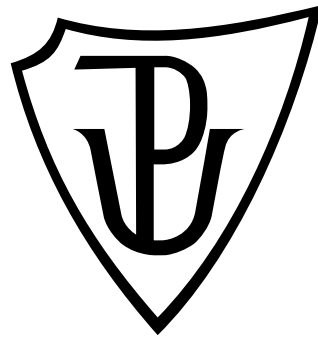


# **Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Kristýna Judasová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Detekce koaktivátoru NcoA4 v závislosti na expresi androgenového receptoru a PSA u na androgenech nezávislých buněk nádoru prostaty**

**Bakalářská práce**

**Kristýna Judasová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí: Ing. Kateřina Směšný Trtková, CSc.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Kateřiny Směšný Trtkové, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 12. 5. 2014

## Shrnutí

Buňky karcinomu prostaty jsou charakteristické změnou exprese androgenového receptoru. Markerem karcinomu prostaty je prostatický specifický antigen – PSA. V teoretické části práce je zmiňována struktura a funkce androgenového receptoru i prostatického specifického antigenu a jejich vliv na vznik a vývoj karcinomu prostaty. Pozornost je také věnována koaktivátoru NcoA4, který ovlivňuje změnu nádorových buněk prostaty do na androgenech nezávislého stavu. Slibnými látkami pro léčbu nádorových onemocnění jsou inhibitory histonových deacetyláz. Tato bakalářská práce se soustřeďuje na vliv dvou inhibitorů histonových deacetyláz – SAHA a SBHA, kterými byly ovlivňovány buňky na androgenech nezávislých buněčných liniích, C4-2, PC3 a DU145

V experimentální části byla sledována cytotoxicita testovaných inhibitorů o různých koncentracích. Cytotoxicita byla stanovována ovlivňováním všech tří na androgen nezávislých liniích (C4-2, DU145, PC3), ale zvláštní pozornost byla věnována viabilitě buněk buněčné linie C4-2. Bylo zjištěno, že cytotoxický účinek testovaných látek roste s jejich koncentrací.

Dále byla detekována exprese androgenového receptoru, prostatického specifického antigenu a koaktivátoru NcoA4 v cytosolické a jaderné proteinové frakci. Vliv na změny všech tří sledovaných proteinů měla pouze SAHA. Exprese androgenového receptoru v cytosolické frakci po 72hodinovém ovlivnění kolidovala s výskytem NcoA4. Na expresi prostatického specifického antigenu v cytosolu měla vliv pouze SAHA. V jaderné frakci byl detekován prostatický specifický antigen i koaktivátor NcoA4. Testovaná látka SBHA neměla na expresi sledovaných proteinů žádný vliv.

V diskusi jsou srovnány výsledky obou prováděných testů viability a zhodnocen vliv testovaných inhibitorů histonových deacetyláz na změny v expresi sledovaných proteinů.

## Summary

Prostate cancer cells are characterized altered expression of the androgen receptor. A marker of prostate cancer is prostate specific antigen – PSA. Structure and function of the androgen receptor and prostate specific antigen and their influence on the formation and progression of the prostate cancer, are described in the Introduction. Moreover, the coactivator NcoA4 supports change of the prostate cancer cells into the androgen independent state. Promising drugs for treatment of cancer are histone deacetylase inhibitors. This thesis focuses on the effect of two inhibitors of histone deacetylases – SAHA and SBHA that were used for a treatment of the androgen independent cell lines, C4-2, PC3 and DU145.

In the experimental part, the effect of different concentrations of two tested HDACs inhibitors on cell cytotoxicity was performed. The cell cytotoxicity was determined in androgen-independent prostate cancer cell lines C4-2, DU145 and PC3, but most experiments were performed on C4-2 cell lines with only the AR gene expression. It was found that the cytotoxic effect of the tested inhibitors of HDACs increase with their concentrations.

Expression of androgen receptor, prostate specific antigen and coactivator NcoA4 in cytosolic and nuclear protein fraction were detected. The only SAHA has an effect on protein expressions change of the studied proteins. Expression of the androgen receptor in the cytosolic fraction after 72hour biasing interferes with the appearance NcoA4. The PSA expression in a cell cytosol is changed only in cells treated with SAHA. The prostate specific antigen and the coactivator NcoA4 were detected in the cell nuclear fraction. The SBHA has not effect on an expression of the studied proteins.

In the discussion, results of the two cell viability tests are compared and an effect of the two studied histone deacetylase inhibitors on expression of the AR, PSA and NcoA4 protein is described.

Tímto děkuji Ing. Kateřině Směšný Trtkové, CsC. za odborné vedení, pomoc v laboratoři, ochotu a trpělivost při zpracování této bakalářské práce.

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce.....	9
3	Současný stav řešené problematiky.....	10
3.1	Androgenový receptor .....	10
3.1.1	Struktura a funkce .....	10
3.2	PSA (prostate specific antigen).....	11
3.2.1	Regulace exprese PSA .....	12
3.3	Koregulátory androgenového receptoru .....	13
3.3.1	Koaktivátory androgenového receptoru.....	13
3.3.2	Korepresory androgenového receptoru.....	16
3.4	Karcinom prostaty.....	16
3.4.1	Vliv androgenového receptoru na vznik karcinomu prostaty .....	17
3.4.2	Epigenetické modifikace způsobené HDAC .....	18
3.4.3	Inhibitory histonových deacetyláz .....	19
4	Materiál a metodika.....	22
4.1	Detekce viability buněk .....	22
4.1.1	MTT test .....	22
4.1.2	System xCelligence.....	24
4.2	Kultivace a ovlivňování buněčných linií .....	25
4.3	Analýza proteinů.....	26
4.3.1	Izolace proteinů.....	26
4.3.2	Stanovení koncentrace proteinů .....	28
4.3.3	Western blot analýza (Imunoblot) .....	29
4.4	Použité roztoky .....	32
4.5	Média pro práci s buněčnými kulturami .....	33
4.6	Seznam chemikálií.....	34
4.7	Vybavení laboratoře.....	35
5	Výsledky.....	37
5.1	Viabilita buněk.....	37
5.2	Western blot analýza.....	40
6	Diskuse.....	44
7	Závěr.....	45

8	Seznam použitých zkratk.....	46
9	Použitá literatura .....	48
10	Přílohy .....	55



## Úvod

Karcinom prostaty je celosvětově čtvrté nejzávažnější onemocnění mužů a v České republice se řadí dokonce na třetí místo. Tímto onemocněním trpí častěji muži nad padesát let a s věkem výskyt karcinomu stoupá. Na výskyt karcinomu prostaty má vliv také rasové zařazení. U černochů je úmrtnost spojená s tímto onemocněním dvakrát větší než u bělochů, ale u asiátů je výskyt naopak nižší. Vliv na výskyt má také životní prostředí, strava s vysokým obsahem tuků a dědičný aspekt (Kolář *et al.*, 2003).

Karcinom prostaty je typický pomalým růstem a pozdní tvorbou metastáz. Díky tomu je většina karcinomů prostaty diagnostikována až ve vyšším věku pacienta. Léčba tohoto onemocnění je úspěšná, pokud je karcinom prostaty diagnostikován v časném stádiu a pokud je karcinom ohraničený anatomickým pouzdrem tvořeným prostatou. Časnou diagnózu umožňuje klinický test, který spočívá ve stanovení hladiny PSA (prostate specific antigen) v krevním séru.

Jednou z možností léčby je terapie androgenovou blokádou. Jelikož jsou primární karcinomy na androgenech závislé, tato léčba se zprvu zdá úspěšná. Nádory se ale po čase stávají na androgenech nezávislé a začínají znovu progredovat.

Pro buňky karcinomu prostaty je typická vysoká koncentrace histonových deacetyláz (HDACs), které zabraňují expresi některých tumor supresorových genů. Potenciálními léčivými, která potlačují funkci histonových deacetyláz jsou inhibitory HDACs, které se v poslední době stávají nadějnými léčivými pro nádory prostaty. Tyto látky způsobují hyperacetaaci histonových proteinů, což má vliv na potlačení buněčného cyklu a iniciaci buněčné smrti nádorových buněk. Inhibitory HDACs mají také non-epigenetickou roli, která se uplatňuje v cytoplasmě. Potlačují funkci ochranných HSP (heat shock proteins) a tím napomáhají k degradaci nádorového proteinu.

Některé inhibitory histonových deacetyláz jsou k dispozici, jiné jsou ve stádiu klinických testů. Výsledky pre-klinických a klinických testů podporují použití inhibitorů v kombinaci s dalšími proti-nádorovými léčivými (Marchion *et Munster*, 2007).

## **1 Cíle práce**

1. Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma.
2. Kultivace na androgenech nezávislých prostatických nádorových buněčných liniích (DU145, PC3 a C4-2).
3. Stanovení biologického statusu buněk ovlivněných inhibitory histonových deacetyláz (NaB, SAHA a SBHA) zahrnující změny v počtu dělících se buněk a jejich viabilitu využitím systému xCelligence (Roche).
4. Detekce androgenového receptoru (AR), PSA a NcoA4 z jaderné a cytoplasmatické frakce ovlivněných buněk.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Androgenový receptor

AR (androgen receptor) je nukleární receptor a transkripční faktor, který zprostředkovává biologickou aktivitu mužských pohlavních hormonů, androgenů (Dehm *et Tindall*, 2007). Aktivovaný AR reguluje vývoj prostaty, ale má vliv i na také růst nádoru prostaty (Culig *et al.*, 1998). AR je členem steroidní proteinové rodiny, jeho velikost je 110 kDa a 112 kDa. Gen pro AR se nachází na dlouhém raménku chromosomu X. AR je schopen regulovat expresi cílových genů (Chahg *et al.*, 1995) a jeho aktivita je důležitá pro správný vývoj a funkci prostaty (Dehm *et Tindall*, 2007).

#### 2.1.1 Struktura a funkce

Androgenový receptor obsahuje ve své struktuře tři hlavní domény: NTD (N-terminal domain), centrální DBD (DNA-binding domain) a CTD (COOH-terminal domain). Mezi DBD a CTD se nachází krátký úsek – „hinge region“. NTD plní funkci aktivačního místa AF-1 CTD se skládá z domény LBD (ligand-binding domain) a z aktivačního místa AF-2 (Bain *et al.*, 2007), které vzniká vazbou příslušného ligandu na LBD. Tato vazba způsobí změnu konformace CTD a zformování AF-2, které slouží jako vazebné místo pro koaktivátory a korepresory (Hur *et al.*, 2004, He *et al.*, 2004).

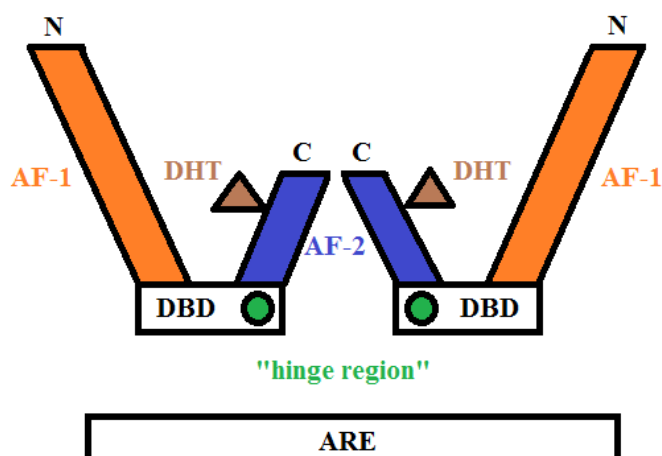
Doména DBD a úsek „hinge region“ hrají významnou roli při dimerizaci AR a při jeho vazbě na DNA. Vysoce konzervovaná doména DBD se skládá ze dvou motivů zinkových prstů a z CTE (carboxy-terminal extension). Díky P-boxu, který ve své struktuře obsahuje  $\alpha$ -helix a který je umístěn na prvním zinkovém prstu, je DBD schopna rozpoznat a vázat se na DNA. Druhý zinkový prst obsahuje D-box, který je styčnou plochou při dimerizaci AR (Dehm *et Tindall*, 2007).

Doména NTD je naopak flexibilní a dynamická. Aktivita sekundární struktury NTD závisí na buněčném typu, hladině androgenů, vazebných partnerech, typu post-translačních modifikací nebo chromatinovém prostředí. Tato doména se podílí na transkripční aktivitě AR, a to nezávisle na doméně CTD. Tato schopnost souvisí s aktivačním místem AF-1, které je hlavní oblastí zprostředkovávající transkripční aktivitu AR (Dehm *et Tindall*, 2007) (obr. I).

Primárními fyziologickými ligandy AR jsou testosteron a DHT (dihydrotestosterone). Androgenový receptor, na který není navázaný žádný ligand, se nachází v cytoplasmě a tvoří

komplex s HSPs (heat shock proteins), které mají ochrannou funkci a řadí se mezi chaperony. Tento komplex vyvolává vysokou afinitu AR k androgenům. Po vazbě androgenu na AR nastává změna konformace AR, která vede k disociaci chaperonového komplexu a fosforylaci androgenového receptoru (Wang *et al.*, 1999). Tyto změny konformace AR podporují jeho dimerizaci. Následuje translokace AR do jádra, kde se váže na AREs (androgen response elements) nacházejícími se na promotoru genu způsobujícího růst a aktivitu prostatických buněk, PSA (prostate specific antigen) (Dehm *et Tindall*, 2007). Po vazbě AR na AREs se dále na AR váží koaktivátory, které hrají významnou roli při iniciaci transkripce (Shang *et al.*, 2002).

**Obr. I:** Struktura AR (upraveno podle Dehm *et Tindall*, 2007)



## 2.2 PSA (prostate specific antigen)

PSA je cílovým genem androgenového receptoru. PSA je členem rodiny KLK (human kallikrein family), která je tvořena serinovými proteázami (Heinlein *et Chang.*, 2004). Všechny geny kódující proteiny této rodiny mají pět exonů podobné velikosti a většina těchto genů je regulována steroidními hormony. Gen pro PSA kóduje glykoprotein o velikosti 33 kDa, který je tvořen polypeptidovým řetězcem obsahujícím 240 aminokyselin (Kim *et Coetzee*, 2004).

Serinové proteázy jsou syntetizovány ve formě inaktivních proenzymů, které nejdříve vznikají jako pre-proenzymy. Proenzymy jsou aktivovány odstraněním 4 – 9 aminokyselin z N-konce (Saxena *et al.*, 2012). Většina genů rodiny KLK je obvykle aktivována členy stejné rodiny nebo jinými proteázami. PSA je *In vitro* aktivován KLK2 (Kumaret *al.*, 1997,

Lovgren *et al.*, 1997). Funkcí PSA jako enzymatického proteinu je inhibice srážení semenné tekutiny a jeho hlavními složkami jsou seminogelin I a II, fibronektin, TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), PTH (parathyroid hormone) a plasminogen (Kim *et Coetzee*, 2004, Yousef *et Diamandies*, 2001).

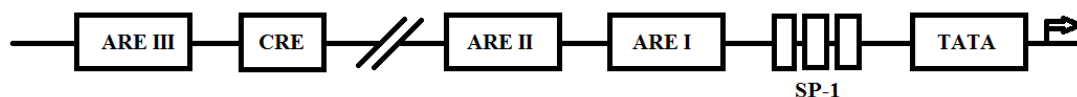
Zvýšené množství PSA v krevním séru může signalizovat výskyt karcinomu prostaty, proto je PSA používán jako biomarker při diagnóze tohoto onemocnění (Nash *et Melezinek*, 2000).

