



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Syntéza konjugátů testosteronu  
s nepolárními *N*-Boc-aminokyselinami**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Libor Běhal</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Miroslav Kvasnica, PhD</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Libor Běhal
Název práce	Syntéza konjugátů testosteronu s nepolárními <i>N</i> -Boc-aminokyselinami
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Miroslav Kvasnica, PhD
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	

Jednou z nedílných součástí léčby karcinomu prostaty je hormonální terapie. Ačkoli současně dostupné preparáty vykazují velmi dobré účinky při použití během terapie, jejich nasazení s sebou současně nese i zvýšené riziko výskytu rezistence a opětovné proliferace. Proto je nezbytné pro zlepšení a zkvalitnění léčby vyvíjet stále nová léčiva. Jsou prokázány antagonistické účinky vůči androgenovému receptoru po navázání nepolární *N*-Boc-L-aminokyseliny na 17. uhlík D-kruhu testosteronu. Hlavní část této bakalářské práce je proto věnována syntéze derivátů testosteronu s nepolárními aminokyselinami v L – konformaci s chráněnou aminokyselinou pomocí Boc skupiny. Syntetizované látky ovlivňovaly viabilitu nádorových linií při použití nízkých mikromolárních koncentrací. Na základě výsledků z inhibičních testů byly vybrány tři konjugáty (nesoucí aminokyseliny L-fenylalanin, L-norvalin, L-izoleucin), u nichž byl stanoven jejich vliv na transkripční aktivitu androgenového receptoru. Všechny tři látky se chovaly jako antagonisté. Látky vyvolaly snížení exprese podřízených genových produktů androgenového receptoru – PSA a Nkx. 3.1.

Klíčová slova	Rakovina prostaty, androgenový receptor, testosteron, antagonist, nepolární aminokyseliny
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Libor Běhal
Title of thesis	Synthesis of testosterone conjugates with <i>N</i> -Boc-amino acids
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Miroslav Kvasnica, PhD
The year of presentation	2024
Abstract	

Hormonal therapy is one of the prostate cancer treatment. Although currently available preparations exhibit very good effects, their application simultaneously carries an increased risk of resistance development and re-proliferation. Therefore, it is essential to develop new drugs continually to improve and enhance treatment. Antagonistic effects against the androgen receptor have been demonstrated after non-polar *N*-Boc-L-amino acid binding to the 17th carbon of the D-ring of testosterone. The main part of this bachelor thesis is therefore dedicated to the synthesis of testosterone derivatives with non-polar amino acids in the L-conformation, utilizing a protected amino acid with the Boc group. The synthesized compounds affected the viability of tumor cell lines at low micromolar concentrations. Based on the results from inhibitory tests, three conjugates (bearing the amino acids L-phenylalanine, L-norvaline, L-isoleucine) were selected, and their impact on the transcriptional activity of the androgen receptor was investigated. All three compounds behaved as antagonists, leading to a decrease androgen responsive gene products – PSA and Nkx. 3.1.

Keywords	Prostate cancer, androgen receptor, testosterone, antagonist, non-polar amino acid
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a)  
samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat panu RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, PhD. za jeho čas, trpělivý přístup a pomoc při vypracování a finalizaci mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval paní Mgr. Lucii Rárové PhD. a jejímu týmu za pomoc při vypracování experimentů zaměřených a testování buněčné viability. Rovněž děkuji Mgr. Miroslavu Peřinovi za konzultace ohledně potenciálního vlivu syntetizovaných látek na transkripční aktivitu androgenového receptoru a pomoc při realizaci experimentu signalizace androgenového receptoru.

# 1 OBSAH

1	Obsah.....	6
2	Seznam zkratek .....	8
3	Úvod .....	9
4	Cíle práce.....	10
5	Současný stav řešené problematiky.....	11
5.1	Rakovina prostaty.....	11
5.1.1	Klasifikace rakoviny prostaty .....	12
5.2	Androgenový receptor.....	12
5.2.1	Struktura .....	14
5.2.2	Mechanismus účinku (dráha) .....	17
5.2.3	Ligandy androgenového receptoru .....	19
5.2.3.1	Agonisté AR.....	19
5.2.3.2	Androgeny .....	20
5.2.3.3	Steroidní antiandrogeny .....	20
5.2.3.4	Nesteroidní antiandrogeny .....	21
6	Materiál a použité metody .....	23
6.1	Chemická část .....	23
6.1.1	Použité chemikálie.....	23
6.1.2	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	24
6.1.2.1	Všeobecný postup přípravy esterů.....	25
6.1.2.2	Všeobecný postup zpracování chemických reakcí .....	25
6.1.2.3	Identifikace látek .....	25
6.2	Biologická část .....	26
6.2.1	Biologický materiál .....	26
6.2.2	Použité chemikálie a roztoky.....	26
6.2.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	27

6.2.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	28
6.2.4.1	Adherentní buněčné linie .....	28
6.2.4.2	Příprava experimentu pro testování viability .....	28
6.2.4.3	Příprava a aplikace syntetizovaných látek .....	29
6.2.4.4	Stanovení viability buněk pomocí resazurinu .....	29
6.2.4.5	Příprava buněk pro analýzu signalizace AR .....	29
6.2.4.6	Zpracování buněčného lyzátu pro SDS-PAGE .....	30
6.2.4.7	SDS-PAGE .....	30
6.2.4.8	Imunoblotting .....	30
7	Výsledky .....	31
7.1	Chemická část .....	31
7.1.1	Příprava esterů .....	31
7.2	Biologická část .....	36
7.2.1	Hodnocení cytotoxicity připravených derivátů .....	36
7.2.2	Hodnocení signalizace androgenového receptoru .....	37
8	Diskuze .....	39
9	Závěr .....	44
10	Seznam použité literatury .....	45

## 2 SEZNAM ZKRATEK

AR	Androgenový receptor
AF	Aktivační funkce
AK	Aminokyselina
AREs	Androgen response elements
Boc	tercbutyloxikarbonyl
CSS	Charcoal stripped serum
DBD	DNA vazebná doména
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
ECACC	Evropská sbírka ověřených buněčných kultur
HR	Hinge region
HSP	Heatshock protein
LBD	Ligand vazebná doména
NTD	N-terminální doména
PMSF	Fenyl-methylsulfonylfluorid
PSA	Prostatický specifický antigen
RIPA	Radioimunoprecipitační testovací pufr
RVO	Rotační vakuová odparka
SDS	dodecylsulfát sodný
TLC	Tenkvrstvá chromatografie



### 3 ÚVOD

Steroidní hormony jsou látky nepolárního charakteru, odvozené od steranu, syntetizované ve vaječnících, placentě, kůře nadledvin či varlately. Endokrinní orgány vyúsťují do krevního řečiště, čímž je umožněn transport steroidních hormonů do cílových buněk. Skrz jejich lipofilní charakter, je nutné, aby v prostoru oběhové soustavy byly navázány na přenašečové proteiny. Transport z krve do buňky skrze plasmatickou membránu pak probíhá samovolně pomocí volné difúze. Po prostupu přes membránu se steroidní hormony váží na jaderné receptory.

Jedním ze zástupců jaderných receptorů je androgenový receptor. Tento receptor slouží jako regulátor růstu a vývoje prostaty, mužských pohlavních orgánů, sekundárních pohlavních znaků a spermatogeneze. Vazbou testosteronu či dihydrotestosteronu dochází ke změně kvartérního uspořádání a transportu androgenového receptoru do jádra buňky. Zde tento receptor vystupuje jako transkripční faktor, který moduluje expresi specifických genů. Transkripční a regulační účinky androgenového receptoru zahrnují dráhy zapojené do buněčného růstu a proliferace, progresu buněčného cyklu či apoptosy. Patologické změny androgenového receptoru vedou k chybné transdukci hormonálního signálu, což je jednou z hlavních příčin vzniku rakoviny prostaty.

Androgenový receptor je vhodný cíl kandidátní léčby nejen rakoviny prostaty. Skrz četný výskyt mutací však vyžaduje inovativní postupy v rámci organické syntézy. Tato bakalářská práce je zaměřena na syntézu nových potenciálních ligandů androgenového receptoru vycházejících ze struktury testosteronu a jejich následnou aplikaci na buněčné linie 22Rv1 a C4-2 s cílem potvrzení vlivu syntetizovaných látek na indukci buněčné smrti.

#### **4 CÍLE PRÁCE**

- Zpracování literární rešerše na téma androgenový receptor a jeho modulátory
- Syntéza konjugátů testosteronu s vybranými aminokyselinami
- Testování biologické aktivity připravených látek na buňkách karcinomu prostaty

## 5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 5.1 Rakovina prostaty

Rakovina prostaty je onemocnění mužské populace napříč všemi věkovými a etnickými skupinami. Toto onemocnění nejčastěji postihuje muže ve věku 45-60 let a je také zodpovědné za většinu úmrtí spojených s rakovinou v západních státech. Výskyt tohoto onemocnění je ovlivněn mnoha faktory a jejich kombinací. Mezi rizikové faktory řadíme zejména genetické predispozice, etnickou příslušnost, věk, obezitu a jiné faktory spojené s prostředím. Diagnostika onemocnění může být provedena pomocí biopsie, analýzy prostaty, digitálního vyšetření, nukleární magnetické rezonance nebo testováním prostatického specifického antigenu (PSA)(Chang *et al.*, 2014).

Mimo již výše zmíněné metody se pro zpřesnění diagnostiky analyzují různé specifické biomarkery nádorové proliferace, pomocí kterých by v budoucnu bylo možné určit, kteří pacienti v rizikovém stádiu by mohli mít prospěch z dlouhodobé terapie nedostatku androgenů (Cooperberg, *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014) Jedním z těchto biomarkerů je marker buněčného dělení Ki-67 ve specifických signalizačních drahách nebo sekretovaný fosfoprotein 1, díky kterému můžeme predikovat biochemickou recidivu a metastázy (Ding *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014).

Rakovinu prostaty řadíme jako nádor třídy C s omezeným mutačním zatížením (3-6 % genomu primárního nádoru). Většina genetických změn spojených s rakovinou prostaty jsou strukturální přestavby genů nebo změny v počtu kopií (Robinson *et al.*, 2009; Rebello *et al.*, 2021).

Hlavním iniciačním faktorem této nemoci jsou genetické mutace. Buňky zodpovědné za iniciaci nádoru nebo buňky adenokarcinomu prostaty pravděpodobně vznikají z bazálních nebo lumenálních buněk prostaty (Chua *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Rebello *et al.*, 2021). Lokalizovaná rakovina prostaty je poměrně často morfologicky heterogenní. Heterogenita se také vykytuje v rámci jednotlivých ložisek, kdy můžeme pozorovat genetické rozdíly mezi jednotlivými ložisky v těle (Boyd *et al.*, 2012; Bostwick *et al.*, 2004; Rebello *et al.*, 2021). Pokračující rozvoj rakoviny je provázen zvyšujícími se hladinami PSA, které poukazují na aktivitu androgenového receptoru (AR), který hraje v rozvoji

rakoviny prostaty klíčovou roli. Nemoc může nadále pokračovat i po skončení terapie, kdy po použití antagonistů AR nebo androgen deficientní terapie může vyvolat rezistenci (Espiritu *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021). V případě některých mutantních forem AR může navíc funkci částečně nebo zcela převzít glukokortikoidní receptor, což vede k neúčinné léčbě rakoviny pomocí antiandrogenů (Liu *et al.*, 2009; Boyd *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2015; Gundem *et al.*, 2015; Berglund *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021).

### **5.1.1 Klasifikace rakoviny prostaty**

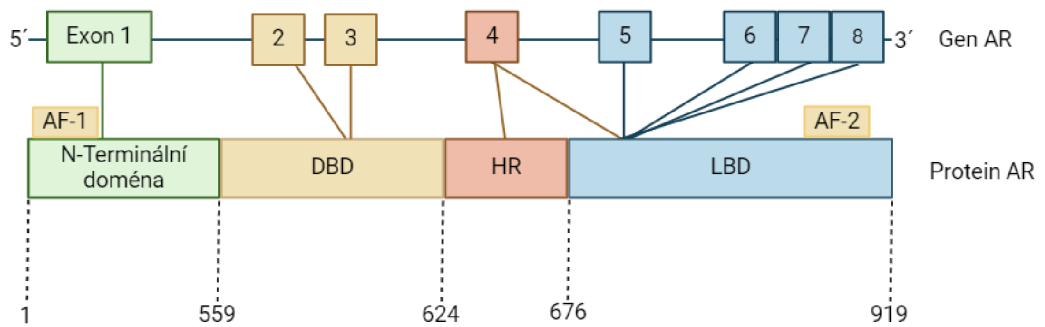
System klasifikace pro rakovinu prostaty není v současné době jednotný. Existuje však řada metod, podle kterých můžeme zhodnotit stav a závažnost onemocnění. Součástí těchto metod je TNM systém, který hodnotí výskyt a rozsah tumoru, regionálních lymfatických uzlin a metastáz. Tento systém klasifikuje rakovinu do 4 stádií (I-IV). To má ovšem své limity, a proto je nutné v případě rakoviny prostaty brát v potaz také Gleasonovo skóre a množství prostatického specifického antigenu, které blíže charakterizují stav histologického nálezu v jednotlivých metodách (Thompson *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2014).

## **5.2 Androgenový receptor**

Androgenový receptor (AR) je jedním z jaderných receptorů steroidního charakteru. Výsledkem interakce steroidního ligandu s receptorem je jaderná akumulace a indukce exprese specifického souboru genů (Shen a Coetzee, 2005). Řízení androgenového receptoru podléhá přísné kontrole, a to jak ze strany endokrinního systému, tak pomocí intrabuněčných mechanismů. Mimo vazbu hormonů či jiných ligandů je aktivita androgenového receptoru ovlivněna četnou řadou intramolekulárních i intermolekulárních interakcí. V důsledku toho tak AR rovněž vystupuje coby mediátor vzniku a proliferace tumorózní tkáně v oblasti prostaty. Androgenový receptor se účastní kardiovaskulárního, reprodukčního a muskuloskeletálního systému (Modi *et al.*, 2016). Jeho zvýšená aktivita se pojí s výskytem rakoviny prostaty. Kromě rakoviny prostaty je androgenový receptor spojován i s jinými typy rakoviny nebo anabolickými deficity.

Gen kódující androgenový receptor leží na chromosomu Xq11-12, má velikost odpovídající 90 kb a je složen celkem z 8 exonů a 7 intronů. První exon obsahuje ATG translační start kodon a celou informaci o kompletní N-terminální

doméně (NTD, 1 586 bp). DNA-vazebná doména (DBD) je reprezentována dvěma malými exony (exon 2, 152 bp; exon 3, 117 bp). Ligand-vazebná doména (LBD) je rozdělena do 5 exonů (exon 4, 288 bp; exon 5, 145 bp; exon 6, 131 bp; exon 7, 158 bp; exon 8, 153 bp). Introny mezi exony 1-2, 2-3 a 3-4 jsou velmi dlouhé (>24 kb, >15 kb a >26 kb). Zbylé introny jsou mnohem menší (5,6 kb, 4,8 kb, 0,8 kb a 0,7 kb) (Kuiper *et al.*, 1989).

