



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Biologická aktivita konjugátů pohlavních
hormonů s N-Boc-valinem v nádorových
buňkách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Kalitová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Kalitová
Název práce	Biologická aktivita konjugátů pohlavních hormonů s N-Boc-valinem v nádorových buňkách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce je zaměřena na studium biologické aktivity konjugátů pohlavních hormonů s N-Boc-valinem <i>in vitro</i>. Tyto konjugáty, odvozené od testosteronu, estradiolu a 2-methoxyestradiolu, jsou zkoumány z důvodu potenciální antiproliferační aktivity. Teoretická část shrnuje poznatky o regulaci buněčného cyklu a programované buněčné smrti – apoptose. Pozornost je věnována také steroidním receptorům a jejich ligandům.</p> <p>V experimentální části byl studován vliv testovaných látek na nádorovou buněčnou linii HeLa, odvozenou od cervikálního karcinomu, a nádorovou linii MCF7, odvozenou od prsního adenokarcinomu. Pomocí metody western blottingu byla sledována exprese apoptotických markerů a steroidních receptorů. Následně byl metodou imunofluorescence pozorován vliv testovaných látek na translokaci steroidních receptorů z cytoplasmy do jádra.</p>
Klíčová slova	Apoptosa, steroidní receptory, nádorová linie HeLa, nádorová linie MCF, western blotting, imunofluorescence
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Kalitová
Title of thesis	Biological activity of sex hormone conjugates with N-Boc-valine in tumour cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>This bachelor thesis is focused on the study of biological activity of sex hormone conjugates with N-Boc-valine in vitro. These conjugates, derived from testosterone, estradiol and 2-methoxyestradiol, are investigated for their potential antiproliferative activity. The theoretical part summarizes the knowledge on cell cycle regulation and programmed cell death - apoptosis. Attention is also focused on steroid receptors and their ligands.</p> <p>In the experimental part, the effect of the tested substances on the HeLa tumor cell line, derived from cervical carcinoma, and the MCF7 tumour line, derived from breast adenocarcinoma, was studied. The expression of apoptotic markers and steroid receptors was monitored by western blotting. Subsequently, the effect of the tested substances on the translocation of steroid receptors from the cytoplasm to the nucleus was observed by immunofluorescence.</p>
Keywords	Apoptosis, steroid receptors, HeLa tumour line, MCF tumour line, western blotting, immunofluorescence
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 11. května 2023

Tereza Kalitová

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za její nekonečnou trpělivost a cenné rady při psaní bakalářské práce. Dále pak jejímu týmu Mgr. Marii Kvasnicové, Ph.D. a Anežce Šindlerové za pomoc při experimentální části. Mé díky patří také Katedře experimentální biologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. Tato práce byla vykonávána s pomocí grantu IGA_PrF_2023_012. Poslední a největší díky patří mé rodině, která mě nikdy nepřestala podporovat.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK

1	ÚVOD A CÍLE	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Buněčný cyklus	11
2.1.1	Retinoblastoma protein (pRb)	12
2.1.2	p53	12
2.2	Programovaná buněčná smrt – apoptosa	13
2.2.1	Caspasa-7	14
2.2.2	Poly(ADP-ribosa) polymerasa (PARP)	15
2.2.3	Bcl-2	15
2.2.4	Mcl-1	16
2.3	Další typy rozpadu buněk	16
2.4	Steroidní receptory	17
2.4.1	Androgenní receptor (AR)	18
2.4.2	Glukokortikoidní receptor (GR)	19
2.4.3	Estrogenový receptor (ER)	20
2.4.4	Jaterní X receptor (LXR)	21
2.5	Steroidní hormony a jejich deriváty	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	MATERIÁL	24
3.1.1	Použité buněčné linie	24
3.1.2	Testované steroidní deriváty	24
3.1.3	Použité protilátky	26
3.1.4	Použité chemikálie	27
3.1.5	Použité roztoky	28
3.1.6	Použité přístroje	29
3.2	METODY	31
3.2.1	Kultivace buněčných linií, ovlivnění testovanou látkou a sklizení	31
3.2.2	Lyzace buněk	32
3.2.3	SDS-PAGE a Western blotting	33
3.2.4	Imunodetekce proteinů	34
3.2.5	Imunofluorescence	35

4	VÝSLEDKY	36
4.1	Western blotting a imunodetekce	36
4.2	Imunofluorescenční analýza	41
5	DISKUZE	44
6	ZÁVĚR	49
7	SEZNAM LITERATURY	50

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
AF1	aktivační funkční doména
AF2	aktivační funkční doména
Apaf-1	z angl. apoptotic protease activating factor-1
APS	peroxosíran amonný
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
Bax	z angl. Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	z angl. B-cell lymphoma 2
BH	homologní doména
BSA	hovězí sérový albumin
CAK	CDK-aktivační kinasy
CDK	Cyklin dependentní kinasy
CMA	chaperony zprostředkovaná autofágie
DHT	dihydrotestosteron
DMEM	z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E2F	transkripční faktor
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
ER	estrogenový receptor
FasL	Fas ligand
GR	glukokortikoidní receptor
HeLa	nádorová buněčná linie cervikálního karcinomu
hsp	z angl. heat shock protein
IC ₅₀	50 % inhibiční koncentrace
LBD	ligand-vázající doména
LXR	žaterní X receptor
MCF7	nádorová buněčná linie prsního adenokarcinomu

Mcl-1	z angl. myeloid cell leukemia 1
MDM2	z angl. mouse double minute 2, E3 ubikvitin ligasa
MDM4	z angl. mouse double minute 4
MPF	z angl. maturation-proforming factor
MW	molekulová hmotnost
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
p53	transkripční faktor
PARP	Poly(ADP-ribosa) polymerasa
PBS	fosfátový pufr
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastoma protein
RB1	nádorový supresorový gen
RIPA	lyzační pufr
SDS	dodecyl síran sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsíranu sodného
SR	steroidní receptory
TBS	z angl. Tris-buffered saline
TEMED	Tetrametylethylendiamin
TNF- α	z angl. tumour necrosis factor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WB	western blotting

1 ÚVOD A CÍLE

V rámci hledání nových molekul, jakožto potenciálních léčiv, jsou nově nasyntetizované látky biologicky testovány a je prováděna analýza závislosti struktury na jejich biologické aktivitě. Takto vznikají celé knihovny analogů a derivátů ve snaze najít ideální lék. Tato bakalářská práce zkoumá vliv vybraných steroidních konjugátů na proliferaci a indukci translokace steroidních receptorů v nádorových buněčných liniích.

Cílem teoretické části této práce bylo vypracovat literární rešerši na téma programované buněčné smrti, apoptotických markerů a regulace buněčného cyklu. Dále je pozornost věnována steroidním receptorům a molekulám, které působí jako jejich ligandy. Konkrétně je zacíleno na testosteron, estradiol a 2-methoxyestradiol, které byly v experimentální části použity jako standardy.

Cílem experimentální části bylo testování připravených konjugátů pohlavních hormonů s N-Boc-valinem na nádorové epitelové buněčné linii MCF7 odvozené od lidského prsního adenokarcinomu, a linii Hela odvozené od cervikálního karcinomu. V obou případech se jednalo o adherentní buněčné linie, které byly po ovlivnění testovanými konjugáty analyzovány pomocí metod western blottingu a imunofluorescence.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část se zabývá popisem buněčného cyklu a přechodu buněk do programované buněčné smrti – apoptosy, přičemž jsou zmíněny i další typy degradace buněk. Dále jsou popisovány steroidní receptory, sloužící jako transkripčními faktory. Poslední jsou zmíněny steroidní hormony, působící jako přenašeče extracelulárního signálu do buněk. Je zde popsán jejich výskyt, biologická funkce a také jejich využití jakožto léčiva.

2.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled událostí, kdy dochází k rozdělení genetické informace a organel buňky za vzniku dvou buněk nových. Zásadně se liší v závislosti na organismu. Prokaryotní bakterie, které jsou bezjaderné a obsahují pouze kruhový chromosom, se dělí binárně. Po replikaci genetické informace dochází ke vchlípení jejich plasmatické membrány do středu buňky a rovnoměrnému rozdělení na dvě buňky dceřiné. Dělení eukaryot je oproti tomu mnohem složitější a proto zde dochází k precizní regulaci (Alberts, 2004).

Buněčný cyklus eukaryot se skládá ze dvou základních částí – mitózy a interfáze. Tyto části jsou dále uspořádány do jednotlivých fází. Během mitotické (M) fáze dochází k rozdělení genetické informace a následnému rozdělení celé buňky (cytokineze). Cyklus pokračuje G_1 fází, kdy je buňka metabolicky aktivní, dorůstá a připravuje se na syntetickou (S) fázi. V té je replikována genetická informace. Jako poslední nastupuje G_2 fáze, během které buňka pokračuje v růstu a dochází k syntéze proteinů, důležitých pro nadcházející M fázi (Cooper, 2000).

Hlavními regulátory buněčného cyklu jsou cyklin-dependentní protein kinasy (CDK), které jsou aktivovány na základě intracelulárních a extracelulárních podnětů. Množství CDK zůstává během buněčného cyklu konstantní. K jejich aktivaci je nutná vazba cyklinů a fosforylace threoninového nebo serinového residua CDK-aktivačními kinasami (CAK) (Morgan, 1995). Regulace pomocí fosforylace je dobře známá například u komplexu kinasu CDK2 a cyklinu B. Jejich vazbou vzniká „maturation-proforming factor“ (MPF), který je však inaktivní a až po jeho fosforylaci CAK na threoninu 161

dochází k aktivaci. Takto vzniklý komplex iniciuje přechod buňky z G₂ fáze do metafáze (Clarke, 1995).

2.1.1 Retinoblastoma protein (pRb)

Retinoblastoma protein (pRb) je produktem tumor supresorového genu RB1, který je častým cílem mutací u mnoha typů karcinogeneze. pRb je důležitým regulátorem buněčného cyklu a jeho ztráta vede k nekontrolovatelné proliferaci (Hickman *et al.*, 2002). Ve své hypofosforylované formě se pRb váže na transkripční faktor E2F, který je zodpovědný za transkripci genů vedoucích buňku z G₁ do S fáze. Po fosforylaci pRb komplexem cyklin D-CDK4/CDK6 dochází k vyvázání z E2F. Volný faktor spouští expresi proteinu p16, který je negativním regulátorem celé dráhy a zabraňuje vzniku komplexu cyklin D-CDK4/CDK6, čímž umožňuje vazbu pRb na E2F a blokáci cyklu v G₁/S kontrolním bodě (Weinberg, 1995). Historicky byl pRb uvažován pouze jako regulátor buněčného cyklu. Některé novější studie však dokazují, že hraje roli i v udržování genomové stability a apoptose, což vypovídá o jeho multifunkčnosti (Dick and Rubin, 2013).

2.1.2 p53

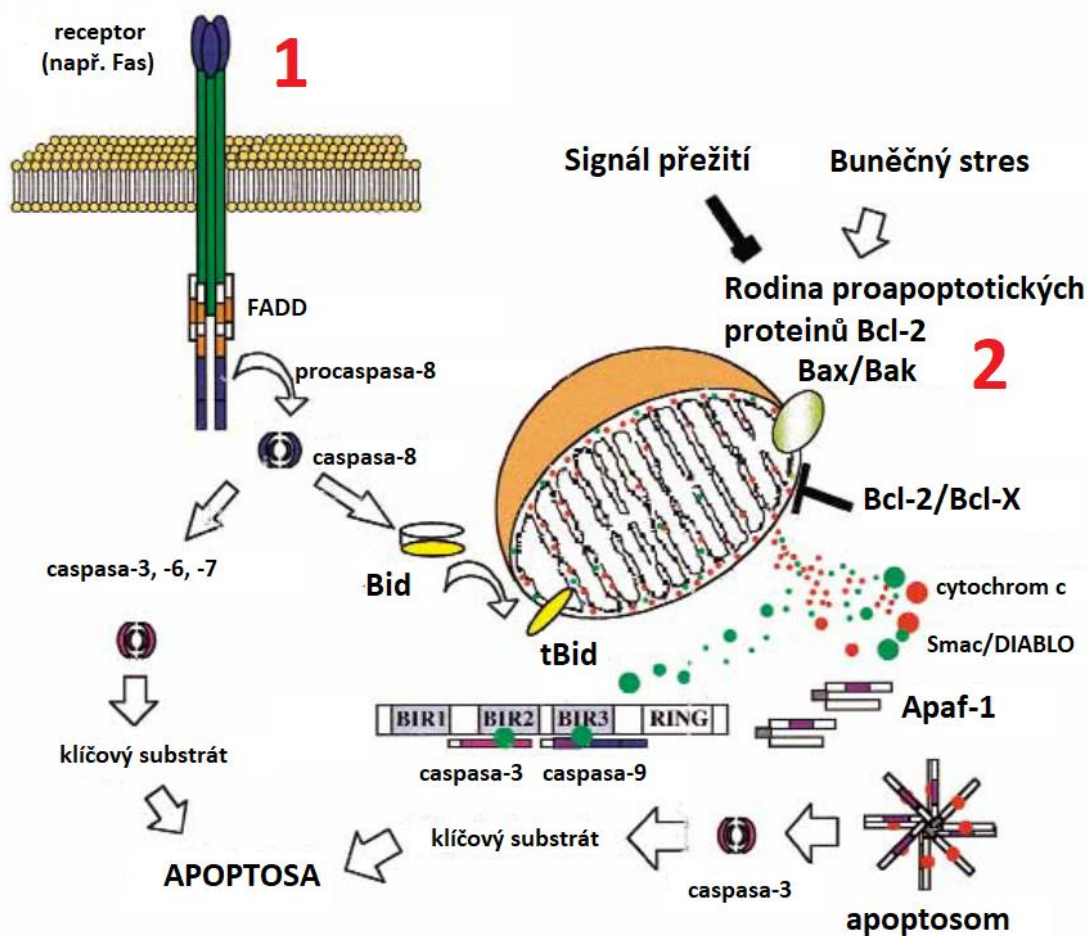
Protein p53 je tetramerní transkripční faktor spojený s genomovou stabilitou a rozvojem nádoru. Je zodpovědný za odpověď na stresové stimuly jako jsou poškození DNA nebo hypoxie (Levine, 1997). Jedním ze způsobů jeho regulace může být fosforylace na jeho N- a C-terminálních doménách, jak zkoumali Ashcroft a kolektiv. Ačkoliv jejich výsledky ukázaly, že fosforylace není nezbytná pro aktivaci transkripce p53, zvyšuje však její účinnost (Ashcroft *et al.*, 1999). Mezi negativní regulátory patří proteiny MDM2 a MDM4 (Bieging *et al.*, 2014). Protein MDM2 (E3 ubikvitinligasa) je produktem MDM2 onkogenu. Jeho zvýšené hodnoty snižují množství proteinu p53 a utlumují jeho funkci, čímž stoupá riziko rozvoje nádorového bujení (Hu *et al.*, 2012). Stejně je tomu u MDM4 (také označovaný MDMX), který je strukturním homologem MDM2. Sám však nemá

ubiquitinizační aktivitu a ovlivňuje degradaci p53 nepřímo po vazbě na MDM2 (Brown *et al.*, 2011).

