

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



## **Aktivace aryluhlovodíkového receptoru fluorovanými deriváty indolu a dopad na aktivitu androgenového receptoru v nádorové prostatické linii 22Rv1**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Karolina Bolková</b>
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.</b>
Rok:	2023

Prohlá-uji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatn s vyzna ením v-ech poufítých pramen a spoluautorství. Souhlasím se zve ejn ním diplomové práce podle zákona . 111/1998 Sb., o vysokých -kolách, ve zn ní pozd j-ích p edpis . Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona . 121/2000 Sb., autorský zákon, ve zn ní pozd j-ích p edpis .

V Olomouci dne í .....

í .....

Podpis studenta

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému vedoucímu diplomové práce, panu doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, trpělivost, ochotný a vstřícný přístup, vnovaný čas a předané zkušenosti. Dále bych chtěla poděkovat ostatním zaměstnancům Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za jejich trpělivost, ochotu, pomoc a cenné rady během práce na experimentální části.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Karolina Bolková
Název práce	Aktivace aryluhlovodíkového receptoru fluorovanými deriváty indolu a dopad na aktivitu androgenového receptoru v nádorové prostatické linii 22Rv1
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá působením fluorovaných derivátů indolu na aryluhlovodíkový receptor (AhR) a jeho následným dopadem na aktivitu androgenového receptoru (AR) v buňkách nádorové prostatické linie 22Rv1. V první kapitole teoretické části je popsána problematika rakoviny prostaty od jejích mechanismů, po diagnostiku a léčbu. Následující dvě kapitoly jsou věnovány AhR a AR. Poslední kapitola se pak zaměřuje na výskyt a funkce indolu. V experimentální části byla po vystavení buněk testovaným látkám stanovena aktivita AhR a AR metodou reporter gene assay, hladina exprese cílových genů AhR a AR metodou qPCR a detekována hladina proteinů AhR a AR metodou western blotting.

Klíčová slova	rakovina prostaty, AhR, AR, fluorindoly, 22Rv1
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Karolina Bolková
Title	Bc.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	doc.Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation	2023

### **Abstract**

This diploma thesis deals with the exposure of fluorinated indole derivatives on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its subsequent impact on the activity of the androgen receptor (AR) in cells of the prostate tumor line 22Rv1. In the first chapter of the theoretical part, the problematics of prostate cancer is described, from its mechanisms to diagnostics and treatment. The next two chapters are devoted to AhR and AR. The last chapter then focuses on the occurrence and functions of indoles. In the experimental part, after exposure of the cells to the tested substances, the activity of AhR and AR was determined by the reporter gene assay, the level of expression of AhR and AR target genes by the qPCR method, and the level of AhR and AR proteins was detected by the western blotting.

Keywords	prostate cancer, AhR, AR, fluoroindoles, 22Rv1
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOU AASNÝ STAV ETNÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	Rakovina prostaty .....	2
2.1.1	Prostata.....	2
2.1.2	etnost rakoviny prostaty .....	3
2.1.3	Souvislost androgen s rakovinou prostaty .....	4
2.1.4	Diagnostika rakoviny prostaty.....	7
2.1.5	Lé ba rakoviny prostaty.....	8
2.2	Aryluhlovodíkový receptor .....	10
2.2.1	Struktura aryluhlovodíkového receptoru .....	10
2.2.2	Signalizace aryluhlovodíkového receptoru.....	11
2.2.3	Ligandy aryluhlovodíkového receptoru.....	13
2.2.4	Ubikvitin E3 ligasa .....	13
2.3	Androgenní receptor .....	15
2.3.1	Struktura androgenního receptoru .....	15
2.3.2	Signalizace androgenního receptoru.....	16
2.3.3	Ligandy androgenního receptoru.....	18
2.4	Indoly .....	19
2.4.1	Syntéza indol .....	19
2.4.2	Funkce indol .....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ÁST .....	21
3.1	Materiál .....	21
3.1.1	Biologický .....	21
3.1.2	Chemikálie .....	21
3.1.3	P ipravované roztoky.....	24
3.1.4	Pom cky.....	25
3.1.5	P ístroje .....	26
3.1.6	Software .....	27
3.2	Metody .....	27
3.2.1	Metodika práce .....	27
3.2.2	Rozmrazení bun k .....	28
3.2.3	Pasáflování bun k .....	28
3.2.4	Po ítání a vysetí bun k .....	29

3.2.5	Inkubace buněk s testovanými látkami.....	29
3.2.6	Reporter gene assay .....	30
3.2.7	Izolace RNA.....	30
3.2.8	Reverzní transkripce .....	31
3.2.9	qPCR.....	32
3.2.10	Izolace protein .....	33
3.2.11	SDS-PAGE .....	33
3.2.12	Western blotting.....	35
3.2.13	Reblotting .....	35
4	VÝSLEDKY.....	37
4.1	Reporter gene assay .....	37
4.1.1	Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru v agonistickém módu.....	37
4.1.2	Stanovení aktivity androgenního receptoru v agonistickém módu .....	38
4.1.3	Stanovení aktivity androgenního receptoru v antagonistickém módu.....	39
4.2	qPCR.....	40
4.2.1	Stanovení hladiny exprese genu CYP1A1 .....	40
4.2.2	Stanovení hladiny exprese genu FKBP5.....	41
4.2.3	Stanovení hladiny exprese genu KLK3 .....	42
4.3	Western blotting.....	43
4.3.1	Detekce hladiny proteinu AhR .....	43
4.3.2	Detekce hladiny proteinu AR .....	44
5	DISKUSE .....	46
6	ZÁVĚR.....	50
7	LITERATURA.....	51
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	57

## **CÍLE PRÁCE:**

### **Teoretická část**

Vypracování rešerše na téma diplomové práce

Vypracování diplomové práce a multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

### **Experimentální část**

Stanovení aktivity aryluhlovodíkového (AhR) a androgenního receptoru (AR) v linii 22Rv1 metodou reporter gene assay

Stanovení hladiny exprese cílových genů AhR a AR v prostatické linii 22Rv1

Detekce hladiny proteinů AhR a AR metodou western blotting



# 1 ÚVOD

Rakovina prostaty je jedním z nejčastějších typů rakoviny, které se vyskytují u mužů. Růst a celková progresse karcinomu prostaty je v těle závislá na působení androgenních hormonů, jejichž funkci zprostředkovává androgenní receptor. Možným způsobem léčby je androgenní deprivace terapie, která je založená na redukci hladiny androgenních hormonů, což lze dosáhnout mimo jiné působením dráhy aktivace androgenního receptoru androgeny s využitím antiandrogenů. Avšak v mnoha případech rakoviny prostaty po této terapii dochází k rozvoji rakoviny na androgen-resistentní a její progresse nastává i za nízkých hladin androgenních hormonů. Nicméně i v tomto případě se downregulace androgenního receptoru ukázala jako efektivní mechanismus v léčbě rakoviny prostaty. Další rolí v downregulaci androgenního receptoru by mohl hrát aryluhlovodíkový receptor. Aryluhlovodíkový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Má velký význam v regulaci enzymů metabolizujících xenobiotika a figuruje i v mnoha jiných fyziologických procesech. Jeho podstatnou funkcí, která souvisí s rakovinou prostaty je, že jako ligandem aktivovaný může být součástí enzymu ubiquitin E3 ligasy, která dokáže zacílit steroidní receptory, jako estrogení a právě i androgení, k proteasomální degradaci. Aryluhlovodíkový receptor je aktivován mnoha exogenními a endogenními sloučeninami jako pesticidy, léčiva, polyhalogenované dioxiny a furany, polyaromatické uhlovodíky nebo také polyhalogenované uhlovodíky, kterými mohou být i fluorované deriváty indolu. Cílem této diplomové práce pak bylo sledovat působení čtyř vybraných sloučenin fluorovaných derivátů indolu na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru a jeho následný dopad na aktivitu androgenního receptoru v nádorové prostatické linii 22Rv1.

## 2 SOUASNÝ STAV ETNÉ PROBLEMATIKY

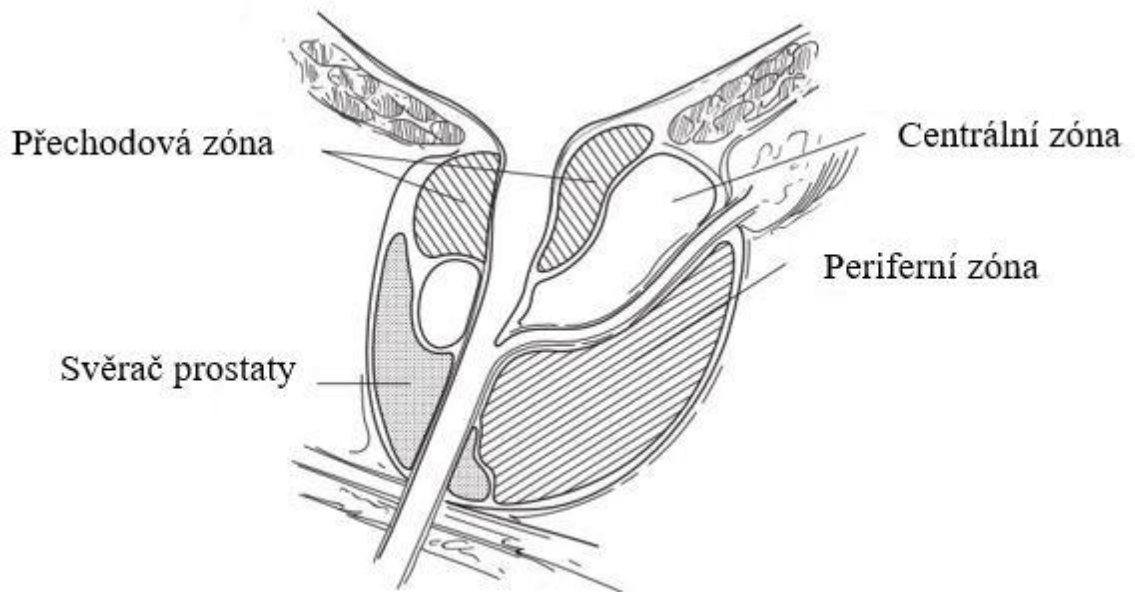
### 2.1 Rakovina prostaty

#### 2.1.1 Prostata

Prostata nebo také předstojná fláza je vnitřní orgán mužské pohlavní soustavy. Je přítomná i u ostatních savců, ale mezi druhy se mohou objevovat rozdíly v její anatomii a biochemii (Frick & Aulitzky, 1991). Prostata dospělého člověka je elastická pevná fláza, která má tvar obrácené pyramidy. Zdravá prostata má hmotnost v rozmezí 15 až 20 g a její průměrné rozměry jsou 3,4 cm na délku, 4,4 cm na šířku a 2,6 cm na tloušťku (Amis, 1994). Je lokalizována v subperitoneálním prostoru, konkrétně před konečníkem a pod močovými měchýři, kde obklopuje močovou trubici vycházející z močového měchýře (Lee et al., 2011).

Funkcí prostatických buněk je produkce zásaditého sekretu, který umožňuje neutralizaci kyselého prostředí v mužské močové trubici a při pohlavním styku i v pochvě ženy, čímž je podpořena životnost a také pohyblivost spermií. Spermie jsou odváděny z nadvarlat do močové trubice pomocí dlouhého úzkého párového chámovodu. Chámovod se před vyústěním do močové trubice spojuje s vývody semenných váčků a prochází přes prostatu. Spermie pak spolu se sekrety váčků a prostaty vytvářejí ejakulát, při němž prostatické sekrety jsou hlavní složkou semenné plazmy ejakulátu (Frick & Aulitzky, 1991).

Prostatický epitel obsahuje tři typy buněk: kmenové buňky, bazální buňky a sekretní buňky. V tkáni pak dochází k transformaci kmenových buněk na předchodné proliferující buňky a následně na zralé plně diferenciované již nedělící se sekretní buňky (Frick & Aulitzky, 1991). Prostata se dělí na tři oblasti: centrální zóna, předchodová zóna a periferní zóna. Tyto oblasti se liší svou anatomii, histologií, funkcí a embryologickým původem (Lee et al., 2011). Centrální zóna zaujímá tvar kufelu a nachází se v blízkosti ejakulačních vývodů. Předchodová zóna je lokalizována v blízkosti močové trubice, která ústí z močového měchýře a prochází prostatou. U mladých lidí je tato zóna obvykle nevýrazná a představuje asi 5 % flázy. U většiny starších mužů však bývá výrazně rozšířena v důsledku benigní hyperplazie prostaty. Periferní zóna tvoří vnější část flázy. Ze všech tří oblastí, periferní zóna zaujímá největší část prostaty a v normálním případě představuje přibližně 70 % (Obr. 1) (Ittmann, 2017).



**Obrázek 1:** Znáznorn ní anatomického rozd lení lidské prostaty na t i oblasti: centrální, periferní a p echodovou (obrázek p evzat z Ittmann, 2017, upraveno)

Lidská prostata je orgánem, který postihují dvě nej častěji onemocnění vyskytující se u starších mužů: benigní hyperplazie prostaty a rakovina prostaty. Jednotlivé oblasti prostaty se odlišují nejen svou anatomií, histologií a funkcí, ale také rozdílnou náchylností ke vzniku patologických poruch. Například u rakoviny prostaty bývá nej častěji zasažena periferní zóna, kdy přibližně 70 % všech karcinomů pochází právě z této oblasti. Naopak centrální zóna bývá zasažena nejméně a výskyt rakoviny je zde velmi nízký. Rozdíly mezi náchylností ke karcinogenezi těchto dvou zón souvisí s odlišným embryonálním původem. Přechodová a periferní zóna mají podobný embryonální původ, ale jejich náchylnost ke karcinogenezi se liší. Zatímco v periferní zóně vzniká většina karcinomů prostaty, počet případů vznikajících v přechodné zóně je nižší, přibližně okolo 25 %. To může být způsobeno rozdílným složením stromy těchto zón. V přechodové zóně má stroma více fibromuskulární strukturu. Proto se také předpokládá, že benigní hyperplazie prostaty je onemocněním fibromuskulární stromy, protože právě tato zóna bývá při hyperplazii postihována (Lee et al., 2011).

## 2.1.2 etnost rakoviny prostaty

Rakovina prostaty je druhým nej častěji diagnostikovaným typem rakoviny vyskytujícím se u mužů. Z celosvětového hlediska se jedná o pátou nej častěji příčinu úmrtí, které souvisejí s rakovinou (Wang et al., 2022; Zheng et al., 2022). Ve 48 zemích jde dokonce

o hlavní příčinu úmrtí spojeným s rakovinou a ve 112 zemích je nejast j-í diagnostikovanou rakovinou (Wang et al., 2022).

V roce 2020 v souvislosti s rakovinou prostaty celosv tov p ibylo odhadem 1 414 000 nových p ípad ů a 375 304 úmrtí. V ěské republice byl za rok 2020 po et nových p ípad ů odhadován na 9117 a po et úmrtí na p ibliffn 1467. Výzkum mapující rakovinu prostaty mezi lety 2000 a 2019 ukazuje v ěsku na zvy-ující se trend incidence, av-ak mortalita zaujímá trend klesající. Z d ůvodu stárnutí populace se ale p edpokládá, ůe po et p ípad ů rakoviny prostaty se bude zvy-ovat (Wang et al., 2022).

Zatím jedinými dob e známými rizikovými faktory rakoviny prostaty jsou vy-í v k, rodinná anamnéza a africký p vod. Rodinná anamnéza je velmi významným faktorem pro screening, proto ůe relativní riziko výskytu je a 2násobn ů zvý-eno u lidí, u nich ů se jiff rakovina prostaty objevila u p íbuzných prvního stupn ů. Tito pacienti v-ak vykazují vy-í -ance na p efití, které jsou spojovány s asným klinickým stádiem rakoviny p i diagnóze. Mezi lety 2001 a 2016 bylo ve Spojených státech amerických desetileté relativní p efití lokalizované rakoviny prostaty 100 %, av-ak p íleté relativní p efití pokro ílého metastatického nález u bylo jiff pouhých 30 %, co 1 u rizikových skupin poukazuje na d ůle ůitost detekce rakoviny prostaty v brzkém stádiu (Zheng et al., 2022).

Byly p edlofeny i dal-í rizikové faktory, u kterých se p edpokládá, ůe by mohly mít vliv na riziko rozvoje rakoviny prostaty, jako jsou kondice a stravovací návyky lov ka, obezita, diabetes mellitus a suplementace vitamínu E. Vliv na incidenci a mortalitu má také index lidského rozvoje (HDI) (Wang et al., 2022), který na základ ů n kolika rozm ůr jako je zdraví a délka ůivota, p ístup ke vzd lání a ůivotní standard, v podstat ů ur uje úrove ů lidského ůivota (Roser, 2014).

### **2.1.3 Souvislost androgen ů s rakovinou prostaty**

V roce 1941 Charles B. Huggins a Clarence V. Hodges objevili, ůe r st a p efití rakoviny prostaty jsou ovliv ovány androgenními hormony. U rakoviny prostaty p eva ůují androgen-dependentní karcinomy, co 1 znamená, ůe jejich r st a p efití jsou závislé na p ítomnosti androgen ů a reagují na androgenní abla ní terapii, tedy na zastavení produkce nebo p ítomnosti t chto hormon ů. Problémem v-ak je, ůe tyto karcinomy se mohou stát androgen-independentními a mohou progredovat i navzdory androgenní ablac i (Debes & Tindall, 2004).

P i vývoji samotné prostaty i p i rozvoji rakoviny nese významnou roli androgenní receptor (AR) (viz. Kapitola 2.3), a to i u karcinom ů, které jsou nezávislé na androgenech.

Ukázalo se, že u hem karcinogeneze androgen-refrakterních karcinom prostaty dochází k up-regulaci exprese genu pro AR. Mechanismy progresu androgen-refrakterního karcinomu prostaty lze rozlišit na ty, které vyvolávají AR a ty, které jej obcházejí. Vzájemně se však tyto dva mechanismy nevyklučují a mohou se prolínat (Debes & Tindall, 2004).

V případě androgen-dependentních karcinom dochází k progresi rakoviny prostřednictvím mechanismu klasické signalizace AR (viz. Kapitola 2.3.2), kdy je receptor aktivován vazbou ligandu, jako dihydrotestosteron (DHT), translokován do jádra a navázán na DNA. Tím je umožněna aktivace transkripce genů zodpovědných za růst a přežití prostatických nádorových buněk (Obr. 2) (Agoulnik & Weigel, 2006).

Jedním z principů progresu buněk androgen-independentních karcinom, které vyvolávají AR, je amplifikace receptoru. Ve srovnání s androgen-dependentními karcinomy u independentních dochází k amplifikaci afluently přítetiny případu. Je tedy zvýšena exprese genu a jelikož se následně v buňce vyskytuje více molekul receptoru, k jeho aktivaci postačí i nižší hladiny ligandu (Mellado et al., 2009).

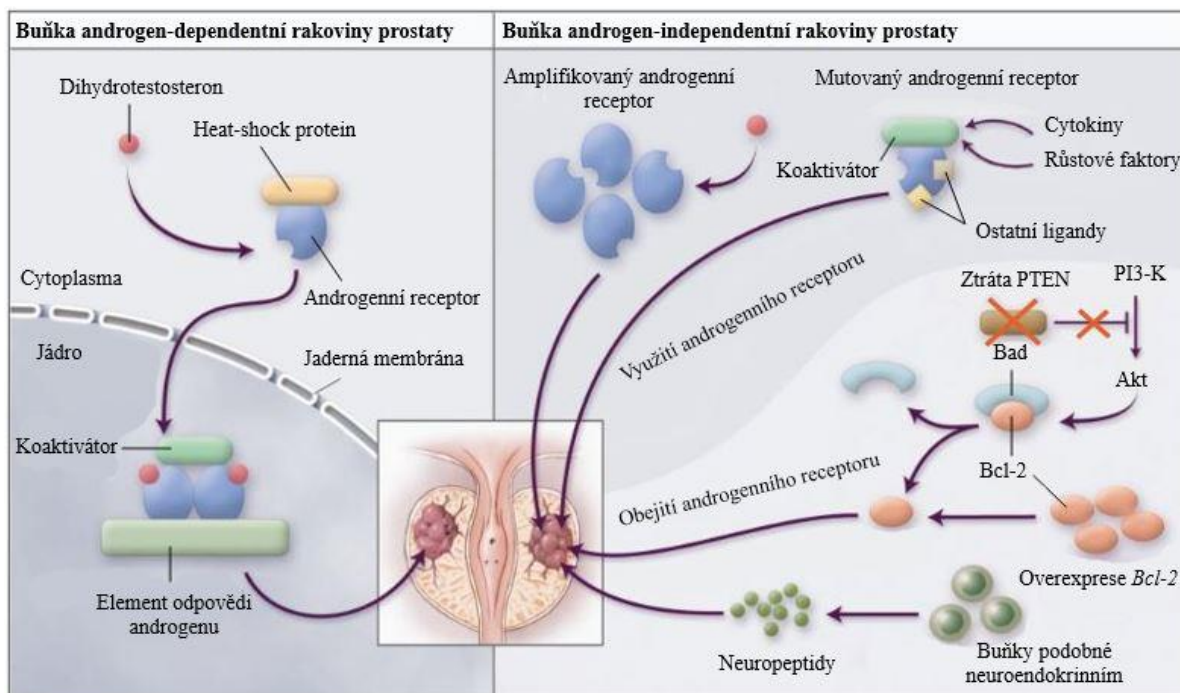
Dalším možným, avšak neplatným principem, je mutace genu pro AR v buňkách androgen-refrakterního karcinomu. Mutacemi může dojít k navýšení počtu molekul schopných vázat se k receptoru a tím k jeho aktivaci. Pokud tedy dojde k mutacím, může být receptor aktivován odlišnými ligandy, než za normálních podmínek a reagovat i na jiné steroidní látky nebo sloučeniny působící opačně než androgenní hormony (Debes & Tindall, 2004).

