

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů

**Stanovení androgenních a antiandrogenních aktivit
na buňkách karcinomu mléčné žlázy**

Assessing androgenic and antiandrogenic activities
with human breast carcinoma cells

Jana Kubátová



Bakalářská práce

Praha, 2008

Školitel: Ing. Eva Köhlerová, PhD.

OBSAH

Seznam zkratek	4
Abstrakt	5
Abstract	6
1. ÚVOD	7
2. ANDROGENY	7
2.1. Chemická struktura androgenů	7
2.2. Řízení funkce varlat	8
2.3. Biologické účinky androgenů	9
2.4. Biosyntéza androgenů	10
3. ANDROGENNÍ RECEPTOR	10
4. CHEMICKÁ STRUKTURA ANTIANDROGENŮ	13
5. MECHANISMUS PŮSOBNÍ ANDROGENŮ	13
5.1. Působení steroidů v jádře (genomové účinky)	14
5.1.1. Aktivace receptoru závislá na ligandu	15
5.1.2. Aktivace receptoru nezávislá na ligandu	15
5.2. Negenomové působení steroidů	16
5.3. Transkripční kofaktory: koaktivátory, negativní koregulátory a korepresory	17
5.4. Mechanismus působení antiandrogenů	19
6. STANOVENÍ ANDROGENNÍCH A ANTIANDROGENNÍCH AKTIVIT <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i>	19
6.1. Studie <i>in vitro</i>	19
6.1.1. Receptorové vazebné testy	20
6.1.2. Stanovení proliferační aktivity hormonálně dependentních buněk	20
6.1.3. Test reporterového genu	21
6.2. Stanovení <i>in vivo</i>	21
7. VÝSLEDKY STANOVENÍ ANDROGENNÍCH A ANTIANDROGENNÍCH AKTIVIT <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i>	22
8. ZÁVĚR	24
Přehled použité literatury	25

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Doc. MVDr. Josefu Škardovi, DrSc. a Ing. Evě Köhlerové za pomoc při shromáždění literatury a cenné rady při sepisování práce.

Seznam zkratek

AD	androstendion
AF	aktivační funkce
AMP	adenosin monofosfát
AR	androgenní receptor
ARE	androgen responzivní část
DCCFBS	fetální bovinní sérum zbavené steroidů pomocí aktivního uhlí pokrytého dextrans
DHEA	dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
DHT	5 α -dihydrotestosteron
ED	endokrinní disruptory
ER	estrogenní receptor
FSH	folikuly stimulující hormon
GnRH	gonadotropin (gonadotropin releasing hormone)
GF	růstový faktor (growth factor)
GR	glukokortikoidní receptor
HDAC	histon deacetyláza
HRE	hormon responzivní část
Hsp	protein tepelného šoku (heat shock protein)
IL-6	interleukin 6
LBD	doména vázající ligand (ligand binding domain)
LH	luteinizační hormon
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
mRNA	messenger RNA
MT	methyltestosteron
N-CoR	korepresor jaderného receptoru (nuclear receptor corepressor)
NTD	N-koncová doména (N-terminal domain)
NR	nukleární receptory (nuclear receptors)
PKA	protein kináza A
PR	progesteronový receptor
SMRT	tlumící mediátor retinoidních a thyroïdních receptorů (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors)
SR	steroidní receptor
SRC	koaktivátor steroidního receptoru (steroid receptor coactivator)
T	testosteron
TR	thyroïdní receptor

Abstrakt

Androgeny patří do skupiny C₁₉ steroidních hormonů, které jsou produkovány hlavně Leydigovými buňkami varlete. Pasivně difundují do buňky, kde se váží na androgenní receptor, což vede ke změně jeho konformace a k disociaci proteinů tepelného šoku. Komplex hormon-receptor se poté přesune do jádra a váže se na specifické sekvence – androgen responsivní elementy na DNA, které jsou propojeny s promotorovými oblastmi genů řízených androgeny.

Masivní výroba syntetických chemikálií zvýšila výskyt těchto látek v prostředí. Některé z těchto chemikálií mají schopnost zasahovat do přirozené funkce endokrinního systému a reprodukce zvířat a lidí. Tyto látky nazýváme endokrinními disruptory. *In vitro* je možné androgenní a antiandrogenní aktivity stanovovat třemi různými postupy: receptorovým vazebným testem, testem reporterového genu nebo buněčným proliferačním stanovením (A-screen).

Receptorové vazebné reakce stanovují schopnost testovaných látek vázat se na receptory androgenů. Tato stanovení tedy monitorují pouze jednu charakteristickou vlastnost androgenů, vázat se na receptor.

Test reporterového genu je založen na indukci exprese reporterového genu. Vystavení buněk hormonálně aktivní látce vede k aktivaci transkripce reporterového genu, často luciferázy, jejíž aktivita může být změřena luminometrem.

Stanovení A-screen je založeno na inhibici proliferační buněk. Proliferační buněk je nejprve stimulována estrogény, přídavek androgenů tuto proliferační tlumí. A-screen reprezentuje nejvyšší úroveň biologické komplexity ze všech *in vitro* stanovení.

V důsledku rozdílné biodostupnosti a metabolismu látek je korelace mezi výsledky testů *in vitro* a *in vivo* nízká. Proto pozitivní nálezy získané *in vitro* je nutno ověřit *in vivo*. Jedním z takových testů je Hershbergerův test, který je založen na stimulaci nebo inhibici růstu semenných váčků kastrovaných samců hlodavců.

Klíčová slova: androgeny, antiandrogeny, test reporterového genu, A-screen, receptorový vazebný test, Hershbergerův test

Abstract

Androgens are C₁₉ steroid hormones that are mainly produced by Leydig cells in testes. The entry of androgens into cell results in receptor binding causing a conformational change that releases heat shock proteins and allows the androgen-receptor complex to be translocated to the nucleus where binds to the specific sequence of DNA – androgen response element. These are connected with the promotor regions of a competent genes.

The massive manufacture of synthetic chemicals increased the occurrence of these compounds in the environment. The environmental exposure to some chemicals interfere with the normal function of endocrine system and reproduction of wildlife and humans and therefore, these substances were called endocrine disruptors. A large number of these chemicals can mimic endogenous hormones. There are three different methods for assessing androgens and antiandrogens *in vitro*: receptor binding assay, reporter gene assay and cell proliferation assay (A-screen).

The receptor binding assay determine the ability of chemicals to bind to the hormone receptor, so that this test monitors only one feature of androgens.

The reporter gene assay is based on induction expression of the reporter gene. If cells are exposed to the hormonally active chemical, transcription of reporter gene is activated. This gene is often a luciferase, the activity of which can be measured by luminometer.

A-screen is based on an inhibition of cell proliferation. Cells are at first stimulated by estrogens to proliferate. Addition of androgen agonists inhibit this proliferation. A-screen represents the highest level of biological complexity of all *in vitro* assays.

The critical objective is to detect chemicals that may be active *in vivo*, there by taking into account bioavailability and metabolism of a substance in animals. An example of such *in vivo* test is Hershberger assay based on stimulation/inhibition of growth of seminal vesicles of castrated male rodents.

Keywords: androgen, antiandrogen, reporter gene assay, receptor binding assay, A-screen, Hershberger assay

1. ÚVOD

V posledních letech byl zaznamenán zvyšující se výskyt hormonálně dependentních nádorových onemocnění a poruch reprodukce lidí a volně žijících zvířat. Tato skutečnost je dávana do souvislosti se zvyšujícím se výskytem přirozených a syntetických hormonálně aktivních látek ve vnějším prostředí a v potravinovém řetězci. Vzhledem ke schopnosti těchto chemikálií mimikovat nebo blokovat působení endogenních hormonů jsou nazývány endokrinními disruptory (ED). Předpokládá se, že expozice plodů a novorozenců ED indukuje po vazbě na příslušné receptory morfologické a funkční změny ve vývoji reprodukčních orgánů, imunitního, nervového a endokrinního systému. Výsledkem je narušení delikátní hormonální rovnováhy, která vede k abnormální funkci hormonálně dependentních tkání a orgánů a k různým onemocněním v pozdějších stadiích ontogeneze a v dospělosti (Colborn et al., 1993; vom Saal et al., 1997; Markey et al., 2003).

Byly vyvinuty systémy, které jsou schopné detekovat estrogenní a androgenní účinky látek. Cílem této práce je podat stručný přehled o této problematice a zaměřit se zvláště na mechanismus působení androgenů a testovací systémy, které jsou v současné době používány k detekci androgenů a antiandrogenů.

