

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie



Nové steroidní sloučeniny a jejich vliv na jaderné receptory

Diplomová práce

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| Autor: | Bc. Lukáš MADA |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Ročník studia: | Pátý |
| Pracoviště: | Katedra experimentální biologie |
| Vedoucí práce: | Mgr. Radek JORDA, Ph.D. |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Lukáš Mada |
| Název práce | Nové steroidní sloučeniny a jejich vliv na jaderné receptory |
| Typ práce | Magisterská |
| Pracoviště | Katedra experimentální biologie |
| Vedoucí práce | Mgr. Radek Jorda, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2023 |

Abstrakt

Androgenní receptor (AR) patří mezi jaderné receptory a hraje klíčovou roli ve vývoji rakoviny prostaty. Působí jako transkripční faktor pro expresi proteinů, jakými jsou například PSA a Nkx3.1.

V případě rakoviny prostaty se nejmodernější vědecké přístupy zaměřují na inhibici transkripční aktivity AR, zablokování vazby ligandu či inhibici koaktivátorů AR, které jsou klíčové pro jeho konečnou aktivitu. Zajímavých úspěchů se v současnosti povedlo dosáhnout ve vývoji technologie PROTAC, která umožňuje cílenou degradaci AR.

V praktické části této práce je pozornost zaměřena na studium dvou sérií látek odvozených od galeteronu a jejich vlivu na AR a estrogenní receptor (ER). U vybraných prostatických nádorových linií byl stanoven vliv studovaných látek na transkripční aktivitu AR a pomocí imunoblotingu byly sledovány exprese klíčových proteinů signalizace AR. Součástí práce byla i optimalizace reporterové eseje pro ER pomocí přechodné transfekce s cílem otestovat specifitu vybraných sloučeniny vůči ER.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | rakovina prostaty, androgenní receptor, imunodetekce, reportérová esej, transfekce, průtoková cytometrie |
| Počet stran | 107 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Bc. Lukáš Mada |
| Title of thesis | Novel steroidal compounds and their effect to nuclear receptors |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Department of experimental biology |
| Supervisor | Mgr. Radek Jorda, Ph.D. |
| The year of presentation | 2023 |

Abstract

The androgen receptor (AR) is a nuclear receptor and plays a key role in the development of prostate cancer. It acts as a transcription factor for the expression of proteins such as PSA and Nkx3.1.

Recent scientific approaches to prostate cancer treatment have focused on inhibiting the AR transcriptional activity, blocking ligand binding or inhibiting AR coactivators which are critical for its ultimate activity. An interesting approach has been introduced by PROTAC technology, which allows for targeted degradation of AR.

In the practical part of this thesis, the focus is on the study of two series of compounds derived from galeterone and their influence on AR and estrogen receptor (ER). The effect of the studied compounds on the transcriptional activity of AR was determined in selected prostate cancer cell lines and the expression of key proteins of AR signaling was analysed using immunoblotting. The thesis also includes the optimization of a reporter assay for ER through transient transfection to test the specificity of selected compounds against ER.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | prostate cancer, androgen receptor, immunodetection, reporter assay, transfection, flow cytometry |
| Number of pages | 107 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.“

V Olomouci dne 3. 5. 2023

Bc. Lukáš Mada

„Rád bych na tomto místě poděkoval svému vedoucímu Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a důvěru. Velké díky patří také mému kolegovi Mgr. Miroslavu Peřinovi za nesčetné praktické rady a ochotu vždy pomoci. Poděkování patří také všem členům Katedry experimentální biologie za milé přijetí.“

Diplomová práce byla podpořena Univerzitou Palackého v Olomouci (IGA_2023_012) a projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

OBSAH

| | |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk | 9 |
| Cíle práce | 11 |
| 1 Úvod | 12 |
| 2 Současný stav řešené problematiky | 14 |
| 2.1 Karcinom prostaty | 14 |
| 2.1.1 Genetické predispozice karcinomu prostaty | 14 |
| 2.1.2 Vybrané markery karcinomu prostaty | 15 |
| 2.2 Jaderné receptory | 17 |
| 2.3 Androgenní receptor | 17 |
| 2.3.1 Struktura androgenního receptoru | 18 |
| 2.3.2 Aktivace androgenního receptoru | 21 |
| 2.3.3 Koaktivátory androgenního receptoru | 23 |
| 2.3.4 Agonisté androgenního receptoru | 24 |
| 2.3.5 Aberace v androgenním receptoru | 25 |
| 2.4 Léčba rakoviny prostaty skrze androgenní receptor | 27 |
| 2.4.1 Agonisté a antagonisté LHRH receptoru | 28 |
| 2.4.2 Inhibitory syntézy androgenů | 29 |
| 2.4.3 Steroidní antiandrogeny | 31 |
| 2.4.4 Nesteroidní antiandrogeny první generace | 36 |
| 2.4.5 Nesteroidní antiandrogeny druhé generace | 37 |
| 2.4.6 Inhibitory koaktivátorů androgenního receptoru | 43 |
| 2.4.7 Inhibitory N-terminální domény AR | 45 |
| 2.4.8 Cílená ubikvitinace AR technologií PROTAC | 46 |
| 2.4.9 Úloha GR při rezistenci na léčbu rakoviny prostaty | 48 |
| 2.5 Role ER v rakovině prostaty | 49 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3 | Experimentální část..... | 51 |
| 3.1 | Materiál..... | 51 |
| 3.1.1 | Chemikálie..... | 51 |
| 3.1.2 | Roztoky..... | 52 |
| 3.1.3 | Biologický materiál..... | 54 |
| 3.1.4 | Protilátky..... | 55 |
| 3.1.5 | Testované látky a standardy..... | 56 |
| 3.1.6 | Přístrojové vybavení..... | 57 |
| 3.2 | Metody..... | 58 |
| 3.2.1 | Kultivace buněk..... | 58 |
| 3.2.2 | Příprava a ovlivnění buněk pro imunodetekci..... | 59 |
| 3.2.3 | Sklízení a lýze buněk..... | 59 |
| 3.2.4 | Polyakrylamidová elektroforéza a Western blot..... | 60 |
| 3.2.5 | Imunodetekce proteinů..... | 62 |
| 3.2.6 | Izolace a purifikace plazmidů..... | 63 |
| 3.2.7 | Transfekce plazmidů do buněčné linie..... | 64 |
| 3.2.8 | Reportérová esej pro ER..... | 65 |
| 3.2.9 | Reportérová esej pro AR..... | 65 |
| 3.2.10 | Analýza buněčného cyklus průtokovým cytometrem..... | 66 |
| 4 | Výsledky a diskuze..... | 68 |
| 4.1 | Transkripční aktivita AR po ovlivnění studovanými látkami..... | 68 |
| 4.2 | Expresse vybraných proteinů souvisejících se signalizací AR po ovlivnění studovanými látkami..... | 72 |
| 4.3 | Expresse vybraných proteinů souvisejících se signalizací AR po ovlivnění užším výběrem látek..... | 76 |
| 4.3.1 | Expresse proteinů po kultivaci buněk v plném séru s vybranými látkami.. | 76 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.2 | Exprese proteinů po kultivaci buněk ve stripovaném séru s vybranými látkami | 78 |
| 4.4 | Izolace a purifikace plazmidů | 82 |
| 4.5 | Optimalizace transfekce plazmidů..... | 84 |
| 4.5.1 | Transfekce plazmidu ER α | 84 |
| 4.5.2 | Transfekce plazmidu FNC+RNC..... | 85 |
| 4.5.3 | Společná transfekce plazmidu ER α a plazmidu FNC+RNC..... | 87 |
| 4.6 | Optimalizace reportérové eseje pro ER | 88 |
| 4.7 | Relativní luciferázová aktivita u transfekované buněčné linie SKBR3 po ovlivnění užším výběrem látek..... | 90 |
| 4.8 | Vliv vybraných látek na buněčný cyklus u buněčné linie LNCaP | 93 |
| 5 | Závěr | 96 |
| | Literatura..... | 98 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------|---|
| AA | akrylamid |
| AF | aktivační oblast |
| ALT | alaninaminotransferáza |
| APS | peroxodisíran amonný |
| AR | androgenní receptor |
| AR-Vs | alternativní varianty/sestříhy AR |
| ARE | androgen-responzivní element |
| BET | bromodoménové a extraterminální proteiny |
| BIS | N,N'-methylenbisakrylamid |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| BRD | bromodomain-containing protein |
| CBP | CREB-binding protein |
| CDK | cyclin dependent kinase |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| CRPC | castrate-resistant prostate cancer |
| CSS | charcoal-stripped bovine serum |
| DBD | DNA vazebná doména |
| DHT | dihydrotestosterone |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DTT | dithiotreitol |
| D4A | $\Delta(4)$ -abirateron |
| D4G | $\Delta(4)$ -galeteron |
| ECACC | European Collection of Authenticated Cell Cultures |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EGTA | kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová |
| ER | estrogenní receptor |
| ERE | estrogen-responzivní element |
| ERG | gen spojený s transformací erytroblastu |
| E2 | 17 β -estradiol |
| fAR (S81) | fosforylovaná forma AR na serinu v pozici 81 |
| FBS | bovinní fetální sérum |

| | |
|---------|---|
| FDA | Food and Drug Administration |
| FNC | firefly luciferáza |
| GnRH | hormon uvolňující gonadotropin |
| GR | glukokortikoidní receptor |
| HEPES | kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová |
| HSP | protein teplotního šoku |
| LBD | ligand vazebná doména |
| LBP | ligand vazebná kapsa |
| LHRH | hormon uvolňující luteinizační hormon |
| mCRPC | metastatická forma CRPC |
| MDM2 | ouse double minute 2 homolog |
| nmCRPC | nemetastatická forma CRPC |
| NTD | N-terminální doména |
| PARP | poly(ADP-robóza)polymeráza |
| PBS | phosphate buffered saline, fosfátový pufr |
| PIM | protoonkogení serin/treonin protein kináza |
| PMSF | fenylmethylsulfonyl fluorid |
| PR | progesteronový receptor |
| PROTAC | proteolysis-targeting chimera |
| PSA | prostatický specifický antigen |
| RB1 | retinoblastomový protein |
| RLA | relativní luciferázová aktivita |
| RNC | renilla luciferáza |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| R1881 | metribolon |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SGK1 | serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 |
| TBS | tris-buffered saline, tris-pufr |
| TBS-T | TBS s TWEEN 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin |
| TMPRSS2 | transmembránová serinová proteáza 2 |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Cílem teoretické části této práce bylo seznámit se s problematikou rakoviny prostaty v souvislosti s aktivitou androgenního receptoru a jemu podřízených proteinů.

Dále bylo cílem sjednotit dosavadní poznatky o problematice léčby rakoviny prostaty pomocí klasických i moderních medicínských metod, jakými jsou inhibitory syntézy androgenů, agonisté a antagonisté LHRH receptorů, steroidní a nesteroidní antiandrogeny, inhibitory N-terminální domény, inhibitory koaktivátorů androgenního receptoru nebo technologie PROTAC.

Experimentální část

Cílem praktické části bakalářské práce bylo naučit se pracovat s buněčnými kulturami ve sterilním prostředí. Dále stanovit koncentraci proteinů, pracovat s elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a metodou Western blotting, provést imunodetekci proteinů s chemiluminiscenční detekcí a analyzovat obsah DNA pomocí průtokové cytometrie. Cílem experimentální části bylo také optimalizovat využití transfekce plazmidů nesoucí geny pro estrogení receptor a vybrané luciferázy do buněk rakoviny prsu s cílem využít takto modifikované buňky k reportérové eseji.

Dalším cílem bylo testovat vybrané látky a jejich agonistický či antagonistický charakter vůči androgennímu receptoru. Cílem bylo prokázat potenciál těchto látek při léčbě rakoviny prostaty. Pomocí optimalizované reportérové eseje bylo také cílem testovat specifitu vybraných látek vůči estrogenímu receptoru. V neposlední řadě bylo cílem testovat vliv inhibice transkripční aktivity androgenního receptoru na expresi vybraných proteinů a na stádium buněčného cyklu buněk.

1 ÚVOD

Rakovina prostaty patří mezi nejnebezpečnější karcinomy u mužů, hned vedle karcinomu kolorekta a plic. Ročně je celosvětově diagnostikováno takřka 20 miliónů případů v různé fázi onemocnění. Zatímco dřívější stádia nemoci nepředstavují výrazné riziko, u pokročilejších stádií je prognóza nejistá. Klíčovými faktory v boji proti rakovině prostaty jsou vedle zdravého životního stylu také pravidelná vyšetření a časná diagnóza.

Androgenní receptor patří mezi tzv. jaderné receptory, které se na rozdíl od membránových receptorů nacházejí uvnitř buňky a primárně nepřenášejí signál skrze složité kaskády, ale přímo působí jako transkripční faktory v jádře. Tuto skutečnost umožňuje fakt, že ligandem těchto receptorů jsou lipofilní molekuly, které se snadno dostanou skrze cytoplazmatickou membránu do cytosolu buňky, kde se naváží na jaderný receptor. V případě androgenního receptoru je přirozeným ligandem testosteron, respektive dihydrotestosteron, který vzniká z testosteronu v cytosolu buňky. Po jeho navázání na androgenní receptor dojde k několikanásobné fosforylaci, metylaci a acetylaci, což vede k dimerizaci receptoru a jeho translokaci do jádra. Tam v přítomnosti koaktivátorů vytváří komplex, který je schopen vazby na DNA a působí jako transkripční faktor. Mezi významné proteiny, jejichž exprese ovlivňuje androgenní receptor patří PSA a Nkx3.1.

Nadměrná tvorba androgenů, amplifikace androgenního receptoru či jeho kontinuální aktivita jsou mechanismy, které buňky karcinomu prostaty využívají pro vývoj nádoru. Prvotní metody léčby spočívaly v chirurgické kastraci či radioterapii. Tyto postupy se ukázaly jako neúčinné a bylo nutné vyvinout cílenou léčbu skrze inhibici syntézy androgenů a potlačení transkripční aktivity AR. V současnosti tak existuje pestrá škála moderních přístupů. Léčba je v prvotních stádiích zaměřena na potlačení hladin androgenů na kastracní úroveň. Bohužel je tento postup účinný pouze v prvních letech léčby. Následně dochází k vývoji na kastraci rezistentní rakoviny prostaty, kde dochází k transkripční aktivitě AR i při takřka nulových hladinách androgenů.

Nejmodernější přístupy tak cílí na samotný AR. Byli vyvinuty steroidní i nesteroidní antagonisté AR, kteří se vážou na místo přirozených ligandů a zamezují tak

aktivaci receptoru. Mezi významné látky tohoto typu patří galeteron, který našel uplatnění převážně ve vědecké sféře a enzalutamid, který je dnes využíván v léčbě rakoviny prostaty. Omezení těchto látek je jejich vazba na ligand vazebnou doménu receptoru, která nemusí být u některých alternativních sestřihových variant přítomna. Vůči těmto variantám jsou naopak účinné inhibitory vážící se na N-terminální doménu či inhibitory koaktivátorů androgenního receptoru. V rámci nejmodernějších přístupů se vyvíjí průlomová technologie PROTAC, která často využívá již známé antagonisty a agonisty AR k vazbě molekuly PROTAC na androgenní receptor. Tyto molekuly následně fungují jako spojka mezi AR a E3 ubikvitin ligázou, která ubikvitinizuje AR, čímž ho označuje k degradaci v proteazomu.

Praktická část se věnuje studiu vlivu starší a nové série látek odvozených od galeteronu. Pozornost byla zaměřena na studium antagonistického a agonistického vlivu těchto látek vůči AR a na imunodetekci klíčových proteinů u buněk ovlivněných těmito látkami. Byl studován také vliv vybraných látek na buněčný cyklus. Pro detailnější pohled na charakter studovaných látek byla v rámci této práce optimalizována transfekce plazmidů do buněčné linie rakoviny prsu s cílem připravit reportérovou esej pro estrogenní receptor, který hraje ve vývoji rakoviny prostaty také svou roli.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je maligní forma rakovinového bujení postihující předstojnou žlázu, prostatu. Jedná se o mužský reprodukční přídatný orgán nacházející se pod močovým měchýřem a obklopující močovou trubici. Hlavní funkcí této žlázy je podílet se na tvorbě spermatu.

V současnosti se onemocnění karcinomem prostaty celosvětově řadí na přední příčky incidence po boku karcinomu prsu, kolorekta a plic (Sung a kol., 2021). Ročně se celosvětově diagnostikuje přes 19 miliónů nových případů rakoviny, z toho rakovina prostaty představuje cca 7,3 %. Četnost výskytu tohoto onemocnění je také úzce spjata s věkem. Zatímco u mužů pod 40 let se takřka nevyskytuje, od 60. roku život incidence prudce stoupá. Negativní rodinná anamnéza může tuto hranici posunout až o deset let (Johns a kol., 2003). I přes zvyšující se výskyt je v porovnání s ostatními typy rakovin mortalita karcinomu prostaty výrazně nižší (Siegel a kol., 2021). Velké procento těchto nádorů je latentních a nevykazují tak maligní aktivitu. Za povšimnutí stojí také rozdílný výskyt karcinomu prostaty u jednotlivých ras. Nejvíce je tímto onemocněním zasažena černošská populace, a to převážně v USA. Naopak mongoloidní rasa vykazuje nižší výskyt tohoto typu rakoviny. Matoušková dává tato fakta do souvislosti také se životním stylem obyvatel Asie a USA. Zatímco v Japonsku a Číně převládá rostlinná strava, v západních zemích dominují živočišné tuky a strava bohatá na jednoduché cukry (Matoušková, 2008).

2.1.1 Genetické predispozice karcinomu prostaty

Genetické predispozice pro tento typ nádorového bujení nejsou jednoznačné (Attard a kol., 2016). Mohou vycházet ze vzácných, ale vysoce penetrantních mutací, případně z genetických variant s nižším rizikem. Možností je samozřejmě také kombinace obou výše zmíněných typů mutací. Již dřívější studie naznačovaly rodinné shlukování rakoviny prostaty skrze autozomálně dominantní dědičnost alel příslušných genů (Carter a kol., 1992). Tato studie potvrdila, že tato dědičná forma rakoviny prostaty je vysoce penetrantní (u osob nad 85 let v cca 88 % případů) a je zodpovědná za časný nástup nemoci ve věku pod 40 let, ovšem na celkovém počtu onemocnění se podílí jen z cca 9 %. Tyto myšlenky, tedy že rodinná agregace je způsobena malým množstvím

autozomálně dominantních alel s vysokou penetrací, dominovaly v 90. letech 20. století. Novější studie však přináší odlišný názor. Dle Maclniss a kol. jsou modely vycházející z jediného způsobu dědičnosti nerealistické (Maclniss a kol., 2010). Je tedy vysoce pravděpodobné, že rodinné shlukování je způsobeno více geny a je úzce spjaté se životním stylem. V úvahu připadají modely s pouze recesivními geny, ale také s geny vázanými na chromozom X, případně model heterogenity s dvěma až třemi dominantními geny.

Jedním z genů, u kterého byla prokázána souvislost mezi jeho mutací a dědičností karcinomu prostaty je gen *HOXB13* kódující homeoboxový protein Hox-B13 (Ewing a kol., 2012). Konkrétně se jedná o mutaci G84E. Byla prokázána její spojitost s výrazně zvýšeným rizikem dědičnosti karcinomu prostaty, ačkoli je tato varianta přítomna jen ve zlomku případů rakoviny prostaty. S tímto typem karcinomu jsou spojené také aberace v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Zárodečné mutace *BRCA2* genu (typické pro rodiny s výskytem rakoviny vaječníku a prsu) poskytují pětikrát až sedmkrát vyšší riziko vzniku rakoviny prostaty (Thompson a kol., 2001). Zároveň 1,2 % pacientů s rakovinou prostaty mladších 65 let má mutaci v genu *BRCA2* (Kote-Jarai a kol., 2011). Vliv zárodečných mutací v genu *BRCA1* je méně jednoznačný. Studie však ukazují, že zárodečné mutace v genu *BRCA1* zvyšují riziko karcinomu prostaty 3,8krát u pacientů s věkem pod 65 let (Leongamornlert a kol., 2012). Mezi další geny, u kterých byla pozorována souvislost s karcinomem prostaty patří *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* a *NBS1* (Attard a kol., 2016). Mutacím v androgenním receptoru je věnována samostatná kapitola dále v této práci.

2.1.2 Vybrané markery karcinomu prostaty

U karcinomu prostaty lze nalézt celou řadu markerů. Liší se svou specifitou, senzitivitou a svým praktickým využitím. Některé markery slouží pro klinickou diagnostiku rakoviny prostaty, některé se naopak používají především ve výzkumu. Tyto markery mají také rozdílný biologický charakter. Jedná se jak o proteinové markery, tak o mRNA markery. V této kapitole budou blíže popsány dva hlavní markery, které budou využity a diskutovány také v experimentální části této práce. Jedná se o prostatický specifický antigen (PSA) a homeoboxový protein Nkx3.1. Mezi další významné markery rakoviny prostaty patří fúze genu pro transmembránovou serinovou proteázu 2 (*TMPRSS2*) s genem spojeným s transformací erytroblastu

(ERG), která je označována jako TMPRSS2:ERG (Wang a kol., 2017). Dále lze zmínit homeoboxový protein HOXC6 a DLX1, u kterých je jako marker detekována jejich mRNA (Porzycki a kol., 2020).

Jako univerzální a obecně uznávaný klinický marker rakoviny prostaty je označován PSA. Jedná se o enzym (serinová proteáza), který je syntetizován epitelovými buňkami prostaty. Fyziologická funkce PSA spočívá ve zvýšení pohybu spermií skrze zkapalnění semene. Tento enzym se v krvi fyziologicky vyskytuje ve velmi malém množství a ve velké míře je vázán na proteiny. Při diagnostice skrze koncentraci PSA v krvi se nejedná o nádorově specifický antigen, jelikož koncentrace PSA v krvi může stoupat také z důvodu jiných patologických stavů, jakým je například zánět. Pomocí prekurzorů PSA se určuje diagnosticky významný index zdraví prostaty (Kopecký a kol., 2015). V experimentální části této práce je PSA jeden z proteinů, který je identifikován metodou Western blott.

Dalším proteinem, na který se také zaměřuje experimentální část této práce, a zároveň se jedná o významný experimentální marker karcinomu prostaty je homeoboxový protein Nkx3.1 (Antao a kol., 2021). Jedná se o protein z rodiny Nkx, která u člověka zahrnuje 12 zástupců, z nichž Nkx3.1 je do značné míry specifický pro prostatickou tkáň. Tento protein je kódován tumor supresorovým genem *Nkx3.1* a je schopen se vázat na jiné proteiny (transkripční faktory) a DNA. Jeho role je však stále nejasná. Je považován za tumor supresorový gen a jeho exprese klesá s progresí karcinomu prostaty. Exprese *Nkx3.1* je pozorována během vývoje a diferenciaci prostaty, stejně tak jako při plně vyvinuté prostatě v dospělosti (Abate-Shen a kol., 2008). Ztráta exprese *Nkx3.1* je spojena se ztrátou tvorby prostatického proteinu a se změnou morfologie a větvení kanálků prostaty, což je neslučitelné se správným vývojem prostaty a může přispívat k její karcinogenezi. Exprese *Nkx3.1* je standardně nižší u karcinomu prostaty z důvodu delece alel, metylace promotoru nebo z důvodu posttranskripčního umlčení a nastává již v rané fázi karcinogeneze (Antao a kol., 2021). Regulace transkripce genu *Nkx3.1* je zprostředkována skrze dva androgen-responzivní elementy (ARE). Mimo to byly popsány regulace skrze ETS1, Sp1 a Wnt signální dráhu. Počáteční exprese *Nkx3.1* předchází expresi androgenního receptoru, nicméně následná exprese *Nkx3.1* je pozitivně regulována androgenní signalizací (Bhatia-Gaur a kol., 1999). Samotný Nkx3.1 pak inhibuje expresi androgenního receptoru.

2.2 Jaderné receptory

Jaderné receptory jsou ze své podstaty mechanismu fungování považovány za ligandem aktivované transkripční faktory (Frigo a kol., 2021). Hrají klíčovou roli v regulaci reprodukce, diferenciaci, homeostázy, metabolismu a ontogenetického vývoje. Ligandem těchto receptorů jsou převážně malé lipofilní molekuly, které snadno difundují skrze cytoplazmatickou membránu a váží se na receptory v cytosolu, případně v jádře, kde se tyto receptory běžně nacházejí. V průběhu intenzivního výzkumu se prokázalo, že jaderné receptory jsou zodpovědné za zprostředkování odpovědi na ligand v podobě hormonů štítné žlázy, které pro svůj charakter jsou však do buňky transportovány aktivně za pomoci specifických transportérů (Friesema a kol., 2003). Ligandem však může být také zástupce vitamínů a sice vitamín D, případně metabolit vitamínu A, kyselina retinová. Značná část receptorů je považována za tzv. sirotčí receptory bez známého ligandu, případně se širokým spektrem různých typů ligandů na lipofilní bázi.

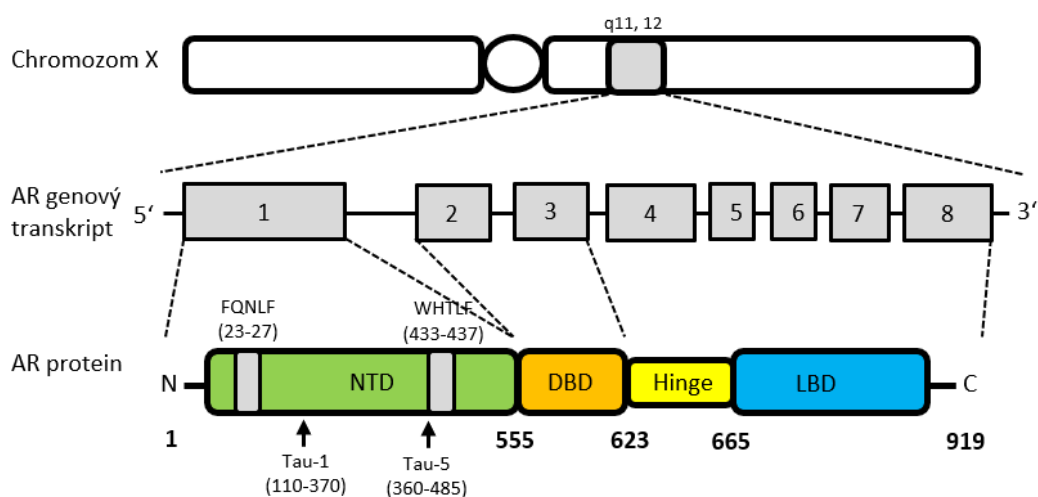
V současnosti je popsáno 48 jaderných receptorů, které jsou rozděleny do 7 skupin označovaných dle Frigo a kol. NR0 až NR7 (NR, nuclear receptor) (Frigo a kol., 2021). Praktická část této práce je zaměřena na studium exprese a aktivity převážně androgenního receptoru, případně receptoru estrogenního, progesteronového a glukokortikoidního, které společně patří do skupiny NR3. Velká pozornost je věnována jaderným receptorům, zvláště pak pro jejich terapeutický potenciál skrze studium modulace jejich aktivity. Prvním významným objevem na poli terapeutického potenciálu cílení na jaderné receptory jsou studie ze 70. let 20. století, které se zaměřovaly na antiestrogen tamoxifen a jeho využití při léčbě rakoviny prsu (Mouridsen a kol., 1978). Význam androgenního receptoru u rakoviny prostaty, jeho mechanismus fungování, stejně jako objasnění interakce jeho známých antagonistů a agonistů je shrnuto v následujících kapitolách.

2.3 Androgenní receptor

Androgenní receptor (AR), někdy také označován jako NR3C4 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) je jaderný receptor jehož ligandem jsou androgenní hormony, tedy převážně testosteron a jeho metabolit dihydrotestosteron (Velho a kol., 2021). Skrze úlohu transkripčního faktoru má zásadní vliv na vývoj primárních a

sekundárních mužských pohlavních znaků. V této diplomové práci bude diskutován jeho vliv na vývoj prostaty, především pak jeho vliv na vývoj karcinomu prostaty.

Gen pro AR je lokalizován na chromozomu X, konkrétně na dlouhém raménku v lokusu Xq11 až Xq12 (Velho a kol., 2021). Gen se skládá z 8 exonů a introny mají velikost mezi 0,7 až 2,6 kb. Samotný protein, receptor, se skládá z 919 aminokyselin a můžeme jej členit na 3 hlavní domény a pantovou část (angl. hinge). Velikost finálního receptoru je 110 kDa (Tan a kol., 2015). Exon 1 kóduje N-terminální doménu (NTD, N-terminal domain), exon 2 a 3 pak kóduje DNA vazebnou doménu (DBD, DNA binding domain) a zbylé exony 4 až 8 kódují ligand vazebnou doménu (LBD, ligand binding domain) a pantovou oblast. Celé strukturní schéma AR je znázorněno na obr. 1.



Obr. 1 – Schéma lokusu genu *AR*, genového transkriptu a samotného proteinového produktu. Gen *AR* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X (q11, 12) a obsahuje 8 exonů a introny o velikosti od 0,7 do 2,6 kb. NTD značí N-terminální doménu kódovanou exonem 1 a nacházející se mezi 1. a 555. aminokyselinou a obsahující důležité oblasti FQNLF, WHTLF, Tau-1 a Tau-5. DBD značí DNA vazebnou doménu mezi 556. a 623. aminokyselinou. Hinge značí pantovou oblast mezi 624. a 665. aminokyselinou a LBD značí ligand vazebnou doménu mezi 666. a 919. aminokyselinou (Velho a kol., 2021).

2.3.1 Struktura androgenního receptoru

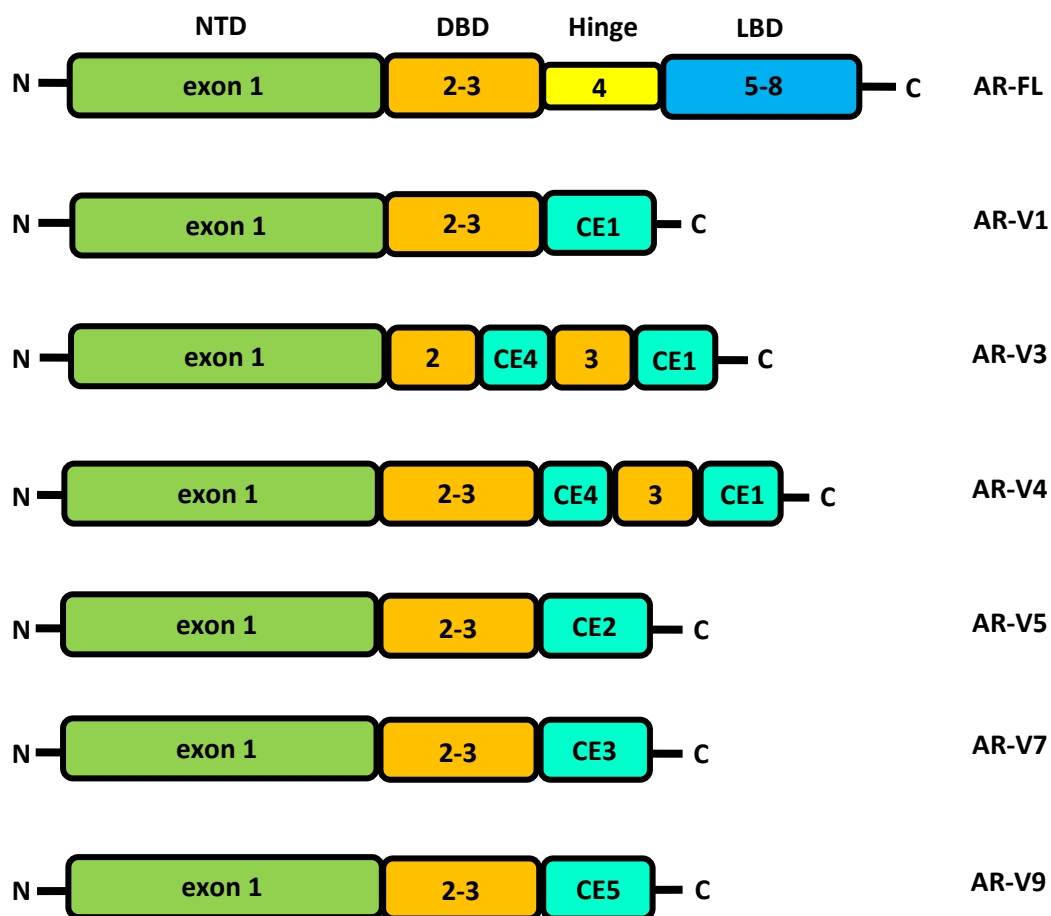
N-terminální doména je dominantní součástí AR a má velikost 555 aminokyselin (Velho a kol., 2021). Její role je klíčová při aktivaci receptoru společně s LBD. Obsahuje konstitutivně aktivní, primární efektorovou oblast, tzv. aktivační oblast 1 (AF1) v rozmezí 142. až 485. aminokyseliny. Na plné aktivitě AR se podílí regiony AF1, tedy Tau-1 (110. až 370. aminokyselina) a Tau-5 (360. až 485. aminokyselina),

kteře jsou nezbytné pro plnou aktivaci receptoru. V NTD lze popsat také oblasti FQNLF (23. až 27. aminokyselina) a WHTLF (433. až 437. aminokyselina), které jsou nezbytné pro navázání přímé interakce závislé na ligandu mezi NTD a LBD, což je důležité pro mnohé regulace na androgenech závislých genů (Tan a kol., 2015). Tato interakce domén pomáhá stabilizovat dimerizaci receptoru a zpomaluje disociaci ligandu, což je blíže diskutováno dále v této práci.

DNA vazebná doména se nachází mezi 556. a 623. aminokyselinou a jedná se o velmi konzervovanou doménu (Tan a kol., 2015). Jádro tvoří oblast bohatá na cystein obsahující 2 tzv. zinkové prsty (angl. zinc fingers), kterými se receptor po dimerizaci váže na DNA. Částečně v DBD, částečně v pantové oblasti (mezi 634. a 665. aminokyselinou), se nachází signální oblast zodpovědná za import aktivovaného receptoru do jádra (oblast mezi 617. a 633. aminokyselinou). Tato oblast je pro transport klíčová, jelikož pasivní transport skrze jadernou membránu je možný pouze pro proteiny o velikost do cca 40 kDa. Proto AR potřebuje k transportu do jádra navázání ligandu a aktivaci výše zmíněného signálu skrze změnu konformace receptoru v tomto místě. Pantová oblast také podporuje vazbu na DNA a je cílovým místem pro acetylaci, metylaci a ubikvitinaci.

Ligand vazebná doména se nachází mezi 666. a 919. aminokyselinou. Její struktura byla na rozdíl od NTD detailněji popsána pomocí krystalografie už na začátku 21. století (Matias a kol., 2000). Tato doména se skládá z 11 alfa-helixů a 4 krátkých beta-skládaných listů, které tvoří 2 antiparalelně skládané beta-listy. Celá struktura je složena do 3 vrstev. V první vrstvě se nachází helixy H1 a H3, kdy helix H2 (typický pro LBD většiny jaderných receptorů) u AR chybí a je nahrazen dlouhým flexibilním linkerem. Střední vrstva je tvořena helixy H4, H5, beta-skládaným listem a helixy H8 a H9. Třetí vrstvu tvoří helixy H10 a H11. Přímé místo navázání ligandu se nazývá ligand vazebná kapsa (LBP, ligand binding pocket), která je obklopena N-terminálními částmi helixů H3, H5 a H11. Jako „víko“ LBP slouží aktivační funkce 2 (AF2), jejíž jádro je tvořeno helixem H12 a po navázání ligandu uzavírá změnou konformace LBP.

