British Journal of Cancer (2006) 94, 407 – 426
© 2006 Cancer Research UK All rights reserved 0007 – 0920/06 $30.00
www.bjcancer.com

BRCA1 a BRCA2 jako molekulární cíle pro fytolátky indol-3-karbinol a genistein v nádorových buňkách prsu a prostaty

S Fan[1], Q Meng[1], K Auborn[2], T Carter[2] and EM Rosen*[,1]
[1]Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, 3970 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20057-1469, USA; [2]Department of Otolaryngology, North Shore-Long Island Jewish Research Institute, BoasMarks Biomedical Science Research Center, 350 Community Drive, Manhasset, New York 11030, USA

Indol-3-karbinol (I3C) a genistein jsou v přírodě se vyskytující látky získávané z brukvovité zeleniny (I3C) a sóji (genistein), s potenciálním preventivním účinkem na hormonálně závislé tumory (např. rakovinu prsu a prostaty).
Dříve jsme objasnili, že I3C vyvolává BRCA1 expresi a že oba, jak I3C tak i BRCA 1, inhibují aktivitu estrogenem (E2) stimulovaného estrogenního receptoru (ER-α) v lidských rakovinných buňkách prsu. Nynější výsledky naší studie ukazují, že oba, jak I3C tak i genistein, vyvolávají expresi obou genů rizikových pro vznik rakoviny prsu (BRCA1 and BRCA2) v typech nádorových buněk prsu (MCF-7 and T47D) a prostaty (DU-145 and LNCaP), a to v závislosti na čase a dávce. Indukce BRCA genů se objevila při malých dávkách I3C (20 mM) a genisteinu (0.5–1.0 mM), což svědčí o potenciálním významu pro prevenci nádorového bujení. Kombinace I3C a genisteinu poskytla větší než očekávanou indukci BRCA exprese. Studie užívající malé interferující RNA kyseliny (siRNAs) a BRCA vektory exprese ukazují, že fytochemická indukce BRCA2 je částečně výsledkem BRCA1. Funkční studie ukazují, že cytotoxicita zprostředkovaná I3C je částečně závislá na BRCA1 a BRCA2. Inhibice aktivity E2 stimulovaného ER-α prostřednictvím I3C a genisteinu byla závislá na BRCA1; a inhibice aktivity ligandem indukovaného androgenního receptoru (AR) prostřednictvím I3C a genisteinu byla částečně revertována prostřednictvím BRCA1-siRNA. Závěrem poskytujeme důkaz, svědčící o tom, že fytochemická indukce BRCA1 exprese je částečně způsobená stresovou odpovědí endoplazmatického retikula. Tyto nálezy svědčí o tom, že BRCA geny jsou molekulárními cíly pro některé z aktivit I3C a genisteinu.
British Journal of Cancer (2006) **94**, 407–426. doi:10.1038/sj.bjc.6602935 www.bjcancer.com
Published online 24 January 2006
© 2006 Cancer Research UK

Klíčová slova: indol-3-karbinol (I3C); genistein; chemoprevence; BRCA1; BRCA2; EMR; stresová odpověď endoplazmatického retikula

Indol-3-karbinol (I3C) je fytolátka nacházející se v brukvovité zelenině, jako je kapusta a květák. Epidemiologické studie ukazují závislost mezi dietou bohatou na takovou zeleninu a sníženým výskytem rakoviny prsu (Graham et al, 1982).
Ve studiích na zvířatech dieta bohatá na tuto zeleninu inhibovala nádory indukované chemickými karcinogeny a dietní suplementace I3C byla schopna předejít vzniku estrogen-dependentních tumorů (prsu, děložního čípku, endometria) (Bradlow et al, 1991; Kojima et al, 1994; Jin et al,1999). V klinických studiích I3C způsobil regresi intraepiteliální neoplazie děložního čípku (Bell et al, 2000) a regresi nebo snížení tempa růstu u opakovaných polypů hrtanu (Rosen et al,1998). Protinádorová aktivita indol-3-karbinolu je částečně přisuzována jeho antiestrogenní aktivitě: stimuluje 2-hydroxylaci a inhibuje 16α-hydroxylaci estronu vedoucí k vzniku inaktivních estronových metabolitů (Michnovicz and Bradlow, 1990). Indol-3-karbinol pravděpodobně také přímo vzájemně reaguje s estrogenovým receptorem (ER-α) a inhibuje jeho aktivitu (Jin et al, 1999) a spolupracuje s Tamoxifenem při inhibici proliferace nádorové buňky prsu (Cover et al, 1999).

Indol-3-karbinol se také uplatňuje v estrogen-nondependentních procesech. Může inhibovat progresi buněčného cyklu, indukovat apoptózu a inhibovat nádorovou invazi a metastazování, dokonce i v ER-α negativních buňkách (Meng et al, 2000a, 2001; Bonnesen et al, 2001; Chen et al, 2001). Indol-3-karbinol snižuje expresi G1 cyklin dependentní kinázy (CDK6) a zvyšuje CDK inhibitor ($p21^{Cip1}$) (Cover et al, 1998). Hlavní aktivní metabolit I3C, diindolylmetan (DIM), indukuje expresi GADD45α - genu odpovědného za opravy DNA a domnělého nádorového supresoru (Carter et al, 2002). Indol-3-karbinol může aktivovat dvě cesty spojené s prevencí rakoviny: 1) signálování aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) (což vede k expresi enzymatické fáze I (např. CYP1A1) cestou xenobiotické odpovědi prvku a 2) signálování antioxidant/elektrofilní odpověďi prvku (vedoucí k expresi fáze II detoxikujících enzymů: např. oxidoreduktáz a glutathion-S-transferáz) (Chen et al, 1998; Hayes and McMahon, 2001; Kwak et al, 2002). Schopnost I3C indukovat enzymy, které metabolizují genotoxické sloučeniny, tedy pravděpodobně přispívá k nádorové prevenci.

Schopnost I3C a DIM inhibovat růst lidských prostatických nádorových buněk zvýšila zájem o I3C v prevenci rakoviny prostaty. Z toho vyplývá, že DIM inhiboval dihydrotestosteronem (DHT) stimulovanou buněčnou proliferaci a DHT indukovanou aktivaci promotoru prostatického specifického antigenu v buňkách LNCaP tím, že působil jako AR antagonista (Le et al,2003). Indol-3-karbinol indukoval zástavu růstu upregulací inhibitoru G1 buněčného cyklu ($p21^{Cip1}$ a $p27^{Kip1}$) u androgen-nondependentních buněk rakoviny prostaty PC-3 (Chinni et al, 2001). Indol-3-karbinol a DIM mohou indukovat

*Korespondence: Dr EM Rosen;
E-mail: emr36@georgetown.edu
Revidováno 30.11. 2005; přijato 30. 11. 2005; publikováno online 24. 1. 2006

p53-nondependentní apoptózu u buněk rakoviny prostaty, a to částečně díky inhibici NF-kB a c-Akt signální dráhy (Chinni et al, 2001; Nacheson-Kedmi et al, 2003).

Prokázali jsme, že I3C upreguluje expresi susceptibilního genu-1 rakoviny prsu (BRCA1) (Meng et al, 2000a b, 2001; Carter et al, 2002). V tomto sdělení publikujeme, že : 1) jak I3C, tak genistein, sójový isoflavon s preventivní aktivitou proti růstu buněk nádorů prostaty a jiných typů nádorů zvyšuje aktivitu BRCA1 a BRCA2; 2) geny BRCA přispívají k funkčním aktivitám I3C a genisteinu a 3) indukce BRCA může být částečně způsobena stimulací stresového signálování endoplazmatického retikula. Tyto nálezy mají dopady na pochopení mechanismu(ů) působení těchto fytolátek uplatňujících se v prevenci rakoviny.

MATERIÁL A METODIKA

Zdroje reagencií

Indol-3-karbinol a genistein byly získány od firmy Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) a rozpuštěny v malém množství dimetylsulfoxidu (DMSO) rozředěním v buněčné kultuře. 17-b Estradiol a DHT byly rovněž získány od firmy Sigma. Thapsigargin a tunicamycin byly získány od Sigmy, rozpuštěny v DMSO a skladovány při -20°C.

Buněčné linie a kultury

Nádorové buňky rakoviny lidského prsu (MCF-7 and T47D) a prostaty (DU-145, PC-3, and LNCaP) byly získány ze sbírky American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Všechny buněčné linie s výjimkou LNCaP byly pěstovány v Eaglově médiu s Dulbeccovou modifikací (DMEM) s 5% (MCF-7, DU-145, a PC-3) nebo 10% (T47D) ($vv\tilde{o}^{1}$) fetálním telecím sérem, L-glutaminem (5mM), neesenciálními amino kyselinami (5mM), penicilinem ($100Uml\tilde{o}^{1}$) a streptomycinem (100 $\mu gml\tilde{o}^{1}$) (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). LNCaP buňky byly pěstovány v médiu RPMI 1640 s 10% fetálním telecím sérem a výše uvedenými aditivy. Byla použita standartní metodika pro pěstování buněčných kultur (Fan et al, 1998, 2001a, b).

Vektory exprese a reportérové plasmidy

Přirozená („wild type“, pozn. překl.) BRCA1 (wtBRCA1) cDNA, klonovaná do pcDNA3 vektoru exprese (Invitrogen), byla popsána dříve (Fan et al,1998). Pro expresi BRCA2, humánní BRCA2 cDNA v plné délce (poskytnutá Dr Qingshen Gao, New England Medical Center, Boston, MA, USA) byla klonovaná do pCMV-Tag2B vektoru (Stratagene). Humánní vektor exprese ER-α a estrogen responsivní reportér ERE-TK-Luc byly popsány dříve (Fan et al, 1999b, 2001a). Vektor „wild-type“ AR exprese pSG5-AR a androgen responsivní reportérový plazmid ARE-TK-Luc poskytl Dr. Chawshang Chang (University of Rochester, Rochester, NY, USA). ARE-TK-Luc reportér obsahuje upstream androgen responsivního prvku vztahujícího se k promotéru minimální thymidinové kinázy (TK), řídícího gen pro luciferázu.

Reportéry luciferázy řízené „wild type“ prvkem stresové odpovědi endoplazmatického retikula (ERSEwt-Luc), mutantní ERSE (ERSEmut-Luc, a negativní kontrola) a ERSE-II element (ERSEII3x-Luc) v pGL3 vektoru byly s laskavostí poskytnuty Dr. Kazutoshi Mori (HSP Research Institute, Kyoto Research Park, Kyoto, Japan) (Yoshida et al, 1998; Yamamoto et al, 2004). CHOP (C/EBP homologní protein) reportér promotéru luciferázy v pGL3 vektoru (CHOP-Luc) poskytl Dr. Pierre Fafournoux (Unite de Nutrition et Metabolisme Proteique, INRA de Theix, Saint Genes Champanelle, France) (Bruhat et al, 2000). Dominantní negativní (DN) PERK expresní vektor v pcDNA3 vektoru (DN-PERK) laskavě poskytla Dr. Annette C Dolphin (University College London, London, UK) (Page et al, 2004). DN-ATF4 vektor exprese poskytl Dr. Steve F Abcouwer (University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM, USA) (Roybal et al, 2004), zatímco DN-IRE1 vektor exprese poskytl Dr. David Ron (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine, New York, NY, USA) (Wang et al, 1998).

Analýzy buněčné viability (MTT)

Životaschopnost buňky byla určována následnými zpracováními popsanými v legendě, jak bylo popsáno dříve (Fan et al, 1998, 1999a). Pro zpracování siRNA byly subkonfluentní proliferující buňky byly transfektovány s BRCA1 nebo BRCA2 siRNA (50 nM x 72 h; viz níže) v 96 jamkové mikrotitrační destičce nebo simulovaně upravované (pouze s transfekčím činidlem), vystaveny různým dávkám I3C (nebo jen nosného media (DMSO)) na 24 h a poté zanalyzovány na MTT redukci. Pro pokusy s hyperexpresí byly buňky transfektovány přes noc s wtBRCA1 nebo wtBRCA2 expresními vektory (0.06 μg plazmidové DNA na 1 jamku), vymyty a postinkubovány po dalších 24 h, aby byla umožněna genová exprese, a to před expozicí I3C. Buněčná viabilita byla vyjádřena v porovnání s kontrolními buňkami vystavenými pouze DMSO (žádný I3C) jako průměr ±s.e.m. (standardní chyba průměru) z 10 replikačních jamek.

Knockdown BRCA1 nebo BRCA2 s použitím malých interferujících RNA kyselin (siRNAs)

BRCA1-siRNA a kontrolní (smíchaná sekvence) siRNA kyseliny byly popsány dříve (Xiong et al, 2003). Všechny siRNA kyseliny byly chemicky syntetizovány firmou Dharmacon, Inc. Pro zpracování s siRNA byly subkonfluentní proliferující buňky transfektovány s 50 nM siRNA za použití siPORT amino transfekčního činidla (Ambion). 72–hodinová inkubace se siRNA byla vyžadována jak pro BRCA1, tak pro BRCA2 pro dosažení maximální redukce hladiny proteinu. Předchozí studie ukázaly, že za těchto podmínek nezpůsobuje žádná ze siRNA kyselin cytotoxicitu, vztaženo na buněčnou morfologii a MTT analýzy. Sekvence používané k syntetizování siRNA kyselin jsou uvedeny níže:

BRCA1-siRNA 5'-AATGCCAAAGTAGCTAATGTA-3'
Kontrolní -siRNA 5'-CGATAGATACACAGATTGAAT-3'
BRCA2-siRNA 5'-AACTGAGCAAGCCTCAGTCAA-3'

Analýza transkripční aktivity estrogenního receptoru-α

Aktivita estrogenního receptoru-α byla měřena cestou transientních transfekčních analýz za použití estrogen-responsivního reportéru luciferázy (Fan et al, 1999b, 2001a). Stručně, subkonfluentní proliferující buňky byly kotransfektovány přes noc ve 24 jamkových titračních destičkách s „wild type“ ER-α expresním vektorem (pSG5-ER-α) a ERE-TK-Luc reportérem (0.25 μg v každém plazmidu na jamku), za přítomnosti Lipofectamine™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Jamky byly vymyty k odstranění zbývajícího plazmidu a Lipofectamine, ponechány několik hodin v izolaci a postinkubovány na 24 h v médiu bez fenolové červeni obsahujícím 2% fetální telecí sérum čištěné dřevěným uhlím s uvedenými látkami (17-β-estradiol (E2, 1 βM) a/nebo I3C a/nebo genistein). Dávky každé látky jsou uvedeny v obrázcích. Aktivita luciferázy byla určena a hodnoty byly vyjádřeny relativně vztaženo k pozitivní kontrole (+ E2, žádný I3C nebo genistein) jako průměry ±s.e.m. (standardní chyba průměru) tří nezávislých pokusů, podmínka každé analýzy byla testována opakovaně ve čtyřech jamkách na pokus. K monitorování transfekční efektivity byly buňky kotransfektovány s kontrolním plazmidem pRSV-β-gal k umožnění měření aktivity β-galaktosidázy.

Analýzy transkripční aktivity androgenního receptoru (AR)

Aktivita androgenního receptoru byla měřena cestou transientních transfekčních analýz za použití androgen-responsivního reportéru (ARE-TK-Luc).

Analýzy byly provedeny tak, jak je popsáno výše, kromě toho AR negativní PC buňky byly kotranfekovány „wild type“ lidským AR expresním vektorem (pSG5-AR) a buňky byly stimulovány DHT (10 μM) na 24 h opět za absence nebo přítomnosti přesně stanovených dávek I3C nebo genisteinu. Exprese aktivity luciferázy a počet opakovaných analýz byly stejné, jak je popsáno výše. Každý pokus byl opakován nejméně dvakrát k zajištění reprodukovatelnosti.

mRNA analýzy

mRNA exprese byla určena pečlivě kontrolovanými semikvantitativními RT-PCR analýzami. Pro každý zesílený (amplifikovaný) výsledek byly podmínky PCR reakce a počty cyklů individuálně nastaveny tak, že všechny reakce se udály v rámci lineárního rozsahu umocnění výsledku. Detailní metody RNA izolace, cDNA syntéz a RT-PCR analýz pro BRCA1, BRCA2 a β-aktin (kontrolní gen) byly popsány dříve (Fan et al, 1998, 1999a; Xiong et al, 2003). Pro AR PCR úvody byly jak následuje: 5'-TTTTCCCCCTCTTCCTT-3' (dopředu) a 5'- TCCTTTTTTCCAGCATAGACC-3' (zpět). PCR výsledky byly analyzovány elektroforézou v 0,8% agarózních gelech obsahujících 0.1mgml^{-1} ethidium bromid, gely byly fotografovány pod ultrafialovým světlem. Hladiny mRNA byly kvantifikovány denzitometrií cDNA pruhů a vyjádřeny relativně k β-aktinu. Byly provedeny nejméně dva nezávislé pokusy pro každý pozorovaný buněčný typ.

