

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2012

Bc. Ivana Trefilíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv kombinace inhibitorů histonových
deacetyláz na expresi vybraného
koaktivátoru ze skupiny regulačních
proteinů u na androgenech-nezávislé
prostatické nádorové buněčné linie s expresí
androgenového receptoru (AR)**

Diplomová práce

Bc. Ivana Trefilíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Trtková, CSc.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Kateřiny Trtkové CSc. a uvedla jsem veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 20. 4. 2012

.....

Souhrn

Nádorová onemocnění prostaty úzce souvisí s aktivitou androgenového receptoru a jsou spojována také se zvýšenou expresí koaktivátorů AR. Je prokázáno, že inhibitory histonových deacetyláz (HDACs) mají protinádorové účinky, proto je tato diplomová práce zaměřena na vliv kombinace dvou inhibitorů HDACs – tributyrinu a trichostatinu A - na expresi koaktivátorů SRC-1 a p300, androgenového receptoru a PSA.

Buňky dvou prostatických linií, nádorové linie nezávislé na androgenech a exprimující AR (C4-2), a nenádorové buněčné linie (RWPE-1), byly ovlivňovány třemi různými kombinacemi tributyrinu (TB) a trichostatinu A (TSA). Z takto ovlivněných a kontrolních neovlivněných buněk byla izolována RNA a cDNA byla po reverzní transkripci analyzována pomocí real-time PCR. Pro analýzu na proteinové úrovni byl získáván celkový proteinový lyzát včetně chromatinu a proteinový lyzát z buněčné cytosolické frakce.

Po ovlivnění buněk kombinacemi inhibitorů HDACs byly u nádorových buněk pozorovány změny v expresi AR a PSA. Na úrovni RNA byla oproti kontrolním neovlivněným buňkám detekována snížená exprese AR, která se u 96-hodinové inkubace s rostoucími koncentracemi TB zvyšovala. Byla zjištěna klesající exprese PSA, ale tento pokles nebyl potvrzen na proteinové úrovni. U nenádorových buněk RWPE-1 nebyla po jejich ovlivnění exprese AR ani PSA detekována. Kombinace uvedených inhibitorů HDACs má vliv na expresi koaktivátorů AR u nádorových C4-2 i nenádorových RWPE-1 prostatických buněk. U buněk linie C4-2 byla zaznamenána zvyšující se exprese SRC-1 a p300 v závislosti na rostoucí koncentraci TB. U ovlivněných buněk linie RWPE-1 byla exprese těchto koaktivátorů zvýšená.

Summary

Development of prostate cancer depends on an activation of the androgen receptor (AR). Increased expression of coregulator proteins of the AR – coactivators could modulate the AR gene activity. The histone deacetylases (HDACs) inhibitors: tributyrin and trichostatin A have an anticancer effect. Therefore, the diploma thesis is focused on a study of the effect of combinations of these two HDACs inhibitors on gene expression of the SRC-1 and p300 coactivators as well as on the androgen receptor and PSA gene expressions.

Two prostate cell lines, androgen-independent prostate cancer cell line with AR gene expression - C4-2 and non-tumorigenic cell line - RWPE-1 were treated with three different combinations of tributyrin (TB) and trichostatin A (TSA). RNA was isolated from treated and un-treated control cells and cDNA obtained after reverse transcription was analysed by real-time PCR. Total protein lysate including chromatin and cell lysate from the cytosolic fraction were used for western blot analysis.

Treatment of cancer cells with combinations of the HDACs inhibitors induced changes in AR and PSA gene expressions. Reduced AR gene expression when compared with control un-treated cells was detected at RNA level. As was shown after 96-hours incubation, the reduced AR gene expression was increased with increasing concentration of TB. Simultaneously, a reduced PSA gene expression was observed, but it was not confirmed at the protein level. AR and PSA gene expressions were not detected in treated non-tumorigenic RWPE-1 cells. The combination of these two inhibitors HDACs has an effect on AR gene coactivators expression in both cancer C4-2 and non-tumorigenic RWPE-1 prostate cells. In C4-2 cells, SRC-1 and p300 gene expressions were increased with increasing TB concentrations. Similarly, expressions of these two coactivators were also increased in treated RWPE-1 cells.