Krom výše popsané klasické struktury AR je možné pozorovat i jiné varianty tohoto receptoru, a to i u zdravých buněk (Velho a kol., 2021). Tyto morfologicky odlišné varianty postrádají LBD a označují se jako AR-Vs (Nakazawa a kol., 2014) a vznikají alternativním sestřihem intronových oblastí. Nejvýznamnější variantou je AR-V7,



Obr. 2 – Schématické znázornění jednotlivých významných alternativních variant AR dle Luo a kol., 2018. AR-FL značí běžnou plnou variantu AR, NTD značí N-terminální doménu (zeleně), DBD značí DNA vazebnou doménu (oranžově), LBD značí ligand vazebnou doménu (modře), CE značí peptidy kódované cryptic exony (tyrkysově), hinge je pantová oblast (žlutě). Čísly uvnitř domén jsou označeny exony, které doménu kódují. Schéma vytvořeno dle Cao a kol., 2016.

kteřá vzniká alternativním sestřihem intronových oblastí za exonem 3, čímž vzniká tzv. cryptic exon 3 kódující AR-V7 specifický peptid, který navazuje na DBD v místě, kde u běžné varianty AR bývá pantová oblast (obr. 2). Cryptic exony se většinou nacházejí v okolí exonu 3. Krom AR-V7 lze popsat významné varianty AR-V1, AR-V3, AR-V4, AR-V5 a AR-V9 (Luo a kol., 2018). AR-V7 vlivem absence LBD je konstitutivně aktivní a spouští signální dráhy AR nezávisle na přítomnosti ligandu. Významně zvýšená exprese této varianty je velmi dobře pozorovatelná u mnohých rakovin prostaty, které jsou rezistentní vůči kastraci, a u kterých konstitutivní aktivace vysvětluje progresi rakoviny i v nepřítomnosti androgenů po kastraci. Mimo to je varianta AR-V7 přítomna ve zvýšené míře u některých pacientů léčených abirateronem a enzalutamidem a je považována za jeden z rezistentních mechanismů rakovinových buněk vůči léčbě antiandrogeny. Vědecká skupina Antonarakis a kol.

(Antonarakis a kol., 2014) studovala 31 pacientů s rakovinou prostaty léčených abirateronem a stejný počet pacientů léčených enzalutamidem. Pozorovala závislost mezi léčbou těmito antiandrogeny a expresí varianty AR-V7. Stejně tak pozorovala i horší prognózu a délku dožití u pacientů s výskytem této varianty. Sami autoři studie však v závěru připouští, že kauzalita není v tomto případě zcela objasněna a vyžadují se další studie. Obdobné výsledky ukazuje i studie skupiny Taplin a kol., která prokazuje, že u většiny pacientů s AR-V7 lze pozorovat agresivnější klinické projevy nemoci a rezistenci vůči léčbě skrze AR (Taplin a kol., 2019). Autoři této studie také v závěru apelují na naléhavost alternativních léčebných přístupů pro pacienty trpící CRPC (castrate-resistant prostate cancer) s AR-V7. Jako řešení se nabízí inhibitory N-terminální domény, které jsou diskutovány dále v této práci.

2.3.2 Aktivace androgenního receptoru

Aktivace AR je vícestupňový proces, který začíná střetnutím receptoru s ligandem v cytosolu buňky. Charakter ligandu může být agonistický (pozitivní vliv na transkripční aktivitu AR) nebo antagonistický (negativní vliv na transkripční aktivitu AR), případně jejich působení může být smíšené či proměnné. Běžně může AR vázat celou škálu ligandů skrze modifikaci LBD, konkrétně LBP (Tan a kol., 2015). Z chemického hlediska jsou ligandy, agonisté, malé lipofilní molekuly strukturně podobné androgenním hormonům (zejména testosteronu), tedy na bázi cholesterolu. Takovéto ligandy totiž dokáží, díky své lipofilní povaze projít pasivně skrze cytoplazmatickou membránu a navázat se na receptor uvnitř buňky.

Samotný proces aktivace je možné popsat na fyziologicky nejbližším ligandu (agonistovi) AR testosteronu, respektive dihydrotestosteronu. Testosteron se dle principu, který je popsán výše, dostane do cytosolu buňky. Následně dojde k jeho metabolismu na 5α -dihydrotestosteron pomocí enzymu 5α -reduktázy. V cytosolu se AR vyskytuje jako neaktivní monomer ve spojení s proteinem teplotního šoku (HSP, heat shock protein). Po navázání ligandu na LBD, respektive LBP, dojde k uvolnění HSP a vlivem signální oblasti v DBD a pantové oblasti (vizte výše) dojde k transportu monomerního AR s ligandem do jádra a k dimerizaci s dalším ligandem aktivovaným AR. K dimerizaci napomáhá první ze dvou zinkových prstů, které lze pozorovat v DBD. Důležitou roli při aktivaci AR hrají posttranslační modifikace, převážně fosforylace, o které je psáno dále. Po dimerizaci dojde k navázání AR skrze DBD na

ARE v promotorové oblasti cílového genu (např. *PSA*). Toto navázání je zprostředkováno druhým zinkovým prstem. Dojde k vytvoření komplexu dimeru AR s koaktivátory a dalšími DNA vazebnými proteiny, čímž dojde k úplné aktivaci transkripční aktivity AR. Obecně platí, že vlivem své struktury je DHT silnější agonista k AR než testosteron a má sníženou rychlost disociace (vizte dále) (Grino a kol., 1990). Na stejném principu funguje i aktivace AR pomocí metribolonu, o kterém pojednává následující kapitola.

Mezi LBD a DHT jsou vytvořeny čtyři vodíkové vazby (Tan a kol., 2015). U všech třech hlavních agonistů popisovaných v této práci (testosteron, DHT, metribolon) interaguje keto skupina na A kruhu (obr. 3) vodíkovými můstky s aminokyselinami glutaminem (Q711) a argininem (R752), zatímco hydroxylová skupina na D kruhu se váže vodíkovými můstky se zbytky aminokyselin asparaginu (N705) a treoninu (T877) (Pereira de Jésus-Tran a kol., 2006). Jak keto skupina, tak hydroxylová skupina jsou přítomny u všech těchto tří ligandů. Je tedy zjevné, že interakce těchto skupin s aminokyselinami LBD je klíčová pro vazbu androgenu. Tyto konzervativní skupiny a jejich interakce mohou být vysvětlením silné afinity androgenů k AR i při nonamolární koncentraci.

Jak bylo zmíněno výše, pro plnou aktivaci AR je potřeba řady posttranslačních modifikací, jakými jsou fosforylace, acetylace a metylace (Wen a kol., 2020). Drtivá většina posttranslačních modifikací slouží k aktivaci AR, ovšem některé fosforylace (S215, S308) a ubikvitinace slouží k deaktivaci AR. K většině posttranslačních úprav AR dochází na NTD a jedná se především o fosforylace. V současnosti je známo minimálně 19 takovýchto fosforylací, kdy minimálně 16 z nich se nachází na NTD (Wen a kol., 2020). Dominantní aminokyselinou AR, na které dochází k fosforylaci je serin, ovšem k fosforylaci dochází také na treoninu a tyrosinu. Za významná fosforylační místa lze označit S81, S210/213 nebo S308. Fosforylace S81 je zprostředkována cyklin-dependentními kinázami a podporuje transkripční aktivitu AR, stabilitu receptoru a napomáhá jeho lokalizaci do jádra (Koryakina a kol., 2014). Vliv CDK (hlavně CDK1 a CDK9) na transkripční aktivitu potvrdila také vědecká skupina Jorda a kol. (2018), která se zaměřila na fosforylaci na S81. Fosforylace v tomto místě na AR se detekuje také v experimentální část této práce. Fosforylace S210 a S213 je zprostředkována proteinkinázou B a PIM-1 a obdobně jako S81 napomáhá stabilizaci, translokaci a aktivitě AR. Poslední výše zmíněná fosforylace na

S308 je zprostředkována CDK11 a CDK5 a slouží, na rozdíl od většiny fosforylací, k inhibici transkripční aktivity AR.

2.3.3 Koaktivátory androgenního receptoru

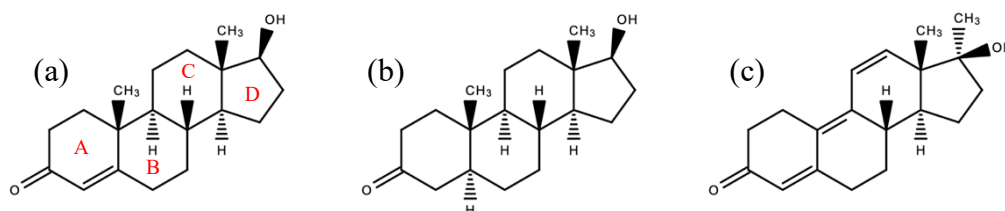
Jak bylo již opakovaně zmíněno, AR je významným transkripčním faktorem. Regulace transkripce je v kombinaci s AR zprostředkována také dalšími proteiny, které tvoří konečný transkripční komplex (Velho a kol, 2021). Mnohé z těchto proteinů ovlivňují transkripci pomocí epigenetických změn. Aberace epigenetické regulace je často pozorována u malignit a vede k nadměrné expresi onkogenů nebo umlčení exprese tumor supresorových genů (Egger a kol., 2004). Významným epigenetickým regulačním mechanismem je acetylace histonů, která je řízena 3 hlavními třídami proteinů. Jedná se o histon acetyltransferázy (kovalentně váží acetylové skupiny na histony), histon deacetylázy (odstraňují navázané acetylové skupiny) a bromodoménové a extraterminální proteiny (BET, váží se na acetylované histony) (Dawson a kol., 2012). Mezi významné transkripční koaktivátory, podílející se na transkripční aktivitě AR, lze řadit CBP (CREB-binding protein) a jeho homolog p300, které patří mezi histon acetyltransferázy.

Jak CBP, tak p300 a BET tvoří komplex koaktivátorů AR při reakci buňky na androgeny. Studie poukazují také na vliv převážně p300 a CBP na transaktivaci AR pomocí IL-6 u CRPC (Debes a kol., 2002; Chan a Dehm, 2015). Komplexy koaktivátorů hrají důležitou roli také při tvorbě rezistence rakoviny prostaty vůči léčbě antiandrogeny. Jedná se o mechanismus, kdy léčba antiandrogeny indukuje aktivaci transkripčního faktoru CREB (cAMP response element-binding protein), na který se váže CBP, čímž je podpořena rezistence buněk rakoviny prostaty (Pan a kol., 2020). Obdobné komplikace mohou nastat i při aktivitě BET proteinů, které zvyšují expresi dalších onkogenních faktorů, jako je např. c-MYC (Wyce a kol., 2013). Inhibice BET také snižuje expresi AR-V7. Vývoj inhibitorů CBP/p300 a BET může být terapeutickou cestou k překonání konvenčních mechanismů rezistence rakoviny prostaty na primární terapii a tyto inhibitory jsou diskutovány dále v této práci. Bohužel byly prokázány také mechanismy rezistence vůči inhibitorům BET (Pawar a kol., 2018).

2.3.4 Agonisté androgenního receptoru

Fyziologicky nejvýznamnějšími agonisty (ligandy) AR jsou testosteron, respektive 5α -dihydrotestosteron (DHT). Z hlediska síly efektu těchto agonistů na AR lze jednoznačně říci, že DHT je silnějším agonistou než testosteron, a to z důvodu absence dvojnás vazby na A kruhu (obr. 3). Absence dvojnás vazby vede ke změně geometrie A kruhu, tedy dochází ke změně orientace keto skupiny a vlivem toho je změněna vzdálenost a úhel vodíkové vazby se zbytkem aminokyseliny R752. Vlivem výše popsaného tak dochází k upřednostnění interakce LBD s DHT před testosteronem (Pereira de Jesus-Tran a kol., 2006). Tato modifikace, fyziologicky způsobena enzymem 5α -reduktázou, snižuje také rychlost disociace DHT až 5x oproti testosteronu (Grino a kol., 1990). Struktury obou těchto fyziologických agonistů jsou společně s metribolonem zobrazeny na obr. 3.

Významným syntetickým agonistou AR je metribolon (R1881), také znám jako methyltrienolon. Jedná se o jeden z nejsilnějších orálně aktivních agonistů AR (Tan a kol., 2015). Patří mezi anabolické androgenní steroidy společně s např. testosteronem a DHT, se kterými je strukturně podobný (obr. 3). Poprvé byl syntetizován a popsán v 60. letech 20. století a následně intenzivně studován jako potenciální lék rakoviny prsu. Je obecně známo, že z důvodu své vysoké hepatotoxicity nikdy nenaplnil svůj potenciál a nebyl schválen jako lék pro klinické použití. I přes tyto neúspěchy je metribolon od 70. let 20. století široce užíván jako standard ve vědeckém výzkumu, jakožto agonista AR. Krom vysoké afinity k AR byla pozorována jeho vysoká afinita k progesteronovému receptoru (PR), glukokortikoidnímu receptoru (GR) a výzkum z roku 2007 mu přisuzuje také afinitu k mineralkortikoidnímu receptoru (Takeda a kol., 2007). Krom výše zmíněného je také metabolicky stabilnější než DHT. Bývá také zneužíván ve sportu jako doping.



Obr. 3 – Struktury významných agonistů AR. (a) Strukturní vzorec testosteronu s označenými kruhy (A, B, C, D). (b) Strukturní vzorec dihydrotestosteronu. (c) Strukturní vzorec metribolonu.

2.3.5 Aberace v androgenním receptoru

Aberantní aktivace signální dráhy AR je přisuzována řadě mechanismů. Jedná se především o amplifikaci a nadměrnou expresi *AR*, nadměrnou syntézu androgenů či expresi konstitutivně aktivních variant AR, která je způsobena bodovými mutacemi v genu pro AR (Shiota a kol., 2022). Konstitutivní aktivita AR u rakoviny prostaty byla prokázána, mimo jiné, i skrze pozorování translokace AR do jádra bez ohledu na množství cirkulujících androgenů (Laitinen a kol., 2007).

Nadměrná exprese *AR* byla pozorována u naprosté většiny CRPC, kde se předpokládá, že k ní dochází vlivem terapie antiandrogeny (Waltering a kol., 2012). Vědecká skupina Chen a kol. prokázala, že na androgenech nezávislé rakoviny prostaty nadměrně exprimují *AR*, kdy tato nadměrná exprese byla nezbytná k transformaci rakoviny ze závislé na androgenech na nezávislou (Chen a kol., 2004). Autoři studie navíc dokázali, že nadměrná exprese *AR* změnila povahu bicalutamidu z antagonisty na agonistu AR. Ve vzácném počtu CRPC je naopak exprese *AR* snížena, a to vlivem hypermetylace promotoru *AR* (Kinoshita a kol., 2000).

Amplifikace genu *AR* je jednou z nejčastějších aberací u CRPC, kdy zdroje uvádějí zvýšený počet kopií genu *AR* u 80 % CRPC a u 30 % se hovoří o vysoké úrovni amplifikace (Taylor a kol., 2010). Naopak u neléčených karcinomů prostaty jsou amplifikace pozorovány jen zřídka. Studie vědecké skupiny Bubendorf a kol. detekovala pouze 2 případy pacientů trpící neléčenou rakovinou prostaty s amplifikací genu *AR* z celkového počtu 205 pacientů (Bubendorf a kol., 1999). Toto zjištění dokazuje, že amplifikace genu *AR* se objevují až po cílené léčbě rakoviny prostaty, a to jak kastrací, tak blokadí samotného receptoru či jiným typem léčby.

Jako zjevná se jeví spojitost mezi amplifikací genu *AR* a jeho nadměrnou expresí u CRPC. Ovšem samotná amplifikace vysvětluje nadměrnou expresi jen částečně, jelikož byla pozorována nadměrná exprese *AR* i při nepřítomnosti amplifikace genu (Waltering a kol., 2012). Nicméně mechanismy vedoucí k nadměrné expresi bez zvýšené amplifikace jsou stále nejasné. Diskutuje se například role retinoblastomového proteinu (RB1), u kterého bylo zjištěno, že ztráta exprese RB1 má za následek zvýšenou expresi E2F1, který svou transkripční aktivitou zvyšuje expresi genu *AR* (Sharma a kol., 2010).

Dle studií, 10-30 % pacientů s CRPC má bodovou mutaci v genu pro AR (Taplin a kol., 2003). V časných fázích rakoviny prostaty jsou mutace spíše velmi vzácné a jejich zvýšený výskyt a význam je pozorován až u CRPC. Jejich výskyt je velmi často spojován s léčbou rakoviny prostaty pomocí antiandrogenů (převážně u flutamidu) a je považován za mechanismus rezistence nádoru vůči této léčbě (Waltering a kol., 2012). Mutantní AR mohou být konstitutivně aktivní, ale také mohou být aktivovány adrenálními androgeny, neandrogenními steroidy, ba dokonce i samotnými antiandrogeny. V roce 2012 bylo u rakoviny prostaty popsáno 159 mutací *AR* a naprostá většina z nich byla bodovou somatickou mutací (Gottlieb a kol., 2012). Největší počet těchto mutací byl identifikován v LBD (cca 45 %), minoritně byly mutace zastoupeny v NTD a nejméně jich bylo lokalizováno v DBD.

Nejběžnější mutace v NTD jsou E252G, E255K a W435L a je jim přisuzováno zvyšování aktivity AR skrze zvyšování stability celého receptoru, translokaci receptoru do jádra nebo skrze navazování koaktivátorů (Steinkamp a kol., 2009). Jak bylo zmíněno výše, největší frekvence mutací je v LBD. Jedná se především o mutace L702H, T878A, H875Y, W742C, W742L, F877L a T878S. Jejich procentuální zastoupení je rozdílné v rámci různých studií, ovšem shoda je na dominantním postavení trojice T878A, L702H a H875Y (Shiota a kol., 2022). Studie skupiny Abida a kol. zkoumala 444 vzorků tkání od 429 pacientů a detekovala mutace T878A (2,5 %), L702H (2,3 %), W742C (2,3 %), H875Y (2,0 %), W742L (0,5 %), T878S (0,5 %) a F877L (0,2 %) (Abida a kol., 2019). Obdobné výsledky v rámci pořadí četnosti mutací přináší také studie skupiny Ladet a kol., která testovala 892 pacientů u nichž detekovala mutace L702H (24,6 %), T878A (14,5 %), H875Y (11,4 %), W742C (8,4 %), W742L (3,8 %), F877L (2,1 %) a T878S (1,6 %) (Ladet a kol., 2020). Tato studie byla založena na použití ctDNA pacientů. Nejaktuálnější meta-analýza, zahrnující 21 studií, vědecké skupiny Snaterse a kol., která studovala 1 614 pacientů s CRPC vyzdvihla 3 hlavní mutace *AR*, konkrétně H875Y (4,9 %), T878A (4,4 %) a L702H (3,4 %) (Snaterse a kol., 2022).

Jako velmi významné se jeví mutace F876L, respektive F877L a T878A, které snižují afinitu apalutamidu a enzalutamidu k LBD AR, což se může projevit jako forma rezistence karcinomu na léčbu těmito významnými antiandrogeny druhé generace (Saranyutanon a kol., 2019).

2.4 Léčba rakoviny prostaty skrze androgenní receptor

Jak již bylo zmíněno v prvních kapitolách této práce, rakovina prostaty patří mezi nejčastější diagnostikované rakoviny u mužů a v USA se jedná dokonce o druhou nejčastější příčinu úmrtí (Saranyutanon a kol., 2019). Smrtnost této nemoci záleží, mimo jiné, také na včasné diagnostice a zahájení adekvátní léčby. Mezi konvenční formy terapie rakoviny prostaty patří chirurgické operace s cílem odstranění nádoru, radioterapie a chemoterapie, případně cílená terapie. V případě časně diagnostiky, která je vlivem moderních technologií a osvěty čím dál častější, se standardně lékaři uchylují ke chirurgickému či radioterapeutickému řešení, případně ke kombinaci obojího. U významné skupiny pacientů však diagnóza přichází až ve fázi nemoci, kdy je konvenční chirurgický či radioterapeutický přístup nedostačující nebo nemožný. Většinou se jedná o pacienty, u kterých došlo k tvorbě metastáz do blízkých nebo vzdálených orgánů. Obdobná nedostatečnost konvenční léčby nastává také u pacientů s opakovaným výskytem rakoviny prostaty, například po chirurgické léčbě. Jak u pacientů s pozdní fází rakoviny, tak u pacientů s vracející se rakovinou prostaty se nabízí chemoterapie cílená na aktivitu androgenního receptoru a jeho signalizaci.

První linií léčby rakoviny prostaty je nasazení androgen-deprivační léčby, což představuje aplikace antagonistů a agonistů receptoru pro hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH) (vizte dále) nebo provedení chirurgické kastrace (Kocák, 2020). Cílem této primární terapie je udržení hladiny androgenů na kastroční úrovni a tím zamezení progresu nemoci. Dobrou odpověď na tento typ léčby je možné pozorovat první dva až tři roky, poté dojde k rozvoji rezistence nádoru a k jeho nezávislosti na androgenech. Karcinom prostaty přechází do stavu CRPC, kdy se však stále pokračuje v udržování androgenů na kastroční úrovni. Dochází k vzestupu hladiny PSA a ke zhoršení klinického obrazu pacienta. CRPC může probíhat formou nemetastatickou (nmCRPC) a formou metastatickou (mCRPC). Cílem další léčby je udržení pacienta v asymptomatickém nemetastatickém stavu za použití léčby antiandrogeny, případně v kombinaci s jinými přístupy, které jsou popsány dále. V případě, že se onemocnění dostane do fáze metastatické, je označeno za fatální s mediánem přežití 2,5 roku.

V následujících kapitolách jsou diskutovány látky, které cílí na inhibici syntézy androgenů nebo na inhibici mechanismu jejich účinku, dále jsou zde uvedeny látky, které cílí na samotný androgenní receptor a jeho LBD a v posledních podkapitolách jsou zmíněny další možnosti léčby rakoviny prostaty, jako je léčba skrze inhibici koaktivátorů AR, inhibice N-terminální domény AR či cílená ubikvitinace AR pomocí technologie proteolysis-targeting chimera (PROTAC).

2.4.1 Agonisté a antagonisté LHRH receptoru

Mezi přístupy léčby rakoviny prostaty, které cílí na syntézu androgenů, patří použití agonistů a antagonistů LHRH receptoru. Tento receptor je exprimován primárně v hypofýze a je citlivý na LHRH, který je uvolňován z hypothalamu (Tolkach a kol., 2013). Prostatická tkáň také obsahuje tento receptor, ovšem jeho hladina exprese je zde cca 190x nižší než u hypofýzy (Tieva a kol., 2003). Významnou expresi LHRH receptoru můžeme pozorovat také u tkáně prsu, ledvin, brzlíku a u lymfocytů. Dle rozmístění LHRH receptoru je patrné, že LHRH může působit také na periferní tkáň, nicméně přesná úloha LHRH receptoru v těchto tkáních není zcela objasněna.

Jedná se o transmembránový receptor spřažený s G proteinem a je také označován jako receptor pro hormon uvolňující gonadotropin (GnRH) (Harrison a kol., 2004). Působením LHRH dochází k počátečnímu uvolnění luteinizačního a folikulostimulačního hormonu z hypofýzy, což sekundárně vede ke zvýšení hladiny testosteronu. Pokračující nadměrná stimulace LHRH receptoru však vede k poklesu exprese samotného receptoru, což vede ke snížení uvolňování luteinizačního hormonu a ke snížení hladiny testosteronu, mnohdy až na kastrovační hodnoty. Takto lze pomocí agonistů významně snížit hladinu testosteronu. Antagonisté naopak blokují LHRH receptor, čímž nedojde k produkci luteinizačního a folikulostimulačního hormonu, čímž je udržena nízká hladina testosteronu. Nedochozí k prvotním zvýšením hladin luteinizačního hormonu, folikulostimulačního hormonu a testosteronu, čímž je léčba antagonisty celkově účinnější (Tolkach a kol., 2013). Mezi významné agonisty LHRH receptoru patří buserelin, leuprolid, goserelin, histrelin a triptorelin. Mezi významné antagonisty pak patří abarelix, cetorelix, ganirelix a degarelix. V následujících odstavcích jsou diskutovány vybraní agonisté a antagonisté LHRH receptoru.

Buserelin je analogem LHRH a je dokonce účinnějším ligandem LHRH receptoru než přírodní LHRH. Po podání dochází ke krátké prvotní stimulaci produkce

testosteronu a následně dochází k inhibici jeho sekrece a k poklesu hladiny testosteronu na kastroční úroveň (Brogenden a kol., 1990). Mezi nejčastější vedlejší účinky buserelinu patří ztráta potence a návaly horka. Poprvé byl popsán v roce 1976 a od 80. let 20. století je schválen k medicínskému použití. Pro léčbu karcinomu prostaty je injekčně vpravován po 500 μg třikrát za den po dobu jednoho týdne, následně pak 200 μg denně. Lze užívat také ve formě nosního spreje při vyšších dávkách. Není dostupný v USA (Tolkach a kol., 2013).

Leuprolid je látka, která se váže na LHRH receptor, sekundárně snižuje sekreci luteinizačního a folikulostimulačního hormonu, což vede k inhibici sekrece gonadotropinů (Wilson a kol., 2007). Krom léčby rakoviny prostaty je zkoumán ve spojitosti s léčbou Alzheimerovy choroby, syndromu polycystických vaječnicků či jako alternativa antikoncepce.

Abarelix je antagonist LHRH receptoru, který vyvolává kastroční hodnoty testosteronu bez prvotního nárůstu, jako tomu je při efektu agonistů (Debruyne, 2004). Klinické studie prokázaly srovnatelný bezpečnostní profil s profilem agonistů. Ovšem nepřítomnost prvotního nárůstu hladiny testosteronu poskytuje bezpečností výhodu odstraněním rizika vzplanutí karcinomu prostaty. Poprvé byl tento antagonist chválen v roce 2004 v USA a následně v roce 2005 v Německu a Nizozemí. V USA byl následně stažen z důvodu nadměrného výskytu vážnějších alergických reakcí v květnu roku 2005 (Kirby a kol., 2009).

2.4.2 Inhibitory syntézy androgenů

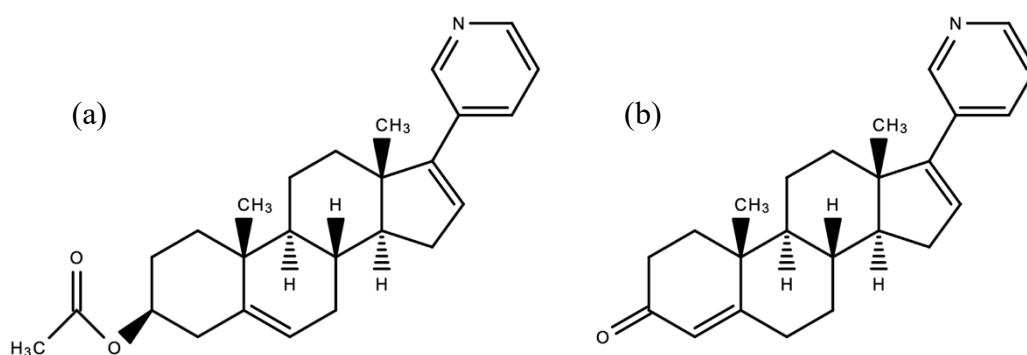
Poté co bylo zjištěno, že intratumorální syntéza androgenů a adrenální androgeny mohou být příčinou rezistence vůči terapii kastrací, začaly snahy vědeckých skupin vyvinout novou strategii pro léčbu karcinomu prostaty skrze cílenou inhibici klíčových enzymů, které zprostředkovávají tvorbu androgenů (Chandrasekar a kol., 2015).

Testosteron, jakožto nejběžnější zástupce androgenů v lidském těle, vzniká původně z cholesterolu za katalýzy enzymu CYP17A1, neboli 17α -hydroxylázy nebo také $17,20$ -lyázy. Tento enzym patří do rodiny cytochromu P450 a je lokalizován v endoplazmatickém retikulu. Enzymy této rodiny patří mezi monooxygenázy, které katalyzují syntézu cholesterolu, mineralokortikoidů, glukokortikoidů, estrogenů,

androgenů a dalších steroidních sloučenin. Inhibice tohoto enzymu způsobuje výrazný pokles hladiny testosteronu (Saranyutanon a kol., 2019).

Ketokonazol je syntetické antimykotikum, které se od počátku 80. let 20. století používá na léčbu kožních plísní (Trachtenberg a kol., 1984). Od roku 1984 se používá také v terapii CRPC. Působí jako nespecifický inhibitor cytochromu P450 (Pont a kol., 1982). Léčba ketokonazolem prokazatelně snižuje hladinu PSA u pacientů trpící CRPC (Small a kol., 2004) a to zejména v kombinaci s hydrokortisonem (Scholz a kol., 2005) a docetaxalem (Pond a kol., 2013). Žádné studie však jednoznačně neprokázaly zlepšení celkového přežití pacientů, zato se objevovaly časté a vážné nežádoucí účinky, mezi které patřila únava, abnormální funkce jater a nevolnost. Vlivem těchto faktů bylo od perorální užívání ketokonazolu v nedávné době upuštěno.

Mezi inhibitory, které blokují jak 17α -hydroxylázu, tak $17,20$ -lyázu, patří abirateron, přesněji abirateron acetát (Saranyutanon a kol., 2019). Jedná se o první lék schválený FDA (Food and Drug Administration), který prokazatelně snižuje intratumorální i adrenální syntézu androgenů. V první fázi klinické studie bylo prokázáno, že blokáce CYP17A1 abirateronem vede ke snížení sérové hladiny testosteronu a steroidů, jejichž syntéza je podřízena AR (Attard a kol., 2008). Studie také prokázala, že je abirateron v těle dobře tolerován a zároveň vykazuje protinádorovou aktivitu u pacientů s CRPC. Později bylo zjištěno, že užívání abirateronu vede ke zvýšení hladiny adrenokortikotropního hormonu (Auchus a kol., 2014). K potlačení tohoto nežádoucího účinku bylo doporučeno podávat společně



Obr. 4 – (a) Strukturní vzorec abirateron acetátu. (b) Strukturní vzorec $\Delta(4)$ -abirateronu. Shodné kruhy A a B mezi testosteronem a D4A jsou příčinou antagonistického charakteru D4A (Li a kol., 2015).

s abirateronem malé množství prednisonu (5 mg, dvakrát denně), což je syntetický kortikosteroid, který kompenzuje abirateronem indukované snížení sérové hladiny kortizolu, čímž blokuje kompenzační zvýšení adrenokortikotropního hormonu. Vědecká skupina Li a kol. popsala metabolismus abirateronu na $\Delta(4)$ -abirateron (D4A), který inhibuje kromě CYP17A1 také 3β -hydroxysteriod dehydrogenázu a 5α -reduktázu, což jsou enzymy nezbytné pro syntézu DHT (Li a kol., 2015). Tato vědecká skupina také prokázala antagonistický charakter abirateronu vůči AR, který byl na srovnatelné úrovni s enzalutamidem. Studie přisuzují tento antagonistický charakter abirateronu jeho struktuře, respektive struktuře D4A, jelikož kruhy A a B u D4A jsou identické s testosteronem (obr. 4).

Mezi další látky s potenciálem inhibovat CYP17A1 a tím snižovat hladiny androgenů patří orteronel, také označován jako TAK-700 (Saranyutanon a kol., 2019). Ukázal se jako 5x selektivnější než abirateron při testech na lidských a opičích adrenálních buňkách (Yamaoka a kol., 2012). Druhá fáze klinické studie potvrdila snížení hladiny cirkulujících androgenů a počtu nádorových buněk u pacientů s CRPC (Zhu a kol., 2013). Léčba touto látkou také prodloužila přežití pacientů s nemocí, ovšem nebyl zaznamenán vliv na celkové vyléčení.

Jako poslední látka zde uvedena, která svým účinkem cílí primárně na pokles hladiny androgenů, je finasterid, který je inhibitorem enzymu 5α -reduktázy, který je nezbytný pro přeměnu testosteronu na DHT (Saranyutanon a kol., 2019).

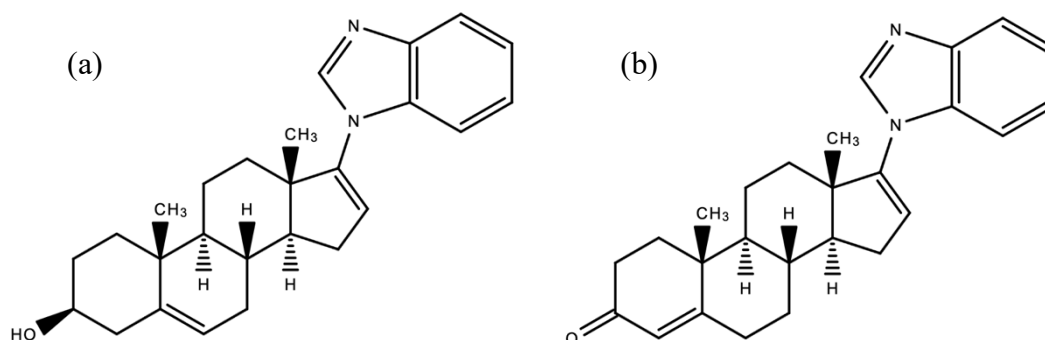
Inhibitorem CYP17A1 je také galeteron, kterému se ovšem věnuje následující kapitola, jelikož je zároveň také steroidním antiandrogenem.

2.4.3 Steroidní antiandrogeny

Antiandrogeny obecně byly vyvinuty v reakci na některé neúspěchy a vážnější vedlejší účinky látek, které cílí na syntézu androgenů. Antiandrogeny inhibují AR skrze inhibici vazby agonistů na receptor, tedy cílí na LBD. Látky, které inhibují AR skrze NTD jsou popsány v samostatné kapitole. V této kapitole jsou diskutovány antiandrogeny, které mají steroidní charakter. Patří mezi ně hlavně cyproteron acetát, megestrol acetát, dienogest, galeteron (také znám jako TOK-001) a chlormadinon acetát.

Cyproteron acetát byl jeden z nejběžněji klinicky používaných léků rakoviny prostaty, zejména pro paliativní léčbu (Saranyutanon a kol., 2019). Tato látka je odvozena od hydroxyprogesteronu, který má větší vazebnou afinitu k AR než mnohé nesteroidní antiandrogeny první generace, které jsou uvedeny dále. Krom jeho antiandrogenního charakteru byl u něj pozorován také antigonadotropní charakter, jelikož soutěží s gonadotropinem o vazbu na jeho receptor. Pozdější studie prokázaly, že cyproteron nemá takovou účinnost a terapie tímto lékem nevede k přežití pacienta, a to ani v monoterapii, ani v kombinaci s chirurgickou kastrací (Thorpe a kol., 1996). Kromě toho byly obecně u steroidních antiandrogenů pozorovány nežádoucí účinky ve formě kardiovaskulárních problémů a hepatotoxicity. Z těchto důvodů bylo klinické používání cyproteronu pozastaveno.

Megesterol acetát je steroidní antiandrogen, který primárně inhibuje transkripční aktivitu AR, ale také inhibuje 5α -reduktázu a potlačuje uvolňování luteinizačního hormonu (Saranyutanon a kol., 2019). Užívání této látky u onkologicky nemocných dětí bylo ve studii spojeno s výrazným zvýšením váhy pacienta, se zvýšenou chutí k jídlu a se zvýšeným kalorickým příjmem (Orme a kol., 2003). Nicméně u 10 pacientů z 11 došlo k nebezpečnému snížení hladiny kortizolu, přičemž u jednoho pacienta se projevil také hypoadrenalismus s hemodynamickým kolapsem.



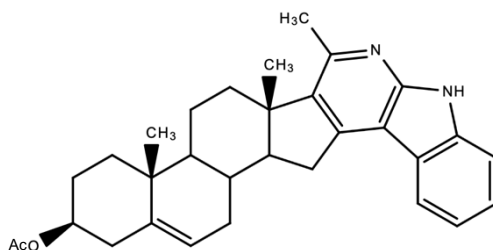
Obr. 5 – (a) Strukturní vzorec galeteronu. (b) Strukturní vzorec $\Delta(4)$ -galeteronu. Shodné kruhy A a B mezi testosteronem a D4G jsou příčinou silného antagonistického charakteru D4G (Alyamani a kol., 2017).