### 2.2.1 Regulace exprese PSA

Exprese PSA je primárně aktivována androgeny a regulována AR na úrovni transkripce. Androgenový receptor reguluje expresi PSA prostřednictvím tří oblastí AREs umístěnými v promotoru a u genu PSA v místě zesilovače (upstream enhancer). Promotor PSA obsahuje TATA box, ARE I, ARE II a SP-1 (Sadar *et al.*, 1999). ARE I obsahuje sekvenci, která se vyznačuje nejvyšší afinitou k vazbě AR (Riegman *et al.*, 1991). ARE II interaguje s jinými oblastmi AREs pro zvýšení transkripčního potenciálu promotoru. Úsek genu PSA „upstream enhancer“ obsahuje ARE III a významně se uplatňuje při androgenstimulované expresi PSA (Cleutjens *et al.*, 1996). Přídavné ARE (Huang *et al.*, 1999) a CRE (cAMP response element) souvisí s vysokou aktivitou AR (Sadar *et al.*, 1999) (obr. II). Není ovšem jasné, jestli transkripční faktory citlivé k cAMP regulují expresi genu PSA vazbou na toto místo (Kim *et Coetzee*, 2004).

Transkripce PSA vyžaduje vazbu různých proteinů, které se váží na androgenový receptor přímo (primární koaktivátory) nebo nepřímo (sekundární koaktivátory) (Rosenfeld *et Glass*, 2001).

**Obr. II:** Struktury promotoru a „upstream enhancer“ genu PSA (upraveno podle Kim *et Coetzee*, 2004)



## 2.3 Koregulátory androgenového receptoru

Koregulátory jsou biologické makromolekuly proteinového původu, které mění ligandovou specifitu AR a jeho schopnost vázat se na DNA (Richter *et al.*, 2007).

Podstatou změny transkripční aktivity způsobené vazbou koregulátorů na AR jsou změny ve struktuře chromatinu (Jerónimo *et al.*, 2011). Tyto změny zahrnují nejčastěji acetylaci, metylaci a forforylaci. Androgenový receptor je cílem přímé acetylace a deacetylace (Wang *et al.*, 2004). Acetylace mění afinitu histonů k DNA, která vede k otevření chromatinu, který je následně transkribován. Deacetylace způsobuje uzavření chromatinu a umlčení transkripce. Za acetylaci chromatinu je zodpovědný enzym histonová acetyltransferáza (HAT – histone acetyltransferase). Deacetylace je způsobena enzymem histonová deacetyláza (HDAC – histone deacetylase) (Jerónimo *et al.*, 2011).

Mezi koregulátory jsou řazeny koaktivátory a korepresory. Obecně platí, že koaktivátory zvyšují transkripční aktivitu a korepresory transkripční aktivitu naopak snižují. Mutace koaktivátorů a korepresorů mohou vést k nesprávné funkci AR a způsobovat tak různé nemoci mj. karcinom prostaty (Katzenellenbogen *et al.*, 1996).

### 2.3.1 Koaktivátory androgenového receptoru

Koaktivátory jsou proteiny, které se váží na aktivovaný AR a zlepšují jeho schopnost aktivace cílového genu (Bevan *et al.*, 1999). Koaktivátory ovlivňují jevy vedoucí k iniciaci transkripce. Ovlivňují změnu struktury chromatinu, shromáždění pre-iniciačního komplexu na promotoru cílového genu nebo pohyb RNA polymerázy podél genu (Powell *et al.*, 2004).

#### 2.3.1.1 Koaktivátory SRCs

Mezi nejlépe prostudované koaktivátory jaderných receptorů patří komplex koaktivátorů SRCs (steroid receptor coactivators, také p160). Je to komplex tří příbuzných proteinů o velikosti 160 kDa. Těmito třemi proteiny jsou SRC-1, SRC-2 (také GRIP1 – glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nebo TIF2 – transcriptional intermediary protein 2) a SRC-3 (také ACTR – activator of thyroid and retinoic acid receptor nebo AIB1 – amplified in breast cancer 1 nebo RAC3 – receptor-associated coactivator 3 nebo TRAM1 – thyroid activator molecule 1) (Trtková *et al.*, 2007).

Na N-terminálním konci SRCs proteinů se vyskytuje doména bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim) (Kim *et al.*, 2003). Tato konzervovaná doména slouží pro interakci s transkripčními faktory (Belandia *et Parker*, 2000, Chen *et al.*, 2000). Za interakci koaktivátoru s receptorem zodpovídá centrální doména koaktivátoru, s motivem LXXLL (L – leucin, X – jakákoliv aminokyselina) motivem (Heery *et al.*, 1997). Na C-terminálním konci SRC se objevují domény AD1 a AD2 (activation domain), které váží sekundární koaktivátory. AD1 váže acetyltransferázy p300 a CBP (CREB-binding protein). Tato vazba je důležitá pro aktivaci transkripce prostřednictvím SRCs (Xu *et al.*, 2009). AD2 interaguje s metyltransferázami CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) a PRMT1 (protein arginine methyltransferases) (Brown *et al.*, 2003).

Struktura SRC zajišťuje vazbu přídavných koregulátorů a transkripčních faktorů. Výsledkem této vazby je změna struktury chromatinu, shromáždění transkripčních faktorů, produkce RNA polymerázy II a její vazba na DNA, čímž je aktivována transkripce (Xu *et Li*, 2003, Zhang *et al.*, 2004).

Měnicí se koncentrace a aktivita SRCs je hlavním faktorem při regulaci genové exprese. Mimobuněčné podněty prostřednictvím hormonů, růstových faktorů a cytokininů mají za následek post-translační modifikace SRCs, které určují stabilitu proteinů a transkripční specifitu a aktivitu SRC (Xu *et al.*, 2009).

Neřízené post-translační modifikace SRC hrají významnou roli například při výskytu karcinomů (Xu *et al.*, 2009).

### **2.3.1.2 Koaktivátory CBP a p300**

Proteiny CBP (CREB-binding protein) a p300 jsou homologními koaktivátory. Interagují s transkripčními faktory a díky své acetyltransferázové aktivitě mění strukturu chromatinu (Trtková *et al.*, 2007). Ve struktuře CBP a p300 se nachází bromo-doména, která se váže na acetylované konce histonů. Dále se ve struktuře těchto koaktivátorů nachází CH1, CH2 a CH3 regiony (cysteine (C)-histidine (H)-rich region) a doména HAT. Nedílnou součástí HAT domény je tzv. zinkový prst (Bordoli *et al.*, 2001), jehož hlavní funkcí je vazba na nukleozom (Ragvin *et al.*, 2004), přičemž pro koaktivátor p300 je zinkový prst postradatelný (Bordoli *et al.*, 2001).

Koaktivátory CBP a p300 jsou také označovány jako sekundární, protože se na cílový gen váží prostřednictvím koaktivátorů SRC, čímž zesilují jejich transkripční aktivitu.

Sekundární koaktivátory také podporují postup celého transkripčního mechanismu k jadernému receptoru (Culig *et al.*, 2004).

### 2.3.1.3 Koaktivátory Tip60

Dalším typem koaktivátorů s acetyltransferázovou aktivitou, který putuje mezi cytoplasmou a jádrem (Culig *et al.*, 2004), je koaktivátor Tip60 (Tat-interactive protein) o velikosti 60 kDa (Gaughan *et al.*, 2002). Tip60 interaguje s androgenovým receptorem a to přímo prostřednictvím LBD domény (Brady *et al.*, 1999) nebo navázáním na doménu HAT acetyluje histonové proteiny (Yamamoto *et al.*, 1997). Vazba Tip60 na AR je závislá na motivu LXXLL přítomném na C-terminálním konci Tip60 (Gaughan *et al.*, 2001).

Pro vazbu Tip60 na AR je potřebná přítomnost androgenu. Ovšem v na androgenech-nezávislých liniích buněk byla pozorována vazba Tip60 na AR i bez přítomnosti androgenů, což by mohlo vysvětlovat expresi genů regulovaných androgenovým receptorem při návratu (relapsu) onemocnění karcinomu prostaty (Culig *et al.*, 2004).

### 2.3.1.4 Koaktivátor NcoA4

Studie poukazují na roli koaktivátorů, které se nevyznačují acetyltransferázovou aktivitou (Alen *et al.*, 1999). Mezi tyto koaktivátory patří NcoA4 (nuclear receptor coactivator 4, také ARA70 – androgen receptor-associated protein 70), který není spřízněn s žádnou proteinovou rodinou. Gen pro tento protein se nachází na chromosomu 10 a skládá se z deseti exonů (Kollara *et al.*, 2012).

NCoA4 je známý ve dvou variantách. „Full-length“ NcoA4 $\alpha$  o molekulové hmotnosti 70 kDa je tvořen 614 aminokyselinami (Yeh *et al.*, 1996) a kratší NcoA4 $\beta$  o molekulové hmotnosti 35 kDa, dlouhý 286 aminokyselin (Alen *et al.*, 1999). Ve struktuře NcoA4 se nachází peptid ARA70N a peptid ARA70-N2, které interagují s doménou aktivovaného androgenového receptoru – LBD. Další tři peptidy, ARA70-N1, ARA70-C a peptid obsahující motiv LXXLL, nejsou interakce s doménou LBD schopny. Interakce NcoA4 a AR se uskutečňuje pomocí motivu FXXLF (F – fenylalanin, L – leucin, X – jakákoliv aminokyselina), který je přítomný ve struktuře peptidu ARA70-N2, proto je tento úsek pro NcoA4 nepostradatelný. Klasický motiv LXXLL se uplatňuje při reakci NcoA4 s jinými receptory (Hu *et al.*, 2004). NcoA4 $\beta$  neobsahuje úsek s motivem FXXLF, přesto ale s AR reaguje, a to výhradně v oblasti N-terminálního konce AR (Peng *et al.*, 2008).



NcoA4 postrádá acetyltransferázovou aktivitu, ale reaguje s p/CAF (p300/cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (CBP)-associated factor) (Alen *et al.*, 1999), tudíž je možné, že NcoA4 ovlivňuje tvorbu komplexu p/CAF – receptor (Kollara *et Brown*, 2012). NcoA4 je oproti p 160 lokalizován přednostně v cytoplasmě, kde pravděpodobně zvyšuje aktivitu receptoru, ovlivňuje přesun receptoru do jádra a receptorovou stabilitu (Hu *et al.*, 2004).

### **2.3.2 Korepresory androgenového receptoru**

Korepresory AR působí na vazbu agonisty na AR, na deasociaci komplexu AR-chaperon, translokaci do jádra a vazbu AR na cílový gen a tím ovlivňují transaktivaci AR.

#### **2.3.2.1 Korepresory SMRT a NCoR**

Nejlépe prozkoumanou skupinou korepresorů které váží enzymy histonových deacetyláz je SMRT (silencing mediator of retionic and thyroid hormone receptors) a příbuzný NCoR (nuclear receptor corepressor) (Ordentlich *et al.*, 2001, Wagner *et al.*, 1998).

SMRT se váže na doménu LBD doménu androgenového receptoru a tato vazba může být posílena přítomností domény DBD a oblasti „hinge region“. SMRT může interagovat s AR v přítomnosti i nepřítomnosti agonisty nebo antagonisty (Wang *et al.*, 2004).

NCoR interaguje s AR přímo, a to v přítomnosti i nepřítomnosti androgenů. Interakci mezi AR a NCoR zprostředkovává C-terminální konec koaktivátoru (Cheng *et al.*, 2002).

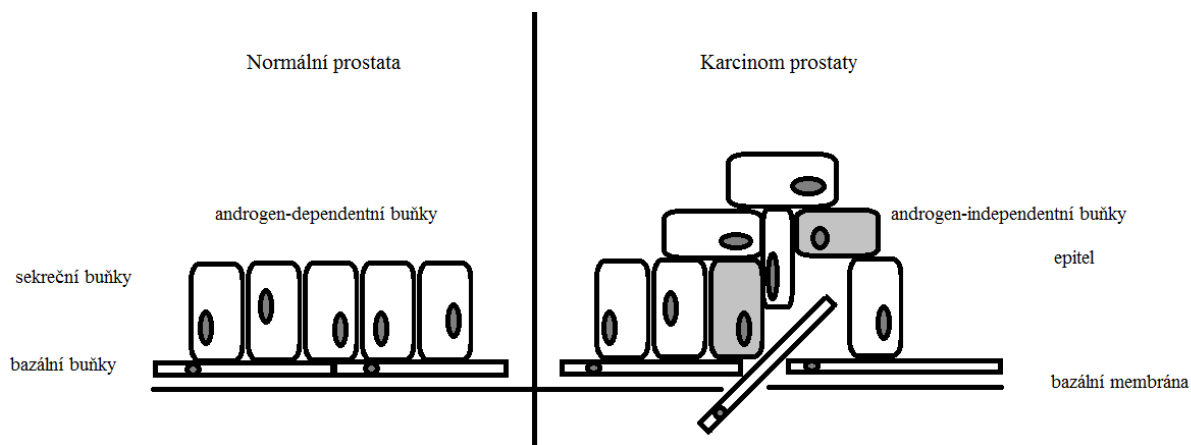
Inhibiční aktivita SMRT i NCoR spočívá ve vazbě histonových deacetyláz nebo inhibici vazby C-terminálního konce AR s jeho N-terminálním koncem. SMRC je také schopný kompetice s koaktivátory, kdy NCoR potlačuje transaktivaci zabráněním vazby koaktivátoru na AR (Wang *et al.*, 2004).

## **2.4 Karcinom prostaty**

Karcinom prostaty vzniká ze žláзовého epitelu zadního laloku prostaty. Normální prostatu tvoří sekreční epiteliální buňky, které exprimují PSA, a bazální epiteliální buňky, které PSA neexprimují. Dále je normální prostata tvořena buňkami stromatu a bazální membránou (obr. III). Na androgenech je závislé pouze přežití sekrečních epiteliálních buněk.

Růst prostatických buněk je závislý na androgenech, ale jsou schopné přežít i bez přítomnosti androgenu (Kolář *et al.*, 2003).

**Obr. III:** Rozdíl mezi normální prostatou a karcinomem prostaty (upraveno podle Kolář *et al.*, 2003)



#### 2.4.1 Vliv androgenového receptoru na vznik karcinomu prostaty

Androgeny, které v těle kolují po období puberty i po vývoji a růstu prostaty, udržují sekreční funkci prostaty. V případě vzniku karcinomu prostaty dochází k obnově růstu buněk na androgenech závislých (androgen-dependentní). Cílem léčby je odstranění androgenů chemickou nebo chirurgickou kastrací. Tato terapie zpočátku vede k zastavení růstu nádoru a k jeho regresi, ale po určité době se nádorové onemocnění, i přes absenci androgenů a přítomnost anti-androgenů, vrací. Většina progredujících nádorů prostaty se vyznačuje expresí AR (Powell *et al.*, 2004). Aktivace AR, která není způsobena vazbou androgenu, může být způsobena mutacemi AR, nadměrným výskytem koregulačních proteinů, post-translačními modifikacemi nebo pozměněnou aktivitou koregulatorů androgenového receptoru. Příčinou abnormální aktivity AR může být také změna signální transdukce podporující vazbu mezi AR a koaktivátorem nebo potlačující vazbu AR a korepresoru (shrnutí v Dehm *et Tindall*, 2007). Tato aktivace AR přispívá k na androgenech nezávislému (androgen-independentnímu) stavu onemocnění (Powell *et al.*, 2004).

V jádrech nádorových buněk stimulovaných AR se shromažďuje PSA (Saxena *et al.*, 2012). Zvýšená hladina PSA podporuje transaktivaci AR indukovanou NcoA4 (nuclear receptor coactivator 4). Toto se děje ovlivněním signální dráhy p53, což má za následek potlačení apoptózy a zvýšení proliferace buněk nádoru prostaty (Niu *et al.*, 2008).