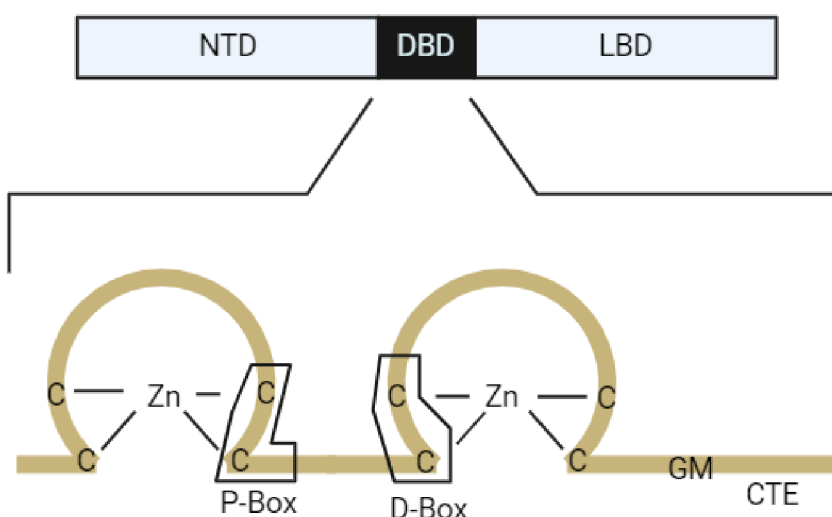


Obrázek 1 Schéma organizace androgenového receptoru včetně znázornění jednotlivých domén translatovaného proteinu. DBD – DNA vazebná doména, HR – flexibilní (hinge) region, LBD – ligand vazebná doména, AF – 1/2 - aktivační funkce androgenového receptoru 1/2 . Čísla uvedená pod schématem struktury proteinu AR určují velikost jednotlivých domén (AMK). Vytvořeno podle Messner *et al.*, 2020 pomocí softwaru Biorender.

## 5.2.1 Struktura

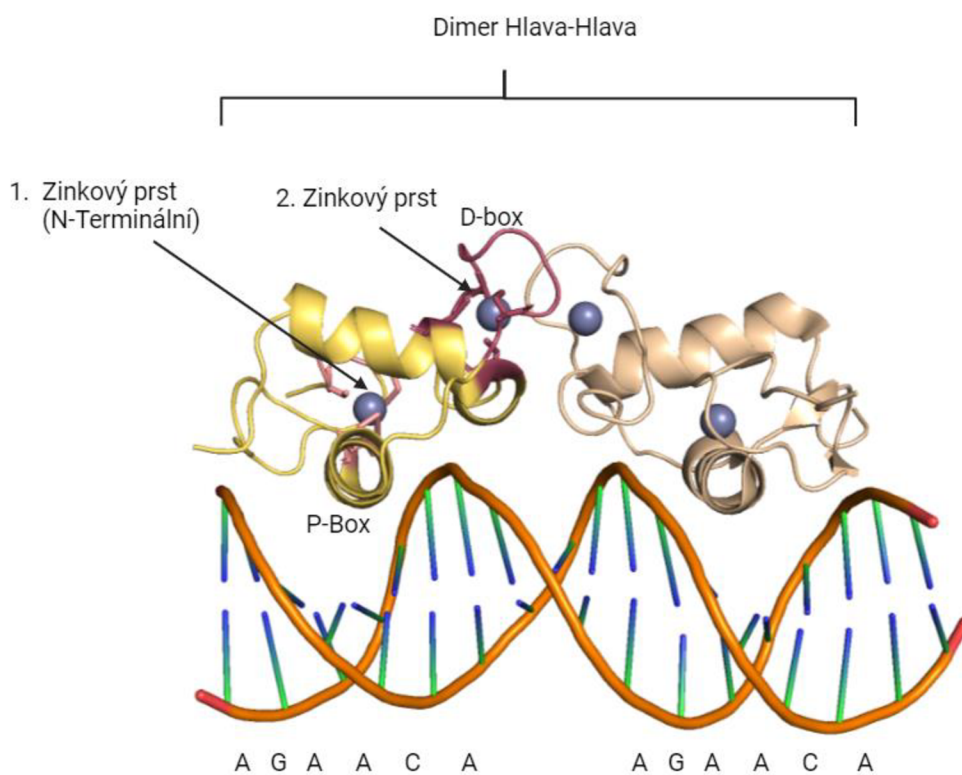
Androgenový receptor je protein složený z 920 aminokyselin o celkové velikosti 110 kDa. Mimo 110kDa variantu (AR-A) se taktéž vyskytuje 87kDa varianta (AR-B), jejíž N-terminální doména je zkrácená o prvních 187 aminokyselin. Tento receptor se skládá z několika domén, jmenovitě N-terminální domény (NTD), DNA-vazebné domény (DBD), flexibilního regionu, jež spojuje DBD a LBD, a ligand-vazebnou doménu (LBD) (Gao *et al.*, 2005; Messner *et al.*, 2020).

NTD, též známá jako aktivační doména, je součástí nezbytnou pro aktivaci LBD. Tato doména zodpovídá za aktivační funkci 1 (AF1). Mechanismus této funkce spočívá v interakci motivu <sup>23</sup>FQNLF<sup>27</sup> s aktivační funkcí 2 (AF2) na LBD a spolu s koaktivátory v iniciaci dimerizace AR. Vzniklý komplex mezi AR a androgenním ligandem je stabilizován interakcí mezi motivem <sup>433</sup>WHTLF<sup>437</sup> a LBD. V rámci NTD se navíc vyskytují dvě další transkripčně aktivační jednotky (Tau-1, Tau-5). Tau-1 se nachází mezi 100-370 residuem. Tato jednotka je závislá na funkci LBD a spolu s korespondujícími koaktivátory a korepresory je regulována její transkripční aktivita. Tau-5 se nachází mezi 360-528 residuem (Claessens *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015; He *et al.*, 2000; Jaakelainen *et al.*, 2006; Messner *et al.*, 2020).



Obrázek 2 Schématické znázornění zinkových prstů P-boxu a D-boxu DNA vazebné domény. Čtyři cysteinová residua zprostředkovávají interakci se zinečnatými ionty. NTD – N-terminální doména, DBD – DNA vazebná doména, LBD – ligand vazebná doména, CTE – C-terminální extenze. Na vlákně představující polypeptidovou sekvenci jsou jednopísmenné zkratky aminokyselin. Vytvořeno podle Claessens a Gewirth, 2004 v softwaru Biorender.

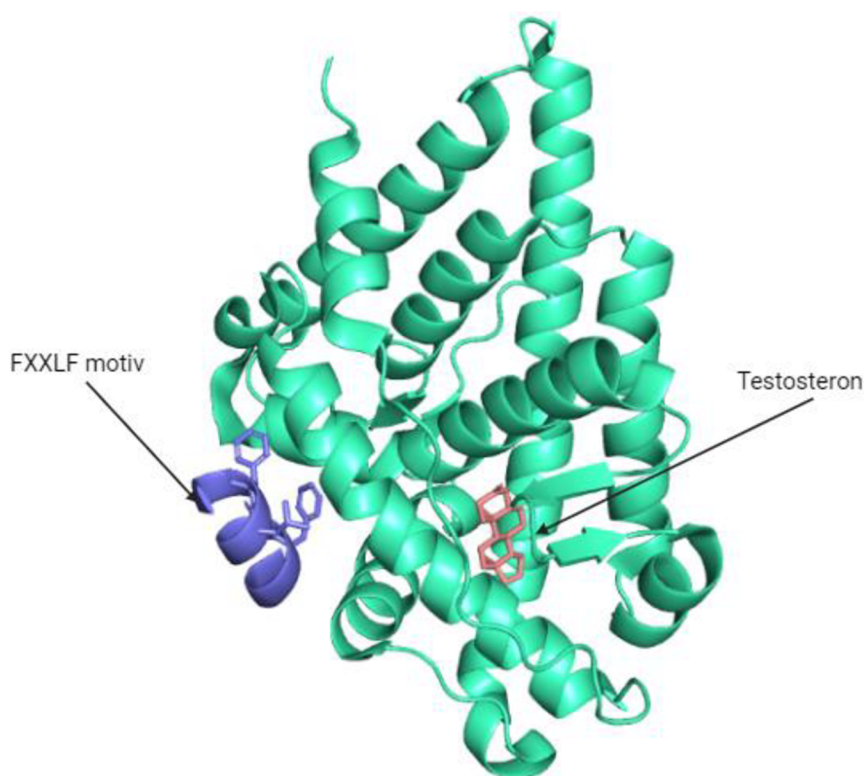
DBD je nezbytná pro funkci androgenového receptoru. Podílí se na jeho dimerizaci a zprostředkovává vazbu mezi vzniklým dimerem AR a specifickými motivy cílové DNA. Tato doména vytváří motiv dvou zinkových prstů, jejichž struktura je stabilizována pomocí cysteinových residuí. První motiv zinkového prstu se nachází blíže NTD, obsahuje tzv. P-box a je zodpovědný za specifitu vazby AR ku DNA sekvencím, tzv. „*androgen response elements*“ (AREs). Druhý motiv zinkového prstu se podílí na dimerizaci AR přes tzv. D-box (Lallous *et al.*, 2013; Marcelli *et al.*, 2017; Heemers a Tindall, 2007; Jenster *et al.*, 1993; Messner *et al.*, 2020).



Obrázek 3 Krystalová struktura dimeru Hlava-Hlava DNA vazebné domény androgenového receptoru v kokystalizaci s úsekem DNA (PDB ID: 1R4I).

Flexibilní region, zvaný též „*hinge reigon*“, je flexibilní linker mezi LBD a DBD. Tento linker obsahuje motiv <sup>629</sup>RKLKKL<sup>634</sup>, který se váže na importin- $\alpha$  nukleárního transportéru, čímž zprostředkovává translokaci AR do jádra. V jádře tento region interaguje s DBD, za účelem rozpoznání AREs. Flexibilní region kontroluje schopnost aktivace AR a zprostředkovává jeho degradaci (Cutress *et al.*, 2008; Clinckemalie *et al.*, 2012; Messner *et al.*, 2020).

LBD je lokalizována na C-konci AR. Skládá se z 11  $\beta$ -helixů, které tvoří ligand-vazebnou kapsu. Konformační změny této kapsy vedou k vazbě androgenového ligandu, čímž je zajištěna AF2. LBD váže FXXLF motivy z NTD. Dále je schopna rozpoznávat a vázat LXXLL motivy nacházející se na koaktivátorech. Homodimerizace LBD-LBD je indukována agonisty receptorů AR, což je nezbytným krokem ve správné funkci AR (Dubink *et al.*, 2006; Jaaskelainen *et al.*, 2006; Nadal *et al.*, 2017; Messner *et al.*, 2020).



Obrázek 4 Krystalová struktura ligand vazebné domény (LBD) v kokrytalizaci s testosteronem a peptidem s FXXLF motivem (PDB ID: 1E3G).



## 5.2.2 Mechanismus účinku (dráha)

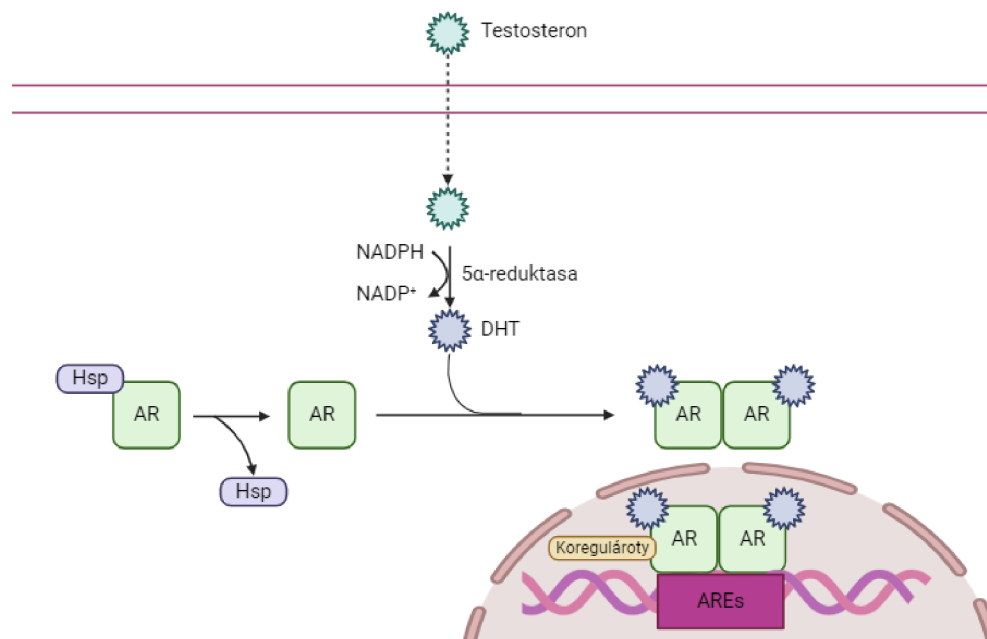
Androgenový receptor se řadí mezi steroidní jaderné receptory, jejichž mechanismus je v principu shodný. Volný androgen je nepolární, a proto snadno prochází buněčnou membránou. Po vstupu do cytoplasmy se váže na androgenový receptor. Androgenový receptor v neaktivním stavu je v cytoplasmě navázán v komplexu s heat-shock proteiny (HSP90, 70 a 40). V tomto komplexu je AR chráněn před degradací. Po navázání androgenu dochází ke konformačním změnám AR vedoucím k disociaci HSP a následné vazbě HSP 27 spolu s intramolekulární interakcí mezi NTD a LBD. Konformační změny mimo jiné vedou k zpřístupnění signální sekvence, jenž umožňuje vstup molekuly AR do jádra buňky. V jádře buňky dochází k novým intermolekulárním interakcím mezi DBD dvou AR monomerů v aktivní konformaci. D-box regiony DBD vytvářejí dimer a P-box regiony rozpoznávají AREs cílové DNA. Mezi AREs se řadí pár kanonických palindromických sekvencí 5'-AGAACA-NNN-TGTTCT-3' či AR specifické dvou-hexamerní přímé repetitivní sekvence 5'-AGAACA-NNN-AGAACA-3'. AR se rovněž může vázat na nekanonické AREs, i když není stále jasné, zdali se tato vazba podílí na regulaci exprese těchto genů. Po vazbě AR mohou NTD oblasti AR homodimerů rovněž zasahovat do regulace genové exprese zprostředkováním vazby koregulačních proteinů (Vis a Schroder, 2009; Chandrasekar *et al.*, 2015; Brand a Dehm, 2013; Harris *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2005; Marcelli *et al.*, 2017; Azad *et al.*, 2015; Velcheti *et al.*, 2008; Centenera *et al.*, 2008; Dehm a Tindall, 2011; Messner *et al.*, 2020).