Tetím principem u androgen-refrakterního karcinomu, jehož mechanismus vyvolává AR, je zafokněn na změněch funkce nebo exprese růstových faktorů, cytokinů a koaktivátorů umožňujících aktivaci receptoru. Některé růstové faktory a koaktivátory jsou u androgen-refrakterních karcinomů nadměrně exprimovány. Tyto látkami aktivujícími receptor jsou cytokiny, obzvláště interleukin-6, nebo růstový faktor I, který je podobný inzulinu (IGF-1) (Debes & Tindall, 2004).

Jedním z mechanismů přežití androgen-refrakterních nádorů prostaty, které obcházejí AR, je neuroendokrinní diferenciace rakovinných buněk. Neuroendokrinní buňky proliferují velmi pomalu, což usnadňuje jejich přežití při léčbě chemoterapeutickou, radiací nebo endokrinní cestou. Tyto buňky také produkují látky jako serotonin a bombesin, což jsou neuropeptidy, které mohou zvyšovat proliferaci rakovinných buněk nacházejících se v okolí a tím zajišťovat progresi karcinomu prostaty (Grossmann et al., 2001).

Dalším mechanismem obcházející AR je deregulace genů pro apoptózu. Dlefitou funkci mají tumor-supresorové geny *PTEN* a antiapoptotické geny *Bcl-2*. Za běžných podmínek je produktem genu *PTEN* inhibována fosfatidylinositol 3-kinasová dráha. Pokud je tato dráha aktivovaná, je stimulován protein Akt, který inaktivuje některé proapoptotické proteiny a tím je podpořeno přežití buněk. *PTEN* tedy umožňuje normálnímu buňkám podstoupit apoptózu. V rakovinných buňkách dochází ke ztrátě funkce *PTEN*, ke zvýšení aktivity proteinu Akt a následné blokaci apoptózy (Obr. 2). Ztráta funkce genu *PTEN* je však běžná i u jiných typů rakovin (Feldman & Feldman, 2001).

Jiným důležitým prvkem v mechanismu rakoviny prostaty je aryluhlovodíkový receptor (AhR). Tento receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, ale má také funkci ubiquitin E3 ligasy (viz. Kapitola 1.2.4) (Luecke-Johansson et al., 2017). To znamená, že AhR po aktivaci ligandem může podporovat proteasomální degradaci steroidních receptorů, jako jsou estrogenový receptor alfa, a právě i AR. Následně dochází ke poklesu transkripční aktivity AR zapojeného do progresu rakoviny prostaty. Proto by proteasomální degradace AR prostřednictvím AhR mohla být zásadní pro potlačení proliferace buněk rakoviny prostaty využívající AR (Sun et al., 2015). AhR je však nadměrně exprimován u mnoha typů rakovin a z toho důvodu by mohl být v těchto nádorech důležitým cílem léčby (Chen et al., 2020).



**Obrázek 2:** Schéma progresu androgen-dependentní a androgen-independentní rakoviny prostaty (obrázek převzat z Debes & Tindall, 2004, upraveno)

## 2.1.4 Diagnostika rakoviny prostaty

Podle české urologické společnosti by preventivní vyšetření na přítomnost karcinomu prostaty mělo být provedeno u mužů od 50 let věku nebo pokud se onemocnění vyskytuje v rodinné anamnéze, je vyšetření doporučeno u mužů již od 45 let. V současnosti je většina karcinomu diagnostikována prostřednictvím odběru krve pacienta a její následnou analýzou na hladinu prostatického specifického antigenu (PSA) (česká urologická společnost LS JEP).

PSA je serinová proteasa regulovaná androgeny, patří do rodiny kálových kalikreinů (Balk et al., 2003), kódovaná genem *KLK3* (Penney et al., 2011). Je produkován jak prostatickými rakovinnými buňkami, tak epiteliálními buňkami prostaty. Původně se vyskytuje ve spermatu, kde tvoří semenogelin (Balk et al., 2003), což jsou proteiny inhibující pohyblivost spermií (de Lamirande, 2007). Do vývodu prostaty se PSA dostává jako neaktivní proenzym (proPSA) ze sekrečního epitelu, který je obklopen bazálními buňkami a bazální membránou. Po aktivaci může aktivní PSA přecházet difuzí do krevního oběhu, kde je však vázán proteasovými inhibitory. Aktivní PSA v lumenu prostaty také podléhá proteolýze a vzniká tím neaktivní PSA, který také může přecházet do krevního oběhu a vyskytovat se v nevázaném stavu jako volný PSA. Charakteristickým znakem karcinomu prostaty je zvýšení hladiny proPSA a vázaného PSA s proteasovými inhibitory v krvi, protože při rakovině často dochází k porušení struktury bazálních buněk (Balk et al., 2003). Avšak PSA není specifický pro onemocnění, ale pro prostatu jako orgán. Je tedy možné, že stavy jako prostatitida, benigní hyperplazie nebo infekce močových cest mohou způsobit zvýšené hladiny PSA a naopak u pacientů s vysokou nádorovou zátěží mohou být hladiny nízké (Narain & Sooriakumaran, 2022). Nicméně zvýšené hladiny PSA naznačují větší riziko rakoviny prostaty. Je ale nutné brát do úvahy věk, rodinnou anamnézu, klinický stav nebo případné komorbidity pacienta. Přesná hraniční hodnota hladiny PSA, pod kterou by bylo riziko rakoviny nulové, není jasná (Descotes, 2019). Byly však stanoveny maximální hranice koncentrace PSA v séru s ohledem na věk pacienta a to až 2,5 ng·ml<sup>-1</sup> pro muže ve věku 40 až 49 let, 3,5 ng·ml<sup>-1</sup> pro muže v rozmezí 50 až 59 let, 4,5 ng·ml<sup>-1</sup> pro 60 až 69 let a 6,5 ng·ml<sup>-1</sup> pro muže staré 70 až 79 let. Jeden z nejpravděpodobnějších faktorů nárstu hladiny sérového PSA v průběhu věku je zvětšení prostaty (Oesterling et al., 1995).

Další důležitou metodou je digitální rektální vyšetření (DRE) prostaty, tedy vyšetření pohmatem přes konečník. DRE je rutinní screeningový test, při kterém se hodnotí povrch

prostaty. Cílem je odhalení jakýchkoli odlišností od normálního stavu, jako jsou hrbolatá nebo ztvrdlá místa. Pouze podle výsledků DRE ale není možné určit diagnózu rakoviny prostaty, nebo tato metoda není dostatečně přesná (Sharma et al., 2017).

Na základě výsledků stanovení hladin PSA a DRE může být provedena biopsie prostaty a histopatologické vyšetření odebrané tkáně, které je nutné pro definitivní diagnózu (Mottet et al., 2015). Během vyšetření jsou popsány charakteristiky tkáně a v případě pozitivního nálezu je určeno Gleasonovo skóre, které vypovídá o agresivitě nádoru a vyvolává se při výběru vhodné léčby (Gleason, 1992; Sharma et al., 2017). Zlatým standardem pro diagnostiku rakoviny prostaty je tedy biopsie (Sharma et al., 2017), která se provádí pod kontrolou transrektální ultrasonografie (Das et al., 2019). S biopsií je ale spojena řada neřádných komplikací jako je krvácení, infekce nebo erektilní dysfunkce (Derin et al., 2020). Proto se v dnešní době uvažuje o využití multiparametrické magnetické rezonance ještě před biopsií, nebo umožní relativně přesnou detekci karcinomu prostaty. Je tak možné vyloučit přítomnost rakoviny a 25-50 % mužů se zvýšenými hladinami PSA tak nemusí podstupovat okamžitou biopsii. V případě možné přítomnosti karcinomu nemusí být odebírány vzorky z celé prostaty jako při biopsii pod kontrolou ultrasonografie, ale přímo z podezřelého místa, což zvyšuje pravděpodobnost detekce rakoviny (Lomas & Ahmed, 2020).

### **2.1.5 Léčba rakoviny prostaty**

Výběr vhodné léčby rakoviny prostaty vždy závisí na mnoha faktorech. Na základě stanovení hladiny PSA, Gleasonova skóre a klinického stádia jsou u pacientů rozlišeny karcinomy s nízkým, středním a vysokým rizikem. Také záleží na tom, zda jsou nádory omezeny pouze na prostatu, tedy lokalizované, nebo již v těchto rozměrech napadají blízké tkáně, tedy lokálně pokročilé, anebo metastatické.

U lokalizovaného karcinomu s nízkým rizikem je několik možností léčby jako aktivní sledování, radikální prostatektomie, tedy chirurgické odstranění celé prostaty, radioterapie vnějším paprskem (EBRT), brachyterapie a pozorné vyšetřování (Waldron et al., 2023). Aktivní sledování znamená, že onemocnění není léčeno, ale jsou prováděny pravidelné kontroly hladin PSA, DRE a biopsie, a při zhoršení stavu se přechází k léčbě s cílem pacienta vyléčit. Oproti tomu pozorné vyšetřování je při zhoršení stavu zaměřeno spíše na léčbu příznaků s paliativním záměrem (Litvin & Tan, 2017). Brachyterapie je specifická forma radioterapie, kdy je zdroj ionizujícího záření – kodlivého pro nádorové



bu ky, umíst ěn p ěmo do nádoru nebo do jeho blízkosti. P ě EBRT je zá ění generováno mimo t ělo pacienta (Chargari et al., 2019).

V p ěpad ě lokalizovaného karcinomu se st ědním rizikem se v t ěinou jako lé ba uplat uje prostatektomie nebo radioterapie. U lokalizovaných karcinom ů s vysokým rizikem se postupuje stejn ě jako u lokáln ě pokro ilých karcinom ů, tedy ve form ě chirurgického odstran ění prostaty nebo radioterapie sou asn ě s hormonální lé bou. V p ěpad ě metastatických karcinom ů lze rozli- ět dv ě fáze, kdy je rakovina prostaty kastra n ě citlivá nebo kastra n ě rezistentní (Waldron et al., 2023).

U kastra n ě citlivých karcinom ů je standardní lé bou androgen-depriva ní terapie (ADT), která znamená snížen ěí nebo úplnou blokaci produkce androgen ů. Toho lze docílit prost ědnictvím chirurgické kastrace, tedy orchiektomie, nebo farmakologické kastrace, která spo ívá v p ůsobení agonist ů nebo antagonist ů hormonu uvol ujícího gonadotropin (GnRH) (Yamada & Beltran, 2021). Vyuffit ěí agonist ů GnRH je založeno na zvý- ěné produkci luteiniza ního hormonu, stimulujícího tvorbu testosteronu, po jejich vazb ě na receptory GnRH. To na krátkou dobu v ádu dn ě zp ůsob ě nár ůst hladiny testosteronu, av- ak dlouhodobé p ůsobení agonist ů vyvolá downregulaci receptor ů GnRH, což bude mít za následek pokles hladiny testosteronu. U antagonist ů GnRH je principem ú ěinku kompetitivní obsazen ěí receptoru (Pagliarulo, 2018). Sou asn ě s ADT se uplat uje i podáván ěí látek, jako je docetaxel nebo látek cílícími na AR jako apalutamid, (Yamada & Beltran, 2021) což je kompetitivní antagonist a AR (Chi et al., 2019).

U v t ěiny pacient ů ale i p ěs ADT v pr ůběhu dvou ař t ěí let dojde k ur ěit ěmu rozvoji onemocn ění a rakovina se stane kastra n ě rezistentní. Nicmén ě i tak mají androgeny v progresi onemocn ění d ěležitou funkci (Chandrasekar et al., 2015). Z tohoto d ůvodu se také vyuffívají látky, které cíl ěí na funkci ěí synt ězu androgen ů, jako enzalutamid nebo abirateron (Sarton & de Bono, 2018). Enzalutamid je látka se schopností inhibice signalizace AR (Pagliarulo, 2018). Vykazuje vysokou afinitu k AR. Ve studii, kterou provedli Tran et al., 2009, byla pozorována ař 8x vyš ěí afinita k AR než u klinicky pouffíváného antiandrogenu bicalutamidu. Funkce enzalutamidu jako antagonist y AR spo ívá ve t ěech mechanismech, kdy inhibuje vazbu androgen ů na AR, blokuje translokaci AR do jádra bu ky a zabrá uje jeho vazb ě na DNA (Katolická, 2014). Abirateron blokuje synt ězu steroidních hormon ů, kdy konkr ětn ě inhibuje cytochrom P450 17A1 (CYP17A1), zapojeného do biosynt ězy testosteronu (Pagliarulo, 2018). Stejn ě jako u kastra n ě citlivých karcinom ů se i u kastra n ě rezistentních vyuffívá látka docetaxel, což je chemoterapeutikum indukující apoptózu díky vazb ě na -tubulin

v mikrotubulech a tím zabrávuje depolymerizaci nutné k mitóze (Chandrasekar et al., 2015).

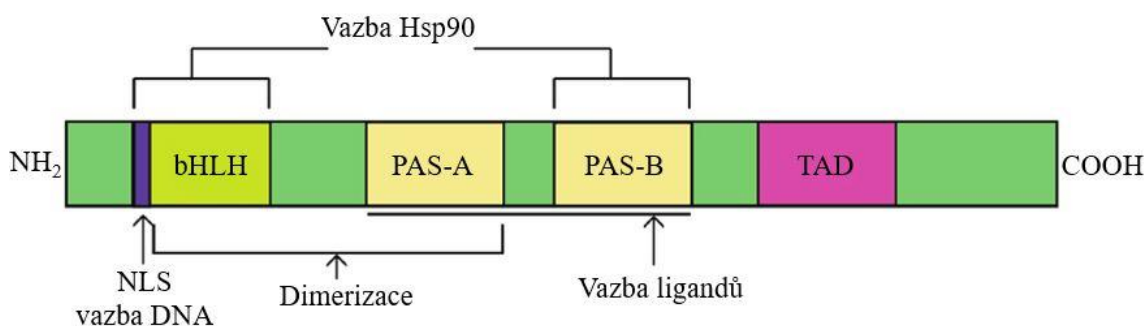
## 2.2 Arylhydroxidový receptor

Arylhydroxidový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Jednou z jeho mnoha funkcí je regulace enzymů, které metabolizují xenobiotika, hlavně pak sloučeniny, které obsahují aromatické uhlovodíky, podle něho byl pojmenován (Kou & Dai, 2021). Je ale také zapojen do mnoha fyziologických procesů, jako jsou proliferace a regulace buněčného cyklu, apoptóza, opravné procesy DNA, imunitní odpovědi, cirkadiánní rytmus, exprese genů zapojených do lipidového metabolismu a další (Kolluri et al., 2017).

### 2.2.1 Struktura arylhydroxidového receptoru

AhR je protein, který je tvořen 848 aminokyselinami a jeho teoretická molekulová hmotnost je přibližně 96 kDa (Vrzal et al., 2004). Protein je kódován genem *AHR* (UniProt (28.2.2023)), který se u člověka nachází na chromosomu 7, kde je 12 exonů pro produkci proteinu (Vrzal et al., 2004). AhR je součástí basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS proteinové rodiny. Primární struktura proteinu obsahuje tři domény: N-terminální doména bHLH, domény Per-ARNT-Sim (PAS) A a B a C-terminální transkripční doména (TAD) (Obr. 3) (Kou & Dai, 2021).

N-terminální doména bHLH má funkci při vazbě AhR na DNA a podporuje dimerizaci mezi receptorem a jaderným translokátorem AhR (ARNT), což je strukturálně příbuzný protein (Stevens et al., 2009). bHLH je tvořena dvěma amfipatickými  $\alpha$ -helixy, které odděluje nehelikální smyčka. Tato doména je typická pro mnoho proteinů, které fungují jako modulatory buněčné diferenciace a proliferace, diferenciace B-buněk nebo také determinace pohlaví (Vrzal et al., 2004).



**Obrázek 3:** Známkování doménové struktury proteinu AhR (obrázek převzat ze Zhu et al., 2019, upraveno).

Většina transkripčních faktorů z rodiny bHLH/PAS obsahuje dvě tandemové PAS domény, PAS A a PAS B (Hao et al., 2011). Doména PAS obecně umožňuje rozpoznávání DNA, vazbu ligandů, heterodimerizaci s ARNT a také interakce chaperonů (Stevens et al., 2009). PAS A je důležitá pro dimerizaci a její specifitu, stabilitu a sílu vazby DNA. Doména PAS B se uplatňuje při vazbě ligandů (Hao et al., 2011). Byla identifikována jako konzervovaná sekvence u transkripčních faktorů rodu *Drosophila* PER (period) a SIM (single-minded) a u lidského proteinu ARNT (Vrzal et al., 2004).

C-terminální doména TAD je z velké části nestrukturovaná. Zahrnuje transkripční aktivní oblast a potenciální oblasti, které se účastní transformace receptoru. Tato oblast také bývá velmi variabilní. Právě změny v této doméně způsobují rozdíly v molekulové hmotnosti proteinu receptoru v rámci jednoho druhu, ale i mezi nimi (Stevens et al., 2009).

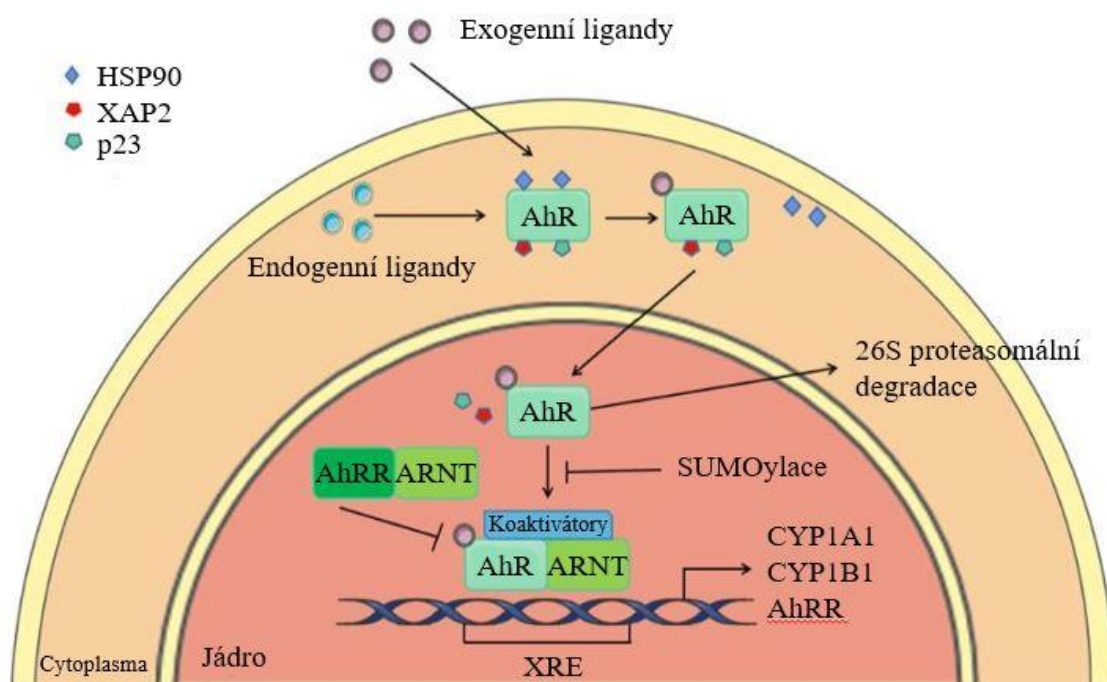
### 2.2.2 Signalizace aryluhlovodíkového receptoru

U člověka je AhR exprimován v mnoha tkáních. Nejvyšší hladiny exprese mRNA byly identifikovány v placentě, plicích a játrech. Naopak nízké hladiny se vyskytovaly v mozku, ledvinách a kosterním svalstvu (Jiang et al., 2010). Pokud je receptor v inaktivované formě, nachází se v cytoplasmu (Pollenz et al., 1993). Zde vytváří proteinový komplex se dvěma heat shock proteiny 90 (Hsp90), podílejícími se na skládání, stabilizaci konformace a udržení AhR v inaktivním stavu, X-asociovaným proteinem 2 viru hepatitidy B (XAP2), který ukotvuje receptor na cytoskeletu, s ko-chaperonem p23 a proteinkinásou c-SRC. Zároveň mohou tyto chaperony inhibovat ubiquitinaci a degradaci a tím v cytoplasmu udržovat určité množství receptoru (Obr. 4).

