReadyMix	5,0
F+R primer pre <i>KLK3</i> ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,3
Próba	0,2
Voda zbavená nukleáz	2,5

**Tab. č. 10: Zloženie reakčnej zmesi PCR pre gén *UBE2C* (KiCqStart® Probe Assay)**

Položka	Objem [ $\mu$ l]
KiCqStart Probe qPCR ReadyMix	5,0
F+R primer pre <i>UBE2C</i> ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,3
Próba	0,2
Voda zbavená nukleáz	2,5

**Tab. č. 11: Časový a teplotný profil PCR reakcie:**

Proces	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná inkubácia	95	10 min	1
Amplifikácia	95	10 s	45
	60	30 s	
Chladienie	40	30 s	1

#### 4.2.10 Izolácia proteínov

Kultivácia a inkubácia buniek s testovanými látkami bola popísaná vyššie. Po skončení 4- a 24-hodinovej inkubácie buniek boli jamky prepláchnuté  $1\times$  PBS a následne bol do každej jamky napipetovaný 1 ml  $1\times$  PBS. Pomocou škrabky boli bunky v každej jamke zoškrabané z povrchu kultivačnej dosky a prepipetované do čistých 1,5ml mikrocentrifugačných skúmaviiek a okamžite umiestnené na ľad. Následne boli skúmavky centrifugované 5 min pri 4 600 rpm ( $1\ 987\ \text{g}$ ) a  $4\ ^{\circ}\text{C}$ . Vzniknutý supernatant bol odstránený zo skúmavky, k peletu bolo pridaných 80 – 100  $\mu$ l lyzačného pufra a pelet bol zhomogenizovaný. Následne bola vykonaná aj mechanická lyzácia pomocou sonikátora. Skúmavky boli centrifugované 15 min pri najvyšších otáčkach a pri  $4\ ^{\circ}\text{C}$ . Supernatant obsahujúci proteíny bol odobratý do čistých 1,5ml mikrocentrifugačných skúmaviiek a bola odmeraná koncentrácia proteínov Bradfordovou metódou.

#### 4.2.11 Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou

Meranie koncentrácie proteínov prebiehalo v 96-jamkovej kultivačnej doske. Vzorky boli  $5\times$  zriedené vodou zbavenou proteáz. Následne boli vzorky napipetované v dvoch opakovaniach do 96-jamkovej kultivačnej dosky po 10  $\mu$ l na jamku. Do kultivačnej dosky bola taktiež napipetovaná voda a BSA v koncentráciách 0,2; 0,4 a  $0,6\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ku všetkým vzorkám bolo pridaných 200  $\mu$ l  $1\times$  Bradfordovho činidla a koncentrácia proteínov bola odmeraná pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 586 nm.

#### 4.2.12 SDS-PAGE

##### a) Príprava vzoriek

Na základe výpočtov z merania koncentrácie proteínov boli pripravené vzorky pre SDS-PAGE tak, aby každá vzorka obsahovala približne 20 µg proteínov v 20 µl vzorky. Všetky vzorky boli zmiešané s 2× LB v pomere 1:1. Pripravené vzorky boli vortexované a inkubované v termobloku 5 min pri 95 °C.

##### b) Príprava gélov

Krycie a podložné sklá boli umyté 70% EtOH a vložené do plastovej aparatury na prípravu gélov. Ako prvý bol pripravený 10% deliaci gél podľa návodu v Tab. č. 12. Roztok bol premiešaný a okamžite napipetovaný medzi pripravené sklá do výšky približne 2 cm od horného okraja krycieho skla. Deliaci gél bol prevrstvený 400 µl izopropanolu, aby sa vyrovnala hladina gélu a nechal sa polymerovať 20 min.

Po stuhnutí deliaceho gélu bol vyliaty izopropanol, priestor medzi sklami bol 3× premytý vodou a jemne osušený filtračným papierom. Následne bol pripravený zaostrovací gél podľa návodu v Tab. č. 13, napipetovaný na deliaci gél až po okraj krycieho skla, medzi sklá bol vložený hrebienok a zaostrovací gél sa nechal polymerovať 30 min.

**Tab. č. 12: Zloženie 10% deliaceho gélu pre 1 gél s hrúbkou 1,5 mm**

Položka	Objem
40% Akrylamid	2,5 ml
deionizovaná voda	4,9 ml
4× pufor do deliaceho gélu (Tris/HCl, pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl

**Tab. č. 13: Zloženie zaostrovacieho gélu pre 1 gél s hrúbkou 1,5 mm**

Položka	Objem
40% Akrylamid	400 µl
deionizovaná voda	2,56 ml
4× pufor do zaostrovacieho gélu (Tris/HCl, pH 6,8)	1 ml
10% SDS	40 µl
APS	30 µl
TEMED	4 µl

c) SDS-PAGE

Pripravené gély boli vložené do elektroforetickej komôrky, následne bol naliaty migračný pufor a opatrne boli odstránené hrebienky z gélov. Do prvej jamky boli napipetované 2 µl markeru relatívnej molekulovej hmotnosti, do zvyšných jamiek bolo napipetovaných 20 µl pripravených vzoriek. Následne bola uzatvorená elektroforetická komôrka a elektroforéza prebiehala pri 60 mA a 120 V po dobu 30 min, kým sa vzorky dostali na hranu zaostrovacieho a deliaceho gélu. Potom bolo nastavených 120 mA, 150 V a nechala sa dokončiť elektroforéza približne 1 hod, kým sa vzorky nedostali približne 0,5 cm od spodného okraja gélu.

#### 4.2.13 Western Blotting (WB)

d) Prenos proteínov na PVDF membránu

Po skončení elektroforézy bol z nádoby vyliaty migračný pufor, sklá s gélom boli vybraté z aparatury, krycie sklo a zaostrovací gél boli odstránené a deliaci gél bol presunutý do transfer pufra. PVDF membrána bola hydratovaná v 100% metanole po dobu približne 3 min, 2× opláchnutá v destilovanej vode po dobu 10 min a prenesená do transfer pufra. Filtračné papiere boli namočené v transfer pufri. Do aparatury pre WB bolo nasledovne vrstvené: 2× filtračný papier, membrána, gél, 2× filtračný papier. Každá vrstva bola jemne uhladená valčekom, aparatura bola uzavretá a WB sa vykonal pri 380 mA a 23 V po dobu 2 hod.

e) Detekcia proteínov

Po uplynutí doby prenosu bola aparatura rozobratá. Membrána bola premytá v destilovanej vode 3× po 5 min, farbená v roztoku Ponceau S po dobu 5 min a premytá v destilovanej vode 3× po 5 min. Následne bola membrána umiestnená do roztoku 5% mlieka v TBS/Tween a inkubovaná po dobu 1 hod na trepačke. Po uplynutí tejto doby bol pripravený roztok 5% BSA v TBS/Tween, do ktorého boli pridané primárne protilátky pre AR v pomere 1:250 a membrána bola inkubovaná s roztokom primárnych protilátok cez noc v chladničke na trepačke.

Následujúce ráno bola membrána premytá v TBS/Tween 3× po 10 min. Do roztoku 5% mlieka v TBS/Tween boli pridané sekundárne protilátky v pomere 1:2 000 a membrána bola inkubovaná s roztokom sekundárnych protilátok na trepačke po dobu 1 hod. Po uplynutí tejto doby bola membrána premytá v TBS/Tween 3× po 5 min, marker molekulovej hmotnosti bol označený fixou, membrána bola inkubovaná s chemiluminiscenčným substrátom po dobu 5 min (luminol substrát + luminol enhancer v pomere 1:1) a signál bol detegovaný pomocou chemiluminiscenčného skenera.

Po detekcii AR bola membrána premytá v TBS/Tween po dobu 5 min a inkubovaná v Re-blot pufri po dobu 15 min. Membrána bola premytá v roztoku 5% mlieka v TBS/Tween 2× po 5 min. Do roztoku 5% BSA v TBS/Tween boli pridané primárne protilátky na aktín v pomere 1:2 000

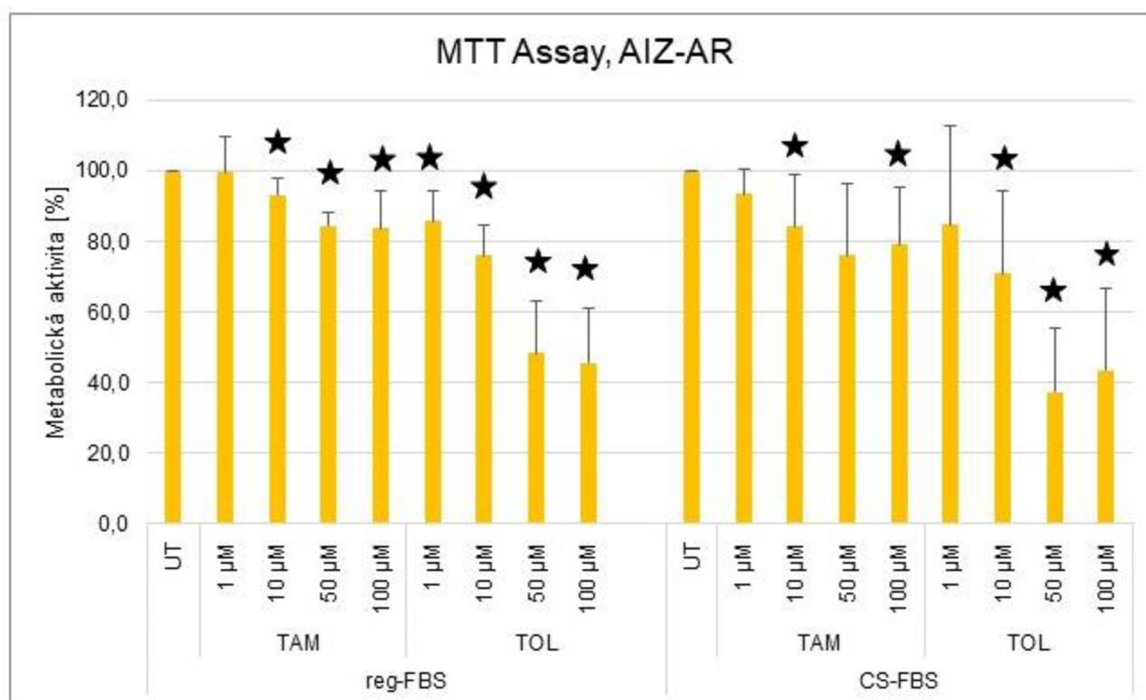
a membrána bola inkubovaná s roztokom primárnych protilátok po dobu 1 hod. Následne bola membrána premytá v TBS/Tween 3× po 5 min a inkubovaná s roztokom 5% mlieka v TBS/Tween so sekundárnymi protilátkami na aktín v pomere 1:2 000 po dobu 1 hod. Po uplynutí tejto doby bola membrána premytá v TBS/Tween 3× po 5 min a následne bola zopakovaná detekcia chemiluminiscenčným substrátom.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 MTT Assay