2.2 Programovaná buněčná smrt – apoptosa

Slovo apoptosa pochází z řečtiny a znamená opadávání okvětních lístků nebo listů stromů. Jedná se o důležitý mechanismus kontrolované buněčné degradace, komplementární k buněčnému cyklu, jakožto regulaci počtu buněk v organismu (Kerr *et al.*, 1972). Apoptosa probíhá ve dvou dráhách – extracelulární a intracelulární mitochondriální (Obr. 1). Extracelulární dráha začíná vazbou ligandu na „receptor smrti“ na povrchu buňky, čímž dojde ke změně konformace receptoru a vzniku komplexu s caspasou-8. Tato caspasa je aktivována a sama iniciuje kaskádu aktivací dalších caspas. Spuštění extracelulární dráhy probíhá následkem nedostatku růstových faktorů, steroidních hormonů nebo vazbou ligandu FasL nebo TNF- α (tumour necrosis factor- α). Intracelulární dráha apoptosy může být spuštěna poškozením DNA. Dochází k aktivaci pro-apoptotických proteinů, které zapříčiňují uvolnění cytochromu *c* přes vnější mitochondriální membránu. Cytochrom *c* se následně spojí s procaspasou-9 a Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) a vzniká tak apoptosom. Vznik apoptosomu má za následek štěpení caspasy-3 (Hetts, 1998; Fuchs and Steller, 2015). K indukci apoptosy dochází vlivem cytostatik jako cisplatina nebo paklitaxel v liposomovém obalu (Feuser *et al.*, 2022). Dalším spouštěčem apoptosy může být peroxid vodíku, který iniciuje mitochondriální apoptotickou dráhu působením na proapoptotický marker Bax. Tato signalizační kaskáda byla zkoumána na buněčných liniích HeLa, které díky mutaci v genu kódující protein p53 neobsahují dostatek tohoto proteinu (Singh *et al.*, 2007).

Caspasy, cystein-dependentní aspartát proteasy, jsou enzymy, které se před svou aktivací vyskytují v buňkách jako zymogeny. Dělí se na iniciační (caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) a efektorové (caspasa-3, -6, -7) podle svého postavení v aktivační kaskádě (Creagh, 2014). Štěpení iniciačních procaspas vede k aktivaci caspas efektorových. Ty následně proteolyticky štěpí specifické substráty jako je aktinový cytoskelet, jaderná lamina, tubuliny a mikrotubuly (Taylor *et al.*, 2008).



Obr. 1: Způsoby aktivace apoptozy v buňce. 1 – vnější cesta spuštěná vazbou ligandu (např. FasL/TNF α) na receptor smrti Fas vedoucí ke spuštění aktivační kaskády. 2 – vnitřní cesta spuštěná převažujícím poměrem proapoptotických markerů vedoucí k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a tvorbě apoptosomu. Převzato z Zimmermann and Green, 2001.

2.2.1 Caspasa-7

Caspasa-7 patří spolu s caspasou-3 a -6 mezi efektorové caspasy, jejichž úlohou je proteolytické štěpení buněčných proteinů. Vyskytuje se v kratší (28 kDa) a delší formě (34 kDa). Zatímco delší forma působí jako inhibitor apoptozy, kratší forma caspasy-7 tvoří aktivní heterodimerní komplex a podílí se na štěpení PARP, čímž indukuje apoptosu (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995). Ačkoliv je podobnost caspas-7 a -3 značná, caspasa-7 specificky štěpí některé substráty a také je závislá na zánětlivých podmínkách zprostředkovaných caspasou-1 (Lamkanfi and Kanneganti, 2010).

2.2.2 Poly(ADP-ribosa) polymerasa (PARP)

Poly(ADP-ribosa) polymerasa (PARP) tvoří rodinu 17 jaderných enzymů, které vykonávají funkci například při opravě DNA, regulaci genové exprese, apoptose nebo diferenciaci imunitních buněk (Bai and Virág, 2012). Podstatnou izoformou této skupiny je PARP-1, skládající se ze tří hlavních domén. Součástí jedné z domén jsou zinkové prsty, jimiž se enzym váže k jednořetězcovým zlomům DNA (Jagtap and Szabó, 2005). Po vazbě dochází k posttranslační modifikaci, poly(ADP-ribosyl)aci, kdy za využití nikotinamidadenin dinukleotidu (NAD⁺) vzniká polymer ADP-ribosy vázající se k histonům chromatinu. Tím dochází k jeho rozvolnění a opravě DNA (Amé *et al.*, 2004). PARP je substrátem caspasy-3 v nádorové buněčné linii HeLa, proto jsou inhibitory caspasy-3 blokátory apoptosy (Calandria *et al.*, 2004).

2.2.3 Bcl-2

B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) je skupina proapoptotických a antiapoptotických proteinů ovlivňující vnitřní mitochondriální dráhu programované buněčné smrti. Tuto proteinovou rodinu lze dělit do tří podskupin podle účasti v udržování integrity a tvorbě pórů v mitochondriální membráně. První skupinou jsou antiapoptotické faktory Bcl-2 mezi které patří Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 a Boo. Proti nim stojí proapoptotické faktory Bak, Bax, Boc a Bcl-xS. Třetí skupinou jsou proapoptotické „BH3-only“ proteiny jako Bik, Bid, Bim, Bad, Bmf, NOXA nebo PUMA (Slabý *et al.*, 2015). Pomocí BH3 domény se váží na proapoptotické faktory a zajišťují permeabilizaci mitochondriální membrány (Kale *et al.*, 2018).

Spouštěčem vnitřní apoptotické dráhy je například buněčný stres. Jeho vlivem dochází ke změně poměru apoptotických markerů. Všechny Bcl-2 se vyznačují přítomností 1-4 homologních domén (BH) (Oltval *et al.*, 1993). Nguyen a kolektiv v roce 1993 uvedli, že tyto membránové proteiny na svém C-terminálním konci obsahují sekvenci, sloužící jako kotva k vnitřní mitochondriální membráně (Nguyen *et al.*, 1993). Proteiny Bak a Bax, patří do proapoptotické skupiny (Hotchkiss *et al.*, 2009). Bax, protein o hmotnosti 21 kDa, je homologní k antiapoptotickému Bcl-2 a vytváří s ním

homodimery a heterodimery. K vazbě dochází přes BH1 a BH2 domény. V případě převážení proapoptotického homodimeru Bax je spuštěna apoptosa (Oltval *et al.*, 1993).

2.2.4 Mcl-1

Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) je gen časně indukce při diferenciaci myeloblastické nádorové buněčné linie. Kozopas a kolektiv zkoumali podobnost genů Mcl-1 a Bcl-2 a zjistili, že patří do stejné genové rodiny. Proteiny produkované těmito geny mají podobné karboxylové části a hydrofobní karboxylové konce, jimiž se přichytávají k mitochondriální membráně (Kozopas *et al.*, 1993).

2.3 Další typy rozpadu buněk

Jedním z dalších regulovaných typů buněčné smrti je autofágie, kdy buňka degraduje samu sebe. Jedná se o vnitrobuněčný recyklační proces, který zajišťuje energii a stavební látky rozkladem cytoplasmatického materiálu (Mizushima and Klionsky, 2007). Podle mechanismu a funkce se dělí na několik podtypů: makroautofágie, mikroautofágie a chaperony zprostředkovaná autofágie (Mizushima *et al.*, 2008). Během makroautofágie dochází k tvorbě autofagozomů, což jsou odštěpené části cytoplasmatické membrány, které obsahují proteiny a organely určené k degradaci. Takto vzniklé autofagozomy fúzí s lysosomy za vzniku autolysozomů a následného rozkladu dopravených látek (Mizushima and Komatsu, 2011). Mikroautofágie se liší svou selektivitou. Pomocí chaperonů hsc70 jsou elektrostatickými interakcemi vázány rozpustné cytosolické proteiny. Děj probíhá současně s biosyntézou pozdních endosomů neboli multivesikulárních tělísek, do kterých jsou cytosolické proteiny vpravovány. Kombinací těchto drah dochází k degradaci jak cytosolu, tak jednotlivých organel (Sahu *et al.*, 2011). Chaperony zprostředkovaná autofágie (CMA) probíhá pomocí specifických membránových glykoproteinů, které působí jako receptory v membráně lysozomu (Cuervo and Dice, 1996). Tyto receptory váží cytosolické proteiny a přenáší je do lumenu lysozomů, bez vzniku specifických vesikul či deformace membrány (Massey *et al.*,

2004). CMA je buňkami využívána hlavně za podmínek nutričního a oxidačního stresu, svou roli však nachází i při stárnutí organismu (Massey *et al.*, 2006).

Buněčná smrt neprobíhá pouze za regulovaných podmínek. Nejčastějším nekontrolovatelným způsobem rozpadu tkáně je nekróza. Dochází k ní po mechanickém poškození nebo vystavení buňky toxickému prostředí. Jejím následkem je bobtnání, rozpad cytoplasmatické membrány, vakuolizace cytoplasmy, bobtnání mitochondrií a produkce prozánětlivých molekul, bez viditelných morfologických změn v jádře. To vše probíhá za blokace syntézy ATP (Edinger and Thompson, 2004; Tsujimoto, 1997). Vlivem buněčného rozpadu dochází k štěpení jaderné DNA na náhodně velké fragmenty (Tsujimoto, 1997). Jedním z faktorů vedoucí buňku k nekróze může být faktor nádorové nekrózy α (TNF- α), jak zkoumali Maiani a kolektiv. Buňky v přítomnosti TNF- α podléhaly apoptose zprostředkované caspasami. K jejich smrti však docházelo i po přidavku inhibitoru caspas zVAD-fmk, což dokazovalo schopnost TNF- α indukovat na caspasach nezávislou smrt (Maiani *et al.*, 2003).

Výzkum inhibitorů nezávislých na caspasach ukázal, že i v případě nekrózy existují regulační mechanismy. Degterev a kolektiv zkoumali spuštění neapoptotických drah pomocí inhibitoru necrostatin-1. Tato molekula po navázání na receptory smrti úspěšně inhibovala buněčnou smrt ve všech typech zkoumaných buněk (Degterev *et al.*, 2005). Regulovaná nekróza je charakteristická morfologickými změnami jako je granulace cytoplasmy a bobtnání organel či celé buňky. V závislosti na mechanismu dráhy regulované nekrózy, obecně nazývané nekroptóza, existuje několik alternativních podtypů buněčné smrti. Patří sem například parthanoptóza, oxitóza, ferroptóza, pyronekróza nebo pyroptóza (Berghe *et al.*, 2014). Nekroptóza je iniciována tvorbou porů v intracelulárních membránách, které mají za následek jejich rozpad. Následuje celá řada morfologických změn, jako je bobtnání organel, zvětšování buněčného objemu a kondenzace chromatinu. (Wang *et al.*, 2014).

2.4 Steroidní receptory

Steroidní receptory (SR) patří do super rodiny jaderných hormonálních receptorů zodpovědných za regulaci genové exprese. Tato rodina zahrnuje také receptory pro thyroïdní hormon, vitamín D, kyselinu retinovou a další ligandy. Jedná se o jednoduché

peptidy o molekulové hmotnosti 55 až 120 kDa. Steroidní receptory se ve své transkripčně aktivní formě, vázané na hormony, nacházejí výhradně v jádře. Jejich neaktivní subcelulární lokalizace se však může v rámci jednotlivých typů receptorů lišit (Kawata, 1995; Kumar *et al.*, 2006). Estrogenový receptor α i β je ve své nevázané formě převážně v jádře, glukokortikoidní a androgenní receptor se vyskytuje v cytoplasmě a distribuce mineralokortikoidního a progesteronového receptoru je rozložena do jádra i cytoplasmy (Griekspoor *et al.*, 2007).

SR se skládají ze tří domén: variabilního N-terminálního konce, krátké centrální oblasti bohaté na cystein, která umožňuje vazbu na DNA a C-terminálního konce (Beato, 1989). Společnou vlastností SR je vazba neaktivních receptorů s heat shock proteiny (hsp90, hsp70) a imunophiliny na C-terminálním konci (Pratt and Toft, 1997). Takto vázané neinteragují s jadernou DNA. Po vazbě hormonu do hydrofobní kavity C-terminálního konce složeného z 12 α -helixů, dochází k vyvázání heat shock proteinu a změně konformace této oblasti. Klíčový je helix 12, který se skládá těsně k C-terminálnímu konci a tím zajišťuje prostor pro interakci s transkripčními koregulátory (Henry and Norman, 2003). N-terminální konec je zodpovědný za dimerizaci SR, které jsou schopny tvořit jak homo- tak heterodimery. Tím dochází ke zvyšování afinity receptoru při vazbě na DNA. Mezi SR tvořící homodimery patří například progesteronový, glukokortikoidní a estrogenový receptor. Naopak heterodimery tvoří receptory pro vitamín D, thyroïdní hormon a kyselinu retinovou (Wong *et al.*, 1993).