Proteinové analýzy

Produkty buněčné lýzy byly připraveny a **„**Western blotting**“** (oddělování proteinů elektroforézou) bylo provedeno tak, jak bylo popsáno dříve (Fan et al, 1998, 1999a). Stejné množství alikvotních částí z celkového buněčného proteinu (50 μg na pruh) bylo elektroforezováno na SDS-polyacrylamidových gradientních gelech, transferováno do nitrocelulosových membrán (Millipore, Billerica, MA, USA) a „blotted“ za použití těchto primárních protilátek: BRCA1 (C-20, polyklonální králičí, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 200); BRCA2 (C-19, Santa Cruz, 1 : 200) a aktinu (I-19, polyklonální kozí, Santa Cruz, 1 : 500). Proteinové pásy byly vizualizovány za použití zvýšeného chemiluminescenčního systému (Amersham) s barvenými indikátory (BioRad) jako molekulárními standardy velikosti. Proteinové pásy byly kvantitativně vyjádřeny pomocí denzitometrie a hodnoty byly vyjádřeny relativně k aktinu (kontrola obsahu a přenosu). Byly provedeny nejméně dva nezávislé pokusy pro každý sledovaný buněčný typ.

Statistická srovnání

Tam, kde to bylo patřičné, byla statistická srovnání experimentálních výsledků provedena za použití dvouvýběrového Studentova t-testu.

Výsledky

Indol-3-karbinol upreguluje BRCA1 a BRCA2 expresi v rakovinných buňkách prsu a prostaty

Dříve jsme ukázali, že I3C stimuluje BRCA expresi v lidských rakovinných buňkách děložního čípku a prsu (Meng et al, 2000a, b, 2001; Carter et al, 2002). V této studii jsme testovali efekt I3C na BRCA1 a BRCA2 expresi v rakovinných buňkách prsu a prostaty. Za použití přísně kontrolovaných semikvantitativních a denzitometrických analýz jsme zjistili, že dávka I3C (60 μM) s malou nebo žádnou cytotoxicitou způsobila časově závislé zvýšení hladin BRCA1 a BRCA2mRNA ve dvou buněčných rakoviných liních MCF-7 and T47D (obr. 1A and B). Hladiny BRCA1 byly zvýšeny v nejdříve testovaném časovém bodu (1 h), dosáhly přibližného maxima v průběhu 6-8 h a byly ještě zvýšeny za 48 h. Hladiny T47D, BRCA2 mRNA byly také zvýšeny v průběhu 1-2 h a zvýšení ptřetrvávalo po celou dobu experimentu. Buňky MCF-7 také vykazovaly silnou časově závislou indukci BRCA2 prostřednictvím I3C, ale konzistentně zvýšené hladiny BRCA2 mRNA byly pozorovány pouze za 6 h a později. Indol-3-karbinol způsobuje na dávce závislé zvýšení BRCA1 a BRCA2 mRNA (měřeno za 24 h) začínající na 20-40 μM (obr. 1C a D). V těchto pokusech byly evidentní malé nebo žádné změny v expresi kontrolního genu (β-aktinu).

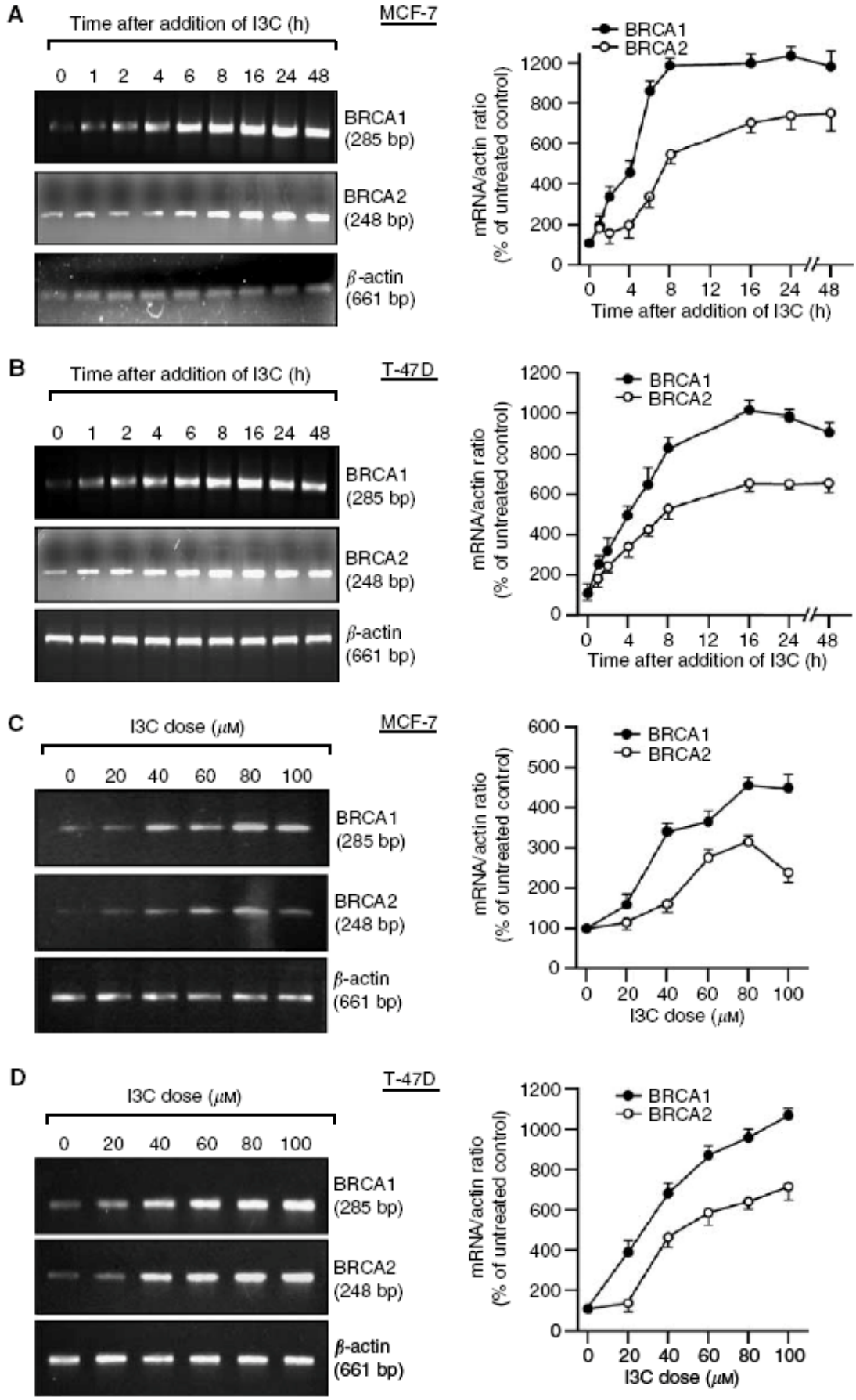
Testovali jsme efekt I3C na hladiny BRCA proteinu za použití „Western blotting“ s kvantifikací proteinových pruhů denzitometrií. Hladiny BRCA proteinu byly upregulovány prostřednictvím I3C v závislosti na čase a dávce v typu rakovinných buněk prsu (MCF-7 and T47D) a prostaty (LNCaP and DU-145) (obr. 2). Zvýšení hladin BRCA2 proteinu v rakovinných buňkách prsu bylo poprvé pozorováno po 4-8 h při I3C (6O μM), zatímco zvýšení hladin BRCA1 bylo detekováno dříve, ale jejich nárůst byl relativně nízký v časných fázích (obr. 2a a B). Studie dávka-odpověď MCF7 a T47D buněk ukázaly signifikatní indukci (>2násobně) hladin proteinu BRCA1 a BRCA2 pri nejnižší testované dávce I3C, 20 μM (obr. 2C a D.) Na obrázku 2C indukce proteinu BRCA2 není taková jako indukce mRNA (obr. 1C). Může to být díky nepřesnostem denzitometrického stanovení množství RT-PCR (speciálně pokud jsou pruhy slabé), díky faktu, že proteinové a mRNA pokusy byly prováděny v různých časech nebo díky faktu, že I3C měl možná dodatečný efekt na proteinovou stabilitu, což nemůžeme vyloučit.

Studie časového průběhu buněčných linií rakoviny prostaty ukázaly zpoždění v indukci BRCA2 s použitím I3C (první pozorováno v 6h) ve srovnání s BRCA1 (1h) (obr. 2E a F). Pokud jde o buňky rakoviny prsu, BRCA1 a BRCA2 hladiny byly zvýšeny prostřednictvím ≥ 2násobku nejnižší dávky I3C (20 μM) (obr. 2G a H). Ačkoliv se vyskytlo několik odlišností mezi jednotlivými buněčnými liniemi, tyto studie ukazují reprodukovatelnou indukci úrovní proteinu BRCA1 a BRCA2 prostřednictvím I3C s nárůsty hladin proteinu BRCA1 a BRCA2 v dávce I3C 60 μM za 24 h 5-10násobku pro buněčné linie rakoviny prsu a 8-16násobku pro buněčné linice rakoviny prostaty. Poznámka: Ve studiích ukázaných v obrázcích 1 a 2 jsou hodnoty denzitometrie průměry nejméně dvou nezávislých pokusů.

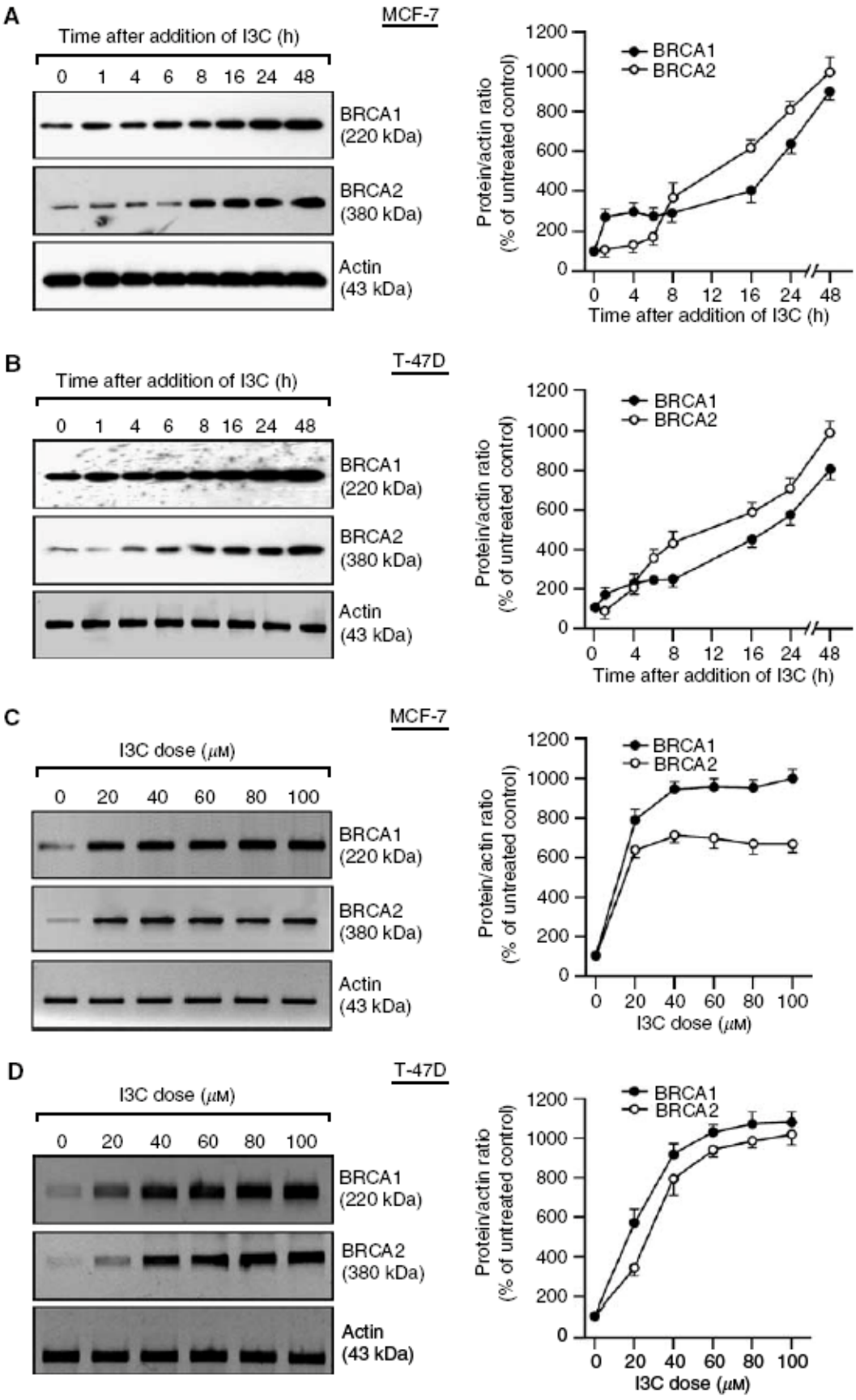
Genistein upreguluje expresi BRCA1 a BRCA2

Genistein je sójový izoflavon, který funguje částečně jako fytoestrogen a fytoandrogen (Wang et al, 1996; Maggiolini et al, 2002). Od té doby, co je genistein navrhován jako chemopreventivní činidlo pro několik typů tumorů včetně rakoviny prsu a prostaty, jsme testovali jeho schopnost indukovat expresi BRCA. Genistein způsobil na dávce a čase závislá zvýšení hladin BRCA1 a BRCA2 proteinů ve dvou estrogen-responsivních buněčných liniích rakoviny prsu (MCF-7 and T47D) (obr. 3D). Indukce BRCA 1 se objevila po 1 h od expozice genisteinu (5 μM), zatímco indukce BRCA2 byla zpožděna až do 6-8 h (obr. 3A a B). Pro obě buněčné linie byla zvýšení hladin BRCA1 >2násobně pozorována v nejnižší dávce testovaného genisteinu (0.5 μM), zatímco podobně silná zvýšení hladin BRCA2 vyžadovala vyšší dávky genisteinu (1-2.5 μM) (obr. 3C a D).

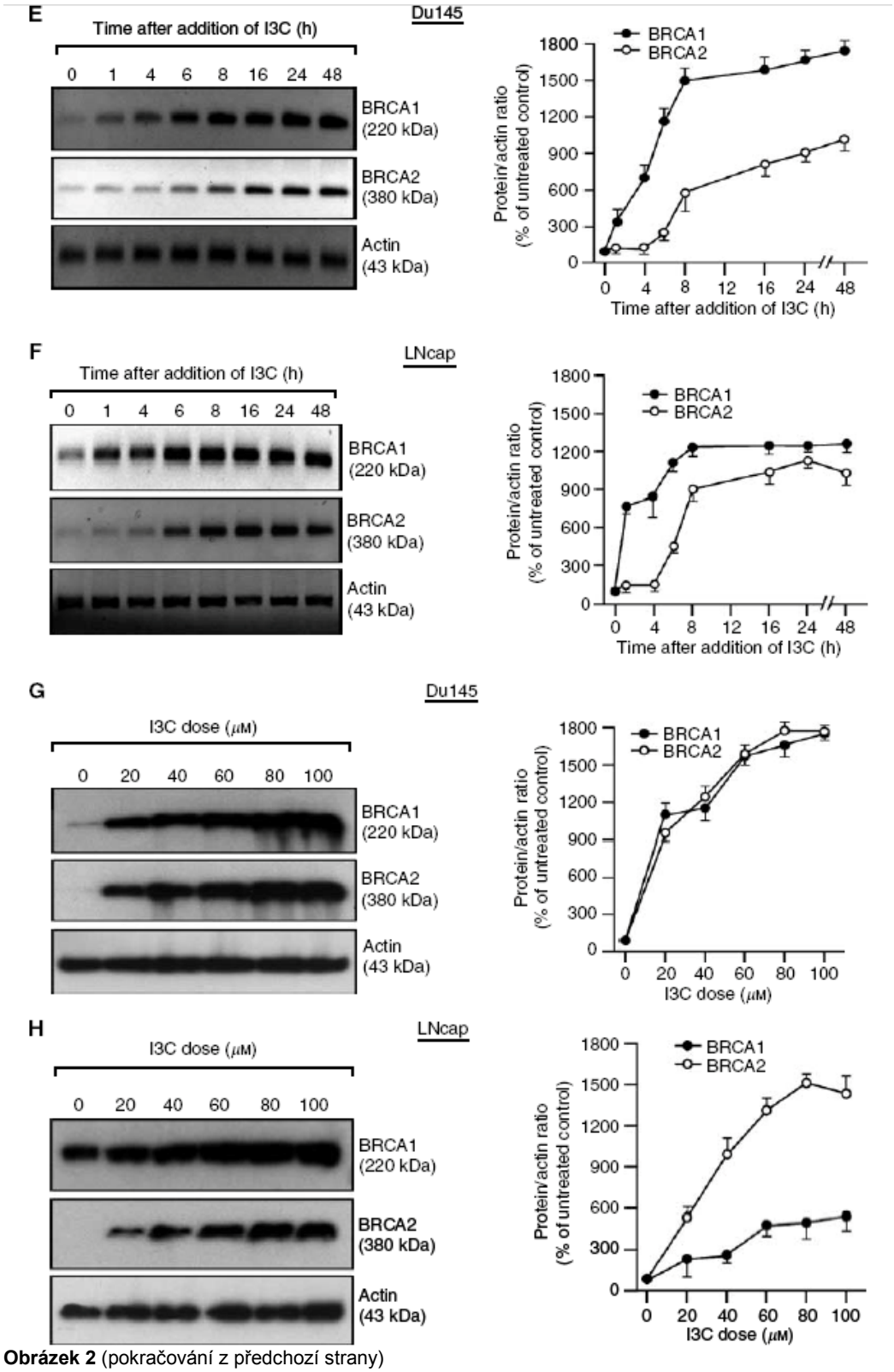
Genistein také způsobil na čase a dávce závislá zvýšení hladin BRCA v androgen-senzitivních (LNCaP) a nesenzitivních (DU-145) buňkách rakoviny prostaty. Pro tyto buněčné linie se zvýšení hladin BRCA1 ≥ 2násobně objevila za 1 h, zatímco podobná zvýšení hladin BRCA2 se objevila za 4-8 h (obr. 3E a F). Pokud bylo měřeno za 24 h, signifikatní zvýšení hladin BRCA1 vyžadovala dávky 0.5-1.0 μM, zatímco zvýšení hladin BRCA2 vyžadovala 2.5 μM genisteinu (obr. 3G a H). Zvýšení hladin BRCA po vystavení až 5 μM genisteinu byla v rozmezí 4-12násobně vyšší pro buňky rakoviny prsu a 5-17násobně vyšší pro rakovinné buňky prostaty. Hodnoty denzitometrie na obrázku 3 jsou průměry nejméně dvou nezávislých pokusů.