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Trtkové CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce a Mgr. Lence Paškové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE.....	9
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1 Androgenový receptor	10
3.1.1 Struktura androgenového receptoru.....	10
3.1.2 Aktivace a funkce androgenového receptoru.....	11
3.2 Koregulátory androgenového receptoru	12
3.2.1 Koaktivátory androgenového receptoru.....	12
3.2.1.1. Koaktivátory p160	13
3.2.1.2 Koaktivátory CBP a p300.....	14
3.2.1.3 Koaktivátor Tip60.....	14
3.2.2 Korepresory androgenového receptoru.....	15
3.2.2.1 Korepresory SMRT a N-CoR	15
3.3 Nádory prostaty a androgenový receptor.....	16
3.3.1 Léčba nádorů prostaty.....	16
3.3.1.1 Inhibitory histonových deacetyláz	17
3.3.1.1.1 Tributyrin	18
3.3.1.1.2 Trichostatin A	18
4 MATERIÁL A METODIKA.....	20
4.1 Biologický materiál.....	20
4.2 MTT test	20
4.3 Kultivace a ovlivňování buněčných linií	22
4.4 Izolace RNA	24
4.4.1 Izolace RNA z buněk nádorové buněčné linie C4-2.....	24
4.4.2 Izolace RNA z buněk nenádorové buněčné linie RWPE-1	25
4.5 Reverzní transkripce	25
4.6 Real-time PCR	26
4.7 Práce s buněčnými lyzáty	30
4.7.1 Promývání a lyze buněk pro získání celkového obsahu proteinů.....	30
4.7.2 Získávání jednotlivých proteinových frakcí	31
4.7.3 Sonikace buněčných lyzátů.....	31
4.7.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové.....	32

4.8 Western blot analýza.....	32
4.8.1 Elektroforéza.....	32
4.8.2 Přenos proteinů na membránu	33
4.8.3 Detekce proteinů	34
4.8.3.1 Detekce SRC-1 a GAPDH.....	34
4.8.3.2 Detekce AR a PSA.....	34
4.9 Použité roztoky	35
4.10 Média pro práci s buněčnými kulturami:.....	38
4.11 Použité chemikálie.....	38
4.12 Vybavení laboratoře.....	39
5 VÝSLEDKY	41
5.1 Viabilita buněk linie C4-2 po ovlivnění TSA a TB	41
5.2 Real-time PCR analýza.....	46
5.2.1 Exprese AR a PSA u buněčné linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB	46
5.2.2 Exprese koaktivátorů SRC-1 a p300 u buněčné linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB	49
5.2.3 Exprese AR a PSA u buněčné linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB.....	51
5.2.4 Exprese koaktivátorů SRC-1 a p300 u buněčné linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB	51
5.3 Western blot analýza.....	54
5.3.1 Exprese AR a PSA po ovlivnění kombinacemi TSA a TB.....	54
5.3.2 Exprese koaktivátoru SRC-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB	55
6 DISKUZE	56
7 ZÁVĚR	59
8 POUŽITÁ LITERATURA	61
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	66
10 PŘÍLOHY	67