2. ANDROGENY

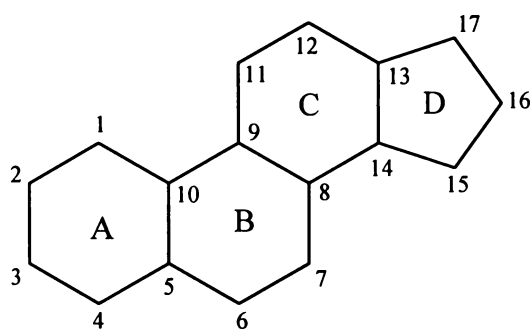
2.1. Chemická struktura androgenů

Androgeny patří do skupiny steroidních hormonů. Jako steroidy se označují látky s cyklopentano-perhydrofenanthrenovým skeletem složeným ze čtyř kruhů (obr. 1). Jsou to látky ve vodě téměř nerozpustné, lipofilní. Jejich rozpustnost se zvyšuje, pokud jsou ve formě esterů s kyselinou sírovou nebo ve formě glukuronidů, případně glykosidů. Steroidní strukturu mají hormony pohlavní (gonadální), hormony produkované kůrou nadledvin (kortikoidy), neurosteroidy a vitamín D. Z dalších přirozených látek můžeme jmenovat steroly, žlučové kyseliny, aglykony srdečních glykosidů, některé sapogeniny a alkaloidy. Některé z těchto látek jsou vhodnou surovinou pro syntetickou přípravu steroidních hormonů.

Chemie steroidů byla propracována v posledních 70 letech zásluhou celé řady badatelů (např. A. Butenandt, E.A. Doisy, atd.). Isolace hormonálně aktivních steroidů ze žláz s vnitřní sekrecí byly v počátcích ztíženy nedostatečnou purifikací a dělením látek s podobnou

strukturou. Teprve chromatografické postupy umožnily izolaci jednotlivých steroidních hormonů ze směsí různých steroidů v čistém stavu.

V současné době se steroidní hormony již nepřipravují z endokrinních žláz, nýbrž synteticky z některých přírodních steroidů zejména rostlinných (fytosteroly). Byly již také vypracovány totální syntézy steroidních hormonů, vycházející z velmi jednoduchých sloučenin. Většina farmaceutických preparátů steroidních hormonů jsou dnes syntetické steroidní estery se složkou kyseliny propionové nebo trimethyloctové apod. Estery steroidních hormonů mají protražované působení, což je způsobeno jejich pomalejší resorpcí a zvolněnou inaktivací v organismu, zvláště v játrech, takže se dosáhne vyšších hladin hormonů po delší dobu.



Obr.1. Cyklopentano-perhydrofenanthren

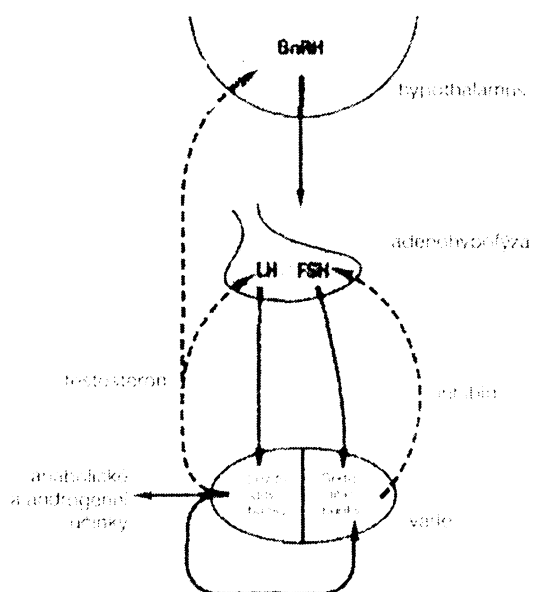
Jsou známy tři skupiny gonadálních hormonů:

- estrogeny- C_{18} steroidy, ovlivňující růst a vývoj samičích pohlavních orgánů. Jsou uvolňovány vaječnickovými folikuly, žlutým tělískem, placentou a nadledvinou, vyznačují se estranovým skeletem s aromatickým kruhem A, fenolovou hydroxyskupinou na C_3 a hydroxy- nebo ketoskupinou na C_{17} ;
- gestageny- C_{21} steroidy, produkované žlutým tělískem, placentou a (v malých množstvích) folikulem a nadledvinou;
- androgeny- C_{19} steroidy, syntetizovány v Leydigových buňkách varlete a také v kůře nadledvin.

2.2. Řízení funkce varlat

Funkce varlat je řízena přes osu hypothalamus-adenohypofýza-varlata. V hypothalamu se tvoří gonadotropin (GnRH), který ovlivňuje sekreci luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) v adenohypofýze. FSH je tropinem Sertoliho buněk a společně

s androgeny udržuje gametogenní funkci varlat. Inhibin zpětnovazebně tlumí sekreci FSH. LH je tropinem Leydigových buněk a stimuluje sekreci testosteronu (T), která zpětnovazebně inhibuje sekreci LH. Léze hypothalamu u zvířat a hypothalamická onemocnění u lidí vedou k atrofii varlat a ke ztrátě jejich funkce. Hladiny těchto hormonů jsou řízeny mechanismem steroidní zpětné vazby (obr. 2). T snižuje sekreci LH přímým působením na adenohipofýzu a inhibicí sekrece hypothalamického GnRH. Inhibin působí přímo na adenohipofýzu a tlumí sekreci FSH. V reakci na LH část T produkovaná Leydigovými buňkami ovlivňuje semenotvorný epitel a vede k vysoké místní koncentraci androgenů v Sertoliho buňkách, která je nezbytná pro normální spermatogenezi.



Obr. 2. Předpokládané vztahy mezi hypothalamem, adenohipofýzou a varlaty. Plné šipky ukazují účinky stimulační a čárkované šipky účinky inhibiční (Ganong, 1995).

2.3. Biologické účinky androgenů

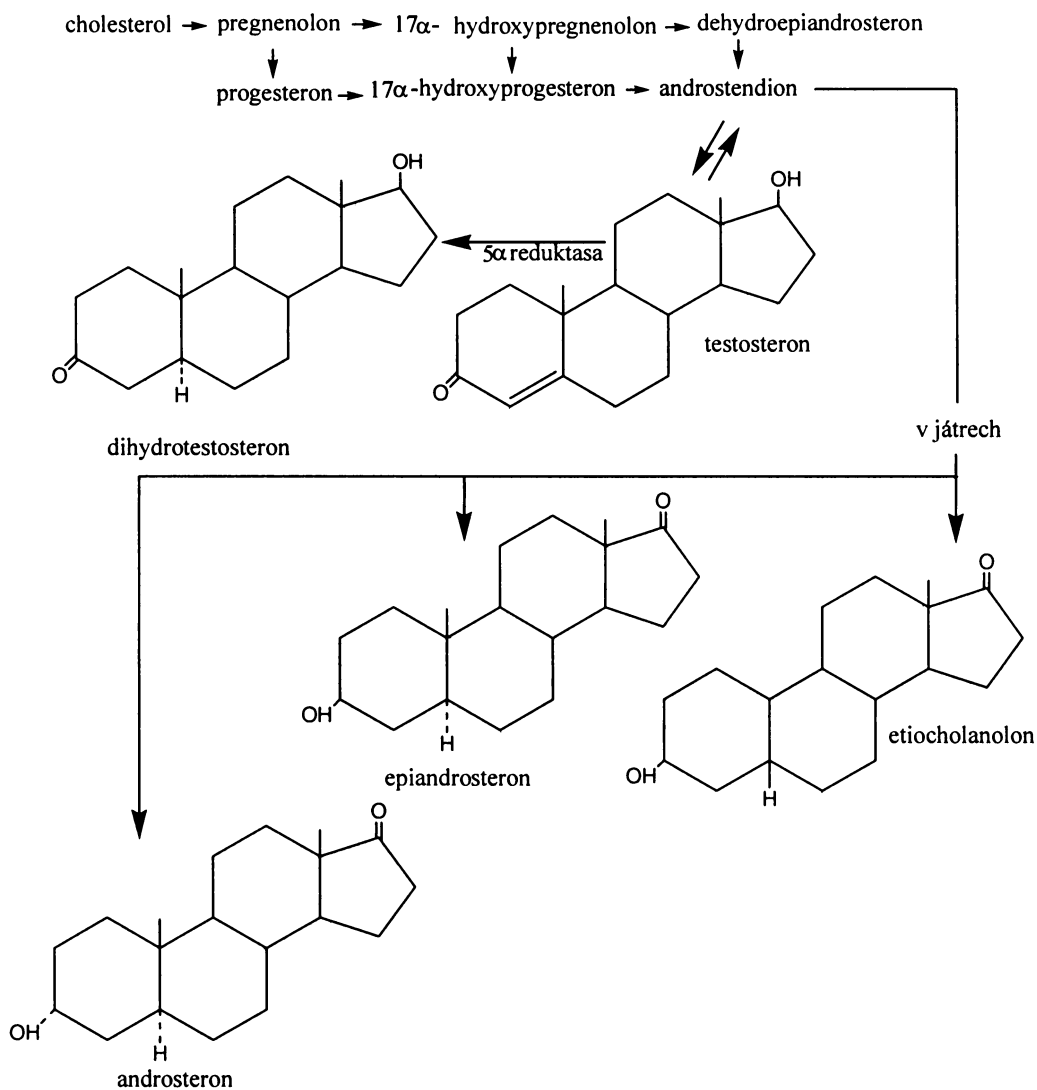
Androgeny jsou pohlavní hormony vznikající u mužů v testikulárních Leydigových buňkách (T), u žen v buňkách vaječníku a u obou pohlaví v zóně *reticularis* kůry nadledvin (dehydroepiandrosteron a androstendion). T a další androgeny mají zpětnovazebný inhibiční účinek na adenohipofyzární sekreci LH, podněcují vývin a udržování samčích sekundárních pohlavních znaků a mají též výrazný proteoanabolický a růstový účinek. Společně s FSH testosteron udržuje gametogenezi. U pokusných zvířat androgeny vyvolávají agresivní chování. Dávky exogenního T, které mají významný anabolický účinek, jsou také maskulinizující a zvyšují libido.