Koregulační proteiny ovlivňují transkripci pomocí změn prostorové struktury chromatinu, ovlivněním stability receptorů, zprostředkováním jaderného transportu, ovlivněním vazby na DNA a regulací molekulárních interakcí. Mezi koaktivátory řadíme ARA70, filamin A, SRC1, TIF2 či P160. Tyto proteiny stabilizují vazbu androgenu do receptoru a ovlivňují AF2. Mezi další transkripční faktory ovlivňující AR transkripční aktivitu patří ETS, GATA, FOXA1, NFB, Smad3 či SRY. Korepresory transkripční aktivity AR jsou Calreticulin či FOXO1, které znemožňují vazbu AR na DNA či přes vazbu do NTD zablokují vazebné místo pro koaktivátory (Heemers a Tindall, 2007; Heinlein a Chang, 2002; Scher a Sawyers, 2005; Bedolla *et al.*, 2009; Mooso *et al.*, 2012; Savoy *et al.*, 2013; Savoy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2007; He *et al.*, 1999;

Klocker *et al.*, 1999; Foley *et al.*, 2016; Obinata *et al.*, 2017; Chan a Dehm, 2014; Messner *et al.*, 2020).

Posttranslační modifikace jsou další možností, jak ovlivnit aktivitu AR či proteinovou dynamiku v cytoplasmě nebo jádře. AR může být modifikován na všech svých doménách. NTD obsahuje sekvenční motivy pro fosforylaci či SUMOylaci, DBD bývá acetylována a methylována. Ubiquitinilace probíhá na LBD. Veškeré tyto modifikace mají vliv na funkci stabilitu a aktivitu AR za účelem zachování homeostázy (Gioeli a Paschal, 2012; Messner *et al.*, 2020).

Poslední možností regulace AR je ovlivnění metabolismu testosteronu a jeho konverze na dihydrotestosteron (Brand a Dehm, 2013; Messner *et al.*, 2020).

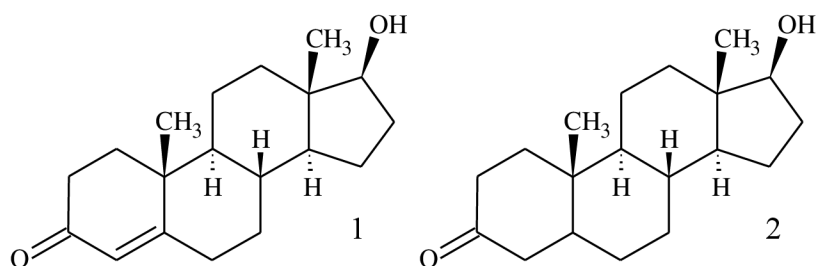


Obrázek 5 Schématické znázornění signální transdukce androgenového receptoru po navázání androgenů (testosteron, DHT). Hsp – heat shock proteiny, AR – androgenový receptor, DHT – dihydrotestosteron, AREs – elementy responzivní vůči androgenům. Vytvořeno podle Leung a Sadar, 2017 pomocí softwaru Biorender.

## 5.2.3 Ligandy androgenového receptoru

### 5.2.3.1 Agonisté AR

Hlavními ligandy vystupujícími coby agonisté androgenového receptoru jsou testosteron a dihydrotestosteron. Mimo tyto endogenní ligandy však s androgenovým receptorem mohou interagovat i mnohé další látky. Mezi takové látky řadíme například enviromentální chemikálie či farmaceutika. Tyto látky se mohou chovat jako agonisté nebo antagonisté. Mechanismus, kterým se z agonisty stává antagonist, je stále nejasný. Obsazením aktivního místa receptoru blokují jeho interakci s endogenními hormony, a zároveň modulují vazbu koaktivátorů nebo korepresorů do transkripčního komplexu. Pro agonisty je nezbytná schopnost již při nízkých koncentracích iniciovat interakci mezi NBD a LBD. Oproti tomu drtivá většina antagonistů tuto interakci inhibuje. Díky antagonistickým vlastnostem vůči AR se některé chemikálie (např. dikarboximidové fungicidy, linuron či flutamid) mohou chovat toxicky. U takovýchto toxinů byl prokázán vliv na poruchy signalizace AR, které mohou vést k mnohým nepříznivým důsledkům, jako je syndrom necitlivosti na androgeny nebo rakovina prostaty (Azhagiya Singam et al, 2019; Delfosse *et al.*, 2015; Martinovic *et al.*, 2008; Lambright *et al.*, 2000; Zacharia Sama, 2017; Shtivelman *et al.*, 2014; Matsumoto *et al.*, 2013; Lonergan a Tindall, 2011; Shafi *et al.*, 2013; Davei a Grossman, 2016; Banerjee *et al.*, 2018; Fujita a Nonomura, 2019; Newschaffer *et al.*, 2000).



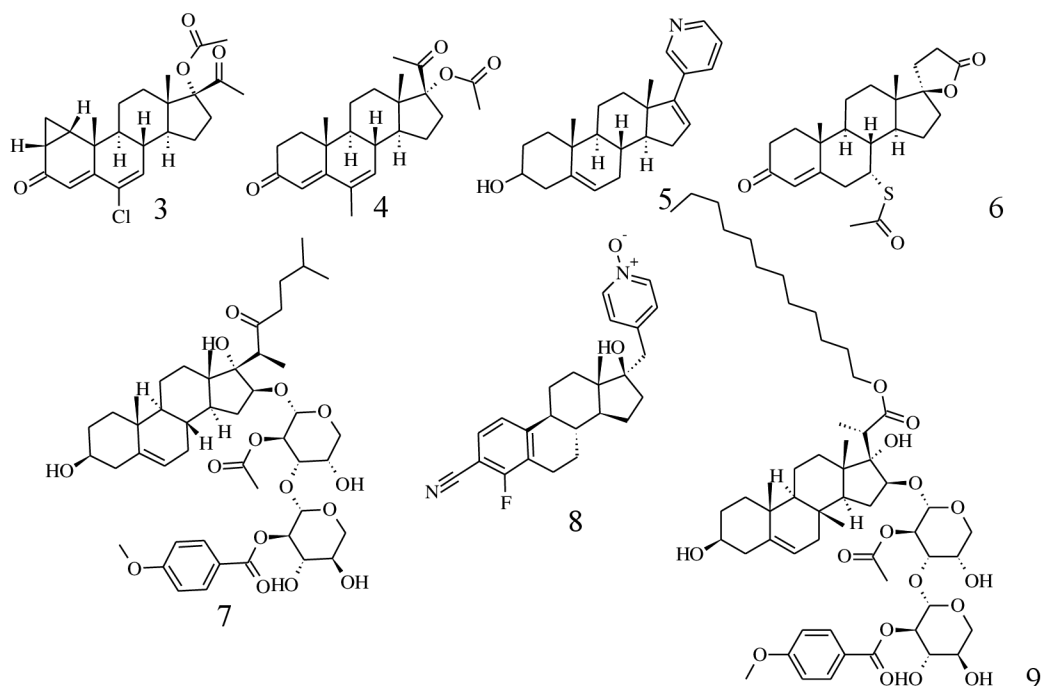
Obrázek 6 Struktura testosteronu (1) a struktura dihydrotestosteronu (2).

### 5.2.3.2 Androgeny

Androgeny jsou pohlavní hormony nepolárního charakteru, která se podílejí na vývoji mužského typu genitálu a sekundárních pohlavních znaků. Jako prekurzor pro biosyntézu androgenů slouží cholesterol. Samotná syntéza androgenů probíhá primárně v Leydigových buňkách varlat. Mimo varlata jsou androgeny produkovány kůrou nadledvin. Oba tyto orgány jsou řízeny pomocí hypothalamu-hypofyzárního systému (Silbernagl a Despopoulos, 2004; Soronen *et al.*, 2004; Sharifi *et al.*, 2012). Mezi androgeny se řadí, testosteron (**1**), dihydrotestosteron (**2**) a dehydroepiandrosteron (DHEA). Zatímco testosteron a dihydrotestosteron vystupují jako agonisté AR, DHEA se na AR neváže a slouží pouze jako substrát pro syntézu testosteronu a DHT.

### 5.2.3.3 Steroidní antiandrogeny

Návrh struktury prvních inhibitorů AR vychází ze struktury hlavních agonistů (testosteron, DHT). Prvním objeveným antiandrogenem byl cyproteron (**3**), který oproti testosteronu obsahuje navíc 2 methylové skupiny v pozici 1 a 2, chlór v pozici 6 a karbonylovou skupinu spolu s acetátem v pozici 17 steranového jádra (Jaaskelainen *et al.*, 2006; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). Dalšími antiandrogeny jsou oxendolon, spironolacton (**6**), megestrol acetát (**4**). I přes možné využití v praxi jsou tyto látky limitovány skrz jejich schopnost se vázat i na zbylé steroidní receptory (Ishizuka *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2015; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). Významným steroidním antiandrogenem je abirateron (**5**), který se od roku 2011 využívá coby preparát při léčbě rakoviny prostaty rezistentní na kastraci (Potter *et al.*, 1995; Kluetz *et al.*, 2013; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). U tohoto preparátu dochází ke konverzi na 3-oxo- $\Delta^4$ -abirateron, jež vykazuje vyšší afinitu vůči originální i mutantní formě AR než samotný abirateron, enzalutamid či bicalutamid (Li *et al.*, 2015; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). Mezi antiandrogeny, které momentálně prochází klinickým testováním, se dále řadí EM-5854 (**8**). Podobně jako bicalutamid či enzalutamid nese EM-5854 v pozici 17-methylpyridin-N-oxid. Oproti nim však má 40-105krát vyšší inhibiční schopnost proliferace u Shionogiho buněk senzitivních na androgen (Gauthier *et al.*, 2012; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).



Obrázek 7 Struktury steroidních antagonistů cyproteron (3), megesterol acetát (4), abirateron (5), spironolakton (6), saponin OSW-1 (7), EM-5854 (8), SBF-1 (9)

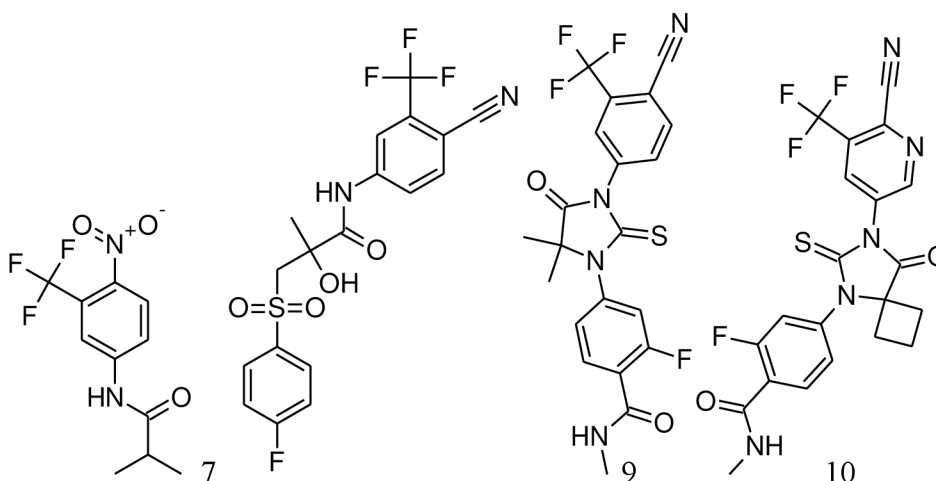
Výzkum antitumorózních antiandrogenů se mimo syntetické analogy zaměřuje také na steroidní glykosidy přírodního původu. Mezi takové se řadí saponin OSW-1 (7), který vykazuje inhibiční účinky na proliferaci u různých nádorových linií v kombinaci s nízkou toxicitou. Analogen saponinu OSW-1 je syntetický SBF-1 (9), který vykazuje vyšší inhibiční účinek (Elgeham *et al.*, 2021).

Mimo inhibitory AR se mezi steroidní antiandrogeny řadí rovněž AR degradéry. Prvním objeveným AR degradérem byl galeteron, jenž byl původně navržen coby inhibitor 17 $\alpha$ -hydroxylasy/17,20-lyasy (CYP-17), avšak během in-vitro fáze byl objeven i jeho farmakologický účinek prostřednictvím degradace AR. Navzdory jeho velkému potenciálu, klinické testování galeteronu neuspělo ve III. fázi, pravděpodobně skrz jeho nízký biologický poločas rozpadu. (Njar a Broodie *et al.*, 2015; Kwegyir-Afful *et al.*, 2019; Purusthottamachar *et al.*, 2013; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). I přes neúspěch galeteronu ve III. fázi klinického byly vyvinuty jeho nové deriváty.

### 5.2.3.4 Nesteroidní antiandrogeny

Kromě antiandrogenů steroidního charakteru se výzkum zaměřuje i na antiandrogeny charakteru nesteroidního, jejichž skupina je mnohem širší. Prvním

popsaným nesteroidním antiandrogenem byl flutamid (**10**). Tato látka se stala klíčovou pro objevení derivátů hydantoninu nilutamidu a diarylpropionamidu bicalutamidu (**11**) (Baker *et al.*, 1967; Raynaud *et al.*, 1984; Furr *et al.*, 1987, Ioannis Avgeris *et al.*, 2022). Díky nízké křížové reaktivitě s ostatními steroidními receptory se tyto látky využívají jako preparáty první linie léčby brzké fáze rakoviny prostaty. V případě neúspěchu při léčbě brzké fáze rakoviny prostaty, nesteroidní antiandrogeny první generace indukují mutace v exonech kódujících LBD AR (T877A, W741L, W741C). Obzvláště při výměně tryptofanového residua za leucin, dochází ke vzniku kapsy, do níž se váže fenylový postranní řetězec R-biglutamidu, čímž AR zaujímá agonistickou konformaci namísto antagonistické. Tato záměna vede k vývoji rezistence vůči terapii a progresi letální fáze rakoviny prostaty rezistentní vůči kastraci (Bohl *et al.*, 2005; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).



Obrázek 8 Struktury nesteroidních antagonistů: flutamid (**10**), bicalutamid (**11**), enzalutamid (**12**), apalutamid (**13**)

Kvůli výše zmíněným komplikacím byly navrženy nesteroidní antiandrogeny druhé generace. Hlavními zástupci těchto látek jsou enzalutamid (**12**) a apalutamid (**13**). Oproti první generaci obsahují navíc thiohydantoin. Narozdíl od bicalutamidu enzalutamid zabraňuje translokaci AR do jádra, inhibuje vazbu AR na DNA či koaktivátory. (Tran *et al.*, 2009). I přes to, že se enzalutamid používá coby klinický preparát cílený na rezistentní formy rakoviny prostaty, u mutantní varianty AR F876L vystupuje enzalutamid jako agonista (Joseph *et al.*, 2013; Korpál *et al.*, 2013; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).