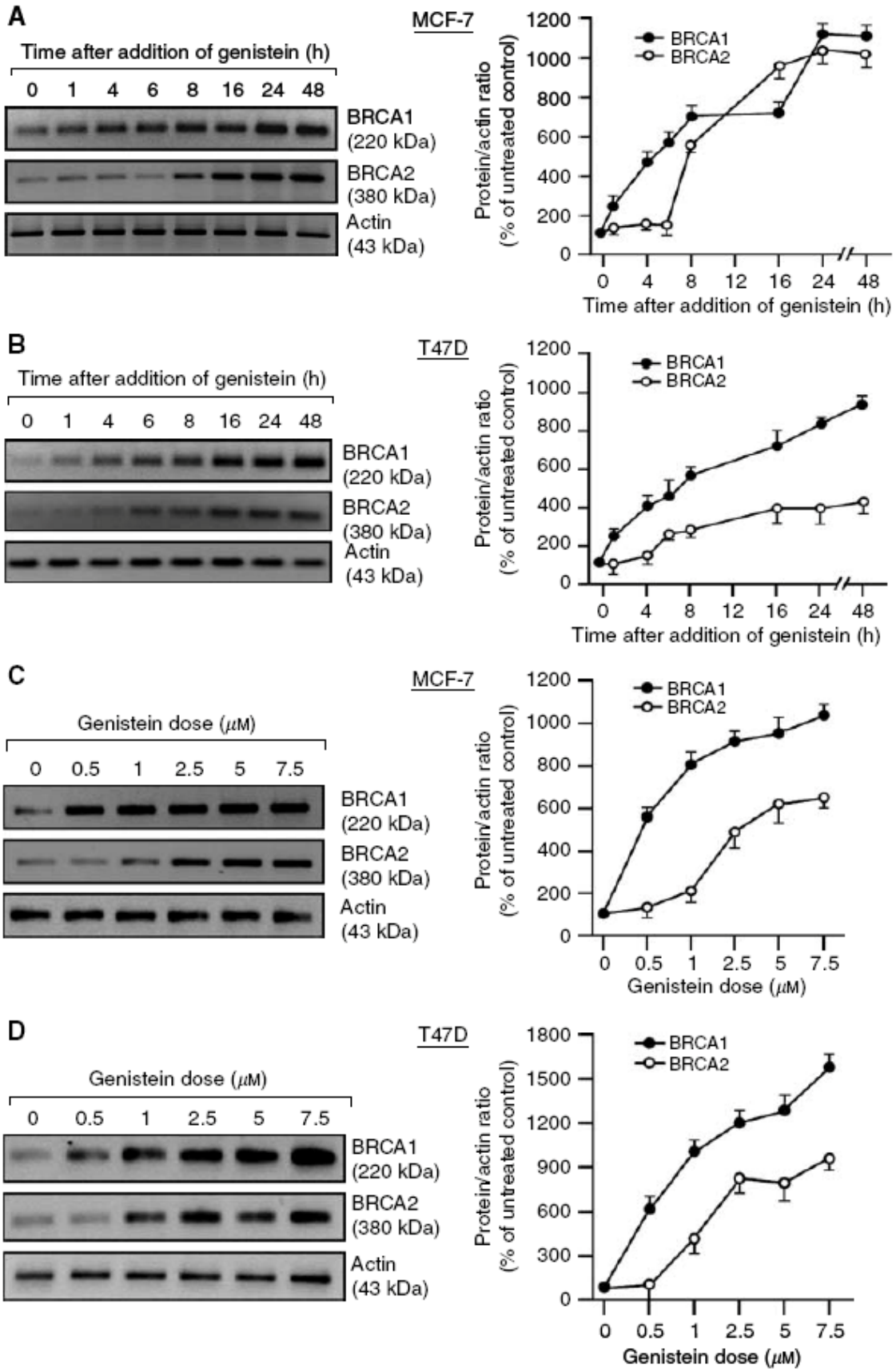
Obrázek 1
Indol-3-karbinol (I3C) upreguluje expresi BRCA1 a BRCA2mRNA v lidkých buňkách rakoviny prsu v závislosti na čase a dávce. Pro studie časového průběhu byly subkonfluentní proliferující MCF-7) (**A**) nebo T47D (**B**) buňky upraveny I3C (60 μM) pro různé časy a sesbírány pro mRNA analýzy semikvantitativní RT-PCR. Pro studie dávka-odpověď byly MCF-7) (**C**) nebo T47D (**D**) buňky upraveny různými dávkami I3C na 24 h a sesbírány pro mRNA analýzy. PCR pruhy byly kvantifikovány denzitometricky a vyjádřeny relativně ke kontrolnímu genu, β-aktinu. Hodnoty denzitometrie jsou průměry ±s.e.m. z nejméně dvou nezávislých pokusů.



Obrázek 2
Indol-3-karbinol upreguluje hladiny BRCA1 a BRCA2 proteinu v lidských buňkách rakoviny prsu a prostaty v závislosti na čase a dávce Pro studie časového průběhu byly subkonfluentní proliferující MCF-7 (**A**), T47D (**B**), DU-145 (**E**), a LNCaP (**F**) buňky upraveny s I3C (60 μM) po různé časy a sesbírány pro analýzy „Western blot" k detekci BRCA1, BRCA2 nebo proteinů aktinu (kontrola obsahu a přenos). Pro studie dávka-odpoěď byly MCF-7 (**C**), T47D (**D**), DU-145 (**G**), and LNCaP (**H**) buňky upraveny s indikovanou dávkou I3C na 24 h a poté proveden kvantitativní rozbor exprese proteinu BRCA1 a BRCA2. Proteinové pruhy byly kvantifikovány denzitometricky a vyjádřeny relativně k aktinu. Hodnoty denzitometrie jsou průměry ±s.e.m. z nejméně dvou nezávislých pokusů.



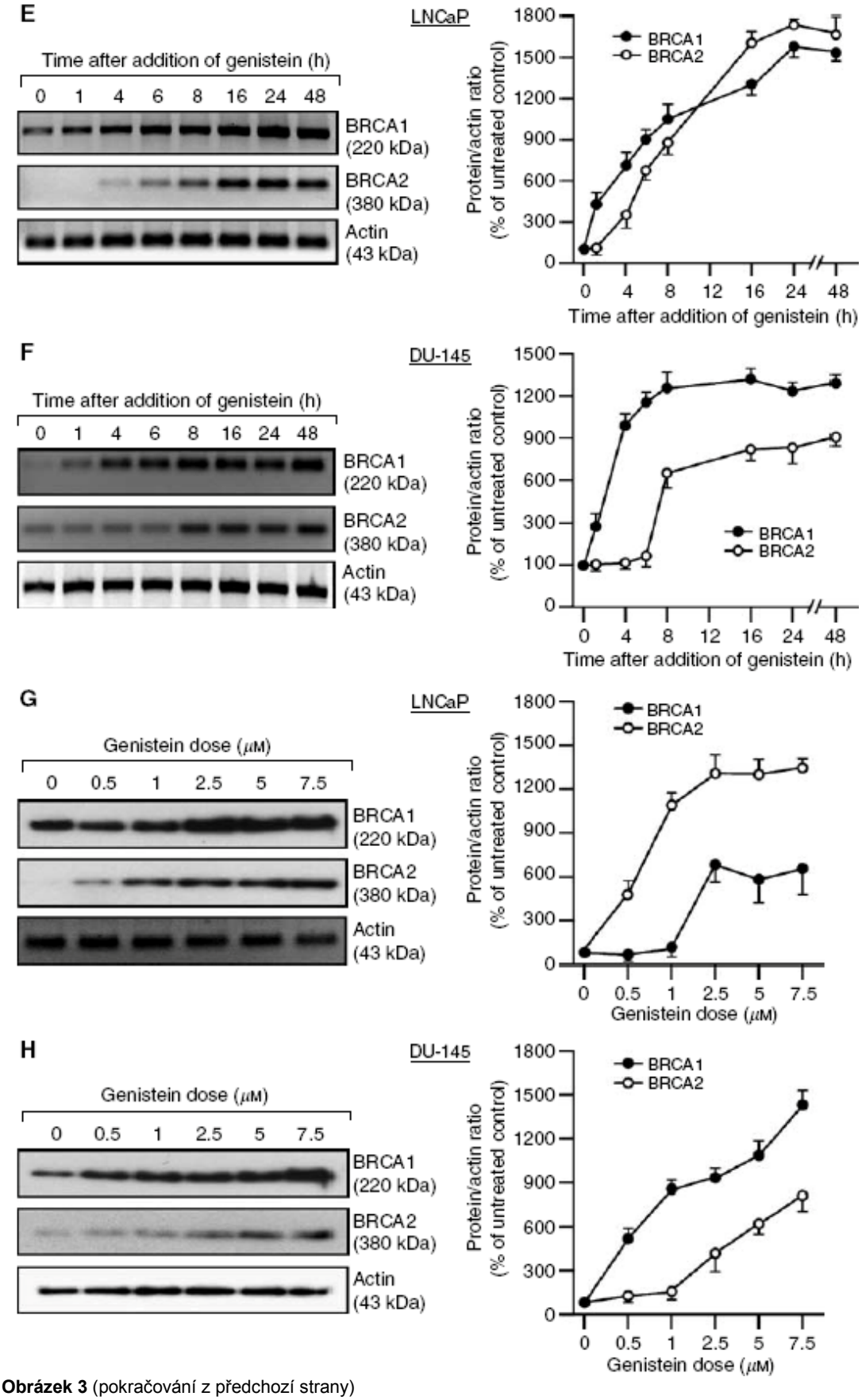
Obrázek 2 (pokračování z předchozí strany)



Obrázek 3
Genistein upreguluje hladiny proteinu BRCA1 a BRCA2 v buňkách rakoviny prsu. Pro studie časového průběhu byly subkonfluentní proliferující MCF-7 (**A**), T47D (**B**), DU-145 (**E**), a LNCaP (**F**) buňky upraveny s genisteinem (5 μM) pro indikované časy a sesbírány pro „western blotting" k detekci BRCA1, BRCA2 nebo proteinů aktinu. Pro studie dávka-odpověď byly MCF-7 (**C**), T47D (**D**), DU-145 (**G**) nebo LNCaP (**H**) buňky upraveny indikovanou dávkou I3C na 24 h a proveden kvantitativní rozbor, jak je popsáno výše. Hodnoty denzitometrie představují průměry ±s.e.m. z nejméně dvou nezávislých pokusů.

Role BRCA1 v indukci BRCA2 prostřednictvím I3C a genisteinu

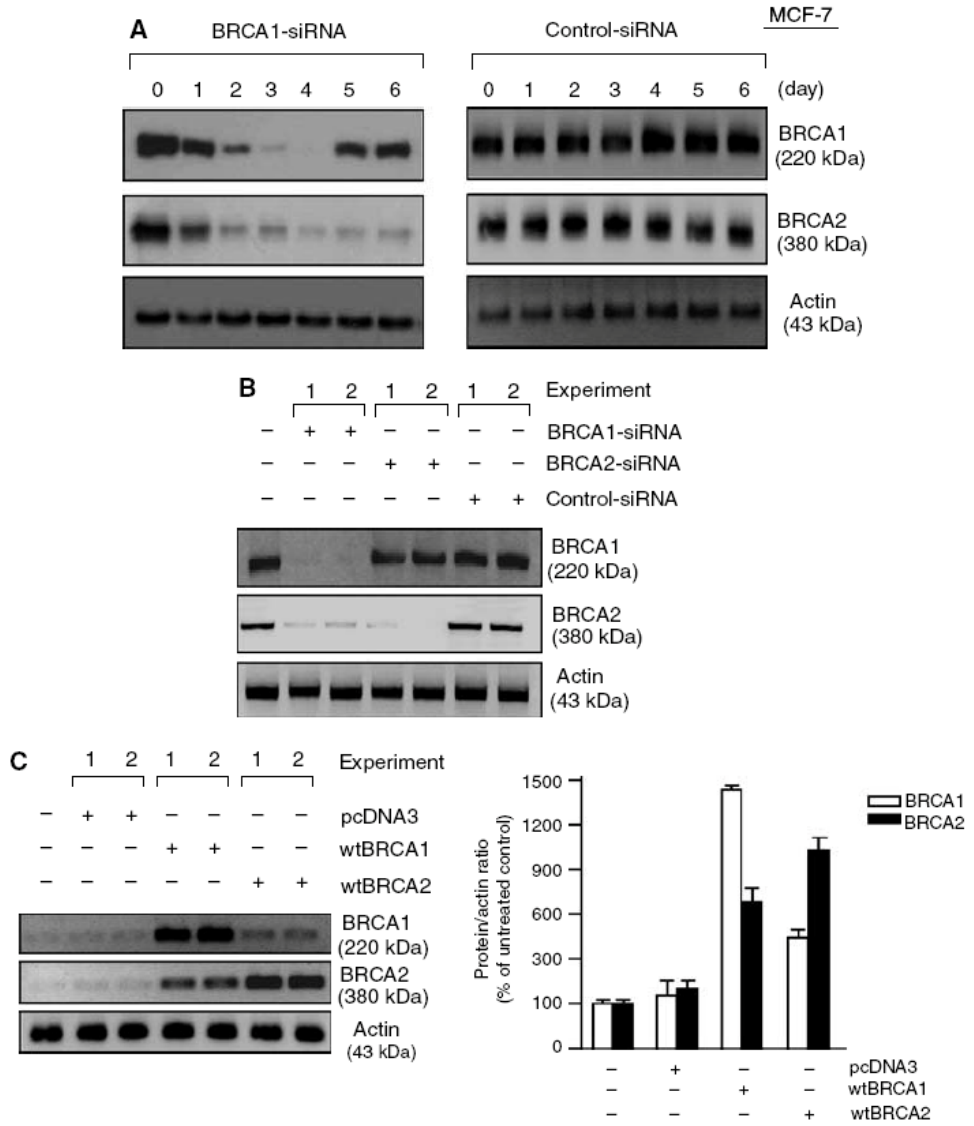
Několik faktorů ukazuje na to, že fytochemická indukce BRCA2 je částečně díky BRCA1. Tedy BRCA1 a BRCA2 jsou rovnocenně regulovány během růstu a během vývoje buněčného cyklu (Rajan et al, 1996, 1997) a exogenní BRCA1 upreguluje expresi BRCA2 buněčných kulturách (Fan et al, 1998). BRCA1 a BRCA2 jsou také koregulovány v odpovědi na DNA poškozující chemické látky a jiné cytotoxiny (Andres et al, 1998; Fan et al, 1999a). K přesnému stanovení úlohy BRCA1 v indukci BRCA2 jsme použili specifické BRCA1 a BRCA2 siRNA kyseliny. BRCA1-siRNA byla validována v předcházející studii (Xiong et al, 2003). Jak je znázorněno na obrázku 4, jednotlivá aplikace



Obrázek 3 (pokračování z předchozí strany)

50 nM BRCA1-siRNA způsobila snížení BRCA1 a BRCA2 proteinů během 48-72 h, zatímco kontrolní siRNA neměla žádný efekt na hladiny BRCA1 nebo BRCA2.