2.4. Biosyntéza androgenů

Testosteron, hlavní hormon varlat, je C₁₉ steroid se skupinou -OH v pozici 17. Syntetizuje se v Leydigových buňkách z cholesterolu a je také tvořen z androstendionu uvolňovaného kůrou nadledvin. Podle současných názorů jsou biosyntetické cesty ve všech steroidogenních endokrinních orgánech podobné a jednotlivé žlázy se od sebe liší jen obsahem enzymových systémů. V Leydigových buňkách chybějí 11- a 21-hydroxylasy, které jsou přítomny v kůře nadledvin, ale je přítomna 17 α -hydroxylasa. Pregnenolon se proto hydroxyluje v pozici 17 a poté se odštěpuje postranní řetězec, takže vzniká dehydroepiandrosteron. Androstendion se také tvoří cestou přes progesteron a 17-hydroxyprogesteron. Tato cesta se však u lidí uplatňuje jen málo. Dehydroepiandrosteron a androstendion jsou poté přeměňovány na T (obr. 3). Sekrece T je pod kontrolou LH. V mechanismu stimulace sekrece androgenů v Leydigových buňkách prostřednictvím LH se uplatňuje cyklický AMP (cAMP) (Ganong, 1995).

3. ANDROGENNÍ RECEPTOR

Buněčné a molekulární působení androgenů během vývoje je klíčem k pochopení diferenciaci samčího pohlaví. Hlavní roli v tomto procesu hraje jaderný androgenní receptor (AR), 110 kDa veliký transkripční faktor, který kontroluje expresi genů závislých na androgenech (Hughes, 2001). U lidí je AR gen lokalizován na chromozomu Xq11-12, skládá se z 8 exonů. První exon kóduje NTD, druhý a třetí exon DBD a exony 4-8 kódují LBD. První exon kóduje N-terminální polymorfní glutaminovou oblast, která obsahuje repetice CAG. Délka repetice CAG ovlivňuje transkripční účinnost AR (Chamberlain a kol., 1994; La Spada a kol., 1991). Promotor genu AR neobsahuje TATA ani CAAT box, ale je bohatý na GC sekvence, které váží transkripční faktor SP1 (Tilley a kol., 1989; Song a kol., 1993). AR je transkribován ze dvou oddělených promotorových startovacích míst, jejichž aktivita se liší v závislosti na typu buněk (Grossmann a kol., 1994).



Obr. 3. Biosyntéza a metabolismus testosteronu (Ganong, 1995)

Kromě sleziny je AR exprimován téměř ve všech tkáních. Transkripce AR genu v cílových orgánech závisí na typu buněk a věku zvířat. Promotor AR potkanů obsahuje palindromická DNA vazebná místa, která jsou rozpoznávána AR, glukokortikoidním receptorem (GR) a progesteronovým receptorem (PR) (Song a kol., 1993; Baarends a kol., 1990). Působení AR je regulováno do určitého stupně negativní zpětnou vazbou transkripce samotného genu AR. Kastrace hladinu AR mRNA zvyšuje, podání androgenů tuto hladinu snižuje (Tan a kol., 1988; Quarmby a kol., 1990). Exprese AR je snižována androgeny a FSH (Blok a kol., 1992; Lindzey a kol., 1993).

AR bez ligandu je inaktivní oligomer lokalizovaný v komplexu s proteiny tepelného šoku (Hsp90, Hsp70) v cytoplasmě. Po navázání ligandu oligomerní protein disociuje, projde konformačními změnami a je transportován do jádra, kde se váže jako homodimer na

androgen responsivní element (ARE) na DNA (White a Parker, 1998). Mutace AR, které mění schopnost AR vázat androgeny, nebo mění transkripční aktivitu AR po navázání ligandu, mohou mít za následek neplodnost, nebo kompletní či částečnou necitlivost k androgenům (Gottlieb a kol., 2001; Quigley a kol., 1995; Tyagi a kol., 1998). Mutace somatického AR byly nalezeny v některých tumorech prostaty (Bentel a Tilley, 1996).

V roce 2000 byla publikována trojrozměrná struktura ligand-vázající domény (LBD) AR (Matias a kol., 2000; Sack a kol., 2001). Navzdory značné odlišnosti v primární sekvenci aminokyselin mezi AR LBD a jinými steroidními receptory (SRs), která může být větší než 80%, je 3D struktura LBDs těchto látek celkem podobná. Stejně jako u ostatních SRs tvoří LBD AR kapsu složenou z 12 helixů.

Krystalická struktura AR LBD s navázaným ligandem je monomerní, zatímco LBD estrogenního receptoru (ER) a LBD pro thyroideální receptor (TR) tvoří v krystalické struktuře dimery (Matias a kol., 2000; Sack a kol., 2001). Vzhledem k tomu, že v podmínkách *in vivo* AR s navázaným ligandem je ve formě dimeru, lze předpokládat, že významnou roli v procesu dimerizace hraje NTD.

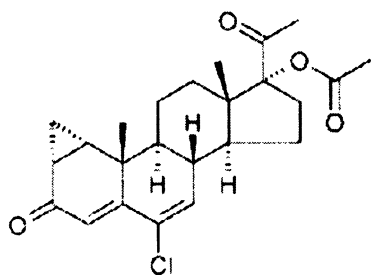
DNA vazebná doména (DBD) AR se u člověka skládá ze 70 aminokyselin, které jsou kódovány exony 2 a 3. Tato doména patří mezi nejvíce zakonzervované oblasti mezi SRs. Sekvence aminokyselin DBD AR člověka je 100% identická s DBD AR potkanů. S jinými humánními SR je DBD AR ze 79% identický s PR DBD, ze 76% s GR DBD a z 56% s ER α DBD (Hard a kol., 1990). Prostřednictvím DBD se AR váže na ARE v DNA. ARE je složen ze dvou palindromických hexanukleotidových míst, která jsou oddělena třínukleotidovým mezerníkem (Schwabe a kol., 1993).

N-koncová doména (NTD) je primární efektorová oblast AR, která je zodpovědná za transaktivaci. Delecí LBD z AR vznikne N-terminální fragment s konstitutivní aktivitou, která je téměř stejná jako transkripční aktivita celého proteinu s navázaným ligandem. Tímto se AR liší od ostatních SRs, jejichž aktivita je delecí LBD tlumena. NTD AR je tedy místem primární interakce AR s koaktivátory. Prvních 140 aminokyselin není pro transkripční aktivitu receptoru nezbytných, avšak delece aminokyselin mezi 210-337 aktivitu receptoru výrazně snižuje (Simental a kol., 1991). NTD AR je nejméně evolučně zakonzervovaná. Mezi humánním AR NTD a potkana je podobnost pouze 20%. Pomocí delecí a mutací byly identifikovány 2 transkripční aktivační funkce (AF). Na ligandu nezávislá AF-1 v NTD (Jenster a kol., 1995; Tora a kol., 1989) a na ligandu závislá AF-2 funkce v LBD, mutace a delece AF-2 domény drasticky snižují aktivaci transkripce po vazbě ligandu (Tora a kol., 1989; He a kol., 1999; Bevan a kol., 1999).

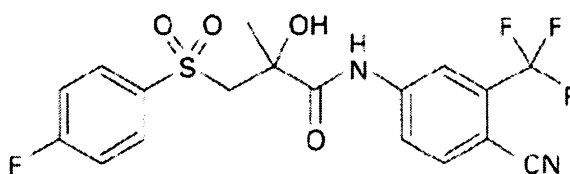
Transkripční aktivita AR je stejně jako u jiných členů rodiny jaderných receptorů modulována koregulačními proteiny. Koregulátory jsou proteiny, které reagují s komplexem ligand- jaderný receptor a zvyšují nebo snižují transaktivaci cílových genů, nemění však úroveň basální transkripce (McKenna a kol., 1999). AR běžně působí jako homodimer, byly však publikovány i heterodimery mezi AR a testikulárním sirotčím receptorem 4 (Lee a kol., 1999) nebo ER α (Panet-Raymand a kol., 2000). V obou případech byl výsledkem pokles transkripční aktivity. Ligandem indukovaná aktivita AR je stejně jako u jiných NR modifikována fosforylací (Lin a kol., 2001).

4. CHEMICKÁ STRUKTURA ANTIANDROGENŮ

Antiandrogeny jsou známy steroidní i nesteroidní. Steroidní deriváty vykazují smíšenou agonistickou i antagonistickou činnost. Nesteroidní deriváty jsou čistě antagonistické (Singh a kol., 2000). Čisté antiandrogeny jsou účinnější v kompetici o vazbu androgenů na AR, což bylo dokázáno na řadě experimentálních modelů, např. na ventrální prostatě potkanů či na růstu androgen dependentních nádorů. Ze steroidních antiandrogenů jsou známy např. cyproteronoacetát (obr. 4) nebo medroxyprogesteronacetát. Tyto látky jsou svým účinkem podobné progesteronu. Mezi nejznámější nesteroidní antiandrogeny patří flutamid, bicalutamid (obr. 5) a nilutamid, herbicid linuron či fungicid vinclozolin a jeho metabolity.