Na androgenech nezávislý stav nádorových buněk je podporován koaktivátorem NcoA4, který interaguje s AR a ovlivňuje jeho aktivitu nejen v přítomnosti agonisty, ale také v přítomnosti antagonisty. Může tedy přispívat k aktivaci AR v přítomnosti anti-androgenu, čímž se buňky stávají na androgenech nezávislémi (Rahman *et al.* 2003). Koaktivátor NcoA4 mohl byt tak mohl být potenciálním cílem při léčbě karcinomu prostaty (Hu *et al.*, 2004).

#### 2.4.2 Epigenetické modifikace způsobené HDAC

Změny v expresi supresorových genů bývají u nádorových onemocnění způsobeny mutacemi. Příčinou mohou být také epigenetické modifikace, které mohou ovlivňovat genovou transkripci, jako jsou metylace a demethylace DNA (a také histonů) nebo acetylace a deacetylace (Kim *et Bae*, 2011).

Rovnováha mezi acetylacemi a deacetylacemi, která je obvykle striktně regulována, je narušena v případě výskytu nádorových nebo i jiných nemocí (Kim *et Bae*, 2011). Pro buňky nádorových linií je typická vysoká hladina HDACs, které způsobují hypo-acetylaci histonových proteinů (Yoo *et Jones*, 2006, Nakagawa *et al.*, 2007).

Doposud bylo detekováno osmnáct HDACs, které jsou rozdělovány do čtyř skupin. V aktivním místě enzymů skupiny I, II a IV se nachází molekula zinku. Histonové deacetylázy patřící do skupiny IV místo zinku obsahují NAD<sup>+</sup> (tab. I).

**Tab. I:** Skupiny HDACs (upraveno podle Lane *et Chabner*, 2009)

Skupina	Enzym	Lokalizace	Přítomnost Zn <sup>2+</sup>
I	HDAC 1, HDAC 2, HDAC 8	jádro	ano
IIa	HDAC 4, HDAC 5, HDAC 7, HDAC 9	jádro, cytoplasma	ano
IIb	HDAC6, HDAC 10	cytoplasma	ano

Skupina	Enzym	Lokalizace	Přítomnost Zn <sup>2+</sup>
III	"Sirtuins" 1 - 7	variabilní	ne
IV	HDAC 11	jádro, cytoplasma	ano

### 2.4.3 Inhibitory histonových deacetyláz

Novou skupinou proti-nádorových látek jsou inhibitory histonových deacetyláz, které ovlivňují aktivitu transkripčních faktorů. Tyto látky hrají roli jak v epigenetické, tak v non-epigenetické regulaci. Způsobují apoptózu a potlačují buněčný cyklus nádorových buněk (Blander *et Guarente*, 2004). Hyper-acetylace způsobená vlivem inhibitorů HDACs podporuje vazbu transkripčního faktoru na DNA (Lane *et Chabner*, 2009).

Inhibitory HDACs podporují expresi genu p21, který reguluje buněčný cyklus. Vlivem inhibice HDACs také dochází k blokaci komplexu cyklin/CDK (cyclin-dependent kinase) (Richon *et al.*, 2000, Sandor *et al.* 2000), který je důležitý pro to, aby se buňka dostala do mitózy (Kolář *et al.*, 2003) a k následnému potlačení buněčného cyklu a zastavení diferenciaci buněk (Richon *et al.*, 2000, Sandor *et al.* 2000). K hyper-acetylaci vlivem inhibitorů HDACs dochází jak v nádorových, tak v normálních buňkách, ale pro normální buňky jsou inhibitory histonových deacetyláz relativně netoxické (Richon *et al.*, 1998, Butler *et al.*, 2000).

Inhibitory HDACs se váží na molekulu zinku v aktivním místě enzymu a tak jsou schopny potlačit enzymovou aktivitu (Kim *et Bae*, 2011). Kvůli přítomnosti NAD<sup>+</sup> v aktivním místě skupiny IV histonových deacetyláz, nemají inhibitory na tuto skupinu vliv (Blander *et Guarente*, 2004).

Inhibitory HDACs jsou podle své struktury děleny do čtyř tříd – hydroxamové kyseliny, cyklické peptidy, alifatické kyseliny a benzamidy (tab. II). Funkční skupinou hydroxamátů, mezi které patří SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) a SBHA (suberohydroxamic acid), je sulfidrilová skupina, která je schopna reagovat se zinkem v aktivačním místě histonové deacetylázy (Furumai *et al.*, 2002). Skupina alifatických

kyselin, do které patří butyrát sodný nebo fenylbutyrát, má poměrně slabou inhibiční aktivitu (Xu *et al.*, 2007).

Inhibice HSP90 (heatshock protein 90) způsobená inhibitory HDACs vede k inaktivaci ochranné funkce chaperonu a následkem je degradace nádorového proteinu (Kim *et Bae*, 2011).

**Tab. II:** Třídy inhibitorů HDACs a jejich účinné koncentrace *in vitro* (upraveno podle Lane *et Chabner*, 2009)

Třída	Inhibitor	HDAC specifita	Účinná koncentrace
Hydroxamové kyseliny	Vorinostat (Zolinza), suberoylanilide hydroxamic acid	I, II, IV	μmol/l
	Trichostatin A (TSA)	I, II, IV	μmol/l
	LAQ824	I, II, IV	nmol/l
	Panobinostat (LBH589)	I, II, IV	nmol/l
	Belinostat (PXD101)	I, II, IV	μmol/l
	ITF2357	I, II, IV	μmol/l
Cyklické peptidy	Depsipeptide (romidepsin, FK228)	I (hlavně HDAC 1, 2)	μmol/l
Benzamidy	Entinostat (SNDX-275/MS-275)	I (hlavně HDAC 1, 2, 3)	μmol/l

Třída	Inhibitor	HDAC specifita	Účinná koncentrace
Benzamidy	Entinostat (SNDX-275/MS-275)	I (hlavně HDAC 1, 2, 3)	μmol/l
	MGCD0103	I	nmol/l
Alifatické kyseliny	Valproic acid	I, IIa	mmol/l
	Phenylbutyrate	I, IIa	mmol/l
	AN-9, pivanex	není známo	μmol/l

### 3 Materiál a metodika

V experimentální části bakalářské práce byly použity prostatické nádorové buněčné linie PC3, DU145 (ATCC, Rockville, Maryland, USA) a C4-2 (UroCor Labs, Oklahoma City, Oklahoma, USA). Všechny tyto tři buněčné linie jsou na androgenech nezávislé (androgen – nesenzitivní).

#### 3.1 Detekce viability buněk

##### 3.1.1 MTT test

MTT test je založený na schopnosti živých buněk redukovat MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) na modrý formazan. Tato reakce probíhá za pomoci mitochondriální dehydrogenázy a intenzita modrého zbarvení produktu je měřitelná pomocí spektrofotometru (Carmichael *et al.*, 1987).

Při tomto experimentu byly na dvě mikrotitrační destičky s 96 jamkami do 100  $\mu$ l média DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) nasazeny prostatické buněčné linie PC3 a DU145 (příloha I – II). Buněčná linie C4-2 (příloha III) byla nasazena na mikrotitrační destičku do 100  $\mu$ l média RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Oba typy medií byly bez FBS (fetální bovinní sérum). Ve všech případech bylo použito  $4,5 \times 10^3$  –  $5 \times 10^3$  buněk na jamku. Po 24hodinovém hladovění buněk inkubovaných při 37 °C a v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> bylo k médiu přidáno 50  $\mu$ l odpovídajícího média, které obsahovalo FBS a trojnásobnou koncentraci testovaných látek – NaB (sodium butyrate) (příloha IV, VI, VIII), SBHA (suberoyl bis-hydroxamic acid) a SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid). V případě testované látky NaB byl jako kontrola použit roztok 0,3% DMSO (dimethyl sulfoxide) a v případě SBHA byl použit roztok 0,03% DMSO (tab. III). Roztoky s těmito koncentracemi byly použity při přípravě roztoků testovaných látek (tab. IV - IX).

Buňky byly ovlivňovány po dobu 24, 48 a 96 hodin. V případě 96hodinového ovlivnění bylo médium po 48 hodinách vyměněno. Poté bylo do jamek přidáno 10  $\mu$ l MTT. Po 4hodinové inkubaci byla reakce zastavena přidáním 100  $\mu$ l 10% SDS (sodium laureth sulfate). Buňky byly po dobu minimálně 20 minut umístěny do inkubátoru o teplotě 37 °C. Měření absorbance bylo prováděno při vlnové délce 570 nm.

**Tab. III:** Složení roztoků média a DMSO jako negativní kontroly pro MTT (10 ml)

Trojnásobná koncentrace	DMSO (100%) [ $\mu$ l]	DMEM/RPMI médium [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace
0,3% DMSO	3	997	0,10%
0,03% DMSO	30	970	0,01%

**Tab. IV:** Složení roztoků testované látky SAHA pro MTT (1 ml)

	DMSO (0,03%) [ $\mu$ l]	SAHA (100 mmol/l) [ $\mu$ l]	SAHA (0,03 mmol/l)	Konečná koncentrace
SAHA 30 $\mu$ mol/l*	9997	3	-	10 $\mu$ mol/l
SAHA 22,5 $\mu$ mol/l	250	-	750	7,5 $\mu$ mol/l
SAHA 15 $\mu$ mol/l	500	-	500	5 $\mu$ mol/l
SAHA 7,5 $\mu$ mol/l	750	-	250	2,5 $\mu$ mol/l

\*Objem 10 ml; použit jako pracovní roztok pro přípravu nižších koncentrací SAHA

**Tab. V:** Složení roztoků testované látky SBHA pro MTT (1ml)

	DMSO (0,03%) [ $\mu$ l]	SBHA (1 mmol/l) [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace
SBHA 61,26 mmol/l	938,7	61,26	20,42 mmol/l
SBHA 6,12 mmol/l	993,87	6,126	2,042 mmol/l



	DMSO (0,03%) [ $\mu$ l]	SBHA (1 mmol/l) [ $\mu$ l]	Konečná koncentrace
SBHA 0,3 mmol/l	999,3	0,3	0,03 mmol/l

**Tab. VI:** Složení roztoků testované látky NaB pro MTT (1 ml)

	DMSO (0,03%) [ $\mu$ l]	NaB (500 mmol/l)	NaB (15 mmol/l)	Konečná koncentrace
NaB 15 mmol/l*	9700	300	-	5 mmol/l
NaB 5 mmol/l	800	-	200	1 mmol/l

\*Objem 10 ml; použit jako pracovní roztok pro přípravu nižší koncentrace NaB

### 3.1.2 Systém xCelligence

Systém xCelligence využívá aktuálního stavu impedance – elektrického odporu v prostředí, kterým prochází střídavý elektrický proud – ke kontinuálnímu monitorování viability, migrace a invaze buněk v reálném čase (Atienza *et al.*, 2006).

Buňky příslušné buněčné linie jsou nasazovány na elektronické destičky, které jsou spojeny se zlatými mikroelektrodami. Působením střídavého proudu (méně než 20 mV) vzniká mezi mikroelektrodami elektrické pole. Mikroelektrody jsou v kontaktu s médiem a mohou tak reagovat na počet buněk pokrývajících elektrody, morfologii buněk a jejich přilnavost k povrchu. Tyto faktory mění elektrickou impedanci, která je analyzována použitím RTCA software 1,2. (Ziebolz *et al.*, 2010).

Pro systém xCelligence byly použity buňky linie C4-2. Do jamek elektrických destiček byly do 150  $\mu$ l média RPMI (bez FBS) nasazeny buňky ( $4 \times 10^4$  buněk/jamka) a po 24 hodinách bylo do jamek přidáno 50  $\mu$ l média obsahujícího čtyřnásobnou koncentraci testovaných látek (tab. VII). Jako kontrola bylo použito 0,04% DMSO (výsledná koncentrace byla 0,01%), které bylo připraveno smísením 0,04  $\mu$ l 100% DMSO a 999,6  $\mu$ l média RPMI.

Roztok 0,04% DMSO byl dále použit jako pracovní roztok pro přípravu roztoků testovaných látek. Buňky byly ovlivňovány a monitorovány po dobu 24, 48 a 96 hodin. Po uplynutí této doby byly hodnoceny výsledné grafy.

**Tab. VII:** Složení roztoků testovaných látek SAHA a SBHA pro stanovení xCelligence (1 ml)

	SAHA (100 mmol/l) [μl]	SBHA (1 mol/l) [μl]	DMSO (0,04%) [μl]	Konečná koncentrace
SAHA 0,4 μmol/l	0,4	-	999,6	0,01 mmol/l
SAHA 0,2 μmol/l	0,2	-	999,8	0,005 mmol/l
SBHA 0,4 mmol/l	-	0,4	999,6	0,1 mmol/l
SBHA 81,68 mmol/l	-	81,68	918,32	20,42 mmol/l

### 3.2 Kultivace a ovlivňování buněčných linií

Pro ovlivňování testovanými látkami SAHA a SBHA byla použita buněčná linie C4-2. Podle výsledků systému xCelligence byla zvolena délka ovlivnění 48 a 72 hodin pro následnou izolaci proteinů z ovlivněných buněk.

Prostatická buněčná linie C4-2 byla nasazena na Petriho misky (průměr 10 cm) v počtu  $1 \times 10^6$  na misku. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI při teplotě 37 °C a v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Asi po dvou dnech, kdy jejich konfluence dosáhla 60 – 80 %, bylo médium RPMI vyměněno za médium s níže uvedenými koncentracemi látek SAHA a SBHA (tab. VIII).

Pro ovlivnění testovanou látkou SAHA bylo použito osm misek. Dvě misky byly kontrolní a obsahovaly 0,03% DMSO, které bylo připraveno smísením 3 μl 100% DMSO a 9997 μl média RPMI. Buňky na třech miskách byly ovlivněny testovanou látkou SAHA

o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  a další tři misky byly ovlivněny testovanou látkou SAHA o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ . V případě ovlivnění buněk látkou SBHA byly ovlivňovány buňky kultivované opět na osmi miskách. Dvě z nich byly ovlivněny látkou SBHA o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , další dvě misky byly ovlivněny SBHA o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  a na zbývajících čtyřech miskách byly buňky ovlivňovány SBHA o koncentraci 1  $\text{mmol/l}$ .

Po 48 a 72hodinové inkubaci buněk v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  byly z buněčného lyzátu izolovány cytosolické a jaderné proteiny.

**Tab. VIII:** Složení roztoků pro jednotlivá ovlivnění (10 ml)

Typ ovlivnění	SAHA (100 mmol/l) [ $\mu\text{l}$ ]	SBHA 1 mol/l [ $\mu\text{l}$ ]	Médium RPMI [ $\mu\text{l}$ ]
SAHA 0,005 mmol/l	0,5	-	9999,5
SAHA 0,01 mmol/l	1	-	9999,9
SBHA 0,01 mmol/l	-	0,1	9999,9
SBHA 0,1 mmol/l	-	1	9999
SBHA 1 mmol/l	-	10	9990

### 3.3 Analýza proteinů

#### 3.3.1 Izolace proteinů

Z ovlivněných buněk linie C4-2 byly pomocí kitu Qproteome Cell Compartment Kit (Quiagen) izolovány cytosolické a jaderné proteiny. Extrakční pufrы byly připraveny dle návodu dodávaného výrobcem kitu (tab. IX).