Apalutamid coby strukturní analog enzalutamidu vykazuje stejné shodné farmakologické vlastnosti jako enzalutamid, nicméně jeho biologická účinnost je vyšší skrz nižší vaznost na plasmatické proteiny. Pro mutantní variantu AR F876 opět dochází k rezistenci vůči léčbě, vlivem nadměrné exprese glukokortikoidního receptoru (GPR), při které dochází k bypasu blokády AR (Arora *et al.*, 2013; Joseph *et al.*, 2013; Clegg *et al.*, 2012; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).

Mezi nesteroidní antiandrogeny druhé generace patří také Darolutamid, jehož struktura je odlišná. Darolutamid obsahuje směs dvou farmakologicky odlišných diastereomerů v poměru 1:1. Tato látka slouží k léčbě nemetastatické rakoviny prostaty. Jedná se o vysokoafinitního antagonistu AR, jenž podobně jako enzalutamid či apalutamid poškozuje testosteronem indukovanou translokaci AR. Oproti ostatním nesteroidním antiandrogenům druhé generace je účinný i v případě mutantních variant AR F876L a W741L (Moilanen *et al.*, 2015; US Food and Drug Administration, 2019; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).

Dalšími nesteroidními antiandrogeny jsou VPCs, pyrivinium či SKLB-C2807. Potenciál jejich využití coby antantagonistů AR tkví v jejich schopnosti vázat se do DBD domény. Cílením na DNA-vazebnou doménu AR tak obcházejí možný rozvoj rezistence vůči protinádorové terapii způsobené mutací LBD. V pozdější fázi vývoje byly navíc VPCs upraveny tak, aby se vázaly do D-boxu DBD, čímž zabraňují interakci AR s chromatinem (Li *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018; Dalal *et al.*, 2018; Radaeva *et al.*, 2021; Lim *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013b; Ban *et al.*, 2021; Ioannis Avgeris *et al.*, 2022).

V rámci moderního přístupu se používají i látky zvané PROTACy a další látky přírodního původu. Tyto ligandy jsou již strukturně odlišné a neváží se do LBD místa.

## **6 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY**

### **6.1 Chemická část**

#### **6.1.1 Použité chemikálie**

- Aceton (PENTA)
- Benzen (Sigma – Aldrich)

- Boc-L-alanin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-fenylalanin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-norvalin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-leucin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-glycin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-methionin (Sigma-Aldrich)
- Boc-L-isoleucin (Sigma-Aldrich)
- Testosteron (z knihovny Miroslava Kvasnici, PhD.)
- N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (Sigma-Aldrich)
- 4-(Dimethylamino)pyridin (Sigma-Aldrich)
- Cyklohexan (PENTA)
- Ethylacetát (PENTA)
- Ethanol (PENTA)
- Dichlormetan (PENTA)
- Silikagel Kieselgel 60 (Merck)

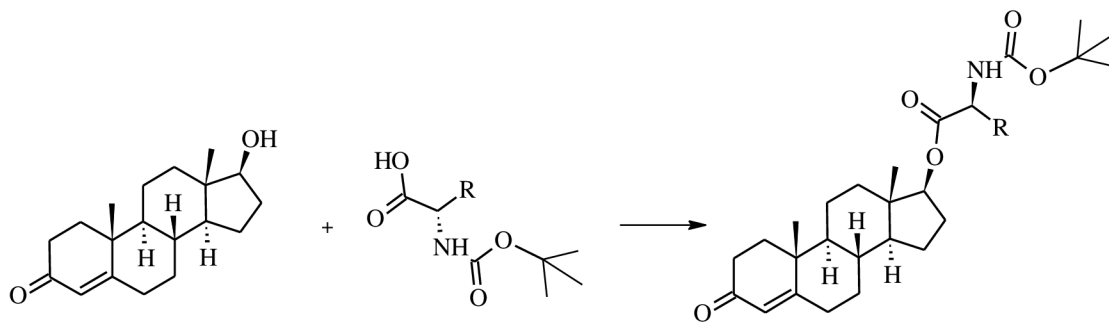
### **6.1.2 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- Analytické váhy CPA225D (Santorius)
- Hliníkové TLC destičky potáhnuté silikagelem 60 W F<sub>254</sub> (Merck)
- Magnetická míchačka s ohřevem RCT Basic IKAMAG (IKA)
- Rotační vakuová odparka (RVO) Hei-VAP Value (Heidoph)
- UV lampa (Spectroline® E-Series)
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf (HPLC) s ELSD detektorem (Waters)
- Horkovzdušná pistole HL 1626S (Steinel)
- NMR spektrometr JNM-ECA 500 (JEOL)
- Mmotnostním spektrometrem Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific)



### 6.1.2.1 Všeobecný postup přípravy esterů

Testosteron (50 mg, 0,173 mmol) byl smíchán s ekvimolárním množstvím *N*-Boc-aminokyseliny (AK) a dimethylaminopyridinem (DMAP) (2 mg). Získaná směs byla rozpuštěna v benzenu (5 ml). Během stálého míchání byl do roztoku přidán DCC (60 mg). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin (Obrázek 9).



Obrázek 9 Všeobecné schéma přípravy esterů z testosteronu.

### 6.1.2.2 Všeobecný postup zpracování chemických reakcí

Po 24 hodinách byla pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) pod UV lampou zkontrolována úspěšnost reakce. Pomocí TLC byla také určena mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii (viz. výsledky). Reakce byla ukončena přidáním vody. Následně byla reakční směs přefiltrována přes fritu. Rozpouštědla byla odpařena pomocí RVO. Po odpaření rozpouštědla byla látka pročištěna pomocí sloupcové chromatografie. Pročištěné látky byly lyofilizovány z t-butanolu.

### 6.1.2.3 Identifikace látek

NMR spektra byla získána pomocí spektrometru JEOL JMNC-ECA 500 (JEOL, Tokyo, Japonsko;  $^1\text{H}$ , 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) s využitím 5mm JEOL Royal sondy. Posuny  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR byly kalibrovány pomocí tetramethylsilanu (TMS,  $^1\text{H}$   $\delta=0$  ppm) či následujících solventů:  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$   $\delta=7,27$  ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta=77,00$  ppm) nebo  $\text{DMSO-}d_6$  ( $^1\text{H}$   $\delta=2,46$  ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta=40,00$  ppm). Chemické posuny jsou vyjádřeny v ppm, interakční konstanty (J) v Hz. Data byla procesorována pomocí analýzy prvního řádu a zpracována pomocí softwaru ACD/NMR Processor Academic Edition (ver. 12.01).

Všechny vzorky byly měřeny vysoko-rozlišujícím hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) s ionizací elektrosprejem metodou přímého nástřiku.

## 6.2 Biologická část

### 6.2.1 Biologický materiál

- 22Rv1 – lidská epiteliální buněčná linie karcinomu prostaty odvozená z xenograftu, který byl sériově propagován v myších (ATCC)
- BJ – lidské fibroblasty předkožky (ATCC)
- C4-2 – izolovány z metastázy rakoviny prostaty pacienta v lymfatických uzlinách. (ATCC)

### 6.2.2 Použité chemikálie a roztoky

- Aprotinin (Merck)
- D6F11/králičí monoklonální protilátka (Merck)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) pro buněčné kultury (PanReac AppliChem)
- DMEM (Biowest)
- DTT (Merck)
- Etanol 96 % (Penta)
- fAR (S81) – králičí monoklonální protilátka (Merck)
- Galeteron (Merck)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, kat. č. 12340-31000)
- Kyselina etylenglykol-bis(2-aminoetyleter)-*N,N,N',N'*-tetraoctová (EGTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E3889)
- Leupetin (Merck)
- Lyzační pufr RIPA (Merck)
- MK-465 (z chemické knihovny Dr. Miroslava Kvasnici)
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Merck)
- Nkx.3.1 -D2Y1A/králičí monoklonární protilátka (Cell Signaling)
- Penicilín-streptomycin v 0,9 % NaCl, vhodný pro buněčné kultury – 10 000 U·ml<sup>-1</sup> penicilínu a 10 mg·ml<sup>-1</sup> streptomycinu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)

- PMSF (Merck)
- PSA-D6B1/králičí monoklonální protilátka (Cell Signaling)
- RAM – HPR-konjugovaná prasečí Ig proti králičí Ig (Cell Signaling)
- RPMI (Biowest)
- Sodná sůl resazurinu (Sigma-Aldrich, kat. č. R7017)
- SWAR- HPR- konjugovaná králičí Ig proti myši (Cell Signaling)
- Trypsin, 25 g·l<sup>-1</sup> v 0,9% roztoku, pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, kat. č. T2600000)
- $\alpha$ -tubulin-DM1A/myši monoklonální protilátka (Merck)
- $\beta$ -aktin-C4/myši monoklonální protilátka (Santa Cruz Bioechnology)

### 6.2.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy KERN ABT 120-5DM (KERN)
- Autokláv MLS-3781L (Sanyo)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Blottovací systém (Biorad)
- CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-17AIC (Sanyo)
- Elektroforetická vana (Biorad)
- Hluboko mrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific)
- Lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr)
- Minicentrifuga MyFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Mrazák Innova (Fagor)
- Multikanálová pipeta (Brand)
- Odsávačka VACUSAFE (INTEGRA Biosciences)
- Pipetovací nástavec accu-jet-pro (BrandTech Scientific)
- Reader mikrotitračních destiček Fluoroskan Ascent (Labsystems)
- Stolní centrifuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher Scientific)
- Ultrazvuková vana VWR Ultrasonic Cleaner (VWR)

## **6.2.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **6.2.4.1 Adherentní buněčné linie**

Z důvodu případné kontaminace byla kultivační nádoba s buňkami zkontrolována pod světelným mikroskopem. V laminárním boxu bylo za sterilních podmínek odsáto médium. Přisedlé buňky byly opláchnuty sterilním roztokem EGTA, který byl následně odsán. Po odsátí roztoku EGTA byl do nádoby nanesen roztok trypsin-EGTA. Nádoba byla přenesena do inkubátoru po dobu 5 minut. Přidáním roztoku EGTA coby chelatačního činidla byly vychytány vápenaté ionty. Vápenaté ionty působí jako inhibitory trypsinu, který je zodpovědný za degradaci proteinů umožňujících přichycení buněk ke stěně nádoby. Po inkubaci byl v laminárním boxu k buňkám přidán 10% DMEM, který inhiboval činnost trypsinu pomocí vápenatých iontů. Uvolněné buňky byly rozsuspendovány pomocí pipety a přeneseny do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla následně centrifugována po dobu 5 minut při 1 000 rpm. Po zcentrifugování byla zkumavka přenesena do laminárního boxu, kde byl odsán supernatant. Pelet usazený na dně zkumavky byl pomocí pipety rozsuspendován v 10% DMEM. Vytvořená suspenze byla rozdělena do nových kultivačních nádob a doplněna 10% DMEM na objem 10 ml, aby bylo dosaženo celkového poměru buněk k médiu 1:3. Kultivační nádoby byly přeneseny do inkubátoru. Pasážování buněk bylo prováděno každé 3 dny.

### **6.2.4.2 Příprava experimentu pro testování viability**

První kroky přípravy experimentu byly stejné jako při pasážování buněk. Centrifugační zkumavka byla po centrifugaci přenesena do laminárního boxu, kde byl odsán supernatant. Pelet byl pomocí pipety rozsuspendován v 5 ml 10% DMEM. Z buněčné suspenze bylo odebráno 20  $\mu$ l, které byly přeneseny do Bürkerovy komůrky, pomocí níž byl pod světelným mikroskopem stanoven počet buněk. Po vynásobení 10 000 byl získán počet buněk v 1 ml suspenze. Po vynásobení 5 byl získán celkový počet buněk v centrifugační zkumavce. Pro 96jamkovou destičku byla buněčná suspenze naředěna 10% DMEM na finální počet 5 000 buněk v 80  $\mu$ l média. Naředěná buněčná suspenze byla přenesena do 96jamkové destičky pomocí multikanálové pipety. Poté bylo pod světelným

mikroskopem zkontrolováno rozmístění a koncentrace buněk v jednotlivých jamkách. Destička byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

#### **6.2.4.3 Příprava a aplikace syntetizovaných látek**

Syntetizované látky (I – VII a referenční MK495), byly rozpuštěny v DMSO, aby výsledná koncentrace vytvořených roztoků v 1,5 ml mikrozkuhavce činila  $7,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z připravených zásobních roztoků byla v laminárním boxu vytvořena koncentrační řada. Do laminárního boxu byla přenesena 96jamková destička s buňkami z předchozího dne. Pomocí multikanálové pipety bylo do druhého sloupce přidáno 20  $\mu\text{l}$  destilované vody. Do třetího až jedenáctého sloupce bylo přeneseno v triplikátech 20  $\mu\text{l}$  roztoků jednotlivých látek z předem připravené koncentrační řady o trojkovém ředění. Připravené roztoky byly testovány v triplikátech, v 6 různých koncentracích. Nejvyšší testovaná koncentrace byla  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a nejnižší  $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Destičky byly poté přeneseny do inkubátoru a byly inkubovány po dobu 72 hodin.

#### **6.2.4.4 Stanovení viability buněk pomocí resazurinu**

Pro stanovení životaschopnosti buněk se běžně využívá redoxní barvivo resazurin. Po průchodu přes membránu je resazurin v cytosolu živých buněk metabolizován na resofurin a dihydroresofurin. Během této metabolické přeměny přechází resazurin z oxidované modré formy na redukovanou červenou, která má schopnost fluorescence.

Po 72 hodinách byla z důvodu případné kontaminace 96jamková destička s buňkami zkontrolována pod světelným mikroskopem. V laminárním boxu bylo do jamek destičky pomocí multikanálové pipety přidáno 10  $\mu\text{l}$  resazurinu ( $125 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Destička byla v inkubátoru inkubována po dobu 3 hodin. Po tříhodinové inkubaci byla destička změřená na fluorescenčním readeru mikrotitračních destiček při hodnotách 544/590 nm. Ze získaných hodnot byla stanovena hodnota inhibiční aktivity  $\text{IC}_{50}$  pro jednotlivé látky v programu Origin.

#### **6.2.4.5 Příprava buněk pro analýzu signalizace AR**

Buňky 22Rv1 kultivované v 10% RPMI médiu byly nasazeny do 10 mm Petriho misek. Po jednodenní inkubaci bylo RPMI médium odsáto a buňky byly opláchnuty roztokem PBS. Po odsátí PBS bylo do misek nanášeno 10 ml RPMI

s 10% CSS média s testovanými látkami. Což umožní vypnutí androgenní signalizace – uvolnění vazebných míst v LBD. Látky III, IV a V se ředily na koncentraci  $7,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Galeteron a MK465 se ředily na koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro sledování antagonistického módu bylo do média přidáno R1881 (finální koncentrace 1 nM). Ovlivněné buňky byly inkubovány přes noc a následně byly sklizeny.