Galeteron je látka s perorálním užitím, která vykazuje 3 mechanismy účinku vůči rakovině prostaty (McClurg a kol., 2018). Jednak působí jako antagonistista vůči AR, jednak vykazuje inhibiční aktivitu vůči 17,20-lyáze CYP17A1 a také indukuje degradaci AR. V klinických studiích prokázal galeteron dobrý bezpečnostní profil

u pacientů s CRPC (Montgomery a kol., 2016). Stejně studie popisují vliv galeteronu na pokles hladiny PSA o více jak 30 % u zhruba poloviny pacientů, a dokonce pokles o více jak 50 % u 22 % pacientů. Jako optimální dávku stanovila skupina Montgomery a kol. 2 550 mg za den. Galeteron má také vysoký potenciál pro pacienty s CRPC, u kterých selhala léčba jinými antiandrogeny, jelikož prokazatelně indukuje degradaci AR, respektive dochází ke snížení hladin mRNA jak pro plnou variantu AR, tak pro alternativní varianty AR-Vs (Kwegyir-Afful a kol., 2015). Galeteron také ovlivňuje stabilitu MDM2 ubikvitin ligázy. Tato skutečnost je příslibem převážně pro pacienty s AR-Vs, kde léčba antiandrogeny není dostačující, jelikož AR-Vs postrádají LBD. Bylo také prokázáno, že degradace AR-Vs vyžaduje podstatně delší působení galeteronu než degradace plné varianty AR. Galeteron je navíc účinný také vůči AR-negativním buněčným liniím, a to skrze mechanismus zahrnující fosforylaci důležitých částí eukaryotního translačního komplexu (Kwegyir-Afful a kol., 2016). Pozoruhodné výsledky přinesla studie skupiny McKay a kol., která srovnávala účinky abirateronu a enzalutamidu po léčbě galeteronem (McKay a kol., 2017). Abirateron v této studii vykazoval mnohem lepší výsledky (ve smyslu snížení hladiny PSA u pacientů s CRPC) než enzalutamid. Krom výše zmíněných mechanismů účinku galeteronu, byl také prokázán jeho vliv na USP12 a USP46, což jsou si navzájem velmi podobné deubikvitinační enzymy, mezi jejichž cíle patří také AR nebo p53 (McClurg a kol., 2018). Galeteron je, obdobně jako abirateron, metabolizován na $\Delta(4)$ -galeteron (D4G) (obr. 5), který je dále v těle metabolizován na 3-keto-5 α -galeteron (Alyamani a kol., 2017). Metabolit D4G pak, obdobně jako D4A, vykazuje větší antagonistickou aktivitu vůči AR z důvodu podobnosti s testosteronem. Galeteron, na rozdíl od tobicalutamidu, ale obdobně jako enzalutamid, nestimuluje vazbu AR na chromatin (Yu a kol., 2014). Nedávno byla zveřejněna 3. fáze linické studie, ve které byl galeteron testován oproti enzalutamidu se zaměřením na potlačení exprese a degradaci AR-V7 u pacientů s CRPC s metastázemi (Taplin a kol., 2019). V této studii bylo vybráno 38 pacientů s AR-V7 z celkového počtu 953. Z těchto 38 pacientů bylo náhodně 19 léčeno galeteronem a 19 enzalutamidem. Galeteron nevykazoval uspokojivé výsledky vůči enzalutamidu a jeho vývoj byl ukončen. I po neúspěších na poli léčby karcinomu prostaty je galeteron hojně využíván v laboratořích jako standard. Stejně využití má i v experimentální části této práce. Stejně tak se vědecké skupiny snaží syntetizovat analogy galeteronu, které na buněčných liniích rakoviny

prostata prokazují potlačení exprese AR regulovaných proteinů, jako je Nkx3.1 a PSA (Jorda a kol., 2019).

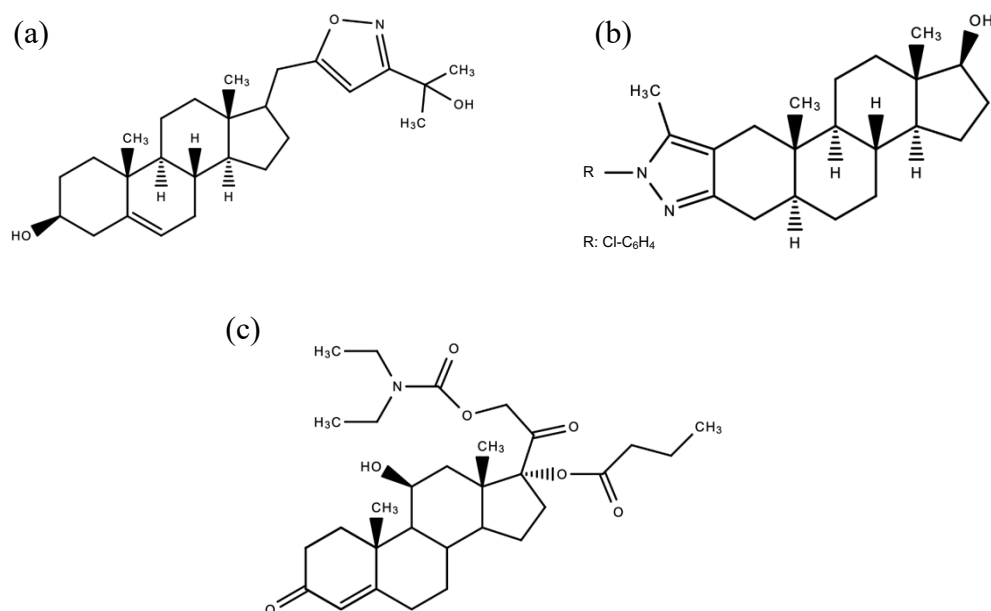
Výše zmíněná studie Jorda a kol. zkoumala 16 různých analogů galeteronu. Vědecká práce se zaměřila, mimo jiné, na antiproliferační aktivitu na buněčných liniích rakoviny prostaty, jakými byli ARE14, C4-2, VCaP a PC3 jako negativní kontrolu (Jorda a kol., 2019). V tomto experimentu většina látek prokázala silný antiproliferační charakter při 72hodinovém ovlivnění a koncentraci 40 μM . Při testování derivátů galeteronu, na transkripční aktivitě AR, byly detekovány proteiny metodou Western blott při 24hodinovém ovlivnění a koncentraci látky 5 μM , obdobně jako v experimentální části této práce. Mezi detekované proteiny patřila plná varianta AR, AR-V7, Nkx3.1, PSA a α -tubulin pro detekci rovnoměrného nanesení vzorků. V tomto experimentu prokázaly 3 látky (označeny jako 3f, 3h a 3e) silný vliv na snížení hladiny proteinu Nkx3.1, jenž byl srovnatelný s galeteronem. Snížení hladiny PSA bylo pozorováno u pouze 2 látek, kde jako důvod autoři uvádí pravděpodobnou nižší stabilitu proteinu Nkx3.1 oproti PSA. U zbylých látek nebyl pozorován vliv na hladiny detekovaných proteinů. Dalším důležitým experimentem, který je obdobně použit v experimentální části této práce, je reportérová esej s využitím luciferázy, která je exprimovaná buněčnou linií ARE14. Buňky byly kultivovány s přidáním 1 nM R1881 a 10 μM testované látky v CSS médiu s takřka nulovou hladinou androgenů. Aktivita luciferázy je spojena s aktivitou AR, proto následná detekce signálu luciferázy odhalila vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AR. Nejlepší výsledky byly prokázány u látky 3f, kde luminiscence klesla na cca 30 % kontroly a byla srovnatelná se vzorkem ovlivněným enzalutamidem a nižší než u vzorku, který byl ovlivněn galeteronem. Z důvodu pozitivních výsledků při snížení hladiny Nkx3.1 a při reportérové esaji byla látka 3f (obr. 6) dále testována. Byl proveden aktivační experiment, kdy se sledoval vliv



Obr. 6 – Strukturní vzorec látky 3f odvozené od galeteronu a zkoumané ve studii Jorda a kol., 2019.

látky 3f na hladiny dříve zmíněných proteinů u buněk ARE14, které byly kultivovány v CSS médiu s přidáním R1881. V tomto experimentu látka 3f prokázala schopnost snížit hladinu Nkx3.1 a PSA již při koncentraci 5 μM oproti kontrole, aniž by vyvolala apoptózu (byl detekován také fragment poly(ADP-ribózy)polymerázy (PARP)). Byly provedeny také další experimenty, jako například pozorování vlivu studovaných látek na tvorbu kolonií. Závěrem autoři uvádí, že látka 3f prokázala snížení viability buněk rakoviny prostaty a potlačila tvorbu jejich kolonií. Tato látka také prokazatelně snížila hladiny PSA a Nkx3.1, tedy proteinů, které jsou podřízeny AR. Autoři studie označují látku 3f jako slibného kandidáta k dalším studiím.

Obdobné látky zkoumala také skupina Rudovich a kol., která označila látku 24j (obr. 7a) jakožto slibný antiandrogen na základě její schopnosti potlačit signální dráhy AR a snížení hladiny podřízených proteinů u buněčných linií LNCaP a LAPC-4 (Rudovich a kol., 2022). Další studie, tentokrát skupiny Peřina a kol., studovala skupinu látek taktéž odvozených od DHT s derivátem pyrazolu navázaným na A kruh (Peřina a kol., 2023b). Z této studie vzešla látka 3d (obr. 7b), která byla označena za potenciálního antagonistu AR z důvodu její schopnosti potlačit signální dráhu AR a antiproliferační aktivity vůči buňkám rakoviny prostaty. Mimo to tato látka prokázala potenciál při *ex vivo* studii ve tkáních od pacientů s rakovinou prostaty. V další studii



Obr. 7 – Strukturní vzorce látek (a) 24j (Rudovich a kol., 2022), (b) 3d (Peřina a kol., 2023b) a (c) 14 (Peřina a kol., 2023a).

skupiny Peřina a kol. byly testovány deriváty hydrokortizonu (Peřina a kol., 2023a). Oproti jiným studiím se zde pozornost zaměřila také na GR, který hraje roli v mechanismu rezistence na léčbu rakoviny prostaty (vizte dále). Ze studovaných látek byl vyzdvihnut vliv látky 14 (obr. 7c) na transkripční aktivitu AR i GR. Mimo to tato látka prokázala svůj vliv v kombinaci s enzalutamidem na kumulaci buněk v G1 fázi, který byl výraznější než vliv samotného enzalutamidu.

2.4.4 Nesteroidní antiandrogeny první generace

Oproti steroidním antiandrogenům mají ty nesteroidní užší cílový rozsah, a proto vykazují méně vedlejších účinků (Saranyutanon a kol., 2019). Tyto látky byly vyvíjeny už od 70. let 20. století, aby obešly necílené účinky steroidních antiandrogenů a neměly žádné významné interakce s jinými jadernými receptory než AR. Tři nejvýznamnější nesteroidní antiandrogeny jsou bicalutamid, flutamid a nilutamid, které jsou zároveň v současnosti schváleny k použití (Chen a kol., 2009).

Flutamid inhibuje AR skrze vytěsnění ligandu v LBD. Častěji než v monoterapii, byl používán v kombinaci s jinými léčivy, jako například s agonisty LHRH v počáteční terapii metastatické rakoviny prostaty (Saranyutanon a kol., 2019). Klinické studie flutamidu neposkytly uspokojivé výsledky. Jedna ze studií, prováděná na 603 pacientech s metastatickým karcinomem prostaty, kteří dostávali flutamid společně s agonistou LHRH oproti placebo, ukázala 25% zlepšení přežití ve prospěch flutamidu (Crawford a kol., 1989). Výsledky této studie však nebyly potvrzeny v další randomizované studii s více než 1 400 pacienty a zaměření vědecké komunity se začalo orientovat na vývoj derivátů flutamidu, které by vykazovaly přesvědčivější výsledky (Chen a kol., 2009).

Nilutamid je derivátem flutamidu s farmakokinetickými vlastnostmi, které umožňují dávkování pouze jednou denně (Chen a kol., 2009). Funguje na stejném principu jako jeho předchůdce, tedy inhibuje AR kompeticí o vazebné místo s ligandem. Byl schválen v roce 1996 pro použití společně s kastrací, kdy vykazuje dobrý bezpečnostní profil a dlouhodobě prodlužuje život pacientům s rakovinou prostaty (Dijkman a kol., 1997). Studie z roku 2005 byla zaměřena na léčbu nilutamidem u pacientů, kde selhala léčba flutamidem nebo bicalutamidem (Davis a kol., 2005). Studie byla přerušena z důvodu nepřesvědčivých výsledků nilutamidu,

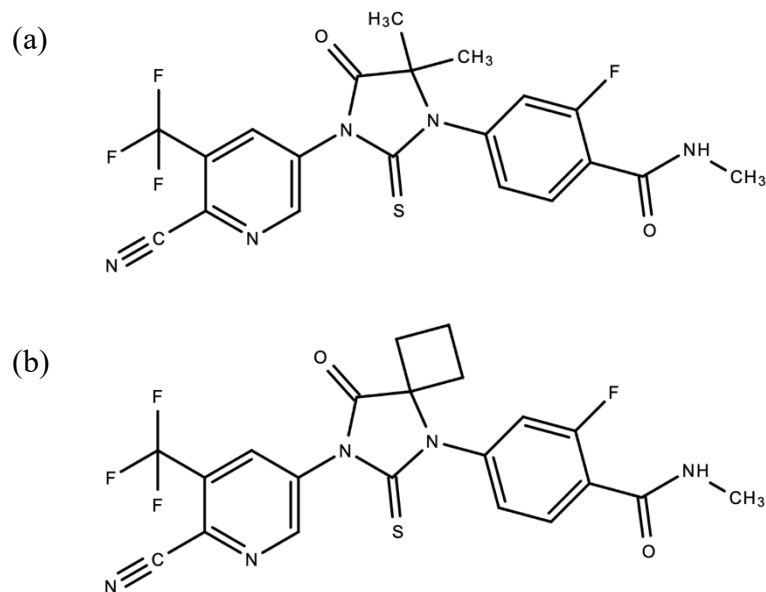
ovšem sami autoři připouští, že nilutamid přinášel benefity několika pacientům, u kterých bicalutamid selhal.

Bicalutamid má odlišný mechanismus účinku než výše dva zmíněné antiandrogeny. Váže se na alosterické místo na AR v LBD, čímž vyvolá konformační změnu ve vazebném místě pro koaktivátory, což má za následek inhibici transkripční aktivity AR (Osguthorpe, Hagler, 2011). Je odvozen od flutamidu a má až 2x větší afinitu k AR ve srovnání s ostatními nesteroidními antiandrogeny první generace (Kucuk a kol., 2001). U pacientů léčených bicalutamidem je pozorována také snížená exprese AR, ovšem pouze přechodně. U některých pacientů s CRPC byla pozorována také agonistická aktivita bicalutamidu, a to zejména vlivem mutací AR. Díky dobrému bezpečnostnímu profilu a dávkování jednou denně po 150 mg je bicalutamid nejčastěji používaným antiandrogenem v monoterapii (Chen a kol., 2009). Byl schválen k léčbě CRPC již v roce 1995.

2.4.5 Nesteroidní antiandrogeny druhé generace

Nesteroidní antiandrogeny druhé generace jsou vyvíjeny v reakci na nedostatky první generace těchto léčiv. Častou komplikací první generace antiandrogenů byla jejich konverze na agonisty (Chen a kol., 2009). Ukázalo se, že látky první generace se sice úspěšně vázaly na AR a způsobovaly v něm konformační změny, ovšem stále byl AR translokován do jádra a byl schopen se vázat na DNA, i když např. v případě bicalutamidu nedocházelo k transkripční aktivitě AR vlivem blokace vazby koaktivátorů. Byly však popsány situace, kdy byly tyto mechanismy nedostatečně účinné a docházelo tak k transkripční aktivitě AR. Vliv na změnu charakteru antiandrogenů z antagonistického na agonistický měly hlavně mutace AR (např. T877A nebo W741L, který způsobovaly částečné agonistické chování bicalutamidu) a nadměrná exprese AR. Vlivem těchto nedostatků v léčbě jsou vyvíjeny tzv. antiandrogeny druhé generace, mezi které patří primárně enzalutamid, apalutamid, darolutamid a AZD3514.

Apalutamid (dříve také ARN-509) se kompetitivně váže na AR s vysokou afinitou a zamezuje tak vazbě androgenu, čímž inhibuje translokaci AR do jádra a jeho celkovou transkripční aktivitu (Al-Salam, 2018). Je strukturně velmi podobný enzalutamidu (obr. 8). V roce 2018 byl schválen v USA pro léčbu nmCRPC a v roce 2019 i pro mCRPC (Saranyutanon a kol., 2019). Schválení předcházely klinické



Obr. 8 – Strukturální vzorce dvou významných antagonistů AR druhé generace: (a) apalutamidu a (b) enzalutamidu. Patrná je výrazná strukturální podobnost.

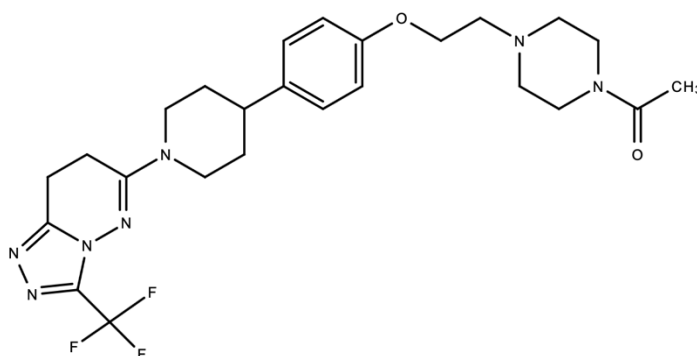
studie, ve kterých byl apalutamid podáván po 240 mg jednou za den perorálně (Smith a kol., 2016). Těto studie se zúčastnilo 51 pacientů s nmCRPC v průměrném věku 71 let a prokázala dobrý bezpečnostní profil apalutamidu společně s jeho významným vlivem na pokles hladiny PSA o více jak 50 % u 93 % pacientů. Stejně pozitivní výsledky měla i 3. fáze klinické studie, kdy bylo prokázáno významné zlepšení přežití u mužů s nmCRPC mezi 1 207 pacienty, kdy 806 dostávalo apalutamid v dávce 240 mg denně a 401 pacientů dostávalo placebo (Small a kol., 2020). Ačkoli apalutamid není indikován pro ženy a údaje o jeho vlivu na ženy jsou minimální, je jeho použití u těhotných žen kontraindikováno, jelikož může způsobit poškození plodu (Al-Salam, 2018). Muži užívající apalutamid by měli při pohlavním styku s těhotnými ženami, či ženami mající reprodukční potenciál, používat bariérovou antikoncepci. Slabou stránkou apalutamidu, obdobně jako enzalutamidu, je jeho slabá vazba na AR s mutací F876L (Shao a kol., 2021).

Enzalutamid (dříve také MDV3100) obdobně jako apalutamid, inhibuje AR skrze afinitu k vazebnému místu LBD, čímž zamezuje aktivaci AR a jeho translokaci do jádra (Saranyutanon a kol., 2019). Je strukturálně velmi podobný apalutamidu (obr. 8). Vědecká skupina Scher a kol. se ve své 3. fázi klinické studie zaměřila na zhodnocení, zda enzalutamid prodlužuje přežití mužů s mCRPC po chemoterapii (Scher a kol., 2012). Jednalo se o dvojitě zaslepenou, placebem kontrolovanou studii, která

zahrnovala 1 199 pacientů s mCRPC, kdy byli pacienti náhodně rozděleni poměrem 2:1 a větší část pacientů dostávala perorálně 160 mg enzalutamidu denně. Studie byla ukončena po 520 úmrtích pacientů, kdy medián celkového přežití byl 18,4 měsíců pro pacienty léčené enzalutamidem oproti 13,6 měsícům pro pacienty, kterým bylo podáváno placebo. I sekundární cílový parametr studie, tedy hladina PSA, byl pozitivně ovlivněn enzalutamidem. Pokles hladiny PSA o více jak 50 % byl pozorován u 54 % pacientů s enzalutamidem oproti pouhým 2 % pacientů s placebem. Mezi vedlejší účinky, které studie detekovala a byly patrné u pacientů léčených enzalutamidem, patřily hlavně průjemy, návaly horka a únava. Vážnější vedlejší účinky, jako jsou například záchvaty, byly hlášeny pouze u 0,6 % pacientů, kterým byl podáván enzalutamid. Studie označila enzalutamid jako látku, která významně prodlužuje přežití mužů s mCRPC. Jiná studie, skupiny Sternberg a kol., testovala enzalutamid v rámci 3. fáze klinické studie na pacientech s nmCRPC a s rychle rostoucí hladinou PSA v kombinaci s androgen-deprivační léčbou (Sternberg a kol., 2020). Do studie bylo zapojeno 1 401 pacientů, kteří byli náhodně rozděleni poměrem 2:1, kde větší skupině byl podáván enzalutamid v dávce 160 mg denně a menší skupině placebo. V době vyhodnocení studie zemřelo 288 ze 933 pacientů (31 %) léčených enzalutamidem a 178 ze 468 pacientů (38 %), kterým bylo podáváno placebo. Medián celkového přežití byl 67,0 měsíců (enzalutamid) oproti 56,3 měsíců (placebo). Nežádoucí účinky byly obdobné, jako u jiných studií a vážnější vedlejší účinky se vyskytovaly sporadicky. Závěr studie konstatoval, že enzalutamid v kombinaci s androgen-deprivační léčbou vede k delšímu celkovému přežití pacienta s nmCRPC a rychlou rostoucí hladinou PSA. Riziko úmrtí s enzalutamidem bylo o 27 % nižší než s placebem. Enzalutamid byl patentován v roce 2006, od roku 2012 je povolen k léčbě mCRPC a od roku 2018 dokonce k léčbě nmCRPC v USA. Od schválení bicalutamidu v roce 1995 se jedná o první schválený antiandrogen k léčbě karcinomu prostaty a vůbec první schválený antiandrogen druhé generace. Slabou stránkou enzalutamidu, obdobně jako apalutamidu, je jeho slabá vazba na AR s mutací F876L, což může být riziko pro vznik rezistence na léčbu touto látkou (Saranyutanon a kol., 2019).

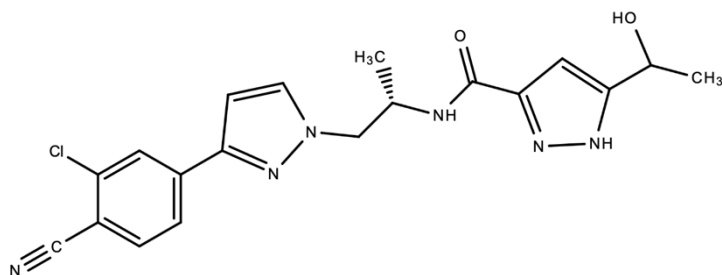
AZD3514 je další perorální selektivní antagonist a druhé generace, který krom vazby na LBD a zabránění translokace AR do jádra také, oproti ostatním antiandrogenům druhé generace, snižuje expresi AR (Loddick a kol., 2013). Struktura AZD3514 je znázorněna na obr. 9. Ve studii skupiny Loddick a kol. byl AZD3514

testován na buněčných liniích LNCaP a LAPC4 karcinomu prostaty exprimující jak nemutovanou variantu AR, tak AR s mutací T877A v LBD. AZD3514 v této studii prokázal schopnost snížit hladinu exprese PSA při koncentraci 10 μ M, a to už po 2 až 4 hodinách od ovlivnění. Naopak jeho efekt na buněčnou linii DU145, která je tzv. AR negativní, byl minimální. Pokles exprese AR byl pozorován u buněčných linií LAPC-4 i LNCaP při ovlivnění 10 μ M AZD3514, a to po 24 hodinách, jak za přítomnosti DHT, tak bez DHT. Naopak tento efekt nebyl pozorován při kratší době ovlivnění, tedy 2 a 6 hodinách. Úplného zastavení exprese AR se v této studii docílit nepodařilo. K porovnání použila vědecká skupina Loddick a kol. enzalutamid, který vykazoval menší snížení exprese AR u obou buněčných linií. Jako metoda detekce exprese byl použit Western-blott. Tato studie také zahrnovala experimenty *in vivo*, kdy byl použit potkaní model rakoviny prostaty závislý na androgenech, konkrétně Dunning R3327H. AZD3514 inhiboval růst tohoto nádoru a také inhiboval zvýšení hmotnosti semenných váčků u samců potkanů, jenž bylo řízeno buďto fyziologickým testosteronem, nebo exogenním testosteronem u kastrovaných potkanů. Autoři studie zde poukazují na skutečnost, že je tento výsledek v kontrastu s abirateron acetátem, který je aktivní pouze proti fyziologickému testosteronu. První fáze klinické studie z roku 2015 označila protinádorovou aktivitu AZD3514 za mírnou (angl. moderate) u pacientů s pokročilou fází CRPC (Omlin a kol., 2015). Látka byla testována na 49 pacientech s eskalujícím dávkováním, kdy dávka 2 000 mg dvakrát denně byla popsána jako netolerovatelná z důvodu toxicity. Obecně se u AZD3514 v této studii objevily nežádoucí účinky, jako nevolnost a zvracení, které byly považovány za významné.



Obr. 9 – Strukturní vzorec AZD3514, antagonisty AR druhé generace, který krom inhibice AR skrze zamezení translokace AR do jádra také snižuje syntézu AR.

Pokles PSA o více jak 50 % byl pozorován pouze u 13 % pacientů. Závěr studie doporučil další vývoj a testování této sloučeniny.



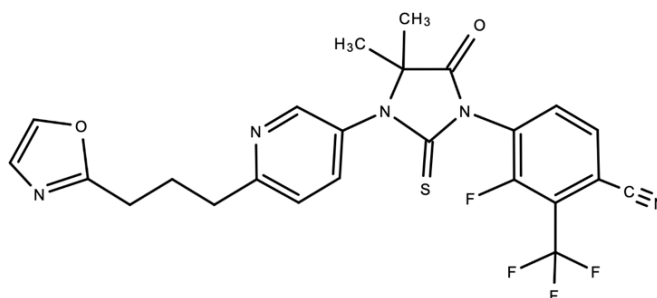
Obr. 10 – Strukturní vzorec darolutamidu, antagonisty AR druhé generace, který si oproti ostatním antagonistům zachovává svou afinitu k mutantům AR.

Darolutamid (dříve také ODM-201) je někdy označován jako inhibitor třetí generace, jelikož jeho afinita k AR není ovlivněna mutací F876L, jako tomu je u enzalutamidu nebo apalutamidu (Saranyutanon a kol., 2019). Struktura darolutamidu je znázorněna na obr. 10. Mechanismus jeho účinku je obdobný, jako u ostatních inhibitorů druhé generace. Váže se na LBD AR, blokuje vazbu ligandu a zamezuje translokaci AR do jádra. Preklinická studie skupiny Moilanen a kol. prokázala, že darolutamid (ve studii ještě označován jako ODM-201, respektive jako jeho metabolit ORM-15341) není ovlivněn klíčovými mutacemi AR a jeho antagonistický charakter je tak zachován (Moilanen a kol., 2015). Konkrétně byly testovány mutace F876L, W741L a T877A a darolutamid byl postaven oproti enzalutamidu a apalutamidu (ve studii ještě jako ARN-509). Studie prokázala jeho inhibici transkripční aktivity AR skrze zamezení translokace AR do jádra a popsala jeho pozitivní vliv na potlačení růstu jak nádorových buněk *in vitro*, tak nádorů *in vivo* v myším modelu. Obdobně jako ostatní inhibitory druhé generace, ani darolutamid nevykazoval aktivitu v buněčné linii DU145, která je tzv. AR negativní. Studie také potvrdila, že darolutamid nezvyšuje hladinu testosteronu v krvi a neprochází skrz hematoencefalickou bariéru u myší, což se naopak ukázalo u enzalutamidu a apalutamidu. Klinická studie skupiny Fizazi a kol. hodnotila darolutamid (ve studii ještě jako ODM-201) z hlediska bezpečnosti, farmakokinetiky a celkové aktivity u mužů s mCRPC (Fizazi a kol., 2014). Tato studie kombinovala 1. a 2. fázi klinické studie a probíhala ve 23 nemocnicích v Evropě a USA. Ve fázi 1 byl podáván darolutamid v počáteční denní dávce 200 mg, která byla postupně zvyšována na 400 mg, 600 mg, 1 000 mg, 1 400 mg až na konečných

1 800 mg. Takto bylo pozorováno 24 pacientů, kteří byli rozděleni do 6 kohort. U žádného z pacientů nebyly hlášeny žádné toxické účinky omezující dávku, a tudíž nebyla stanovena ani maximální tolerovaná dávka. Byly sice hlášeny různé nežádoucí příhody (bolest, zvracení, retence moči, lymfedém), ale u žádné se nepotvrdila spojitost s podáním darolutamidu. Do 2. fáze studie postoupili čtyři pacienti s dávkou 200 mg, sedm s dávkou 400 mg a 3 s dávkou 1 400 mg z 1. fáze studie. Krom těchto pacientů bylo do 2. fáze studie zařazeno dalších 110 pacientů a byly vytvořeny tři skupiny: 38 pacientů s dávkou 200 mg, 37 s dávkou 400 mg a 35 s dávkou 1 400 mg. V 2. fázi studie byl hlavním pozorovaným parametrem podíl pacientů, u kterých klesla hladina PSA alespoň o 50 % po léčbě darolutamidem. Pozorované nežádoucí účinky byly hlavně únava a snížená chuť k jídlu a vyskytovaly se u jednotek procent pacientů. Pokles hladiny PSA o více jak 50 % byl po 12 týdnech pozorován u 11 (29 %) pacientů s dávkou 200 mg, u 13 (33 %) pacientů s dávkou 400 mg a u 11 (33 %) pacientů s dávkou 1 400 mg. Závěr studie označil darolutamid za látku s dobrým bezpečnostním profilem a schopností potlačení mCRPC v monoterapii. V USA byl darolutamid schválen v červenci 2019 pro léčbu CRPC.

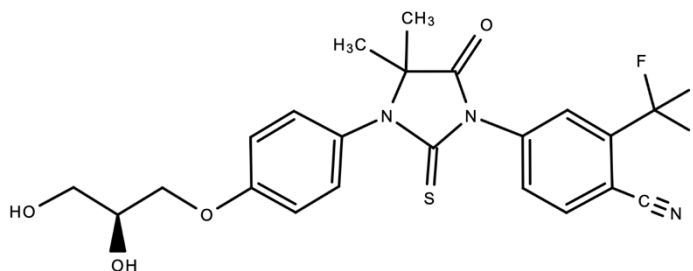
Mezi nejnovější antiandrogeny patří proxalutamid (obr. 11). Jedná se o antagonistu AR, který se v současnosti nachází ve 3. fázi klinické studie v kombinaci s abirateronem (Qu a kol., 2020). Má pravděpodobně podobný mechanismus účinku jako enzalutamid, ale vyšší účinnost blokovat AR. Vědecká skupina Qu a kol. také uvádí, že u buněk ovlivněných proxalutamidem došlo ke snížení intracelulárních hladin glutaminu, glutamátu, glutationu, cysteinu, glycinu, aspartátu, uridinu a cytidinu, což se neprojevovalo u buněk, které byly ovlivněny enzalutamidem. Tato studie probíhala na buněčných liniích LNCaP, 22Rv1, PC3 a DU145 rakoviny prostaty. Byl prokázán silný antiproliferační efekt proxalutamidu, kdy byl pozorován výraznější efekt u AR pozitivních buněčných liniích (LNCaP a 22Rv1) oproti AR negativním (PC3 a DU145). Toto zjištění poukazuje na fakt, že antiproliferační aktivita této látky je závislá na signální dráze AR. Výsledky této studie naznačují, že proxalutamid může mít nový mechanismus účinku v androgenní signalizaci, který je zcela odlišný od mechanismu enzalutamidu. Během pandemie onemocnění COVID-19 byl proxalutamid testován v souvislosti s tímto onemocněním. Studie skupiny McCoy a kol. tvrdila, že podáváním proxalutamidu došlo ke snížení počtu hospitalizací s onemocněním COVID-19 o 91 % (McCoy a kol., 2021). Tato studie byla následně

stažena a zpochybněna z důvodu nezajištění náhodnosti distribuce léku a placebo mezi pacienty. Studuje se také vliv proxalutamidu na rakovinu prsu (Jiang a kol., 2022).



Obr. 11 – Strukturní vzorec proxalutamidu.

Mezi nové antiandrogeny patří také rezvilutamid, který je strukturně podobný proxalutamidu (obr. 12). Od roku 2016 byl testován v klinických studiích a v roce 2022 byl schválen v Číně k léčbě rakoviny prostaty (Keam, 2023). Obdobně jako většina antiandrogenů se rezvilutamid váže na LBD AR a kompetitivně inhibuje vazbu androgenů na AR.



Obr. 12 – Strukturní vzorec rezvilutamidu

2.4.6 Inhibitory koaktivátorů androgenního receptoru

V kapitole 2.3.3 byla zmíněna důležitost aktivity koaktivátorů AR na výsledný transkripční efekt receptoru. V této kapitole budou shrnuty jejich inhibitory, které lze rozdělit na inhibitory BET, inhibitory CBP/p300 a duální inhibitory. Jelikož se nejedná o koaktivátory výlučně jen AR a jejich aktivita je důležitá i pro jiné transkripční faktory, jejich inhibitory mají přesah do léčby i jiných typů nádorů. Jak je uvedeno dále v této kapitole, často našly tyto látky využití v léčbě karcinomu prostaty v kombinaci s antiandrogeny, jako je například enzalutamid.

Molibresid patří mezi perorálně aktivní inhibitory BET (Velho a kol., 2021). Prvotní preklinické studie tohoto inhibitoru prokázaly jeho protinádorovou účinnost u zvířecích modelů a u vícero druhů rakovin, včetně rakoviny prostaty (Wyce a kol., 2013). Studie na lidech nebyly zprvu velmi úspěšné, a to převážně z důvodu výskytu velkého množství nežádoucích účinků u větších dávek molibresidu (Piha-Paul a kol., 2019). Z celkového počtu 196 pacientů (s různým typem rakoviny, z toho 35 s CRPC) se v první fázi klinických testů musela léčba přerušit u 19 %, u 92 % se vyskytovaly vedlejší účinky a u 27 % pacientů se musela z důvodu vedlejších účinků snížit dávka. Nejčastější vedlejší účinky byly trombocytopenie (64 % pacientů), nevolnost (49 %) a snížená chuť k jídlu (46 %). Medián věku pacientů s CRPC byl okolo 64 let a podstoupili již minimálně 3 předešlé odlišné terapie. V dalších studiích se částečná odpověď projevila u 1 pacienta s CRPC a u 5 pacientů se onemocnění stabilizovalo (Cousin a kol., 2020). V současnosti je molibresid zkoumán v kombinaci s abirateronem nebo enzalutamidem u pacientů s mCRPC.

Mezi inhibitory bromodomény patří také birabresid, který je inhibitorem proteinů BRD2, BRD3 a BRD4 (bromodomain-containing protein) patřící do rodiny BET (Lewin a kol., 2018). Dle studie, která testovala tento inhibitor na 46 pacientech s různými typy nádorů, se birabresid u léčby rakoviny prostaty neosvědčil. Studie zahrnovala pacienty s CRPC (26 pacientů), ale také například pacienty s karcinomem plic. Pacienti byli rozděleni do dvou kohort A a B. V kohortě A byl birabresid dávkován denně po dobu 21 dnů a v dávce 80 mg. V kohortě B byl inhibitor dávkován po 100 mg denně prvních 7 dnů z celkových 21 sledovaných. Nejzávažnější vedlejší účinky byly pozorovány převážně v kohortě A a patřila mezi ně anorexie, nevolnost, případně trombocytopenie a zvýšené hodnoty ALT (alaninaminotransferáza). Na základě těchto výsledků byla v dalších fázích studie preferována dávka 80 mg denně. U pacientů s CRPC byl nejlepší výsledek léčby stabilizace nádorového bujení (u 15 pacientů z 26). Na základě těchto nepřesvědčivých výsledků birabresidu u pacientů s CRPC není jeho další využití při léčbě rakoviny prostaty jasné.

