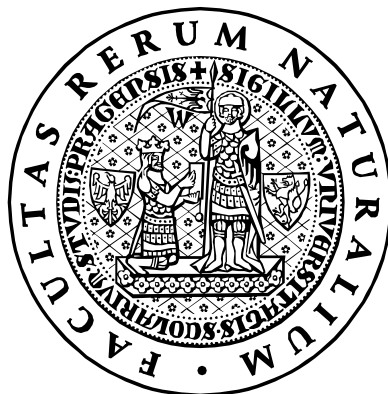


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Mgr. Helena Líbalová

Využití transkriptomiky při studiu mechanismu působení komplexních směsí organických látek ve vnějším ovzduší se zaměřením na polycyklické aromatické uhlovodíky.

Use of transcriptomics to study mechanism of the action of complex mixtures of organic compounds occurring in the ambient air focusing on polycyclic aromatic hydrocarbons.

Dizertační práce

Školitel: Ing. Jan Topinka, DrSc.

Praha 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Mgr. Helena Líbalová

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prohlašuji, že Mgr. Helena Líbalová rozhodujícím způsobem (30-90 %) přispěla ke vzniku všech 3 článků, které jsou součástí této dizertační práce. Sama prováděla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....

Ing. Jan Topinka, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Janu Topinkovi, DrSc. za mimořádnou pomoc při vypracování této práce, odborné vedení, možnost zpracování zajímavého tématu a obětavý přístup.

Dále děkuji MUDr. Radimu J. Šrámovi, DrSc. za vynikající podporu v odborných záležitostech a poskytnutí výborných pracovních podmínek, Katce Uhlířové za přínosnou spolupráci a cenné rady a také všem ostatním kolegům z Oddělení genetické ekotoxikologie za ochotu, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji RNDr. Miroslavu Machalovi, CSc. za obrovský přínos k této práci.

Velký dík patří též celé mojí rodině, která mě v této práci vždy velmi podporovala a všem přátelům, kteří mi důvěřovali.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (310/07/0961) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (2B08005).

Abstrakt

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) tvoří rozsáhlou skupinu organických sloučenin vyskytujících se jako polutanty ve vnějším ovzduší. Kromě genotoxických účinků působí některé z nich jako kompletní karcinogeny, tzn. mají také negenotoxické a nádorově promoční vlastnosti. Ačkoli jsou účinky mnoha individuálních PAU dobře popsány, k expozici člověka ve vnějším prostředí dochází především působením komplexních směsí obsahujících PAU a pouze několik málo prací se věnuje problematice působení těchto reálných komplexních směsí.

První část dizertační práce se zabývá změnami globální genové exprese v lidských embryonálních plicních fibroblastech po působení komplexních směsí obsahujících PAU extrahovaných z respirabilních prachových částic PM_{2.5} v ovzduší. Částice byly odebrány ve 4 lokalitách České republiky (Ostrava – Bartovice, Ostrava – Poruba, Karviná a Třeboň), které se liší mírou i zdroji znečištění ovzduší. Pro stanovení změn genové exprese jsme analyzovali buňky inkubované 24h se 3 subtoxickými koncentracemi organických extraktů částic z ovzduší (EOM) z každé lokality pomocí čipové technologie. Pro hlubší interpretaci dat jsme použili analýzu signálních drah s využitím databáze Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). V každé lokalitě jsme identifikovali deregulované signální dráhy a geny s největšími příspěvky. Většina deregulovaných drah byla ovlivňována v závislosti na aktivaci arylhydrokarbonového receptoru (AhR). Největší změnu ve všech 4 lokalitách měla dráha Metabolismus xenobiotik cytochromy P450 a gen CYP1B1, který nejvíce přispíval k deregulaci dráhy. Analýza genové exprese prokázala, že ačkoli se jednotlivé lokality liší původem znečištění ovzduší, biologické účinky organických extraktů se kvalitativně významně neliší.

Druhá část dizertační práce se zaměřuje na modulační účinky PAU na vznik a průběh specifického nádorového onemocnění prostaty. Linie androgen-senzitivních nádorových buněk prostaty (LNCaP) byla použita pro objasnění mechanismu přežívání buněk s poškozenou DNA a pro vysvětlení dalších mechanismů vedoucích k nádorové promoci a progresi. Po inkubaci se silnými mutageny benzo[a]pyrenem (B[a]P) a dibenzo[a,l]pyrenem (DB[a,l]P) jsme pozorovali indukci cytochromů P450, které se účastní metabolické aktivity PAU. Navzdory tvorbě velkého množství DNA aduktů v buňkách LNCaP, nebyla indukována apoptóza, zástava buněčného cyklu, dvouřetězcové zlomy ani reparace DNA. Akumulace poškození DNA a neschopnost aktivace buněčné odpovědi u těchto buněk může vést až k rozvoji agresivního typu nádoru. Pro studium globálních změn v genové expresi buněk LNCaP jsme využili čipovou analýzu genové exprese a porovnali jsme expresní profily LNCaP inkubovaných s B[a]P a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD), negenotoxickým aktivátorem AhR. Z výsledků porovnání vyplývá, že existuje velký překryv stejných deregulovaných genů. Více než 64% signifikantně up-regulovaných a 47% signifikantně down-regulovaných genů bylo společných po inkubaci buněk s B[a]P i TCDD. Analýza signálních drah ukazuje na snížení exprese genů souvisejících s regulací a progresí buněčného cyklu. Tyto procesy pravděpodobně souvisí s negenotoxickými účinky B[a]P a významným působením aktivovaného AhR.

Tato dizertační práce ukazuje možnosti využití transkriptomiky v různých mechanistických toxikologických studiích. Čipová analýza umožňuje zkoumat nejen působení komplexních směsí a jejich rozmanité účinky, ale také odhalit detailní mechanismus působení individuální sloučeniny, např. v konkrétním nádorovém onemocnění a vysvětlit klíčovou roli aktivace AhR při působení PAU.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represent a large group of organic compounds occurring as pollutants in ambient air. Besides their genotoxic effect, some of them are known to be complete carcinogens and act via nongenotoxic and tumor promoting mechanism. Although effects of many individual compounds are well-documented, human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air occurs through complex mixtures and only few studies describe the behavior of PAH in real complex mixtures.

The first part of the thesis is dealing with the global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts (HEL) as a consequence of the effect of complex mixtures containing PAH extracted from the respirable airborne particles PM_{2.5}. These particles were collected in 4 localities in the Czech republic (Ostrava – Bartovice, Ostrava – Poruba, Karviná, Třeboň) differing in the level of the air pollution. Gene expression changes induced by three subtoxic concentrations of organic extracts (EOM – extractable organic matter) from each locality after 24 hour incubation were examined by microarray analysis. Pathway analysis using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database was applied to interpret gene expression data. In each locality we identified several deregulated signaling pathways and most contributing genes. Most of deregulated pathways were dependent on activation of the arylhydrocarbon receptor (AhR). Among others, strongest deregulation by EOMs from all 4 localities exhibited AhR-dependent Metabolism of xenobiotics by cytochromes P450 and CYP1B1 as a gene with the most pronounced contribution to the pathway deregulation. The transcriptomic data did not differ substantially among the localities, suggesting that the air pollution originating mainly from various sources may have similar biological effect.

The second part of the thesis is focused on the effect of PAH on the specific cancer disease – prostate cancer. We used prostatic androgen-sensitive cancer cells (LNCaP) to investigate the mechanism of their survival with damaged DNA and further events leading to tumor promotion and progression. After the treatment of cells by strong mutagenes, benzo[a]pyrene (B[a]P) and dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P), induction of cytochromes P450 was observed indicating the metabolic activation of PAH. Despite a significant amount of DNA adducts, neither apoptosis, cell-cycle arrest, double-strand breaks nor DNA repair were induced. The accumulation of DNA damage and the inability to activate DNA damage response may lead to the development of the aggressive cancer phenotype. To explore global changes in gene expression in LNCaP cells, microarray analysis was applied. We compared gene expression profiles of cells treated with B[a]P and nongenotoxic AhR activator 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Results of the comparison showed significant overlap of deregulated genes. Over the 64% of significantly up-regulated and 47% of significantly down-regulated genes were similarly affected by both B[a]P and TCDD. Pathway analysis indicated suppressed expression of genes associated with the regulation and progression of the cell cycle suggesting a key role of activated AhR in nongenotoxic effect of B[a]P in the LNCaP cell line.

This thesis demonstrates that various applications of transcriptomics in the toxicology may be useful for numerous mechanistic studies. Microarray analysis helps understand effects of complex mixtures containing many PAH as well as the detailed mechanism of action of individual compounds, for example in specific cancer disease and explain a prominent role of AhR activation by PAH.

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1 ÚVOD	14
1.1 Vzdušné polutanty	14
1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	15
1.2.1 Expozice člověka.....	16
1.2.2 Jednoduché a komplexní směsi.....	17
1.2.3 Toxické účinky PAU.....	18
1.2.4 Metabolická aktivace a genotoxické účinky PAU	21
1.2.4.1 Tvorba dihydrodiolepoxidů	21
1.2.4.2 Tvorba o-chinonů a ROS.....	23
1.2.4.3 Tvorba kationtových radikálů	25
1.2.4.4 Detoxikace	25
1.3 Mechanismus karcinogeneze	26
1.3.1 Odpověď buňky na genotoxické účinky PAU	28
1.3.2 Odpověď buňky na negenotoxické účinky PAU	29
1.3.3 Aktivace AhR.....	30
1.3.4 Cílové geny a procesy AhR.....	32
1.3.5 Nádorové onemocnění prostaty	33
1.4 Genová exprese v toxikologii komplexních směsí	34
2 CÍLE PRÁCE	36
3 PŘEHLED METOD	37
3.1 Odběr prachových částic z ovzduší a organická extrakce	37
3.2 Frakcionace organických extraktů	37
3.3 Separace pomocí HPLC/DAD, LC/MS-MS a GC/MS	38
3.4 Kultivace buněčných linií	38
3.4.1 Lidské embryonální plicní fibroblasty (HEL)	38
3.4.2 Lidské prostatické nádorové buněčné linie.....	39
3.5 Izolace RNA a kontrola kvality	39
3.6 Analýza genové exprese na celogenomových čípech Illumina	39
3.7 Verifikace čipové analýzy pomocí qPCR	40

3.8 Statistická analýza.....	40
3.9 Analýza DNA aduktů metodou ³² P-postlabeling.....	41
3.10 Western blotting a imunodetekce	42
3.11 Detekce apoptózy	42
3.12 Hodnocení buněčného cyklu a proliferace	43
4 VÝSLEDKY.....	44
4.1 Globální změny v genové expresi indukované organickými extrakty prachových částic z ovzduší v lidských embryonálních plicních fibroblastech	44
4.2 Neschopnost genotoxických polycyklických aromatických uhlovodíků indukovat p53 dependentní odpověď na poškození DNA, apoptózu a zástavu buněčného cyklu v lidských prostatických nádorových buňkách LNCaP.....	45
4.3 Změny v genové expresi v lidských prostatických nádorových buňkách inkubovaných s genotoxickými a negenotoxickými ligandy aryl hydrokarbonového receptoru	46
5 DISKUZE	48
5.1 Studium globálních změn v genové expresi po působení organických extraktů respirabilních prachových částic v lidských plicních embryonálních fibroblastech ...	48
5.2 Studium expozice PAU na vývoj nádorového onemocnění prostaty.....	51
6 ZÁVĚR.....	57
7 POUŽITÁ LITERATURA	59
PŘÍLOHY	69

Seznam použitých zkratek

14-3-3 σ	Regulatory proteins	Regulační proteiny, název odvozen od migračního vzorce (Moore a Perez,1967)
ABC	ATP-binding cassette transporters	Transportní proteiny rodiny ABC
AhR	Arylhydrocarbon receptor	Arylhydrokarbonový receptor
AhRR	Arylhydrocarbon receptor repressor	Represor arylhydrokarbonového receptoru
AKR	Aldoketoreductases	Rodina aldoketoreduktáz
AKR1A1	Aldoketoreductase 1 family, member A1	Aldoketoreduktáza 1A1
AKR1C1	Aldoketoreductase 1 family, member C1	Aldoketoreduktáza 1C1
AKR1C4	Aldoketoreductase 1 family, member C4	Aldoketoreduktáza 1C4
ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	Aldehydehydrogenáza 3A1
AP-1	Activator protein 1	Aktivační protein 1, transkripční faktor
AR	Androgen receptor	Androgenní receptor
ARE	Antioxidant response element	Vazebné místo pro antioxidanty
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	Jaderný přenašeč AhR
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein kinase	Proteinkináza, jejíž mutace způsobuje onemocnění Ataxia telangiectasia
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	Proteinkináza spolupracující s ATM
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry	Agentura pro toxické látky a registr nemocí
B2M	β 2 microglobulin	β 2 mikroglobulin
B[a]P	Benzo[a]pyrene	Benzo[a]pyren
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer	Antagonistický homolog Bcl-2
Bax	Bcl-2-associated X protein	Protein X asociovaný s Bcl 2
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2	Anti-apoptotický protein odvozený od lymfomu B buněk
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	Anti-apoptotický protein odvozený od lymfomu B buněk
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large	Anti-apoptotický protein rodiny Bcl-2
bHLH/PAS	Basic-helix-loop-helix/ Per-Arnt-Sim	Základ helix-smýčka-helix/Per-Arnt-Sim
Bid	BH3 interacting domain death agonist	Pro-apoptotický protein s BH3 doménou
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	Kostní morfogenetický protein 2
BPDE	(+/-)-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide	(+/-)-benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosin monofosfát
CCND2	Cyclin D2	Cyklin D2
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	Cyklin-dependenční kináza 2
CHK1/2	Checkpoint kinase 1/2	Kináza kontrolního bodu 1 a 2
COX-2	Cyclooxygenase 2	Cyklooxygenáza 2
Ct	Cross threshold value	Počet PCR cyklů při kterém fluorescence vzorku překročí prahovou hodnotu
Cy3	Cyanine fluorescent dye	Cyaninová fluorescenční barva
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1	Cytochrom P450 1A1

CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	Cytochrom P450 1A2
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1	Cytochrom P450 1B1
CYP450	Cytochrome P450	Rodina cytochromů P450
DB[a,l]P	Dibenzo[a,l]pyrene	Dibenzo[a,l]pyren
DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2	Malá podjednotka reparačního proteinu, který se váže na poškozenou DNA
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DRE/XRE	Dioxin responsive elements/Xenobiotic responsive elements	Vazebné místo pro dioxin/vazebné místo pro xenobiotika
DU-145	Prostate cancer cell line	Nádorové buňky prostaty
E-MEM	Eagle's Minimum Essential Medium	Buněčné kultivační medium
E2F1	E2F transcription factor 1	Transkripční faktor regulující buněčný cyklus
EC SCF	European Commission Scientific Committees for Food	Vědecký výbor pro potraviny Evropské unie
EFSA	European Food Safety Authority	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EH	Epoxidhydrolase	Epoxidhydroláza
EOM	Extractable organic matter	Extrahovatelná organická hmota
ER	Estrogen Receptor	Estrogenní receptor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases	Kinázy regulované mimobuněčným signálem (dráha MAPK)
EXO1	Exonuclease 1	Exonukleáza 1
F-12	Cell culture medium	Buněčné kultivační medium
Fas	TNF receptor superfamily, member 6	Transmembránový receptor buněčné smrti ze skupiny TNF receptorů
FBS	Fetal bovine serum	Fetální hovězí sérum
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1	Reparační enzym, odstraňuje 5' přesahující konce DNA
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Regulátor buněčné proliferace, diferenciace a transformace, tvoří dimer s JUN
FOXQ1	Forkhead box Q1	Protein rodiny FOX, podílí se na regulaci buněčného cyklu, signalizaci a tumorogenezi
GADD45	Growth arrest and DNA damage proteins	Proteiny podílející se na odpovědi na genotoxický či fyziologický stres
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza
GJIC	Gap junction intercellular communication	Mezibuněčná komunikace zprostředkovaná mezerovými spoji
GPX3	Glutathione peroxidase 3	Glutathion peroxidáza 3
GSH	Glutathion	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase	Glutathion-S-transferáza
H2AX	H2A histone family, member X	Člen proteinové rodiny histonů H2A
HEL 12469	Human embryonic lung fibroblasts	Lidské embryonální plicní fibroblasty
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell line	Lidská jaterní nádorová linie

HPLC/DAD	High performance liquid chromatography with diode array detectors	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
HSP90	Heat shock protein 90	Protein teplotního šoku o velikosti 90 kDa, chaperon
IARC	International Agency for Research on Cancer	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IL-1 β	Interleukin 1- β	Interleukin 1- β
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminální kináza
JUN	Jun proto-oncogene	Regulátor buněčné proliferace, diferenciaci a transformace, tvoří dimer s FOS
LC/MS-MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LNCaP	Androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells	Nádorové androgen-senzitivní buňky prostaty
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Proteinkinázy aktivované mitogenem, regulují buněčný vývoj, proliferaci a diferenciaci
MCF-7	Breast cancer cell line (Michigan Cancer Foundation – 7)	Buněčná linie odvozená od nádoru prsu
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	Anti-apoptotický protein rodiny Bcl-2
mEH	Microsomal epoxidhydrolase	Mikrosomální epoxidhydroláza
MFO	Mixed function oxidases	Oxidázy se smíšenou funkcí
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NaF	Sodium fluoride	Fluorid sodný, inhibitor fosfoserinových a fosfothreoninových proteáz
NE	Neuroendocrine cells	Neuroendokrinní buňky
NES	Nuclear export signal	Jaderný exportní signál
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B	Jaderný faktor κ B, transkripční faktor
NKD2	Naked cuticle homolog 2	Negativní regulační protein Wnt signální dráhy
NLS	Nuclear localization signal	Jaderný lokalizační signál
NOXA	Pro-apoptotic protein (noxa = damage in latin)	Pro-apoptotický protein z rodiny Bcl-2
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	Jaderný transkripční faktor, váže se na geny s ARE sekvencí v promotoru
p21 ^{CIP1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Inhibitor cyklin E-CDK2 a cyklin D-CDK4 komplexů
p27 ^{KIP1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Inhibitor cyklin E-CDK2 a cyklin D-CDK4 komplexů
p38	Mitogen-activated protein kinase 14	Protein rodiny MAP kináz

p53	Tumor protein p53	Protein regulující buněčný cyklus v odpovědi na poškození DNA
p53AIP	53-regulated apoptosis-inducing protein 1	Protein, který zprostředkovává apoptózu, jeho indukce je závislá na p53
p73	Tumor protein p73	Protein rodiny p53, transkripční faktor regulující buněčný cyklus
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PC-3	Prostate cancer cell line	Nádorové buňky prostaty
PCA	Principal component analysis	Analýza hlavních komponent
PCB	Polychlorinated biphenyls	Polychlorované bifenyly
PCDD	Polychlorinated dibenzo-p-dioxins	Polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDF	Polychlorinated dibenzofurans	Polychlorované dibenzofurany
PEF	Potency Equivalency Factor	Faktor potenciální ekvivalence
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Katalytická podjednotka fosfatidylinositol 3-kinázy
PIDD	p53-induced death domain protein	Adaptorový protein signálních procesů vedoucích k buněčné smrti
PKC	Proteinkinase C	Proteinkináza C
PM _{2.5}	Particulate Matter (size < 2.5 μm)	Prachové částice o velikosti < 2.5 μm
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid	Fenylmethylsulfonyl fluorid, inhibitor serinových proteáz
POR	NADPH-dependent cytochrome P450 reductase	NADPH dependentní cytochrom P450 reduktáza
pRb	Retinoblastoma 1	Protein odvozený od retinoblastomu, negativní regulátor buněčného cyklu
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	Fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát 3-fosfatáza
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis	Pro-apoptotický protein rodiny Bcl-2
PVDF	Polyvinylidene difluoride membrane	Polyvinyliden difluoridová membrána
qPCR	Quantitative Polymerase chain reaction	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RPMI 1640	Cell culture medium (Roswell Park Memorial institute)	Buněčné kultivační medium
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	Komplex sukcinát dehydrogenázy, podjednotka A
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Dodecyl síran sodný
SMAD3	SMAD family member 3	Transkripční modulátor TGF-β, jméno odvozeno od genu Mad (Drosophila) a genu Sma (C.elegans)
SRM1469a	Standard reference material of urban dust	Standardní referenční materiál městského prachu
SULT	Sulfotransferase	Sulfotransferáza
TBXAS1	Thromboxane A synthase 1	Thromboxan A syntáza 1

TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEF	Toxic equivalency factor	Faktor toxické ekvivalence
TGF- β	Transforming growth factor, beta	Rodina cytokinů regulujících dělení buňky
TNF	Tumor necrosis factor	Rodina cytokinů regulujících zejména buněčnou smrt
TNF α	Tumor necrosis factor α	Cytokin, reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a smrt nádorových buněk
TRAIL	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Cytokin, způsobuje především apoptózu nádorových buněk
Tris	Trizma base	Trizma báze
UGT	UDP-glucuronyltransferase	UDP-glukuronyltransferáza
UV	Ultra-violet radiation	Ultrafialové záření
WB-F344	Normal liver epithelial cell line from rat	Jaterní epiteliální buňky potkana
WNT	Wingless/Int-1	Skupina glykoproteinů regulující buněčný vývoj a karcinogenezi, název odvozený od hybridního proteinu Wingless/Int-1
WNT2	Wingless-type MMTV integration site family, member 2	Člen Wnt signální dráhy
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Člen Wnt signální dráhy
XAP2	Immunophilin-like hepatitis B virus Xassociated protein	Součást komplexu vázaného s AhR
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Protein zahrnutý v nukleotidové excisní reparaci

1 ÚVOD

Znečištěné ovzduší představuje v České republice i celosvětově závažný problém. Epidemiologické studie již několik desetiletí prokazují, že expozice vzdušným polutantům, které jsou emitovány do atmosféry, má krátkodobý i dlouhodobý vliv na zdraví lidí. S rostoucí mírou znečištění ovzduší se stává prioritní výzkum zaměřující se nejen na původ a složení vzdušných polutantů, ale také na jejich účinek na lidské zdraví. Studium toxických účinků ovzduší zaznamenalo v nedávné době velký pokrok díky novým přístupům zohledňujícím komplexní působení směsi polutantů a díky moderním technologiím kombinujícím toxikologické a molekulárně biologické metody.

1.1 VZDUŠNÉ POLUTANTY

Kontaminanty uvolňující se do ovzduší tvoří komplexní směs skládající se ze stovek různých anorganických a organických látek. Mezi ně patří např. oxid uhelnatý (CO), oxid siřičitý (SO₂), oxidy dusíku, těkavé organické sloučeniny, ozon (O₃), perzistentní organické polutanty, jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany (PCDD, PCDF), polychlorované bifenyly (PCB), dále těžké kovy a respirabilní malé částice (Han and Naeher, 2006). Hlavními zdroji tohoto znečištění je spalování fosilních paliv využívané zejména pro výrobu energie a dopravu, část polutantů však vzniká i z přírodních zdrojů, jako jsou požáry a vulkány (Kampa and Castanas, 2008).

Aerosolové částice jsou kapalné nebo tuhé částice rozptýlené v ovzduší a v současné době se řadí mezi hlavní problémy kvality ovzduší. Jsou významným rizikovým faktorem s mnohočetným vlivem na lidské zdraví. Velikost a složení částic jsou ovlivněny zdrojem, ze kterého částice pochází, distribuce v ovzduší pak závisí na lokalitě a meteorologických podmínkách (Poschl, 2005). Prachové částice vždy tvoří směs látek s různými účinky, které závisí na jejich velikosti, tvaru a chemickém složení. Zdravotní riziko představují sloučeniny, které jsou adsorbovány na povrchu prachových částic (těžké kovy, organické sloučeniny, materiál biologického původu, ionty, reaktivní plyny aj.) i samotné uhlíkové jádro. Prachové částice jsou emitovány spalovacími procesy ve stacionárních zdrojích (průmysl, pohonné hmoty a biopaliva, spalovny odpadů aj.), ale také přírodními zdroji. Podle velikosti se částice dělí na hrubé (> 1 μm), jemné (< 1 μm) a ultrajemné (< 0.1 μm; Kampa and Castanas, 2008).

Velikost částic je rozhodující pro průnik a ukládání v dýchacím traktu. Větší částice jsou zachyceny v horních partiích dýchacího ústrojí, odkud jsou částečně vykašlány a částečně spolknuty. S ohledem na zdravotní rizika jsou však důležitější malé částice do velikosti 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$). Tyto částice jsou významné vzhledem ke své malé velikosti a schopnosti průniku do lidského organismu respirační cestou do dolních cest dýchacích. Z hlediska retence (ukládání částic aerosolu v plicích) jsou částice menší než 2.5 μm nejnebezpečnější, protože pronikají průduškami až do plicních sklípků (Sugita et al., 2004).

Vysoké koncentrace $\text{PM}_{2.5}$ mohou mít negativní akutní i chronický vliv na lidské zdraví. V posledních desetiletích je prokazován vliv prachových částic $\text{PM}_{2.5}$ na zvýšení úmrtnosti, počtu nádorových onemocnění i kardiovaskulárních onemocnění, jako je ateroskleróza a hypertenze (Sram et al., 1996).

Genotoxické účinky jemných prachových částic jsou nejčastěji spojovány s látkami vázanými na jejich povrchu anebo s částicemi samotnými (Lewtas, 2007). Mezi těmito látkami mají největší význam z hlediska genotoxicity karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a jejich deriváty tvořící organickou frakci $\text{PM}_{2.5}$ (Binkova and Sram, 2004; Binkova et al., 1999; Topinka et al., 2011). Komplexní směs organických polutantů však obsahuje i mnoho látek, které mají negenotoxické účinky (Andryšik et al., 2011; Upham et al., 2008).

1.2 POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAU)

PAU jsou velkou skupinou stabilních organických sloučenin, obsahujících dvě a více kondenzovaných benzenových jader. PAU mají strukturu a účinky podobné heterocyklickým aromatickým uhlovodíkům, které mají zabudovaný jeden nebo více atomů kyslíku, dusíku nebo síry v aromatických kruzích. Existují také různé halogen-, amino-, sulfo-, nitro- a hydroxyderiváty, dále různé formy karbonylových a karboxylových derivátů a chinony. Jsou velmi málo rozpustné ve vodě, ale snadno se rozpouštějí v tucích a olejích, metabolismus PAU a jejich derivátů závisí na polaritě a lipofilitě jednotlivých sloučenin. PAU vznikají nedokonalým spalováním nebo pyrolýzou organického materiálu. V atmosféře za normální teploty jsou nízkomolekulární PAU se dvěma až třemi aromatickými kruhy ve formě plynné, zatímco PAU s vyšší molekulovou hmotností se nachází v kondenzované formě navázané na prachových částicích; většinou také tvoří komplexní směsi mnoha sloučenin (Ravindra et al., 2008). PAU navázané na prachové částice mohou procházet různými chemickými

a fotochemickými transformacemi. Dochází k interakcím s ostatními polutanty SO_x , NO_x , fotochemickým reakcím s kyslíkem a reakcím se sekundárními vzdušnými polutanty vzniklými fotolýzou, jako např. s ozónem, peroxyacetylnitrátem a hydroxylovými a peroxylovými radikály (Harvey, 1991). PAU se dále vyskytují ve vodě, vodních sedimentech a v půdě (ATSDR, 1995).

PAU působí v životním prostředí jako kontaminanty s negativními účinky na člověka. Přestože PAU mohou pocházet i z přírodních zdrojů, jako jsou lesní požáry nebo vulkanická činnost, rozhodujícím faktorem pro zvýšené hladiny PAU v životním prostředí jsou antropogenní zdroje, zejména lokální topeniště, silniční doprava, průmyslová výroba, spalování fosilních paliv a spalování odpadu (Boström et al., 2002).

1.2.1 Expozice člověka

Člověk je exponován PAU třemi hlavními cestami:

- vdechováním kontaminovaného ovzduší dýchacím ústrojím.

Zdroje kontaminace ve vnějším prostředí jsou již zmíněná lokální topeniště, silniční doprava a průmyslová výroba. Pro expozici ve vnitřním prostředí má význam hlavně kouření, topení dřevem, uhlím nebo plynem a otevřená topeniště při přípravě pokrmů. Zásadním rizikem je aktivní kouření, ale i pasivní vdechování cigaretového kouře významně přispívá k celkové expozici PAU (Boström et al., 2002).

- trávicím traktem příjmem kontaminované vody nebo potravy.

Potrava tvoří hlavní příjem PAU pro člověka. Skupiny potravin, které představují pro člověka největší riziko, jsou cereálie, rostlinné oleje a tuky a zelenina. Rostliny akumulují na povrchu svých listů prachové částice s navázanými PAU, zachycují je z půdy nebo vytváří endogenními procesy. Dále je to konzumace ovoce, zeleniny, rybího masa, mléka a masa upraveného uzením a grilováním na otevřeném ohni (EFSA, 2008; Phillips, 1999).

- pokožkou.

K dermálnímu kontaktu a penetraci dochází většinou při profesionální expozici (EHC, 1998). Nepříznivý vliv PAU byl popsán také při léčbě kožních onemocnění (pemphigus vulgaris, xeroderma pigmentosum) 1% roztokem benzo[a]pyrenu (ATSDR, 1995).

1.2.2 Jednoduché a komplexní směsi

Toxicita individuálních chemických sloučenin je dobře popsána v mnoha studiích, avšak existuje málo dat o působení směsi různých chemických sloučenin, ačkoliv člověk ve vnějším i vnitřním prostředí je vždy exponován složitou směsí látek. Reálná expozice vzdušným polutantům představuje působení komplexních směsí, které obsahují látky z řady různých zdrojů a mnoha fotochemických procesů probíhajících v atmosféře. Kromě plynných látek se v atmosféře v závislosti na zdrojích a meteorologických podmínkách nacházejí i prachové částice, směsi pevných a kapalných složek v různých velikostech, koncentracích a chemickém složení (Feron and Groten, 2002).

Chemické směsi mohou být jednoduché (10 látek a méně), u kterých je známé kvalitativní i kvantitativní složení. Komplexní směsi pak obsahují desítky až tisíce chemikálií a přesné kvalitativní a kvantitativní složení není známo (Feron et al., 1998).

Pro studium toxicity a stanovení zdravotního rizika je nutné znát mechanismus působení a vzájemných interakcí individuálních sloučenin. Existují tři základní typy účinků směsí:

- aditivní působení podobných sloučenin – sloučeniny s podobným mechanismem působení se vzájemně neovlivňují a ve směsi nedochází k interakcím; výsledný účinek směsi je daný součtem účinků individuálních sloučenin
- aditivní působení odlišných sloučenin – stejné jako aditivní působení podobných sloučenin, ale sloučeniny mají odlišný mechanismus působení, vzájemně se neovlivňují
- interakce – předpokládají se interakce individuálních sloučenin, výsledný účinek směsi je slabší (antagonismus) nebo silnější (synergismus) než účinek směsi individuálních sloučenin (Feron and Groten, 2002).

Pro stanovení toxických účinků podobných sloučenin stejné třídy se používá TEF (Toxic Equivalency Factor). Tento matematický model vyjadřuje např. pro jednotlivé PAU relativní karcinogenní potenciál vůči karcinogennímu potenciálu referenční sloučeniny – benzo[a]pyren (B[a]P). Koncept TEF předpokládá, že referenční sloučenina je dobře charakterizovaná ve svých účincích a ostatní sloučeniny stejné třídy mají podobné toxické účinky, které jsou ve směsi aditivní. Hodnota TEF není přesná, protože pracuje pouze s experimentálními daty, které jsou k dispozici a liší se v závislosti na dávce (Nisbet and LaGoy, 1992). Další ukazatel karcinogenních účinků PAU, PEF (Potency Equivalency Factor), zahrnuje navíc data testování karcinogenity na zvířecích modelech (Collins et al., 1998).

Vhodnost použití B[a]P jako referenční sloučeniny pro venkovní vzdušné polutanty je otázkou, protože složení směsí je velmi odlišné, např. v dieselových emisích se B[a]P nachází v minoritní koncentraci oproti majoritnímu výskytu v průmyslových emisích. Stanovení TEF je také sporné, protože neuvažuje interakce mezi jednotlivými sloučeninami. Ve směsi se nachází PAU s genotoxickými i negenotoxickými účinky, které se svými účinky mohou navzájem ovlivňovat a může dojít k synergistickému či antagonistickému účinku oproti očekávanému aditivnímu. Např. aktivace arylhydrokarbonového receptoru (AhR) negenotoxickými PAU vede k indukci biotransformačních enzymů, které aktivují genotoxické PAU a tím zvyšují karcinogenní potenciál (Boström et al., 2002). Byl popsán i opačný efekt, kdy výsledný účinek směsi byl spíše antagonistický v důsledku kompetitivní inhibice enzymů aktivujících PAU na reaktivní metabolity (White, 2002). Karcinogenní potenciál také závisí na cílové tkáni expozice (Boström et al., 2002).

1.2.3 Toxické účinky PAU

PAU mají řadu různých toxických účinků na živé organismy. Mechanismus toxicity zahrnuje interakci s funkcí buněčné membrány a s enzymovým systémem, který je přítomný na membráně (Sikkema et al., 1995). PAU jsou distribuovány téměř do všech orgánů nezávisle na cestě vstupu, zvláště do orgánů bohatých na tukovou tkáň.

Nezávisle na způsobu expozice, játra představují hlavní orgán, kde probíhá biotransformace PAU a jejich vylučování (Boström et al., 2002). Velká část organických látek absorbovaná v gastrointestinálním traktu je eliminována játry ještě před tím, než se dostanou do oběhového systému. Metabolity se z jater dostávají do žluči aktivním transportem v závislosti na molekulové hmotnosti, náboji a jeho distribuci; sloučeniny o nižší molekulové hmotnosti a menší polaritě jsou vylučovány spíše ledvinami (Williams, 2000).

Hlavní cestou vstřebávání vzdušných polutantů je plicní bronchoalveolární epithelium (plicní sklípky). PAU vázané na prachových částicích jsou zde desorbovány a přechází do krve. Rychlost vstřebání závisí na lipofilitě; čím více je PAU lipofilní, tím pomaleji se dostává do krve. Vysoce lipofilní látky, jako např. B[a]P, se vstřebávají do krve velmi pomalu a plicní epiteliální buňky jsou exponovány velmi vysokými dávkami. Zde probíhá metabolická přeměna na látky, které mohou být reaktivnější a stále vysoce lipofilní. Méně lipofilní látky lépe difundují do krve, dochází ke snížení lokální

koncentrace a jsou transportovány do ostatních orgánů. Při nízkých expozicích PAU je tvorba reaktivních meziproduktů v plicích dominantní, zatímco při vysokých dávkách jsou reaktivní metabolity tvořeny hlavně v játrech (Boström et al., 2002).

Toxické účinky PAU závisí na délce expozice, místu vstupu i struktuře. PAU mají střední až nízkou akutní i střednědobou toxicitu u lidí. Antracen, benzo[a]pyren a naftalen jsou primárními kožními iritanty, antracen a benzo[a]pyren také zvyšují hypersenzitivitu (EHC, 1998).

Fototoxické účinky PAU se projevují na kontaminované kůži exponované slunečnímu záření. PAU mohou procházet chemickými reakcemi a tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní meziprodukty, které oxidují makromolekuly. Další mechanismus je tvorba fotoproduktů během fotolýzy (IARC, 2010).

Reprodukční a vývojová toxicita zahrnuje schopnost PAU procházet částečně přes placentární bariéru. DNA adukty (kovalentní sloučeniny metabolitů PAU s nukleotidy DNA) byly nalezeny v tkáni placenty i plodu, významně vyšší byly u kuřáček a žen žijících ve znečištěném prostředí. Mnoho studií prokazuje nitroděložní růstovou retardaci plodu, sníženou délku gestace a sníženou porodní hmotnost u dětí. Expozice PAU má vliv i na plodnost mužů (EC, 2002; IARC, 2010)

Existují genotoxické i negenotoxické mechanismy, kterými PAU a jejich metabolity modulují signalizaci imunitních buněk (IARC, 2010). Porucha této signalizace se projevuje jako imunoprese, která je spojená s nárůstem citlivosti k rozvoji infekčních a nádorových onemocnění, nebo imunopotenciace, která vede ke zvýšené tvorbě zánětlivých cytokinů a tím i zánětu. Tyto účinky pak mohou podpořit tvorbu nádorů, hypersenzitivitu (alergie, kontaktní hypersenzitivita) nebo autoimunitní poruchy (EC, 2002).

Karcinogenita individuálních PAU i jejich směsí je studována a popsána hlavně na experimentálních zvířecích modelech. U lidí se předpokládají potenciální karcinogenní účinky, které již byly prokázány na zvířatech. Přestože data o přímém působení PAU u lidí jsou pouze omezená, mnoho studií se zabývá vztahem environmentální expozice PAU a výskytu rakoviny (EHC, 1998).

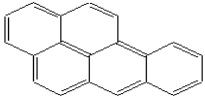
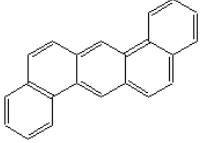
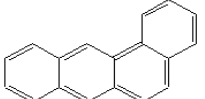
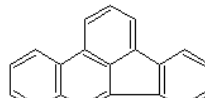
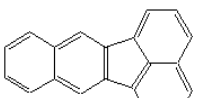
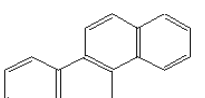
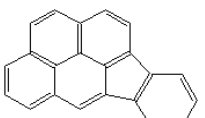
Karcinogenní účinek PAU se liší u jednotlivých sloučenin. Většina PAU funguje jako promutagen, resp. prokarcinogen; pro rozvoj mutagenních a karcinogenních vlastností je nutná jejich metabolická aktivace. Bioaktivací vznikají z málo reaktivních sloučenin (proximální karcinogeny) velmi reaktivní elektrofilní metabolity (ultimativní karcinogeny), které jsou schopné interagovat s buněčnými makromolekulami a vytvářet perzistentní adukty s proteiny a zejména s nukleovými kyselinami. Během metabolické aktivace PAU může docházet také k oxidačnímu stresu a následně k oxidačnímu

poškození DNA. Význam jednotlivých příspěvků každého mechanismu záleží na chemických a biologických vlastnostech jednotlivých sloučenin, druhu organismu, úrovni exprese aktivačních enzymů, apod. (Xue and Warshawsky, 2005).

Kromě genotoxických účinků vykazují PAU také účinky negenotoxické, které mají promoční účinek na tvorbu nádorů. Některé PAU působí jako kompletní karcinogeny, tzn. mají iniciační i promoční účinek na buňku a jsou schopné indukovat tvorbu nádoru. Jiné PAU samy o sobě nevedou ke tvorbě nádorů – mohou být vysoce mutagenní, ale vzhledem k absenci promočních účinků nejsou karcinogenní a nebo mohou mít pouze promoční účinky bez iniciační aktivity. Stanovení mutagenních účinků dané sloučeniny odráží schopnost iniciace karcinogeneze, zatímco promoční aktivita sloučeniny je dána schopností vazby na AhR (Sjögren et al., 1996).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) řadí 7 sloučenin PAU mezi karcinogeny (Tab.1).

Tab. 1: Lidské karcinogenní PAU (IARC, 2010)

Struktura PAU	Název	Klasifikace
	benzo[a]pyren	1 - prokázáný karcinogen
	dibenzo[a,h]anthracen	2A - pravděpodobný lidský karcinogen
	benzo[a]anthracen	2B - možný lidský karcinogen
	benzo[b]fluoranthen	2B - možný lidský karcinogen
	benzo[k]fluoranthen	2B - možný lidský karcinogen
	chrysen	2B - možný lidský karcinogen
	indeno[1,2,3-c,d]pyren	2B - možný lidský karcinogen

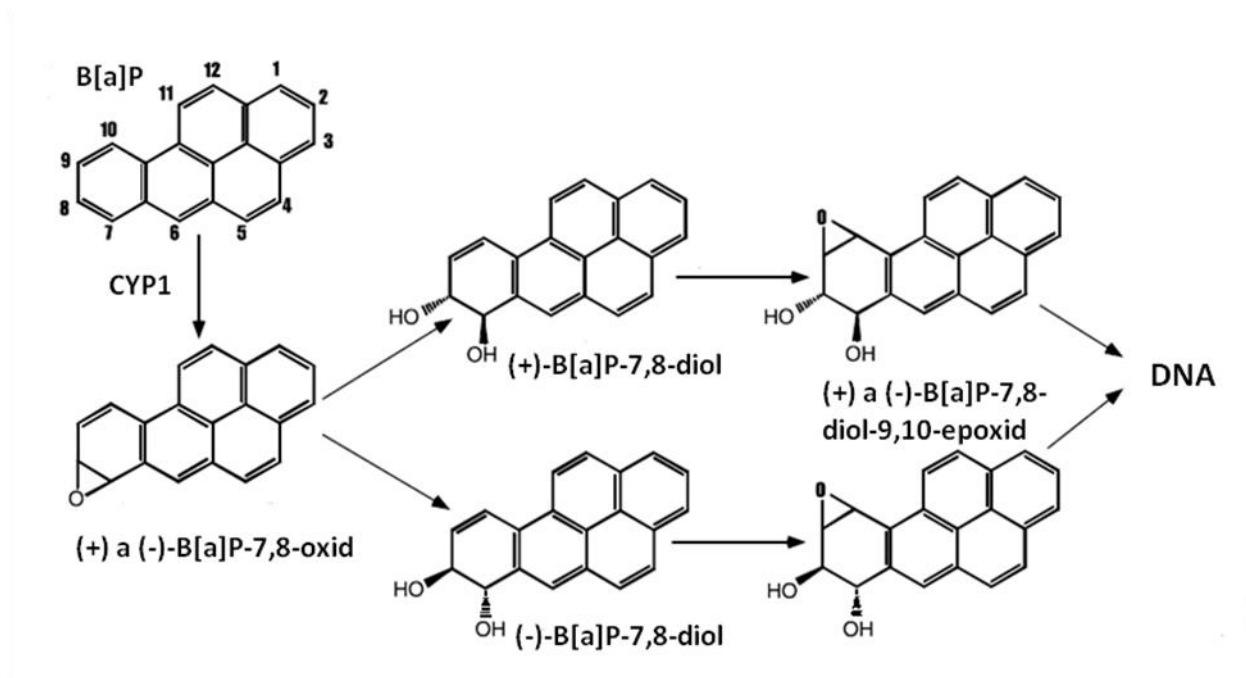
1.2.4 Metabolická aktivace a genotoxické účinky PAU

Biotransformace je enzymatická modifikace lipofilních xenobiotik na látky více rozpustné ve vodě, které mohou být lépe vyloučeny z těla. V první fázi biotransformace probíhají hydrolyzační, redukční a oxidační reakce, výsledkem je vnášení polárnějších skupin do molekuly xenobiotika ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ nebo $-\text{COOH}$) a zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě. Druhá fáze biotransformace zahrnuje glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, metylaci, konjugaci s glutathionem (GSH) a konjugaci s aminokyselinami (glycin, taurin a kyselina glutamová). Kofaktory těchto reakcí reagují s funkčními skupinami, které jsou přítomné na xenobiotiku nebo vznikají během první fáze biotransformace. Reakce druhé fáze velmi přispívají ke zvýšení rozpustnosti xenobiotik ve vodě a umožňují jejich vyloučení z organismu (Parkinson, 2001).

Zvýšení polaritý PAU v první fázi biotransformace vede k bioaktivaci (tvorbě reaktivnějších metabolitů, než je původní sloučenina) a je příčinou genotoxických účinků PAU.

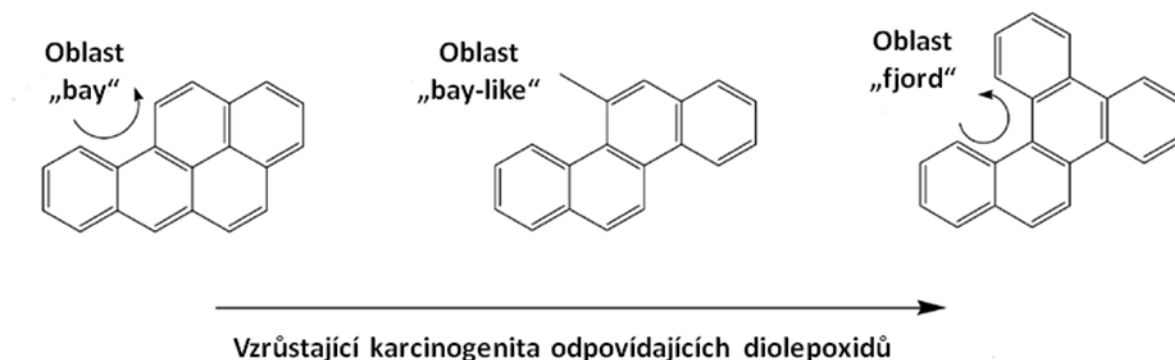
1.2.4.1 Tvorba dihydrodiolepoxydů

Jednou z cest metabolické aktivace PAU je tvorba dihydrodiolepoxydů, kde mají klíčovou úlohu CYP450 (cytochromy P450). V prvním kroku reakce této metabolické dráhy jsou PAU oxidovány CYP450 na nestabilní epoxidové meziprodukty. Následuje hydrolýza katalyzovaná EH (epoxidhydroláza) a nakonec jsou tyto meziprodukty opět oxidovány CYP450 na diolepoxydy, které jsou vysoce DNA reaktivní (Xue and Warshawsky, 2005). Tato dráha je podrobně popsána na příkladu modelového mutagenu a karcinogenu benzo[a]pyrenu. CYP450 oxidují B[a]P na (+)-B[a]P-7,8-oxid a (–)-B[a]P-7,8-oxid s přednostní tvorbou (+) enantiomeru. EH hydrolyzuje oxidy na (+)- a (–)-B[a]P-7,8-diol a ty jsou nakonec aktivovány pomocí CYP450 na vysoce reaktivní (+)- a (–)-B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxydy-1 a -2 (Obr. 1; (Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004).