#### **6.2.4.6 Zpracování buněčného lyzátu pro SDS-PAGE**

Buňky v Petriho miskách byly sklizeny pomocí plastové škrabky. Pro dokonalejší sklizení byla miska promývána roztokem PBS. Buňky byly sklizeny do zkumavky a následně dvakrát centrifugovány a promývány pomocí PBS. Po posledním promytí byl supernatant odsán a zamražen a ke zbylému peletu ve zkumavce byl přidán lyzační pufr RIPA obsahující PMSF, DTT,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , leupeptin a aprotinin. Po rozsuspendování peletu v lyzačním pufru byly vzorky podrobeny sonikací ultrazvukem na ledu po dobu 10 sekund s 30 % amplitudou. Rozpuštěné proteiny byly získány pomocí centrifugace při 14 000 g po dobu 30 minut. Po centrifugaci byly koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích změřeny a následně sjednoceny. Poté byla zahájena denaturace proteinů přidáním dodecylsulfátu sodného (SDS) a merkaptoetanolu. Po přidání SDS pufru byly vzorky povařeny v termobloku po dobu 5 minut  $95^\circ\text{C}$ .

#### **6.2.4.7 SDS-PAGE**

Pro elektroforetickou separaci byly vzorky spolu s kontrolním vzorkem a markerem molekulové hmotnosti nanесeny do jamek v polyakrylamidovém gelu (10%). Následně byla provedena elektroforéza při napětí 120 V, dokud zóna bromfenolové modři nepřešla ze zaostřovacího gelu do gelu dělicího. Poté bylo napětí zvýšeno na 200 V.

#### **6.2.4.8 Immunoblotting**

Po skončení elektroforetické separace byl gel přenesen na nitrocelulosovou membránu a pomocí blotovacího systému Biorad využívajícího elektrotransferu byly proteiny přebloťovány na membránu. Membrány byly následně obarveny v roztoku ponceau za účelem vizualizace proteinů. Ze suchých membrán bylo vyříznuto šest oblastí s proteiny pro následnou imunodetekci: 140–70 kDa pro detekci celkového AR, 140–70 kDa pro detekci pARS81, 60–40 kDa

pro detekci  $\alpha$ -tubulinu, 50-35 kDa pro detekci  $\beta$ -aktinu, 40-30 kDa pro detekci PSA a 40-35 kDa pro detekci Nkx.3.1. Membrány byly odbarveny roztokem TBS. Za účelem zablokování nespecifických vazebných míst byly membrány ponořeny na 1 hodinu do blokovacího roztoku obsahující BSA (5% BSA rozpuštěné v 1xTBS s 0,1 % Tween 20). Vyřiznuté části membrány byly opláchnuty roztokem TBS.

Následně byly na membrány naneseny primární protilátky. Membrány byly uchovány přes noc v krabičce s vodou uložené v lednici. Pro promytí membrán od nenavázané protilátky byl použit roztok TBS a poté roztok TBS s Tweenem pro omytí nespecificky navázaných protilátek. Po promytí byly na membrány naneseny sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidasou. Membrány byly inkubovány přibližně 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byly membrány opět promyty v roztocích TBS a TBS s Tweenem. Osušené membrány byly převrstveny roztokem detekční směsi ECL west piko substrate therma (luminol:peroxid, 1:1). Po 5minutové inkubaci následovala chemiluminiscenční analýza ve vyvolávacím přístroji s kamerou. Křenová peroxidasa oxiduje substrát luminol za současného generování chemiluminiscenčního záření zaznamenaného ve vyvolávacím přístroji pomocí CCD kamery.

## **7 VÝSLEDKY**

### **7.1 Chemická část**

V rámci chemické části této bakalářské práce bylo pomocí jedноступňové syntézy připraveno a identifikováno celkem 7 látek. U těchto látek byl následně v biologické části testován jejich cytotoxický vliv na prostatických nádorových liniích. Následně byly vybrány 3 látky s nejnižší hodnotou  $IC_{50}$ , u kterých byl poté testován jejich vliv na signalizaci androgenního receptoru. Syntetizované látky obsahovaly na D kruhu na C-17 nepolární aminokyselinu chráněnou na dusíku Boc skupinou. Jednotlivé látky se mezi sebou liší v druhu navázané aminokyseliny.

#### **7.1.1 Příprava esterů**

Podle všeobecného postupu pro přípravu esterů bylo syntetizováno celkem 7 látek. Amino skupina aminokyselin je chráněná pomocí Boc skupiny. Pro

syntézu byly použité glycin, L-alanin, L-fenylalanin, L-norvalin, L-leucin, L-izoleucin a L-methionin.

#### **Ester s Boc-glycinem I**

Podle všeobecného postupu byla připravena látka I ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 25 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 65 mg (84 %).

3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)glycinát (**I**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,81 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,42 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ); 2,00 (ddd, 1H,  $J = 13,1, 4,9, 3,1$  Hz); 2,16 (m, 1H); 2,26 (m, 1H); 2,32-2,43 (m, 3H); 3,83-3,92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 4,64 (dd, 1H,  $J = 9,0, 8,1$  Hz, H-17 $\alpha$ ); 5,06 (m, 1H, NH); 5,70 (s, 1H, H-4).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11,90; 17,28; 20,37; 23,34; 27,28; 28,22 ( $3\times\text{C}$ ); 31,34; 32,60; 33,81; 35,23; 35,57; 36,42; 38,48; 42,37; 42,49; 50,03; 53,53; 79,77; 83,31; 123,84; 155,61; 170,27; 170,81; 199,37. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 446,2906; nalezeno 446,2901.

#### **Ester s Boc-L-alaninem II**

Podle všeobecného postupu byla připravena látka II ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 25 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 61 mg (77 %).

3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-alaninát (**II**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,38 (d, 3H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); 1,43 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3$ ); 2,01 (ddd, 1H,  $J = 13,1, 4,9, 3,1$  Hz); 2,16 (m, 1H); 2,28 (m, 1H); 2,34-2,44 (m, 3H); 4,30 (m, 1H, CHN); 4,66 (dd, 1H,  $J = 9,2, 7,9$  Hz, H-17 $\alpha$ ); 5,07 (bd, 1H,  $J = 7,3$  Hz, NH); 5,72 (s, 1H, H-4).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11,98; 17,32; 18,97; 20,41; 23,37; 27,22; 28,28 ( $3\times\text{C}$ ); 31,37; 32,64; 33,85; 35,29; 35,62; 36,50; 38,51; 42,64; 49,24; 50,09; 53,56; 79,65; 83,10; 123,91; 155,01; 170,82; 173,32; 199,40. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 460,3063; nalezeno 460,3050.

#### **Ester s Boc-L-norvalinem III**

Podle všeobecného postupu byla připravena látka III ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 25 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 72mg (85 %).



3-Oxoandrost-4-en-17b-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-norvalinát (**III**): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,91 (d, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>); 1,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,41 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>); 2,00 (m, 1H); 2,15 (m, 1H); 2,25 (m, 1H); 2,29-2,43 (m, 3H); 4,26 (m, 1H, CHN); 4,63 (t, 1H, J = 8,6 Hz, H-17α); 5,03 (d, 1H, J = 8,3 Hz, NH); 5,70 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11,98; 13,66, 17,27; 18,46; 20,39; 23,35; 27,25; 28,23 (3×C); 31,32; 32,60; 33,81; 34,95; 35,23; 35,57; 36,46; 38,47; 42,50; 50,03; 53,27; 53,53; 79,54; 83,09; 123,86; 155,24; 170,76; 172,87; 199,32. HRMS vypočteno pro C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 488,3376; nalezeno 488,3372.

### Ester s Boc-L-fenylalaninem IV

Podle všeobecného postupu byla připravena látka IV ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 25 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 70 mg (76 %).

3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-fenylalaninát (**IV**): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 0,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,42 (s, 9H, 3 $\times$ CH<sub>3</sub>); 2,03 (ddd, 1H, J = 13,0, 4,9, 3,1 Hz); 2,18 (m, 1H); 2,28 (m, 1H); 2,32-2,46 (m, 3H); 3,03-3,13 (m, 2H); 4,56-4,60 (m, 2H, H-17 $\alpha$ , CHN); 5,00 (d, 1H, J = 8,6 Hz, NH); 5,73 (s, 1H, H-4); 7,15 (d, 2H, J = 7,3 Hz, 2 $\times$ H<sub>Ar</sub>); 7,24 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>); 7,29 (m, 2H, 2 $\times$ H<sub>Ar</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 11,90; 17,28; 20,33; 23,37; 27,35; 28,21 (3 $\times$ C); 31,33; 32,59; 33,82; 35,19; 35,58; 36,35; 38,48; 38,50; 42,33; 49,97; 53,54; 54,38; 79,70; 83,52; 123,86; 126,85; 128,42 (2 $\times$ C); 129,22 (2 $\times$ C); 135,99; 154,94; 170,81; 171,85; 199,37. HRMS vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 536,3376; nalezeno 536,3372.

### Ester s Boc-L-isooleucinem V

Podle všeobecného postupu byla připravena látka V ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 30 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 74 mg (85 %).

3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-isooleucinát (**V**): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,898 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>); 0,904 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>); 1,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,41 (s, 9H, 3 $\times$ CH<sub>3</sub>); 1,99 (ddd, 1H, J = 13,0, 4,7, 3,1 Hz); 2,17 (m, 1H); 2,25 (m, 1H); 2,28-2,43 (m, 3H); 4,25 (dd, 1H, J = 8,9, 4,6 Hz, CHN); 4,61 (t, 1H, J = 8,6 Hz, H-17 $\alpha$ ); 5,06 (d, 1H, J = 9,2 Hz, NH); 5,70 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 11,65; 12,08; 15,45; 17,26; 20,39; 23,37; 24,96; 27,30; 28,22 (3 $\times$ C); 31,30; 32,58; 33,80; 35,21; 35,56; 36,47; 38,09; 38,46; 42,36; 49,97; 53,54; 57,77; 79,51; 83,26; 123,84; 155,45; 170,76; 172,18; 199,31. HRMS vypočteno pro C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 502,3532; nalezeno 502,3528.

### Ester s Boc-L-leucinem VI

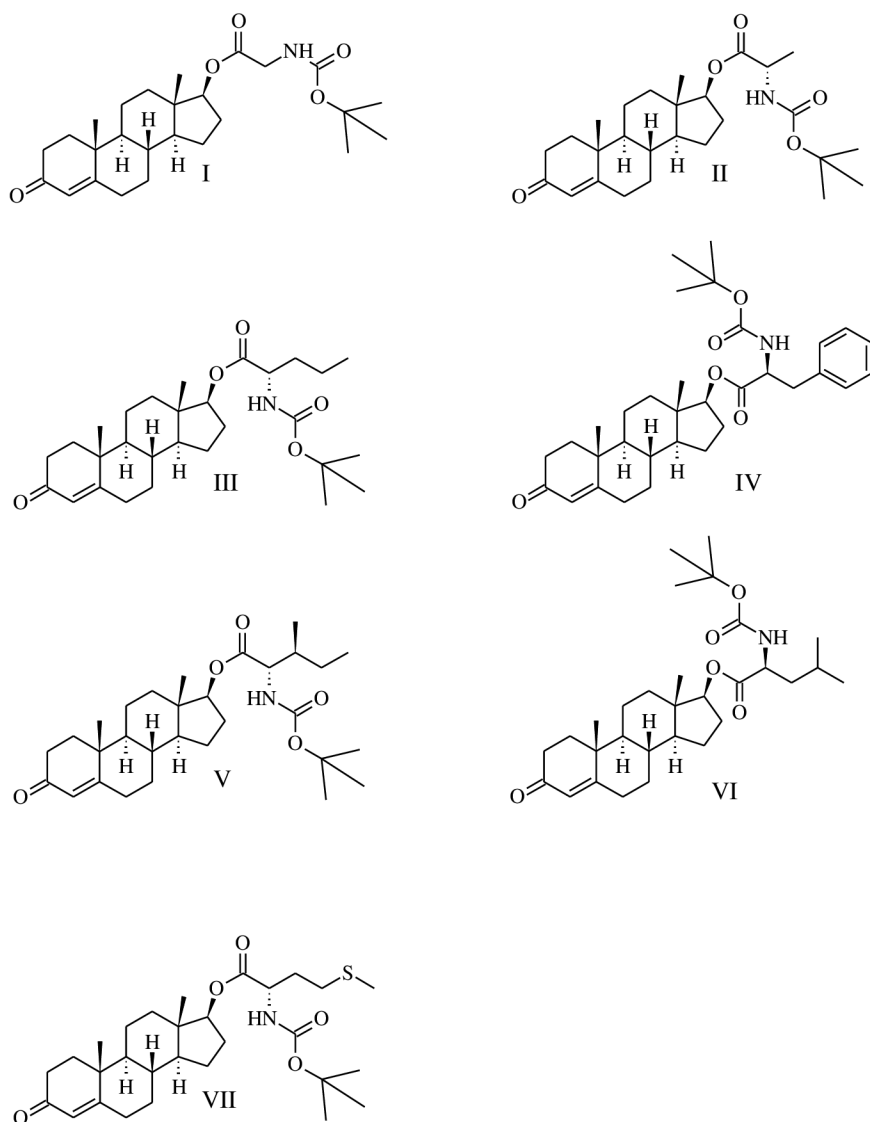
Podle všeobecného postupu byla připravena látka VI ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 30 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 70 mg (80 %)

3-Oxoandrost-4-en-17b-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-leucinát (VI): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,93 (d, 6H, J = 6,4 Hz, 2×CH<sub>3</sub>); 1,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,41 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>); 2,00 (m, 1H); 2,16 (m, 1H); 2,25 (m, 1H); 2,29-2,43 (m, 3H); 4,27 (m, 1H, CHN); 4,60 (t, 1H, J = 8,6 Hz, H-17α); 4,94 (d, 1H, J = 8,9 Hz, NH); 5,70 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 12,00; 17,27; 20,39; 22,01; 22,68; 23,37; 24,74; 27,28; 28,23 (3×C); 31,33; 32,60; 33,81; 35,23; 35,57; 36,46; 38,47; 42,08; 42,46; 50,02; 52,09; 53,54; 79,56; 83,13; 123,85; 155,24; 170,78; 173,39; 199,33. HRMS vypočteno pro C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 502,3532; nalezeno 502,3526.

#### **Ester s Boc-*L*-methioninem VII**

Podle všeobecného postupu byla připravena látka VI ve formě bílého prášku. Byla použita mobilní fáze 30 % ethylacetátu v cyklohexanu. Hmotnost získané látky činila 80 mg (88 %).

3-Oxoandrost-4-en-17b-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-*L*-methioninát (VII): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,42 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>); 2,00 (m, 1H); 2,08 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 2,16 (m, 1H); 2,25 (m, 1H); 2,28-2,43 (m, 3H); 2,47-2,57 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>); 4,38 (m, 1H, CHN); 4,63 (t, 1H, J = 8,6 Hz, H-17α); 5,16 (d, 1H, J = 8,3 Hz, NH); 5,70 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 12,05; 15,38; 17,27; 20,36; 23,35; 27,24; 28,20 (3×C); 29,85; 31,30; 32,38; 32,57; 33,80; 35,21; 35,56; 36,50; 38,46; 42,49; 49,99; 52,78; 53,51; 79,79; 83,47; 123,86; 155,21; 170,71; 172,18; 199,31. HRMS vypočteno pro C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 520,3097; nalezeno 520,3094.