2.4.1 Androgenní receptor (AR)

Androgenní receptor (AR) je jedním z jaderných transkripčních faktorů zodpovědný za aktivaci transkripce androgenních genů. Ligandem tohoto receptoru jsou mužské pohlavní hormony, jejichž zvýšené množství může vést k amplifikaci a nadměrné expresi AR genů a tím ke vzniku rakoviny (Koivisto *et al.*, 1998). Mezi nejvíce využívaná léčiva v terapii rakoviny prostaty patří antiandrogeny, blokující vazbu na receptory; inhibitory syntézy androgenů nebo inhibitory 5-alfa reduktasy blokující aktivní formu testosteronu 5-alfa dihydrotestosteron. Tyto látky se využívají při léčbě benigních i maligních forem rakoviny (Collins and Cheng, 2023).

Androgenní receptory se nachází v mozku, pohlavních orgánech, kostech, kosterním svalstvu a kardiovaskulárním systému (Ikeda *et al.*, 2012). Hlavním endogenním agonistou AR je testosteron a jeho metabolit dihydrotestosteron. Antagonisty, využívanými se v medicíně, jsou antiandrogeny první generace (flutamid, bicalutamid, nilutamid) a druhé generace (enzalutamid) (Tan *et al.*, 2015). AR se běžně vyskytuje v cytoplasmě, kde se váže na heat shock proteiny (hsp) a další chaperony. Po navázání ligandu dochází ke konformační změně, kde ligand-vázající doména (LBD) spolu s helixy 3, 4 a 12 tvoří aktivační funkční doménu (AF2). Její integrace s N-konci transaktivační domény vede k vyvázání AR z hsp a následné dimerizaci. Vazba AF2 na DNA probíhá pomocí koaktivátorů, což jsou proteiny využívající histon acetyl transferasu k modifikaci chromatinu (Bennett *et al.*, 2010; He *et al.*, 2002).

2.4.2 Glukokortikoidní receptor (GR)

Glukokortikoidy se podílejí na regulaci cirkadiálního rytmu, udržování homeostázy a odpovědi organismu na stres. Jsou hlavními ligandy glukokortikoidních receptorů (GR). Syntetické glukokortikoidy jsou využívány k léčbě zánětů, autoimunitních onemocnění, astmatu i rakoviny. GR se běžně nacházejí vázané na hsp v cytoplasmě. Po vazbě přirozeného nebo syntetického ligandu mění svou konformaci a přecházejí do jádra, kde působí jako aktivátory či represory transkripce (Kadmiel and Cidlowski, 2013; Oakley and Cidlowski, 2011).

V závislosti na alternativním sestřihu transkriptu genu kódujícího GR vznikají různé izoformy tohoto receptoru. Zatímco GR α po vazbě ligandu tvoří homodimery a váže se na responzibilní elementy DNA, GR β slouží jako negativní regulátor α izoformy v jádře buňky. Lze jej nalézt v celé řadě tkání napříč organismem a jeho zvýšené hladiny jsou spojovány s tvorbou glukokortikoidní rezistence (Lu and Cidlowski, 2004; Rhen and Cidlowski, 2005).

2.4.3 Estrogenový receptor (ER)

Estrogenový receptor α byl naklonován z krysí dělohy již v roce 1987, o několik let později byl naklonován také jeho β homolog, který se z 95 % shodoval v DNA-vazebné doméně a z 55 % v C-terminální ligand vázající doméně (Koike *et al.*, 1987; Kuiper *et al.*, 1996). Tyto domény spolu s N-terminální doménou tvoří tři nezávislé, ale interagující části receptoru. N-terminální doména, označovaná jako aktivační funkční doména (AF1), je zodpovědná za aktivaci transkripce cílových genů. Právě tato část se u homologů ER α a ER β značně liší a to tak, že AF1 má u ER α vyšší aktivitu (Nilsson *et al.*, 2001).

ER α se nejhojněji vyskytuje v ženských reprodukčních orgánech, kterými jsou děloha a vaječníky. Jeho exprese je však také v prsní tkáni, ledvinách, játrech, kostech a bílé adipósní tkáni. ER β pak můžeme nalézt kromě vaječnicků, centrálního nervového systému a kardiovaskulárního systému i v mužských reprodukčních orgánech a prostatě (Jia *et al.*, 2015). Hlavním přirozeným ligandem regulujícím většinu fyziologických funkcí je 17 β -estradiol. Jeho méně častými analogy jsou estron a estriol (Yaşar *et al.*, 2017). Estrogeny jsou jako hlavní agonisté ER využívány již dlouhou dobu při léčbě specifických symptomů menopauzy. Ačkoliv se od sebe ER α a ER β značně liší a zprostředkovávají vazbu na rozdílné responzibilní elementy s odlišnými produkty transkripce, využití ER agonistů nachází podobné uplatnění v hormonální terapii. ER β -selektivní agonisté se využívají zejména při léčbě nádorových onemocnění, zánětů a návalů horka při menopauze. Vzhledem k proliferačnímu efektu estrogenů, zprostředkovanému ER α , je využití selektivních agonistů tohoto receptoru zacíleno spíše na prevenci osteoporózy, přibírání hmotnosti a inzulinové rezistence (Leitman *et al.*, 2010).



Obr. 2: Schématické struktury receptorů ER α a ER β s uvedeným počtem aminokyselin. A/B je N-terminální doména, DBD/C oblast pro vazbu DNA, D flexibilní oblast, LBD/E C-terminální doména, F je oblast specifická pro ER α . Převzato z Griekspoor *et al.*, 2007.

2.4.4 Jaterní X receptor (LXR)

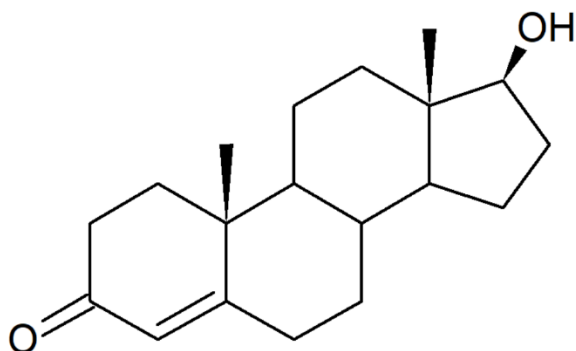
Aktivace jaterního X receptoru (LXR) závisí na hladině intracelulárního cholesterolu v buňkách. Aktivované LXR hrají stěžejní roli v absorpci, transportu a exkreci cholesterolu, kdy působí jako regulátory transkripce. Jejich další vlastností je vyvolávání imunitní a prozánětlivé odpovědi v makrofázích. Toto spojení z nich dělá atraktivní cílovou molekulu při léčbě metabolických chorob jako je ateroskleróza (Zelcer and Tontonoz, 2006).

Oba známé podtypy (LXR α i LXR β) tvoří po navázání ligandu heterodimery s retinoidním X receptorem a spolu se váží na responzibilní elementy (Apfel *et al.*, 1994; Alberti *et al.*, 2000). Exprese LXR α je soustředěna hlavně do jater, střev, adipózní tkáně a makrofágů, kdežto LXR β je rozšířená ve většině tkání (Repa and Mangelsdorf, 2000). Přírodními ligandy obou podtypů LXR jsou oxysteroly. V organismu jsou zapojeny do regulace homeostázy cholesterolu, syntézy steroidních hormonů a kyseliny žlučové nebo apoptosy (Lehmann *et al.*, 1997). Výzkum je zaměřen na studium syntetických agonistů, kteří mají potenciál k léčbě aterosklerózy. Příkladem je nesteroidní LXR agonista GW3967, jehož účinkem docházelo ke zmenšení aterosklerózních lézí až o 50 % (Joseph *et al.*, 2002).

2.5 Steroidní hormony a jejich deriváty

Steroidní hormony mají v organismu fyziologickou i patofyziologickou funkci, kdy hrají roli při tvorbě zánětu, adaptivní imunity či proliferaci nádorových buněk (Benagiano *et al.*, 2019; Chen, 2008). Z fyziologického hlediska jsou absolutně nezbytné pro účast v růstu, vývoji, energetickém metabolismu, reprodukci a udržování homeostázy. Jejich syntéza probíhá v mitochondriích a endoplasmatickém retikulu buněk kůry nadledvin, pohlavních orgánů a placenty. Podle místa produkce se dělí na mineralokortikoidy, glukokortikoidy, androgeny, estrogeny a progestiny (Becker, 2001). Tyto látky do buněk vstupují prostou difuzí, popřípadě aktivním transportem přes cytoplasmatickou membránu (Brann *et al.*, 1995). Zde nastává již dříve zmíněná vazba na steroidní receptory a přenos do jádra, čímž dochází k regulaci této signální dráhy (Kawata, 1995).

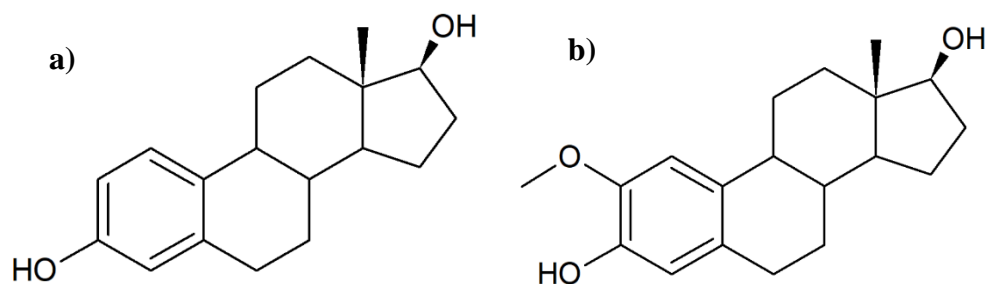
Testosteron, hlavní mužský androgenní hormon, je významný při diferenciaci mužských pohlavních orgánů. Je syntetizován z cholesterolu v endoplasmatickém retikulu a mitochondriích buněk varlat a kůry nadledvin. Při klasické cestě v organismu z cholesterolu vzniká pregnenolon, z něj 17-hydroxypregnenolon a následně 17-hydroxyprogesteron. Ten je konvertován v androstendion, který je premetabolitem testosteronu. V prostatě je testosteron 5α -reduktasou transformován na svůj účinnější metabolit dihydrotestosteron (DHT). Ten je 10 krát koncentrovanější než testosteron a váže se na AR s 10 krát větší afinitou (Crawford, 2009; Batth *et al.*, 2020). Při rozvoji rakoviny prostaty dochází ke zvýšení hladin 5α -reduktasy. Inhibitor tohoto enzymu finasterid snižuje prevalenci rakoviny prostaty (Thomas *et al.*, 2005). Suplementace testosteronu je využívána při andropauze, kdy u mužů s tímto onemocněním dochází ke snížení množství testosteronu v organismu (Kant *et al.*, 2023).



Obr. 3: Strukturální vzorec testosteronu

Estrogeny zodpovídají za vývin a diferenciaci ženských pohlavních orgánů a spermatogenezi u mužů. Důležitou roli však hrají i v dalších tkáních, kdy jsou zodpovědné za vývoj kostní dřeně, embryonální vývoj a správnou činnost mozku. Hlavním estrogenem je estradiol, který je syntetizován z testosteronu enzymem aromatasou. Estradiol zajišťuje buněčnou signalizaci vazbou na ER receptory. Mutace v genech kodujících aromatasu nebo ER zapříčiňují některé z endokrinních poruch (Fukami and Ogata, 2022; Cui *et al.*, 2013). Léčba estrogeny je využívána zejména u nemocí spojených se stářím jako je osteoporóza (Cui *et al.*, 2013). Syntéza 2-methoxyestradiolu probíhá z 17β -estradiolu pomocí jaterních enzymů cytochromu 450 a

katechol-O-methyl transferasy (Varricchio and Stevens, 2001). Mezi významné vlastnosti 2-methoxyestradiolu patří antiproliferační a antiangiogenní aktivita, čehož se využívá při léčbě rakoviny. V kombinaci s bortezomibem, tamoxifenem nebo epirubicinem tvoří terapeutika k léčbě rakoviny prsu (Ba *et al.*, 2019).



Obr. 4: a) strukturní vzorec estradiolu, b) strukturní vzorec 2-methoxyestradiolu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Použité buněčné linie

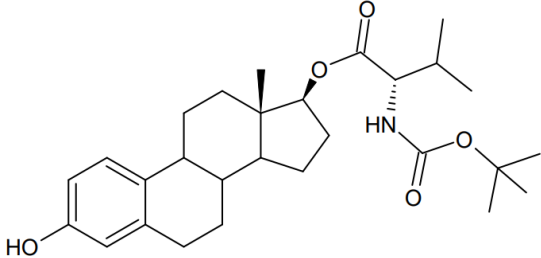
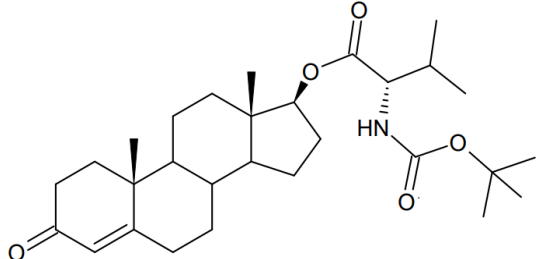
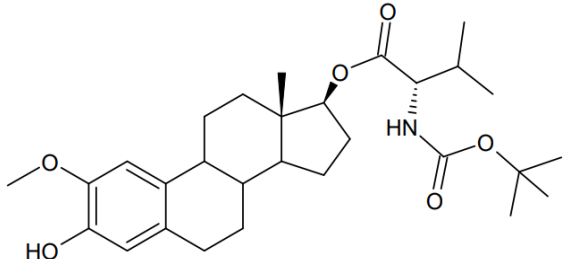
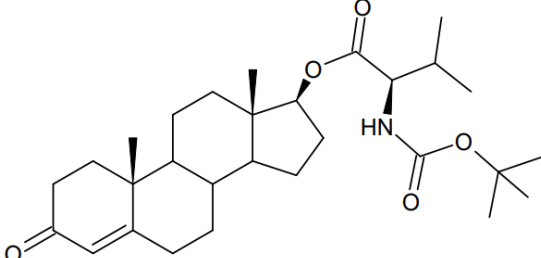
V experimentální části byla použita epitelová buněčná linie MCF7 odvozená od lidského prsního adenokarcinomu a epitelová buněčná linie HeLa odvozená od cervikálního karcinomu (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie)

3.1.2 Testované steroidní deriváty

K testování antiproliferační aktivity *in vitro* byly použity steroidní deriváty MK464 (konjugát estradiolu s valinem), MK465 (konjugát testosteronu s L-valinem), MK499 (konjugát 2-methoxyestradiolu s valinem) a MK653 (konjugát testosteronu s D-valinem), jejichž struktury zobrazuje tabulka 1. Substituovaný valin obsahuje na svém α uhlíku N-Boc skupinu. Tyto deriváty byly připraveny RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů, podle postupu v článku Rárová a kolektiv, 2018 (Rárová *et al.*, 2018). Pro experiment byly použity jejich roztoky o koncentraci 10 mM v DMSO, které byly následně ředěny do 10% DMEM média na finální koncentraci 10 μ M.