Obr. 1 Metabolická aktivace B[a]P (upraveno podle Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004)

Schopnost dihydrodiolepoxidů vázat se na DNA a vytvářet DNA adukty souvisí s přítomností tzv. „bay region“ nebo „fjord region“ ve struktuře molekuly (Obr. 2). Reaktivní metabolity s navázanou epoxidovou skupinou sousedící s touto oblastí mají silnější genotoxické účinky, neboť se ochotněji vážou na DNA. Důvodem vysoké DNA reaktivity je sféricky obtížný přístup enzymů druhé fáze biotransformace, který zabraňuje konjugaci s polární skupinou a detoxifikaci metabolitu (Baird et al., 2005). Míra persistence navázaného DNA aduktu a tvorba mutací souvisí také s konformací aduktu v molekule DNA a se schopností reparačních enzymů nalézt a opravit lézi v DNA (Wu et al., 2002).



Obr. 2. Přítomnost oblastí „bay“ , „bay-like“ a „fjord“ zvyšuje karcinogenní účinky PAU (upraveno podle Penning, 2004)

Mezi enzymy katalyzující derivatizační reakce xenobiotik patří jednak enzymy mikrosomální frakce (subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenizaci buněk) a také cytosolu (roztok cytoplazmy a izolačního pufru). Klíčovým enzymovým systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální systém monooxygenáz se smíšenou funkcí (MFO) obsahující cytochromy P450 (Stiborová et al., 2004).

Cytochromy P450 je skupina hem-thiolátových monooxygenáz participujících nejen na aktivaci PAU a dalších cizorodých látek, ale kontrolujících také metabolismus endogenních látek, např. kyseliny arachidonové, eicosanoidů, cholesterolu a žlučových kyselin, syntézu a metabolismus steroidů a vitamínu D3, hydroxylaci kyseliny retinové a mnoho dalších procesů. Mechanismus indukce exprese CYP450 rodiny 1 po expozici PAU probíhá přes aktivaci AhR (Nebert and Dalton, 2006). Exprese lidských CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 je tkáňově specifická, CYP1A2 je přednostně exprimován v játrech, zatímco CYP1A1 a CYP1B1 jsou především extrahepatální enzymy. Na metabolické aktivaci PAU se nejvýznamněji podílejí CYP1A1 a zejména CYP1B1, který je v tvorbě toxických a karcinogenních metabolitů PAU účinnější (Shimada, 2006).

1.2.4.2 Tvorba o-chinonů a ROS

Alternativní metabolická dráha PAU (Obr.3) spočívá v aktivaci aldoketoreduktáz AKR1A1 a AKR1C1-1C4, které v případě B[a]P oxidují (-)B[a]P-7,8-dihydrodiol vzniklý po reakcích s CYP450 a

epoxidhydrolázou na příslušný ketol, který přechází na katechol. Katecholy jsou nestabilní v přítomnosti kyslíku a podstupují další neenzymatickou jednoelektronovou oxidaci, při které vzniká o-semichinonový aniontový radikál a peroxid vodíku. Druhou jednoelektronovou oxidací vzniká plně oxidovaný o-chinon a superoxidový anion. O-chinony jsou schopné vstupovat do dalších redoxních cyklů. Dvouelektronovou redukcí v přítomnosti NQO1 (NADPH-chinonoxidoreduktáza) nebo dvěma jednoelektronovými redukcemi v přítomnosti POR (NADPH cytochrom P450 reduktáza) se znovuvytváří katechol, který se opět rozpadá na o-chinon a opakovaně se tvoří ROS, které vyvolávají oxidační poškození DNA vedoucí k mutacím (Flowers-Geary et al., 1992; Park et al., 2005; Penning et al., 1999; Penning et al., 1996). Vzniklé o-chinony jsou velmi reaktivní a vytváří různé stabilní a depurinační DNA adukty (McCoull et al., 1999; Shou et al., 1993).

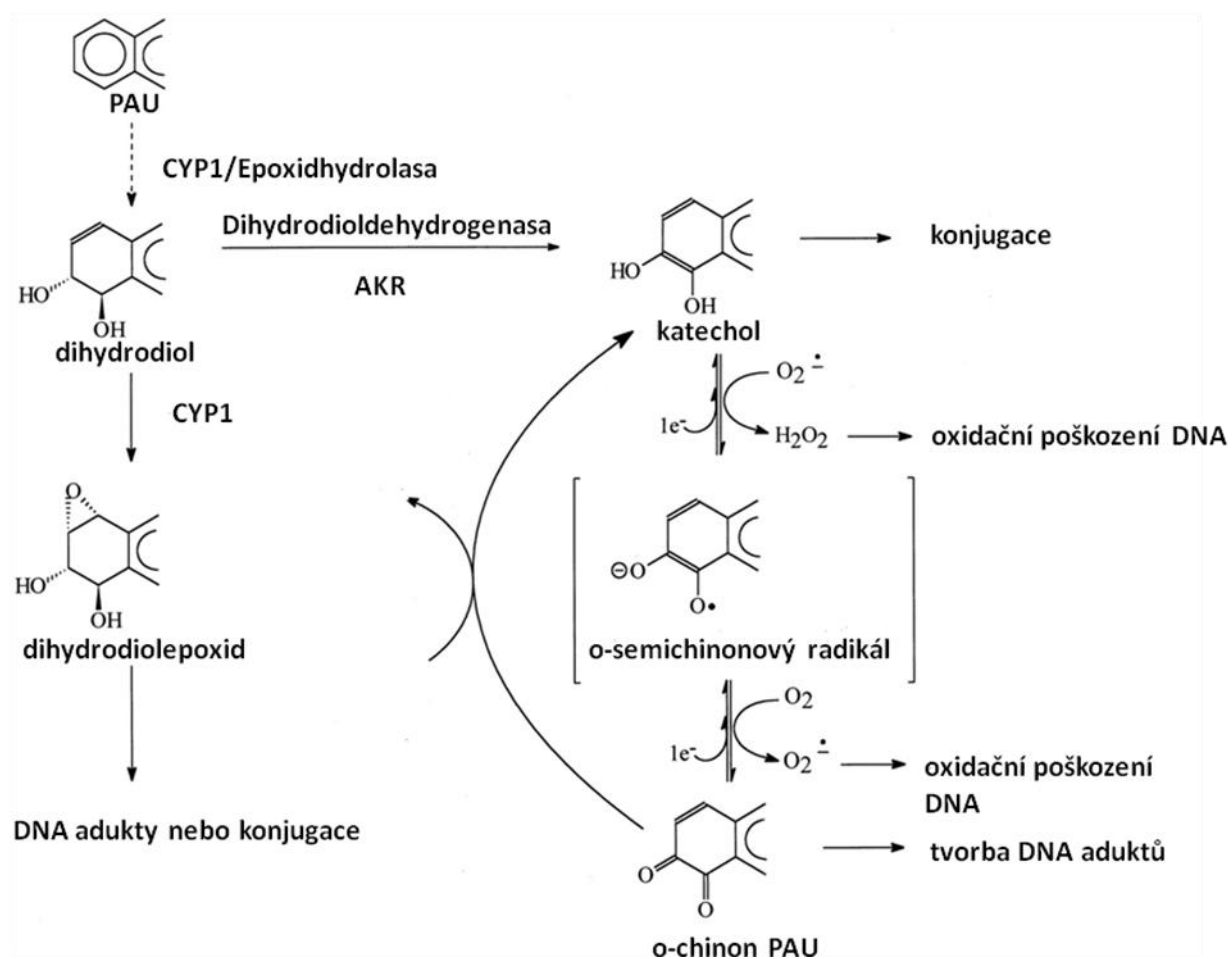
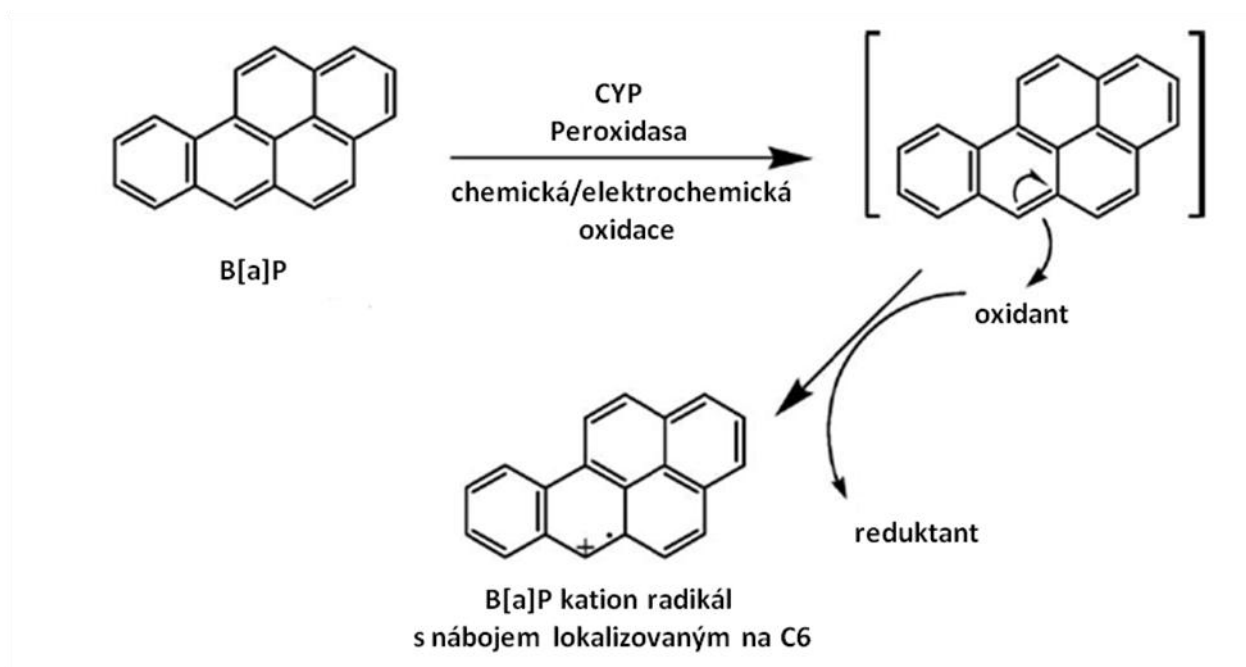


Fig. 3. Metabolická aktivace PAU pomocí aldoketoreduktáz (upraveno podle Burczynski and Penning, 2000).

1.2.4.3 Tvorba kationtových radikálů

Za určitých podmínek dochází v molekule PAU k jednoelektronové oxidaci a vzniku kationtového radikálu (Obr. 4), velmi silného elektrofilu, který reaguje s nukleofilními centry DNA a tvoří DNA adukty. Tyto adukty jsou nestabilní, dochází ke spontánní depurinaci a vzniku apurinních míst na DNA (Xue and Warshawsky, 2005). Na formaci radikálových kationtů se podílejí cytosolární monooxygenázy a peroxidázy, které oxidují PAU s nízkými ionizačními potenciály (Cavalieri and Rogan, 1990). V této reakci se uplatňují zejména extrahepatální enzymy, jako např. COX-2 (cyklooxygenáza 2; Eling et al., 1990).



Obr. 4. Jednoelektronová oxidace PAU a vznik kationtového radikálu (upraveno podle Xue and Warshawsky, 2005)

1.2.4.4 Detoxikace

Oxidované metabolity PAU první fáze biotransformace jsou dále metabolizovány na polárnější sloučeniny enzymy II. fáze. Výsledné produkty jsou většinou více rozpustné ve vodě a mohou být

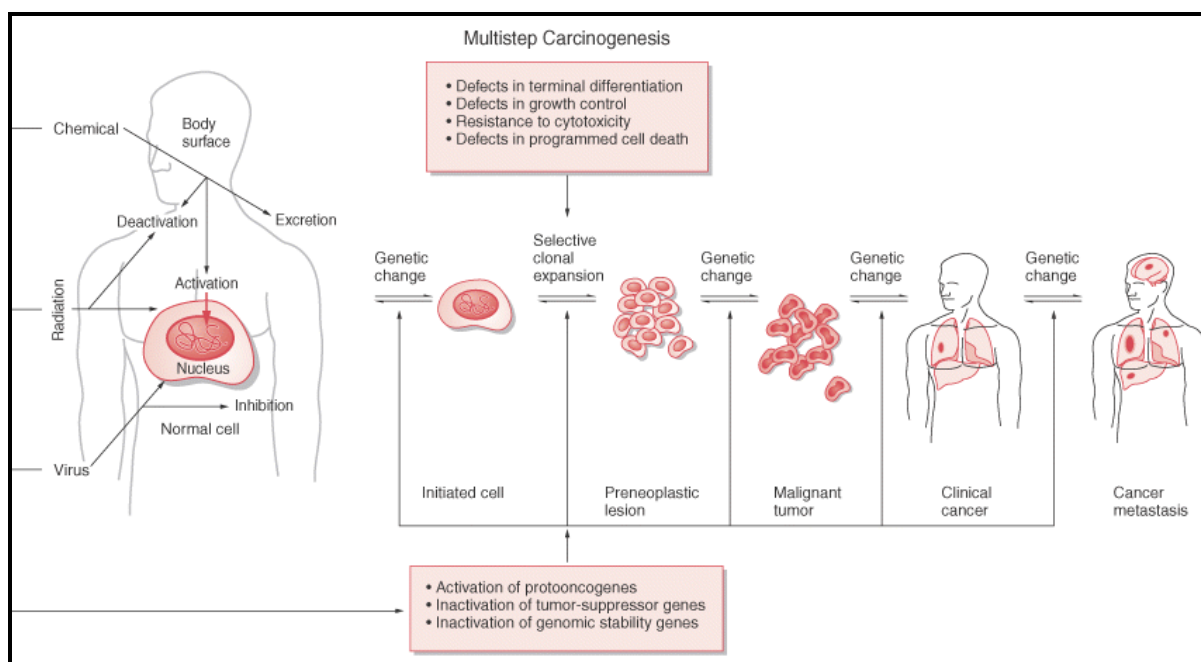
vyloučeny z organismu. Enzymy podílející se na této fázi je např. mEH (mikrosomální epoxidhydroláza), která hydrolyzuje oxidované meziprodukty PAU. Ačkoli mEH je detoxikační enzym, podílí se také na tvorbě reaktivních diolepidů. GST (glutathion-S-transferáza) a UGT (UDP-glukuronosyltransferáza) tvoří konjugáty s glutathionem, resp. s glukózou, které jsou většinou méně toxické než původní sloučenina. SULT (sulfotransferáza) katalyzuje konjugaci s aktivovaným sulfátem, ale může také tvořit vysoce reaktivní estery, které se vážou na DNA (Shimada, 2006).

1.3 MECHANISMUS KARCINOGENEZE

Karcinogeneze je několikastupňový proces, při kterém dochází k mutacím v klíčových genech buněčného růstu a diferenciaci (protoonkogeny, tumor supresorové geny, geny zahrnuté v DNA reparaci a apoptóze, aj.) a následné maligní transformaci buněk (Vogelstein and Kinzler, 2004). Při vzniku nádorů mají významnou roli fyzikální faktory (radioaktivní, UV, kosmické a Rentgenovo záření, dále některé typy jemných částic, atd), biologické faktory (onkoviry, dědičné predispozice) a chemické karcinogeny (Obr. 5). Podle účinků lze chemické karcinogeny dělit na genotoxické, epigenetické a negenotoxické. Genotoxické karcinogeny se mohou dále dělit podle mechanismu působení na DNA reaktivní (způsobují mutace) a genotoxiny nereagující s DNA (např. inhibitory topoisomeráz nebo mitotického vřeténka; Bolt et al., 2004). Epigenetické změny na chromatinu způsobené druhým typem karcinogenů jsou reverzibilní (metylace DNA, acetylace histonů) a mohou vést ke zvýšené citlivosti ke vzniku mutací nebo ke změně genové exprese (Dixon and Koprás, 2004). Negenotoxické karcinogeny nereagují s DNA, jejich účinek na buňku může být cytotoxický nebo mitogenní (Butterworth and Bogdanffy, 1999).

První fáze složitého procesu chemické karcinogeneze je iniciace, kdy působením genotoxických látek dochází k poškození DNA v buňkách. Část těchto poškození, která nejsou opravena reparačním systémem buňky, mohou být v procesu buněčného dělení fixována jako irreverzibilní mutace. Pokud nejsou takto iniciované buňky odstraněny imunitním systémem, přetrvávají v organismu, je inhibována terminální diferenciaci, symetrickým dělením jsou mutace fixovány a vytváří se další iniciované buňky. V následující promoční fázi prochází iniciované buňky klonální expanzí, která se projevuje mohutnou tvorbou stejných klonů nediferenciovaných buněk. Vznikají preneoplastické léze nebo benigní neoplasie. Klíčovými faktory promoční fáze jsou především epigenetické mechanismy,

kteřé způsobují reverzibilní změny na transkripční, translační a post-translační úrovni jako např. indukci genové exprese aktivací transkripčních faktorů AP-1 a NF- κ B, aktivaci proteinkinázy C, indukci proliferace a diferenciace, blokaci apoptózy a reverzibilní inhibici G1C (Oliveira et al., 2007; Trosko, 2001; Trosko, 2003; Trosko and Upham, 2005). V této fázi se také uplatňuje oxidační stres způsobený tvorbou reaktivních forem kyslíku. Kromě mutagenních účinků může oxidační stres modulovat redoxní potenciál buňky a modifikovat genovou expresi (Klaunig et al., 2011). V poslední fázi karcinogeneze (progrese) je dokončena maligní transformace buněk. Působením progresorů (látky s genotoxickými účinky) dochází k rozsáhlejšímu irreverzibilnímu poškození DNA. Buněčná proliferace se stává nekontrolovatelnou, vytváří se vlastní cévní zásobenění nádorových buněk (angiogeneze) a maligní buňky infiltrují do jiných orgánů, kde vznikají metastázy (Oliveira et al., 2007).



Obr. 5. Fáze karcinogeneze (převzato z Kufe, 2006)

1.3.1 Odpověď buňky na genotoxické účinky PAU

V primární struktuře DNA dochází působením genotoxických látek k tvorbě kovalentních vazeb mezi metabolity PAU a nukleotidy DNA, které mohou vést k různým typům mutací (inzerce nukleotidu, tj. zařazení jednoho či více nukleotidů, delece nukleotidu, tj. ztráta jednoho či více nukleotidů nebo substituce báze) nebo k chromozomálním aberacím (změna struktury nebo počtu chromozomů) (Clancy, 2008).

Organismus reaguje na poškození DNA komplexním systémem odpovědi, který zahrnuje aktivaci kontrolních bodů zprostředkovávajících zástavu buněčného cyklu, transkripční změny, aktivaci opravných mechanismů a iniciaci apoptózy v případě neopravitelných poškození.

Kontrolní body (DNA damage checkpoints) jsou aktivovány při poškození DNA nebo při chybné replikaci, aby zabránily buňce při přechodu do další fáze buněčného cyklu a umožnily opravu DNA. Aktivace kontrolních bodů je spojená se zvýšenou expresí genů spojených s opravou DNA a apoptózou. Během buněčného cyklu probíhá neustálá intenzivní kontrola v místech přechodu G1 a S fáze, v průběhu S fáze a v místě přechodu G2 a M fáze. Pokud je zjištěna zvýšená frekvence poškození DNA, dochází k zesílení signálu a spuštění buněčné odpovědi.

Pro G1/S, S a G2/M kontrolní body jsou společné klíčové protein kinázy ATM (ataxia telangiectesia mutated) a ATR (AMT- and Rad3- related) a jejich efektorové kinázy Chk2 (check-point kináza 2), resp. Chk1 (check-point kináza 1). ATM kináza je přednostně stimulovaná látkami, které způsobují vznik dvouřetězových zlomů (např. ionizující záření, PAU), zatímco ATR kináza rozeznává jednořetězové zlomy (UV záření, PAU; Sancar et al., 2004).

ATM/ATR kinázy řídí jeden z nejvíce prostudovaných mechanismů odpovědi na poškození DNA – aktivaci tumor supresorového proteinu p53. Tento protein funguje jako transkripční faktor a má důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a v procesu karcinogeneze, přibližně u poloviny všech nádorových onemocnění je tento protein inaktivní (Soussi and Beroud, 2001). p53 reguluje zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi zejména aktivací transkripce p21^{CIP1}, inhibitoru komplexu zodpovědného za vstup do S fáze. p53 se uplatňuje při zastavení buněčného cyklu také v S fázi (Binkova et al., 2000; Khan et al., 2002) a v G2 fázi prostřednictvím p21^{CIP1}, GADD45 a 14-3-3σ (Taylor and Stark, 2001). Zástava buněčného cyklu pak poskytuje prostor pro opravu poškozené DNA nebo zahájení apoptotických procesů.

Pro apoptózu zprostředkovanou p53 je nezbytná aktivace transkripce pro-apoptotických genů. Jedná se o geny aktivující tzv. receptory smrti (Fas, TNF, TRAIL, PIDD), geny indukující změny v mitochondriích (Bax, PUMA, NOXA, P53AIP, Bid) a stresovou dráhu endoplasmatického retikula (Bourdon et al., 2003).

Tumor supresorové proteiny p53, p21^{CIP1} a pRb udržují rovnováhu mezi pro-apoptotickými a anti-apoptotickými signály, mají klíčovou roli v ochraně buňky při poškození DNA a mutace v těchto genech mohou vést ke ztrátě kontroly buněčného cyklu (Garner and Raj, 2008). PAU mohou přednostně tvořit DNA adukty a způsobovat mutace např. v p53 (Smith et al., 2000).

1.3.2 Odpověď buňky na negenotoxické účinky PAU

Vedle genotoxických účinků mají PAU také negenotoxické účinky, které přispívají ke karcinogenitě a jsou v poslední době intenzivně studovány. Negenotoxické účinky se projevují především v procesech nádorové promoce a endokrinní disrupce.

Promoční účinky PAU zahrnují modulaci vnitrobuněčných signálních drah a aktivit transkripčních faktorů, které mohou být spojeny s indukcí buněčné proliferace nebo modulací buněčné diferenciaci a apoptózy (Li et al., 2004). Ztráta rovnováhy v těchto procesech pak může vyústit k expanzi transformovaných buněk a vzniku neoplasii a dysplasií vedoucích ke karcinogenezi.

Modulací cytokinů regulujících hematopoézu mohou PAU způsobovat poškození imunitního systému (Page et al., 2004). Imunotoxicita PAU je způsobena také indukcí apoptózy buněk imunitního systému. Metabolity PAU a ROS vznikající při jejich aktivaci způsobují např. změny v Ca²⁺ homeostáze, které vedou k apoptóze lymfoidních buněk (Burchiel and Luster, 2001). Modulace Ca²⁺ signalizace pomocí PAU naopak podporuje proliferaci a mitogenezi u jiných typů buněk, např. u epiteliálních buněk mléčné žlázy (Tannheimer et al., 1997). Zvýšení intracelulární hladiny Ca²⁺ vede k aktivaci PKC signální dráhy, která je asociována s nádorovou promoci (Rasmussen et al., 1995). PAU mohou také způsobovat změny v intracelulárním pH vedoucí ke změnám v proliferaci, diferenciaci a apoptóze (Huc et al., 2007).

Důležitým mechanismem nádorové promoce zprostředkované PAU je inhibice mezibuněčné komunikace (GJIC; gap junction intercellular communication). Význam GJIC spočívá v udržování homeostázy ve tkáních – pomocí mezerových spojů (gap junction) dochází k neustálému vyrovnávání

rovnováhy koncentrace živných látek, iontů a tekutin mezi buňkami a v šíření signálů regulujících proliferaci a diferenciaci mezi buňkami. Inhibice GJIC narušuje buněčnou rovnováhu, což vede spolu s indukci buněčné proliferace a eventuálně inhibicí apoptózy ke klonální expanzi preneoplastických buněk. PAU inhibují GJIC s různou intenzitou v závislosti na struktuře (Upham et al., 2008).

Vlastností PAU je také schopnost interakce s různými nukleárními receptory. Nukleární receptory jsou aktivovány nízkomolekulárními ligandy, které mohou být strukturně podobné PAU (steroidní hormony, thyroïdní hormony, deriváty vitamínu A, a jiné). PAU přispívají k endokrinní disrupci nejčastěji na úrovni modulace receptorů steroidních hormonů, avšak mohou i přímo ovlivňovat syntézu, transport a metabolismus steroidních hormonů (Janošek et al., 2006). Drtivá většina negenotoxických účinků je spojená s aktivací AhR (viz kapitola AhR 1.3.4. Cílové geny a procesy AhR).

1.3.3 Aktivace AhR

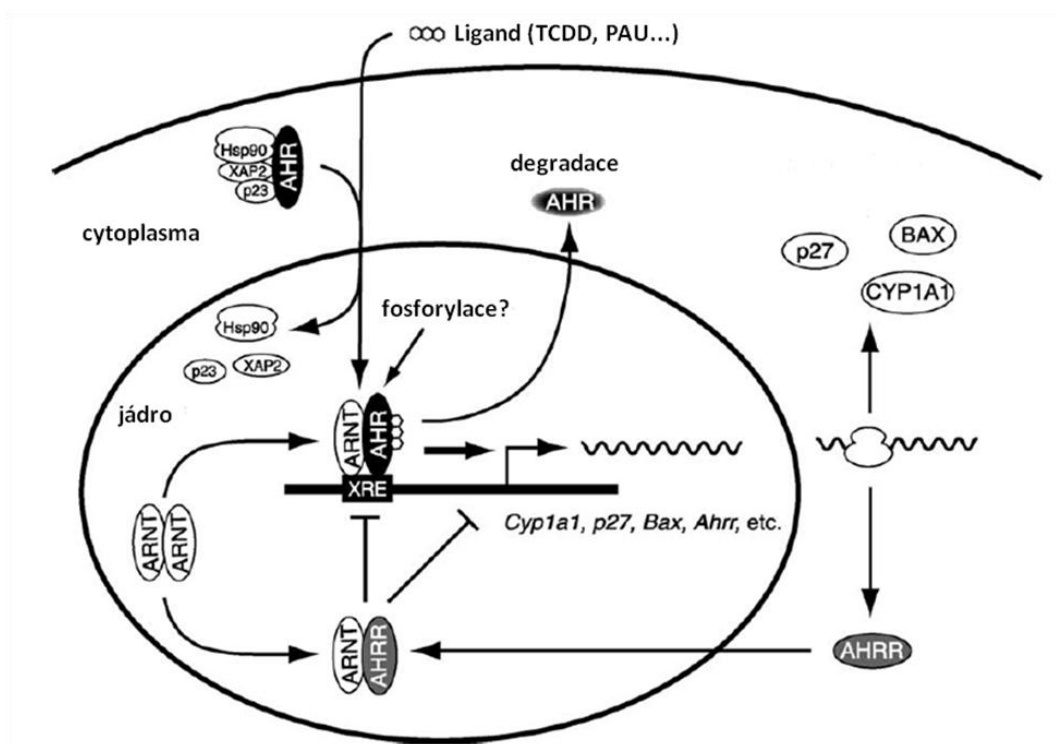
AhR je cytosolický transkripční faktor aktivovaný ligandem. Spolu s dalšími transkripčními regulátory patří do bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) rodiny transkripčních faktorů (Furness et al., 2007). Většina členů této rodiny obsahuje tři základní domény - jednu bHLH doménu a dvě PAS domény. Obvykle je bHLH doména lokalizována v blízkosti N-konce, následují ji dvě PAS domény a slabě konzervovaný C-konec. bHLH/PAS proteiny vytvářejí v jádře homodimery nebo heterodimery s dalšími členy rodiny. Po dimerizaci dvou bHLH/PAS faktorů v jádře, dochází k vazbě na DNA přes základní oblast bHLH domény, a tím je spuštěna transkripce cílových genů (Kewley et al., 2004). Značně evolučně konzervovaná PAS oblast zahrnuje 100-120 aminokyselin, které tvoří dvě degenerované repetice - PAS A a PAS B. PAS domény jsou zodpovědné za dimerizaci členů bHLH/PAS rodiny a navázání ligandu (Taylor and Zhulin, 1999). Kromě těchto dvou typů domén, mohou faktory obsahovat ještě transaktivační doménu, která se účastní aktivace transkripce, nebo mohou obsahovat doménu, která se podílí na represi transkripce (Kewley et al., 2004).

AhR se vyskytuje v latentním stavu v cytoplazmě v komplexu s HSP90, XAP2 a p23 (Kazlauskas et al., 1999). Vazba HSP90 udržuje AhR transkripčně neaktivní, maskuje NLS (Nuclear Localization Signal) a udržuje komplex v cytoplazmě (Kazlauskas et al., 2001). Po vazbě ligandu se celý komplex přesouvá do jádra, kde AhR disociuje z HSP90 komplexu a naváže se na Arnt (Obr. 5; Hankinson, 1995).

Vzniklý dimer AhR/ARNT se váže na specifickou DNA sekvenci, zvanou DRE/XRE (Dioxin Responsive Elements/Xenobiotic Responsive Elements), která obsahuje sekvenční motiv 5'-TNGCGTG-3' (Lai et al., 1996; Swanson, 2002). Tato sekvence se vyskytuje v oblasti enhancerů řady cílových genů AhR.

AhR signalizace může být regulována zpětnou vazbou s AhRR (repressor AhR). AhRR je lokalizován v jádře a je indukován aktivovaným AhR, se kterým kompetuje o vazbu na Arnt nebo s komplexem AhR/Arnt o vazbu na DRE/XRE sekvenci. Jeho vazba pak vede k represi transkripce (Mimura et al., 1999).

Dalším možným mechanismem regulace aktivity AhR je jeho degradace. Po navázání ligandu je AhR rychle degradován. Ligandem indukovaná degradace AhR v jádře probíhá prostřednictvím 26S proteazomální dráhy, která je kontrolována ubiquitin ligázou E3, jejíž identita není zcela jasná (Ma, 2007). Inhibice AhR degradace má za následek zvýšení transkripce genů indukované ligandem. Protože AhR obsahuje kromě NLS také NES (Nuclear Export Signal) nacházející se ve druhé šroubovici bHLH domény, je možné, že degradace přes 26S proteazom je ovlivněná subcelulární lokalizací AhR (Davarinos and Pollenz, 1999).



Obr. 5. AhR signalizace (upraveno podle Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003).

1.3.4 Cílové geny a procesy AhR

Aktivace AhR ovlivňuje transkripci širokého spektra genů v různých fyziologických buněčných procesech, jako např. v proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Mnoho ligandů AhR stimuluje signální kaskády aktivací růstových faktorů, hormonů, neurotransmiterů a extracelulárních ligandů. Tyto ligandy fungují jako mitogenní faktory a ovlivňují signální dráhy, např. průchod iontů přes membránu, zvyšování intracelulárního Ca^{2+} , cAMP a aktivaci proteinkináz a fosfatáz (Puga et al., 2002).

Mezi nejznámější cílové geny, které obsahují sekvenci DRE/XRE v promotoru, patří některé enzymy I. a II. fáze biotransformace – rodina cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) a další biotransformační enzymy - NQO1, ALDH3A1 a UGT1A6 (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003).

V proliferaci a diferenciaci má AhR různý účinek v závislosti na druhu ligandu a typu tkáně. Po vazbě ligandu může způsobit zástavu buněčného cyklu v G1 fázi nejen přímou blokáží hyperfosforylace Rb proteinu, která vede k represi E2F a inaktivaci genů zodpovědných za vstup do S fáze, ale také aktivací $p21^{\text{CIP1}}$ a $p27^{\text{KIP1}}$, které inhibují cyklin-dependentní kinázy 2 a 4. Byl ovšem pozorován i opačný účinek – aktivace genů včasné odpovědi (immediate-early response genes; např. geny *JUN* a *FOS* rodiny), které jsou zodpovědné za ukončení G0 fáze a zahájení progresu buněčného cyklu (Puga et al., 2009).

Inhibice apoptózy je jedním z mechanismů nádorové promoce a progresu. Podobně jako v regulaci buněčného cyklu má však AhR protichůdné účinky. K indukci apoptózy dochází pravděpodobně při vzniku oxidačního a stresu způsobeném aktivací cytochromů AhR ligandy (Nebert et al., 2000). Byly popsány pro-apoptotické signály zprostředkované indukcí E2F1 (Marlowe et al., 2008), ale také aktivace anti-apoptotických proteinů (Solhaug et al., 2004).

Kromě fyziologických procesů AhR také kontroluje řadu genů zahrnutých v odpovědi na oxidační stres. Aktivace exprese enzymů I. fáze biotransformace vede k tvorbě elektrofilních produktů a ROS, zatímco aktivované enzymy II. fáze vzniklý oxidační stres eliminují. Produkce ROS indukuje také tvorbu zánětlivých cytokinů a vznik prozánětlivé odpovědi (Dalton et al., 2002). Zajímavou roli má interakce AhR s transkripčním faktorem NF- κ B, který hraje klíčovou roli v regulaci imunitního systému, zejména zánětlivé odpovědi a odpovědi buňky na různé formy stresu. Zánětlivé cytokiny (TNF α , IL-1 β) a lipopolysacharid, které indukují aktivaci NF- κ B, mění aktivitu cytochromů v játrech i v extrahepatálních tkáních (Morgan et al., 2008). V některých případech vede narušení rovnováhy cytochromů ke změně biotransformace PAU, např. TNF α zeslabuje aktivitu CYP1A1 a 1A2, ale naopak zvyšuje aktivitu CYP1B1 a zvyšuje tak genotoxický potenciál B[a]P (Umannova et al., 2008).

Ligandy AhR mohou také indukovat expresi některých enzymů podílejících se na regulaci zánětlivé odpovědi, jako je např. inducibilní COX-2 (Degner et al., 2009). Tento enzym katalyzuje syntézu prostaglandinů za použití kyseliny arachidonové jako substrátu. Působením AhR ligandů dochází ke zvýšené tvorbě prostaglandinů a tím také k produkci ROS (Dalton et al., 2002).

Řada detoxikačních a anti-oxidačních genů aktivovaných AhR (NQO1, UGT1A6 a GSTA1) je též závislá na transkripčním faktoru Nrf2 (Yeager et al., 2009). Nrf – ARE (antioxidant response element) signální dráha udržuje redoxní rovnováhu v buňce a reguluje expresi genů zodpovědných za detoxikaci a eliminaci ROS a reaktivních elektrofilů (Nguyen et al., 2009).

Mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPKs) jsou intracelulární mediátory signální transdukce a kontrolují transkripci mnoha genů fosforylací příslušných transkripčních faktorů. ERK1/2 reguluje mitogenní a vývojové procesy, p38 hraje roli při zánětlivé odpovědi, apoptóze a buněčném cyklu a JNK se účastní buněčné signalizace, imunitního systému, apoptózy, karcinogeneze a patogeneze diabetu. Podle nejnovějších poznatků funguje modulace MAPK dvěma způsoby. AhR ligandy mohou zprostředkovávat aktivaci různých MAPK přes aktivovaný AhR nebo mohou MAPK aktivovat přímo a dochází pak zpětně ke kontrole funkce AhR (Henklova et al., 2008; Puga et al., 2009; Tan et al., 2002).

Významným mechanismem toxického působení PAU je endokrinní disrupce. Anti-estrogenní účinky PAU se projevují vazbou na AhR, výsledkem je aktivace širokého spektra anti-estrogenních odpovědí (Safe, 1995). Bylo popsáno několik mechanismů vysvětlujících AhR – zprostředkovanou anti-estrogenitu (Navas and Segner, 2000; Safe, 2001). Estrogenní účinky PAU mohou být způsobeny přímým působením metabolitů PAU na ER (Charles et al., 2000) nebo vazbou na AhR, který může asociovat s ER (Kamiya et al., 2005). Menší pozornost byla věnována androgenním/anti-androgenním účinkům PAU, o kterých je doposud známo podstatně méně. Z hlediska xeno-androgenního působení jsou PAU především považovány za anti-androgeny. Výjimečně byly pozorovány také androgenní účinky, zejména u dibenzo[a,h]antracenu, mechanismus tohoto působení však doposud nebyl objasněn (Vinggaard et al., 2000).

1.3.5 Nádorové onemocnění prostaty

Nádor prostaty je jedna z nejvíce rozšířených forem rakoviny v rozvinutém světě (ACS, 2009). Epidemiologické studie naznačují možnou souvislost nádoru prostaty a dietou, např. konzumace

červeného a tepelně upravovaného masa přináší vyšší riziko, zřejmě také díky obsahu B[a]P (Sinha et al., 2009). Další studie poukazují na souvislost mezi nádorem prostaty a profesionální expozicí PAU (Aronson et al., 2009; Brown and Delzell, 2000).

Neuroendokrinní transdiferenciace nádoru prostaty je významný proces ovlivňující tkáňové mikroprostředí a regulující rozvoj tohoto nádorového onemocnění. Rozvoj onemocnění je v časných fázích závislý na přítomnosti androgenů, proto patří anti-androgenní terapie mezi účinné terapeutické přístupy. Tato terapie je však v mnoha případech pouze přechodná a u pacientů dochází k relapsu (Denis and Murphy, 1993). Mechanismus získání nezávislosti na androgenech a selekce nádorového klonu, který je resistentní k anti-androgenní terapii, je stále neznámý.

Neuroendokrinní (NE) buňky jsou vedle bazálních a sekrečních epiteliálních buněk přítomné v normální prostatické tkáni a podílejí se na regulaci proliferace a diferenciaci epiteliálních buněk parakrinním, endokrinním a neurokrinním mechanismem v závislosti na androgenních faktorech. V normální prostatické tkáni je výskyt NE buněk velmi nízký, avšak v nádorové tkáni se v nepřítomnosti androgenního signálu počet NE buněk rozrůstá a buňky prochází transdiferenčním procesem, kdy mění svůj genotyp a fenotyp. Bylo prokázáno, že neuroendokrinní faktory mohou parakrinně či autokrinně aktivovat mitogenní dráhy prostřednictvím mechanismu závislém, ale i nezávislém na funkci androgenního receptoru. Tyto faktory pak mohou také indukovat rezistenci k apoptóze u okolních epiteliálních buněk a podporovat vaskularizaci nádoru prostaty (Amorino and Parsons, 2004; Fu et al., 2003; Zhang et al., 2003). Nárůst populace koreluje s nádorovou progresí a špatnou prognózou (Yuan et al., 2007). K transdiferenciaci také přispívá mutace v androgenním receptoru (AR), interakce s některými cytokiny a růstovými hormony a aktivace receptoru nezávisle na ligandu (Chan et al., 1998; Culig et al., 1997; Peehl et al., 1996).

PAU mají kromě karcinogenních účinků také významnou roli jako endokrinní disruptory (Santodonato, 1997). Jednou z jejich vlastností je schopnost metabolitů vázat se na AR a působit antagonisticky, AhR má anti-androgenní účinek (Kizu et al., 2003).

1.4 GENOVÁ EXPRESE V TOXIKOLOGII KOMPLEXNÍCH SMĚSÍ

Studium genové exprese v toxikologii zaznamenalo v poslední době velký rozvoj. S nástupem nových technologií se výrazně změnil přístup k analýze genové exprese – místo omezeného počtu

genů lze moderními metodami zkoumat genovou expresi simultánně na celogenomové úrovni v různých buňkách, tkáních, orgánech i organismech. Tzv. high-throughput (velkokapacitní) technologie analýzy genové exprese na RNA a proteinové úrovni jsou široce využívány např. ve farmaceutickém průmyslu při testování a kontrole léčiv, v lékařství při diagnostice chorob a zejména v toxikologii, kde fungují jako alternativa k tradičním *in vitro* a *in vivo* testům používaných pro identifikaci a testování bezpečnosti chemikálií. Pro výzkum má studium expresních profilů dvojitý význam – přispívá k objasnění mechanismů působení sledované látky a k predikci jejích toxických účinků (Fielden and Zacharewski, 2001).

Mnoho toxikologických studií se zabývalo především účinkem jednotlivých látek, ačkoli je zřejmé, že člověk je v životním prostředí vystavován působení reálných komplexních směsí. Při analýze změn expresních profilů po expozici komplexními směsmi potenciálně toxických látek v životním prostředí je nepochybně mnohem obtížnější se dopracovat k exaktnějším mechanismům působení těchto směsí na molekulární úrovni. Předmětem mnoha studií je dlouhodobě např. výzkum toxických účinků tabákového kouře a jeho kondenzátu, dieselových a koksárenských emisí, ale existuje pouze několik prací studujících účinky komplexních směsí pocházejících z prachových částic v běžném vnějším ovzduší (Sen et al., 2007).

Pro studium genotoxicity komplexních směsí částic z ovzduší se používá mnoho *in vitro* buněčných modelů. Toxické účinky různých reálných i umělých směsí, které obsahují PAU, byly testovány např. na nádorových buňkách MCF-7. Na těchto buňkách byl sledován účinek SRM1649a (standardní referenční materiál městského prachu), kde se prokázaly změny v genové expresi týkající se hlavně DNA reparace, peroxisomové proliferace, metabolismu a změny v onkogenech a růstových faktorech (Mahadevan et al., 2005). Studium na jaterních progenitorových buňkách potkana WB-F344 prokázalo klíčovou roli AhR aktivovaného působením SRM1649a (Andrysik et al., 2011).

Lidské embryonální plicní fibroblasty (HEL 12469) je modelový buněčný systém vhodný pro studium toxicity inhalovaných komplexních směsí PAU a dalších látek (Binkova et al., 2000; Binkova and Sram, 2004). Na rozdíl od nádorových buněčných linií, které obsahují různé mutace ovlivňující odpověď na poškození DNA, odpovídají HEL více podmínkám *in vivo* (Di Leonardo et al., 1994).

2 CÍLE PRÁCE

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou důležité environmentální kontaminanty vyskytující se ve znečištěném ovzduší a mající vliv na zdraví lidí.

Cílem této dizertační práce je ukázat využití transkriptomiky nejen pro studium širokého spektra účinků PAU, které se vyskytují jako polutanty v komplexních směsích, ale i pro studium detailního mechanismu působení individuálních sloučenin v konkrétním nádorovém onemocnění. První část práce se zabývá změnami v globální genové expresi indukovanými působením organických extraktů prachových částic z ovzduší obsahujících PAU v lidských plicních buňkách. Druhá část se zaměřuje na úlohu jednotlivých PAU při vývoji nádoru prostaty. Je známo, že PAU se podílejí na tomto onemocnění, avšak mechanismus tohoto příspěvku není dosud objasněn.

Předkládanou dizertační práci tvoří soubor 3 publikovaných prací, z nichž každá přispívá k řešení následujících cílů:

1. stanovení účinků komplexních směsí z ovzduší obsahujících PAU v plicní buněčné linii HEL pomocí analýzy genové exprese na celogenomové úrovni, identifikace nejvíce ovlivněných biologických procesů a výběr genů nejvíce přispívajících k deregulaci dané dráhy
2. objasnění mechanismu přežívání genotoxicky poškozených prostatických nádorových buněk po inkubaci s genotoxickými sloučeninami B[a]P a DB[a,l]P
3. stanovení účinků modelových látek B[a]P a TCDD na změny v genové expresi na celogenomové úrovni v lidských nádorových prostatických liniích, porovnání expresních profilů genotoxického karcinogenu B[a]P a negenotoxického karcinogenu TCDD

3 PŘEHLED METOD

Výběr použitých metod, zejména studia exprese na celogenomové úrovni, byl dán především snahou o zachycení všech podstatných změn na úrovni transkripce po působení komplexních směsí i modelových PAU. Ostatní použité metodiky pak sloužily zejména ke specifikaci těchto komplexních směsí (první část dizertační práce) a dále k podpoře a bližší charakterizaci nalezených změn po působení modelových PAU na buňky nádoru prostaty (druhá část dizertační práce). Detailní popis všech metod je uveden v příslušných publikacích.

3.1 ODBĚR PRACHOVÝCH ČÁSTIC Z OVZDUŠÍ A ORGANICKÁ EXTRAKCE

Prachové částice < 2.5 μm byly odebírány vysokoobjemovými samplery HiVol 3000 air sampler (model ECO-HVS3000, Ecotech) s filtry Pallflex T60A20 (Pall) ve čtyřech lokalitách České republiky s různým stupněm znečištění ovzduší. Odběry probíhaly 24 h denně po dobu 30-35 dní v zimním období 2008/2009. Organická hmota z každého filtru byla extrahována směsí 60 ml dichlormetanu a 3 ml cyklohexanu po dobu 3 h. Chemickou extrakci provedla autorizovaná firma ALS Česká republika, s.r.o. Pro *in vitro* experimenty byly jednotlivé extrakty odpařeny, rozpuštěny v DMSO do výsledné koncentrace 50 mg/ml a zamraženy při -80°C .

