

# 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

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

V Olomouci dne ... ..

... ..

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, věnovaný 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 androgenního 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 indolů. 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	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	Rakovina prostaty .....	2
2.1.1	Prostata.....	2
2.1.2	Četnost rakoviny prostaty .....	3
2.1.3	Souvislost androgenů s rakovinou prostaty .....	4
2.1.4	Diagnostika rakoviny prostaty.....	7
2.1.5	Léčba 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 indolů.....	19
2.4.2	Funkce indolů.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
3.1	Materiál .....	21
3.1.1	Biologický .....	21
3.1.2	Chemikálie .....	21
3.1.3	Připravované roztoky.....	24
3.1.4	Pomůcky.....	25
3.1.5	Přístroje .....	26
3.1.6	Software .....	27
3.2	Metody .....	27
3.2.1	Metodika práce .....	27
3.2.2	Rozmrazení buněk .....	28
3.2.3	Pasážování buněk .....	28
3.2.4	Počítání a vysetí buněk .....	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 proteinů.....	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 proteinů 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 karcinomů prostaty je většinou 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, čehož lze dosáhnout mimo jiné přerušáním 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. Důležitou roli 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 androgenní, 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 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

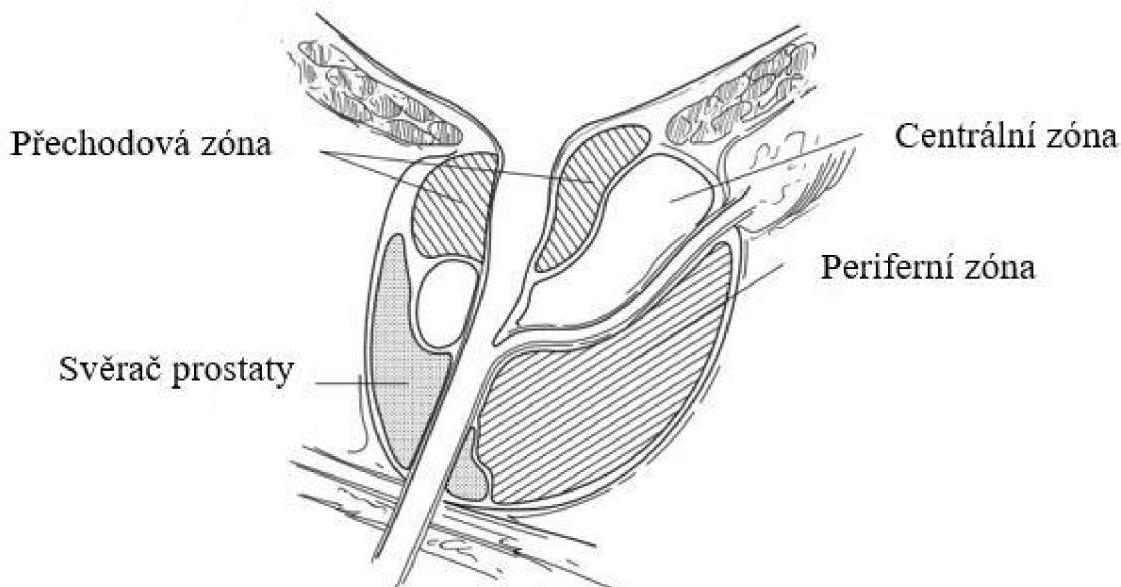
### **2.1 Rakovina prostaty**

#### **2.1.1 Prostata**

Prostata nebo také předstojná žláza 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 žláza, 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 močovým měchýřem, 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 vytváří ejakulát, přičemž prostatické sekrety jsou hlavní složkou semenné plazmy ejakulátu (Frick & Aulitzky, 1991).

Prostatický epitel obsahuje tři typy buněk: kmenové buňky, bazální buňky a sekreční buňky. V tkáni pak dochází k transformaci kmenových buněk na přechodné proliferující buňky a následně na zralé plně diferenciované již nedělící se sekreční buňky (Frick & Aulitzky, 1991). Prostata se dělí na tři oblasti: centrální zóna, přechodová zóna a periferní zóna. Tyto oblasti se liší svou anatomii, histologií, funkcí a embryologickým původem (Lee et al., 2011). Centrální zóna zaujímá tvar kuželu a nachází se v blízkosti ejakulačních vývodů. Přechodová 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 % žlázy. U většiny starších mužů však bývá výrazně rozšířena v důsledku benigní hyperplazie prostaty. Periferní zóna tvoří vnější část žlázy. Ze všech tří oblastí, periferní zóna zaujímá největší část prostaty a v normálním případě představuje přibližně 70 % (Obr. 1) (Ittmann, 2017).



**Obrázek 1:** Znázornění anatomického rozdělení lidské prostaty na tři oblasti: centrální, periferní a přechodovou (obrázek převzat z Ittmann, 2017, upraveno)

Lidská prostata je orgánem, který postihují dvě nejčastější 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 nejčastěji 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 postižena (Lee et al., 2011).

### 2.1.2 Četnost rakoviny prostaty

Rakovina prostaty je druhým nejčastěji diagnostikovaným typem rakoviny vyskytujícím se u mužů. Z celosvětového hlediska se jedná o pátou nejčastější 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 nejčastější diagnostikovanou rakovinou (Wang et al., 2022).

V roce 2020 v souvislosti s rakovinou prostaty celosvětově přibylo odhadem 1 414 000 nových případů a 375 304 úmrtí. V České republice byl za rok 2020 počet nových případů odhadován na 9117 a počet úmrtí na přibližně 1467. Výzkum mapující rakovinu prostaty mezi lety 2000 až 2019 ukazuje v Česku na zvyšující se trend incidence, avšak mortalita zaujímá trend klesající. Z důvodu stárnutí populace se ale předpokládá, že počet případů rakoviny prostaty se bude zvyšovat (Wang et al., 2022).

Zatím jedinými dobře známými rizikovými faktory rakoviny prostaty jsou vyšší věk, rodinná anamnéza a africký původ. Rodinná anamnéza je velmi významným faktorem pro screening, protože relativní riziko výskytu je až dvojnásobně zvýšeno u lidí, u nichž se již rakovina prostaty objevila u příbuzných prvního stupně. Tito pacienti však vykazují vyšší šance na přežití, které jsou spojovány s časným klinickým stádiem rakoviny při diagnóze. Mezi lety 2001 až 2016 bylo ve Spojených státech amerických desetileté relativní přežití lokalizované rakoviny prostaty 100 %, avšak pětileté relativní přežití pokročilého metastatického nálezu bylo již pouhých 30 %, což u rizikových skupin poukazuje na důležitost detekce rakoviny prostaty v brzkém stádiu (Zheng et al., 2022).

Byly předloženy i další rizikové faktory, u kterých se předpokládá, že by mohly mít vliv na riziko rozvoje rakoviny prostaty, jako jsou kondice a stravovací návyky člověka, obezita, diabetes mellitus a suplementace vitamínu E. Vliv na incidenci a mortalitu má také index lidského rozvoje (HDI) (Wang et al., 2022), který na základě několika rozměrů jako je zdraví a délka života, přístup ke vzdělání a životní standard, v podstatě určuje úroveň lidského života (Roser, 2014).

### **2.1.3 Souvislost androgenů s rakovinou prostaty**

V roce 1941 Charles B. Huggins a Clarence V. Hodges objevili, že růst a přežití rakoviny prostaty jsou ovlivňovány androgenními hormony. U rakoviny prostaty převažují androgen-dependentní karcinomy, což znamená, že jejich růst a přežití jsou závislé na přítomnosti androgenů a reagují na androgenní ablační terapii, tedy na zastavení produkce nebo přítomnosti těchto hormonů. Problémem však je, že tyto karcinomy se mohou stát androgen-independentními a mohou progredovat i navzdory androgenní ablacii (Debes & Tindall, 2004).

Při vývoji samotné prostaty i při rozvoji rakoviny nese významnou roli androgenní receptor (AR) (viz. Kapitola 2.3), a to i u karcinomů, které jsou nezávislé na androgenech.



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

V případě androgen-dependentních karcinomů dochází k progresi rakoviny prostřednictvím mechanismu klasické signalizace AR (viz. Kapitola 2.3.2), kdy je receptor aktivován vazbou ligandů, 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 karcinomů, které využívají AR, je amplifikace receptoru. Ve srovnání s androgen-dependentními karcinomy u independentních dochází k amplifikaci až u přibližně třetiny případů. Je tedy zvýšena exprese genu a jelikož se následně v buňce vyskytuje více molekul receptoru, k jeho aktivaci postačují i nižší hladiny ligandů (Mellado et al., 2009).