Jako standardy byly využity roztoky testosteronu, estradiolu a 2-methoxyestradiolu v DMSO, každý o koncentraci 10 μ M.

Tabulka 1: Informace o testovaných konjugátech. $c_{z\acute{a}s.}$ – zásobní koncentrace, IC_{50} – poloviční inhibiční koncentrace pro linii HeLa a MCF7.

Název	Vzorec	$c_{z\acute{a}s.}$ [mM]	IC_{50} [μ M]
MK464		7,5	$6,7 \pm 0,0$ (HeLa) $12,7 \pm 1,7$ (MCF7)
MK465		7,5	$7,3 \pm 0,8$ (HeLa) $20,0 \pm 3,5$ (MCF7)
MK499		7,5	$9,9 \pm 3,4$ (HeLa) $17,5 \pm 2,3$ (MCF7)
MK653		10	NT (HeLa) $45,2 \pm 4,7$ (MCF7)

3.1.3 Použité protilátky

K testování imunochemickými a imunofluorescenčními metodami byly použity níže uvedené primární protilátky (Tab. 2) a sekundární protilátky (Tab. 3).

Tabulka 2: Seznam použitých primárních protilátek pro imunodetekci i imunofluorescenci. IF – ředění pro imunofluorescenci, MW – molekulová hmotnost.

Název	Zdroj	MW [kDa]	Klon	Ředění	Výrobce
anti-PARP	králík	116, 89	46D11	1:500	Cell Signaling
anti- β -actin	myš	43	C4	1:5000	Santa Cruz
anti-caspase-7	králík	20, 35	-	1:250	Cell Signaling
anti-phosphoAR	králík	110	S81	1:500 (IF) 1:500	Merck Millipore
anti-phosphoER α	králík	66	Ser104/106	1:500	Cell Signaling
anti-phosphoRb	králík	110	Ser807/811	1:500	Cell Signaling
anti-p53	myš	53	DO-7	1:10	Cell Signaling
anti-Mcl-1	králík	40	D35A5	1:100	Cell Signaling
anti-Bcl-2	myš	26	-	1:1000	Sigma-Aldrich
anti-phosphoGR	králík	95	Ser211	1:1000	Cell Signaling
anti-ER β	myš	55	PPG5/10	1:20	Thermo
anti-AR	králík	110	D6F11	1:2000	Cell Signaling
anti-ER α	králík	66	D8H8	1:1000 (IF) 1:200	Cell Signaling
anti-GR	myš	95	G5	1:100	Santa Cruz
anti-LXR α/β	myš	56	G10	1:1000	Santa Cruz

Tabulka 3: Seznam použitých sekundárních protilátek pro imunodetekci i imunofluorescenci. IF – ředění pro imunofluorescenci, RAM/Px – králíčí proti myši značená křenovou peroxidasou, SWAR/Px – prasečí proti myši značená křenovou peroxidasou, GAR/Alexa Fluor 488 – kozi proti králíčí konjugovaná s barvivem Alexa Fluor 488, RAM/Alexa Fluor 488 – králíčí proti myši konjugovaná s barvivem Alexa Fluor 488.

Název	Zdroj	Ředění	Výrobce
RAM/Px	králík	1:1500	Sigma
SWAR/Px	prase	1:1000	Cell Signaling
RAM/Alexa Fluor 488	králík	(IF) 1:1000	Thermo
GAR/Alexa Fluor 488	koza	(IF) 1:1000	Thermo

3.1.4 Použité chemikálie

- Aceton (Lach-Ner, Česká republika)
- Akrylamid (AA) (Merck Millipore, USA)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (Bis) (Sigma-Aldrich, USA)
- Buthanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Lachema, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Pancreac Applichem, USA)
- Dithiotreitol (DTT) (Serva, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Lach-Ner, Česká republika)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, Česká republika)
- Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální telecí sérum 10% (Biowest, Francie)
- Fluorid sodný (NaF) (Sigma-Aldrich, USA)
- FluorSave Reagent (Merck Millipore, USA)
- Glycin (Calbiochem, USA)

- Hovězí sérový albumin (BSA) (Biowest, Francie)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (Penta, Česká republika)
- Chemiluminiscenční substrát SuperSignalTM West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chlorid draselný (KCl) (Chemopol, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl) (Penta, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, ČR)
- Kyselina octová (CH_3COOH) (Penta, Česká republika)
- Kyselina ortho-fosforečná (Penta, Česká republika)
- Leupeptin (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (Penta, Česká republika)
- Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxosíran amonný (APS) (BioRad, USA)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)
- Proteinový marker SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Bio-Rad, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Serva, Německo)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween 20 (MP Biomedicals, USA)
- Vanadičnan sodný (Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.5 Použité roztoky

- 1M TRIS/HCl (pH 6,8): 24,23 g TRIS / 200 ml H_2O pH 6,8
- 1M TRIS/HCl (pH 8,8): 24,23 g TRIS / 200 ml H_2O pH 8,8
- PBS + 0,1% Tween 20: 500 ml PBS; 500 μl Tween 20
- TBS + 0,1% Tween 20: 500 ml TBS; 500 μl Tween 20
- 1% BSA v PBS + Tween 20: 0,5 g BSA; 50 ml 0,1% PBS + Tween 20

- 10% APS: 0,1 g / 1 ml H₂O
- 10% DMEM: 10 % fetální sérum; 2 mM L-glutamin; 0,1 mg/ml streptomycin; 100 U/ml penicilin
- 10% SDS: 5 g SDS / 50 ml H₂O
- 5% BSA v TBS + Tween 20: 2,5 g BSA / 50 ml TBS + Tween 20
- 5% sušené mléko: 2,5 g sušené mléko / 50 ml TBS + Tween 20
- AA + Bis (30% Akrylamid + 0,8% Bisakrylamid): 58,4 g AA; 1,6 g N'N' Bis; 200 ml H₂O
- Činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie Brilliant Blue; 96% ethanol; 85% kyselina ortho-fosforečná
- Elektroforetický pufr 10× konc.: 76,6 g TRIS; 180 g glycin; 25 g SDS / 2,5 l H₂O
- Fixační roztok: methanol:aceton (1:1)
- Chemiluminiscenční činidlo: peroxid vodíku:luminol (1:1)
- PBS 10× konc. (pH 7,4): 80 g NaCl; 2 g KCl; 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 g KH₂PO₄
- Ponceau S: 0,1 g Ponceau S; 0,5 ml 98% CH₃COOH / 50 ml H₂O
- Western Blott pufr 10× konc.: 30,3 g TRIS; 144 g glycin / 1 l H₂O
- Lyzační pufr (RIPA): 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4); přidáno před použitím: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin, 2 mM NaF
- TBS 10× konc. (pH 7,6): 24,2 g TRIS; 80 g NaCl; HCl k úpravě pH / 1 l H₂O

3.1.6 Použité přístroje

- Analytické laboratorní váhy AE240 (METTLER TOLEDO, Švýcarsko)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu (Bio-Rad, USA)
- Aparatura pro western blotting (Bio-Rad, USA)
- Centrifuga CompactStar CS4 (VWR International, USA)
- CO₂ inkubátor MLO-19AICLE (Panasonic, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop IX51 (Olympus, Japonsko)
- Chlazená centrifuga Heraeus Megafuge 16R (ThermoFisher Scientific, USA)
- Chemiluminiscenční kamera LAS4000 (Fujifilm, Japonsko)

- Kývačka Mini Rocket-Shaker (Biosan, Litva)
- Laboratorní váhy Kern PCB (Kern, Německo)
- Flowbox (Telstar, USA)
- Magnetická míchačka (VELP Scientifica, Itálie)
- Optický mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Německo)
- Termoblok (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus (Bandelin, Německo)
- Vakuová pumpa Vacusafe comfort (Integra Bioscientifica, Švýcarsko)
- Vodní lázeň (GFL, Německo)
- Vortex Wizard Advancer IR Vortex Mixer (VELP Scientifica, Itálie)
- Zdroj napětí PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

3.2 METODY

3.2.1 Kultivace buněčných linií, ovlivnění testovanou látkou a sklizení

Kultivace obou buněčných linií MCF7 i HeLa probíhala v laminárním boxu za stejných podmínek. Na Petriho miskách o průměru 100 mm byly buňky kultivovány v přítomnosti 10% kultivačního média DMEM. Několikrát do týdne byly pasážovány, kdy po odsátí starého média bylo ke kultuře v misce napipetováno 3 ml EGTA po okraji misky. Po odsátí tohoto roztoku bylo do misky napipetováno 2 ml trypsinu a takto byla miska vložena do inkubátoru, což vedlo k uvolnění buněčné linie z jejího dna. Následně byl povrch misky opláchnut 5 ml DMEM a celý její obsah byl přenesen do zkumavky, která byla centrifugována při $1000 \times \text{rpm}$ po dobu 5 minut. Médium bylo odsáto a k peletu buněk byly přidány 2 ml nového DMEM. Obsah zkumavky byl rozdělen 1:2 přenesením 1 ml do dvou nových misek. Misky byly doplněny 9 ml média a vloženy do inkubátoru. Kultivace probíhala v inkubátoru za stabilních podmínek (teplota 37°C , 100 % vlhkost, atmosféra 5,5 % CO_2).

Poté co buňky narostly po celém povrchu misek, byly opět pasážovány uvedeným způsobem. Veškerý buněčný pelet byl rozpuštěn v 20 ml DMEM. Z této suspenze bylo odebráno 10 μl a pomocí Bürkerovy komůrky bylo v optickém mikroskopu spočítáno množství buněk ve 3 velkých čtvercích. Ze zjištěného množství buněk v přesně definovaném objemu byl vypočítán objem buněčné suspenze nutný k naředění na koncentraci 7×10^6 buněk ve 100 ml. Suspenze byla naředěna DMEM médiem na tuto koncentraci a buňky byly vysázeny na Petriho misky v objemu 10 ml.

Roztoky testovaných látek o koncentraci 10 μM byly připraveny naředěním zásobních roztoků do DMEM média. Po 24 hodinách byly buněčné linie těmito roztoky ovlivněny. Koncentraci 10 μM měly i zvolené standardy, kterými byly testosteron, estradiol a 2-methoxyestradiol. Jako kontrola vlivu rozpouštědla bylo použito DMSO a k neovlivněným kontrolním buňkám bylo přidáno pouze 5 ml 10% DMEM média. Misky s látkami byly inkubovány po dobu 24 hodin.

Následné sklizení probíhalo na ledu za nesterilních podmínek. Každá miska byla nejdříve důkladně prohlédnuta v optickém mikroskopu a případné změny buněčné kultury způsobené vlivem testovaných látek byly zapsány. Následně byl povrch misek

převrstven 1 ml studeného PBS. Buňky byly ze dna misky seškrábány škrabkou a automatickou pipetou přeneseny do zkumavky na ledu. Takto zpracované zkumavky s buněčnými suspenzemi byly centrifugovány 10 minut při 4 °C a tíhové zrychlení 1000 × g. Ze zkumavek byl odsát supernatant, jednotlivé pelety byly resuspendovány v 1 ml studeného PBS a přeneseny do mikrozkušavek. Ty byly popsány a opět zcentrifugovány po dobu 10 minut při 4 °C a 1000 × g. Z mikrozkušavek byl odsát veškerý supernatant a poté byly umístěny do mrazáku při teplotě -80 °C.

3.2.2 Lyzace buněk

Pro získání proteinů z buněk je potřeba narušit jejich membránu. Proto byly buňky vystaveny působení lyzačního pufru, který obsahuje detergenty, soli a inhibitory proteas a fosfatas. Před zahájením lyzace byl připraven 1 ml lyzačního pufru RIPA podle návodu (984 μl RIPA, 10 μl PMSF, 1 μl leupeptin, 1 μl aprotinin, 1 μl DTT, 2 μl NaF, 1 μl Na₃VO₄). K peletům v mikrozkušavkách na ledu bylo přidáno 30-50 μl lyzačního pufru dle velikosti peletu. Lyzáty byly inkubovány na ledu 30 minut, během toho byly třikrát resuspendovány automatickou pipetou. Pro důkladné narušení membrány buněk byly lyzáty zhomogenizovány ultrazvukovým homogenizátorem (10 s, 3 cykly, 30 %). Následně byly zkumavky centrifugovány 30 minut při 4 °C a 14000 × g. Přesný obsah supernatantu byl odebrán do nových mikrozkušavek.

Koncentrace proteinů v supernatantu byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm pomocí metody Bradforda. Do 1 ml Bradfordova činidla ve skleněné zkumavce byl přidán 1 μl stanovovaného roztoku a zkumavka byla promíchána na vortexu. Následně byl roztok ve zkumavce inkubován po dobu 10 minut. Všechny vzorky byly měřeny v duplikátu na spektrofotometru. Po změření koncentrace proteinů byly vzorky čtyřikrát naředěny 5x SDS. Následně byly 5 minut zahřáty na teplotu 96 °C v termobloku, zcentrifugovány 20 sekund na stolní centrifuze, promíchány na vortexu a zmrazeny při teplotě -20 °C. Takto byly připraveny pro SDS-PAGE a následný Western blotting.

3.2.3 SDS-PAGE a Western blotting

Před začátkem elektroforézy byly připraveny 2 polyakrylamidové gely podle návodu (Tab. 3). Pro buněčné linie MCF7 byl použit 10% dělicí gel, pro linie HeLa pak 12,5% gel. Po nanesení dělicího gelu mezi elektroforetická skla byla jeho hladina převrstvena butanolem, aby se předešlo vytvoření bublin na jejím povrchu. Za 45 minut, kdy došlo k zatuhnutí dělicího gelu, byl butanol odsán filtračním papírem a místo něj byl nanesen zaostřovací gel. Poté, co hladina tohoto gelu sahala na okraj skel, do něj byl vložen patnácti jamkový hřebínek. Zaostřovací gel byl v obou případech 5%. Gely byly zhruba hodinu ponechány k zatuhnutí.