3.2 FRAKCIONACE ORGANICKÝCH EXTRAKTŮ

Frakcionace a přečištění extraktů pro detailní chemickou analýzu bylo provedeno pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu ve skleněné koloně 250 x 10 mm. Vysušené vzorky rozpuštěné v 0.5 ml hexanu byly nanášeny na kolonu a postupně eluovány 20 ml hexanu (frakce F0), 20 ml směsi hexan/dichlormetan (1:1; frakce F1), 20 ml dichlormetanu (frakce F2) a 20 ml methanolu (frakce F3). Frakce perzistentních organických polutantů byla připravena prolitím alikvotního podílu extraktu vzorku kolonou naplněnou silikagelem impregnovaným 40% roztokem kyseliny sírové.

3.3 SEPARACE POMOCÍ HPLC/DAD, LC/MS-MS A GC/MS

Pomocí kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole byly stanoveny PAU s molekulovou hmotností 128 až 302 g/mol. Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu umožňující speciální režimy detekce iontů (LC/MS-MS) byla použita pro analýzu nitro-, dinitro- a oxy-PAU. Pomocí GC/MS a výše uvedených technik bylo ve vzorcích stanoveno patnáct skupin kontaminantů: lineární a rozvětvené alkany, PAU, alkylované deriváty PAU, oxidované formy PAU, heterocyklické PAU s jedním heteroatomem N a jedním heteroatomem S, estery kyseliny ftalové, sterany, terpany a triterpany, steroly a industriální kontaminaty. Pomocí chemické analýzy bylo ve vzorcích identifikováno a kvantifikováno celkem 258 sloučenin, z toho 209 bylo kvantifikováno pomocí autentických standardů a zbytek pomocí standardů s podobnou strukturou a molekulovou hmotností.

3.4 KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ

3.4.1 Lidské embryonální plicní fibroblasty (HEL)

Lidské embryonální plicní diploidní fibroblasty (HEL 12469, ECACC, UK) byly kultivovány v médiu E-MEM s přísávkem 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, 1% neesenciálních aminokyselin, 0.2% NaHCO₃, penicilinu (50 U/ml) a streptomycinu (50 µg/ml). Buňky rostly na kultivačních miskách při 37°C a 5% CO₂ do 90% konfluence, následně bylo vyměněno čerstvé médium s přísávkem 1% FBS. Vzorky extraktů z jednotlivých lokalit byly rozpuštěny v DMSO a aplikovány do média ve třech subtoxických koncentracích 10, 30 a 60 µg/ml. Buňky byly inkubovány s extrakty v triplikátech po dobu 24h, kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO. Cytotoxicita extraktů na HEL buňkách byla testována pomocí LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Bio Vision) při koncentracích 10, 30, 60 a 100 µg/ml. Významná cytotoxicita byla pozorována pouze u koncentrace 100 µg/ml extraktu z Ostravy-Bartovic (66%) a Třeboně (17%). Pro další analýzy byly proto použity subtoxické koncentrace 10, 30 a 60 µg/ml.

3.4.2 Lidské prostatické nádorové buněčné linie

Prostatická nádorová linie LNCaP (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Německo) a DU-145 (American Type Culture Collection, USA) byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s přísávkem L-glutaminu, NaHCO₃ (2 g/l), 10% fetálního telecího séra (FBS), penicilinu (100 U/ml) a streptomycinu (100 mg/ml). Prostatická nádorová linie PC-3 (American Type Culture Collection, USA) byla kultivována v médiu F12 s přísávkem 10% FBS. Před expozicí modelovým polutantům byla buněčná linie LNCaP nasazena do média RPMI s fenolovou červení a 10% FBS a kultivována v termostatu při teplotě 37 °C 48 hodin. Po 48 hodinách bylo médium vyměněno za médium RPMI bez fenolové červeně s 5% inaktivovaným „charcoal treated“ sérem a 24 hodin kultivována v termostatu.

Expozice modelovým polutantům B[a]P, DB[a,l]P a TCDD rozpuštěných v DMSO trvala 24h. Kontrolní buňky byly inkubovány s DMSO.

3.5 IZOLACE RNA A KONTROLA KVALITY

Buňky HEL a LNCaP byly zlyzovány a z lyzátů byla izolovaná RNA (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel). Integrita RNA a stanovení RIN (RNA Integrity Number) bylo provedeno pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

3.6 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE NA CELOGENOMOVÝCH ČIPECH ILLUMINA

Pro detekci změn v genové expresi v buňkách HEL a LNCaP na celogenomové úrovni byla použita čipová analýza. 200 ng RNA bylo převedeno pomocí reverzní transkripce do cDNA a následně pomocí in vitro transkripce do cRNA značené biotinem (Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit, Ambion). cRNA byla dále inkubována s komplexem streptavidin – Cy3 a hybridizována podle manuálu výrobce na expresní čipy obsahující více než 48 tisíc oligonukleotidových prób pro stejný počet transkriptů

(HumanHT-12 v3 Expression BeadChips, Illumina). Fluorescenční signál byl detekován pomocí skeneru Beadstation 500GX (Illumina).

3.7 VERIFIKACE ČIPOVÉ ANALÝZY POMOCÍ QPCR

Genová exprese vybraných signifikantně změněných transkriptů z čipové analýzy byla ověřena metodou qPCR. RNA vyizolovaná z buněk HEL byla použita na syntézu cDNA (High Fidelity Transcription Kit, Roche). Do reakce bylo přidáno 2.5 μM oligo(dT) a 10 μM náhodných hexamerů jako směs primerů, reakce probíhala za následujících teplotních podmínek: 30 min při 55°C a 5 min při 85°C. Měření PCR reakce bylo prováděno na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) za využití specifické směsi primerů s proubou (PerfectProbe, Primerdesign). Reakční podmínky byly následující: 10 min při 95°C, následovalo 40 cyklů amplifikace (15 s při 95°C, 30 s při 50°C a 15 s při 72°C). Hladiny exprese vybraných genů byly normalizovány k expresi referenčních genů GAPDH a SDHA.

Pro jednodřkovou detekci cílových transkriptů buněk LNCaP pomocí qPCR s reverzní transkripci byl použit QuantiTect Probe RT-PCR kit (Quiagen), primery (Generi Biotech) a specifické TaqMan próby (Universal Probe Library, Roche). Amplifikace s reverzní transkripci probíhala na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) za následujících reakčních podmínek: 20 min při 50°C (reverzní transkripce), následovala iniciace PCR reakce 15 min při 95°C a dále 40 cyklů amplifikace (15 s při 95°C a 60 s při 60°C). Exprese cílových genů byla normalizována k expresi referenčního genu B2M.

Hrubá data byla analyzována za použití SDS Relative Quantification Software verze 2.3 (Applied Biosystems) a byly stanoveny hodnoty Ct.

3.8 STATISTICKÁ ANALÝZA

Souhrnná data z analýzy na čipech byla převedena do R-statistického prostředí (<http://www.r-project.org>) a normalizována kvantilovou metodou (programový balík Lumi; Du 2008). Pouze próby s pravděpodobností detekce $p < 0.01$ ve více než 50% analýz byly zařazeny do další statistické analýzy.

Diferenciální expresní analýza individuálních genů byla provedena s použitím programového balíku Limma. Pro každý gen byl uplatněn lineární model s použitím lmFit konstrukce (Smyth 2004). Korekce pro mnohočetné testování byla provedena Benjamini & Hochberg metodou. Vennovy diagramy byly vytvořeny dle (Oliveros 2007).

Pro detekci deregulovaných drah a genů přispívajících k jejich deregulaci byl použit Goemanův globální test (Goemann et al., 2004) a KEGG databáze signálních drah. Korekce pro mnohočetné testování byla provedena Holmovou metodou (Holm 1979). Pro testování dávkové závislosti jednotlivých genů byl použit Jonckheere – Terprstův test monotonicity (Bewick 2004; Jonckheere 1954).

Ct hodnoty qPCR dat byly analyzovány pomocí GenEx software, verze 5.2.7 (MultiD Analyses AB, Švédsko). Referenční geny byly vybrány podle stability exprese za experimentálních podmínek za použití geNorm Reference Gene Selection Kit (Primerdesign).

3.9 ANALÝZA DNA ADUKTŮ METODOU ³²P-POSTLABELING

Metabolická aktivace a genotoxické účinky PAU byly ověřeny množstvím DNA aduktů. Po expozici testovanými látkami byly LNCaP, Du-145 a PC-3 buňky opláchnuty PBS, přemístěny do mikrozkuvek, zcentrifugovány a buněčný pelet byl zamražen na -80°C. Buněčné pelety byly poté homogenizovány v extrakčním roztoku (10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA a 0,5% SDS, pH 8,0). DNA byla izolována za použití směsí RNAáz A a T1, proteinázy K a fenol/chloroform/isoamylalkoholové precipitace (Binkova et al., 2000). Vzorky byly analyzovány metodou ³²P-postlabeling (Phillips and Castegnaro, 1999; Reddy and Randerath, 1986). Značené DNA adukty byly detekovány pomocí dvourozměrné chromatografie na tenké vrstvě. Autoradiografie byla provedena při -80°C po dobu 1 a 24 hod. Radioaktivita jednotlivých skvrn byla měřena kapalinovým scintilačním počítacem. Ve vzorcích bylo také určeno přesné množství nukleotidů DNA pomocí HPLC s UV detekcí. Hladina DNA aduktů byla vyjádřena jako počet aduktů na 10⁸ nukleotidů.

3.10 WESTERN BLOTTING A IMUNODETEKCE

Metoda byla použita pro sledování akumulace nebo aktivace (fosforylace) proteinů CYP1A1, CYP1A2, p53, Chk1/2, Bcl-X_L, p21, Bax, Bak, Mcl-1, H2AX, E2F1 a WNT5A u LNCaP buněk. Exponované buňky byly sklizeny do lyzačního pufru (1% SDS, 10% glycerol, 100 mM Tris, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄) a zamraženy na -75°C přes noc. Poté byly lyzáty sonikovány. Koncentrace proteinů byla určena za použití kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého (Sigma-Aldrich). Vzorky byly upraveny na stejnou koncentraci bílkovin a byl k nim přidán redukující roztok (65 mM Tris pH 6.8; 10% glycerol; 2% SDS; 5% merkaptoethanol; bromfenolová modř 50 µg/ml) v poměru 1:2. Proteiny byly rozděleny na standardní SDS-PAGE (Bio-Rad) a pomocí polosuchého blottingu přeneseny na PVDF membránu Hybond-F (GE Healthcare). Paralelně byly použity standardy molekulových hmotností (Bio-Rad). Membrány byly po zablokování v 2,5% roztoku odtučněného mléka nebo bovinního sérového albuminu v promývacím pufru (20 mM Tris- HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20) inkubovány s primární protilátkou vázající se na cílový protein. Inkubace s primární protilátkou probíhala ve stejném roztoku, v jakém byly membrány blokovány. Na navázanou primární protilátku se poté navázala sekundární protilátka, konjugovaná s křenuvou peroxidázou. Pro ověření stejného množství proteinu v jednotlivých jamkách byla použita detekce β-aktinu. Proteiny byly vizualizovány použitím chemiluminiscenčního systému ECL Plus (GE Healthcare) podle návodu výrobce.

3.11 DETEKCE APOPTÓZY

Schopnost modelových PAU vyvolat apoptózu byla testována na buněčné linii LNCaP. Po expozici testovanými látkami byly LNCaP buňky opláchnuty PBS, trypsinizovány 0.05% trypsinem a resuspendovány v PBS s 10% FBS v mikrozkuvkách. Po 5 minutové centrifugaci (200 g) byl odstraněn supernatant, buňky byly zafixovány ve 2 ml 70% ethanolu a skladovány přes noc při teplotě 4 °C. Fixované buňky byly barveny DAPI v konečné koncentraci 1 µg/ml 5 min při laboratorní teplotě. Poté byly zcentrifugovány (200 g, 5 min), smíchány s potřebným množstvím roztoku Mowiolu (10% roztok Mowiolu připravený v 25% glycerolu, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) a přeneseny na mikroskopické sklo. S použitím fluorescenčního mikroskopu bylo hodnoceno minimálně 300 jader.

3.12 HODNOCENÍ BUNĚČNÉHO CYKLU A PROLIFERACE

Modulace buněčného cyklu a proliferace modelovými PAU byla sledována na buněčné linii LNCaP. Po expozici testovanými látkami byly LNCaP buňky opláchnuty PBS, trypsinizovány 0.05% trypsinem a resuspendovány v PBS s 10% FBS v mikrozkušnicích. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 minut při 200 g a po odstranění supernatantu zafixována ve 2 ml 70% ethanolu a skladována přes noc při 4 °C. Po odstranění ethanolu a promytí v PBS byly buňky barveny propidium jodidem (Vondracek et al., 2006). Po té byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson) při emisní vlnové délce 617 nm za použití argonového laseru (488 nm, 15 mV). Jednotlivé fáze buněčného cyklu byly vyhodnoceny v programu ModFit LT 3.0 (Verity Software House, Topsham).

4 VÝSLEDKY

V první části je studie (Líbalová et al., 2012; Příloha 1) zabývající se celkovými změnami v genové expresi indukovanými působením organických extraktů z prachových částic z ovzduší v lidských embryonálních plicních fibroblastech (HEL).

Druhá část obsahuje práce (Hrubá et al., 2010 a Hrubá et al., 2011; Příloha 2 a 3), které objasňují změny v genové expresi po působení modelových polutantů v lidských nádorových prostatických buňkách, roli aktivovaného AhR a mechanismus přežívání těchto nádorových buněk.

Příspěvek dizertantky k jednotlivým publikacím:

Kap 4.1: Dizertantka se podílela na kultivaci buněčných kultur, přípravě a zpracování buněčných lyzátů, izolaci RNA, přípravě a provedení microarray analýzy. Dále prováděla ověřování genové exprese vybraných genů metodou qPCR a statistické vyhodnocení výsledků. Rozhodujícím způsobem se podílela na napsání a revizi rukopisu.

Kap. 4.2: Dizertantka se podílela na zpracování buněčných lyzátů, izolaci DNA a analýze DNA aduktů metodou ³²P-postlabeling, dále se účastnila analýzy genové exprese některých genů pomocí qPCR a ověřování jejich proteinových produktů metodou Western blotting. Podílela se také na revizi a opravě rukopisu.

Kap. 4.3: Dizertantka se podílela na přípravě vzorků RNA pro microarray analýzu, dále ověřovala genovou expresi vybraných genů metodou qPCR a prováděla statistické vyhodnocování výsledků. Podílela se také na napsání a revizi rukopisu.

4.1 GLOBÁLNÍ ZMĚNY V GENOVÉ EXPRESI INDUKOVANÉ ORGANICKÝMI EXTRAKTY Z PRACHOVÝCH ČÁSTIC Z OVZDUŠÍ V LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH PLICNÍCH FIBROBLASTECH.

Lidské plicní embryonální fibroblasty (HEL 12469) byly využity jako model cílové tkáně pro inhalační expozici pro stanovení biologických procesů zahrnutých v odpovědi na toxické působení organických extraktů z respirabilních prachových částic z ovzduší (EOM), které byly odebírány ve 4 lokalitách České

republiky lišícími se stupněm a zdroji znečištění ovzduší. Buňky byly inkubovány se třemi subtoxickými koncentracemi (10, 30 a 60 µg/ml) EOMů extrahovaných z prachových částic o velikosti 2.5 µm. Pro maximální komplexnost studie jsme použili celogenomové expresní čipy, které obsahují próby pro více než 48 tisíc transkriptů.

Stanovili jsme diferenciální genovou expresi pro každou koncentraci EOM z každé lokality. Navzdory velkým rozdílům ve zdrojích znečištěného ovzduší mezi jednotlivými lokalitami bylo překvapivě mnoho významně deregulovaných genů společných pro všechny lokality (30 – 60% v závislosti na lokalitě). Tyto výsledky potvrzuje i chemická analýza prokazující kvalitativně obdobné chemické složení jednotlivých extraktů a PCA analýza expresních dat (principal component analysis; analýza principiálních komponent), která zobrazuje shluky jednotlivých vzorků podle podobnosti expresních profilů. V současné studii jsou zobrazeny vzorky shlukující se podle koncentrace a ne podle lokality.

Pro identifikaci deregulovaných signálních drah jsme pro každou lokalitu použili Goemanův globální test a databázi KEGG pathways. Celkem bylo zjištěno 6 deregulovaných signálních drah, které byly společné pro všechny lokality. Nejvýznamněji deregulovaná dráha byl Metabolismus xenobiotik cytochromy P450 a gen nejvíce přispívající k její deregulaci byl CYP1B1.

Genová exprese vybraných genů byla verifikována pomocí qPCR. Ve většině případů vykazovala expresní data dávkovou závislost a vysoce korelovala s daty získanými pomocí microarray analýzy ($r = 0.91$).

4.2 NESCHOPNOST GENOTOXICKÝCH POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ INDUKOVAT P53 DEPENDENTNÍ ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA, APOPTÓZU A ZÁSTAVU BUNĚČNÉHO CYKLU V LIDSKÝCH PROSTATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH LNCAP.

B[a]P a DB[a,l]P byly použity jako modelové genotoxické polutanty pro objasnění mechanismu odpovědi na poškození DNA v lidských prostatických nádorových liniích.

Vliv B[a]P na tvorbu stabilních DNA aduktů byl porovnáván ve třech buněčných liniích odvozených od nádoru prostaty – LNCaP, DU-145 a PC-3. Tvorba signifikantního množství DNA aduktů byla pozorována po třech koncentracích B[a]P (1, 10 a 25 µM) ve všech třech buněčných liniích. Výsledky potvrdila inkubace s DB[a,l]P, který také vytvářel signifikantní množství DNA aduktů.

Pro další pokusy byla vybrána pouze LNCaP buněčná linie, protože představuje nádorové buňky závislé na androgenním signálu (Kizu et al., 2003) a obsahuje neporušenou p53 buněčnou odpověď na poškození DNA (Nelson and Kastan, 1994). Indukce biotransformačních enzymů CYP1A1 a CYP1A2 prokázala aktivaci B[a]P a tvorbu reaktivních metabolitů. Testování účinků B[a]P na buněčný cyklus však neukázalo žádný vliv B[a]P v porovnání s pozitivními kontrolami roscovitinem a UV zářením, které aktivovaly p53 odpověď a zástavu buněčného cyklu v S fázi. Také apoptóza nebyla indukována B[a]P ani DB[a,l]P po 24h nebo 48h inkubaci, narozdíl od působení roscovitinu a UV záření. Vliv mutované PTEN fosfatázy a konstitutivní aktivace PI3K signální dráhy podporující přežívání buněk byl vyloučen použitím specifického inhibitoru wortmanninu. Přídavek wortmanninu zvýšil procento apoptotických buněk ošetřených roscovitinem a UV zářením, avšak žádné zvýšení se neprojevovalo u buněk inkubovaných s B[a]P a DB[a,l]P. Poměr pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů z rodiny apoptotických regulátorů Bcl-2 byl ověřen Western blottingem, avšak nebyl nalezen žádný vliv B[a]P. Neschopnost B[a]P aktivovat v LNCaP buňkách apoptózu je pravděpodobně dána nedostatečnou aktivací p53 buněčné odpovědi. B[a]P neindukoval akumulaci a fosforylaci proteinu p53 a zároveň byla prokázána neschopnost indukce dvouřetězcových zlomů díky nedostatečné fosforylaci histonu H2AX. Podobné výsledky byly pozorovány u DB[a,l]P.

4.3 ZMĚNY GENOVÉ EXPRESE V LIDSKÝCH PROSTATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH INKUBOVANÝCH S GENOTOXICKÝMI A NEGENOTOXICKÝMI LIGANDY ARYL HYDROKARBONOVÉHO RECEPTORU.

Pro objasnění vlivu B[a]P na globální změny v genové expresi a stanovení vlivu aktivovaného AhR jsme porovnávali expresní profily LNCaP buněk inkubovaných s B[a]P a negenotoxickým aktivátorem AhR, TCDD. Čipová analýza odhalila celkem 80 genů, které byly signifikantně změněny po 24h inkubaci s B[a]P a 91 genů po 24h inkubaci s TCDD. Identifikovali jsme velký překryv genů deregulovaných po inkubaci s B[a]P i TCDD – 59 genů bylo společných pro oba polutanty. Up-regulované geny společné pro obě inkubace byly zahrnuté zejména v metabolismu xenobiotik, který je pod kontrolou AhR. Exprese genů CYP1A1 a CYP1A2 byla signifikantně zvýšena a potvrdila tak aktivaci AhR po aplikovaných dávkách B[a]P a TCDD. Analýza signálních drah s využitím KEGG databáze prokázala společné down-regulované dráhy po inkubaci B[a]P a TCDD související s DNA reparací, replikací,

progresí buněčného cyklu a mitózou. Procesy up-regulované po působení obou sloučenin se týkaly hlavně metabolismu. Vybrané geny byly verifikovány pomocí qPCR.

Zvýšená genová exprese Wnt5A, důležitého indikátoru progresu nádoru prostaty, byla prokázána na proteinové úrovni; obě sloučeniny B[a]P i TCDD signifikantně indukovaly expresi proteinu v LNCaP buňkách. Podobně byla ověřena exprese proteinu E2F1, klíčového transkripčního faktoru buněčného cyklu a proliferace. Snížené množství proteinu odpovídá snížené genové expresi po inkubaci s B[a]P i TCDD. Časově závislá modulace genové exprese vybraných genů byla stanovena pro 3 různé časové expozice (6, 12 a 24h) B[a]P a TCDD. Exprese genů CYP1A1 a Wnt5A byla zvýšena po inkubaci s B[a]P i TCDD ve všech třech testovaných časech. Výsledky naznačují přímou regulaci aktivovaného AhR. Oproti tomu exprese genů E2F1 a CDC2, které jsou zahrnuty v buněčném cyklu, nebyla ovlivněna B[a]P a TCDD po kratších inkubacích 6 a 12h; genová exprese byla signifikantně snížena až po 24h inkubaci s oběma sloučeninami. Podobné výsledky byly pozorovány také pro modulaci exprese reparačních genů EXO1 a FEN1.

5 DISKUZE

5.1 STUDIUM GLOBÁLNÍCH ZMĚN V GENOVÉ EXPRESI PO PŮSOBNÍ ORGANICKÝCH EXTRAKTŮ RESPIRABILNÍCH PRACHOVÝCH ČÁSTIC V LIDSKÝCH PLICNÍCH EMBRYONÁLNÍCH FIBROBLASTECH

Ve studii Líbalová et al., 2012 byly identifikovány globální změny genové exprese na úrovni individuálních genů i biologických drah indukované organickými extrakty z respirabilních prachových částic v ovzduší aplikovanými na buněčnou linii lidských plicních embryonálních fibroblastů (HEL 12469). Extrakty byly odebrány ve 4 lokalitách České republiky, které se liší mírou i hlavními zdroji znečištění ovzduší. Ostrava – Bartovice je rezidenční oblast znečištěná především hutním a koksárenským průmyslem v blízkém okolí, v Karviné znečištění ovzduší také odpovídá zejména průmyslovým zdrojům, v Ostravě – Porubě je největší příspěvek ke znečištění z dopravy a v Třeboni je znečištění ovzduší způsobeno zejména lokálními topeništi (Topinka et al., 2011). Pro porovnání toxických účinků z těchto lokalit byly buňky HEL inkubovány s extrakty ve 3 subtoxických koncentracích 10, 30 a 60 $\mu\text{g/ml}$ a genová exprese byla analyzována pomocí celogenomových čipů firmy Illumina.

Množství deregulovaných genů ve všech lokalitách bylo přímo úměrné dávce extraktů – nejvíce genů bylo deregulováno po inkubaci s extraktem o koncentraci 60 μg extraktu/ml. Navzdory různým zdrojům znečištění ovzduší v různých lokalitách existuje překvapivě vysoký překryv v seznamech kvalitativně stejně deregulovaných genů (30 – 68%). Tento vysoký překryv deregulovaných genů pro jednotlivé lokality po inkubaci s extrakty odpovídá chemickému složení jednotlivých extraktů, které se kvalitativně významně neliší. Výsledky byly potvrzeny analýzou hlavních komponent (Principle Component Analysis – PCA), kde se jednotlivé vzorky shlukují podle podobnosti v expresních profilech. V této analýze je zřejmý trend shlukování vzorků podle koncentrace a ne podle lokality. Přes velkou kvalitativní podobnost v chemickém složení extraktů však bylo detekováno 32% deregulovaných genů specifických pouze pro lokalitu Ostrava – Bartovice, což může souviset s relativně vyšším obsahem toxických komponent ve vzorcích z této lokality.

Pro hlubší interpretaci změn expresních profilů byla použita analýza genové exprese na úrovni biologických drah s využitím databáze Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), která

zahrnuje kromě signifikantně změněných genů s velkou změnou také geny se změnou malou, ale koordinovanou, jejichž individuální hodnota změny je pod hranicí statistické signifikance.

Vzhledem k relativně vysokému množství PAU, jejich derivátů a sloučenin vázaných na PM_{2,5} byla pro extrakty ze všech lokalit nejvýznamněji ovlivněna dráha Metabolismus xenobiotik cytochromy P450. Gen s největším příspěvkem k deregulaci dráhy, CYP1B1, byl významně zvýšen ve všech lokalitách. CYP1B1 metabolizuje zejména PAU, dále N-heterocyklické aminy, arylaminy, aminoazobarviva a další karcinogeny (Guengerich et al., 2000). Kromě metabolismu xenobiotik CYP1B1 přispívá k metabolismu cholesterolu, steroidních hormonů, kyseliny arachidonové a dalších lipidů, metabolismu kyseliny retinoové a také k syntéze a metabolismu vitamínu D3 (Nebert and Russell, 2002). Indukce CYP1B1 je pod kontrolou AhR, který je aktivován různými PAU. Funkce AhR byla již popsána v souvislosti s toxickým působením komplexních směsí, např. SRM1469a (Andryšik et al., 2011). Dalšími enzymy zapojenými do Metabolismu xenobiotik cytochromy P450 je skupina glutathion-S-transferáz. MGST1 a GSTM5 detoxifikují reaktivní elektrofilny konjugací s redukováným glutathionem (Kelner et al., 1996; Xu et al., 1998) a GSTO1 působí jako glutathion-dependentní thiol transferáza a dehydroaskorbát reduktáza (Whitbread et al., 2005).

Další proces významně deregulovaný ve všech lokalitách byla Biosyntéza steroidních hormonů, významný cíl endokrinních disruptorů (Sanderson, 2006). Největší příspěvek k deregulaci měl CYP1B1, který mimo jiné hydroxyluje estrogen (Tsuchiya et al., 2005), dále aldoketoreduktázy a hydroxysteroid- β -dehydrogenázy. Bylo popsáno několik mechanismů modulace steroidní signalizace chemickými látkami přímo nebo aktivací AhR (Ohtake et al., 2008; Shanle and Xu, 2010). Předchozí studie naznačují, že aktivace AhR a AhR – dependentní změny v genové expresi převládají nad genotoxickými a apoptotickými procesy (Andryšik et al., 2011). Detailní chemická analýza extraktů naznačuje, že PAU jsou zde významně zastoupeny a přispívají největší měrou k endokrinní disrupci a deregulaci Biosyntézy steroidních hormonů, na rozdíl od persistentních organických polutantů.

Wnt signální dráhu, deregulovanou ve všech lokalitách, tvoří síť proteinů účastnících se různých vývojových, fyziologických i nádorových procesů. Nedávné studie prokazují interakci Wnt/ β -catenin signální dráhy s aktivovaným AhR (Mathew et al., 2008; Prochazkova et al., 2011). Gen NKD2, který přispívá nejvíce k deregulaci dráhy, funguje jako buněčný autonomní agonista kanonické Wnt signální dráhy (Katoh, 2001). Exprese genů WNT2 a CCND2 byla signifikantně snižena ve všech lokalitách.

TGF- β signální dráha, která zahrnuje množství cytokinů regulujících široké spektrum buněčných funkcí, jako např. buněčný růst a proliferaci, apoptózu, diferenciaci a migraci pomocí receptorů typu I

a II (Shi and Massague, 2003), byla také významně deregulovaná ve všech lokalitách. V této studii nejvíce přispívala k deregulaci této dráhy zvýšená exprese genu BMP2, antagonisty TGF- β signalizace, který má funkci v osteogenezi, buněčné diferenciaci, růstu a invazivitě (McLean et al., 2011). Současně přispívaly k deregulaci dráhy i down-regulovaný gen SMAD3, efektor TGF- β signalizace, a transkripční faktory ID1 a ID2, které negativně regulují buněčnou diferenciaci (Langlands et al., 1997). V nedávné studii byl navržen mechanismus suprese TGF- β signalizace aktivovaným AhR (Gomez-Duran et al., 2009).

Další dráha signifikantně deregulovaná ve všech lokalitách byly ABC transportéry, transmembránové proteiny, které jsou zodpovědné za aktivní transport různých sloučenin přes buněčnou membránu (Vasiliou et al., 2009). V naší studii byly nejvýznamněji deregulovány transportéry rodiny C (C4 a C5), které zajišťují transport iontů a toxinů a rodiny B (B6 a B9) přenášející zejména peptidy (Davidson et al., 2008).

Poslední dráha deregulovaná ve všech lokalitách byl Metabolismus glycerolipidů. Diacylglycerol a kyselina fosfatidová jsou důležité meziprodukty této dráhy, diacylglycerol funguje také jako klíčová signální molekula pro aktivaci proteinkináz, buněčné přežívání a proliferaci. Deregulace této dráhy je způsobena hlavně zvýšenou expresí aldoketoreduktáz (AKR1B1) katalyzující NADPH – dependentní redukci různých sloučenin obsahující karbonylové skupiny na příslušné alkoholy (Nishimura et al., 1990). Karbonylové skupiny se pravděpodobně nacházejí i v řadě sloučenin obsažených v extraktech z částic PM_{2.5} ze všech lokalit.

Mnoho dalších drah bylo signifikantně deregulováno pouze v některých lokalitách. Metabolismus glutathionu byl deregulován po inkubaci buněk s extraty z Ostravy-Bartovic, Ostravy-Poruby a z Karviné; po extraktu z Třeboně, zemědělské oblasti, nebyla tato dráha významně ovlivněna. Geny tvořící dráhu Metabolismu glutathionu patří mezi enzymy II. fáze biotransformace xenobiotik a enzymy chránící proti oxidačnímu stresu. Geny Metabolismu kyseliny arachidonové mají úlohu v prozánětlivé odpovědi (TBXAS1, PTGS2) a ochraně proti oxidačnímu poškození (GPX3). Dráha p53 signalizace byla deregulovaná pouze po inkubaci s extraktem z Ostravy-Bartovic, nejvíce znečištěné průmyslové oblasti. V této studii nebyla pozorována žádná indukce p53 cílových genů, která by odpovídala supresivní roli aktivovaného AhR (Chopra and Schrenk, 2011). Funkce genů významně přispívající k deregulaci dráhy Mezerová buněčná spojení je důležitá spíše pro funkci mikrotubulů, mitózu a těsná mezibuněčná spojení. Na základě chemické analýzy a expresních dat je obtížné

stanovit důvod, proč jsou některé dráhy specificky deregulované pouze v některých lokalitách. Tato data mohou sloužit jako podklad pro následnou detailnější analýzu.

Tato studie jako první popisuje vliv reálné komplexní směsi vzdušných polutantů na genovou expresi v embryonálních lidských plicních fibroblastech na celogenomové úrovni. Byly detekovány specificky deregulované signální dráhy po působení organických extraktů pocházejících z různě znečištěných lokalit na buňky HEL; zásadní vliv na deregulaci většiny toxikologicky významných drah má s největší pravděpodobností aktivace AhR. Výsledky této studie mohou být v budoucnosti využity pro detailnější mechanistické studie zabývající se úlohou jednotlivých drah.

5.2 STUDIUM EXPOXICE PAU NA VÝVOJ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PROSTATY

Ve studiích Hrubá et al., 2010 a Hrubá et al., 2011 jsou popsána data, která mohou přispívat k částečnému objasnění mechanismu transdiferenciace neuroendokrinních buněk.

Studie z roku 2010 se zabývá vlivem B[a]P na vznik DNA aduktů a odpovědi na genotoxické poškození ve třech různých prostatických liniích (LNCaP, DU-145 a PC-3). Pro porovnání genotoxických účinků byl kromě B[a]P použit také DB[a,l]P, který má silnější genotoxický potenciál.

Všechny tři linie vykazovaly tvorbu DNA aduktů po 24 h působení B[a]P v koncentracích 1, 10 a 25 μM , nejvyšší hladina DNA aduktů byla nalezena v buněčné linii DU-145 a nejnižší v PC-3. Stejně výsledky poskytoval DB[a,l]P s tím rozdílem, že k tvorbě DNA aduktů v buněčné linii DU-145 došlo již při 100 nM koncentraci DB[a,l]P.

Analýza genové exprese biotransformačních enzymů na úrovni mRNA prokázala u LNCaP po 24h expozici 25 μM B[a]P zvýšenou transkripci CYP1A1 a CYP1A2, zatímco exprese CYP1B1 zvýšena nebyla, ačkoli má významnou roli v aktivaci B[a]P a DB[a,l]P (Topinka et al., 2008). Tato data byla potvrzena i na proteinové úrovni a prokazují tak tvorbu BPDE-DNA aduktů za účasti enzymů CYP1A1/1A2. U buněčných linií DU-145 a PC-3 dochází ke konstitutivní expresi CYP1A1/1A2 (Sterling and Cutroneo, 2004), a proto mohla být potlačena indukce CYP1B1. Pro další testování byla vybrána linie LNCaP, která na rozdíl od DU-145 a PC-3 představuje androgen-senzitivní model, která se využívá při studiu anti-androgenních vlivů environmentálních kontaminantů (Kizu et al., 2003) a obsahuje neporušený p53-dependentní systém odpovědi na poškození DNA (Nelson and Kastan, 1994).

p53 tumor supresorový protein je centrální transkripční faktor, který se akumuluje při odpovědi na poškození DNA působením PAU a vzniku aduktů (Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995). p53 protein má klíčovou roli při integraci signálů buněčné odpovědi na genotoxický stres, zahrnující regulaci apoptózy, zástavu buněčného cyklu, indukce DNA reparace, senescence a zachování genomické stability (Vousden and Lane, 2007). Bylo prokázáno, že PAU s genotoxickými účinky indukují apoptózu a zástavu buněčného cyklu v S fázi u plicních fibroblastů (Binkova et al., 2000) i jiných typech buněk (Chramostova et al., 2004; Khan and Dipple, 2000). V této studii však nebyla pozorována akumulace a fosforylace p53. Navzdory vysokým hodnotám DNA aduktů u LNCaP buněk inkubovanými s B[a]P a DB[a,l]P nedošlo k zástavě buněčného cyklu a indukci apoptózy. Po působení 25 μ M B[a]P nebyla pozorována zástava buněk v S fázi, mírné zvýšení počtu buněk v G1 fázi nastalo pravděpodobně v důsledku aktivace AhR a jeho anti-androgenního účinku (Morrow et al., 2004). Zástava v S fázi buněčného cyklu byla pozorována po působení pozitivních kontrol 25 μ M roscovitinu a UV-C záření (0.01 J.cm⁻²), jež aktivují signální dráhu p53. Po 24h ani 48h inkubaci buněk s B[a]P a DB[a,l]P nebyla pozorována fragmentace jader značící apoptózu, zatímco 25 μ M roscovitin a UV-C záření indukovaly statisticky významné zvýšení fragmentace jader již po 24h. Na transkripční úrovni nebyla pozorována aktivace genové exprese u cílových genů p53 signální dráhy, které jsou spojené se zástavou buněčného cyklu (p21^{CIP1}, GADD45A), apoptózou (PUMA, NOXA) nebo nukleotidovou excisní reparací (DDB2, XPC).

Konstitutivní aktivace PI3K signální dráhy v důsledku neaktivní fosfatázy PTEN je důležitá pro přežívání LNCaP buněk (Carson et al., 1999). Pro ověření hypotézy, zda je přežívání buněk způsobeno konstitutivně aktivní PI3K signální dráhou, byl použit specifický inhibitor PI3K dráhy wortmannin. Po 30 min působení 100 μ M wortmanninu došlo ke zvýšené indukci apoptózy u buněk ošetřených UV-C zářením nebo roscovitinem, avšak u buněk inkubovaných s B[a]P nebo DB[a,l]P k indukci apoptózy nedošlo.

Přežívání nádorových buněk může také způsobit modulace apoptózy (Yang et al., 2003). Metodou Western blotting se neprokázala exprese pro-apoptických (Bax, Bak) nebo anti-apoptických proteinů (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1), žádný z těchto proteinů nebyl působením B[a]P ovlivněn. Stejně výsledky poskytovala inkubace s modelovým aktivátorem AhR, TCDD, který postrádá genotoxický potenciál.

V buněčné linii LNCaP má v aktivaci p53 a indukci apoptózy zásadní úlohu tvorba dvouřetězcových zlomů, zatímco jiné typy DNA poškození nespouští p53 buněčnou odpověď (Nelson and Kastan, 1994). Absence fosforylace histonu H2AX po inkubaci LNCaP buněk s B[a]P v této studii vysvětluje

nepřítomnost dvouřetězcových zlomů a neschopnost aktivace p53 signální dráhy. Tuto hypotézu dále podporuje fosforylace proteinu Chk1 po 24h působení 25 μ M B[a]P a UV-C záření, který je indukován přítomností jednořetězcových zlomů a vznikem DNA aduktů. K fosforylaci Chk2, který je indukován dvouřetězcovými zlomy, po působení B[a]P nedošlo; tyto výsledky korelují s absencí fosforylace histonu H2AX. Aktivovaná Chk1 může chránit buňky před apoptózou a podporovat jejich přežívání (Myers et al., 2009; Sidi et al., 2008).

Různé typy DNA lézí, včetně O-methylovaných a N-alkylovaných DNA bazí, pyrimidinových dimerů a DNA křížových spojení, vedou k tvorbě dvouřetězcových zlomů, indukci p53 signální dráhy a apoptóze (Nelson and Kastan, 1994). Uvedené výsledky naznačují, že neschopnost B[a]P indukovat v buněčné linii LNCaP apoptózu, zástavu buněčného cyklu nebo opravy může souviset s neschopností indukovat dvouřetězcové zlomy a aktivovat protein p53. V důsledku neaktivního p53 i po působení PAU dochází k akumulaci poškození DNA, přežívání buněk a rozvoji nádorového fenotypu.

Studie Hrubá et al. z roku 2011 se zabývá negenotoxickými účinky B[a]P na LNCaP buněčnou linii a objasňuje zásadní roli aktivace AhR. B[a]P má širokou škálu toxických účinků, k nádorové promoci a progresi přispívá nejenom tvorbou DNA aduktů a oxidačního stresu (Hockley et al., 2007; Hockley et al., 2008). Ačkoli jsou karcinogenní účinky B[a]P připisovány zejména genotoxicitě a mutagenitě, B[a]P se efektivně váže na AhR (Machala et al., 2001), důležitý regulátor karcinomu prostaty (Fritz et al., 2007). Ve studii (Hrubá et al., 2010) bylo prokázáno, že B[a]P nespouští v androgen-senzitivním modelu prostatických buněk odpověď na poškození DNA a toxické účinky B[a]P mohou být zprostředkovány aktivací AhR. Pro studium vlivu negenotoxických účinků B[a]P byla provedena analýza celogenomové exprese a výsledky byly porovnány s modelovým negenotoxickým AhR ligandem TCDD.

PAU jsou schopné inhibovat buněčný cyklus v androgen-senzitivním modelu prostatických nádorových buněk a mají anti-androgenní účinek (Kizu et al., 2003). Různé studie prokazují, že B[a]P a jeho metabolity mohou působit i nepřímo na buněčný cyklus a aktivovat různé signální dráhy vedoucí k jeho zastavení (Puga et al., 2009). V některých nádorových buněčných liniích (HepG2, MCF-7) byl popsán odlišný účinek B[a]P a TCDD v regulaci exprese genů různých procesů (Hockley et al., 2007). V této studii však byla porovnáním expresních profilů buněk LNCaP po působení B[a]P a TCDD nalezena řada stejných down-regulovaných genů zahrnutých v procesech DNA replikace, reparace, mitózy a kontroly buněčného cyklu. Deregulace cyklinů, cyklin-dependentních kináz a některých genů

spojených s tvorbou mitotického vřeténka a mitotického kontrolního bodu poukazuje na nepřímou inhibici průběhu buněčného cyklu. Analýza časového průběhu působení B[a]P a TCDD prokázala významnou down-regulaci některých genů zahrnutých v buněčném cyklu (CDK2, E2F1) a DNA reparaci (EXO1, FEN1) až po 24h oproti 6h a 12h inkubaci; změny v těchto genech poukazují na nepřímé působení aktivovaného AhR.

Další společné down-regulované geny po expozici B[a]P a TCDD jsou zahrnuty v DNA reparaci. Ačkoli AhR ligandy mohou indukovat expresi genů zahrnutých v nukleotidové excisní reparaci nebo homologní rekombinaci (Chan et al., 2004; Schreck et al., 2009), v této studii byly reparační geny down-regulovány pravděpodobně ve vztahu k inhibici buněčného cyklu.

Zásadní otázka předchozí publikace (Hrubá et al., 2010) byla neschopnost B[a]P indukovat apoptózu i přes rozsáhlá genotoxická poškození. Byl navržen pravděpodobný mechanismus, kdy B[a]P i přes tvorbu DNA aduktů nezpůsobuje dvouřetězcové zlomy a neindukuje p53 signální dráhu vedoucí k apoptóze. Současná studie odhaluje deregulaci několika genů zahrnutých v regulaci buněčného cyklu a apoptóze. E2F1 transkripční faktor je důležitý regulátor buněčného cyklu, který je rovněž zahrnutý v indukcii apoptózy v odpovědi na poškození DNA. Acetylace a fosforylace E2F1 vede k aktivaci p73 a indukcii apoptózy (Wu et al., 2009). Existuje i alternativní cesta p53 – dependentní indukce apoptózy, ke které E2F1 přispívá, ale jeho přesná úloha je zatím nejasná (Wu et al., 2009). V této studii je E2F1 významně down-regulován po působení B[a]P i TCDD, tento mechanismus pravděpodobně přispívá k inhibici apoptózy a přežívání LNCaP buněk i přes vysokou hladinu DNA aduktů. Další deregulovaný transkript, BCL6, je negativní regulátor apoptózy, který přispívá k přežívání nádorových buněk v odpovědi na chemoterapeutika (Kurosu et al., 2003; Phan and Dalla-Favera, 2004). Tento gen byl významně up-regulovaný po působení B[a]P a TCDD. Kromě neschopnosti aktivace p53 signální dráhy je pravděpodobné, že deregulace E2F1 a BCL6 přispívají k přežívání LNCaP buněk i přes přítomnost velkého počtu DNA aduktů. Efekty však byly pozorovány až po 24h inkubaci, proto je otázka, nakolik jsou v mechanismu inhibice apoptózy klíčové.

Úloha AhR v regulaci a vývoji karcinomu prostaty je spojena také s proteinem WNT5A, členem nekanonické Wnt dráhy (Vezina et al., 2009). WNT5A signalizace přispívá k vývoji prostatické žlázy (Huang et al., 2009) a jeho exprese je zvýšena v nádoru prostaty, přispívá k progresi onemocnění, metastázím a relapsu po prostatektomii (Stanbrough et al., 2006; Yamamoto et al., 2010). Po působení B[a]P i TCDD došlo již po 6h inkubaci k indukcii exprese mRNA i proteinu WNT5A. Zvýšená exprese WNT5A koreluje i s vysoce zvýšenou expresí CYP1A1 a hladinou DNA aduktů, která je spojena

s biochemickou recidivou po prostatektomii (Rybicki et al., 2008). Další gen spojený s epiteliálně-mezenchymální tranzicí a agresivitou nádoru, FOXQ1 (Qiao et al., 2011), byl rovněž signifikantně zvýšen po inkubaci s B[a]P a TCDD.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že model karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků, B[a]P, indukuje změny v genové expresi, které jsou do značné míry podobné jako změny v genové expresi vyvolané negenotoxickým modelovým AhR ligandem TCDD. Down-regulace genů zapojených do DNA replikace a reparace, mitózy a progresu buněčného cyklu po inkubaci s oběma sloučeninami B[a]P i TCDD naznačuje, že anti-proliferativní působení B[a]P může souviset s AhR – dependentní inhibicí buněčného cyklu a ne s genotoxickými účinky. LNCaP buněčná linie může být dobrým modelem pro studium genotoxických i negenotoxických účinků ve vztahu k aktivaci AhR. Down-regulace genů spojených s DNA reparací naznačuje, že PAU mohou prostřednictvím aktivace AhR narušovat reparaci DNA aduktů, které se vytváří v důsledku jejich genotoxického působení. Dále mohou PAU narušovat dráhy regulace buněčného cyklu a spuštění apoptózy a přispívat tím k přežívání buněk s poškozenou DNA. Schopnost PAU indukovat WNT5A a další geny asociované s nádorovou progresí poukazuje na jejich úlohu v rozvoji nádoru prostaty.

Mnoho environmentálních polutantů působí jako endokrinní disruptory, modulují např. syntézu, transformaci a transport steroidních hormonů nebo ovlivňují činnost steroidních receptorů. Vzájemná interakce těchto receptorů s jinými jadernými receptory, např. AhR, přispívá k přežívání a proliferaci normálních i nádorových buněk. Účinek těchto látek může být dále ovlivňován genotoxickým poškozením, které indukuje zástavu buněčného cyklu, reparaci DNA nebo apoptózu (Pliskova et al., 2005).