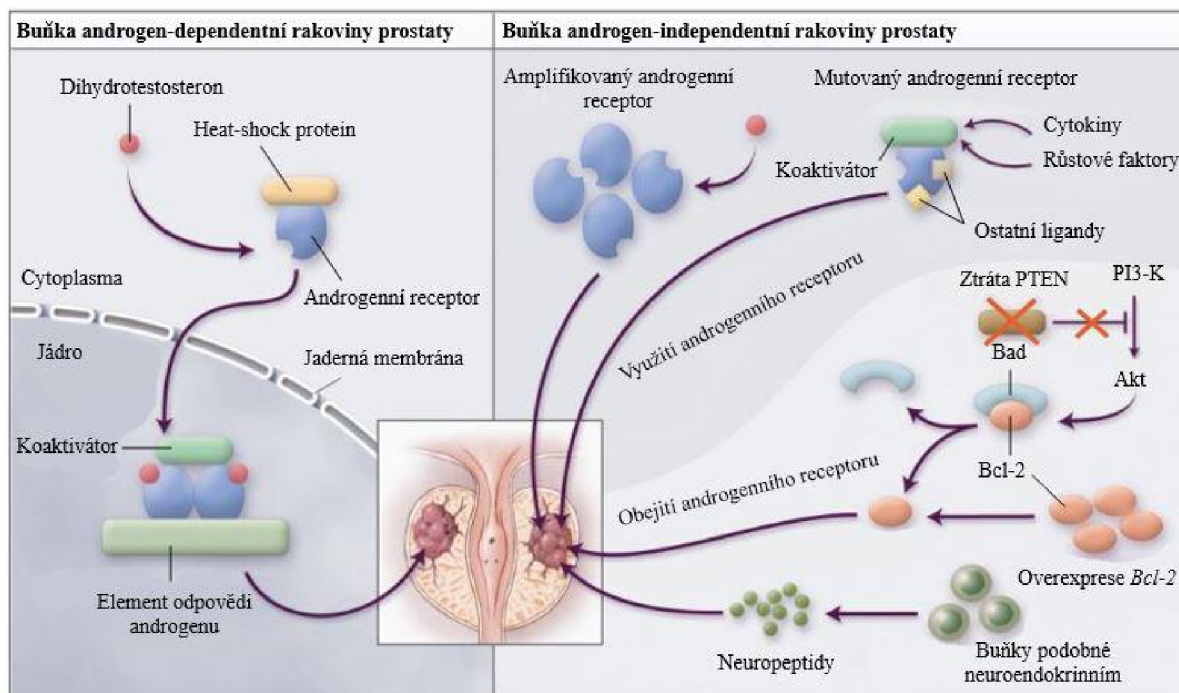
Dalším možným, avšak ne příliš častým principem, je mutace genu pro AR v buňkách androgen-refrakterního karcinomu. Mutacemi může dojít k navýšení počtu molekul schopných vázat se k receptoru a tím k jeho aktivaci. Pokud tedy dojde k mutacím, může být receptor aktivován odlišnými ligandy, než za normálních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

Třetí princip u androgen-refrakterního karcinomu, jehož mechanismus využívá AR, je založen na změnách funkce nebo exprese růstových faktorů, cytokinů a koaktivátorů umožňující aktivaci receptoru. Některé růstové faktory a koaktivátory jsou u androgen-refrakterních karcinomů nadměrně exprimovány. Častými 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 diferenciací rakovinných buněk. Neuroendokrinní buňky proliferují velmi pomalu, což usnadňuje jejich přežití při léčbě chemoterapeutickou, radiační 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 karcinomů prostaty (Grossmann et al., 2001).

Dalším mechanismem obcházející AR je deregulace genů pro apoptózu. Důležitou 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 normálním buňkám podstoupit apoptózu. V rakoviných 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 k přerušení 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 karcinomů diagnostikována prostřednictvím odběru krve pacienta a její následnou analýzou na hladinu prostatického specifického antigenu (PSA) (Česká urologická společnost ČLS JEP).

PSA je serinová proteasa regulovaná androgeny, patřící do rodiny tkáňových kalikreinů (Balk et al., 2003), kódovaná genem *KLK3* (Penney et al., 2011). Je produkován jak prostatickými rakovinnými buňkami, tak epiteliálními buňkami prostaty. Přirozeně se vyskytuje ve spermatu, kde štěpí semenogeliny (Balk et al., 2003), což jsou proteiny inhibující pohyblivost spermií (de Lamirande, 2007). Do vývodů 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 taktéž může přecházet do krevního oběhu a vyskytovat se v nenavázaném 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 zapříčinit 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 pacientů 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 nárůstu 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, neboť 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 u karcinomu určeno Gleasonovo skóre, které vypovídá o agresivitě nádoru a využívá 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 nežádoucích 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, neboť umožňuje 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 větších rozměrů a 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 vyčkávání (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 vyčkávání 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 škodlivého pro nádorové

buňky, umístěn přímo do nádoru nebo do jeho blízkosti. Při EBRT je záření generováno mimo tělo pacienta (Chargari et al., 2019).

V případě lokalizovaného karcinomu se středním rizikem se většinou jako léčba uplatňuje prostatektomie nebo radioterapie. U lokalizovaných karcinomů s vysokým rizikem se postupuje stejně jako u lokálně pokročilých karcinomů, tedy ve formě chirurgického odstranění prostaty nebo radioterapie současně s hormonální léčbou. V případě metastatických karcinomů lze rozlišit dvě fáze, kdy je rakovina prostaty kastročně citlivá nebo kastročně rezistentní (Waldron et al., 2023).

U kastročně citlivých karcinomů je standardní léčbou androgen-deprivační terapie (ADT), která znamená snížení nebo úplnou blokaci produkce androgenů. Toho lze docílit prostřednictvím chirurgické kastrace, tedy orchiektomie, nebo farmakologické kastrace, která spočívá v působení agonistů nebo antagonistů hormonu uvolňujícího gonadotropin (GnRH) (Yamada & Beltran, 2021). Využití agonistů GnRH je založeno na zvýšené produkci luteinizačního hormonu, stimujícího tvorbu testosteronu, po jejich vazbě na receptory GnRH. To na krátkou dobu v řádu dnů způsobí nárůst hladiny testosteronu, avšak dlouhodobé působení agonistů vyvolá downregulaci receptorů GnRH, což bude mít za následek pokles hladiny testosteronu. U antagonistů GnRH je principem účinku kompetitivní obsazení receptoru (Pagliarulo, 2018). Současně s ADT se uplatňuje i podávání látek, jako je docetaxel nebo látek cílících na AR jako apalutamid, (Yamada & Beltran, 2021) což je kompetitivní antagonist AR (Chi et al., 2019).

U většiny pacientů ale i přes ADT v průběhu dvou až tří let dojde k určitému rozvoji onemocnění a rakovina se stane kastročně rezistentní. Nicméně i tak mají androgeny v progresi onemocnění důležitou funkci (Chandrasekar et al., 2015). Z tohoto důvodu se také využívají látky, které cílí na funkci či syntézu androgenů, 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 až 8x vyšší afinita k AR než u klinicky používaného antiandrogenu bicalutamidu. Funkce enzalutamidu jako antagonisty AR spočívá ve třech mechanismech, kdy inhibuje vazbu androgenů na AR, blokuje translokaci AR do jádra buňky a zabraňuje jeho vazbě na DNA (Katolická, 2014). Abirateron blokuje syntézu steroidních hormonů, kdy konkrétně inhibuje cytochrom P450 17A1 (CYP17A1), zapojeného do biosyntézy testosteronu (Pagliarulo, 2018). Stejně jako u kastročně citlivých karcinomů se i u kastročně rezistentních využívá látka docetaxel, což je chemoterapeutikum indukující apoptózu díky vazbě na  $\beta$ -tubulin

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

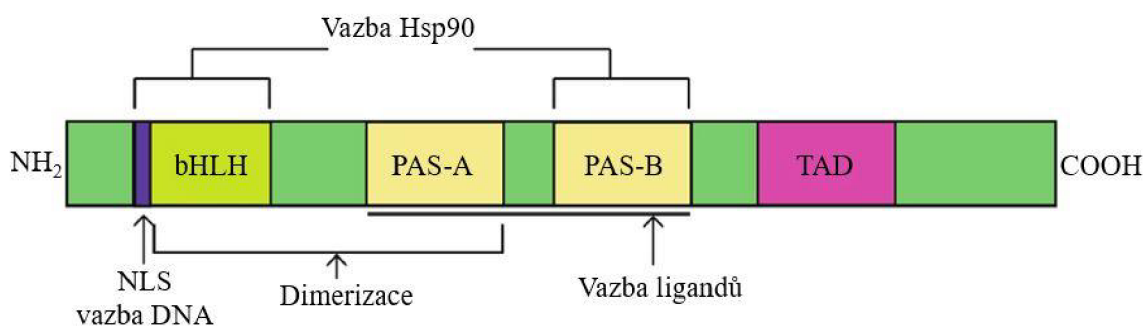
## 2.2 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový 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 čehož 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 aryluhlovodíkového 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 transaktivací 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 strukturně 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 modulátory buněčné diference a proliferace, diference B-buněk nebo také determinace pohlaví (Vrzal et al., 2004).



**Obrázek 3:** Znárodnění 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 transkripčně aktivní oblast a potenciální oblasti, které se účastní transformace receptoru. Tato oblast také bývá velmi variabilní. Právě změny v této doméně zapříčiňují rozdíly v molekulové hmotnosti proteinu receptoru v rámci jednoho druhu, ale i mezi nimi (Stevens et al., 2009).