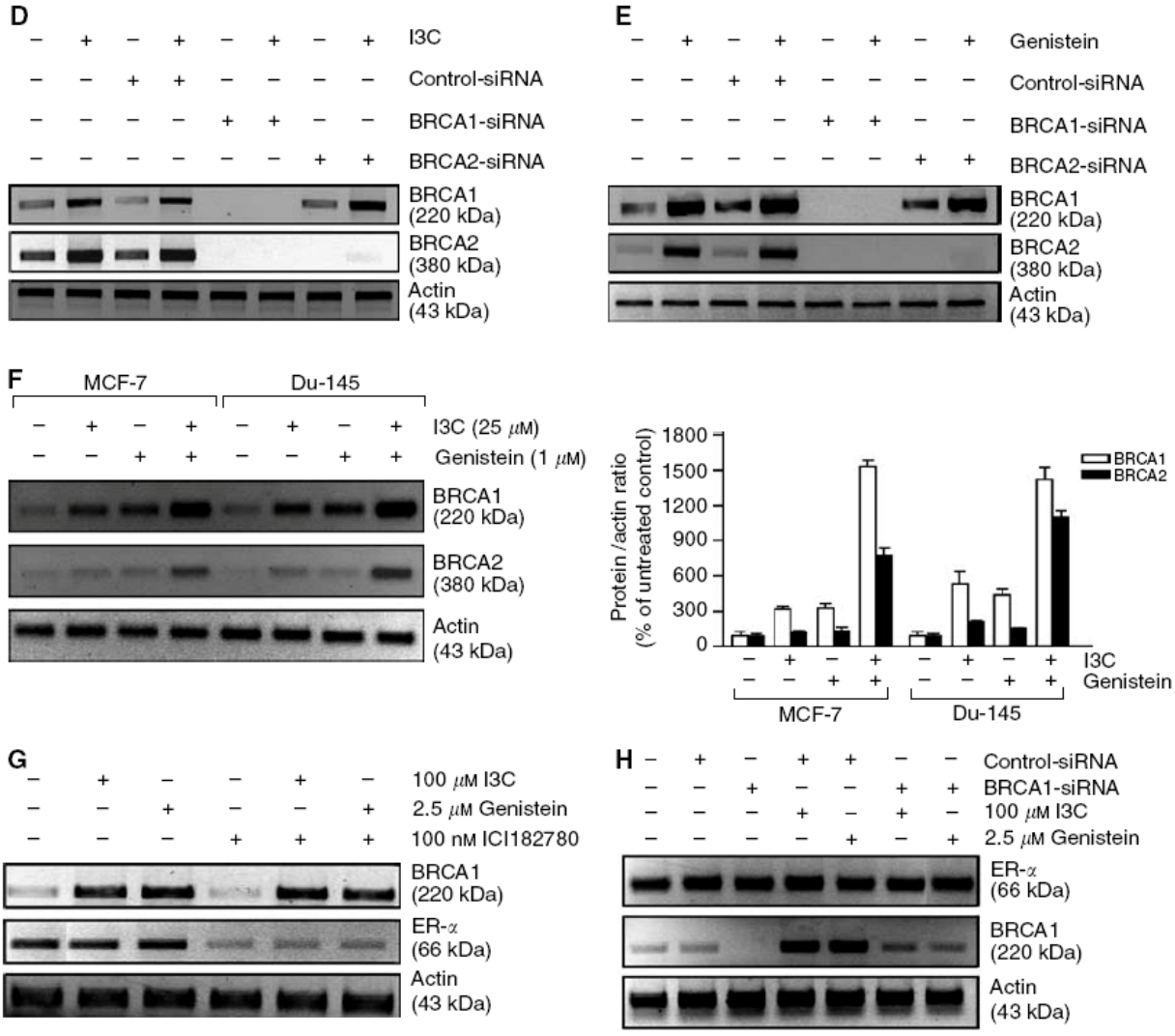
V souladu s těmito nálezy BRCA1-siRNA způsobila snížení BRCA1 a BRCA2 proteinů v DU-145 buňkách, ale opak nebyl pravdou (obr. 4B). Tedy BRCA2-siRNA způsobila snížení BRCA2 proteinu, ale BRCA1 nebyla ovlivněna nebo jen lehce snížena (obr. 4B). Kontrolní siRNA měla malý nebo žádný efekt na BRCA1 nebo BRCA2. Ve studiích overexprese způsobil „wild-type“ (wt) BRCA1 expresní vektor signifikantní indukci hladin BRCA2,



Obrázek 4

Závislost fytochemicky indukované exprese BRCA2 na BRCA1. (**A**) BRCA1-siRNA způsobuje časově závislé snížení BRCA1 a BRCA2 v MCF-7 buňkách. Subkonfluentní proliferující buňky byly upraveny s BRCA1-siRNA (vlevo) nebo kontrolní siRNA (vpravo) (50nM) po rozdílné časy, sesbírány a zanalyzovány „western blot" na BRCA1, BRCA2 a aktin. (**B**) Efekt BRCA1-siRNA na hladiny proteinu BRCA2 a naopak v DU-145 buňkách. Buňky byly upraveny s BRCA1, BRCA2 nebo kontrolní siRNA (50nM) po 72 h a „western blotted" pro BRCA1, BRCA2 a aktin. Výsledky jsou ukázány pro dvě různé buněčné úpravy a proteinové izolace ve stejném blot. (**C**) Působení wtBRCA1 na hladiny BRCA2 proteinu a obráceně v DU-145 buňkách. Buňky byly transfektovány přes noc s wtBRCA1, wtBRCA2 nebo prázdným pcDNA3 vektorem, vymyty, postinkubovány po 24 h k umožnění genové exprese, sesbírány a „Western blotted" pro BRCA1, BRCA2 a aktin. Výsledky jsou ukázány pro dvě různé buněčné úpravy a proteinové izolace ve stejném blot. Hodnoty denzitometrie jsou průměry ±rozmezích ze dvou pokusů. (**D**) Působení BRCA1 a BRCA2 si RNA kyselin na indukci BRCA prostřednictvím I3C. Buňky DU-145 byly preinkubovány s indikovanou siRNA (50nM x 72 h) nebo žádnou siRNA (transfekce jen činidlem), poté vystaveny I3C (40 μM) na 24 h a pak sesbírány pro „Western blotting". (**E**) Působení BRCA1 a BRCA2 siRNA na indukci BRCA1 a BRCA2 prostřednictvím genisteinu. DU-145 buňky byly preinkubovány indikovanou siRNA (50nM x 72 h), upraveny s genisteinem (5 μM) na 24 h a sesbírány pro „Western blotting" jako uvedeno výše. (**F**) Indukce BRCA1 a BRCA2 prostřednictvím kombinace I3C a genisteinu. MCF-7 nebo DU-145 buňky byly upraveny nízkými dávkami I3C (25 μM) a/nebo genisteinu (1 μM) na 24 h a sesbírány pro „Western blotting". Hodnoty denzitometrie jsou průměry ±rozmezích ze dvou nezávislých pokusů. (**G**) Působení ICI182,780 na fytochemickou indukci BRCA1 v MCF-7 buňkách. Proliferující buňky byly inkubovány s indikovaným činidlem na 24 h a poté sesbírány pro „Western blotting" na BRCA1, ER-α nebo aktin. (**H**) Působení knockdownu BRCA1 a fytolátek na hladiny ER-α proteinu. MCF-7 buňky byly předběžně upraveny s BRCA1 nebo kontrolní siRNA , jak je popsáno výše, vystaveny indikovaným dávkám I3C nebo genisteinu po 24 h a poté „Western blotedt" pro ER-α, BRCA1 nebo aktin.

zatímco wtBRCA2 způsobil mnohem mírnější vzestup hladin BRCA2 (obr. 4C). Dále jsme testovali úlohu BRCA1 v indukci hladin BRCA2 prostřednictvím I3C a genisteinu. V DU-145 buňkách předběžně pravených s BRCA1-siRNA bylo málo nebo nedetekovatelně BRCA2 v buňkách kontrolních, upravených I3C nebo genisteinem (obr. 4D a E, v tomto pořadí) V buňkách upravených s BRCA2-siRNA byla BRCA2 téměř nedetekovatelná v kontrolních a fytolátkami upravených buňkách. Nicméně BRCA1 byla signifikantně indukována prostřednictvím jak I3C, tak i genisteinu. Kontrolní siRNA neměla žádný efekt na expresi nebo indukci proteinů BRCA. Tyto nálezy naznačují, že indukce BRCA2 pomocí fytolátek je částečně závislá na BRCA1, ale ne obráceně.



Obrázek 4 (pokračování z předchozí strany)

Kombinace I3C a genisteinu

Testovali jsme působení kombinace nízkých dávek I3C (25 μM) a genisteinu (1 μM) na hladiny BRCA proteinu v MCF-7 a DU-145 buňkách. Kombinace (I3C + genistein) měla větší efekt na indukci BRCA než kterákoliv z látek samotná (obr. 4). Tyto efekty se zdály být supraaditivní nebo synergistické pro BRCA1 v MCF-7 buňkách a pro BRCA2 v obou buněčných typech, ačkoliv jsme neprovedli studie za použití rozsahu rozdílných dávek. Tedy 1 μM genisteinu sám způsobuje jen nepatrné zvýšení hladin BRCA2, ale kombinace (I3C + genistein) způsobila mnohem větší zvýšení hladin BRCA2 než I3C sám.

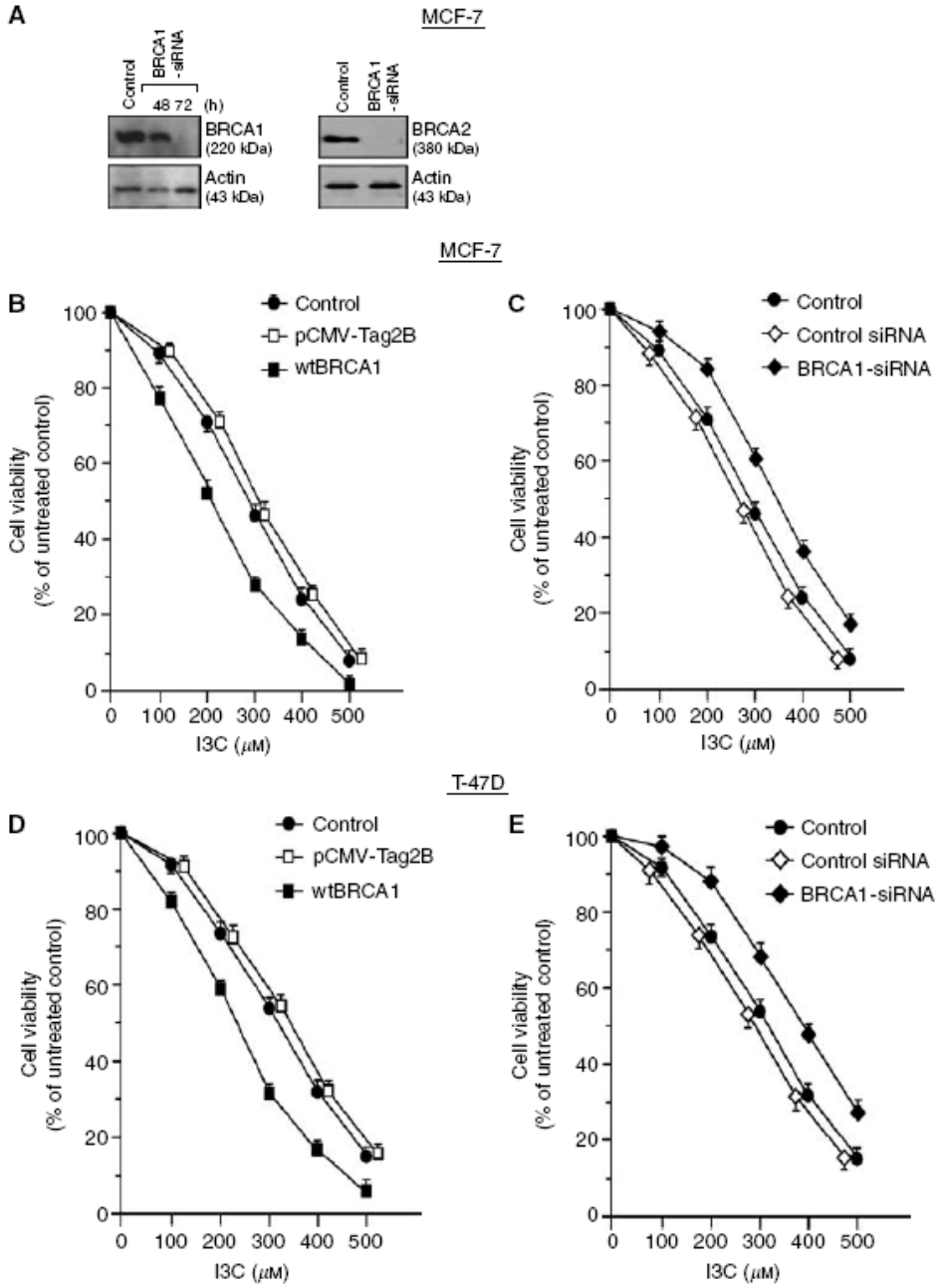
Efekt inhibice ER-α na BRCA1 expresi

Ke zjištění, zda ER-α může hrát roli v indukci BRCA1 prostřednictvím fytolátek, byly MCF-7 buňky upraveny s I3C nebo genisteinem bez nebo v přítomnosti ICI182,780 (Fulvestrant), antiestrogenu, který způsobuje rozpad ER-α. V této studii ICI182,780 způsobil ztrátu ER-α proteinu, ale neměl žádný efekt na schopnost I3C nebo genisteinu indukovat BRCA1 protein (obr. 4G). Jak je zobrazeno na obrázku 4H, ani BRCA1-siRNA, ani I3C, ani genistein neměli hladiny ER-α proteinu v MCF-7 buňkách. Vzato dohromady s nálezy, že I3C a genistein mohou indukovat BRCA expresi v ER-α negativních buněčných typech (např. DU-145), tyto výsledky naznačují, že indukce BRCA exprese prostřednictvím fytolátek není zprostředkována estrogenním receptorem.

Úloha BRCA1 ve zprostředkování některých biologických pochodů I3C a genisteinu

Zatímco je jasné, že I3C a genistein indukují expresi BRCA genu v lidských rakovinných buňkách, role BRCA genů ve zprostředkovávání biologických odpovědí na tyto fytolátky není prokázána. Testovali jsme tyto úlohy za použití BRCA1 a BRCA2 siRNA a jiných reagencií.