PAU byly mnoha studiemi prokázány jako endokrinní disruptory (Santodonato, 1997). Práce (Hrubá et al., 2010) využívá modelové látky B[a]P a DB[a,l]P pro získání představy o mechanismu genotoxického působení v androgen-senzitivní nádorové buněčné linii LNCaP. Výsledky naznačují, že i přes významnou hladinu DNA aduktů, markerů genotoxického poškození, nevytváří modelové genotoxiny dvouřetězcové zlomy v DNA, neindukují p53 buněčnou odpověď a následnou zástavu buněčného cyklu, reparaci DNA nebo apoptózu. Tato skutečnost přispívá k objasnění mechanismu přežívání androgen-senzitivních prostatických buněk, které v důsledku akumulace poškození DNA mohou měnit svůj fenotyp a tvořit tak nádorové buňky, které již neodpovídají na androgenní signály a související hormonální terapii.

Některé PAU mají řadu negenotoxických účinků, např. aktivují AhR. Anti-androgenní účinky PAU v LNCaP byly prokázány přímým antagonistickým působením aktivovaného AhR, který zabraňuje vazbě AR na responsivní element DNA (Kizu et al., 2003). Vliv modelového genotoxinu s prokázanými negenotoxickými účinky B[a]P na aktivaci AhR byl sledován ve studii (Hrubá et al., 2011). Změny v genové expresi, analýza signálních drah a porovnání s účinky TCDD, významného AhR aktivátoru, prokázaly klíčové zapojení aktivovaného AhR do inhibice buněčného cyklu, proliferace, reparace DNA a apoptózy. Potlačení procesů souvisejících s DNA reparací a apoptózou může vést k přežívání genotoxicky poškozených buněk.

Nádor prostaty je jedním z nejrozšířenějších nádorových onemocnění, avšak molekulární etiologie tohoto onemocnění není přesně známá. V počátečním stadiu je růst prostatických nádorových buněk závislý na přítomnosti androgenů. Anti-androgenní terapie je v tomto stadiu účinná, ale pouze přechodně, u většiny pacientů časem dochází k relapsu a rozvoji agresivnímu metastázujícímu onemocnění, které je resistantní na anti-androgenní léčbu. Studie (Hrubá et al., 2010; Hrubá et al., 2011) objasňují úlohu environmentálních polutantů PAU v tomto onemocnění a významnou měrou přispívají k odhalení mechanismu vzniku rezistence androgen-senzitivních nádorových buněk.

6 ZÁVĚR

V předkládané dizertační práci jsem ukázala význam využití transkriptomiky při studiu škodlivých účinků environmentálních polutantů.

Analýza genové exprese na úrovni celého genomu umožňuje identifikaci významně deregulovaných drah i v tak složitém systému, jako je buněčná odpověď na expozici komplexním směsím vzdušných polutantů. Následná detailnější analýza těchto dráh může výrazně přispět k získání jasnější představy o mechanismech působení reálných směsí na lidský organismus.

Transkriptomika je však přínosná například i pro studium patogeneze konkrétních nádorových onemocnění, kde přispívá k objasnění dílčích mechanismů vedoucích ke vzniku nebo vývoji tohoto onemocnění. Působením modelových polutantů z ovzduší můžeme sledovat detailní účinek na vybrané procesy a s využitím řady dalších metod tak přispět ke hlubším poznatkům o mechanismu onemocnění.

Hlavní závěry práce, které zároveň naplňují stanovené cíle, jsou následující:

1. Stanovili jsme hlavní změny v genové expresi na celogenomové úrovni na modelu lidských embryonálních fibroblastů a využili jsme čipovou technologii k vyhodnocení účinků reálných komplexních směsí vzdušných polutantů obsahujících PAU. Identifikovali jsme nejvýznamnější biologické procesy a geny nejvíce přispívající k deregulaci těchto procesů. Data naznačují, že ačkoli se jednotlivé lokality lišily původem znečištění ovzduší, biologické účinky organických extraktů se kvalitativně významně neliší. Klíčovou roli v deregulaci biologických procesů hraje aktivovaný AhR.
2. V rámci objasnění mechanismu vývoje nádorového onemocnění prostaty jsme sledovali působení modelových karcinogenních polutantů B[a]P a DB[a,l]P v prostatické nádorové buněčné linii LNCaP. Po inkubaci s oběma sloučeninami byla v těchto buňkách pozorována neschopnost indukovat p53 buněčnou odpověď a geny regulující apoptózu, zástavu buněčného cyklu a reparaci DNA i přes významné genotoxické poškození indukované tvorbou DNA aduktů. Nedostatečná odpověď na poškození DNA zřejmě souvisí s omezenou schopností B[a]P a DB[a,l]P tvořit dvouřetězcové zlomy. Tato skutečnost přispívá k přežívání genotoxicky poškozených buněk a může podporovat vývoj nádoru.

3. Pomocí čipové technologie jsme stanovili změny v genové expresi indukované karcinogeny B[a]P a TCDD v buněčné linii LNCaP. Buňky LNCaP inkubované s modelovým genotoxinem B[a]P indukovaly podobné změny v genové expresi jako buňky inkubované s negenotoxickým TCDD, aktivátorem AhR. Down-regulované geny byly zahrnuty zejména v replikaci DNA a reparaci, mitóze a buněčném cyklu. Inhibice těchto procesů souvisí s negenotoxickými a anti-proliferativními účinky B[a]P, které jsou způsobeny aktivovaným AhR. Tyto změny mohou podporovat přežívání buněk s poškozenou DNA.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- ACS, 2009. Cancer Facts & Figures 2008. American Cancer Society.
- Amorino, G. P., Parsons, S. J., 2004. Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 14, 287-300.
- Andrysik, Z., Vondracek, J., Marvanova, S., Ciganek, M., Neca, J., Pencikova, K., Mahadevan, B., Topinka, J., Baird, W. M., Kozubik, A., Machala, M., 2011. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 714, 53-62.
- Aronson, K. J., Wilson, J. W., Hamel, M., Diarsvitri, W., Fan, W., Woolcott, C., Heaton, J. P., Nickel, J. C., Macneily, A., Morales, A., 2009. Plasma organochlorine levels and prostate cancer risk. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 20, 434-45.
- ATSDR, 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Department of Health and human Services.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen.* 45, 106-14.
- Binkova, B., Giguere, Y., Rossner, P., Jr., Dostal, M., Sram, R. J., 2000. The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res.* 471, 57-70.
- Binkova, B., Sram, R. J., 2004. The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res.* 547, 109-21.
- Binkova, B., Vesely, D., Vesela, D., Jelinek, R., Sram, R. J., 1999. Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat Res.* 440, 45-58.
- Bolt, H. M., Foth, H., Hengstler, J. G., Degen, G. H., 2004. Carcinogenicity categorization of chemicals- new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett.* 151, 29-41.
- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Tornqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 3, 451-88.
- Bourdon, J. C., Laurenzi, V. D., Melino, G., Lane, D., 2003. p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death Differ.* 10, 397-9.
- Brown, D. A., Delzell, E., 2000. Motor vehicle manufacturing and prostate cancer. *Am J Ind Med.* 38, 59-70.
- Burchiel, S. W., Luster, M. I., 2001. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin Immunol.* 98, 2-10.
- Burczynski, M. E., Penning, T. M., 2000. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 60, 908-15.
- Butterworth, B. E., Bogdanffy, M. S., 1999. A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments. *Regul Toxicol Pharmacol.* 29, 23-36.
- Carson, J. P., Kulik, G., Weber, M. J., 1999. Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res.* 59, 1449-53.

- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., 1990. Radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Free Radic Res Commun.* 11, 77-87.
- Chan, C. Y., Kim, P. M., Winn, L. M., 2004. TCDD affects DNA double strand-break repair. *Toxicol Sci.* 81, 133-8.
- Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., 1998. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol.* 8, 263-73.
- Charles, G. D., Bartels, M. J., Zacharewski, T. R., Gollapudi, B. B., Freshour, N. L., Carney, E. W., 2000. Activity of benzo[a]pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor-alpha reporter gene assay. *Toxicol Sci.* 55, 320-6.
- Chopra, M., Schrenk, D., 2011. Dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor signaling, and apoptosis-persistent pollutants affect programmed cell death. *Crit Rev Toxicol.* 41, 292-320.
- Chramostova, K., Vondracek, J., Sindlerova, L., Vojtesek, B., Kozubik, A., Machala, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 196, 136-48.
- Clancy, S., 2008. Genetic mutation. *Nature Education* 1.
- Collins, J. F., Brown, J. P., Alexeeff, G. V., Salmon, A. G., 1998. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *Regul Toxicol Pharmacol.* 28, 45-54.
- Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Zhang, J., Bartsch, G., Klocker, H., 1997. Synergistic activation of androgen receptor by androgen and luteinizing hormone-releasing hormone in prostatic carcinoma cells. *Prostate.* 32, 106-14.
- Dalton, T. P., Puga, A., Shertzer, H. G., 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact.* 141, 77-95.
- Davarinos, N. A., Pollenz, R. S., 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem.* 274, 28708-15.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72, 317-64, table of contents.
- Degner, S. C., Papoutsis, A. J., Selmin, O., Romagnolo, D. F., 2009. Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J Nutr.* 139, 26-32.
- Denis, L., Murphy, G. P., 1993. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer.* 72, 3888-95.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., Wahl, G. M., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540-51.
- Dixon, K., Koprass, E., 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 14, 441-8.
- EC, 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. ANNEX S. C. o. Food
- EFSA, 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal.* 724, 1-114.
- EHC, 1998. Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Health Criteria.* 202.
- Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., Hughes, M. F., 1990. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30, 1-45.

- Feron, V. J., Cassee, F. R., Groten, J. P., 1998. Toxicology of chemical mixtures: international perspective. *Environ Health Perspect.* 106 Suppl 6, 1281-9.
- Feron, V. J., Groten, J. P., 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food Chem Toxicol.* 40, 825-39.
- Fielden, M. R., Zacharewski, T. R., 2001. Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci.* 60, 6-10.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R. G., Penning, T. M., 1992. Examination of diols and diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons as substrates for rat liver dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol.* 5, 576-83.
- Fritz, W. A., Lin, T. M., Cardiff, R. D., Peterson, R. E., 2007. The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Carcinogenesis.* 28, 497-505.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., Fan, S., Rosen, E., Palvimo, J. J., Janne, O. A., Muratoglu, S., Avantaggiati, M. L., Pestell, R. G., 2003. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol.* 23, 8563-75.
- Furness, S. G., Lees, M. J., Whitelaw, M. L., 2007. The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Lett.* 581, 3616-25.
- Garner, E., Raj, K., 2008. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle.* 7, 277-82.
- Gomez-Duran, A., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Puga, A., Fernandez-Salguero, P. M., 2009. Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: how the dioxin receptor interacts with TGFbeta signaling. *Biochem Pharmacol.* 77, 700-12.
- Guengerich, F. P., Parikh, A., Yun, C. H., Kim, D., Nakamura, K., Notley, L. M., Gillam, E. M., 2000. What makes P450s work? Searches for answers with known and new P450s. *Drug Metab Rev.* 32, 267-81.
- Han, X., Naeher, L. P., 2006. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environ Int.* 32, 106-20.
- Hankinson, O., 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 307-40.
- Harvey, R. G., 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. Cambridge University Press.
- Henklova, P., Vrzal, R., Ulrichova, J., Dvorak, Z., 2008. Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact.* 172, 93-104.
- Hockley, S. L., Arlt, V. M., Brewer, D., Te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., Phillips, D. H., 2007. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem Res Toxicol.* 20, 1797-810.
- Hockley, S. L., Arlt, V. M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I., Phillips, D. H., 2008. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. *Carcinogenesis.* 29, 202-10.
- Hrubá, E., Trilecova, L., Marvanova, S., Krcmar, P., Vykopalova, L., Milcova, A., Libalova, H., Topinka, J., Starsichova, A., Soucek, K., Vondracek, J., Machala, M., 2010. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells. *Toxicol Lett.* 197, 227-35.
- Hrubá, E., Vondracek, J., Libalova, H., Topinka, J., Bryja, V., Soucek, K., Machala, M., 2011. Gene expression changes in human prostate carcinoma cells exposed to genotoxic and nongenotoxic aryl hydrocarbon receptor ligands. *Toxicol Lett.* 206, 178-88.

- Huang, L., Pu, Y., Hu, W. Y., Birch, L., Luccio-Camelo, D., Yamaguchi, T., Prins, G. S., 2009. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol.* 328, 188-99.
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J. A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M. T., Lagadic-Gossmann, D., 2007. c-Jun NH2-terminal kinase-related Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1696-705.
- IARC, 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER
- Kamiya, M., Toriba, A., Onoda, Y., Kizu, R., Hayakawa, K., 2005. Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Food Chem Toxicol.* 43, 1017-27.
- Kampa, M., Castanas, E., 2008. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 151, 362-7.
- Katoh, M., 2001. Molecular cloning, gene structure, and expression analyses of NKD1 and NKD2. *Int J Oncol.* 19, 963-9.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I., 1999. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem.* 274, 13519-24.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., Pongratz, I., 2001. The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol.* 21, 2594-607.
- KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kanehisa Laboratories.
- Kelner, M. J., Stokely, M. N., Stovall, N. E., Montoya, M. A., 1996. Structural organization of the human microsomal glutathione S-transferase gene (GST12). *Genomics.* 36, 100-3.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A., 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 189-204.
- Khan, Q. A., Dipple, A., 2000. Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells. *Carcinogenesis.* 21, 1611-8.
- Khan, Q. A., Dipple, A., Anderson, L. M., 2002. Protease inhibitor-induced stabilization of p21(waf1/cip1) and cell-cycle arrest in chemical carcinogen-exposed mammary and lung cells. *Mol Carcinog.* 33, 1-8.
- Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Kakishima, H., Mizokami, A., Burnstein, K. L., Hayakawa, K., 2003. A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Arch Toxicol.* 77, 335-43.
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S., 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 254, 86-99.
- Kufe, D. W., Bast Jr., R.C., Hait, W., Hong, W.K., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Holland, J.F., Frei, E., 2006. *Holland Frei Cancer Medicine.* BC Decker.
- Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T., Miura, O., 2003. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene.* 22, 4459-68.
- Lai, Z. W., Pineau, T., Esser, C., 1996. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. *Chem Biol Interact.* 100, 97-112.
- Langlands, K., Yin, X., Anand, G., Prochownik, E. V., 1997. Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem.* 272, 19785-93.
- Lewtas, J., 2007. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res.* 636, 95-133.

- Li, J., Chen, H., Tang, M. S., Shi, X., Amin, S., Desai, D., Costa, M., Huang, C., 2004. PI-3K and Akt are mediators of AP-1 induction by 5-MCDE in mouse epidermal Cl41 cells. *J Cell Biol.* 165, 77-86.
- Libalova, H., Uhlirova, K., Klema, J., Machala, M., Sram, R. J., Ciganek, M., Topinka, J., 2012. Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles. *Part Fibre Toxicol.* 9, 1.
- Luch, A., Kudla, K., Seidel, A., Doehmer, J., Greim, H., Baird, W. M., 1999. The level of DNA modification by (+)-syn-(11S,12R,13S,14R)- and (-)-anti-(11R,12S,13S,14R)-dihydrodiol epoxides of dibenzo[a,l]pyrene determined the effect on the proteins p53 and p21WAF1 in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis.* 20, 859-65.
- Ma, Q., 2007. Aryl hydrocarbon receptor degradation-promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response. *Mol Interv.* 7, 133-7.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J. V., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res.* 497, 49-62.
- Mahadevan, B., Keshava, C., Musafia-Jeknic, T., Pecaj, A., Weston, A., Baird, W. M., 2005. Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res.* 65, 1251-8.
- Marlowe, J. L., Fan, Y., Chang, X., Peng, L., Knudsen, E. S., Xia, Y., Puga, A., 2008. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol Biol Cell.* 19, 3263-71.
- Mathew, L. K., Sengupta, S. S., Ladu, J., Andreassen, E. A., Tanguay, R. L., 2008. Crosstalk between AHR and Wnt signaling through R-Spondin1 impairs tissue regeneration in zebrafish. *FASEB J.* 22, 3087-96.
- McCoull, K. D., Rindgen, D., Blair, I. A., Penning, T. M., 1999. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol.* 12, 237-46.
- McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., Bai, S., Cabrera, L., Keller, E., McCauley, L., Cho, K. R., Buckanovich, R. J., 2011. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest.* 121, 3206-19.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13, 20-5.
- Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* 1619, 263-8.
- Morgan, E. T., Goralski, K. B., Piquette-Miller, M., Renton, K. W., Robertson, G. R., Chaluvadi, M. R., Charles, K. A., Clarke, S. J., Kacevska, M., Liddle, C., Richardson, T. A., Sharma, R., Sinal, C. J., 2008. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos.* 36, 205-16.
- Morrow, D., Qin, C., Smith, R., 3rd, Safe, S., 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 88, 27-36.
- Myers, K., Gagou, M. E., Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R., Meuth, M., 2009. ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress. *PLoS Genet.* 5, e1000324.
- Navas, J. M., Segner, H., 2000. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol.* 51, 79-92.

- Nebert, D. W., Dalton, T. P., 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 6, 947-60.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., Dalton, T. P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 59, 65-85.
- Nebert, D. W., Russell, D. W., 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 360, 1155-62.
- Nelson, W. G., Kastan, M. B., 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol*. 14, 1815-23.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*. 284, 13291-5.
- Nisbet, I. C., LaGoy, P. K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol*. 16, 290-300.
- Nishimura, C., Matsuura, Y., Kokai, Y., Akera, T., Carper, D., Morjana, N., Lyons, C., Flynn, T. G., 1990. Cloning and expression of human aldose reductase. *J Biol Chem*. 265, 9788-92.
- Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2008. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun*. 370, 541-6.
- Oliveira, P. A., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, P. L., Lopes, C., 2007. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. 79, 593-616.
- Page, T. J., MacWilliams, P. S., Suresh, M., Jefcoate, C. R., Czuprynski, C. J., 2004. 7-12 Dimethylbenz[a]anthracene-induced bone marrow hypocellularity is dependent on signaling through both the TNFR and PKR. *Toxicol Appl Pharmacol*. 198, 21-8.
- Park, J. H., Gopishetty, S., Szewczuk, L. M., Troxel, A. B., Harvey, R. G., Penning, T. M., 2005. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH o-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. *Chem Res Toxicol*. 18, 1026-37.
- Parkinson, A., 2001. Biotransformation of xenobiotics. McGraw-Hill.
- Peehl, D. M., Wong, S. T., Rubin, J. S., 1996. KGF and EGF differentially regulate the phenotype of prostatic epithelial cells. *Growth Regul*. 6, 22-31.
- Penning, T. M., 2004. Aldo-keto reductases and formation of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones. *Methods Enzymol*. 378, 31-67.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C. F., McCoull, K. D., Palackal, N. T., Tsuruda, L. S., 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol*. 12, 1-18.
- Penning, T. M., Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., Harvey, R. G., 1996. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol*. 9, 84-92.
- Phan, R. T., Dalla-Favera, R., 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 432, 635-9.
- Phillips, D. H., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res*. 443, 139-47.
- Phillips, D. H., Castegnaro, M., 1999. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis*. 14, 301-15.
- Pliskova, M., Vondracek, J., Vojtesek, B., Kozubik, A., Machala, M., 2005. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol Sci*. 83, 246-56.

- Poschl, U., 2005. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44, 7520-40.
- Prochazkova, J., Kabatkova, M., Bryja, V., Umannova, L., Bernatik, O., Kozubik, A., Machala, M., Vondracek, J., 2011. The interplay of the aryl hydrocarbon receptor and beta-catenin alters both AhR-dependent transcription and Wnt/beta-catenin signaling in liver progenitors. *Toxicol Sci.* 122, 349-60.
- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J. L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 77, 713-22.
- Puga, A., Marlowe, J., Barnes, S., Chang, C. Y., Maier, A., Tan, Z., Kerzee, J. K., Chang, X., Strobeck, M., Knudsen, E. S., 2002. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 181-182, 171-7.
- Qiao, Y., Jiang, X., Lee, S. T., Karuturi, R. K., Hooi, S. C., Yu, Q., 2011. FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers. *Cancer Res.* 71, 3076-86.
- Ramet, M., Castren, K., Jarvinen, K., Pekkala, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Soini, Y., Paakko, P., Vahakangas, K., 1995. p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis.* 16, 2117-24.
- Rasmussen, H., Isales, C. M., Calle, R., Throckmorton, D., Anderson, M., Gasalla-Herraiz, J., McCarthy, R., 1995. Diacylglycerol production, Ca²⁺ influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses. *Endocr Rev.* 16, 649-81.
- Ravindra, K., Sokhi, R., van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmosph Environ.* 42, 2895-2921.
- Reddy, M. V., Randerath, K., 1986. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis.* 7, 1543-51.
- Rybicki, B. A., Neslund-Dudas, C., Bock, C. H., Rundle, A., Savera, A. T., Yang, J. J., Nock, N. L., Tang, D., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon--DNA adducts in prostate and biochemical recurrence after prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 14, 750-7.
- Safe, S., 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 120, 1-7.
- Safe, S. H., 1995. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol Ther.* 67, 247-81.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73, 39-85.
- Sanderson, J. T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci.* 94, 3-21.
- Santodonato, J., 1997. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere.* 34, 835-48.
- Schreck, I., Chudziak, D., Schneider, S., Seidel, A., Platt, K. L., Oesch, F., Weiss, C., 2009. Influence of aryl hydrocarbon- (Ah) receptor and genotoxins on DNA repair gene expression and cell survival of mouse hepatoma cells. *Toxicology.* 259, 91-6.
- Sen, B., Mahadevan, B., DeMarini, D. M., 2007. Transcriptional responses to complex mixtures: a review. *Mutat Res.* 636, 144-77.
- Shanle, E. K., Xu, W., 2010. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol.* 24, 6-19.
- Shi, Y., Massague, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113, 685-700.
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21, 257-76.

- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1-6.
- Shou, M., Harvey, R. G., Penning, T. M., 1993. Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis.* 14, 475-82.
- Sidi, S., Sanda, T., Kennedy, R. D., Hagen, A. T., Jette, C. A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J. F., Kanki, J. P., Green, D. R., D'Andrea, A. A., Look, A. T., 2008. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell.* 133, 864-77.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 59, 201-22.
- Sinha, R., Park, Y., Graubard, B. I., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., Cross, A. J., 2009. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J Epidemiol.* 170, 1165-77.
- Sjögren, M., Ehrenberg, L., Rannug, U., 1996. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutat Res.* 358, 97-112.
- Smith, L. E., Denissenko, M. F., Bennett, W. P., Li, H., Amin, S., Tang, M., Pfeifer, G. P., 2000. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.* 92, 803-11.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Lag, M., Schwarze, P. E., Husoy, T., Holme, J. A., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis.* 25, 809-19.
- Soussi, T., Beroud, C., 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 1, 233-40.
- Sram, R. J., Benes, I., Binkova, B., Dejmek, J., Horstman, D., Kotesovec, F., Otto, D., Perreault, S. D., Rubes, J., Selevan, S. G., Skalik, I., Stevens, R. K., Lewtas, J., 1996. Teplice program--the impact of air pollution on human health. *Environ Health Perspect.* 104 Suppl 4, 699-714.
- Stanbrough, M., Buble, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G., Balk, S. P., 2006. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 2815-25.
- Sterling, K. M., Jr., Cutroneo, K. R., 2004. Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 91, 423-9.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Páca Jr., J., Martínek, V., Páca, J., 2004. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy.* 98, 876 – 890.
- Sugita, K., Goto, S., Endo, O., Nakajima, D., Yajima, H., Ishii, T., 2004. Particle Size Effects on the Deposition Ratios of Airborne Particles in the Respiratory Tract. *J. Health Sci.* 50, 185-188.
- Swanson, H. I., 2002. DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chem Biol Interact.* 141, 63-76.
- Tan, Z., Chang, X., Puga, A., Xia, Y., 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol.* 64, 771-80.
- Tannheimer, S. L., Barton, S. L., Ethier, S. P., Burchiel, S. W., 1997. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca²⁺ and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 18, 1177-82.
- Taylor, B. L., Zhulin, I. B., 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, 479-506.

- Taylor, W. R., Stark, G. R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 20, 1803-15.
- Topinka, J., Marvanova, S., Vondracek, J., Sevastyanova, O., Novakova, Z., Krcmar, P., Pencikova, K., Machala, M., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 638, 122-32.
- Topinka, J., Rossner, P., Jr., Milcova, A., Schmuczerova, J., Svecova, V., Sram, R. J., 2011. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM2.5 in an acellular assay. *Toxicol Lett.* 202, 186-92.
- Trosko, J. E., 2001. Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Mol Carcinog.* 30, 131-7.
- Trosko, J. E., 2003. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36, 43-8.
- Trosko, J. E., Upham, B. L., 2005. The emperor wears no clothes in the field of carcinogen risk assessment: ignored concepts in cancer risk assessment. *Mutagenesis.* 20, 81-92.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T., 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 227, 115-24.
- Umannova, L., Machala, M., Topinka, J., Novakova, Z., Milcova, A., Kozubik, A., Vondracek, J., 2008. Tumor necrosis factor-alpha potentiates genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression. *Mutat Res.* 640, 162-9.
- Upham, B. L., Blaha, L., Babica, P., Park, J. S., Sovadinova, I., Pudrith, C., Rummel, A. M., Weis, L. M., Sai, K., Tithof, P. K., Guzvic, M., Vondracek, J., Machala, M., Trosko, J. E., 2008. Tumor promoting properties of a cigarette smoke prevalent polycyclic aromatic hydrocarbon as indicated by the inhibition of gap junctional intercellular communication via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Cancer Sci.* 99, 696-705.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D. W., 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 3, 281-90.
- Vezina, C. M., Lin, T. M., Peterson, R. E., 2009. AHR signaling in prostate growth, morphogenesis, and disease. *Biochem Pharmacol.* 77, 566-76.
- Vinggaard, A. M., Hnida, C., Larsen, J. C., 2000. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology.* 145, 173-83.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 10, 789-99.
- Vondracek, J., Svihalkova-Sindlerova, L., Pencikova, K., Krcmar, P., Andrysik, Z., Chramostova, K., Marvanova, S., Valovicova, Z., Kozubik, A., Gabelova, A., Machala, M., 2006. 7H-Dibenzo[c,g]carbazole and 5,9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole exert multiple toxic events contributing to tumor promotion in rat liver epithelial 'stem-like' cells. *Mutat Res.* 596, 43-56.
- Vousden, K. H., Lane, D. P., 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 275-83.
- Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., Board, P. G., 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 78-99.
- White, P. A., 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res.* 515, 85-98.
- Williams, P. L., James, R.C, Roberts, S.M., 2000. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. A Wiley - Inetrscience Publication.

- Wu, M., Yan, S., Patel, D. J., Geacintov, N. E., Broyde, S., 2002. Relating repair susceptibility of carcinogen-damaged DNA with structural distortion and thermodynamic stability. *Nucleic Acids Res.* 30, 3422-32.
- Wu, Z., Zheng, S., Yu, Q., 2009. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 41, 2389-97.
- Xu, S., Wang, Y., Roe, B., Pearson, W. R., 1998. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem.* 273, 3517-27.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 206, 73-93.
- Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Matsubara, A., Yasui, W., Kikuchi, A., 2010. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene.* 29, 2036-46.
- Yang, C. C., Lin, H. P., Chen, C. S., Yang, Y. T., Tseng, P. H., Rangnekar, V. M., 2003. Bcl-xL mediates a survival mechanism independent of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 278, 25872-8.
- Yeager, R. L., Reisman, S. A., Aleksunes, L. M., Klaassen, C. D., 2009. Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci.* 111, 238-46.
- Yuan, T. C., Veeramani, S., Lin, M. F., 2007. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer.* 14, 531-47.
- Zhang, X. Q., Kondrikov, D., Yuan, T. C., Lin, F. F., Hansen, J., Lin, M. F., 2003. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha signaling is involved in androgen depletion-induced neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene.* 22, 6704-16.

PŘÍLOHA 1

Helena Líbalová, Kateřina Uhlířová, Jiří Kléma, Miroslav Machala, Radim J. Šrám, Miroslav Cigánek,
Jan Topinka

**Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced
by organic extracts from respirable air particles.**

Part Fibre Toxicol. 2012 Jan 12;9(1):1.

RESEARCH

Open Access

Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles

Helena Líbalová^{1,2}, Kateřina Uhlířová¹, Jiří Kléma³, Miroslav Machala⁴, Radim J Šrám¹, Miroslav Cigánek⁴ and Jan Topinka^{1*}

Abstract

Background: Recently, we used cell-free assays to demonstrate the toxic effects of complex mixtures of organic extracts from urban air particles (PM_{2.5}) collected in four localities of the Czech Republic (Ostrava-Bartovice, Ostrava-Poruba, Karvina and Trebon) which differed in the extent and sources of air pollution. To obtain further insight into the biological mechanisms of action of the extractable organic matter (EOM) from ambient air particles, human embryonic lung fibroblasts (HEL12469) were treated with the same four EOMs to assess changes in the genome-wide expression profiles compared to DMSO treated controls.

Method: For this purpose, HEL cells were incubated with subtoxic EOM concentrations of 10, 30, and 60 µg EOM/ml for 24 hours and global gene expression changes were analyzed using human whole genome microarrays (Illumina). The expression of selected genes was verified by quantitative real-time PCR.

Results: Dose-dependent increases in the number of significantly deregulated transcripts as well as dose-response relationships in the levels of individual transcripts were observed. The transcriptomic data did not differ substantially between the localities, suggesting that the air pollution originating mainly from various sources may have similar biological effects. This was further confirmed by the analysis of deregulated pathways and by identification of the most contributing gene modulations. The number of significantly deregulated KEGG pathways, as identified by Goeman's global test, varied, depending on the locality, between 12 to 29. The Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 exhibited the strongest upregulation in all 4 localities and *CYP1B1* had a major contribution to the upregulation of this pathway. Other important deregulated pathways in all 4 localities were ABC transporters (involved in the translocation of exogenous and endogenous metabolites across membranes and DNA repair), the Wnt and TGF-β signaling pathways (associated particularly with tumor promotion and progression), Steroid hormone biosynthesis (involved in the endocrine-disrupting activity of chemicals), and Glycerolipid metabolism (pathways involving the lipids with a glycerol backbone including lipid signaling molecules).

Conclusion: The microarray data suggested a prominent role of activation of aryl hydrocarbon receptor-dependent gene expression.

Keywords: air pollution, complex mixtures, HEL cells, *CYP1B1*, AhR, gene expression profile

* Correspondence: jtopinka@biomed.cas.cz

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Considerable efforts have been made to clarify the adverse effects of environmental pollution on human health [1]. Respirable ambient air particulate matter with an aerodynamic diameter < 2.5 μm (PM_{2.5}) is a complex mixture consisting of a large number of chemicals, many of which are toxic and/or carcinogenic [2]. The mixtures of organic compounds to which the general population is exposed are not completely characterized since complex chemical analysis is very difficult. Investigations into the biological effects of ambient air particulate matter have involved a number of different approaches, including the study of particle-induced genotoxicity. Although hundreds of genotoxic compounds have been identified in ambient air, less than 25 of these compounds are routinely monitored [3]. Therefore, a biological approach based on specific toxic effects, such as direct or indirect reactivity with DNA or mutagenicity of complex mixture components might represent a suitable alternative [4,5]. The toxic effects of ambient air particulate matter (PM) are most frequently associated with chemicals bound onto the surface of the PM and/or with the particles themselves [6,7]. Some studies suggest that the genotoxic effects of PM are induced by polycyclic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives forming the organic fraction of PM [1,8,9]. Other studies indicate that some metals forming PM may catalyze the oxidative damage of DNA [10-12]. Much less attention has been paid to nongenotoxic mechanisms of the toxic effects of chemicals bound onto PM_{2.5}, although complex mixtures of air pollutants are known to contain various tumor promoters [13,14]. It has been repeatedly demonstrated that some PAHs, such as benzo[a]pyrene (BaP), form DNA adducts, after their metabolic activation by cytochrome P450 enzymes [15-18]. However, the PAHs, which activate aryl hydrocarbon receptor (AhR), induce several AhR-dependent nongenotoxic effects associated with tumor promotion [19,20]. PAHs have been reported to contribute to antiapoptotic effect of PM via activation of AhR in human bronchial epithelial cells [21] and AhR-dependent induction of cell proliferation, another hallmark of tumor promotion, after exposure to the extract of reference airborne particles has been described in liver epithelial cells [14]. Moreover, another group of PAHs (fluoranthene, pyrene) is known to exhibit tumor promoting activity via inhibition of intercellular communication [13,22].

Several attempts have been made to study the toxic effects of both artificial and real mixtures of environmental air pollutants, including PAHs, in various cell cultures [23]. The recent progress of "omics" technology in toxicology has allowed more insight into the mechanisms of the toxic effects of complex mixtures [24]. This technology offers the ability to query the entire genome after exposure to a complex mixture of compounds, permitting

characterization of the biological effects of such exposure and the mechanisms of action involved. Significant attention has been paid to the global gene expression changes caused by complex mixtures, such as cigarette smoke and its condensate, diesel exhaust and carbon black. However, only a few studies have dealt with ambient dust particles (reviewed in [24]). The genome-wide study, dealing with particles from urban dust (standardized SRM1649a) in a human cell line *in vitro*, indicated deregulation of genes involved in DNA repair, peroxisome proliferation, metabolism and changes in tissue growth factors and oncogenes [25]. In human aortic endothelial cells exposed to the ambient particulate matter, the modulation of gene expression included upregulation of metabolism of xenobiotics and proinflammatory responses [26].

In this study, the toxicogenomic approach was used to identify genes and particularly the biological pathways involved in the action of mixtures of organic air pollutants adsorbed onto respirable air particles (PM_{2.5}). As a model system, human embryonic lung fibroblasts (HEL) which have been repeatedly shown to be a suitable model for toxicity studies of individual compounds as well as artificial and environmental mixtures, were used [9,27]. Importantly, embryonic fibroblasts have distinctive differentiation status compared with other lung cell models and therefore, unique gene expression changes might be expected. Changes in the whole genome expression profiles induced by extractable organic matter (EOM) from the PM_{2.5} particles in HEL cells were analyzed at sub-toxic EOM concentrations and significantly deregulated genes and biological processes were identified. Moreover, changes in gene expression profiles for various localities (differing by the sources and extent of air pollution) were compared with the aim of identifying exclusive changes in gene transcription profiles corresponding to the air pollution exposure.

Results

Air sampling

The occurrence of organic compounds in the air is dependent on their physical properties, there are present in the gas phase, partially or completely adsorbed to the particles present in the air. This fact complicates the procedures for air sampling and the interpretation of the observed concentrations or toxic effects. PAHs with two to three cycles are present in the air under normal physical conditions in the gas phase (partly but can also be adsorbed on air particles, e.g. fluoranthene), PAHs with four cycles (e.g., pyrene) are distributed both in the gas and particulate phase, and PAHs with five or more cycles (benzo[a]pyrene, benzo[fluoranthene], dibenzanthracenes and dibenzopyrenes) are almost entirely adsorbed on particles [28-30]. This study was also focused on the determination of organic extractable compounds bound

to the particulate matter in the air, which in terms of genotoxicity, carcinogenicity and dioxin-like toxicity represent the highest risk.

The basic characteristics of PM_{2.5} sampling such as GPS coordinates, volume of sampled air, concentrations of PM_{2.5} and EOM in all localities are summarized in Table 1. The highest air pollution level in terms of PM_{2.5} was found in the industrial area of Ostrava-Bartovice (1.5-fold and more than 3-fold higher than in Ostrava-Poruba and Trebon, respectively).

Chemical characterization of ambient air particulate matter

To evaluate the chemical characterization of ambient air particulate matter (PM_{2.5}), many classes of organic contaminants were analyzed (Additional file 1). The highest concentrations were found for n-alkanes (77.4 - 89.5 ng/m³), ten U.S. EPA PAHs (parent PAHs prioritized by U.S. EPA, ranged from 5.89 to 76.3 ng/m³), other PAHs (other parent compounds with significant toxicological and indicator characteristics, 3.28 - 44.3 ng/m³) and oxidized PAHs (2.02 - 36.1 ng/m³) (Table 2). Assuming that traffic emitted n-alkanes and PAHs in similar proportions, then the approximately one order of magnitude higher PAH emissions in the hot spot site Bartovice is caused by emissions from other, mainly local industrial sources. Like n-alkanes, other contaminants associated with emissions from traffic (UCM, terpanes, triterpanes and steranes) were present in the samples. In addition to these compounds, sterols (mainly of plant origin, stigmasterol, β -sitosterol, β -amyirin, β -amyirin and lupeol), ubiquitous dialkyl-esters of phthalic acid, which is still used as a softener for plastics based on polyvinyl chloride, and other industrial contaminants (bisphenol A, benzophenone, etc.) were also found. Different, more abundant individual U.S. EPA PAHs were found in the sites under study. Pyrene (a marker of pyrogenic sources of PAHs) dominated in Bartovice, Poruba and Trebon; Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (a marker of traffic sources) prevailed in the site Karvina (Table 3). The average concentration of benzo[*a*]pyrene ranged from 0.55 (Trebon site) to

5.98 ng/m³ (hot spot site Bartovice). The difference in B[*a*]P was much higher in terms of B[*a*]P than in terms of PM_{2.5} (3-fold higher PM_{2.5} levels and more than 10-fold higher B[*a*]P levels in Ostrava-Bartovice and Trebon, respectively).

Gene expression changes induced by EOMs

Gene expression profiling using the Illumina microarray platform and pathway analysis was used to identify deregulated genes and biological processes in HEL cells following 24 h exposure to EOM from each locality at three subtoxic concentrations (10, 30, 60 μ g EOM/ml). Gene expression levels were compared to control HEL cell cultures treated with DMSO only.

Deregulated transcripts and genes

We first identified differential gene expression in each EOM dose from all 4 localities. A full list of deregulated genes is available as Additional file 2. The number of deregulated transcripts with adjusted *P*-value < 0.05, average expression level (AvgExp) > 4, and log₂ FC (fold change) > |1| exhibiting a positive dose response for all 4 localities is shown in Figure 1. More than 1200 transcripts were deregulated at the highest dose of 60 μ g EOM/ml for the heavily polluted area of Ostrava-Bartovice, while after the exposure to the extract sample from Ostrava-Poruba (6 km from Ostrava-Bartovice) only about 700 genes were deregulated. Significant overlap of deregulated transcripts was observed between the localities (Figure 2). More than 360 transcripts were deregulated simultaneously in all 4 localities for EOM at the concentration of 60 μ g EOM/ml. This number represented approximately 30% of all deregulated genes for Ostrava-Bartovice, 50% for Ostrava-Poruba, 68% for Karvina, and 36% for Trebon sample. Despite this significant overlap, 388 transcripts (32%) were exclusively deregulated in cells treated with EOM (60 μ g/ml) from Ostrava-Bartovice, while only 58 (8%), 37 (7%), and 178 (18%) transcripts were deregulated by samples from Ostrava-Poruba, Karvina, and Trebon, respectively.

Table 1 Basic characteristics of PM_{2.5} sampling in various localities of the Czech Republic

Locality [GPS coordinates]	Sampling period	Air volume [m ³]	PM [μ g/m ³]	EOM [μ g/m ³]
Ostrava-Bartovice [49°48'07"N, 18°20'56"E]	1.3.-4.4. 09	29,900	36.7	13.0
Ostrava-Poruba [49°48'07"N, 18°20'56"E]	1.3.-31.3. 09	35,200	25.8	8.05
Karvina [49°48'07"N, 18°20'56"E]	1.4.-5.5. 09	47,400	n.a.*	9.16
Trebon [49°00'15"N, 14°45'56"E]	19.11.-17.12. 08	44,700	11.4	4.15

*Missing for technical reasons

Table 2 Concentration of contaminant groups in the extracts from PM2.5 (ng/m³)

Contaminant classes	Contaminant groups	Ostrava-Bartovice	Ostrava-Poruba	Karvina	Trebon
Polycyclic aromatic compounds	U.S. EPA PAHs (10)*	76.3	13.6	17.1	5.89
	other PAHs (29)	44.3	7.14	9.29	3.28
	alkylated PAHs (46)	29.7	7.36	5.88	4.98
	oxidized PAHs (7)	36.1	11.0	12.8	2.02
	N-heterocyclic PAHs (PANHs) (13)	19.9	4.27	3.13	0.46
	S-heterocyclic PAHs (PASHs) (8)	9.99	2.27	1.80	0.42
	nitrated PAHs (15)	0.38	0.05	0.04	0.02
	dinitrated PAHs (3)	0.00097	0.00008	0.00005	0.00005
Hydrocarbon markers	n-alkanes (29)	84.4	89.5	77.4	89.2
	UCM (unresolved complex mixture) **	20.1	15.3	9.19	12.7
	terpanes (15)	14.8	9.34	5.64	4.14
	triterpanes (13)	4.49	3.16	1.49	3.73
	steranes (19)	2.24	2.68	0.85	1.76
Sterols	faecal sterols (8)	0.38	0.12	0.17	0.88
	phytosterols (5)	1.04	0.20	0.59	1.63
Industrial contaminants	musk compounds (9)	0.01	0.003	0.003	0.06
	dialkyl-phthalates (6)	0.75	0.60	0.34	2.08
	bisphenol A	0.18	0.09	0.10	0.09
	benzophenone	0.24	0.05	0.04	0.04
	isomyristate	0.19	0.10	0.07	0.46

* the numbers of quantified compounds are in parentheses

** mixture of thousands cyclic and branched saturated hydrocarbons forming a characteristic hump on the GC chromatogram of the fraction of non-polar compounds of air particulate matter

To further evaluate the differences in gene expression profiles between localities, principal component analysis (PCA) was performed (Figure 3). The data did not exhibit any significant clustering according to the locality, suggesting similarities in expression profiles. In contrast, clusters separating individual EOM concentrations were observed (ellipses in Figure 3 indicate 95% confidence interval). Further statistical analysis of the expression data was focused on the deregulated pathways involving the levels of all detectable transcripts, and not only significantly deregulated transcripts.