Obr. 4. Cyproteronoacetát



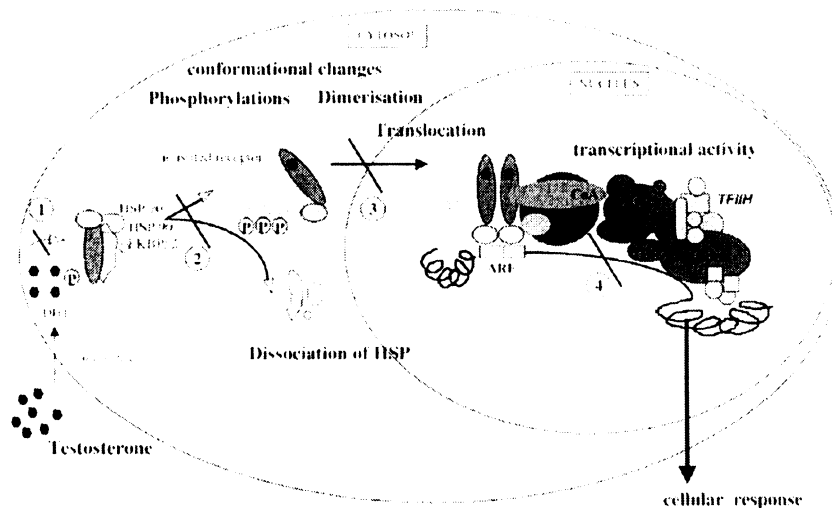
Obr. 5. Bicalutamid

5. MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANDROGENŮ

Androgeny mohou stejně jako ostatní steroidní hormony působit v organismu několika různými mechanismy.

5.1. Působení steroidů v jádře (genomové účinky)

Steroidy pasivně difundují cytoplasmatickou membránou a váží se na aktivovaný jaderný receptor. Po vazbě ligandu na receptor dojde k disociaci proteinů tepelného šoku (Hsp), ke změně konformace receptorové bílkoviny a k dimerizaci receptoru. Komplex hormon-receptor se poté váže na specifické sekvence DNA (AREs), které jsou propojeny s promotorovými oblastmi genů řízených příslušným hormonem (obr. 6).



Obr. 6. Mechanismus působení ED v buňce. (1) kompetice o ligand-vazebnou doménu (LBD); (2) konformační změna androgenního receptoru (AR); (3) přesun do jádra a (4) vazba na DNA a aktivace transkripce (Sultan a kol., 2001)

Jaderné receptory (NR) jsou transkripční faktory nezbytné pro embryonální a fetální vývoj, udržení diferenciace buněčného fenotypu, metabolismu a buněčné smrti. Dysfunkce NR vede k proliferativním chorobám, poruchám reprodukce a metabolickým chorobám jako je rakovina, neplodnost, obesita a cukrovka (Laudet a Gronemeyer, 2001). NR ovlivňují tvorbu bílkovin (enzymů, strukturních proteinů, ale i např. receptorů) a to již na úrovni transkripce příslušných genů.

Biologická odpověď zprostředkovaná tímto typem regulace je poměrně pomalá, řádově jde o desítky minut.

Specifita působení steroidních hormonů na expresi genů spočívá ve:

- ❖ specifické vazbě hormonu na receptor
- ❖ specifické vazbě komplexu hormon - SR na DNA
- ❖ kontrole přístupu SR ke genům pomocí různé organizace chromatinu v mnoha různých cílových buňkách a tkáních

5.1.1. Aktivace receptoru závislá na ligandu

SR obsahují dvě oblasti AF. AF-1 v NTD a AF-2 lokalizovanou v LBD. Vazba estrogenu na ER např. vyvolá konformační změny receptoru, které umožní interakci s AF-1 a AF-2 s transkripčním aparátem. Výsledkem je aktivace transkripce. Některé modely mechanismu působení steroidů předpokládají, že po vazbě dimerizovaného hormon-receptorového komplexu na palindromický HRE na DNA se vytvoří svinutá struktura, která umožní SR interagovat s transkripčním aparátem na iniciačním místě RNA. Důležitou úlohu zde hraje fosforylace receptoru, hlavně jsou důležité četné seriny na amino-konci receptorové bílkoviny. Procesu fosforylace se účastní řada různých protein kináz.

Kromě působení SR na expresi genů po jeho přímé vazbě na DNA existují mechanismy, kterými SR interaguje s DNA nepřímo.

5.1.2. Aktivace receptoru nezávislá na ligandu

Během posledních 15 let se změnilo dogma o potřebě hormonu pro aktivaci SR (Murdoch a kol., 1990). Bylo např. prokázáno, že AR může být aktivován v nepřítomnosti ligandu pomocí růstových faktorů (GF), které aktivují signalizační dráhu mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK). Dalšími prokázanými aktivátory AR je např. protein kináza A (PKA) či interleukin 6 (IL-6). IL-6 je pleiotropní regulátor nádorového růstu, který v některých nádorech prostaty působí jako parakrinní růstový inhibitor, v jiných případech zase jako autokrinní růstový stimulant (Culig, 2004). Aktivace IL-6 vyžaduje Janus kinázu a dále MAPK. Obecně tedy SR mohou být modulovány bez přítomnosti steroidních hormonů prostřednictvím jiných metabolických cest. Těchto procesů se účastní:

- a) obecné regulátory buněčné fosforylace- protein kinasa A (PKA) nebo protein kinasa C (PKC)
- b) extracelulární signály- GF, cytokiny, neurotransmitery
- c) regulátory buněčného cyklu

5.2. Negenomové působení steroidů

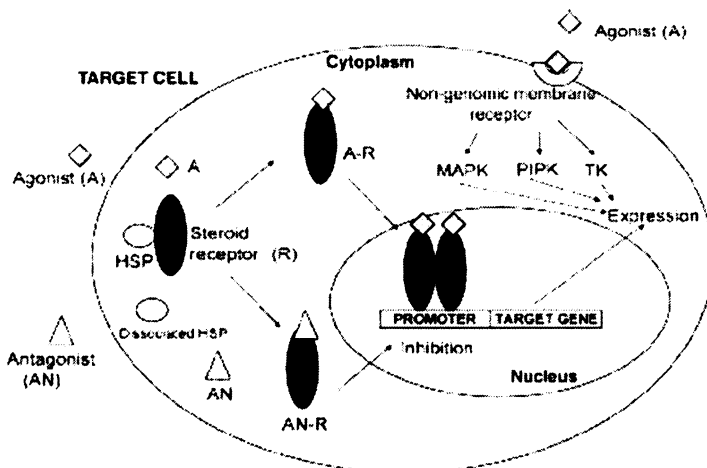
Kromě klasického genomického působení mohou steroidy také působit extrémně rychle prostřednictvím tzv. druhých posílů (Revelli a kol., 1998) a to zvýšením koncentrace Ca^{2+} nebo cAMP (Morley a kol., 1992; Aronica a Katzenellenbogen, 1993). Kromě AR byly tyto efekty demonstrovány i na ER a PR. Bylo zjištěno, že stimulují MAPK v různých buňkách. Oproti antiestrogenům a antiprogestinům, které inhibují aktivaci MAPK vyvolanou agonistou, antiandrogen flutamid stimuluje aktivitu MAPK ve stejném rozsahu jako syntetický androgen R1881. Současné antiandrogeny nemohou úplně zrušit veškerou androgenní aktivitu v cílových buňkách. Androgenní efekty způsobené negenomovým působením byly popsány např. na tepnách psa. Krátkodobé podání testosteronu navodilo na pohlaví nezávislou vasodilataci v tepnách *in vivo*. Koronární vasodilatace epikardiálních cév navozená testosteronem je zprostředkována zčásti oxidem dusnatým pocházejícím z endothelia. Zdá se, že i ATP-citlivé draselné kanály hrají roli v tomto vasodilatačním efektu.

Negenomové působení steroidních hormonů má následující charakteristiky:

- ❖ je velmi rychlé (řádově jde o sekundy, nebo minuty)
- ❖ může probíhat i ve vysoce specializovaných buňkách, které nesyntetizují proteiny (např. spermatozoa) nebo v buněčných klonech, kterým chybí NR pro steroidní hormony
- ❖ může být vyvoláno steroidy vázanými na vysokomolekulární látky, které neprocházejí plasmatickou membránou do buněk
- ❖ není blokováno inhibitory syntézy mRNA nebo inhibitory syntézy proteinů
- ❖ nemůže být blokováno antagonisty klasických genomických SR (pokud tyto antagonisté nereagují se strukturálně příbuznými steroid vázajícími doménami, které mohou být stejné pro genomické i negenomické SR)
- ❖ je vysoce specifické, steroidy s velmi podobnou strukturou mohou vyvolávat různou intenzitu biologického účinku (Revelli a kol., 1998)

Literární údaje upozorňují i na komunikaci mezi genomickým a negenomickým působením steroidů v mléčné žláze (Silberstein a kol., 1984), buňkách karcinomu mléčné žlázy (Sheffield a Welsch, 1985; Cho a kol., 1993; El Tadani a Green, 1996) a v buňkách dělohy (Sumida a Pasqualini, 1990; Aronica a Katzenellenbogen, 1991). V těchto buňkách je

komunikace mezi těmito dvěma mechanismy působení steroidů realizována prostřednictvím cAMP. Negenomový a genomový mechanismus může působit synergisticky, což vede k bifázickému účinku, který má jak rychlý nástup, tak dlouhodobé působení (obr. 7).