Cytotoxicita jednotlivých koncentrácií skúmaných látok tamsulosin a tolterodín bola stanovená pomocou MTT testu. Testovanie prebiehalo s použitím reportétovej bunkovej línie AIZ-AR, ktorá je odvodená od primárnej epiteliálnej bunkovej línie karcinómu prostaty 22Rv1. Použité boli dva typy kultivačného média, reg-FBS a CS-FBS, aby bolo vo výsledkoch experimentu možné zhodnotiť rozdiely medzi nimi. Pre obe skúmané látky boli použité koncentrácie  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , ktoré pôsobili na bunky po dobu 24 hod.

Obe testované látky vyvolali štatisticky významný, koncentračne závislý pokles metabolickej aktivity a rozdiel v cytotoxicite medzi použitými kultivačnými médiami nebol výrazný. Najväčší pokles metabolickej aktivity, ktorý predstavoval viac ako 50 %, bol zaznamenaný v prípade skúmanej látky tolterodín, a to v koncentráciách  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pre oba typy kultivačného média (Graf č. 1).

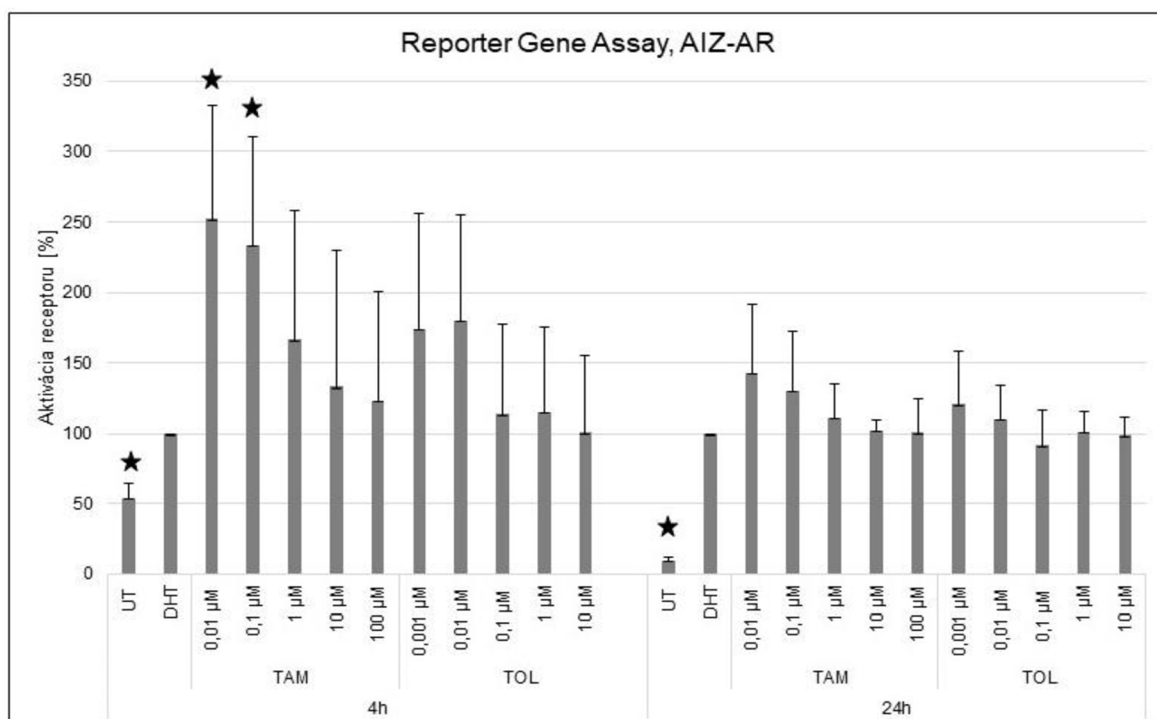


**Graf. č. 1: Metabolická aktivita bunkovej línie AIZ-AR.** Graf znázorňuje metabolickú aktivitu buniek línie AIZ-AR po pôsobení tamsulosinu a tolterodínu, vyjadrenú v percentách. Metabolická aktivita buniek bola zistená pomocou MTT testu, po pôsobení tamsulosinu a tolterodínu v koncentrácií  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , po dobu 24 hod. Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k negatívnej kontrole (UT), ktorá predstavuje 100 %. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotené pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Reporter Gene Assay

Stanovenie aktivity AR prebiehalo pomocou Reporter Gene Assay s použitím bunkovej línie AIZ-AR. Bunky boli vystavené pôsobeniu tamsulosinu a tolterodinu v kombinácii s DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , čo predstavuje antagonistický mód testovania, tzn. za prítomnosti endogénneho ligandu. Tamsulosin bol použitý v koncentracii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentracii  $0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako pozitívna kontrola aktivácie AR bol použitý DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Experiment prebiehal v 4- a 24-hodinovom časovom intervale.

Výsledky pozorovania aktivity AR po pôsobení skúmaných látok v 4-hodinovom experimente ukazujú výrazné zvýšenie aktivity receptora v porovnaní s aktiváciou DHT. K štatisticky významnému zvýšeniu aktivity AR došlo po pôsobení tamsulosinu v koncentracii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to až o  $\sim 150\%$  v porovnaní s DHT. V prípade 24-hodinového experimentu nedošlo k významnej zmene aktivovaného AR testovanými látkami v porovnaní s hodnotou pozitívnej kontroly (DHT) (Graf č. 2).



**Graf č. 2: Stanovenie aktivity AR v bunkovej líni AIZ-AR.** Graf znázorňuje aktiváciu receptora v bunkovej líni AIZ-AR, vyjadrenú v percentách. Experiment bol vykonaný v časovom intervale 4 hod a 24 hod v antagonistickom móde, tzn. k roztokom skúmaných látok bol pridaný DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pre aktiváciu AR. Tamsulosin bol použitý v koncentracii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentracii  $0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ako pozitívna kontrola bol použitý DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k pozitívnej kontrole

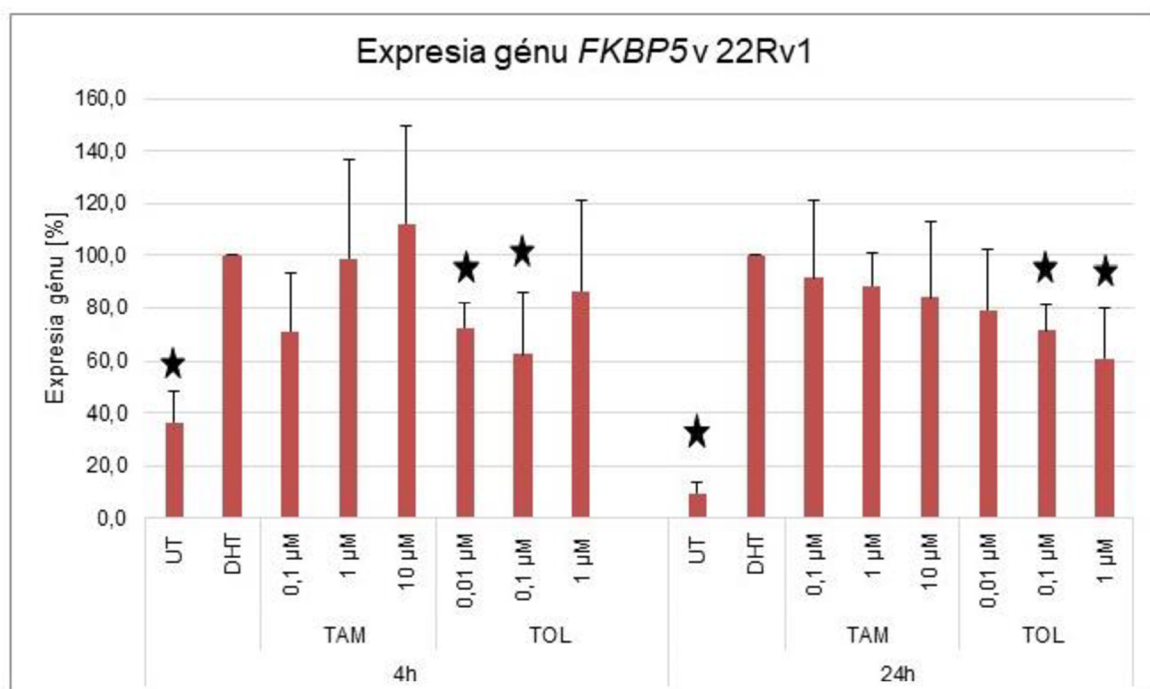


(DHT), ktorá predstavuje 100 %. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotené pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Expresia cieľových génov AR na úrovni RNA

V primárnej bunkovej línii 22Rv1 bola sledovaná expresia cieľových génov AR, a to *FKBP5*, *KLK3* a *UBE2C* (Graf č. 3, 4, a 5). Bunky 22Rv1 boli inkubované so skúmanými látkami v kombinácii s DHT s koncentráciou  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v časových intervaloch 4 hod a 24 hod. Tamsulosin bol použitý v koncentracii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentracii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Po izolácii RNA z buniek a reverznej transkripcii bola vykonaná kvantitatívna (qPCR) týchto génov. Ako pozitívna kontrola bol použitý DHT v koncentracii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu *GAPDH* a sú vzťahnuté vzhľadom k pozitívnej kontrole (DHT), ktorá predstavuje 100 %.