Z Petriho misek bylo odsáto médium a na každou misku byly napipetovány 2 ml vychlazeného roztoku 1 x PBS. Pomocí plastové stěrky byly z povrchu misek umístěných na ledové tříšti seškrábány buňky. Suspenze buněk byla přenesena do popsaných zkumavek o objemu 15 ml. Ze dvou misek se stejným ovlivněním byla buněčná suspenze přenesena do jedné zkumavky, ze tří nebo čtyř misek se stejným ovlivněním buněk byla suspenze přenesena do dvou zkumavek. Na Petriho misky byly opět napipetovány 2 ml vychlazeného roztoku 1 x PBS a zbytky buněčné suspenze byly opět přeneseny do příslušných zkumavek. Následně byly použity 4 ml vychlazeného roztoku 1 x PBS, kterým byly misky opět důkladně opláchnuty, a roztok se zbylými buňkami byl přenesen do zkumavek. Zkumavky s buněčnou suspenzí byly centrifugovány po dobu 10 minut při 500 x g a 4 °C.

Centrifugací získaný supernatant byl opatrně odsát. Buněčný pelet byl re-suspendován ve 2 ml vychlazeného roztoku 1 x PBS a přemístěn do popsaných 1,5ml mikrozukumavek. Počet mikrozukumavek odpovídal počtu použitých ovlivnění. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 500 x g a 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a celý tento krok byl zopakován.

Buněčný pelet byl re-suspendován v 1 ml vychlazeného extračního pufru CE1 a mikrozukumavky byly umístěny po dobu 10 minut na třepačku (25 otáček/min) v chladové místnosti při teplotě 4 °C. Získaný lyzát byl centrifugován 10 minut při 1000 x g a 4 °C. Supernatant z každé mikrozukumavky byl přenesen do nové popsané mikrozukumavky. Takto získané cytosolické proteiny byly uchovány na v ledové tříšti.

Buněčný pelet byl re-suspendován v 1 ml vychlazeného extračního pufru CE2 a mikrozukumavky s roztoky byly umístěny po dobu 30 minut na třepačku ve 4 °C. Po centrifugaci při 6000 x g a 4 °C byl supernatant opatrně odstraněn.

Do každé mikrozukumavky bylo přidáno 7 µl nukleázy Bensoase a 13 µl destilované vody. Buněčný pelet byl re-suspendován a 15 minut inkubován při pokojové teplotě. Do každé mikrozukumavky bylo přidáno 500 µl vychlazeného extračního pufru CE3, suspenze byla promíchána a po dobu 10 minut umístěna na třepačku ve 4 °C. Následnou 10minutovou centrifugací při 6800 x g a 4 °C byly získány jaderné proteiny, které byly přeneseny do nových popsaných mikrozukumavek a umístěny do ledové tříště. Získané cytosolické a jaderné proteiny byly uchovávány při -80 °C.

**Tab. IX:** Příprava extrakčních pufřů

Puřř	Celkový objem [ml]	Roztok inhibitoru proteasy [ $\mu$ l]
CE1	1	10
CE2	1	10
CE3	0,5	5

### 3.3.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v cytosolické a jaderné frakci byla zjiřřena pomocí metody Bradfordové.

Podle počtu vzorků bylo stanoveno množství činidla Bradfordové, které bylo získáno smísením činidla Bradfordové (BioRad) se sterilní deionizovanou vodou v poměru 1 : 4. Do zkumavy byl umístěn navlhčený filtrační papír, přes který byl roztok činidla Bradfordové filtrován v tmavé místnosti při 4 °C.

Jako standard byl použit gamaglobulin (1 mg/ml), který byl do mikrotitrační destičky s 96 jamkami napipetován v sestupné koncentrační řadě. Jako první byl do jamek nanesen gamaglobulin v těchto objemech: 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, 5  $\mu$ l a 10  $\mu$ l. Poté bylo do jamek ve shodném pořadí přidáno 9  $\mu$ l, 8  $\mu$ l, 7  $\mu$ l, 6  $\mu$ l, 5  $\mu$ l a 0  $\mu$ l sterilní deionizované vody.

Do tří jamek (triplet) byl přenesen vždy 1  $\mu$ l daného vzorku, ke kterému byl přidán 1  $\mu$ l sterilní deionizované vody. Následně bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l naředěného činidla Bradfordové. Stejný objem tohoto činidla byl použit jako slepý vzorek (blank). Slepý vzorek byl nanášen také ve třech opakováních.

U vzorků byla na spektrofotometru měřena absorbance při 595 nm. Podle získaných hodnot absorbance byla sestavena kalibrační křivka, na jejímž základě byly vypočteny koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích (přiloha X).

### 3.3.3 Western blot analýza (Imunoblot)

Western blot spočívá v přenesení separovaných proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu působením elektrického proudu a následné imunodetekci.

Pro rozdělení proteinů podle jejich velikosti v polyakrylamidovém gelu byla použita horizontální elektroforetická separace (SDS – PAGE).

Pro přenesení proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu byla zvolena metoda blotování (semi-dry) a vizualizace proteinů spočívala v nepřímé imunodetekci specifických protilátek.

#### 3.3.3.1 Elektroforéza

Na základě stanovených koncentrací bylo vypočteno, kolik  $\mu\text{l}$  daného vzorku obsahuje 30  $\mu\text{g}$  proteinů a toto množství bylo doplněno pufrům 1 x LBS (4 x LBS) do objemu 50  $\mu\text{l}$ . Standard molekulové hmotnosti byl připraven smísením 2  $\mu\text{l}$  hmotnostního standardu (Full Range Molecular Weight Marker Rainbow, Sigma-Aldrich) a 38  $\mu\text{l}$  1 x LSB pufru.

Pro elektroforetickou separaci proteinů byl použit 10% dělicí gel a 5% zaostřovací gel (tab. X). Po sestavení aparatury pro elektroforézu byl do aparatury mezi skla o tloušťce 1,5 mm nalit dělicí gel, který byl převrstven N-butanolem. Po 30minutové polymeraci dělicího gelu byl N-butanol vylit a jeho zbytky byly odstraněny pomocí filtračního papíru a promytím 1 mol/l Tris – HCl pufru pH 6,8. Na dělicí gel byl nalit roztok zaostřovacího gelu, do kterého byl umístěn hřeben. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl odstraněn hřeben.

Gel byl vyjmut z aparatury, jamky byly promyty elektroforetickým pufrům a gel byl umístěn do elektroforetické komůrky. Do příslušného oddílu elektroforetické komůrky byl nalit elektroforetický pufr a jamky byly ještě jednou tímto pufrům promyty. Jako první byl napipetován standard molekulové hmotnosti. Vzorky byly po 1minutové inkubaci v termobloku při 100°C (denaturace proteinů) a krátkém centrifugování na stolní mini centrifuze napipetovány do dalších jamek. Po napipetování všech vzorků byla elektroforetická komůrka doplněna elektroforetickým pufrům. Na elektroforetickou komůrku byl připevněn kryt, který byl následně připojen ke zdroji elektrického napětí. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 minut při 80 V a následně 2 – 3 hodiny při 100 V.

**Tab. X:** Složení 5% zaostřovacího a 10% dělicího polyakrylamidového gelu

Složka	5% zaostřovací gel [ml]	10% dělicí gel [ml]
Akrylamid/N,N-bisakrylamid (29 : 1)	1	6,7
Deionizovaná voda	4,1	7,9
Tris – HCl 1 mol/l (pH 6,8)	0,75	-
Tris – HCl 1,5 mol/l (pH 8,8)	-	5
10% SDS	0,06	0,2
10% APS	0,06	0,2
TEMED	0,006	0,008

### 3.3.3.2 Blotování (přenesení proteinů na membránu)

Skla s gelem byla vyjmuta z elektroforetické komůrky a byla od sebe oddělena. Byl odstraněn zaostřovací gel a dělicí gel byl umístěn do transferového pufru, ve kterém byl po dobu 20 minut umístěn na třepačku (55 otáček/minutu). Membrána a filtrační papíry byly v transferovém pufru promývány 5 minut.

Blotovací zařízení bylo lehce navlhčeno transferovým pufrem. Na navlhčeném místě byl sestaven blotovací můstek (filtrační papír, membrána, gel filtrační papír). Při každém kroku byla použita skleněná tyčinka pro stlačení můstku a transferový pufr pro navlhčení. Aparatura byla přikryta víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí. Přenos proteinů na membránu probíhal 40 minut při 20 V.

### 3.3.3.3 Imunodetekce

Membrána byla po dobu 5 minut barvena v Ponceau S a poté bylo pozadí odbarveno pomocí 10% kyseliny octové. Z membrány byly odříznuty úseky, které podle standardu odpovídaly molekulové hmotnosti sledovaných proteinů – AR (110 a 112 kDa) a ARA70 (70 kDa). Z membrány byly také získány proužky odpovídající molekulové hmotnosti GAPDH (37 kDa) a Lamin A/C (28 a 70 kDa). Tyto části membrány byly použity jako kontroly (GAPDH pro cytosolické proteiny a Lamin A/C pro jaderné proteiny).

Proužky odpovídající molekulové hmotnosti AR byly promývány v pufru 1 x PBS a proužky membrány odpovídající molekulové hmotnosti ARA70, GAPDH a Lamin A/C v pufru 1 x TBS. Promývání probíhalo 3 minuty na třepačce při pokojové teplotě. Následovalo 1 – 2hodinové blokování nespecifických vazebných míst na membráně pomocí blokovacího pufru. Poté byla membrána odpovídající molekulové hmotnosti AR promývána po dobu 3 – 5 minut v roztoku PBS s Tween 20 (1 x PBS + 0,1% Tween 20). Proužky membrány odpovídající molekulové hmotnosti ARA70, GAPDH a Lamin A/C byly promývány po stejnou dobu v roztoku TBS s Tween 20 (1 x TBS + 0,1 % Tween 20).

Proužek membrány odpovídající molekulové hmotnosti AR byl ponořen do myší monoklonální protilátky AR441 (Santa Cruz Biotechnology), která byla naředěna 5% roztokem sušeného odtučněného mléka v pufru 1 x PBS (ředění 1 : 200, objem 10 ml). Proužek membrány odpovídající molekulové hmotnosti GAPDH byl ponořen do myší monoklonální protilátky GAPDH (Sigma, ředění 1 : 10000, objem 10 ml). Proužky membrány odpovídající molekulové hmotnosti ARA70 a Lamin A/C byly umístěny do příslušných králíčích polyklonálních protilátek, které byly obě použity se stejným ředěním (1 : 1000, objem 10 ml). Membrány byly s protilátkami inkubovány přes noc na třepačce umístěné ve 4 °C.

Po odstranění primárních protilátek byly proužky membrán po dobu 45 minut promývány. Proužek membrány odpovídající molekulové hmotnosti AR byl promýván v roztoku 1 x PBS s 0,1 % Tween 20 a proužky membrány odpovídající molekulové hmotnosti ARA70, GAPDH a Lamin A/C byly promývány v roztoku 1 x TBS s 0,1% Tween 20. Promývání probíhalo na třepačce (50 otáček/minutu) při pokojové teplotě a roztoky byly po 15 minutách měněny.



Proužky odpovídající molekulové hmotnosti AR a GAPDH byly inkubovány s anti-myší (anti-mouse goat) sekundární protilátkou (ředění 1 : 6000) a proužky odpovídající molekulové hmotnosti ARA70 a Lamin A/C s anti-králičími (anti-rabbit mouse) sekundárními protilátkami (ředění 1 : 5000). Inkubace se sekundárními protilátkami probíhala při pokojové teplotě po dobu 30 nebo 45 minut na třepačce (50 otáček/minutu). Po odstranění sekundárních protilátek byly proužky membrán po dobu 45 minut promývány. Proužek membrány odpovídající molekulové hmotnosti AR byl promýván v roztoku 1 x PBS s 0,1% Tween 20 a proužky membrány odpovídající molekulové hmotnosti ARA70, GAPDH a Lamin A/C byly promývány v roztoku 1 x TBS s Tween 20. Promývání probíhalo na třepačce (50 otáček/minutu) při pokojové teplotě a roztoky byly po 15 minutách měněny.

Po přidání substrátu (SuperSignal West Dura) a 3 minutové reakci v temné místnosti následovala vizualizace chemiluminiscenčního signálu prostřednictvím přístroje LI-COR.

### 3.4 Použité roztoky

#### 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

- 1 ml 100% DMSO
- Doplnit do 10 ml sterilní deionizovanou vodou
- Přípravovat čerstvý nebo uchovávat v mrazáku

#### 10 x PBS pufr

- 160 g NaCl
- 4 g KCl
- 64,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Doplnit do 2 l sterilní deionizovanou vodou a autoklávovat
- Uchovávat při pokojové teplotě

#### 10% SDS (sodium laureth sulfate)

- 40 g SDS
- Rozpustit ve 400 ml sterilní deionizované vody
- Uchovávat v tmavé skleněné láhvi se skleněnou zátkou při pokojové teplotě

#### 10 x TBS

- 24,2 g Tris-base

- 80 g NaCl
- Rozpustit v 1 l sterilní deionizované vody

#### Blokovací pufr

- 15 ml 10x TBS
- 7,5 g sušeného odtučněného mléka
- 150 µl Tween 20
- Doplnit do 150 ml sterilní deionizovanou vodou

#### Elektroforetický pufr (5 x)

- 15,1 g Tris
- 5,09 g SDS
- 72 g glycinu
- Doplnit do 1 l sterilní deionizovanou vodou
- Uchovávat ve skleněné láhvi

#### Transferový pufr

- 2,9 g glycinu
- 5,8 g Tris
- 0,37 g SDS
- 200 ml methanolu

#### Promývací pufr

- 500 ml 1 x TBS (resp. PBS)
- 500 µl Tween 20

#### Primary antibody dilution pufr

- 2 ml 10 x TBS
- 18 ml sterilní deionizované vody
- 1 g BSA
- 20 µl Tween 20

### **3.5 Média pro práci s buněčnými kulturami**

#### DMEM

- 100 ml DMEM
- 1 ml 10% roztoku FBS

- 1 ml roztoku glutaminu o koncentraci 2 mmol/l
- 1 ml roztoku antibiotik PenStrep
- Uchovávat v lednici

#### RPMI

- 100 ml RPMI – 1640 with L – glutamin and 15 mmol/l Hepes without Sodium bicarbonate
- 1 ml 10% roztoku FBS
- 1 ml roztoku glutaminu o koncentraci 2 mmol/l
- 1 ml roztoku antibiotik PenStrep
- 1 ml roztoku pyruvátu sodného o koncentraci 100 mmol/l
- Uchovávat v lednici

### 3.6 Seznam chemikálií

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
- Akrylamid/N,N-bisakrylamid
- BSA
- Butanol (Lach – Ner)
- Butyrát sodný (Sigma – Aldrich)
- Činidlo Bradfordové – Protein Assay Dye Reagent (Bio – Rad)
- Dimethyl sulfoxid 100% (Sigma – Aldrich)
- DMEM (Gibco)
- Dodecylsulfát sodný
- Fetální bovinní sérum 100% roztok (Gibco)
- Gamaglobulin (Bio – Rad)
- Glycin (Sigma – Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan draselný
- Hydrogenfosforečnan sodný
- Chlorid draselný
- Chlorid sodný
- Kyselina chlorovodíková 35% roztok
- Kyselina octová 10%
- LSB
- Methanol

- PBS
- Peroxosíran amonný
- Protilátka ARA70 (Bethyl Laboratories Inc.)
- Ponceau S (Serva)
- Protilátka anti-králičí (Cell Signaling Technology)
- Protilátka anti-myší (Santa Cruz Biotechnology)
- Protilátka AR (441): sc-7305 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Protilátka GAPDH (Sigma)
- Protilátka Lamin A/C (Cell Signaling Technology)
- Protilátka PSA – AMACR P504S (Chemicon International a Serologicals Company)
- RPMI (Sigma – Aldrich)
- Standard molekulové hmotnosti – Full-range Rainbow (Amersham Biosciences USA)
- Suberoylanilide hydroxamová kyselina (Sigma – Aldrich)
- Suberoyl bis-hydroxamová kyselina (Sigma – Aldrich)
- SuperSignal West Dura (Thermo Scientific)
- TBS
- Tetramethylethyldiamin (Promega)
- Tris (Serva)
- Tween 20 (Serva)