### **2.2.2 Signalizace aryluhlovodíkového receptoru**

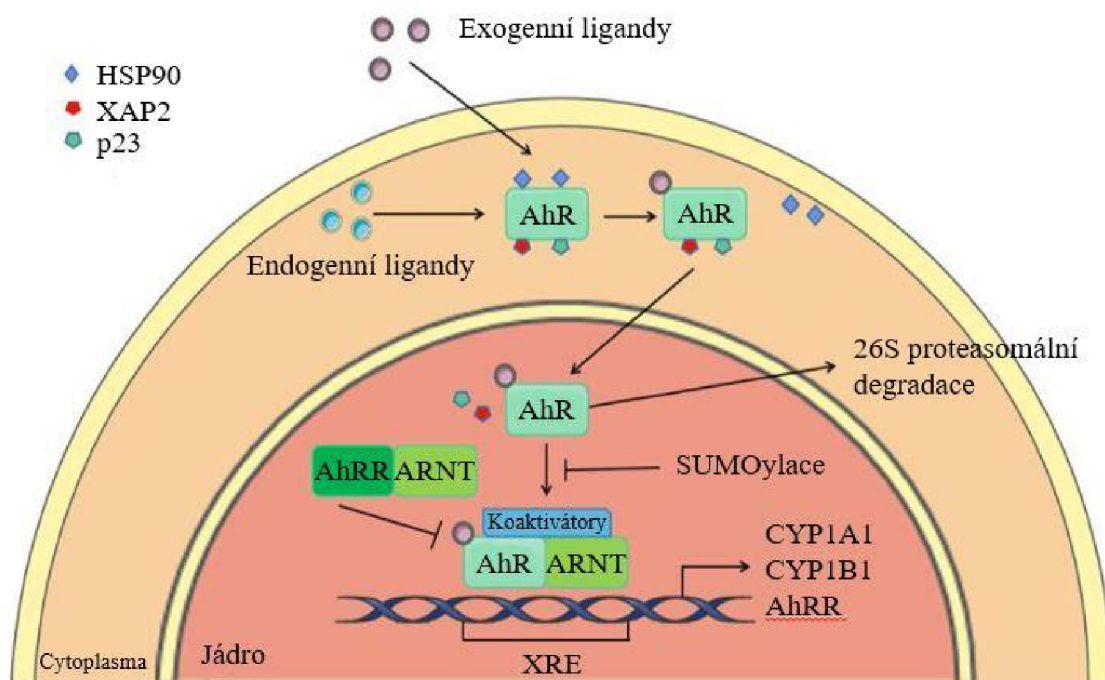
U člověka je AhR exprimován v mnoha tkáních. Nejvyšší hladiny exprese mRNA byly identifikovány v placentě, plicích a játrech. Naopak nízké hladiny se vyskytovaly v mozku, ledvinách a kosterním svalstvu (Jiang et al., 2010). Pokud je receptor v inaktivované formě, nachází se v cytoplasmě (Pollenz et al., 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 proteinkinasou c-SRC. Zároveň mohou tyto chaperony inhibovat ubikvitinaci a degradaci a tím v cytoplasmě 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 signalizačních 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, relokizaci či disociaci nukleosomů v chromatinu enhanceru a promotoru, a mohou tak iniciovat transkripci mnoha genů. Aktivované geny se mohou mezi typy tkání i druhy



savců lišit, 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 jádra a rychle degradován v cytoplasmatickém kompartmentu pomocí proteasomu, což zahrnuje kovalentní vazbu ubikvitinu. Byly pozorovány i jiné post-translační modifikace jako např. SUMOylace, která prostřednictvím inhibice ubikvitinylation 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 zpětnovazební smyčky pro AhR, vázat se s ARNT, poté na XRE, tím 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 naturální, 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 původně objeven jako intracelulární protein zprostředkávající toxické účinky 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 některá léčiva, 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 B 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. Přirozeně se vyskytující exogenní ligandy, jejichž hlavním zdrojem je potrava, jsou látky jako flavonoidy, karotenoidy, kurkumin, resveratrol a další. Mezi endogenní ligandy pak patří sloučeniny syntetizované vyššími organismy, například indigo a indirubin, metabolity hemu, bilirubin, biliverdin a hemin, metabolity kyseliny arachidonové a deriváty tryptofanu, tryptamin a kyselina indoloctová (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 cíleně selektivní způsoby 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- $\beta$ -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 proteinů 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), neboť 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 většiny 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 strukturně a funkčně odlišných sestřihových variant, jako AR-v7, k jejíž zvýšené expresi dochází u kastročně 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 složena 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 zprostředkovávání interakcí mezi AR a heat shock proteiny a chaperony a také interakce s N-koncem receptoru za účelem stabilizace vázaných androgenů.



**Obrázek 5:** Znázornění 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 několik signálních sekvencí. AF-1 je na ligandu nezávislá funkce transkripční aktivace potřebná pro maximální aktivitu AR a je lokalizována v N-terminální doméně. AF-2 je na ligandu závislá funkce transkripční aktivace umístěná v ligand vazebné doméně. Je důležitá pro přímé interakce mezi N-terminální a ligand vazebnou doménou a také pro tvorbu vazebného místa pro koregulátory. Jaderný lokalizační signál (NLS) sloužící k importu AR do jádra je umístěn mezi DBD a pantovou oblastí. Jaderný exportní signál (NES) pro export AR z jádra do cytoplasmy se nachází v ligand vazebné doméně (Davey & Grossmann, 2016). Sestřihová varianta AR-v7 postrádá ligand vazebnou doménu, ale má zachovalou DBD a NLS, čímž je umožněn vstup do jádra i v nepřítomnosti ligandu. Tam pak působí jako transkripční faktor, který potlačuje důležité tumor supresorové geny. Proto může být potenciálně využit jako diagnostický nebo prognostický marker a terapeutický cíl (Sobhani et al., 2021).

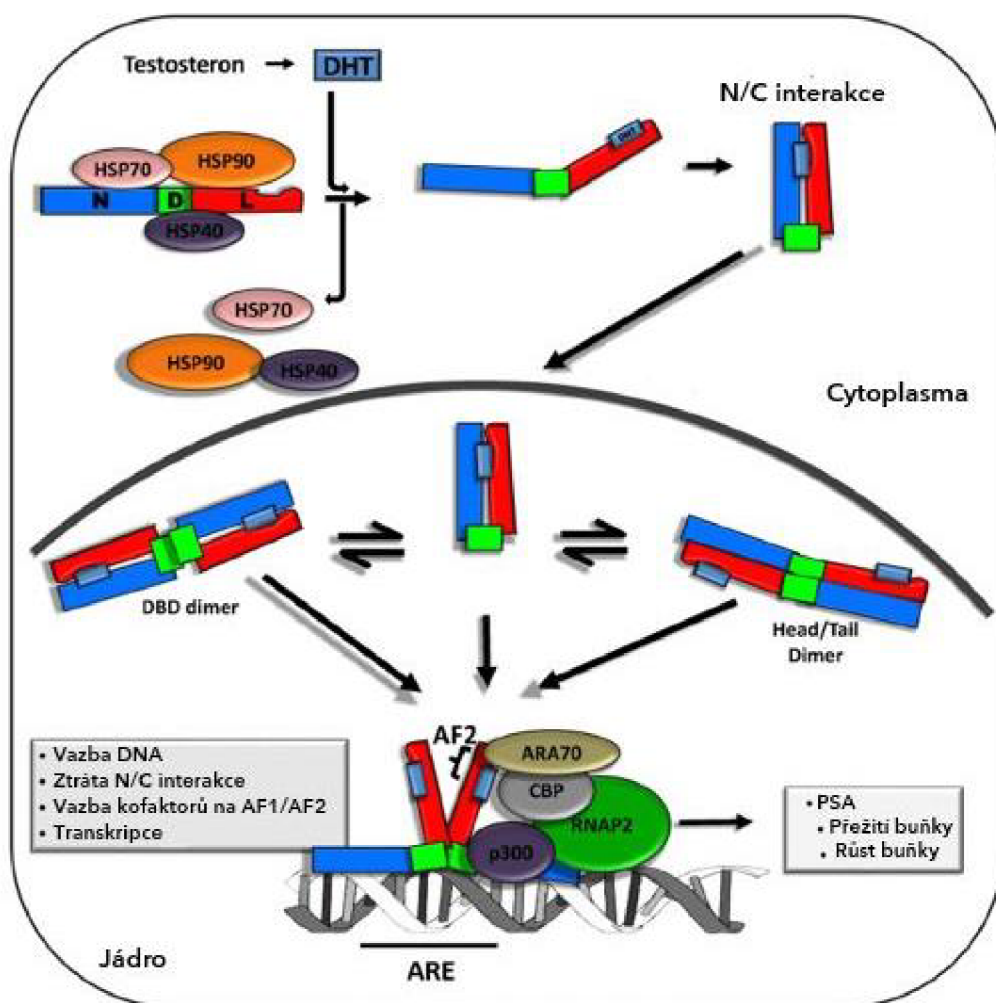
### **2.3.2 Signalizace androgenního receptoru**

Nejvyšší hladiny exprese AR jsou přítomny v prostatě, adipocytech a játrech. AR je však exprimován v mnoha lidských tkáních a orgánech, jako kosterní svalstvo, srdce, děloha, štítná žláza či hypofýza (Campana et al., 2015). Nižší hladiny se pak vyskytují i v nadledvinách, plicích či tlustém střevě (Wilson & McPhaul, 1996). Pokud nejsou přítomny ligandy, AR se nachází v cytoplasmě navázaný na heat shock proteiny. Při klasické signalizaci dochází k vazbě ligandů na ligand vazebnou doménu, přičemž dojde k vytlačení heat shock proteinů. Tím je umožněna fosforylace a změna konformace (Crumbaker et al., 2017). Při konformační změně vytvoří helixy 3, 4 a 12 v ligand vazebné doméně povrch vazby AF-2.

U jaderných receptorů je AF-2 hlavní místo protein-proteinových interakcí, sloužící k získání koaktivátorů s motivem LxxLL. Motiv LxxLL se vyskytuje u některých transkripčních faktorů a slouží k interakci s jinými proteiny jako aktivátory nebo represory, které mají příslušnou doménu. V případě AR jsou však přednostně vázány motivy FxxLF, mající podobnou funkci jako motiv LxxLL, vyskytující se v N-terminální doméně. To usnadňuje intramolekulární interakce mezi N-terminální doménou a ligand vazebnou doménou tzv. N/C interakci (Lonergan & Tindall, 2011). K tomuto procesu tedy dochází po vazbě ligandů ještě v cytoplasmě. Po translokaci AR do jádra dochází k intermolekulární interakci dvou DBD domén díky dimerizačnímu boxu (D-box) a poté k intermolekulární N/C interakci u části jaderných AR, což vede k homodimerizaci AR.

V jádře 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 nengenomické 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 umožňuje působení androgenů. Jeho nejdůležitějšími ligandy jsou tedy androgenní steroidní hormony jako testosteron a 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (Brinkann et al., 1999).