1 ÚVOD

Androgenový receptor (AR) je jaderný steroidní receptor, který je cílem signalizace androgenních hormonů. AR je důležitý pro vývoj a normální funkci prostaty, ale na druhé straně může významně ovlivnit vznik a progresi prostatických nádorových onemocnění. Transkripční aktivita AR je ovlivňována působením koregulačních proteinů: koaktivátorů a korepresorů. Koregulátory mohou ovlivňovat aktivitu samotného AR a také jeho cílových genů pomocí enzymů histonových acetyltransferáz nebo histonových deacetyláz. Mezi koaktivátory AR patří velká skupina proteinů p160 a jejich zvýšená exprese bývá spojována s nádory prostaty. Většina nádorů prostaty je zpočátku závislá na androgenech, proto léčba směřuje ke snížení hladiny androgenů a potlačení funkce AR. Tento způsob terapie má však pouze dočasný účinek a během několika let dochází k návratu choroby, která se stává na androgenech nezávislou. V současné době je věnována stále větší pozornost epigenetickým modifikacím, které jak se zdá mohou ovlivňovat průběh nádorové transformace a jejich studium tak může přispět k pochopení účinku některých protinádorových léčiv. Potenciálními léky pro léčbu nádorových onemocnění jsou inhibitory histonových deacetyláz, o kterých je známo, že mají antiproliferativní účinky, působí toxicky na nádorové buňky a netoxicky na buňky zdravé tkáně. Vyznačují se pleiotropním účinkem a některé z těchto látek jsou již ve stádiu klinického testování. Mezi inhibitory HDACs vyznačující se schopností navodit zástavu buněčného cyklu, diferenciaci a apoptózu prostatických nádorových buněk patří také tributyrin a trichostatin A. Jak naznačuje tato studie, mohly by být tyto látky využity i pro terapii prostatických nádorových onemocnění v pokročilých na androgenech-nezávislých stádiích.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše
2. Kultivace a ovlivňování buněk na androgenech-nezávislé prostatické linie s expresí AR (C4-2) a kontrolní prostatické nenádorové linie RWPE-1 kombinacemi dvou inhibitorů histonových deacetyláz: tributyrinu a trichostatinu
3. Izolace RNA, její reverzní transkripce a použití cDNA pro stanovení real-time exprese koaktivátoru SRC-1 ve vztahu k expresím AR a PSA genů
4. Dle výsledků real-time PCR přistoupit k získání proteinových frakcí (cytoplazmatická a jaderná frakce) z ovlivněných a kontrolních buněk
5. Detekce SRC-1, doplněna o AR a PSA expresi Western blotovou analýzou

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Androgenový receptor

Androgenový receptor (AR) patří do rozsáhlé rodiny jaderných steroidních receptorů, má velikost 110 kDa (112 kDa) a je klíčovým mediátorem působení androgenů v cílových tkáních jako je prostata. (Dehm *et Tindall*, 2006). Gen pro AR je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X (Xq11-12), je velký přibližně 90 kb a obsahuje osm exonů (Gelmann, 2002).

3.1.1 Struktura androgenového receptoru

Androgenový receptor má čtyři funkční domény: DNA-vazebnou doménu, hinge oblast, ligand-vazebnou doménu a N-terminální doménu (Richter *et al.*, 2007).

Centrální DNA-vazebná doména (DNA-binding domain, DBD) je tvořena 70 aminokyselinami kódovanými exony 2 a 3 (Gelmann, 2002) a odpovídá za rozpoznání specifických sekvencí DNA označovaných jako androgen response elements (AREs) (Lavery *et Bevan*, 2011). Jedná se o nejvíce konzervovanou oblast receptoru. DBD obsahuje osm cysteinových zbytků, které formují dva koordinační komplexy, každý složený ze čtyř cysteinů a Zn^{2+} iontu. Tyto dva zinkové prsty vytváří strukturu, která se váže do většího žlábků DNA. Druhý zinkový prst stabilizuje vazbu komplexu pomocí hydrofobních interakcí s prvním zinkovým prstem a přispívá ke specifitě vazby receptoru a DNA. Druhý zinkový prst je potřebný pro dimerizaci receptoru, ke které dochází během vazby DNA (Gelmann, 2002).

Ligand-vazebná doména (ligand-binding domain, LBD) se nachází v C-terminální oblasti AR. Slouží k rozpoznání a navázání androgenních hormonů (Lavery *et Bevan*, 2011). LBD je tvořena 12 helixy, které vytváří kapsu pro navázání ligandu. Je kódována exony 4 až 8 (Gelmann, 2002).