Tabulka 4: Přehled chemikálií a objemů pro přípravu dvou polyakrylamidových gelů

	10% dělicí gel	12,5% dělicí gel	5% zaostřovací gel
AA+Bis	3,125 ml	3,9 ml	840 μ l
H ₂ O	2,67 ml	1,94 ml	3,51 ml
TRIS pH 8,8	3,5 ml	3,5 ml	-
TRIS pH 6,8	-	-	630 μ l
10% SDS	94 μ l	94 μ l	50 μ l
TEMED	6,25 μ l	6,25 μ l	5 μ l
APS	37,5 μ l	37,5 μ l	30 μ l

Zmražené vzorky pro elektroforézu byly na 2 minuty zahřáty v termobloku při teplotě 96 °C. Mezitím byla z elektroforetické komůrky s víkem a stojanem pro umístění gelů sestavena aparatura pro vertikální elektroforézu. Mezi skla gelů byl použit 1 l ELFO pufu 1 \times (připraven ze 100 ml ELFO pufu 10 \times a 900 ml destilované vody). Do jamek v zaostřovacím gelu byly jako první nanесeny 4 μ l proteinového markeru, poté byly postupně nanášeny vzorky ve vypočítaných objemech (35 μ g na jamku). Po nanesení vzorků do obou gelů bylo na zdroji nastaveno napětí 90 V. Po zajetí vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla ukončena po doputování vzorků ke konci gelu (zhruba 1,5 hodiny).

Po ukončení SDS-PAGE byla aparatura rozebrána a skla gelů od sebe byla oddělena špachtlí. Dělicí gel byl přenesen na nitrocelulózovou membránu, která byla

vložena mezi vlhké blotovací papíry, poté mezi porézní podložky a takto byla uzavřena v blotovací kazetě. Po nalití 1 l blotovacího pufru (připraven ze 100 ml BLOT pufru 10× a 900 ml destilované vody) do blotovací vany byla celá aparatura přesunuta na magnetickou míchačku, kde za stálého míchání docházelo k chlazení chladicí vložkou. Membrány byly blotovány při proudu 270 mA po dobu 3 hodin.

Po ukončení Western blottingu byly membrány vytaženy z kazety a 5 minut barveny v roztoku Ponceau S, který obarvil pouze bandy s nablíženými proteiny. Následně byly přeneseny do destilované vody, která přebytečný barvicí roztok vymyla. Poté byly vysušeny.

3.2.4 Imunodetekce proteinů

Dle potřeby byl připraven 5% roztok BSA v 1× TBS/TWEEN (2,5 g BSA bylo rozpuštěno v 50 ml 1× TBS/TWEEN) nebo 5% roztok mléka v 1× TBS/TWEEN (2,5 g sušeného mléka bylo rozpuštěno v 1× TBS/TWEEN). Z nitrocelulósových membrán s bandy byly skalpelem vyřezány proužky podle molekulových hmotností stanovených proteinů. Po odbarvení proužků v roztoku TBS po dobu 5 minut byly proužky přeneseny do 5% roztoku BSA v 1× TBS/TWEEN nebo 5% roztoku mléka v 1× TBS/TWEEN. V tomto roztoku byly hodinu promývány na kývačce, čímž došlo k blokaci nespecifických vazeb na membráně. Jako vlhká komůrka sloužil plastový box, v kterém byla umístěná podložka s parafilmem. Proužky byly přeneseny na podložku a převrstveny primárními protilátkami (Tab. 1). Vlhká komůrka byla přes noc uchovávána v lednici.

Následující den byly proužky membrán promývány v 1× TBS 5 minut, 1× TBS/TWEEN 5 minut, 1× TBS 5 minut a 1× TBS 10 minut. Poté byly převrstveny příslušnými sekundárními protilátkami (Tab. 2) a ponechány 1 hodinu k inkubaci při laboratorní teplotě. Následně byly na kývačce promývány v 1× TBS 10 minut, 1× TBS/TWEEN 5 minut, 1× TBS 5 minut a 1× TBS 10 minut. Membrány byly přeneseny na podložku s parafilmem a převrstveny substrátem (luminol a křenová peroxidasa v poměru 1:1). Po 5 minutové inkubaci byla detekována chemiluminiscence pomocí chemiluminiscenční kamery (LAS-4000 Image, Fujifilm, Japonsko) a programu ImageReader. Vlivem oxidace luminolu křenovou peroxidasou, navázanou na sekundární protilátce, zde docházelo k emisi a následné detekci chemiluminiscenčního signálu.

3.2.5 Imunofluorescence

Přechod steroidních receptorů AR a ER α do jádra byl detekován pomocí imunofluorescenčních metod na buněčných liniích MCF7. Buněčné linie byly sklizeny z Petriho misky podle předchozího postupu. Následně byly resuspendovány v 5 ml 10% DMEM ve zkumavce. Poté byly spočítány v Bürkerově komůrce a naředěny na koncentraci 60 tisíc buněk na 1 ml. Takto byly přeneseny do osmi jamkových slidů po 250 μ l na jamku. Po 24 hodinách došlo k ovlivnění linií testovanými látkami o koncentracích 10 μ M a 1 μ M. Stejně koncentrace byly zvoleny pro standardy, kterými byly testosteron, estradiol a 2-methoxyestradiol. Jako kontrola vlivu rozpouštědla sloužil roztok 10 μ M DMSO v DMEM a kontrolní buňky zůstaly bez ovlivnění. Po 24 hodinách bylo médium odsáto a buňky byly opláchnuty ve 200 μ l PBS. Po odsátí roztoku PBS bylo přidáno 200 μ l ledového roztoku aceton:methanol, a slidy s buňkami byly na 10 minut umístěny do teploty -20 °C. Tím došlo k fixaci buněk ke dnu jamek. Fixace byla odsána. Slidy byly ponechány v laminárním boxu k vyschnutí a poté byly uchovávány při teplotě -20 °C.

Barvení fixovaných buněk bylo provedeno pomocí sekundární protilátky konjugované s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488. Před detekcí byly slidy 3 minuty promývány roztokem PBS + 0,1% Tween 20 a následně byly 30 minut blokovány v 1% BSA v PBS + Tween 20 při laboratorní teplotě. Poté byly opět promyty v PBS + 0,1% Tween 20 a do každého slidu bylo aplikováno 150 μ l primární protilátky. Slidy byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly promývány 15 minut v roztoku PBS + 0,1% Tween 20. Poté byla aplikována sekundární protilátka a slidy byly 90 minut inkubovány při teplotě 4 °C ve tmě, čímž bylo zabráněno nadměrnému vysvěcování fluorescenčního barviva. Po inkubaci byly slidy promyty v PBS a destilované vodě. Vysušené slidy byly zakápnuty FluorSave reagentem a foceny na fluorescenčním mikroskopu při 400x zvětšení.

4 VÝSLEDKY

Účinky steroidních konjugátů s N-Boc-valinem byly zkoumány na nádorových liniích MCF7 a HeLa. Látky byly testovány pomocí metod western blottingu a imunofluorescenční mikroskopie. K detekci pro- a antiapoptotických markerů významných pro apoptosu byla použita linie HeLa, u které se v laboratoři KEB ukázala zvýšená citlivost na steroidní látky. Naopak pro detekci steroidních receptorů, jako jsou AR, ER α nebo GR, byla využita linie MCF7, jelikož jde o hormonálně závislou linii. U této linie pak byla také pomocí fluorescenčního mikroskopu sledována případná translokace steroidních receptorů ER α a AR z cytoplasmy do jádra.

4.1 Western blotting a imunodetekce

Pro detekci pro- a antiapoptotických markerů byla využita metoda western blotting s následnou imunodetekcí. Nádorová buněčná linie HeLa byla po dobu 24 hodin ovlivněna látkami MK464, MK465, MK499 a MK653 o koncentraci 10 μ M. Zkoumané látky jsou deriváty testosteronu, estradiolu a 2-methoxyestradiolu, proto byly uvedené látky využity jako standardy, všechny o koncentraci 10 μ M. Pro porovnání účinku zkoumaných látek byly použity neovlivněné kontrolní buňky (značené jako Ko $^-$) a buňky s přidáním DMSO (značené Ko $^+$) po dobu 24 hodin.

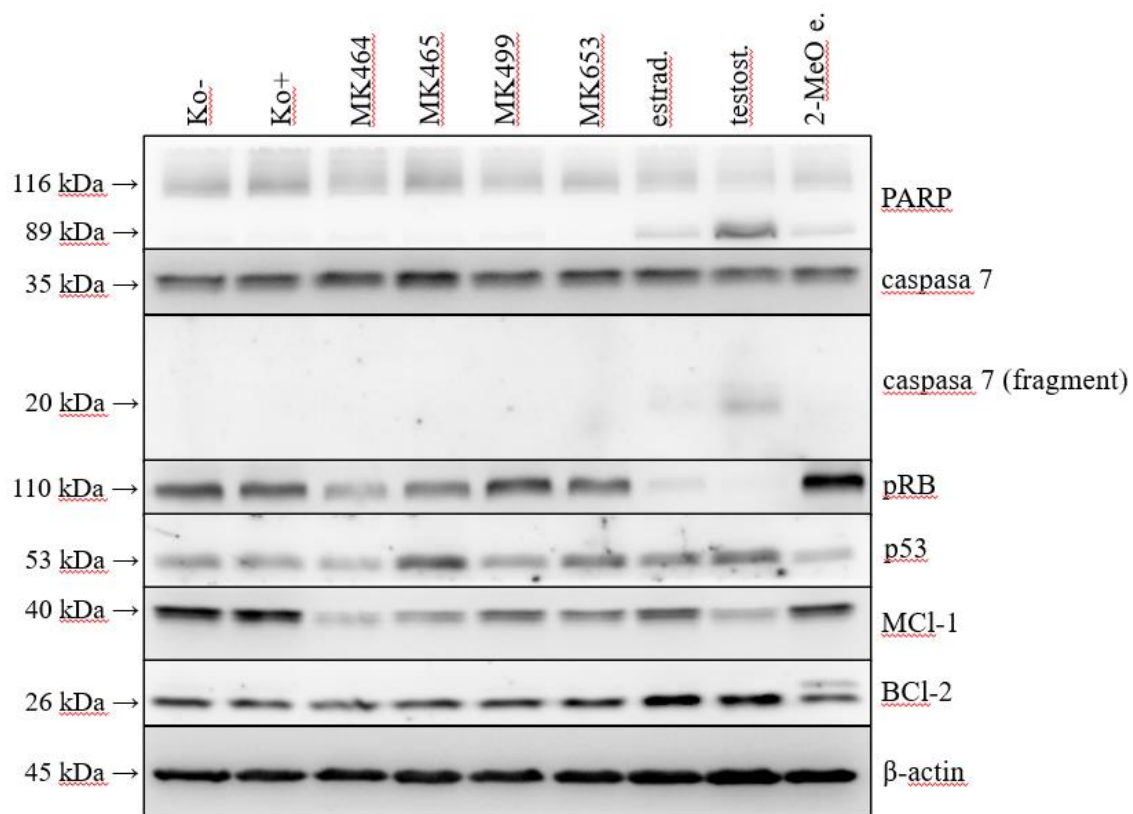
Protein PARP je apoptotickým markerem a substrátem caspas, které zajišťují jeho štěpení. Detekce štěpného fragmentu o obvyklé hmotnosti 89 kDa je důkazem přechodu buněk do apoptosy. Tento fragment byl detekován v buňkách ovlivněných testosteronem, estradiolem a 2-methoxyestradiolem po dobu 24 hodin. Nejsilnější exprese proteinu byla identifikována v buňkách ovlivněných testosteronem, kdy docházelo ke kompletnímu rozštěpení proteinu PARP. Tento fragment nebyl zaznamenán u žádné ze zkoumaných látek (Obr. 5).

Dalším ze zkoumaných apoptotických markerů je caspasa-7 (zymogen velikost 35 kDa), která zajišťuje štěpení proteinu PARP. Sama se pak při apoptose štěpí na svou aktivní formu, která je pomocí imunodetekce identifikovatelná jako fragment o hmotnosti 20 kDa. Tento fragment je zaznamenán v buňkách ovlivněných testosteronem a v nízké míře i estradiolem, po dobu 24 hodin.

Retinoblastomový protein, produkt tumor supresorového genu, je ve své hypofosforylované aktivní formě navázán na E2F transkripční faktor. Po fosforylaci cyklin dependentními kinasami je deaktivován a uvolněn z E2F, čímž umožňuje buněčné dělení (Weinberg, 1995). Detekce fosforylované formy ukázala výrazné zvýšení exprese u standardu 2-methoxyestradiolu. Protein o hmotnosti 110 kDa nebyl detekován v buňkách ovlivněných testosteronem ani estradiolem, nedocházelo zde k jeho fosforylaci. Zvýšenou expresi ukázaly také testované látky MK499 a MK653, což mohlo značit zástavu buněčného dělení po ovlivnění buněk těmito látkami. U konjugátů MK464 a MK465 bylo neaktivní formy tohoto proteinu méně.

Protein p53 je transkripčním faktorem aktivujícím a inhibujícím expresi genů zodpovědných zejména za regulaci buněčného dělení a opravu poškozené DNA (Perry and Levine, 1993). V buněčných liniích HeLa je přítomen i v kontrolních buňkách. Snížené množství tohoto proteinu oproti kontrolním buňkám se nacházelo v buňkách ovlivněných MK464 a standardem 2-methoxyestradiolem.