Obr. 7. Základní mechanismus působení steroidního/thyroidního receptoru přes genomickou klasickou cestu a rychlou nengenomickou cestu. Hsp-proteiny tepelného šoku; MAPK-mitogenem aktivovaná kináza; PIPK-fosfatidylinositolfosfátová kináza; TK-tyrosin kináza (Roy a kol., 2008)

5.3. Transkripční kofaktory: koaktivátory, negativní koregulátory a korepresory

Současné modely regulace eukaryotických genů předpokládají existenci různých stavů aktivity genů, tj. potlačený/umlčený, základní a aktivovaný stav. Působení androgenů je obvykle spojováno s aktivací genů, tj. přepnutí mezi základním a aktivovaným stavem. Se změnou prostředí v buňce mohou ARs reagovat s různými skupinami kofaktorů v závislosti na vazebné afinitě a relativním nadbytku těchto faktorů. Koaktivátory aktivují transkripci cílového genu, zatímco negativní koregulátory a korepresory inhibují aktivaci genů a nebo mohou aktivované cílové geny vypnout. Tyto proteiny existují ve složitých komplexech, mají mnohonásobné enzymatické účinky a zvyšují vazbu ARs ke složkám chromatinu nebo k basálnímu transkripčnímu aparátu, nebo k oběma. Velká část kofaktorů se váže na LBD, která má zásadní význam nejen pro vazbu ligandu, ale také pro transformaci signálu ligandu.

Zdaleka ne všechny proteiny, které se váží na AF-2 domény působí jako koaktivátory. Např. RIP 140 a SHP (short heterodimerization portener) vykazují negativní koregulační funkci, která vyplývá z jejich schopnosti antagonizovat SRC-1 koaktivátory *in vivo* a soutěžit o vazbu na AF-2 *in vitro*. Z tohoto důvodu jsou tyto kofaktory řazeny do zvláštní kategorie koregulátorů, které jsou odlišné od běžných korepresorů. RIP 140 ovšem ve vysokých koncentracích funguje jako koaktivátor.

Jinou skupinou molekul, které jsou schopny potlačovat basální transkripci indukovanou receptory, je korepresor SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) (Chen a Evans, 1995) a korepresor jaderných receptorů N-CoR (nuclear receptor corepressor) (Horlein a kol. 1995). SMRT i N-CoR reprimují funkci AR aktivací histon deacetylázy. Tyto histon deacetylázy (HDAC) odstraňují acetylovou skupinu z lysinových zbytků, což má za následek kondenzaci chromatinu a znemožnění přístupu k promotoru (Sengupta a Seto, 2004). Aktivace HDAC těmito korepresory je umožněna deacetylázu-aktivující doména (DAD), která je přítomna jak u SMRT tak u N-CoR. Věřící se, že tyto regulátory existují ve velkých represorových komplexech, které kromě HDAC dále obsahují např. transducin β -like 1 (TBL1) (Yoon a kol., 2003). Oba korepresory SMRT i N-CoR se spojují s receptory bez navázaných ligandů. Po vazbě specifických ligandů se však od receptorů odpojují (Chen a Evans, 1995; Horlein a kol., 1995). Tento poznatek je v souladu se současnou teorií, podle které je schopnost receptoru bez navázaného ligandu aktivovat transkripci kompromisem mezi koncentrací koaktivátorů a korepresorů v cílových buňkách. Vazbou ligandu na receptor se snižuje působení represorů a schopnost receptoru aktivovat transkripci je stimulována.

Koaktivátory naopak modifikují chromatin přímo nebo přes působení dalších enzymů acetylací nebo metylací (Burd a kol., 2006). Tyto procesy udržují chromatin rozvolněný a tudíž přístupný transkripčnímu aparátu a RNA polymeráze II. Více specializovaná skupina koaktivátorů slouží k propojení N- a C- terminální domény, což je důležité pro plnou transkripční aktivitu receptoru. Toto propojení je zprostředkováno přes FxxLF motif na N-terminální doméně, který interaguje s hydrofobní oblastí na C-terminální AF-2 doméně, poté, co se naváže ligand (Zhou a kol., 1994). Některé koaktivátory, např. koaktivátor steroidního receptoru 1 (SRC - steroid receptor coactivator) a faktor iniciace translace 2 (TIF – translation initiation factor) usnadňují interakci mezi C- a N-terminálními doménami a tím stabilizují komplex receptoru s ligandem, podporují vazbu dalších koaktivátorových molekul a zvyšují celkovou stabilitu receptoru (Ikonen a kol., 1997).

5.4. Mechanismus působení antiandrogenů

Studium mechanismu působení antiandrogenů je důležité jak pro jejich léčebné účinky, tak i jako prostředek ke zkoumání molekulárního působení androgenů. Antiandrogeny soutěží s androgeny o vazebné místo na AR, ale vazba antagonisty nekončí aktivací receptoru.

Antiandrogeny mohou různě ovlivňovat funkci androgenů. Mohou:

- 1) inhibovat transport T nebo jiných androgenů do plazmy
- 2) zhoršovat absorpci T
- 3) inhibovat enzymové systémy v metabolismu T (např. enzym 5 α reduktázu či aromatázu)
- 4) inhibovat sekreci T varlaty
- 5) blokovat proteiny androgenního receptoru (Mainwaring a kol., 1987)

Pokud se již antiandrogen naváže na androgenní receptor, je možné, že se přesune do jádra a zde se akumuluje, ale jelikož má odlišnou konformaci než AR s navázaným androgenem, je biologicky neaktivní a nezvyšuje transkripční účinnost genů. Kontula a kolektiv v roce 1985 tuto skutečnost prokázali v případě použití antiandrogenu flutamidu. Flutamid zvyšuje koncentrace AR v chromatinu, ale nevede to ovšem k expresi genu kódující ornithin dekarboxylázu, kontrolovaného androgeny.

6. STANOVENÍ ANDROGENNÍCH A ANTIANDROGENNÍCH AKTIVIT IN VITRO A IN VIVO

6.1. Studie in vitro

Většina ED byla identifikována metodami *in vitro*. Jde o postupy nejen vysoce citlivé a specifické, ale i o postupy mnohem levnější než metody *in vivo* (Fertuck, 2002). Nevýhodou je, že data získaná *in vitro* nezahrnují komplexní mechanismus působení látky *in vivo*. Chybí i vliv metabolismu na testované látky, což může vést jak k falsně negativním tak k falsně pozitivním výsledkům (Gray a kol., 2002). Vliv metabolismu je velmi komplexní a závisí na mnoha faktorech jako je absorpce, vazba na bílkoviny, distribuce v tkáních a eliminace látky (Greenspan a Gordon, 1997).

6.1.1. Receptorové vazebné testy

Receptorové vazebné reakce stanovují schopnost testovaných látek vázat se na receptory hormonů (ER α , ER β , PR, AR, GR, MR atd.). Vazebné receptorové testy jsou založeny na kompetici vazby na příslušný receptor mezi neradioaktivní látkou (testovaná látka) a radioaktivním hormonem (Lambright a kol., 2000). Receptory se získávají z cytosolu nebo jaderného extraktu buněk cílových tkání (Wong a kol., 1995; Evans, 1988). Tato stanovení tedy monitorují pouze jednu charakteristickou vlastnost androgenní aktivity, vazbu na receptor, ale neberou v úvahu schopnost komplexu hormon-receptor navodit funkční odpověď. Zásadní nevýhodou je tedy vlastnost, že tato metoda nerozlišuje mezi androgenními agonisty a antagonisty (Roy a kol., 2008).

6.1.2. Stanovení proliferační aktivity hormonálně dependentních buněk

V 80. letech se pro testování androgenní aktivity používaly buňky rakoviny prostaty (LNCaP-FGC). Následně bylo zjištěno, že tato linie obsahuje bodovou mutaci, která ovlivňovala vazbu i indukci exprese (Veldscholte a kol., 1990), a proto se tato linie dále pro testování nepoužívala. Další pokusy byly prováděny na buňkách karcinomu mléčné žlázy (MCF) transfektovaných androgenním receptorem. Tato linie exprimuje 5x větší množství AR než původní linie (Szelei a kol., 1997). Tyto buňky se v současné době používají při buněčném proliferačním stanovení androgenů – A-screen.

A-screen je podobný testovacímu systému E-screen, který zkoumá indukci proliferace po aplikaci estrogenů. Principem A-screenu je inhibice proliferace buněk agonisty androgenů (Soto a kol., 2006). Antagonisté androgenů tuto inhibici naopak tlumí.