Testosteron je hlavní mužský pohlavní hormon, který je u mužů syntetizován převážně ve varlatech Leydigovými buňkami a u žen je v malém množství syntetizován ve vaječnících. 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, přičemž v některých tkáních 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 mění receptor do DNA vazebného stavu. Nicméně ne vždy je na AR vázán přednostně (Swerdloff 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 indolů

Více než 85 druhů grampozitivních i gramnegativních 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). Živočišné buňky nejsou schopny indol syntetizovat. Přesto jsou u živočichů přítomny díky jejich produkci střevními bakteriemi (Lee et al., 2015). V lidských výkalech byly zaznamenány hladiny koncentrace indolu v rozmezí přibližně 250-1100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Bansal et al., 2010). Deriváty indolu se však vyskytují nejen ve střevech, ale i krvi, moči nebo potu a orgánech jako třeba mozek (Lee et al., 2015).

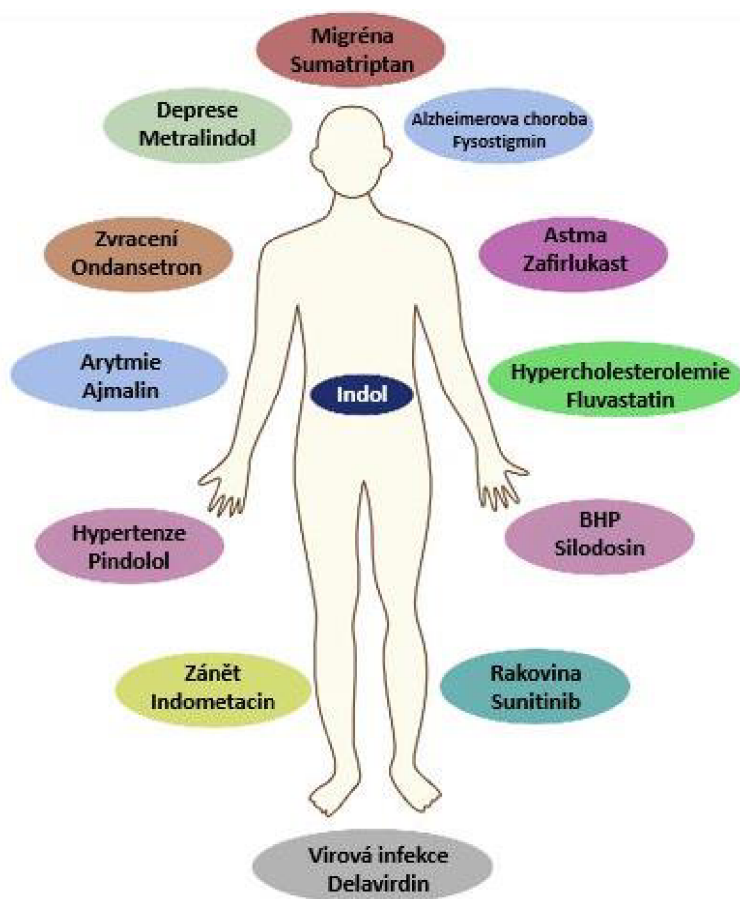
### 2.4.2 Funkce indolů

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 či antioxidační 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 diferenciaci buněk v tlustém střevě myši. Diferenciaci střevních buněk se s postupem věku snižuje, což znamená, že byl potlačen účinek 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

indolů vázaných AhR je alkaloid tryptamin nebo indirubin, který byl identifikován v lidské moči. AhR aktivní indoly, u člověka produkované bakteriemi, jsou látky jako indol-3-laktát nebo indol-3-pyruvát. Indolové ligandy AhR se vyskytují také v potravě, jako například glukobrassicin, který je přítomný v brukvovité zelenině. AhR je kromě xenobiotické odpovědi zapojen do fyziologických a patologických procesů, a také hraje roli při etiologii některých onemocnění. Je tedy potenciálním terapeutickým cílem (Dvořák et al., 2021).

Příkladem indolové léčivé látky, která má agonistický účinek na AhR, je sunitinib. Tento lék inhibuje receptorové tyrosinkinasy a využívá se při léčbě rakoviny, konkrétně karcinomu ledvin a gastrointestinálního stromálního tumoru. Indoly jsou ale součástí mnoha syntetických léků, které mohou působit různými mechanismy a používají se u velkého spektra onemocnění (Obr. 7) (Chadha & Silakari, 2017; Dvořák et al., 2021).



**Obrázek 7:** Příklady látek obsahujících indoly využívané k léčbě řady onemocnění (BHP = benigní hyperplazie prostaty) (obrázek převzat z Chadha & Silakari, 2017, upraveno)



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický

- Lidská epiteliální buněčná linie prostatického karcinomu 22Rv1 odvozená z xenograftu propagovaného v myších (kat. č. ECACC 05092802)
- Stabilní luciferasová reportérová buněčná linie 22AhRv1 odvozená z buněčné linie 22Rv1 obsahující reportérový plasmid pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro]
- Stabilní luciferasová reportérová buněčná linie AIZ-AR odvozená z buněčné linie 22Rv1 obsahující reportérový plasmid p3ARR/ARE-luc2P/minP/hygro

#### 3.1.2 Chemikálie

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

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

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

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

### 3.1.3 Připravované 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 (ředění s dH<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 µl 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 µl 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 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- Bílá 96jamková destička pro PCR (Roche)
- Bílá 96jamková destička pro reporter gene assay (NUNG)
- Buničina (Tork)
- Elektroforetická cela Mini PROTEAN Tetra Cell (BioRad)
- Filtrační papír pro western blotting (BioRad)
- Fólie na PCR destičku (Roche)
- Krycí sklíčka (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 µl (Eppendorf)
- Nitrilové rukavice (NitriSenese)
- Papírová krabička do -80 °C (Biologix)
- Petriho misky (TPP)
- Plastové mikrozkušavky 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics)
- Plastové stojánky na zkumavky (TPP)
- Plastové špičky 0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- Plastové špičky pro sérologické pipety 0,1-2 ml, 1-5 ml, 1-10 ml, 1-25 ml (SPL)
- Plastové špičky s filtrem 100-1000 µl (Eppendorf)
- Plastové zkumavky 15 a 50 ml (TPP)
- Podložní sklo s Bürkerovou komůrkou (Assistent)
- Polyvinylidenfluoridová membrána (PVDF) (Thermo Scientific)
- Sérologické pipety (Labnet)
- Škrabka na buňky (TPP)
- Zapalovač

### **3.1.5 Přístroje**

- 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)

- Chladnička (Whirlpool)
- Inkubátor CO<sub>2</sub> Incubator 203XL (N-Biotek)
- Kývačka 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)
- Příklad 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 lázeň LCB22D (Daihan LabTech)
- Vortex Reax top (Heidolph)
- Zdroj napětí 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 části byla stanovována aktivita AhR a AR metodou reporter gene assay, exprese genů *CYP1A1*, *FKBP5* a *KLK3* metodou qPCR a detekovány hladiny proteinů AhR a AR metodou western blotting. Základem pro každou analýzu byl 3denní experiment, kdy první den byly buňky vysety na kultivační destičky, druhý den proběhla inkubace buněk s testovanými látkami a třetí den byl experiment ukončen podle toho, pro kterou metodu analýzy byl připravován.

Všechny buněčné linie byly udržovány v nativním stavu uložené v inkubátoru za podmínek 37 °C, koncentrace CO<sub>2</sub> 5 % a 95% vlhkosti v kultivačním médiu RPMI-1640 s přísávkem fetálního bovinního séra, L-glutaminu a neesenciálních aminokyselin. Do média k liniím 22AhRv1 a AIZ-AR bylo jednou týdně přidáno 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 mrazícího 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 pasážovány a přeneseny na větší kultivační láhev za účelem jejich zmnožení podle potřeb experimentu.

### 3.2.3 Pasážování buněk

Nejprve byla pomocí mikroskopu určena konfluence 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 odsávačky odstraněno staré médium. Buňky byly promyty PBS, které bylo společně s kultivačním médiem předem zahřáto na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve vodní lázni. Objem PBS využitý na promytí buněk závisel na velikosti kultivační láhve. Pro malou láhev byly použity přibližně 3 ml, pro střední 5 ml a pro velkou 8 ml. PBS pak bylo odstraněno pomocí odsávačky. Následně byla k 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 použito 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 potřebném 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 Počítání a vyšetí buněk**

Před samotným vyšetím buněk na kultivační destičky musely být buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky, protože bylo nutné vyšet určitý 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 µl 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 vyšetí 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 µl suspenze do zkumavky Eppendorf a poté mimo laminární box smícháno s 90 µl trypanové modři. Následně bylo podložní sklo s Bürkerovou komůrkou překryto krycím sklíčkem a mezi ně byla nanesena směs buněk a trypanové modři tak, aby se dostala pod celou plochu krycího sklíčka. Pomocí mikroskopu byly spočítány živé neobarvené buňky v 10 čtvercích 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 naředění 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 vyšetí byly buňky vystaveny působení testovaných látek. Nejprve byly kultivační destičky přeneseny z inkubátoru do laminárního boxu a celý proces probíhal za sterilních podmínek. Pomocí odsávačky bylo z jednotlivých jamek odstraněno staré kultivační médium a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím rozpuštěnou testovanou látku. Pokud byly buňky vystaveny agonistickému působení, před aplikací na buňky byly testované látky rozpuštěny v médiu. Pokud ale byly buňky vystaveny antagonistickému působení, byl do média před rozpuštěním 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  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , přičemž vždy byly nanášeny v kvadruplikátech. Pro metody PCR a western blotting byly buňky vystaveny antagonistickému působení stejných látek, ale pouze o nejvyšší koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a byly aplikovány v monoplikátech. Jako pozitivní kontrola aktivace AhR byl využit TCDD v koncentraci 10 nmol  $\text{l}^{-1}$ . Jako pozitivní kontrola aktivace AR byl využit DHT o koncentraci 10 nmol  $\text{l}^{-1}$ . V antagonistickém módu byla zavedena i kontrola inhibice aktivity AR vyvolaná přídatkem antagonisty enzalutamidu (ENZ) o koncentraci 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  v kombinaci s DHT. Některé buňky byly ošetřeny pouze DMSO, který byl míchán s médiem v poměru 1:1000, což sloužilo jako negativní kontrola (UT). Následně byly kultivační destičky uzavřeny a přeneseny do inkubátoru na inkubaci za podmínek 37 °C, 95% vlhkosti a 5 % koncentrace  $\text{CO}_2$ .