Mezi tzv. inhibitory BET druhé generace patří látka ZEN-3694 (Velho a kol., 2021). Dle studií prokázala tato látka silnou inhibiční aktivitu k BET, a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s enzalutamidem (Aggarwal a kol., 2020). Ve studiích se ZEN-3694 osvědčil jako inhibitor AR signální dráhy, a to jak u běžné varianty AR, tak u AR-Vs, glukokortikoidního receptoru a dalších produktech onkogenů spojených s CRPC. Ve

studii Aggarwal a kol. bylo zahrnuto 75 pacientů s CRPC a byla jim podávána dávka od 36 mg ZEN-3694 jednou denně v kombinaci se 160 mg enzalutamidu. Vážnější vedlejší účinky se projevily u 14 pacientů a čítaly nevolnost, únavu, anémii či trombocytopenii. Výsledkem studie bylo stanovení doporučené dávky ZEN-3694 na 96 mg/den. Pozitivní výsledky také vedly k doporučení autorů k pokračování výzkumu v kombinaci také s pembrolizumabem.

Látka CCS1477 je silným, selektivním a perorálně dostupným inhibitorem CBP/p300, který prokázal také konzistentní schopnost inhibovat expresi jak běžné varianty AR, tak alternativních variant (Velho a kol., 2021). Prvotní preklinické studie prokázaly, že monoterapie CCS1477 způsobila snížení hodnot PSA a regresi nádoru (Butler a kol., 2019). V současnosti se další studie zaměřují jednak na monoterapii CCS1477, jednak na kombinaci CCS1477 s abirateronem nebo enzalutamidem.

Mezi zástupce duálních inhibitorů BET a CBP/p300 patří látka NEO2734, která prokazatelně působí antiproliferačně proti různým solidním nádorům, jako je například karcinom prsu, karcinom kolorekta a CRPC (Spriano a kol., 2020). Preklinické studie látky NEO2734 ukázaly, že duální inhibice BET a CBP/p300 vede k protinádorovým účinkům, které jsou srovnatelné nebo lepší, než účinky inhibitorů zmíněných výše v tomto textu (Yan a kol., 2019).

2.4.7 Inhibitory N-terminální domény AR

N-terminální doména tvoří největší část AR. Společně s LBD je klíčová pro aktivaci receptoru skrze konstitutivně aktivní AF1, která interakcí NTD s LBD stabilizuje dimerizaci AR. Inhibice aktivity NTD by znamenala zamezení interakce s LBD, blokaci dimerizace a v konečném důsledku inhibici transkripční aktivity AR. Výhodou těchto inhibitorů je také fakt, že NTD je součástí všech alternativních sestřihových variant AR, což nelze říci o LBD, na kterou je cílená většina současné terapie (Velho a kol., 2021). Dosavadní výsledky studií zjistily slibné výsledky inhibitorů NTD u rakoviny prostaty, a to včetně buněk rezistentních na enzalutamid (Kranzbühler a kol., 2019).

EPI-506 je vysoce specifická malá molekula vycházející z EPI-001, která se váže na NTD, čímž inhibuje transkripční aktivitu AR (Andersen a kol., 2010). Během prvních 5 minut se EPI-506 v těle plně metabolizuje na aktivní PI-002. Studie zkoumala vliv EPI-506 na karcinom prostaty u pacientů, kteří prošli terapií

enzalutamidem nebo abirateronem (Chi a kol., 2017). První část studie zahrnovala 18 pacientů a byla zaměřena na eskalaci dávky léčiva při počáteční dávce 80 mg za den. Pokles PSA v rozmezí od 4 do 29 % byl pozorován u pouze 4 pacientů, kdy všichni dostávali denní dávku minimálně 1 280 mg. Druhá část studie byla ukončena, a to i přes skutečnost, že EPI-506 byl označen za tělem dobře tolerovanou látku. Problém byl v nadměrně vysoké pilulkové zátěži. Výzkum této látky byl u rakoviny prostaty pozastaven a pozornost vědecké komunity se zaměřila na EPI-7386.

Stejně jako EPI-506, tak i EPI-7386 je inhibítorem NTD, čímž inhibuje transkripční aktivitu AR ve všech jeho sestřihových variantách (Le Moigne a kol., 2020). Preklinická studie porovnávala EPI-7386 s EPI-506 společně s různými antiandrogeny, jako jsou například enzalutamid nebo darolutamid. Studie skupiny Le Moigne a kol. prokázala silný inhibiční charakter EPI-7386. Na základě této preklinické studie je v současnosti v běhu 1. fáze klinické studie, do které by mělo být zařazeno 40 pacientů s CRPC.

2.4.8 Cílená ubikvitinace AR technologií PROTAC

Ubikvitinace je proces, při kterém dochází k navázání polypeptidu ubikvitinu na protein, který je určen k degradaci. Po navázání dostatečného množství ubikvitinu je takto označený protein rozpoznán proteazomem a degradován. Celý proces ubikvitinace zprostředkovávají enzymy označované jako E1, E2 a E3. E1 je ubikvitin aktivační enzym a zahajuje celý proces ubikvitinace. Ubikvitin se aktivuje převážně adenylací (za spotřeby ATP) a navázáním na E1 skrze SH skupinu. Následně dochází k přenosu ubikvitinu na ubikvitin konjugující enzym E2, který tvoří komplex s ubikvitin ligázou E3, která váže ubikvitin na cílený protein. Celý proces ubikvitinace a následné degradace v proteazomu je klíčovým regulačním procesem v eukaryotických buňkách.

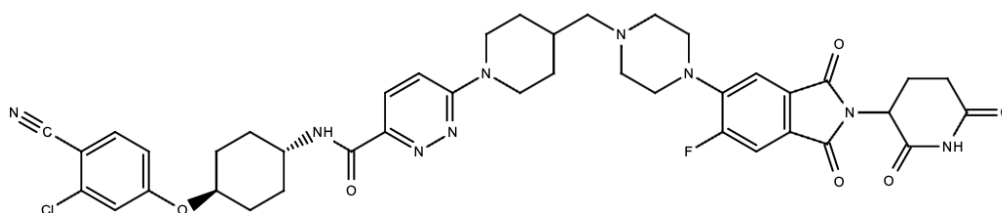
Technologie PROTAC využívá heterobifunkční nanomolekuly o velikosti přibližně 10 nm a se schopností zprostředkovat cílenou ubikvitinaci požadovaného proteinu, tedy proteinu spojeného s rakovinným bujením (Sakamoto, 2010). Látky PROTAC se skládají ze dvou kovalentně spojených molekul skrze linker, kdy jedna váže ubikvitin ligázu E3, a druhá molekula (agonista nebo antagonistu AR) váže cílový protein určený k degradaci (AR). Vzhledem k přítomnosti několika typů E3 ligáz u

lidí, lze vyvinout vícero možných kombinací PROTAC se zaměřením na specifické proteiny požadované rakoviny.

Jako první byly na počátku 21. století vyvinuty látky, které měly peptidový základ a cílily na AR, případně ER (Jia a kol., 2023). Tyto látky se skládaly z fosfopeptidu spojeného přes linker s DHT. Jejich obecnou nevýhodou byla horší prostupnost v buňkách, což omezilo jejich další využití. Pozornost vědeckých skupin se tak přesunula na PROTAC molekuly, které neobsahovaly peptidovou složku.

Alternativou k peptidové složce může být například MDM2 ubikvitin ligáza, jako tomu je u látky PROTAC-14, která byla první PROTAC sloučeninou obsahující pouze malé molekuly (Jia a kol., 2023). Část této molekuly, která se váže na AR je analogem bicalutamidu, což celé molekule zajišťuje dostatečnou afinitu k AR. Látka byla testována na buněčné linii Hela, kde prokázala degradaci AR již při koncentraci 10 μM . Později se ukázalo, že látka PROTAC-14 vykazovala pouze slabou účinnost v degradaci AR, ale její struktura poskytla inspiraci pro další vývoj.

V současnosti dochází ke klinickému testování látky bavdegalutamidu (ARV-110), která by měla soužit jako perorálně dostupný degradátor AR (Neklesa a kol., 2019). Tato látka prokázala robustní degradaci AR v mnoha buněčných liniích, včetně těch rezistentních na enzalutamid. První fáze klinické studie zahrnovala 22 pacientů s CRPC, kteří byli v minulosti léčeni abirateronem nebo enzalutamidem (Petrylak a kol., 2020). Lék v této studii prokázal přijatelný bezpečnostní profil a u 2 pacientů došlo k poklesu PSA o více než 50 %. Další studie jsou v procesu.



Obr. 13 – Strukturální vzorec bavdegalutamidu (ARV-110).

Látka, která jakožto antagonistu AR obsahuje enzalutamid, byla vyvinuta v roce 2018 a nese název ARCC-4 (obr. 14) (Jia a kol., 2023). Tato látka prokázala vyšší účinnost než samotný enzalutamid ve smyslu potlačení transkripční aktivity AR, inhibice proliferace buněk rakoviny prostaty a indukci apoptózy. Důležitou vlastností

obejít blokádu AR (Puhr a kol., 2018). Cílené ovlivnění dráhy GR v kombinaci s antiandrogenní léčbou se projevuje jako cesta ke zlepšení léčby karcinomu prostaty. Krom rakoviny prostaty byla prokázána souvislost s aktivitou GR a horší prognózou rakoviny prsu (Pan a kol., 2011).

Tento receptor je jedním z detekovaných proteinů v experimentální části této práce.

2.5 Role ER v rakovině prostaty

Obdobně jako AR a GR, také ER patří do stejné rodiny jaderných receptorů a je tedy označován jako NR3A1/2 (nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1/2). Jsou známy dvě různé fyziologické formy ER, které jsou označovány jako ER α (NR3A1) a ER β (NR3A2). Je nutné zmínit, že krom těchto jaderných ER existují také membránové ER, které jsou spřaženy s G proteinem. Tato kapitola je věnována jaderným ER a jejich roli v rakovině prostaty.

Obě formy ER, tedy ER α i ER β , jsou kódovány různými geny, přičemž gen pro ER α je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 6 a gen pro ER β na dlouhém raménku chromozomu 14 (Ramírez-de-Arellano a kol., 2022). Svou strukturou je ER velmi podobný ostatním jaderným receptorům a jeho jednotlivé formy jsou si navzájem velmi homologní. V případě LBD sdílení přes 55 % aminokyselinové sekvence a v případě DBD dokonce 95 %. Pro aktivaci ER je potřeba navázání ligandu, dimerizace a následná translokace do jádra, kde působí společně s koaktivátory jako transkripční faktor. Může vzniknout homodimer dvou α nebo dvou β forem, ale stejně tak jsou běžné heterodimery. Fyziologickým ligandem ER je hormon 17 β -estradiol (E2). ER β je nejrozšířenější ER v lidské prostatě, zatímco přítomnost ER α je omezena na bazální buňky prostatického epitelu (Bonkhoff, 2018).

Je známo, že ER má u rakoviny prostaty specifickou roli, ovšem přesný mechanismus jeho vlivu na progresi rakoviny prostaty nebyl zcela objasněn (Ramírez-de-Arellano a kol., 2022). Bylo potvrzeno, že ER α podporuje proliferaci buněk, působí prozánětlivě a má pozitivní vliv na migraci buněk. Zatímco ER β je považován za antiproliferační a tumor suprimující a jeho snížení exprese je pozorována u CRPC (Bonkhoff, 2018). Vědecká skupina Lombardi a kol. však zjistila, že aktivace ER β u buněčné linie PC-3 rakoviny prostaty, zvyšuje fosforylaci β -kateninu, který

podporuje migraci a invazivitu buněk rakoviny (Lombardi a kol., 2020). Toto a podobná zjištění vyvolávají pochybnosti o roli ER β při rakovinovém bujení.

Pro prokázání vlivu ER na karcinogenezi rakoviny prostaty byly již dříve provedeny testy na myších. Vědecká skupina Ricke a kol. testovala míru karcinogeneze u myší s vyřazenou expresí enzymu aromatázy, který metabolizuje testosteron na estradiol (Ricke a kol., 2008). Těmto myším byl dlouhodobě a v nízkých dávkách podáván testosteron, přičemž byl pozorován vznik rakoviny prostaty u 40 % exemplářů. V případě, že byl myším podáván společně s testosteronem také E2, stoupl výskyt rakoviny prostaty na 100 %. Tyto výsledky jasně ukázaly vliv E2 na karcinogenezi minimálně u myších prostat. Pro prokázání role ER byl experiment zopakován stejnou vědeckou skupinou na myších s vyřazenou expresí ER α . U tohoto modelu myší nebyla po opakovaném podávání E2 s testosteronem pozorována výraznější karcinogeneze. Tento experiment prokázal nutnou přítomnost ER α pro vznik rakoviny prostaty minimálně u myší.

Význam ER pro rakovinu prostaty u lidí lze demonstrovat na jeho vlivu na TMPRSS2:ERG. Jak již byli zmíněno v prvotních kapitolách této práce, fúze TMPRSS2 a ERG je běžná u rakoviny prostaty a slouží jako jeden z markeru tohoto onemocnění. Zatímco regulace genu pro TMPRSS2 je zprostředkována androgeny, regulace onkogenní fúze TMPRSS2:ERG zahrnuje signální dráhy ER (Bonkhoff, 2018). Bylo prokázáno, že fúze TMPRSS2:ERG je zvýšena agonisty ER α a potlačena agonisty ER β (Setlur a kol., 2008). Tyto a další skutečnosti prokazují, že abnormální exprese či aktivita ER α se podílí na maligní transformaci prostatických buněk a představuje tak riziko pro vznik rakoviny prostaty.

V experimentální části této práce byl ER α využit v reportérové esaji, kdy byl zkoumán antagonistický či agonistický charakter studovaných látek k tomuto receptoru, jelikož, jak bylo popsáno výše, není žádoucí, aby antagonist AR byl zároveň agonistou ER.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- 2-merkптоethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- akrylamid (VWR, USA)
- aprotinin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- buthanol ($\geq 99\%$, Lach-Ner, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid, pro buněčné kultury (PanReac AppliChem, Německo)
- dodecylsírán sodný ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- ethanol 96% (Lach-ner, ČR)
- fenylmethansulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum (Biowest, Francie)
- fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- glycin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, ČR)
- chemiluminiscenční kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate a West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorid draselný ($\geq 99\%$, Lachema, ČR)
- chlorid sodný (PENTA, Česká republika)
- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová ($\geq 98,5\%$ Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Lach-ner, ČR)
- leupeptin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)

- L-glutamin, pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, USA)
- marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Biowest, Francie)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- N,N'-metylenbisakrylamid ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin-streptomycin v 0,9% NaCl, pro buněčné kultury: 10 000 U/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxidisíran amonný ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Ponceau S (SERVA, Německo)
- propidium jodid (1 mg/ml) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan ($\geq 99\%$ Serva, Německo)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Roztoky

- Kultivační médium RPMI 1640 s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní dH₂O; doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 U/ml; streptomycin 100 µg/ml; 2 mM L-glutamin
- Kultivační médium DMEM s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní dH₂O; doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 U/ml; streptomycin 100 µg/ml; 2 mM L-glutamin
- Fosfátový pufr: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 6,4 mM Na₂HPO₄; v dH₂O, pH = 7,4
- Lyzační pufr RIPA: 150 mM NaCl; 1,0% (v/v) Nonidet NP40; v dH₂O, 0,5% deoxycholát sodný; v dH₂O; 0,1% SDS; v dH₂O; 50mM Tris-HCl; v dH₂O, pH = 8,0; pH = 7,5. Před použitím přidáno: 2 mM NaF; 1 mM PMSF; 1 mM Na₂VO₃; 1 mM DTT; 2 µg/ml aprotinin; 0,5 µg/ml leupeptin; v dH₂O
- Vzorkovací pufr (5x): 0,3 M Tris pH = 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) glycerol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkptoethanol
- Tris-HCl pH 6,8: 1 M Tris v dH₂O; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 6,8

- Tris-HCl pH 8,8: 1 M Tris v dH₂O; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- Tris-pufr: 20 mM Tris; 137 mM NaCl; v dH₂O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,6
- Tris-pufr s Tweenem: k TBS přídavek 0,05% (v/v) TWEEN 20
- Tris-glycinový elektrodový pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS (w/v); v dH₂O; pH = 8,3
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) H₃PO₄; v dH₂O
- Blotovací pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; v dH₂O
- Roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v dH₂O
- Roztok plazmidu pcDNA3 s inzercí genu pro ER α , koncentrace 1 μ g/ μ l v dH₂O (plazmid původně z Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA; požadovaný gen vpraven vědeckou skupinou doc. Romana Hrstky, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika)
- Roztok plazmidu pcDNA3 s inzercí genu pro FNC+RNC, koncentrace 1 μ g/ μ l v dH₂O (plazmid původně z Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA; požadovaný gen vpraven vědeckou skupinou doc. Romana Hrstky, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika)
- Transfekční pufr: 4 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 120 mM NaH₂PO₄; 10 mM HEPES; pH = 7,2; v dH₂O
- Reakční pufr pro AR reportérovou esej: 20 mM Tricin; 1,07 mM MgSO₄ · 7H₂O; 5 mM ATP; 9,4 μ M luciferin; pH = 7,4; v dH₂O
- FNC reakční pufr pro ER reportérovou esej: 0,1 M Tris; 15 mM MgSO₄; 4 mM EGTA; 1 mM ATP; 1 mM DTT; 0,2 mM luciferin; pH = 7,8; v dH₂O
- RNC reakční pufr pro ER reportérovou esej: 13,4 mM KH₂PO₄; 86,6 mM K₂HPO₄; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,4 μ M koelenterazin; pH = 7,6; v dH₂O
- Lyzační pufr pro reportérovou esej: 10 mM Tris; 2 mM DCTA; 1% nonidet P40; 2 mM DTT; pH = 7,4; v dH₂O
- Roztoky firmy Macherey-Nagel (Německo), sada NucleoBond® plasmid purification kit

- Buffer S1: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNázy A; v dH₂O, pH = 8,0
- Buffer S2: 200 mM NaOH; 1% SDS; v dH₂O
- Buffer S3: 2,8 M KAc; v dH₂O; pH = 5,1
- Buffer N2: 100 mM Tris; 15% ethanol; 900 mM KCl; 0,15% Trition X-100; v dH₂O, upraveno na pH = 6,3 pomocí H₃PO₄
- Buffer N3: 100 mM Tris; 15% ethanol; 1,15 M KCl; v dH₂O, upraveno na pH = 6,3 pomocí H₃PO₄
- Buffer N5: 100 mM Tris; 15% ethanol; 1 M KCl; v dH₂O; upraveno na pH = 8,5 pomocí H₃PO₄

3.1.3 Biologický materiál

- LAPC-4, buňky metastáze rakoviny prostaty v lymfatických uzlinách s běžnou variantou AR a expresí PSA (poskytnuto prof. Janem Bouchalem, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika).
- LNCaP, buňky metastáze rakoviny prostaty v lymfatických uzlinách s mutovanou formou AR (ECACC, Porton Down, Anglie).
- 22Rv1, epiteliální buňky rakoviny prostaty, které byly původně získány po implementaci do imunodeficientních myši (poskytnuto prof. Janem Bouchalem, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika).
- SKBR3, buňky rakoviny prsu bez exprese estrogenního receptoru alfa a se zvýšenou expresí Her2 (ECACC, Porton Down, Anglie).
- MCF-7, buňky rakoviny prsu se zvýšenou expresí estrogenního receptoru alfa (ECACC, Porton Down, Anglie).
- ARE14, buňky odvozené od buněčné linie 22Rv1 nesoucí gen pro firefly luciferázu, který je závislý na androgen response element (poskytnuto prof. Zdeňkem Dvořákem, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika) (Bartonkova a kol., 2015).
- *Escherichia coli* TOP10, kmen obsahující plazmidy nesoucí geny pro ERα a FNC+RNC (poskytnuto doc. Romanem Hrstkou, Masarykova univerzita, Česká republika)

3.1.4 Protilátky

Tab. 1 – Seznam použitých primárních protilátek s popisem cíle, zdrojem, výrobcem a ředěním.

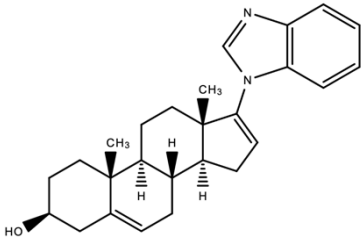
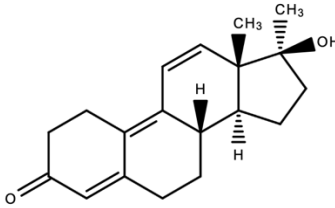
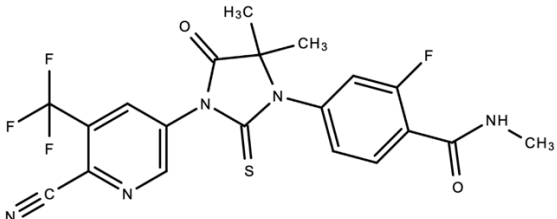
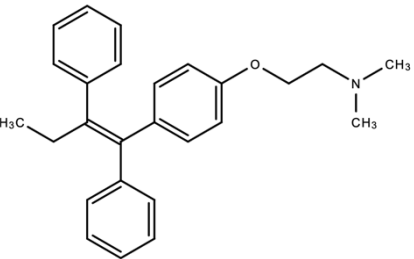
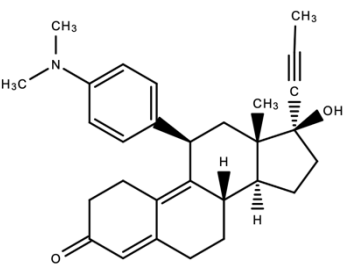
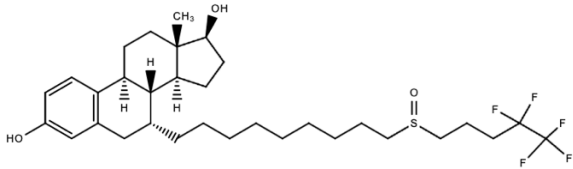
| Název cíle | Molekulární hmotnost (kDa) | Protilátka: kolon/zdroj | Výrobce | Ředění |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------|
| ER α | 65 | D6R2W/králíčí monoklonální | Cell Signaling (USA) | 1:500 |
| PR α/β | 90/120 | D8Q2J/králíčí monoklonální | Cell Signaling (USA) | 1:500 |
| luciferáza | 72-95 | králíčí monoklonální | Sigma-Aldrich (USA) | 1:1000 |
| AR | 110 | D6F11/králíčí monoklonální | Cell Signaling (USA) | 1:1000 |
| fAR (S81) | 110 | králíčí monoklonální | Merck (Německo) | 1:500 |
| GR | 95 | G5/myší monoklonální | Santa Cruz Biotechnology (USA) | 1:300 |
| Nkx3.1 | 34 | D2Y1A/králíčí monoklonální | Cell Signaling (USA) | 1:500 |
| PSA | 34 | D6B1/králíčí monoklonální | Cell Signaling (USA) | 1:250 |
| α -tubulin | 52 | DM1A/myší monoklonální | Merck (Německo) | 1:500 |
| β -aktin | 42 | C4/myší monoklonální | Santa Cruz Biotechnology (USA) | 1:1000 |

Tab. 2 – Seznam použitých sekundárních protilátek s popisem, výrobcem a ředěním

| Zkrácený název | Celý název | Popis | Výrobce | Ředění |
|----------------|----------------------|---|-----------------------|--------|
| SWAR | swine anti-rabbit Ig | HRP-konjugovaná prasečí Ig proti králíčí Ig | Cell Signalling (USA) | 1:1000 |
| RAM | rabbit anti-mouse Ig | HRP-konjugovaná králíčí Ig proti myší Ig | Cell Signalling (USA) | 1:1000 |

3.1.5 Testované látky a standardy

Tab. 3 – Seznam použitých standardů, včetně vzorce a výrobce.

| Název | Strukturní vzorec | Výrobce |
|-------------|--|----------------------|
| Galeteron |  | MedChemExpress (USA) |
| Metribolon |  | PerkinElmer (USA) |
| Enzalutamid |  | MedChemExpress (USA) |
| Tamoxifen |  | MedChemExpress (USA) |
| Mifepriston |  | Merck (Německo) |
| Fulvestrant |  | Merck (Německo) |

Studovanými sloučeninami (označené KEB kódy 7707 až 7726 a 8867 až 8877) byly deriváty galeteronu (17-(1*H*-Benzimidazol-1-yl)androsta-5,16-dien-3 β -ol), které byly poskytnuty prof. Zhabinskiim z Institutu bioorganické chemie, Národní akademie věd Běloruska.

3.1.6 Přístrojové vybavení

Použité přístroje:

- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- centrifuga ROTINA 420/420 R (HETTICH, Německo)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN, Německo)
- laminární box OS-N (Merci, Česká republika)
- laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- minicentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- souprava pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Amaxa Cell Line Nucleofector (Lonza Cologne AG, Cologne, Německo)

- Tecan M200 Pro (Biotek, Winooski, USA)
- Nanodrop: Spectrophotometer/Fluorometer DS-11 Series (DeNovix, USA)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Dále bylo použito spotřební laboratorní zboží:

- sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika)
- sterilní Petriho misky průměru 10 cm a 5 cm (TPP, Švýcarsko)
- mikrozkušavky 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Německo)
- nitroceluloseová membrána pro western blot (Bio-Rad, USA)
- Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)
- Transfekční kyvety (Carl Roth, Německo)

Dále bylo použito běžné laboratorní vybavení: kádinky, skleněné tyčinky, odměrné válce, lžičky, váženky, špičky, zkumavky, stříčky, stojany na zkumavky a mikrozkušavky, skalpely, pinzety apod.

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace buněk

Kultivace buněk byla prováděna ve sterilních Petriho miskách o průměru 50 mm, respektive 100 mm. Petriho misky s buňkami byly umístěny v inkubátorech při teplotě 37 °C, 100% vlhkosti vzduchu a v atmosféře s 5% oxidem uhličitým. Pro buněčnou linii SKBR3, LAPC-4 a MCF-7 bylo použito médium DMEM, pro buněčnou linii LNCaP, 22Rv11 a ARE14 bylo použito médium RPMI.

Pravidelně, avšak minimálně jednou za tři dny, byly buněčné linie pasážovány. Použité buněčné linie patřily mezi prostatické nebo prsní karcinomy, jednalo se tedy o adherentní buňky. Pasážování probíhalo v laminárním boxu ve sterilním prostředí. Nejprve bylo odstraněno médium a následně bylo přidán roztok EDTA. Po minutové inkubaci za laboratorní teploty byl roztok EDTA odstraněn a do Petriho misky byl přidán roztok trypsinu s EDTA. Následně byly buňky umístěny do inkubátoru na 5 minut. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno médium a suspenze buněk byla přenesena do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut při 1000 rpm za laboratorní teploty. Po centrifugaci došlo k odstranění supernatantu a pelet buněk byl

v centrifugační zkumavce rozsuspendován v čerstvém médiu o požadovaném objemu, který byl určen na základě počtu buněk, respektive velikosti peletu. Dle počtu buněk byl z této suspenze odebrán určitý objem do nové sterilní Petriho misky a následně byl tento objem doplněn čistým sterilním médiem do konečného objemu 10 nebo 5 ml podle velikosti Petriho misky.

3.2.2 Příprava a ovlivnění buněk pro imunodetekci

Před každou manipulací s buňkami a po každém vytažení buněk z inkubátoru byla Petriho miska pozorována pod mikroskopem, kde se zkoumal počet a morfologie buněk. Následující proces byl prováděn v laminárním boxu. Stejně jako při pasážování buněk, byly buňky přeneseny do centrifugační zkumavky za pomoci trypsinu a EDTA pro jejich uvolnění do média. Centrifugační zkumavka byla umístěna do centrifugy a centrifugována 5 minut při laboratorní teplotě při 1000 rpm. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu buněk byl přidán přesný objem média. Objem média závisel na velikosti peletu, respektive na počtu buněk v původních koloniích a na požadavcích experimentu. Pomocí pipety byly buňky rozsuspendovány a ze vzniklé suspenze bylo sterilně odebráno 10 μ l a napipetováno do Bürkerovy komůrky. Na základě pozorování pod mikroskopem byly spočítány buňky a vypočten výsledný počet buněk v suspenzi. Suspenze buněk byla následně naředěna čerstvým médiem do požadované koncentrace buněk. V případě experimentů v médiu se stripovaným sérem byly buňky před ovlivněním kultivovány 24 hodin v tomto médiu. Pro imunodetekci byla použita koncentrace 2 000 000 buněk na 5 ml. Takto připravené buněčné linie byly přemístěny do inkubátoru.

Inhibiční látky byly naředěny v DMSO na požadované koncentrace. Buněčné linie v Petriho miskách byly ovlivněny danou látkou v laminárním boxu a bylo dbáno na rovnoměrnou distribuci látky v médiu s buňkami. Takto ovlivněné buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem a na požadovanou dobu umístěny do inkubátoru.

3.2.3 Sklizení a lýze buněk

Po uplynutí požadované doby ovlivnění byly suspenze buněk přeneseny do zkumavek. Pomocí plastové škrabky byly buňky uvolněny do média a následně přeneseny do zkumavek. Petriho miska byla následně ještě promyta PBS. Zkumavky s buňkami byly centrifugovány 8 minut při 4 °C a 1000 g. Po centrifugaci došlo k odstranění

supernatantu, pelety byly promyty a rozsuspendovány ve 2 ml PBS. Po promytí byla suspenze buněk v PBS opět centrifugována za stejných podmínek. Po odsání PBS po centrifugaci byl pelet rozsuspendován ve 2 ml PBS a suspenze byla přenesena do mikrozkušavek, které byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Poté bylo PBS odstraněno a mikrozkušavky s peletem buněk uskladněny při -80 °C.

Lyzace buněk byla prováděna na ledu. Byl připraven chlazený lyzační pufr RIPA o objemu 20-50 μ l pro jeden vzorek, kdy objem závisel na množství peletu buněk. Po přidání určitého objemu pufru do mikrozkušavek byl pelet rozsuspendován a mikrozkušavky byly pravidelně promíchávány na vortexu. Takto byly mikrozkušavky pravidelně promíchávány cca co 10 minut po dobu 30 minut. Následně byly buňky v mikrozkušavkách umístěny do sonikátoru a sonikovány po dobu 10 sekund při 40% intenzitě přístroje. Po sonikaci byly mikrozkušavky centrifugovány 30 minut při 4 °C a 14 000 g. Po centrifugaci byl supernatant přenesen do nových mikrozkušavek s tím, že přesný objem supernatantu byl zaznamenán.

K určení koncentrace proteinů v odebraném supernatantu byla použita Bradfordova metoda (Bradford, 1976). Ze vzorku byl odebrán 1 μ l vzorku a přenesen do zkumavky s 1 ml Bradfordova činidla. Roztok vzorku s činidlem byl promíchán na vortexu a ponechán inkubaci po 10 minut při laboratorní teplotě. Objem zkumavky byl přenesen do křemenné kyvety a byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Takto byl měřen každý vzorek dvakrát a výsledná hodnota koncentrace byla průměrem obou měření. Na základě zjištěných koncentrací byly vzorky naředěny RIPA pufrům k dosažení nejnižší naměřené koncentrace u všech vzorků. Poté byl ke vzorkům přidán denaturační vzorkovací pufr (5x). Objem denaturačního pufru odpovídal $\frac{1}{4}$ objemu vzorku. Mikrozkušavky byly promíchány na vortexu a 5 minut zahřívány v termobloku na 95 °C. Vzorky byly uloženy ve -20 °C.

3.2.4 Polyakrylamidová elektroforéza a Western blot

Separace proteinů ve vzorcích proběhla pomocí SDS-PAGE polyakrylamidové diskontinuální elektroforézy dle Laemmliho (1970). Použité gely byly o tloušťce 10 mm. Byla použita kombinace separačního gelu (10%) a zaostřovacího gelu (5%). Gely byly připraveny z roztoků dle tab. 4.

Do zkumavek byly přidány všechny složky roztoku na přípravu separačního gelu bez APS, který byl přidán jako poslední, jelikož jeho přidáním započala polymerace.

Jakmile byla směs kompletní, byla směs napipetována mezi skleněné desky určené k elektroforéze. Roztok separačního gelu byl napipetován cca 5 cm pod horní hranu skla. Následně došlo k převrstvení roztoku mezi skly pár kapkami vody k zarovnání gelu a odstranění vzduchových bublin. Směs mezi skly byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu cca 30 minut do úplného zatuhnutí separačního gelu. Po zatuhnutí byla odstraněna voda, která tvořila horní vrstvu nad gelem. Následně byl připraven roztok zaostřovacího gelu dle tab. 4. Opět i zde byl APS přidán jako poslední složka k zahájení polymerace. Jakmile byla směs kompletní, byla napipetována nad ztuhlý separační gel mezi elektroforetická skla až po okraj. Ihned po napipetování byl mezi skla, do zaostřovacího gelu, zasunut plastový hřeben, který vytvořil jednotlivé komory pro vzorky. Směs zaostřovacího gelu byla ponechána 30 minut při laboratorní teplotě k úplnému ztuhnutí. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byly skleněné desky s gelem vloženy do elektroforetické komory, případně umístěny do sáčku s malým množstvím destilované vody do 4 °C pro budoucí použití. Maximální stáří gelu pro budoucí použití bylo 5 dní.

Tab. 4 – Složení roztoků na přípravu dvou 10 mm silných gelů

| Složka | Separací gel (10%) | Zaostřovací gel (5%) |
|------------------|--------------------|----------------------|
| AA/BIS | 3,13 ml | 0,84 ml |
| Destilovaná voda | 2,67 ml | 3,51 ml |
| Tris pH 8,8 | 3,50 ml | - |
| Tris pH 6,8 | - | 0,63 ml |
| SDS (10%) | 94,00 µl | 50,00 µl |
| TEMED | 6,25 µl | 5,00 µl |
| APS (10%) | 37,50 µl | 30,00 µl |

Elektroforetické komory s elektroforetickými skly s gely byly vloženy do elektroforetické vany. Do komor i vany byl nalit Tris-glycinový elektrodový pufr. Po zalití pufrům byl odstraněn plastový hřeben ze zaostřovacího gelu. Mezitím byly vzorky proteinů vyjmuty z mrazu a ponechány v laboratorní teplotě k rozmražení. Poté byly vzorky vloženy do termobloku, který byl nastaven na 95 °C a byly zahřívány po dobu cca 2 minut. Do vzniklých jamek v zaostřovacím gelu byl nanesen objem vzorků

tak, aby konečná koncentrace celkových proteinů v jamce byla 50 µg. Do jedné z jamek byl nanesen marker molekulových hmotností o objemu 3 µl. Vana byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí. Napětí bylo nejprve nastaveno na 80 V, jakmile vzorky dosáhly hranice separačního gelu, bylo napětí nastaveno na 120 V. Po dostatečném separování jednotlivých proteinů byla elektroforetická sestava odpojena od napětí a skleněné desky s gely vyjmuty.

Po rozpojení skleněné desky byl odstraněn zaostřovací gel. Do připravené vany s blotovacím pufrem byly umístěna blotovací souprava. Do blotovací soupravy byl vložen separační gel spolu s nitroceluloseovou membránou, a to mezi dvojice filtračních papírů. Blotovací souprava s gelem a membránou byla přenesena do blotovací komory v blotovací vaně. Do vany byl nalit blotovací pufr. Pro udržení nízké teploty byla do blotovací vany umístěna nádoba s ledem a elektromagnetické míchátko. Nádoba byla uzavřena víkem, přemístěna na elektromagnetickou míchačku a zapojena do zdroje napětí, čímž probíhal přenos proteinů metodou Western blot. Hodnota proudu byla nastavena na 280 mA. Celkový proces trval 3 hodiny, během této doby byl led pravidelně měněn tak, aby blotovací souprava byla neustále chlazená.