A-screen probíhá následujícím způsobem: do mikrotitračních destiček se nasejí buňky v Dulbeccově modifikaci Eaglova média (DMEM), s fenolovou červení a 5% fetálním bovinním sérem. Po 24 hodinách buňky adherují a medium se vymění za DMEM bez fenolové červeně doplněné o 5% fetální bovinní sérum zbavené steroidů pomocí aktivního uhlí pokrytého dextranem (DCCFBS). Následně se přidají testované androgeny v kombinaci s estradiolem. Androgeny sníží estradiolem stimulovaný růst buněk (Körner a kol., 2004). Pro zjištění míry proliferace buněk se počet buněk stanovuje barvením proteinů sulforhodaminem B a následným měřením absorbance barviva při 517 nm.

6.1.3. Test reporterového genu

Androgenicita látky je stanovena na základě indukce exprese reporterového genu, který je pod kontrolou ARE. K tomuto stanovení se používají savčí buněčné linie (MCF-7, PALM, AR CALUX). Kmeny jsou transfektovány vektorem, který kóduje určité receptory (např. ER nebo AR) a vektorem kódujícím reporterový gen (HRE spojený s reporterovým genem- β -galaktosidasa nebo luciferasa) (Hoogenboom a kol., 2001; Arnold a kol., 1996). Vystavení buněk hormonálně aktivní látce má za následek její vazbu na příslušný receptor. Ligand-receptorový komplex tvoří dimery, které interagují s HRE, což vede k aktivaci transkripce a k expresi genu β -galaktosidasy (Routledge a Sumpter, 1996). β -Galaktosidasa metabolizuje substrát za vzniku červeného zabarvení, které může být změřeno na spektrofotometru (De Boever a kol., 2001). Gen pro luciferázu katalyzuje světelnou reakci. Světelná aktivita je měřena luminometrem po přidání luciferinu a lyzujícího pufru.

U stanovení pomocí reporterových genů je základní problém endogenní exprese jiných steroidních receptorů a pokud studovaný vzorek obsahuje jiné steroidní hormony, což se u sérových vzorků stává, mohou také stimulovat transkripci reporterového genu, a tím snižovat specifitu měření androgenní aktivity. Dále tato stanovení nepočítají s možností, že část androgenních akcí *in vivo* je zprostředkována přes negenomické mechanismy. U stanovení pomocí reporterového genu je také důležitý vybraný promotor a buněčné prostředí, u kterého je potřeba zaměřit se hlavně na metabolické kapacity a uspořádání kofaktorů v různých liniích (Simon a Mueller, 2006).

6.2. Stanovení *in vivo*

In vitro testy stanovují pouze jednu specifickou charakteristiku endokrinně aktivní látky, zatímco testy *in vivo* stanovují komplexní působení látky v organismu. V podmínkách *in vitro* se mohou testované látky vázat jen ke složkám kultivačního média, *in vivo* se váží na sérové proteiny a komponenty tkání např. na lipidy, což vede ke změně koncentrační hladiny látek v organismu. V důsledku těchto skutečností se může stanovení hormonálních aktivit látek *in vitro* a *in vivo* velmi významně lišit. Další nedostatkem testů *in vitro* je absence vlivu metabolismu na množství i kvalitu testovaných látek a na jejich biodostupnost (Gray a kol., 2002). Z toho je zřejmé, že žádný *in vitro* test nemůže při stanovení biologických účinků ED nahradit test *in vivo*. Tento závěr je dále podporován existencí multi-hormonálních/anti-hormonálních nebo antagonistických a parciálně agonistických aktivit ve stejné molekule.

Výsledky testování látek *in vivo* mohou být použity pro stanovení jejich nebezpečí a rizik a mohou poskytnout možnost pro komplexní extrapolaci na lidskou populaci (Ankley a kol., 1998). Testy mohou stanovit, zda má testovaná látka účinky podobné přirozeným hormonům a mohou tyto účinky nejen identifikovat, ale i charakterizovat a kvantifikovat. Získané výsledky jsou použity pro stanovení koncentrací, při kterých látky nevykazují signifikantní účinky (No observed effect levels-NOELs) (O'Connor a kol., 2002).

Stanovení androgenní/antiandrogenní aktivit látek lze testovat pomocí stimulace růstu prostaty a semenných váčků kastrovaných samců hlodavců (Hershberger a kol., 1953).

Estrogenní a androgenní účinky látek mohou být dále stanoveny sledováním abnormalit ve vývoji reprodukčních orgánů a sekundárních pohlavních znaků juvenilních samic a samců hlodavců (Gray a kol., 2002) a také stanovením abnormalit reprodukčního chování ryb.

7. VÝSLEDKY STANOVENÍ ANDROGENNÍCH A ANTIANDROGENNÍCH AKTIVIT *IN VITRO* A *IN VIVO*

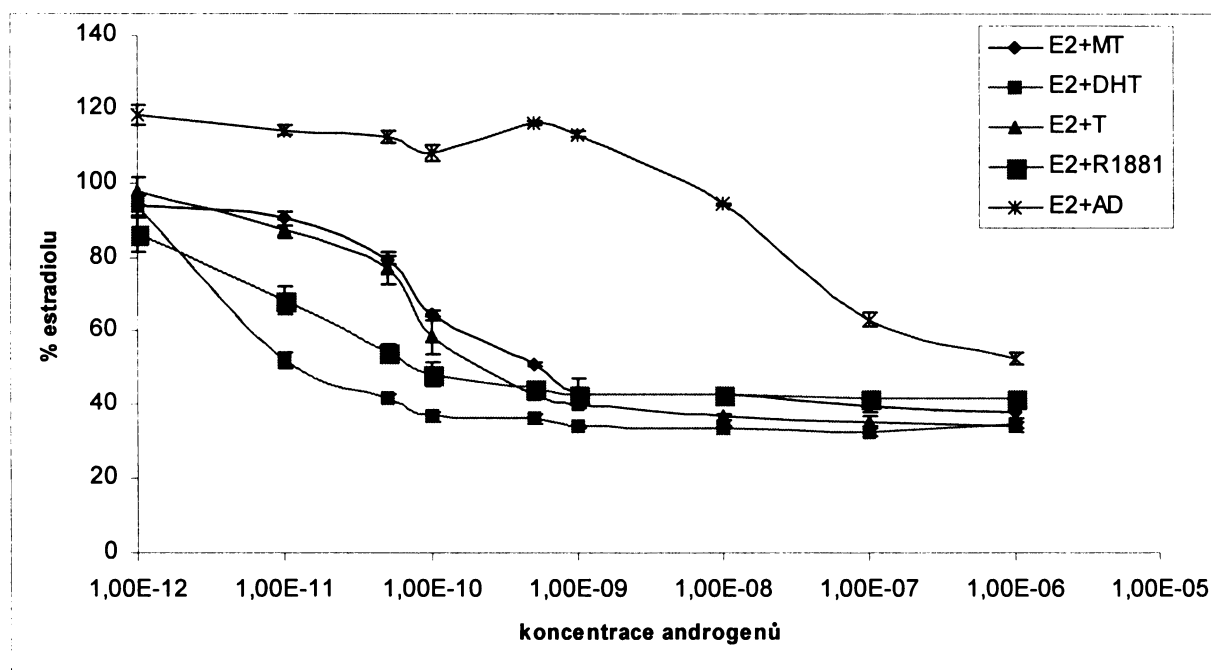
Detekce androgenních a antiandrogenních aktivit

Vazebným biostanovením bylo prokázáno, že androgenní receptory jsou méně promiskuitní než receptory estrogenní. Avšak podobně jako látky s vlastnostmi ligandů estrogenních receptorů jsou i látky s vlastnostmi ligandů androgenních receptorů strukturálně velmi rozdílné (Fang a kol., 2003). Jejich relativní potence měřená podle relativní vazebné afinity byla následující: steroidy > diethylstilbestroly, difenylmetany, polychlorované bifenyly > fytoestrogeny, fenoly, flutamidy, ftaláty a fenolům podobné látky. Mezi steroidními hormony se na androgenní receptory váží některé progestageny a mineralokortikoidy. Navíc receptory pro androgeny, glukokortikoidy, gestageny a mineralokortikoidy mají identický konsensus responsního elementu a i jejich DNA-vázací domény jsou vysoce konzervovány. Tato skutečnost vysvětluje překrývání gestagenních, androgenních a kortikoidních aktivit u řady látek. Vyšší specifitu stanovení androgenních aktivit je možno dosáhnout jen použitím systémů s vyššími úrovněmi biologické organizace než jsou vazebné studie. V 80. letech byl vypracován postup detekce androgenů na buněčné linii buněk (LNCaP) karcinomu prostaty člověka (Horoszewicz a kol., 1983). Vzhledem k tomu, že androgenní receptor těchto buněk má bodové mutace v doméně vázající androgeny, které zvyšují vazbu estrogenů, nemohly být tyto buňky využity ke screeningu androgenních látek. Szelei a kol. (1997) transfektovali úplný humánní androgenní receptor do MCF-7 buněk a pro stanovení androgenních aktivit využili inhibice estradiolem stimulované proliferace buněk. Interferenci účinků estrogenů na

proliferaci buněk je možno eliminovat použitím kultivačního média bez séra s přidavkem transferinu a insulinu. Za těchto podmínek buňky proliferují maximálně v nepřítomnosti estrogenů. Pro stanovení antiandrogenních aktivit pak sloužila inhibice účinků androgenů, která se projevila vzestupem proliferace buněk.