### **3.2.6 Reporter gene assay**

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 40  $\mu\text{l}$  nesterilního PBS. Po odstranění PBS a osušení destiček bylo do každé jamky nanášeno 20  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru. Destičky byly uzavřeny, přelepeny lepící páskou a umístěny do mrazničky o teplotě -80 °C po dobu minimálně 20 min. Poté byly destičky vyjmuty a umístěny za laboratorní teploty na kývačku. Po úplném roztání bylo 6  $\mu\text{l}$  lyzátu z každé jamky přeneseno do bílé 96jamkové destičky, k nimž bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  substrátu pro enzym luciferasu. Destičky pak byly postupně vloženy do přístroje Tecan Infinite M200 pro analýzu transkripční aktivity AhR nebo AR a výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel.

### **3.2.7 Izolace RNA**

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 nanášen 1 ml TRI Reagentu®. Destičky byly uzavřeny, přelepeny lepící páskou a umístěny do mrazničky o teplotě -80 °C, kde mohly být uchovávány do doby dalšího postupu. Poté byly destičky vyjmuty a umístěny za laboratorní teploty na kývačku. Po úplném roztání byl obsah jamek přenesen pomocí pipety s filtrem do jednotlivých zkumavek Eppendorf a do nich bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného

chloroformu. Směs ve zkumavkách pak byla asi 1 min protřepávána. Následovala inkubace přibližně 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 (přibližně 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 přibližně 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 změřena 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 naředěny PCR vodou podle předem provedeného výpočtu tak, aby v celkovém objemu 5 µl bylo obsaženo 1000 ng RNA. Po naředění byl do každé zkumavky přidán 1 µl Random primers o koncentraci 100 pmol µl<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 naředěna 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 <sup>-1</sup> )	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<sup>-1</sup>, 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 čtyř genů *GAPDH*, *CYP11A1*, *FKBP5* a *KLK3*. Všechny vzorky pro analýzu exprese všech čtyř genů byly na destičku aplikovány v triplicátech. Destička byla uzavřena fólií a centrifugována 3 min při 4 °C a 1500 rpm. Následně byla vložena 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 <sup>-1</sup> )	0,3
Próba (10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	0,2
PCR voda	2,5
<b>Celkem</b>	<b>8</b>

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

Počet cyklů	Proces	Čas	Teplota [°C]
1	Počáteční denaturace	2-3 min	95
30-45	Denaturace	10 s	95
	Elongace	30-60 s	60

### 3.2.10 Izolace proteinů

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 adherované 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 µl lyzačního pufru Protein Lysis Buffer. Před použitím byla do 10 ml lyzačního pufru přidána 1 tableta inhibitoru fosfatas a 1 tableta inhibitoru proteas. Vzorky byly zvortexovány, 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 µl 5x zředěných vzorků, tedy 5 µl vzorku bylo ředěno 20 µl PCR vody. Do 96jamkové destičky bylo naneseo 10 µl na jamku, přičemž všechny vzorky se měřily v duplikátech. Následně byla v duplikátech naneseo kalibrační křivka sestávající z PCR vody a roztoků 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 µl Bradfordova činidla. Destička byla vložena 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 přidavku 10 µl LB pufru bylo v celkovém objemu 20 µl obsaženo 20 µg 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. Podložní a krycí skla byla omyta deionizovanou vodou, očištěna ethanolem a po oschnutí upevněna do stojanu. Podle tabulky 4 (Tab. 4) byl připraven roztok 10% dělicího gelu, který byl po promíchání aplikován do prostoru mezi skly. Přibližný objem naneseného roztoku byl 7,5 ml. Roztok byl převrstven isopropanolem o objemu asi 2x200 µl a nechal se polymerovat po dobu 20 min. Po ztuhnutí gelu byl isopropanol odstraněn a gel 5x omyt destilovanou vodou. Přebytečná 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. Přibližný objem naneseného roztoku byl 2 ml. Mezi skla byl vložen hřebínek a roztok se nechal tuhnout po dobu 30 min. Po polymeraci byla skla s gelem ve vlhké buničině uložena do chladničky do následujícího dne. Druhý den byl gel vložen do elektroforetické komůrky a hřebínek byl opatrně vyjmut. Do komůrky byl nalit migrační pufr a následně byly do jamek nanесeny 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% dělicího 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 dělicí pufr (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
APS	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

**Tabulka 5:** Složení roztoku zaostřovacího 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 zaostřovací 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 zaostřovací gel. Dělicí gel byl pak přenesen do transferového pufru. Následně byla připravena blotovací aparatura. Elektrody byly otřeny deionizovanou vodou a filtrační papíry byly namočeny 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 odřezány. Poté byla membrána inkubována 1 h v roztoku 5% mléka v TBS/Tween. Mezitím byly připraveny roztoky primárních protilátek ředěním s 5% BSA v TBS/Tween v poměru závisícím na druhu protilátky. Protilátky pro aktin byly ředěny 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 ředěním 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 očištěné podložní sklo a převrstvena přibližně 600  $\mu$ l 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 ředěním 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 kývačce 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 podložním skle převrstvena substrátem a detekce proteinů probíhala stejným způsobem jako u western blottingu.



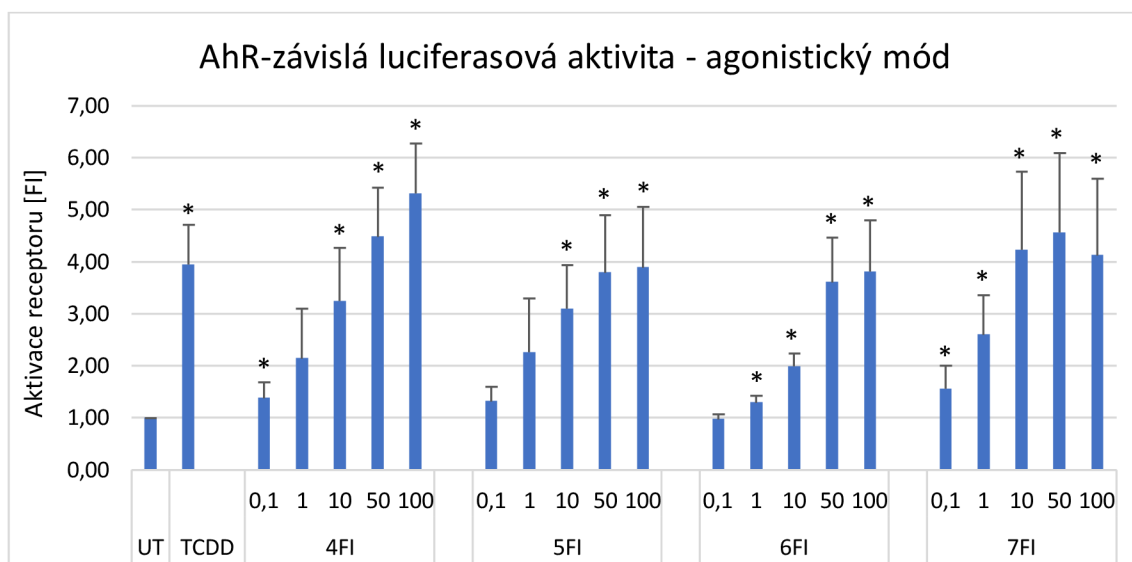
## 4 VÝSLEDKY

### 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  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

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  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  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.



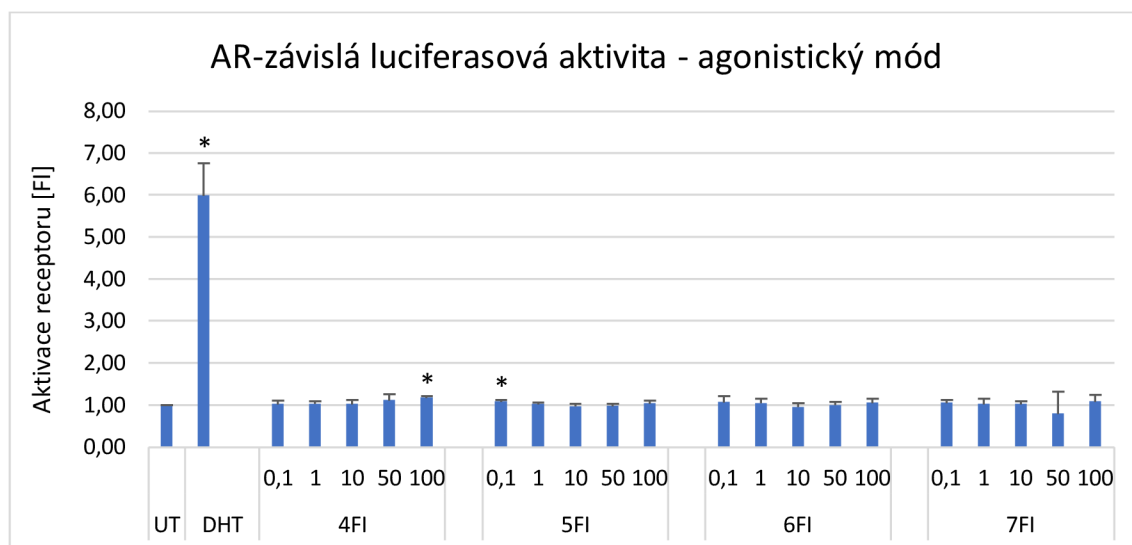
**Graf 1: Působení látek na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR).** Buněčná linie 22AhRv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI). Jako negativní kontrola, označena jako UT, byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit ligand AhR, 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Všechny fluorindoly byly použity v koncentracích  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . 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 vůči negativní kontrole, 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 vůči 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. Buňky 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  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Při pozorování vlivu působení látek na aktivitu AR nebyla sledována žádná výrazná změna aktivity 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.