Cytotoxicita Při vysokých dávkách (≥ 100 μM) I3C způsobuje cytotoxicitu a apoptózu v rakovinných buněčných liniích (Chen et al, 2001; Chinni et al, 2001; Rahman et al, 2003; Sarkar et al, 2003). Exogenní BRCA1 způsobuje zvýšenou náchylnost k apoptóze díky DNA poškozujícím látkám (např. adriamycin), ačkoliv wtBRCA1 neindukuje apoptózu sám (Fan et al, 1998, 2001b). Testovali jsme efekt hladin zpracovávaných BRCA na I3C cytotoxicitu užitím MTT analýz. Obrázek 5 ukazuje schopnost BRCA1-siRNA a BRCA2-siRNA redukovat hladiny proteinu BRCA1 a BRCA2 jednotlivě po dobu 48-72 h. Ve třech odlišných buněčných liniích (MCF-7, T47D, a DU-145) jsme zjistili, že BRCA1-siRNA chránila buňky proti I3C cytotoxicitě (obr. 5C, E a G). Buňky upravované s BRCA-siRNA obvykle vykazovaly stupeň přežití přibližně 15±5% vyšší než kontrolní buňky upravované s siRNA



Obrázek 5

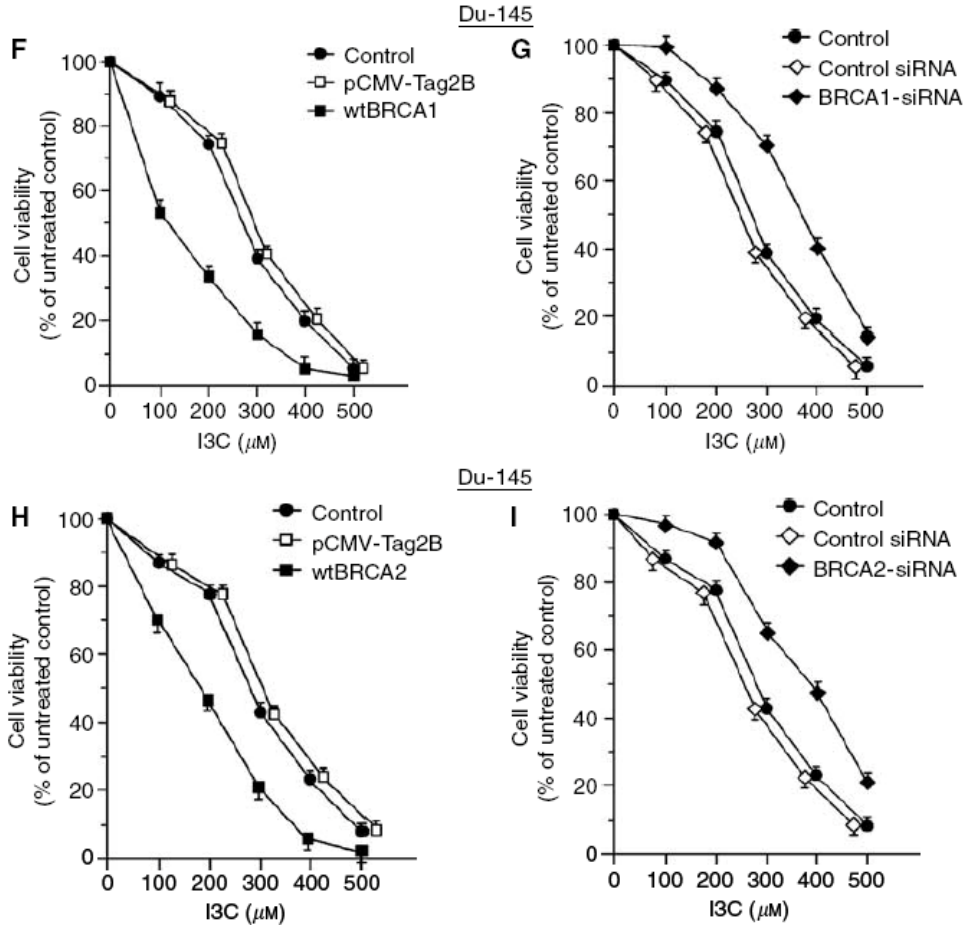
Přispění BRCA1 a BRCA2 k cytotoxicitě zprostředkované I3C. (**A**) Účinky BRCA1-siRNA (48 a 72 h) a BRCA2-siRNA (72 h) (50 nM) na hladiny proteinu BRCA1 a BRCA2 jednotlivě v MCF-7 buňkách. MCF-7 (**B** a **C**), T47D (**D** a **E**) a DU-145 (**F** a **G**) buňky byly experimentálně manipulovány ke zvýšení (wtBRCA1) nebo snížení (BRCA1-siRNA) hladin BRCA1, vystaveny rozdílným dávkám I3C a testovány na viabilitu buněk za použití MTT analýz. V (**H**) a (**I**) byly buňky manipulovány ke zvýšení (wtBRCA2) nebo snížení (BRCA2-siRNA) hladin BRCA2, vystaveny různým dávkám I3C a testovány na viabilitu buněk za použití MTT analýz. *Metodologie* (**B**-**I**). Ke vzýšení hladin BRCA1 byly subkonfluentní buňky transfektovány s wtBRCA v 96 jamkové titrační destičce přes noc (podívej na Materiály a Metody), vymyty, postinkubovány po 24 h, vystaveny různým dávkám I3C po 24 h a zanalyzovány pro MTT redukci. Ke zvýšení hladin BRCA1 byly buňky předem upraveny s BRCA1 nebo kontrolní siRNA (50 nM x 72 h) nebo simulovaně transfektovány (kontrolní) a zanalyzovány na citlivost k I3C, jak je popsáno výše. Pro BRCA2 pokusy byly buňky DU-145 transfektovány s wtBRCA2 nebo upraveny s BRCA2 nebo kontrolní siRNA (jak je popsáno výše) a zanalyzovány, jak je popsáno výše, na citlivost k I3C. Hodnoty buněčné viability jsou vyjádřeny relativně k 0 I3C kontrole a jsou průměry ±s.e.m. pro 10 zdvojených jamek. *Statistická srovnání* Srovnání buněčné viability byla provedena za použití dvouvýběrových t-testů. . Signifikatní rozdíly byly následující: MCF-7 wtBRCA1 vs kontrolní, *P*<0.001 v 100–400 μM I3C; MCF-7 BRCA1-siRNA vs kontrolní, *P*<0.001 v 200–500 μM I3C; T47D wtBRCA1 vs kontroní, *P*<0.001 v 100–500 μM I3C; T47D BRCA1-siRNA vs kontrolní, *P*<0.001 v 200–500 μM I3C; DU-145 wtBRCA1 vs kontrolní, *P*<0.001 v 100–400 μM I3C; DU-145
BRCA1-siRNA vs kontrolní, *P*<0.001 v 100–500 μM I3C; DU-145 wtBRCA1 vs kontrolní, *P*<0.001, 100–400 μM I3C; a DU-145 BRCA2-siRNA vs kontrolní, *P*<0.001 v 200–500 μM I3C.

(*P*<0.001, dvouvýběrové t-testy), ačkoliv míra ochrany prostřednictvím BRCA1-siRNA byla větší pro DU-145 buňky v 300-400 μM I3C (21-32%). Na rozdíl buňky transfektované genem wtBRCA1 byly více sensitivní k I3C než kontrolní buňky (*P*<0.001) (obr. 5B, D a F). V 200-400 μM I3C, MCF-7 a T47D buňky transfektované s

wtBRCA1 vykazovaly míru přežití přibližně 15-20% nižší než kontrolně transfektované buňky, kdežto wtBRCA1 transfektované buňky DU-1456 vykazovaly 15-40% nižší přežití než kontrolně transfektované buňky v 100-400 μM I3C. Tyto nálezy naznačují, že BRCA1 modifikuje cytotoxicitu I3C a že endogenní BRCA1 přispívá k cytotoxicitě I3C.

Vzhledem k tomu, že BRCA1-siRNA downreguluje hladiny BRCA2, testovali jsme schopnost BRCA2 modifikovat sensitivitu k vyšším dávkám I3C. Stejně jak bylo pravdou pro BRCA1, expresní vektor wtBRCA2-siRNA sensitivoval DU-145 buňky k I3C (obr. 5H), zatímco BRCA2-siRNA prokázala snížení sensitivity k I3C (P<0.001 ve všech dávkách) (obr. 5I). Vzato dohromady s předcházejícími výsledky, tyto nálezy naznačují, že 1) oba BRCA geny modifikují buněčnou sensitivitu k I3C a 2) modifikace sensitivity k I3C prostřednictvím BRCA1 je částečně závislá na změnách hladin BRCA2.

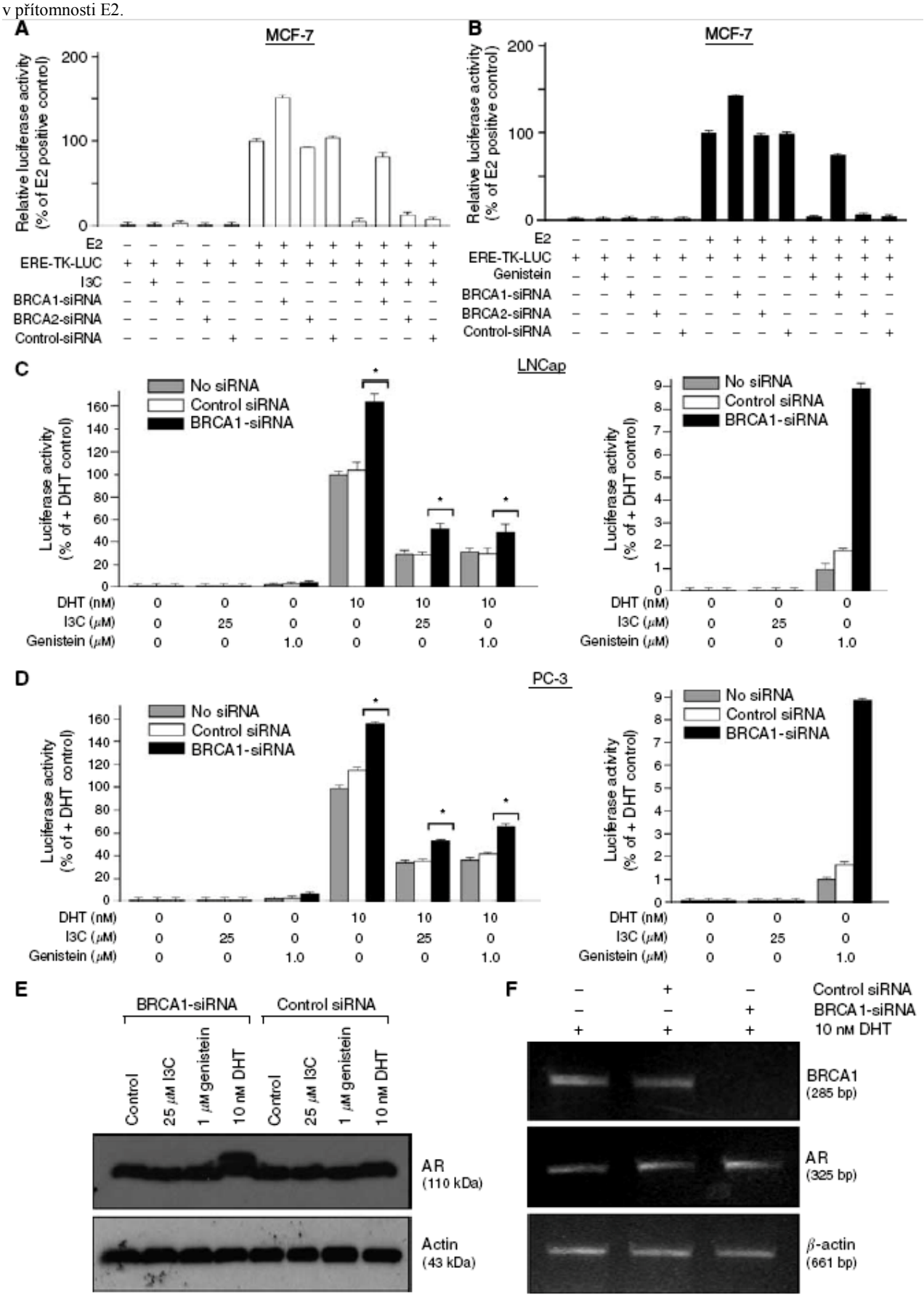
Signální estrogenní receptor-α Prokázali jsme, že I3C způsobuje na dávce závislou inhibici estradiolem (E2) stimulované ER-α aktivity v rakovinných buňkách děložního čípku a prsu užitím E2-responsivního reportéru (ERE-TK-Luc), testováním efektu I3C na expresi endogenních E2-responsivních genů (Meng et al, 2000b). Jelikož wtBRCA1 silně inhibije signální ER-α (Fan



Obrázek 5 (pokračování z předchozí strany)

Obrázek 6 (následující strana)
Přispění BRCA genů k regulaci ER-α a AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu. (**A**) Záchrana I3C inhibice E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím BRCA1-siRNA. MCF-7 buňky byly předem upraveny s BRCA1-siRNA, BRCA2-siRNA, kontrolní siRNA (50 nM x 72 h) nebo bez siRNA (jenom vehikulum). Po prvních 48 h zpracováním se siRNA byly transfektovány s ERE-TK-Luc reportérem přes noc, vymyty, postinkubovány ±17β-estradiolem (E2, 1 μM) a ±I3C (100 μM) na 24 h a testovány na aktivitu luciferázy. Hodnoty jsou vyjádřeny relativně k +E2 pozitivní kontrole (žádná siRNA, žádný I3C) a jsou průměrem ±s.e.m. ze tří nezávislých pokusů. V každém pokusu byla každá podmínka analýzy testována ve čtyřech zdvojených jamkách a hodnoty byly zprůměrovány. BRCA1 (ale ne BRCA2 nebo kontrolní) siRNA zajistila inhibici E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím I3C (P<0.001). (**B**) Záchrana inhibice genisteinu E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím BRCA1-siRNA. Pokus byl proveden tak, jak je popsáno výše, kromě toho, že buňky byly vystaveny ±genisteinu (5 μM) namísto I3C. Hodnoty luciferázy jsou vyjáddřeny relativně k + E2 pozitivní kontrole (žádná siRNA, žádný genistein) a jsou průměrem ±s.e.m. ze tří nezávislých pokusů, při každém pokusu každá podmínka eseje byla testována ve čtyřech zdvojených jamkách. BRCA1 (ale ne BRCA2 nebo kontrolní) siRNA zajišťovala inhibici E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím genisteinu (P<0.001). (**C**, **D**) Příspěvek BRCA1 k inhibici DHT stimulované AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu. LNCaP (**C**) nebo PC-3 (**D**) buňky byly předem upraveny s wtBRCA1-siRNA, kontrolní siRNA (50 nM x 72 h) nebo žádnou siRNA. LNCaP buňky, které jsou AR positivní, byly transfektovány s androgen-responsivním reportérem (ARE-TK-Luc), zatímco PC-3 buňky, které jsou AR negativní, byly kontransfektovány s AR vektorem exprese plus ARE-TK-Luc. Buňky byly upraveny s dihydrotestosteronem (DHT, 10 nM), I3C (25 μM a/nebo genisteinem (1.0 μM) na 24 h a zanalyzovány na aktivitu luciferázy. BRCA1-siRNA zvýšila DHT stimulovanou AR aktivitu a částečně zachránila inhibici AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu (levé skupiny). Hvězdičky ukazují signifikantní srovnání (P<0.01). (**E**) Efekt BRCA1-siRNA a fytolátek na hladiny AR proteinu v LNCaP buňkách. Buňky byly předem upraveny s BRCA1 nebo kontrolní siRNA a poté upraven\ s I3C, genisteinem nebo DHT, jak je popsáno v (**C**). Buňky byly pak sesbírány a Western blottted na AR nebo aktin. (**F**) Efekt BRCA1-siRNA na hladiny ARmRNA. LNCaP buňky byly předem upraveny s BRCA1 nebo kontrolní siRNA, upraveny s DHT na 24 h a sesbírány na semikvantitativní RT-PCR k detekci BRCA1, AR nebo β-aktinu.

et al, 1999b), předpokládali jsme, že BRCA1 by mohl přispívat k inhibici ER-α aktivity prostřednictvím I3C. Tudíž jsme provedli kvantitativní rozbor efektů BRCAsiRNA kyyselin na schopnost I3C a genisteinu inhibovat E2 stimulovanou ER-α aktivitu (obr. 6). Zatímco genistein je nazýván „fytoestrogen“, protože má slabou estrogenní aktivitu při absenci E2, funguje jako inhibitor ER-α v přítomnosti E2.



Obrázek 6 (pokračování z předchozí strany)

Tedy genistein způsobuje na dávce závislou inhibici E2 stimulované ER-α aktivity v MCF-7 buňkách (data nejsou ukázána). V této studii jsme nesledovali pro estrogenní efekty genisteinu. Nicméně jsme speciálně netestovali podmínky, které by takové efekty vyvolaly.

Obrázek 6A ukazuje efekt předem zpracování s BRCAsiRNA kyselinami na inhibici E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím I3C. Tato data jsou průměry ±s.e.m. ze tří nezávislých pokusů. BRCA1 (ale ne BRCA2) siRNA způsobila mírné zvýšení v E2 stimulované ER-α aktivitě. V podmínkách, ve kterých I3C způsobil >90% inhibici ER-α aktivity, předem zpracování s BRCA1-siRNA (ale ne BRCA2 nebo kontrolní siRNA) značně obnovilo E2 stimulovanou ER-α aktivitu (P<0.001, dvouvýběrový t-test). Podobné výsledky byly dosaženy použitím genisteinu (obr. 6B). Tedy BRCA1 (ale ne BRCA2 nebo kontrolní) siRNA signifikantně změnily genisteinem zprostředkovanou inhibici E2 stimulované ER-α aktivity (P<0.001). Dříve jsme identifikovali N-terminální fragment BRCA1 proteinu (amino kyseliny 1-302), který fungoval jako DN inhibitor full-length wild-type BRCA1 a „chrání“ wtBRCA1 zprostředkovanou inhibici ER-α aktivity (Fan et al, 2001a, b). V této studii jsme zjistili, že transientní transfekce BRCA1 amino kyseliny 1-302 vektoru exprese (DN-BRCA1) částečně chrání inhibici E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím samotného I3C, samotného genisteinu nebo kombinací I3C + genistein (P<0.001) (data nejsou ukázána). Tyto nálezy naznačují, že inhibice E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu je částečně díky BRCA1.