Poté byla souprava odpojena od zdroje napětí a nitroceluloseová membrána byla přenesena do roztoku Ponceau S na dobu 5 minut pro vizualizaci proteinů. Membrána byla poté promyta v destilované vodě a vysušena na čistém filtračním papíru za laboratorní teploty.

3.2.5 Imunodetekce proteinů

Na základě výběru proteinů byly z nitroceluloseové membrány pomocí skalpelu vyřezány části obsahující vybrané proteiny. K jejich identifikaci na membráně posloužil marker molekulové hmotnosti. Vyřezané části byly pro vlastní potřebu označeny a přeneseny do 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Membrány v roztoku BSA nebo mléku byly umístěny na kývačku a tzv. blokovány proti nespecifickým vazbám protilátek po dobu 1 hodiny.

Po blokování byly membrány vysušeny na čistém filtračním papíře. Následně byly přemístěny na plastovou podložku potaženou parafilmem, která byla umístěna do vany s malou vrstvou destilované vody. Na membrány byl nanesen roztok primární protilátky naředěný ve 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Typ primární protilátky závisel na detekovaném proteinu. Vana s membránami byla

přikryta víkem a umístěna do 4 °C k inkubaci přes noc. Po inkubaci byly membrány promývány na kývačce. Nejprve 5 minut v TBS, poté 5 minut v TBS-T, poté 5 minut v TBS a nakonec 10 minut v TBS. Po každém kroku byl roztok TBS (TBS-T) vyměněn za nový. Membrány byly poté opět přeneseny na plastovou podložku s parafilmem ve vaně s vrstvou destilované vody. Na membrány byl nanesen roztok sekundární protilátky, který byl opět naředěn ve 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Sekundární protilátka byla vybrána na základě specifčnosti k protilátce primární. Následně byla vana uzavřena víkem a membrány se inkubovaly po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Po inkubaci byly membrány promývány na kývačce k odstranění nespecificky navázaných protilátek. Nejprve 10 minut v TBS, poté 5 minut v TBS-T, následně 5 minut v TBS a nakonec 10 minut v TBS. Po každém kroku byl roztok TBS (TBS-T) vyměněn za nový.

Membrány byly vysušeny na čistém filtračním papíru a přeneseny na suchou plastovou podložku s parafilmem a převrstveny chemiluminiscenčním roztokem West Pico s detekčním limitem okolo 1 pg. Membrány byly inkubovány 5 minut a následně byla podložka s membránami přesunuta do detekčního systému, kde byl zaznamenán chemiluminiscenční signál v podobě fotografie. V případě, že signál nebyl dostatečně silný, byly membrány promyty 5 minut v TBS a následně byl na ně nanesen chemiluminiscenční roztok West Femto s detekčním limitem v rámci desítek fg. Získaný záznam byl zpracován v programu Multi Gauge 2.2 (Fujifilm, Japonsko).

3.2.6 Izolace a purifikace plazmidů

Izolace a purifikace plazmidů byla provedena pomocí komerční sady firmy Macherey-Nagel, Německo, z buněčné kultury kmene *E. coli* TOP10. Po sklizení bakterií byly buňky rozsuspendovány ve 4 ml komerčního Buffer S1. Následně byly přidány 4 ml Buffer S2 a zkumavka byla cca 8x promíchána jemným překlápěním. Takto upravená suspenze buněk byla ponechána k 3minutové inkubaci za laboratorní teploty. Po inkubaci byly přidány 4 ml Buffer S3 vychlazeného na 4 °C. Opět došlo k jemnému promíchání překlápěním. Tato suspenze byla ponechána k 5minutové inkubaci na ledu.

Následně byla provedena samotná izolace plazmidů pomocí komerční kolony. Nejprve došlo ke kalibraci kolony pomocí 2,5 ml Buffer N2, který byl napipetován do kolony a ponechán k volnému protečení. Připravený lyzát buněk byl přefiltrován skrze komerčně dodaný filtrační papír, který byl smočen pár kapkami Buffer N2. Filtrát byl

následně nanesen na kalibrovanou kolonu a ponechán k volnému protečení. Následně byla kolona pomyta 10 ml Buffer N3 a k eluci bylo následně použito 5 ml Buffer N5.

K precipitaci plazmidů bylo nejprve použito 3,5 ml isopropanolu. Směs byla jemně promíchána a následně centrifugována na 15 000 g po dobu 30 minut při 4 °C. Supernatant byl poté odstraněn. K promytí DNA peletu byly použity 2 ml 70% ethanolu o laboratorní teplotě. Směs byla krátce promíchána a opět centrifugována na 15 000 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odstraněn ethanol a pelet byl ponechán k vyschnutí po dobu maximálně 10 minut při laboratorní teplotě. Vysušený DNA pelet byl rozpuštěn ve 100 µl sterilní deionizované vody a koncentrace plazmidu byla změřena na nanodropu. Výsledná koncentrace byla srovnána na koncentraci 1 µg/µl v dH₂O. Roztoky plazmidů byly uchovány v mrazáku při -20 °C.

3.2.7 Transfekce plazmidů do buněčné linie

Prvotní postup pro přípravu buněk na transfekci je obdobný jako pro imunodetekci. Na transfekci bylo použito médium bez antibiotik, v případě linie SKBR3 se jednalo o 10% DMEM. Na Western blot bylo nasazeno 2 milióny buněk v 5 ml média, na reportérovou ER esej to bylo 40 000 buněk na jednu jamku 96jamkové desky. Buňky byly napočítány obdobně, jako při přípravě buněk na imunodetekci. Zkumavka s celkovým počtem buněk pro daný experiment byla centrifugována 5 minut při laboratorní teplotě a při 1000 rpm. Následně byl odsán supernatant a bylo přidáno 100 µl transfekčního pufru, ve kterém byly buňky rozsuspendovány. K suspenzi buněk v transfekčním pufru byly přidány roztoky s plazmidy. Množství izolovaného plazmidu záleželo na experimentu. Pro reportérovou esej bylo použito 1 µg plazmidu na 2 milióny buněk. Celá suspenze byla převedena do transfekční kyvety, která byla následně umístěna do nukleofektoru, ve kterém byl zvolen program určený pro transfekci plazmidů do buněčné linie SKBR3. Po samotné transfekci byly buňky přeneseny v transfekčním pufru do 5 ml kultivačního média v 60 mm Petriho misce. Pro reportérovou esej byly buňky nejprve přeneseny do zkumavky s médiem, kde výsledná koncentrace buněk odpovídala 40 000 buněk na jamku 96jamkové desky.

3.2.8 Reportérová esej pro ER

Transfekované buňky byly naneseny do 96jamkové desky v počtu 40 000 buněk na jednu jamku ve 100 μ l 10% CSS DMEM média bez antibiotik a ponechány ke 24hodinové inkubaci v inkubátoru. Po inkubaci byly do horních jamek s buňkami přidány vybrané testované látky o konečné koncentraci 50 μ M. Následně byly metodou postupného ředění ovlivněny i buňky v ostatních jamkách na konečné koncentrace 10 a 2 μ M. Obdobně byly ovlivněny buňky také standardem tamoxifenem. Estradiolem byly ovlivněny buňky v celém jednom sloupci o konečné koncentraci 4 nM ve 100 μ l média. V případě antagonistického módu bylo přidáno také E2 (finální koncentrace 4 nM) do každé jamky s látkou, pro agonistický mód bylo médium v jamkách s látkou bez E2. Okrajové jamky desky se nechávaly prázdné, respektive do nich byla přidána sterilní voda. Takto ovlivněné buňky byly ponechány k inkubaci přes noc v inkubátoru.

Po inkubaci bylo odsáto médium a do každé jamky s buňkami bylo přidáno 50 ml PBS k promytí. Následně byl k buňkám přidán lyzační pufr pro reportérovou esej (25 μ l na jamku). Lyzace probíhala 10 minut v inkubátoru. Po lyzaci byl do každé jamky přidán FNC reakční pufr pro ER reportérovou esej (100 μ l na jamku). Po krátkém promíchání byla deska okamžitě měřena na přístroji Infinite M1000 Pro, filtr GREEN1 (560 nm), integrační čas 10 000 ms, zpoždění 500 ms.

Následně byl do každé jamky s buňkami přidán 300mM roztok EDTA v objemu 25 μ l pro zastavení reakce. Po zastavení reakce byl do každé jamky přidán RNC reakční pufr pro ER reportérovou esej (100 μ l na jamku). Po krátkém promíchání byla deska okamžitě měřena na přístroji Tecan M200 Pro, filtr BLUE (480 nm), integrační čas 10 000 ms, zpoždění 500 ms.

3.2.9 Reportérová esej pro AR

Pro AR reportérovou esej byly použity buňky ARE14, původně kultivované v 10% RPMI médiu. Po spočtení buněk a naředení na požadovaný objem (obdobně jako při přípravě na imunodetekci) byly buňky sázeny do 96jamkové desky tak, aby v každé měřené jamce bylo 40 000 buněk ve 100 μ l média. Okrajové jamky desky se nechávaly prázdné, respektive do nich byla přidána sterilní voda. Buňky se ponechaly k inkubaci přes noc v inkubátoru.

Po inkubaci bylo z jamek odsáto médium a přidáno 100 ml PBS k propláchnutí. Následně bylo PBS odsáto a do jamek přidáno nové CSS médium. Poté byly do horních jamek s buňkami přidány vybrané testované látky o konečné koncentraci 50 μ M. Následně byly metodou postupného ředění ovlivněny i buňky v ostatních jamkách na konečné koncentrace 10 a 2 μ M. V případě antagonistického módu bylo přidáno také R1881 (finální koncentrace 1 nM) do každé jamky, pro agonistický mód bylo médium bez R1881. Takto ovlivněné buňky se ponechaly k inkubaci přes noc v inkubátoru.

Další den bylo odsáto médium a buňky opět propláchnuty 100 ml PBS. Následně byl přidán lyzační pufr pro reportérovou esej (50 μ l na jamku). Lyzace probíhala 10 minut v inkubátoru. Po lyzaci byl do jamek přidán reakční pufr pro AR reportérovou esej (100 μ l na jamku) a deska byla jemně promíchána. Okamžitě po promíchání byla měřena luminiscence na přístroji Tecan M200 Pro.

3.2.10 Analýza buněčného cyklus průtokovým cytometrem

Buňky na analýzu buněčného cyklu byly nasazeny do 96jamkové desky. K analýze byly použity buňky LNCaP. Počet buněk na jamku byl 10 000 ve 100 μ l média. Buňky v horních jamkách byly ovlivněny vybranými látkami o konečné koncentraci 50 μ M. Následně byly metodou postupného ředění ovlivněny i buňky v ostatních jamkách na konečné koncentrace 25; 12,5; 6,25 a 3,125 μ M. Po ovlivnění byly buňky ponechány k inkubaci po dobu 48 hodin v inkubátoru. Okrajové jamky desky se nechávaly prázdné, respektive do nich byla přidána sterilní voda.

Po inkubaci bylo odsáto médium z jamek s buňkami. Bylo přidáno 25 μ l tripsinu a ponecháno k cca minutové inkubaci v inkubátoru. Po tripsinizaci bylo přidáno 175 μ l média do každé jamky s buňkami a každá jamka byla důkladně promíchána. Stranou byl připraven 5x koncentrovaný permeabilizační roztok s 20x propidium jodidem (v celkovém objemu odpovídajícím 50 μ l na jamku). Následně byl tento roztok přidán do média v jamkách, čímž došlo k jeho ředění na 1x koncentrovaný. Takto připravené jamky bylo možné měřit na průtokovém cytometru.

Samotná analýza byla provedena na průtokovém cytometru. Pro dosažení analýzy obsahu jaderné DNA, a s tím spojené rozdělení buněk dle zastoupení v různých fázích buněčného cyklu, byl využit excitační laser o vlnové délce 488 nm. Výsledky,

histogramy, byly analyzovány softwarem ModFit LT 5.0 (Verity Software house, USA). Průměrné hodnoty byly poté zpracovány ve formě grafu, který značil procentuální zastoupení buněk v různých fázích buněčného cyklu. Zvlášť byl v grafu zaznamenán podíl fragmentů buněk označený jako „debris“.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část práce byla prováděna na Katedře experimentální biologie na Univerzitě Palackého v Olomouci v rámci dlouhodobého zkoumání látek ovlivňující transkripční aktivitu androgenního receptoru ve vztahu k rakovině prostaty. V rámci experimentální činnosti nejen na této práci byly publikovány také 3 vědecké články týkající se rakoviny prostaty a její léčby skrze potlačení aktivity androgenního receptoru (Rudovich a kol., 2022; Peřina a kol., 2023a; Peřina a kol., 2023b).

Tato diplomová práce se zaměřuje na nové steroidní sloučeniny a jejich vliv na jaderné receptory s důrazem na androgenní receptor u rakoviny prostaty. K porovnání byly studovány také steroidní sloučeniny starší série. Studován byl vliv na transkripční aktivitu samotného AR (a jeho fosforylace na S81), ale i dalších jaderných receptorů, jakými jsou ER, GR, PR, a AR podřazené proteiny, jakými jsou PSA a Nkx3.1. K podrobnější analýze byly využity dvě reportérové eseje, jež měly objasnit agonistický či antagonistický charakter studovaných látek. K provedení reportérové eseje pro estrogení receptor bylo nejdříve nutné izolovat a purifikovat potřebné plazmidy a následně optimalizovat transfekci do buněk SKBR3. V neposlední řadě byl proveden experiment na průtokovém cytometru, jehož cílem byla studie vlivu testovaných látek na podíl buněk v různých fázích buněčného cyklu.

4.1 Transkripční aktivita AR po ovlivnění studovanými látkami

Reportérová esej pro AR je zavedenou metodou na Katedře experimentální biologie. Byla použita pro zjištění agonistického nebo antagonistického charakteru studovaných látek vůči AR. Výsledkem této eseje je signál luciferázy normalizován na kontrolní vzorek s přídávkem 1 nM R1881 (100 %). Luciferáza je svou aktivitou závislá na AR, čímž tento signál dopovídá transkripční aktivitě AR (udáváno v %). Výsledky reportérové eseje lze pozorovat v tab. 5.

V případě agonistického módu nebyl prokázán významný agonistický charakter u žádné ze studovaných látek. Transkripční aktivita kontrolního vzorku CSS byla na 16,2 % signálu vzorku s R1881. Pouze u vzorků s látkami 7710, 8867 a 8870 byla míra transkripční aktivity AR na více jak 20 % signálu kontrolního vzorku s R1881. U žádné látky však nepřesáhla tato hodnota 30 %. U výše zmíněných látek byla také pozorována zvyšující se transkripční aktivita AR v závislosti na koncentraci, což nelze

pozorovat u zbytku studovaných látek, kde transkripční aktivita AR klesala se zvyšující se koncentrací použité látky. Výjimku tvoří látky 8869 a 7724, u kterých se transkripční aktivita takřka neměnila v závislosti na koncentraci, respektive se změna pohybovala v mezích statistické chyby.

Závěrem lze konstatovat, že žádná ze studovaných látek se neprojevila jako agonista AR, avšak u látek 7710, 8867 a 8870 lze pozorovat jistý agonistický potenciál, který ovšem ani zdaleka nedosahuje agonistického charakteru R1881, ovšem transkripční aktivita AR roste u těchto látek se zvyšující se koncentrací. V rámci látek z nové série, tedy v tomto případě látek 8867 a 8870, lze výsledky z reportérové eseje porovnat s výsledky imunodetekce v následujících kapitolách. Již prvotní experimenty (obr. 15) naznačovaly částečný agonistický charakter látky 8870 skrze zvýšenou hladinu proteinu Nkx3.1. U látky 8867 byl naopak pozorován vliv na pokles hladiny AR a podřízených proteinů PSA a Nkx3.1 u experimentu v CSS médiu (obr. 16), což naznačovalo antagonistický charakter této látky. Tato skutečnost tedy s největší pravděpodobností vylučuje, byť jen částečný agonistický charakter látky 8867.

Výsledky agonistického módu lze také porovnat s výsledky vlivu galeteronu na transkripční aktivitu AR, které byly publikovány ve studii Rudovich a kol. (2022). V agonistickém módu byl měřen vzorek galeteronu v koncentracích 2, 10 a 50 μM , tedy při stejných koncentracích jako byly koncentrace látek v této práci, a stejně tak byla použita stejná metodika včetně normalizace signálu na kontrolní vzorek s R1881. Výsledky transkripční aktivity galeteronu vůči vzorku s R1881 byly v této studii (v agonistickém módu) 15,4 % pro 2 μM , 10,8 % pro 10 μM a 2,4 % pro 50 μM . Nejpodobnější výsledky v rámci reportérové eseje v této diplomové práci byly pozorovány u látky 7717. U látek z nové série byl jejich vliv na transkripční aktivitu AR vyšší než u galeteronu ze studie Rudovich a kol. (2022) s tím, že nejpodobnější hodnoty vykazovala látka 8868, u které při nejvyšší koncentraci byla hodnota transkripční aktivity AR rovna 7,7 % oproti signálu kontrolního vzorku s R1881.

V antagonistickém módu byl nejvýraznější antagonistický charakter pozorován u látky 7717, kdy transkripční aktivita AR klesla na 6,7 % oproti kontrole s 1 nM R1881 při koncentraci látky 50 μM . Významný pokles transkripční aktivity pod 30 % byl pozorován také u látek 7708, 7715, 7716 ze starší série a u látky 8868 z nové série, vše při koncentraci 50 μM . Oproti agonistickému módu, kde žádná látka nevykazovala

agonistický charakter, je v antagonistickém módu možné dobře pozorovat koncentrační závislost. Výše zmíněné látky s největším poklesem transkripční aktivity AR vykazují tento antagonistický charakter při nejvyšší koncentraci, tedy 50 μM , kdy je pozorován výrazný pokles transkripční aktivity mezi 10 a 50 μM , který je nejpatrnější u látek 7708, 7717 a 8868. Látky, u kterých se neprokázal antagonistický charakter vykazovaly často vyšší hodnoty transkripční aktivity AR v agonistickém módu. Zejména látka 7710, která patřila mezi látky s největším agonistickým potenciálem, zvýšila transkripční aktivitu AR v antagonistickém módu na 178,4 % při koncentraci 50 μM . Hodnoty nad 100 % vůči kontrole s R1881 vykazovala tato látka při všech použitých koncentracích. Nejvyšší transkripční aktivitu AR vůči kontrole s R1881 bylo možné naměřit u látky 7720 a sice 196,5 % při koncentraci 50 μM . Z nové série se vedle látky 8868 prokázal výrazný antagonistický charakter také u látky 8874. Na zhruba poloviční hodnoty vůči R1881 klesla transkripční aktivita AR u látky 8872 z nové série při koncentraci 50 μM .

Vědecká skupina Rudovich a kol. (2022) využila reportérovou esej pro studované látky včetně galeteronu také v antagonistickém módu. Zde galeteron snížil transkripční aktivitu AR na 65,2 % při 2 μM , 35,1 % při 10 μM a na 3,0 % při 50 μM ve srovnání s kontrolním vzorkem s R1881. Takto silné antagonistické aktivity nedosáhly žádné zkoumané látky z nové série a ve starší sérii byla nejbližší výše zmíněná látka 7717, která při 50 μM snížila transkripční aktivitu AR na 6,7 % kontroly s R1881.

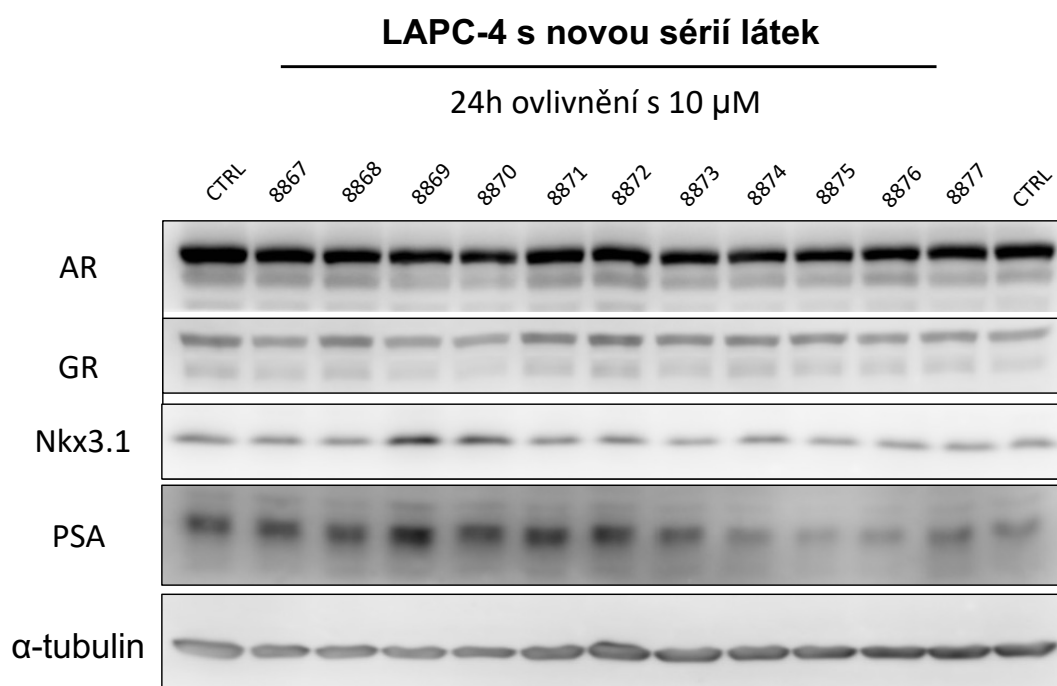
Studie Rudovich a kol. (2022) testovala také látky 8868, 8872 a 8874, které vykazovaly takřka totožné výsledky s touto diplomovou prací, a to jak v antagonistickém, tak agonistickém módu. Bylo potvrzeno, že ani jedna z testovaných látek nevykazuje agonistický charakter vůči AR. V antagonistickém módu byl naopak potvrzen středně silný antagonistický charakter látek 8868, 8872 a 8874. V této studii je látka 8868 označena jako „24j“, látka 8872 jako „41a“ a látka 8874 jako „32“.

Tab. 5 – Transkripční aktivita AR (v % ± SD) u buněčné linie ARE14 vůči CSS kontrole. Měření probíhalo za přítomnosti dané látky a v případě antagonistického módu také v přítomnosti 1 nM R1881. Signál by normalizován na vzorek s 1 nM R1881 = 100 %. Měřeno v duplikátu a pro každou látku minimálně ještě 1x opakováno. Signifikantní hodnoty jsou zvýrazněny. CSS značí kontrolu bez přidání R1881.

| Transkripční aktivita AR (%) | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Látka | Antagonistický mód | | | Agonistický mód | | |
| | 50 µM | 10 µM | 2 µM | 50 µM | 10 µM | 2 µM |
| 7709 | 31,5 ± 1,6 | 72,6 ± 3,3 | 104,1 ± 3,9 | 8,3 ± 0,8 | 14,5 ± 0,9 | 16,9 ± 1,8 |
| 7710 | 178,4 ± 7,5 | 141,7 ± 8,2 | 134,7 ± 7,6 | 27,2 ± 3,5 | 22,1 ± 0,4 | 20,7 ± 2,0 |
| 7711 | 133,3 ± 4,5 | 122,2 ± 5,0 | 132,3 ± 7,4 | 17,6 ± 0,9 | 19,7 ± 1,5 | 22,7 ± 2,7 |
| 7712 | 140,6 ± 1,3 | 120,2 ± 12,2 | 129,3 ± 3,1 | 10,3 ± 2,2 | 16,3 ± 1,3 | 20,8 ± 0,9 |
| 7713 | 135,8 ± 7,2 | 113,6 ± 11,6 | 122,7 ± 7,0 | 10,3 ± 0,2 | 16,3 ± 0,3 | 20,8 ± 2,0 |
| 7714 | 29,7 ± 0,2 | 109,4 ± 0,2 | 119,2 ± 3,2 | 6,5 ± 3,1 | 16,6 ± 1,5 | 20,4 ± 2,1 |
| 7715 | 12,0 ± 0,2 | 53,5 ± 1,4 | 96,1 ± 3,3 | 4,2 ± 0,1 | 14,6 ± 1,0 | 17,3 ± 2,5 |
| 7716 | 26,0 ± 2,7 | 68,4 ± 3,0 | 105,9 ± 2,4 | 6,4 ± 2,2 | 16,1 ± 2,6 | 17,2 ± 3,2 |
| 7717 | 6,7 ± 0,2 | 56,9 ± 0,8 | 108,3 ± 2,8 | 3,7 ± 1,5 | 13,2 ± 1,4 | 18,7 ± 1,5 |
| 7718 | 71,3 ± 5,0 | 128,9 ± 6,0 | 156,4 ± 2,5 | 10,8 ± 1,0 | 16,9 ± 1,1 | 20,7 ± 0,3 |
| 7719 | 95,3 ± 3,6 | 121,3 ± 4,6 | 142,7 ± 1,8 | 11,8 ± 1,4 | 18,7 ± 0,1 | 21,2 ± 1,9 |
| 7720 | 196,5 ± 2,2 | 174,6 ± 6,1 | 163,3 ± 4,8 | 19,2 ± 1,9 | 24,8 ± 2,2 | 20,7 ± 1,4 |
| 7721 | 37,0 ± 4,4 | 119,2 ± 10,1 | 112,9 ± 0,8 | 10,1 ± 1,3 | 15,3 ± 0,3 | 15,4 ± 0,5 |
| 7722 | 59,1 ± 3,5 | 92,5 ± 4,9 | 101,1 ± 0,2 | 7,9 ± 1,1 | 12,1 ± 0,1 | 15,3 ± 1,4 |
| 7723 | 130,2 ± 37,4 | 80,0 ± 5,8 | 82,5 ± 13,8 | 14,6 ± 0,9 | 16,4 ± 0,8 | 16,4 ± 1,0 |
| 7724 | 136,6 ± 14,9 | 110,3 ± 5,0 | 108,0 ± 18,4 | 15,6 ± 1,2 | 14,3 ± 0,8 | 15,6 ± 0,6 |
| 7725 | 143,9 ± 2,9 | 140,2 ± 2,1 | 121,7 ± 13,3 | 8,8 ± 0,4 | 15,0 ± 1,3 | 15,8 ± 1,0 |
| 7726 | 51,0 ± 1,2 | 121,5 ± 7,0 | 109,4 ± 41,8 | 11,1 ± 0,6 | 16,9 ± 0,9 | 16,8 ± 0,6 |
| 8867 | 140,3 ± 6,8 | 124,0 ± 4,4 | 108,1 ± 8,5 | 28,4 ± 4,3 | 22,1 ± 1,9 | 19,0 ± 0,8 |
| 8868 | 27,2 ± 0,2 | 82,0 ± 7,6 | 99,2 ± 8,6 | 7,7 ± 0,3 | 13,4 ± 1,3 | 17,4 ± 1,3 |
| 8869 | 95,3 ± 3,2 | 111,7 ± 14,2 | 108,8 ± 4,0 | 18,2 ± 0,9 | 21,2 ± 1,9 | 17,8 ± 1,5 |
| 8870 | 109,1 ± 6,2 | 112,4 ± 6,4 | 112,9 ± 3,0 | 28,6 ± 3,9 | 25,1 ± 2,2 | 20,2 ± 0,5 |
| 8871 | 119,6 ± 13,1 | 112,7 ± 4,2 | 112,4 ± 2,2 | 15,8 ± 1,3 | 17,5 ± 1,0 | 17,9 ± 1,0 |
| 8872 | 50,0 ± 5,7 | 98,9 ± 2,7 | 107,7 ± 0,8 | 11,8 ± 0,3 | 17,2 ± 1,7 | 17,5 ± 1,3 |
| 8873 | 84,8 ± 7,5 | 91,5 ± 5,6 | 103,8 ± 5,9 | 11,6 ± 3,3 | 15,7 ± 4,2 | 18,7 ± 0,3 |
| 8874 | 30,2 ± 2,1 | 100,5 ± 2,6 | 110,0 ± 12,9 | 12,6 ± 0,2 | 14,8 ± 2,6 | 16,2 ± 1,2 |
| 8875 | 68,6 ± 4,2 | 77,1 ± 3,8 | 100,4 ± 11,6 | 15,4 ± 0,3 | 19,2 ± 0,2 | 17,9 ± 3,5 |
| 8876 | 123,0 ± 9,5 | 104,1 ± 3,5 | 103,2 ± 10,3 | 15,5 ± 0,2 | 16,9 ± 1,3 | 17,3 ± 0,9 |
| 8877 | 64,6 ± 2,3 | 71,7 ± 7,5 | 99,9 ± 11,5 | 16,0 ± 2,5 | 15,2 ± 0,1 | 17,2 ± 1,0 |
| CSS | | 18,3 ± 1,6 | | | 16,2 ± 3,3 | |

4.2 Exprese vybraných proteinů souvisejících se signalizací AR po ovlivnění studovanými látkami

V tomto experimentu byla buněčná linie rakoviny prostaty LAPC-4 ovlivněna všemi studovanými látkami z nové série, tedy 8867 až 8877. Následně byla stejná linie ovlivněna užším výběrem látek (8868, 8872, 8874 a 8877) v porovnání s galeteronem a látkou 7719 ze starší série. Byly detekovány proteiny AR, fAR (S81), GR, Nkx3.1, PSA, α -tubulin a β -aktin. Cílem této části bylo určit užší výběr látek pro následující experimenty na základě inhibičního charakteru vůči transkripční aktivitě AR.



Obr. 15 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LAPC-4 v 10% DMEM po ovlivnění vybranými látkami o konečné koncentraci 10 μ M a době ovlivnění 24 hodin. AR značí androgenní receptor, GR značí glukokortikoidní receptor, PSA značí prostatický specifický antigen. Kontrolní vzorky byly naneseny dvakrát, ovšem pocházejí z jedné buněčné linie z jedné Petriho misky. Detekce α -tubulinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

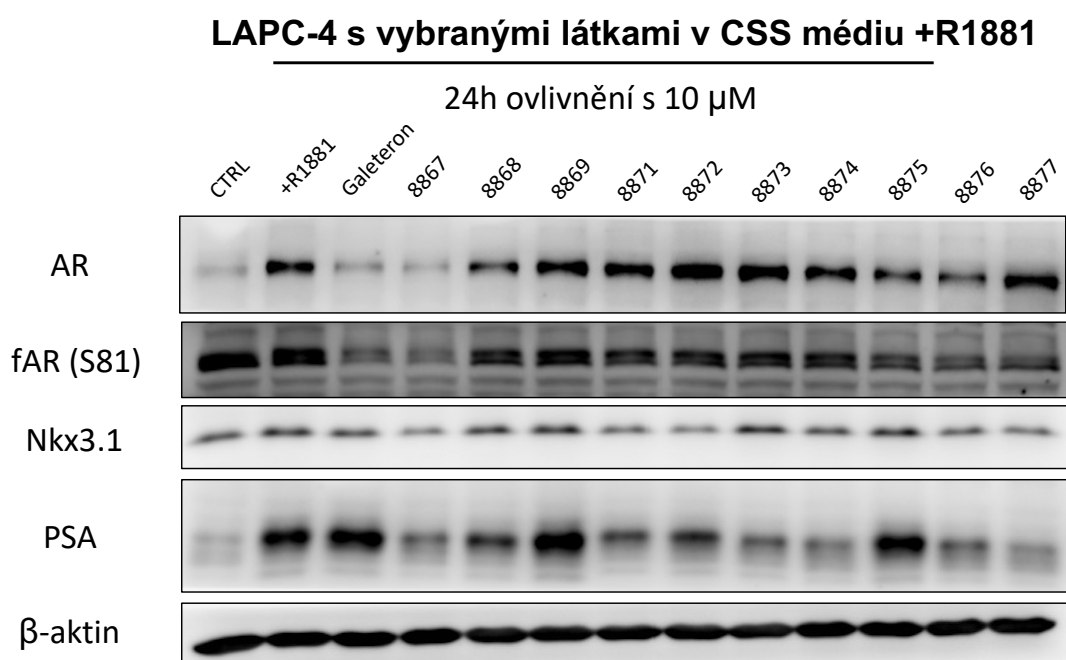
Výsledky první imunodetekce lze pozorovat na obr. 15. Jedná se o buněčnou linii LAPC-4, která byla kultivována v plném 10% DMEM, tedy ve standardním médiu s 10% fetálním sérem bohatém na androgeny. Buňky byly ovlivněny roztokem inhibitorů o konečné koncentraci 10 μ M po dobu 24 hodin.

Studované látky, dle předpokladu, neměly vliv na celkovou expresi AR, která se i po ovlivnění těmito látkami udržela na hodnotách kontrol. Patrný vliv látek 8867, 8869 a 8870 lze pozorovat u exprese GR, ovšem pokles nelze označit za významný. U

proteinu Nkx3.1 byla pozorována zvýšená exprese po ovlivnění látkou 8869 a 8870. U látky 8869 byl podobný vliv sledován také u PSA. Výsledkem této imunodetekce bylo odvrácení pozornosti od látek 8869 a 8870.

Po imunodetekci proteinu buněčné linie LAPC-4 v plném 10% DMEM byl proveden experiment v CSS 10% DMEM. Medium CSS obsahuje tzv. stripované sérum, které zajišťuje téměř nulovou bazální hladinu androgenů. V tomto experimentu nebyla zahrnuta látka 8870.

Výsledky tohoto experimentu lze pozorovat na obr. 16. Z experimentu je patrný vliv metribolonu na aktivitu AR. V kontrolním vzorku je hladina AR takřka nulová, naopak ve vzorku +R1881 je exprese na úrovni plného séra z předešlého experimentu. I přes aktivaci AR pomocí agonisty metribolonu byla hladina AR výrazně snížena u buněk ovlivněných galeteronem a látkou 8867. U látek 8868, 8875 a 8876 byl pozorován pokles hladiny AR. Snížení fosforylace AR (S81) byla výrazně patrná u buněk ovlivněných galeteronem a látkou 8867. Snížení fosforylace AR (S81) je pak



Obr. 16 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LAPC-4 po ovlivnění vybranými látkami a galeteronem o konečné koncentraci 10 μ M a době ovlivnění 24 hodin. Ke všem vzorkům, krom vzorku CTRL, byl přidán 1nM R1881. Bylo použito 10% stripované sérum (CSS) DMEM s takřka nulovou bazální hladinou androgenů. AR značí androgenní receptor, fAR (S81) značí fosforylovanou formu AR na serinu v pozici 81, PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

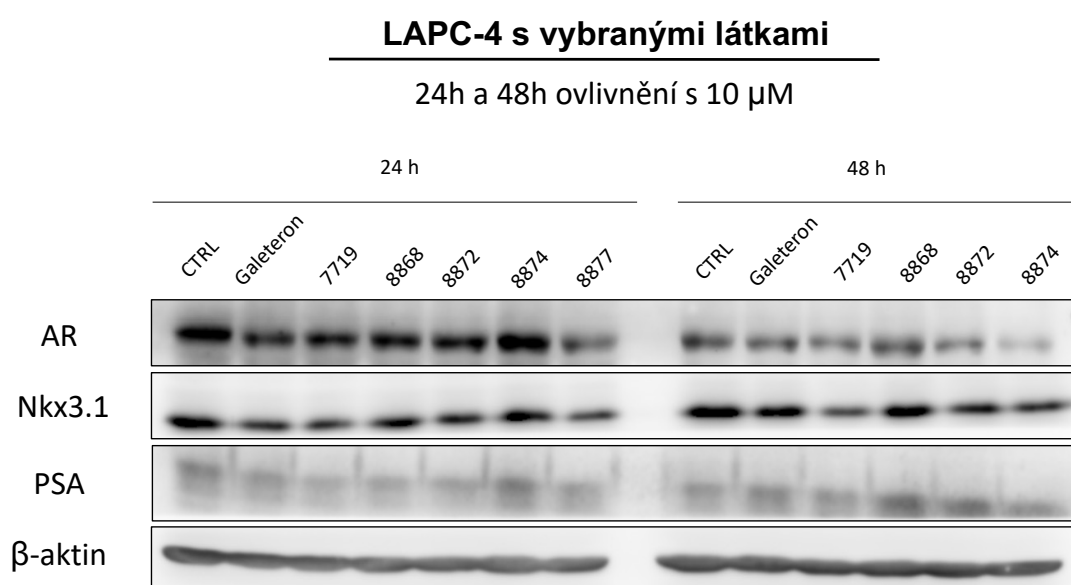
patrná také u buněk ovlivněných látkami 8875, 8876 a 8877. Z výsledků je patrný také vztah mezi zvýšenou stabilitou celkového AR při fosforylaci AR v pozici serinu 81, což je v souladu s odbornou literaturou (Chen a kol., 2006). U detekce Nkx3.1 byl pozorován významnější pokles u látek 8867, 8871 a 8872.