### **3.7 Vybavení laboratoře**

- Automatická pipeta Pipets - akku (Hirschman Laborgerate)
- Blotovací filtrační papír
- Blotovací membrány
- Blotovací zařízení Trans-blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)
- Centrifuga MR22i (Jouan)
- Centrifugační zkumavky, 15 ml
- Digitální váha (Kern)
- Elektroforetická aparatura, skla 1,5mm, hřebeny 10 zubů (Bio-Rad)
- Flow box (MSC – Advantage)
- Chladnička (Gorenje)
- Inkubátor (Heracel)
- Mikropipety (Eppendorf)

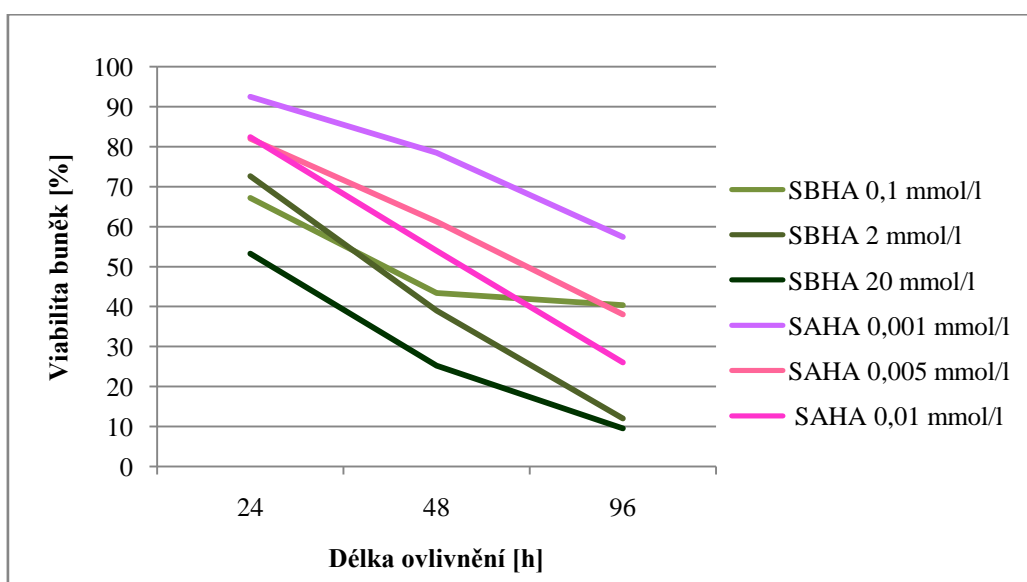
- Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
- Mikrotitrační destička, 96 jamek
- Mikrozkušavky (Eppendorf)
- Mrazicí box VX490 E (Jouan)
- Mraznička (Siemens)
- Nitroceluloseová membrána (Amersham Biosciences)
- Nůžky
- Petriho misky, 10 cm
- Pipetové nástavce (Mirschmann Laborderate)
- Plastové stěrky (Biologix Research Company)
- Skleněné kapiláry
- Skleněné pipety
- Spektrofotometr PowerWave XS (Bio-Tek)
- Sterilní jehly
- Sterilní mikrozkušavky (Eppendorf)
- Sterilní špičky (Eppendorf)
- Sterilní zkumavky, 15 ml (Gama group)
- Stolní centrifuga (Chemikalien laborbedarf)
- Talířový rotátor (Stuart)
- Termoblok – AccuBlock (Labnet)
- Třepačka Sky Line (Elmi)
- Vakuová pumpa (Millipore)
- Vodní lázeň (Biotech)
- Zdroj elektrického napětí (Mayor Science)
- Zkumavky Falcon, 50 ml

## 4 Výsledky

### 4.1 Viabilita buněk

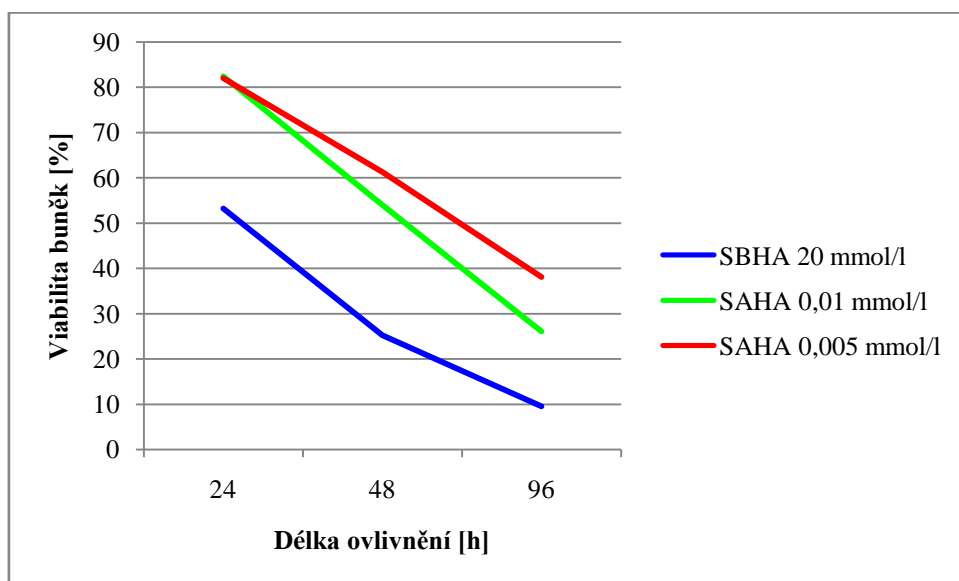
Životaschopnost (viabilita) buněk prostatické nádorové linie C4-2, které byly ovlivňovány dvěma inhibitory HDACs – SAHA a SBHA, byla zjišťována pomocí MTT testu. Byly použity tyto koncentrace SAHA – 0,001 mmol/l, 0,005 mmol/l a 0,01 mmol/l. Koncentrace 0,1 mmol/l, 2 mmol/l a 20 mmol/l byly zvoleny pro ovlivnění SBHA (obr. IV). Buňky byly ovlivňovány po dobu 24, 48 a 92 hodin. Pro kontrolní ovlivnění bylo použito 0,01% DMSO.

**Obr. IV:** Viabilita buněk po ovlivnění SAHA a SBHA a následném spektrofotometrickém stanovení (MTT test)

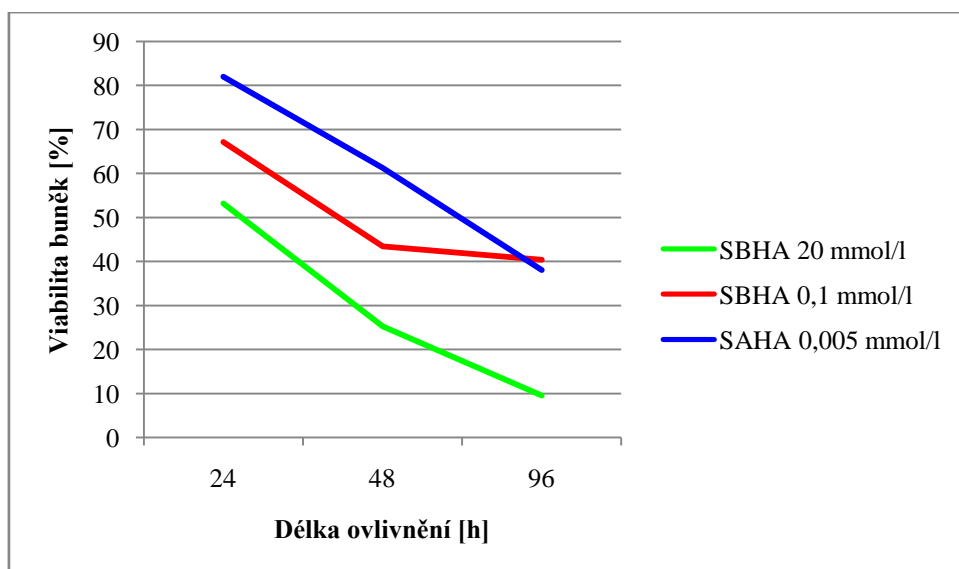


Největší cytotoxický účinek byl zjištěn u ovlivnění testovanou látkou SBHA o koncentraci 20 mmol/l, nejnižší pak u buněk ovlivněných SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l (obr. V, VI). Se zvyšující se koncentrací SAHA a SBHA se zvyšoval cytotoxický účinek těchto látek u ovlivněných buněk. Použité koncentrace testované látky SAHA byly o řád nižší než koncentrace SBHA, a přesto po 48 hodinách měla testovaná látka SAHA o koncentracích 0,005 mmol/l na buňky vyšší toxický účinek než SBHA o koncentraci 0,1 mmol/l (obr. VI). Cytotoxický účinek nejvyšší koncentrace SBHA (20 mmol/l) se po 48 hodinách nepatrně snížil (obr. V, VI).

**Obr. V:** Viabilita buněk po ovlivnění vybranými koncentracemi SAHA (0,01 mmol/l, 0,005 mmol/l) a SBHA(20 mmol/l) a následném spektrofotometrickém stanovení (MTT test)



**Obr. VI:** Viabilita buněk po ovlivnění vybranými koncentracemi SAHA (0,005 mmol/l) a SBHA (20 mmol/l, 0,1 mmol/l) a následném spektrofotometrickém stanovení (MTT test)

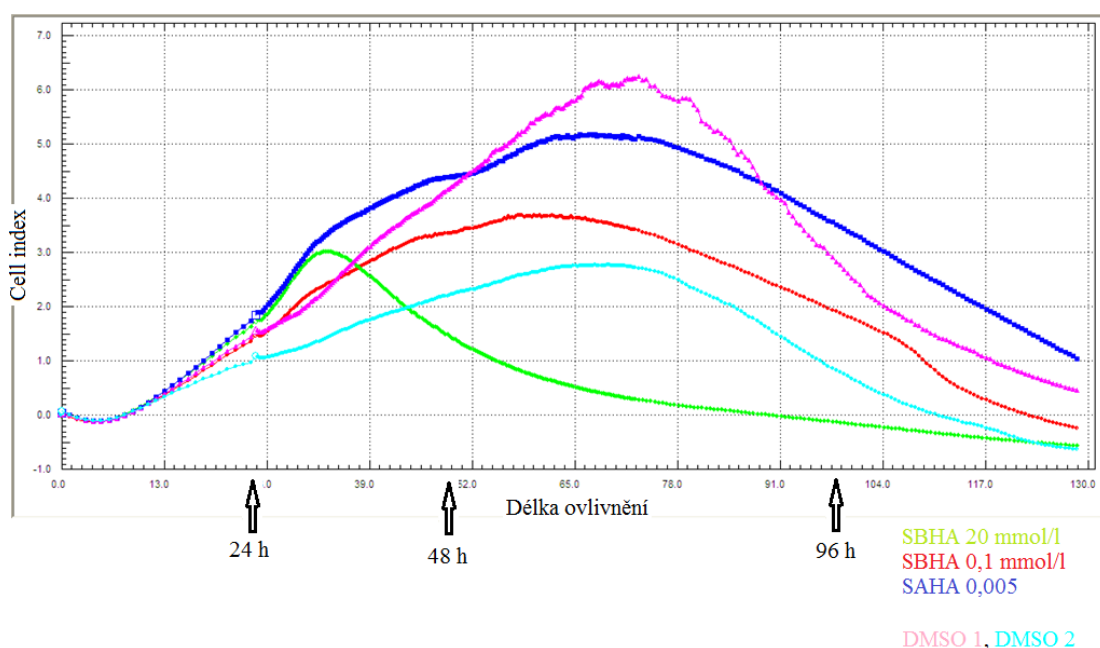


Účinek obou látek byl kontinuálně sledován u ovlivněných buněk linie C4-2 systémem xCelligene. Sledované buňky byly ovlivněny vybranými koncentracemi SAHA a SBHA (Obr. VII, VIII) tak, aby mohly být porovnány s výsledky MTT testu (Obr. V, VI). Viabilita

ovlivněných buněk byla monitorována průběžně po dobu 96 hodin. Pro kontrolní ovlivnění bylo použito 0,01% DMSO.

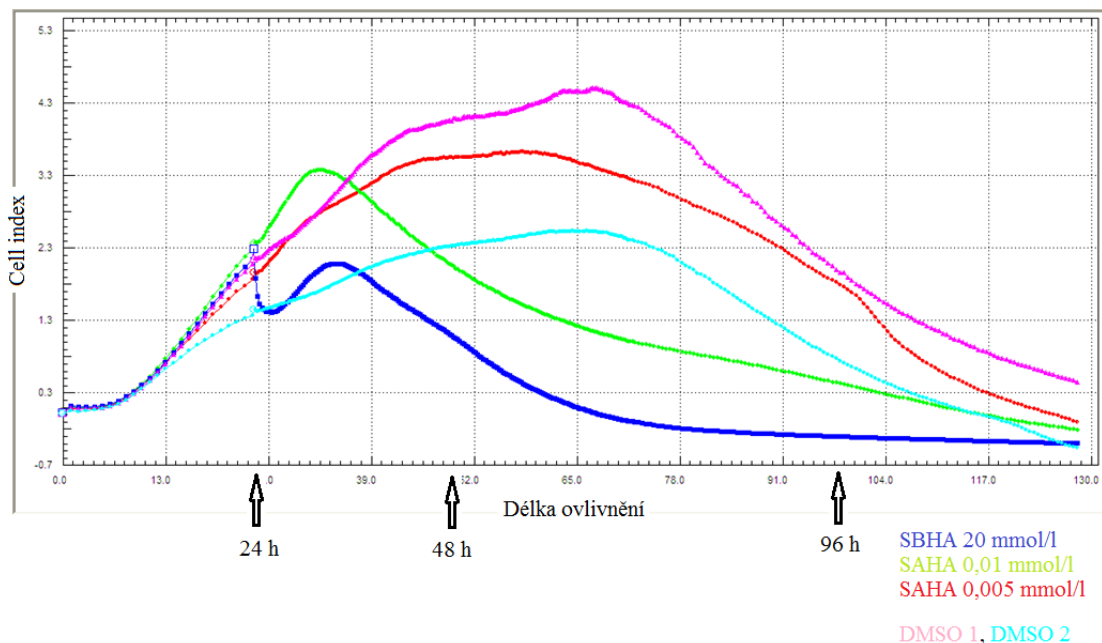
Výsledky získané pomocí systému xCelligence odpovídaly výsledkům MTT testu. Nejmenší cytotoxicitou se vyznačovala testovaná látka SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l, která téměř odpovídala kontrolnímu ovlivnění (Obr. VII, VIII). Největší cytotoxické účinky byly zaznamenány u ovlivnění SBHA o koncentraci 20 mmol/l (obr VII, VIII) a SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l (obr VII), jejichž toxicita byla zvláště patrná po prvních 24 hodinách. Viabilita buněk u kontrolního ovlivnění a buněk ovlivněných SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l a SBHA o koncentraci 0,1 mmol/l nebyla zpočátku nijak významně ovlivněna, ale po 65 hodinách se možný toxický účinek látek těchto koncentrací začal projevovat (obr. VII). Tento jev byl sledován i u kontrolních vzorků.