Při kontaktu AhR s exogenními nebo endogenními ligandy dochází k uvolnění XAP2 a proteinkinasy c-SRC a receptor je translokován do jádra (Hu et al., 2023). AhR může způsobovat aktivaci více signálních drah a může být aktivován různými ligandy. První popsanou byla genomická dráha. Receptor se po translokaci do jádra váže s ARNT za vzniku aktivního heterodimeru, který se pak připojuje na krátké specifické sekvence DNA zvané xenobiotické responzivní elementy (XRE) (Larigot et al., 2018). Ty se nacházejí v promotorové oblasti genu *CYP1A1*. Poté působí jako transkripční faktor a indukuje enzym metabolizující toxické látky, cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) (Kudo et al., 2018). Heterodimery rekrutují koaktivátorové proteiny, indukující remodelaci, relokaci i disociaci nukleosomů v chromatinu enhanceru a promotoru, a mohou tak iniciovat transkripci mnoha genů. Aktivované geny se mohou mezi typy tkání i druhy

savci-li-it, ale geny *CYP1A1* a *CYP1B1* jsou exprimovány v různých tkáních u všech savců a patří k nejčastěji indukovaným genům. Zároveň je *AHR* konstitutivně aktivní a spolu s *CYP1A1* a *CYP1B1* jsou nadměrně exprimovány u mnoha typů rakovin (Hankinson, 2016).

Následně je AhR transportován z jadra a rychle degradován v cytoplasmatickém kompartmentu pomocí proteasomu, což zahrnuje kovalentní vazbu ubiquitinu. Byly pozorovány i jiné post-translační modifikace jako např. SUMOylace, která prostřednictvím inhibice ubiquitinylace zvyšuje stabilitu receptoru (Larigot et al., 2018). Jedním z významných cílů aktivovaných při genomické dráze je gen pro represor AhR (AhRR), což je strukturně podobný protein, ale z důvodu defektní PAS-B domény a rozdílů v TAD doméně není schopen vázat ligandy. Může však získávat korepresory, které jsou zapojeny do negativní zpětnovazebné smyčky pro AhR, vázat se s ARNT, poté na XRE, čímž potlačovat aktivitu receptoru a regulovat transkripci genů závislých na AhR (Hu et al., 2023).



**Obrázek 4:** Schéma signalizační dráhy aryluhlovodíkového receptoru (obrázek převzat z Hu et al., 2023, upraveno)

### 2.2.3 Ligandy aryluhlovodíkového receptoru

AhR je aktivován širokým spektrem strukturně odlišných endogenních a exogenních ligandů, které mohou být jak přírodní, tak syntetické (Denison et al., 2002). Rozdílné ligandy mohou mít prostřednictvím indukce genové exprese různých genů mnoho toxických a biologických účinků (Denison & Nagy, 2003).

AhR byl poprvé objeven jako intracelulární protein prostřednictvím toxického účinku 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD) a strukturně příbuzných halogenovaných aromatických sloučenin, jako jsou halogenované dibenzo-p-dioxiny, dibenzofurany a polychlorované bifenyly (Safe et al., 2018). AhR tedy váže xenobiotika a podílí se na jejich detekci a detoxikaci. Jako receptor slouží i pro látky, které léčí, návykové látky, fytochemikálie, jako flavonoidy a deriváty indolu, a další látky běžně se vyskytující v životním prostředí (Barouki et al., 2012). Významnými ligandy s vysokou afinitou k AhR jsou již zmíněný TCDD a 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ) (Ehrlich et al., 2018). FICZ je metabolit L-tryptofanu, který vzniká při působení ultrafialového záření (Furue et al., 2019). TCDD je sloučenina vznikající při průmyslových procesech nebo jako vedlejší produkt spalování (Safe et al., 1991). Spouští široké spektrum biochemických a toxických procesů, jako teratogeneze, imunosuprese nebo podpora karcinogeneze, a je také silným induktorem CYP1A1 (Mimura & Fujii-Kuriyama, 2003).

Nejlépe charakterizovanými exogenními syntetickými ligandy AhR jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, halogenované dioxiny a příbuzné sloučeniny. Přírodně se vyskytující exogenní ligandy, jejichž hlavním zdrojem je potrava, jsou látky jako flavonoidy, karotenoidy, kurkumin, resveratrol a další. Mezi endogenní ligandy patří sloučeniny syntetizované v organismu, například indigo a indirubin, metabolity hemu, bilirubin, biliverdin a hemin, metabolity kyseliny arachidonové a deriváty tryptofanu, tryptamin a kyselina indolactová (Stejskalova et al., 2011).

### 2.2.4 Ubikvitin E3 ligasa

V roce 2007 bylo objeveno, že AhR funguje jako na ligandu závislá ubikvitin E3 ligasa. Ubikvitin E3 ligasy určují cílovou specifitu selektivní degradace proteinů, která je řízena systémem ubikvitin-proteasom. Systém ubikvitin-proteasom společně s transkripčním regulačním systémem jsou dva hlavní cíle selektivní zsoby kontroly hladin intracelulárních proteinů. AhR je tedy součástí komplexu ubikvitin ligasy cullin 4B, CUL4B<sup>AhR</sup> (Ohtake et al., 2007). Tento komplex asociující AhR zahrnuje scaffold

protein cullin4B (CUL4B), ring finger protein RBX1, protein transduktin-like 3 (TBL3), proteasomální částici 19S a damage DNA binding protein (DDB1) (Ohtake et al., 2011; Luecke-Johansson et al., 2017). CUL4B se svým N-koncem váže na adaptorový protein a C-koncem na protein RBX1, který je pak připojen na enzym E2 (Ohtake et al., 2009). Sestavení a aktivita jsou *in vitro* i *in vivo* závislé na ligandu AhR. V komplexu má aktivovaný AhR funkci adaptorového proteinu, který rozpoznává substrát jako androgenní nebo estrogenní receptory, a cílí je k degradaci (Ohtake et al., 2007).

Na procesu degradace protein prostřednictvím ubikvitin E3 ligasy se podílí několik enzymů. Enzym E1 aktivuje ubikvitin. Enzym E2 konjuguje ubikvitin a substrát. Enzym ubikvitin E3 ligasa má substrátovou specifitu a spojuje E2 a substrát. Ubikvitin se pak kovalentně váže k lysinovým zbytkům substrátových proteinů jako jedna molekula nebo ve formě polymeru. Následně je rozpoznán 26S proteasomem a proběhne proteolýza (Ohtake et al., 2009).

AhR má tedy duální funkci transkripčního faktoru a ubikvitin E3 ligasy, která cílí receptory steroidních hormonů k degradaci. To, jakou funkci AhR bude mít, pravděpodobně závisí na přítomnosti ARNT, jak navrhli Luecke-Johansson et al. (2017). Při potlačení exprese ARNT byl pozorován pokles funkce AhR jako transkripčního faktoru, přičemž funkce jako ubikvitin E3 ligasy nebyla ovlivněna. Pokud je tedy ARNT dostupný, AhR funguje jako transkripční faktor. V případě, že ARNT dostupný není, má AhR funkci ubikvitin E3 ligasy. K nedostupnosti ARNT může docházet při jeho obsazení jinou molekulou jako je AHRR (Luecke-Johansson et al., 2017), nebo bylo pozorováno, že AHRR a AhR jsou ve vzájemné kompetici o vazbu na ARNT a následně na XRE, čímž pak může být negativně regulována signalizace AhR (Oshima et al., 2009).

## 2.3 Androgenní receptor

Androgenní receptor (AR) patří do skupiny jaderných receptorů steroidních hormonů podobně jako estrogení, glukokortikoidní, progesteronový a mineralokortikoidní receptor. AR funguje jako na ligandu závislý transkripční faktor kontrolující expresi specifických genů (Tan et al., 2015), který zprostředkovává působení v těle androgenních hormonů. Ty pak ovlivňují vývoj mužských pohlavních orgánů a kosterního svalstva, ale jsou také zapojeny do patologických procesů jako rakovina prostaty, spinální svalová atrofie nebo syndrom androgenní insenzitivity (Matsumoto et al., 2008).

### 2.3.1 Struktura androgenního receptoru

Gen *AR* se nachází na chromosomu X a obsahuje osm exonů (Brinkmann et al., 1989). Tento gen pak kóduje protein AR, který je tvořen 920 aminokyselinami (Liu et al., 2019; UniProt (1.3.2023)). Molekulová hmotnost AR plné délky (AR-fl) je 110 kDa (van Laar et al., 1989). AR však může vytvářet mnoho strukturálních a funkčních odlišných sestihových variant, jako AR-v7, k jejíž zvýšené expresi dochází u kastrací rezistentních karcinomů prostaty (Lu & Luo, 2013). Struktura AR obsahuje čtyři hlavní domény: N-terminální doménu, DNA vazebnou doménu (DBD), pantovou oblast a ligand vazebnou doménu (Obr. 5) (Fujita & Nonomura, 2019).

N-terminální doména je nejvíce variabilní a má funkci při regulaci transkripce. DBD naopak bývá nejkonzervovanější. Tato doména je složená ze dvou zinkových prstů, které rozpoznávají specifické sekvence DNA a usnadňují tím přímou vazbu AR na DNA v oblasti promotorů a enhancerů genů, které receptor reguluje. Tím dochází k aktivaci N-terminální domény a ligand vazebné domény, čímž je umožněna stimulace nebo represe transkripce těchto genů. Ligand vazebná doména má v rámci jaderných receptorů podobnou strukturu. Její funkcí je zprostředkování interakcí mezi AR a heat shock proteiny a chaperony a také interakce s N-koncem receptoru za účelem stabilizace vázaných androgenů.



**Obrázek 5:** Znáznorní doménového složení proteinu AR (NTD = N-terminální doména, DBD = DNA vazebná doména, HR = pantová oblast, LBD = ligand vazebná doména) (obrázek převzat z Fujita & Nonomura, 2019)

Struktura AR obsahuje i n kolik signálních sekvencí. AF-1 je na ligandu nezávislá funkce transkrip ní aktivace pot ebná pro maximální aktivitu AR a je lokalizována v N-terminální domén . AF-2 je na ligandu závislá funkce transkrip ní aktivace umíst ná v ligand vazebné domén . Je d leffitá pro p ímé interakce mezi N-terminální a ligand vazebnou doménou a také pro tvorbu vazebného místa pro koregulátory. Jaderný lokaliza ní signál (NLS) slouffící k importu AR do jádra je umíst n mezi DBD a pantovou oblastí. Jaderný exportní signál (NES) pro export AR z jádra do cytoplasmy se nachází v ligand vazebné domén (Davey & Grossmann, 2016). Sest ihová varianta AR-v7 postrádá ligand vazebnou doménu, ale má zachovalou DBD a NLS, ímfl je umofn n vstup do jádra i v nep ítomnosti ligandu. Tam pak p sobí jako transkrip ní faktor, který potla uje d leffité tumor supresorové geny. Proto m fle být potenciáln vyuffit jako diagnostický nebo prognostický marker a terapeutický cíl (Sobhani et al., 2021).

### 2.3.2 Signalizace androgenního receptoru

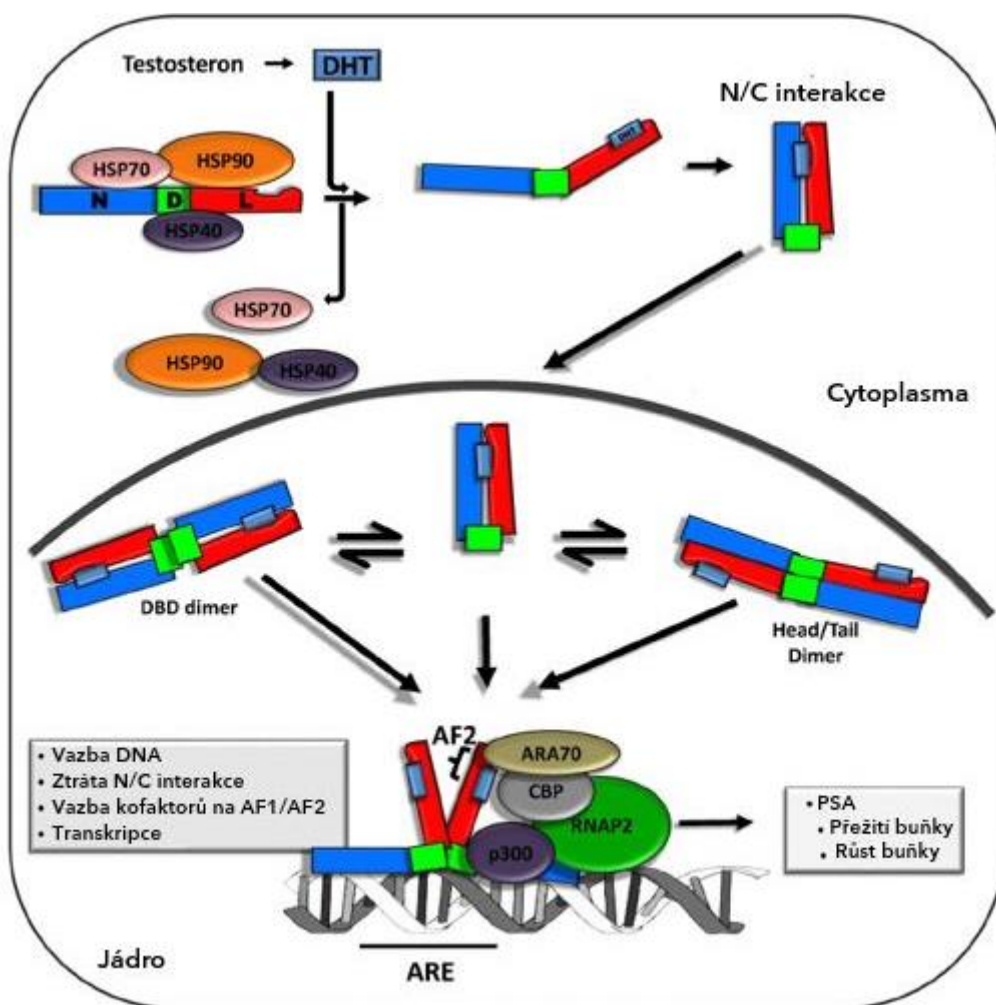
Nejvyší hladiny exprese AR jsou p ítomny v prostat , adipocytech a játrech. AR je v-ak exprimován v mnoha lidských tkáních a orgánech, jako kosterní svalstvo, srdce, d loha, -títná fláza i hypofýza (Campana et al., 2015). Niflí hladiny se pak vyskytují i v nadledvinách, plicích i tlustém st ev (Wilson & McPhaul, 1996). Pokud nejsou p ítomny ligandy, AR se nachází v cytoplasm navázaný na heat shock proteiny. P i klasické signalizaci dochází k vazb ligand na ligand vazebnou doménu, p i emfl dojde k vytla ení heat shock protein . Tím je umofn na fosforylace a zm na konformace (Crumbaker et al., 2017). P i konforma ní zm n vytvo í helixy 3, 4 a 12 v ligand vazebné domén povrch vazby AF-2.

U jaderných receptor je AF-2 hlavní místo protein-proteinových interakcí, slouffící k zisku koaktivátor s motivem LxxLL. Motiv LxxLL se vyskytuje u n kterých transkrip ních faktor a slouffí k interakci s jinými proteiny jako aktivátory nebo represory, které mají p íslu-nou doménu. V p ípad AR jsou v-ak p ednostn vázány motivy FxxLF, mající podobnou funkci jako motiv LxxLL, vyskytující se v N-terminální domén . To usnad uje intramolekulární interakce mezi N-terminální doménou a ligand vazebnou doménou tzv. N/C interakci (Lonergan & Tindall, 2011). K tomuto procesu tedy dochází po vazb ligand je-t v cytoplasm . Po translokaci AR do jádra dochází k intermolekulární interakci dvou DBD domén díky dimeriza nímu boxu (D-box) a poté k intermolekulární N/C interakci u ásti jaderných AR, cofl vede k homodimerizaci AR.



V jádru pak může být AR přítomný jak ve formě dimeru, tak monomeru (van Royen et al., 2012).

Následně prostřednictvím DBD je AR navázán na androgen responzivní elementy (ARE). To iniciuje transkripci specifických cílových genů AR, na které se pak váží transkripční koaktivátory nebo korepresory (Obr. 6). Účinky AR se ale mohou projevit i jinými mechanismy než klasickou signalizací (Crumbaker et al., 2017). Může docházet i k negenomické signalizaci (Leung & Sadar, 2017) nebo na ligandu nezávislé aktivaci prostřednictvím interleukinů (Ueda et al., 2002).



**Obrázek 6:** Schéma signalizační dráhy AR (DHT = dihydrotestosteron, HSP = heat shock protein, N = N-terminální doména, D = DNA vazebná doména, L = ligand vazebná doména, ARA70 = AR-asociovaný protein, CBP = CREB vazebný protein, p300 = transkripční aktivátor, RNAP2 = RNA polymerasa II) (obrázek převzat z Lallous et al., 2013, upraveno)

### 2.3.3 Ligandy androgenního receptoru

Jak již bylo zmíněno, AR umí vázat a přenášet androgeny. Jeho nejčastějšími ligandy jsou tedy androgenní steroidní hormony jako testosteron a 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (Brinkmann et al., 1999).

Testosteron je hlavní mužský pohlavní hormon, který je u mužů syntetizován především ve varlatech Leydigovými buňkami a u žen je v malém množství syntetizován ve vaječnicích. Prekurzory testosteronu jsou u obou pohlaví syntetizovány i v nadledvinách (Shea et al., 2014). Během životního cyklu člověka má různé funkce. Při prenatálním vývoji se podílí na diferenciaci vnitřních pohlavních orgánů, v pubertě ovlivňuje růst a projev sekundárních pohlavních znaků a v dospělosti má vliv na spermatogenezi, sexuální chování, ale také na metabolismus kostí nebo na glykometabolickou homeostázi (Corona et al., 2017).

Testosteron je prohormonem dihydrotestosteronu (DHT). DHT tedy vzniká z testosteronu působením dvou izoenzymů 5 $\alpha$ -reduktasy (Mendonca et al., 2016). K této přeměně dochází zejména v cílových orgánech, jako je prostata, kůže nebo játra, především v těch tkáních, kde je jeho přítomnost nezbytná pro správný vývoj a funkci orgánů. Zároveň je DHT nejúčinnějším endogenním androgenem, neboť má přibližně čtyřikrát vyšší vazebnou afinitu k AR než testosteron a jeho disociace z AR je zhruba třikrát pomalejší než u testosteronu. DHT také zvyšuje syntézu AR a jeho vazba na AR pomáhá receptoru do DNA vazebného stavu. Nicméně ne vždy je na AR vázán pouze jeden

(Swerdlow et al., 2017).

## 2.4 Indoly

Indol je aromatická organická sloučenina patřící mezi heterocykly. Jeho struktura je tvořena benzenovým jádrem a pyrrolem. Může vytvářet různé funkčně variabilní deriváty a také slouží jako mezidruhová signální molekula (Lee et al., 2015).

### 2.4.1 Syntéza indol

Více než 85 druhů gram pozitivních i gram negativních bakterií, včetně *Escherichia coli*, je schopných produkovat indol. Je syntetizován z aminokyseliny L-tryptofanu za účasti cytoplasmatického enzymu tryptofanasy. Tento enzym hydrolyzuje tryptofan a vzniká indol, pyruvát a amoniak (Li & Young, 2013). Toho se také využívá při indolovém testu, který umožňuje na základě vzniku indolu rozlišit mezi indol-pozitivními bakteriemi, například *E. coli* nebo indol-negativními, jako je *Enterobacter* (MacWilliams, 2012).

Přirozeně se vyskytuje i u rostlin, kdy vzniká působením enzymu indol-3-glycerolfosfát lyasy (Frey et al., 2000). Některé buňky nejsou schopny indol syntetizovat. Přesto jsou u živočichů přítomny díky jejich produkci stěvnými bakteriemi (Lee et al., 2015). V lidských výkalech byly zaznamenány hladiny koncentrace indolu v rozmezí přibližně  $250\text{--}1100\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Bansal et al., 2010). Deriváty indolu se však vyskytují nejen ve stěvech, ale i krvi, moči nebo potu a orgánech jako třeba mozek (Lee et al., 2015).