Obrázek 10 Estery testosteronu s *N*-Boc-*L* – aminokyselinami připravené podle všeobecného postupu. (**I**) ester s *N*-Boc -*L*-glycinem, (**II**) ester s *N*-Boc -*L*-alaninem, (**III**) ester s *N*-Boc -*L*-norvalinem, (**IV**) ester s *N*-Boc -*L*-fenylalaninem, (**V**) ester s *N*-Boc -*L*-isoleucinem, (**VI**) ester s *N*-Boc -*L*-leucinem, (**VII**) ester s *N*-Boc -*L*-methioninem

## 7.2 Biologická část

### 7.2.1 Hodnocení cytotoxicity připravených derivátů

V rámci biologické části byl testován vliv připravených konjugátů testosteronu na cytotoxicitu na lidských fibroblastech předkožky (BJ) a prostatických nádorových liniích 22Rv1 a C4-2. Stanovení míry cytotoxicity připravených konjugátů bylo pomocí resazurinu. Buňky byly ovlivněny s testovanými deriváty po dobu 72 hodin. Hodnoty IC<sub>50</sub> pro jednotlivé látky byly stanoveny na základě testování ve třech nezávislých opakováních. Syntetizované látky byly mnohem účinnější vůči prostatické nádorové linii 22Rv1. Z naměřených hodnot pro obě nádorové

linie vyplývá, že nejúčinnější látky jsou **III**, **IV** a **V**. Naopak nejméně účinnou látkou byla **I** – testosteronový derivát s navázaným glycinem. Tyto tři látky byly použity pro následnou charakterizaci z hlediska ovlivnění transkripční aktivity AR.

Tabulka I Výsledné hodnoty IC50 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) získané po 72hodinové inkubaci buněčných linií 22Rv1, C4-1 a BJ s naměřenými látkami.

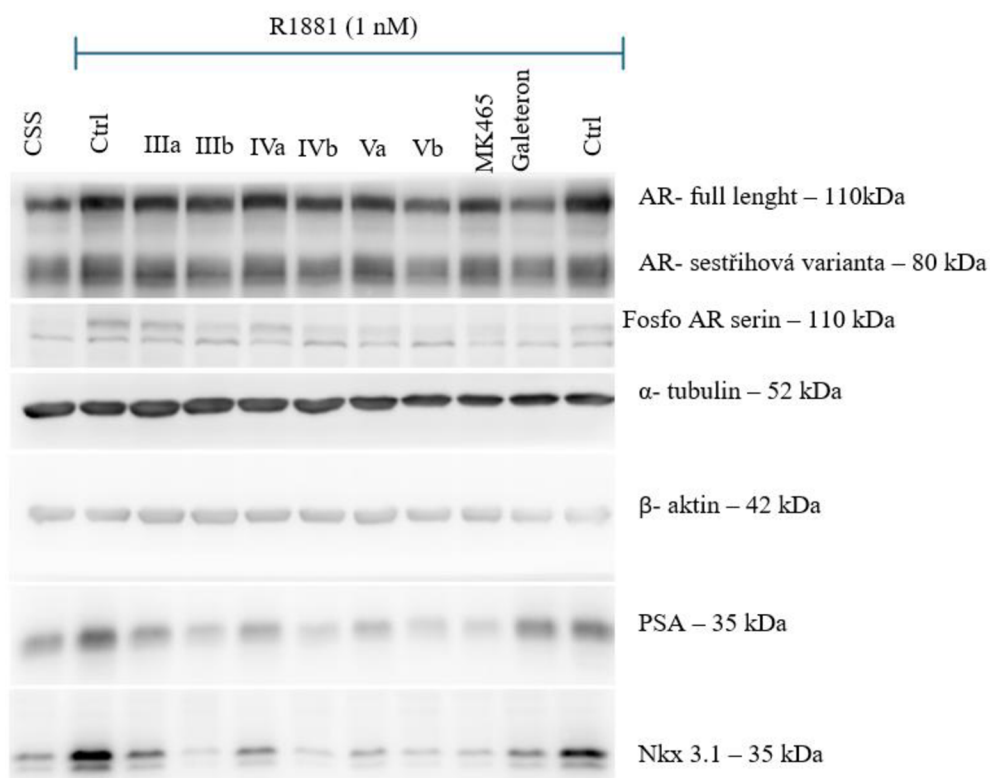
Látky	Buněčná linie (IC50)		
	22Rv1	C4-2	BJ
<b>I</b>	18,6 ± 2,1	36,0 ± 0,1	>50
<b>II</b>	17,9 ± 1,9	35,2 ± 3,3	>50
<b>III</b>	8,7 ± 1,3	19,7 ± 0,2	48,11 ± 0,16
<b>IV</b>	6,8 ± 0,2	20,7 ± 1,6	>50
<b>V</b>	7,2 ± 2,1	17,8 ± 5,6	>50
<b>VI</b>	9,5 ± 3,2	22,5 ± 4,0	>50
<b>VII</b>	9,0 ± 2,5	28,5 ± 5,0	49,35 ± 31,47
<b>MK465</b>	9,9 ± 2,2	34,0 ± 6,9	>50

## 7.2.2 Hodnocení signalizace androgenového receptoru

U nejúčinnějších látek z měření cytotoxicity (**III**, **IV** a **V**) byl pomocí imunoblottingu zkoumán jejich vliv na signalizaci AR. Deprivované buňky od androgenů mají vypnutou androgenovou signalizaci. Androgenový receptor se pravděpodobně nachází v cytosolu v komplexu s HSP. Ten není lokalizován v jádře na chromatinu, kde by aktivoval transkripci podřízených genů. Po přidání metribolonu došlo k opětovnému nárůstu hladiny AR i podřízených proteinových produktů genů (PSA a Nkx 3.1.), z čehož se dá předpokládat výskyt aktivního AR v jádře na chromatinu a opětovná exprese podřízených genů.

Na základě snímků pořízených pomocí CCD kamery (obrázek 11) vyplývá, že všechny zkoumané látky mají antagonistický účinek vůči AR. Zaznamenané koncentračně závislé poklesy na úrovni AR (Fosfo ARS81) a na úrovni podřízených genů (bandy PSA, Nkx3.1.) dokazují, že se jedná o antagonisty, kteří jsou schopni kompetice s R1881 o vazebné místo v LBD. Byla tak prokázána jejich schopnost se vázat na AR a tím ovlivňovat jeho transkripční aktivitu s jeho celou signalizací. Sjednocenost koncentrace celkových proteinů ve vzorcích dokazovaly bandy pro  $\alpha$ -tubulin a pro  $\beta$ -aktin. Můžeme také pozorovat

koncentrační pokles v PSA a NKx 3.1., vlivem zvýšené koncentrace látek **III**, **IV**, a **V**.

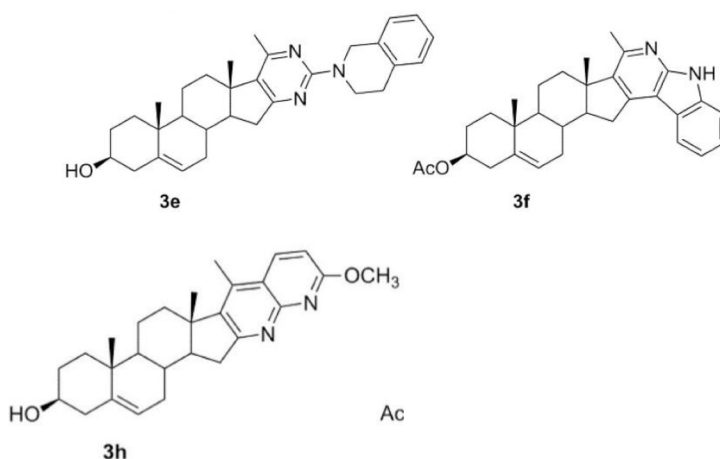


Obrázek 11 Chemiluminiscenční záznam imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie 22RV1 v CSS médiu po ovlivnění vybranými látkami o finální koncentraci a –  $7,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , b –  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , galeteronem a látkou MK465 o finální koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . AR- androgenový receptor, PSA – prostatický specifický antigen, Nkx 3.1.- homeobox doména.

## 8 DISKUZE

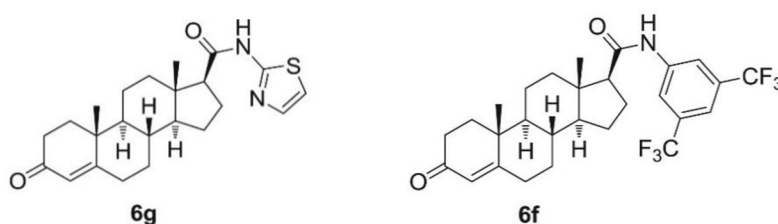
V současné době lze rakovinu prostaty částečně léčit chirurgickým odstraněním prostaty, radioterapií, brachyterapií, hormonálními terapiemi (androgen deprivací terapie) nebo pomocí chemoterapií. V rámci chemické cesty protinádorové terapie se uplatňují preparáty, které cílí na signální dráhu AR. Signální dráhu AR lze ovlivnit blokadou vlastnosti gonadotropinů indukovat syntézu testosteronu ve varlatech, inhibicí enzymů zodpovědných za syntézu androgenů, zamezení přeměny testosteronu na dihydrotestosteron nebo cílením na samotný receptor. Tyto látky jsou většinou antagonisté.

Jedním z mnoha perspektivních antagonistů je galeteron a jeho deriváty. Hodnota  $IC_{50}$  galeteronu pro nádorovou linii 22Rv1 činí  $37.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$  (Jorda *et al.*, 2019;). Na buněčné linii 22Rv1 byla také měřena hodnota  $IC_{50}$  pro syntetizované látky (I-VII). Po porovnání hodnot mezi sebou, můžeme říct, že připravené estery mají mnohem nižší hodnoty  $IC_{50}$  než galeteron. Jorda *et al.* (2019) připravili další nové deriváty odvozené od galeteronu pomocí kondenzace steranového jádra s různými aromatickými heterocykly, které byly rovněž testovány z hlediska jejich biologické aktivity (obrázek 12). Většina derivátů vykazovala hodnoty  $IC_{50}$  v rozmezí desítek mikromolárních. Tyto hodnoty jsou nižší nebo velmi podobné hodnotám látek **III**, **IV** a **V**. Při sledování vlivu látek na transkripční aktivitu AR podřízených genů navíc látky **3f**, **3h** a **3e** vykazovaly obdobný negativní účinek na expresi Nkx3.1 jako samotný galeteron a syntetizované látky **III**, **IV** a **V**.



Obrázek 12 Látky odvozené od galeteronu (Jorda *et al.*, 2019).

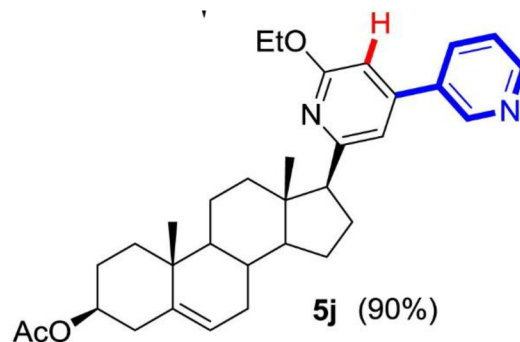
Mimo deriváty s azocykly byly rovněž připraveny i látky s různými arylkarbamoylovými skupinami na uhlíku C17 (Cortés-Benítez *et al.*, 2016). Dva z připravených derivátů (obrázek 13) (**6g**, **6f**) navíc vykazovaly vyšší inhibiční účinek na růst LNCaP buněčné linie v porovnání s komerčně dostupnými léčivy (finasterid, flutamid, ketokonazol). Obě tyto látky vykazovaly rovněž výrazný inhibiční účinek u linie PC3, což naznačuje jejich nezávislý antiproliferační účinek na androgenu. Žádná z testovaných látek navíc nevykazovala výraznější cytotoxický účinek.



Obrázek 13 Látky s arylkarbamoylovými skupinami na uhlíku C17 (**6g**, **6f**) (Cortés-Benítez *et al.*, 2016).

Shi *et al.* (2018) využili studie SAR pro determinaci potenciálních kandidátů coby nových steroidních pyridinů odvozených od abirateronu. Studie rovněž odhalila vyšší potenciální afinitu ligandů v případě vazby heterocyklického kruhu na pozici 4 pyridinového kruhu. Nejlepší kandidátní molekula se mezi všemi testovanými projevila významným zastavením růstu proti všem testovaným rakovinným buňkám, zejména buněk PC-3 s hodnotou IC<sub>50</sub> 1,55 μM. Další mechanistické studie ukázaly, že tato nejúčinnější sloučenina inhibuje tvorbu kolonií, migraci a uvolnění buněk PC-3 z tkání a indukuje apoptózu buněk PC-3, pravděpodobně prostřednictvím mitochondriálně souvisejících apoptotických drah. Aktivace kaspázy-3/-9 a PARP nakonec vedla k apoptóze buněk PC-3. Pro androgen-senzitivní (AR+) buněčnou linii rakoviny prostaty LNCaP byla nejúčinnější sloučenina méně účinná než abirateron, s hodnotami IC<sub>50</sub> 8,48 μM a 3,29 μM. Tato nejúčinnější sloučenina by mohla sloužit jako výchozí bod pro vývoj nových steroidních heterocyklů s vyšší anticancerogenní účinností a selektivitou. Syntetizované steroidní pyridiny obsahují funkční skupiny -OEt a CN, které by mohly být dále modifikovány právě nepolárními L-aminokyselinami pro rozšíření steroidní knihovny.