**Obr. VII:** Viabilita buněk po ovlivnění SAHA (0,005 mmol/l) a SBHA (0,1 mmol/l, 20 mmol/l) monitorována systémem xCelligence





**Obr. VIII:** Viabilita buněk po ovlivnění SAHA (0,005 mmol/l, 0,1 mmol/l) a SBHA (20 mmol/l) monitorována systémem xCelligence



#### 4.2 Western blot analýza

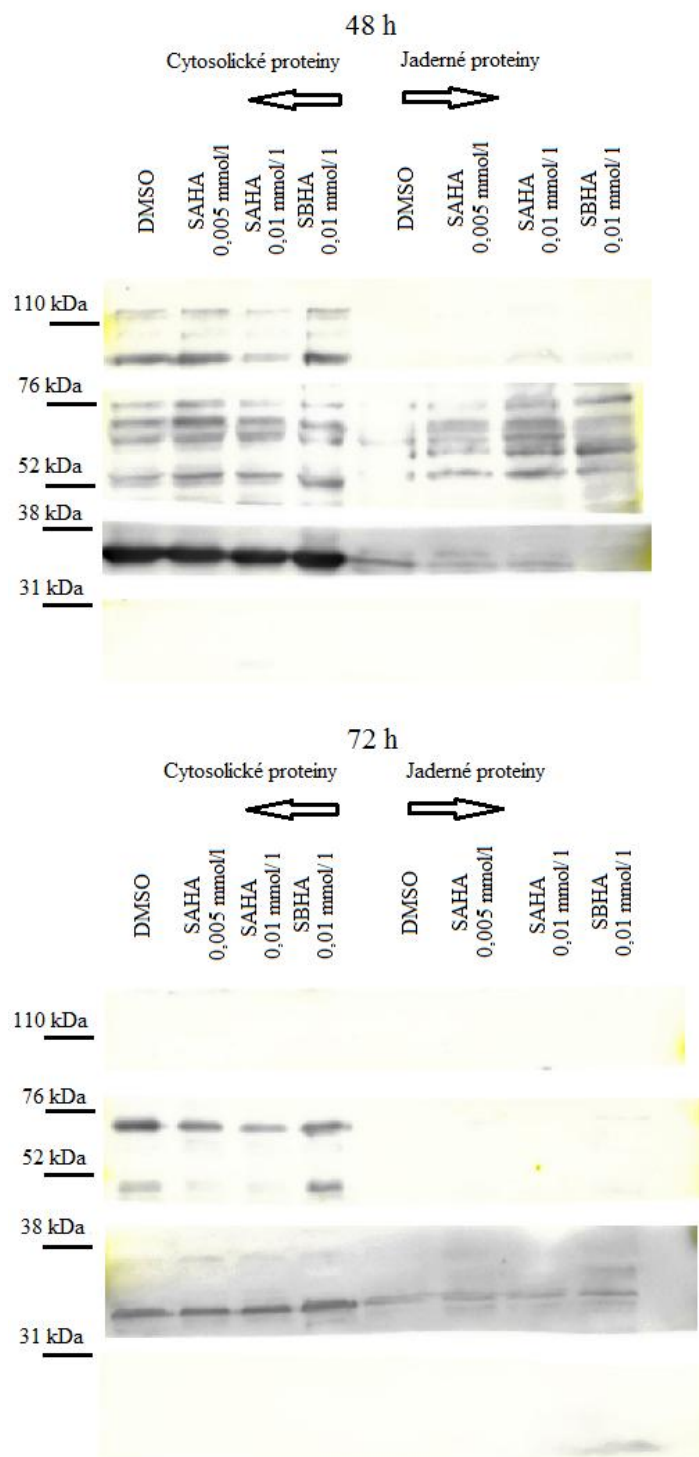
Pro analýzu proteinů byla zvolena metoda „Western blotting“. Proteiny byly izolovány z buněk, které byly po dobu 48 a 72 hodin ovlivňovány koncentracemi testovaných látek SAHA a SBHA. Jako kontrola bylo zvoleno ovlivnění buněk 0,1% DMSO. Jako kontrola množství nanášených proteinů byla pro cytosolické proteiny použita protilátka proti GAPDH a pro jaderné proteiny byla použita protilátka proti Lamin A/C (obr. IX). V následujících experimentech sloužil jako kontrola pro obě buněčné frakce GAPDH (obr. X, XI).

Pro získání proteinového lyzátu byly buňky ovlivněny koncentracemi SAHA 0,005 mmol/l a 0,01 mmol/l, a koncentracemi SBHA 0,01 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,1 mmol/ml a 1 mmol/l.

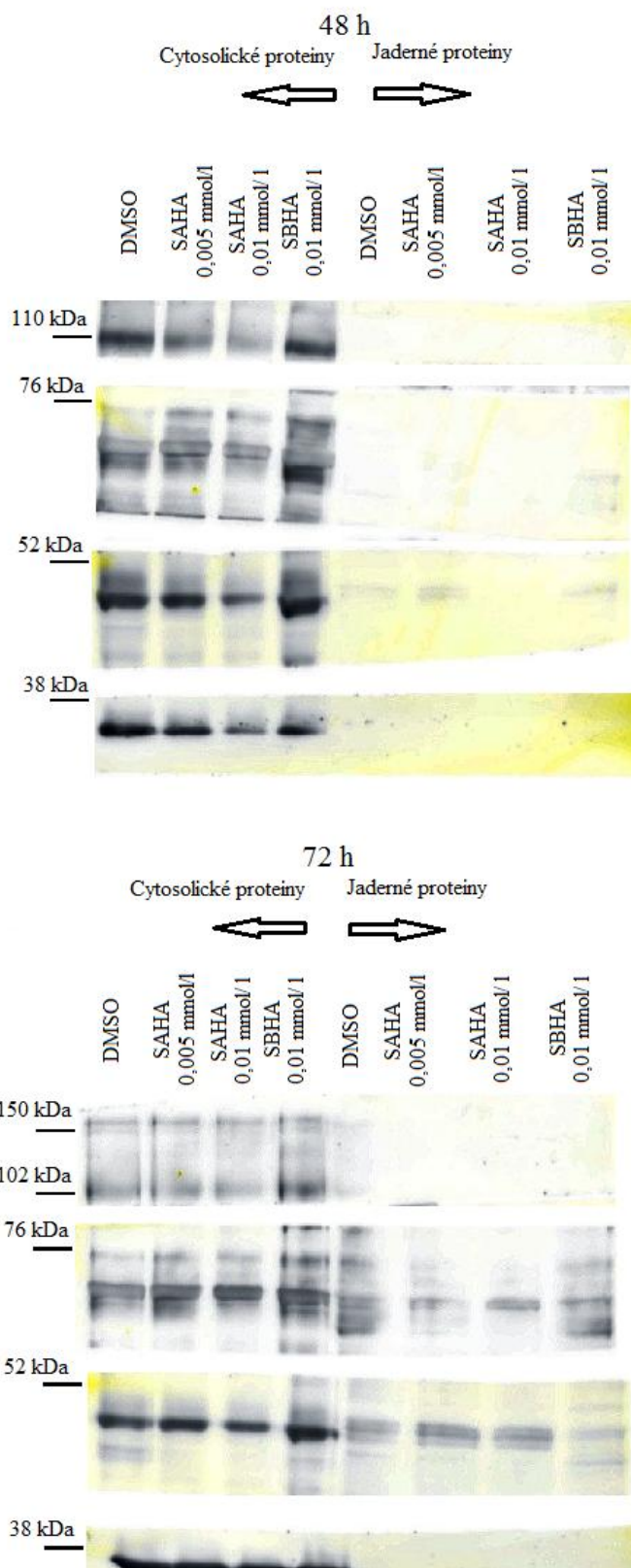
Expres AR byla v cytosolické frakci mírně snížena po 48hodinovém a 72hodinovém ovlivnění SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l, a to v porovnání s expresí AR u buněk ovlivněných SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l (Obr. IX, X). Podobné snížení bylo detekováno u NcoA4 v cytosolu zřetelněji po 72hodinovém ovlivnění buněk SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l (Obr. IX). Opakovaný Western blot nepotvrdil sníženou expresi Nco4 (Obr. X). Podobné nepatrné snížení exprese proteinu PSA bylo detekováno u buněk ovlivněných SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l (obr. X) u 48 i 72hodinového ovlivnění buněk.

Androgenový receptor, na rozdíl od Nco4 a PSA, nebyl v jaderné frakci detekován (obr. IX - XI). Testovaná látka SBHA v použitých koncentracích neměla vliv na expresi žádného ze sledovaných proteinů (Nco4, PSA) v cytosolické i jaderné frakci (obr. XI).

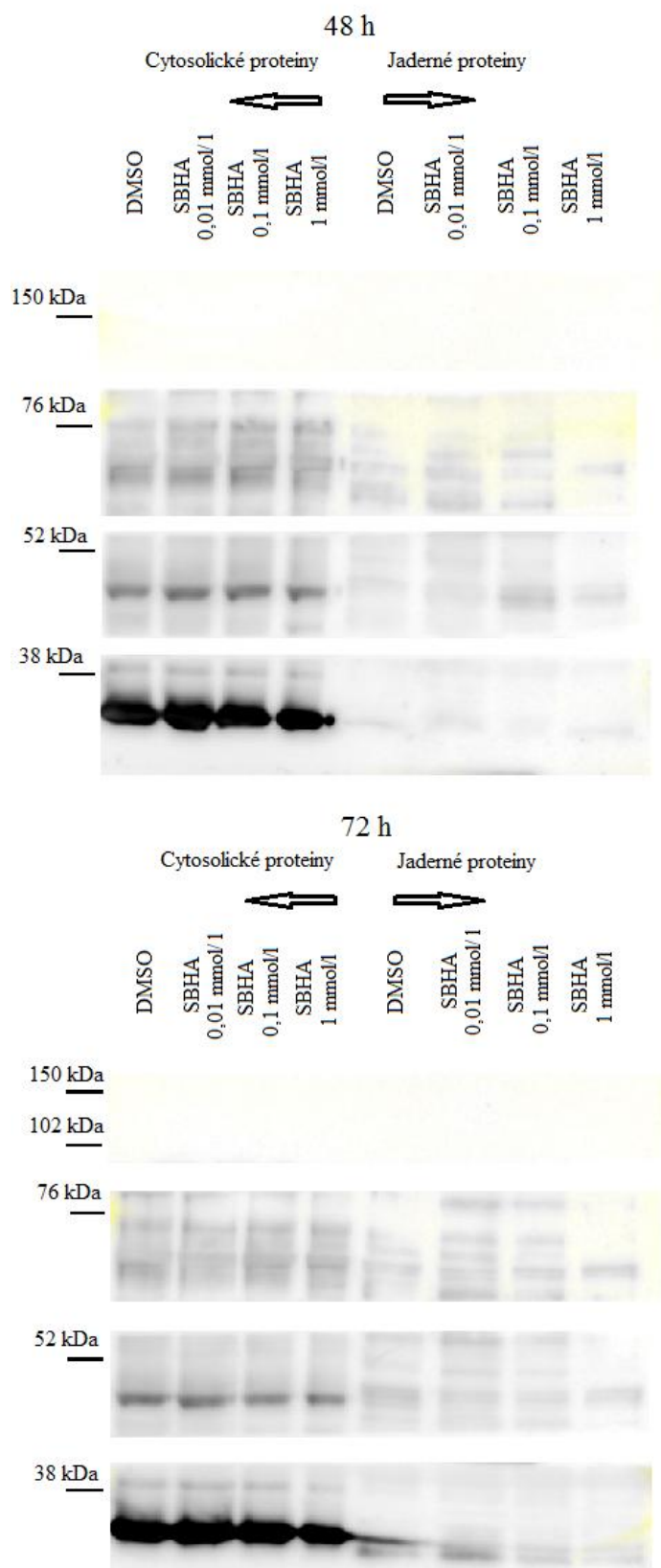
**Obr. IX:** Imunodetekce sledovaných proteinů (AR, NcoA4, PSA) po ovlivnění SAHA (0,005 mmol/l, 0,01 mmol/l) a SBHA 0,01 mmol/l



**Obr. X:** Imunodetekce sledovaných proteinů (AR, NcoA4, PSA) po ovlivnění SAHA (0,005 mmol/l, 0,01 mmol/l) a SBHA 0,01 mmol/l



**Obr. XI:** Imunodetekce sledovaných proteinů (AR, NcoA4, PSA) po ovlivnění SAHA (0,005 mmol/l, 0,01 mmol/l) a SBHA 0,01 mmol/l



## 5 Diskuse

V léčbě karcinomu prostaty jsou v poslední době intenzivně studovány inhibitory histonových deacetyláz, které by se tak mohly stát základem epigeneticky cílené léčby tohoto onemocnění (Blander *et* Guarente, 2004). Tato práce se soustřeďuje na dva z inhibitorů HDACs – SAHA a SBHA. Podle experimentů provedených v rámci této bakalářské práce bylo zjištěno, že cytotoxicita obou těchto látek byla závislá na jejich koncentraci, ale jejich vliv na expresi sledovaných proteinů se lišil. Snížení exprese AR (Obr. IX) i PSA (obr. X) v cytosolické frakci bylo pozorováno v případě ovlivnění testovanou látkou SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l (obr IX, X). Podobné snížení exprese sledovaného koaktivátoru NcoA4 bylo v cytosolické frakci detekováno také po ovlivnění SAHA (obr. IX). V případě testované látky SBHA nebyl zjištěn žádný vliv na expresi sledovaných proteinů (obr. IX – XI). Oba inhibitory HDACs, SAHA a SBHA, sice patří do stejné skupiny hydroxamových kyselin, ale jak z našich výsledků vyplývá, mechanismus jejich účinku je zřejmě odlišný.

Testovaná látka SAHA má i přes nižší testované koncentrace vyšší vliv na žádoucí snížení exprese AR, PSA i NcoA4. Koaktivátor NcoA4 se přednostně nachází v cytoplasmě, kde ovlivňuje přesun AR do jádra (Hu *et al.*, 2004). Jelikož v této práci bylo detekováno snížení exprese NcoA4 v cytoplasmě po 72 hodinách a při stejných podmínkách byla snížena translokace AR do jádra, lze říci, že tyto výsledky korespondují s tímto tvrzením. Snížení exprese NcoA4 vlivem inhibitorů histonových deacetyláz bylo zjištěno i přesto, že tento koaktivátor postrádá acetyltransferázovou aktivitu (Alen *et al.*, 1999).

SAHA též vykazovala nejnižší cytotoxický účinek a to při koncentraci 0,001 mmol/l, kdy viabilita buněk neklesla pod 50 % (obr. IV). Při testování pomocí MTT testu byl největší cytotoxický účinek sledován u SBHA o koncentraci 20 mmol/l (Obr. V, VI). Nicméně v této studii nelze porovnávat oba inhibitory HDACs, poněvadž nebylo použito při ovlivňování buněk stejných koncentrací.

Důležitým se jeví ovšem porovnání dvou testů buněčné viability – MTT test a systém xCelligence. Viabilita buněk ovlivněných SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l oproti kontrolnímu vzorku klesla, ale v porovnání s ostatními koncentracemi obou inhibitorů neměla výrazný účinek (obr VII, VIII). SBHA o koncentraci 20 mmol/l vykazovala nejvyšší cytotoxicitu, což bylo potvrzeno i u ostatních testovaných koncentrací obou látek shodně jak MTT testem, tak systémem xCelligence (Obr. V – VIII).

## 6 Závěr

V této bakalářské práci byla vpracována literární rešerše věnující se problematice karcinomu prostaty. Pozornost byla věnována struktuře a funkci AR a PSA a jejich vlivu vznik a vývoj karcinomu prostaty. Vliv na AR mají také koregulátory a tato práce se soustřeďuje zejména na koaktivátor NcoA4. Experimentální část práce se soustřeďuje na vliv histonových deacetyláz, jejichž struktura a vliv je také popsán v teoretické části.