AR signálování Oba, I3C i genistein, mohou vzájemně reagovat s AR a modifikovat ho. Tedy I3C je AR antagonista (Le et al, 2003), zatímco genistein může aktivovat AR v absenci ligand, ale inhibovat DHT-indukovanou AR aktivitu (Maggiolini et al, 2002). Testovali jsme roli BRCA1 ve zprostředkování efektů nízkých dávek I3C (25 μM) nebo genisteinu (1 μM) na signální AR. Studovali jsme LNCaP buňky (androgen-responsivní buněčná linie) za použití jejich endogenního AR a PC-3 (androgen nesensitivní buněčná linie) za použití transientně exprimovaného „wild type“ AR. Konzistentně s publikovanými nálezy genistein (ale ne I3C) způsobil mírnou aktivaci adrogen-responsivního reportéru (ARE-TK-Luc) při absenci DHT (obr. 6C a D, pravé sloupce), zatímco oba, jak I3C, tak genistein, způsobily inhibici DHT stimulované AR aktivity (P<0.001) (obr. 6C a D, levé sloupce). Zajímavě, předem zpracování s BRCA1-siRNA způsobilo zvýšení DHT stimulované AR aktivity (relativně ke kontrolní siRNA nebo buňkám zpravovaným vehikulem) při absenci I3C nebo genisteinu a částečně chránilo inhibici AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu (P<0.01). Podobné výsledky byly pozorovány v LNCaP a PC-3 buňkách. Předem zpracování s BRCA1-siRNA způsobilo zvýšení hladin AR proteinu v buňkách upravených s DHT, kdežto BRCA1-siRNA sama a kontrolní siRNA při absenci nebo přítomnosti DHT měla malý nebo žádný efekt na AR hladiny (obr. 6E). Naproti tomu BRCA1-siRNA neměla žádný efekt na hladiny ARmRNA při přítomnosti DHT (obr. 6F). Důsledky těchto nálezů jsou zváženy v Diskusi.

Role stresu endoplazmatického retikula v indukci BRCA exprese

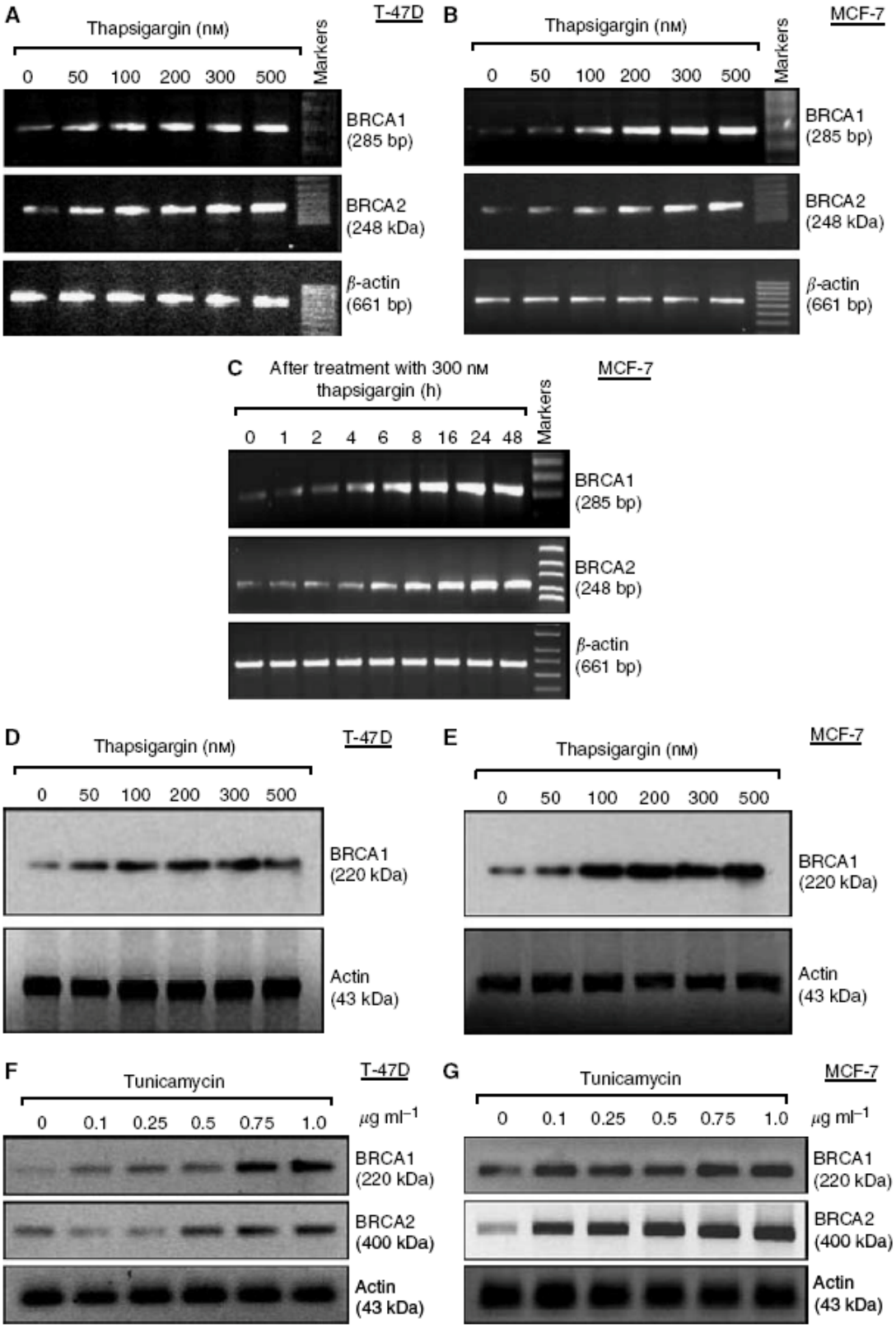
Látky, které způsobují stres endoplazmatického retikula indkují BRCA expresi Nedávná studie ukázala, že DIM, hlavní metabolit I3C, způsobuje stresu podobnou odpověď endoplazmatického retikula, podobně jako rozprostřený protein reaguje v kvasnicích (Sun et al, 2004). Diindolylmetan způsobuje fosforylaci eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2α (EIF2A) vedoucí ke zvýšení hladin ATF4 proteinu, aktivaci IRE1 (homolog inositol-requiring 1) a rapidní zvýšení ve stres specifické sestřižené („spliced“) formě XBP-1mRNA a indukci mnoha stres-responsivních genech, včetně CHOP (nebo GADD153), GADD34, GADD45A, XBP-1, GRP78, a GRP94 (Carter et al, 2002; Sun et al, 2004). V této studii jsme testovali schopnost dvou činidel známých tím, že způsobují stresovou odpověď endoplazmatického retikula k indukci BRCA exprese. Inkubace T47D nebo MCF buněk s thapsigarginem, selektivním inhibitorem endoplazmatického retikula Ca^{+} dependentní ATP-ázy**,** způsobila indukci BRCA1 a BRCA2 mRNA exprese v závisloti na dávce a čase (obr. 7A-C). Indukce obou BRCA genů se objevila po 24 h inkubaci s dávkami thapsigarginu nízkými pouze 50-100 nM (obr. 7A a B), zatímco studie časového průběhu ukázala, že BRCA1mRNA byla thapsigarginem (300 nM) indukována po 4-6 h, s BRCA2mRNA indukcí objevující se lehce později (obr. 7C). MTT analýzy neodhalily žádnou toxicitu v thapsigarginových dávkách ≤300 nM (data nejsou ukázána). „Western blotting“ odhalil indukci BRCA1 proteinu v T47D a MCF-7 buňkách v 50-100 nM thapsigarginu (obr. 7D a E).

Také jsme viděli na dávce závislou indukci BRCA1 a BRCA2 proteinů prostřednictvím tunicamycinu (obr. 7F a G), látky, která způsobuje stresovou odpověď endoplazmatického retikula inhibicí proteinové glykosylace. Tyto nálezy svědčí o tom, že aktivace stresové odpovědi endoplazmatického retikula dvěma odlišnými látkami uppreguluje expresi BRCA1 a BRCA2.

Stres-responsivní ER kináza PERK je nezbytná pro indukci BRCA1 prostřednictvím I3C Testovali jsme úlohu několika signálních stresových proteinů endoplazmatického retikula v I3C indukci BRCA1 a BRCA2 za použití DN expresního vektorů. PERK (EIF2AK3) je kináza, která fosforyluje EIF2A v odpovědi na stres endoplazmatického retikula, zapřičiňující inhibici proteinové syntézy spojené s akumulací ATF4 proteinu (Rutkowski and Kaufman, 2003). Transfekce DN-PERK blokuje schopnost I3C (100 μM) indukovat hladiny obou proteinů BRCA1 a BRCA2 (obr. 8A). Nicméně DN-ATF4 vektor byl neúspěšný inhibovat expresi BRCA1 a BRCA2 indukovanou I3C (obr. 8B). Na závěr jsme testovali úlohu IRE1 (homolog z kvasnic inositol-reguiring 1) – kinázu lokalizovanou v membráně endoplazmatického retikula a endoribonukleázu, která je aktivována při odpovědi na stres (Shen et al, 2001) – ve zprostředkování indukce BRCA. V této studii DN-IRE1 vektor byl neúspěšný v inhibici exprese BRCA1 nebo BRCA2 indukovanou I3C (obr. 8C). Tyto nálezy naznačují, že PERK, upstream komponent endoplazmatického retikula a vyživovacích stres-responsivních drah, je pro indukci BRCA nezbytný.

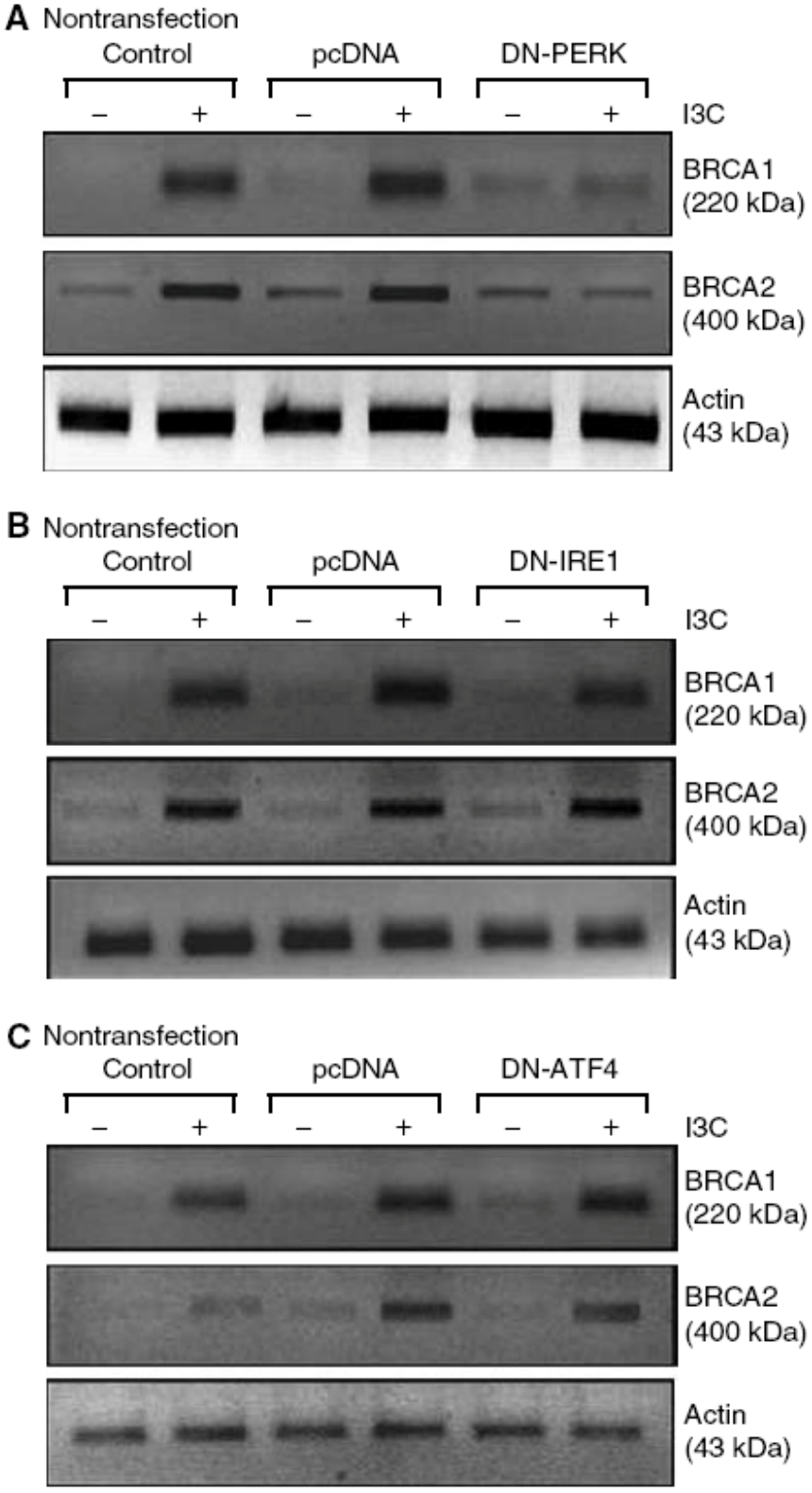
I3C, genistein a BRCA1 stimulují signálování stresu endo plazmatického retikula Signálování stresu endoplazmatického retikula je částečně zprostředkováno transkripcí cestou „cis-acting“ DNA elementů v cílových genech, včetně stres-responsivního elementu endoplazmatického retikula (ERSE), „unfolded“ (nesbaleného) elementu proteinové odpovědi (UPRE) a druhého typu ERSE (ERSE-II) (Yamamoto et al, 2004). Testovali jsme schopnost I3C, genisteinu a BRCA1 stimulovat reportéry řízené „wild type“ ERSE (ERSEwt-Luc), mutantím ERSE (ERSEmut-Luc, negativní kontrola) a ERSE-II elementem (ERSEII3x-Luc). Obrázek 9A ukazuje schopnost I3C a/nebo tunicamycinu indukovat signální ERSE v T47D a MCF-7 buňkách. Každá látka způsobila signifikantní indukci ERSEwt a ERSE-II aktivity (P<0.001), ale ERSEmut-Luc reportér vykazoval malou nebo žádnou aktivitu. Podobně nízké dávky genisteinu (0.5 a 1.0 μM) signifikantně aktivovaly ERSEwt a ERSE-II, ale ne ERSEmut reportér (P<0.001) (obr. 9B). CHOP je stres-responsivní transkripční regulátor implikovaný v apoptóze díky vážně poškozené funkci endoplazmatického retikula (Oyadomari and Mori, 2004). Indol-3-karbinol a genistein způsobily na dávce závislou aktivaci CHOP-Luc reportéru v T47D a MCF buňkách (P<0.001) (obr. 9C).

Následně jsme zjistili, že BRCA1 (ale ne kontrolní) siRNA inhibovala bazální ERSEwt a ERSE-II reportérovou aktivitu (P<0.001) (obr. 9D), zatímco wtBRCA1 (ale ne prázdný pcDNA3 vektor) zvyšoval bazální ERSEwt a ERSE-II signálování (P<0.001) (obr. 9E). Předem zpracování s BRCA1-siRNA vážně zmírnilo schopnost I3C upregulovat RESEwt a ERSE-II reportérovou aktivitu v T47D a MCF-7 buňkách (P<0.001) (obr. 9F). Konečně předem zpracování s BRCA1 (ale ne kontrolní) siRNA blokovalo



Obrázek 7

Thapsigargin a tunicamycin upregulují expresi BRCA genu. (**A**, **B**) Dávka - odpověď pro indukci BRCA mRNA kyselin prostřednictvím thapsigarginu v T47D (**A**) a MCF-7 (**B**) buňkách. Subkofluentní proilferativní buňky byly inkubovány s určenými dávkami thapsigarginu na 24 h a poté sesbírány pro semikvantitativní analýzy RT-PCR na BRCA1, BRCA2 a β-aktin (kontrolní gen). (**C**) Časový průběh indukce BRCA1 mRNA kyselin prostřednictvím thapsigarginu v MCF-7 buňkách. MCF-7 buňky byly inkubovány s thapsigarginem (300 nM) na rozdílné časové intervaly až do 48 h a poté sesbírány na semikvantitativní RT-PCR analýzy pro BRCA1, BRCA2 a β- aktin. (**D**, **E**) Dávka - odpověď pro indukci BRCA1 proteinu prostřednictvím thapsigarginu v T47D (**D**) a MCF-7 (**E**) buňkách. Buňky byly inkubovány s indikovanými dávkami thapsigarginu na 24 h a poté sesbírány na „Western blotting" k detekci BRCA1 a aktinu (kontrola obsahu a přenosu). (**F**, **G**) Dávka – odpověď pro indukci BRCA proteinů prostřednictvím tunicamycinu v T47D (**F**) a MCF-7 (**G**) buňkách. Buňky byly inkubovány s určenými dávkami thapsigarginu na 24 h a poté sesbírány na „Western blotting" k detekci BRCA1, BRCA2 a aktinu.