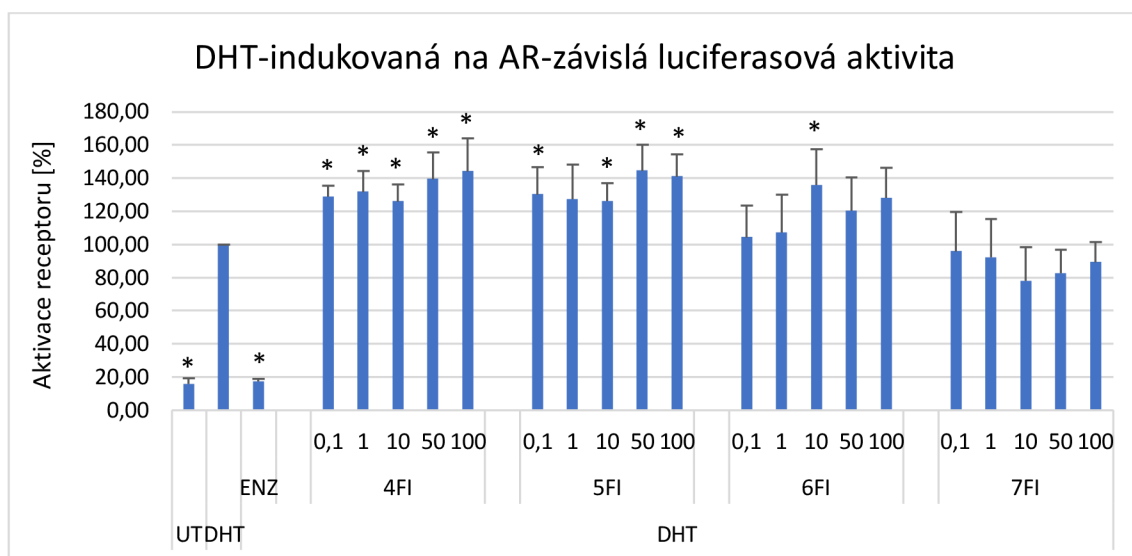


**Graf 2: Působení látek na aktivitu androgenního receptoru (AR).** Buněčná linie AIZ-AR byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI). Jako negativní kontrola (zde označeno jako UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako pozitivní kontrola byl využit ligand AR, dihydrotestosteron (DHT). Všechny fluorindoly byly použity v koncentracích  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . 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 vůči 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 vůči 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 využit pro aktivaci AR. Následně byla metodou reporter gene assay stanovena aktivita AR při působení dvou látek (antagonistický mód). Všechny fluorindoly byly použity v pěti koncentracích  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Jako kontrola schopnosti antagonizovat receptor bylo použito léčivo enzalutamid (ENZ), který snížil DHT-indukovanou na AR-závislou luciferasovou aktivitu přibližně na úroveň negativní kontroly (Graf 3). Překvapivě, tři z testovaných indolů, konkrétně 4-fluorindol, 5-fluorindol a 6-fluorindol, vykazovaly mírný potenciační účinek. Úroveň aktivace receptoru u těchto látek ve všech koncentracích přesahovala pozitivní kontrolu, u některých koncentrací až o 40 % (Graf 3). Jediný 7-fluorindol indukoval koncentračně závislý, i když statisticky nevýznamný, pokles dihydrotestosteronem vyvolané na AR-závislé luciferasové aktivity skoro až o 20 %.



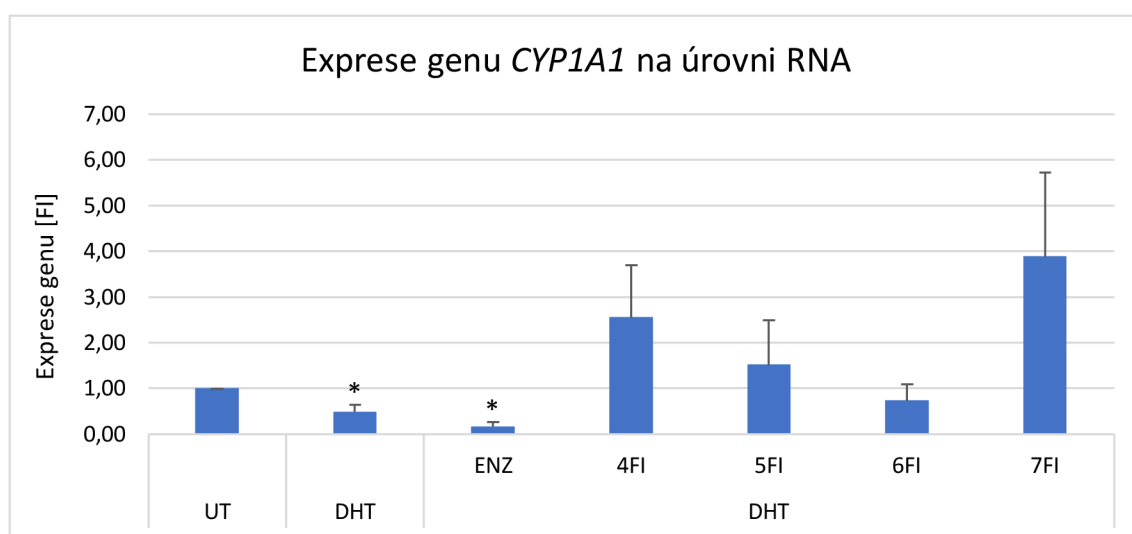
**Graf 3: Působení látek na aktivitu AR v přítomnosti DHT.** Buněčná linie AIZ-AR byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (označená jako UT) byl využit dimethylsulfoxid.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

## 4.2 qPCR

Přestože fluorindoly vykazaly minimální vliv na DHT-indukovanou AR-závislou luciferasovou aktivitu, bylo dále sledováno, zda ovlivňují 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 využit pro aktivaci AR. Následně byla metodou qPCR stanovena hladina exprese cílových genů AhR a AR, konkrétně genů *CYP1A1*, *FKBP5* a *KLK3*. Všechny fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 4.2.1 Stanovení hladiny exprese genu *CYP1A1*

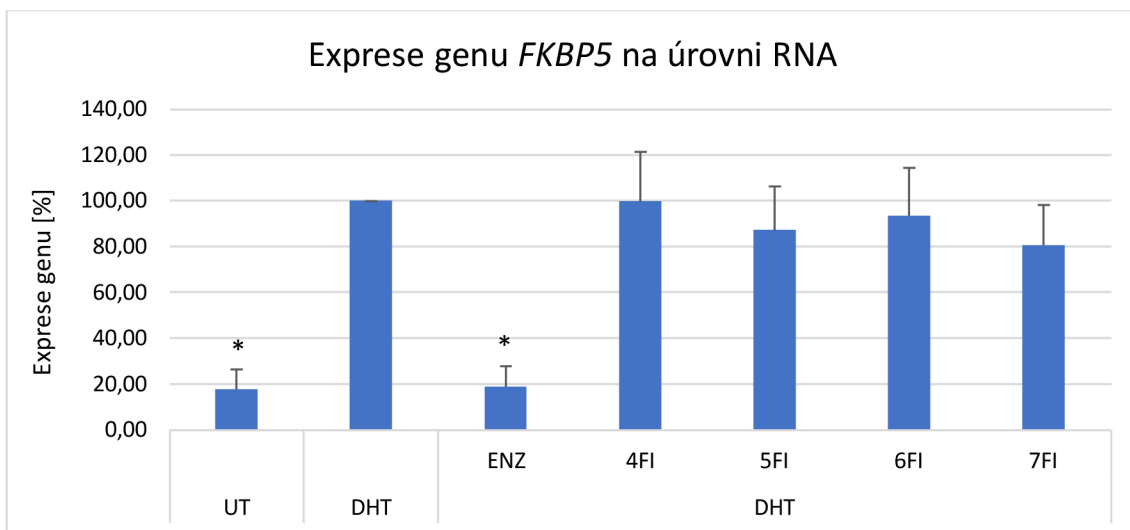
*CYP1A1* je cílový gen AhR a jeho exprese je využívána jako marker aktivity AhR (Hu et al., 2007). Při pozorování vlivu působení látek na expresi genu *CYP1A1* byly nejvyšší indukce exprese zaznamenány u 7-fluorindolu a 4-fluorindolu. U 7-fluorindolu indukce dosahovala 3,9násobku negativní kontroly a 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*.** 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 kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) při současném působení DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla stanovena exprese 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*