Skutečnost, že docházelo k fosforylaci AR na S81 u kontrolního CSS vzorku byla překvapivá. Vzhledem k odborné literatuře (Jorda a kol., 2018) lze konstatovat, že se jedná o chybu. Studie skupiny Jorda a kol. (2018) zkoumala spojitost mezi stimulací buněk rakoviny prostaty R1881 a fosforylací AR na S81, která vedla ke transkripční aktivitě AR a zvýšení hladin proteinů PSA a Nkx3.1. Byla jednoznačně prokázána spojitost mezi zvyšující se dávkou R1881 a fosforylací AR na S81. Zároveň tato studie potvrdila, že k fosforylaci AR na tomto místě přispívají již dříve známé CDK1 a CDK9. Také byla potvrzena pozitivní role CDK2, zatímco vliv CDK4 prokázán nebyl. Nárůst hladin fAR (S81) oproti kontrole bez R1881 v experimentu na obr. 16 byl tak očekávatelný, a tudíž pokles hladin fAR (S81) u vzorků byl způsobem vlivem testovaných látek.

Hladiny PSA byly zvýšeny oproti kontrole bez R1881 u všech vzorků. Nejvýraznější nárůst byl pozorován u kontroly s R1881, galeteronu a látek 8869 a 8875. Tento protein je exprimován jak u zdravé prostaty, tak u karcinomu prostaty, ovšem vlivem karcinomu prostaty dochází k jeho uvolňování do séra. Je přímo regulován AR, ovšem u karcinomu prostaty často exprese PSA uniká regulaci ze strany AR (Kim a kol., 2004). Zároveň studie skupiny Yu a kol. (2014) potvrdila, že u vzorků ovlivněných galeteronem společně s DHT roste výrazně hladina PSA, zatímco u vzorků s galeteronem bez DHT hladina PSA klesá. V této studii sledovali koncentrační závislost, kdy DHT byl použit v koncentračním rozmezí od 0,1 do 10 nM a galeteron v koncentraci 1 nebo 10 μ M. Ze studie je patrné, že již nízké hladiny DHT zvyšují hladinu PSA, a to i v přítomnosti 10 μ M galeteronu. Metribolon, použit v této diplomové práci, je agonistou AR stejně jako DHT, tudíž se dalo předpokládat, že bude mít obdobný efekt v kombinaci s galeteronem jako ve zmíněné studii. Tyto skutečnosti vysvětlují nárůst exprese PSA u buněk ovlivněných galeteronem v přítomnosti R1881, u kterých je zároveň patrný pokles jak celkového AR, tak jeho fosforylované formy (obr. 16).

Posledním experimentem v této části práce byla imunodetekce proteinů u buněčné linie LAPC-4, kde došlo k ovlivnění buněk pomocí látek 8868, 8872, 8874 a 8877 z nové série, látky 7719 ze starší série a galeteronu jakožto standardu. Pozorován byl také rozdíl mezi 24hodinovou a 48hodinovou kultivací buněk od ovlivnění látkami. Výsledky jsou znázorněny na obr. 17.

Na obr. 17 lze u hladiny AR pozorovat významný vliv doby kultivace na expresi. Při 24hodinové kultivaci byla hladina AR mírně snížena u všech použitých látek krom látky 8874. Nejvýznamnější pokles byl pak u látky 8877. Tento efekt byl mnohem výraznější při 48hodinové kultivaci. Hladina Nkx3.1 klesla u galeteronu a látek 7719 a 8877 při 24hodinové inkubaci a u látek 7719, 8872 a 8874 u 48hodinové kultivace. Zvýšenou hladinu PSA bylo možné pozorovat po 24hodinové inkubaci u látky 8874 a u látek 8868 a 8872 po 48hodinové inkubaci.



Obr. 17 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LAPC-4 v 10% DMEM po ovlivnění vybranými látkami a galeteronem o konečné koncentraci 10 μ M a době ovlivnění 24 a 48 hodin. AR značí androgenní receptor a PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

Výsledkem prvotních imunodetekcí byla selekce 3 hlavních látek z nové série, které byly podrobeny dalším experimentům. Při využití plného séra se ukázala jako vhodnější 48hodinová inkubace a při využití stripovaného séra 24hodinová inkubace s 1nM R1881. Jako látky pro další experimenty byly zvoleny látky 8868, 8872 a 8874 z nové série.

4.3 Exprese vybraných proteinů souvisejících se signalizací AR po ovlivnění užším výběrem látek

Na základě reportérové eseje a následných prvotních imunodetekčních experimentů byly pro detailnější zkoumání vybrány látky 8868, 8872 a 8874 z nové série. Společně s nimi byly testovány také látky 7709, 7718 a 7719 ze starší série. Látka 8868 byla vybrána pro svůj antagonistický charakter dle reportérové eseje pro AR (tab. 5) a dle výsledků imunodetekce proteinů buněk v CSS médiu (obr. 16), kde u vzorku s touto látkou došlo k výraznému poklesu hladiny PSA a částečně také hladiny AR vůči kontrole s R1881. Látka 8872 patřila v reportérové eseji mezi středně účinné antagonisty AR (tab. 5) a při imunodetekčních experimentech prokázala tato látka svůj vliv na snížení hladiny AR po 48hodinovém ovlivnění na hladiny vzorku s galeteronem v plném médiu, a zároveň došlo u vzorku s látkou 8872 k poklesu hladiny PSA a Nkx3.1 u buněk v CSS médiu. Látka 8874 projevila v reportérové eseji silný antagonistický charakter a při imunodetekci byla u vzorků ovlivněných touto látkou prokázána snižující se hladina AR po 48hodinovém ovlivnění.

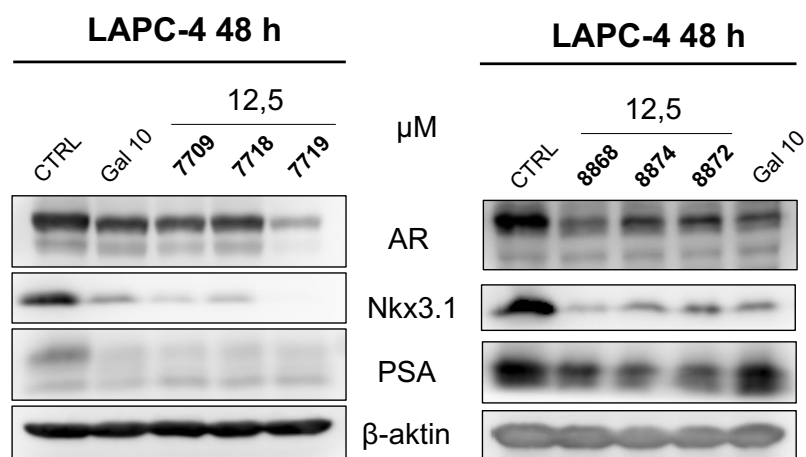
Experimenty byly dvojího typu. Jednak byly buňky kultivovány v plném médiu s látkami po dobu 48 hodin, jednak ve stripovaném médiu s látkami po dobu 24 hodin.

4.3.1 Exprese proteinů po kultivaci buněk v plném séru s vybranými látkami

V této části experimentu byly detekovány proteiny AR, Nkx3.1, PSA a β -aktin po ovlivnění vybranými látkami a po 48hodinové kultivaci v 10% DMEM (LAPC-4) nebo v 10% RPMI (LNCaP). Výsledky pro buněčnou linii LAPC-4 lze pozorovat na obr. 18, pro linii LNCaP na obr. 19.

V případě starší série látek je významná inhibiční aktivita látky 7719 vůči AR u buněčné linie LAPC-4, která byla výrazně vyšší než u galeteronu. U ostatních látek této série byla tato aktivita srovnatelná s galeteronem. Naopak u buněčné linie LNCaP byly výsledky inhibiční aktivity všech testovaných látek starší série nepřesvědčivé, respektive byla tato aktivita nižší než u galeteronu. Významný pokles exprese je patrný u Nkx3.1, a to jak u linie LAPC-4, tak u linie LNCaP. V případě LAPC-4 byla nejúčinnější látka 7719, což odpovídá také její aktivitě vůči AR. U buněčné linie LNCaP vykazovaly všechny látky této série obdobnou aktivitu vůči expresi Nkx3.1,

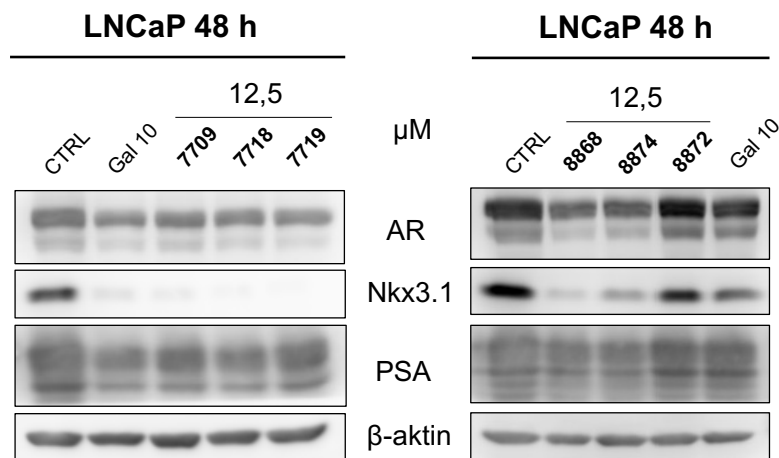
kteřá byla srovnatelná nebo výraznější než u galeteronu. Obdobné výsledky vykazovaly tyto látky i při detekci PSA. V případě linie LAPC-4 byla aktivita všech látek srovnatelná s galeteronem a u linie LNCaP byly nepatrně vyšší hladiny PSA detekovány u vzorků ovlivněných látkami 7709 a 7719, které ovšem nepřesahovaly hladinu u kontroly.



Obr. 18 – Výsledky imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LAPC-4 v plném DMEM médiu po ovlivnění vybranými látkami o konečné koncentraci 12,5 μ M a galeteronem o konečné koncentraci 10 μ M (Gal 10) při době ovlivnění 48 hodin. AR značí androgenní receptor a PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

Nová série látek neprokázala tak přesvědčivé výsledky, jako tomu bylo u starší série. V případě AR byl pozorován nejvýraznější pokles hladiny u látky 8868 při ovlivnění linie LAPC-4, kdy hladina AR klesla pod hodnoty vzorku s galeteronem. U látek 8874 a 8872 byly hladiny AR u LAPC-4 nepatrně vyšší než u vzorku s galeteronem, ovšem stále významně nižší než u kontrolního vzorku. Jiné závěry bylo možné pozorovat u buněčné linie LNCaP, kdy látky 8868 a 8874 prokázaly schopnost snížit hladinu AR, a to i vůči vzorku s galeteronem, ovšem u vzorku s látkou 8872 byla pozorována minimálně stejná, ne-li vyšší hladina AR než u kontrolního vzorku. Linie LNCaP exprimuje mutovanou formu AR. Je tedy možné, že látka 8872 vykazuje u této buněčné linie agonistický charakter vůči AR. Tuto skutečnost podporuje i výsledek detekce Nkx3.1, kdy u vzorku s látkou 8872 u LNCaP lze pozorovat vyšší hladinu tohoto proteinu než u ostatních vzorků včetně galeteronu. Tento agonistický charakter látky 8872 nebyl pozorován u linie LAPC-4 exprimující běžnou variantu AR, kdy hladina Nkx3.1 u vzorku s touto látkou výrazně klesla vůči kontrole. Nižší hladiny PSA bylo možné pozorovat u všech vzorků s látkami u linie LAPC-4. U linie LNCaP

byla hladina PSA takřka neměnná vůči kontrole, nepatrně vyšší pak u vzorků s látkou 8872.



Obr. 19 – Výsledky imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LNCaP v plném RPMI médiu po ovlivnění vybranými látkami o konečné koncentraci 12,5 μM a galeteronem o konečné koncentraci 10 μM (Gal 10) při době ovlivnění 48 hodin. AR značí androgenní receptor a PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

U obou buněčných linií je patrný vliv galeteronu na klesající hladinu jak samotného AR, tak podřízených proteinů PSA a Nkx3.1, což je v souladu s mechanismy účinku galeteronu diskutovaných v teoretické části této práce, a zároveň odpovídá publikovaným studiím (Yu a kol., 2014; Peřina a kol., 2023b).

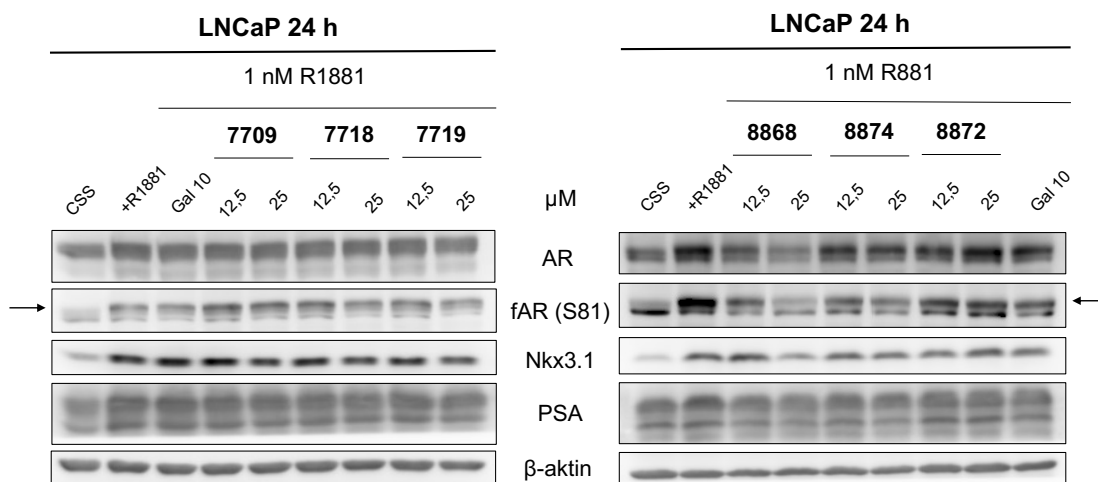
4.3.2 Exprese proteinů po kultivaci buněk ve stripovaném séru s vybranými látkami

V této části experimentu byly detekovány proteiny AR, fosforylovaná forma AR v pozici serinu 81, Nkx3.1, PSA a β -aktin. Buňky byly nejprve 24 hodin kultivovány ve stripovaném CSS médiu a následně ovlivněny vybranými látkami a galeteronem s přidáním 1 nM R1881 na 24 hodin. Výsledky pro buněčnou linii LNCaP lze pozorovat na obr. 20, pro linii LAPC-4 na obr. 21.

U buněk ovlivněných výběrem ze starší série látek lze pozorovat takřka neměnnou hladinu AR u obou buněčných linií. Částečný pokles je viditelný u LAPC-4 ovlivněných galeteronem, patrnější pak u látky 7719 při koncentraci 25 μM . Pozoruhodnější výsledky přinesla detekce fosforylované formy AR, kdy byl patrný očekávaný nárůst fosforylace u obou buněčných liniích mezi kontrolami s a bez R1881 dle odborné literatury (Jorda a kol., 2018). Potlačení fosforylace na hladiny galeteronu

u LAPC-4 bylo prokázáno u vzorku s látkou 7719 v koncentraci 25 μM . U vzorků s látkami 7709 a 7718 byla fosforylace také prokazatelně potlačena při koncentraci 25 μM , ovšem pokles nedosáhl úrovně galeteronu.

Obdobné výsledky bylo možné pozorovat také u buněčné linie LNCaP, kdy ale na rozdíl od linie LAPC-4 látka 7709 neprokázala potlačení fosforylace, a to ani při koncentraci 25 μM . U linie LAPC-4 byly výsledky detekce hladiny Nkx3.1 v souladu s výsledky detekce fosforylace AR. Opět u vzorku s 25 μM látkou 7719 klesla hladina Nkx3.1 na úroveň galeteronu. Stejně koncentrace látek 7709 a 7718 už takto úspěšné nebyly. U linie LNCaP naopak u vzorků všech tří látek o koncentraci 25 μM bylo pozorováno potlačení exprese Nkx3.1, a to více než u vzorku s galeteronem. Je však třeba říci, že pokles nebyl nikterak signifikantní a hladina Nkx3.1 se ani v jedno z případů nepřiblížila hodnotně kontroly bez R1881. Detekce proteinu PSA nepřinesla žádné významné poznatky u linie LNCaP, kdy hladina PSA byla u všech vzorků s R1881 na podobné hladině, která byla vyšší, než byla hladina PSA u kontroly bez R1881. Obdobně neprůkazné byly také výsledky detekce PSA u linie LAPC-4, kdy byl však pozorován mírný pokles hladiny PSA u vzorků všech tří látek, převážně u koncentrace 25 μM . Jak již bylo diskutováno dříve, zvýšená hladina PSA, respektive

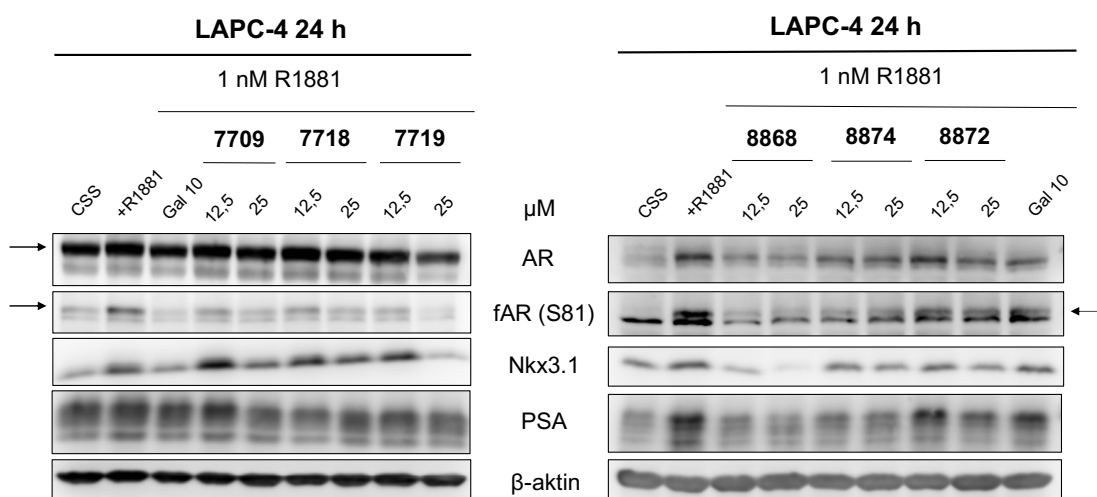


Obr. 20 – Výsledky imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LNCaP po kultivaci ve stripovaném RPMI médiu a po ovlivnění vybranými látkami o konečné koncentraci 12,5 a 25 μM a galeteronem o konečné koncentraci 10 μM (Gal 10) s přidáním 1 nM R1881 při době ovlivnění 24 hodin. Kontrolní buňky byly kultivovány v CSS médiu bez metribolonu (označeno CSS), případně byly kultivovány v CSS médiu s přidáním R1881 o konečné koncentraci 1 nM po dobu 24 hodin (označeno +R1881). AR značí androgenní receptor, fAR (S81) značí fosforylovanou formu AR v pozici serinu 81 a PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

udržení hladiny PSA na úrovni kontroly, po ovlivnění buněk steroidním antagonistou může být způsobeno jednak přítomností silného agonisty (Yu a kol., 2014), a jednak skutečností, že u karcinomu prostaty může exprese PSA unikat regulaci ze strany AR (Kim a kol., 2004), čemuž odpovídají i poznatky z odborné literatury.

Závěrem tohoto experimentu lze konstatovat, že studované látky starší série jsou obdobně účinné jako galeteron, ovšem pouze při koncentraci 25 μM . Koncentrace 12,5 μM se ukázala jako nedostatečná při daných podmínkách experimentu. Výsledky látky 7719 se jevíly pozitivněji než u zbylých dvou látek, a to především při potlačení fosforylace AR na S81 a snížení hladiny Nkx3.1 u obou buněčných linií.

U vzorků s výběrem látek z nové série, a sice s látkami 8868, 8872 a 8874, lze pozorovat významné změny v hladině AR. U buněčné linie LAPC-4 byl pokles hladiny detekovaného receptoru vždy pod hladinou kontroly s R1881. Nejvyšší pokles byl pozorován u obou koncentrací látky 8868, kdy hladiny AR klesly pod hladinu AR vzorku s galeteronem, ovšem ne na úroveň kontroly bez R1881. U zbylých dvou látek byl pokles hladiny AR u linie LAPC-4 srovnatelný se vzorkem s galeteronem, a to opět u všech koncentrací s výjimkou 12,5 μM 8872, kde byl pokles hladiny AR takřka nulový a celková hladina receptoru byla srovnatelná s hladinou kontroly s R1881.



Obr. 21 – Výsledky imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie LAPC-4 po kultivaci ve stripovaném DMEM médiu a po ovlivnění vybranými látkami o konečné koncentraci 12,5 a 25 μM a galeteronem o konečné koncentraci 10 μM (Gal 10) s přidáním 1 nM R1881 při době ovlivnění 24 hodin. Kontrolní buňky byly kultivovány v CSS médiu bez metribolonu (označeno CSS), případně byly kultivovány v CSS médiu s přidáním R1881 o konečné koncentraci 1 nM po dobu 24 hodin (označeno +R1881). AR značí androgenní receptor, fAR (S81) značí fosforylovanou formu AR v pozici serinu 81 a PSA značí prostatický specifický antigen. Detekce β -aktinu značí rovnoměrné nanesení vzorku.

Látka 8868 potvrdila svůj inhibiční charakter vůči transkripční aktivitě AR i u buněčné linie LNCaP, kdy byl opět pozorován výrazný pokles hladiny AR u obou koncentrací a při možném pozorování koncentrační závislosti. U zbylých dvou vzorků s látkami 8872 a 8874 byl pokles hladiny AR nižší, ovšem srovnatelný s poklesem u vzorku s galeteronem. Výjimku tvořil vzorek s 25 μ M 8872, kdy byla hladina AR srovnatelná s kontrolou s R1881. Tato látka už při minulých experimentech vykazovala spíše agonistický charakter vůči AR, čemuž nasvědčují i nyní zmíněné poznatky. Patrněji je tento charakter možné pozorovat u linie LNCaP.

Fosforylace AR byla u linie LAPC-4 se všemi látkami nižší než u kontroly s R1881. Nejvýraznější pokles byl pozorován u vzorků s oběma koncentracemi látky 8868. Tento pokles byl dokonce pod úroveň vzorku s galeteronem. U linie LNCaP opět dominoval efekt látky 8868 na fosforylaci AR, kdy sice byly pozorovány rozdíly mezi koncentracemi, ovšem v obou případech byla fosforylace potlačena pod úroveň vzorku s galeteronem. V případě 25 μ M 8868 dokonce na úroveň kontroly bez R1881. Na hladiny vzorku s galeteronem se dostala fosforylace AR u vzorků s látkou 8874. Nejméně výrazný pokles fosforylace AR, ovšem stále pod hladiny kontroly s R1881, bylo možné pozorovat u látky 8872.

Korespondující výsledky přinesla také detekce Nkx3.1, kdy u linie LAPC-4 byl nejvýraznější pokles hladiny tohoto proteinu u vzorků s látkou 8868, kdy v případě koncentrace 25 μ M byl pokles pod úroveň kontroly bez R1881. U zbylých látek, včetně galeteronu, byl efekt na pokles hladiny Nkx3.1 ne příliš výrazný vůči kontrole s R1881. Nutno podotknout, že nebyl pozorován významný rozdíl mezi hladinou Nkx3.1 mezi kontrolou s a bez R1881 u buněčné linie LAPC-4. Naopak u linie LNCaP, byl rozdíl v hladině Nkx3.1 mezi kontrolou s a bez R1881 markantní. Ovšem zde byly ne příliš průkazné výsledky jednotlivých látek. Patrnější pokles hladiny Nkx3.1 u LNCaP byl pozorovatelný pouze u vzorku s 25 μ M 8868. Ani v tomto případě však hladina nedosáhla hladiny kontroly bez R1881.

Detekce PSA u LNCaP nepřinesla žádné významné poznatky. Hladiny byly u všech vzorků s látkami a galeteronem takřka vyrovnané, kdy nepatrný pokles bylo možné pozorovat u látky 8868. Výraznější rozdíly přinesl experiment na linii LAPC-4, kdy byl citelnější rozdíl i mezi oběma kontrolami. Pokles hladiny PSA vůči kontrole s R1881 byl nejvýznamnější u látky 8868, následně u látky 8874. U látky 8872 byla

hladina PSA významně závislá na koncentraci. Zatímco u koncentrace 25 μM byl znát pokles vůči kontrole s R1881, u koncentrace 12,5 μM byla hladina PSA srovnatelná s hladinou kontroly s R1881.

Závěrem lze konstatovat, že látka 8868 prokázala významný inhibiční charakter vůči transkripční aktivitě AR, kdy potlačila také fosforylaci receptoru a významně snížila hladinu Nkx3.1 u obou buněčných linií. Naopak látka 8872 vykazovala agonistický charakter při daném experimentu vůči AR, což koresponduje s výsledky z minulých experimentů. Antagonistických a agonistický charakter látek byl předmětem reportérové eseje.

Byl pozorován růst fosforylace AR na S81 po aktivaci AR R1881 u obou buněčných linií. Tato skutečnost odpovídá odborné literatuře (Jorda a kol., 2018) a sledovaný pokles hladin fAR (S81) lze tak jednoznačně přisoudit vlivu studovaných látek.

Obdobné aktivační experimenty byly provedeny také vědeckou skupinou Peřina a kol. (2023b), ve kterých byla, mimo jiné látky, testována také látka s označením 3d, která je zmíněna v teoretické části této práce. Použitá koncentrace látek v této studii byla 10 μM . Na buněčných liniích LNCaP i LAPC-4 vykazovala tato látka, také steroidní antagonist, srovnatelné výsledky s látkou 8868, kdy rovněž došlo k výraznému potlačení hladin celkového AR, fosforylované formy na S81, ale i PSA a Nkx3.1.

4.4 Izolace a purifikace plazmidů

V této části experimentu byl izolován plazmid ze 300 ml buněčné kultury kmene *E. coli* TOP10. Následně byly plazmidy purifikovány a naředěny do konečné koncentrace 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Volba plazmidů závisela na následném využití v reportérové eseji. Plazmidy byly zkonstruovány skupinou pana doc. Romana Hrstky z Masarykovy univerzity v Brně. Byly zapotřebí dva druhy plazmidů. Jeden druh nesl fragment genu pro firefly luciferázu (FNC) společně s fragmentem genu pro renilla luciferázu (RNC), dále označován jako plazmid FNC+RNC. Druhý druh plazmidů nesl gen pro ER α a je dále označován jako plazmid ER α .

Firefly luciferázy pochází původně ze světlušek (*Lampyridae*), odkud dostala také své jméno a katalyzuje oxidaci luciferinu za spotřeby ATP a vzniku zelenožlutého

světelného záření. Renilla luciferáza je původem ze živočicha renily fialové (*Renilla reniformis*) a katalyzuje oxidaci koelenterazinu za vzniku modrého světelného záření.

Původní gen pro FNC obsahuje 3 estrogen-responzivní elementy (ERE), které aktivitu luciferázy činí závislou na estrogenech, respektive na ER α . Tento gen byl skupinou doc. Hrstky získán amplifikací z původního 3xERRE/ERE-luciferáza vektoru (Addgene Europe, Teddington, United Kingdom). Následně byl fragment genu FNC vnesen do pcDNA3 vektoru (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA). Nakonec byl do vektoru pcDNA3 vnesen také fragment genu RNC. Tento vektor byl poté transformován do buněčné linie *E. coli* TOP10.

Výsledky izolace plazmidů je možné sledovat v tab. 6. Pomocí nanodropu DeNovix DS-11 Series byla změřena koncentrace plazmidů a jejich čistota. Koncentrace plazmidu ER α byla 1 115,899 ng/ μ l a plazmidu FNC+RNC 1 109,278 ng/ μ l. Z výsledků je patrné, že izolace a purifikace proběhla velmi úspěšně, a to u obou roztoků plazmidů. Poměr mezi absorbancí DNA (při 260 nm) a absorbancí proteinů (při 280 nm), tedy hodnota 260/280, byl v případě plazmidu ER α 1,90 a v případě plazmidu FNC+RNC 1,91, kdy optimální hodnoty jsou okolo 1,8. Tento poměr slouží jako primární ukazatel čistoty DNA a v obou případech lze označit oba roztoky plazmidů za čisté od proteinů. Jako sekundární ukazatel čistoty slouží hodnota 260/230, tedy podíl mezi absorbancí DNA a absorbancí převážně sacharidů, fenolických látek a EDTA (při 230 nm). I tento poměr vyšel u obou vzorků v požadovaném rozmezí, a sice mezi 2,0 a 2,2. U vzorku s plazmidy ER α byl tento poměr 2,14 a u vzorku s plazmidy FNC+RNC byl tento poměr 2,15.

Tab. 6 – Výsledky měření na nanodropu DeNovix DS-11 Series. Hodnota 260/280 značí poměr absorbancí mezi těmito vlnovými délkami a je primárním ukazatelem čistoty vzorku, kdy ideální hodnota je okolo 1,8. Hodnota 260/230 značí poměr absorbancí mezi těmito vlnovými délkami a je sekundárním ukazatelem čistoty vzorku, kdy ideální rozmezí činí 2,0 až 2,2. Při 260 nm má maximální absorbanci DNA, při 280 nm mají maximální absorbanci proteiny a při 230 nm mají maximální absorbanci sacharidy, fenolické látky a EDTA.

| Plazmid | Koncentrace (ng/ μ l) | 260/280 | 260/230 |
|-------------|---------------------------|---------|---------|
| ER α | 1 115,899 | 1,90 | 2,14 |
| FNC+RNC | 1 109,278 | 1,91 | 2,15 |

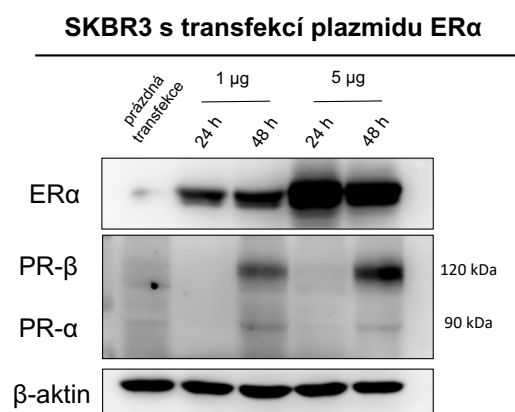
4.5 Optimalizace transfekce plazmidů

V rámci této části experimentální práce bylo žádoucí optimalizovat jednak samotný postup transfekce, jednak i jednotlivé parametry, jakými bylo množství použitého plazmidu na určitý počet buněk, poměr mezi množstvím plazmidu ER α a množstvím plazmidu FNC+RNC a doba kultivace po transfekci. Z hlediska samotného postupu bylo nutné optimalizovat také prokázání úspěšnosti transfekce metodou imunodetekce.

4.5.1 Transfekce plazmidu ER α

Prvotní experimenty byly zaměřeny na detekci úspěšné transfekce plazmidu ER α do buněčné linie rakoviny prsu SKBR3, která neobsahuje gen pro ER α , a tudíž je nezávislá na estrogenech.

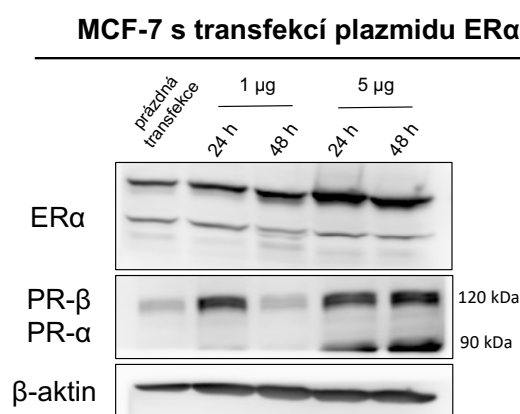
Z obr. 22 je patrné, že transfekce proběhla úspěšně. Lze pozorovat značný nárůst exprese ER α a to již po 24 hodinách od transfekce 1 μ g plazmidu. Zároveň je patrné, že doba kultivace od transfekce nehrála v rámci exprese ER α významnou roli, jelikož jsou hodnoty mezi 24 a 48 hodinami u 1 μ g plazmidu takřka totožné. V případě vzorků s 5 μ g plazmidu je dokonce detekované množství ER α větší u 24hodinové kultivace. Doba kultivace hrála klíčovou roli u progesteronového receptoru, kde je exprese patrná až po 48hodinové kultivaci, a to jak u vzorku s 1 μ g plazmidu, tak u vzorku s 5 μ g plazmidu. Z důvodu dostatečné exprese ER α po 24hodinové kultivaci s 1 μ g plazmidu



Obr. 22 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie SKBR3 po transfekci plazmidu ER α v CSS DMEM. ER α značí estrogení receptor alfa, PR α / β značí progesteronový receptor alfa/beta. Kontrolní buňky prošly procesem transfekce v nukleofektoru, ovšem bez přítomnosti plazmidu. Údaj o množství se vztahuje k plazmidu. Časové údaje značí kultivační dobu od provedení transfekce. β -aktin je kontrolou rovnoměrného nanesení vzorků.

bylo usouzeno, že takovéto časové a množství parametry budou použity také v následujících experimentech, včetně reportérové eseje.

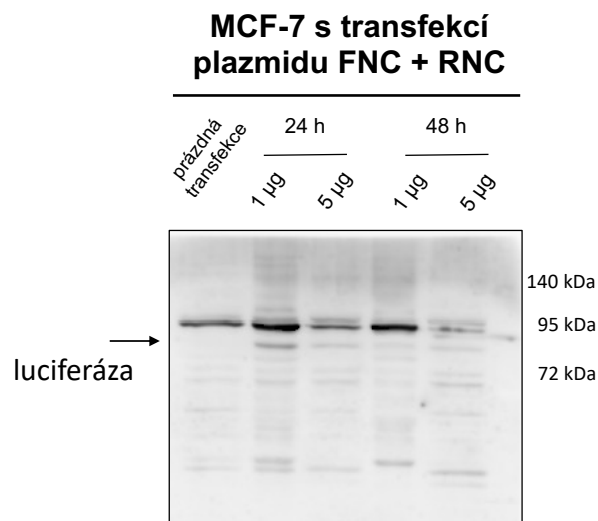
V případě kontrolní linie MCF-7 lze výsledky imunodetekce sledovat na obr. 23. U této buněčné linie je běžná exprese ER α . Při nižším množství plazmidu nedošlo k výraznému zvýšení exprese ER α , ovšem při použití vyššího množství byl patrný nárůst, a to jak po 24hodinové, tak po 48hodinové kultivaci. Obdobně dle očekávání se jevíly výsledky detekce progesteronového receptoru. V případě 48hodinové kultivace po transfekci 1 μ g plazmidu byl sledován pokles exprese PR na kontrolní hodnoty. Tento výsledek byl s největší pravděpodobností chybný a mohl vzniknout na základě chybné vazby primární či sekundární protilátky.