Obrázek 8
Indukce BRCA exprese prostřednictvím I3C vyžaduje kinázu PERK (EIFAK3). (**A**) Dominantně negativní (DN) PERK blokuje I3C indukci BRCA proteinu. Subkonfluentní proliferativní MCF-7 buňky byly transfektovány přes noc s kontrolním (jen vehikulum), prázdným pcDNA3 vektorem nebo DN-PERK (15-μg plazmidové DNA na 100-mm jamku) za užití Lipofectamine™. Transfektované buňky byly vymyty, ponechány v klidu po několik hodin, upraveny ±I3C na 24 h a sesbírány pro „Western blotting" k detekci BRCA1, BRCA2 nebo aktinu (kontrola obsahu a přenosu). (**B**) Dominantně negativní IRE 1 neuspěla v blokaci I3C indukce BRCA proteinu. Analýzy byly provedeny tak, jak je popsáno v (**A**), kromě užití DN-IRE 1 místo DN-PERK. (**C**) Dominantně negativní ATF4 neuspěla v blokaci I3C indukce BRCA proteinu. Analýzy byly provedeny tak, jak je popsáno v (**A**), kromě užití DN-ATF4 místo DN-PERK.

schopnost genisteinu stimulovat ERSEwt a ERSE-II aktivitu (P<0.001) (obr. 9G). Tyto nálezy naznačují, že oba, jak I3C, tak genistein, stimulují ERSE aktivitu a BRCA1 je potřebný pro I3C a genisteinem indukovanou ERSE aktivitu.

Diskuse

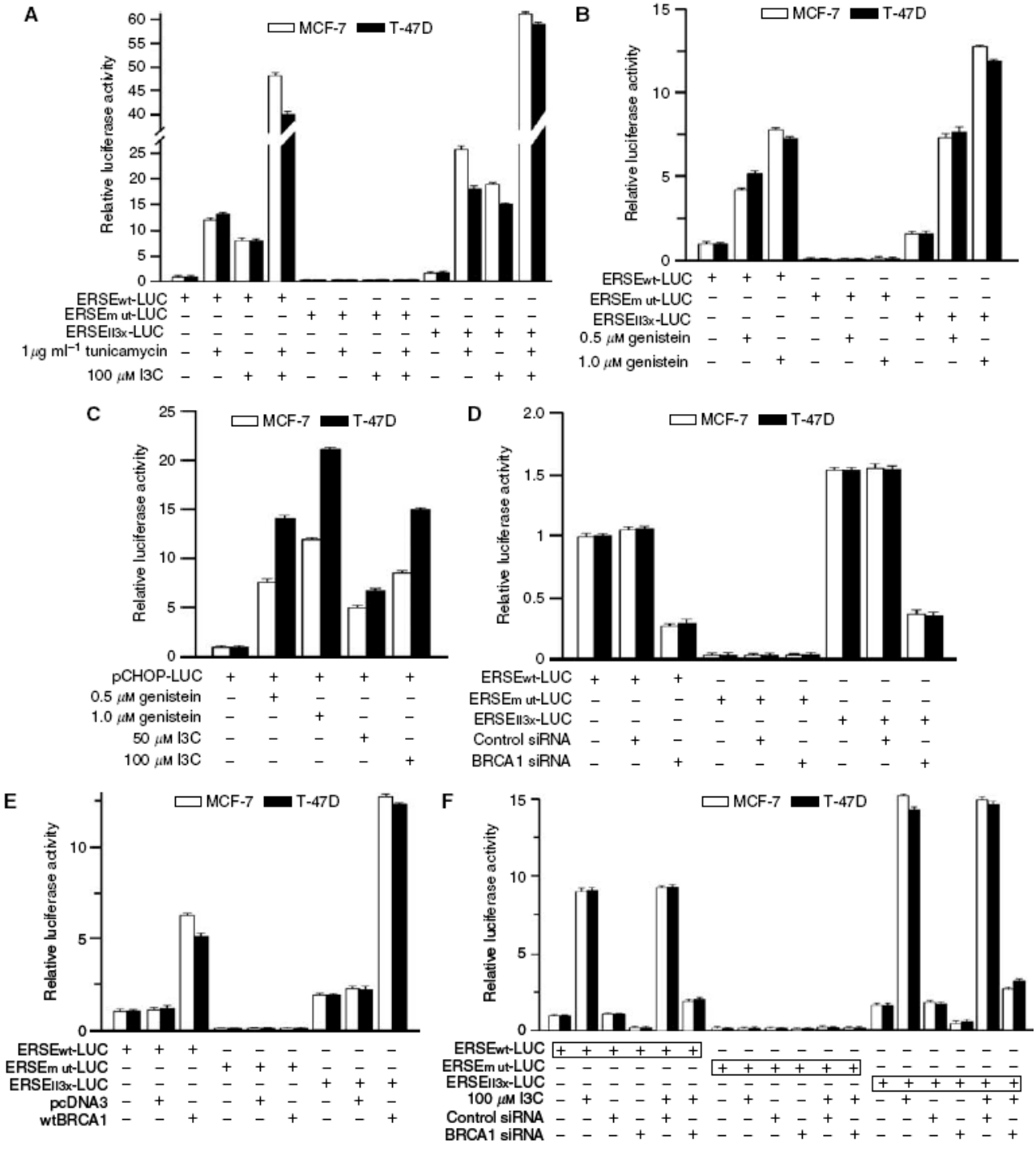
Ukázali jsme, že každá ze dvou fytolátek s potenciální protirakovinnou aktivitou, I3C a genistein, upreguluje expresi BRCA1 a BRCA2 genů rakoviny prsu. Signifikatní zvýšení v hladinách proteinů BRCA1 a BRCA2 (>2násobně) byla pozorována v relativně nízkých dávkách obou těchto látek (20 μM I3C a 0.5-1μM genisteinu), předpokládáme potenciální fyziologickou závažnost těchto nálezů. Zatímco I3C a genistein mají rozmanité děje in vitro a chrání proti různým typům rakoviny in vivo, není jasné, který z těchto dějů je nezbytný pro prevenci rakoviny a v jaké míře. BRCA1 a BRCA2 byly identifikovány jako nádorové supresory pro několik hormonálně responsivních typů rakoviny (rakoviny prsu a prostaty (BRCA1 a BRCA2), rakoviny endometria a děložního čípku (BRCA1) a neendokrinní typ rakoviny (rakovinu slinivky (BRCA1 a BRCA2)) (Struewing et al, 1997; Thompson and Easton, 2002; Aretini et al, 2003; Edwards et al, 2003). Tedy je možné předpokládat, že některá z chemopreventivních aktivit I3C a genisteinu je díky stimulaci BRCA exprese.

Důkaz o úloze BRCA1 ve sporadických mammárních karcinogenezích přispívá k této myšlence. Tedy BRCA1 exprese je zvyšována nebo chybí v signifikantním podílu sporadických případů rakoviny prsu a ovarií, částečně kvůli hypermetylaci BRCA1 promotéru na CpG ostrůvcích (Wilson et al, 1999; Rice et al, 2000). Signifikatní zlomek sporadických rakovin prsu (46%) byl nalezen jako haploinsuficientní pro BRCA1 (Staff et al, 2003). Kromě toho několik látek, které možná přispívají k rozvoji rakoviny prsu (polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo(a)-pyrene) a alkohol) downregulují BRCA1 expresi (Fan et al, 2000; Jeffy et al, 2002). Zatímco ztráta BRCA1 exprese nebo funkce vede k rakovině prsu, role upregulování kteréhokoliv BRCA genu v prevenci rakoviny je nejasná. Několik studií napovídá, že BRCA exprese je silně indukována v proliferativních buňkách absolvujících diferenciaci, včetně těch v prsní žláze během puberty a těhotenství (Rajan et al, 1996, 1997; Bernard-Gallon et al, 2001). Tyto nálezy naznačují, že BRCA geny jsou vysoce indukovány a hrají antikarcinogenní úlohy ve specifických dobách vývoje prsu. Jestliže je to tak, látky, které upregulují BRCA1 a BRCA2 v prsních epiteliálních buňkách mohou bránit rozvoji rakoviny.

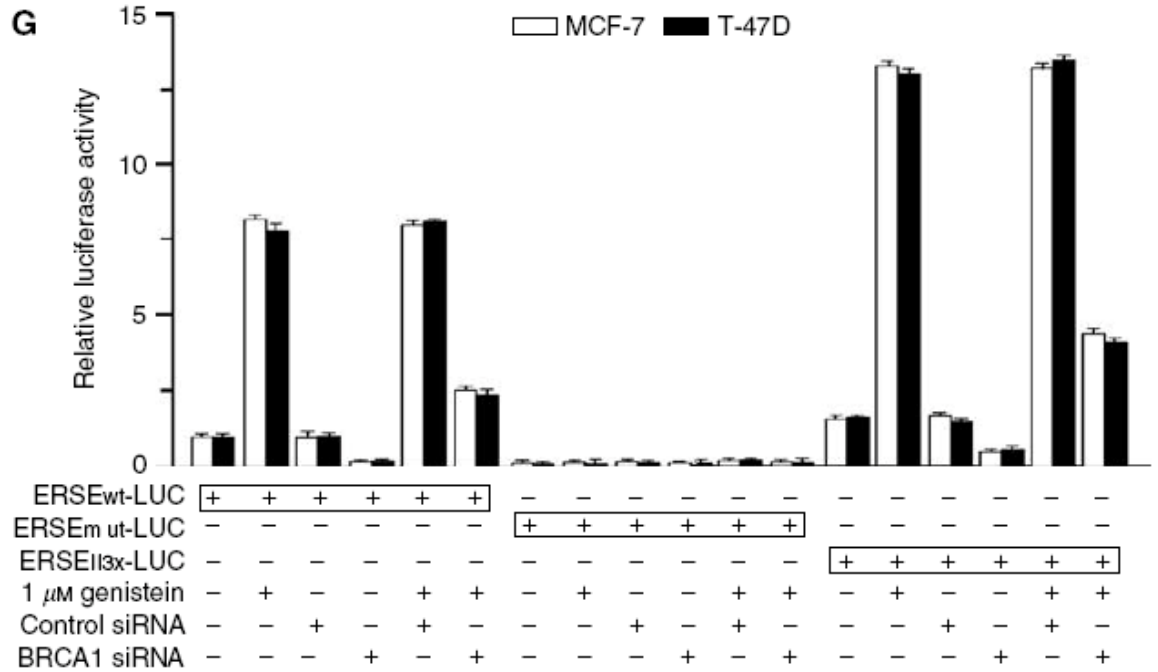
Genistein má mnohočetná biologická působení, z nichž některá mohou přispívat k jejich aktivitě v prevenci rakoviny: 1) inhibice buněčné proliferace hormonálně závislé a nezávislé, antiapoptopické signálování (NF-κB a c-Akt), aktivita topomerázy IIα, aktivita tyrosin kinázy a angiogenese; 2) stimulace TGF-β signální transdukce, aktivita p53 a Chk2 kinázy, antioxidační aktivita a diferenciace (Castle and Thrasher, 2002; Sarkar and Li, 2002). Naše nálezy ukazují, že genistein upreguluje BRCA1 a BRCA2 expresi v buněčných liniích rakoviny prsu a prostaty. V předcházející studii genistein způsobil zvýšení hladin BRCA2 mRNA (ale ne proteinu) v MDA-MB-231 a MCF-10A, ale ne v MCF-7 buňkách (Vissac-Sabatier et al, 2003). V této studii daidzein, další sójový izoflavon, neměl žádný efekt na BRCA2 expresi. Mezi touto a naší studií byly metodolické rozdíly (např. užití podobnosti chromatografie s měřením BRCA2 proteinu). Přesto důvod rozdílnosti s našimi výsledky je nejasný, poté co jsme objevili, že BRCA2 protein byl vysoce indukován v reprodukovatelném způsobu ve čtyřech různých liniích lidských rakovinných buněk.

Několik faktorů nazančuje, že BRCA indukce prostřednictvím fytolátek není díky signální ER-α: 1) BRCA geny byly indukovány zároveň I3C a genisteinem v MCF-7 buňkách upravených bez vs s ICI182,780 (což způsobuje degradaci ER-α); 2) jiný antiestrogen, Tamoxifen, neměl žádný efekt na hladiny BRCA1 (Jones et al, 2005); 3) BRCA1 a BRCA2 byly silně indukovány prostřednictvím I3C a genisteinu v ER-α negativních DU-145 buňkách rakoviny prostaty a 4) I3C upreguluje BRCA1 expresi v ER-α negativních buňkách rakoviny prsu (MDA-MB-231 a MDA-MB-468) a děložního čípku nebo lidských keratinocytech předkožky (Meng et al, 2000a b, 2001; Carter et al, 2002). Konečně naše výsledky naznačují indukci BRCA exprese prostřednictvím estrogen-nezávislých mechanismů zahrnujících stresu podobnou odpověď endoplazmatického retikula.

Ukázali jsme, že některé aktivity I3C a genisteinu jsou blokovány nebo částečně změněny inhibicí BRCA: 1) upregulace BRCA2 prostřednictvím I3C nebo genisteinu; 2) cytotoxicita díky vysokým dávkám I3C; 3) inhibice E2 stimulované ER-α aktivity prostřednictvím I3C a/nebo genisteinu v buňkách rakoviny prsu a 4) inhibice DHT stimulované AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu v buňkách rakoviny prostaty. Studie používající sníženou a over expresi BRCA1 a BRCA2 naznačují, že schopnost BRCA1 modifikovat cytotoxicitu I3C je částečně díky BRCA2. Na druhé straně I3C inhibice ER-α aktivity je většinou díky BRCA1 a ne BRCA2. Indol-3-karbinol a genistein možná uplatňují BRCA1 závislé a BRCA1 nezávislé efekty na signálování ER-α a AR, poté co BRCA1-siRNA může ovlivňovat ER-α a AR aktivitu při absenci fytolátek. Je také vhodné zmínit, že některé z



Obrázek 9 (legenda na další straně)



Obrázek 9
Stimulace signálování stresu endoplazmatického retikula prostřednictvím I3C, genisteinu a BRCA1. (**A**) Stimulace ERSE řízené reportérové aktivity prostřednictvím I3C a tunicamycinu. MCF-7 nebo T47D buňky byly transfektovány přes noc s indikovaným reportérem luciferázy, vymyty, postinkubovány s tunicamycinem (1 μg/ml) a/nebo I3C (100 μM) na 24 h a sesbírány pro analýzy luciferázy. Aktivita luciferázy byla vyjádřena relativně ke sledováním užívajícím ERSEwt-Luc reportér při absenci tunicamycinu nebo I3C. Hodnoty jsou průměry ±s.e.m. ze čtyř zdvojených jamek. Testované reportéry byly řízeny wt stres-responsivním elementem endoplazamtického retikula (ERSEwt-Luc), mutantním ERSE (ERSEmut-Luc) a třemi kopiemi ERSE-II elementu (ERSEII3x-Luc). (**B**) Stimulace ERSE reportérové aktivity prostřednictvím genisteinu. Analýzy byly provedeny tak, jak je popsáno výše, kromě toho, že po transfekci reportérů byly buňky upraveny s genisteinem (O.5 nebo 1.0 μM) na 24 h. (**C**) Stimulace CHOP promotér – reportér aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu. Buňky byly transfektovány přes noc s reportérem vytvořeným z CHOP promotéru upstream z genu luciferázy (pCHOP-Luc), vymyty a postinkubovány s rozdílnými dávkami I3C nebo genisteinu na 24 h. Aktivita luciferázy byla vyjádřena relativně k té bez přítomnosti I3C nebo genisteinu. Hodnoty jsou průměrem ±s.e.m. ze čtyř zdvojených jamek. (**D**) Závislost bazální ERSE reportérové aktivity na endogenní BRCA1. Proliferativní buňky byly předem upraveny s BRCA1-siRNA, kontrolní siRNA (50 nM x 72 h) nebo žádnou siRNA (jen vehikulum). Po 48 h
úpravy s siRNA byly transfektovány s indikovaným ERSE reportérem. Po siRNA zpracování a transfekci byly buňky vymyty, postinkubovány na 24 h a sesbírány na analýzy luciferázy. Hodnoty jsou vyjádřeny relativně k ERSEwt-Luc kontrole (žádná siRNA) a jsou průměrem ± s.e.m. ze čtyř zdvojených jamek. (**E**) Stimulace ERSE reportérové aktivity prostřednictvím wtBRCA1. Buňky byly kotransfektovány přes noc s wtBRCA, prázdným pcDNA3 vektorem nebo žádným vektorem (pouze vehikulum) a indikovaným reportérem. Buňky byly vymyty a postinkubovány na 24 h. Hodnoty luciferázy jsou vyjádřeny relativně k ERSEwt-Luc reportéru při absenci wtBRCA1 nebo pcDNA3 a jsou průměry ± s.e.m. čtyřnásobných jamek. (**F**) Závislost I3C stimulované ERSE aktivity na endogenním BRCA1. Analýzy byly provedeny tak, jak je popsáno v (**D**), kromě toho, že po siRNA zpracování a transfekci byly buňky postinkubovány na 24 h při absenci nebo v přítomnosti I3C (100 μM). (**G**) Závislost ghenisteinem stimulované ERSE aktivity na endogenním BRCA1. Analýzy byly provedeny, jak je popsáno v (**F**), kromě užití genisteinu (1 μM) místo I3C.

efektů genisteinu na signálování estrogenního receptoru mohou být zprostředkovány přes ER-β, poté co genistein má vyšší afinitu k ER-β než k ER-α (Kuiper et al, 1998).