Indukcia expresie génov *FKBP5* a *KLK3* endogénnym ligandom AR, dihydrotestosterónom, bola 3,5 – 9× vyššia v porovnaní v negatívnu kontrolou (UT), čo dokazuje aktiváciu AR a funkčnosť použitého systému (Graf č. 3 a 4). V prípade indukcie expresie *UBE2C* nedošlo k výraznému zvýšeniu expresie po indukcii androgénmi, čo môže súvisieť s faktom, že *UBE2C* je kontrolovaný skrátanou variantou receptora, a to AR-V7, v ktorej chýba ligand-väzobná doména (Hu *et al.*, 2009).

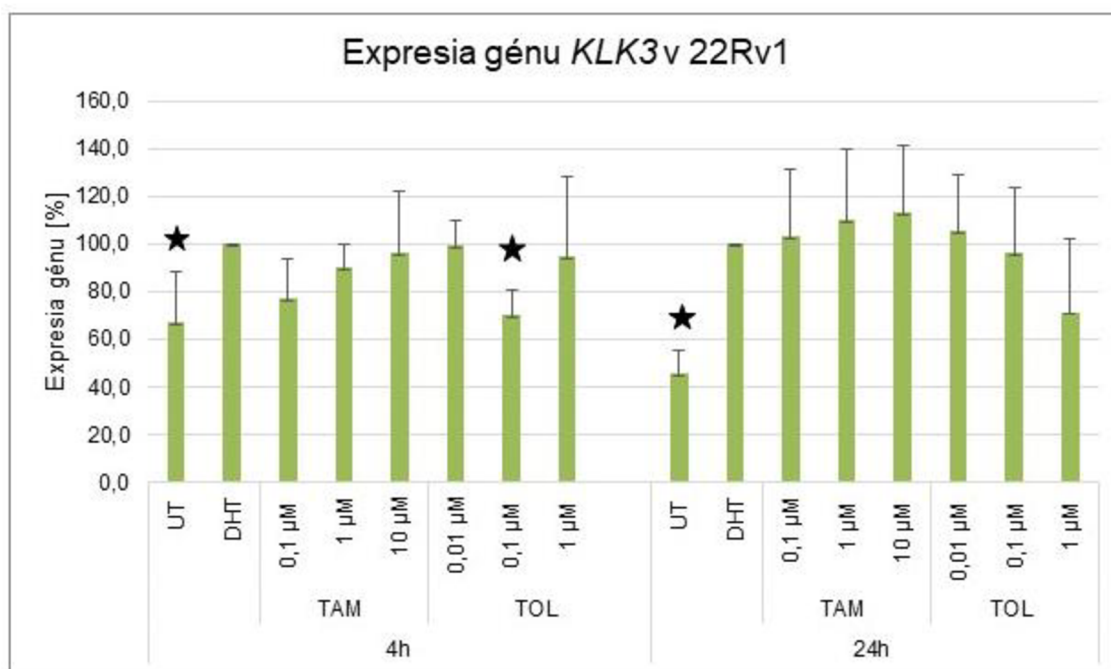


**Graf č. 3: Expresia génu *FKBP5* v bunkovej línii 22Rv1.** Bunky boli inkubované 4 hod a 24 hod s tamsulosinom a tolterodinom v kombinácii s DHT v koncentracii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tamsulosin bol použitý v koncentracii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentracii

0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k DHT a vyjadrené v percentách. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotených pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

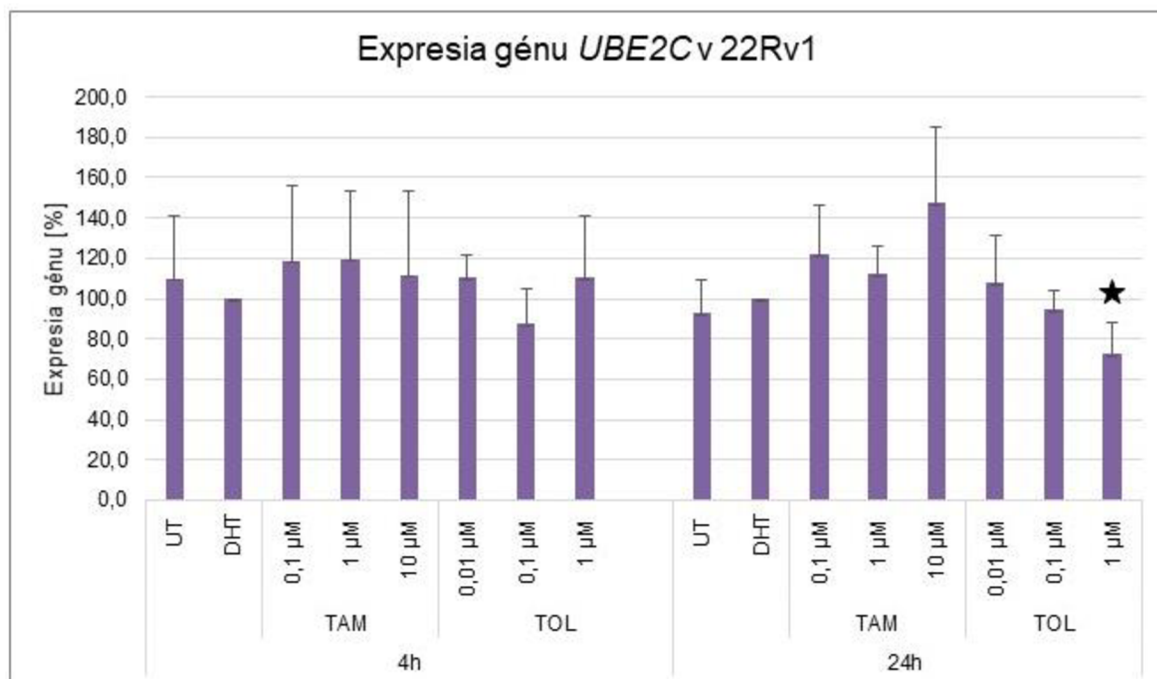
Expresia génu *FKBP5* po pôsobení skúmaných látok vykazovala veľkú variabilitu. V prípade 4-hodinového experimentu nebolo možné určiť jednoznačný trend z dôvodu nekonzistentnosti hodnôt. Naopak pri 24-hodinovom experimente spôsobili skúmané látky zníženie expresie *FKBP5* so zvyšujúcou sa koncentráciou látky, avšak väčšina hodnôt nebola vyhodnotená T-testom ako štatisticky významná. K štatisticky významnému zníženiu expresie *FKBP5* v porovnaní s pozitívnou kontrolou (DHT) došlo iba v prípade tolterodinu. Po 4 hod pôsobenia došlo k poklesu expresie o ~25 – 40 % a to v koncentracii 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V prípade 24-hodinového experimentu došlo k poklesu expresie o ~25 – 40 % v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf č. 3).

Výsledky expresie *KLK3* ukazujú, že tamsulosin ani tolterodin nemali signifikantný vplyv na indukovanú expresiu *KLK3* mRNA. Tolterodin vykazoval zníženie expresie génu najmä po 24 hod inkubácie, ale tento trend nebol štatisticky významný. (Graf č. 4).



**Graf č. 4: Expresia génu *KLK3* v bunkovej línii 22Rv1.** Bunky boli inkubované 4 hod a 24 hod s tamsulosinom a tolterodinom v kombinácii s DHT v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tamsulosin bol použitý v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentracii 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k DHT a vyjadrené v percentách. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotených pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

Hodnoty expresie génu *UBE2C* vykazovali veľkú variabilitu a nekonzistentnosť. Po 4 hod pôsobenia skúmaných látok došlo k poklesu expresie, v porovnaní s DHT, o ~15 % v prípade tolterodinu v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , avšak hodnota nie je štatisticky významná. Tolterodin spôsobil pokles expresie *UBE2C* o ~5 – 25 % aj po 24 hod pôsobenia v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pričom štatisticky významná bola iba hodnota tolterodinu v koncentrácii 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf č. 5).