Obr. 23 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie MCF-7 po transfekci plazmidu ER α v CSS DMEM. ER α značí estrogenní receptor alfa, PR α / β značí progesteronový receptor alfa/beta. Kontrolní buňky prošly procesem transfekce v nukleofektoru, ovšem bez přítomnosti plazmidu. Údaj o množství se vztahuje k plazmidu. Časové údaje značí kultivační dobu od provedení transfekce. β -aktin je kontrolou rovnoměrného nanesení vzorků.

4.5.2 Transfekce plazmidu FNC+RNC

Nejprve byl proveden experiment, při kterém byl plazmid FNC+RNC transfekován do buněčné linie MCF-7 a následně byla imunodetekována luciferáza. Buněčná linie MCF-7 byla vybrána z důvodu exprese ER α , s jehož aktivitou je svázána aktivita luciferázy. Výsledek imunodetekce lze pozorovat na obr. 24. Transfekce u této buněčné linie neproběhla optimálně a nárůst exprese luciferázy je nejviditelnější při 24hodinové kultivaci s 1 μ g plazmidu, což se ovšem nepotvrdilo u experimentu v následující kapitole na buněčné linii SKBR3 (obr. 26).

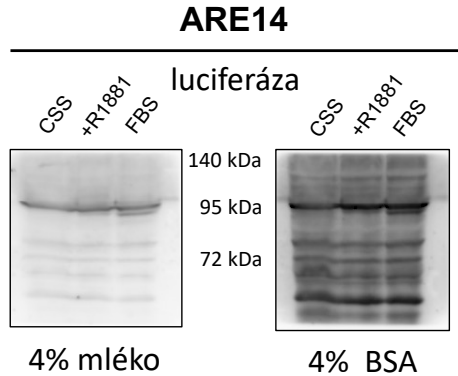


Obr. 24 – Výsledek imunodetekce luciferázy u buněčné linie MCF-7 po transfekci plazmidu FNC+RNC. Kontrolní buňky prošly procesem transfekce v nukleofektoru, ovšem bez přítomnosti plazmidů. Údaj o množství se vztahuje k plazmidu. Časové údaje značí kultivační dobu od provedení transfekce. Šipkou je označena molekulová hmotnost, při které je detekována požadovaná luciferáza.

V případě detekce vybraných proteinů v experimentech v předešlých kapitolách byl použit k tzv. blokování membrán proti nespecifickým vazbám protilátek 4% roztok BSA. Pro detekci luciferázy bylo nutné proces blokace optimalizovat. K optimalizaci byla použita buněčná linie ARE14, která nese gen pro firefly luciferázu. Porovnání výsledků imunodetekce luciferázy u buněčné linie ARE14 mezi membránami blokovanými ve 4% BSA a 4% mléku je zobrazeno na obr. 25. Roztok BSA se jevil jako nevhodný pro blokaci a bylo vhodnější provést blokaci ve 4% roztoku mléka.

Z imunodetekce luciferázy u buněčné linie ARE14 je patrné, že pro detekci luciferázy je vhodnější blokovat membrány ve 4% roztoku mléka. Dochází tak ke snížení nespecifických vazeb protilátek a je patrnější detekce samotné luciferázy okolo 95 kDa.

Výsledkem těchto experimentů byla optimalizace detekce luciferázy skrze blokaci membrán v roztoku 4% mléka. Dostupná protilátka proti luciferáze (králičí, monoklonální, Sigma-Aldrich (USA)) i přesto vykazovala nespecifické vazby, které však neměly vliv na výslednou detekci.



Obr. 25 – Výsledek imunodetekce luciferázy u buněčné linie ARE14 nesoucí gen pro tento protein. Luciferáza byla detekována u buněk kultivovaných v CSS médiu, FBS médiu a v CSS médiu s přidáním R1881 o konečné koncentraci 10 μ M. Vlevo membrána blokována ve 4% mléku, vpravo pak membrána blokována ve 4% BSA.

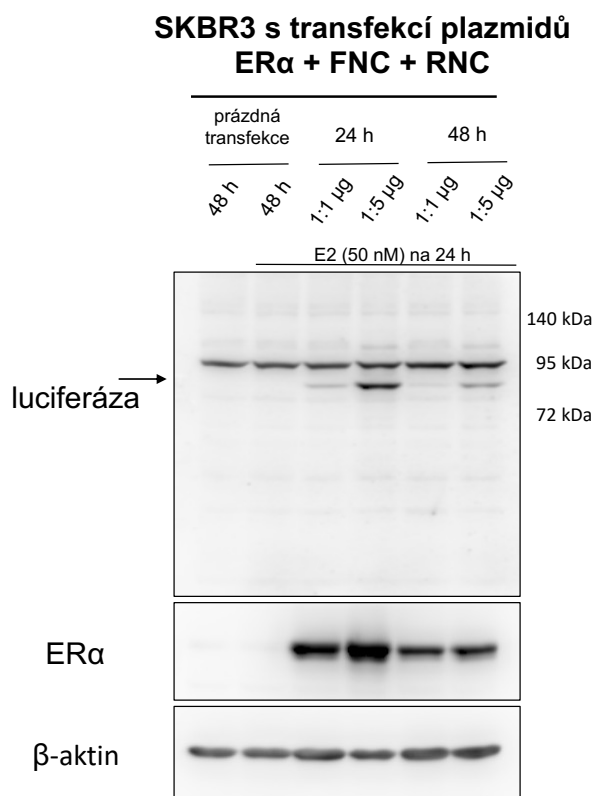
4.5.3 Společná transfekce plazmidu ER α a plazmidu FNC+RNC

Po optimalizacích dílčích transfekcí byl proveden experiment, při kterém byly transfekovány oba plazmidy nesoucí jak gen pro ER α , tak pro FNC+RNC. Jako buněčná linie byla použita SKBR3, která byla plánována k použití i u následné reportérové eseje. Cílem této části bylo provést jednak společnou transfekci obou plazmidů v jednom kroku, jednak určit ideální poměr mezi množstvím plazmidu ER α a plazmidu FNC+RNC.

Výsledná imunodetekce je na obr. 26. Z výsledků je patrné, že transfekce obou plazmidů najednou proběhla úspěšně. U ER α bylo možné pozorovat výrazný nárůst exprese při všech kombinacích doby inkubace a množství plazmidů. Jak již bylo potvrzeno v předešlém experimentu, jako optimální doba kultivace po transfekci u plazmidu ER α bylo 24 hodin. U 48hodinové inkubace již docházelo k mírnému poklesu exprese ER α . Exprese luciferázy byla také patrná ve všech případech, kdy byl přítomen plazmid FNC+RNC. Zde však bylo možné pozorovat výraznější rozdíly, a to jak mezi množstvím plazmidu, tak mezi dobami inkubace. Jako nejvhodnější se z výsledku jevil poměr 1:5 mezi množstvím plazmidu ER α a množstvím plazmidu FNC+RNC, a to při 24hodinové inkubaci po transfekci. Nižší množství plazmidu FNC+RNC vykazovalo znatelně horší signál, respektive expresi luciferázy. Stejně méně vhodně se jevila 48hodinová inkubace při poměru 1:5 mezi množstvím plazmidu ER α a množstvím plazmidu FNC+RNC, kdy se množství detekované luciferázy

znatelně snížilo. Estradiol byl přidán jakožto ligand ER α k jeho aktivaci, jelikož je aktivita ER α spojena s aktivitou luciferázy.

Výsledkem tohoto experimentu bylo stanovení postupu při transfekci obou plazmidů najednou, a zároveň určení poměru mezi množstvím obou plazmidů a doby inkubace od transfekce. Jako optimální byl zvolen poměr 1:5 mezi množstvím plazmidu ER α a množstvím plazmidu FNC+RNC a doba inkubace 24 hodin po provedení transfekce. Tyto hodnoty byly používány i nadále, zejména pak při reportérové eseji pro ER.



Obr. 26 – Výsledek imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie SKBR3 po transfekci plazmidu ER α a plazmidu FNC+RNC. ER α značí estrogenní receptor alfa. Kontrolní buňky prošly procesem transfekce v nukleofektoru, ovšem bez přítomnosti plazmidů. Údaj o množství se vztahuje k plazmidům, respektive k poměru mezi plazmidem ER α a plazmidem FNC+RNC. K vybraným buňkám byl na 24 hodin přidán 50 nM estradiol (E2). Šipkou je označena molekulová hmotnost, při které je detekována požadovaná luciferáza. Časové údaje značí kultivační dobu od provedení transfekce. β -aktin je kontrolou rovnoměrného nanesení vzorků.

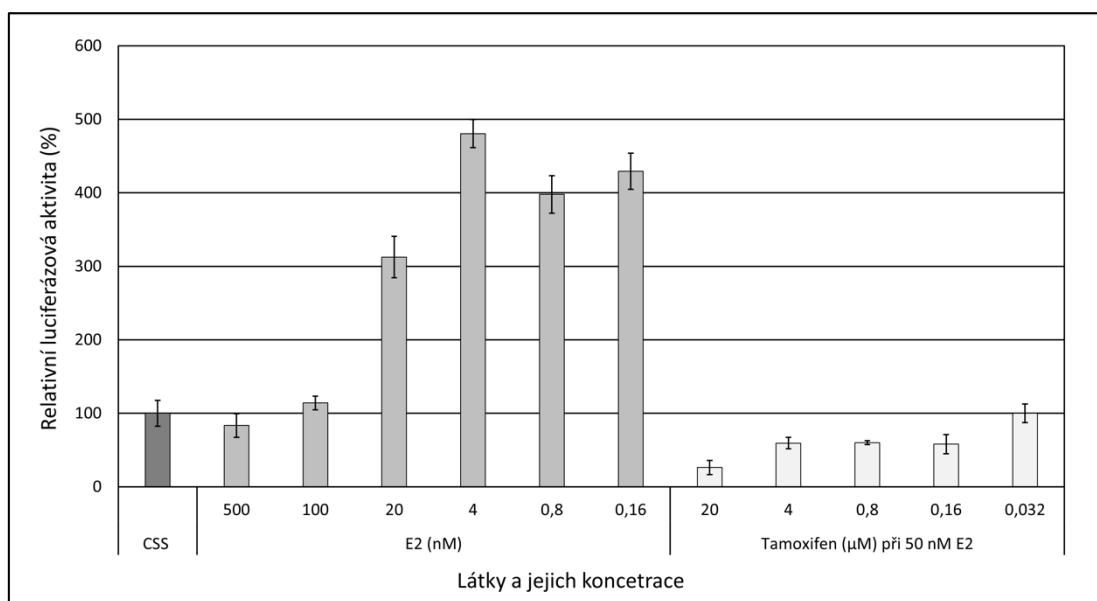
4.6 Optimalizace reportérové eseje pro ER

Před použitím reportérové eseje pro zjištění agonistického nebo antagonistického charakteru studovaných látek vůči ER bylo nejprve nutné optimalizovat parametry reportérové eseje. Jednalo se zejména o vhodné zvolení koncentrace E2 pro kontrolu

aktivace ER α a luciferázy, případně potvrzení tamoxifenu jakožto vhodného antagonisty ER α .

Výsledky optimalizační reportérové eseje byly zaneseny do grafu (obr. 27). Na první pohled bylo patrné, že došlo k několikanásobnému vzrůstu signálů u vzorků s E2 o koncentraci 0,16; 0,8; 5 a 20 nM, kde nejvyšší nárůst byl pozorován u 4 nM koncentrace E2. Signál vzorků s 100 a 500 nM E2 byl srovnatelný s kontrolou, což bylo patrné způsobeno úmrtím buněk. Jako nejvhodnější koncentrace E2 pro kontrolu aktivace ER α a luciferázy se ukázala koncentrace 4 nM.

Jako antagonist ER α byl při této optimalizaci použit tamoxifen. Bylo možné pozorovat snižující se relativní luciferázovou aktivitu při zvyšujících se koncentracích tamoxifenu, což odpovídá jeho obecně známému antagonistickému charakteru vůči ER α . Blokace vazebného místa tamoxifenem způsobí transkripční inaktivitu ER α , na které je aktivita luciferázy závislá. Tamoxifen se potvrdil jako vhodný kontrolní antagonist ER α pro reportérovou esej.



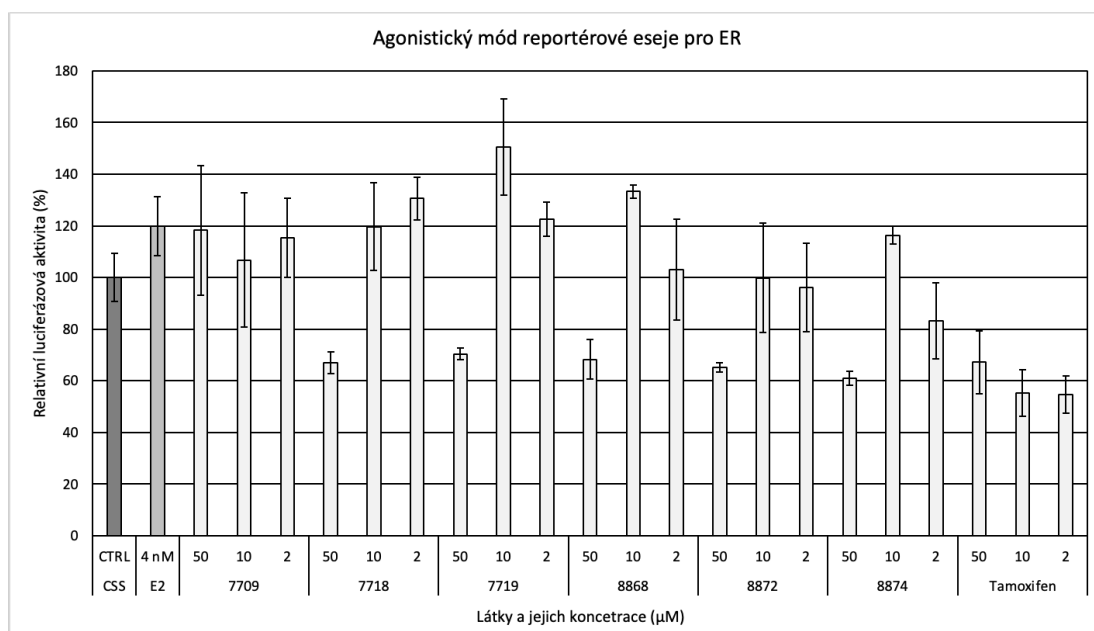
Obr. 27 – Výsledky optimalizační reportérové eseje pro ER. Graf relativní luciferázové aktivity (%) v závislosti na použité koncentraci 17 β -estradiol (E2) a tamoxifenu, ke kterému bylo přidáno 50 nM E2. Signál FNC luciferázy u každého vzorku byl vztažen na průměrný signál RNC luciferázy z celého měření.

4.7 Relativní luciferázová aktivita u transfekované buněčné linie SKBR3 po ovlivnění užším výběrem látek

Pro detailnější zkoumání vlastností látek byla využita reportérová esej pro ER, která byla v rámci této práce optimalizována. Výsledkem je relativní luciferázová aktivita (RLA) v %. Tato hodnota byla získána poměrem mezi signálem FNC luciferázy k průměrnému signálu RNC luciferázy v rámci měřené 96jamkové desky. Tento poměr byl následně normalizován na signál kontroly s prázdnou transfekcí v CSS médiu. V rámci reportérové eseje pro ER byly měřeny vybrané látky dle předešlých experimentů, a sice látky 7709, 7718 a 7719 ze starší série a látky 8868, 8872 a 8874 z nové série.

Výsledky agonistického módu lze pozorovat na obr. 28. Úspěšné provedení experimentu bylo možné pozorovat na RLA pozitivní kontroly se 4 nM E2, kde byl pozorován nárůst zhruba 20 %. Naopak antagonist ER tamoxifen potlačil RLA oproti kontrole o 50-60 % ve všech použitých koncentracích.

Výsledky v rámci testovaných látek byly velmi podobné. Rozdílný charakter byl pozorován u látky 7709, kdy ve všech použitých koncentracích byla RLA nad úrovní

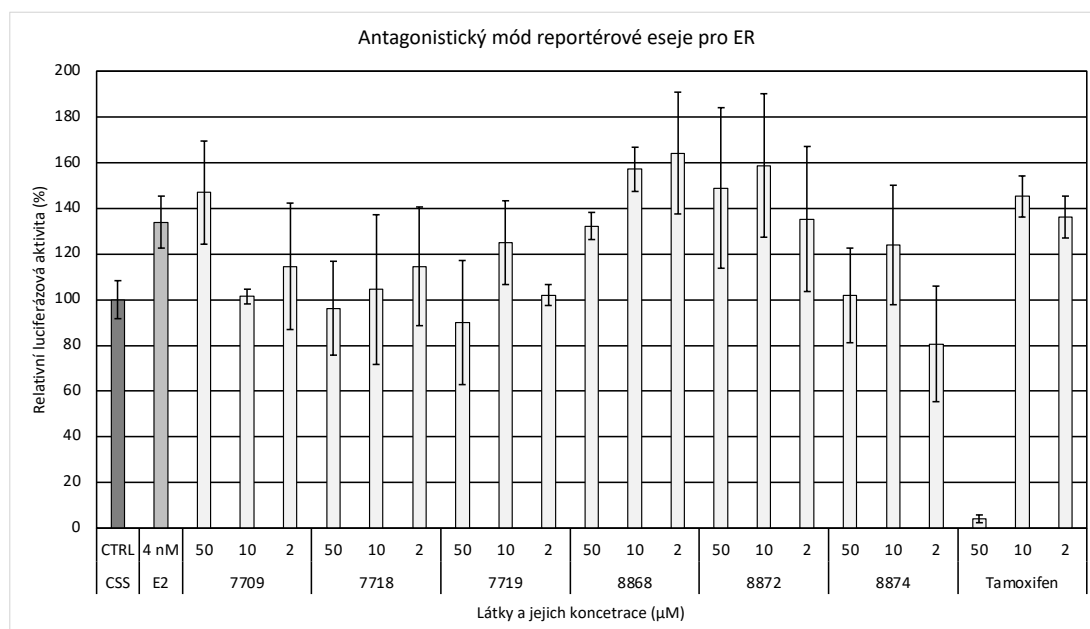


Obr. 28 – Výsledný graf agonistického módu reportérové eseje pro ER. Relativní luciferázová aktivita byla vypočtena poměrem mezi průměrným signálem FNC luciferázy pro daný vzorek ku průměrné hodnotě signálu RNC luciferázy v rámci měřené 96jamkové desky. Tento poměr byl následně normalizován na signál kontroly s prázdnou transfekcí v CSS médiu (100 %).

kontroly a v rámci chybových úseček dosahovala hodnot E2. U ostatních testovaných látek bylo možné pozorovat snížení RLA oproti kontrole u koncentrace 50 μM , a to zhruba na hodnoty 60-70 %, tedy takřka na úroveň tamoxifenu. U zbylých koncentrací byla pozorována RLA na úrovni kontroly, respektive E2. Nejvyšší RLA byla změřena u látky 7719 při koncentraci 10 μM . Závěrem bylo možné konstatovat, že měřené látky nevykazovaly agonistický charakter vůči ER při koncentraci 50 μM . Výjimkou je látka 7709. U nižších koncentracích byly výsledky neprůkazné a látky při nich vykazovaly agonistický charakter, kdy nejvýrazněji tomu bylo u látky 7719. Naopak u látky 8872 RLA nestoupala nad úroveň CSS kontroly při žádné z použitých koncentrací.

Výsledky antagonistického módu lze graficky pozorovat na obr. 29. Úspěšné provedení experimentu bylo možné pozorovat na RLA pozitivní kontroly se 4 nM E2, kde byl pozorován nárůst zhruba 30 % vůči CSS kontrole. Silný antagonistický charakter tamoxifenu byl také prokázán v rámci tohoto experimentu, kde byl pozorován propad RLA na jednotkové hodnoty u 50 μM koncentrace.

U testovaných látek byly výsledky nejednoznačné. U látky 7709, která v agonistickém módu vykazovala obdobný agonistický charakter jako kontrolní E2,



Obr. 29 – Výsledný graf antagonistického módu reportérové eseje pro ER. Ke všem vzorkům s látkami bylo přidáno 4 nM E2. Relativní luciferázová aktivita byla vypočtena poměrem mezi průměrným signálem FNC luciferázy pro daný vzorek ku průměrné hodnotě signálu RNC luciferázy v rámci měřené 96jamkové desky. Tento poměr byl následně normalizován na signál kontroly s prázdnou transfekcí v CSS médiu (100 %).

byl pozorován pokles RLA pod hranici E2 u koncentrací 2 a 10 μM , zatímco u nejvyšší koncentrace 50 μM byla hladina RLA jemně nad hranicí E2. Antagonistický charakter, který byl koncentračně závislý, bylo možné pozorovat u látky 7718, kdy RLA klesala při zvyšující se koncentraci a ve vše případech se pohybovala citelně pod hranicí kontrolního E2, a dokonce při nejvyšší koncentraci klesla hladina RLA pod úroveň CSS kontroly. Látka 7718 tak prokázala koncentračně závislý antagonistický charakter vůči $\text{ER}\alpha$. Obdobný charakter bylo možné pozorovat u látky 7719, kdy ovšem hladina RLA u koncentrace 10 μM byla nad úrovní 120 % CSS kontroly. U látek nové série byl antagonistický charakter možné částečně pozorovat pouze u látky 8874. Vzorky s látkami 8868 a 8872 vykazovaly RLA na úrovni, či nad úrovní, kontrolního E2 ve všech použitých koncentracích. Dle tohoto experimentu tak nebylo možné tyto látky považovat za antagonisty $\text{ER}\alpha$. U látky 8874 klesla RLA na 80 % CSS kontroly u koncentrace 2 μM . Obdobně jako u látky 7719 byl pozorován nárůst RLA u koncentrace 10 μM a opět pokles u koncentrace 50 μM . Látka 8874 a 7719 tak vykazovaly obdobný charakter vůči $\text{ER}\alpha$ v rámci této reportérové eseje.

Výsledky reportérové eseje byly v mnohých případech zatíženy významnou chybovou odchylkou, která z části zpochybňuje naměřené výsledky. O správném navrzení a provedení reportérové eseje hovořily výsledky kontrolního E2 a tamoxifenu, kdy v obou módech byl pozorován očekávaný výsledek, a sice nárůst RLA u E2 a pokles u tamoxifenu. V rámci agonistického módu byl částečný agonistický charakter pozorován u látky 7709, což nebylo jednoznačně vyvráceno u antagonistického módu. U ostatních látek v agonistickém módu byl pozorován výrazný pokles RLA na úroveň tamoxifenu při nejvyšších koncentracích. Antagonistický charakter byl patrný u látek 7718 a 7719 ze staré série a u látky 8874 z nové série. Naopak u látek 8868 a 8872 byl výsledek nejednoznačný a nelze je na základě tohoto experimentu prohlásit za antagonisty $\text{ER}\alpha$.

Reportérovou esej se podařilo optimalizovat v rámci úspěšné transfekce potřebných plazmidů $\text{ER}\alpha$ a FNC+RNC. Taktéž byla vhodně zvolená koncentrace kontroly E2, která vedla k nárůstu RLA. Stejně tak byl vhodně zvolen antagonist $\text{ER}\alpha$ tamoxifen. V rámci dalších optimalizací je nutné se zaměřit na rovnoměrnější detekci signálu RNC luciferázy a na samotný postup přípravy vzorků s testovanými látkami v rámci snížení směrodatné odchylky.

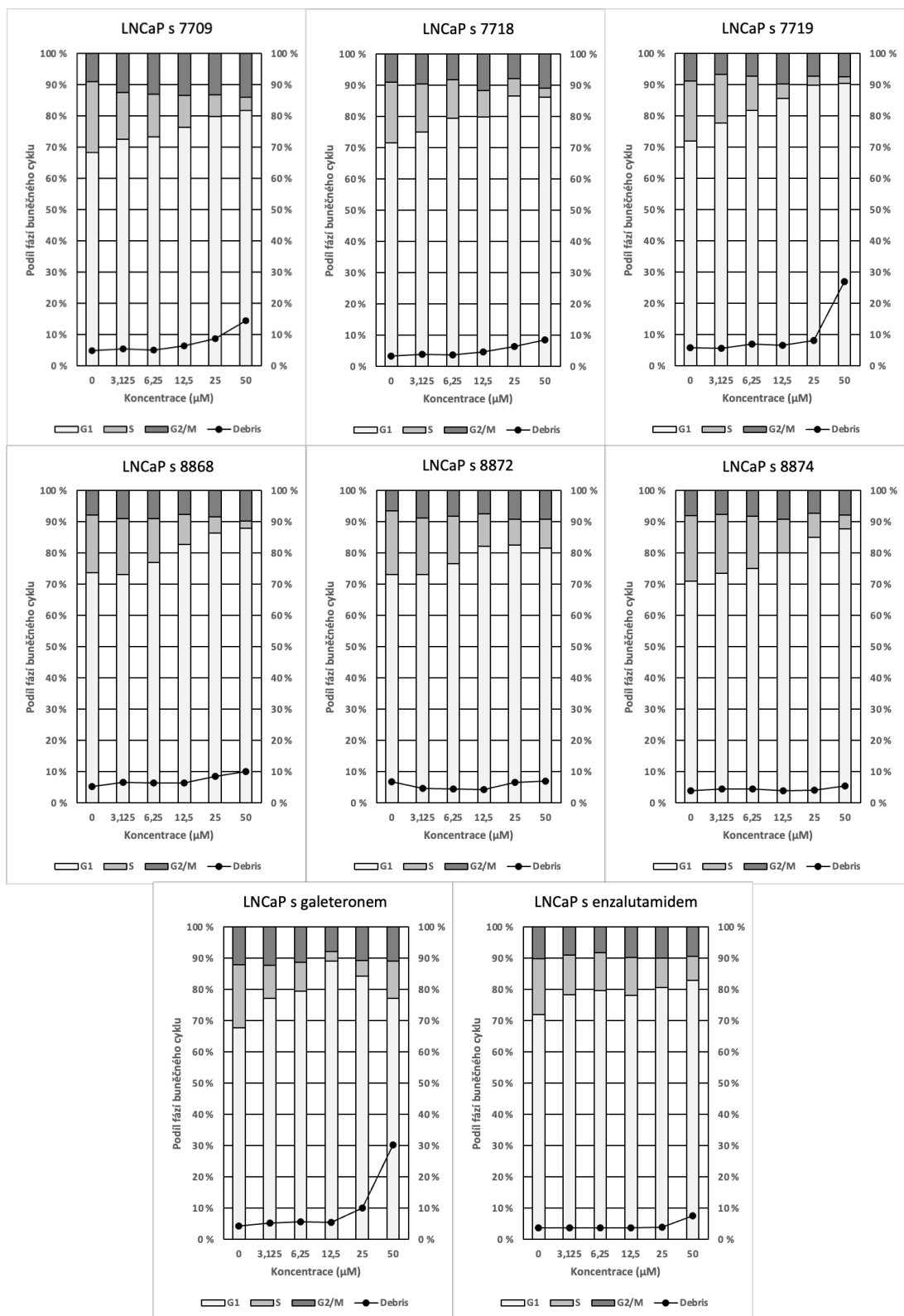
4.8 Vliv vybraných látek na buněčný cyklus u buněčné linie LNCaP

Pro získání komplexnějších informací o výběru studovaných látek byla provedena analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem. Zpracované výsledky ve formě grafů pro jednotlivé látky a dva standardy lze pozorovat na obr. 30 pro buněčnou linii LNCaP.

V případě buněčné linie LNCaP bylo velmi dobře pozorovatelný nárůst podílu buněk v G1 fázi, respektive snižující se podíl S fáze, a to s rostoucí koncentrací použité látky. U kontrolních vzorků bylo ve všech případech cca 70 % buněk v G1 fázi, 20 % buněk v S fázi a 10 % buněk v G2/M fázi. Nejvyšší nárůst buněk v G1 fázi byl u látky 7719, kdy již při 25 μM koncentraci stoupl tento podíl buněk na 90 %. Při maximální koncentraci 50 μM již docházelo k prudkému nárůstu podílu fragmentů buněk, tedy docházelo k odumírání buněčné linie. Obdobné výsledky, co se týče podílu buněk v G1 fázi, bylo možné pozorovat u látek 8868 a 8874, kde se ovšem podařilo dosáhnout podílu buněk v G1 fázi mírně pod 90 %, a to až u koncentrace 50 μM . U látek 7719, 8868 a 8874, ale také u látek 8872 a 7718 nebyl zároveň pozorován nárůst podílu buněk v G2/M fázi. U látky 8872 bylo zároveň možno pozorovat, že maximálního podílu buněk v G1 fázi (cca 80 %) bylo dosaženo již při koncentraci 12,5 μM . Při zvyšující se koncentraci již nedocházelo ke změně podílů fází buněčného cyklu. Pozitivní je, že u této látky nebyl pozorován ani nárůst odumřelých buněk, respektive jejich fragmentů. Nevýrazný G1 blok bylo možné pozorovat také u standardu enzalutamidu, kdy podíl buněk v G1 fázi nepřesáhl 85 % v žádné použité koncentraci, zato byl poměrně stabilní již od nejnižší použité koncentrace a enzalutamid neměl zásadní vliv na podíl odumřelých buněk. Galeteron dosáhl maximálního podílu buněk v G1 fázi při koncentraci 12,5 μM , kdy se tento podíl blížil 90 %. Naopak vyšší koncentrace měly za následek výraznější odumírání buněk a tím i snižující se podíl buněk v G1 fázi. Obecně při pohledu na spojnicovou část grafů (podíl fragmentů buněk) bylo možné usoudit, že látky starší série vykazují podobný charakter jako galeteron, kdy od koncentrace 25 μM docházelo k výraznému nárůstu odumřelých buněk. U látek nové série nebyl tento trend pozorován, podíl fragmentů buněk nepřesáhl 10 % a byl poměrně stabilní napříč koncentracemi.

Závěrem analýzy buněčného cyklu u linie LNCaP bylo možné konstatovat, že všechny studované látky způsobovaly tzv. G1 blok, a tudíž zvyšovaly podíl buněk v G1 fázi na úkor podílu S fáze. Tento efekt bylo možné nejvýrazněji pozorovat u látky 7719, a to při koncentraci 25 μM , kdy při vyšší koncentraci docházelo k výraznému odumírání buněk. Z látek nové série látky 8868 a 8874 prokázaly silnou schopnost G1 bloku. U látky 8872 byl pozorován nižší nárůst podílu buněk v G1 fázi, kdy byl tento nárůst podílu zastaven u koncentrace 12,5 μM a při vyšších koncentracích již nerostl. V rámci životaschopnosti buněk při vyšších koncentracích použitých látek byly výsledky pozitivnější pro látky nové série. Pro přesnější konstatování by bylo potřeba provést test viability.

Výsledky korespondují s odbornou literaturou, kdy bylo v minulosti mnohokrát prokázáno, že AR hraje klíčovou roli při přechodu buňky z G1 do S fáze, a to nezávislé na své transkripční aktivitě (Schiewer a kol., 2012). Vědecká skupina Cifuentes a kol. (2003) již dříve studovala vliv nesteroidního antagonisty bicalutamidu na přechod buněk LNCaP z G1 do S fáze. Tato studie využila metody měření míry inkorporace ^3H -thymidinu do DNA a prokázala, že inhibice aktivity AR bicalutamidem má zásadní vliv na kumulaci buněk v G1 fázi. Předpokládalo se tedy, že studované látky, jakožto antagonisté AR, zabrání buňkám vstoupit do S fáze a způsobí tzv. G1 blok. Tento předpoklad se potvrdil.



Obr. 30 – Výsledné grafy analýzy buněčného cyklu průtokovým cytometrem pro látky 7709, 7718, 7719, 8868, 8872, 8874 a standardy galeteron a enzalutamid u buněčné linie LNCaP. Kontrolní vzorek je v grafu označen koncentrací „0“. „Debris“ značí fragmenty odumřelých buněk.

5 ZÁVĚR

V případě léčby rakoviny prostaty hraje klíčovou roli včasná diagnóza a dostatečná prevence. Pakliže však nemoc naplno propukne, zná dnešní medicína vedle klasických chirurgických a radioterapeutických metod i řadu moderních přístupů. I přes prvotní neúspěchy a rezistence karcinomu na léčbu se vědecké komunitě podařilo vyvinout jak velmi účinné steroidní antiandrogeny, jakým je například galeteron, který našel uplatnění převážně ve vědeckém výzkumu, tak i nesteroidní antiandrogeny, jakým je například enzalutamid, který je dnes využíván při klinické léčbě rakoviny prostaty. Inhibitory N-terminální domény AR, inhibitory koaktivátorů či v současnosti průlomová technologie PROTAC jsou dalšími důkazy velkého pokroku v léčbě karcinomu prostaty a mohou být také odpovědí na AR-Vs či řadu rezistentních mechanismů.

Praktická část se zaměřila na studium dvou sérií látek, které byly deriváty silného antagonisty AR galeteronu, a které pocházely od vědecké skupiny profesora Zhabinského. Látky starší série byly označeny kódy 7707 až 7726 a látky nové série kódy 8867 až 8877. Součástí testování těchto látek byla také reportérová esej pro ER, kde se testoval charakter látek vůči ER. V rámci praktické části byly pro tuto esej úspěšně připraveny transfekované buněčné linie SKRB3, byly navrženy parametry eseje a následně byla celá esej optimalizována. Mimo tuto metodu studie látek byla použita také imunodetekce klíčových proteinů spojených s rakovinou prostaty, jakými byli AR, fAR, PSA a Nkx3.1. Pro bližší určení charakteru látek vůči AR byla použita reportérová esej. V samotném závěru byly ovlivněné buněčné linie karcinomu prostaty testovány na průtokovém cytometru po zjištění podílů buněk v různých fázích buněčného cyklu ve spojitosti s danou látkou.

Pomocí prvotních imunodetekčních experimentů a reportérové eseje pro AR byly vybrány 3 kandidátní látky z každé série na základě jejich antagonistického charakteru vůči AR a schopnosti snižovat hladiny jak samotného AR, tak podřízených proteinů. Ze starší série se jednalo o látky 7709, 7718 a 7719 a z nové série to byly látky 8868, 8872 a 8874. Tyto látky byly podrobeny dalším imunodetekčním experimentům, reportérové eseji pro ER a analýze buněčného cyklu. Všechny kandidátní látky nové série projevily významný antagonistický charakter vůči AR v reportérové eseji a při imunodetekčních experimentech byly u nich pozorovány poklesy hladin klíčových

proteinů, tedy AR, PSA a Nkx3.1 a to jak v plném, tak ve stripovaném médiu. Nejvýraznější efekt byl pozorován u látky 8868. Krom u látky 7709 nebyl u zbylých látek pozorován agonistický charakter vůči ER se zvyšující se koncentrací. V případě antagonistického charakteru vůči ER byly nejvýraznější látky 7718, 7719 a 8874. Naopak látka 8868 neprojevila antagonistický charakter vůči ER. Jak bylo popsáno v teoretické části této práce, pro potenciální lék karcinomu prostaty je klíčové, aby nebyl agonistou ER a v ideálním případě, aby byl jeho antagonistou. Při analýze buněčného cyklu průtokovou cytometrií byl u linie LNCaP pozorován u všech látek G1 blok, což vzhledem k jejich antagonistickému charakteru vůči AR odpovídá výsledkům publikovaných v odborné literatuře (Schiewer a kol., 2012).

Do budoucna je určitě doporučeno pokračovat v optimalizaci reportérové eseje pro ER, která má potenciál stát se standardní metodou na Katedře experimentální biologie Univerzity Palackého v Olomouci pro studium vlivu látek na transkripční aktivitu ER. Samotná transfekce byla dle výsledků této práce plně funkční, ovšem nedostatky byly pozorovány v provádění samotné reportérové eseje. Doporučuje se provést testy viability pro studované látky, což by pomohlo objasnit některá data nejen z analýzy buněčného cyklu.