N-terminální doména (N-terminal domain, NTD) je kódována prvním exonem a představuje transkripčně regulační oblast AR (Gelmann, 2002). Tato doména je nejvíce variabilní a nejméně konzervovaná (Richter *et al.*, 2007). NTD je důležitá také pro dimerizaci receptoru (Gelmann, 2002).

Hinge oblast (hinge region) leží mezi DBD a LBD. Obsahuje jadernou lokalizační sekvenci NLS (nuclear localization signal) a je místem, kde dochází k acetylaci AR (Lavery *et Bevan*, 2011).

AR má také dvě transkripční aktivační funkční domény, na ligandu nezávislou doménu AF-1 (activation function-1) situovanou v N-terminální oblasti a na ligandu závislou doménu AF-2 (activation function-2), která se nachází v LBD na C-terminálním konci AR (Heinlein *et Chang*, 2004).

3.1.2 Aktivace a funkce androgenového receptoru

AR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který je regulován testosteronem a dihydrotestosteronem (DHT), což jsou hlavní androgeny podílející se na vývoji prostaty (Powell *et al.*, 2004). V cílové tkáni je testosteron nejprve převeden na DHT pomocí enzymu 5 α -reduktázy. DHT je účinnějším ligandem než testosteron, protože ve srovnání s testosteronem disociuje z AR pomaleji a podporuje konformaci receptoru, která je odolnější vůči degradaci (Dehm *et Tindall*, 2006).

V základním stavu za nepřítomnosti androgenů se AR nachází v cytoplazmě, kde je vázaný v komplexu s proteiny tepelného šoku (heat shock proteins, HSPs), jako jsou Hsp90, Hsp70 a Hsp56 (Dehm *et Tindall*, 2006). Tento komplex umožňuje vytvoření takové konformace, při které má AR vysokou afinitu k androgenům. Po rozpoznání a navázání androgenu následuje série konformačních změn, které vedou k uvolnění HSPs a k přemístění AR do jádra (Gelman, 2002). Pro správnou aktivaci AR s navázaným ligandem jsou zásadní interakce mezi NTD a LBD, čímž dochází ke stabilizaci receptoru, omezení disociace ligandu a zvýšení vazebné afinity k DNA (Bevan *et al.*, 1999). V jádře působí AR jako transkripční faktor a ve formě dimeru se následně váže na AREs, které se nachází v oblasti promotoru cílových genů (Dehm *et Tindall*, 2006).

AR může být aktivován také za nepřítomnosti androgenů. Aktivace AR, nezávisle na ligandu, je zprostředkována pomocí růstových faktorů a cytokinů. Růstovými faktory, které jsou zapojeny v regulaci aktivity AR, jsou insuline-like růstový faktor-1 (insuline-like growth factor-1, IGF-1), keratinocytový růstový faktor (keratinocyte growth factor, KGF) a epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF) (Culig *et al.*, 1994). AR může být aktivován také prostřednictvím

interleukinu-6 (IL-6) (Lin *et al.*, 2001). Transkripci AR může zahájit fosforylace. Androgenový receptor je fosforylován v N-terminální oblasti, v místě C-terminální domény, na níž se váže ligand, a DNA-vazebné domény. Proteinkinázy, které fosforylují AR jsou aktivovány proteinkinázou A (PAK), proteinkinázou C (PKC) a mitogeny-aktivovanými kinázami (MAPKs) (Richter *et al.*, 2007).

3.2 Koregulátory androgenového receptoru

Koregulační proteiny jsou makromolekuly, které modifikují transkripční aktivitu AR. Ovlivňují jeho funkční vlastnosti zahrnující ligandovou specifitu a také schopnost vázat DNA. Koregulačními proteiny jsou koaktivátory, které přispívají ke zvýšení transkripce cílových genů, a korepresory, které transkripci potlačují (Richter *et al.*, 2007). Většina koaktivátorů a korepresorů androgenového receptoru ovlivňuje transkripční aktivitu buď cílových genů AR nebo samotného AR pomocí enzymů histonových acetyltransferáz (HATs) nebo histonových deacetyláz (HDACs). Acetylace oslabuje afinitu histonů k DNA a vytváří podmínky pro otevřenou konformaci chromatinu umožňující transkripci genů. Deacetylace histonů je naopak charakterizována uzavřeným stavem chromatinu a umlčením transkripce. Změny v expresi enzymů modifikujících histony jsou obecně spojovány s vývojem rakoviny (Jerónimo *et al.*, 2011).