Apoptotické markery Bcl-2 a Mcl-1 patří do skupiny antiapoptotických proteinů podílejících se na udržování integrity mitochondriální membrány. O přechodu buňky do apoptosy rozhoduje jejich poměr vůči proapoptotickým markerům v mitochondrii (Slabý *et al.*, 2015). Hladina exprese proteinu Bcl-2 byla výrazně zvýšená v buňkách ovlivněných standardy testosteron a estradiol. Naopak pro MK464 a standard 2-methoxyestradiol docházelo oproti kontrolním buňkám k mírnému poklesu. Při detekci Mcl-1 docházelo k výrazným změnám exprese hladiny proteinu. Nejintenzivněji byla hladina detekována v buňkách kontrolních a těch ovlivněných 2-methoxyestradiolem. Z testovaných látek expresi nejvíce snižovaly konjugáty MK464 a MK465. Snížení způsoboval i testosteron. To mohlo být ovlivněno přítomností aktivní caspasy, která se podílí na štěpení tohoto proteinu.



Obrázek 5: Výsledky imunodetekce apoptotických proteinů v buněčné linii HeLa po ovlivnění steroidními konjugáty a standardy po dobu 24 hodin. Zleva MK464, MK465, MK499, MK653, testosteron, estradiol a 2-methoxyestradiol, všechny látky o koncentracích 10 μ M.

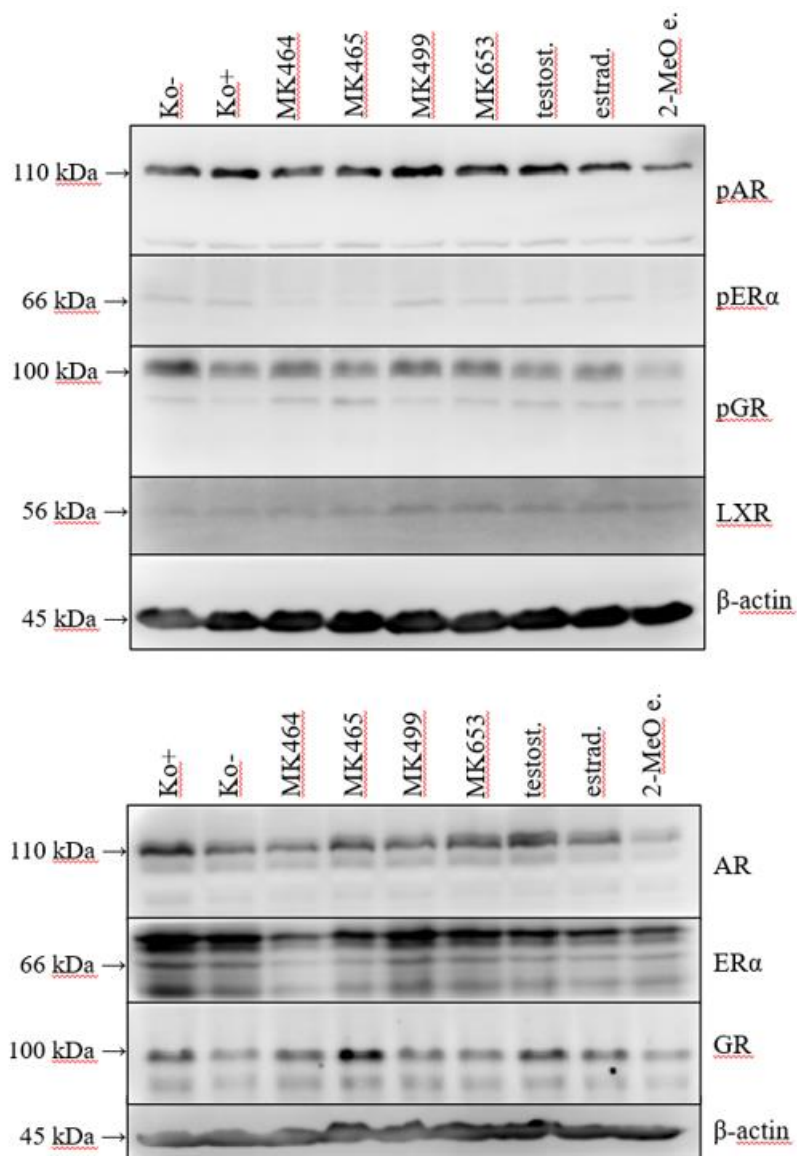
Ke sledování hladin steroidních receptorů pomocí imunodetekce i pozorování translokace steroidních receptorů z cytoplasmy do jádra byla využívána hormonálně závislá buněčná linie MCF7. Steroidní receptory byly porovnávány ve svých celkových a fosforylovaných formách. Při blokaci membrán byl používán 5% roztok BSA v 1× TBS/TWEEN nebo 5% roztok mléka v 1× TBS/TWEEN.

Androgenový receptor (AR), protein o velikosti 110 kDa, je fosfoprotein sloužící jako jaderný transkripční regulátor závislý na vazbě ligandu jako je testosteron nebo dihydrotestosteron (Brown *et al.*, 1989). U fosforylované formy tohoto proteinu docházelo ke zvýšení exprese pro látku MK499, pro 2-methoxyestradiol bylo naopak detekováno snížení exprese. Nejintenzivnější hladina celkové formy AR byla detekována pro standard testosteron. Ze zkoumaných látek byla nejintenzivnější exprese pozorována pro konjugáty MK465 a MK653.

Estrogenové receptory ER α a ER β jsou transkripční faktory účastníci se regulace mnoha metabolických procesů. Nejhojněji se vyskytují v jádře, lze je však nalézt také v cytoplasmě a mitochondriích (Jia *et al.*, 2015). Pomocí imunodetekce byla testována exprese podtypu α . ER α je protein o hmotnosti 66 kDa a nejvyšší hladina exprese fosforylované formy tohoto receptoru se vyskytovala v kontrolních buňkách a buňkách ovlivněných látkami MK499, testosteronem a estradiolem. Pokles hladin byl pak pozorován pro látky MK464, MK465 a 2-methoxyestradiol. Při sledování celkové formy byla exprese nejintenzivněji detekována pro MK499, o něco méně pak pro MK465 a MK653. Naopak pro konjugát MK464 a standard 2-methoxyestradiol v porovnání s kontrolními buňkami hladina exprese ER α výrazně klesala.

Dalším z transkripčních regulátorů je glukokortikoidní receptor (GR), nacházející se v cytoplasmě. Po navázání ligandu dochází k jeho translokaci do jádra, kde působí jako aktivátor nebo represor transkripce (Zhou and Cidlowski, 2005). Hladina exprese pro fosforylovanou formu tohoto proteinu (pGR) v buňkách ovlivněných 2-methoxyestradiolem klesá. Nejintenzivnější zvýšení pGR je pro kontrolní buňky bez ovlivnění, slabší je pak signál pro MK464, MK499 a MK653. Výrazné zvýšení hladiny celkové formy lze pozorovat v buňkách ovlivněných konjugátem MK465 a testosteronem. Naopak pro 2-methoxyestradiol exprese oproti kontrolním buňkám klesá, stejně jako tomu bylo pro pGR.

Posledním ze studovaných receptorů byl jaterní X receptor (LXR). Mírné zvýšení hladiny bylo pozorováno pro látku MK499, u dalších vzorků však k výraznějšímu ovlivnění exprese nedocházelo, a proto také bylo upuštěno od detekce fosforylované formy tohoto receptoru.

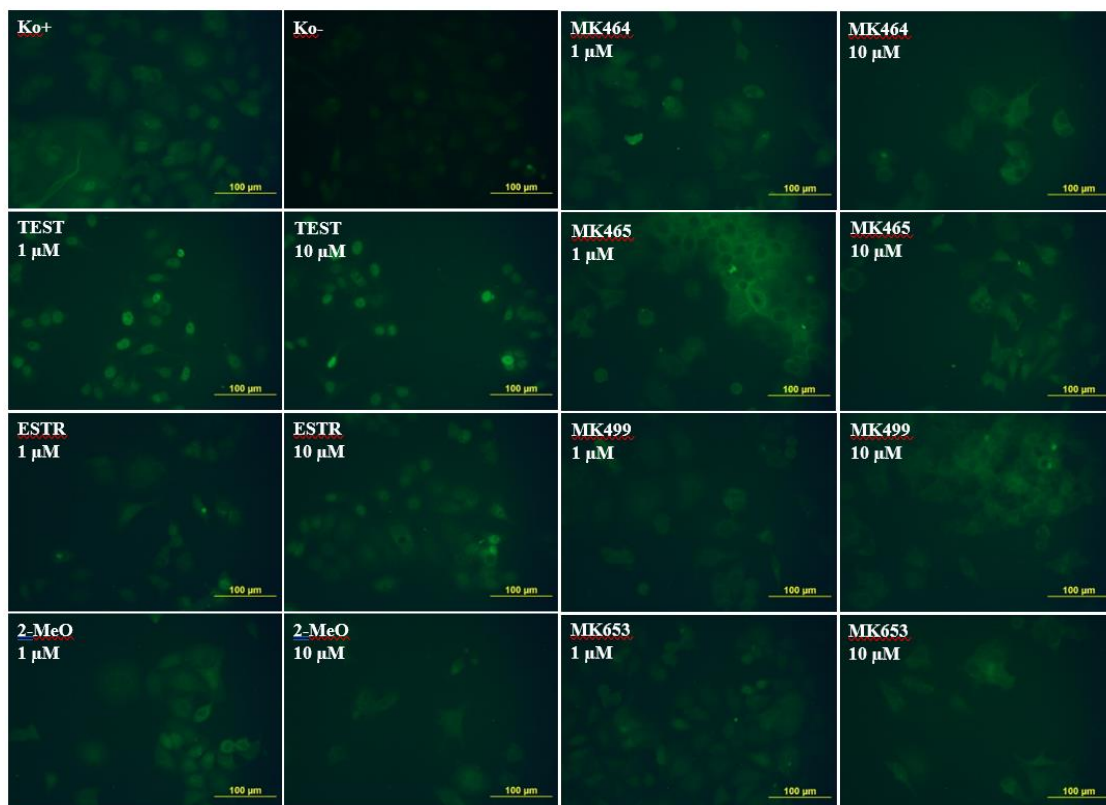


Obrázek 6: Výsledky imunodetekce steroidních receptorů v buňkách MCF7 po ovlivnění steroidními konjugáty a standardy po dobu 24 hodin. Zleva MK464, MK465, MK499, MK653, testosteron, estradiol a 2-methoxyestradiol, všechny látky o koncentracích 10 μM.

4.2 Imunofluorescenční analýza

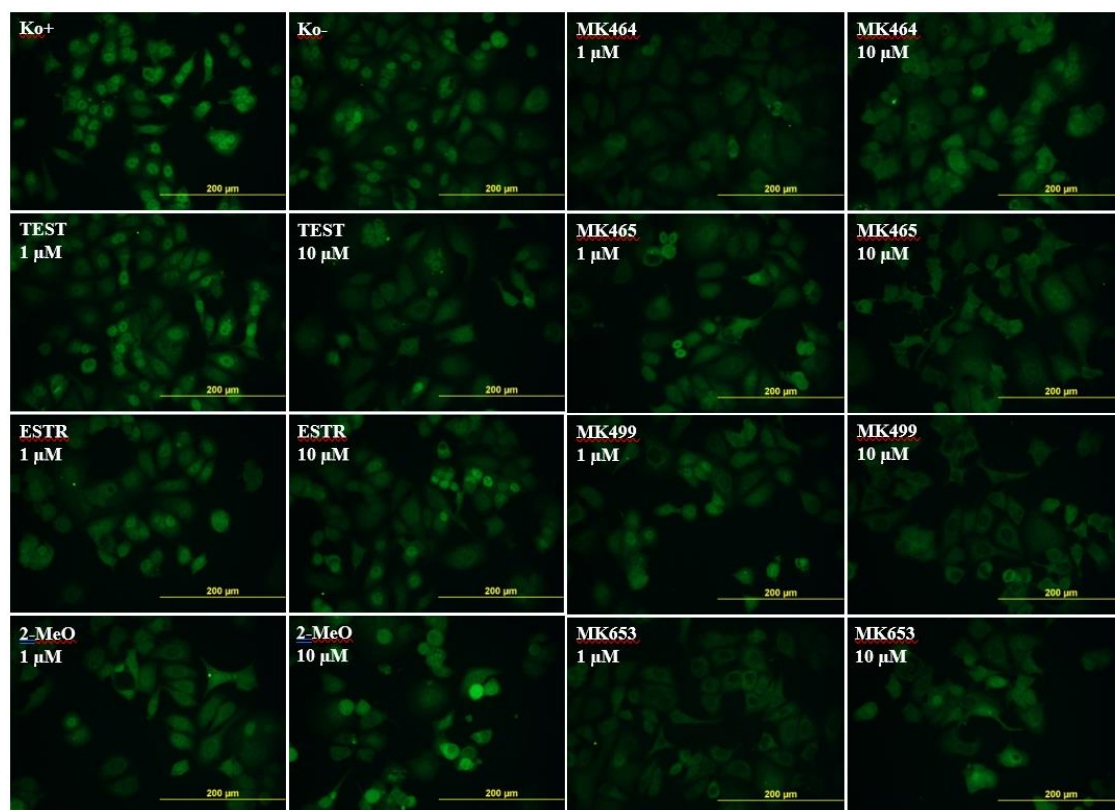
Pro potvrzení účinků detekovaných western blottingem byla využita metoda imunofluorescence k sledování lokalizace steroidních receptorů AR a ER α a jejich případné translokace do jádra. Buněčná linie MCF7 odvozená od lidského prsního adenokarcinomu byla ovlivněna studovanými látkami MK464, MK465, MK499, MK653 a standardy testosteronem, estradiolem a 2-methoxyestradiolem. Všechny tyto látky byly testovány při koncentracích 10 a 1 μ M.

Pomocí primární protilátky anti-AR (myší) a fluorescenční sekundární protilátky (králíčí-anti-myší AF488) byl sledován vliv testovaných látek na translokaci androgenních receptorů z cytoplasmy do jádra. Kontrolní buňky (Ko⁻) ovlivněny nebyly. V těchto buňkách k translokaci nedocházelo. Stejně tomu bylo v negativních kontrolních buňkách (Ko⁺), s DMSO po dobu 24 hodin. K nejvýraznějšímu přenosu AR do jádra buněk docházelo při ovlivnění testosteronem o koncentraci 10 i 1 μ M. Stejně tak k translokaci docházelo i pro estradiol o koncentraci 1 μ M, vyšší koncentrace však byly pro linii příliš toxické. Pro 2-methoxyestradiol, MK464, MK465, MK499 a MK653 byly obarvené androgenní receptory identifikovány pouze v cytoplasmě, nikoliv v jádře. Fluorescenční signál při pozorování AR byl poměrně slabý vůči pozadí, a proto byla detekce lokalizace značně obtížná.