Záchrana inhibice ER-α protřednictvím I3C a/nebo genisteinu je konzistentní s předešlými studiemi ukazujícími, že wtBRCA1 inhibuje signálování ER-α a DN-BRCA1 zachraňuje inhibici (Fan et al, 1999b; 2001a, b). Ačkoliv zjištění, že BRCA1-siRNA stimuluje AR aktivitu a částečně revertuje inhibici DHT indukované AR aktivity prostřednictvím I3C a genisteinu, je poněkud překvapující, protože bylo publikováno, že wtBRCA1 a wtBRCA2 stimulují signálování AR (Yeh et al, 2000; Shin and Verma, 2003). Nyní opravdu nemáme dobré vysvětlení pro tuto diskrepanci, ale pozorovali jsme, že wtBRCA1 buď neměl žádný efekt nebo mírně zvyšoval DHT stimulovanou aktivaci některých ARE řízených reportérů (ARE-TK-Luc and MMTV-Luc) (nepublikované výsledky), naznačující, že důsledky snížené exprese BRCA1, dle over expresních modelů, nemusí být předvídatelné. Zajímavě zpracování buněk LNCaP s BRCA1-siRNA plus DHT způsobilo zvýšení v AR proteinech, což možná přispělo ke zvýšení v DHT stimulované AR aktivitě v buňkách zpracovaných s BRCA1-siRNA. Zvýšení v AR proteinu nebylo díky zvýšení v mRNA, ale bylo spojeno s lehkým snížením v elektroforetické mobilitě, odpovídající posttranslační (např. fosforylaci). Poté co kofaktorové prostředí je kritické pro AR aktivitu, je také možné, že ztráta BRCA1 způsobuje upregulaci AR koaktivátoru(ů) a/nebo downregulaci AR korepresoru(ů).

V nedávné studii bylo oznámeno, že prepubertální vystavení krys (věk 7-20 dní) genisteinu způsobilo prolongovanou upregulaci BRCA1mRNA exprese v prsních žlázách (Cabanes et al, 2004). Indukce BRCA1 byla spojená s morfologickým důkazem mammární diferenciace a redukovanou susceptibilitou k 7,12-dimetylbenzen antracenem indukovaným prsním tumorům. Tyto nálezy naznačují,

že BRCA1 možná přispívá k protekci proti vývoji rakoviny prsu prostřednictvím genisteinu, ale příčina a výsledek nebyly zatím prokázány.

Vzato dohromady, naše nálezy naznačují, že BRCA1 a BRCA2 jsou potenciální molekulární cíle pro chemopreventivní látky I3C a genistein. Ačkoliv jsme rozsáhle nestudovali kombinace látek, naše nálezy naznačují, že I3C a genistein možná pracují synergisticky nebo supraaditivně ve stimulaci BRCA1 a BRCA2 exprese. Je zapotřebí další práce k přesnému určení, zda BRCA1 a BRCA2 jsou potenciální přechodné biomarkry, které předpovídají účinnost těchto nebo jiných preventivních látek a zda kombinace I3C a genisteinu může poskytnout větší preventivní účinnost proti rakovině se stejnou nebo menší toxicitou (tj. lepší terapeutický poměr).

Naše studie naznačuje, že I3C indukuje BRCA expresi prostřednictvím stresu podobné dráhy endoplazmatického retikula, ačkoliv tato hypotéza potřebuje být definitivně prokázána. Předcházející studie odhalila, že I3C metabolit DIM aktivuje mnohočetné stresové dráhy endoplazmatického retikula, vedoucí k indukci downstream cílových genů (např. chaperony) a aktivaci c-Jun N-terminálních kináz JNK1 a JNK2 (Sun et al, 2004). V této studii jsme zjistili, že I3C aktivuje signální ERSE a ERSE-II a indukuje CHOP promotér aktivity v T47D a MCF-7 buňkách, shodně se stresu podobnou odpovědí endoplazmatického retikula. Důležitý je poznatek,že dvě látky známé tím, že způsobují stres endoplazmatického retikula, thapsigargin

a tunicamycin, také indukovaly BRCA1 a BRCA2 expresi a DN PERK, upstream komponent endoplazmatické a vyživovacích stres-responsivních drah, blokoval I3C indukovanou BRCA1 expresi.

Mechanismus (mechanismy), kterým (kterými) signálování endoplazmatického retikula indukuje BRCA1 expresi, nebyl (nebyly) dosud přesně určen (určeny). Analyzovali jsme sekvenci BRCA1 promotéru (GeneBank Accession U37574) na standardní ERSE (ccaat-n9-ccacg), UPRE (tgacgtgg/a) a ERSE-II (attgg-n-ccacg) elementy (kde n=jakýkoliv nukleotid). 1.5-kb upstream oblast BRCA1 kódované sekvence neobsahovala žádné kompletní ERSE nebo ERSE-II elementy, ale obsahovala množství half sites (polovičních vazebných míst). Jakkoliv tato oblast obsahuje dva možné UPRE: tgacgtga and tggcgtgg. Úlohu těchto elementů ve zprotředkování fytochemické indukce BRCA1 bude nutno teprve přesně určit.

Naše výsledky také naznačují úlohu BRCA1 ve stresovém signálování endoplazmatického retikula, protože bylo zjištěno, že BRCA1 pozitivně reguluje ERSE a ERSE-II aktivitu. Tedy knockdown BRCA1 inhiboval bazální ERSE a ERSE-II aktivitu, zatímco overexprese BRCA1 stimulovala ERSE a ERSE-II aktivitu a knockdown BRCA1 redukoval I3C indukovanou ERSE a ERSE-II aktivitu. Tyto výsledky jsou konzistentní s modelem, ve kterém BRCA1 je zároveň cílem a mediátorem stresové odpovědi endoplazmatického retikula, jako jsou jiné transkripční regulátory, jako například aktivující transkripční faktor 6 (ATF6) a X box-binding protein 1 (XBP1). Konečně jsme zjistili, že nízké dávky genisteinu (0.5-1.0 μM) signifikantně indukovaly ERSE, ERSE-II a CHOP promotér aktivity, což naznačuje, že genistein je schopen aktivovat signálování stresové odpovědi endoplazmatického retikula, ačkoliv rozsah aktivované dráhy a její význam nejsou doposud objasněny. Schopnost genisteinu indukovat signálování stresové odpovědi endoplazmatického retikula by mohla částečně vysvětlit, jak nízké dávky genisteinu indukují expresi BRCA genu.

Poděkování

Tento výzkum byl podpořen částečně United States Public Health Service Grants R01-CA104546, R01-CA82599, R01-CA80000, RO1-ES09169 (E.M.R.), R21-AA13122 (S.F.) a pomocí grantu z Susan G Komen Breast Cancer Foundation (BCTR0201295) (E.M.R.).

Literatura

Andres JL, Fan S, Turkel GJ, Wang JA, Twu NF, Yuan RQ, Lamszus K, Goldberg ID, Rosen EM (1998) Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents. Oncogene 16: 2229–2241

Aretini P, D'Andrea E, Pasini B, Viel A, Costantini RM, Cortesi L, Ricevuto E, Agata S, Bisegna R, Boiocchi M, Caligo MA, Chieco-Bianchi L, Cipollini G, Crucianelli R, D'Amico C, Federico M, Ghimenti C, De Giacomi C, De Nicolo A, Della Puppa L, Ferrari S, Ficorella C, Iandolo D, Manoukian S, Marchetti P, Marroni F, Menin C, Montagna M, Ottini L, Pensotti V, Pierotti M, Radice P, Santarosa M, Silingardi V, Turchetti D, Bevilacqua G, Presciuttini S (2003) Different expressivity of BRCA1 and BRCA2: analysis of 179 Italian pedigrees with identified mutation. Breast Cancer Res Treat 81: 71–79

Bell MC, Crowley-Nowick P, Bradlow HL, Sepkovic DW, Schmidt-Grimminger D, Howell P, Mayeaux EJ, Tucker A, Turbat-Herrera EA, Mathis JM (2000) Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN. Gynecol Oncol 78: 123–129

Bernard-Gallon DJ, De Latour MP, Sylvain V, Vissac C, Aunoble B, Chassagne J, Bignon YJ (2001) Brca1 and Brca2 protein expression patterns in different tissues of murine origin. Int J Oncol 18: 271–280

Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD (2001) Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. Cancer Res 61: 6120–6130

Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT, Osborne MP (1991) Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. Carcinogenesis 12: 1571–1574

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. Mol Cell Biol 20: 7192–7204

Cabanes A, Wang M, Olivo S, DeAssis S, Gustafsson JA, Khan G, Hilakivi-Clarke L (2004) Prepubertal estradiol and genistein exposures upregulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. Carcinogenesis 25: 741– 748

Carter TH, Liu K, Ralph Jr W, Chen D, Qi M, Fan S, Yuan F, Rosen EM, Auborn KJ (2002) Diindolylmethane alters gene expression in human keratinocytes. J Nutr 132: 3314–3324

Castle EP, Thrasher JB (2002) The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. Urol Clin North Am 29: 71–81

Chen D-Z, Mei Q, Auborn KJ, Carter TH (2001) Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. J Nutr 131: 3294– 3302

Chen I, McDougal A, Wang F, Safe S (1998) Aryl hydrocarbon-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolymethane. Carcinogenesis 19: 1631–1639

Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH (2001) Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. Oncogene 20: 2927– 2936

Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, Firestone GL (1999) Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Res 59: 1244– 1251

Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL (1998) Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. J Biol Chem 273: 3838– 3847

Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, Jackson R, Southgate C, Singh R, Falconer A, Dearnaley DP, Ardern-Jones A, Murkin A, Dowe A, Kelly J, Williams S, Oram R, Stevens M, Teare DM, Ponder BA, Gayther SA, Easton DF, Eeles RA, Cancer Research UK/ Bristish Prostate Group UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators; British Association of Urological Surgeons Section of Oncology (2003) Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. Am J Hum Genet 1: 1–12

Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA, Erdos M, Goldberg ID, Webb P, Kushner PJ, Pestell RG, Rosen EM (2001a) Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. Oncogene 20: 77–87

Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID, Rosen EM (2000) Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. Cancer Res 60: 5635–5639

Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Goldberg ID, Rosen EM (1999a) Co-ordinate down-regulation of BRCA1, BRCA2, Rad51, and p300 during the response to damage in human prostate cancer cell lines. Prostate 40: 37–49

Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Ma YX, Meng Q, Erdos MR, Brody LC, Goldberg ID, Rosen EM (1998) BRCA1 as a human prostate tumor suppressor: Modulation of proliferation, damage responses, and expression of cell regulatory proteins. Oncogene 16: 3069–3083

Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auborn KJ, Goldberg ID, Rosen EM (1999b) BRCA1 inhibits estrogen receptor signaling in transfected cells. Science 284: 1354–1356

Fan S, Yuan RQ, Ma YX, Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM (2001b) Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. Oncogene 20: 8215– 8235

Graham S, Marshall J, Mettlin C, Rzepka T, Nemoto T, Byers T (1982) Diet in the epidemiology of breast cancer. Am J Epidemiol 116: 68–75

Hayes JD, McMahon M (2001) Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. Review. Cancer Lett 174: 103–113

Jeffy BD, Chirnomas RB, Chen EJ, Gudas JM, Romagnolo DF (2002) Activation of the aromatic hydrocarbon receptor pathway is not sufficient for transcriptional repression of BRCA-1: requirements for Translational

Therapeutics metabolism of benzo[a]pyrene to 7r,8t-dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-

tetrahydrobenzo[a]pyrene. Cancer Res 62: 113–121

Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, Auborn KJ (1999) Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. Cancer Res 59: 3991–3997

Jones LP, Li M, Halama ED, Ma Y, Lubet R, Grubbs CJ, Deng CX, Rosen EM, Furth PA (2005) Promotion of mammary cancer development by tamoxifen in a mouse model of Brca1-mutation-related breast cancer. Oncogene 24: 3554–3562

Kojima T, Tanaka T, Mori H (1994) Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female donryu rats by indole-3-carbinol. Cancer Res 54: 1446–1449

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139: 4252– 4263

Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. Mol Cell Biol 22: 2883–2892
Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A (2002) Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate tumors. J Nutr 132: 552S–558S
Le HT, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes JF (2003) Plant derived 3,30-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. J Biol Chem 278: 21136–21145
Maggiolini M, Vivacqua A, Carpino A, Bonofiglio D, Fasanella G, Salerno M, Picard D, Ando S (2002) The mutant androgen receptor T877A mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of genistein and quercetin on human LNCaP prostate cancer cells. Mol Pharmacol 62: 1027–1035
Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM, Fan S (2001) Inhibitory effects of indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 63: 147–152
Meng Q, Qi M, Chen DZ, Yuan R, Goldberg ID, Rosen EM, Auborn K, Fan S (2000a) Suppression of breast cancer invasion and migration mediated by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and Ecadherin/catenin complexes. J Mol Med 78: 155–165
Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auborn K, Fan S (2000b) Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-a signaling in human tumor cells. J Nutr 130: 2927–2931
Mentor-Marcel R, Lamartiniere CA, Greenberg NM, Elagavish A (2001) Genistein in the diet reduces the incidence of prostate tumors in a transgenic mouse (TRAMP). Cancer Res 61: 6777–6782
Michnovicz JJ, Bradlow HL (1990) Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. J Natl Cancer Inst 82: 947–949
Nacheson-Kedmi M, Yannai S, Haj A, Fares FA (2003) Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. Food Chem Toxicol 41: 745–752
Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ 11: 381–389, Review
Page KM, Heblich F, Davies A, Butcher AJ, Leroy J, Bertaso F, Pratt WS, Dolphin AC (2004) Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. J Neurosci 24: 5400–5409
Rahman KM, Aranha O, Sarkar FH (2003) Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. Nutr Cancer 45: 101–112
Rajan JV, Marquis ST, Gardner HP, Chodosh LA (1997) Developmental expression of Brca2 colocalizes with Brca1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. Dev Biol 184: 385–401
Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA (1996) Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 93: 13078–13083
Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW (2000) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. Carcinogenesis 21: 1761– 1765
Rosen CA, Woodson GE, Thompson JW, Hengesteg AP, Bradlow HL (1998) Preliminary results of the use of indole-3-carbinol for recurrent laryngeal papillomatosis. Otolaryngol Head Neck Surg 118: 810–815
Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM, Abcouwer SF (2004) Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. J Biol Chem 279: 14844–14852
Rutkowski DT, Kaufman RJ (2003) All roads lead to ATF4. Dev Cell 4: 442–444, Review
Sarkar FH, Li Y (2002) Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. Cancer Metast Rev 21: 265–280
Sarkar FH, Rahman KM, Li Y (2003) Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. J Nutr 133: 2434S–2439S
Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C. elegans development. Cell 107: 893– 903
Shin S, Verma IM (2003) BRCA2 cooperates with histone acetyltransferases in androgen receptor-mediated transcription. Proc Natl Acad Sci USA 100: 7201–7206
Staff S, Isola J, Tanner M (2003) Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. Cancer Res 63: 4978– 4983
Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. N Engl J Med 336: 1401–1408
Sun S, Han J, Ralph Jr WM, Chandrasekaran A, Liu K, Auborn KJ, Carter TH (2004) Endoplasmic reticulum stress as a correlate of cytotoxicity in human tumor cells exposed to diindolylmethane in vitro. Cell Stress Chaperones 9: 76–87
Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium (2002) Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. J Natl Cancer Inst 94: 1358– 1365
Vissac-Sabatier C, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ (2003) Effects of the phytoestrogens genistein and daidzein on BRCA2 tumor suppressor gene expression in breast cell lines. Nutr Cancer 45: 247–255
Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM (1996) Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis 17: 271–275
Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. EMBO J 17: 5708–5817
Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Chen JJ, Scully R, Livingston D, Zuch RH, Kanter MH, Cohen S, Calzone FJ, Slamon DJ (1999) Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. Nat Genet 21: 236–340
Xiong J, Fan S, Meng Q, Schramm L, Wang C, Bouzahza B, Zhou J, Zafonte B, Goldberg ID, Haddad BR, Pestell RG, Rosen EM (2003) BRCA1 inhibition of telomerase activity in cultured cells. Mol Cell Biol 23: 8668–8690
Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J Biochem (Tokyo) 136: 343– 350
Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ, Kang HY, Chang C (2000) Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11256–11261
Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. J Biol Chem 273: 33741–33749