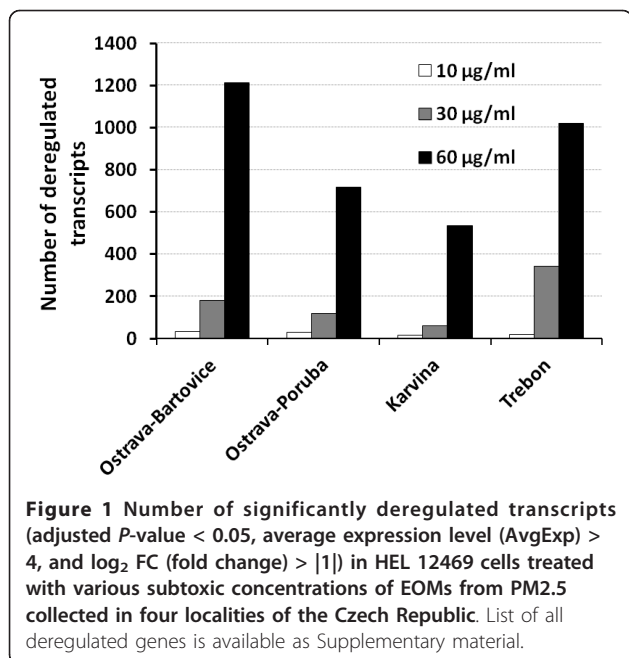
Deregulated pathways

To identify deregulated KEGG pathways for the individual localities, all 3 EOM concentrations (10, 30, and 60 µg/ml)

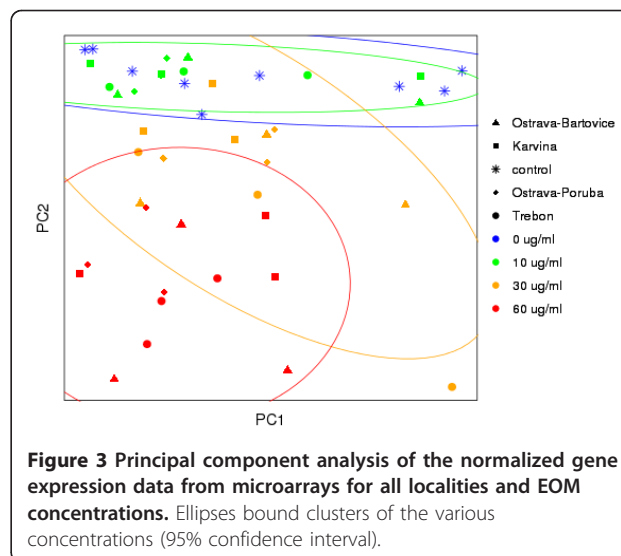
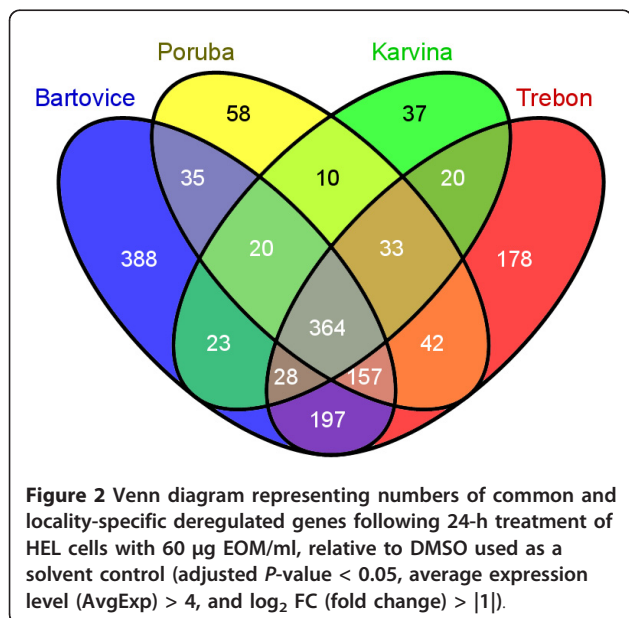
were combined for the analysis. The main reason for that was to identify deregulated pathways in individual localities for the whole concentration range. The complete list of significantly deregulated pathways resulting from EOM-treated HEL 12469 cells, as identified by Goeman's global test, is shown in Table 4. Although the analysis on the level of individual transcripts identified an almost 2-fold higher number of deregulated genes for Ostrava-Bartovice than for Ostrava-Poruba (1212 vs. 719 for 60 µg EOM/ml), the number of deregulated pathways was higher for Ostrava-Poruba than for Ostrava-Bartovice (29 vs. 18). The pathway exhibiting the strongest deregulation in all 4 localities was the Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450. The main genes contributing to the deregulation of this pathway included upregulation of *CYP1B1*,

Table 3 Selected priority U.S. EPA PAHs adsorbed on the PM2.5 collected in various localities (ng/m³)

Compound name	Ostrava-Bartovice	Ostrava-Poruba	Karvina	Trebon
Fluoranthene	11.6	2.48	1.72	1.00
Pyrene	13.9	2.61	1.76	1.01
Benz[a]anthracene	11.6	1.62	1.67	0.50
Chrysene	9.06	1.96	2.19	0.89
Benzo[b]fluoranthene	3.89	0.55	1.03	0.31
Benzo[k]fluoranthene	4.34	0.69	1.18	0.32
Benzo[a]pyrene	5.98	1.31	2.26	0.55
Dibenz[a, h]anthracene	1.16	0.21	0.16	0.09
Benzo[ghi]perylene	5.15	0.80	1.83	0.51
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	9.67	1.38	3.30	0.72



MGST1 (2 transcripts), *GSTM5*, and *GSTO1* (Figure 4). The significance of this contribution as well as the correlations between transcripts are shown in Figure 5. These results suggest a crucial role of *CYP1B1* upregulation and its correlation with the expression of other genes encoding detoxifying enzymes. All the genes depicted in Figure 4 were upregulated. Five other pathways were significantly deregulated in all 4 localities: Steroid hormone biosynthesis (driven mostly by *CYP1B1* and aldo-ketoreductases), ABC transporters, Wnt signaling pathway, TGF- β signaling pathway, and Glycerolipid metabolism. The genes with



the highest contribution to the deregulation of these pathways at various localities are summarized in Figure 4. Together with the pathways deregulated in all localities, Figure 4 summarizes 5 other toxicologically important pathways (Drug metabolism by cytochrome P450, Glutathione metabolism, Gap junction, Arachidonic acid metabolism, p53 signaling) deregulated in at least 1 of the 4 localities. For each pathway, selected genes mainly contributing to pathway deregulation are shown.

Quantitative real-time PCR verification

The gene expression of 11 selected significantly deregulated genes from microarray data in HEL cells was verified by qPCR. These genes include *CYP1B1*, *MGST1*, *NKD2*, *BMP2*, *SMAD3*, *TBXAS1*, *CCND2*, *PTGS2*, *TJPI1*, *WNT2*, and *ID2*. The transcripts were selected to represent various deregulated pathways (Figure 4). Transcript levels of each selected gene were measured in each locality (Figure 6 A-D). In most cases, data proved dose-dependent up- or downregulation as indicated by Jonckheere-Terprsta monotonicity test. With the exception of the downregulation of *SMAD3* gene involved in TGF- β and Wnt signaling pathways, all other transcripts verified by qPCR were closely correlated (Figure 7). The mean correlation across all the transcripts and localities was $r = 0.91$, the mean correlation without *SMAD3* gene was $r = 0.96$ (r is the Pearson correlation coefficient).

Discussion

This study aimed to use human embryonic lung fibroblasts (HEL12469) as a model of target tissue for inhalation exposure, to identify biological processes and pathways involved in the toxic effects of organic extracts from respirable ambient air particles collected in 4 localities of the Czech Republic differing in the extent and

Table 4 Pathways significantly deregulated after EOM-treatment of HEL 12469 cells as identified by Goeman's global test

ID	KEGG pathway	Ostrava-Bartovice	Adj. p-value*		
			Ostrava-Poruba	Karvina	Trebon
980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4.06E-04	2.97E-05	4.71E-04	1.70E-03
4270	Vascular smooth muscle contraction	3.08E-04	2.06E-03	1.09E-01	2.41E-03
4310	Wnt signaling pathway	5.14E-03	1.32E-04	7.07E-03	2.88E-03
30	Pentose phosphate pathway	5.64E-03	8.84E-03	1.27E-01	3.19E-02
140	Steroid hormone biosynthesis	1.03E-02	2.58E-03	4.29E-03	3.37E-02
2010	ABC transporters	1.17E-02	1.86E-03	3.51E-02	4.34E-03
561	Glycerolipid metabolism	1.50E-02	2.63E-03	4.38E-02	5.03E-03
770	Pantothenate and CoA biosynthesis	1.64E-02	4.78E-02	3.68E-02	1.46E-01
4540	Gap junction	1.80E-02	3.50E-02	8.14E-02	3.63E-02
4350	TGF-beta signaling pathway	1.84E-02	3.07E-02	3.09E-02	1.29E-02
4115	p53 signaling pathway	2.39E-02	1.70E-01	2.74E-01	7.77E-02
520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2.58E-02	6.46E-03	1.22E-01	9.54E-02
600	Sphingolipid metabolism	2.63E-02	2.72E-01	8.92E-02	3.45E-02
52	Galactose metabolism	2.63E-02	1.97E-02	1.86E-01	7.77E-02
620	Pyruvate metabolism	2.89E-02	2.68E-02	1.00E+00	4.05E-02
982	Drug metabolism - cytochrome P450	3.01E-02	9.84E-05	1.49E-03	9.04E-02
480	Glutathione metabolism	3.08E-02	2.13E-03	7.91E-03	6.30E-02
72	Synthesis and degradation of ketone bodies	3.83E-02	2.10E-01	2.74E-01	1.00E+00
4340	Hedgehog signaling pathway	5.23E-02	2.22E-03	5.75E-02	4.33E-02
5217	Basal cell carcinoma	5.06E-02	5.04E-03	4.86E-02	5.16E-02
40	Pentose and glucuronate interconversions	6.10E-02	5.70E-03	1.59E-01	6.37E-02
4142	Lysosome	7.53E-02	5.78E-03	4.30E-01	7.05E-02
565	Ether lipid metabolism	5.47E-02	1.23E-02	1.52E-02	1.38E-02
4614	Renin-angiotensin system	5.43E-02	1.33E-02	1.22E-01	6.17E-01
590	Arachidonic acid metabolism	5.71E-02	1.97E-02	7.05E-02	4.70E-02
4744	Phototransduction	1.56E-01	2.07E-02	4.15E-01	2.22E-02
511	Other glycan degradation	1.09E-01	2.64E-02	5.96E-01	7.55E-02
4610	Complement and coagulation cascades	1.15E-01	2.85E-02	9.83E-01	4.56E-01
5222	Small cell lung cancer	1.48E-01	3.07E-02	4.63E-01	7.55E-02
4612	Antigen processing and presentation	4.26E-01	3.35E-02	5.52E-01	2.08E-01
5140	Leishmaniasis	1.18E-01	3.58E-02	2.20E-01	5.18E-02
4145	Phagosome	5.26E-02	4.38E-02	1.00E+00	1.16E-01
564	Glycerophospholipid metabolism	3.80E-01	1.08E-01	7.85E-01	6.10E-03
4730	Long-term depression	2.77E-01	4.64E-01	1.00E+00	7.49E-03

KEGG pathways deregulated in all localities are in bold. PM2.5 samples were collected in 4 localities of the Czech Republic, and extractable organic matters (EOMs) were prepared as described in Materials and Methods.

*The procedure of Holm for control of the family-wise error rate [62].

sources of environmental pollution. For this purpose, cell cultures were treated with subtoxic concentrations of organic extracts from PM2.5 particles collected by high volume filter sampling. To ensure the complexity of the study, the whole genome RNA expression microarray covering 48 k of gene transcripts was used. The major findings of the study suggest that multiple genes involved in various biological pathways were deregulated in a dose-dependent manner, and the highest number of transcripts was deregulated in Ostrava-Bartovice, a residential part of Ostrava city which is mostly polluted by heavy industry, such as steel works and coke ovens

located in the immediate vicinity [31]. Taking into account substantial differences in major air pollution sources among the localities, the high number of commonly deregulated genes seems to be surprising (30-68%, depending on the locality). This is further supported by the qualitative similarities in the chemical composition of the organic extracts from all 4 localities (determined more than 200 aromatic compounds), particularly by the results from the principal component analysis of gene expression profiles which indicated clustering according to the EOM concentration, but not according to the locality. However, this similarity was least for the most

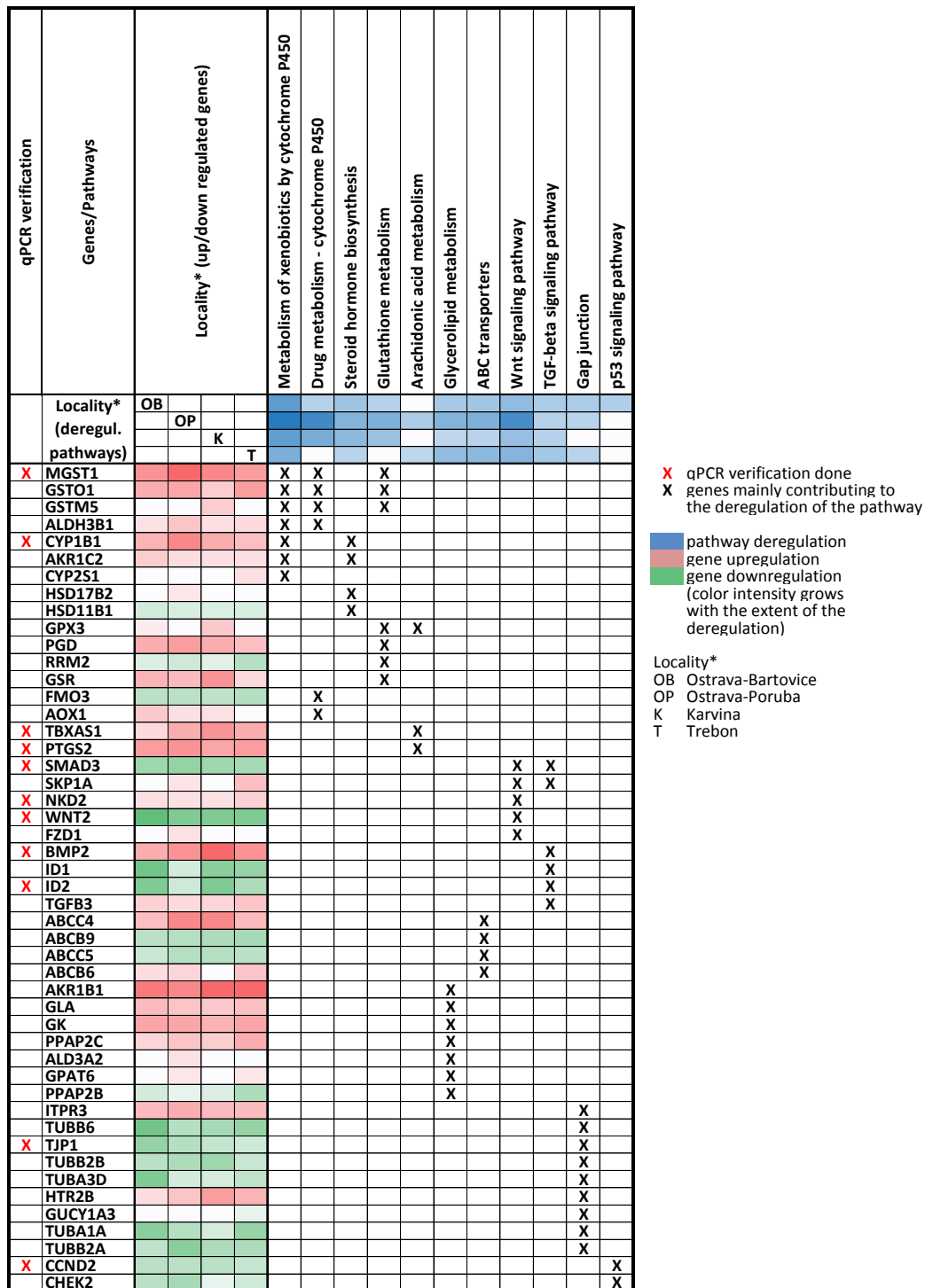
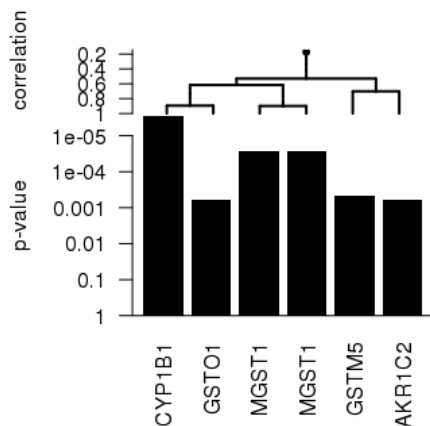


Figure 4 Selected deregulated pathways and genes mainly contributing to their deregulation in various sampling localities.

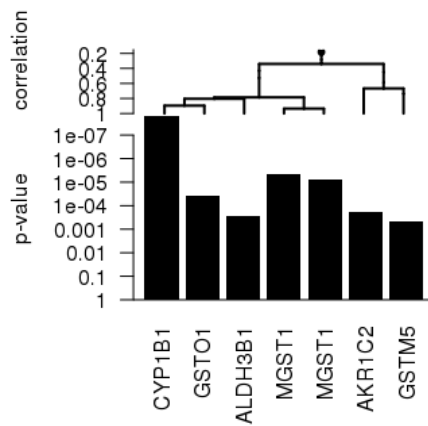
polluted area of Ostrava-Bartovice, where 32% of deregulated transcripts were exclusive to this locality, which was much more than for the 3 remaining areas. Chemical analysis revealed higher relative content of some of PAHs

and nitrated PAH derivatives, which may at least explain a slightly different gene expression responses. However, the major modulations of gene expression were dependent on activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR).

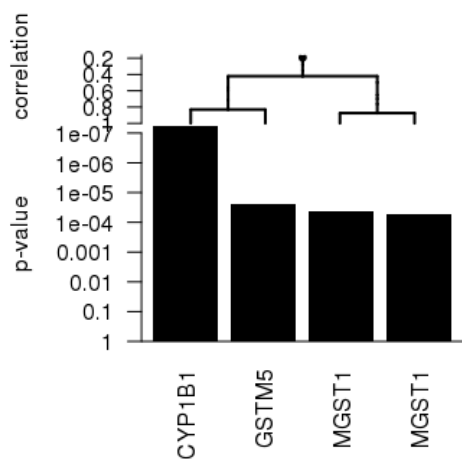
A. Ostrava-Bartovice



B. Ostrava-Poruba



C. Karvina



D. Trebon

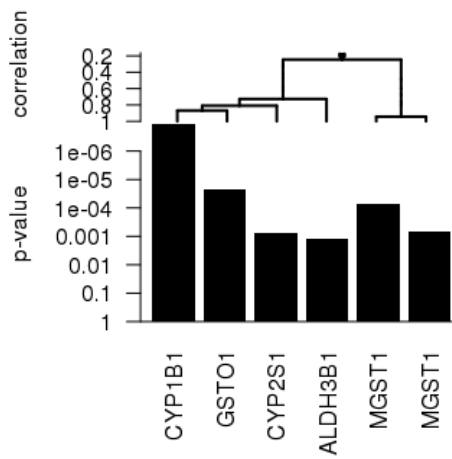
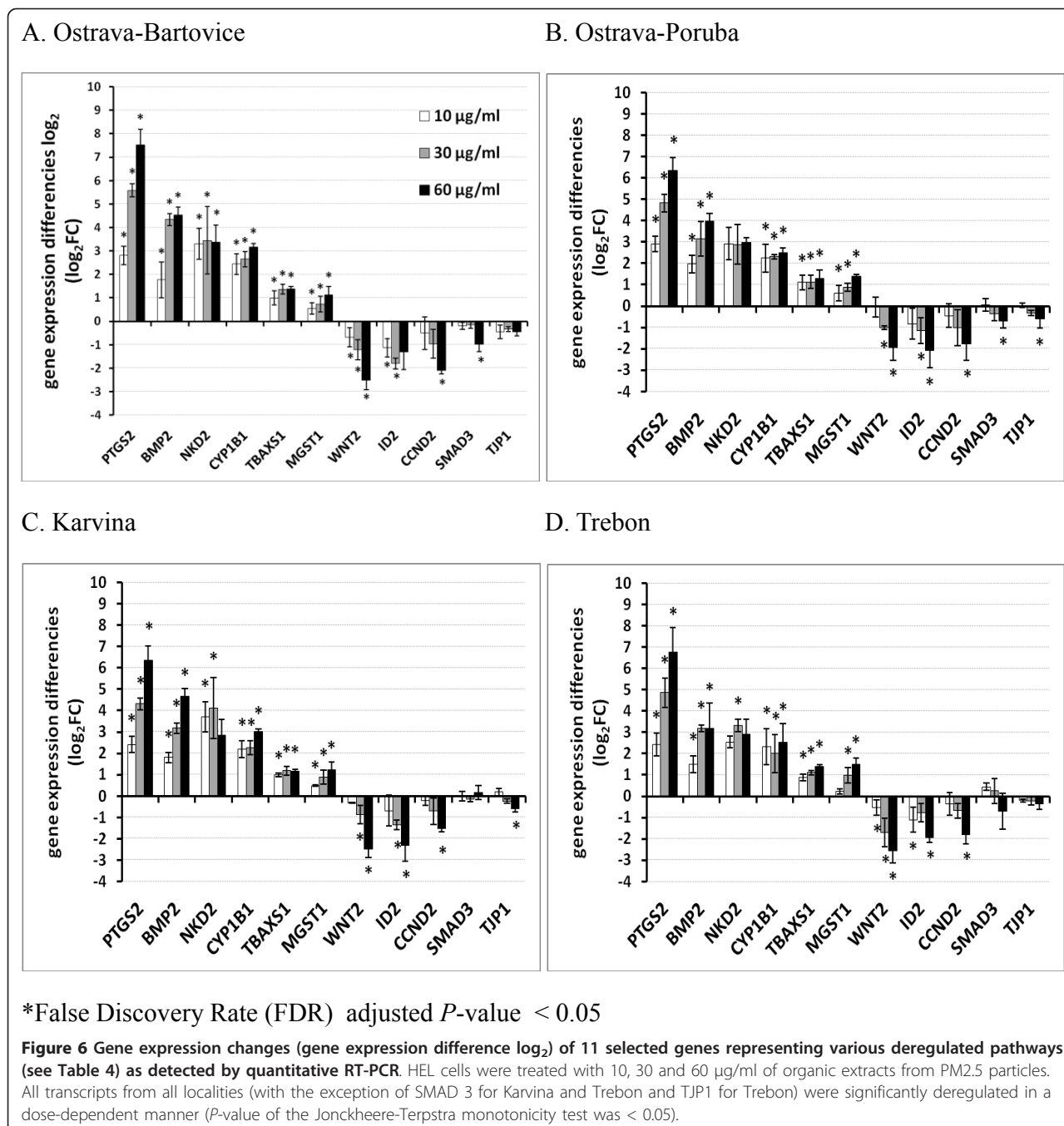


Figure 5 Genes mainly contributing to deregulation of the KEGG pathway, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, in various sampling localities. All depicted genes were upregulated.

For better biological interpretation of the observed gene expression changes, we identified deregulated pathways without preliminary discrimination of up- and downregulated genes. The data indicated that some pathways were significantly affected by both up- and downregulated genes. We were also interested in pathways that contained a large number of genes whose regulation was associated with the EOM concentration in “a small way” (still under

the significance threshold for each individual gene). Therefore, the preliminary discrimination of up- and downregulated genes may result in loss of some deregulated pathways. Furthermore, for the purpose of pathway analysis, we did not discriminate between individual EOM concentrations used in the treatment of HEL cells.

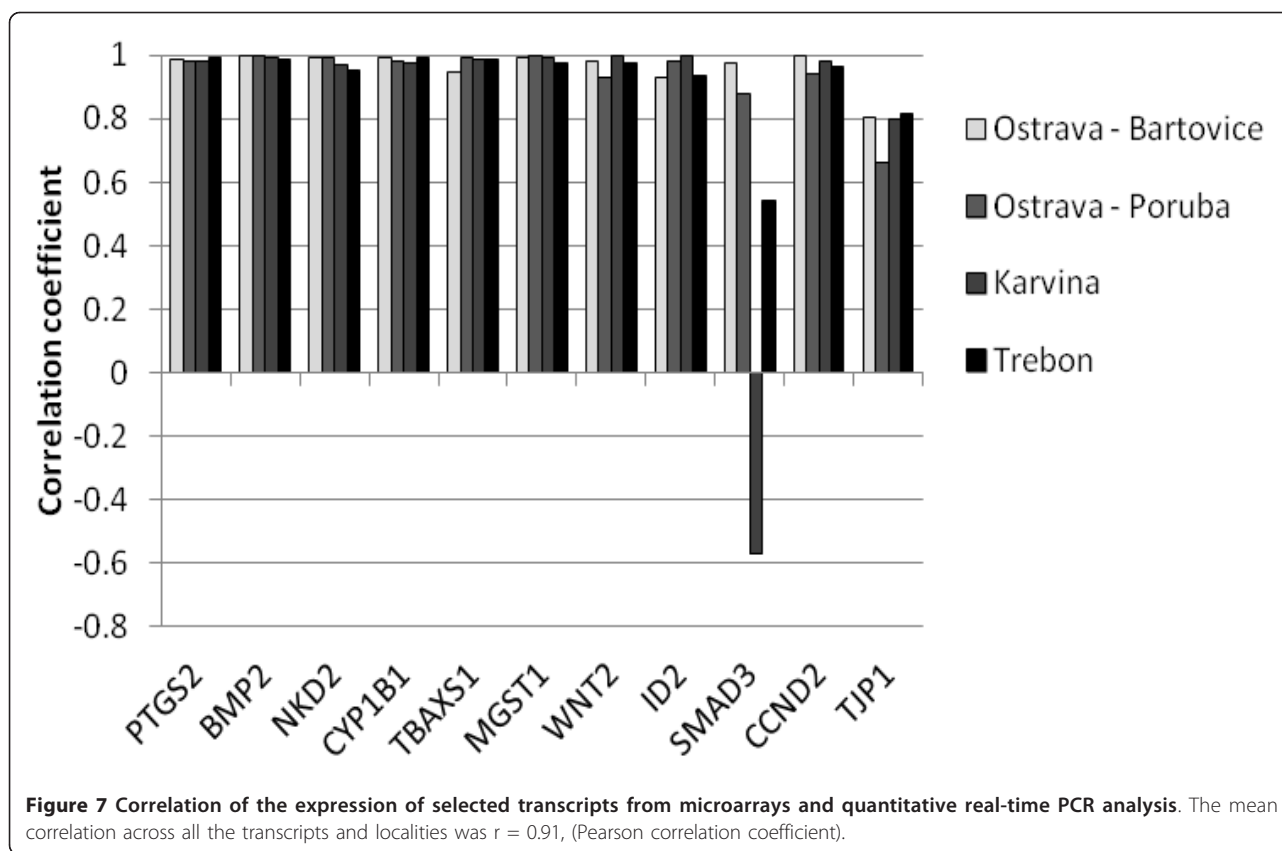
Taking into account the high levels of PAHs, their derivatives and many other compounds bound to PM2.5



[2], it is not too surprising that the strongest deregulation in this study was observed for the KEGG pathway, Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450. Among the many upregulated metabolic enzymes in this pathway, *CYP1B1* dominated in all localities. *CYP1B1* is a mixed-function monooxygenase, which metabolizes mainly polycyclic aromatic hydrocarbons, N-heterocyclic amines, arylamines, aminoazodyes and several other carcinogens [32]. Besides its role in the metabolism of xenobiotics, *CYP1B1* is also involved in the metabolism

of cholesterol, steroid hormones, arachidonic acid and other lipids, metabolism of retinoic acid as well as in vitamin D3 synthesis and metabolism [33].

The induction of *CYP1B1* by complex mixtures such as tobacco smoke or airborne particles has been observed [14,25,34]. It is well known that the *CYP1B1* gene is under the regulatory control of the AhR and many PAHs are known to induce *CYP1B1* and their own metabolism through binding to and activation of the AhR [35]. The AhR is a ligand-activated transcription factor which has a



central role in the induction of drug-metabolizing enzymes. AhR can also interact with other pathways suggesting that this activity is important in the toxicity of exogenous compounds. AhR activation by some of its ligands participates, among others, in pathways involved in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis [36], cell adhesion and matrix remodeling [37] as well as multiple developmental pathways [19]. Strong involvement of AhR related pathways in the toxic response of EOMs within this study are supported by recent findings on the mechanisms of toxicity induced by an organic extract of the urban dust standard reference material, SRM1649a [14], also suggesting a crucial role for AhR and PAHs as key AhR activators. Another group of upregulated genes within the metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 pathway, are glutathione S-transferases *MGST1* and *GSTM5*, known to be involved in conjugation of reduced glutathione to a wide number hydrophobic electrophile metabolites [38,39], and *GSTO1*, a glutathione-dependent thiol transferase and dehydroascorbate reductase [40].

In this study, *CYP1B1* upregulation was also a major factor in deregulation of the second most important deregulated KEGG pathway - Steroid hormone biosynthesis (SHB), which is known to be a target for endocrine-disrupting chemicals [41]. Similar to the Metabolism of

xenobiotics by cytochrome P450, this pathway was deregulated in all 4 localities. In addition to *CYP1B1*, which is known to hydroxylate estrogens [42], aldo-keto reductase (*AKR1C2*) and some hydroxysteroid β -dehydrogenases 1 (*HSD17B2*, *HSD11B1*, *HSD17B8*) significantly contributed to deregulation of the SHB pathway. The results of the detailed chemical analysis of the EOMs, including the analysis of the dioxin toxicity of the fractionated crude extracts, strongly suggests that PAHs (abundant components in all EOMs) and not persistent organic pollutants (chlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofuranes or biphenyls) are mainly responsible for SHB deregulation and dioxin-like toxicity. These findings are in accordance with our previous study [14], in which the activation of AhR and AhR-mediated gene expression and cellular nongenotoxic events prevailed the genotoxic and apoptotic processes. Several mechanisms on the modulation of estrogen and androgen signaling by chemicals directly or indirectly through cross-talk between AhR and steroid hormone receptors have been discussed [43,44]. Here we found a possible correlation between the modulations of enzymes of steroidogenesis and oxidative steroid metabolism and the AhR activation.

The crucial role of AhR in the toxic effects of the EOM components is further underlined by the analysis of the third KEGG pathway - Wnt signaling, which was

significantly deregulated by all 4 extracts in this study. Wnt signaling proteins are required for basic developmental processes in many different organs. A recent genomic analysis revealed functional cross-talk between AhR and the well-established Wnt/ β -catenin signal transduction pathway [45,46]. *NKD2*, as an upregulated gene mostly contributing to the deregulation of Wnt signaling in all EOM-treated cells, is known as a cell autonomous antagonist of the canonical Wnt signaling pathway [47]. Accordingly, Wnt target genes, *WNT2* and *CCND2* were significantly downregulated in lung fibroblasts exposed to all 4 extracts (Figure 6).

The next KEGG pathway deregulated by EOMs from all 4 localities was the Transforming growth factor- β (*TGF- β*) signaling, which includes structurally related cytokines regulating a wide spectrum of cellular functions such as cell growth and proliferation, apoptosis, differentiation and migration via receptors type I and II [48]. In our study, the upregulation of bone morphogenic protein type-2 (*BMP2*), antagonist of *TGF- β* involved in osteogenesis, cell differentiation, growth and invasivity, is primarily responsible for *TGF- β* signaling deregulation [49]. Simultaneously, downregulation of *SMAD3*, effector of *TGF- β* signaling, and DNA-binding inhibitors 1 or 2 (*ID1*, *ID2*), transcription factors which negatively regulate cell differentiation [50], was observed in this study. Again, suppression of *TGF- β* signaling by activated AhR has been reported [51], pointing out the key role of AhR activation in lung fibroblasts exposed to complex airborne mixtures.

The ATP binding cassette (ABC transporters), as a fifth pathway deregulated by all extracts in this study, includes a huge number of various transmembrane proteins capable of active transport of various compounds through the cell membrane. In humans, there are 49 known ABC transporters, which are classified into eight families [52]. In our study, the most significant deregulation was observed for family C (C4 and C5), known to facilitate transport of bile salt and steroid conjugates, ion transport and toxin excretion activity, and family B (B6 and B9), used mostly for transport of peptides [53]. Recently, AhR-dependent upregulation of *ABCC4* was reported [54]. In eukaryotes including humans, ABC transporters serve as pumps that extrude toxins from the cell. Some ABC proteins are known to be involved in translation and DNA repair processes. It was obvious that exposure of HEL cells to complex mixtures of organic compounds bound to PM2.5 induced deregulation of many ABC transporters as a defending reaction of cells to this exposure and that AhR induction may play a significant role in their upregulation. Similar primary transcription response was reported in mouse lung fibroblasts exposed to TCDD for 4 h [55]. TCDD-induced significant upregulation of *CYP1B1*, *PTGS2*, *BMP2*, *ABCC4* and deregulation of other genes belonging to Metabolism of xenobiotics, ABC

transporters, *TGF- β* and Wnt signaling pathways in mouse lung fibroblasts suggests a significant AhR-dependent gene expression in the HEL cells.

The last pathway deregulated in all 4 localities was Glycerolipid metabolism, which includes the chemical reactions and pathways involving glycerolipids, the lipid with a glycerol backbone. Diacylglycerol and phosphatidic acid are key lipid intermediates of glycerolipid biosynthesis; diacylglycerol is a key lipid signaling molecule involved in activation of protein kinases and cell survival and proliferation. The deregulation of this pathway is caused mainly by upregulation of aldo-keto reductase 1B1 (*AKR1B1*) catalyzing the NADPH-dependent reduction of a wide variety of carbonyl-containing compounds to their corresponding alcohols with a broad range of catalytic efficiencies [56]. It is very likely that carbonyl compounds are the components of all 4 EOMs. Importantly, genes responsible for sphingolipid metabolism were also significantly deregulated; these results suggest effects on sphingolipid signaling molecules which regulate cell survival, proliferation and apoptosis.

There were many other deregulated pathways detected in this study (Table 5), but these were not found in all localities, e.g. Glutathione metabolism pathway was deregulated after the treatment with the extracts from sampling sites Ostrava-Bartovice, Ostrava-Poruba and Karvina but not after the exposure to extract from Trebon,

Table 5 Sequences of primers used in quantitative RT-PCR

Symbol	RefSeq ID	Oligonucleotide
CYP1B1	NM_000104.2	sense CACTGGAAACCGCACCTC
		antisense AGCACCGACAGGAGTAGC
MGST1	NM_145792.1	sense CACCTGAATGACCTTGAAAATATTATT
		antisense TCCGTGCTCCGACAAATAGT
NKD2	NM_033120.2	sense GGAAGGTCAACAGGGAGGA
		antisense TTCACACGGAGGGTCTTGC
BMP2	NM_001200.2	sense GGGCATCCTCTCCACAAAAG
		antisense CCACGCTCACTGAAGTCCAC
SMAD3	NM_005902.3	sense GGCTGCTCTCCAATGTCAAC
		antisense ACCTCCCCTCCGATGTAGTA
TBXAS1	NM_001061.2	sense ATCTTCCTCATCGTGGCTAT
		antisense CCTTAAAAACGTCTACCTCTCCA
CCND2	NM_001759.2	sense TGGGACAATGGGTGGTGAA
		antisense GCAAAGCTGGCTCTTGAGAA
PTGS2	NM_000963.1	sense CAAATCATCAACTGCCTCAAT
		antisense TCTGGATCTGGAACACTGAATG
TJP1	NM_175610.2	sense AAACAAGCCAGCAGAGACC
		antisense CGCAGACGATGTTTCATAGTTTC
WNT2	NM_003391.1	sense CAAGAACGCTGACTGGACAA
		antisense CCCGAGAAAGAACCCAAAGG
ID2	NM_002166.4	sense CGATGAGCCTGCTATACAACA
		antisense AGGTCCAAGATGTAGTCGATGA

the only agricultural area. The genes in the KEGG cluster of Glutathione metabolism belong to the phase II biotransformation of xenobiotics and oxidative stress defense. The genes of arachidonic metabolism are involved in proinflammatory responses (*PTGS2*, *TBXAS1*) and protection against oxidative stress (*GPX3*). Interestingly, the p53 signaling pathway was deregulated exclusively after the treatment by EOM from Ostrava-Bartovice, the most polluted industrial locality. It was found no induction of p53 target genes suggesting possible suppressive role of activated AhR [20]. Genes mostly involved in the deregulation of the Gap junction pathway belong rather to microtubule functions, mitosis and tight junction, they are not so relevant for gap junctions. In conclusion, major deregulated KEGG pathways are related to various cancer promoting processes.

Limitations of this study

The major limitation of this study was that the comparison of the various localities, in terms of the gene expression profiles, should only be regarded as qualitative since equal EOM doses used for all localities (10-60 µg EOM/ml) did not reflect different EOM content per m³ of the sampled air. In contrast to some toxicity markers such as stable DNA adduct formation [1], gene expression data cannot be normalized to EOM/m³. Therefore, to make a quantitative comparison of the effect of organic compounds bound to PM_{2.5} on gene expression profiles, the EOM doses used for cell treatment should take into account the differences in EOM/m³. Such a study is in progress. On the other hand, using of equal EOM doses allowed us to reveal similar gene expression profiles and affected KEGG pathways.

For technical reasons, it was impossible to sample PM_{2.5} simultaneously in all 4 localities, which is another limitation of the study. This fact may partially explain why the agricultural locality of Trebon sampled in November and December (period of frequent winter inversions) exhibited such a high number of deregulated transcripts compared to Ostrava-Poruba and Karvina, industrial locations sampled in March and April, respectively. The effect of the winter inversions on particulate matter and PAH air pollution is well known [57].

Conclusion

To our knowledge, this is the first study dealing with differential gene expression in the context of real complex mixtures of air pollutants at the level of the whole genome in human lung fibroblasts. The study identified KEGG pathways deregulated by real complex mixtures of air pollutants collected in areas differing in the extent and sources of air pollution and the key role of activation of AhR was found. The results of this study may be used for future more detailed mechanistic studies

focused on the role of individual affected pathways and genes.

Materials and methods

Reagents

All chemical standards were purchased from Promochem (Wesel, Germany), Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) or Midwest Research Institute (Kansas City, MO, USA); solvents were from Merck (Darmstadt, Germany) and chromatographic consumables from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). The other compounds and materials used were of the highest purity available suitable for organic trace analysis. DMSO was purchased from Merck, Darmstadt, Germany. The sources of other specific chemicals and kits are indicated below.

PM_{2.5} collection, sampling sites and EOM extraction

Particulate matter < 2.5 µm (PM_{2.5}) was collected by a HiVol 3000 air sampler (model ECO-HVS3000, Ecotech, Australia) on Pallflex filters T60A20 (20 × 25 cm) in four localities of the Czech Republic differing in the extent and major sources of air pollution: Ostrava-Bartovice (heavily polluted industrial area), Ostrava-Poruba (high level of traffic), Karvina (industrial area) and Trebon (rural area with some houses equipped with local brown coal heating) as described by Topinka et al. [31]. Briefly, sampling was conducted for 24 h each day for 30-35 days in the winter season of 2008/2009. Each filter was extracted by 60 ml of dichloromethane and 3 ml of cyclohexane for 3 hours. The extracts (EOMs) from all filters with PM_{2.5} samples were pooled and aliquots were used for the detailed chemical analysis and the cell treatment. The extraction of PM_{2.5} was performed in the laboratories of the certified company ALS Czech Republic, Prague (EN ISO CSN IEC 17025). For the *in vitro* experiments, EOM samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen and the residue redissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). The stock solution of each EOM sample contained 50 mg of EOM/ml DMSO. Samples were kept in the freezer at -80°C until analysis.

Sample handling for chemical analysis

Extracts of air PM_{2.5} samples were used for fractionation into four fractions using low-pressure silica gel column chromatography. Fractionation was performed to facilitate the chemical analysis of complex mixtures of polar and nonpolar contaminants of the air samples. An aliquot of the sample extract in dichloromethane was evaporated just to dryness; the residues was redissolved in 0.5 ml of hexane and applied to the top of the open silica gel column. The silica gel (Silica gel 60, particle size 0.063-0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany) was activated for 1 hour at 200°C prior to its use. A column

with the dimensions 250 × 10 mm was dry-packed with 10 g of activated silica gel and washed with 30 ml of hexane prior to the application of the sample. Fractionation was done by gradual elution with 20 ml of hexane to obtain an aliphatic fraction (this fraction was used for alkanes, terpanes and steranes analysis), followed by 20 ml of hexane/dichloromethane (1:1, v/v) (fraction including parent aromatic and POPs compounds), 20 ml of dichloromethane (fraction with slightly-polar compounds such as nitrated derivatives of PAHs) and finally by 30 ml of methanol (polar compounds represented by oxygenated derivatives of PAHs, heterocyclic PAHs with one atom of nitrogen, esters of phthalic acid and sterols). Aliquots of these fractions were redissolved in the required volume of acetonitrile for HPLC/DAD, LC/MS-MS and in 2,2,4-trimethylpentane for GC/MS analysis.

HPLC, LC/MS-MS and GC/MS analysis

The HPLC system consisted of a Waters 717 plus autosampler, a Waters 600 E multisolvent delivery system, a Waters 474 scanning fluorescence detector and a Waters 996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA, USA). A 150 × 3 mm Supelcosil LC-PAH column with particle diameter 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used for the separation of parent PAHs with molecular weights (MW) ranging from 178 to 326 g/mol. A gradient with water, methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran was applied to separate the analytes: 0-55 min. 40-0% water, 30% acetonitrile and 30-70% methanol, 55-72 min. 30-100% acetonitrile and 70-0% methanol, 72-100 min. 100-72% acetonitrile and 0-28% tetrahydrofuran. The flow rate of the mobile phase was 0.6 ml/min., the column temperature was set at 35°C.

The LC/MS-MS analysis of parent PAHs (178-326 MW) and nitrated and oxygenated derivatives of PAHs was performed on a TripleQuad 6410 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with an electrospray ion source (ESI), an Agilent 1200 Binary Pump System with an autosampler and a MassHunter software system. The ionization of the analytes was performed in the positive ion mode. The analyte classes were separated in a reverse-phase mode using a Supelcosil LC-PAH HPLC column (150 mm × 3 mm, 5 µm - Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Other classes of contaminants included hydrocarbon markers, parent PAHs (128-278 MW), alkylated, oxidized and nitrated derivatives of PAHs and compounds with one heterocyclic atom in the ring (PANHs, PASHs) were determined by GC/MS. GC separation was done in a fused silica capillary column (SLB-5 ms: 30 m × 0.20 mm × 0.20 µm - Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) with helium as the carrier gas. A Saturn 2100 T ion trap mass

spectrometer (Varian, Walnut Creek, CA, USA), which operated in electron ionization and selected ion storage modes at an electron ionization energy of 70 eV, was used for the identification and quantification of the analytes under study.

Cell cultures and cytotoxicity

Human embryonic lung diploid fibroblasts (HEL 12469a, ECACC, UK) were grown in minimal essential medium E-MEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acids, 0.2% sodium bicarbonate, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. The cells were cultivated in plastic cell culture dishes (21 cm²) at 37°C in 5% CO₂. After reaching 90% confluency, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 1% FBS. EOM samples were diluted by DMSO and added to the medium at the test concentrations: 10, 30 and 60 µg/ml. The cells were treated for 24 h. Each concentration was tested in triplicate including control cell cultures incubated with DMSO only. The harvested cells were washed three times in PBS and the final concentration of DMSO did not exceed 0.1% of the total incubation volume. The cytotoxicity of the extracts in HEL cells was tested by the LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Bio Vision, catalogue #K311-400) at concentrations 10, 30, 60 and 100 µg EOM/ml. Significant cytotoxicity was observed at the highest EOM concentration of 100 µg/ml for extracts from Ostrava-Barstovice and Trebon (66% and 17%, respectively). Therefore, three subtoxic EOM concentrations between 10 and 60 µg/ml were used.

RNA isolation and quality control

Total RNA from lysed HEL cells was obtained using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was quantified with a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The integrity of RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). All samples had an RNA Integrity Number (RIN) above 9. Isolated RNA was stored at -80°C until processing.

Gene expression profiling and data analysis

Illumina Human-HT12 v3 Expression BeadChips (Illumina, San Diego, CA, USA) were used to generate expression profiles. Biotinylated cRNAs were prepared from 200 ng of total RNA using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX, USA). Next, 750 ng of biotinylated cRNA targets was hybridized to the beadchips. The steps of hybridization and the subsequent washing, staining and drying of the beadchips were processed according to standard instructions from Illumina. The

hybridized beadchips were then scanned on the Illumina BeadArray Reader and bead level data were summarized by Illumina BeadStudio Software v2.

Quantitative RT-PCR verification

Two thousands ng RNA from each sample was used for cDNA synthesis using the High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). The original protocol was modified by using 2.5 μ M oligo(dT) and 10 μ M random hexamers for priming in a 20 μ l reaction volume. cDNA synthesis was run according to the following conditions: 30 min at 55°C and 5 min at 85°C. Quantitative PCR measurements were performed using the 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Each qPCR reaction was carried out in a final volume of 14 μ l containing 3.5 μ l of diluted cDNA, 2.8 μ l of water and 7 μ l of master mix (Primerdesign, Southampton, UK). To determine the level of each target gene, 0.7 μ l of a specifically designed assay (PerfectProbe, Primerdesign) was added to the reaction mixture (list of primers in Table 5). Cycling conditions were: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95°C, 30 s at 50°C and 15 s at 72°C). Raw data were analyzed with SDS Relative Quantification Software version 2.3 (Applied Biosystems, USA) to assign the baseline and threshold for Ct determination. The sequences of primers used in quantitative RT-PCR are shown in Table 5.

Statistical analysis

Gene expression levels were compared with control HEL cell cultures treated with DMSO only. Bead summary data were imported into R statistical environment <http://www.r-project.org> and normalized using the quantile method in the Lumi package [58]. Only probes with a detection *P*-value < 0.01 in more than 50% of arrays were included for further analyses. Differential gene expression was analyzed in the Limma package using the moderated *t*-statistic. A linear model was fitted for each gene given a series of arrays using lmFit function [59]. Multiple testing correction was performed using the Benjamini & Hochberg method. A Venn diagram was prepared according to Oliveros [60].

Goeman's global test [61] and the KEGG database were applied to identify deregulated biological pathways and deregulated genes within these pathways. The procedure of Holm for control of the family-wise error rate was applied [62]. The Jonckheere - Terpstra monotonicity test [63,64] was used to analyze the dose response of expression of selected genes.

Ct values of real-time PCR data were analyzed using GenEx software version 5.2.7 (MultiD Analyses AB, Goteborg, Sweden). The expression levels of the target genes were normalized to the expression levels of the

reference genes *GAPDH* and *SDHA*. Reference genes were selected according to the stability of gene expression during experimental conditions using the geNorm reference gene selection kit (Primerdesign).

Additional material

Additional file 1: Supplementary table with the list of chemical compounds identified and quantified in EOMs from various localities.

Additional file 2: Complete list of significantly deregulated genes in HEL cells treated with 10, 30, and 60 μ g/ml of organic extracts from PM2.5 collected in Ostrava-Bartovice, Ostrava-Poruba, Karvina, and Trebon. Each excel sheet contains list of deregulated transcripts detected from the comparison of gene expression profile of cells treated with an appropriate EOM (Table 1) and cells treated with DMSO. Transcripts with adjusted *p*-value > 0.05 and average expression < 4 were filtered out.

List of abbreviations

ABC: ATP binding cassettes; AhR: aryl hydrocarbon receptor; B[a]P: benzo[a]pyrene; DCM: dichloromethane; EOM: extractable organic matter; HPLC: high performance liquid chromatography; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PM2.5: particulate matter < 2.5 μ m; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; LDH: lactate dehydrogenase; qPCR: quantitative real time PCR; RIN: RNA integrity number, TGF- β : transforming growth factor beta; SHB: steroid hormone biosynthesis.

Acknowledgements

We would like to thank V. Švecová from the Institute of Experimental Medicine for excellent assistance during the particulate matter sampling campaign. The study was supported by the Czech Ministry of Education (CZ: MSMT 2B08005), Grant Agency of the Czech Republic (CZ: GACR P503/11/0142) and by the Academy of Science of the Czech Republic (CZ: AV CR AV0Z50390512). The work of Jiří Kléma was funded by the Czech Ministry of Education in the framework of the research program, Transdisciplinary Research in the Area of Biomedical Engineering II (MSM 6840770012).