Obrázek 7: Imunofluorescenční lokalizace androgenního receptoru v buněčné linii MCF7 po ovlivnění standardy (testosteron, estradiol, 2-methoxyestradiol) a testovanými látkami (MK464, MK465, MK499, MK653) o koncentracích 1 μM a 10 μM po dobu 24 hodin a kontrolní buňky (Ko⁻, Ko⁺ s DMSO) po 24 hodinách.

Intenzivnější fluorescence byla pozorována u estrogenového receptoru α ($ER\alpha$). Jako primární protilátka byla použita anti- $ER\alpha$ (králíčí) a jako sekundární fluorescenční (kozí-anti-králíčí AF488). Expres $ER\alpha$ v jádře byla pozorována v kontrolních buňkách bez ovlivnění i s přidavkem DMSO. Stejně tomu bylo v buňkách ovlivněných testosteronem (1 μ M), jeho vyšší koncentrace však byla toxická. Po ovlivnění estradiolem byla prokázána exprese jak v jádře, tak v cytosolu buněk. Pro 2-methoxyestradiol pak byly receptory lokalizovány pouze v cytosolu. Testované látky MK 465 a MK 653 v porovnání s kontrolními buňkami způsobovaly translokaci $ER\alpha$ do cytoplasmy. Pouze částečný přenos proběhl pro MK464, která způsobovala rozprostření receptorů do jádra i cytoplasmy. Podobný výsledek byl detekován pro MK499 o koncentraci 1 μ M. Koncentrace 10 μ M se ve většině buněk jevila jako toxická.



Obrázek 8: Imunofluorescenční lokalizace estrogenového receptoru α v buněčné linii MCF7 po ovlivnění standardy (testosteron, estradiol, 2-methoxyestradiol) a konjugáty (MK464, MK465, MK499 a MK653) o koncentracích 1 μ M a 10 μ M po dobu 24 hodin a kontrolní buňky (Ko-, Ko+ s DMSO) po 24 hodinách.

5 DISKUZE

Cílem experimentální části mé bakalářské práce bylo otestovat biologickou aktivitu konjugátů steroidních hormonů s N-Boc-valinem *in vitro* na nádorových buněčných liniích HeLa a MCF7 metodami western blottingu a imunofluorescenční analýzou. Záměrem bylo testování vlivu uvedených látek na expresi hladiny apoptotických markerů, k čemuž byla využita linie HeLa. Následně byla na linii MCF7 sledována exprese steroidních receptorů AR, ER α , GR a LXR, a to z důvodu podobnosti testovaných látek s ligandy daných receptorů. V poslední části byly vybrány receptory AR a ER α , u nichž byla sledována translokace z cytoplasmy do jádra. Přírozenými ligandy těchto receptorů jsou testosteron a estradiol, které tvoří základní strukturu testovaných konjugátů.

Význam testování antiproliferační aktivity podobných steroidních konjugátů v buňkách HeLa uvedli již Rárová a kolektiv, kdy testovali i antiangiogenní aktivitu brassinosteroidního derivátu BR4848 na endotelových buňkách. Tento derivát o koncentracích 5, 10 a 20 μ M spouštěl v nádorové linii HeLa apoptotickou kaskádu vyznačující se snížením exprese antiapoptotických markerů Bcl-2 a Mcl-1, štěpením procaspasy 7 za vzniku fragmentu a následným štěpením proteinu PARP (Rárová *et al.*, 2018). V této práci byl však podobný výsledek zaznamenán pouze u standardu testosteronu, který spouštěl štěpení procaspasy 7 a tím i štěpení proteinu PARP. Tyto výsledky poskytoval i výzkum Estrady a kolektivu, kdy neuroblastomové buňky po ovlivnění testosteronem o koncentraci 10 μ M po 24 hodinách podléhaly apoptose (Estrada *et al.*, 2006).

Vybranými testovanými konjugáty byly MK464 (estradiol + N-Boc-valin), MK 465 (testosteron + N-Boc-L-valin), MK 499 (2-methoxyestradiol + N-Boc-valin) a MK653 (testosteron + N-Boc-D-valin). Tyto konjugáty obsahují ve své struktuře steranový skelet, čímž se podobají oxysterolům nebo rostlinným hormonům brassinosteroidům. Proto byly biologické účinky konjugátů porovnávány právě s těmito látkami. Lim *et al.* zkoumali vliv dvou zástupců oxysterolů (7 β -hydroxycholesterolu a 25-hydroxycholesterolu) na buněčnou nádorovou linii THP-1 (monocytární lidská buněčná linie z krve pacienta trpícího akutní leukémií). Obě látky o koncentraci 5 a 10 μ M indukovaly v buňkách po 48 hodinách apoptosu. Důkazem bylo snižování hladiny Bcl-2 s časem, zvyšování exprese caspasy 9 a 3, která po aktivaci štěpila protein PARP

za vzniku fragmentu (Lim *et al.*, 2003). Pro buňky ovlivněné MK465 docházelo ke zvyšování hladiny caspasy 7 i proteinu PARP, účinky ostatních testovaných konjugátů se však v porovnání s kontrolními buňkami nelišily. V souvislosti s apoptosou byla sledována také hladina antiapoptotických markerů Bcl-2 a Mcl-1. V expresi proteinu Bcl-2 nedocházelo pro testované látky v porovnání s kontrolními buňkami k výrazným změnám. Pro Mcl-1 však docházelo k výraznému snížení exprese pro MK464 a MK465. To spolu se sníženou hladinou pRb poukazovalo na navození apoptosy.

Transkripční faktor p53 je produktem nádorového supresorového genu TP53, který je v nádorové linii HeLa mutován. Tím dochází k nadměrné expresi proteinu kódovaného daným genem (May *et al.*, 1991). V kontrolních buňkách byla tato zvýšená hladina exprese p53 detekována. Pozornost byla věnována snížení hladiny exprese, která probíhala u konjugátu MK464 a standardu 2-methoxyestradiolu. Vliv těchto látek na snížení exprese p53 vypovídá o jejich antiproliferačních vlastnostech.

Protein Rb je ve svém inaktivním stavu hypofosforylovaný a je navázán na faktor E2F. Fosforylací dochází k vyvázání transkripčního faktoru E2F, jeho aktivaci a přechodu buňky z G₁ do S fáze (Chellappan *et al.*, 1991). Nejvyšší hladina exprese pRb byla pro 2-methoxyestradiol. Nejnižší naopak pro standardy testosteron a estradiol, což značilo, že jejich vlivem docházelo k zástavě buněčného cyklu. Zajímavé výsledky prokázaly konjugáty MK464 a MK465, u kterých byla snížená hladina exprese proteinu, tudíž mohly v buňkách způsobit blok a poté navozovat apoptosu.

Na hormonálně závislé buněčné linii MCF7 byla pozorována exprese celkových steroidních receptorů a jejich aktivovaných fosforylovaných forem. Buňky byly ovlivněny konjugáty MK464 (estradiol s valinem), MK465 (testosteron s L-valinem), MK499 (2-methoxyestradiol s valinem), MK653 (testosteron s D-valinem) a standardy testosteronem, estradiolem a 2-methoxyestradiolem o koncentraci 10 μM po dobu 24 hodin. Vliv brassinosteroidů, konkrétně 28-homocastasteronu a 24-epibrassinolidu pozorovala Steigerová a kolektiv na stejné buněčné linii. Výzkum byl zaměřen na translokaci a expresi ERα a ERβ po ovlivnění látkami o koncentraci IC₅₀ po dobu 6, 12 a 24 hodin. Zatímco v kontrolních buňkách nedocházelo ke změnám v expresi, v ovlivněných buňkách se hladina exprese ERβ snižovala mírně s časem a exprese ERα po 24 hodinách klesala výrazně (Steigerová *et al.*, 2010). Nejviditelnější změna byla pro MK464 a 2-methoxyestradiol, jejich hladiny v porovnání s kontrolními buňkami klesaly.

Podobný trend byl pozorován i pro aktivní fosforylovanou formu tohoto proteinu, kdy došlo k poklesu exprese stejných látek. Tyto látky by mohly působit jako antagonisté.

Vliv testovaných látek na expresi celkového androgenního receptoru byl nejvýraznější v buňkách ovlivněných testosteronem, MK465 a MK653. Jelikož se jednalo o konjugáty s testosteronem, mohly tyto látky působit jako agonisté. Furutani a kolektiv se ve svém výzkumu zabývali vlivem syntetických agonistů AR. Z jejich výsledků vyplývá, že dihydrotestosteron (DHT), metabolit testosteronu, způsoboval zvýšení exprese AR. Míra exprese byla závislá na koncentraci DHT (Furutani *et al.*, 2002). Podobné výsledky uvedla ve svém výzkumu Rárová a kolektiv, která zkoumala vliv cholestanonu a brassinosteroidních derivátů na AR. Uvedla, že steroidní derivát cholestanon je silným agonistou AR (Rárová *et al.*, 2012). Tuto skutečnost potvrdil i výzkum Dietricha a kolektivu, který po ovlivnění primární myometriální buněčné linie testosteronem sledoval zvýšení exprese AR (Dietrich *et al.*, 2011). Jelikož mají látky MK465 a MK653 vlastnosti podobné agonistům AR, jejich vliv na tento receptor odpovídá výsledkům uvedených studií. Snížení exprese celkové formy bylo detekováno pro MK464, tato látka mohla působit jako případný antagonist. U fosforylované formy tohoto receptoru docházelo ke zvýšení exprese pro MK499. Ke snížení docházelo pouze pro 2-methoxyestradiol.

Nejvyšší hladina exprese GR byla detekována pro látku MK465, jeho fosforylovaná forma byla oproti kontrolním buňkám snižena. Podobně tomu bylo pro testosteron, kdy docházelo ke zvýšení exprese celkového receptoru a snížení fosforylovaného. Opačný efekt způsobovaly látky MK499 a MK653, docházelo zde k mírnému poklesu celkového receptoru a zvýšení jeho fosforylované formy, což svědčí o jeho aktivaci. Rozdíl mezi expresí aktivovaného pGR u látek MK465 a MK653, které jsou obě konjugáty testosteronu, může být způsoben jejich rozdílnou prostorovou orientací substituovaného valinu. Zatímco MK653 má účinky podobné agonistovi, MK465 se chová jako antagonist. Mezi oxysteroly a GR existuje signální dráha, kdy mezi LXR a GR probíhá kompetice o koaktivátor receptoru (Trousson *et al.*, 2009). Další známou dráhou je spojení AR a GR, kdy v rakovinných buňkách prostaty bylo po inhibici AR pozorováno zvýšení GR (Arora *et al.*, 2013).

K aktivaci jaterního X receptoru (LXR) nedochází pouze cholesterolem, ale i jeho přirozeně se vyskytujícími metabolity oxysteroly (Lehmann *et al.*, 1997). Výsledky

z experimentální části však ukázaly, že z testovaných látek měla na expresi LXR jen MK499, kdy docházelo k jejímu mírnému zvýšení.

Jako poslední byla sledována lokalizace steroidních receptorů AR a ER α . K experimentu byla využita metoda imunofluorescenční mikroskopie, kdy po ovlivnění buněčné linie MCF7 testovanými látkami po dobu 24 hodin byly buňky fixovány, barveny specifickou primární protilátkou a poté sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488. Látky i standardy byly testovány o dvou koncentracích, 1 a 10 μ M. Cílem bylo zjistit, zda v ovlivněných buňkách dochází k translokaci uvedených receptorů z cytoplasmy do jádra. Vliv látek byl při detekci lokalizace AR porovnáván s kontrolními buňkami. V těch k translokaci receptorů nedošlo. Nejúčinněji působil testosteron, kdy při koncentraci 1 i 10 μ M byly AR detekovány v jádrech buněk. Další z látek ovlivňující přenos byl estradiol o koncentraci 1 μ M. Vyšší koncentrace se jevily jako toxické. V buňkách ovlivněných 2-methoxyestradiolem, MK464, MK465, MK499 a MK653 byly AR lokalizovány pouze v cytoplasmě. V práci Rárové byl sledován vliv brassinosteroidů, derivátů cholestanu, na lokalizaci steroidních receptorů v buňkách MCF7. Ve srovnání s kontrolními buňkami, kde se AR nacházel v cytoplasmě, jeden z derivátů způsoboval translokaci do jádra. Receptory se však vyskytovaly převážně na jaderné periférii (Rárová *et al.*, 2016). Z výsledků se dá usoudit, že ani jeden z testovaných derivátů neměl významný vliv na translokaci androgenního receptoru z cytoplasmy do jádra. Detekce byla také značně ztížena slabým fluorescenčním signálem, který byl pravděpodobně způsoben nedostatečnou fixací buněk nebo chybou při pasážování a ovlivnění buněk.

K detekci přenosu ER α z cytoplasmy do jádra buněk byl použit stejný postup jako pro AR, fluorescenční signál byl však silnější. Receptory v kontrolních buňkách bez ovlivnění i s přidavkem DMSO byly detekovány uvnitř jader. Totéž bylo sledováno pro testosteron o koncentraci 1 μ M. Po ovlivnění látkami MK464 (konjugát estradiolu s valinem; pro 1 μ M) a MK499 (konjugát 2-methoxyestradiolu s valinem) byla lokalizace ER α rozprostřena do cytosolu i jádra buněk, pro MK465 (konjugát testosteronu s L-valinem) a MK653 (konjugát testosteronu s D-valinem) byla detekce pouze v cytosolu. Ligandy, které se na ER α přirozeně váží jsou 17 β -estradiol, estron a estriol (Yaşar *et al.*, 2017). Práce Steigerové a kolektivu se zabývala vlivem brassinosteroidů na lokalizaci ER α . Buněčná linie LNCaP byla dvěma deriváty ovlivněna po dobu 12 hodin. Lokalizace ER α pro kontrolní buňky byla v cytoplasmě, v buňkách ovlivněných testovanými

deriváty nedocházelo k výraznějším změnám (Steigerová *et al.*, 2010). Podobných výsledků dosahovala i Rárová a kolektiv, kdy po ovlivnění buněk MCF7 deriváty brassinosteroidů docházelo k rozprostření mezi jádrem a cytoplasmou (Rárová *et al.*, 2016).