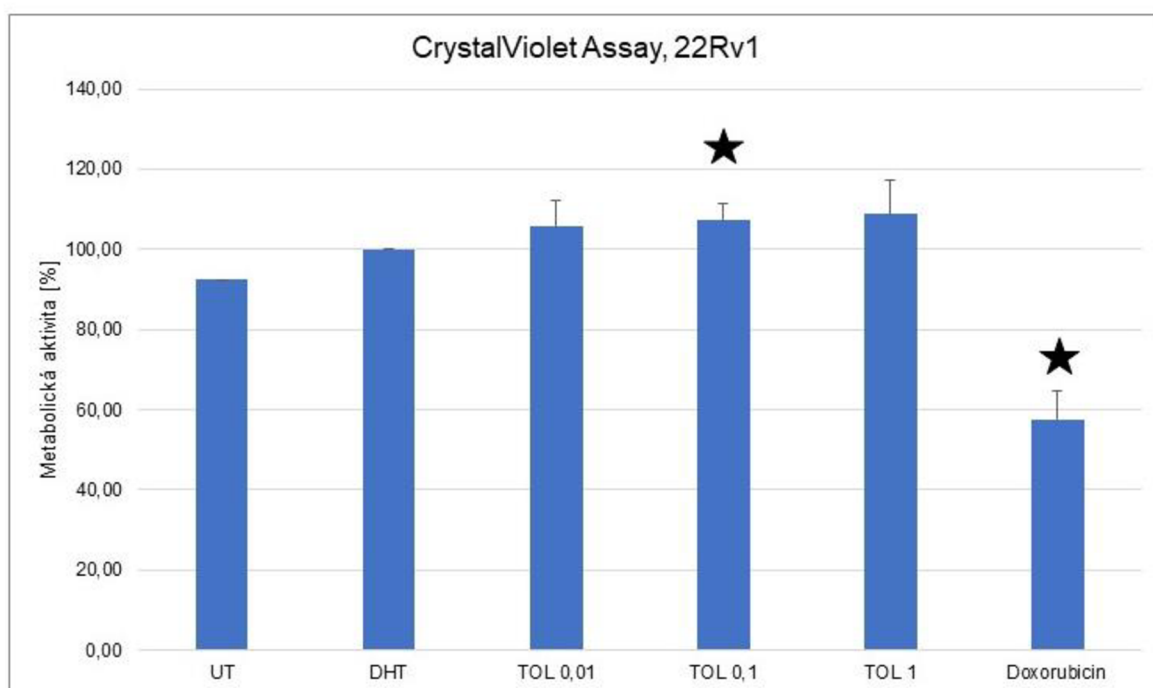


**Graf č. 5: Expresia génu *UBE2C* v bunkovej línii 22Rv1.** Bunky boli inkubované 4 hod a 24 hod s tamsulosinom a tolterodinom v kombinácii s DHT v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tamsulosin bol použitý v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentrácii 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahované vzhľadom k DHT a vyjadrené v percentách. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotené pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

## 5.4 Crystal Violet Assay

Z dôvodu vysokého poklesu expresie génu *FKBP5* po pôsobení tolterodinu, pozorovaného počas stanovenia expresie génu na úrovni mRNA, bola cytotoxicita látky tolterodin stanovená aj s použitím Crystal Violet Assay. Pre tento experiment bola použitá primárna bunková línia 22Rv1 a kultivačné médium CS-FBS. K bunkám bol pridaný tolterodin v koncentráciách 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , v kombinácii s 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  DHT. Ako pozitívne kontroly bol použitý doxorubicin v koncentracii 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a tiež DHT v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pridané roztoky látok pôsobili na bunky po dobu 24 hod.

Výsledky pôsobenia skúmaných látok na bunky línie 22Rv1 ukazujú, že tolterodin v kombinácii s DHT nepôsobí na bunky výrazne cytotoxicky. Proliferácia buniek v jednotlivých vzorkách tolterodinu bola v porovnaní s pozitívnou kontrolou (DHT) len mierne zvýšená. Štatisticky významné hodnoty boli iba pre doxorubicin a tolterodin v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf č. 6).



**Graf. č. 6: Metabolická aktivita bunkovej línie 22Rv1.** Graf znázorňuje metabolickú aktivitu buniek línie 22Rv1 po pôsobení tolterodinu, vyjadrenú v percentách. Metabolická aktivita buniek bola zistená pomocou Crystal Violet Assay, po pôsobení tolterodinu v koncentracii 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v kombinácii s DHT v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pozitívne kontroly boli dve, prvá obsahovala DHT v koncentracii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a druhá obsahovala doxorubicin v koncentracii 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k endogénemu ligandu, DHT, ktorý predstavuje 100 %. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotené pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).

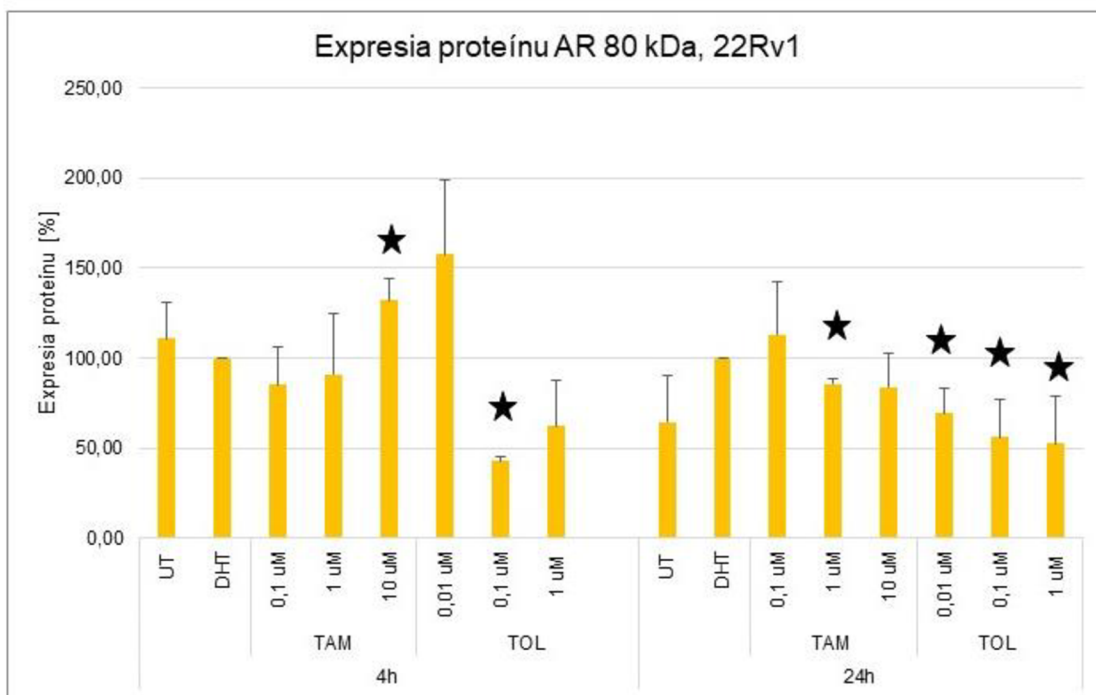
## 5.5 Expresia na úrovni proteínov

Stanovenie expresie AR na úrovni proteínu bolo vykonané pomocou metódy western blotting. Bunky 22Rv1 boli inkubované so študovanými látkami v kombinácii s DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a v časových intervaloch 4 hod a 24 hod. Tamsulosin bol použitý v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentrácii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bunková línia 22Rv1 exprimuje dve formy androgénového receptora, AR plnej dĺžky (AR-FL) a AR-V7 (Tepper *et. al.*, 2002), z toho dôvodu boli hodnotené výsledky expresie oboch variant AR. Ako pozitívna kontrola bol použitý DHT v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému proteínu  $\beta$ -aktín a sú vzťahnuté vzhľadom k pozitívnej kontrole (DHT), ktorá predstavuje 100 %. Fotografická dokumentácia výsledkov metódy western blotting je zobrazená v Obrázku č. 4.

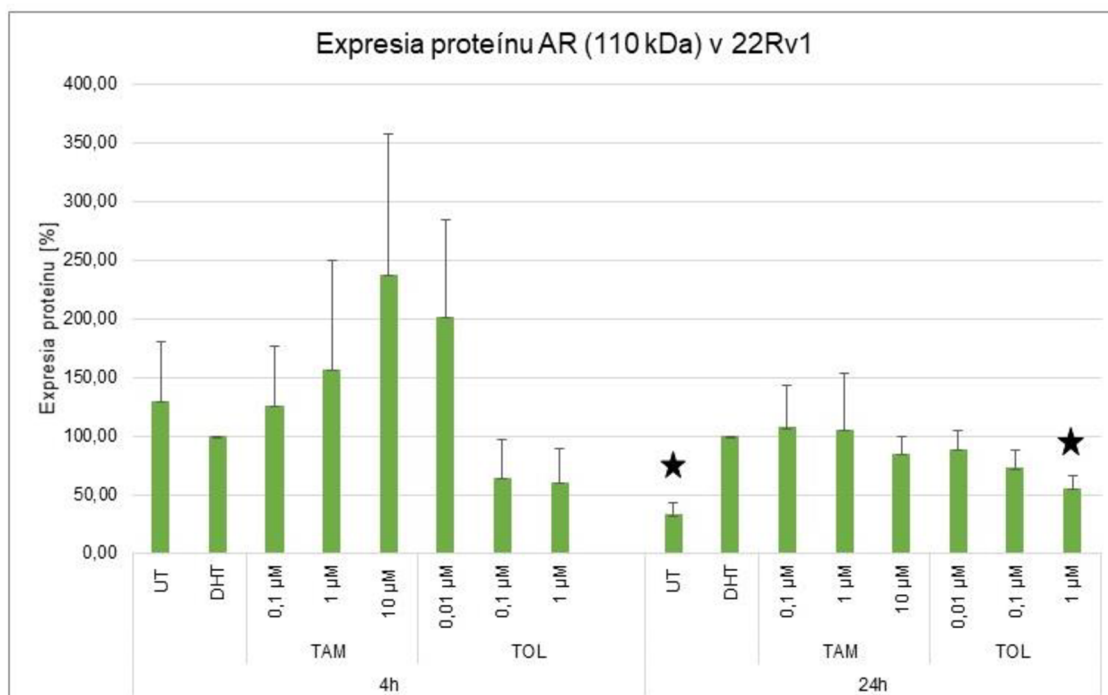
Tamsulosin vykazoval po 4 hod pôsobenia zvýšenie hladiny expresie proteínu AR so zvyšujúcou sa koncentráciou v oboch variantách AR. Pri AR-V7 (80 kDa, Graf č. 7) boli štatisticky významné hodnoty tamsulosinu v koncentrácii  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 4 hod pôsobenia, pričom došlo k zvýšeniu hladiny expresie proteínu AR o  $\sim 50\%$  v porovnaní s DHT. Druhou štatisticky významnou hodnotou tamsulosinu bola vzorka s koncentráciou  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24 hod pôsobenia, kedy došlo k zníženiu hladiny expresie proteínu o  $\sim 20\%$  v porovnaní s DHT.