Author details

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, Czech Republic. ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic. ³Czech Technical University in Prague, Prague 2, Czech Republic. ⁴Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic.

Authors' contributions

HL carried out gene expression analysis on Illumina microarrays and qPCR verification. She also substantially contributed to the description of results and their discussion and interpretation. KU carried out cell preparations and treatment, cytotoxicity analysis and gene expression on Illumina microarrays. JK was responsible for biostatistical evaluation of data. MM substantially contributed to the data interpretation. RJS performed overall text revision, and he contributed to the Discussion. MC was responsible for detailed chemical analysis of extracts from particulate matter. JT was responsible for PM2.5 sampling, EOM extraction, chemical analysis and the overall preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 October 2011 Accepted: 12 January 2012
Published: 12 January 2012

References

- Lewtas J: Air pollution combustion emissions: characterisation of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive and cardiovascular effects. *Mutat Res* 2007, **636**:95-133.
- Harrison RM, Smith DJT, Kibble AJ: What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}? *Occup Environ Med* 2004, **61**:799-805.
- Claxton LD, Woodall GM Jr: A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res* 2007, **636**:36-94.
- Topinka J, Hovorka J, Milcova A, Schmuczerova J, Krouzek J, Rossner P Jr, Sram RJ: Acellular assay to assess genotoxicity of complex mixtures of organic pollutants bound on size segregated aerosol. Part I: DNA adducts. *Toxicol Lett* 2010, **198**:304-311.
- Marvin CH, Hewitt LM: Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. *Mutat Res* 2007, **636**:4-35.
- Karlsson HL, Nygren J, Moller L: Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat Res* 2004, **565**:1-10.
- Steenhof M, Gosens I, Strak M, Godri K, Hoek G, Cassee FR, Mudway IS, Kelly FJ, Harrison RM, Lebreit E, Brunekreef B, Janssen NAH, Pieters HHP: In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential - the RAPTES project. *Particle and Fibre Toxicology* 2011, **8**:26.
- Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Cerna M, Wolff T: Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat Res* 2000, **469**:83-93.
- Binkova B, Sram RJ: The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res* 2004, **547**:109-121.
- Ghio AJ, Stonehuerner J, Dailey LA, Carter JD: Metals associated with both the water soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particles catalyze an oxidative stress. *Inhal Toxicol* 1999, **11**:37-49.
- Prahalad AK, Inmon J, Dailey LA, Madden MC, Ghio AJ, Gallagher JE: Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem Res Toxicol* 2001, **14**:879-887.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP: Soluble metals as well as insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* 2002, **234**:317-326.
- Upham BL, Bláha L, Babica P, Park JS, Sovadinová I, Pudrith C, Rummel AM, Weis LM, Sai K, Tithof PK, Guzvić M, Vondráček J, Machala M, Trosko JE: Tumor promoting properties of a cigarette smoke prevalent polycyclic aromatic hydrocarbon as indicated by the inhibition of gap junctional intercellular communication via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Cancer Sci* 2008, **99**:696-705.
- Andrysik Z, Vondráček J, Marvanová S, Čigánek M, Neča J, Pěňčiková K, Mahadevan B, Topinka J, Baird WM, Kozubík A, Machala M: Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: The role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res* 2011, **714**:53-62.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2009 [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php].
- Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H: DNA Adducts: Identification and Biological Significance. *IARC, Lyon* 1994, **16**:437-441.
- Khalili H, Zhang FJ, Harvey RG, Dipple A: Mutagenicity of benzo[a]pyrene-deoxyadenosine adducts in a sequence context derived from the p53 gene. *Mutat Res* 2000, **465**:39-44.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y: Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol* 2005, **69**:199-207.
- Chopra M, Schrenk D: Dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor signaling, and apoptosis-persistent pollutants affect programmed cell death. *Crit Rev Toxicol* 2011, **41**:292-320.
- Ferecatu I, Borot M-C, Bossard C, Leroux M, Boggetto N, Marano F, Baeza-Squiban A, Andreau K: Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Particle and Fibre Toxicology* 2010, **7**:8-18.
- Bláha L, Kapplová P, Vondráček J, Upham B, Machala M: Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Sci* 2002, **65**:43-51.
- Mahadevan B, Parsons H, Musafia T, Sharma AK, Amin S, et al: Effect of artificial mixtures of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons present in coal tar, urban dust, and diesel exhaust particulates on MCF-7 cells in culture. *Environ Mol Mutagen* 2004, **44**:99-107.
- Sen B, Mahadevan B, DeMarini D: Transcriptional responses of the complex mixtures - A review. *Mutat Res* 2007, **636**:144-177.
- Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, Baird WM: Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res* 2005, **65**:1251-1258.
- Aung JH, Lame MW, Gohil K, He G, Denison M, Rutledge JC, Wilson DW: Comparative gene responses to collected ambient particles in vitro: endothelial responses. *Physiol Genomics* 2011, **43**:917-929.
- Binkova B, Giguere Y, Rossner P, Dostal M, Sram RJ: The effect of dibenzo[a]pyrene on human diploid fibroblasts; the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21^{WAF1} proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res* 2000, **471**:57-70.
- Ravindra K, Sokhi R, van Grieken R: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmosph Environ* 2008, **42**:2895-2921.
- Yang Y, Guo P, Zhang Li D, Zhao L, Mu D: Seasonal variation, sources and gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in Guangzhou, China. *Science Tot Environ* 2010, **408**:2492-2500.
- Gupta S, Kumar K, Srivastava A, Srivastava VK: Size distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aerosol particle samples from the atmospheric environment of Delhi, India. *Science of the Total Environment* 2011, **409**:4674-4680.
- Topinka J, Rossner P Jr, Milcova A, Schmuczerova J, Svecova V, Sram RJ: DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM_{2.5} in an acellular assay. *Toxicol Lett* 2011, **202**:186-192.
- Guengerich FP, Parikh A, Yun CH, Kim D, Nakamura K, Notley LM, Gillam EM: What makes P450s work? Searches for answers with known and new P450s. *Drug Metab Rev* 2000, **32**:267-281.
- Nebert DW, Russell DW: Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002, **360**:1155-62.
- Port JL, Yamaguchi K, Du B, De Lorenzo M, Chang M, Heerdt PM, Kopelovich R, Marcus CB, Altorki NK, Subbaramaiah K, Dannenberg A: Tobacco smoke induces CYP1B1 in the aerodigestive tract. *Carcinogenesis* 2004, **25**:2275-2281.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M, Yokoi T: Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* 2004, **64**:3119-3125.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP: Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000, **59**:65-85.
- Kung T, Murphy KA, White LA: The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochem Pharmacol* 2009, **77**:536-546.
- Kelner MJ, Stokely MN, Stoval NE, Montoya MA: Structural organization of the human microsomal glutathione S-transferase gene (GSTT2). *Genomics* 1996, **36**:100-103.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR: Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998, **6**:3517-3527.
- Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG: Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol* 2005, **401**:78-99.
- Sanderson JT: The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 2006, **94**:3-21.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T: Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 2005, **227**:115-124.
- Ohtake Y, Baba A, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Intrinsic AHR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **370**:541-546.

44. Shanle EK, Xu W: Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 2011, **24**:6-19.
45. Mathew LR, Simonich MT, Tanguay RL: AhR-dependent misregulation of Wnt signalling disrupts tissue regeneration. *Biochem Pharmacol* 2009, **77**:498-507.
46. Procházková J, Kabátková M, Bryja V, Umannová L, Bernatík O, Kozubík A, Machala M, Vondráček J: The Interplay of the Aryl Hydrocarbon Receptor and β -Catenin Alters Both AhR-Dependent Transcription and Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Progenitors. *Toxicol Sci* 2011, **122**:349-360.
47. Katoh M: Molecular cloning, gene structure, and expression analyses of NKD1 and NKD2. *Int J Oncol* 2001, **19**:963-969.
48. Shi Y, Massague J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
49. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ: Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 2011, **121**:3206-3219.
50. Langlands K, Yin X, Anand G, Prochownik EV: Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 1997, **272**:19785-19793.
51. Gomez-Duran A, Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Puga A, Fernandez-Salguero PM: Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: how the dioxin receptor interacts with TGFbeta signaling. *Biochem Pharmacol* 2009, **15**:700-712.
52. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW: Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2009, **3**:281-290.
53. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J: Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**:317-364.
54. Xu S, Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ, Boyer JL: Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, **99**:G126-G135.
55. Henry EC, Welle SL, Gasiewicz TA: TCDD and a Putative Endogenous AhR Ligand, ITE, Elicit the Same Immediate Changes in Gene Expression in Mouse Lung Fibroblasts. *Toxicol Sci* 2010, **114**:90-100.
56. Nishimura C, Matsuura Y, Kohai Y, Ahera T, Carper D, Morjana N, Lyons C, Flynn TG: Cloning and expression of human aldose-reductase. *J Biol Chem* 1990, **265**:9788-9792.
57. Sevastyanova O, Novakova Z, Hanzalova K, Binkova B, Sram RJ, Topinka J: Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat Res* 2008, **649**:179-186.
58. Du P, Kibbe W, Lin SM: Lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics* 2008, **24**:1547-1548.
59. Smyth GK: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004, **3**, Article 3.
60. Oliveros JC: VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.[<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>].
61. Goeman JJ, van de Geer SA, de Kort F, van Houwelingen JC: A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* 2004, **20**:93-99.
62. Holm S: A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979, **6**:65-70.
63. Jonckheere AR: A test of significance for the relation between m rankings and k ranked categories. *Brit J Stat Psychol* 1954, **7**:93-100.
64. Bewick V, Cheek L, Ball J: Statistics review 10: Further nonparametric methods. *Crit Care* 2004, **8**:196-199.

doi:10.1186/1743-8977-9-1

Cite this article as: Líbalová *et al.*: Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles. *Particle and Fibre Toxicology* 2012 **9**:1.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

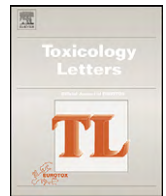


PŘÍLOHA 2

Eva Hrubá, Lenka Trilecová, Soňa Marvanová, Pavel Krčmář, Lenka Vykopalová, Alena Milcová, Helena Líbalová, Jan Topinka, Andrea Staršíchová, Karel Souček, Jan Vondráček, Miroslav Machala

Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells.

Toxicol Lett. 2010 Sep 1;197(3):227-35. Epub 2010 Jun 11.



Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells

Eva Hrubá^a, Lenka Trilecová^a, Soňa Marvanová^a, Pavel Krčmář^a, Lenka Vykopalová^a, Alena Milcová^b, Helena Líbalová^b, Jan Topinka^b, Andrea Staršíchová^{c,1}, Karel Souček^c, Jan Vondráček^{a,c}, Miroslav Machala^{a,*}

^a Department of Chemistry and Toxicology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100 Brno, Czech Republic

^b Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, AS CR, Vídeňská 1083, 14220 Prague, Czech Republic

^c Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2010

Received in revised form 1 June 2010

Accepted 2 June 2010

Available online 11 June 2010

Keywords:

Prostate epithelial cells

DNA adducts

Apoptosis

Cell-cycle arrest

p53

Carcinogenesis

ABSTRACT

Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has been positively associated with prostate cancer, but knowledge of the formation of PAH–DNA adducts and related genotoxic events in prostatic cells is limited. In the present study, benzo[*a*]pyrene (BaP), a potent mutagenic PAH, formed significant levels of DNA adducts in cell lines derived from human prostate carcinoma. When analyzing the effect of BaP on the induction of CYP1 enzymes participating in the metabolic activation of PAHs in LNCaP cells, we found that BaP induced expression of CYP1A1 and CYP1A2, but not CYP1B1 enzyme. Despite a significant amount of DNA adducts being formed by BaP and, to a lesser extent also by another strong genotoxin, dibenzo[*a,l*]pyrene, neither apoptosis nor cell-cycle arrest were induced in LNCaP cells. LNCaP cells were not sensitized to the induction of apoptosis by PAHs even through inhibition of the phosphoinositide-3-kinase/Akt pro-survival pathway. The lack of apoptosis was not due a disruption of expression of pro-apoptotic and pro-survival members of the Bcl-2 family of apoptosis regulators. In contrast to other genotoxic stimuli, genotoxic PAHs failed to induce DNA double-strand breaks, as illustrated by the lack of phosphorylation of histone H2AX or checkpoint kinase-2. BaP did not activate p53, as evidenced by the lack of p53 accumulation, phosphorylation at Ser15, or induction of p53 transcriptional targets. Taken together, although genotoxic PAHs produced significant levels of DNA adducts in a model of human prostate carcinoma cells, they did not activate the mechanisms leading to elimination of cells with significant damage to DNA, presumably due to their failure to activate the p53-dependent DNA damage response.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate carcinoma is one of the most prevalent forms of cancer in the “developed” world. In the USA, it is the commonest cancer among men (ACS, 2009). Epidemiologic studies suggest a possible link between diet and the carcinogenesis of prostate cancer. A recent study indicated that red meat and processed meat may be positively associated with prostate cancer via mechanisms involving (among other factors) benzo[*a*]pyrene (BaP) (Sinha et al., 2009).

Some retrospective epidemiologic studies support a possible link between occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the risk of prostate cancer (Aronson et al., 1996; Brown and Delzell, 2000). BaP is listed by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a group-1 carcinogen, it is i.e., carcinogenic to humans (IARC, 1983, 2010). Together with other genotoxic PAHs such as dibenzo[*a,l*]pyrene (DBaP), BaP is known to produce stable DNA adducts *in vitro* and *in vivo* which are related to several genotoxic effects in target cells, leading to accumulation and activation of p53 tumor suppressor protein, induction of cell-cycle arrest, and apoptosis (Binková et al., 2000; Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995; Solhaug et al., 2004; Tekpli et al., 2010; Topinka et al., 2008). Primary cells isolated from human prostate tissues seem to be able to bioactivate BaP, but information on the effects of PAHs on cell lines derived from prostate tissue is limited (Grover and Martin, 2002; Martin et al., 2002). The levels of DNA adducts

* Corresponding author at: Department of Toxicology, Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute, 62100 Brno, Czech Republic
Tel.: +420 533331801; fax: +420 541211229.

E-mail address: machala@vri.cz (M. Machala).

¹ Present address: European Institute for Molecular Imaging, University of Münster, Mendelstrasse 11, 48149 Münster, Germany.

formed by PAHs in prostate cancer seem to vary due to factors such as metabolic clearance or the rate of DNA repair; nevertheless, a recent study suggested that high levels of PAH–DNA adducts in non-tumor prostate cells are strongly associated with biochemical recurrence (i.e., rise in levels of prostate-specific antigen in serum) after prostatectomy (Rybicki et al., 2008, 2006, 2004).

The formation of genotoxic metabolites is considered to represent an important event in the PAH-induced initiation of tumors (Baird et al., 2005). BaP is highly mutagenic, but its effects may also include modulations of processes contributing to tumor promotion (Burdick et al., 2003; Rubin, 2001). One of the mechanisms possibly participating in tumor promotion induced by PAHs is activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Sjögren et al., 1996). This ligand-activated transcription factor regulates expression of cytochromes P450 1A1 (CYP1A1), P450 1A2 (CYP1A2) and P450 1B1 (CYP1B1), thereby metabolizing PAHs to reactive dihydrodiol epoxides that can form adducts with DNA (Nebert et al., 2004, 2000; Xue and Warshawsky, 2005). Nevertheless, apart from being involved in metabolism of PAHs to their ultimate genotoxic metabolites, AhR may also participate in other toxic effects of PAHs, such as deregulation of cell-cycle control or interactions with other intracellular signaling pathways (Andrysík et al., 2007; Puga et al., 2009). Activation of the AhR may also protect cells from the induction of programmed cell death (e.g., by the E2F1-dependent pathway), leading to apoptosis inhibition (Chopra et al., 2009; Marlowe et al., 2008). PAHs or other AhR ligands may also initiate anti-androgenic effects, leading to inhibition of androgen-dependent proliferation of prostate cancer cells (Barnes-Ellerbe et al., 2004; Kizu et al., 2003; Morrow et al., 2004). Therefore, the overall effect of genotoxic PAHs on prostatic epithelial cells may reflect AhR activation and DNA damage. However, apart from identification of PAH–DNA adducts in human prostate tissue or the formation of DNA adducts in prostatic cells *in vitro* (Martin et al., 2002; Rybicki et al., 2004), little is known about the effect of the formation of PAH–DNA adducts on DNA damage response in prostate epithelial cells.

In the present study, we analyzed the formation of stable adducts of anti-BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) in various prostate carcinoma cell lines and then continued with the analysis of the effects of BaP on DNA damage response in LNCaP cells. Our results suggested that, despite forming significant levels of DNA adducts, genotoxic PAHs failed to induce the p53-dependent DNA damage response, including transcriptional activation of p53 target genes, induction of apoptosis, or cell-cycle arrest.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

BaP was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and DBaP was from Promochem GmbH (Wesel, Germany). Dimethylsulfoxide (DMSO), wortmannin, 4'-6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI), ribonuclease A and T1, proteinase K, micrococcal nuclease, nuclease P1, and protein assay kit were from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Thin-layer chromatography (TLC) plates made of polyethyleneimine (PEI; thickness, 0.1 mm) cellulose were from Macherey–Nagel (Düren, Germany). T4 polynucleotide kinase was from USB (Cleveland, OH, USA), γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ L) was from GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Propidium iodide was from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany). Roscovitine was kindly provided by Professor Miroslav Strnad (Institute of Experimental Botany AS CR, Olomouc, Czech Republic). All other reagents were from Sigma–Aldrich unless indicated otherwise.

2.2. Cells

Human prostate carcinoma LNCaP cells (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and DU-145 cells (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Auckland, New Zealand) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma–Aldrich). Human prostate carcinoma PC-3 cells (ATCC) were

grown in F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. For the treatment, LNCaP cells were maintained in modified RPMI-1640 without phenol red (Sigma–Aldrich) supplemented with 5% charcoal-treated (CT) serum. All cell lines were maintained in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. Analyses of DNA adducts by ³²P-post-labeling

All cell lines were exposed to the test compounds or DMSO (0.25%; solvent control), for 24 h. After exposure, cells were washed with cold PBS, scraped into Eppendorf tubes, centrifuged, and cell pellets stored at –80 °C. Cell pellets were homogenized in a solution of 10 mM Tris–HCl, 100 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 8.0. DNA was isolated using RNase A and T1, and proteinase K treatment followed by the phenol/chloroform/isoamylalcohol procedure as previously described (Binková et al., 2000). The DNA concentration was estimated by spectrophotometric means by measuring the ultraviolet (UV) absorbance at 260 nm. DNA samples were stored at –80 °C until analyses. ³²P-post-labeling analysis was undertaken as previously described (Phillips and Castegnaro, 1999; Reddy and Randerath, 1986). Briefly, DNA samples (6 μ g) were digested by a mixture of micrococcal endonuclease and spleen phosphodiesterase for 4 h at 37 °C. Nuclease P1 was used for adduct enrichment. The labeled DNA adducts were resolved by two-directional TLC on 10 cm \times 10 cm PEI cellulose plates. The solvent systems used for TLC were: D-1: 1 M sodium phosphate, pH 6.8; D-2: 3.8 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5; and D-3: 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0. Autoradiography was carried out at –80 °C for 1–24 h. The radioactivity of distinct adduct spots was measured using a liquid scintillation counter. To determine the exact amount of DNA in each sample, aliquots of DNA enzymatic digest (1 μ g of DNA hydrolysate) were analyzed for nucleotide content by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, which simultaneously permitted checking of DNA purity. Levels of DNA adduct were expressed as adducts per 10⁸ nucleotides. The standard of the BPDE–DNA adduct was run in triplicate in each post-labeling experiment to check for inter-assay variability and to normalize the calculated levels of DNA adducts.

2.4. Detection of cell death

LNCaP cells were exposed to the test compounds for 24 and 48 h. Exposure for 48 h included change of the fresh medium and the compound after 24 h. For DAPI staining, cells fixed in 70% ethanol were incubated with 1 μ g/ml DAPI (final concentration) for 5 min at room temperature. After incubation, cells were centrifuged and mixed with 10–20 μ L of MOWIOL solution (10% MOWIOL 4-88 was prepared in 25% glycerol, 100 mM Tris–HCl, pH 8.5) and mounted for observation under a fluorescence microscope. A minimum of 300 nuclei were counted per sample.

2.5. Assessment of distribution of the cell cycle

LNCaP cells were grown for 48 h in RPMI medium with 10% FBS. One day before exposure, the medium was changed for RPMI medium with 5% CT serum. LNCaP cells were exposed to test compounds dissolved in DMSO (maximal concentration, 0.1%, v/v) for 24 h. Following treatment, the medium was removed, cells harvested by trypsinization, and then suspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 10% FBS. Cells were then centrifuged, and fixed in 70% ethanol at 4 °C overnight. Fixed cells were washed once with PBS and stained with propidium iodide as described previously (Vondráček et al., 2006). Cells were then analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using a 488-nm (15 mW) air-cooled argon-ion laser for excitation of propidium iodide, and CELLQuest software version 5.1.1 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for data acquisition. A minimum of 15,000 events was collected per sample. Data were analyzed using ModFit LT version 3.0 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

2.6. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from cells using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey–Nagel). The amplifications of samples were carried out using a QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to manufacturer's specifications. All probes were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5'-end, and with the Black Hole 1 (BH 1) fluorescent quencher dye on the 3'-end. The sequences are listed in Table 1. Amplifications were run on a LightCycler machine (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using the following program: reverse transcription at 50 °C for 20 min and initial activation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 0 s and 60 °C for 60 s. Relative gene expression for each sample was expressed in terms of the threshold cycle (Ct) normalized to housekeeping genes *B2M* or *POLR2A* (Δ Ct). The primers and probes for the housekeeping genes were purchased as qPCR kits from Geneti Biotech (Hradec Králové, Czech Republic). Δ Ct values were then compared between control samples (DMSO 0.1%) and samples treated with BaP to calculate $\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct [BaP] – Δ Ct [control]). The final comparison of transcript ratios between samples is given as 2^{– $\Delta\Delta$ Ct} (Livak and Schmittgen, 2001). The absolute quantification of CYP1 mRNAs was done using the pCR4-ZeroBlunt-TOPO vector with inserted hCYP1A1, hCYP1A2 and hCYP1B1 PCR products (Geneti Biotech) as standards. For the absolute

Table 1
List of sequences of primers and probes used for quantitative real-time RT-PCR.

Gene	Accession no.	Primer and probe sequences	Product length (bp)
CYP1A1	NM_000499	F: 5'-CACCATCCCCACAGCAC-3' R: 5'-TTACAAAGACACAACGCCCC-3' P: 5'-CAAGTTTGAAGGCTTTTACATCCCC-3'	77
CYP1A2	NM_000761	F: 5'-AGACCTCCGACACTCCTC-3' R: 5'-GTTTACGAAGACACAGCATTTTC-3' P: 5'-CACCATCCCCACAGCACAA-3'	110
CYP1B1	NM_000104	F: 5'-GCTTTTCTCTTCATCTCCATC-3' R: 5'-TTCATTTTCGAGGCTCATTTG-3' P: 5'-CTCACCAGTGGATTTTACAGGCCAAC-3'	73
p21	NM_000389	F: 5'-CCGCTCTACATCTTCTGCCTTA-3' R: 5'-ACCTCTCATTCAACCCGCTA-3' P: 5'-CCGCCCCCTGCCCCCA-3'	160
GADD45A	NM_001924	F: 5'-GAGCAGAAGACCCAAAGGAT-3' R: 5'-AGGCACAACACCACGTTATC-3' P: 5'-CCTCAGGGCATCCCCAC-3'	146
PUMA (BBC3)	NM_014417	F: 5'-GCACAGTACGAGCGGGGAG-3' R: 5'-CCCTGGGTAAGGGCAGGAGTC-3' P: 5'-CAAGAGGAGCAGCAGCGGCCCGC-3'	103
NOXA (PMAIP1)	NM_021127	F: 5'-CTGTCCGAGGTGCTCCAGTT-3' R: 5'-TCCTGAGTTGAGTAGCACAC-3' P: 5'-CTCGGTTGAGCGTTCTTGCGCGC-3'	164
XPC	NM_004628	F: 5'-GAGAAGTACCCTACAAGATGG-3' R: 5'-GCTGATACTCTCTGTCTGC-3' P: 5'-AGGCTTTTCTAACCGTCTCGGG-3'	129
DDB2	NM_000107	F: 5'-GGACAAACCCACCTTCATCA-3' R: 5'-CCATTGAGGAGCGGTAATAAC-3' P: 5'-GGATTGGAGCTGGAGGGAGC-3'	101

(F) forward primer; (R) reverse primer; (P) probe.

quantification, the following reaction conditions were used: reverse transcription 50 °C, 20 min; denaturation 95 °C, 15 min; and amplification 40 cycles—95 °C, 15 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 30 s. The total RNA content was determined using a Qubit™ fluorometer and Quant-iT™ RNA Assay kit (Invitrogen).

2.7. Western blotting

LNCaP cells were exposed for 24 h to BaP (1–25 μM) or to DMSO (solvent control). Roscovitine (25 μM) and UV-C irradiation were used as controls for the activation of DNA damage-response proteins. After the exposure, cells were harvested with lysis buffer (1% SDS, 10% glycerol, 100 mM Tris and protease/phosphatase inhibitors) and the samples sonicated. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid (BCA) and copper sulfate (Sigma–Aldrich). For western blotting analyses, equal amounts of total protein lysates were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) on 8.5%, 10% or 15% gels and electrotransferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane Hybond-P (GE Healthcare). Pre-stained molecular-weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were run in parallel. The membranes were blocked and incubated with primary antibodies against CYP1A1 and CYP1A2 (polyclonal anti-human P450 1A1 and 1A2 antibodies and purified antigens as standards were generous gifts of Professor F. Peter Guengerich from the Department of Biochemistry and Center of Molecular Toxicology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA). Other primary antibodies for the detection of the following proteins were obtained from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA): Chk1 phosphorylated on Ser345 (#2341), Chk2 phosphorylated on Thr68 (#2661), p53 phosphorylated on Ser15 (#9284), Bcl-X_L (#2762); from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): Bcl-2 (sc-509) and p21 (sc-397); from Millipore Upstate (Billerica, MA, USA): Bak (#06-536), Bax (#06-499) and H2AX phosphorylated on Ser139 (#07-143); from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA): Mcl-1 (#559027); from Calbiochem (San Diego, CA, USA): total p53 (OP43); from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA): β-actin (A1978) and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody IgG (A9044); and from GE Healthcare (Little Chalfont): horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (#NA934). Expression of β-actin was used to verify equal loading. To visualize peroxidase activity, the ECLPlus western blotting detection system (GE Healthcare) was used.

2.8. Statistical analyses

Data were quantitatively expressed as means ± S.D. and analyzed by Student's *t*-test or one-way ANOVA (analysis of variance in STATISTICA for Windows (StatSoft, Prague, Czech Republic)) followed by the post hoc Tukey's range test. If the variances

were not homogeneous, a non-parametric Mann–Whitney *U*-test was used. *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Formation of stable DNA adducts in prostate cancer cell lines

First, we investigated the effects of BaP on the formation of stable DNA adducts in three cell lines derived from prostate carcinoma: LNCaP, DU-145 and PC-3. Similar DNA adduct patterns, with two adduct spots representing major BaP-derived adducts, were found for all three cell lines (Fig. 1). The major adduct spot in Fig. 1A–C represented the most abundant (+)-trans-anti-7R,8S,9S-trihydroxy-10S-(N₂-deoxyguanosyl)-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene (N₂-BPDE-dG). The identity of the second minor spot is not clear without carrying out co-chromatography with a corresponding standard. We may speculate only that it is N₆-BPDE-dA. This has been identified to be a minor adduct in BaP- or BPDE-treated cells (Drej et al., 2005). All three concentrations (1, 10 and 25 μM) enabled formation of a significant number of DNA adducts in all three cell lines tested (Table 2). However, there was a variation among the three cell lines in terms of the amount of DNA adducts formed by BaP treatment. The highest level of DNA adducts was observed in DU-145 cells, followed by LNCaP cells, and the lowest adduct quantities were detected in the PC-3 cell line. These results were confirmed when we used another highly potent genotoxic PAH: DBaP. The latter was a weaker inducer of DNA adducts than BaP (particularly in LNCaP cells and PC3 cells) whereas, in DU-145 cells, DBaP formed DNA adducts already at 0.1 μM concentration (data not shown). The LNCaP cell line is an androgen-sensitive model derived from prostate carcinoma metastasis. This cell line has been frequently used to study the anti-androgenic effects of environmental contaminants, including AhR ligands (Barnes-Elberbe et al., 2004; Kizu et

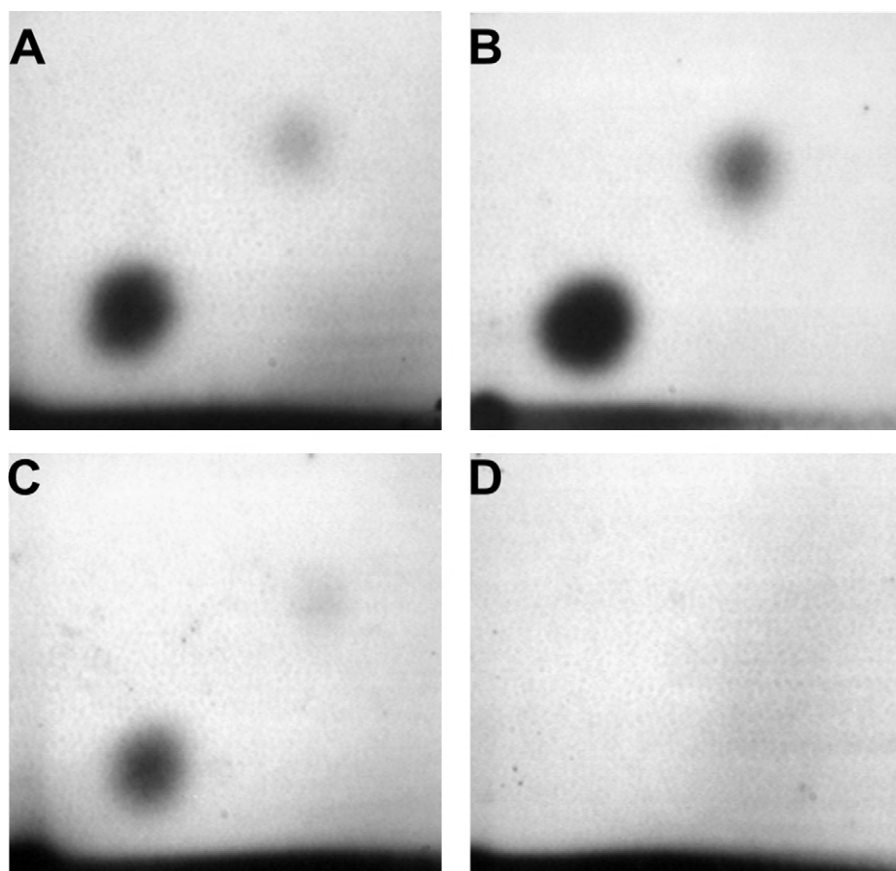


Fig. 1. Autoradiographs of thin-layer chromatograms with the DNA adduct pattern of DNA isolated from various cell lines exposed to 1 μ M of BaP for 24 h: (A) LNCaP cells, (B) DU-145 cells and (C) PC3 cells. (D) Negative control (0.25% DMSO) is shown for LNCaP cells only. DNA (5 μ g) was analyzed by 32 P-post-labeling using the nuclease P1 method of sensitivity enhancement as described in Section 2. Screen-enhanced autoradiography was undertaken at -80°C for 24 (panels A, C, D) or 6 h (panel B).

al., 2003; Morrow et al., 2004) and it contains intact p53-dependent DNA damage-response pathways (Nelson and Kastan, 1994). Therefore, we selected this cell line to further study the effects of BaP on the cellular responses to DNA damage.

BaP was a potent inducer of expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNA in LNCaP cells (Fig. 2A). In contrast, expression of CYP1B1 mRNA was not induced by BaP. CYP1B1 may play a prominent part in the metabolic activation and genotoxic effects of PAHs (Uno et al., 2006), so we next undertook the absolute quantification of CYP1 transcripts. The amount of CYP1B1 in BaP-treated cells was identical to control levels, and three orders of magnitude lower than in the case of CYP1A1 and CYP1A2 (Table 3). CYP1A1 and CYP1A2 were induced also at the protein level (Fig. 2B), suggesting that these two CYP1A enzymes were responsible for BaP metabolism to BPDE.

Table 2
DNA adducts in LNCaP, DU-145 and PC-3 cells after 24h exposure to BaP.

	LNCaP	DU-145	PC-3
DMSO 0.25%	0.6 \pm 0.18 ^a	0.8 \pm 0.31	0.3 \pm 0.15
BaP 1 μ M	8.4 \pm 1.32 [*]	131.5 \pm 12.95 ^{**}	1.8 \pm 0.27 ^{**}
BaP 10 μ M	13.2 \pm 1.58 ^{**}	70.2 \pm 12.78 ^{**}	1.9 \pm 0.24 ^{**}
BaP 25 μ M	15.9 \pm 3.78 ^{**}	61.9 \pm 6.86 ^{**}	1.9 \pm 0.43 ^{**}

^a The data were expressed as a number of adducts per 10^8 nucleotides and represent means \pm S.D. obtained from three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's range test.

^{*} Statistically significant difference between DMSO-treated control and BaP-treated samples ($P < 0.05$).

^{**} Statistically significant difference between DMSO-treated control and BaP-treated samples ($P < 0.01$).

3.2. BaP fails to induce cell-cycle arrest or apoptosis in LNCaP cells

Genotoxic PAHs producing stable DNA adducts have been shown to induce apoptosis and cell-cycle arrest in lung fibroblasts, breast epithelial cells and liver epithelial cells, the latter one preferentially in the S-phase of cell cycle (Binková et al., 2000; Chramostová et al., 2004; Khan and Dipple, 2000). Therefore, we next tested the effects of BaP on cell-cycle distribution in LNCaP cells. Surprisingly, BaP had no effect on the cell cycle even though treatments inducing the accumulation and activation (roscovitine) of p53, or significant DNA damage (UV irradiation) induced S-phase arrest in LNCaP cells (Fig. 3A). The minor increase in the number of G1 cells may be attributed to activation of the AhR and its supposed anti-androgenic effects (Morrow et al., 2004). Importantly, neither BaP nor DBaP caused apoptosis (which was detected as nuclear fragmentation) in the LNCaP cell line after 24-h or 48-h exposure (Fig. 3B; data not shown). This was in marked contrast to the effects of either roscovitine or UV-C irradiation, both of which already induced significant nuclear fragmentation after 24-h expo-

Table 3
Absolute numbers of copies of CYP1 transcripts in LNCaP cells.

Treatment	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1
DMSO	1757 (\pm 462)	3981 (\pm 425)	396 (\pm 285)
BaP 25 μ M	190 822 (\pm 53 872)	215 855 (\pm 60 934)	333 (\pm 149)

Cells were treated for 24 h with 25 μ M BaP or 0.25% DMSO (solvent control). Total RNA was isolated and quantitative RT-PCR was performed as described in Section 2. Total RNA content was determined fluorimetrically. The results are representative of three independent experiments and are expressed as means \pm S.D. of number of copies of respective genes per μ g of total RNA.

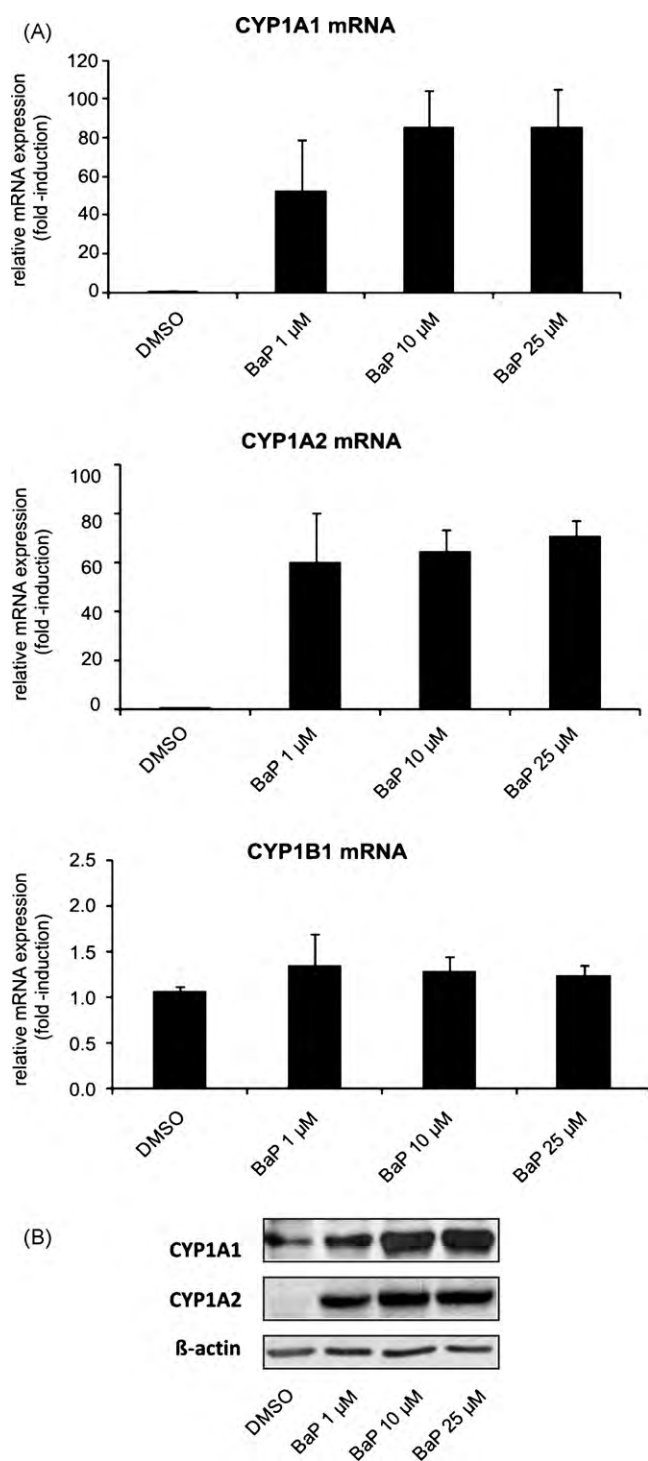


Fig. 2. Induction of expression of CYP enzymes participating in the metabolic activation of PAHs in LNCaP cells. (A) Modulation of levels of CYP1A1, CYP1A2 and 1B1 mRNA by BaP. Total RNA was isolated and quantitative RT-PCR carried out for the detection of levels of CYP1A1, 1A2 and 1B1 mRNA. Data were normalized to expression of the *POLR2A* housekeeping gene. Results are means \pm S.D. of two independent experiments each carried out in triplicate. (B) Induction of CYP1A1 and CYP1A2 proteins. Cells were treated with the indicated concentrations of BaP or 0.25% DMSO (solvent control) for 24 h. Cell lysates were prepared as described in Section 2 and analyzed by western blotting for levels of CYP1A1, 1A2 and β -actin protein (loading control). Results are representative of three independent experiments.

sure (Fig. 3B and C). To exclude the possibility that BaP did not induce apoptosis due to the use of mostly non-proliferating cells in the medium with androgen-depleted serum, we also applied BaP and DBaP to proliferating LNCaP cells in normal growth medium. However, neither treatment increased the percentage of cells with fragmented nuclei above that seen in controls.

It has been shown that inactivation of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) phosphatase due to frame-shift mutation leads to an increased pro-survival signaling in LNCaP cells (Carson et al., 1999) because of constitutive PI3K activation. To exclude the possibility that the observed lack of apoptosis after BaP treatment may be due to increased PI3K activity, we also used the specific PI3K inhibitor wortmannin. However, although UV-C irradiation- and roscovitine-induced apoptosis were potentiated by pre-treatment with wortmannin, it had no effect on BaP- or DBaP-treated cells (Fig. 3C). We also did not observe any effect of BaP itself on phosphorylation of PKB/Akt or ERK1/2 kinases, suggesting that these two pro-survival pathways were not activated in BaP-treated LNCaP cells (data not shown).

Disruption of expression levels of Bcl-2 family proteins has also been suggested to modulate survival of prostate carcinoma cells (Yang et al., 2003). We wanted to exclude the possibility that BaP may change the ratio of pro-apoptotic/pro-survival members of Bcl-2 family of apoptosis regulators, so we also undertook western blotting analyses of their protein expression. However, the protein levels of Bax and Bak (pro-apoptotic) or Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 (pro-survival) proteins were not affected by BaP. The model non-genotoxic Ah receptor ligand TCDD also had no effect on their expression (Fig. 3D).

3.3. BaP fails to activate the p53-dependent response to DNA damage in LNCaP cells

The p53 tumor suppressor is a central transcription factor accumulating in cells in response to signals arising from the formation of PAH-DNA adducts (Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995). We previously observed that in liver epithelial cells, its accumulation and phosphorylation at the Ser15 residue closely correlates with high levels of PAH-DNA adducts and the cellular response to genotoxic damage, including the induction of apoptosis and S-phase arrest (Topinka et al., 2008). We therefore next investigated if the failure of BaP to induce apoptosis in LNCaP cells may be related to the lack of p53 activation. BaP did not induce the accumulation and phosphorylation of p53 at concentrations up to 25 μ M (Fig. 4A). Similar results were also observed for DBaP (data not shown). This was in marked contrast with the effects of roscovitine and UV-C irradiation, which induced significant accumulation and phosphorylation of p53. It is likely that BaP did not induce DNA double-strand breaks, as evidenced by the lack of phosphorylation of histone H2AX at Ser139 (Fig. 4A), which is rapidly phosphorylated in regions adjacent to DNA double-strand breaks and which can be used to estimate DNA damage induced by exogenous agents (Tanaka et al., 2007a,b). UV-C irradiation and roscovitine significantly induced H2AX phosphorylation.

The lack of p53 activation may prevent the induction of its transcriptional targets participating in regulation of the cell cycle, apoptosis or DNA repair. BaP failed to induce expression of genes playing an integral part of p53-dependent cell-cycle arrest (*p21/CDKN1A*, *GADD45A*), p53-induced apoptosis (*PUMA/BBC3*, *NOXA/ PMAIP1*), or in nucleotide excision repair (*XPC*, *DDP2*) (Fig. 4B–D).