V experimentální části této práce byl sledován vliv dvou inhibitorů histonových deacetyláz (SAHA a SBHA) na buněčnou viabilitu a molekulární změny u na androgenech nezávislé prostatické buněčné linie C4-2. V první části byla pozorována cytotoxicita těchto inhibitorů a následně byl zjišťován vliv těchto látek na expresi AR, PSA a NcoA4 v cytosolické a jaderné proteinové frakci.

Pomocí MTT testu bylo zjištěno, že na viabilitu buněk měla největší vliv SBHA o koncentraci 20 mmol/l a SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l následně se viabilita buněk zvyšovala s klesajícími koncentracemi. Nejnižší cytotoxicitu vykazovala SAHA o koncentraci 0,005 mmol/l, která byla téměř srovnatelná s kontrolním vzorkem. Tyto výsledky byly potvrzeny systémem xCelligencem. Koncentrace, které vykazovaly největší cytotoxicitu, měly na buňky největší vliv po prvních 24 hodinách ovlivňování.

Proteinová analýza ukázala, že na změny v expresi sledovaných proteinů má vliv inhibitor SAHA. Pokles exprese AR v cytoplasmě byl v případě SAHA o koncentraci 0,01 mmol/l pozorován při 48 i 72hodinovém ovlivnění. Po 72hodinovém ovlivnění byla snížena také exprese koaktivátoru NcoA4, tento výsledek ale nebyl opakovanou analýzou potvrzen. Při stejné koncentraci SAHA byla ovlivněna také exprese PSA při 48 i 72hodinovém ovlivnění. V jaderné frakci byl po ovlivnění SAHA detekován pouze PSA a NcoA4.

Snížení exprese AR by mohlo souviset se sníženou expresí NcoA4, který může ovlivňovat aktivitu AR také v přítomnosti antagonisty (Rahman *et al.* 2003). Inhibitor histonových deacetyláz SAHA podle získaných výsledků ovlivňuje NcoA4 a následně expresi AR. Také snižuje expresi PSA, jehož zvýšená hladina indukuje transaktivaci AR.

## 7 Seznam použitých zkratk

AD1	activation domain 1
AD2	activation domain 2
AF-1	aktivační místo 1
AF-2	aktivační místo 2
AR	androgenový receptor, androgen receptor
ARA70	androgen receptor-associated protein 70
AREs	androgen response elements
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CBP	CREB-binding protein
CDK	cyclin-dependent kinase
CH1	cysteine (C)-histidine (H)-rich region 1
CH2	cysteine (C)-histidine (H)-rich region 2
CH3	cysteine (C)-histidine (H)-rich region 3
CRE	cAMP response element
CTD	COOH-terminal domain
CTE	carboxy-terminal extension
DBD	DNA-binding domain)
DHT	dihydrotestosterone
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonukleová kyselina
F	fenylalanin
FBS	fetální bovinní sérum
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HSP	heat shock protein
kDa	kiloDalton
KLK	human kallikrein family
L	leucin
LBD	ligand-binding domain
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

NcoA4	nuclear receptor coactivator 4
NCoR	nuclear receptor corepressor
NTD	N-terminal domain
PSA	prostatický specifický antigen, prostate specific antigen
PSB	phosphate buffered saline
p/CAF	p300/cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (CBP)-associated factor
PRMT1	protein arginine methyltransferases
PTH	parathyroid hormone
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SBHA	suberohydroxamic acid
SDS	sodium laureth sulfate
SMRT	silencing mediator of retionic and thyroid hormone receptors
SRC	steroid receptor coactivator
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Tip60	Tat-interactive protein 60
Tris	trishydroxymethylaminomethan
TSB	tris buffered saline
X	jakákoliv aminokyselina



## 8 Použitá literatura

- Alen, P., Claessens, F., Schoenmakers, E., Swinnen, J. V., Verhoeven, G., Rombauts, W., Peeters, B. (1999): Interaction of the putative androgen receptor-specific coactivator ARA70/ELE1 alpha with multiple steroid receptors and identification of an internally deleted ELE1 beta isoform. *Molecular Endocrinology* 13 (1): 117- 128.
- Atienza, J. M., Yu, N., Kirstein, S. L., Xi, B., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A. (2006): Dynamic and label- free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay and Drug Development Technology* 4 (5): 597–607.
- Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D., Miura, M. T. (2007): Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annual Review of Physiology* 69: 201–220.
- Belandia, B., Parker, M. G. (2000): Functional Interaction between the p160 Coactivator Proteins and the Transcriptional Enhancer Factor Family of Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 30801 – 30805.
- Bevan, C. L., Parket, M. G. (1999): The Role of Coactivators in Steroid Hormone Action. *Experimental Cell Research* 253: 349 – 356.
- Blander, G., Guarente, L. (2004): The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry* 73: 417 – 435.
- Bordoli, L., Husser, S., Luthi, U., Netsch, M., Osmani, H., Eckner, R., (2001): Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucleic Acids Research* 29: 4462 – 4471.
- Brady, M. E., Ozanne, D. M., Gaughan L. (1999): Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *Journal of Biological Chemistry* 274 (25): 17599 – 17604.
- Brown, K., Chen, Y., Underhill, T. M., Mymryk J. S., Torchia, J. (2003): The coactivator p/CIP/SRC-3 facilitates retinoic acid receptor signaling via recruitment of GCN5. *Journal of Biological Chemistry* 278: 39402 – 39412.
- Butler, L. M., Agus, D. B., Scher, H., I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H., T., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M. (2000): Suberoylanilide hydroxamic

- acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 60: 5165 – 5170.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936 – 942.
- Cleutjens, K., B., van Eekelen, C., C., van der Korput, H., A., Brinkmann, A., O., Trapman, J. (1996): Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Journal of Biological Chemistry* 271: 6379 – 6388.
- Culig, Z., Commuzi, B., Steiner, H., Bartsch, G., Hobisch, A. (2004): Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 92: 265 – 271.
- Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Peterziel, H., Cato, A. C., Bartsch, G., Klocker, H. (1998): Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate* 35: 63 – 70.
- Dahm, S. M., Tindall, D. J. (2007): Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Molecular Endocrinology* 21 (12): 2855 – 2863.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., Horinouchi, S. (2002): FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Research* 62: 4916 – 4921.
- Gaughan, L., Brady, M. E., Cook, S., Neal D. E., Robson, C. N. (2001): Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276 (50): 46841 – 46848.
- Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E., Robson, C. N. (2002): Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 25904 – 25913.
- He, B., Gampe, Jr. R. T., Kole, A. J., Hnat, A. T., Stanley, T. B., An, G., Stewart, E. L., Kalman, R. I., Minges, J. T., Wilson, E. M. (2004): Structural basis for androgen receptor

- interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance. *Molecular Cell* 16: 425–438.
- Heery, D., M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M., G. (1997): A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733–736.
- Heinlein, C. A., Chang, C. (2004): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews* 25 (2): 276 – 308.
- Hu, Y., Yeh, S., Yeh, S., Sampson, E. R., Huang, J., Li, P., Hsu, Ch., Ting, H., Lin, H., Wang, L., Kim, E., Ni, J., Chang, Ch. (2004): Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 33438 – 33446.
- Huang, W., Shostak, Y., Tarr, P., Sawyers, C., Carey, M. (1999): Cooperative assembly of androgen receptor into a nucleoprotein complex that regulates the prostate-specific antigen enhancer. *Journal of Biological Chemistry* 274: 25756 – 25768.
- Hur, E., Pfaff, S. J., Payne, E. S., Gron, H., Buehrer, B. M., Fletterick, R. J. (2004): Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biol* 2: E274.
- Chang, C., Saltzman, A., Yeh, S., Young, W., Keller, E., Lee, H. J., Wang, C., Mizokami, A. (1995): Androgen receptor: An overview. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 5 (2): 97 – 125.
- Chen, S. L., Dowhan, D. H., Hosking, B. M., Muscat, G. E. (2000): The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes and Development* 14: 1209 – 1228.
- Cheng, S., Brzostek, S., Lee, S. R., Hollenberg, A. N., Balk, S. P. (2002): Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Molecular Endocrinology* 16 (7): 1492 – 1501.
- Jerónimo, C., Bastian, P. J., Bjartell, A., Carbone, G. M., Catto, J. W., F., Clark, S. J., Henrique, R., Nelson, W. G., Shariat, S. F. (2011): Epigenetics in prostate cancer: Biologic and clinical relevance. *European Urology* 60: 753 – 766.

- Katzenellenbogen, J. A., O'Malley, B. W., Katzenellenbogen, B. S. (1996): Tri-partite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Molecular Endocrinology* 10: 119–31.
- Kim, H., Bae, S. (2011): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research* 3 (2): 166 – 179.
- Kim, J., Coetzee, G. A. (2004): Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (2): 233 – 241.
- Kim, J. H., Li, H., Stallcup, M. R. (2003): CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an Nterminal activation domain of p160 coactivators. *Molecular Cell* 12: 1537–1549.
- Kolář, Z. *et al.* (2003): *Molekulární patologie nádorů*. Epava, Olomouc.
- Kollara, A., Brown, T. J. (2012): Expression and function of nuclear receptor co-activator 4: evidence of a potential role independent of co-activator activity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3895 – 3909.
- Kumar, A., Mikolajczyk, S. D., Goel, A. S., Millar, L. S., Saedi, M. S. (1997): Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Research* 57 (15): 3111 – 3114.
- Lane A. A., Chabner, B. A. (2009): Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 27 (32): 5459 – 5468.
- Lovgren, J., Rajakoski, K., Karp, M., Lundwall, A., Lilja, H. (1997): Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochemical Biophysical Research Communication* 238 (2): 549 – 555.
- Marchion, D., Munster, P. (2007): Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment. *Expert Review of Anticancer Therapy* 7: 583 – 598.
- Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, S., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M., Tsuneyoshi, M. (2007): Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncology Reports* 18: 769 – 774.

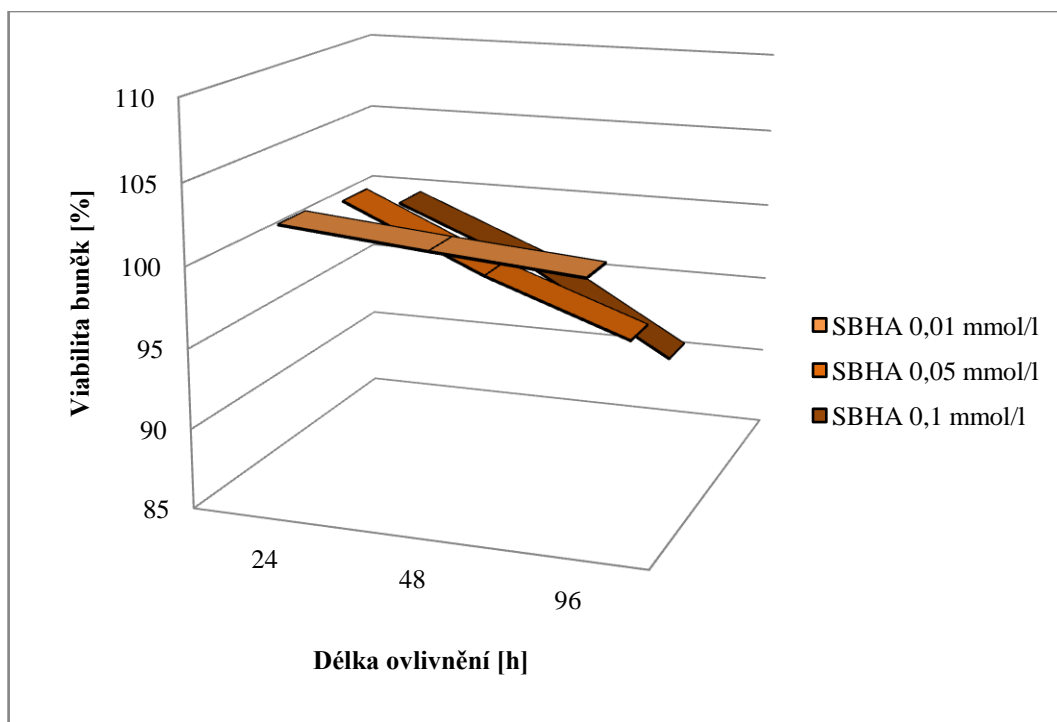
- Nash, A. F., Melezinek, I. (2000): The role of prostate specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer. *Endocrine Related Cancer* 7 (1): 37 – 51.
- Niu, Y., Yeh, S., Miyamoto, H., Li, G., Altuwaijri, S., Yuan, J., Han, R., Ma, T., Kuo, H. C., Chang, C. (2008): Tissue prostate-specific antigen facilitates refractory prostate tumor progression via enhancing ARA70-regulated androgen receptor transactivation. *Cancer Research* 68 (17): 7110 – 7119
- Ordentlich, P., Downes, M., Evans, R., M. (2001): Corepressors and nuclear hormone receptor function. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 254: 101 – 116.
- Peng, I., Li, C., X., Chen, F., Wang, Z., Ligr, M., Melamed, J., Wei, J., Gelard, W., Pagano, M., Garabedian, M. J., Lee, P. (2008): Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70. *American Journal of Pathology* 172 (1): 225 – 235.
- Powell, S. M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F., Bevan, C. L. (2004): Mechanism of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocrine Related Cancer* 11: 117 – 130.
- Ragvin, A., Valvatne, H., Erdal, S., Arskog, V., Tufteland, K. R., Breen, K., OYan, A. M., Eberharter, A., Gibson, T. J., Becker, P. B., Aasland, R. (2004): Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *Journal of Molecular Biology* 337: 773 – 788.
- Rahman, M. M., Miyamoto, H., Takatera, H., Yeh, S., Altuwaijri, S., Chang, Ch. (2003): Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19619 – 19626.
- Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Brinkmann, A. O., Trapman, J. (1991): The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Molecular Endocrinology* 5: 1921–1930.
- Richon, V. M, Emiliani, S, Verdin, E, Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A. (1998): A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3003 – 3007.