Tolterodin vykazoval u oboch variant AR rovnaký trend po 4 aj 24 hod pôsobenia, kedy spôsobil zníženie hladiny expresie proteínu AR so zvyšujúcou sa koncentráciou, avšak v prípade AR-FL (110 kDa, Graf č. 8) neboli hodnoty štatisticky významné. V prípade AR-V7 varianty, tolterodin indukoval štatisticky významný pokles proteínu v rozmedzí 35 – 50 % po 24 hod pôsobenia a istá miera poklesu bola pozorovaná aj po 4 hod pôsobenia. Štatisticky významná bola však iba hodnota vzorky s tolterodinom v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Graf č. 7).

V prípade AR-FL bol pozorovaný podobný trend ako u AR-V7 a štatisticky významný pokles bol zaznamenaný len pre vzorku s tolterodinom v koncentrácii  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kedy došlo k zníženiu hladiny expresie proteínu AR-FL o viac ako 40 % v porovnaní s DHT (Graf č. 8).

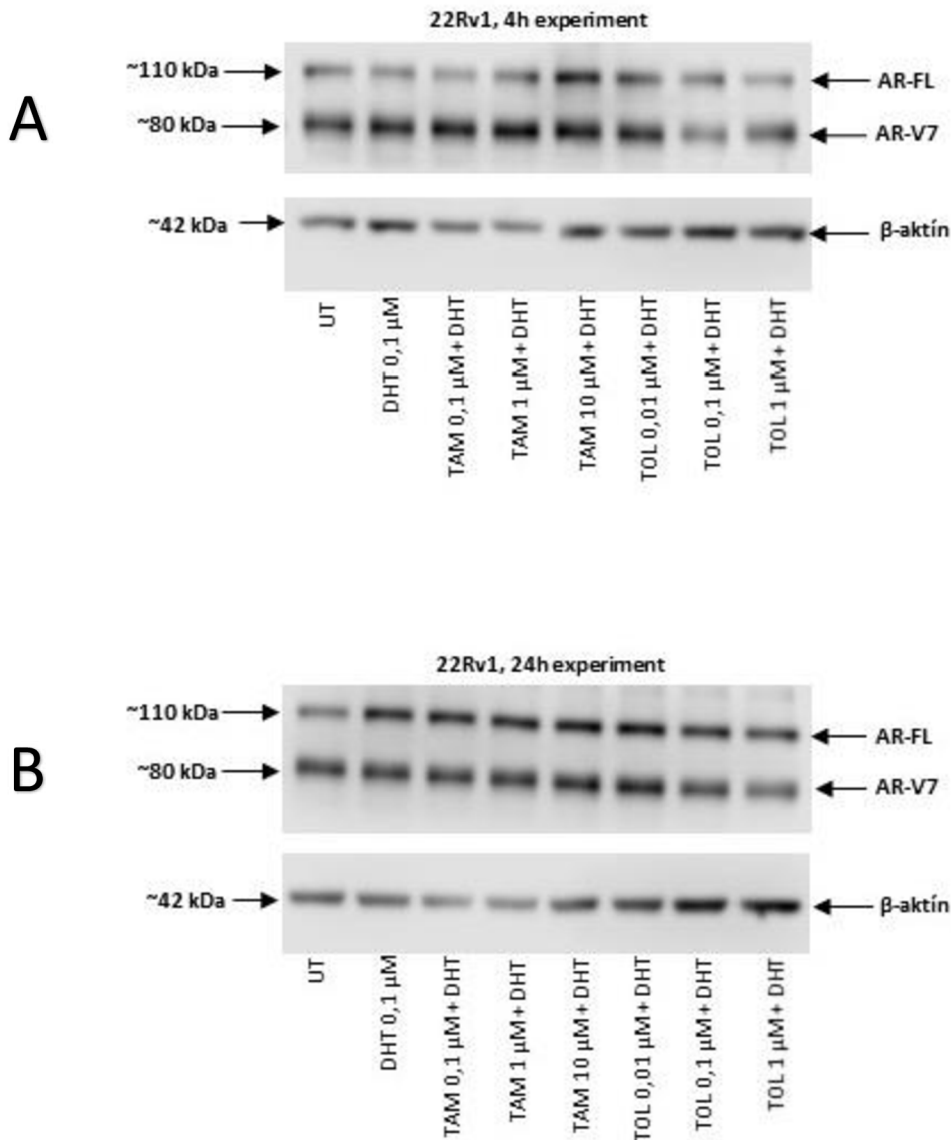


**Graf č. 7: Expresia AR-V7 na úrovni proteínu v bunkovej línii 22Rv1.** Bunky boli inkubované 4 hod a 24 hod s tamsulosinom a tolterodinom v kombinácii s DHT v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tamsulosin bol použitý v koncentrácii 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentrácii 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahované vzhľadom k DHT a vyjadrené v percentách. Získané hodnoty boli normalizované vzhľadom k referenčnému proteínu  $\beta$ -aktín. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotených pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).



**Graf č. 8: Expresia AR plnej dĺžky (110 kDa) na úrovni proteínu v bunkovej línii 22Rv1.** Bunky boli inkubované 4 hod a 24 hod s tamsulosinom a tolterodinom v kombinácii s DHT

v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tamsulosin bol použitý v koncentrácii  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tolterodin bol použitý v koncentrácii  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky sú vzťahnuté vzhľadom k DHT a vyjadrené v percentách. Získané hodnoty boli normalizované vzhľadom k referenčnému proteínu  $\beta$ -aktín. Symbol \* označuje štatisticky významné hodnoty, vyhodnotené pomocou T-testu ( $p < 0,05$ ).



**Obrázok č. 4: Reprezentatívne fotografie detekcie proteínov AR-FL a AR-V7 metódou western blot.** Časť A zobrazuje výsledok detekcie  $\beta$ -aktínu a proteínu AR-FL (110 kDa) a AR-V7 (80 kDa) v 4-hodinovom experimente. Časť B zobrazuje výsledok detekcie vyššie spomínaných proteínov v 24- hodinovom experimente. Šípkami na pravej strane sú označené detegované proteíny, šípky na ľavej strane zobrazujú molekulovú hmotnosť detegovaného proteínu. Western blotting bol vykonaný so vzorkami buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu tamsulosinu a tolterodinu v kombinácii s endogénnym ligandom receptora, DHT.

## 6 DISKUSIA

V tejto bakalárskej práci bol študovaný vplyv vybraných liečiv na aktivitu androgénového receptora. Androgénový receptor má dôležitú funkciu v ľudskom organizme pri vývine a udržiavaní homeostázy mnohých orgánových systémov, ako napr. reprodukčný systém, kardiovaskulárny systém a pod. Je tiež exprimovaný v primárnom karcinóme prostaty, kde riadi proliferáciu, apoptózu a diferenciáciu buniek. Zvýšená aktivita AR často vyúsťuje do tvorby rakoviny prostaty, čo stavia AR do stredu záujmu mnohých výskumov. Ligandy AR sú modulátormi aktivity receptora, a sú preto považované za potenciálne terapeutiká.

Táto práca je zameraná na potvrdenie/vyvrátenie inhibičného účinku tamsulosinu a tolterodinu na transkripčnú aktivitu AR. Tieto liečivá sa v klinickej praxi používajú k liečbe benígnej hypertrofii prostaty a hyperaktívneho močového mechúra (OAB). V štúdiu Hallas *et al.*, (2018) bol potvrdený preukázateľne nižší výskyt rakoviny prostaty po dlhodobej liečbe tolterodinom. Ako je spomenuté vyššie, rakovina prostaty úzko súvisí so zvýšenou aktivitou androgénového receptora, a preto je predmetom tejto práce štúdium vplyvu tamsulosinu a tolterodinu na aktivitu AR, ktorej myšlienka bola inšpirovaná výsledkami epidemiologickej štúdie Hallas *et al.*, (2018). V tejto štúdiu sledovali, okrem iného, mieru výskytu rakoviny prostaty u ľudí nad 18 rokov, ktorí užívali terapeutiká na liečbu OAB, medzi nimi aj tolterodin, po dobu 8 rokov. Osôb, užívajúcich tolterodin, bolo spolu 23 776, z toho u 1 552 došlo k vývinu rakoviny akéhokoľvek typu. Výsledky tejto štúdie ukazujú, že miera výskytu rakoviny prostaty bola 2,8 – 3,4/1000 osôb za rok. Počas prvých 6 mesiacov liečby bola zaznamenaná vyššia miera výskytu rakoviny prostaty a močového mechúra, avšak časom nadobudla miera výskytu tejto rakoviny klesajúci trend s rastúcou kumulatívnou dávkou liečiva (Hallas *et al.*, 2018).

Tamsulosin je selektívnym blokátorom  $\alpha 1$ -adrenoreceptorov. Aktivácia a spojenie  $\alpha 1$ -adrenoreceptorov s G-proteínom vedie k aktivácii rozličných efektorových enzýmov a v konečnom dôsledku modifikácii biologickej aktivity buniek. Aj keď je známe, že aktivácia  $\alpha 1$ -adrenoreceptorov vedie ku kontrakcii prostaty, presný molekulárny mechanizmus nie je zatiaľ známy (Marshall *et al.*, 1999). Je možné, že odozva signálnej dráhy  $\alpha 1$ -adrenoreceptorov sa dostaví v dlhšom časovom úseku, čo mohlo spôsobiť dočasne zvýšenú aktivitu AR po 4 hod pôsobenia, ktorá sa však po 24 hod ustálila. Tento predpoklad by však potreboval ďalšie štúdie.