UV-C irradiation and BaP induced phosphorylation of checkpoint kinase 1 (Chk1), suggesting that ATM- and Rad-3-related (ATR) kinase (ATR)/Chk1 module, responding primarily to DNA single-strand breaks or bulky lesions (Reinhardt and Yaffe, 2009), was activated in LNCaP cells treated with BaP. However, BaP did

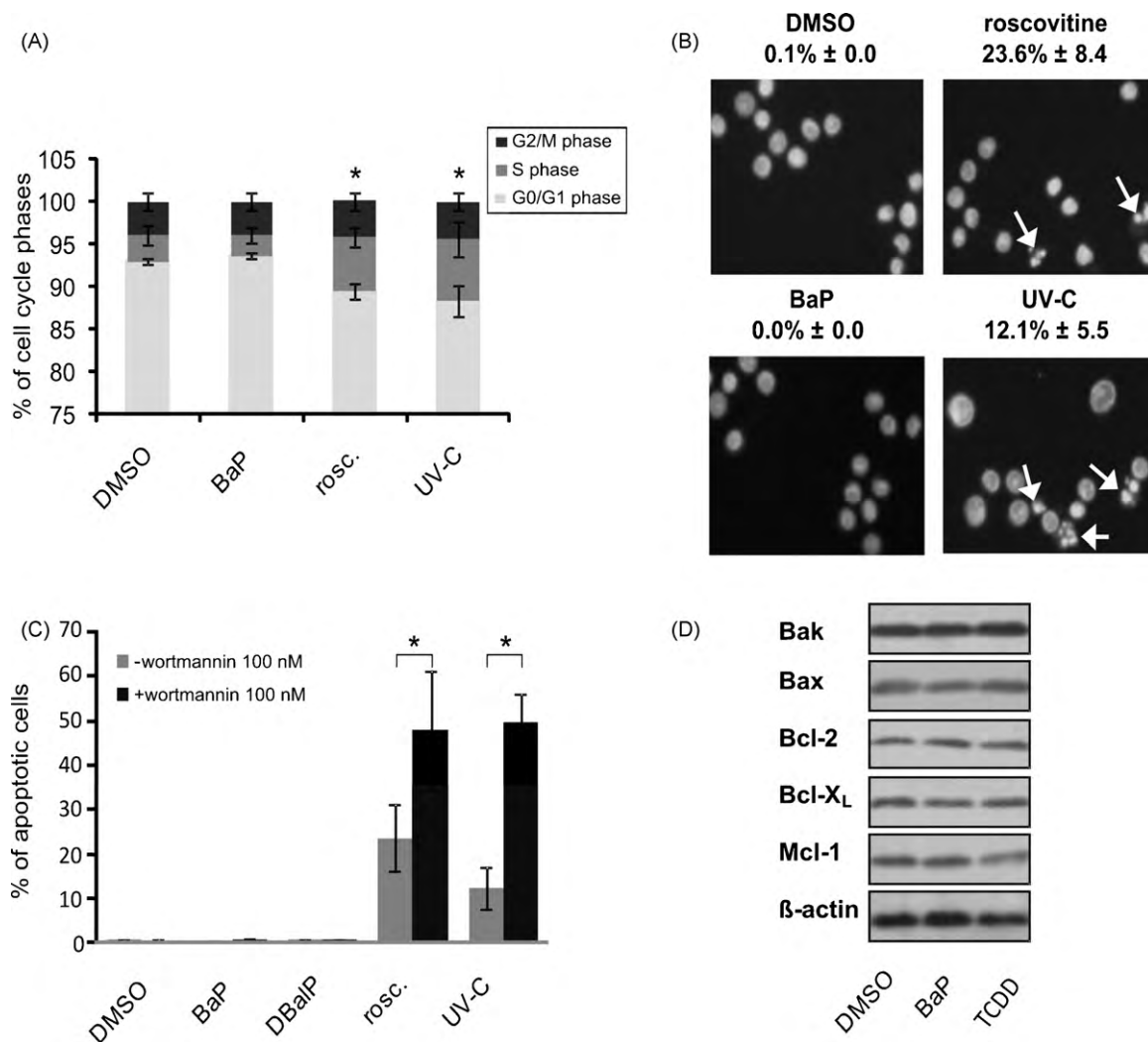


Fig. 3. BaP does not induce cell-cycle arrest or induce apoptosis in LNCaP cells. (A) Cell-cycle distribution of LNCaP cells treated for 24 h with 0.25% DMSO (solvent control), 25 μ M BaP, 25 μ M roscovitine (positive control) or exposed to UV-C irradiation (0.01 J/cm²; positive control). Cells were harvested and cell-cycle distribution using flow cytometry with propidium iodide staining undertaken as described in Section 2. Results are means \pm S.D. of three independent experiments. *** denotes a significant difference in the percentage of cells in the S-phase between sample treated with test compound and control sample treated with DMSO ($P < 0.05$). (B) Representative microphotographs of cell nuclei stained with DAPI as described in Section 2. A minimum of 300 cells were counted per sample. The numbers above each microphotograph represent the percentage of apoptotic cells expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. (C) Effects of BaP, DBaP, roscovitine or UV-C irradiation on apoptotic nuclear fragmentation in the presence or absence of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin. LNCaP cells were pre-treated with wortmannin 30 min before exposure and then exposed to test compounds for 24 h or irradiated as in (A) and the fragmentation of nuclei (stained with DAPI) determined by fluorescence microscopy as in (B). The percentage of apoptotic cells was expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. *** denotes a statistically significant difference between wortmannin pre-treated cells and the respective test compound-treated sample ($P < 0.05$). (D) BaP and the model AhR ligand TCDD had no effect on the expression of pro-apoptotic (Bak, Bax) or pro-survival (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) members of Bcl-2 family proteins. Protein levels were analyzed by western blotting in the cell lysates of LNCaP cells treated with 25 μ M BaP, 5 nM TCDD or 0.25% DMSO (solvent control). β -Actin served as a control of equal loading. Results are representative of three independent experiments.

not induce Chk2 phosphorylation (Fig. 5), suggesting that it fails to activate the *ataxia telangiectasia*-mutated (ATM)-Chk2/p53 module, which is preferentially activated by DNA double-strand breaks (Pommier et al., 2006; Reinhardt and Yaffe, 2009). Taken together, the present results suggest that the lack of apoptosis and cell-cycle arrest in LNCaP cells treated with BaP could be related to its failure to induce DNA double-strand breaks and to activate the p53-dependent DNA damage response.

4. Discussion

PAHs are ubiquitous environmental pollutants derived mainly from incomplete combustion processes. BaP is perhaps the most-studied PAH due to the high levels found in the environment and its carcinogenicity. Although several studies suggested a possible link between exposure of BaP (or PAH) and the development of prostatic

cancer (Aronson et al., 1996; Brown and Delzell, 2000; Sinha et al., 2009), its exact contribution to the development of prostate cancer remains unclear. Prostate epithelial cells seem to possess sufficient enzymatic capacity to bioactivate PAHs to their mutagenic metabolites (Al-Buheissi et al., 2006; Grover and Martin, 2002; Martin et al., 2002) and PAH-DNA adducts have been identified in prostate tissue (Rybicki et al., 2006, 2004). However, the response of prostatic epithelial cells to PAH-induced DNA damage has only rarely been studied. We therefore evaluated the formation of BPDE-DNA adducts in various cell lines derived from prostate carcinoma, and then studied the DNA damage responses elicited by BaP in LNCaP cells.

BaP was found to form significant levels of DNA adducts in all three cell lines studied: LNCaP, DU-145 and PC-3. However, the levels of adduct in PC-3 cells were relatively low, whereas the highest level of BPDE-DNA adduct was found in DU-145 cells. For further

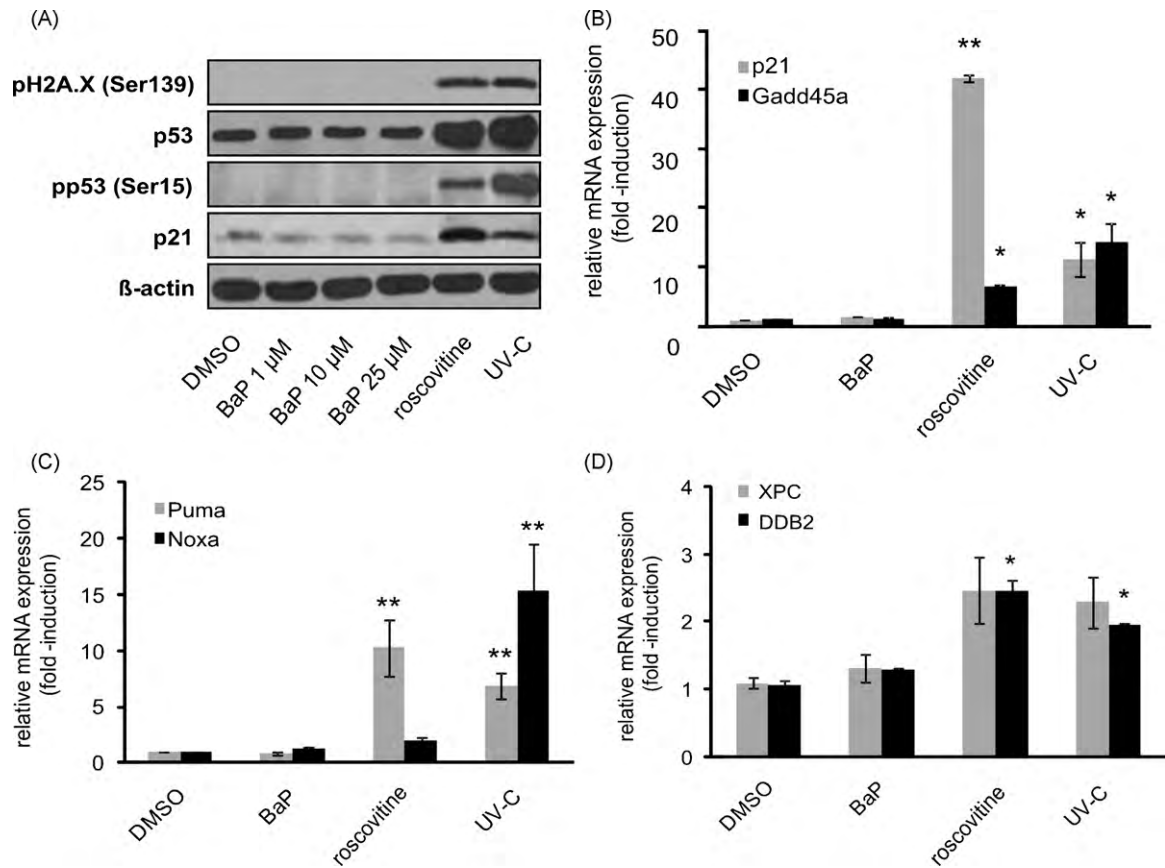


Fig. 4. The lack of induction of apoptosis/cell-cycle arrest corresponds with the failure of BaP to induce DNA double-strand breaks or activate the p53-dependent DNA damage response. (A) Effects of BaP, roscovitine and UV-C irradiation on histone H2A.X phosphorylation (Ser139), total p53 protein levels, p53 phosphorylation at Ser15, and p21^{Waf1/Cip1} levels. LNCaP cells were exposed to various concentrations of BaP or 25 μM roscovitine for 24 h, or to UV-C irradiation (0.01 J/cm²). Cell lysates were analyzed by western blotting as described in Section 2. β-Actin was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments. (B)–(D) Quantitative real-time RT-PCR analyses of mRNA levels of p53 target genes: (B) cell-cycle regulatory genes *p21/CDKN1A* and *GADD45A*; (C) pro-apoptotic BH-3-only genes *PUMA/BBC3* and *NOXA/PMIP1*; or (D) genes participating in the nucleotide excision repair—*XPC* and *DDB2*. LNCaP cells were treated with 25 μM BaP, 25 μM roscovitine and 0.25% DMSO (solvent control) for 24 h or exposed to UV-C irradiation (0.01 J/cm²). Total RNA was isolated and quantitative RT-PCR done as described in Section 2 and results normalized to the B2 M housekeeping gene. Data are means ± S.D. of two independent experiments, each done in triplicate. * and ** denote a statistically significant difference between vehicle-treated control and test compound-treated samples ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

investigations on DNA damage response, we selected LNCaP cells because they have been widely used to study the (anti)-androgenic properties of environmental contaminants (including PAHs) and, unlike the other two cell lines, they contain wild-type p53 protein (Barnes-Ellerbe et al., 2004; Kizu et al., 2003; Morrow et al., 2004). We found that the bioactivation of BaP in LNCaP cells proceeded probably via CYP1A1/1A2 induction because the levels of CYP1B1

in LNCaP cells were very low and not inducible by BaP. CYP1B1 plays a major part in the metabolic activation of BaP and DBaP *in vitro* and *in vivo* (Topinka et al., 2008; Uno et al., 2006). CYP1A1/1A2 have been reported to be constitutively expressed in DU-145 cells and PC-3 cells (Sterling and Cutroneo, 2004), so the differential inducibility of CYP1B1 may explain the differences between the levels of BPDE–DNA adduct among the three cell lines studied.

Induction of programmed cell death or cell-cycle arrest have key roles in the cellular response to DNA damage inflicted by PAHs (Baird et al., 2005; Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995; Roos and Kaina, 2006; Tekpli et al., 2010). In the present study, we found that BaP did not induce apoptosis or cell-cycle arrest in LNCaP cells, although significant levels of BPDE–DNA adducts were formed. LNCaP cells contain a frame-shift mutation in the PTEN gene (Vlietstra et al., 1998), which leads to constitutive activation of Akt/PKB (Carson et al., 1999). We therefore first hypothesized that increased activity of this important pro-survival pathway may be responsible for the survival of cells treated with BaP (and DBaP). However, the use of a specific PI3K inhibitor had no effect on BaP-treated cells, although it significantly increased apoptosis induced by other stimuli such as UV-C irradiation or roscovitine. The pro-survival members of the Bcl-2 family of apoptosis regulators have been shown to promote the survival of prostate cancer cells (Yang et al., 2003). However, in the present study, BaP did not affect the expression of pro-apoptotic (Bax and Bak) or pro-survival (Bcl-2,

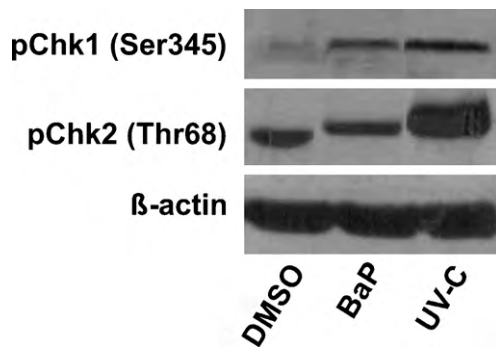


Fig. 5. Effects of BaP on the phosphorylation of Chk1 (Ser345) and Chk2 (Thr68). LNCaP cells were exposed to the indicated concentrations of BaP, 0.25% DMSO for 24 h or to UV-C irradiation (0.01 J/cm²) and total cell lysates analyzed by western blotting as described in Section 2. β-Actin was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments.

Bcl-X_L and Mcl-1) members of this family, thus excluding the possibility that changes in their ratio may lead to survival of LNCaP cells treated with BaP. Finally, we did not observe any changes in the levels of phosphorylation of ERK1/2 or PKB/Akt, thus confirming that BaP itself did not modulate these pro-survival pathways.

Taken together, these data suggested that signaling pathways activating programmed cell death were intact in the cellular model described herein. This, together with the fact that BaP also failed to induce significant arrest of the cell cycle in LNCaP cells, indicated that the lack of response to BPDE–DNA adducts may be related to a defect in transduction of the DNA damage signal to effector signaling modules activating cell-cycle checkpoints or apoptosis (Zhou and Elledge, 2000). The p53 tumor suppressor has a key role in the integration of cellular responses to genotoxic stress, including regulation of apoptosis, cell-cycle arrest, induction of DNA repair, senescence, and maintenance of genomic stability (Vousden and Lane, 2007). It has been widely documented that in various cellular models such as lung fibroblasts, breast cancer epithelial cells, lung carcinoma cells, liver epithelial cells and hepatoma cells that the activation of p53 is an essential part of the cellular response to PAH-induced genotoxic damage (Binková et al., 2000; Hockley et al., 2008; Chramostová et al., 2004; Khan and Dipple, 2000; Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995). Strongly genotoxic PAHs and/or their ultimate metabolites form stable DNA adducts and activate p53, which correlates with the induction of apoptosis in various cellular models (Kwon et al., 2002; Solhaug et al., 2004; Tampio et al., 2009; Topinka et al., 2008; Xiao and Singh, 2007). However, in the present study, we found that BaP did not induce the accumulation and phosphorylation of p53. This was in a marked contrast with the other stimuli inducing apoptosis in LNCaP cells, UV-C irradiation and roscovitine, which we used as positive controls (Mohapatra et al., 2005). In the absence of p53 activation, we also did not observe induction of the p53 transcriptional targets which are essential for the induction of cell-cycle arrest (p21^{Waf1/Cip1}, GADD45A), apoptosis (PUMA, NOXA) or nucleotide excision repair (DDB2, XPC). The lack of p53 activation may be related to absence of the formation of DNA double-strand breaks, as indicated by the absence of histone H2AX phosphorylation in LNCaP cells treated with BaP. It has been shown that in LNCaP cells, DNA double-strand breaks have an essential role in the activation of p53 and induction of apoptosis because other types of DNA lesions may not be able to trigger a p53 response (Nelson and Kastan, 1994). This hypothesis is further supported by the fact that BaP induced Chk1 phosphorylation (which can be triggered by bulky DNA adducts), whereas it did not induce Chk2 phosphorylation (which is primarily activated by double-strand breaks) (Reinhardt and Yaffe, 2009). As several recent studies have suggested that Chk1 protects cells from apoptosis induced by e.g. replication inhibitors (Myers et al., 2009; Sidi et al., 2008), activation of ATR–Chk1 pathway might also contribute to survival of BaP-treated cells. PAHs may also induce other types of DNA lesions, such as oxidative DNA damage (Xue and Warshawsky, 2005). However, the exact relationship between these lesions and p53 activation by BaP is presently unclear. Nevertheless, various types of DNA lesions, including O-methylated and N-alkylated DNA bases, pyrimidine dimers and DNA crosslinks, are known to provoke the formation of double-strand breaks, which is an integral part of DNA repair processes and may lead to p53 induction and activation of apoptosis (Nelson and Kastan, 1994; Roos and Kaina, 2006). Interestingly, increased levels of DNA repair genes have been found in malignant prostatic cells, which may preclude efficient repair including formation of DNA double-strand break intermediates (Fan et al., 2004).

In conclusion, in prostate epithelial cells containing wild-type p53 protein, genotoxic PAHs failed to induce the p53-dependent DNA damage response, including induction of expression of p53 transcriptional targets regulating apoptosis, cell-cycle arrest or

DNA repair, despite the formation of significant levels of PAH–DNA adducts. These findings have implications for the screening of genotoxic effects of environmental PAHs in prostatic cells because the induction of p53 or its transcriptional targets may not reflect the level of formation of DNA lesions (e.g., PAH–DNA adducts) in the absence of formation of DNA double-strand breaks. Moreover, in the absence of p53 activation, cells affected by PAHs may survive and accumulate DNA damage, possibly leading to the development of a more aggressive cancer phenotype. It has been hypothesized that defective repair of DNA may contribute to genetic instability and progression of prostate tumors (Fan et al., 2004). The inefficiency of the p53 response, which contributes to the elimination of cells with considerable DNA damage and DNA repair, may further enhance these processes, contributing to prostate malignancies. Future studies should therefore establish if similar mechanisms are found in, for example, pre-cancerous prostate epithelial cells.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Professor F. Peter Guengerich (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA) for providing anti-human CYP1A1 and 1A2 antibodies and Professor Miroslav Strnad (Institute of Experimental Botany AS CR, Olomouc, Czech Republic) for kindly providing roscovitine. This study was supported by the Czech Science Foundation (grant number 310/07/0961). Institutional support was provided by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Research Plans AV0Z50040507, AV0Z50040702) and the Czech Ministry of Agriculture (No. MZE0002716202).

References

- American Cancer Society, 2009. Cancer Facts & Figures 2008. American Cancer Society, Atlanta.
- Al-Buheissi, S.Z., Cole, K.J., Hewer, A., Kumar, V., Bryan, R.L., Hudson, D.L., Patel, H.R., Nathan, S., Miller, R.A., Phillips, D.H., 2006. The expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in human prostate and in prostate epithelial cells (PECs) derived from primary cultures. *Prostate* 66, 876–885.
- Andryšik, Z., Vondráček, J., Machala, M., Krčmář, P., Švihálková-Šindlerová, L., Kranz, A., Weiss, C., Faust, D., Kozubík, A., Dietrich, C., 2007. The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells. *Mutat. Res.* 615, 87–97.
- Aronson, K.J., Siemiątycki, J., Dewar, R., Gerin, M., 1996. Occupational risk factors for prostate cancer: results from a case–control study in Montreal, Quebec, Canada. *Am. J. Epidemiol.* 143, 363–373.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114.
- Barnes-Ellerbe, S., Knudsen, K.E., Puga, A., 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 66, 502–511.
- Binková, B., Giguere, Y., Rössner Jr., P., Dostál, M., Šrám, R.J., 2000. The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat. Res.* 471, 57–70.
- Brown, D.A., Delzell, E., 2000. Motor vehicle manufacturing and prostate cancer. *Am. J. Ind. Med.* 38, 59–70.
- Burdick, A.D., Davis, J.W., IInd, Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W., 2003. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63, 7825–7833.
- Carson, J.P., Kulik, G., Weber, M.J., 1999. Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res.* 59, 1449–1453.
- Chopra, M., Dharmarajan, A.M., Meiss, G., Schrenk, D., 2009. Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Sci.* 111, 49–63.
- Chramostová, K., Vondráček, J., Šindlerová, L., Vojtěšek, B., Kozubík, A., Machala, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 136–148.

- Dreij, K., Seidel, A., Jernstrom, B., 2005. Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo[a,h]pyrene and benzo[a]pyrene in human cells. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 655–664.
- Fan, R., Kumaravel, T.S., Jalali, F., Marrano, P., Squire, J.A., Bristow, R.G., 2004. Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer Res.* 64, 8526–8533.
- Grover, P.L., Martin, F.L., 2002. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis* 23, 1095–1102.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I., Phillips, D.H., 2008. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. *Carcinogenesis* 29, 202–210.
- IARC, 1983. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1: Chemical, Environmental and Experimental Data. IARC, Lyon.
- IARC, 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC, Lyon.
- Khan, Q.A., Dipple, A., 2000. Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 21, 1611–1618.
- Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Kakishima, H., Mizokami, A., Burnstein, K.L., Hayakawa, K., 2003. A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Arch. Toxicol.* 77, 335–343.
- Kwon, Y.W., Ueda, S., Ueno, M., Yodoi, J., Masutani, H., 2002. Mechanism of p53-dependent apoptosis induced by 3-methylcholanthrene: involvement of p53 phosphorylation and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 277, 1837–1844.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Luch, A., Kudla, K., Seidel, A., Doehmer, J., Greim, H., Baird, W.M., 1999. The level of DNA modification by (+)-syn-(11S,12R,13S,14R)- and (-)-anti-(11R,12S,13S,14R)-dihydrodiol epoxides of dibenzo[a,h]pyrene determined the effect on the proteins p53 and p21WAF1 in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 20, 859–865.
- Marlowe, J.L., Fan, Y., Chang, X., Peng, L., Knudsen, E.S., Xia, Y., Puga, A., 2008. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 19, 3263–3271.
- Martin, F.L., Cole, K.J., Muir, G.H., Kooiman, G.G., Williams, J.A., Sherwood, R.A., Grover, P.L., Phillips, D.H., 2002. Primary cultures of prostate cells and their ability to activate carcinogens. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 5, 96–104.
- Mohapatra, S., Chu, B., Zhao, X., Pledger, W.J., 2005. Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65, 7717–7723.
- Morrow, D., Qin, C., Smith 3rd, R., Safe, S., 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 27–36.
- Myers, K., Gagou, M.E., Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R., Meuth, M., 2009. ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress. *PLoS Genet.* 5, e1000324.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85.
- Nelson, W.G., Kastan, M.B., 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1815–1823.
- Phillips, D.H., Castegnaro, M., 1999. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14, 301–315.
- Pommier, Y., Weinstein, J.N., Aladjem, M.I., Kohn, K.W., 2006. Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 12, 2657–2661.
- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713–722.
- Ramet, M., Castren, K., Jarvinen, K., Pekkala, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Soini, Y., Paakko, P., Vahakangas, K., 1995. p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 16, 2117–2124.
- Reddy, M.V., Randerath, K., 1986. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1543–1551.
- Reinhardt, H.C., Yaffe, M.B., 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 245–255.
- Roos, W.P., Kaina, B., 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 12, 440–450.
- Rubin, H., 2001. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22, 1903–1930.
- Rybicki, B.A., Neslund-Dudas, C., Bock, C.H., Rundle, A., Saveria, A.T., Yang, J.J., Nock, N.L., Tang, D., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in prostate and biochemical recurrence after prostatectomy. *Clin. Cancer Res.* 14, 750–757.
- Rybicki, B.A., Nock, N.L., Saveria, A.T., Tang, D., Rundle, A., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.* 239, 157–167.
- Rybicki, B.A., Rundle, A., Saveria, A.T., Sankey, S.S., Tang, D., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 8854–8859.
- Sidi, S., Sando, T., Kennedy, R.D., Hagen, A.T., Jette, C.A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J.F., Kanki, J.P., Green, D.R., D'Andrea, A.A., Look, A.T., 2008. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell* 133, 864–877.
- Sinha, R., Park, Y., Graubard, B.I., Leitzmann, M.F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., Cross, A.J., 2009. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 170, 1165–1177.
- Sjögren, M., Ehrenberg, L., Rannug, U., 1996. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutat. Res.* 358, 97–112.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Lag, M., Schwarze, P.E., Husoy, T., Holme, J.A., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809–819.
- Sterling Jr., K.M., Cutroneo, K.R., 2004. Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 91, 423–429.
- Tampio, M., Markkanen, P., Puttonen, K.A., Hagelberg, E., Heikkinen, H., Huhtinen, K., Loikkanen, J., Hirvonen, M.R., Vahakangas, K.H., 2009. Induction of PUMA-alpha and down-regulation of PUMA-beta expression is associated with benzo(a)pyrene-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Toxicol. Lett.* 188, 214–222.
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A.P., Dai, W., Darzynkiewicz, Z., 2007a. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* 71, 648–661.
- Tanaka, T., Huang, X., Jorgensen, E., Gietl, D., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Albino, A.P., 2007b. ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke. *BMC Cell Biol.* 8, 26.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 68–76.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krčmář, P., Pencikova, K., Machala, M., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 638, 122–132.
- Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 2006. Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication. CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol. Pharmacol.* 69, 1103–1114.
- Vlietstra, R.J., van Alewijk, D.C., Hermans, K.G., van Steenbrugge, G.J., Trapman, J., 1998. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res.* 58, 2720–2723.
- Vondráček, J., Švihálková-Šindlerová, L., Pěnčíková, K., Krčmář, P., Andrysík, Z., Chramostová, K., Marvanová, S., Valovičová, Z., Kozubík, A., Gábelová, A., Machala, M., 2006. 7H-Dibenzo[c,g]carbazole and 5,9-dimethylidibenzo[c,g]carbazole exert multiple toxic events contributing to tumor promotion in rat liver epithelial 'stem-like' cells. *Mutat. Res.* 596, 43–56.
- Vousden, K.H., Lane, D.P., 2007. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 275–283.
- Xiao, H., Singh, S.V., 2007. p53 regulates cellular responses to environmental carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide in human lung cancer cells. *Cell Cycle* 6, 1753–1761.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.
- Yang, C.C., Lin, H.P., Chen, C.S., Yang, Y.T., Tseng, P.H., Rangnekar, V.M., Chen, C.S., 2003. Bcl-xL mediates a survival mechanism independent of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 25872–25878.
- Zhou, B.B., Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.

PŘÍLOHA 3

Eva Hrubá, Jan Vondráček, Helena Líbalová, Jan Topinka, Vítězslav Bryja, Karel Souček, Miroslav Machala

Gene expression changes in human prostate carcinoma cells exposed to genotoxic and nongenotoxic aryl hydrocarbon receptor ligands.

Toxicol Lett. 2011 Oct 10;206(2):178-88. Epub 2011 Jul 23.



Gene expression changes in human prostate carcinoma cells exposed to genotoxic and nongenotoxic aryl hydrocarbon receptor ligands

Eva Hrubá^a, Jan Vondráček^{a,b}, Helena Líbalová^c, Jan Topinka^c, Vítězslav Bryja^b, Karel Souček^b, Miroslav Machala^{a,*}

^a Department of Toxicology, Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100 Brno, Czech Republic

^b Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic

^c Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2011

Received in revised form 11 July 2011

Accepted 12 July 2011

Available online 23 July 2011

Keywords:

LNCaP cells

Benzo[*a*]pyrene

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

Cell cycle

WNT5A

E2F1

ABSTRACT

Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are known as efficient mutagens and ligands of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which has been suggested to play an important role in prostate carcinogenesis. In order to evaluate the complex relationship between the genotoxicity and the AhR-mediated activity of PAHs in prostate cells, we selected benzo[*a*]pyrene (BaP) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), as model genotoxic and nongenotoxic AhR ligands, respectively, to explore global changes in gene expression in LNCaP cells by microarray analysis. We identified 112 genes that were differentially expressed in cells treated for 24 h with BaP, TCDD or both compounds. Our data indicated that the impacts of BaP and TCDD on transcriptome of LNCaP cells significantly overlap, since over 64% of significantly up-regulated genes and 47% of down-regulated genes were similarly affected by both AhR ligands. This suggested that the activation of AhR played a prominent role in the nongenotoxic effects of BaP in the prostate carcinoma cell model LNCaP. Both AhR ligands suppressed expression of genes associated with cell cycle progression, DNA replication, spindle assembly checkpoint or DNA repair, which probably occurred secondary to inhibition of cell cycle progression. In contrast, we identified Wnt5a, an important regulator of prostate cancer progression, to be induced as early as 6 h after exposure to both AhR ligands. The AhR ligand-induced Wnt5a upregulation, together with other observed alterations of gene expression, may further contribute to enhanced cell plasticity of prostate carcinoma cells.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The prostate carcinoma is presently one of the most prevalent forms of cancer in the developed world (ACS, 2009). Epidemiologic studies suggest a possible link between diet and prostate carcinogenesis, and a recent study indicated that red and processed meat may be positively associated with prostate cancer via mechanisms involving, among other factors, benzo[*a*]pyrene (BaP) (Sinha et al., 2009). BaP has been listed by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a compound carcinogenic to humans (IARC, 2010). Similar to other genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), BaP is known to produce stable DNA adducts and further DNA damage, resulting in activation of cellular DNA damage response (Binková et al., 2000; Luch et al., 1999; Ramet et al., 1995; Solhaug et al., 2004; Tekpli et al., 2010; Topinka et al., 2008). BaP is also an efficient ligand of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which plays a key role in the regulation of expression of enzymes,

which metabolize PAHs to mutagenic dihydrodiol epoxides, such as cytochromes P450 1A1 (CYP1A1), P450 1A2 (CYP1A2) and P450 1B1 (CYP1B1) (Nebert et al., 2004; Xue and Warshawsky, 2005). However, a number of studies have indicated that AhR itself is directly involved in the regulation of carcinogenesis. The constitutively active AhR mutant has been shown to produce tumors of stomach and liver (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004), while the unliganded AhR has been suggested to function as a tumor suppressor (Fan et al., 2010). The activation of AhR might thus play a much wider role in carcinogenesis than a simple transcriptional control of CYP enzymes.

Interestingly, recent studies of Fritz and colleagues have indicated that AhR and/or its selective ligands may inhibit prostate carcinogenesis in TRAMP mice (Fritz et al., 2007, 2009). Among other effects, the activated AhR has been suggested to inhibit the androgen receptor (AR) activity and cell cycle progression in prostate carcinoma models (Barnes-Elleberbe et al., 2004; Kizu et al., 2003; Morrow et al., 2004). Nevertheless, AhR activity may interfere also with the regulation of numerous other cellular processes closely related to tumor promotion and progression, such as cell differentiation, inhibition of apoptosis, cell motility and invasiv-

* Corresponding author. Tel.: +420 533331801; fax: +420 541211229.

E-mail address: machala@vri.cz (M. Machala).

ity, senescence or intercellular communication (Dietrich and Kaina, 2010; Diry et al., 2006; Kung et al., 2009; Puga et al., 2009; Ray and Swanson, 2009). Therefore, in order to understand the whole spectrum of toxic effects of AhR ligands in prostate cells, it is vital to analyze the whole spectrum of changes in gene expression, not only those related directly to AR or cell proliferation.

The LNCaP cell line is a well-characterized androgen-sensitive model of human prostate carcinoma cells, which has been successfully used to analyze the impact of both PAHs and nongenotoxic AhR ligands, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), on AR and/or the AR-dependent proliferation (Barnes-Elleber et al., 2004; Jana et al., 1999; Kizu et al., 2003; Morrow et al., 2004). Importantly, our previous study suggested that despite forming significant levels of DNA adducts, the genotoxic PAHs, such as BaP, fail to induce the p53-dependent DNA damage response, including transcriptional activation of p53 target genes, induction of apoptosis or cell cycle arrest, in LNCaP prostate carcinoma cells (Hrubá et al., 2010). These results have indicated that activation of AhR might play a more prominent role in the toxic effects of BaP than its genotoxic impact. Unlike TCDD, BaP and/or its principle genotoxic metabolite, *anti*-BaP-*trans*-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) have been shown to produce unique changes in expression of genes involved in cell cycle regulation, apoptosis and DNA repair in human cell lines (Hockley et al., 2007). Therefore, in order to better understand the complex relationship between genotoxicity and AhR-mediated activity of PAHs in prostate cells, we selected BaP and TCDD, as model genotoxic and nongenotoxic AhR ligands, respectively, in order to evaluate global changes in gene expression in LNCaP cells by microarray analysis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

TCDD was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) and BaP was from Fluka (Buchs, Switzerland). Both compounds were dissolved in DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) and stock solutions were stored in dark. All other reagents were from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic), if not indicated otherwise. The sources of other specific chemicals and kits are indicated below.

2.2. Cells

A human prostatic carcinoma cell line LNCaP, originally derived from a lymph node metastasis, was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). Cells were grown in RPMI 1640 growth medium with L-glutamine (Gibco BRL, Rockville, MD) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma–Aldrich), sodium bicarbonate (2 g/l), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/l). For the treatment, LNCaP cells were maintained in modified RPMI-1640 without phenol red (Sigma–Aldrich) supplemented with 5% charcoal-treated (CT) serum. Cells were maintained in 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. Sample processing for microarray analysis

LNCaP cells were grown in growth medium on 60-mm-diameter cell culture dishes at concentration 20,000 cells/cm² for 48 h. Cells were then maintained in medium with charcoal-treated serum for one day and for duration of following 24 h-exposure to 10 μM BaP, 5 nM TCDD and DMSO (0.1%) as a solvent control. Medium was removed, the samples were washed with PBS and total RNA was isolated from cells using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey–Nagel). Quantity of the RNA was measured on NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies LLC, USA). RNA integrity was assessed with Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, USA). All RNA samples had RIN above 8.

2.4. Microarray analysis

Illumina HumanRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina Inc., USA) was used for the microarray analysis following the standard protocol (250 ng of total RNA was amplified with Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion Inc., USA) and 750 ng of amplified RNA was hybridized on the chip according to the manufacturer procedure). Hybridized slides were scanned on Illumina Beadstation and images were analyzed using Illumina BeadScan. Bead level data were summarized by Illumina BeadStudio Software.

Bead summary data were imported into R statistical environment (<http://www.r-project.org>) and normalized by quantile method in the lumi package. Only probes with detection *p*-value *p* < 0.01 on at least 2 arrays in group were included for further analyses. Differential expression analysis was performed using the limma package (Smyth, 2004). Linear model corrected for batch effect was fitted for each gene given a series of arrays using lmFit function. Multiple testing correction was performed using the Benjamini and Hochberg method. Hierarchical clustering analysis of the samples and genes was performed using the average linkage and Euclidean distance.

2.5. Functional analysis of microarray data

Since the fold change of expression of the individual genes across expression data can be relatively modest, the gene set enrichment analysis (GSEA) was employed to classify microarray data at the level of groups of genes that share common biological function. GSEA evaluates the distribution of genes belonging to a biological category in a given sorted list of genes by computing running sum statistics (Subramanian et al., 2005). Enrichment analysis was performed for the treatment groups vs. control using GSEA implemented in java GSEA application, version 2.07. Gene sets tested were taken from Molecular Signature Database v 3.0 curated from the KEGG online database that contained genes present on the used microarray platform. Number of permutations and permutation type was set to 100 and gene set, respectively.

2.6. Real-time RT-PCR

In addition to the 24 h-exposure microarray samples, total RNA samples were also prepared from LNCaP cells after 6, 12 and 24 h exposure to 10 μM BaP, 5 nM TCDD or DMSO (0.1%). The amplifications of the samples were carried out in a final volume of 20 μl using QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to manufacturer's specifications with primers from Geni Biotech (Hradec Králové, Czech Republic) and specific TaqMan probes from the Universal Probe Library (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) that are listed in Table 1. The amplifications were run on the LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according the following program: reverse transcription at 50 °C for 20 min and initial activation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 0 s and 60 °C for 60 s. The changes in gene expression were calculated using the comparative threshold cycle method with B2M as a normalizing gene (Livak and Schmittgen, 2001). The primers and probes for B2M were purchased as qPCR kits from Geni Biotech.

2.7. Western blotting

LNCaP cells were grown and exposed to treatment compounds for 24 h, as described above. After the exposure, cells were harvested with lysis buffer (1% SDS, 10% glycerol, 100 mM Tris and protease/phosphatase inhibitors) and the samples were sonicated. Protein concentrations were determined using bicinchoninic acid and copper sulfate (Sigma–Aldrich). For Western blot analyses, equal amounts of total protein lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gel and electrotransferred onto PVDF membrane Hybond-P (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Pre-stained molecular weight markers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) were run in parallel. The membranes were blocked and incubated with primary antibodies against Wnt5a (AF645, R&D Systems, MN, USA) and E2F1 (sc-251, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and then with secondary peroxidase-conjugated anti-goat IgG (A 5420, Sigma–Aldrich) or anti-mouse IgG (A 9044, Sigma–Aldrich) antibodies. As a positive control for Wnt5a, we used recombinant human/mouse Wnt5a protein (R&D Systems), or cell lysate from human Burkitt's lymphoma (sc-2234, Santa Cruz) for E2F1. Expression of β-actin was used to verify equal loading. To visualize peroxidase activity, the ECLPlus Western blotting detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used.

2.8. Statistical analysis

Quantitative RT-PCR data were expressed as means ± S.D. and analyzed by Student's *t*-test, *P* value of less than 0.05 was considered significant.

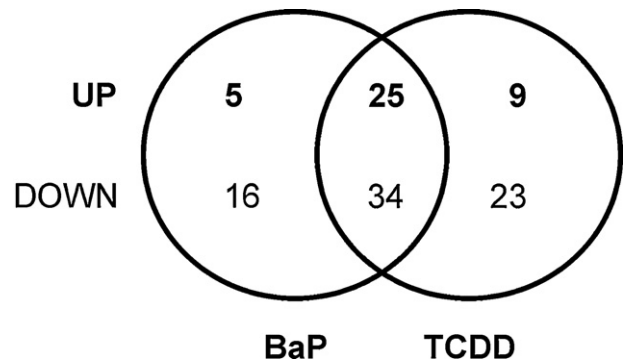
3. Results

3.1. Microarray analysis

In order to analyze the impact of BaP and TCDD on global gene expression in LNCaP cells, we selected cultivation conditions based on both our own and previously published studies evaluating the impact of AhR ligands and carcinogenic PAHs on AR activity, cell proliferation or induction of DNA damage (Barnes-Elleber et al., 2004; Endo et al., 2003; Hrubá et al., 2010; Kizu et al., 2003; Morrow et al., 2004). Cells were cultivated in the growth medium with

Table 1
Sequences of primers used in quantitative RT-PCR.

Gene	Accession no.	Oligonucleotide
<i>ADD3</i>	NM.016824	L: 5'-CCAGAGCCTATCTTTTCTGA-3' R: 5'-CCTGGTCAACCACTTCTCCTA-3' P: UPL #75
<i>AURKA</i>	NM.198436	L: 5'-TCTTGAAGACTTGGGTCTTT-3' R: 5'-TCAAATATCCCCGCACTCTG-3' P: UPL #61
<i>BCL6</i>	NM.001706	L: 5'-TTCCGCTACAAGGGCAAC-3' R: 5'-TGCAACGATAGGGTTTCTCA-3' P: UPL #5
<i>CCNA2</i>	NM.001237	L: 5'-CCATACCTCAAGTATTTGCCATC-3' R: 5'-TCCAGTCTTTTCGTATTAATGATTCAG-3' P: UPL #84
<i>CDC2</i>	NM.001786	L: 5'-TGATCTGAAGAAATACTTGGATTCTA-3' R: 5'-TCCAGTCTTTTCGTATTAATGATTCAG-3' P: UPL #79
<i>CDC20</i>	NM.001255	L: 5'-CATTCCGATCTGGAATGTGT-3' R: 5'-GAGACCAGAGGATGGAGCAC-3' P: UPL #57
<i>CDK2</i>	NM.001798	L: 5'-CCTCCTGGGCTGCAAATA-3' R: 5'-CAGAATCTCCAGGGAATAGGG-3' P: UPL #50
<i>CENPA</i>	NM.001042426	L: 5'-AGCTTCAGAAGAGCACACACC-3' R: 5'-AGGCGTCTCAAAGAGATGA-3' P: UPL #41
<i>CHEK1</i>	NM.001274	L: 5'-CAGGAGAGAAGCAATATCCAA-3' R: 5'-GCATGCCTATGTCTGGCTCT-3' P: UPL #25
<i>CHEK2</i>	NM.007194	L: 5'-GCCAGAGAATGTTTACTGTCATC-3' R: 5'-CTTGGAGTGCCAAAATCAG-3' P: UPL #35
<i>E2F1</i>	NM.005225	L: 5'-TCCAAGAACCACATCCAGTG-3' R: 5'-CTGGGTCAACCCCTCAAG-3' P: UPL #5
<i>E2F2</i>	NM.004091	L: 5'-GCTGTCAAGTCCCAAGG-3' R: 5'-GCTGTCAAGTCCCAAGG-3' P: UPL #3
<i>ERCC6L</i>	NM.017669	L: 5'-GCAGGCTGCTCATTACCTAAG-3' R: 5'-TCCTTTGCCAAATTGAAAAGTT-3' P: UPL #85
<i>EXO1</i>	NM.006027	L: 5'-TGAGCTCTGGAAAACTTTGG-3' R: 5'-CTGGGACAGGGGTTTCT-3' P: UPL #69
<i>FEN1</i>	NM.004111	L: 5'-ACCCGAAACCAAGCTTTAG-3' R: 5'-GGGCCACATCAGCAATTAGT-3' P: UPL #82
<i>KIF15</i>	NM.020242	L: 5'-GCTGCTGAAGCCTATCAGGT-3' R: 5'-GATGTTGATGCCACACGTCTA-3' P: UPL #58
<i>MAD2L1</i>	NM.002358	L: 5'-CAGATCACAGCTACGGTGACA-3' R: 5'-TCTGTATAAATCAGCAGATCAAATGAA-3' P: UPL #59
<i>PCNA</i>	NM.182649	L: 5'-TGGAGAACTTGGAAATGAAAA-3' R: 5'-GAACTGGTTTCACTCTATG-3' P: UPL #69
<i>RAD21</i>	NM.006265	L: 5'-ATTGACCCAGAGCCTGTGAT-3' R: 5'-GGGGAAGCTCTACAGGTGGT-3' P: UPL #62
<i>RAD51</i>	NM.002877	L: 5'-GGGAATTAGTGAAGCCAAAGC-3' R: 5'-TGGTGAAACCACTTGGAACT-3' P: UPL #30
<i>TOP2A</i>	NM.001067	L: 5'-TTGTGGAAAGAAGACTTGGCTA-3' R: 5'-TGTTCACTCTGTTTTCTTGG-3' P: UPL #76
<i>WNT5A</i>	NM.003392	L: 5'-ACTCGCCCAACACACAAG-3' R: 5'-CATTGCCACGCACTAGT-3' P: UPL #23

**Fig. 1.** Venn diagram representing numbers of common and exclusively up- and downregulated genes for 24-h treatment with 10 μ M BaP (left) and 5 nM TCDD (right), relative to DMSO used as solvent control ($-0.5 \leq \log FC \leq 0.5$; adj. P -val ≤ 0.05).

of 91 genes after TCDD exposure. A full list of the affected genes is provided in Table 2. As shown in Fig. 1, there was a significant overlap between BaP- and TCDD-induced changes in gene expression. A total of 59 of the expression alterations were common to both treatments. This trend was more obvious in case of upregulated genes, where 25 out of 39 significantly upregulated genes (over 67%) were common to BaP and TCDD. The commonly up-regulated genes included those in metabolism of xenobiotics, known to be regulated by AhR (*CYP1A1*, *CYP1A2*, and *ALDH3A2*). Both *CYP1A1* and *CYP1A2* were increased to a similar extent, thus confirming that AhR was fully activated by the applied doses of BaP and TCDD. Further upregulated genes included those involved in transcriptional regulation related to cell cycle progression/spindle assembly checkpoint (*FOXQ1*, *TOB1*), intracellular signaling and ion transport (*KCNQ1*, *WNT5A*, *ZIC2*) and other genes (*ADD3*, *BCL6*, *CA12*, *CLBLN2*, *CLYBL*, *EDC3*, *GAD1*, *GCLC*, *MCCCI*, *MYLIP*, *PRG-3*, *PTGFR*, *SPRY1*, *ST3GAL1*, *TBX3*, *TIPARP*) – see Table 2. In contrast, BaP and TCDD specifically downregulated expression of those genes involved in regulation of cycle progression/spindle assembly checkpoint (*AURKA*, *CCNA2*, *CDCA3*, *CDC2*, *CDC20*, *CDC45L*, *CDK2*, *CENPA*, *CENPK*, *CEP55*, *CHEK1*, *E2F1*, *E2F2*, *E2F7*, *ERCC6L*, *FAM64A*, *FBXO5*, *HMMR*, *KIF15*, *MAD2L1*, *NUSAP1*, *OIP5*, *UBE2C*, *UHRF1*, *SGOL1*, *STIL*, *TOP2A*, *ZWILCH*, *ZWINT*) and replication complex and DNA repair (*DNASE2B*, *DTL*, *EXO1*, *FEN1*, *GINS1*, *HMGB2*, *KIAA0101*, *MCM4*, *MCM7*, *MCM10*, *PCNA*, *POLE2*, *PRIM1*, *RFC3*, *RFC4*, *RFC5*, *RAD51AP1*, *RAD54L*, *RRM2*, *SMC2*, *TYMS*). Further commonly downregulated genes included *KCNN2*, *PBK*, *VRK1*, *ATAD2*, *CKAP2L*, *MELK*, *NCAPG*, *PBK*, *PGAM1*, *REPS2*, *RTN4*, and *TM4SF1*.

As these data already indicated that biological processes involving cell cycle progression and DNA repair were seriously affected by both types of AhR ligands, we further performed gene set enrichment analysis of microarray data, using curated data sets from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database. Table 3 summarizes both downregulated and upregulated KEGG pathways that were significantly affected by BaP, TCDD or both compounds. The upper part of Table 3 shows that with exception of a single pathway related to metabolism of xenobiotics, the downregulation of numerous KEGG pathways, related to DNA replication, cell cycle progression, mitosis and DNA repair, was a common event in the effects of both BaP and TCDD on gene expression in LNCaP cells. The KEGG pathways upregulated by both compounds included mostly those involved in metabolism. The basal cell carcinoma pathway was upregulated as well (Table 3), with *WNT5A*, *LEF1*, *FZD3*, *PTCH1*, *FZD1* and *TP53* identified as principal genes contributing to this process.

charcoal-stripped FBS for 24 h prior to application of either AhR ligand, in order to reduce the impact of endogenous androgens present in serum. After another 24 h, total RNA was isolated and analyzed.