- Richon, V. M., Sandhoff, T., W., Rifkind, R., A., Marks P., A. (2000): Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 10014 – 10019.
- Richter, E., Srivastava, S., Dobi, A. (2007): Androgen receptor and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 10: 114 – 118.
- Rosenfeld, M. G., Glass, C. K. (2001): Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276: 36865–36868.
- Sadar, M. D., Hussain, M., Bruchofsky, N. (1999): Prostate cancer: Molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocr Relat Cancer* 6: 487–502.
- Sandor, V., Senderowicz, A., Mertins, S., Sackett, D., Sausville, E., Blagosklonny, M. V., Bates, S. E. (2000): P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *British Journal of Cancer* 83: 817 – 825.
- Shang, Y., Mayers, M., Brown, M. (2002): Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell* 9: 601 – 610.
- Saxena, P., Trerotola, M., Wang, T., Li, J., Sayeed, A., VanOudenhove, J., Adams, D. S., FitzGerald, T. J., Altieri, D. C., Languino, L. R. (2012): PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *The Prostate* 72: 769 – 776.
- Trtková, K., Bouchal, J., Kolář, Z. (2007): Histone acetylation and methylation in the signaling of steroid hormone receptors. *Cellular and Molecular Biology* 53: 928 – 940.
- Wagner, B. L., Norris, J. D., Knotts, T. A., Weigel, N. L., McDonnell, D. P. (1998): The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Molecular and Cellular Biology* 18 (3): 1369 – 1378.
- Wang, L., Hsu, C., Chang, Ch (2004): Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 9999: 1 – 14.
- Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W., Budman, D. R. (1999): Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen

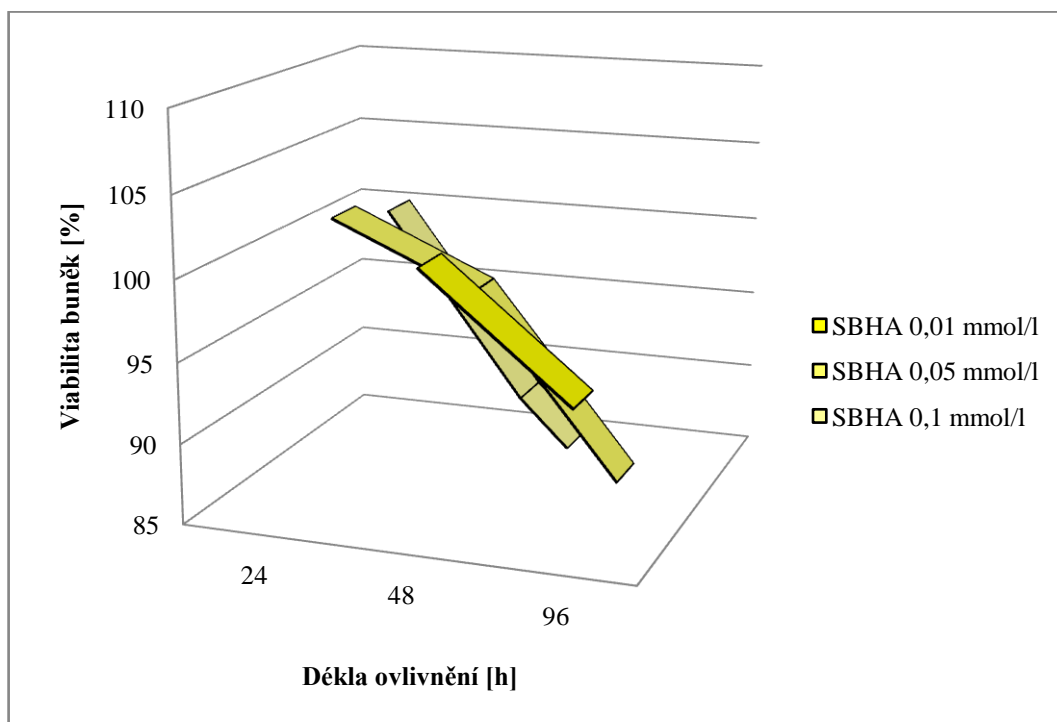
- agonistic or antagonistic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259: 21 – 28.
- Xu, J., Li, Q. (2003): Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology* 17: 1681 – 1692.
- Xu., J., Wu, R., O'Maley, B. W. (2009): Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor coactivator (SRC) family. *Nature Review Cancer* 9 (9): 615 – 630.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., Marks, P. A. (2007): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26: 5541 – 5552.
- Yamamoto, T., Horikoshi, M. (1997): Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *Journal of Biological Chemistry* 272 (49): 30595 – 30598.
- Yeh, S., Chang, C. (1996): Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11): 5517 – 5521.
- Yoo, C. B., Jones, P. A. (2006): Epigenetic therapy of cancer: Past, present and future. *Nature Review Drug Discovery* 5: 37 – 50.
- Yousef, G. M., Diamandies, E. P. (2001): The new human tissue kallikrein gene family: Structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews* 22 (2): 184 – 204.
- Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Yin, N., Shi, B., Wu, H., Wang, D., Wu, G., Shang, Y. (2004): Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes and Development* 18: 1753 – 1765.
- Ziebolz, B., Knop, Ch., Puntik, J., Scheuermann, M., Schmitz, M. (2010): *Cutting Edge Technologies, Cell Analysis*. Germany.

## 9 Přílohy

**Příloha I:** Viabilita buněk buněčné linie PC3 po ovlivnění testovanou látku SBHA

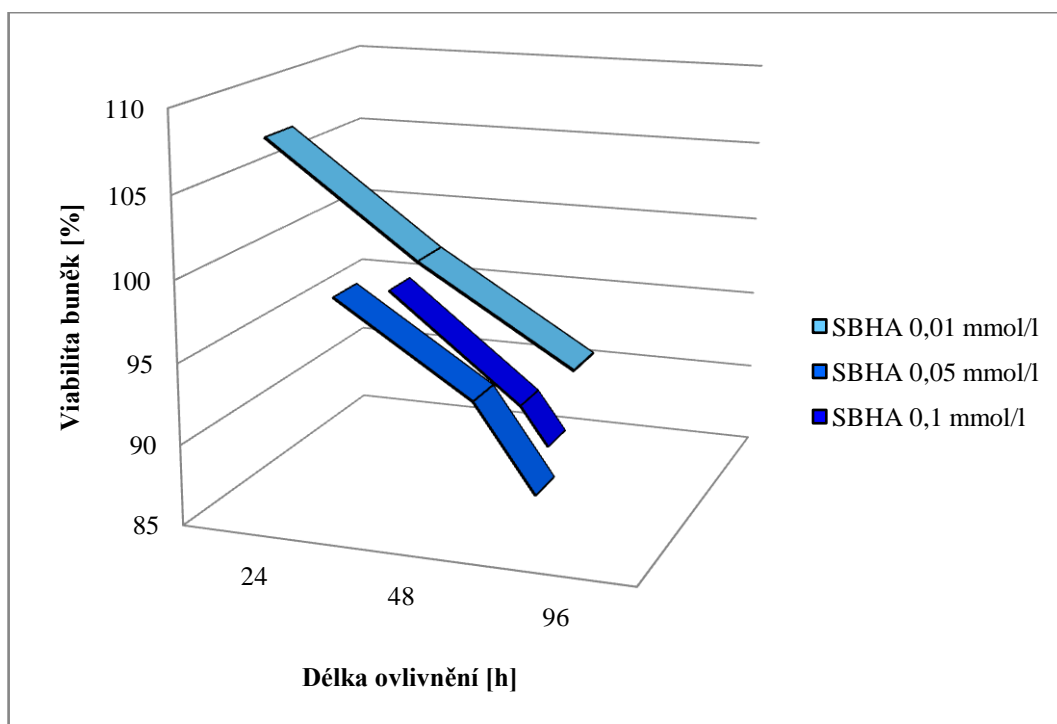


**Příloha II:** Viabilita buněk buněčné linie DU145 po ovlivnění testovanou látku SBHA





**Příloha III:** Viabilita buněk buněčné linie C4-2 po ovlivnění testovanou látkou SBHA



**Příloha IV:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou NaB a SBHA po dobu 24 hodin

	0,3% DMSO	NaB 1 mmol/l	NaB 5 mmol/l	DMSO 0,03%	SBHA 0,1 mmol/l	SBHA 2 mmol/l	SBHA 20 mmol/l
Naměřená ABS	0,48	0,392	0,332	0,487	0,359	0,396	0,25
	0,467	0,408	0,376	0,518	0,415	0,419	0,256
	0,559	0,475	0,437	0,585	0,46	0,393	0,331
	0,567	0,371	0,323	0,585	0,343	0,411	0,343
	0,617	0,405	0,371	0,638	-	-	-
	0,636	0,465	0,432	0,65	-	-	-
Průměrná ABS	0,554333			0,577167	-	-	-
Viabilita buněk	86,59055	70,71562	59,8918	84,37766	64,76252	71,43721	45,09925
	84,24539	73,60197	67,82927	89,74872	74,86475	75,58634	46,18163
	100,8419	73,06078	66,92728	101,3572		70,89601	59,7114
	102,2851	-	-	101,3572	61,87617	74,14316	61,87617
	111,3049	-	-	110,5399	-	-	-
	114,7325	-	-	112,6191	-	-	-
Průměrná viabilita buněk	100,0001	72,45945	64,88278	99,99994	67,16781	72,63985	53,21711
Směrodatná odchylka	-	1,534259	4,345783	-	6,820183	2,225911	8,804408

**Příloha V:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou SAHA po dobu 24 hodin

	0,03% DMSO	SAHA 1 µmol/l	SAHA 2,5 µmol/l	SAHA 5 µmol/l	SAHA 7,5 µmol/l	SAHA 10 µmol/l
Naměřená ABS	0,487	0,499	0,468	0,461	0,474	0,473
	0,518	0,542	0,502	0,481	0,484	0,475
	0,585	0,556	0,526	0,519	0,516	0,522
	0,585	0,501	-	0,467	-	0,478
	0,638	0,537	-	0,483	-	0,476
	0,65	0,567	-	0,517	-	0,521
Průměrná ABS	0,577167	-	-	-	-	-
Viabilita buněk	84,37766	86,45678	86,97656	79,8729	82,12528	81,95202
	89,74872	93,90696	91,1348	83,3381	83,85788	82,29854
	101,3572	96,3326	-	80,91246	89,4022	82,81832
	101,3572	86,8033	-	83,68462	-	82,4718
	110,5399	93,04066	-	-	-	-
	112,6191	98,23847	-	-	-	-
Průměrná viabilita buněk	99,99994	92,46313	89,05568	81,95202	85,12845	82,38517
Směrodatná odchylka	-	4,87556	2,940321	1,855313	3,801207	0,36067

**Příloha VI:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou NaB a SBHA po dobu 48 hodin

	0,3% DMSO	NaB 1 mmol/l	NaB 1 mmol/l	0,03% DMSO	SBHA 0,1 mmol/l	SBHA 2 mmol/l	SBHA 20 mmol/l
Naměřená ABS	0,551	0,337	0,318	0,678	0,317	0,266	0,168
	0,518	0,375	0,303	0,641	0,369	0,297	0,165
	0,612	0,442	0,353	0,694	0,41	0,258	0,201
	0,606	0,392	0,294	0,71	0,296	0,28	0,219
	0,64	0,384	0,3	0,735			
	0,725	0,437	0,336	0,774			
Průměrná ABS	0,608667			0,705333			
Viabilita buněk	90,52569	61,61004	52,24532	96,12481	44,94331	37,71268	23,81854
	85,10401	64,40303	49,78092	90,87906	41,96599	42,10777	23,39321
	100,5476	63,08868	48,30227	98,39324		36,57847	28,49718
	99,56183		49,28803	100,6617		39,69756	
	105,1478			104,2061			
	119,1128			109,7354			

	0,3% DMSO	NaB 1 mmol/l	NaB 1 mmol/l	0,03% DMSO	SBHA 0,1 mmol/l	SBHA 2 mmol/l	SBHA 20 mmol/l
Průměrná viabilita buněk	104,8677	39,73637	35,86037	31,70047	2,105282	30,80371	2,831993
Směrodatná odchylka		1,3973	1,677483		56,09644	38,15809	25,23631

**Příloha VII:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou SAHA po dobu 48 hodin

	DMSO 0,03%	SAHA 1 μmol/l	SAHA 2,5 μmol/l	SAHA 5 μmol/l	SAHA 7,5 μmol/l	SAHA 10 μmol/l
Naměřená ABS	0,678	0,489	0,439	0,385	0,369	0,362
	0,641	0,544	0,46	0,417	0,397	0,383
	0,694	0,561	0,498	0,443	0,421	0,397
	0,71	0,495		0,386		0,37
	0,735	0,554		0,421		0,364
	0,774	0,555		0,447		0,408
Průměrná ABS	0,705333					
Viabilita buněk	96,12481	77,12669	65,21742	59,12101	52,31572	51,32328
	90,87906	79,5369	70,60495	62,80721	56,28547	54,30059
	98,39324	78,54446		59,68812	59,68812	56,28547
	100,6617	78,68624		63,37432		52,45749
	104,2061					51,60683
	109,7354					57,84502
Průměrná viabilita buněk	100	78,47357	67,91119	61,24767	56,09644	53,96978
Směrodatná odchylka		0,999167	3,809556	2,153269	3,689836	2,659468

**Příloha VIII:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou NaB a SBHA po dobu 96 hodin

	DMSO 0,3%	NaB 1 mmol/l	NaB 5 mmol/l	0,03% DMSO	SBHA 0,1 mmol/l	SBHA 2 mmol/l	SBHA 20 mmol/l
Naměřená ABS	1,079	0,462	0,278	1,021	0,464	0,129	0,105
	1,094	0,45	0,295	1,101	0,487	0,148	0,106
	1,12	0,53	0,336	1,166	0,519	0,135	0,115
	1,104	0,471	0,273	1,154	0,433	0,153	0,123
	1,177	0,461	0,292	1,204			
	1,335	0,51	0,352	1,412			

	DMSO 0,3%	NaB 1 mmol/l	NaB 5 mmol/l	0,03% DMSO	SBHA 0,1 mmol/l	SBHA 2 mmol/l	SBHA 20 mmol/l
Průměrná ABS	1,1515			1,176333			
Viabilita buněk	93,70387	40,12158	24,14242	86,79515	39,44461	10,96628	8,926044
	95,00651	39,07946	25,61876	93,59595	41,39984	12,58147	9,011054
	97,26444	46,02692	29,17933	99,12159	43,86513	11,47634	9,776143
	95,87495	40,90317	23,70821	98,10147	36,80931	13,00652	10,45622
	102,2145	40,03474	25,35823	102,352			
	115,9357	44,29006	30,56882	120,034			
Průměrná viabilita buněk	100	41,74265	26,4293	100	2,989483	0,947584	0,719243
Směrodatná odchylka		2,763562	2,797737		40,37972	12,00765	9,542366

**Příloha IX:** Naměřené absorbance a viabilita buněk ovlivňovaných testovanou látkou SAHA po dobu 96 hodin

	DMSO 0,03%	SAHA 1 μmol/l	SAHA 2,5 μmol/l	SAHA 5 μmol/l	SAHA 7,5 μmol/l	SAHA 10 μmol/l
Naměřená ABS	1,021	0,633	0,495	0,411	0,307	0,254
	1,101	0,692	0,514	0,454	0,318	0,263
	1,166	0,72	0,578	0,472	0,358	0,294
	1,154	0,622		0,424		0,258
	1,204	0,667		0,454		0,272
	1,412	0,716		0,471		0,29
Průměrná ABS	1,176333					
Viabilita buněk	86,79515	53,81129	42,07992	34,93909	26,09805	39,23209
	93,59595	58,82688	43,69511	38,59451	27,03316	22,35762
	99,12159	61,20716	49,13575	40,12469	30,43356	24,99292
	98,10147	52,87618		36,04422		21,93257
	102,352	56,70162		38,59451		23,1227
	120,034	60,86712		40,03968		24,65288
Průměrná viabilita buněk	100	57,38171	44,97026	38,05612	27,85492	26,04846
Směrodatná odchylka	DMSO	3,532161	3,696711	2,124002	2,281584	6,572561

**Příloha X:** Koncentrace cytosolických (CP) a jaderných (JP) proteinů po izolaci

		Průměrná ABS	Rozdíl mezi průměrnou ABS a slepým vzorkem	Koncentrace proteinů [mg/ml]
48hodinové ovlivnění	CP DMSO	0,403	0,147666667	0,2945
	CP 5 $\mu\text{mol/l}$ SAHA	0,388	0,132666667	0,2497
	CP 10 $\mu\text{mol/l}$ SAHA	0,336	0,080666667	0,0943
	JP DMSO	0,717333333	0,462	1,2336
	JP 5 $\mu\text{mol/l}$ SAHA	0,517	0,261666667	0,6351
	JP 10 $\mu\text{mol/l}$ SAHA	0,468	0,212666667	0,4887
72hodinové ovlivnění	CP 10 $\mu\text{mol/l}$ SBHA	0,4515	0,196166667	0,4379
	CP 100 $\mu\text{mol/l}$ SBHA	0,386	0,130666667	0,2377
	CP 1 mmol/l SBHA	0,327	0,071666667	0,0634
	JP 10 $\mu\text{mol/l}$ SBHA	0,4985	0,243166667	0,6092
	JP 100 $\mu\text{mol/l}$ SBHA	0,625	0,369666667	0,9767
	JP 1 mmol/l SBHA	0,404	0,148666667	0,3363