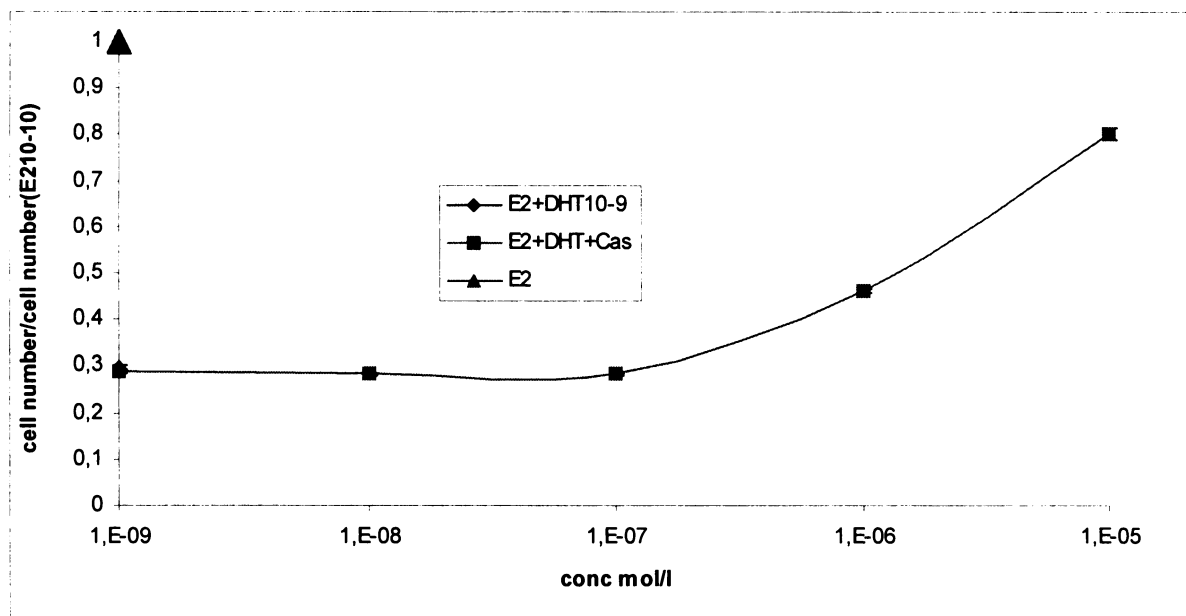
Biostanovení srovnává počet buněk v jednotlivých ošetřeních na konci 6-ti denní kultivace. Antagonisté androgenů jsou pak detekováni na základě jejich schopnosti anulovat působení androgenů a tím stimulovat proliferaci buněk.

Obr. 8. ukazuje inhibici estradiolem stimulované proliferace MCF-7-AR1/E47 androgeny. Maximální inhibice byla pozorována při dávce $0,1 \text{ nmol.l}^{-1}$ DHT, 1 nmol.l^{-1} R1881, 1 nmol.l^{-1} methyltestosteronu (MT), 10 nmol.l^{-1} T a 1000 nmol.l^{-1} androstendionu (AD).



Obr. 8. Proliferační odpověď MCF-7-AR1/E47 buněk transfektovaných androgenním receptorem na aplikaci androgenů. Buňky byly nasety do jamek 96 jamkových destiček (3000 b/jamka) v DMEM s 5% FBS. Po 24 hod. kultivace bylo médium nahrazeno médiem DMEM bez fenolové červeně a s 10% DCCFBS. Po 24 hod. prekulivaci v médiu bez estrogenů, androgenů a jiných steroidních hormonů bylo médium nahrazeno stejným médiem obsahujícím 17β -estradiol (E_2 ; 100 pM), a různé koncentrace methyltestosteronu (MT), dihydrotestosteronu (DHT), testosteronu (T), metyltrienolonu (R1881) a androstendionu (AD). Na ose y je procenticky vyjádřena proliferace buněk v přítomnosti různých koncentrací androgenů (osa x) ve vztahu k samotnému 17β -estradiolu (100%)

Obr. 9. demonstruje detekci antiandrogenních aktivit bicalutamidu v přítomnosti 17β -estradiolu (100 pmol.l^{-1}) a DHT (1 nmol.l^{-1}). DHT sníží estradiolem stimulovanou proliferaci buněk o cca 70%. Casodex tuto inhibici téměř anuloval při koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obr.9. Proliferační odpověď MCF-7-AR1/E47 buněk na antiandrogen Casodex (bicalutamid)
 Buňky byly nasety a kultivovány podobně jak je uvedeno v legendě k obr.8. Kultivační médium obsahovalo 17 β -estradiol (E₂; 100 pmol.l⁻¹), dihydrotestosteron (DHT; 1 nmol.l⁻¹) a různé koncentrace casodexu (Cas;osa x)

7. ZÁVĚR

V této práci byly shrnuty možnosti, jakými můžeme stanovovat aktivitu androgenů a antiandrogenů. Stanovení androgenních aktivit *in vivo* ubývá a používají se spíše studie *in vitro*. *In vivo* studie ovšem umožňují zkoumání látek v komplexním systému. Studie *in vitro* umožňují vysokou kapacitu testovaných vzorků. U proliferačního stanovení je nevýhodou nesnadnost kontroly doprovodných toxických efektů na buňku. U stanovení pomocí reporterového genu je důležitý vybraný promotor, buněčné prostředí a exprese endogenních receptorů. Stanovení pomocí vazby na receptor nerozlišuje mezi agonisty a antagonisty.

V klinické praxi se hladiny androgenů měří téměř vždy imunostanoveními. Tato stanovení jsou založena na schopnosti protilátky rozpoznat specifickou chemickou strukturu steroidních molekul. Ovšem je tu několik případů, kdy jsou stanovení *in vitro* také používána v klinické praxi. Používají se, pokud jsou hladiny androgenů u mužů nízké, nebo k měření hladin androgenů u žen a dětí, kde jsou přirozeně nízké. Zatím ovšem detekční systémy *in vitro* nejsou připraveny pro rutinní práci v laboratorní diagnostice a používají se hlavně na zjišťování androgenních a antiandrogenních látek z prostředí.

Přehled použité literatury

Ankley G.T., Mihaich E., Stahl R., Tillit D., Colborn T., McMaster S., Miller R., Bantle J., Campbell P., Denslow N., Dickerson R., Folmar L., Fry M., Giesy J., Gray L.E., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy S., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Peterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L., Van der Kraak G., Zacharewski T.: Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti)-estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 68-87, 1998

Arnold S.F., Robinson M.K., Notides A.C., Guillette L.J., McLachlan J.A.: A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 104, 544-548, 1996

Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S.: Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estradiol, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and insulin-like growth factor-1 and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 128, 2045-2052, 1991

Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S.: Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Molecular Endocrinology* 7, 743-752, 1993

Baarends W.M., Themmen A.P., Blok L.J., Mackenbach P., Brinkmann A.O., Meijer D., Faber P.W., Trapman J., Grootegoed J.A.: The rat androgen receptor gene promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology* 74, 75-84, 1990

Bentel J.M., Tilley W.D.: Androgen receptors in prostate cancer. *Journal of Endocrinology* 151, 1-11, 1996

Bevan C.L., Hoare S., Claessens F., Heery D.M., Parker M.G.: The AF-1 and AF-2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Molecular and Cellular Biology* 19, 8383-8392, 1999

Blok L.J., Hoogerbrugge J.W., Themmen A.P., Baarends W.M., Post M., Grootegoed J.A.: Transient down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in Sertoli cells by follicle-stimulating hormone is followed by up-regulation of androgen receptor mRNA and protein. *Endocrinology* 131, 1343-1349, 1992

Burd C.J., Morey L.M., Knudsen K.E.: Androgen receptor corepressors and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13, 979-994, 2006

Chamberlain N.L., Driver Ed., Miesfeld R.L.: The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain effect transactivation function. *Nucleic Acids Research* 22, 3181-3186, 1994

Chen J.D., Evans R.M.: A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457, 1995