Microarray analysis identified a total of 80 genes with significantly ($p < 0.05$) altered expression after BaP exposure and a total

Table 2

Gene transcripts differentially up- and downregulated following the exposure of LNCaP cells to BaP and TCDD (24 h), ordered according to their biological function.

Entrez Gene ID	Symbol	Definition	Fold change	
			BaP	TCDD
<i>Metabolizing enzymes</i>				
224	ALDH3A2	<i>Homo sapiens</i> aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2 (ALDH3A2), transcript variant 2, mRNA	1.45 [*]	1.48 ^{**}
51700	CYB5R2	<i>Homo sapiens</i> cytochrome b5 reductase 2 (CYB5R2), mRNA	1.48 ^{**}	1.18
1543	CYP1A1	<i>Homo sapiens</i> cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1), mRNA	4.61 ^{***}	5.20 ^{***}
1544	CYP1A2	<i>Homo sapiens</i> cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2 (CYP1A2), mRNA	2.07 ^{***}	2.30 ^{***}
51478	HSD17B7	<i>Homo sapiens</i> hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 (HSD17B7), mRNA	1.11	1.49 [†]
1728	NQO1	<i>Homo sapiens</i> NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA	1.69 ^{***}	1.24
<i>Cell cycle progression and spindle assembly checkpoint</i>				
6790	AURKA	<i>Homo sapiens</i> aurora kinase A (AURKA), transcript variant 5, mRNA	0.67 ^{**}	0.67 ^{**}
259266	ASPM	<i>Homo sapiens</i> asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila) (ASPM), mRNA	0.74	0.71 [†]
890	CCNA2	<i>Homo sapiens</i> cyclin A2 (CCNA2), mRNA	0.65 ^{**}	0.61 ^{**}
83461	CDCA3	<i>Homo sapiens</i> cell division cycle associated 3 (CDCA3), mRNA	0.66 ^{**}	0.68 ^{**}
983	CDC2	<i>Homo sapiens</i> cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2), transcript variant 1, mRNA	0.68 [*]	0.62 ^{**}
991	CDC20	<i>Homo sapiens</i> cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC20), mRNA	0.69 [†]	0.67 [†]
8318	CDC45L	<i>Homo sapiens</i> CDC45 cell division cycle 45-like (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC45L), mRNA	0.74 [†]	0.70 ^{**}
1017	CDK2	<i>Homo sapiens</i> cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), transcript variant 1, mRNA	0.73 [†]	0.72 [†]
1058	CENPA	<i>Homo sapiens</i> centromere protein A (CENPA), transcript variant 2, mRNA	0.67 [†]	0.62 ^{**}
64105	CENPK	<i>Homo sapiens</i> centromere protein K (CENPK), mRNA	0.71 [†]	0.70 [†]
55165	CEP55	<i>Homo sapiens</i> centrosomal protein 55 kDa (CEP55), mRNA	0.71 [†]	0.68 [†]
1111	CHEK1	<i>Homo sapiens</i> CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>) (CHEK1), mRNA	0.72 [†]	0.68 ^{**}
1869	E2F1	<i>Homo sapiens</i> E2F transcription factor 1 (E2F1), mRNA	0.69 [†]	0.68 [†]
1870	E2F2	<i>Homo sapiens</i> E2F transcription factor 2 (E2F2), mRNA	0.59 ^{**}	0.56 ^{**}
144455	E2F7	<i>Homo sapiens</i> E2F transcription factor 7 (E2F7), mRNA	0.73 [†]	0.67 ^{**}
94234	FOXQ1	<i>Homo sapiens</i> forkhead box Q1 (FOXQ1), mRNA	1.77 [†]	1.77 [†]
10140	TOB1	<i>Homo sapiens</i> transducer of ERBB2, 1 (TOB1), mRNA	1.61 ^{***}	1.58 ^{***}
54821	ERCC6L	<i>Homo sapiens</i> excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like (ERCC6L), mRNA	0.73 [†]	0.68 ^{**}
54478	FAM64A	<i>Homo sapiens</i> family with sequence similarity 64, member A (FAM64A), mRNA	0.70 ^{**}	0.70 ^{**}
81610	FAM83D	<i>Homo sapiens</i> family with sequence similarity 83, member D (FAM83D), mRNA	0.71	0.67 [†]
26271	FBXO5	<i>Homo sapiens</i> F-box protein 5 (FBXO5), mRNA	0.69 [†]	0.64 ^{**}
3161	HMMR	<i>Homo sapiens</i> hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) (HMMR), transcript variant 2, mRNA	0.70 [†]	0.60 ^{**}
56992	KIF15	<i>Homo sapiens</i> kinesin family member 15 (KIF15), mRNA	0.67 [†]	0.68 [†]
4085	MAD2L1	<i>Homo sapiens</i> MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MAD2L1), mRNA	0.69 [†]	0.67 ^{**}
4131	MAP1B	<i>Homo sapiens</i> microtubule-associated protein 1B (MAP1B), mRNA	1.32	1.57 [†]
79682	MLF1IP	<i>Homo sapiens</i> MLF1 interacting protein (MLF1IP), mRNA	0.69 ^{**}	0.65 ^{***}
9585	MPHOSPH1	<i>Homo sapiens</i> M-phase phosphoprotein 1 (MPHOSPH1), mRNA	0.77	0.69 [†]
51203	NUSAP1	<i>Homo sapiens</i> nucleolar and spindle associated protein 1 (NUSAP1), transcript variant 2, mRNA	0.72 [†]	0.66 ^{**}
11339	OIP5	<i>Homo sapiens</i> Opa interacting protein 5 (OIP5), mRNA	0.65 ^{**}	0.65 ^{**}
11065	UBE2C	<i>Homo sapiens</i> ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C), transcript variant 6, mRNA	0.70 ^{**}	0.65 ^{**}
29128	UHRF1	<i>Homo sapiens</i> ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 (UHRF1), transcript variant 1, mRNA	0.70 [†]	0.74 [†]
6307	SC4MOL	<i>Homo sapiens</i> sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), transcript variant 1, mRNA	0.83	0.69 [†]
151648	SGOL1	<i>Homo sapiens</i> shugoshin-like 1 (<i>S. pombe</i>) (SGOL1), transcript variant C2, mRNA	0.68 ^{**}	0.72 ^{**}
6491	STIL	<i>Homo sapiens</i> SCL/TAL1 interrupting locus (STIL), transcript variant 1, mRNA	0.69 [†]	0.68 [†]
7153	TOP2A	<i>Homo sapiens</i> topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa (TOP2A), mRNA	0.73 [†]	0.67 ^{**}
55055	ZWILCH	<i>Homo sapiens</i> Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila) (ZWILCH), transcript variant 1, mRNA	0.73 [†]	0.69 [†]
11130	ZWINT	<i>Homo sapiens</i> ZW10 interactor (ZWINT), transcript variant 3, mRNA	0.69 [†]	0.65 ^{**}
<i>Replication complex and DNA repair</i>				
116028	C16orf75	<i>Homo sapiens</i> chromosome 16 open reading frame 75 (C16orf75), mRNA	0.67 ^{**}	0.70 ^{**}
58511	DNASE2B	<i>Homo sapiens</i> deoxyribonuclease II beta (DNASE2B), transcript variant 2, mRNA	0.71 ^{**}	0.72 ^{**}

Table 2 (Continued)

Entrez Gene ID	Symbol	Definition	Fold change	
51514	DTL	<i>Homo sapiens</i> denticleless homolog (Drosophila) (DTL), mRNA	0.63*	0.60**
9156	EXO1	<i>Homo sapiens</i> exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 1, mRNA	0.74*	0.68**
2237	FEN1	<i>Homo sapiens</i> flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1), mRNA	0.65**	0.65**
51659	GINS2	<i>Homo sapiens</i> GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog) (GINS2), mRNA	0.64***	0.62**
3148	HMGB2	<i>Homo sapiens</i> high-mobility group box 2 (HMGB2), mRNA	0.71*	0.65**
9768	KIAA0101	<i>Homo sapiens</i> KIAA0101 (KIAA0101), transcript variant 1, mRNA	0.74*	0.70*
4173	MCM4	<i>Homo sapiens</i> minichromosome maintenance complex component 4 (MCM4), transcript variant 1, mRNA	0.69*	0.68*
4176	MCM7	<i>Homo sapiens</i> minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7), transcript variant 2, mRNA	0.70**	0.73**
55388	MCM10	<i>Homo sapiens</i> minichromosome maintenance complex component 10 (MCM10), transcript variant 2, mRNA	0.66***	0.68***
5111	PCNA	<i>Homo sapiens</i> proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transcript variant 2, mRNA	0.69**	0.73**
5427	POLE2	<i>Homo sapiens</i> polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit) (POLE2), mRNA	0.70**	0.71**
5557	PRIM1	<i>Homo sapiens</i> primase, DNA, polypeptide 1 (49 kDa) (PRIM1), mRNA	0.72**	0.70**
5983	RFC3	<i>Homo sapiens</i> replication factor C (activator 1) 3, 38 kDa (RFC3), transcript variant 1, mRNA	0.71*	0.62**
5984	RFC4	<i>Homo sapiens</i> replication factor C (activator 1) 4, 37 kDa (RFC4), transcript variant 2, mRNA	0.70**	0.68**
5985	RFC5	<i>Homo sapiens</i> replication factor C (activator 1) 5, 36.5 kDa (RFC5), transcript variant 1, mRNA	0.70**	0.68**
10635	RAD51AP1	<i>Homo sapiens</i> RAD51 associated protein 1 (RAD51AP1), mRNA	0.70*	0.65**
8438	RAD54L	<i>Homo sapiens</i> RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>) (RAD54L), mRNA	0.69**	0.75*
6241	RRM2	<i>Homo sapiens</i> ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA	0.66*	0.62**
10592	SMC2	<i>Homo sapiens</i> structural maintenance of chromosomes 2 (SMC2), transcript variant 1, mRNA	0.75*	0.70*
7298	TYMS	<i>Homo sapiens</i> thymidylate synthetase (TYMS), mRNA	0.68**	0.67**
<i>Intracellular signaling and ion transport</i>				
1445	CSK	<i>Homo sapiens</i> c-src tyrosine kinase (CSK), mRNA	1.27	1.42**
3755	KCNG1	<i>Homo sapiens</i> potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1 (KCNG1), transcript variant 1, mRNA	1.46**	1.46**
3781	KCNN2	<i>Homo sapiens</i> potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2 (KCNN2), transcript variant 1, mRNA	0.69*	0.74**
55872	PBK	<i>Homo sapiens</i> PDZ binding kinase (PBK), mRNA	0.72*	0.67*
7443	VRK1	<i>Homo sapiens</i> vaccinia related kinase 1 (VRK1), mRNA	0.65***	0.71**
7474	WNT5A	<i>Homo sapiens</i> wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA	1.59**	1.62**
7546	ZIC2	<i>Homo sapiens</i> Zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila) (ZIC2), mRNA	2.18**	2.65***
<i>Other genes</i>				
120	ADD3	<i>Homo sapiens</i> adducin 3 (gamma) (ADD3), transcript variant 3, mRNA	1.75***	1.83***
135	ADORA2A	<i>Homo sapiens</i> adenosine A2a receptor (ADORA2A), mRNA	1.17	1.42**
29028	ATAD2	<i>Homo sapiens</i> ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA	0.68**	0.64**
604	BCL6	<i>Homo sapiens</i> B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) (BCL6), transcript variant 1, mRNA	1.47**	1.79***
220042	C11orf82	<i>Homo sapiens</i> chromosome 11 open reading frame 82 (C11orf82), mRNA	0.69**	0.75**
388115	C15orf52	<i>Homo sapiens</i> chromosome 15 open reading frame 52 (C15orf52), mRNA	1.36	1.42*
79098	C1orf116	<i>Homo sapiens</i> chromosome 1 open reading frame 116 (C1orf116), transcript variant 1, mRNA	0.67*	0.85
151963	C3orf59	<i>Homo sapiens</i> chromosome 3 open reading frame 59 (C3orf59), mRNA	1.70**	1.70**
771	CA12	<i>Homo sapiens</i> carbonic anhydrase XII (CA12), transcript variant 1, mRNA	1.46**	1.30*
147381	CBLN2	<i>Homo sapiens</i> cerebellin 2 precursor (CBLN2), mRNA	1.53**	1.43**
150468	CKAP2L	<i>Homo sapiens</i> cytoskeleton associated protein 2-like (CKAP2L), mRNA	0.72*	0.61**
171425	CLYBL	<i>Homo sapiens</i> citrate lyase beta like (CLYBL), mRNA	1.84***	1.88***
55789	DEPDC1B	<i>Homo sapiens</i> DEP domain containing 1B (DEPDC1B), mRNA	0.72	0.67*
80153	EDC3	<i>Homo sapiens</i> enhancer of mRNA decapping 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (EDC3), mRNA	1.61***	1.73***
79993	ELOVL7	<i>Homo sapiens</i> ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast) (ELOVL7), mRNA	0.71*	0.80
2571	GAD1	<i>Homo sapiens</i> glutamate decarboxylase 1 (brain, 67 kDa) (GAD1), transcript variant GAD25, mRNA	1.62***	1.52***

Table 2 (Continued)

Entrez Gene ID	Symbol	Definition	Fold change	
352954	GATS	<i>Homo sapiens</i> opposite strand transcription unit to STAG3 (GATS), mRNA	1.42*	1.35
2729	GCLC	<i>Homo sapiens</i> glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC), mRNA	1.54**	1.55**
2897	GRIK1	<i>Homo sapiens</i> glutamate receptor, ionotropic, kainate 1 (GRIK1), transcript variant 2, mRNA	1.44**	0.80*
9208	LRRFIP1	<i>Homo sapiens</i> leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1 (LRRFIP1), mRNA	1.17	1.47*
56922	MCCC1	<i>Homo sapiens</i> methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha) (MCCC1), mRNA	1.42**	1.52***
9833	MELK	<i>Homo sapiens</i> maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK), mRNA	0.72*	0.69**
29116	MYLIP	<i>Homo sapiens</i> myosin regulatory light chain interacting protein (MYLIP), mRNA	1.49*	1.52**
64151	NCAPG	<i>Homo sapiens</i> non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG), mRNA	0.68*	0.72*
55872	PBK	<i>Homo sapiens</i> PDZ binding kinase (PBK), mRNA	0.72*	0.67*
5223	PGAM1	<i>Homo sapiens</i> phosphoglycerate mutase 1 (brain) (PGAM1), mRNA	0.79*	0.69**
54886	PRG-3	<i>Homo sapiens</i> plasticity related gene 3 (PRG-3), transcript variant 2, mRNA	1.72*	2.02**
5737	PTGFR	<i>Homo sapiens</i> prostaglandin F receptor (FP) (PTGFR), transcript variant 2, mRNA	1.46**	1.50**
9185	REPS2	<i>Homo sapiens</i> RALBP1 associated Eps domain containing 2 (REPS2), transcript variant 1, mRNA	0.70**	0.75*
57142	RTN4	<i>Homo sapiens</i> reticulon 4 (RTN4), transcript variant 3, mRNA	0.67*	0.65*
64116	SLC39A8	<i>Homo sapiens</i> solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8 (SLC39A8), mRNA		
10252	SPRY1	<i>Homo sapiens</i> sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila) (SPRY1), transcript variant 2, mRNA	1.47*	1.77***
6482	ST3GAL1	<i>Homo sapiens</i> ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1 (ST3GAL1), transcript variant 1, mRNA	1.63**	1.77***
6926	TBX3	<i>Homo sapiens</i> T-box 3 (ulnar mammary syndrome) (TBX3), transcript variant 1, mRNA	1.37**	1.42**
7053	TGM3	<i>Homo sapiens</i> transglutaminase 3 (E polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) (TGM3), mRNA	1.49	1.61*
25976	TIPARP	<i>Homo sapiens</i> TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (TIPARP), mRNA	1.43*	1.50**
4071	TM4SF1	<i>Homo sapiens</i> transmembrane 4 L six family member 1 (TM4SF1), mRNA	0.66**	0.75*
7113	TMRSS2	<i>Homo sapiens</i> transmembrane protease, serine 2 (TMRSS2), mRNA	0.59*	0.84
114990	VASN	<i>Homo sapiens</i> vasorin (VASN), mRNA	1.31	1.44*
7450	VWF	<i>Homo sapiens</i> von Willebrand factor (VWF), mRNA	0.67*	0.74

Statistical analysis was performed as described in Section 2. All gene transcripts listed meet the following criteria: $-0.5 \leq \log FC \leq 0.5$ and adj. p -val ≤ 0.05 for at least one of the compounds. The data were obtained from three independently performed microarray experiments.

* Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.05$.

** Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.01$.

*** Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.001$.

3.2. Real-time RT-PCR verification

Quantitative RT-PCR was further used to validate the microarray results for selected genes that were identified as being commonly downregulated by BaP and TCDD and that are involved in cell cycle progression, spindle assembly checkpoint, replication complex or DNA repair. Moreover, we validated the expression of 3 selected genes involved in oncogenic signaling and regulation of apoptosis (*ADD3*, *BCL6*, *WNT5A*), which were commonly upregulated by BaP and TCDD. As outlined in Table 4, we were able to confirm the common trend for downregulation of specific cell cycle and DNA repair genes. Although the results of quantitative RT-PCR were not always significant (due to a higher interassay variability), with exception of 5 out of 18 genes, there was always a clear trend to decrease mRNA levels of genes involved in the above mentioned cellular processes. In addition, we determined *CHEK2* being also downregulated by BaP treatment (this gene was not originally included in the panel of significantly downregulated genes in microarray analysis). In the case of upregulated genes, there was always significant upregulation confirmed for at least one compound and the overall trend was similar for both microarray and quantitative RT-PCR data.

3.3. Modulations of Wnt5a and E2F1 proteins

Since Wnt5a protein has been suggested to be an important determinant of prostate cancer progression and recurrence (Stanbrough et al., 2006; Yamamoto et al., 2010), we next analyzed also protein levels of Wnt5a, in order to confirm that the changes in its expression correspond with protein induction by BaP and TCDD. As shown in Fig. 2A, both BaP and TCDD significantly increased Wnt5a protein in LNCaP cells, which corresponded with mRNA data.

In order to confirm changes in expression of the set of genes associated with cell cycle and proliferation, we determined E2F1 protein, a key transcription factor involved in these events. The suppression of E2F1 mRNA corresponded with a decreased level of E2F1 protein in both BaP- and TCDD-treated cells as shown in Fig. 2B.

3.4. Time course study of expression of selected modulated genes

The AhR-dependent inhibition of cell cycle progression and proliferation has been a principal effect of various types of AhR ligands in LNCaP cells observed in previous studies (Barnes-Ellerbe

Table 3
Pathways significantly affected after BaP- and TCDD-treatment of LNCaP cells identified by GSEA (*P* value <0.05 and FDR value <0.25).

Pathway	NES BaP	TCDD
<i>Downregulated</i>		
KEGG_CELL_CYCLE	-2.85	-2.82
KEGG_DNA_REPLICATION	-2.68	-2.71
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	-2.29	-2.13
KEGG_MISMATCH_REPAIR	-2.30	-2.21
KEGG_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	-2.23	-2.05
KEGG_OOCYTE_MEIOSIS	-2.14	-1.96
KEGG_PROGESTERONE_MEDIATED_OOCYTE_MATURATION	-2.06	-1.93
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	-2.04	-1.94
KEGG_PENTOSE_AND_GLUCURONATE_INTERCONVERSIONS	n.s.	-1.67
KEGG_BASE_EXCISION_REPAIR	-1.82	-1.63
KEGG_PURINE_METABOLISM	-1.83	-1.64
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	-1.68	-1.64
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	-1.58	-1.71
KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	n.s.	-1.61
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	n.s.	-1.60
KEGG_STEROID_BIOSYNTHESIS	-1.57	n.s.
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	n.s.	-1.55
KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	-1.53	n.s.
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLL_INFECTIO	n.s.	-1.53
<i>Upregulated</i>		
KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	2.09	2.26
KEGG_ALANINE_ASPARTATE_AND_GLUTAMATE_METABOLISM	1.95	1.64
KEGG_BETA_ALANINE_METABOLISM	1.92	1.82
KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	1.89	1.86
KEGG_RETINOL_METABOLISM	1.82	1.88
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	n.s.	1.78
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_KERATAN_SULFATE	n.s.	1.73
KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	n.s.	1.67
KEGG_BUTANOATE_METABOLISM	1.70	n.s.
KEGG_GLYCOPHINGOLIPID_BIOSYNTHESIS_GANGLIO_SERIES	1.68	1.65
KEGG_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	1.63	n.s.
KEGG_STEROID_HORMONE_BIOSYNTHESIS	1.60	1.70
KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	1.59	1.66
KEGG_NITROGEN_METABOLISM	1.57	n.s.
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_HEPARAN_SULFATE	n.s.	1.59
KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	n.s.	1.58
KEGG_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY	n.s.	1.57

n.s.: not significant. Curated gene sets from KEGG pathway database, a part of Molecular Signature Database collection were tested. Normalized enrichment score (NES) is the primary statistic for examining gene set enrichment results that accounts for differences in gene set size and in correlations between gene sets and the expression dataset.

et al., 2004; Morrow et al., 2004; Endo et al., 2003; Kizu et al., 2003). Suppression of many genes related to regulation of cell cycle/proliferation could be thus simply a secondary outcome of cell cycle inhibition after BaP and/or TCDD exposure. Therefore, next we determined the modulations of selected genes at three exposure times. Both CYP1A1 and Wnt5a mRNA levels were elevated after 6, 12 and 24 h exposures to BaP or TCDD, thus suggesting that Wnt5a represents a directly regulated AhR target (Fig. 3A). In contrast, E2F1 and CDC2 mRNAs were not affected after 6 h or 12 h exposure to BaP or TCDD and were significantly reduced only after 24 h exposure (Fig. 3B), similar to EXO1 and FEN1 genes, participating in DNA repair. Therefore, the latter mRNA alterations could be classified as secondary changes in gene expression.

4. Discussion

BaP is a ubiquitous mutagenic environmental pollutant, which is suspected to contribute to several types of human cancer (IARC, 2010). However, the formation of bulky DNA adducts, or induction of further DNA damage through generation of oxidative stress, fails to explain the full range of toxic effects of BaP contributing to tumor promotion and progression (Hockley et al., 2007, 2008). Although its carcinogenicity is attributed primarily to its genotoxicity and mutagenicity, BaP is also a relatively efficient AhR ligand (Machala et al., 2001). AhR is an important regulator of prostate carcinoma (Fritz et al., 2007) and androgen-sensitive prostate carcinoma cells respond to various classes of toxic AhR ligands (Barnes-Elberbe et al.,

2004; Endo et al., 2003; Jana et al., 1999; Morrow et al., 2004). Since our previous study has indicated that despite formation of DNA adducts, BaP fails to activate DNA damage response (Hrubá et al., 2010), the effects of BaP in prostate carcinoma cells might be largely due to its AhR-mediated activity. This would make these cells a highly valuable experimental model, where the toxicity of genotoxic AhR ligands could be studied in the absence of activation of signaling pathways related to DNA damage, such as e.g. p53 signaling, without the need inhibit these pathway by other potentially confounding treatments. In order to verify this hypothesis, we performed microarray analysis of effects of BaP on gene expression in LNCaP cells, and compared them to those of the model nongenotoxic AhR ligand TCDD.

Several classes of AhR ligands have been shown to inhibit cell cycle progression of androgen-sensitive prostate carcinoma cells. These include dioxins (Barnes-Elberbe et al., 2004; Morrow et al., 2004), selective modulators of AhR activity (Morrow et al., 2004), coplanar polychlorinated biphenyls (Endo et al., 2003) and PAHs (Kizu et al., 2003). Their effects have been primarily attributed to the antiandrogenic action of AhR ligands related to direct inhibition of AR-regulated transcription or AR itself (Jana et al., 1999; Morrow et al., 2004; Ohtake et al., 2007). Nevertheless, activation of AhR may also directly inhibit cell cycle progression, through various mechanisms, including interference with p21^{WAF1/CIP1} expression, induction of p27^{Kip1}, interactions of AhR with retinoblastoma protein or inhibition of E2F-dependent transcriptional activity (Puga et al., 2009).

Table 4
Quantitative real-time RT-PCR analysis of mRNA levels of the genes selected from microarray analysis.

Entrez Gene ID	Symbol	Definition	Fold change			
			Microarrays		qRT-PCR	
			BaP	TCDD	BaP	TCDD
<i>Cell cycle progression and spindle assembly checkpoint</i>						
6790	AURKA	<i>Homo sapiens</i> aurora kinase A (AURKA), transcript variant 5, mRNA	0.67**	0.67**	0.73**	0.70**
890	CCNA2	<i>Homo sapiens</i> cyclin A2 (CCNA2), mRNA	0.65**	0.61**	0.97	1.48*
983	CDC2	<i>Homo sapiens</i> cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2), transcript variant 1, mRNA	0.68*	0.62**	0.73	0.44**
991	CDC20	<i>Homo sapiens</i> cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC20), mRNA	0.69*	0.67*	0.72	0.59**
1017	CDK2	<i>Homo sapiens</i> cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), transcript variant 1, mRNA	0.73*	0.69*	0.72	0.61
1058	CENPA	<i>Homo sapiens</i> centromere protein A (CENPA), transcript variant 2, mRNA	0.67*	0.62**	0.78	0.52*
1111	CHEK1	<i>Homo sapiens</i> CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>) (CHEK1), mRNA	0.72*	0.68**	0.67*	0.84
11200	CHEK2	<i>Homo sapiens</i> CHK2 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>) (CHEK2), mRNA	–	–	0.60*	0.79
1869	E2F1	<i>Homo sapiens</i> E2F transcription factor 1 (E2F1), mRNA	0.69*	0.68*	0.66**	0.59**
1870	E2F2	<i>Homo sapiens</i> E2F transcription factor 2 (E2F2), mRNA	0.59**	0.56**	0.48*	0.71
56992	KIF15	<i>Homo sapiens</i> kinesin family member 15 (KIF15), mRNA	0.67*	0.68*	0.78	0.67**
4085	MAD2L1	<i>Homo sapiens</i> MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MAD2L1), mRNA	0.69*	0.67**	0.78	0.67
<i>Replication complex and DNA repair</i>						
54821	ERCC6L	<i>Homo sapiens</i> excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like (ERCC6L), mRNA	0.73*	0.68**	0.71	0.57*
9156	EXO1	<i>Homo sapiens</i> exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 1, mRNA	0.74*	0.68**	0.64	0.51*
2237	FEN1	<i>Homo sapiens</i> flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1), mRNA	0.65**	0.65**	0.51**	0.50**
5111	PCNA	<i>Homo sapiens</i> proliferating cell nuclear antigen (PCNA), transcript variant 2, mRNA	0.69**	0.73**	1.06	1.14
5885	RAD21	<i>Homo sapiens</i> RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>) (RAD21), mRNA	0.89	0.73*	0.90	0.92
5888	RAD51	<i>Homo sapiens</i> RAD51 homolog (RecA homolog, <i>E. coli</i>) (<i>S. cerevisiae</i>) (RAD51), transcript variant 1, mRNA	0.77*	0.75*	0.61	0.90
7153	TOP2A	<i>Homo sapiens</i> topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa (TOP2A), mRNA	0.73*	0.67**	1.02	1.21
<i>Other Genes</i>						
120	ADD3	<i>Homo sapiens</i> adducin 3 (gamma) (ADD3), transcript variant 1, mRNA	1.71***	1.80***	2.16**	2.31
604	BCL6	<i>Homo sapiens</i> B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) (BCL6), transcript variant 1, mRNA	1.47**	1.79***	2.2	2.9*
7474	WNT5A	<i>Homo sapiens</i> wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA	1.59**	1.62**	2.40*	3.70*

* Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.05$.

** Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.01$.

*** Statistical difference between control and the respective treatment at $p < 0.001$.

Although the genotoxic effects of PAHs may themselves contribute to inhibition of cell cycle progression (Binková et al., 2000; Khan et al., 1997; Plíšková et al., 2005), we have previously observed that in LNCaP cells, BaP does not activate the p53 pathway, which plays a principle role in cell cycle arrest elicited by genotoxic PAHs (Hrubá et al., 2010). Nevertheless, it cannot be excluded that BaP, or BaP metabolites, may activate also additional signaling pathways eventually leading to cell cycle arrest. It has been reported that BaP and TCDD induce differential sets of genes (including cell cycle regulation, apoptosis and DNA repair) in human cancer cell lines responsive to genotoxic effects of BaP, such as MCF-7 and HepG2 cells (Hockley et al., 2007). In the present study, both BaP and TCDD were found to downregulate similar genes that were subsequently identified by the gene set enrichment analysis as those involved in DNA replication, repair, mitosis and cell cycle control. The latter ones included several direct cell cycle regulators, such as cyclins

and cyclin-dependent kinases and the genes linked to mitotic spindle formation and spindle checkpoint. These changes are likely to occur secondary to established AhR-dependent inhibition of cell cycle progression. Although we observed a suppression of E2F1 and other regulators of cell cycle, spindle assembly and DNA repair at the transcriptional level, the results of time course analysis suggest showed that the downregulation of E2F1, CDK2, EXO1, FEN1 and probably also other related genes, occurred first after a prolonged (24 h) and not after 6 h or 12 h treatment (Fig. 3B). These findings suggest that, although the suppression of the cell cycle genes was related to AhR activation, it represents secondary changes in gene expression.

Interestingly, the commonly downregulated genes included the components of DNA repair. It has been proposed that AhR ligands may modulate expression of genes involved in nucleotide excision repair or to modulate DNA double strand break repair

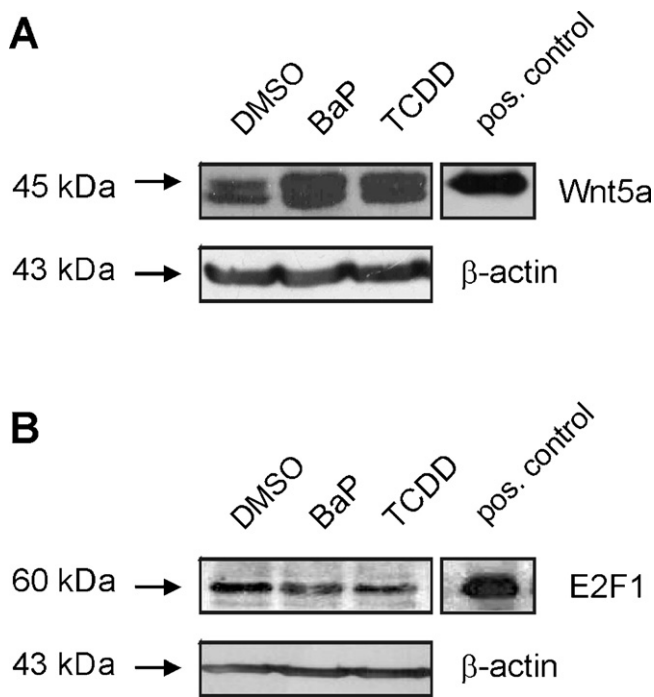


Fig. 2. Effects of BaP and TCDD on Wnt5a (A) and E2F1 (B) protein levels. LNCaP cells were exposed to the indicated concentrations of BaP, TCDD and 0.1% DMSO for 24 h and whole cell lysates were analyzed by Western blotting as described in Section 2.7. β -Actin was used as loading control. The results shown here are representative of three independent experiments.

through upregulation of homologous recombination (Chan et al., 2004; Schreck et al., 2009). In the present study, we did not observe upregulation but a downregulation of several DNA repair components, which could be related to inhibition of cell cycle progression.

One of the central questions opened by our previous study was why the genotoxic PAHs fail to induce apoptotic response despite eliciting serious DNA damage. We concluded that despite forming significant levels of stable DNA adducts, BaP fails to produce DNA double strand breaks, which then do not lead to activation of p53 signaling pathway and induction of apoptosis (Hrubá et al., 2010). Nevertheless, the present study also suggests that BaP deregulated several important transcripts coding proteins involved in the regulation of apoptosis. E2F transcription factor 1 (E2F1), an important cell cycle regulator, has been implicated also in the induction of apoptosis following the DNA damage. E2F1 activation through phosphorylation and acetylation leads to activation of p73, a member of p53 family, and induction of apoptosis (Wu et al., 2009). Moreover, through alternative signaling pathways, E2F1 has been also shown to contribute to the induction of p53-dependent apoptosis. The role of other activator E2Fs in regulation of apoptosis/cell survival is presently unclear (Wu et al., 2009). Our results showed that E2F1 mRNA was significantly downregulated in response to BaP and TCDD, which mechanism might further contribute to the inhibition of apoptosis in prostate cells with significant levels of BPDE-DNA adducts. Moreover, we found that B-cell CLL/lymphoma 6 (BCL6) transcript was significantly increased by AhR ligands in LNCaP cells. This protein has been proposed to act as negative regulator of apoptosis, which may contribute to survival of cancer cells in response to chemotherapeutic agents (Kurosu et al., 2003; Phan and Dalla-Favera, 2004). Therefore, although the failure to activate p53 response may explain survival of LNCaP cells with high levels of BPDE-DNA adducts, deregulation of E2Fs and BCL6 might further contribute to the survival of LNCaP cells affected by the genotoxic PAHs. Nevertheless, again, it should be noted that significant changes in E2F1 levels were first observed after 24 h

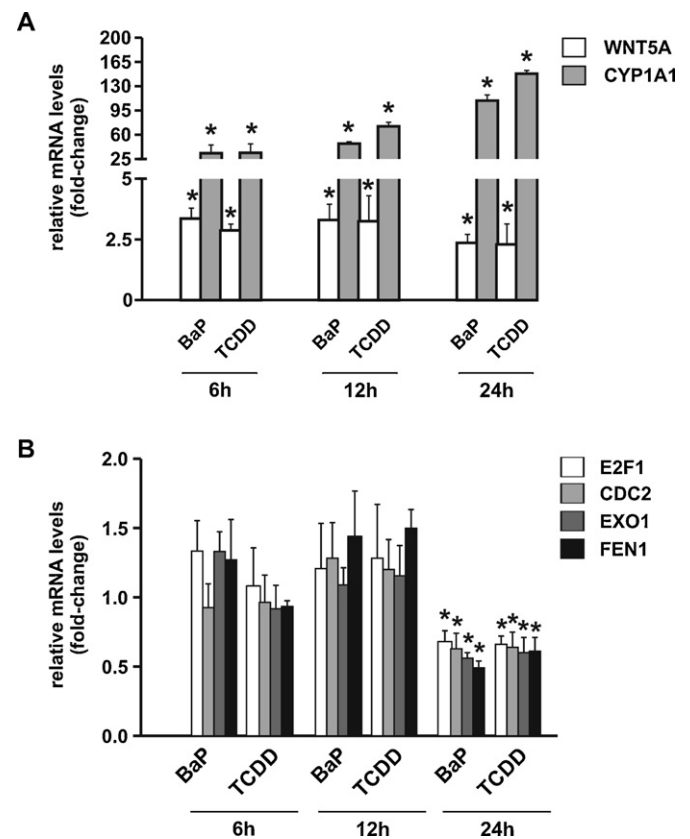


Fig. 3. Time-dependent modulation of expression of genes identified as differentially expressed after 24 h treatment of LNCaP cells with both AhR ligands. (A) Induction of Wnt5a mRNA parallels the induction of CYP1A1 mRNA levels. (B) Downregulation of mRNA levels of genes participating in DNA repair (EXO1, FEN1) and cell cycle regulation (E2F1, CDC2) was first observed after 24 h exposure. Cells were treated with 10 μ M BaP, 5 nM TCDD and 0.1% DMSO as a solvent control for indicated times. Quantitative real-time PCR was performed as described in sections 2.3 and 2.6. The results are presented as means \pm S.D. of three independent experiments. Symbol *** denotes a significant difference between DMSO-treated control and BaP or TCDD-treated sample ($P < 0.05$).

exposure, and as such, are unlikely to be the key factor contributing to the observed lack of apoptosis in BaP-treated LNCaP cells.

The role of AhR in regulation of prostate development and disease has been in part linked to its interactions with Wnt5a, a member of non-canonical Wnt family (Vezina et al., 2009). Wnt5a signaling contributes to the prostate gland development (Huang et al., 2009). WNT5A gene is overexpressed in prostate carcinoma, contributes to the progression of prostate cancer and metastasis, and its expression has been linked to relapse after prostatectomy (Stanbrough et al., 2006; Yamamoto et al., 2010). Possible mechanisms may include increased cell plasticity and motility associated with activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (Wang et al., 2010). Indeed, a forced expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in LNCaP cells has been previously shown to increase Wnt5a-dependent cell migration/invasion (Cao et al., 2008), and Wnt5a thus constitutes a possible target for prostate cancer treatment (Dai et al., 2008). We found in the present study that both BaP and TCDD significantly increased Wnt5a mRNA and protein. Wnt5a mRNA, similarly to CYP1A1, was induced already after 6 h exposure to BaP or TCDD (Fig. 3A). The observed upregulation of WNT5A expression might thus provide a partial explanation for a previous observation that high levels of PAH-DNA adducts are strongly associated with biochemical recurrence, i.e. rise in prostate-specific antigen serum levels, after prostatectomy (Rybicki et al., 2008). In addition to WNT5A, FOXQ1, which has been recently linked to epithelial-mesenchymal

transition and aggressiveness of human cancers (Qiao et al., 2011; Zhang et al., 2011), was also significantly upregulated in LNCaP cells treated with BaP or TCDD (Table 2).

In conclusion, we found in the present study, that BaP, a major environmental carcinogenic PAH, induces gene expression changes, which are to a large extent similar to those elicited by a model nongenotoxic AhR ligand TCDD. Downregulation of genes and pathways related to DNA replication and repair, mitosis and cell cycle progression by both BaP and TCDD indicates that antiproliferative effects of BaP could be related to AhR-dependent inhibition of cell cycle progression, and not to its genotoxic properties. Our data indicated that LNCaP cells could be used as a highly interesting model allowing to discriminate between genotoxic and nongenotoxic effects related to AhR activation. Downregulation of the genes associated with DNA repair suggests that PAHs might, through their AhR-inducing capacity, disrupt the repair of DNA lesions elicited by their genotoxic metabolites. They might also negatively affect signaling pathways associated with both cell cycle progression and regulation of DNA damage-related apoptosis, thus further contributing to survival of cells with damaged DNA. Finally, our data suggest that the induction of Wnt5a, and perhaps other genes related to carcinoma progression, by carcinogenic PAHs might further contribute to the prostate cancer development.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Czech Science Foundation (grants No. 310/07/0961 and 524/09/1337). The institutional support was provided by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Research Plans AVOZ50040507, AVOZ50040702) and the Czech Ministry of Agriculture (No. MZE0002716202).

References

- ACS. 2009. Cancer Facts & Figures 2008. American Cancer Society, Atlanta.
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hansberg, A., Poellinger, L., 2002. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9990–9995.
- Barnes-Ellerbe, S., Knudsen, K.E., Puga, A., 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 66, 502–511.
- Binková, B., Giguere, Y., Rössner Jr., P., Dostál, M., Šrám, R.J., 2000. The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat. Res.* 471, 57–70.
- Cao, J., Chiarelli, C., Richman, O., Zarrabi, K., Kozarekar, P., Zucker, S., 2008. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 6232–6240.
- Chan, C.Y., Kim, P.M., Winn, L.M., 2004. TCDD affects DNA double strand-break repair. *Toxicol. Sci.* 81, 133–138.
- Dai, J., Hall, C.L., Escara-Wilke, J., Mizokami, A., Keller, J.M., Keller, E.T., 2008. Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.* 68, 5785–5794.
- Dietrich, C., Kaina, B., 2010. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell–cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31, 1319–1328.
- Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K.W., Barouki, R., Transy, C., 2006. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 5570–5574.
- Endo, F., Monsees, T.K., Akaza, H., Schill, W.B., Pflieger-Bruss, S., 2003. Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCaP. *Reprod. Toxicol.* 17, 229–236.
- Fan, Y., Boivin, G.P., Knudsen, E.S., Nebert, D.W., Xia, Y., Puga, A., 2010. The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 70, 212–220.
- Fritz, W.A., Lin, T.M., Cardiff, R.D., Peterson, R.E., 2007. The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Carcinogenesis* 28, 497–505.
- Fritz, W.A., Lin, T.M., Moore, R.W., Peterson, R.E., 2009. The selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran inhibits prostate tumor metastasis in TRAMP mice. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1151–1160.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te Poole, R., Workman, P., Giddings, I., Phillips, D.H., 2007. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I., Phillips, D.H., 2008. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. *Carcinogenesis* 29, 202–210.
- Hrubá, E., Trilecová, L., Marvanová, S., Krčmář, P., Vykopalová, L., Milcová, A., Líbalová, H., Topinka, J., Stařichová, A., Souček, K., Vondráček, J., Machala, M., 2010. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells. *Toxicol. Lett.* 197, 227–235.
- Huang, L., Pu, Y., Hu, W.Y., Birch, L., Luccio-Camelo, D., Yamaguchi, T., Prins, G.S., 2009. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev. Biol.* 328, 188–199.
- IARC. 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 92: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures. IARC, Lyon.
- Jana, N.R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Yonemoto, J., Tohyama, C., Sone, H., 1999. Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 462–468.
- Khan, Q.A., Vousden, K.H., Dipple, A., 1997. Cellular response to DNA damage from a potent carcinogen involves stabilization of p53 without induction of p21(waf1/cip1). *Carcinogenesis* 18, 2313–2318.
- Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Kakishima, H., Mizokami, A., Burnstein, K.L., Hayakawa, K., 2003. A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Arch. Toxicol.* 77, 335–343.
- Kung, T., Murphy, K.A., White, L.A., 2009. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 77, 536–546.
- Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T., Miura, O., 2003. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22, 4459–4468.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402–408.
- Luch, A., Kudla, K., Seidel, A., Doehmer, J., Greim, H., Baird, W.M., 1999. The level of DNA modification by (+)-syn-(11S,12R,13S,14R)- and (–)-anti-(11R,12S,13S,14R)-dihydrodiol epoxides of dibenzo[a,h]pyrene determined the effect on the proteins p53 and p21WAF1 in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 20, 883–885.
- Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M., Neča, J., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res.* 497, 49–62.
- Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Itrich, C., Poellinger, L., Schwarz, M., 2004. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 64, 4707–4710.
- Morrow, D., Qin, C., Smith, R., 3rd, Safe, S., 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 27–36.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566.
- Phan, R.T., Dalla-Favera, R., 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635–639.
- Plíšková, M., Vondráček, J., Vojtěšek, B., Kozubík, A., Machala, M., 2005. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol. Sci.* 83, 246–256.
- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713–722.
- Qiao, Y., Jiang, X., Lee, S.T., Karuturi, R.K., Hooi, S.C., Yu, Q., 2011. FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers. *Cancer Res.* 71, 3076–3086.
- Ramet, M., Castren, K., Jarvinen, K., Pekkala, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Soini, Y., Paakko, P., Vahakangas, K., 1995. p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 16, 2117–2124.
- Ray, S., Swanson, H.I., 2009. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event? *Biochem. Pharmacol.* 77, 681–688.
- Rybicki, B.A., Neslund-Dudas, C., Bock, C.H., Rundle, A., Saveria, A.T., Yang, J.J., Nock, N.L., Tang, D., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts in prostate and biochemical recurrence after prostatectomy. *Clin. Cancer Res.* 14, 750–757.
- Schreck, I., Chudziak, D., Schneider, S., Seidel, A., Platt, K.L., Oesch, F., Weiss, C., 2009. Influence of aryl hydrocarbon-(Ah) receptor and genotoxins on DNA repair gene expression and cell survival of mouse hepatoma cells. *Toxicology* 259, 91–96.
- Sinha, R., Park, Y., Graubard, B.I., Leitzmann, M.F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., Cross, A.J., 2009. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in

- a large prospective cohort study in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 170, 1165–1177.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3 (1), Article 3.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Lag, M., Schwarze, P.E., Husoy, T., Holme, J.A., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809–819.
- Stanbrough, M., Bubley, G.J., Ross, K., Golub, T.R., Rubin, M.A., Penning, T.M., Febbo, P.G., Balk, S.P., 2006. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 2815–2825.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 102, 15545–15550.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 68–76.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krémář, P., Pencikova, K., Machala, M., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial “stem-like” cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 638, 122–132.
- Vezina, C.M., Lin, T.M., Peterson, R.E., 2009. AHR signaling in prostate growth, morphogenesis, and disease. *Biochem. Pharmacol.* 77, 566–576.
- Wang, Q., Symes, A.J., Kane, C.A., Freeman, A., Nariculam, J., Munson, P., Thrasivoulou, C., Masters, J.R., Ahmed, A., 2010. A novel role for Wnt/Ca2+ signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer. *PLoS One* 5, e10456.
- Wu, Z., Zheng, S., Yu, Q., 2009. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41, 2389–2397.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.
- Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Matsubara, A., Yasui, W., Kikuchi, A., 2010. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29, 2036–2046.
- Zhang, H., Meng, F., Liu, G., Zhang, B., Zhu, J., Wu, F., Ethier, S.P., Miller, F., Wu, G., 2011. Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 71, 1292–1301.