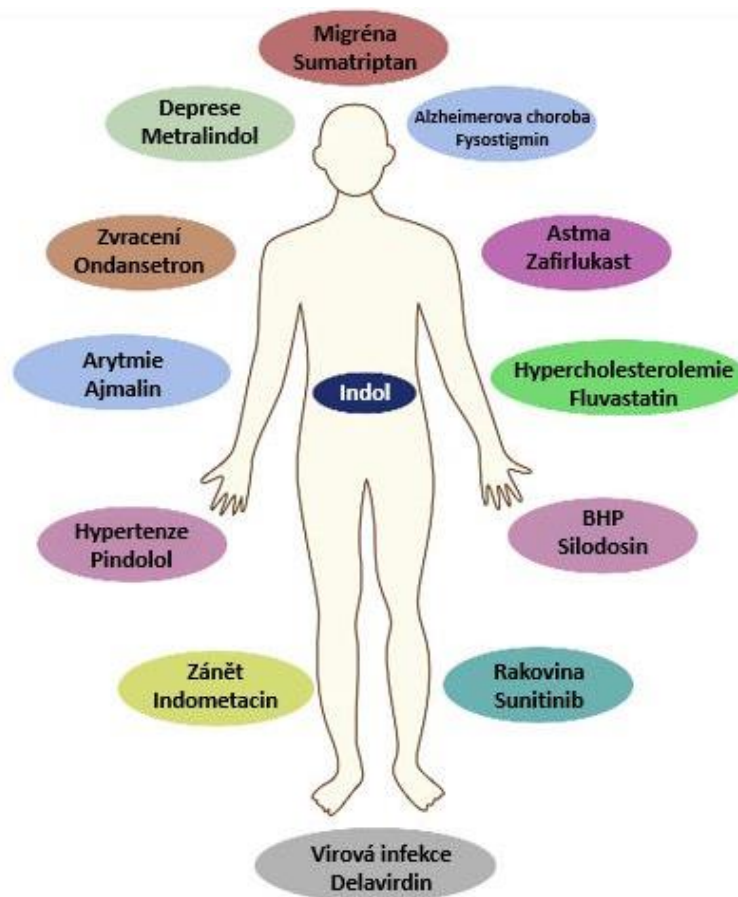
### 2.4.2 Funkce indol

Indoly jsou součástí mnoha sloučenin s různými funkcemi. Využívají se jako biologicky aktivní látky a léčiva nebo i jako agrochemikálie. Jako léčiva vykazují antivirové, antimikrobiální, antimykotické i antioxidantní účinky (Singh & Singh, 2018). Například u fluorovaného derivátu 7-fluorindolu byla testována jeho antimikrobiální aktivita vůči *Pseudomonas aeruginosa*, přičemž prokázal inhibici tvorby bakteriálního biofilmu (Lee et al., 2012). Také byl pozorován pozitivní vliv bakteriálních indolů a indolového derivátu indol-3-aldehydu, které působily prostřednictvím AhR, na zvýšení proliferace a diferenciac buněk v tlustém střevě myši. Diferenciace stěvních buněk se s postupem vku snižuje, což znamená, že byl potlačen úbytek stárnutí organismu (Powell et al., 2020). Indoly ale mohou působit i protizánětlivě nebo jako antihistaminika a analgetika (Singh & Singh, 2018).

Mnoho indolových derivátů, ať už se jedná o přírodní a syntetické sloučeniny nebo metabolity produkované lidskou mikrobiotou, jsou ligandy AhR. Příkladem endogenních

indol vázaných AhR je alkaloid tryptamin nebo indirubin, který byl identifikován v lidské mo i. AhR aktivní indoly, u lov ka produkované bakteriemi, jsou látky jako indol-3-laktát nebo indol-3-pyruvát. Indolové ligandy AhR se vyskytují také v potrav , jako například glukobrassicin, který je p ítomný v brukvovité zelenin . AhR je krom xenobiotické odpov di zapojen do fyziologických a patologických proces , a také hraje roli p i etiologii n kterých onemocn ní. Je tedy potenciálním terapeutickým cílem (Dvo ák et al., 2021).

P íkladem indolové lé ivé látky, která má agonistický ú inek na AhR, je sunitinib. Tento lék inhibuje receptorové tyrosinkinasy a vyuffívá se p i lé b rakoviny, konkrétn karcinomu ledvin a gastrointestinálního stromálního tumoru. Indoly jsou ale sou ástí mnoha syntetických lék , které mohou p sobit r znými mechanismy a pouffívají se u velkého spektra onemocn ní (Obr. 7) (Chadha & Silakari, 2017; Dvo ák et al., 2021).



**Obrázek 7:** P íklady látek obsahujících indoly vyuffívané k lé b ády onemocn ní (BHP = benigní hyperplazie prostaty) (obrázek převzat z Chadha & Silakari, 2017, upraveno)

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický

- Lidská epiteliální bun ěná linie prostatického karcinomu 22Rv1 odvozená z xenograftu propagovaného v my ěích (kat. ě . ECACC 05092802)
- Stabilní luciferasová reportérová bun ěná linie 22AhRv1 odvozená z bun ěné linie 22Rv1 obsahující reportérový plasmid pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro]
- Stabilní luciferasová reportérová bun ěná linie AIZ-AR odvozená z bun ěné linie 22Rv1 obsahující reportérový plasmid p3ARR/ARE-luc2P/minP/hygro

#### 3.1.2 Chemikálie

- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, kat. ě . T4049)
- 10x koncentrovaný Tris/Glycin pufr (BioRad, kat. ě . 1610771)
- 10x koncentrovaný Tris/Glycin/SDS pufr (BioRad, kat. ě . 1610732)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenzo[b,e][1,4]dioxin (TCDD) (Ultra Scientific, kat. ě . RPE-029)
- 20x koncentrovaný TBS pufr (ThermoFisher Scientific, kat. ě . 28358)
- 4x koncentrovaný d ělící pufr (BioRad, kat. ě . 161-0798)
- 4x koncentrovaný zaost ovací pufr (BioRad, kat. ě . 161-0799)
- 5x Reporter Lysis Buffer (Promega, kat. ě . E3971)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, kat. ě . 459844)
- Adenosin-5 trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich, kat. ě . A9062)
- Akrylamid/Bis-akrylamid (Sigma Aldrich, kat. ě . A2792)
- Bovinní sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich, kat. ě . A2153)
- Bradfordovo ěnidlo Bradford Reagent (Sigma Aldrich, kat. ě . B6916)
- Deionizovaná voda dH<sub>2</sub>O
- Dihydrotestosteron (5 -androstan-17 -ol-3-on) (DHT) (Sigma Aldrich, kat. ě . A8380)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, kat. ě . D8418)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, kat. ě . 43819)
- D-luciferin (Sigma Aldrich, kat. ě . L9504)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma Aldrich, kat. ě . L3771)

- Dvakrát destilovaná voda (ddH<sub>2</sub>O)
- Enzalutamid (ENZ) (Santa cruz Biotechnology, kat. . sc-364354)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma Aldrich, kat. . F6178)
- Forward primer (Sigma Aldrich)
  - *GAPDH* (kat. . 8817264953-40/0) 5 GAAGGAAATGAATGGGCAGC 3
  - *CYP11A1* (kat. . 8815746405-10/0) 5 GGAAGTGTATCGGTGAGACC 3
  - *FKBP5* (kat. . 8815864959-280/0) 5 TCCAAGACTCAGATGATGCC 3
  - *KLK3* (kat. . 8815864959-240/0) 5 ACTGCATCAGGAACAAAAGC 3
- Fosfátový pufr Dulbecco´s PBS (Serana, kat. . BDL-001)
- HEPES (Sigma Aldrich, kat. . H3375)
- Hygromycin B (Santa cruz Biotechnology, kat. . sc-29067)
- Chloroform (Sigma Aldrich, kat. . C2432)
- Inhibitor fosfatas PhosSTOP EASYpack (Roche, kat. . 4906837001)
- Inhibitor proteas Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (ThermoFisher Scientific, kat. . 78430)
- Inhibitor ribonukleas RNase Inhibitor Human Placenta (New England BioLabs Inc., kat. . M0307L)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, kat. . I9516)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025)
- KiCqSTART Probe qPCR ReadyMix (Sigma Aldrich, kat. . KCOS04)
- Koenzym A (Sigma Aldrich, kat. . C4780)
- Kultiva ní médium RPMI-1640 Medium (Sigma Aldrich, kat. . R0883)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich, kat. . E6511)
- Laemmlí Sample Buffer, 2x koncentrovaný (LB pufr) (BioRad, kat. . 1610737)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, kat. . F6178)
- Methanol (Penta chemicals, kat. . 21190-20005)
- MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, kat. . M5921)
- NaCl (Sigma Aldrich, kat. . T9284)
- Nesterilní fosfátový pufr Dulbecco´s PBS (Serana, kat. . BDL-001)
- Nukleosidtrifosfáty dNTP (TaKaRa)
  - dATP (kat. . 4026)
  - dCTP (kat. . 4028)
  - dGTP (kat. . 4027)

- dTTP (kat. . 4029)
- PCR voda
- Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma Aldrich, kat. . A3678)
- Primární protilátky
  - -aktin Mouse monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, kat. . 8H10D10)
  - AR Rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, kat. . D6F11)
  - AhR Mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, kat. . sc-133088)
- Próba (Sigma Aldrich)
  - *GAPDH* (kat. . 8817264953-40/2)  
5 [6FAM]ACTAACCCTGCGCTCCTGCCTCGAT[OQA] 3
  - *CYP1A1* (kat. . 8815746405-10/2)  
5 [6FAM]GCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCA[OQA] 3
  - *FKBP5* (kat. . 8815864959-280/2)  
5 [6FAM]AAGTGTGTGTGGGGAGGGGAAGGGT[OQA] 3
  - *KLK3* (kat. . 8815864959-240/2)  
5 [6FAM]TGGGTCGGCACAGCCTGTTTCATCC[OQA] 3
- Random Primer 6 (New England BioLabs Inc., kat. . S1230S)
- Reakční pufr 10x koncentrovaný 10X M-MuLV Reverse Transcriptase Buffer (New England BioLabs Inc., kat. . B0253S)
- Reblotting pufr Re-Blot Plus Strong Solution (10x) (Sigma Aldrich, kat. . 2504)
- Reverse primer (Sigma Aldrich)
  - *GAPDH* (kat. . 8817264953-40/1) 5 TCTAGGAAAAGCATCACCCG 3
  - *CYP1A1* (kat. . 8815746405-10/1) 5 CATAGATGGGGGTCATGTCC 3
  - *FKBP5* (kat. . 8815864959-280/1) 5 GGCACCCTGTAGTTATTTGC 3
  - *KLK3* (kat. . 8815864959-240/1) 5 GGAGGCTCATATCGTAGAGC 3
- Reverzní transkriptasa M-MuLV (New England BioLabs Inc., kat. . M0253L)
- Roztok Ponceau S. (Santa cruz Biotechnology, kat. . sc-301558)
- Roztok neesenciálních aminokyselin MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x) (Sigma Aldich, kat. . M7145)
- Sekundární protilátky
  - Anti-mouse (Cell Signaling Technology, kat. . 7076S)
  - Anti-rabbit (Cell Signaling Technology, kat. . 7074S)

- Sušené mléko Laktino (ARTIFEX Instant s.r.o.)
- TEMED (Sigma Aldrich, kat. . 110732)
- Testované fluorované deriváty indolu (Sigma Aldrich)
  - 4-fluorindol (kat. . 457396)
  - 5-fluorindol (kat. . F9108)
  - 6-fluorindol (kat. . 349593)
  - 7-fluorindol (kat. . 740764)
- TRI Reagent RNA/DNA/Protein isolation reagent (Molecular Research Center, Inc., kat. . TR 118)
- Tris-acetát (Sigma-Aldrich, kat. . T8280)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, kat. . T9284.
- Trypanová mod (0,4% Trypan blue v PBS) (Sigma Aldrich, kat. . T6146)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, P1379)
- WesternSure® PREMIUM Luminol Enhancer Solution (Li-Cor, kat. . 826-13460)
- WesternSure® PREMIUM Stable Peroxide Solution (Li-Cor, kat. . 826-13462)
- WesternSure® Pre-Stained Chemiluminiscent Protein Ladder (Li-Cor, kat. . 926-98000)

### **3.1.3 Přípravované roztoky**

- Kultivační médium
  - 500 ml RPMI-1640 Medium
  - 50 ml fetální bovinní sérum
  - 5 ml L-glutamin
  - 5 ml roztok neesenciálních aminokyselin
- Migrační pufr
  - 100 ml Tris/Glycin/SDS pufr
  - 900 ml ddH<sub>2</sub>O
- Protein lysis buffer (pH=7,5)
  - 50 mM HEPES
  - 5 mM EDTA
  - 150 mM NaCl
  - 1% Triton X-100
- Reporter Lysis Buffer (ředí se s ddH<sub>2</sub>O v poměru 1:4)



- 5x Reporter Lysis Buffer
- dH<sub>2</sub>O
- Substrát pro luciferasu
  - 5 mg D-luciferin
  - 10 mg ATP
  - 5 mg Koenzym A
  - 168 mg DTT
  - 1,32 ml Tris-acetát
  - 1,23 mg/6,6 l 0,5 M EDTA
  - 3,03 mg/1,23 ml 100 mmol·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
  - Doplnit dH<sub>2</sub>O do 30 ml
- TBS/Tween
  - 50 ml 20x TBS pufr
  - 950 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 500 l Tween 20
- Transferový pufr
  - 100 ml Tris/Glycin pufru
  - 200 ml methanol
  - 700 ml ddH<sub>2</sub>O

### 3.1.4 Pomůcky

- 6jamkové kultivační destičky (TPP)
- 96jamkové kultivační destičky (TPP)
- Automatické pipety 0,1-2,5 l, 0,5-10 l, 2-20 l, 20-200 l, 10-100 l, 100-1000 l (Eppendorf)
- Bílá 96jamková destička pro PCR (Roche)
- Bílá 96jamková destička pro reporter gene assay (NUNG)
- Buněnina (Tork)
- Elektroforetická cela Mini PROTEAN Tetra Cell (BioRad)
- Filtrační papír pro western blotting (BioRad)
- Fólie na PCR destičku (Roche)
- Krycí sklenice (Menzel Gläser)
- Kultivační láhev malá (obsah dna 25 cm<sup>2</sup>) (TPP)

- Kultivační láhev střední (obsah dna 75 cm<sup>2</sup>) (TPP)
- Kultivační láhev velká (obsah dna 150 cm<sup>2</sup>) (TPP)
- Lepicí páska
- Lihový kahan
- Multikanálová pipeta 20-200 l (Eppendorf)
- Nitrilové rukavice (NitriSense)
- Papírová krabka do -80 °C (Biologix)
- Petriho misky (TPP)
- Plastové mikrozkušavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- Plastové stojánky na zkumavky (TPP)
- Plastové pipety 0,1-10 l, 10-200 l, 100-1000 l (Eppendorf)
- Plastové pipety pro sérologické pipety 0,1-2 ml, 1-5 ml, 1-10 ml, 1-25 ml (SPL)
- Plastové pipety s filtrem 100-1000 l (Eppendorf)
- Plastové zkumavky 15 a 50 ml (TPP)
- Podlovní sklo s Bürkerovou komůrkou (Assistent)
- Polyvinylidenfluoridová membrána (PVDF) (Thermo Scientific)
- Sérologické pipety (Labnet)
- Krabka na buňky (TPP)
- Zapalova

### 3.1.5 Pístroje

- Analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- Aspirátor FTA-1 (Biosan)
- Blottovací aparatura Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
- Centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf)
- Centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Centrifuga Combi-Sin FVL-2400 (Biosan)
- Digitální mikroskop (Novel Optics)
- Hlubokomrazicí box MDF-U53V (Sanyo)
- Chladnička (BOSCH)
- Chladnička (Gorenje)
- Chladnička (LG)

- Chladni ka (Whirlpool)
- Inkubátor CO<sub>2</sub> Incubator 203XL (N-Biotek)
- Kýva ka Shaker-Rocker MR-12 (Biosan)
- Laminární box Labculture® (ESCO)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-Cor Biosciences)
- Light cycler 480 II (Roche)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- P ístroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic)
- Sonikátor Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- Termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (MS major science)
- Vodní láze LCB22D (Daihan LabTech)
- Vortex Reax top (Heidolph)
- Zdroj nap í MP-300V (MS major science)

### 3.1.6 Software

- Excel
- i-control 2.0 (Tecan)
- Image Studio Digits Ver 3.1
- Light Cycler 480 SW 1.5 (Roche)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Metodika práce

V experimentální ásti byla stanovována aktivita AhR a AR metodou reporter gene assay, exprese gen *CYP1A1*, *FKBP5* a *KLK3* metodou qPCR a detekovány hladiny protein AhR a AR metodou western blotting. Základem pro každou analýzu byl 3denní experiment, kdy první den byly bu ky vysety na kultiva ní destičky, druhý den prob hla inkubace bun k s testovanými látkami a t etí den byl experiment ukon ěn podle toho, pro kterou metodu analýzy byl p ípravován.

V ěchny bun ěné linie byly udržovány v nativním stavu ulofené v inkubátoru za podmínek 37 °C, koncentrace CO<sub>2</sub> 5 % a 95% vlhkosti v kultiva ním médiu RPMI-1640 s p ídávkem fetálního bovinního séra, L-glutaminu a neesenciálních aminokyselin. Do média k liniím 22AhRv1 a AIZ-AR bylo jednou týdn ěn p ídáno antibiotikum hygromycin B o výsledné koncentraci 0,2 mg ml<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Rozmrazení buněk

Nejprve byla připravena malá kultivační láhev, do které bylo za sterilních podmínek v laminárním boxu dáno přibližně 5 ml kultivačního média. Poté byla z mrazicího boxu o teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  vyjmuta kryozkumavka obsahující buněčnou linii a vložena do vodní lázně po dobu 2 minut. Po rozmrznutí bylo z kultivační láhve již za sterilních podmínek v laminárním boxu odebráno asi 500  $\mu\text{l}$  média a přeneseno do kryozkumavky s buněčnou linií. Obsah kryozkumavky byl propipetován a následně celý přenesen do kultivační láhve. Láhev byla uzavřena, suspenze buněk a média byla pomalými pohyby láhve promíchána a přenesena do inkubátoru pro inkubaci za podmínek  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosti a 5 % koncentrace  $\text{CO}_2$ . Druhý den bylo odstraněno staré médium a vyměněno za nové. V následujících dnech byly buňky pasáfovány a přeneseny na větší kultivační láhev za účelem jejich zmožnění podle potřeb experimentu.

### 3.2.3 Pasáfování buněk

Nejprve byla pomocí mikroskopu určena konfluencia buněk v kultivační láhvi. Poté byla kultivační láhev s buňkami přenesena do laminárního boxu a následující kroky již probíhaly za sterilních podmínek. Z kultivační láhve bylo pomocí odsávací kyby odstraněno staré médium. Buňky byly promyty PBS, které bylo společně s kultivačním médiem přivedeno zahřáté na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve vodní lázni. Objem PBS vyuffitý na promytí buněk závisel na velikosti kultivační láhve. Pro malou láhev byly pouffity přibližně 3 ml, pro střední 5 ml a pro velkou 8 ml. PBS pak bylo odstraněno pomocí odsávací kyby. Následně byla ke buňkám přidána proteasa trypsin za účelem rozrušení adheze buněk ke dnu kultivační láhve a buněčných kontaktů. Objem trypsinu opět závisel na velikosti kultivační láhve, tedy na množství buněk. Pro malou láhev bylo pouffito 500  $\mu\text{l}$ , pro střední 1 ml a pro velkou 2 ml. Kultivační láhev byla přenesena do inkubátoru a buňky byly vystaveny působení trypsinu přibližně 4 min. Poté byla kultivační láhev umístěna zpět do laminárního boxu a proteolytická aktivita trypsinu byla zastavena přidáním kultivačního média tak, aby celkový objem média a trypsinu byl 5 ml u malé láhve a 10 ml u střední a velké láhve. Shluky buněk byly sérologickou pipetou rozsuspendovány, aby vznikla homogenní suspenze, která pak byla přenesena z kultivační láhve do plastové zkumavky o objemu 15 ml. Část buněčné suspenze byla vrácena zpět do kultivační láhve. Objem vrácené suspenze byl individuální a závisel na předešlé konfluenci, rychlosti růstu buněk a potěbném množství buněk pro následující experiment. Do kultivační láhve k suspenzi buněk bylo přidáno kultivační médium tak, aby celkový objem byl 20 ml pro střední láhev

nebo 30 ml pro velkou. Láhev byla uzavřena, suspenze buněk a média byla pomalými pohyby láhve promíchána a přenesena do inkubátoru pro inkubaci za podmínek 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % koncentrace CO<sub>2</sub>.