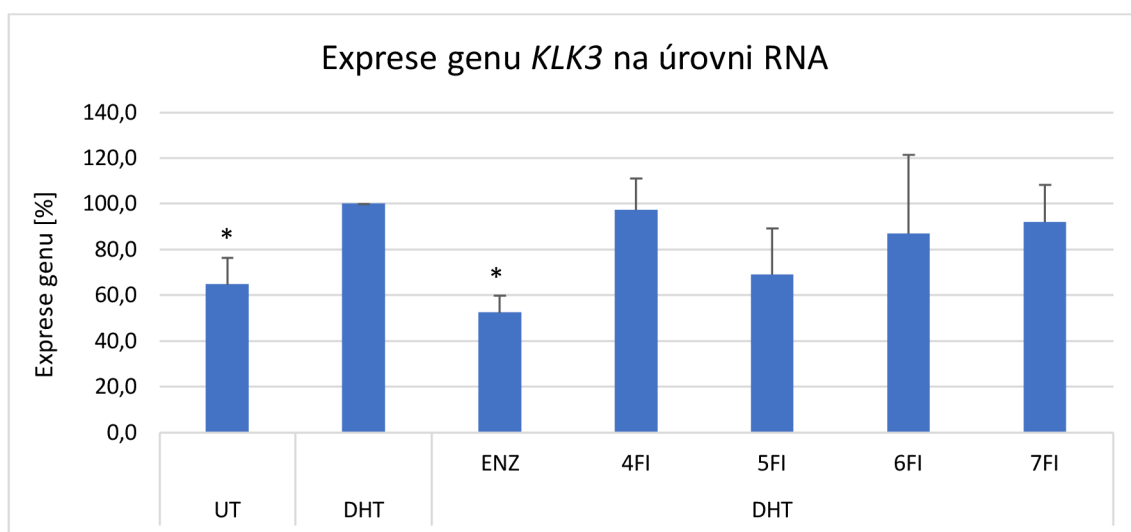
*FKBP5* je cílový gen AR (Magee et al., 2006) a jeho exprese indikuje funkční signalizaci AR (Smith et al., 2015). Při pozorování vlivu působení látek na DHT-indukovanou expresi genu *FKBP5* byl u 7-fluorindolu pozorován přibližně 20% pokles exprese (Graf 5), což je v souladu s výsledky metody reporter 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) při současném působení DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení 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) při současném působení DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení 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.

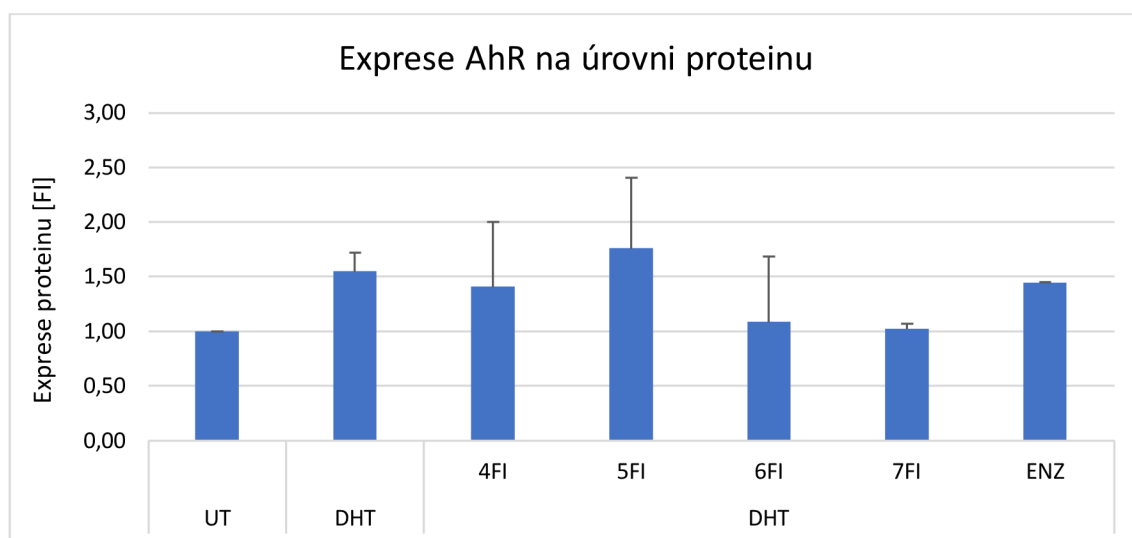


### 4.3 Western blotting

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. Buňky 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 využit pro aktivaci AR. Následně byla metodou western blotting detekována hladina proteinů AhR a AR. Všechny fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 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 přítomností antagonisty, enzalutamidu (Graf 7, Obrázek 1). Z testovaných indolů u jako jediného 7-fluorindolu nebyl pozorován nárůst hladiny proteinu AhR.

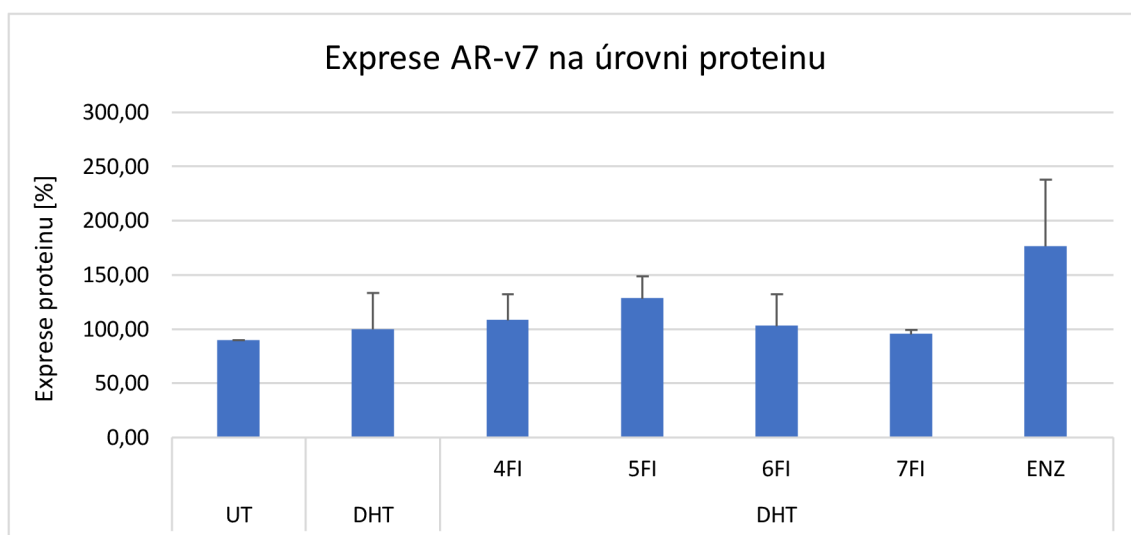


**Graf 7: Působení látek na expresi AhR na úrovni proteinu.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl využit dimethylsulfoxid. Jako kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) při současném působení DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i při současném 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 průměrem ze 2 experimentů.

### 4.3.2 Detekce hladiny proteinů AR

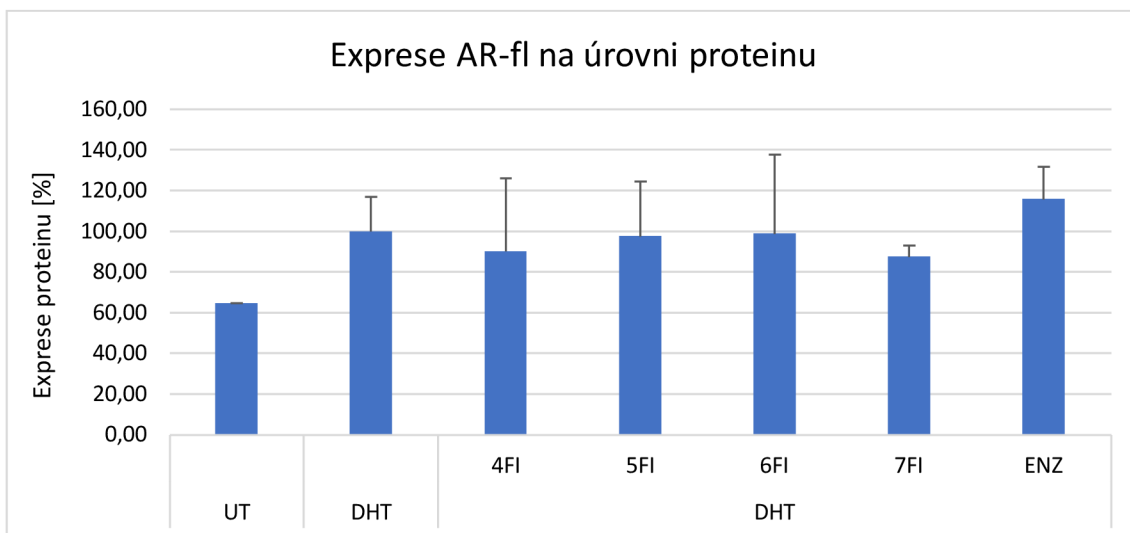
Metodou western blotting byla detekována varianta proteinu AR plné délky (full length = AR-fl), jejíž molekulová hmotnost je 110 kDa, a sestříhová varianta (AR-v7) o molekulové hmotnosti 87 kDa (Obrázek 8). Při pozorování vlivu působení látek na expresi AR-v7 a AR-fl na úrovni proteinu byl v obou případech zaznamenán nárůst AR proteinů působením DHT, který byl jen mírně snížen 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 hladiny AR-fl. Zajímavý byl však účinek enzalutamidu, který hladinu proteinu AR v obou případech mírně navýšil nad samotný DHT.