Pomocou Reporter Gene Assay (RGA) som zaznamenala zvýšenú aktivitu AR po 4 hod pôsobenia tamsulosinom, avšak po 24 hod tento trend nebol zachovaný a došlo k opätovnému poklesu aktivity receptora. Tento jav mohol byť spôsobený napr. posttranslačnými modifikáciami AR, ako je fosforylácia, ktorá zvyšuje transkripčnú aktivitu AR (Gioeli *et al.*, 2002).

V rámci AR proteínu bolo doteraz identifikovaných minimálne 19 fosforylačných miest, pričom väčšina z nich sa odohráva na seríne. Jedným z fosforylačných miest AR je serín 578 (S578), ktorý



bol identifikovaný ako cieľ proteínkinázy C (PKC). Fosforylácia S578 je spojená so zvýšenou aktiváciou AR, a keďže signálna dráha muskarinových receptorov zahŕňa aj PKC, môže byť zvýšená aktivita AR spôsobená práve fosforyláciou S578 prostredníctvom PKC (Wen et al., 2020, Brown *et al.*, 1990).

V epiteliu zdravej prostaty môže byť fosforylácia S578 sprostredkovaná PAK6, pričom dochádza k asociácii AR s E3 ubikvitín ligázou, ktorá vedie k degradácii AR v dôsledku pôsobenia androgénov. Avšak v cytoplazme prostatických nádorových buniek je korelácia PAK6 a AR opačná, z čoho sa predpokladá dôležitosť PAK6 pri onkogenéze rakoviny prostaty a homeostáze AR signalizácie (Wen et al., 2020).

Maximálna plazmatická koncentrácia tolterodinu v spomínanej štúdií bola dosiahnutá  $0,004 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdežto v mojej práci bola najnižšia používaná koncentrácia  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Napriek tomu, že rozdiel medzi *in vivo* dosiahnutou a *in vitro* použitou koncentráciou je približne 2,5-násobný, je z mojich dát vidieť, že tolterodin znižuje hladinu AR proteínu, čo je sprevádzané poklesom expresie niektorých jeho cieľových génov. Dá sa teda hypotetizovať, že opakovaná aplikácia tolterodinu by mohla dlhodobo potlačiť do istej miery aktiváciu AR, čo by v konečnom dôsledku mohlo viesť k nižšiemu výskytu rakoviny prostaty, ako bolo preukázané v štúdií Hallas *et al.*, (2018).

Jedným z cieľových génov AR je aj *CHM1*, ktorý kóduje cholinergný muskarinový receptor 1. AR sa viaže do promótorovej oblasti tohto génu a potláča jeho expresiu (Prescott *et al.*, 2007). Muskarinové receptory sú exprimované vo vyššej miere aj v rakovine prostaty a ich expresia predstavuje zhoršený prognostický faktor u onkologických pacientov (Goto *et al.*, 2020). Inhibičná koncentrácia tolterodinu pre muskarinové receptory subtypu M1, M2 a M3 sa pohybuje v rozmedzí  $3,0 - 3,8 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Nilvebrant *et al.*, 1997). Keďže je tolterodin kompetitívnym antagonistom muskarinových receptorov, výsledky štúdie Hallas *et al.*, (2018) a pokles výskytu rakoviny prostaty mohol byť vyvolaný supresiou ich signalizácie s viac či menej významným vplyvom na AR, ktorý je kľúčovým faktorom v progresii rakoviny prostaty. Porovnanie inhibičných koncentrácií tolterodinu voči jednotlivým subtypom muskarinových receptorov s dosiahnutou plazmatickou koncentráciou túto možnosť nezavrhuje.

Tolterodin preukázal po 24 hod pôsobenia pokles expresie génov *FKBP5*, *KLK3* a *UBE2C*, čo sa následne potvrdilo aj pomocou western blottingu, kedy došlo k zníženej expresii oboch foriem AR na úrovni proteínu. Znížená expresia AR, a tým aj pokles jeho aktivity, by mohol mať priaznivý vplyv na potlačenie tvorby rakoviny prostaty. *UBE2C* je pod kontrolou AR-V7 varianty, ktorá je charakteristická absenciou ligand-väzobnej domény receptora, čo pravdepodobne vysvetľuje slabú indukciu expresie *UBE2C* po pôsobení dihydrotestosterónu, napriek tomu však tolterodin po 24 hod pôsobenia vykazoval zníženie expresie *UBE2C*. Vzhľadom k tomu, že *UBE2C* je

klúčovým faktorom pri bunkovom delení, mitóze, je možné hypotetizovať, že pokles expresie *UBE2C* génu povedie k nižšej proliferácii prostatických buniek a následne nižšej frekvencii výskytu rakoviny prostaty.

V porovnaní s výsledkami štúdie Hallas *et al.*, (2018), ktoré preukázali inhibičný účinok tolterodinu na tvorbu rakoviny prostaty, v mojej práci som síce nepozorovala signifikantný pokles aktivity AR (meranej metódou RGA) po pôsobení skúmaných látok, ale signifikantný pokles expresie troch skúmaných génov pod kontrolou AR bol zaznamenaný. To môže naznačovať vplyv mnou testovaných látok na proliferáciu rakoviny prostaty. Použitý bunkový model v tejto práci predstavuje len jeden z možných typov rakoviny prostaty, kdežto v spomínanej štúdií nebola rakovina prostaty bližšie histologicky charakterizovaná. Okrem toho, štúdia prebiehala 8 rokov, počas ktorých bola dávka liečiva postupne zvyšovaná a osoby užívali terapeutikum opakovane. V mojej práci nebolo z časového hľadiska možné vytvoriť prostredie pre opakovanú expozíciu testovaným látkam, čo by mohlo prispieť k potvrdeniu vyššie navrhutej hypotézy. Pre jednoznačné posúdenie vplyvu skúmaných látok by bolo potrebné vykonať viacero experimentov s opakovanou expozíciou daným látkam.

## 7 ZÁVER

V mojej bakalárskej práci som sa zaoberala moduláciou androgénového receptora (AR) tamsulosinom a tolterodinom. Tieto terapeutiká sa používajú k liečbe benígnej hyperplázie prostaty a hyperaktívneho močového mechúra. Prvým krokom bolo zistenie cytotoxického účinku skúmaných látok pomocou MTT testu. Na základe týchto výsledkov boli pre ďalšie štúdium vybrané koncentrácie, ktoré prejavili minimálny vplyv na metabolickú aktivitu buniek. Experimenty prebiehali s použitím bunkových línií AIZ-AR a 22Rv1, na ktoré bol aplikovaný tamsulosin v koncentrácií 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a tolterodin v koncentrácií 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Časové pôsobenie látok bolo zvolené 4 hod a 24 hod, medzi ktorými bol vo výsledkoch značný rozdiel. Vplyv látok na transkripčnú aktivitu AR bol stanovený pomocou Reporter Gene Assay v antagonistickom móde testovania, tzn. v prítomnosti endogénneho ligandu, DHT. Tamsulosin prejavil po 4 hod výrazne zvýšenú aktiváciu AR, ktorá po 24 hod pôsobenia nenasledovala rovnaký trend. Po 24 hod pôsobenia neprejavila žiadna z látok výrazne zvýšenú aktiváciu AR v porovnaní s DHT. Expresia cieľových génov AR na úrovni mRNA bola stanovená pomocou qPCR, a to pre gény *FKBP5*, *KLK3* a *UBE2C*. V prípade génov *FKBP5* a *KLK3* došlo po 24 hod pôsobenia tolterodinu k miernemu poklesu expresie. *UBE2C* je pod kontrolou AR-V7 varianty, ktorá je charakteristická absenciou ligand-väzobnej domény (LBD), čo sa prejavilo aj vo výsledkoch, kedy nedošlo k významnej indukcii expresie ani po pôsobení endogénneho ligandu, DHT. Hladina proteínu AR bola stanovená pomocou western blotting metódy. Tamsulosin neprejavil významný vplyv na hladinu proteínu AR. Tolterodin nasledoval rovnaký trend ako v prípade expresie cieľových génov, tzn. prejavil sa pokles hladiny proteínu so zvyšujúcou sa koncentráciou. Pre jednoznačné definovanie vplyvu tamsulosinu a tolterodinu by bol potrebný ďalší výskum. Napriek tomu boli ciele bakalárskej práce naplnené.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Andersen, R. J., Mawji, N. R., Wang, J., Wang, G., Haile, S., Myung, J.-K., Watt, K., Tam, T., Yang, Y. C., Bañuelos, C. A., Williams, D. E., McEwan, I. J., Wang, Y., & Sadar, M. D. (2010). Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell*, 17(6), 535–546.
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Luber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., Chen, Y., Mohammad, T. A., Chen, Y., Fedor, H. L., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., ... Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 371(11), 1028–1038.
- Azad, A. A., Zoubeidi, A., Gleave, M. E., & Chi, K. N. (2015). Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews. Urology*, 12(1), 26–36.
- Baker, M. E. (2002). Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *The Journal of Endocrinology*, 175(1), 121–127.
- Balk, S. P., Ko, Y.-J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 383–391.
- Bartonkova, I., Novotna, A., & Dvorak, Z. (2015). Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS One*, 10(3), e0121316.
- Bevan, C., & Parker, M. (1999). The role of coactivators in steroid hormone action. *Experimental Cell Research*, 253(2), 349–356.
- Brown, J. H., Trilivas, I., & Martinson, E. A. (1990). Muscarinic receptor regulation of protein kinase C distribution and phosphatidylcholine hydrolysis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 44, 147–156.
- Callewaert, L., Christiaens, V., Haelens, A., Verrijdt, G., Verhoeven, G., & Claessens, F. (2003). Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(1), 46–52.
- Callewaert, L., Van Tilborgh, N., & Claessens, F. (2006). Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Research*, 66(1), 543–553.
- Cantin, L., Faucher, F., Couture, J.-F., de Jésus-Tran, K. P., Legrand, P., Ciobanu, L. C., Fréchette, Y., Labrecque, R., Singh, S. M., Labrie, F., & Breton, R. (2007). Structural characterization of the human androgen receptor ligand-binding domain complexed with EM5744, a rationally designed steroidal ligand bearing a bulky chain directed toward helix 12. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30910–30919.
- Centenera, M. M., Harris, J. M., Tilley, W. D., & Butler, L. M. (2008). The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(11), 2373–2382.
- Cleutjens, K. B., van Eckelen, C. C., van der Korput, H. A., Brinkmann, A. O., & Trapman, J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6379–6388.