Konjugáty testosteronu, estradiolu a 2-methoxyestradiolu s N-Boc-valinem byly testovány dvěma imunodetekčními metodami na dvou nádorových buněčných liniích. Předmětem výzkumu byl jejich vztah k navození apoptosy a vliv na lokalizaci steroidních receptorů v buňce. Některé z uvedených látek (MK464, MK465) vykazaly antiproliferační aktivitu a způsobovaly přesun steroidních receptorů do cytoplasmy. Proto se tyto látky i jim podobné deriváty s ohledem k jejich nalezeným antiangiogenním a antiproliferačním vlastnostem jeví jako slibný cíl dalšího výzkumu (Rárová *et al.*, 2018; Steigerová *et al.*, 2010).

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala biologickou aktivitou konjugátů pohlavních hormonů s N-Boc-valinem v nádorových buňkách. Pro testování byla použita epitelová buněčná linie MCF7 odvozená od lidského prsního adenokarcinomu a epitelová buněčná linie HeLa odvozená od cervikálního karcinomu. Vliv testovaných konjugátů na navození apoptosy a změny translokace steroidních receptorů byl studován pomocí metod western blottingu a imunofluorescenční analýzy.

Vybranými testovanými látkami byly MK464 (konjugát estradiolu s N-Boc-valinem), MK465 (konjugát testosteronu s N-Boc-L-valinem), MK499 (konjugát 2-methoxyestradiolu s N-Boc-valinem) a MK653 (konjugát testosteronu s N-Boc-D-valinem). Pro jejich značnou podobnost s živočišnými hormony oxysteroly a rostlinnými hormony brassinosteroidy, byla jejich biologická účinnost srovnávána právě s těmito látkami. Při testování antiproliferační aktivity ukázala nejslibnější výsledky látka MK464, která snižovala expresi antiapoptotických markerů, p53 a proteinu Rb, který indikuje blok buněk v G₁ fázi buněčného cyklu. Ve srovnání se standardem testosteronem, který jasně dokázal spuštění apoptotické kaskády štěpením caspasy 7 a následným štěpením proteinu PARP, však nebyly výsledky tak výrazné. Vliv látek na expresi steroidních receptorů byl nejprůkaznější pro konjugáty testosteronu MK465 a MK653, kdy docházelo ke zvýšení exprese AR, pro nějž je testosteron přirozeným ligandem. Fluorescenční analýza indikovala nejvýraznější přenos ER α z jádra do cytoplasmy pro MK465, konjugát estradiolu MK464 naopak způsoboval distribuci receptoru do jádra i cytoplasmy.

Vzhledem ke zjištěným antiproliferačním vlastnostem mají sloučeniny ze skupiny oxysterolů a brassinosteroidů potenciál k dalšímu výzkumu, bude však zapotřebí dalších rozsáhlejších experimentů.

7 SEZNAM LITERATURY

- Alberti, S., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-A. (2000). Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXR α and LXR β . *Gene*, **243**: 93–103.
- Alberts, B. (2004). *Essential Cell Biology*. 2nd ed. Garland Science Pub, New York, NY, 740 pp.
- Amé, J.-C., Spenlehauer, C., de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily: Review articles. *BioEssays*, **26**: 882–893.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Molecular and Cellular Biology*, **14**: 7025–7035.
- Arora, V.K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S.K., Wongvipat, J., Balbas, M.D., Shah, N., Cai, L., Efstathiou, E., Logothetis, C., Zheng, D., Sawyers, C.L. (2013). Glucocorticoid Receptor Confers Resistance to Antiandrogens by Bypassing Androgen Receptor Blockade. *Cell*, **155**: 1309–1322.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, **19**: 1751–1758.
- Ba, M.-Y., Xia, L.-W., Li, H.-L., Wang, Y.-G., Chu, Y.-N., Zhao, Q., Hu, C.-P., He, X.-T., Li, T.-X., Liang, K.-Y., Zhang, Y.-H., Yang, L., Xie, W.-H., Yang, H., Sun, M.-R. (2019). Concise synthesis of 2-methoxyestradiol from 17 β -estradiol through the C(sp²)-H hydroxylation. *Steroids*, **146**: 99–103.
- Bai, P., Virág, L. (2012). Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Letters*, **586**: 3771–3777.
- Bath, R., Nicolle, C., Cuciurean, I.S., Simonsen, H.T. (2020). Biosynthesis and Industrial Production of Androsteroids. *Plants*, **9**: 1144.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**: 335–344.
- Becker, K.L. (2001). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, 2500 pp.
- Benagiano, M., Bianchi, P., D’Elios, M.M., Brosens, I., Benagiano, G. (2019). Autoimmune diseases: Role of steroid hormones. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **60**: 24–34.
- Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., Gobe, G.C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**: 813–827.
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**: 135–147.

- Biegging, K.T., Mello, S.S., Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews. Cancer*, **14**: 359–370.
- Brann, D.W., Hendry, L.B., Mahesh, V.B. (1995). Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **52**: 113–133.
- Brown, C.J., Cheok, C.F., Verma, C.S., Lane, D.P. (2011). Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*, **32**: 53–62.
- Brown, C.J., Goss, S.J., Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Wilson, E.M., French, F.S., Willard, H.F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 264–269.
- Calandria, C., Irurzun, A., Barco, Á., Carrasco, L. (2004). Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Research*, **104**: 39–49.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., Nevins, J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**: 1053–1061.
- Chen, W.Y. (2008). Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **22**: 573–585.
- Clarke, P.R. (1995). Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation. *Current Biology*, **5**: 40–42.
- Collins, K., Cheng, L. (2023). Reprint of: morphologic spectrum of treatment-related changes in prostate tissue and prostate cancer: an updated review. *Human Pathology*, **133**: 92–101.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell : A Molecular Approach*. Washington, D.C., ASM Press, 730 pp.
- Crawford, E.D. (2009). Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. *Urology*, **73**: S4–S10.
- Creagh, E.M. (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology*, **35**: 631–640.
- Cuervo, A.M., Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **273**: 501.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, **19**: 197–209.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, **1**: 112–119.

- Dick, F.A., Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**: 297–306.
- Dietrich, W., Gaba, A., Zhegu, Z., Bieglmayer, C., Mairhofer, M., Mikula, M., Tschugguel, W., Yotova, I. (2011). Testosterone dependent androgen receptor stabilization and activation of cell proliferation in primary human myometrial microvascular endothelial cells. *Fertility and Sterility*, **95**: 1247-1255.e2.
- Edinger, A.L., Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**: 663–669.
- Estrada, M., Varshney, A., Ehrlich, B.E. (2006). Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, **281**: 25492–25501.
- Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M., Salvesson, G., Earnshaw, W.C., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1995). Mch3, a Novel Human Apoptotic Cysteine Protease Highly Related to CPP321. *Cancer Research*, **55**: 6045–6052.
- Feuser, P.E., De Pieri, E., Oliveira, M.E., Cordeiro, A.P., Cercena, R., Hermes de Araújo, P.H., Dal Bó, A.G., Machado-de-Ávila, R.A. (2022). Cisplatin and paclitaxel-loaded liposomes induced cervical cancer (HeLa) cell death with multiple copies of human papillomavirus by apoptosis and decreased their cytotoxic effect on non-tumor cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **73**: 103457.
- Fuchs, Y., Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **16**: 329–344.
- Fukami, M., Ogata, T. (2022). Congenital disorders of estrogen biosynthesis and action. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **36**: 101580.
- Furutani, T., Watanabe, T., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Koutoku, H., Kudoh, M., Shimizu, Y., Kato, S., Shikama, H. (2002). Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**: 779–784.
- Griekspoor, A., Zwart, W., Neefjes, J., Michalides, R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*, **5**: e003.
- He, B., Lee, L.W., Minges, J.T., Wilson, E.M. (2002). Dependence of Selective Gene Activation on the Androgen Receptor NH₂- and COOH-terminal Interaction *. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 25631–25639.
- Henry, H.L., Norman, A.W. (2003). *Encyclopedia of Hormones*. Academic Press, Amsterdam; Boston, 3 pp.
- Hetts, S.W. (1998). To Die or Not to Die: An Overview of Apoptosis and Its Role in Disease. *JAMA*, **279**: 300.
- Hickman, E.S., Moroni, M.C., Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**: 60–66.

- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. (2009). Cell Death. *New England Journal of Medicine*, **361**: 1570–1583.
- Hu, W., Feng, Z., Levine, A.J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes & Cancer*, **3**: 199–208.
- Ikeda, Y., Aihara, K., Yoshida, S., Akaike, M., Matsumoto, T. (2012). Effects of androgens on cardiovascular remodeling. *The Journal of Endocrinology*, **214**: 1–10.
- Jagtap, P., Szabó, C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**: 421–440.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **29**: 557–568.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., Tran, J., Tippin, T.K., Wang, X., Lusic, A.J., Hsueh, W.A., Law, R.E., Collins, J.L., Willson, T.M., Tontonoz, P. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 7604–7609.
- Kadmiel, M., Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **34**: 518–530.
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, **25**: 65–80.
- Kant, R., Barnwal, S., Yadav, P., Malik, A., Dhamija, P. (2023). Clinical outcome of testosterone supplementation assessed by andropausal male symptom scores in type 2 diabetes testosterone-deficient patients receiving testosterone compared to those not receiving testosterone: A nested case-control study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **17**: 102764.
- Kawata, M. (1995). Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neuroscience Research*, **24**: 1–46.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**: 239–257.
- Koike, S., Sakai, M., Muramatsu, M. (1987). Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Research*, **15**: 2499–2513.
- Koivisto, P., Kolmer, M., Visakorpi, T., Kallioniemi, O.P. (1998). Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, **152**: 1–9.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**: 3516–3520.

- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**: 5925–5930.
- Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N.K., Tyagi, R.K. (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **246**: 147–156.
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D. (2010). Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**: 21–24.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.-L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M. (1997). Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 3137–3140.
- Leitman, D.C., Paruthiyil, S., Vivar, O.I., Saunier, E.F., Herber, C.B., Cohen, I., Tagliaferri, M., Speed, T.P. (2010). Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Current Opinion in Pharmacology*, **10**: 629–636.
- Levine, A.J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, **88**: 323–331.
- Lim, H.-K., Kang, H.-K., Yoo, E.-S., Kim, B.-J., Kim, Y.-W., Cho, M., Lee, J.-H., Lee, Y.-S., Chung, M.-H., Hyun, J.-W. (2003). Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G2/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sciences*, **72**: 1389–1399.
- Lu, N.Z., Cidlowski, J.A. (2004). The Origin and Functions of Multiple Human Glucocorticoid Receptor Isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1024**: 102–123.
- Maianski, N.A., Roos, D., Kuijpers, T.W. (2003). Tumor necrosis factor α induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood*, **101**: 1987–1995.
- Massey, A., Kiffin, R., Cuervo, A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**: 2420–2434.
- Massey, A.C., Zhang, C., Cuervo, A.M. (2006). Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, pp. 205–235.
- May, E., Jenkins, J.R., May, P. (1991). Endogenous HeLa p53 proteins are easily detected in HeLa cells transfected with mouse deletion mutant p53 gene. *Oncogene*, **6**: 1363–1365.
- Mizushima, N., Klionsky, D.J. (2007). Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, **27**: 19–40.

- Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, **147**: 728–741.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**: 1069–1075.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**: 131–134.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J., Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 25265–25268.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, **81**: 1535–1565.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**: 3177–3184.
- Oltval, Z.N., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**: 609–619.
- Perry, M.E., Levine, A.J. (1993). Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Current Opinion in Genetics & Development*, **3**: 50–54.
- Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997). Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones*. *Endocrine Reviews*, **18**: 306–360.
- Rárová, L., Sedlák, D., Oklestkova, J., Steigerová, J., Liebl, J., Zahler, S., Bartůněk, P., Kolář, Z., Kohout, L., Kvasnica, M., Strnad, M. (2018). The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **178**: 263–271.
- Rárová, L., Steigerová, J., Kvasnica, M., Bartůněk, P., Křížová, K., Chodounská, H., Kolář, Z., Sedlák, D., Oklestkova, J., Strnad, M. (2016). Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **159**: 154–169.
- Rárová, L., Zahler, S., Liebl, J., Kryštof, V., Sedlák, D., Bartůněk, P., Kohout, L., Strnad, M. (2012). Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids*, **77**: 1502–1509.
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J. (2000). The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**: 459–481.
- Rhen, T., Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*, **353**: 1711–1723.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell*, **20**: 131–139.

Singh, M., Sharma, H., Singh, N. (2007). Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, **7**: 367–373.

Slabý, O. et al. *Molekulární medicína*. (2015). Galén, Praha, 309–311 pp.

Steigerová, J., Oklešťková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., Strnad, M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, **188**: 487–496.

Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, **36**: 3–23.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**: 231–241.

Thomas, L.N., Lazier, C.B., Gupta, R., Norman, R.W., Troyer, D.A., O'Brien, S.P., Rittmaster, R.S. (2005). Differential alterations in 5 α -reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *The Prostate*, **63**: 231–239.

Trousseau, A., Makoukji, J., Petit, P.X., Bernard, S., Slomianny, C., Schumacher, M., Massaad, C. (2009). Cross-Talk between Oxysterols and Glucocorticoids: Differential Regulation of Secreted Phospholipase A2 and Impact on Oligodendrocyte Death. *PLoS ONE*, **4**: e8080.

Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death & Differentiation*, **4**: 429–434.

Varricchio, C.G., Stevens, J. (2001). Funding ideas for new research. *Cancer*, **92**: 1737–1743.

Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.-F., Wang, F.-S., Wang, X. (2014). Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*, **54**: 133–146.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**: 323–330.

Wong, C.I., Zhou, Z.X., Sar, M., Wilson, E.M. (1993). Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 19004–19012.

Yaşar, P., Ayaz, G., User, S.D., Güpür, G., Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, **16**: 4–20.

Zelcer, N., Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**: 607–614.

Zhou, J., Cidlowski, J.A. (2005). The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, **70**: 407–417.

Zimmermann, K.C., Green, D.R. (2001). How cells die: Apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108**: S99–S103.