3.2.1 Koaktivátory androgenového receptoru

Koaktivátory jsou regulační proteiny, které po vazbě na aktivované steroidní receptory zvyšují jejich schopnost aktivovat cílové geny. Ovlivňují remodelaci chromatinu, sestavování pre-iniciačního komplexu v oblasti promotoru a pohyb RNA polymerázy podél genů (Powell *et al.*, 2004). Koaktivátory se vyznačují HAT aktivitou (Trtková *et al.*, 2006) a umožňují AR stát se transkripčně aktivním i při snížených koncentracích androgenů (Heinlein *et al.*, 2004).

3.2.1.1. Koaktivátory p160

Nejlépe charakterizovanou skupinou koaktivátorů AR jsou proteiny p160, které představují vysoce homologní proteiny o velikosti 160 kDa označované jako SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), SRC-2 (TIF2 (transcriptional intermediary factor-2) / GRIP1 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1) a SRC-3 (ACTR (activator of thyroid and retinoic acid) / AIB1 (amplified in breast cancer 1) / RAC3 (receptor-associated coactivator 3) / TRAM1 (thyroid receptor activator molecule 1)) (Trtková *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Proteiny SRC (SRCs) obsahují tři strukturní domény. N-terminální doménu bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim), která je nejvíce konzervovanou oblastí a je důležitá pro interakce mezi proteiny. Centrální oblast těchto proteinů obsahuje tři motivy LXXLL (L je leucin, X je jakákoliv jiná aminokyselina), které jsou zodpovědné za interakce s jadernými receptory. C-terminální konec zahrnuje dvě transkripčně aktivační domény: AD1 a AD2. AD1 váže CBP a p300, což jsou koaktivátory HAT. AD2 vytváří komplex s CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) a PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1). Na C-terminálním konci proteinů SRC-1 a SRC-3 se nachází doména s aktivitou HAT. SRC-1 existuje v několika sestříhových isoformách označovaných jako SRC-1a, SRC-1b, SRC-1c, SRC-1d a SRC-1e. Ve srovnání se SRC-1a, chybí proteinu SRC-1b N-terminální oblast. SRC-1c, SRC-1d a SRC-1e se od SRC-1a a také mezi sebou liší jedinečnými C-terminálními sekvencemi (Xu *et al.*, 2009). Tento úsek je u SRC-1a ve srovnání se SRC-1e delší a obsahuje motiv LXXLL (Powell *et al.*, 2004). Fyziologický význam těchto isoform SRC-1 je prozatím nejasný (Xu *et al.*, 2009).

Koaktivátory p160 interagují s N-terminální i C-terminální oblastí AR (Culig *et al.*, 2004). Prostřednictvím krátkého hydrofobního motivu LXXLL, který je označován také jako nuclear receptor box, interagují SRCs s doménou AF-2 nacházející se u androgenového receptoru v oblasti LBD. Interakce s receptorovou NTD, respektive doménou AF-1, probíhají prostřednictvím sekvence bohaté na glutaminy nacházející se na C-terminálním konci koaktivátorů. Ligand-vazebná doména AR váže motiv LXXLL koaktivátorů slabě a přednostně dochází k navázání SRCs prostřednictvím oblasti bohaté na glutaminy (Estébanez-Perpiñá *et al.*, 2005).

SRCs mohou díky enzymatické aktivitě HAT acetylovat lysinové zbytky na koncích histonových proteinů. Acetylace histonů oslabuje jejich interakce s DNA.