### **3.2.4 Požitání a vyšetření buněk**

Před samotným vyšetřením buněk na kultivační destičky musely být bučky spojitány pomocí Bürkerovy komůrky, protože bylo nutné vyšetřit počet buněk v daném objemu média na jednu jamku. Pro metodu reporter gene assay byly linie 22AhRv1 a AIZ-AR vysévány na 96jamkové destičky, kdy jedna jamka obsahovala 200 l suspenze. V případě 22AhRv1 bylo vyséváno 20 000 buněk na jamku a u AIZ-AR 50 000 buněk na jamku. Pro PCR a western blotting byly podmínky vyšetření stejné, tudíž linie 22Rv1 byla u obou metod vysévána na 6jamkové destičky, kdy jedna jamka obsahovala 1,5 ml suspenze a 1 500 000 buněk. Nejprve tedy bylo během procesu pasážování, po přenesení homogenní buněčné suspenze z kultivační láhve do plastové zkumavky, odebráno 10 l suspenze do zkumavky Eppendorf a poté mimo laminární box smícháno s 90 l trypanové modifikací. Následně bylo podložní sklo s Bürkerovou komůrkou překryto krycím sklíčkem a mezi ním byla nanášena směs buněk a trypanové modifikace tak, aby se dostala pod celou plochu krycího sklíčka. Pomocí mikroskopu byly spojitány živé neobarvené bučky v 10 tvercích Bürkerovy komůrky o rozměrech 1x1 mm. Následně byl vypočítán počet buněk v 1 ml suspenze, z čehož pak byly určeny objemy média a suspenze potřebné pro následně tak, aby v každé jamce kultivační destičky byl v požadovaném objemu určený počet buněk. V laminárním boxu pak byla v nové plastové zkumavce smíchána buněčná suspenze s médiem a takto připravená směs byla vyseta na kultivační destičky. Destičky byly uzavřeny a přeneseny do inkubátoru na inkubaci za podmínek 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % koncentrace CO<sub>2</sub>.

### **3.2.5 Inkubace buněk s testovanými látkami**

Po přibližně 24 h od vyšetření byly bučky vystaveny působení testovaných látek. Nejprve byly kultivační destičky přeneseny z inkubátoru do laminárního boxu a celý proces probíhal za sterilních podmínek. Pomocí odsávací kyby bylo z jednotlivých jamek odstraněno staré kultivační médium a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím rozpustnou testovanou látku. Pokud byly bučky vystaveny agonistickému působení, před aplikací na bučky byly testované látky rozpustny v médiu. Pokud ale byly bučky vystaveny antagonistickému působení, byl do média před rozpustným testovaných látek přidán DHT, aby jeho celková koncentrace byla 10 nmol l<sup>-1</sup>. V případě metody reporter

gene assay byly v agonistickém i antagonistickém módu testovány látky 4-fluorindol, 5-fluorindol, 6-fluorindol a 7-fluorindol, každá v pěti koncentracích 0,1 mol l<sup>-1</sup>, 1 mol l<sup>-1</sup>, 10 mol l<sup>-1</sup>, 50 mol l<sup>-1</sup> a 100 mol l<sup>-1</sup>, p i emflvřdy byly naná-eny v kvadruplikátech. Pro metody PCR a western blotting byly bu ky vystaveny antagonistickému p sobení stejných látek, ale pouze o nejvyšší koncentraci 100 mol l<sup>-1</sup> a byly aplikovány v monoplikátech. Jako pozitivní kontrola aktivace AhR byl vyuffit TCDD v koncentraci 10 nmol l<sup>-1</sup>. Jako pozitivní kontrola aktivace AR byl vyuffit DHT o koncentraci 10 nmol l<sup>-1</sup>. V antagonistickém módu byla zavedena i kontrola inhibice aktivity AR vyvolaná p ídavkem antagonisty enzalutamidu (ENZ) o koncentraci 10 mol l<sup>-1</sup> v kombinaci s DHT. Na které bu ky byly o-ety pouze DMSO, který byl míchán s médiem v pom-ru 1:1000, což slouffilo jako negativní kontrola (UT). Následn- byly kultiva ní destičky uzav-eny a p-eneseny do inkubátoru na inkubaci za podmínek 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % koncentrace CO<sub>2</sub>.

### 3.2.6 Reporter gene assay

Po 24h inkubaci s testovanými látkami byly kultiva ní destičky vyjmuty z inkubátoru a bylo z nich vyklepnutím odstran-eno médium. Destičky byly osu-eny na buni-in a každá jamka byla promyta 40 l nesterilního PBS. Po odstran-ění PBS a osu-ení destiček bylo do každé jamky naneseo 20 l lyza-ního pufru. Destičky byly uzav-eny, p-elepeny lepící páskou a umíst-ny do mrazni-ky o teplot- -80 °C po dobu minimáln- 20 min. Poté byly destičky vyjmuty a umíst-ny za laboratorní teploty na kýva-ku. Po úplném roztání bylo 6 l lyzátu z každé jamky p-eneseno do bílé 96jamkové destičky, k nimfl bylo p-ídáno 30 l substrátu pro enzym luciferasu. Destičky pak byly postupn- vloženy do p-ístroje Tecan Infinite M200 pro analýzu transkrip-ní aktivity AhR nebo AR a výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel.

### 3.2.7 Izolace RNA

Po 24h inkubaci s testovanými látkami byly kultiva ní destičky vyjmuty z inkubátoru a bylo z nich vyklepnutím odstran-eno médium. Destičky byly osu-eny na buni-in a každá jamka byla promyta 1 ml nesterilního PBS. Po odstran-ění PBS a osu-ení destiček byl do každé jamky naneseo 1 ml TRI Reagentu®. Destičky byly uzav-eny, p-elepeny lepící páskou a umíst-ny do mrazni-ky o teplot- -80 °C, kde mohly být uchovávány do doby dal-šího postupu. Poté byly destičky vyjmuty a umíst-ny za laboratorní teploty na kýva-ku. Po úplném roztání byl obsah jamek p-enesen pomocí pipety s filtrem do jednotlivých zkumavek Eppendorf a do nich bylo p-ídáno 200 l vychlazeného

chloroformu. Směs ve zkumavkách pak byla asi 1 min protřepávána. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 8 min při laboratorní teplotě a poté centrifugace po dobu 15 min za podmínek 4 °C a 13 000 rpm. Po centrifugaci byla horní vodná fáze přenesena do nové sady zkumavek (po objemu 450 µl), kde bylo následovně přidáno 500 µl isopropanolu a vzorky byly po dobu asi 5 s lehce vortexovány. Potom byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě po dobu 7 min a po uplynutí této doby byly centrifugovány 13 min při 4 °C a 13 000 rpm. Po centrifugaci již bylo možné pozorovat pelet. Opatrně byl tedy odlit supernatant. Poté byl pelet promyt 1 ml vychlazeného 75% ethanolu a po jeho aplikaci byl pelet rozbit lehkou vortexací. Vzorky pak byly opět centrifugovány 7 min za stejných podmínek. Po centrifugaci byl odlit supernatant a pelet ve zkumavce byl sušen po dobu 4 min při laboratorní teplotě. K peletu bylo přidáno 30 µl PCR vody, čímž byl pelet rozpuštěn. Následovala 5min inkubace v termobloku o teplotě 65 °C. Vzorky pak byly ihned přesunuty na led. Ve vzorcích byla změněna koncentrace RNA pomocí spektrofotometru NanoDropu a zkumavky se vzorky byly uloženy do mrazničky při -80 °C.

### **3.2.8 Reverzní transkripce**

Vzorky RNA získané izolací z buněk byly vyjmuty z mrazničky a ponechány na ledu, dokud neroztály. Po úplném roztání byly vzorky RNA v nové sadě zkumavek naedány PCR vodou podle předem provedeného výpočtu tak, aby v celkovém objemu 5 µl bylo obsaženo 1000 ng RNA. Po naedání byl do každé zkumavky přidán 1 µl Random primers o koncentraci 100 pmol l<sup>-1</sup>. Vzorky pak byly inkubovány 5 min na termobloku při teplotě 65 °C a poté ihned přeneseny na led. Následně proběhla krátká centrifugace, aby se roztok dostal na dno zkumavky. Ke každému vzorku pak bylo přidáno 6 µl reakční směsi premixu, který byl pro příslušný počet vzorků připraven podle tabulky 1 (Tab. 1). Opět proběhla krátká centrifugace. Následovala inkubace v termobloku po dobu 1 h při 42 °C a poté 10 min při 65 °C. Po inkubaci byly vzorky 2 min ochlazovány na ledu. Výsledná cDNA byla 5x naedána PCR vodou, tedy ke 12 µl cDNA bylo přidáno 48 µl vody. Vzorky byly uloženy do mrazničky při -80 °C.

**Tabulka 1:** Složení reakční směsi premixu využívaného při reverzní transkripci pro jeden vzorek

Reagencie	Objem [ $\mu$ l ]
Reverzní transkriptasa M-MuLV	0,6
Inhibitor ribonukleas	0,3
dNTP (10 mmol $l^{-1}$ )	0,6
Reakční pufr 10x koncentrovaný	1,2
PCR voda	3,3
<b>Celkem</b>	<b>6</b>

### 3.2.9 qPCR

Během celého procesu bylo nutné pracovat za nízké teploty, proto byly všechny kroky prováděny na ledu. Nejprve byl připraven roztok primerů na finální koncentraci 10  $\mu$ mol  $l^{-1}$ , kdy bylo smícháno 10  $\mu$ l forward primeru a 10  $\mu$ l reverse primeru s 80  $\mu$ l PCR vody. Mezitím co vzorky cDNA připravené reverzní transkripcí volně tály na ledu, byl pro příslušný počet vzorků připraven mastermix podle tabulky 2 (Tab. 2). Na dno jamek bílé 96jamkové destičky pro PCR bylo aplikováno 8  $\mu$ l mastermixu a poté 2  $\mu$ l jednotlivých vzorků cDNA. Jako negativní kontrola (NTC) byla využita PCR voda. Metodou PCR byla stanovena exprese těchto genů *GAPDH*, *CYP1A1*, *FKBP5* a *KLK3*. Všechny vzorky pro analýzu exprese těchto genů byly na destičku aplikovány v triplicátech. Destička byla uzavřena fólií a centrifugována 3 min při 4  $^{\circ}$ C a 1500 rpm. Následně byla vložená do přístroje Light Cycler pro analýzu exprese, byly zvoleny podmínky PCR reakce viz (Tab. 3) a výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel.

**Tabulka 2:** Složení mastermixu využívaného při qPCR pro jeden vzorek

Reagencie	Objem [ $\mu$ l ]
KiCqStart Probe qPCR ReadyMix	5
Směs forward a reverse primeru (100 $\mu$ mol $l^{-1}$ )	0,3
Průba (10 $\mu$ mol $l^{-1}$ )	0,2
PCR voda	2,5
<b>Celkem</b>	<b>8</b>

**Tabulka 3:** Podmínky jednotlivých procesů reakce qPCR

Počet cyklů	Proces	čas	Teplota [ $^{\circ}$ C]
1	Počáteční denaturace	2-3 min	95
30-45	Denaturace	10 s	95
	Elongace	30-60 s	60



### 3.2.10 Izolace protein

Po 24h inkubaci s testovanými látkami byly kultivační destičky vyjmuty z inkubátoru a bylo z nich vyklepnutím odstraněno médium. Destičky byly osušeny na buničině a každá jamka byla promyta 1 ml nesterilního PBS. Po odstranění PBS a osušení destiček byl do každé jamky nanesen opět 1 ml PBS. Buňky adheované ke dnu jamek byly pomocí škrabky seškrábány a v suspenzi s PBS přeneseny do připravené sady zkumavek. Následně proběhla 5min centrifugace při 4 °C a 4000 rpm. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a do každé zkumavky bylo k peletu přidáno 150  $\mu$ l lyzačního pufru Protein Lysis Buffer. Před použitím byla do 10 ml lyzačního pufru přidána 1 tableta inhibitoru fosfatů a 1 tableta inhibitoru proteas. Vzorky byly vortexovány, vystaveny sonikaci po dobu 20 s, znovu vortexovány a poté centrifugovány 15 min při 4 °C a 13 200 rpm. Vzniklý supernatant obsahující proteiny byl odebrán do nové sady zkumavek. Ve vzorcích pak byla měřena koncentrace proteinů dle metody Bradfordové. Pro měření koncentrace bylo v nové sadě zkumavek připraveno 25  $\mu$ l 5x zředěných vzorků, tedy 5  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 20  $\mu$ l PCR vody. Do 96jamkové destičky bylo nanášeno 10  $\mu$ l na jamku, při čemž všechny vzorky se měřily v duplikátech. Následně byla v duplikátech nanášena kalibrační křivka sestávající z PCR vody a roztoku BSA o koncentraci 0,25 mg ml<sup>-1</sup>, 0,5 mg ml<sup>-1</sup> a 1 mg ml<sup>-1</sup>. Do každé jamky bylo přidáno 200  $\mu$ l Bradfordova činidla. Destička byla vložená do přístroje Tecan Infinite M200 a spektrofotometricky byla stanovena koncentrace proteinů.

### 3.2.11 SDS-PAGE

Vzorky proteinů získané izolací byly pro SDS-PAGE připraveny ředěním s PCR vodou v nové sadě zkumavek, aby po přidání 10  $\mu$ l LB pufru bylo v celkovém objemu 20  $\mu$ l obsaženo 20  $\mu$ g proteinů. Vzorky byly následně vortexovány, krátce centrifugovány a 5 min inkubovány v termobloku při 95 °C. Po inkubaci byly vzorky denaturovaných proteinů přeneseny na led. Podlovní a krycí skla byla omyta deionizovanou vodou, očištěna ethanolem a po oschnutí upevněna do stojanu. Podle tabulky 4 (Tab. 4) byl připraven roztok 10% dlečivého gelu, který byl po promíchání aplikován do prostoru mezi skly. Příbližný objem nanášeného roztoku byl 7,5 ml. Roztok byl převrstven isopropanolem o objemu asi 2x200  $\mu$ l a nechal se polymerovat po dobu 20 min. Po ztuhnutí gelu byl isopropanol odstraněn a gel 5x omyt destilovanou vodou. Přebytková voda pak byla odstraněna pomocí filtračního papíru. Podle tabulky 5 (Tab. 5) byl připraven roztok zaostřovacího gelu, který byl po promíchání aplikován do prostoru mezi

skly. Příbližný objem nanášeného roztoku byl 2 ml. Mezi skla byl vložen hřebíček a roztok se nechal tuhnout po dobu 30 min. Po polymeraci byla skla s gelem ve vlhké buně uložena do chladničky do následujícího dne. Druhý den byl gel vložen do elektroforetické komůrky a hřebíček byl opatrně vyjmut. Do komůrky byl nalit migrační pufr a následně byly do jamek nanášeny 2  $\mu$ l standardu molekulové hmotnosti Protein Ladder a 20  $\mu$ l jednotlivých vzorků připravených pro SDS-PAGE. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí, při podmínkách konstantního proudu 30 mA na 1 gel. Proces SDS-PAGE pak probíhal, dokud separované vzorky nedosáhly úrovně přibližně 0,5 cm od konce skla.

**Tabulka 4:** Složení roztoku 10% denaturovaného gelu (1,5 mm) využívaného při SDS-PAGE pro jeden gel

Reagencie	Objem
40% akrylamid	2,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,9 ml
4x denaturovací pufr (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
APS	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

**Tabulka 5:** Složení roztoku zaostrovacího gelu (1,5 mm) využívaného při SDS-PAGE pro jeden gel

Reagencie	Objem
40% akrylamid	0,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,56 ml
4x zaostrovací pufr (pH 6,8)	1 ml
10% SDS	40 $\mu$ l
APS	30 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l

### 3.2.12 Western blotting

PVDF membrána byla hydratována v methanolu asi 30 s, poté 2x omyta deionizovanou vodou po dobu přibližně 6 min a následně přenesena do transferového pufru. Po ukončení SDS-PAGE byla od sebe oddělena skla a odstraněn zadržovací gel. Důležitý gel byl pak přenesen do transferového pufru. Následně byla připravena blotovací aparatura. Elektrody byly omyty deionizovanou vodou a filtrační papíry byly namořeny do transferového pufru. Aparatura pak byla sestavena skládáním na sebe dvou filtračních papírů, membrány, gelu a znovu dvou filtračních papírů. Jednotlivé vrstvy byly v průběhu sestavování uhlazeny válečkem, aby se zamezilo vzniku vzduchových bublin. Aparatura byla uzavřena a připojena ke zdroji o 300 mA. Proces přenosu proteinů na membránu (semi-dry) probíhal 1,5 h. Po dokončení přenosu byl vypnut zdroj a aparatura rozebrána. Membrána byla 2x omyta deionizovanou vodou a obarvena v roztoku Ponceau S. Následně byla opět hydratována v methanolu, 2x omyta deionizovanou vodou, odbarvena v transferovém pufru a nepotřebné okraje pak byly skalpelem odříznuty. Poté byla membrána inkubována 1 h v roztoku 5% mléka v TBS/Tween. Mezitím byly připraveny roztoky primárních protilátek včetně s 5% BSA v TBS/Tween v poměru závisícím na druhu protilátky. Protilátky pro aktin byly včetně v poměru 1:4000, pro AR 1:1000 a pro AhR 1:250. Po inkubaci v roztoku mléka byla membrána přenesena do roztoku primární protilátky a inkubována přes noc na kývačce v chladničce. Druhý den byla membrána 3x promyta v TBS/Tween po dobu 10 min. Mezitím byly připraveny roztoky sekundárních protilátek včetně v 5% roztoku mléka v TBS/Tween v poměru 1:2000. Po promytí byla membrána inkubována v roztoku sekundárních protilátek 1 h na kývačce za laboratorní teploty. Po inkubaci byla membrána 3x po 5 min promyta v TBS/Tween. Následně byla membrána přenesena na suché ořezané podložní sklo a přivržena přibližně 600 μl substrátu a inkubována 5 min. Substrát byl předem připraven smícháním dvou roztoků Stable Peroxide Solution a Luminol Enhancer Solution v poměru 1:1. Membrána pak byla umístěna do přístroje Li-cor pro detekci proteinů.

### 3.2.13 Reblotting

Jedna membrána mohla být využita pro opětovnou detekci jiného proteinu. V takovém případě musela být reblottována. Po detekci byla tedy membrána promyta v TBS/Tween a následně 15 minut inkubována v reblotting pufru. Reblotting pufr byl pro použití připraven včetně s dH<sub>2</sub>O v poměru 1:9. Membrána byla dále 2x po 10 min promyta v 5% roztoku mléka. Následovala hodinová inkubace membrány v roztoku primárních

protilátek a 5% BSA na kýva ce za laboratorní teploty. Membrána byla 3x po 5 min promyta v TBS/Tween a poté inkubována 1 h se sekundárními protilátkami v roztoku 5% mléka. Po inkubaci byla opět 3x promyta v TBS/Tween, na podlofním skle p evrstvena substrátem a detekce protein probíhala stejným způsobem jako u western blottingu.

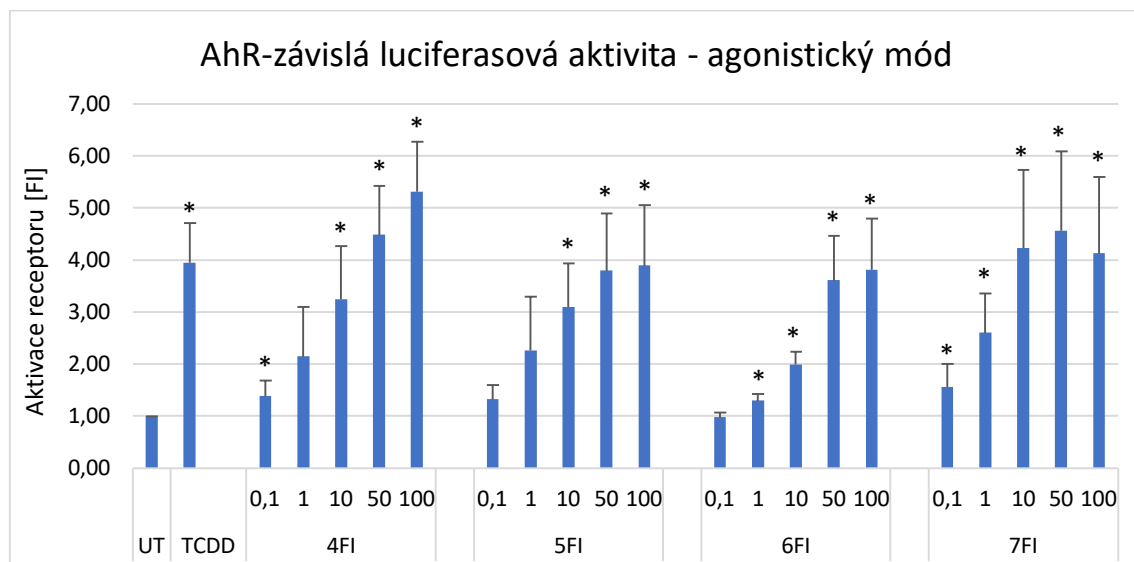
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Reporter gene assay

#### 4.1.1 Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru v agonistickém módu

Stabilně transfekovaná buněčná linie 22AhRv1 nese reportérový gen luciferasy a je využívána pro sledování transkripční aktivity AhR. Buňky linie 22AhRv1 byly po dobu 24 h vystaveny působení 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu. Následně byla metodou reporter gene assay stanovena aktivita AhR při působení vždy jedné látky (agonistický mód). Všechny fluorindoly byly použity v pěti koncentracích  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Při pozorování vlivu působení látek na aktivitu AhR byl u 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu se zvyšující se koncentrací zaznamenán nárůst aktivity receptoru (Graf 1). Nejvýraznější nárůst aktivity AhR byl sledován u 4-fluorindolu, kdy nejvyšší koncentrace  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovala 5,3násobku indukce aktivity receptoru ve srovnání s negativní kontrolou a převyšovala tak i pozitivní kontrolu TCDD, který vyvolával přibližně 4násobek indukce negativní kontroly. Z uvedených výsledků tak vyplývá, že vlivem fluorindolů docházelo k aktivaci AhR.