- Clinckemalie, L., Vanderschueren, D., Boonen, S., & Claessens, F. (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1), 1–8.
- Culig, Z., & Santer, F. R. (2014). Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2), 413–427.
- Dalal, K., Roshan-Moniri, M., Sharma, A., Li, H., Ban, F., Hessein, M., Hsing, M., Singh, K., LeBlanc, E., Dehm, S., Tomlinson Guns, E. S., Cherkasov, A., & Rennie, P. S. (2014). Selectively targeting the DNA-binding domain of the androgen receptor as a prospective therapy for prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26417–26429.
- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(1), 3–15.
- Davies, P., Watt, K., Kelly, S. M., Clark, C., Price, N. C., & McEwan, I. J. (2008). Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5), 301–314.
- Davies, T. H., Ning, Y.-M., & Sánchez, E. R. (2002). A new first step in activation of steroid receptors: Hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4597–4600.
- Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), R183-196.
- Dehm, S. M., Regan, K. M., Schmidt, L. J., & Tindall, D. J. (2007). Selective role of an NH<sub>2</sub>-terminal WxxLF motif for aberrant androgen receptor activation in androgen depletion independent prostate cancer cells. *Cancer Research*, 67(20), 10067–10077.
- Detrol (Tolterodine Tartrate): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning.* (n.d.). RxList. [online] [navštivené 26.7.2021] Dostupné z <https://www.rxlist.com/detrol-drug.htm>
- Doricakova, A., Theile, D., Weiss, J., & Vrzal, R. (2017). Differential effects of the enantiomers of tamsulosin and tolterodine on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(1), 49–59.
- Dunn, C. J., Matheson, A., & Faulds, D. M. (2002). Tamsulosin: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs & Aging*, 19(2), 135–161.
- Edwards, J., Krishna, N. S., Grigor, K. M., & Bartlett, J. M. S. (2003). Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 89(3), 552–556.
- Echeverria, P. C., & Picard, D. (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(6), 641–649.
- El-Amm, J., Patel, N., Freeman, A., & Aragon-Ching, J. B. (2013). Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Critical Review of Enzalutamide. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 7, 235–245.

- Ferro, M., Buonerba, C., Terracciano, D., Lucarelli, G., Cosimato, V., Bottero, D., Deliu, V. M., Ditunno, P., Perdonà, S., Autorino, R., Coman, I., De Placido, S., Di Lorenzo, G., & De Cobelli, O. (2016). Biomarkers in localized prostate cancer. *Future Oncology*, 12(3), 399–411.
- Finsterer, J. (2010). Perspectives of Kennedy's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 298(1–2), 1–10.
- Gao, W., Bohl, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical Reviews*, 105(9), 3352–3370.
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(13), 3001–3015.
- Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1–2), 70–78.
- Gioeli, D., Ficarro, S. B., Kwiek, J. J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A. D., White, F. M., Christian, R. E., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Weber, M. J. (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29304–29314.
- Goto, Y., Ando, T., Izumi, H., Feng, X., Arang, N., Gilardi, M., Wang, Z., Ando, K., & Gutkind, J. S. (2020). Muscarinic receptors promote castration resistant growth of prostate cancer through a FAK-YAP signaling axis. *Oncogene*, 39(20), 4014–4027.
- Grino, P. B., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1990). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126(2), 1165–1172.
- Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, D. E., Chen, H., Chen, H., Kong, X., Melamed, J., Tepper, C. G., Kung, H.-J., Brodie, A. M. H., Edwards, J., & Qiu, Y. (2009). A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Research*, 69(6), 2305–2313.
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., & Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Research*, 67(9), 4514–4523.
- Hallas, J., Margulis, A. V., Pottgård, A., Kristiansen, N. S., Atsma, W. J., Appenteng, K., de Vogel, S., Kaye, J. A., Perez-Gutthann, S., & Arana, A. (2018). Incidence of Common Cancers in Users of Antimuscarinic Medications for Overactive Bladder: A Danish Nationwide Cohort Study. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 122(6), 612–619.
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., & Schreiber, S. L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 341(6244), 758–760.
- Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*, 28(7), 778–808.
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. *Endocrine Reviews*, 23(2), 175–200.

- Hicke, L., Schubert, H. L., & Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), 610–621.
- Hills, C. J., Winter, S. A., & Balfour, J. A. (1998). Tolterodine. *Drugs*, 55(6), 813–820.
- Hoffman, R. M. (2011). Screening for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 365(21), 2013–2019.
- 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., Bova, G. S., & Luo, J. (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 69(1), 16–22.
- Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E. A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W. B., Nelson, P. S., Bluemn, E., Plymate, S. R., & Luo, J. (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 72(14), 3457–3462.
- Hur, E., Pfaff, S. J., Payne, E. S., Grøn, H., Buehrer, B. M., & Fletterick, R. J. (2004). Recognition and Accommodation at the Androgen Receptor Coactivator Binding Interface. *PLOS Biology*, 2(9), e274.
- Chen, C. D., Welsbie, D. S., Tran, C., Baek, S. H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M. G., & Sawyers, C. L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature Medicine*, 10(1), 33–39.
- Chen, Z., Zhang, C., Wu, D., Chen, H., Rorick, A., Zhang, X., & Wang, Q. (2011). Phospho-MED1-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth. *The EMBO Journal*, 30(12), 2405–2419.
- Choong, C. S., & Wilson, E. M. (1998). Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: A molecular basis for disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 21(3), 235–257.
- Jansen, F. H., Roobol, M., Jenster, G., Schröder, F. H., & Bangma, C. H. (2009). Screening for prostate cancer in 2008 II: The importance of molecular subforms of prostate-specific antigen and tissue kallikreins. *European Urology*, 55(3), 563–574.
- Johansen, K. L. (2004). Testosterone metabolism and replacement therapy in patients with end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis*, 17(3), 202–208.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., & Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 159–180.
- Kim, S., & Yu, H. (2011). Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(6), 551–558.
- Kimura, Y., & Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*, 147(6), 793–798.
- Koiso, K., Akaza, H., Kikuchi, K., Aoyagi, K., Ohba, S., Miyazaki, M., Ito, M., Sueyoshi, T., Matsushima, H., Kamimura, H., Watanabe, T., & Higuchi, S. (1996). Pharmacokinetics of tamsulosin hydrochloride in patients with renal impairment: Effects of alpha 1-acid glycoprotein. *Journal of Clinical Pharmacology*, 36(11), 1029–1038.

- Kornberg, Z., Cooperberg, M. R., Spratt, D. E., & Feng, F. Y. (2018). Genomic biomarkers in prostate cancer. *Translational Andrology and Urology*, 7(3), 459–471.
- Li, D., Zhou, W., Pang, J., Tang, Q., Zhong, B., Shen, C., Xiao, L., & Hou, T. (2019). A magic drug target: Androgen receptor. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1485–1514.
- Lilja, H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(5), 1899–1903.
- Liu, T., Brown, T. C., Juhlin, C. C., Andreasson, A., Wang, N., Bäckdahl, M., Healy, J. M., Prasad, M. L., Korah, R., Carling, T., Xu, D., & Larsson, C. (2014). The activating TERT promoter mutation C228T is recurrent in subsets of adrenal tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 427–434.
- Lu, C., & Luo, J. (2013). Decoding the androgen receptor splice variants. *Translational Andrology and Urology*, 2(3), 178–186.
- Lu, N., Wardell, S., Burnstein, K., Defranco, D., Fuller, P., Giguère, V., Hochberg, R., McKay, L., Renoir, J.-M., Weigel, N., Wilson, E., McDonnell, D., & Cidlowski, J. (2007). International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacological reviews*, 58, 782–797.
- Magee, J. A., Chang, L., Stormo, G. D., & Milbrandt, J. (2006). Direct, Androgen Receptor-Mediated Regulation of the FKBP5 Gene via a Distal Enhancer Element. *Endocrinology*, 147(1), 590–598.
- Marks, L. S., & Bostwick, D. G. (2008). Prostate Cancer Specificity of PCA3 Gene Testing: Examples from Clinical Practice. *Reviews in Urology*, 10(3), 175–181.
- Marshall, I., Burt, R. P., & Chapple, C. R. (1999). Signal transduction pathways associated with alpha1-adrenoceptor subtypes in cells and tissues including human prostate. *European Urology*, 36 Suppl 1, 42–47; discussion 65.
- Matsushima, H., Kamimura, H., Soeishi, Y., Watanabe, T., Higuchi, S., & Tsunoo, M. (n.d.). *PHARMACOKINETICS AND PLASMA PROTEIN BINDING OF TAMSULOSIN HYDROCHLORIDE IN RATS, DOGS, AND HUMANS*. 6.
- 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.
- Montaño, L. M., Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Díaz-Hernández, V., Carbajal-García, A., Campuzano-González, E., Ramírez-Salinas, G. L., Velasco-Velázquez, M. A., & Sommer, B. (2018). Testosterone induces hyporesponsiveness by interfering with IP3 receptors in guinea pig airway smooth muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 473, 17–30.
- Nadal, M., Prekovic, S., Gallastegui, N., Helsen, C., Abella, M., Zielinska, K., Gay, M., Vilaseca, M., Taulès, M., Houtsmuller, A. B., van Royen, M. E., Claessens, F., Fuentes-Prior, P., & Estébanez-Perpiñá, E. (2017). Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. *Nature Communications*, 8, 14388.
- Nakazawa, M., Antonarakis, E. S., & Luo, J. (2014). Androgen receptor splice variants in the era of enzalutamide and abiraterone. *Hormones & Cancer*, 5(5), 265–273.