Následně dochází k výměně koaktivátorů na povrchu AF-2 domény AR, produkci enzymu RNA polymerázy II a chromatin-remodelačního komplexu SWI/SNF za účelem navázání transkripčního aparátu na templátovou DNA (Dilworth *et al.*, 2001).

Změny v hladinách SRCs a nebo jejich aktivitě jsou efektivními prostředníky v regulaci genové transkripce. Signalizační dráhy aktivované extracelulárními podněty, jako jsou hormony, růstové faktory a cytokiny, indukují různé post-translační modifikace zahrnující fosforylace, ubiquitinylace, sumoylace, acetylace a metylace. Tyto často reverzibilní post-translační modifikace mají klíčový vliv na stabilitu proteinů, specifikaci transkripčních faktorů a transkripční aktivitu SRCs (Xu *et al.*, 2009).

3.2.1.2 Koaktivátory CBP a p300

Mezi koaktivátory AR patří také CBP (cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein) a jeho funkční homolog p300, které zesilují na ligandu závislou transkripční aktivaci AR a podporují vstup mechanismu transkripce do jádra (Culig *et al.*, 2004). CBP i p300 mají doménu s aktivitou HAT. Tyto proteiny se vážou na koaktivátory p160 a mohou tedy zesilovat transkripci (Lavery *et al.*, 2011). CBP také produkuje další koaktivátor pCAF (p300/CBP associate factor) s enzymatickou aktivitou HAT (Powell *et al.*, 2004).

3.2.1.3 Koaktivátor Tip60

Tip60 (Tat interactive protein, 60 kDa) je členem proteinové rodiny MYST, která se vyznačuje acetyltransferázovou aktivitou, a kyvadlově se pohybuje mezi cytoplazmou a buněčným jádrem (Culig *et al.*, 2004). Tento protein je schopen acetylovat buď přímo AR nebo histonové oblasti chromatinu, konkrétně histony H2A, H3 a H4. Tip60 interaguje s ligand-vazebnou doménou (LBD) AR, přičemž nebyly pozorovány žádné interakce mezi Tip60 a N-terminální doménou (NTD) ani DNA-vazebnou doménou (DBD) androgenového receptoru. Koaktivátor Tip60 by tak mohl být zapojený v aktivaci AR závislé na ligandu. Interakce s AR se uskutečňuje pomocí

motivu LXXLL přítomného na C-terminálním konci proteinu Tip60 (Lavery *et Bevan*, 2011).

3.2.2 Korepresory androgenového receptoru

Korepresory jsou regulační proteiny, které se vážou přímo na AR a potlačují jeho aktivitu. Korepresory mohou ovlivňovat AR různými mechanismy: modifikací chromatinu, regulací interakcí mezi N- a C-terminálními konci AR (N/C interakce), a nebo potlačením produkce koaktivátorů. Na rozdíl od koaktivátorů, které se vyznačují enzymatickou aktivitou HAT, korepresory mají obvykle aktivitu HDAC (Burd *et al.*, 2006).

3.2.2.1 Korepresory SMRT a N-CoR

SMRT (the silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) a N-CoR (nuclear receptor corepressor) jsou dobře charakterizovanými korepresory mnoha jaderných receptorů (Wang *et al.*, 2005) a hrají důležitou roli ve vývoji nádorové progresu (Yoon *et Wong*, 2006). SMRT se váže na AR v oblasti ligand-vazebné domény (LBD), a přestože je LBD dostačující pro navázání tohoto korepresoru, důležitou roli hraje také DBD/hinge oblast, která tuto vazbu zesiluje. Za přítomnosti ligandu může SMRT interagovat také s N-terminální oblastí AR. N-CoR interaguje přímo s AR a může se na něj vázat jak za přítomnosti DHT, tak za jeho nepřítomnosti. Interakce s AR probíhá pomocí C-terminální oblasti N-CoR (Wang *et al.*, 2005). SMRT a N-CoR se vyskytují a fungují ve formě velkých proteinových komplexů obsahujících HDAC3 (histone deacetylase 3) (Yoon *et Wong*, 2006). SMRT i N-CoR produkují enzymy s aktivitou HDAC, aktivaci AR však mohou potlačovat také prostřednictvím narušení interakcí mezi N- a C-terminálními konci AR a znemožněním navázání koaktivátorů (Wang *et al.*, 2005). Snížením exprese korepresorů SMRT a N-CoR dochází ke zvýšení hladiny koaktivátorů SRC-1 a p300, což vede k hyperacetylaci histonů H3 a H4. Tato skutečnost svědčí o tom, že SMRT a N-CoR aktivně soutěží s koaktivátory o vazbu na AR (Yoon *et Wong*, 2006).