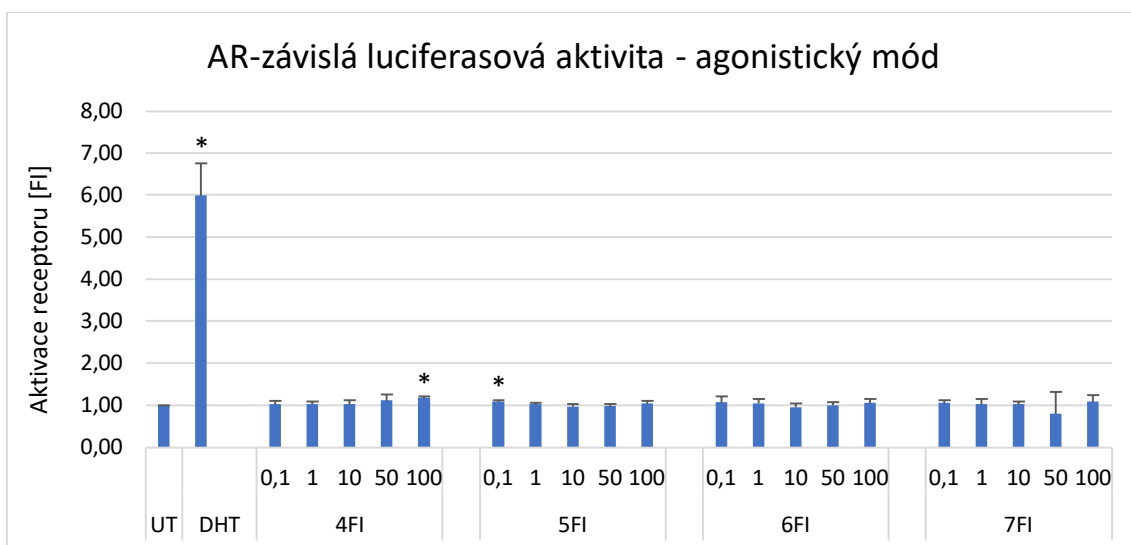
**Graf 1: Působení látek na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR).** Buněčná linie 22AhRv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI). Jako negativní kontrola, označena jako UT, byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit ligand AhR, 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Všechny fluorindoly byly použity v koncentracích  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace TCDD je  $10 \text{ nmo}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena aktivita luciferasy, která je přímo úměrná aktivitě AhR. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky indukce (fold induction = FI) aktivity receptoru v porovnání s negativní kontrolou, která

představuje hodnotu 1. Výsledky jsou průměrem z 5 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem ( $p < 0,05$ ) vyhodnoceny jako statisticky významné vzhledem k UT.

#### 4.1.2 Stanovení aktivity androgenního receptoru v agonistickém módu

Stabilně transfekovaná buněčná linie AIZ-AR nese reportérový gen luciferasy a je využívána pro sledování transkripční aktivity AR. Buněky linie AIZ-AR byly po dobu 24 h vystaveny působení 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu. Následně byla metodou reporter gene assay stanovena aktivita AR v agonistickém módu. Všechny fluorindoly byly použity v pěti koncentracích  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Při pozorování vlivu působení látek na aktivitu AR nebyla sledována žádná výrazná změna na aktivitu receptoru (Graf 2). Úroveň aktivace se tak u všech testovaných látek pohybovala kolem negativní kontroly. Naopak pozitivní kontrola dihydrotestosteron vykazoval 6násobek indukce negativní kontroly, což potvrzuje funkčnost systému. Uvedené výsledky tak naznačují, že testované fluorindoly neaktivovaly androgenní receptor.

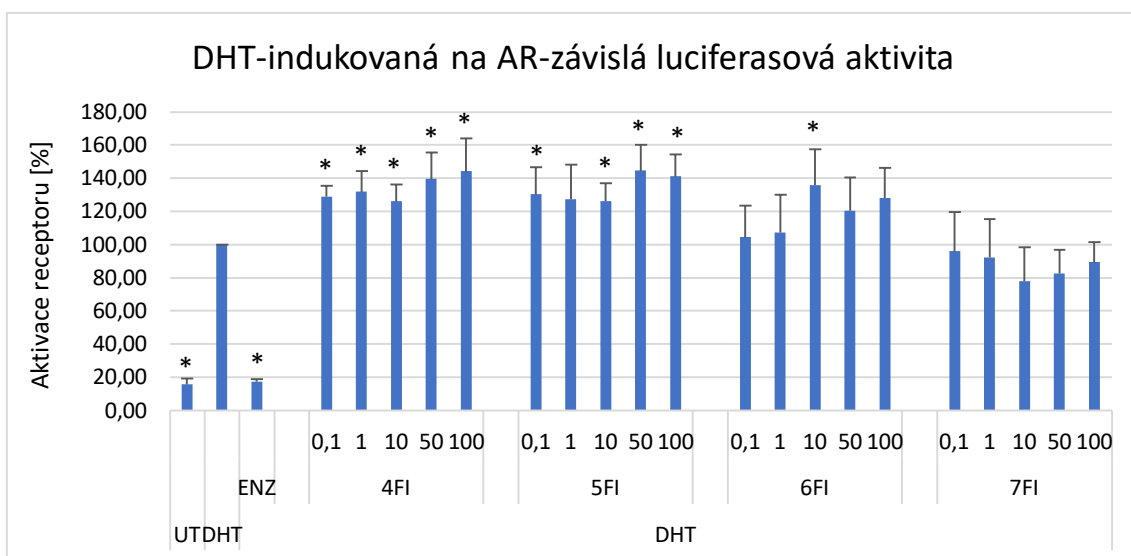


**Graf 2: Působení látek na aktivitu androgenního receptoru (AR).** Buněčná linie AIZ-AR byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI). Jako negativní kontrola (zde označeno jako UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit ligand AR, dihydrotestosteron (DHT). Všechny fluorindoly byly použity v koncentracích  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena aktivita luciferasy, která je přímo úměrná aktivitě AR. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky indukce (fold induction = FI) aktivity receptoru vzhledem k negativní kontrole, která představuje hodnotu 1. Výsledky jsou průměrem ze 4 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem ( $p < 0,05$ ) vyhodnoceny jako statisticky významné vzhledem k UT.

### 4.1.3 Stanovení aktivity androgenního receptoru v antagonistickém módu

Buňky linie AIZ-AR byly po dobu 24 h vystaveny působení 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu současně s dihydrotestosteronem, který byl vyuffit pro aktivaci AR. Následně byla metodou reporter gene assay stanovena aktivita AR při působení dvou látek (antagonistický mód). Všechny fluorindoly byly pouffity v pěti koncentracích 0,1 mol·l<sup>-1</sup>, 1 mol·l<sup>-1</sup>, 10 mol·l<sup>-1</sup>, 50 mol·l<sup>-1</sup> a 100 mol·l<sup>-1</sup>.

Jako kontrola schopnosti antagonizovat receptor bylo pouffito lékivo enzalutamid (ENZ), který snížil DHT-indukovanou na AR-závislou luciferasovou aktivitu podobně na úroveň negativní kontroly (Graf 3). Pěkvapivě, tři z testovaných indolů, konkrétně 4-fluorindol, 5-fluorindol a 6-fluorindol, vykazovaly mírný potenciální účinek. Úroveň aktivity receptoru u těchto látek ve všech koncentracích přesahovala pozitivní kontrolu, u nichž koncentrací aflu 40 % (Graf 3). Jediný 7-fluorindol indukoval koncentraci závislý, i když statisticky nevýznamný, pokles dihydrotestosteronem vyvolané na AR-závislé luciferasové aktivity skoro aflu 20 %.



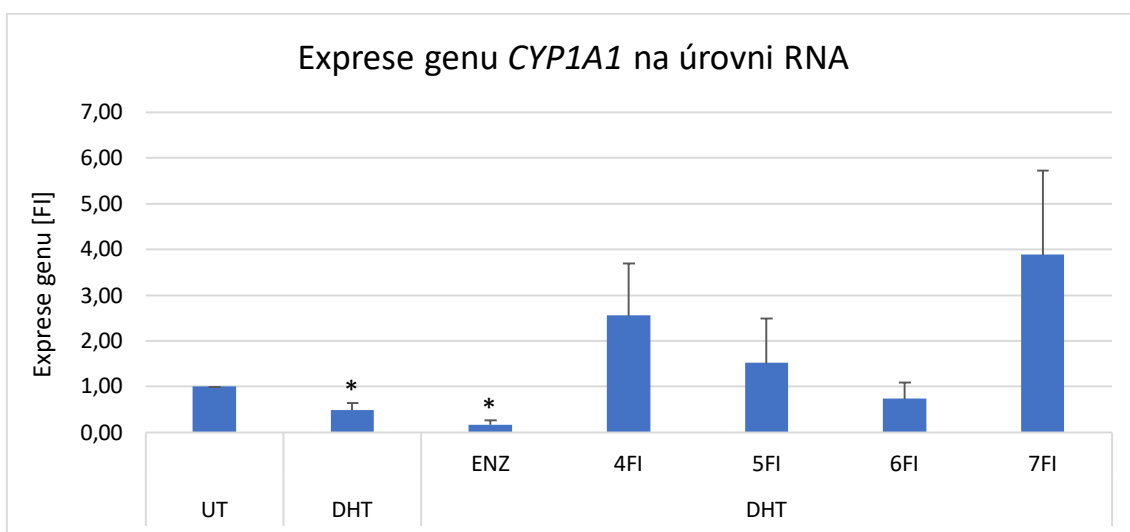
**Graf 3: Působení látek na aktivitu AR v přítomnosti DHT.** Buňky linie AIZ-AR byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (označena jako UT) byl vyuffit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl vyuffit DHT. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl vyuffit enzalutamid (ENZ) při současném působení DHT. Fluorindoly byly pouffity v koncentracích 0,1 mol·l<sup>-1</sup>, 1 mol·l<sup>-1</sup>, 10 mol·l<sup>-1</sup>, 50 mol·l<sup>-1</sup> a 100 mol·l<sup>-1</sup> a ENZ o koncentraci 10 mol·l<sup>-1</sup>. Pouffitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení s látkami, je 10 nmol·l<sup>-1</sup>. Následně byla stanovena aktivita luciferasy, která je přímo úměrná aktivitě AR. Výsledky jsou vztafleny k pozitivní kontrole, která představuje 100 %. Výsledky jsou pro průměrem 5 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem (p < 0,05) vyhodnoceny jako statisticky významné vůči DHT.

## 4.2 qPCR

P estofe fluorindoly vykázaly minimální vliv na DHT-indukovanou AR-závislou luciferasovou aktivitu, bylo dále sledováno, zda ovlivní expresi zejména AR kontrolovaných cílových genů. Buňky nádorové prostatické linie 22Rv1 byly po dobu 24 h vystaveny působení 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu současně s dihydrotestosteronem o koncentraci  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , který byl vyuffit pro aktivaci AR. Následně byla metodou qPCR stanovena hladina exprese cílových genů AhR a AR, konkrétně genů *CYP1A1*, *FKBP5* a *KLK3*. Všechny fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 4.2.1 Stanovení hladiny exprese genu *CYP1A1*

*CYP1A1* je cílový gen AhR a jeho expresi je vyuffívána jako marker aktivace AhR (Hu et al., 2007). Při pozorování vlivu působení látek na expresi genu *CYP1A1* byly nejvýš indukce exprese zaznamenány u 7-fluorindolu a 4-fluorindolu. U 7-fluorindolu indukce dosahovala 3,9násobku negativní kontroly a v případě 4-fluorindolu pak 2,6násobku (Graf 4). To naznačuje aktivaci AhR. Ostatní fluorindoly nevykazovaly žádný vliv na hladinu exprese genu *CYP1A1* na úrovni mRNA.

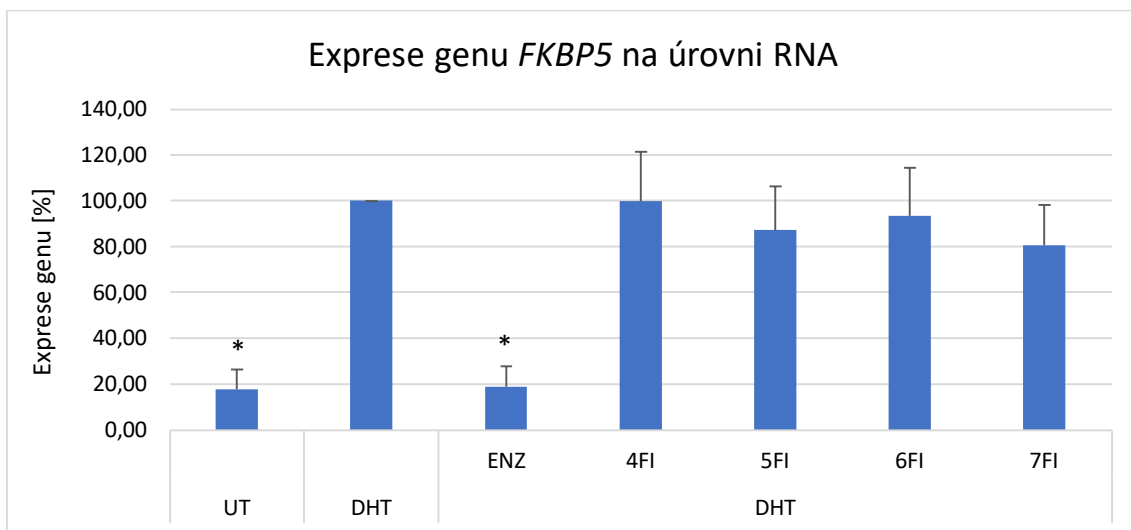


**Graf 4: Působení látek na expresi genu *CYP1A1*.** Buňky linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl vyuffit dimethylsulfoxid. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl vyuffit enzalutamid (ENZ) při současném působení DHT. Fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pouffitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena expresi genu *CYP1A1*. Hodnoty byly normalizovány vůči housekeeping genu *GAPDH*. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky indukce (fold induction = FI) exprese vůči negativní kontrole, která představuje hodnotu 1. Výsledky jsou průměrem 5 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem ( $p < 0,05$ ) vyhodnoceny jako statisticky významné vůči UT.



#### 4.2.2 Stanovení hladiny exprese genu *FKBP5*

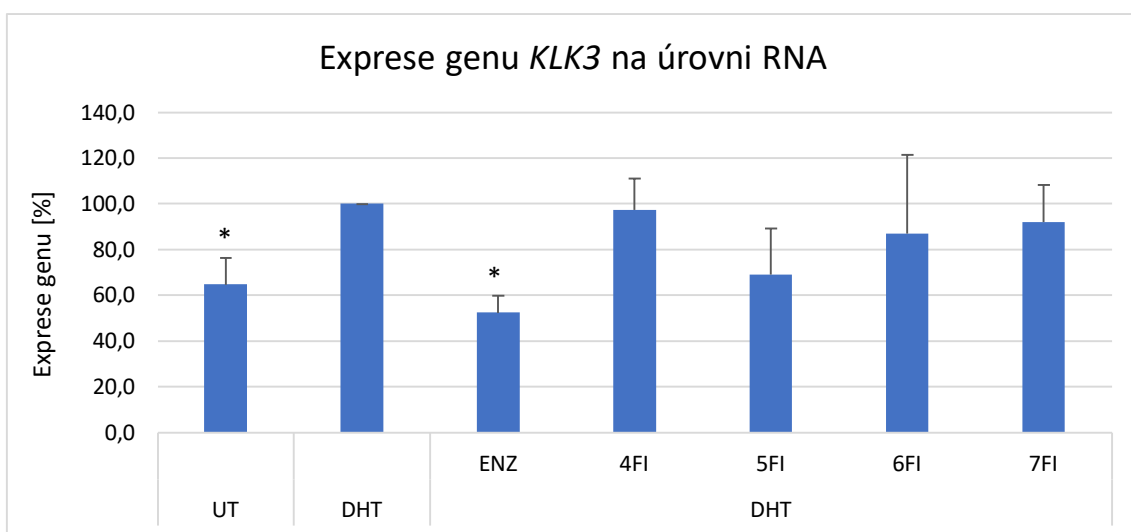
*FKBP5* je cílový gen AR (Magee et al., 2006) a jeho exprese indikuje funkční signalizaci AR (Smith et al., 2015). Při pozorování vlivu působení látek na DHT-indukovanou expresi genu *FKBP5* byl u 7-fluorindolu pozorován přibližně 20% pokles exprese (Graf 5), což je v souladu s výsledky metody reporter gene assay. Ostatní indoly neměly na expresi *FKBP5* významný vliv. V případě antagonisty AR, enzalutamidu, pak bylo sledováno potlačení DHT-indukované exprese *FKBP5* na úroveň negativní kontroly.



**Graf 5: Působení látek na expresi genu *FKBP5*.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit DHT. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) působící současně s působením DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i působící současně s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena exprese genu *FKBP5*. Hodnoty byly normalizovány vůči housekeeping genu *GAPDH*. Výsledky jsou vztaženy k pozitivní kontrole, která představuje 100 %. Výsledky jsou průměrem z 5 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem ( $p < 0,05$ ) vyhodnoceny jako statisticky významné vůči DHT.

### 4.2.3 Stanovení hladiny exprese genu *KLK3*

*KLK3* je androgeny regulovaný gen, jehož exprese naznačuje zvýšenou aktivitu AR (Massie et al., 2007). Při pozorování vlivu působení látek na expresi genu *KLK3* byl zaznamenán pokles exprese (Graf 6), který u 4-, 6- a 7-fluorindolu nepřesáhl 15 %, avšak pro 5-fluorindol dosahovalo snížení exprese až 30 % ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nicméně ani v jednom případě nebyl pokles statisticky významný. U enzalutamidu pak bylo pozorováno potlačení DHT-indukované exprese *KLK3* pod úroveň negativní kontroly.



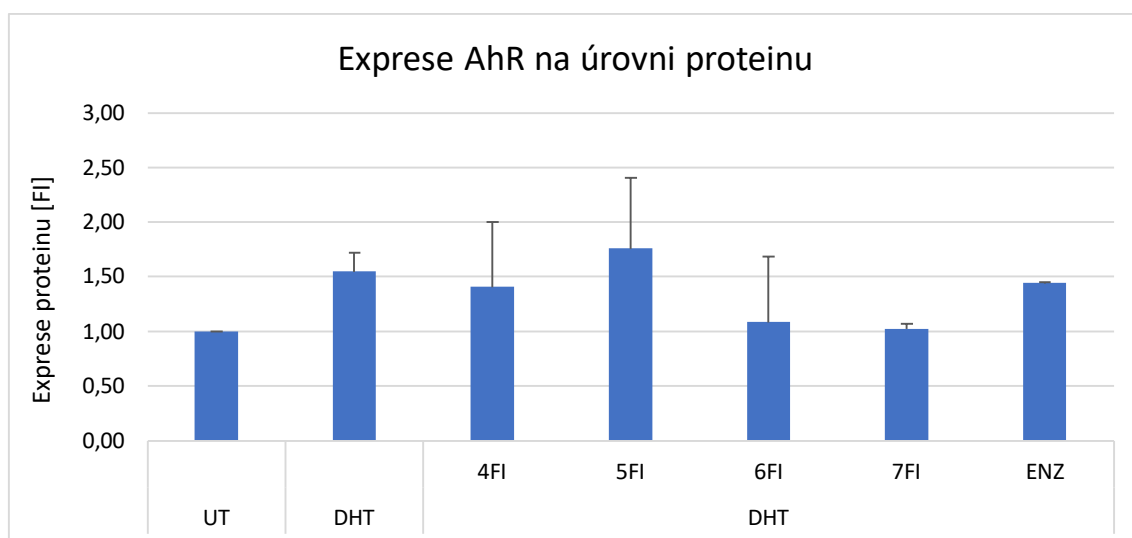
**Graf 6: Působení látek na expresi genu *KLK3*.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit DHT. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) působícím současně s DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i působícím současně s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena exprese genu *KLK3*. Hodnoty byly normalizovány vůči housekeeping genu *GAPDH*. Výsledky jsou vztaženy k pozitivní kontrole, která představuje 100 %. Výsledky jsou průměrem z 5 experimentů. Symbolem \* jsou označeny hodnoty, které byly Studentovým t-testem ( $p < 0,05$ ) vyhodnoceny jako statisticky významné vůči DHT.