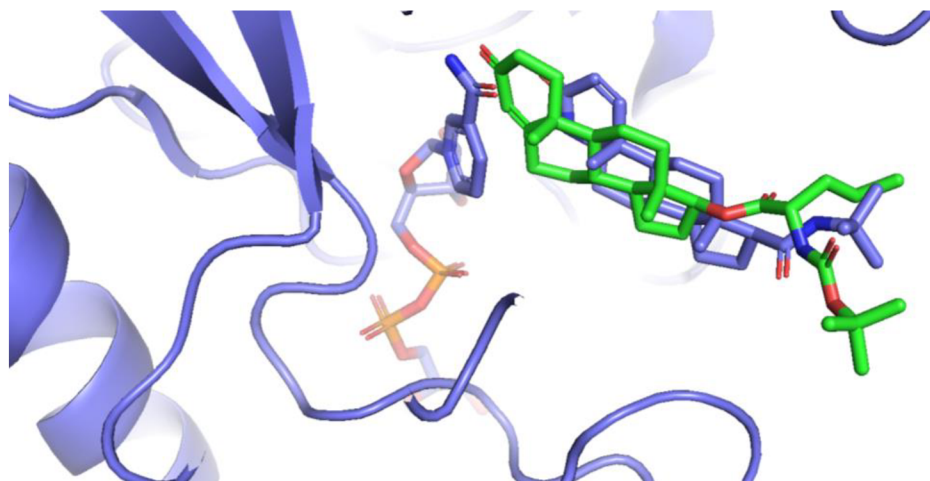


Obrázek 14 Schéma struktury nových steroidních pyridinů odvozených od abirateronu se substitucí na pozici 4 pyridinového kruhu (Shi *et al.*, 2018)

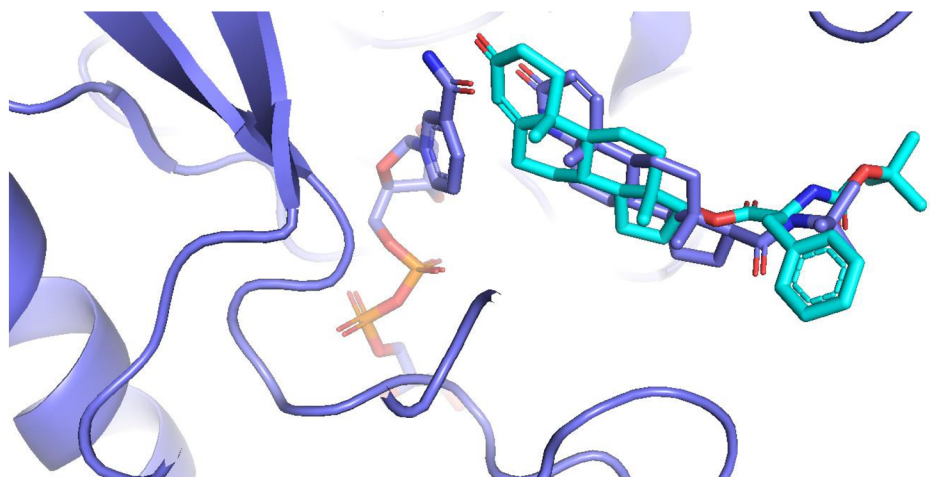
Pro zjištění, zdali dochází k metabolizaci syntetizovaných ligandů, bylo použito molekulárního dckování do enzymu  $5\alpha$ -reduktasy kokrytalizovaného s NADP, produktem reakce, a finasteridem (PDB ID: 3G1R; Drury *et al.*, 2009). Pro dckování byly vybrány ligandy s nejnižšími hodnotami  $IC_{50}$ .

Enzym  $5\alpha$ -reduktasa se podílí na redukci testosteronu na DHT, který má vyšší afinitu vůči AR. Ze získaných póz ligandů ve struktuře proteinu je patrné, že se ligandy vážou do stejného místa jako finasterid, kompetitivní inhibitor tohoto enzymu s dusíkem v pozici 4 A kruhu. Oproti finasteridu však dochází k posunu ligandů do aktivního místa blíže k nikotinamidu NADP (Obrázek 15, 16 a 17). Z toho lze vyvodit, že zkoumané ligandy mohou tímto enzymem být redukovány.

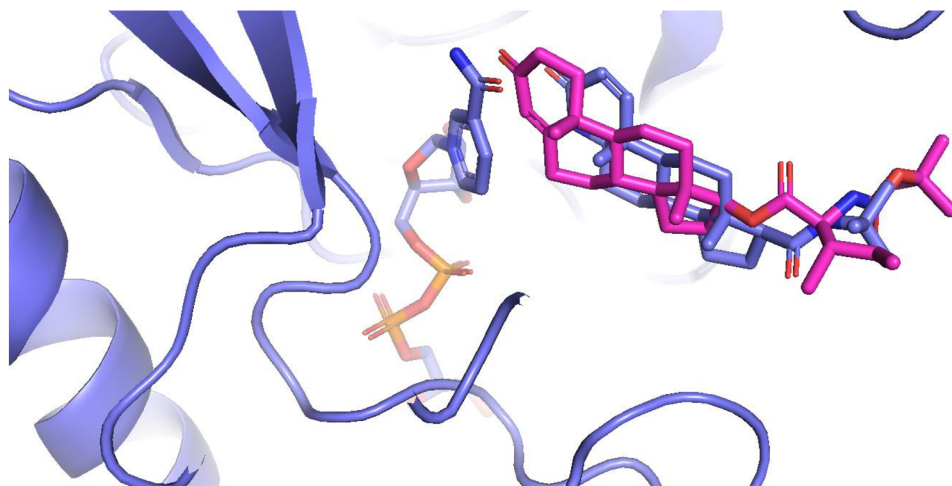
Potenciální redukce ligandů by mohla podobně jako v případě testosteronu zvýšit afinitu zkoumaných ligandů vůči androgenovému receptoru. Pro potvrzení této hypotézy by však bylo nutné připravit analoga ligandů s DHT. Druhou možností by pak byla izolace  $5\alpha$ -reduktasy či exprese rekombinantního enzymu s následným měřením substrátové specifity.



Obrázek 15 . Docking ligandu III (zelená) do struktury lidské 5 $\alpha$ -reduktasy kokrytalizované s NADP a kompetitivním inhibitorem finasteridem (modrá, PDB ID: 3G1R). Póza ligandu byla vybrána na základě nejlepší vazebné energie ( $dG = -9,7$  kJ/mol).



Obrázek 16 Docking ligandu IV (tyrkysová) do struktury lidské 5 $\alpha$ -reduktasy kokrytalizované s NADP a kompetitivním inhibitorem finasteridem (modrá, PDB ID: 3G1R). Póza ligandu byla vybrána na základě nejlepší vazebné energie ( $dG = -10,6$  kJ/mol).



Obrázek 17 Docking ligandu V (fialová) do struktury lidské 5 $\alpha$ -reduktasy kokrytalizované s NADP a kompetitivním inhibitorem finasteridem (modrá, PDB ID: 3G1R). Póza ligandu byla vybrána na základě nejlepší vazebné energie ( $dG = -10,1$  kJ/mol).

## 9 ZÁVĚR

Během této bakalářské práce bylo syntetizováno, identifikováno a vypořifikováno celkem 7 látek obsahující na 17. uhlíku D kruhu testosteronu aminokyselinu chráněnou Boc skupinou. Pro syntézy byly použity: Boc-L-alanin, Boc-L-glycin, Boc-L-norvalin, Boc-L-leucin, Boc-L-isoleucin, Boc-L-methionin. Na nádorových liniích Rv21, C4-2 a na lidských fibroblastech předkožky byla pozorována jejich biologická aktivita.

Nejnižší hodnoty  $IC_{50}$  byly pozorovány na buněčné linii 22Rv1. Na lidských fibroblastech předkožky nebyly pozorovány u většiny látek žádné cytotoxické účinky. Nejúčinnější látky byly **III** – ester s Boc-L-norvalinem, **IV** – ester s Boc-L-fenylalaninem, **V** – ester s Boc-L-isoleucinem.

U těchto tří látek byl zkoumán vliv na signalizaci androgenového receptoru. Z výsledků testů vyplývá, že případě všech tří látek se jedná o antagonisty.

## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arora, V. K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S. K., Wongvipat, J., Balbas, M. D., Shah, N., Cai, L., Efstathiou, E., Logothetis, C., Zheng, D., & Sawyers, C. L. (2013). Glucocorticoid Receptor Confers Resistance to Antiandrogens by Bypassing Androgen Receptor Blockade. *Cell*, 155(6), 1309-1322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.012>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.320>
- Azhagiya Singam, E. R., Tachachartvanich, P., La Merrill, M. A., Smith, M. T., & Durkin, K. A. (2019). Structural Dynamics of Agonist and Antagonist Binding to the Androgen Receptor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123(36), 7657-7666. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05654>
- Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., Van Allen, E., Kryukov, G. V., Sboner, A., Theurillat, J. -P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., et al. (2013). Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. *Cell*, 153(3), 666-677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>
- Baker, J. W., Bachman, G. L., Schumacher, I., Roman, D. P., & Tharp, A. L. (1967). Synthesis and Bacteriostatic Activity of Some Nitrotrifluoro Methylamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10(1), 93-95.
- Ban, F., Leblanc, E., Cavga, A. D., Huang, C. -C. F., Flory, M. R., Zhang, F., Chang, M. E. K., Morin, H., Lallous, N., Singh, K., Gleave, M. E., Mohammed, H., Rennie, P. S., Lack, N. A., & Cherkasov, A. (2021). Development of an Androgen Receptor Inhibitor Targeting the N-Terminal Domain of Androgen Receptor for Treatment of Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancers*, 13(14). <https://doi.org/10.3390/cancers13143488>
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. *American journal of clinical and experimental urology*, 6(2), 62.
- Beato, M. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225-236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>
- Bedolla, R. G., Wang, Y., Asuncion, A., Chamie, K., Siddiqui, S., Mudryj, M. M., Prihoda, T. J., Siddiqui, J., Chinnaiyan, A. M., Mehra, R., de Vere White, R. W., & Ghosh, P. M. (2009). Nuclear versus Cytoplasmic Localization of Filamin A in Prostate Cancer: Immunohistochemical Correlation with Metastases. *Clinical Cancer Research*, 15(3), 788-796. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1402>
- Berglund, E., Maaskola, J., Schultz, N., Friedrich, S., Marklund, M., Bergensträhle, J., Tarish, F., Tanoglidi, A., Vickovic, S., Larsson, L., Salmén, F., Ogris, C., Wallenborg, K., Lagergren, J., Ståhl, P., Sonnhhammer, E., Helleday, T., & Lundeberg, J. (2018). Spatial maps of prostate cancer transcriptomes reveal an unexplored landscape of heterogeneity. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04724-5>
- Bohl, C. E., Gao, W., Miller, D. D., Bell, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 6201-6206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500381102>

- Bostwick, D. G., Liu, L., Brawer, M. K., & Qian, J. (2004). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in urology*, 6(4), 171–179.
- Boyd, L. K., Mao, X., & Lu, Y. -J. (2012). The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity. *Nature Reviews Urology*, 9(11), 652–664. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.185>
- Centenera, M. M., Harris, J. M., Tilley, W. D., & Butler, L. M. (2008). Minireview: The Contribution of Different Androgen Receptor Domains to Receptor Dimerization and Signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(11), 2373–2382. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0017>
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N., & Sander, C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics*, 45(10), 1127–1133. <https://doi.org/10.1038/ng.2762>
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., & Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Receptor Signaling*, 6(1). <https://doi.org/10.1621/nrs.06008>
- Clegg, N. J., Wongvipat, J., Joseph, J. D., Tran, C., Ouk, S., Dilhas, A., Chen, Y., Grillot, K., Bischoff, E. D., Cai, L., Aparicio, A., Dorow, S., Arora, V., Shao, G., Qian, J., Zhao, H., Yang, G., Cao, C., Sensintaffar, J., et al. (2012). ARN-509: A Novel Antiandrogen for Prostate Cancer Treatment. *Cancer Research*, 72(6), 1494–1503. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3948>
- Clinckemalie, L., Vanderschueren, D., Boonen, S., & Claessens, F. (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.02.019>
- Cooperberg, M. R., Simko, J. P., Cowan, J. E., Reid, J. E., Djalilvand, A., Bhatnagar, S., Gutin, A., Lanchbury, J. S., Swanson, G. P., Stone, S., & Carroll, P. R. (2013). Validation of a Cell-Cycle Progression Gene Panel to Improve Risk Stratification in a Contemporary Prostatectomy Cohort. *Journal of Clinical Oncology*, 31(11), 1428–1434. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.4396>
- Cutress, M. L., Whitaker, H. C., Mills, I. G., Stewart, M., & Neal, D. E. (2008). Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *Journal of Cell Science*, 121(7), 957–968. <https://doi.org/10.1242/jcs.022103>
- Dalal, K., Ban, F., Li, H., Morin, H., Roshan-Moniri, M., Tam, K. J., Shepherd, A., Sharma, A., Peacock, J., Carlson, M. L., LeBlanc, E., Perez, C., Duong, F., Ong, C. J., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2018). Selectively targeting the dimerization interface of human androgen receptor with small-molecules to treat castration-resistant prostate cancer. *Cancer Letters*, 437, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.016>
- Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), R183–R196. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0141>
- Delfosse, V., Maire, A. le, Balaguer, P., & Bourguet, W. (2015). A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 88–101. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.133>
- Ding, Z., Wu, C. -J., Chu, G. C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S. R., Labrot, E. S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A. H., Scott, K. L., Signoretti, S., Bardeesy, N., et al. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains

- prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature*, 470(7333), 269-273.  
<https://doi.org/10.1038/nature09677>
- Dubbink, H. J., Hersmus, R., Pike, A. C. W., Molier, M., Brinkmann, A. O., Jenster, G., & Trapman, J. (2006). Androgen Receptor Ligand-Binding Domain Interaction and Nuclear Receptor Specificity of FXXLF and LXXLL Motifs as Determined by L/F Swapping. *Molecular Endocrinology*, 20(8), 1742-1755.  
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0348>
- Espiritu, S. M. G., Liu, L. Y., Rubanova, Y., Bhandari, V., Holgersen, E. M., Szyc, L. M., Fox, N. S., Chua, M. L. K., Yamaguchi, T. N., Heisler, L. E., Livingstone, J., Wintersinger, J., Yousif, F., Lalonde, E., Rouette, A., Salcedo, A., Houlahan, K. E., Li, C. H., Huang, V., et al. (2018). The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression. *Cell*, 173(4),
- Foley, C., & Mitsiades, N. (2016). Moving Beyond the Androgen Receptor (AR): Targeting AR-Interacting Proteins to Treat Prostate Cancer. *Hormones and Cancer*, 7(2), 84-103. <https://doi.org/10.1007/s12672-015-0239-9>
- Fujita, K., & Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The World Journal of Men's Health*, 37(3).  
<https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>
- Furr, B. J. A., Valcaccia, B., Curry, B., Woodburn, J. R., Chesterson, G., & Tucker, H. (1987). ICI 176,334: A novel non-steroidal, periphally selective antiandrogen. *Journal of Endocrinology*, 113(3), R7-R9. <https://doi.org/10.1677/joe.0.113R007>
- Gao, W., Bohl, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical Reviews*, 105(9), 3352-3370.  
<https://doi.org/10.1021/cr020456u>
- Gao, W., Bohl, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical Reviews*, 105(9), 3352-3370.  
<https://doi.org/10.1021/cr020456u>
- Gauthier, S., Martel, C., & Labrie, F. (2012). Steroid derivatives as pure antagonists of the androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1-2), 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.02.006>
- Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1-2), 70-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.004>
- Goldstein, A. S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I. P., & Witte, O. N. (2010). Identification of a Cell of Origin for Human Prostate Cancer. *Science*, 329(5991), 568-571. <https://doi.org/10.1126/science.1189992>
- Gudem, G., Van Loo, P., Kremeyer, B., Alexandrov, L. B., Tubio, J. M. C., Papaemmanuil, E., Brewer, D. S., Kallio, H. M. L., Högnäs, G., Annala, M., Kivinummi, K., Goody, V., Latimer, C., O'Meara, S., Dawson, K. J., Isaacs, W., Emmert-Buck, M. R., Nykter, M., Foster, C., et al. (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*, 520(7547), 353-357.  
<https://doi.org/10.1038/nature14347>
- Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature Clinical Practice Urology*, 6(2), 76-85.  
<https://doi.org/10.1038/ncpuro1296> Začátek formuláře