Závěrem bylo možné konstatovat, že obě série látek obsahovaly slibné antagonisty AR s potenciálem postupu do dalších fází testování. Jednalo se zejména o látky 7709, 7718 a 7719 ze staré série a látky 8868, 8872 a 8874 z nové série, kde látka 8868 vykazovala nejlepší výsledky. Obdobné závěry byly publikovány v práci Rudovich a kol. (2022), kde je látka 8868 označena jako „24j“.

LITERATURA

- Abate-Shen C., Shen M. M., Gelmann E. (2008): Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 76, 717-727.
- Abida W., Cyrta J., Heller G., Prandi D., Armenia J., Coleman I., Cieslik M., Benelli M., Robinson D., Van Allen E. M., Sboner A., Fedrizzi T., Mosquera J. M., Robinson B. D., De Sarkar N., Kunju L. P., Tomlins S., Wu Y. M., Nava Rodrigues D., Loda M., Gopalan A., Reuter V. E., Pritchard C. C., Mateo J., Bianchini D., Miranda S., Carreira S., Rescigno P., Filipenko J., Vinson J., Montgomery R. B., Beltran H., Heath E. I., Scher H. I., Kantoff P. W., Taplin M. E., Schultz N., deBono J. S., Demichelis F., Nelson P. S., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M., Sawyers C. L. (2019): Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 116, 11428-11436.
- Aggarwal R. R., Schweizer M. T., Nanus D. M., Pantuck A. J., Heath E. I., Campeau E., Attwell S., Norek K., Snyder M., Bauman L., Lakhota S., Feng F. Y., Small E. J., Abida W., Alumkal J. J. (2020): A Phase Ib/IIa Study of the Pan-BET Inhibitor ZEN-3694 in Combination with Enzalutamide in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 26, 5338-5347.
- Al-Salama Z. T. (2018): Apalutamide: First Global Approval. *Drugs* 78, 699-705.
- Alyamani M., Li Z., Berk M., Li J., Tang J., Upadhyay S., Auchus R. J., Sharifi N. (2017): Steroidogenic Metabolism of Galeterone Reveals a Diversity of Biochemical Activities. *Cell Chemical Biology* 24, 825-832.
- Andersen R. J., Mawji N. R., Wang J., Wang G., Haile S., Myung J. K., Watt K., Tam T., Yang Y. C., Bañuelos C. A., Williams D. E., McEwan I. J., Wang Y., Sadar M. D. (2010): Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell* 17, 535-546.
- Antao A. M., Ramakrishna S., Kim K. S. (2021): The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. *International Journal of Stem Cells* 14, 168-179.
- Antonarakis E. S., Lu C., Wang H., Luber B., Nakazawa M., Roeser J. C., Chen Y., Mohammad T. A., Chen Y., Fedor H. L., Lotan T. L., Zheng Q., De Marzo A. M., Isaacs J. T., Isaacs W. B., Nadal R., Paller C. J., Denmeade S. R., Carducci M. A., Eisenberger M. A., Luo J. (2014): AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine* 371, 1028-1038.
- Attard G., Reid A. H., Yap T. A., Raynaud F., Dowsett M., Settatree S., Barrett M., Parker C., Martins V., Folkard E., Clark J., Cooper C. S., Kaye S. B., Dearnaley D., Lee G., de Bono J. S. (2008): Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *Journal of Clinical Oncology* 26, 4563-4571.
- Attard G., Parker C., Eeles R. A., Schröder F., Tomlins S. A., Tannock I., Drake C. G., de Bono J.S. (2016): Prostate cancer. *The Lancet* 387, 70-82.
- Auchus R. J., Yu M. K., Nguyen S., Mundle S. D. (2014): Use of Prednisone With Abiraterone Acetate in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Oncologist* 19, 1231-1240.
- Bartonkova I., Novotna A., Dvorak Z. (2015): Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity. *PLoS One* 10, e0121316.
- Bhatia-Gaur R., Donjacour A. A., Sciavolino P. J., Kim M., Desai N., Young P., Norton C. R., Gridley T., Cardiff R. D., Cunha G. R., Abate-Shen C., Shen M. M. (1999): Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes and Development* 13, 966-977.
- Bonkhoff H. (2018): Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *The Prostate* 78, 2-10.

- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brogden R. N., Buckley M. M., Ward A. (1990): Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical profile. *Drugs* 39, 399-437.
- Bubendorf L., Kononen J., Koivisto P., Schraml P., Moch H., Gasser T. C., Willi N., Mihatsch M. J., Sauter G., Kallioniemi O. P. (1999): Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Research* 59, 803-806.
- Butler L., Irani S., Centenera M., Ryan N., Pegg N., Brooks A. N. (2019): Preclinical investigation of a small molecule inhibitor of p300/CBP reveals efficacy in patient-derived prostate tumor explants. *Journal of Clinical Oncology* 37, 16534.
- Cao S., Zhan Y., Dong Y. (2016): Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 23, 199-210.
- Carter B. S., Beaty T. H., Steinberg G. D., Childs B., Walsh P. C. (1992): Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3367-3371.
- Chan S. C., Dehm S. M. (2015): Constitutive activity of the androgen receptor. *Advances in Pharmacology* 70, 327-366.
- 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, 365-380.
- Chen C. D., Welsbie D. S., Tran C., Baek S. H., Chen R., Vessella R., Rosenfeld M. G., Sawyers C. L. (2004): Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature Medicine* 10, 33-39.
- Chen S., Xu Y., Yuan X., Bublely G. J., Balk S. P. (2006): Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15969-15974.
- Chen Y., Clegg N. J., Scher H. I. (2009): Antiandrogens and androgen depleting therapies in prostate cancer: novel agents for an established target. *Lancet Oncology* 10, 981-991.
- Chi K. N., Vaishampayan U. N., Gordon M. S., Smith D. C., Rudsinski E., De Haas-Amatsaleh A., Thapar N., Perabo F., Montgomery R. B. (2017): Efficacy, safety, tolerability, and pharmacokinetics of EPI-506 (ralaniten acetate), a novel androgen receptor (AR) N-terminal domain (NTD) inhibitor, in men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) progressing after enzalutamide and/or abiraterone. *Journal of Clinical Oncology* 35, 5032.
- Cifuentes E., Croxen R., Menon M., Barrack E. R., Reddy G. P. (2003): Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase. *Journal of Cellular Physiology* 195, 337-345.
- Cleutjens C. B., Steketee K., van Eekelen C. C., van der Korput J. A., Brinkmann A. O., Trapman J. (1997): Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. *Endocrinology* 138, 5293-5300.
- Cousin S., Blay J. Y., Garcia I. B., De Bono J. S., Le Tourneau Ch., Moreno V., Triho J. M., Hann Ch. L., Azad A., Im S. A., Ferron-Brady G., Datta A., Wu Y., Horner T., Kremer B. E., Dhar A., O'Dwyer P. J., Shapiro G., Piha-Paul S. A. (2020): Bet inhibitor molibresid for the treatment of advanced solid tumors: Final results from an open-label phase I/II study. *Journal of Clinical Oncology* 38, 3618.
- Crawford E. D., Eisenberger M. A., McLeod D. G., Spaulding J. T., Benson R., Dorr F. A., Blumenstein B. A., Davis M. A., Goodman P. J. (1989): A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 321, 419-424.

- Davis N. B., Ryan C. W., Stadler W. M., Vogelzang N. J. (2005): A phase II study of nilutamide in men with prostate cancer after the failure of flutamide or bicalutamide therapy. *BJU International* 96, 787-790.
- Dawson M. A., Kouzarides T., Huntly B. J. (2012) Targeting epigenetic readers in cancer. *The New England Journal of Medicine* 367, 647-657.
- Debes J. D., Schmidt L. J., Huang H., Tindall D. J. (2002): p300 mediates androgen-independent transactivation of the androgen receptor by interleukin 6. *Cancer research* 62, 5632-5636.
- Debruyne F. M. (2004): Gonadotropin-releasing hormone antagonist in the management of prostate cancer. *Reviews in Urology* 6, 25-32.
- Dijkman G. A., Janknegt R. A., De Reijke T. M., Debruyne F. M. (1997): Long-term efficacy and safety of nilutamide plus castration in advanced prostate cancer, and the significance of early prostate specific antigen normalization. International Anandron Study Group. *The Journal of Urology* 158, 160-163.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.
- Ewing C. M., Ray A. M., Lange E. M., Zuhlke K. A., Robbins C. M., Tembe W. D., Wiley K. E., Isaacs S. D., John D., Wang Y., Bizon C., Yan G., Gielzak M., Partin A. W., Shanmugam V., Izatt T., Sinari S., Craig D. W., Zheng S. L., Walsh P. C., Montie J. E., Xu J., Carpten J. D., Isaacs W. B., Cooney K. A. (2012): Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *The New England Journal of Medicine* 366, 141-149.
- Fizazi K., Massard C., Bono P., Jones R., Kataja V., James N., Garcia J. A., Protheroe A., Tammela T. L., Elliott T., Mattila L., Aspegren J., Vuorela A., Langmuir P., Mustonen M.; ARADES study group. (2014): Activity and safety of ODM-201 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (ARADES): an open-label phase 1 dose-escalation and randomised phase 2 dose expansion trial. *Lancet Oncology* 15, 975-985.
- Friesema E. C., Ganguly S., Abdalla A., Manning Fox J. E., Halestrap A. P., Visser T. J. (2003): Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *Journal of Biological Chemistry* 278, 40128-40135.
- Frigo D. E., Bondesson M., Williams C. (2021): Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays in Biochemistry* 65, 847-856.
- Gottlieb B., Beitel L. K., Nadarajah A., Paliouras M., Trifiro M. (2012): The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation* 33, 887-894.
- Grino P. B., Griffin J. E., Wilson J. D. (1990): Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126, 1165-1172.
- Harrison G. S., Wierman M. E., Nett T. M., Glode L. M. (2004): Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocrine-related Cancer* 11, 725-748.
- Isikbay M., Otto K., Kregel S., Kach J., Cai Y., Vander Griend D. J., Conzen S. D., Szmulewitz R. Z. (2014): Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones and Cancer* 5, 72-89.
- Jia X., Han X. (2023): Targeting androgen receptor degradation with PROTACs from bench to bedside. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 158, 114112.
- Jiang H., Ouyang Q., Yin Y., Tong Z., Shen K., Yuan Z., Geng C., Liu Y., Song G., Ran R., Li W., Qu Q., Wang M., Meng L., Tong Y., Li H. (2022): Proxalutamide in patients with AR-positive metastatic breast cancer: Results from an open-label multicentre phase Ib study and biomarker analysis. *European Journal of Cancer* 176, 1-12.
- Johns L. E., Houlston R. S. (2003): A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU International* 91, 789-794.

- Jorda R., Bučková Z., Řezníčková E., Bouchal J., Kryštof V. (2018): Selective inhibition reveals cyclin-dependent kinase 2 as another kinase that phosphorylates the androgen receptor at serine 81. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research* 1865, 354-363.
- Jorda R., Řezníčková E., Kielczewska U., Maj J., Morzycki J. W., Siergiejczyk L., Bazgier V., Berka K., Rárová L., Wojtkielewicz A. (2019): Synthesis of novel galeterone derivatives and evaluation of their in vitro activity against prostate cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 179, 483-492.
- Keam S. J. (2023): Rezvilutamide: First Approval. *Drugs* 83, 189-193.
- Kim J., Coetzee G. A. (2004): Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 233-241.
- Kinoshita H., Shi Y., Sandefur C., Meisner L. F., Chang C., Choon A., Reznikoff C. R., Bova G. S., Friedl A., Jarrard D. F. (2000): Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Research* 60, 3623-3630.
- Kirby R. S., Fitzpatrick J. M., Clarke N. (2009): Abarelix and other gonadotrophin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *BJU International* 104, 1580-1584.
- Kocák I. (2020): Léčba nemetastatického kastročně rezistentního karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi* 21, 156-159.
- Kopecký J., Povová J., Janout V. (2015): Přínos (-2)proPSA a PHI pro diagnostiku karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi* 16, 106-108.
- Koryakina Y., Ta H. Q., Gioeli D. (2014): Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocrine-Related Cancer* 21, 131-145.
- Kote-Jarai Z., Leongamornlert D., Saunders E., Tymrakiewicz M., Castro E., Mahmud N., Guy M., Edwards S., O'Brien L., Sawyer E., Hall A., Wilkinson R., Dadaev T., Goh C., Easton D.; UKGPCS Collaborators, Goldgar D., Eeles R. (2011): BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *British Journal of Cancer* 105, 1230-1234.
- Kranzbühler B., Salemi S., Mortezaei A., Sulser T., Eberli D. (2019): Combined N-terminal androgen receptor and autophagy inhibition increases the antitumor effect in enzalutamide sensitive and enzalutamide resistant prostate cancer cells. *The Prostate* 79, 206-214.
- Kucuk O., Fisher E., Moinpour C. M., Coleman D., Hussain M. H., Sartor A. O., Chatta G. S., Lowe B. A., Eisenberger M. A., Crawford E. D. (2001): Phase II trial of bicalutamide in patients with advanced prostate cancer in whom conventional hormonal therapy failed: a Southwest Oncology Group study (SWOG 9235). *Urology* 58, 53-58.
- Kwegyir-Afful A. K., Ramalingam S., Purushottamachar P., Ramamurthy V. P., Njar V. C. (2015): Galeterone and VNPT55 induce proteasomal degradation of AR/AR-V7, induce significant apoptosis via cytochrome c release and suppress growth of castration resistant prostate cancer xenografts in vivo. *Oncotarget* 6, 27440-27460.
- Kwegyir-Afful A. K., Bruno R. D., Purushottamachar P., Murigi F. N., Njar V. C. (2016): Galeterone and VNPT55 disrupt Mnk-eIF4E to inhibit prostate cancer cell migration and invasion. *The FEBS Journal* 283, 3898-3918.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laitinen S., Martikainen P. M., Tammela T. L., Visakorpi T. (2007): Cellular changes in prostate cancer cells induced by intermittent androgen suppression. *European Urology* 52, 725-732.
- Le Moigne R., Banuelos C. A., Mawji N. R., Tam T., Wang J., Jian K., Andersen R. J., Cesano A., Sadar M. D., Zhou H. J., Virsik P. (2020): IND candidate EPI-7386 is an N-terminal domain androgen receptor inhibitor in development for the treatment of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 38, 142.

- Ledet E. M., Lilly M. B., Sonpavde G., Lin E., Nussenzweig R. H., Barata P. C., Yandell M., Nagy R. J., Kiedrowski L., Agarwal N., Sartor O. (2020): Comprehensive Analysis of AR Alterations in Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Prostate Cancer. *The Oncologist* 25, 327-333.
- Leongamornlert D., Mahmud N., Tymrakiewicz M., Saunders E., Dadaev T., Castro E., Goh C., Govindasami K., Guy M., O'Brien L., Sawyer E., Hall A., Wilkinson R., Easton D.; UKGPCS Collaborators, Goldgar D., Eeles R., Kote-Jarai Z. (2012): Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *British Journal of Cancer* 106, 1697-1701.
- Lewin J., Soria J. C., Stathis A., Delord J. P., Peters S., Awada A., Aftimos P. G., Bekradda M., Rezai K., Zeng Z., Hussain A., Perez S., Siu L. L., Massard C. (2018): Phase Ib Trial With Birabresib, a Small-Molecule Inhibitor of Bromodomain and Extraterminal Proteins, in Patients With Selected Advanced Solid Tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36, 3007-3014.
- Li M., Zhi Y., Liu B., Yao Q. (2023): Advancing Strategies for Proteolysis-Targeting Chimera Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 66, 2308-2329.
- 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, 347-351.
- Loddick S. A., Ross S. J., Thomason A. G., Robinson D. M., Walker G. E., Dunkley T. P., Brave S. R., Broadbent N., Stratton N. C., Trueman D., Mouchet E., Shaheen F. S., Jacobs V. N., Cumberbatch M., Wilson J., Jones R. D., Bradbury R. H., Rabow A., Gaughan L., Womack C., Barry S. T., Robson C. N., Critchlow S. E., Wedge S. R., Brooks A. N. (2013): AZD3514: a small molecule that modulates androgen receptor signaling and function in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 1715-1727.
- Lombardi A. P. G., Vicente C. M., Porto C. S. (2020): Estrogen Receptors Promote Migration, Invasion and Colony Formation of the Androgen-Independent Prostate Cancer Cells PC-3 Through β -Catenin Pathway. *Frontiers in Endocrinology* 11, 184.
- Luo J., Attard G., Balk S. P., Bevan C., Burnstein K., Cato L., Cherkasov A., De Bono J. S., Dong Y., Gao A. C., Gleave M., Heemers H., Kanayama M., Kittler R., Lang J. M., Lee R. J., Logothetis C. J., Matusik R., Plymate S., Sawyers C. L., Selth L. A., Soule H., Tilley W., Weigel N. L., Zoubeidi A., Dehm S. M., Raj G. V. (2018): Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. *European urology* 73, 715-723.
- MacInnis R. J., Antoniou A. C., Eeles R. A., Severi G., Guy M., McGuffog L., Hall A. L., O'Brien L. T., Wilkinson R. A., Dearnaley D. P., Arden-Jones A. T., Horwich A., Khoo V. S., Parker C. C., Huddart R. A., McCredie M. R., Smith C., Southey M. C., Staples M. P., English D. R., Hopper J. L., Giles G. G., Easton D. F. (2010): Prostate cancer segregation analyses using 4390 families from UK and Australian population-based studies. *Genetic Epidemiology* 34, 42-50.
- Matias P. M., Donner P., Coelho R., Thomaz M., Peixoto C., Macedo S., Otto N., Joschko S., Scholz P., Wegg A., Bäsler S., Schäfer M., Egner U., Carrondo M. A. (2000): Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *Journal of Biological Chemistry* 275, 26164-26171.
- Matoušková M. (2008): Karcinom prostaty. *Klinická onkologie* 21, 280-288.
- McClurg U. L., Azizyan M., Dransfield D. T., Namdev N., Chit N. C. T. H., Nakjang S., Robson C. N. (2018): The novel anti-androgen candidate galeterone targets deubiquitinating enzymes, USP12 and USP46, to control prostate cancer growth and survival. *Oncotarget* 9, 24992-25007.
- McCoy J., Goren A., Cadegiani F. A., Vaño-Galván S., Kovacevic M., Situm M., Shapiro J., Sinclair R., Tosti A., Stanimirovic A., Fonseca D., Dorner E., Onety D. C., Zimmerman R. A., Wambier C. G. (2021): Proxalutamide Reduces the Rate of Hospitalization for COVID-19 Male Outpatients: A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Trial. *Frontiers in Medicine* 8, 668698.

- McKay R. R., Werner L., Fiorillo M., Roberts J., Heath E. I., Bublely G. J., Montgomery R. B., Taplin M. E. (2017): Efficacy of Therapies After Galeterone in Patients With Castration-resistant Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer* 15, 463-471.
- 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, 12007.
- Montgomery B., Eisenberger M. A., Rettig M. B., Chu F., Pili R., Stephenson J. J., Vogelzang N. J., Koletsky A. J., Nordquist L. T., Edenfield W. J., Mamlouk K., Ferrante K. J., Taplin M. E. (2016): Androgen Receptor Modulation Optimized for Response (ARMOR) Phase I and II Studies: Galeterone for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: and official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 1356-1363.
- Mouridsen H., Palshof T., Patterson J., Battersby L. (1978): Tamoxifen in advanced breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 5, 131-141.
- Nakzawa M., Antonarakis E. S., Luo J. (2014): Androgen receptor splice variants in the era of enzalutamide and abiraterone. *Hormones and cancer* 5, 265-273.
- Neklesa T., Snyder L., Willard R. R., Vitale N., Pizzano J., Gordon D., Bookbinder M., Macaluso J., Dong H., Ferraro C., Gan W., Wang J., Crews C., Houston J., Crew A., Taylor I. (2019): ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 37, 259.
- Omlin A., Jones R. J., van der Noll R., Satoh T., Niwakawa M., Smith S. A., Graham J., Ong M., Finkelman R. D., Schellens J. H., Zivi A., Crespo M., Riisnaes R., Nava-Rodrigues D., Malone M. D., Dive C., Sloane R., Moore D., Alumkal J. J., Dymond A., Dickinson P. A., Ranson M., Clack G., de Bono J., Elliott T. (2015): AZD3514, an oral selective androgen receptor down-regulator in patients with castration-resistant prostate cancer - results of two parallel first-in-human phase I studies. *Investigational New Drugs* 33, 679-690.
- Orme L. M., Bond J. D., Humphrey M. S., Zacharin M. R., Downie P. A., Jamsen K. M., Mitchell S. L., Robinson J. M., Grapsas N. A., Ashley D. M. (2003): Megestrol acetate in pediatric oncology patients may lead to severe, symptomatic adrenal suppression. *Cancer* 98, 397-405.
- Osguthorpe D. J., Hagler A. T. (2011): Mechanism of androgen receptor antagonism by bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Biochemistry* 50, 4105-4113.
- Pan D., Kocherginsky M., Conzen S. D. (2011): Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Research* 71, 6360-6370.
- Pan W., Zhang Z., Kimball H., Qiu F., Lee G-S. M., Choueiri T. K., Kantoff P. W. (2020): The effect of abiraterone acetate treatment on CREB and the development of abiraterone acetate resistance in prostate cancer cells. *Journal of Clinical Oncology* 38, 177.
- Pawar A., Gollavilli P. N., Wang S., Asangani I. A. (2018): Resistance to BET Inhibitor Leads to Alternative Therapeutic Vulnerabilities in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell reports* 22, 2236-2245.
- Pereira de Jesus-Tran K., Côté P. L., Cantin L., Blanchet J., Labrie F., Breton R. (2006): Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein science: a publication of the Protein Society* 15, 987-999.
- Peřina M., Kiss A., Meryák E., Mada L., Schneider G., Jorda R. (2023a): Synthesis of hydrocortisone esters targeting androgen and glucocorticoid receptors in prostate cancer in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 229, 106269.
- Peřina M., Kiss M. A., Mótýán G., Szczyrbová E., Eliáš M., Študent V. Jr., Kurfürstová D., Kovalová M., Mada L., Bouchal J., Frank É., Jorda R. (2023b): A-ring-fused pyrazoles of dihydrotestosterone targeting

prostate cancer cells via the downregulation of the androgen receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry* 249, 115086.

Petrylak P. P., Gao X., Vogelzang N. J., Garfield M. H., Tylor I., Moore M. D., Peck R. A., Burris H. A. (2020): First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). *Journal of Clinical Oncology* 38, 3500.

Piha-Paul S. A., Hann C. L., French C. A., Cousin S., Braña I., Cassier P. A., Moreno V., de Bono J. S., Harward S. D., Ferron-Brady G., Barbash O., Wyce A., Wu Y., Horner T., Annan M., Parr N. J., Prinjha R. K., Carpenter C. L., Hilton J., Hong D. S., Haas N. B., Markowski M. C., Dhar A., O'Dwyer P. J., Shapiro G. I. (2019): Phase 1 Study of Molibresib (GSK525762), a Bromodomain and Extra-Terminal Domain Protein Inhibitor, in NUT Carcinoma and Other Solid Tumors. *JNCI cancer spectrum* 4, pkz093.

Pond G. R., Armstrong A. J., Galsky M. D., Wood B. A., Leopold L., Sonpavde G. (2013): Efficacy of docetaxel-based chemotherapy following ketoconazole in metastatic castration-resistant prostate cancer: implications for prior therapy in clinical trials. *Urologic Oncology* 31, 1457-1463.

Pont A., Williams P. L., Azhar S., Reitz R. E., Bochra C., Smith E. R., Stevens D. A. (1982): Ketoconazole blocks testosterone synthesis. *Archives of Internal Medicine* 142, 2137-2140.

Porzycki P., Ciszkowicz E. (2020): Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. *Central European Journal of Urology* 73, 300-306.

Puhr M., Hofer J., Eigentler A., Ploner C., Handle F., Schaefer G., Kroon J., Leo A., Heidegger I., Eder I., Culig Z., Van der Pluijm G., Klocker H. (2018): The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association of Cancer Research* 24, 927-938.

Qu F., Gu Y., Wang Q., He M., Zhou F., Sun J., Wang G., Peng Y. (2020): Metabolomic profiling to evaluate the efficacy of proxalutamide, a novel androgen receptor antagonist, in prostate cancer cells. *Investigational New Drugs* 38, 1292-1302.

Ramírez-de-Arellano A., Pereira-Suárez A. L., Rico-Fuentes C., López-Pulido E. I., Villegas-Pineda J. C., Sierra-Díaz E. (2022): Distribution and Effects of Estrogen Receptors in Prostate Cancer: Associated Molecular Mechanisms. *Frontiers in Endocrinology* 12, 811578.

Ricke W. A., McPherson S. J., Bianco J. J., Cunha G. R., Wang Y., Risbridger G. P. (2008): Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB Journal* 22, 1512-1520.

Rudovich A. S., Peřina M., Krech A. V., Novozhilova M. Y., Tumilovich A. M., Shkel T. V., Grabovec I. P., Kvasnica M., Mada L., Zaviialova M. G., Mekhtiev A. R., Jorda R., Zhabinskii V. N., Khripach V. A. (2022): Synthesis and Biological Evaluation of New Isoxazolyl Steroids as Anti-Prostate Cancer Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 13534.

Sakamoto K. M. (2010): Protacs for treatment of cancer. *Pediatric research* 67, 505-508.

Saranyutanon S., Srivastava S. K., Pai S., Singh S., Singh A. P. (2019): Therapies Targeted to Androgen Receptor Signaling Axis in Prostate Cancer: Progress, Challenges, and Hope. *Cancers (Basel)* 12, 51.

Scher H. I., Fizazi K., Saad F., Taplin M. E., Sternberg C. N., Miller K., de Wit R., Mulders P., Chi K. N., Shore N. D., Armstrong A. J., Flaig T. W., Fléchon A., Mainwaring P., Fleming M., Hainsworth J. D., Hirmand M., Selby B., Seely L., de Bono J. S.; AFFIRM Investigators. (2012): Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* 367, 1187-1197.

Schiewer M. J., Augello M. A., Knudsen K. E. (2012): The AR dependent cell cycle: mechanisms and cancer relevance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 352, 34-45.

- Scholz M., Jennrich R., Strum S., Brosman S., Johnson H., Lam R. (2005): Long-term outcome for men with androgen independent prostate cancer treated with ketoconazole and hydrocortisone. *The Journal of Urology* 173, 1947-1952.
- Setlur S. R., Mertz K. D., Hoshida Y., Demichelis F., Lupien M., Perner S., Sboner A., Pawitan Y., Andr n O., Johnson L. A., Tang J., Adami H. O., Calza S., Chinnaiyan A. M., Rhodes D., Tomlins S., Fall K., Mucci L. A., Kantoff P. W., Stampfer M. J., Andersson S. O., Varenhorst E., Johansson J. E., Brown M., Golub T. R., Rubin M. A. (2008): Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 100 815-825.
- Shao G., Bao J., Pan X., He X., Qi Y., Zhang J. Z. H. (2021): Analysis of the binding modes of the first- and second-generation antiandrogens with respect to F876L mutation. *Chemical Biology and Drug Design* 98, 60-72.
- Sharma A., Yeow W. S., Ertel A., Coleman I., Clegg N., Thangavel C., Morrissey C., Zhang X., Comstock C. E., Witkiewicz A. K., Gomella L., Knudsen E. S., Nelson P. S., Knudsen K. E. (2010): The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 4478-4492.
- Shiota M., Akamatsu S., Tsukahara S., Nagakawa S., Matsumoto T., Eto M. (2022): Androgen receptor mutations for precision medicine in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 29, 143-155.
- Siegel R. L., Miller K. D., Fuchs H. E. (2021): *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 71, 7-33.
- Small E. J., Halabi S., Dawson N. A., Stadler W. M., Rini B. I., Picus J., Gable P., Torti F. M., Kaplan E., Vogelzang N. J. (2004): Antiandrogen withdrawal alone or in combination with ketoconazole in androgen-independent prostate cancer patients: a phase III trial (CALGB 9583). *Journal of Clinical Oncology* 22, 1025-1033.
- Small E. J., Saad F., Chowdhury S., Oudard S., Hadaschik B. A., Graff J. N., Olmos D., Mainwaring P. N., Lee J. Y., Uemura H., De Porre P., Smith A., Brookman-May S. D., Li S., Zhang K., Rooney O. B., Lopez-Gitlitz A., Smith M. R. (2020): Final survival results from SPARTAN, a phase III study of apalutamide (APA) versus placebo (PBO) in patients (pts) with nonmetastatic castration-resistant prostate cancer (nmCRPC). *ASCO 2020; Virtual. Journal of Clinical Oncology* 38, 5516.
- Smith M. R., Antonarakis E. S., Ryan C. J., Berry W. R., Shore N. D., Liu G., Alumkal J. J., Higano C. S., Chow Maneval E., Bandekar R., de Boer C. J., Yu M. K., Rathkopf D. E. (2016): Phase 2 Study of the Safety and Antitumor Activity of Apalutamide (ARN-509), a Potent Androgen Receptor Antagonist, in the High-risk Nonmetastatic Castration-resistant Prostate Cancer Cohort. *European Urology* 70, 963-970.
- Snarterse G., Mies R., van Weerden W. M., French P. J., Jonker J. W., Houtsmuller A. B., van Royen M. E., Visser J. A., Hofland J. (2022): Androgen receptor mutations modulate activation by 11-oxygenated androgens and glucocorticoids. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*. doi:10.1038/s41391-022-00491-z.
- Spriano F., Gaudio E., Cascione L., Tarantelli C., Melle F., Motta G., Priebe V., Rinaldi A., Golino G., Mensah A. A., Aresu L., Zucca E., Pileri S., Witcher M., Brown B., Wahlestedt C., Giles F., Stathis A., Bertoni F. (2020): Antitumor activity of the dual BET and CBP/EP300 inhibitor NEO2734. *Blood advances* 4, 4124-4135.
- Steinkamp M. P., O'Mahony O. A., Brogley M., Rehman H., Lapensee E. W., Dhanasekaran S., Hofer M. D., Kuefer R., Chinnaiyan A., Rubin M. A., Pienta K. J., Robins D. M. (2009): Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Research* 69, 4434-4442.
- Sternberg C. N., Fizazi K., Saad F., Shore N. D., De Giorgi U., Penson D. F., Ferreira U., Efstathiou E., Madziarska K., Kolinsky M. P., Cubero D. I. G., Noerby B., Zohren F., Lin X., Modelska K., Sugg J., Steinberg J., Hussain M.; PROSPER Investigators. (2020): Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 382, 2197-2206.

- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209-249.
- Takeda A. N., Pinon G. M., Bens M., Fagart J., Rafestin-Oblin M. E., Vandewalle A. (2007): The synthetic androgen methyltrienolone (r1881) acts as a potent antagonist of the mineralocorticoid receptor. *Molecular pharmacology* 71, 473-482.
- Tan M. H., Li J., Xu H. E., Melcher K., Yong E. L. (2015): Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 36, 3-23.
- Taplin M. E., Rajeshkumar B., Halabi S., Werner C. P., Woda B. A., Picus J., Stadler W., Hayes D. F., Kantoff P. W., Vogelzang N. J., Small E. J. (2003): Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *Journal of Clinical Oncology* 21, 2673-2678.
- Taplin M. E., Antonarakis E. S., Ferrante K. J., Horgan K., Blumenstein B., Saad F., Luo J., de Bono J.S. (2019): Androgen Receptor Modulation Optimized for Response-Splice Variant: A Phase 3, Randomized Trial of Galeterone Versus Enzalutamide in Androgen Receptor Splice Variant-7-expressing Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European urology* 76, 843-851.
- Taylor B. S., Schultz N., Hieronymus H., Gopalan A., Xiao Y., Carver B. S., Arora V. K., Kaushik P., Cerami E., Reva B., Antipin Y., Mitsiades N., Landers T., Dolgalev I., Major J. E., Wilson M., Socci N. D., Lash A. E., Heguy A., Eastham J. A., Scher H. I., Reuter V. E., Scardino P. T., Sander C., Sawyers C. L., Gerald W. L. (2010): Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22.
- Thompson D., Easton D.; Breast Cancer Linkage Consortium (2001): Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *The American Journal of Human Genetics* 68, 410-419.
- Thorpe S. C., Azmatullah S., Fellows G. J., Gingell J. C., O'Boyle P. J. (1996): A prospective, randomised study to compare goserelin acetate (Zoladex) versus cyproterone acetate (Cyprostat) versus a combination of the two in the treatment of metastatic prostatic carcinoma. *European Urology* 29, 47-54.
- Tieva A., Bergh A., Damber J. E. (2003): The clinical implications of the difference between castration, gonadotrophin releasing-hormone (GnRH) antagonists and agonist treatment on the morphology and expression of GnRH receptors in the rat ventral prostate. *BJU International* 91, 227-233.
- Tolkach Y., Joniau S., Van Poppel H. (2013): Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor agonists vs antagonists: a matter of the receptors? *BJU International* 111, 1021-1030.
- Trachtenberg J., Pont A. (1984): Ketoconazole therapy for advanced prostate cancer. *Lancet* 2, 433-435.
- Velho P. I., Bastos D. A., Antonarakis E. S. (2021): New Approaches to Targeting the Androgen Receptor Pathway in Prostate Cancer. *Clinical Advances in Hematology and Oncology* 19, 228-240.
- Waltering K. K., Urbanucci A., Visakorpi T. (2012): Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 360, 38-43.
- Wang Z., Wang Y., Zhang J., Hu Q., Zhi F., Zhang S., Mao D., Zhang Y., Liang H. (2017): Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Molecular Medicine Reports* 16, 5450-5458.
- Wen S., Niu Y., Huang H. (2020): Posttranslational regulation of androgen dependent and independent androgen receptor activities in prostate cancer. *Asian Journal of Urology* 7, 203-218.
- Wilson A. C., Meethal S. V., Bowen R. L., Atwood C. S. (2007): Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16, 1851-1863.
- Wyce A., Degenhardt Y., Bai Y., Le B., Korenchuk S., Crouthame M. C., McHugh C. F., Vessella R., Creasy C. L., Tummino P. J., Barbash O. (2013): Inhibition of BET bromodomain proteins as a therapeutic approach in prostate cancer. *Oncotarget* 4, 2419-2429.
- Yamaoka M., Hara T., Hitaka T., Kaku T., Takeuchi T., Takahashi J., Asahi S., Miki H., Tasaka A., Kusaka M. (2012): Orteronel (TAK-700), a novel non-steroidal 17,20-lyase inhibitor: effects on steroid

synthesis in human and monkey adrenal cells and serum steroid levels in cynomolgus monkeys. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 129, 115-128.

Yan T. Z., Jin F. S., Xie L. P., Li L. C. (2008): Relationship between glucocorticoid receptor signal pathway and androgen-independent prostate cancer. *Urologia Internationalis* 81, 228-233.

Yan Y., Ma J., Wang D., Lin D., Pang X., Wang S., Zhao Y., Shi L., Xue H., Pan Y., Zhang J., Wahlestedt C., Giles F. J., Chen Y., Gleave M. E., Collins C. C., Ye D., Wang Y., Huang H. (2019): The novel BET-CBP/p300 dual inhibitor NEO2734 is active in SPOP mutant and wild-type prostate cancer. *EMBO Molecular Medicine* 11, 10659.

Yu Z., Cai C., Gao S., Simon N. I., Shen H. C., Balk S. P. (2014): Galeterone prevents androgen receptor binding to chromatin and enhances degradation of mutant androgen receptor. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association of Cancer Research* 20, 4075-4085.

Zhu H., Garcia J. A. (2013): Targeting the adrenal gland in castration-resistant prostate cancer: a case for orteronel, a selective CYP-17 17,20-lyase inhibitor. *Current Oncology Reports* 15, 105-112.