### 4.3 Western blotting

Přestože exprese AR cílových genů byla ovlivněna jen minimálně, stále tu byla možnost změny hladiny samotného proteinu AR. Proto se přistoupilo ke stanovení jeho hladiny. Buněky nádorové prostatické linie 22Rv1 byly po dobu 24 h vystaveny antagonistickému působení 4-fluorindolu, 5-fluorindolu, 6-fluorindolu a 7-fluorindolu současně s dihydrotestosteronem o koncentraci  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , který byl vyuffit pro aktivaci AR. Následně byla metodou western blotting detekována hladina proteinů AhR a AR. Všechny fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.3.1 Detekce hladiny proteinu AhR

Při pozorování vlivu působení látek na hladiny exprese AhR na úrovni proteinu vykazoval agonista AR, dihydrotestosteron, zvýšení množství proteinu AhR, které nebylo ovlivněno působitvostí antagonisty, enzalutamidu (Graf 7, Obrázek 1). Z testovaných indolů jako jediného 7-fluorindolu nebyl pozorován nárůst hladiny proteinu AhR.

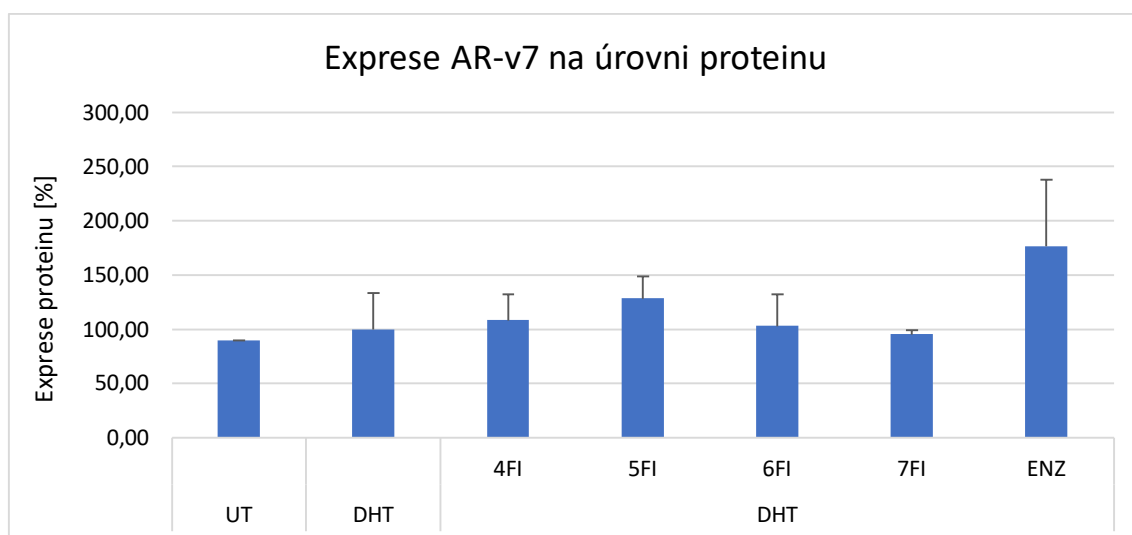


**Graf 7: Působení látek na expresi AhR na úrovni proteinu.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl vyuffit dimethylsulfoxid. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl vyuffit enzalutamid (ENZ) přičemž současně působení DHT. Fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pouffitá koncentrace DHT, samostatně i přičemž současně působení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla detekována hladina proteinu AhR. Hodnoty byly normalizovány vůči  $\beta$ -aktinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky indukce (fold induction = FI) exprese vůči UT, která představuje hodnotu 1. Výsledky jsou průměry ze 2 experimentů.

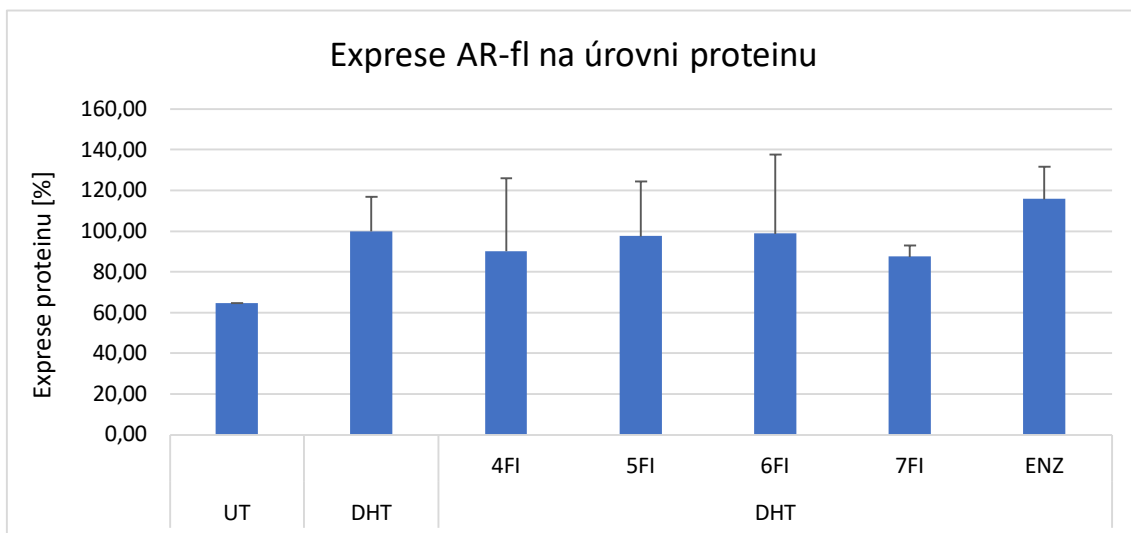
### 4.3.2 Detekce hladiny proteinu AR

Metodou western blotting byla detekována varianta proteinu AR plné délky (full length = AR-fl), jejíž molekulová hmotnost je 110 kDa, a šestihodová varianta (AR-v7) o molekulové hmotnosti 87 kDa (Obrázek 8). Při pozorování vlivu působení látek na expresi AR-v7 a AR-fl na úrovni proteinu byl v obou případech zaznamenán nárůst AR proteinu působením DHT, který byl jen mírně snižován přítomností 7-fluorindolu (Obr 8) (Graf 8 a 9).

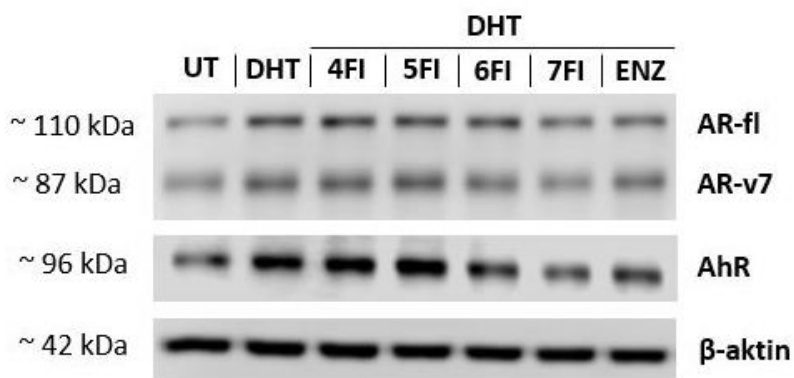
Hladina proteinu AR-v7 byla jen nevýznamně ovlivněna působením DHT nebo kombinací DHT s fluorindoly (Graf 8, Obrázek 8). Při detekci AR-fl indukoval DHT nárůst hladiny proteinu, což je známé z literatury (Gregory et al., 2004) (Graf 9, Obrázek 8). Pouze u jediného 7-fluorindolu byl sledován pokles DHT-indukovaného nárůstu proteinu AR-fl. U ostatních fluorindolů nebyl zaznamenán žádný efekt, který by ovlivňoval hladinu AR-fl. Zajímavý byl však účinek enzalutamidu, který hladinu proteinu AR v obou případech mírně navýšil nad samotný DHT.



**Graf 8: Působení látek na expresi AR-v7 na úrovni proteinu.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit DHT. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) působící současně s DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i působící současně s látkami, je  $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Následně byla detekována hladina proteinu AR-v7. Hodnoty byly normalizovány vůči  $\beta$ -aktinu. Výsledky jsou vztaženy k DHT, která představuje 100 %. Výsledky jsou průměrem ze 2 experimentů.



**Graf 9: P sobení látek na expresi AR-fl na úrovni proteinu.** Bun na linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena p sobení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) sou asn s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl vyuffit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl vyuffit DHT. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl vyuffit enzalutamid (ENZ) p i sou asném p sobení DHT. Fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pouffitá koncentrace DHT, samostatn i p i sou asném p sobení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následn byla detekována hladina proteinu AR-fl. Hodnoty byly normalizovány v i -aktinu. Výsledky jsou vztafeny k DHT, která p edstavuje 100 %. Výsledky jsou pr m rem ze 2 experiment .



**Obrázek 8: Detekce protein AR-fl (110 kDa), AR-v7 (87 kDa), AhR (96 kDa) a -aktinu (42 kDa) metodou western blotting.** Bun na linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena p sobení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) sou asn s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl vyuffit dimethylsulfoxid. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl vyuffit enzalutamid (ENZ) p i sou asném p sobení DHT. Fluorindoly byly pouffity v koncentraci  $100 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pouffitá koncentrace DHT, samostatn i p i sou asném p sobení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Snímek je reprezentivní výsledek ze dvou experiment .

## 5 DISKUSE

Tato diplomová práce se zabývá aktivací AhR fluorovanými deriváty indolu a jejím následným dopadem na aktivitu AR v nádorové prostatické linii 22Rv1. AhR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který je u mnoha živočišných druhů zapojen do různých fyziologických procesů a je aktivován mnoha látkami, jakými mohou být sloučeniny obsahující aromatické uhlovodíky nebo různé xenobiotické chemikálie, přičemž pak reguluje enzymy zapojené do metabolismu těchto látek. V roce 2007 Ohtake et al. objevili, že AhR může být součástí komplexu ubiquitin E3 ligasy, která určuje cílovou specifitu při degradaci proteinů v systému ubiquitin-proteasom. V komplexu má ligandem aktivovaný AhR funkci substrátově specifické adaptorové složky zaměřující jiné proteiny k proteasomální degradaci. Takovými proteiny mohou být receptory steroidních hormonů, jako právě AR (Ohtake et al., 2007). AR zprostředkovává působení mužských pohlavních hormonů, a kromě fyziologických funkcí, jako tvorba kostní hmoty, vývoj kosterního svalstva a mužských pohlavních orgánů, má také významnou roli v mechanismu progresu rakoviny prostaty. Degradace AR prostřednictvím AhR by tedy mohla být potenciálním cílem léčby tohoto onemocnění.

AhR může být aktivován širokým spektrem látek. Typickým příkladem ligandů, jak již bylo zmíněno, jsou látky, které mají ve své struktuře přítomné aromatické uhlovodíky jako třeba indol. Schopnost aktivace AhR byla potvrzena i u celé řady látek odvozených od indolu, které ve své přehledové studii shrnují Dvořák et al., (2021). Eventuálními ligandy jsou i halogenové deriváty indolu. Například bromované indoly a bromované methylinidoly izolované z mořské řasy *Laurencia brongniartii* byly identifikovány jako ligandy AhR po inkubaci s rakovinnými buňkami myši, krysa a morčata (DeGroot et al., 2015). Při pozorování působení čtyř halogenovaných indolů pocházejících z červené řasy *Rhodophyllis membranacea* na lidskou buněčnou linii rakoviny jater HepG2 byla prostřednictvím měření aktivity *CYP1A1* také zaznamenána aktivace AhR (King et al., 2022). Pro experimentální část této diplomové práce pak byly vybrány čtyři fluorované deriváty indolu 4-fluorindol, 5-fluorindol, 6-fluorindol a 7-fluorindol, přičemž se předpokládala schopnost těchto látek AhR aktivovat.

Předpoklad aktivace AhR fluorindoly byl potvrzen i detekcí transkripční aktivity genu pro AhR v buněčné linii 22AhRv1 metodou reporter gene assay, kdy u všech čtyř látek byla pozorována rostoucí hladina aktivity AhR se zvyšující se koncentrací indolů. Podobný trend, během sledování druhově specifické agonistické aktivity indolu v AhR

mezi lidskými, myšmi a potkaními buňkami, pozorovali Hubbard et al. pro samotný indol, který vykazoval koncentrací závislou aktivaci receptoru v lidských buněčných liniích HepG2 nesoucí luciferásový konstrukt pro AhR (Hubbard et al., 2015). Zgarbová & Vrzal, (2022) se ve své studii zabývali dopadem indolových derivátů jako methylyndoly a methoxyindoly, které aktivovaly AhR, na aktivitu AR v linii 22Rv1. Schopnost látek aktivovat AhR byla stejná jako v této diplomové práci ověřena metodou reporter gene assay s využitím linie 22AhRv1. Všechny z 22 testovaných indolů aktivovaly AhR po 24h inkubaci a u 21 z nich byla pozorována koncentrací závislá aktivace tohoto receptoru. Při srovnání fluorindolů a jejich pozicí substituentů podobných methylyndolů z této studie, tedy 4-, 5-, 6- a 7-methylindolů, byla mezi fluorindoly nejvyšší aktivace AhR zaznamenána u 4-fluorindolu, zatímco mezi methylyndoly nejvyšší aktivaci vykazoval 6-methylindol, kdy methylová skupina na pozici 6 způsobila zvýšení aktivity až na téměř dvojnásobek pozitivní kontroly TCDD. Zbývající methylyndoly pak vykazovaly podobnou aktivaci AhR jako fluorindoly, kdy nejvyšší koncentrace dosahovaly podobné aktivity u pozitivní kontroly (Zgarbová & Vrzal, 2022). Tyto výsledky naznačují, že hladina aktivity AhR vyvolaná působením indolových derivátů, může být v rámci jednoho substituentu silně závislá na jeho pozici na indolovém skeletu.

Metodou reporter gene assay byl také pozorován vliv fluorindolů na transkripční aktivitu AR s využitím linie AIZ-AR. Kladným změnám v aktivitě, které by se mohly korelovat s koncentrací látek, nedocházelo. Ve všech případech byla aktivita AR na úrovni negativní kontroly. Ve studii Zgarbové & Vrzala, (2022) také následně sledovali vliv methylyndolů a methoxyindolů, schopných aktivovat AhR, na transkripční aktivitu AR. Většina látek se pohybovala na podobné úrovni negativní kontroly, pouze tři látky signifikantně převyšovaly negativní kontrolu. Paradoxní látka, která jako jediná nevykazovala koncentrací závislou aktivaci AhR, 3-methylindol neboli skatol, vykazoval koncentrací závislé snížení aktivity AR (Zgarbová & Vrzal, 2022). Hladina aktivity AR u methylyndolů srovnávaných s fluorindoly se pohybovala mírně pod hladinou negativní kontroly. U methylyndolů tak byla zaznamenána nepatrně nižší aktivace AR než v případě fluorindolů.

Buňky AIZ-AR byly vystaveny také antagonistickému působení fluorindolů spolu s DHT, aby bylo simulováno prostředí o zvýšených hladinách androgenů, jako je tomu v organismu u pacientů s rakovinou prostaty, a mohla tak být sledována potenciální schopnost fluorindolů tuto DHT-indukovanou aktivitu AR a případně progresi rakoviny potlačit. Suprese rakoviny prostaty díky degradaci AR prostřednictvím ligandů AhR byla ale již

n kolikrát pozorována. Chen et al., (2020) zjistili, že látka Carbidopa, vyuffivaná p i lé b Parkinsonovy choroby a fungující jako agonista AhR, u nádorových bun k snifovala hladinu proteinu AR prost ednictvím AhR-indukované proteasomální degradace a tím vedla k inhibici bun něho r stu a apoptóze (Chen et al., 2020). Ve studii Sun et al., (2015) pozorovali proteasomální degradaci AR i jeho sest ihových variant, které mohou p ispívat k rezistenci v i antiandrogen m, díky aktivaci AhR p irozen se vyskytujícím prenylflavonoidem icaritinem, která vedla taktéfl k indukci apoptózy bun k rakoviny prostaty a potla ení jejich r stu (Sun et al., 2015). V experimentální ásti této diplomové práce p i p sobení fluorindol v antagonistickém módu byl pak sledován koncentra n závislý, av-ak statisticky nevýznamný, pokles aktivity AR pouze u 7-fluorindolu. Ostatní látky m ly spí-e kostimula ní charakter. Ve studii Zgarbové a Vrzala, (2022) p i antagonistickém p sobení methylindol a methoxyindol spole n s DHT, methylindoly porovnávané s fluorindoly obecn vykazovaly v t-í poteciál DHT-indukovanou aktivitu AR potla it. U 4-methylindolu byl pozorován signifikantní koncentra n závislý pokles aktivity AR. 5-methylindol a 6-methylindol nem ly kostimula ní charakter jako 5- a 6-fluorindol, ale úrove aktivity AR se pohybovala na úrovni pozitivní kontroly, p i emfl s rostoucí koncentrací nepatrn klesala. Nejvy-í aktivitu z t chto ty látek vykazoval 7-methylindol, který v-ak pozitivní kontrolu p evy-oval maximáln o 20 %. Celkov v této studii u pouze 8 látek, jako 3-methylindol, 4-methylindol, 1,3-dimethylindol, 2,3-dimethylindol, 2,3,7-trimethylindol, 4,6-dimethylindol, 5,6-dimethylindol a 7-methoxy-4-methylindol, z 22 testovaných pozorovali koncentra n závislý pokles aktivity AR. Výsledky této studie tak nazna ují, že p sobení aktivace AhR na aktivitu AR m že být siln závislé na specificit ligandu AhR (Zgarbová & Vrzal, 2022).

V následujícím postupu experimentální ásti byl sledován vliv fluorindol o nejvy-í koncentraci v antagonistickém p sobení na expresi cílových gen AhR (*CYP1A1*) a AR (*FKBP5* a *KLK3*) a na hladinu protein AhR a AR. Metodou qPCR byla analyzována hladina exprese cílového genu AhR *CYP1A1* na úrovni mRNA. U 7- a 4-fluorindolu byla zaznamenána zvý-ená exprese, zbylé dva indoly pak nem ly na expresi vliv. Nicmén r zné ligandy AhR mohou receptor aktivovat odli-ným zp sobem. P íkladem takového ligandu je resveratrol, který neindukuje silnou expresi genu *CYP1A1*, ale aktivuje expresi paraoxonasy (PON1), což m že být vysv tlováno vazbou AhR na alternativní XRE (Larigot et al., 2018). V-echny ligandy AhR tak pravd podobn nemusí vykazovat silnou expresi genu *CYP1A1*.



B hem detekce protein AR-fl a AR-v7 metodou western blotting došlo u proteinu AR-fl k nárůstu vlivem působení DHT. To ve své studii pozorovali Gregory et al., 2004, kdy zaznamenali zvýšení proteinu AR-fl po expozici 10 nmol l<sup>-1</sup> DHT, což poukazuje na stabilizaci AR androgeny (Gregory et al., 2004). Zajímavý byl efekt enzalutamidu, který zvýšil hladiny proteinu AR-fl i AR-v7 mírně nad hladinu pozitivní kontroly, i když způsoboval pokles exprese AR cílových genů a pokles aktivace AR indukované DHT. To může být vysvětleno tím, že enzalutamid je antagonistou a ligandem AR a jeho působením současně s DHT mohlo dojít ke stabilizaci receptoru. Sharp et al. pozorovali, že použití enzalutamidu může zvýšit tvorbu proteinu AR-v7, který je spojován s rezistencí na toto léčivo (Sharp et al., 2019). Po působení enzalutamidu bylo ale sledováno zvýšení hladin proteinu AR-v7 i AR-fl a bylo by tedy nutné provést další pozorování, aby byl přesněji pochopen mechanismus tohoto jevu.

Všechny testované fluorindoly v této diplomové práci prokázaly schopnost aktivovat AhR, avšak na aktivitu AR neměly podle výsledků metod reporter gene assay, qPCR a western blotting žádný výrazný vliv.

## 6 ZÁV R

Tato diplomová práce se zabývá aktivací aryluhlovodíkového receptoru fluorovanými deriváty indolu, konkrétně 4-fluorindolem, 5-fluorindolem, 6-fluorindolem a 7-fluorindolem, a jejím následným dopadem na aktivitu androgenního receptoru v nádorové prostatické linii 22Rv1. V experimentální části byla metodou reporter gene assay stanovována aktivita AhR v agonistickém působení indolu a aktivita AR v agonistickém i antagonistickém působení, potom co byly buňky vystaveny testovaným látkám po dobu 24 h. Všechny indoly byly použity o koncentracích 0,1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Všechny indoly vykazovaly koncentraci závislou aktivaci AhR. U fládného indolu však nebyl pozorován vliv na aktivitu AR po agonistickém působení. V antagonistickém módu jediný 7-fluorindol snižoval, avšak statisticky nevýznamně, DHT-indukovanou aktivitu AR. U ostatních látek byl sledován spíše potenciální úbytek na aktivitu AR.