- He, B., Kempainen, J. A., & Wilson, E. M. (2000). FXXLF and WXXLF Sequences Mediate the NH<sub>2</sub>-terminal Interaction with the Ligand Binding Domain of the Androgen Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22986-22994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002807200>
- 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. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0019>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocrine Reviews*, 23(2), 175-200. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0460>
- Hieronimus, H., Schultz, N., Gopalan, A., Carver, B. S., Chang, M. T., Xiao, Y., Heguy, A., Huberman, K., Bernstein, M., Assel, M., Murali, R., Vickers, A., Scardino, P. T., Sander, C., Reuter, V., Taylor, B. S., & Sawyers, C. L. (2014). Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), 11139-11144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411446111>
- Hong, M. K. H., Macintyre, G., Wedge, D. C., Van Loo, P., Patel, K., Lunke, S., Alexandrov, L. B., Sloggett, C., Cmero, M., Marass, F., Tsui, D., Mangiola, S., Lonie, A., Naeem, H., Sapre, N., Phal, P. M., Kurganovs, N., Chin, X., Kerger, M., et al. (2015). Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nature Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms7605>
- Chan, S. C., & Dehm, S. M. (2014). Constitutive Activity of the Androgen Receptor. In *Pharmacology & Therapeutics of Constitutively Active Receptors* (pp. 327-366). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00011-0>
- Chan, S. C., & Dehm, S. M. (2014). Constitutive Activity of the Androgen Receptor. In *Pharmacology & Therapeutics of Constitutively Active Receptors* (pp. 327-366). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00011-0>
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational andrology and urology*, 4(3), 365-380. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>
- Chua, C. W., Shibata, M., Lei, M., Toivanen, R., Barlow, L. M. J., Bergren, S. K., Badani, K. K., McKiernan, J. M., Benson, M. C., Hibshoosh, H., & Shen, M. M. (2014). Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nature Cell Biology*, 16(10), 951-961. <https://doi.org/10.1038/ncb3047>
- Ishizuka, O., Nishizawa, O., Hirao, Y., & Ohshima, S. (2002). Evidence-based meta-analysis of pharmacotherapy for benign prostatic hypertrophy. *International Journal of Urology*, 9(11), 607-612. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2042.2002.00539.x>
- J. Brand, L., & M. Dehm, S. (2013). Androgen Receptor Gene Rearrangements: New Perspectives on Prostate Cancer Progression. *Current Drug Targets*, 14(4), 441-449. <https://doi.org/10.2174/1389450111314040005>
- Jääskeläinen, J., Deeb, A., Schwabe, J. W., Mongan, N. P., Martin, H., & Hughes, I. A. (2006). Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(2), 361-368. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01885>
- Jenster, G., Trapman, J., & Brinkmann, A. O. (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochemical Journal*, 293(3), 761-768. <https://doi.org/10.1042/bj2930761>



Joseph, J. D., Lu, N., Qian, J., Sensintaffar, J., Shao, G., Brigham, D., Moon, M., Maneval, E. C., Chen, I., Darimont, B., & Hager, J. H. (2013). A Clinically Relevant Androgen Receptor Mutation Confers Resistance to Second-Generation Antiandrogens Enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discovery*, 3(9), 1020-1029. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0226>

Joseph, J. D., Lu, N., Qian, J., Sensintaffar, J., Shao, G., Brigham, D., Moon, M., Maneval, E. C., Chen, I., Darimont, B., & Hager, J. H. (2013). A Clinically Relevant Androgen Receptor Mutation Confers Resistance to Second-Generation Antiandrogens Enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discovery*, 3(9), 1020-1029. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0226>

Klocker, H., Culig, Z., Eder, I. E., Nessler-Menardi, C., Hobisch, A., Putz, T., Bartsch, G., Peterziel, H., & Cato, A. C. B. Mechanism of Androgen Receptor Activation and Possible Implications for Chemoprevention Trials. *European Urology*, 35(5-6), 413-419. <https://doi.org/10.1159/000019918>

Kluetz, P. G., Ning, Y. -M., Maher, V. E., Zhang, L., Tang, S., Ghosh, D., Aziz, R., Palmby, T., Pfuma, E., Zirkelbach, J. F., Mehrotra, N., Tilley, A., Sridhara, R., Ibrahim, A., Justice, R., & Pazdur, R. (2013). Abiraterone Acetate in Combination with Prednisone for the Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: U.S. Food and Drug Administration Drug Approval Summary. *Clinical Cancer Research*, 19(24), 6650-6656. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2134>

Korpai, M., Korn, J. M., Gao, X., Rakiec, D. P., Ruddy, D. A., Doshi, S., Yuan, J., Kovats, S. G., Kim, S., Cooke, V. G., Monahan, J. E., Stegmeier, F., Roberts, T. M., Sellers, W. R., Zhou, W., & Zhu, P. (2013). An F876L Mutation in Androgen Receptor Confers Genetic and Phenotypic Resistance to MDV3100 (Enzalutamide). *Cancer Discovery*, 3(9), 1030-1043. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0142>

Kuiper, G. G. J. M., Faber, P. W., van Rooij, H. C. J., van der Korput, J. A. G. M., Ris-Stalpers, C., Klaassen, P., Trapman, J., & Brinkmann, A. O. (1989). Structural organisation of the human androgen receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2(3), R1-R4. <https://doi.org/10.1677/jme.0.002R001>

Kwegyir-Afful, A. K., Ramalingam, S., Ramamurthy, V. P., Purushottamachar, P., Murigi, F. N., Vasaitis, T. S., Huang, W., Kane, M. A., Zhang, Y., Ambulos, N., Tiwari, S., Srivastava, P., Nnane, I. P., Hussain, A., Qiu, Y., Weber, D. J., & Njar, V. C. O. (2019). Galeterone and The Next Generation Galeterone Analogs, VNPP414 and VNPP433-3 $\beta$  Exert Potent Therapeutic Effects in Castration-/Drug-Resistant Prostate Cancer Preclinical Models In Vitro and In Vivo. *Cancers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111637>

Lallous, N., Dalal, K., Cherkasov, A., & Rennie, P. (2013). Targeting Alternative Sites on the Androgen Receptor to Treat Castration-Resistant Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12496-12519. <https://doi.org/10.3390/ijms140612496>

Lambright, C. (2000). Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Linuron: An Antiandrogenic Herbicide that Produces Reproductive Malformations in Male Rats. *Toxicological Sciences*, 56(2), 389-399. <https://doi.org/10.1093/toxsci/56.2.389>

Lee, S. H., & Shen, M. M. (2015). Cell types of origin for prostate cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.002>

- Li, H., Ban, F., Dalal, K., Leblanc, E., Frewin, K., Ma, D., Adomat, H., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2014). Discovery of Small-Molecule Inhibitors Selectively Targeting the DNA-Binding Domain of the Human Androgen Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(15), 6458-6467. <https://doi.org/10.1021/jm500802j>
- Li, H., Hassona, M. D. H., Lack, N. A., Axerio-Cilies, P., Leblanc, E., Tavassoli, P., Kanaan, N., Frewin, K., Singh, K., Adomat, H., Böhm, K. J., Prinz, H., Guns, E. T., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2013). Characterization of a New Class of Androgen Receptor Antagonists with Potential Therapeutic Application in Advanced Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(11), 2425-2435. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0267>
- Li, H., Ren, X., Leblanc, E., Frewin, K., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2013). Identification of Novel Androgen Receptor Antagonists Using Structure- and Ligand-Based Methods. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(1), 123-130. <https://doi.org/10.1021/ci300514v>
- Li, Z., Bishop, A. C., Alyamani, M., Garcia, J. A., Dreicer, R., Bunch, D., Liu, J., Upadhyay, S. K., Auchus, R. J., & Sharifi, N. (2015). Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer. *Nature*, 523(7560), 347-351. <https://doi.org/10.1038/nature14406>
- Lim, M., Otto-Duessel, M., He, M., Su, L., Nguyen, D., Chin, E., Alliston, T., & Jones, J. O. (2014). Ligand-Independent and Tissue-Selective Androgen Receptor Inhibition by Pyrvinium. *ACS Chemical Biology*, 9(3), 692-702. <https://doi.org/10.1021/cb400759d>
- Marcelli, M. (2017). Androgen Receptor in Health and Disease. In A. Hohl (Ed.), *Testosterone* (pp. 21-73). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46086-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46086-4_2)
- Martinović, D., Blake, L. S., Durhan, E. J., Greene, K. J., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Villeneuve, D. L., & Ankley, G. T. (2008). Reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow: Confirming an anti-androgenic mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(2), 478-488. <https://doi.org/10.1897/07-206R.1>
- Matsumoto, T., Sakari, M., Okada, M., Yokoyama, A., Takahashi, S., Kouzmenko, A., & Kato, S. (2013). The Androgen Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 201-224. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183656>
- Modi, P. K., Faiena, I., & Kim, I. Y. (2016). Androgen Receptor. In *Prostate Cancer* (pp. 21-28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800077-9.00003-7>
- Moilanen, A. -M., Riikonen, R., Oksala, R., Ravanti, L., Aho, E., Wohlfahrt, G., Nykänen, P. S., Törmäkangas, O. P., Palvimo, J. J., & Kallio, P. J. (2015). Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep12007>
- Mooso, B. A., Vinall, R. L., Tepper, C. G., Savoy, R. M., Cheung, J. P., Singh, S., ... & Ghosh, P. M. (2012). Enhancing the effectiveness of androgen deprivation in prostate cancer by inducing Filamin A nuclear localization. *Endocrine Related Cancer*, 19(6), 759.
- 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-

- Newschaffer, C. J., Otani, K., McDonald, M. K., & Penberthy, L. T. (2000). Causes of Death in Elderly Prostate Cancer Patients and in a Comparison Nonprostate Cancer Cohort. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 92(8), 613-621. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.8.613>
- Njar, V. C. O., & Brodie, A. M. H. (2015). Discovery and Development of Galeterone (TOK-001 or VN/124-1) for the Treatment of All Stages of Prostate Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(5), 2077-2087. <https://doi.org/10.1021/jm501239f>
- 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(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9030022>
- Potter, G. A., Barrie, S. E., Jarman, M., & Rowlands, M. G. (1995). Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017. alpha.-Hydroxylase-C17, 20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 38(13), 2463-2471.
- Purushottamachar, P., Godbole, A. M., Gediya, L. K., Martin, M. S., Vasaitis, T. S., Kwegyir-Afful, A. K., Ramalingam, S., Ates-Alagoz, Z., & Njar, V. C. O. (2013). Systematic Structure Modifications of Multitarget Prostate Cancer Drug Candidate Galeterone To Produce Novel Androgen Receptor Down-Regulating Agents as an Approach to Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(12), 4880-4898. <https://doi.org/10.1021/jm400048v>
- Radaeva, M., Ban, F., Zhang, F., LeBlanc, E., Lallous, N., Rennie, P. S., Gleave, M. E., & Cherkasov, A. (2021). Development of Novel Inhibitors Targeting the D-Box of the DNA Binding Domain of Androgen Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052493>
- Raynaud, J. P., Bonne, C., Moguilewsky, M., Lefebvre, F. A., Bélanger, A., & Labrie, F. (1984). The pure antiandrogen ru 23908 (anandron®), a candidate of choice for the combined antihormonal treatment of prostatic cancer: A review. *The Prostate*, 5(3), 299-311. <https://doi.org/10.1002/pros.2990050307>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Robins, D. M. (2012). Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: Of humanized mice and men. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1-2), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.003>
- Savoy, R. M., & Ghosh, P. M. (2013). The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocrine-Related Cancer*, 20(6), R341-R356. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0364>
- Savoy, R. M., Chen, L., Siddiqui, S., Melgoza, F. U., Durbin-Johnson, B., Drake, C., ... & Ghosh, P. M. (2015). Transcription of *Nrdp1* by the androgen receptor is regulated by nuclear filamin A in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 22(3), 369-386.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>

- Sharifi, N., & Auchus, R. J. (2012). Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids*, 77(7), 719-726. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.015>
- Shtivelman, E., Beer, T. M., & Evans, C. P. (2014). Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget*, 5(17), 7217-7259. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2406>
- Scher, H. I., & Sawyers, C. L. (2005). Biology of Progressive, Castration-Resistant Prostate Cancer: Directed Therapies Targeting the Androgen-Receptor Signaling Axis. *Journal of Clinical Oncology*, 23(32), 8253-8261. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.4777>
- Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (1984). *Atlas fyziologie člověka*.
- Soronen, P., Laiti, M., Törn, S., Härkönen, P., Patrikainen, L., Li, Y., Pulkka, A., Kurkela, R., Herrala, A., Kaija, H., Isomaa, V., & Vihko, P. (2004). Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(4), 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.004>
- Tan, M. H. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. -leong. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Tan, M. H. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. -leong. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Tindall, D. J., & Lonergan, P. E. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*, 10(1). <https://doi.org/10.4103/1477-3163.83937>
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., Wasielewska, T., Welsbie, D., Chen, C. D., Higano, C. S., Beer, T. M., Hung, D. T., Scher, H. I., Jung, M. E., & Sawyers, C. L. (2009). Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science*, 324(5928), 787-790. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>
- US Food and Drug Administration. (2019). FDA approves darolutamide for non-metastatic castration-resistant prostate cancer. 2019
- Velcheti, V., Karnik, S., Bardot, S. F., & Prakash, O. (2008). Pathogenesis of prostate cancer: lessons from basic research. *Ochsner Journal*, 8(4), 213-218.
- Vis, A. N., & Schröder, F. H. (2009). Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. *BJU International*, 104(4), 438-448. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08695.x>
- Wang, Y., Kreisberg, J. I., Bedolla, R. G., Mikhailova, M., deVere White, R. W., & Ghosh, P. M. (2007). A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells. *Oncogene*, 26(41), 6061-6070.
- Xu, R., Tian, Y., Huang, S., Yu, J., Deng, Y., Zhan, M., Zhang, T., Wang, F., Zhao, L., & Chen, Y. (2018). Synthesis and evaluation of novel thiazole-based derivatives as

selective inhibitors of DNA-binding domain of the androgen receptor. *Chemical Biology & Drug Design*, 91(1), 172-180. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13068>

Zacharia, L. C. (2017). Permitted Daily Exposure of the Androgen Receptor Antagonist Flutamide. *Toxicological Sciences*, 159(2), 279-289. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx135>