- Nath, S., Banerjee, T., Sen, D., Das, T., & Roychoudhury, S. (2011). Spindle assembly checkpoint protein Cdc20 transcriptionally activates expression of ubiquitin carrier protein UbcH10. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 15666–15677.
- Nilvebrant, L., Andersson, K. E., Gillberg, P. G., Stahl, M., & Sparf, B. (1997). Tolterodine—A new bladder-selective antimuscarinic agent. *European Journal of Pharmacology*, 327(2–3), 195–207.
- Ning, Y. M., Pierce, W., Maher, V. E., Karuri, S., Tang, S.-H., Chiu, H.-J., Palmby, T., Zirkelbach, J. F., Marathe, D., Mehrotra, N., Liu, Q., Ghosh, D., Cottrell, C. L., Leighton, J., Sridhara, R., Ibrahim, A., Justice, R., & Pazdur, R. (2013). Enzalutamide for treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer who have previously received docetaxel: U.S. Food and Drug Administration drug approval summary. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(22), 6067–6073.
- Obinata, D., Takayama, K., Takahashi, S., & Inoue, S. (2017). Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers*, 9(3), E22.
- Ogino, Y., Miyagawa, S., & Iguchi, T. (2016). Subchapter 94E - Testosterone/Dihydrotestosterone. V Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Ed.), *Handbook of Hormones* (s. 515-e94E-3). Academic Press.
- Pi, M., Parrill, A. L., & Quarles, L. D. (2010). GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39953–39964.
- Piasecki, M., & Abel, P. (2017). Adrenergic Antagonists. V *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition* (s. 122–132).
- Podolak, J., Eilers, K., Newby, T., Slottke, R., Tucker, E., Olson, S. B., Lue, H.-W., Youngren, J., Aggarwal, R., Small, E. J., Graff, J. N., Alumkal, J. J., Beer, T. M., & Thomas, G. V. (2017). Androgen receptor amplification is concordant between circulating tumor cells and biopsies from men undergoing treatment for metastatic castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 8(42), 71447–71455.
- Postlind H, Danielson A, Lindgren A, Andersson SH (1998) Tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, is metabolised by cytochromes P450 2D6 and 3A in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26: 289–293.
- Prescott, J., Jariwala, U., Jia, L., Cogan, J. P., Barski, A., Pregizer, S., Shen, H. C., Arasheben, A., Neilson, J. J., Frenkel, B., & Coetzee, G. A. (2007). Androgen receptor-mediated repression of novel target genes. *The Prostate*, 67(13), 1371–1383.
- Ratajczak, T., Ward, B. K., & Minchin, R. F. (2003). Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(12), 1348–1357.
- Reddy, S. K., Rape, M., Margansky, W. A., & Kirschner, M. W. (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*, 446(7138), 921–925.
- Rennie, P. S., Bruchovsky, N., Leco, K. J., Sheppard, P. C., McQueen, S. A., Cheng, H., Snoek, R., Hamel, A., Bock, M. E., MacDonald, B. S., Nickel, B. E., Chang, C., Liao, S., Cattini, P. A., & Matusik, R. J. (1993). Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Molecular Endocrinology*, 7(1), 23–36.

- Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Brinkmann, A. O., & Trapman, J. (1991). The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), 5(12), 1921–1930.
- Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G., Faber, P. W., Schweikert, H. U., van Rooij, H. C., Zegers, N. D., Hodgins, M. B., Degenhart, H. J., Trapman, J., & Brinkmann, A. O. (1990). Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), 7866–7870.
- 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. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4–6), 813–820.
- Saporita, A. J., Zhang, Q., Navai, N., Dincer, Z., Hahn, J., Cai, X., & Wang, Z. (2003). Identification and Characterization of a Ligand-regulated Nuclear Export Signal in Androgen Receptor \*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41998–42005.
- Shaffer, P. L., Jivan, A., Dollins, D. E., Claessens, F., & Gewirth, D. T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4758–4763.
- Shafi, A. A., Yen, A. E., & Weigel, N. L. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 140(3), 223–238.
- Shang, Y., Myers, M., & Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell*, 9(3), 601–610.
- Schoenmakers, E., Alen, P., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W., & Claessens, F. (1999). Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochemical Journal*, 341(Pt 3), 515–521.
- Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W., & Claessens, F. (2000). Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 12290–12297.
- Schuur, E. R., Henderson, G. A., Kmetec, L. A., Miller, J. D., Lamparski, H. G., & Henderson, D. R. (1996). Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7043–7051.
- Slagsvold, T., Kraus, I., Bentzen, T., Palvimo, J., & Saatcioglu, F. (2000). Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), 14(10), 1603–1617.
- Sobhani, N., Neeli, P. K., D'Angelo, A., Pittacolo, M., Sirico, M., Galli, I. C., Roviello, G., & Nesi, G. (2021). AR-V7 in Metastatic Prostate Cancer: A Strategy beyond Redemption. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5515.

- Song, C. S., Her, S., Slomczynska, M., Choi, S. J., Jung, M. H., Roy, A. K., & Chatterjee, B. (1993). A distal activation domain is critical in the regulation of the rat androgen receptor gene promoter. *The Biochemical Journal*, 294 ( Pt 3), 779–784.
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., & Jacobberger, J. W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 35(7), 403–409.
- Srinivas-Shankar, U., & Wu, F. C. W. (2006). Drug insight: Testosterone preparations. *Nature Clinical Practice. Urology*, 3(12), 653–665.
- Stegmeier, F., Rape, M., Draviam, V. M., Nalepa, G., Sowa, M. E., Ang, X. L., McDonald, E. R., Li, M. Z., Hannon, G. J., Sorger, P. K., Kirschner, M. W., Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*, 446(7138), 876–881.
- Štátny ústav pre kontrolu liečiv. [online] [navštívené 20.7.2021] Dostupné z [https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page\\_id=386&lie\\_id=95320](https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=95320)
- Štátny ústav pre kontrolu liečiv. [online] [navštívené 20.7.2021] Dostupné z [https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page\\_id=386&lie\\_id=32641](https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=32641)
- Tan, M. H. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. (2015). Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3–23.
- Tanner, T. M., Denayer, S., Geverts, B., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., Spans, L., Dubois, V., Houtsmuller, A. B., Claessens, F., & Haelens, A. (2010). A 629RKLKK633 motif in the hinge region controls the androgen receptor at multiple levels. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(11), 1919–1927.
- Taplin, M. E., Bubley, G. J., Shuster, T. D., Frantz, M. E., Spooner, A. E., Ogata, G. K., Keer, H. N., & Balk, S. P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 332(21), 1393–1398.
- Tepper, C. G., Boucher, D. L., Ryan, P. E., Ma, A.-H., Xia, L., Lee, L.-F., Pretlow, T. G., & Kung, H.-J. (2002). Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Research*, 62(22), 6606–6614.
- Tilley, W. D., Marcelli, M., Wilson, J. D., & McPhaul, M. J. (1989). Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), 327–331.
- van Royen, M. E., van Cappellen, W. A., de Vos, C., Houtsmuller, A. B., & Trapman, J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 8), 1970–1979.
- Verrijdt, G., Schauwaers, K., Haelens, A., Rombauts, W., & Claessens, F. (2002). Functional Interplay between Two Response Elements with Distinct Binding Characteristics Dictates Androgen Specificity of the Mouse Sex-limited Protein Enhancer\*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35191–35201.

- Wang, C., Moya, L., Clements, J. A., Nelson, C. C., & Batra, J. (2018). Mining human cancer datasets for kallikrein expression in cancer: The “KLK-CANMAP” Shiny web tool. *Biological Chemistry*, 399(9), 983–995.
- Wang, Q., Li, W., Zhang, Y., Yuan, X., Xu, K., Yu, J., Chen, Z., Beroukhi, R., Wang, H., Lupien, M., Wu, T., Regan, M. M., Meyer, C. A., Carroll, J. S., Manrai, A. K., Jänne, O. A., Balk, S. P., Mehra, R., Han, B., ... Brown, M. (2009). Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell*, 138(2), 245–256.
- Watson, P. A., Arora, V. K., & Sawyers, C. L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(12), 701–711.
- Wen, S., Niu, Y., & Huang, H. (2020). Posttranslational regulation of androgen dependent and independent androgen receptor activities in prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, 7(3), 203–218.
- Wickliffe, K. E., Lorenz, S., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., & Rape, M. (2011). The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. *Cell*, 144(5), 769–781.
- Wolf, I. M., Heitzer, M. D., Grubisha, M., & DeFranco, D. B. (2008). Coactivators and nuclear receptor transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(5), 1580–1586.
- Zajac, J. D., & Fui, M. N. T. (2012). Kennedy’s disease: Clinical significance of tandem repeats in the androgen receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 769, 153–168.
- 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 NH<sub>2</sub>-terminal and carboxyl-terminal sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13115–13123.