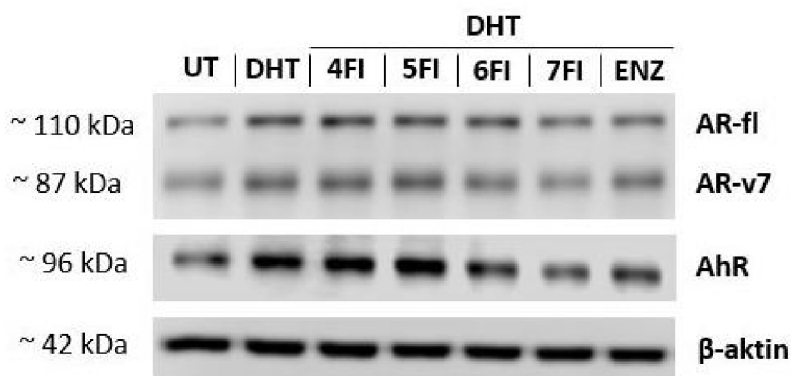


**Graf 8: Působení látek na expresi AR-v7 na úrovni proteinu.** Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena působení 4-fluorindolu (4FI), 5-fluorindolu (5FI), 6-fluorindolu (6FI) a 7-fluorindolu (7FI) současně s dihydrotestosteronem (DHT). Jako negativní kontrola (UT) byl využit dimethylsulfoxid.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



**Obrázek 8: Detekce proteinů AR-fl (110 kDa), AR-v7 (87 kDa), AhR (96 kDa) a  $\beta$ -aktinu (42 kDa) metodou western blotting.** 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 kontrola inhibice aktivity AR byl využit enzalutamid (ENZ) při současném působení DHT. Fluorindoly byly použity v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a ENZ o koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace DHT, samostatně i při současném působení s látkami, je  $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Snímek je reprezentivní výsledek ze dvou experimentů

## 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 živočichů včetně člověka 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 methylyndoly izolované z mořské řasy *Laurencia brongniartii* byly identifikovány jako ligandy AhR po inkubaci s rakovinnými buňkami myši, krysa a morčat (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* taktéž 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 při detekci 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 vůči AhR

mezi lidskými, myšimi a potkaními buňkami, pozorovali Hubbard et al. pro samotný indol, který vykazoval koncentračně 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 methylindoly a methoxyindoly, které aktivovaly AhR, na aktivitu AR v linii 22Rv1. Schopnost látek aktivovat AhR byla stejně 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 koncentračně závislá aktivace tohoto receptoru. Při srovnání fluorindolů a jim pozicí substituentu podobných methylindolů z této studie, tedy 4-, 5-, 6- a 7-methylindolů, byla mezi fluorindoly nejvyšší aktivace AhR zaznamenána u 4-fluorindolu, zatímco mezi methylindoly nejvyšší aktivaci vykazoval 6-methylindol, kdy methylová skupina na pozici 6 způsobila zvýšení aktivity až na téměř dvojnásobek pozitivní kontroly TCDD. Zbylé tři methylindoly pak vykazovaly podobnou aktivaci AhR jako fluorindoly, kdy nejvyšší koncentrace dosahovaly přibližně aktivace 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. K žádným změnám v aktivitě, které by nějak korelovaly s koncentrací látek, nedocházelo. Ve všech případech byla aktivita AR na úrovni negativní kontroly. Ve studii Zgarbové & Vrzala, (2022) taktéž následně sledovali vliv methylindolů a methoxyindolů, schopných aktivovat AhR, na transkripční aktivitu AR. Většina látek se pohybovala na přibližné úrovni negativní kontroly, pouze tři látky signifikantně převyšovaly negativní kontrolu. Paradoxně látka, která jako jediná nevykazovala koncentračně závislou aktivaci AhR, 3-methylindol neboli skatol, vykazoval koncentračně závislé snížení aktivity AR (Zgarbová & Vrzal, 2022). Hladina aktivity AR u methylindolů srovnávaných s fluorindoly se pohybovala mírně pod hladinou negativní kontroly. U methylindolů tak byla zaznamenána nepatrně nižší aktivace AR než v případě fluorindolů.

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

několikrát pozorována. Chen et al., (2020) zjistili, že látka Carbidopa, využívaná při léčbě Parkinsonovy choroby a fungující jako agonista AhR, u nádorových buněk snižovala hladinu proteinu AR prostřednictvím AhR-indukované proteasomální degradace a tím vedla k inhibici buněčného růstu a apoptóze (Chen et al., 2020). Ve studii Sun et al., (2015) pozorovali proteasomální degradaci AR i jeho sestřihových variant, které mohou přispívat k rezistenci vůči antiandrogenům, díky aktivaci AhR přirozeně se vyskytujícím prenylflavonoidem icaritinem, která vedla taktéž k indukci apoptózy buněk rakoviny prostaty a potlačení jejich růstu (Sun et al., 2015). V experimentální části této diplomové práce při působení fluorindolů v antagonistickém módu byl pak sledován koncentračně závislý, avšak statisticky nevýznamný, pokles aktivity AR pouze u 7-fluorindolu. Ostatní látky měly spíše kostimulační charakter. Ve studii Zgarbové a Vrzala, (2022) při antagonistickém působení methylyndolů a methoxyindolů společně s DHT, methylyndoly porovnávané s fluorindoly obecně vykazovaly větší potenciál DHT-indukovanou aktivitu AR potlačit. U 4-methylyndolu byl pozorován signifikantní koncentračně závislý pokles aktivity AR. 5-methylyndol a 6-methylyndol neměly kostimulační charakter jako 5- a 6-fluorindol, ale úroveň aktivity AR se pohybovala na úrovni pozitivní kontroly, přičemž s rostoucí koncentrací nepatrně klesala. Nejvyšší aktivitu z těchto čtyř látek vykazoval 7-methylyndol, který však pozitivní kontrolu převyšoval maximálně o 20 %. Celkově v této studii u pouze 8 látek, jako 3-methylyndol, 4-methylyndol, 1,3-dimethylyndol, 2,3-dimethylyndol, 2,3,7-trimethylyndol, 4,6-dimethylyndol, 5,6-dimethylyndol a 7-methoxy-4-methylyndol, z 22 testovaných pozorovali koncentračně závislý pokles aktivity AR. Výsledky této studie tak naznačují, že působení aktivace AhR na aktivitu AR může být silně závislé na specifitě ligandu AhR (Zgarbová & Vrzal, 2022).

V následujícím postupu experimentální části byl sledován vliv fluorindolů o nejvyšší koncentraci v antagonistickém působení na expresi cílových genů AhR (*CYP1A1*) a AR (*FKBP5* a *KLK3*) a na hladinu proteinů AhR a AR. Metodou qPCR byla analyzována hladina exprese cílového genu AhR *CYP1A1* na úrovni mRNA. U 7- a 4-fluorindolu byla zaznamenána zvýšená exprese, zbylé dva indoly pak neměly na expresi vliv. Nicméně různé ligandy AhR mohou receptor aktivovat odlišným způsobem. Příkladem takového ligandu je resveratrol, který neindukuje silnou expresi genu *CYP1A1*, ale aktivuje expresi paraoxonasy (PON1), což může být vysvětlováno vazbou AhR na alternativní XRE (Larigot et al., 2018). Všechny ligandy AhR tak pravděpodobně nemusí vykazovat silnou expresi genu *CYP1A1*.

Během detekce proteinů 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 proteinů AR-fl i AR-v7 mírně nad hladinu pozitivní kontroly, i když způsobil 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 ZÁVĚR

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 indolů 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 koncentračně závislou aktivaci AhR. U žádného 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 potenciační účinek 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 žádném 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 sestřihové varianty pak nebyl pozorován žádný 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), 362–372. <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), 383–391. <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), 228–233. <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), 3–8. <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), 307–313. [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), 307–310. [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), 225–234. 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), 964–973. 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>
- Česká urologická společnost ČLS 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), 853–864. <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), 3–15.
- de Lamirande E. (2007). Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 33(1), 60–68. <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), 1488–1490. 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), 1176–1185. 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, 309–334. <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), 3–24. [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, 2743–2753. <https://doi.org/10.1007/s00345-020-03112-3>

- Descotes, J. L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian journal of urology*, 6(2), 129–136. <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), 310–320. <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), 34–45. 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), 14801–14806. <https://doi.org/10.1073/pnas.260499897>
- Frick, J., & Aulitzky, W. (1991). Physiology of the prostate. *Infection*, 19(S3), S115–S118. 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), 288–295. <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), 37–41. <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), 273–279. 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), 7119–7130. <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), 1687–1697. <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), 342–350. 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), 3695–3709. <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), 1475–1486. 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, 159–184. <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), 365–380. <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), 386–401. <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., Özgüroğlu, M., Uemura, H., et al. (2019). Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 381(1), 13–24. <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), 679–685. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955955>
- Katolická, J. (2014). Hormonální léčba karcinomu prostaty. *Onkologie*, 8(5), 228–230.
- 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, 1198–1203. <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), 2497–2513. <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), 223–232. <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), 12496–12519. <https://doi.org/10.3390/ijms140612496>
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1–9. <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), 565–575. 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), 36–44. <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), 707–718. <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), 402–410. <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), 2532–2542. <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, 47–51. <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), 372–381. <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), 178–186. <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), 590–598. 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), 236–241. <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), 5–10. 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, 206–211. <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), 263–268. [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), 66–73. <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), 1160–1163. 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), 562–566. <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), 474–484. 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), 102–107. 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), 11017–11026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808694200>
- Pagliarulo, V. (2018). Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1096, 1–30. [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), 853–859. <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), 428–438.
- 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), 21519–21526. <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), 400–409. <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, 10–20. <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), 645–657. <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), 135–149. 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), 192–208. <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, 59–84. <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), 9–25. <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), 433–443. 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), 198–212. <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), 299–311. <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), 757–768. <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), 220–254. <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), 3–23. <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), 787–790. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>
- Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchovsky, 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), 38087–38094. <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), 39–44. [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), 1970–1979. <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), 3–10.
- 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), 51–57. [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, 20–29. <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, 2117–2124. 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), 4763–4773. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10748>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

(4-,5-,6-,7-)FI	(4-,5-,6-,7-)fluorindol
ADT	androgen-deprivační terapie
AF	funkce transkripční aktivace
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AHRR	represor aryluhlovodíkového receptoru
APS	peroxodisíran 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 lokalizační 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 řetězová reakce
rpm	otáčky za minutu
TAD	C-terminální transaktivační doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo[b,e][1,4]dioxin
TEMED	tetramethylethylendiamid
UT	negativní kontrola (untreated cells)
XRE	xenobiotické responzivní elementy