- Cho H., Aronica S.M., Katzenellenbogen B.S.:** Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells: a comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insulin-like growth factor-1 and serum factors. *Endocrinology* 134, 658-664, 1993
- Colborn T., Saal F.S.V., Soto A.M.:** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378-384, 1993
- Culig, Z.:** Androgen receptor cross-talk with cell signalling pathways. *Growth Factors* 22, 179-184, 2004
- De Boever P., Demare W., Vanderperren E., Cooreman K., Bossier P., Verstraete W.:** Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from soygerm powder. *Environmental Health Perspectives* 109, 691-697, 2001
- El Tadani M.K.K., Green C.D.:** Interaction between estradiol and cAMP in the regulation of specific gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 124, 71-77, 1996
- Evans R.M.:** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895, 1988
- Fang, H., Tong, W., Branham W.S., Moland, C.L., Dial, S.L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W., Sheenan, D.M.:** Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology* 16: 1338-1358, 2003
- Fertuck K.C.:** Complementary in vitro and in vivo rodent assays. *Environmental Protection Agency Endocrine Disruptors Workshop, Screening and Testing Assays Symposium*, 2002
- Ganong W.F.:** Přehled lékařské fyziologie, H&H, 1995
- Gottlieb B., Beitel L.E., Trifiro M.A.:** Variable expressivity and mutation databases: the androgen receptor gene mutations database. *Human Mutation* 17, 382-388, 2001
- Gray L.E.J., Ostby J., Wilson V., Lambright C., Bobseine K., Hartig P., Hotchkiss A., Wolf C., Furr J., Price M., Parks L., Cooper R.L., Stoker T.E., Laws S.C., Degitz S.J., Jensen K.M., Kahl M.D., Korte J.J., Makynen E.A., Tietge J.E., Ankley G.T.:** Xenoendocrine disruptors-tiered screening and testing. *Toxicology* 27, 371-382, 2002
- Greenspan F.S., Gordon J.S.:** Introduction to endocrinology. In Reinhardt S., Langan S.: *Basic and Clinical Endocrinology*. Appleton and Lange, Stamford, 1-38, 1997
- Grossmann M.E., Lindzey J., Blok L., Perry J.E., Kumar M.V., Tindall D.J.:** The mouse androgen receptor gene contains a second functional promoter which is regulated by dihydrotestosterone. *Biochemistry* 33, 14594-14600, 1994
- Hard T., Kellenbach E., Boelens R., Maler B.A., Dahlman K., Freedman L.P., Carlstedtduke J., Yamamoto K.R., Gustafsson J.A., Kaptein R.:** Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160, 1990

He B., Kempainen J.A., Voegel J.J., Gronemeyer H., Wilson E.M.: Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH₂-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37219-37225, 1999

Hershberger L., Shipley E., Meyer R.: Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 83, 175-180, 1953

Hoogenboom L.A.P., DeHaan L., Hooijerink D., Bor G., Murk A.J., Brouwer A.: Estrogenic activity of estradiol and its metabolites in the ER-CALUX assay with human T47D breast cells. *APMIS* 109, 101-107, 2001

Horlein A.J., Naar A.M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K., Rosenfeld M.G.: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 77, 397-404, 1995

Hughes I.A.: Minireview: Sex differentiation. *Endocrinology* 142, 3281-3287, 2001

Ikonen T., Palvimo J.J., Jänne O.A.: Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29821-29828, 1997

Jenster G., van der Korput H.A.G.M., Trapman J., Brinkman A.O.: Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chem* 270, 7341-7346, 1995

Kontula K.K., Seppanen P.J., van Duyne P., Bardin C.W., Janne O.A.: Effect of the non-steroidal antiandrogen, flutamide, on androgen receptor dynamics and ornithine decarboxylase gene expression in mouse kidney. *Endocrinology* 116, 226-233, 1985

Körner W., Vinggaard, A.M., Térouanne B., Ma, R., Wieloch, C., Schlumpf, M., Sultan, Ch., Soto, A.M.: Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 112: 695-702, 2004

La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K.H.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77-79, 1991

Lambright C., Ostby J., Bobseine K., Wilson V., Hotchkiss A.K., Mann P.C., Gray L.E.J.: Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicological Sciences* 56, 389-399, 2000

Laudet V., Gronemeyer H.: *The nuclear receptors factbooks*, Academic, San Diego, 2001

Lee Y.-F., Shyr C.R., Thin T.H., Lin W.J., Chang C.: Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: a

unique signalling pathway in the steroid receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 14724-14729, 1999

Lin H.-K., Yeh S., Kang H.-Y., Chang C.: Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 7200-7205, 2001

Lindzey J., Grossmann M., Kumar M.V., Tindall D.J.: Regulation of the 5'-flanking region of the mouse androgen receptor gene by cAMP and androgen. *Molecular Endocrinology* 7, 1530-1540, 1993

Mainwaring W.I.P., Freeman S.N., Harper B.: Pharmacology of antiandrogens In: *Pharmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action*. B.J.A. Furr and A.E. Wakeling (eds), Baillière Tindal, London 1987, 106-122

Markey C.M., Rubin B.S., Soto A.M., Sonnenschein C.: Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 235-244, 2003

Matias P.M., Donner P., Coelho R., Thomaz M., Peixoto C., Macedo S., Otto N., Joschko S., Scholz P., Weqq A., Basler S., Schafer M., Eqner U., Carrondo M.A.: Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor: Implications for pathogenic gene mutations. *Journal of Biological Chemistry* 275, 26164-26171, 2000

McKenna N.J., Lanz R.B., O'Malley B.W.: Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20, 321-344, 1999

Morley P., Whitfield J.F., Vanderhyden B.C., Tsang B.K., Schwartz J.L.: A new nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131, 1305-1312, 1992

Murdoch F.E., Meier D.A., Furlow J.D., Grunwald K., Gorski J.: Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent on estradiol. *Biochemistry* 29, 8377-8385, 1990

O'Connor J.C., Cook J.C., Marty M.S., Davis L.G., Kaplan A.M., Carney E.W.: Evaluation of Tier I screening approaches for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Critical Reviews in Toxicology* 32, 521-549, 2002

Panet-Raymand V., Gottlieb B., Beitel L.K., Pinsky L., Trifiro M.A.: Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transcriptional activities. *Molecular and Cellular Endocrinology* 167, 139-150, 2000

Quarmby V.E., Yarbrough W.G., Lubahn D.B., French F.S., Wilson E.M.: Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology* 4, 22-28, 1990

- Quigley C.A., De Bellis A., Marschke K.B., El-Awady M.K., Wilson E.M., French M.S.:** Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* 16, 271-321, 1995
- Revelli A., Massobrio M., Tesarik J.:** Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Reviews* 19, 3-17, 1998
- Routledge E.J., Sumpter J.P.:** Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 241-248, 1996
- Roy, P., Alevizaki, M., Huhtaniemi, I.:** In vitro bioassays for androgens and their diagnostic applications. *Human reproduction update* 14, 73-82, 2008
- Sack J.S., Kish K.F., Wang C., Attar R.M., Kiefer S.E., An Y., Wu G.Y., Scheffler J.E., Salvati M.E., Krystek S.R.jr., Weinmann R., Einspahr H.M.:** Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 4904-4909, 2001
- Schwabe J.W., Chapman L., Finch J.T., Rhodes D.:** The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567-578, 1993
- Sengupta, N., Seto, E.:** Regulation of histone deacetylase activities. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 57-67, 2004
- Sheffield L.G., Welsch C.W.:** Cholera-toxin-enhanced growth of human breast cancer cell lines in vitro and in vivo: interaction with estrogen. *International Journal of Cancer* 36, 479-483, 1985
- Silberstein G.B., Strickland P., Trumpbour V., Coleman S., Danile C.W.:** In vivo, cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81, 4950-4954, 1984
- Simental J.A., Sar M., Lane M.V., French F.S., Wilson E.M.:** Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266, 510-518, 1991
- Simon S., Mueller S.O.:** Human reporter gene assays: Transcriptional activity of the androgen receptor is modulated by the cellular environment and promoter context. *Toxicology* 220, 90-103, 2006
- Singh M.S., Gauthier S., Labrie F.:** Androgen receptor antagonists (antiandrogens): Structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry* 7, 211-247, 2000
- Song C.S., Her S., Slomczynska M., Choi S.J., Jung M.H., Roy A.K., Chatterjee B.:** A distal activation domain is critical in the regulation of the rat androgen receptor gene promoter. *Biochemical Journal* 294, 779-784, 1993

Soto A.M., Maffini M.V., Schaeberle Ch.M., Sonnenschein C.: Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20, 15-33, 2006

Sultan Ch., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris F., Jeandel C., Lumbroso S., Nicolas J.: Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 178, 99-105, 2001

Sumida C., Pasqualini J.R.: Stimulation of progesterone receptors by phorbol ester and cyclic AMP in fetal uterine cells in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 69, 207-215, 1990

Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A.M., Luizzi, M.F., Sonnenschein, C.: Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138: 1406-1412, 1997

Tan J.A., Joseph D.R., Quarmby V.E., Lubahn D.B., Sar M., French F.S., Wilson E.M.: The rat androgen receptor: Primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. *Molecular Endocrinology* 2, 1276-1285, 1988

Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P.: The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487, 1989

Tyagi R.K., Amazit L., Lescop P., Milgrom E., Guiochon-Mantel A.: Mechanism of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and Ran guanosine triphosphate. *Molecular Endocrinology* 12, 1684-1695, 1998

Tilley W.D., Marcelli M., Wilson J.D., McPhaul M.J.: Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 327-331, 1989

Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper G.G.J.M., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C.J., Trapman J., Brinkmann, A.O., Mulder E.: A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human INCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173, 534-540, 1990

vom Saal F.S., Timms B.G., Montano M.M., Palanza P., Thayer K.A., Nagel S.C., Dhar M.D., Ganjam V.K., Parmigiani S., Welshons W.V.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 2056-2061, 1997

White R., Parker M.G.: Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer* 5, 1-14, 1998

Wong C., Kelce W.R., Sar M., Wilson E.M.: Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *Journal of Biological Chemistry* 25, 19998-20003, 1995

Yoon H., Chan D.W., Huang Z., Li J., Fondell J.D., Qin J., Wong J.: Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *The EMBO Journal* 22, 1336-1346, 2003

Zhou, Z., Sar, M., Simental, J.A., Lane M.V., Wilson, E.M. (1994): A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *Journal of Biological Chemistry* 269, 13115-13123, 1994