Metoda qPCR byla využita pro stanovení hladiny exprese cílových genů AhR a AR po 24h antagonistickém působení DHT a látek již pouze o nejvyšší koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Pro cílový gen AhR *CYP1A1* byla sledována nejvyšší indukce exprese u 7-fluorindolu a mírně zvýšená u 4-fluorindolu. Zbylé dvě látky neměly na expresi vliv. Pro cílové geny AR *FKBP5* a *KLK3* byl vyjma 4-fluorindolu, který vykazoval expresi na úrovni pozitivní kontroly, sledován u zbylých indolů pokles pro oba geny, v fládném případě však statisticky významný.

Detekce hladiny proteinů pak byla provedena metodou western blotting za stejných podmínek jako qPCR. V případě proteinu AhR bylo sledováno zvýšení hladiny působením indolů, jen pouze u 7-fluorindolu nebyl nárůst zaznamenán. Při detekci AR-fl a jeho sestihové varianty pak nebyl pozorován fládný významný vliv fluorindolů na hladinu těchto proteinů.

Cíle diplomové práce byly tedy splněny. Ze získaných výsledků tak vyplývá, že testované fluorindoly byly schopny aktivovat AhR, avšak neměly výrazný vliv na aktivitu AR. Vzhledem ke sledovaným parametrům lze usoudit, že tyto látky pravděpodobně nebudou mít pro léčbu rakoviny prostaty význam. Nicméně pro definitivní potvrzení této hypotézy by byly nezbytné podrobnější studie.

## 7 LITERATURA

- Agoulnik, I. U., & Weigel, N. L. (2006). Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 99(2), 3626372. <https://doi.org/10.1002/jcb.20811>
- Amis, E. S. (1994). Anatomy and Physiology of the Prostate. Radiology of the Lower Urinary Tract. *Medical Radiology*, 167-169. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-84431-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-84431-7_8)
- Balk, S. P., Ko, Y. J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 3836391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.083>
- Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 2286233. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906112107>
- Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., & Coumoul, X. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug metabolism and drug interactions*, 27(1), 368. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2011-0035>
- Brinkmann, A. O., Blok, L. J., de Ruyter, P. E., Doesburg, P., Steketeer, K., Berrevoets, C. A., & Trapman, J. (1999). Mechanisms of androgen receptor activation and function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 69(1-6), 3076313. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(99)00049-7)
- Brinkmann, A. O., Faber, P. W., van Rooij, H. C., Kuiper, G. G., Ris, C., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Voorhorst, M. M., van Laar, J. H., & Mulder, E. (1989). The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *Journal of steroid biochemistry*, 34(1-6), 3076310. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(89\)90098-8](https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90098-8)
- Campana, C., Pezzi, V., & Rainey, W. (2015). Cell-Based Assays for Screening Androgen Receptor Ligands. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(03), 2256234. doi:10.1055/s-0035-1552989
- Corona, G., Dicuio, M., Rastrelli, G., Maseroli, E., Lotti, F., Sforza, A., & Maggi, M. (2017). Testosterone treatment and cardiovascular and venous thromboembolism risk: what is new? *Journal of Investigative Medicine*, 65(6), 9646973. doi:10.1136/jim-2017-000411
- Crumbaker, M., Khoja, L., & Joshua, A. M. (2017). AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer. *Cancers*, 9(4), 34. <https://doi.org/10.3390/cancers9040034>
- eská urologická spole nost LS JEP. <https://www.cus.cz/pro-pacienty/diagnozy/karcinom-prostaty/> (9.2.2023).
- Das, C. J., Razik, A., Sharma, S., & Verma, S. (2019). Prostate biopsy: when and how to perform. *Clinical radiology*, 74(11), 8536864. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2019.03.016>
- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(1), 3615.
- de Lamirande E. (2007). Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 33(1), 60668. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958463>
- Debes, J. D., Tindall D. J. (2004). Mechanisms of Androgen-Refractory Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 148861490. doi:10.1056/nejmp048178
- DeGroot, D. E., Franks, D. G., Higa, T., Tanaka, J., Hahn, M. E., & Denison, M. S. (2015). Naturally Occurring Marine Brominated Indoles Are Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands/Agonists. *Chemical Research in Toxicology*, 28(6), 117661185. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b000
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, 3096334. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., & Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-biological interactions*, 141(1-2), 3624. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00063-7](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00063-7)
- Derin, O., Fonseca, L., Sanchez-Salas, R. & Roberts, M. J. (2020). Infectious complications of prostate biopsy: winning battles but not war. *World J Urol*, 38, 274362753. <https://doi.org/10.1007/s00345-020-03112-3>

- Descotes, J. L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian journal of urology*, 6(2), 1296136. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.11.007>
- Dvořák, Z., Poulíková, K., & Mani, S. (2021). Indole scaffolds as a promising class of the aryl hydrocarbon receptor ligands. *European journal of medicinal chemistry*, 215, 113231. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113231>
- Ehrlich, A. K., Pennington, J. M., Bisson, W. H., Kolluri, S. K., & Kerkvliet, N. I. (2018). TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 161(2), 3106320. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx215>
- Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34645. doi:10.1038/35094009
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., & Gierl, A. (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14801614806. <https://doi.org/10.1073/pnas.260499897>
- Frick, J., & Aulitzky, W. (1991). Physiology of the prostate. *Infection*, 19(S3), S1156S118. doi:10.1007/bf01643679
- Fujita, K., & Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The world journal of men's health*, 37(3), 2886295. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>
- Furue, M., Uchi, H., Mitoma, C., Hashimoto-Hachiya, A., Tanaka, Y., Ito, T., & Tsuji, G. (2019). Implications of tryptophan photoproduct FICZ in oxidative stress and terminal differentiation of keratinocytes. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*, 154(1), 37641. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.18.06132-1>
- Gleason, D. F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology*, 23(3), 2736279. doi:10.1016/0046-8177(92)90108-f
- Gregory, C. W., Fei, X., Ponguta, L. A., He, B., Bill, H. M., French, F. S., & Wilson, E. M. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*, 279(8), 711967130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307649200>
- Grossmann, M. E., Huang, H., & Tindall, D. J. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(22), 168761697. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.22.1687>
- Hankinson, O. (2016). The role of AHR-inducible cytochrome P450s in metabolism of polyunsaturated fatty acids. *Drug Metabolism Reviews*, 48(3), 3426350. doi:10.1080/03602532.2016.1197240
- Hao, N., Whitelaw, M. L., Shearwin, K. E., Dodd, I. B., & Chapman-Smith, A. (2011). Identification of residues in the N-terminal PAS domains important for dimerization of Arnt and AhR. *Nucleic acids research*, 39(9), 369563709. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1336>
- Hu, W., Sorrentino, C., Denison, M. S., Kolaja, K., & Fielden, M. R. (2007). Induction of Cyp1a1 Is a Nonspecific Biomarker of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation: Results of Large Scale Screening of Pharmaceuticals and Toxicants in Vivo and in Vitro. *Molecular Pharmacology*, 71(6), 147561486. doi:10.1124/mol.106.032748
- Hu, J., Ding, Y., Liu, W., & Liu, S. (2023). When AHR signaling pathways meet viral infections. *Cell communication and signaling: CCS*, 21(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01058-8>
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific reports*, 5, 12689. <https://doi.org/10.1038/srep12689>
- Chadha, N., & Silakari, O. (2017). Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. *European journal of medicinal chemistry*, 134, 1596184. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.003>
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational andrology and urology*, 4(3), 3656380. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>

- Chargari, C., Deutsch, E., Blanchard, P., Gouy, S., Martelli, H., Guérin, F., Dumas, I., Bossi, A., Morice, P., Viswanathan, A. N., & Haie-Meder, C. (2019). Brachytherapy: An overview for clinicians. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(5), 3866401. <https://doi.org/10.3322/caac.21578>
- Chen, Z., Cai, A., Zheng, H., Huang, H., Sun, R., Cui, X., Ye, W., Yao, Q., Chen, R., & Kou, L. (2020). Carbidopa suppresses prostate cancer via aryl hydrocarbon receptor-mediated ubiquitination and degradation of androgen receptor. *Oncogenesis*, 9(5), 49. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0236-x>
- Chi, K. N., Agarwal, N., Bjartell, A., Chung, B. H., Pereira de Santana Gomes, A. J., Given, R., Juárez Soto, Á., Merseburger, A. S., Özgüro lu, M., Uemura, H., et al. (2019). Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 381(1), 13624. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903307>
- Ittmann, M. (2017). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5), a030346. doi:10.1101/cshperspect.a030346
- Jiang, Y. Z., Wang, K., Fang, R., & Zheng, J. (2010). Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 58(8), 6796685. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955955>
- Katolická, J. (2014). Hormonální lé ba karcinomu prostaty. *Onkologie*, 8(5), 2286230.
- King, J., Woolner, V. H., Keyzers, R. A., & Rosengren, R. J. (2022). Characterization of marine-derived halogenated indoles as ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology reports*, 9, 119861203. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.05.016>
- Kolluri, S. K., Jin, U. H., & Safe, S. (2017). Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Archives of toxicology*, 91(7), 249762513. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1981-2>
- Kou, Z., & Dai, W. (2021). Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochemical pharmacology*, 185, 114428. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114428>
- Kudo, I., Hosaka, M., Haga, A., Tsuji, N., Nagata, Y., Okada, H., Fukuda, K., Kakizaki, Y., Okamoto, T., Grave, E., & Itoh, H. (2018). The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *Journal of biochemistry*, 163(3), 2236232. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx074>
- Lalous, N., Dalal, K., Cherkasov, A., & Rennie, P. S. (2013). Targeting alternative sites on the androgen receptor to treat castration-resistant prostate cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12496612519. <https://doi.org/10.3390/ijms140612496>
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 169. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>
- Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., Kirschenbaum, A. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 5656575. doi:10.1016/j.ecl.2011.05.012
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, M. H., Kim, J. A., & Lee, J. (2012). 7-fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 329(1), 36644. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02500.x>
- Lee, J. H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in microbiology*, 23(11), 7076718. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.08.001>
- Leung, J. K., & Sadar, M. D. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 8, 2. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00002>
- Li, G., & Young, K. D. (2013). Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 2), 4026410. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064139-0>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317(24), 253262542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Liu, S., Wang, Z., Jiang, J., OuYang, H., Wei, S., Liang, J., Chen, N., Zeng, W., Chen, L., & Xie, X. (2019). Severe forms of complete androgen insensitivity syndrome caused by a p.Q65X novel mutation in androgen receptor: Clinical manifestations, imaging findings and molecular genetics. *Steroids*, 144, 47651. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.007>

- Lomas, D. J., & Ahmed, H. U. (2020). All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(6), 3726381. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0332-z>
- Lonergan, P. E., & Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis*, 10, 20. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.83937>
- Lu, C., & Luo, J. (2013). Decoding the androgen receptor splice variants. *Translational andrology and urology*, 2(3), 1786186. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.08>
- Luecke-Johansson, S., Gralla, M., Rundqvist, H., Ho, J. C., Johnson, R. S., Gradin, K., Poellinger, L. (2017). A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Molecular and cellular biology*, 37(13), e00630-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-16>
- MacWilliams, M. P. (2012). Indole test protocol. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
- Magee, J. A., Chang, L., Stormo, G. D., & Milbrandt, J. (2006). Direct, Androgen Receptor-Mediated Regulation of the FKBP5 Gene via a Distal Enhancer Element. *Endocrinology*, 147(1), 5906598. doi:10.1210/en.2005-1001
- Massie, C. E., Adryan, B., Barbosa-Morais, N. L., Lynch, A. G., Tran, M. G., Neal, D. E., Mills, I. G. (2007). New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO reports*, 8: 871-878. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401046>
- Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T., & Kato, S. (2008). Androgen receptor functions in male and female physiology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 2366241. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.023>
- Mellado, B., Codony, J., Ribal, M. J., Visa, L., & Gascón, P. (2009). Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway. *Clinical and Translational Oncology*, 11(1), 5610. doi:10.1007/s12094-009-0304-3
- Mendonca, B. B., Batista, R. L., Domenice, S., Costa, E. M., Arnhold, I. J., Russell, D. W., & Wilson, J. D. (2016). Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 163, 2066211. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.020>
- Mimura, J., & Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et biophysica acta*, 1619(3), 2636268. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00485-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00485-3)
- Mottet, N. P. J. B., Bellmunt, J., Briers, E., Van den Bergh, R. C. N., Bolla, M., Van Casteren, N. J., Cornford, P., Culine, S., Joniau, S., Lam, T., et al. (2015). Guidelines on prostate cancer. *European Association of Urology*, 56, e137.
- Narain, T. A., & Sooriakumaran, P. (2022). Beyond Prostate Specific Antigen: New Prostate Cancer Screening Options. *The world journal of men's health*, 40(1), 66673. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210076>
- Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., & Cooner, W. H. (1995). The Use of Age-Specific Reference Ranges for Serum Prostate Specific Antigen in Men 60 years Old or Older. *The Journal of Urology*, 153(4), 116061163. doi:10.1016/s0022-5347(01)67538-4
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., et al. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7135), 5626566. <https://doi.org/10.1038/nature05683>
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., & Kato, S. (2009). AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 4746484. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.034
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K., & Kato, S. (2011). Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 1026107. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.007
- Oshima, M., Mimura, J., Sekine, H., Okawa, H., & Fujii-Kuriyama, Y. (2009). SUMO modification regulates the transcriptional repressor function of aryl hydrocarbon receptor repressor. *The Journal of biological chemistry*, 284(17), 11017611026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808694200>
- Pagliarulo, V. (2018). Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1096, 1630. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-99286-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-99286-0_1)
- Penney, K. L., Schumacher, F. R., Kraft, P., Mucci, L. A., Sesso, H. D., Ma, J., Niu, Y., Cheong, J. K., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., & Hsu, S. I. (2011). Association of KLK3 (PSA) genetic

- variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis*, 32(6), 8536859. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr050>
- Pollenz, R. S., Sattler, C. A., & Poland, A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Molecular pharmacology*, 45(3), 4286438.
- Powell, D. N., Swimm, A., Sonowal, R., Bretin, A., Gewirtz, A. T., Jones, R. M., & Kalman, D. (2020). Indoles from the commensal microbiota act via the AHR and IL-10 to tune the cellular composition of the colonic epithelium during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21519621526. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003004117>
- Roser, M. (2014). Human development index (HDI). *Our World in Data*.
- Safe, S., Astroff, B., Harris, M., Zacharewski, T., Dickerson, R., Romkes, M., & Biegel, L. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacology & toxicology*, 69(6), 4006409. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1991.tb01321.x>
- Safe, S., Han, H., Goldsby, J., Mohankumar, K., & Chapkin, R. S. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands as Selective AhR Modulators: Genomic Studies. *Current opinion in toxicology*, 11-12, 10620. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.11.005>
- Sartor, O., & de Bono, J. S. (2018). Metastatic Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 378(7), 6456657. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1701695>
- Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J., & O'Kennedy, R. (2017). Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnology Advances*, 35(2), 1356149. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.009
- Sharp, A., Coleman, I., Yuan, W., Sprenger, C., Dolling, D., Rodrigues, D. N., Russo, J. W., Figueiredo, I., Bertan, C., Seed, G. et al. (2019). Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *The Journal of clinical investigation*, 129(1), 1926208. <https://doi.org/10.1172/JCI122819>
- Shea, J. L., Wong, P. Y., & Chen, Y. (2014). Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Advances in clinical chemistry*, 63, 59684. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800094-6.00002-9>
- Singh, T. P., & Singh, O. M. (2018). Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(1), 9625. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170807123201>
- Smith, E., Palethorpe, H. M., Ruskiewicz, A. R., Edwards, S., Leach, D. A., Underwood, T. J., Need, E. F., & Drew P. A. (2015). Androgen Receptor and Androgen-Responsive Gene FKBP5 Are Independent Prognostic Indicators for Esophageal Adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(2), 4336443. doi:10.1007/s10620-015-3909-0
- Sobhani, N., Neeli, P. K., D'Angelo, A., Pittacolo, M., Sirico, M., Galli, I. C., Roviello, G., & Nesi, G. (2021). AR-V7 in Metastatic Prostate Cancer: A Strategy beyond Redemption. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5515. <https://doi.org/10.3390/ijms22115515>
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., & Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism*, 12(2), 1986212. <https://doi.org/10.2174/138920011795016818>
- Stevens, E. A., Mezrich, J. D., & Bradfield, C. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 127(3), 2996311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x>
- Sun, F., Indran, I. R., Zhang, Z. W., Tan, M. H., Li, Y., Lim, Z. L., Hua, R., Yang, C., Soon, F. F., Li, J., Xu, H. E., Cheung, E., & Yong, E. L. (2015). A novel prostate cancer therapeutic strategy using icaritin-activated arylhydrocarbon-receptor to co-target androgen receptor and its splice variants. *Carcinogenesis*, 36(7), 7576768. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv040>
- Swordloff, R. S., Dudley, R. E., Page, S. T., Wang, C., & Salameh, W. A. (2017). Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocrine reviews*, 38(3), 2206254. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1067>



- 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(1), 3623. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., et al. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 7876790. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>
- Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchofsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(41), 38087638094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203313200>
- UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10275/entry> (1.3.2023).
- UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35869/entry> (28.2.2023).
- van Laar, J. H., Bolt-de Vries, J., Voorhorst-Ogink, M. M., & Brinkmann, A. O. (1989). The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Molecular and cellular endocrinology*, 63(1-2), 39644. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(89\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(89)90079-8)
- van Royen, M. E., van Cappellen, W. A., de Vos, C., Houtsmuller, A. B., & Trapman, J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of cell science*, 125(Pt 8), 197061979. <https://doi.org/10.1242/jcs.096792>
- Vrzal, R., Ulrichová, J., & Dvorák, Z. (2004). Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 148(1), 3610.
- Waldron, N., Chowdhury, S., & McCahill, C. (2023). Prostate cancer. *Medicine*, 51(1), 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.10.013>.
- Wang, L., Lu, B., He, M., Wang, Y., Wang, Z., Du, L. (2022). Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Front. Public Health*, 10:811044. doi: 10.3389/fpubh.2022.811044
- Wilson, C. M., & McPhaul, M. J. (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Molecular and cellular endocrinology*, 120(1), 51657. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03819-1](https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03819-1)
- Yamada, Y., & Beltran, H. (2021). The treatment landscape of metastatic prostate cancer. *Cancer letters*, 519, 20629. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.010>
- Zgarbová, E., & Vrzal, R. (2022). The Impact of Indoles Activating the Aryl Hydrocarbon Receptor on Androgen Receptor Activity in the 22Rv1 Prostate Cancer Cell Line. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 502. <https://doi.org/10.3390/ijms24010502>
- Zheng, G., Sundquist, J., Sundquist, K., Ji, J. (2022). Prostate cancer incidence and survival in relation to prostate cancer as second cancer in relatives. *Cancer Med*, 11, 211762124. doi: 10.1002/cam4.4591
- Zhu, K., Meng, Q., Zhang, Z., Yi, T., He, Y., Zheng, J., & Lei, W. (2019). Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy (Review). *Molecular medicine reports*, 20(6), 476364773. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10748>



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOL

(4-,5-,6-,7-)FI	(4-,5-,6-,7-)fluorindol
ADT	androgen-deprivace terapie
AF	funkce transkripční aktivace
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AHRR	represe aryluhlovodíkového receptoru
APS	peroxidisíran amonný
AR	androgenní receptor
ARE	androgen responzivní elementy
ARNT	jaderný translokátor aryluhlovodíkového receptoru
bHLH	doména basic helix-loop-helix
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BSA	bovinní sérový albumin
DBD	DNA vazebná doména
DHT	dihydrotestosteron
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE	digitální rektální vyšetření
DTT	dithiothreitol
EBRT	radioterapie vnějším paprskem
ENZ	enzalutamid
FBS	fetální bovinní sérum
FI	fold induction
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]karbazol
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GnRH	hormon uvolňující gonadotropin

HDI	index lidského rozvoje
HR	pantová oblast
LBD	ligand vazebná doména
NES	jaderný exportní signál
NLS	jaderný lokaliza ní signál
NTC	netemplátová kontrola
NTD	N-terminální doména
PAS	doména Per(period)-ARNT-Sim(single-minded)
PBS	fosfátový pufr
proPSA	proenzym prostatického specifického antigenu
PSA	prostatický specifický antigen
PVDF	polyvinylidenfluorid
qPCR	kvantitativní polymerasová et zová reakce
rpm	otá ky za minutu
TAD	C-terminální transaktiva ní doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo[b,e][1,4]dioxin
TEMED	tetramethylethylendiamid
UT	negativní kontrola (untreated cells)
XRE	xenobiotické responzivní elementy