3.3 Nádory prostaty a androgenový receptor

Prostata je orgán závislý na androgenech, které jsou nezbytné pro její růst a vývoj během fetálního a pubertálního období. Poté růst prostaty ustává i přes vysokou hladinu cirkulujících androgenů, které jsou potřebné pro zachování její sekreční funkce (Powell *et al.*, 2004).

Nádor prostaty (CaP) je pátý nejčastěji diagnostikovaný karcinom na světě a druhý nejběžnější u mužů. Androgenový receptor je jediným jaderným receptorem, jehož gen se nachází na chromozomu X, a proto onemocnění postihuje pouze muže (Lavery *et Bevan*, 2011).

Toto onemocnění závisí na androgenech. Pro progresi CaP je rozhodující hladina AR a jeho transkripční aktivita (Richter *et al.*, 2007). Androgenový receptor je exprimován v primárních CaP a může být detekován po celou dobu progresu v na androgenech-závislých i na androgenech-nezávislých nádorech prostaty. CaP je spojen také se zvýšenou expresí koaktivátorů AR (Heinlein *et Chang*, 2004). V na androgenech-nezávislých CaP byla zjištěna zvýšená exprese koaktivátoru SRC-1, přičemž u pacientů se zvýšenou expresí SRC-1 je vyšší riziko agresivnějšího rozvoje choroby. V nádorových buňkách jsou nadměrně exprimovány také další koaktivátory rodiny p160. Exprese SRC-2 se zvyšuje s progresí onemocnění a také nadměrná exprese SRC-3 souvisí se špatnou prognózou (Agoulnik *et al.*, 2005). Koaktivátory proto mohou být součástí mechanismu, kterým se nádorové buňky prostaty stávají na androgenech nezávislé (Richter *et al.*, 2007).

Citlivým biochemickým markerem dostupným pro monitorování prostatických onemocnění, zejména rakoviny prostaty je prostatický specifický antigen (prostate specific antigen, PSA). PSA je glykoprotein a patří do kalikreinové rodiny serinových proteáz. Hlavním regulátorem PSA je androgenový receptor, který podmiňuje jeho expresi (Heinlein *et Chang*, 2004).

3.3.1 Léčba nádorů prostaty

Přibližně 80 – 90 % nádorů prostaty je v počátečním stádiu závislých na androgenech. Endokrinní terapie CaP je tedy namířena ke snížení hladiny androgenů a inhibici AR. Jedná se o odstranění androgenů chirurgickou nebo chemickou kastrací (Heinlein *et Chang*, 2004). Využívá se také antiandrogenů, které působí tak, že soutěží

o vazebné místo v jádře C-terminální oblasti LBD androgenového receptoru (Hur *et al.*, 2004). Léčba aplikací antiandrogenů se provádí buď samostatně nebo v kombinaci s chemickou či chirurgickou kastrací (Heinlein *et Chang*, 2004). Nicméně odezva na terapii pomocí androgenové ablace je pouze dočasná a většinou do dvou let dochází k návratu choroby (Agoulnik *et Weigel*, 2009). CaP postupuje do stádia nezávislém na androgenech (Heinlein *et Chang*, 2004). Většina nádorů však dále exprimuje AR a zůstává závislá na signalizačních drahách AR (Powell *et al.*, 2004). Po terapii hormonální deprivací dochází ke změnám AR, které vedou ke zvýšené citlivosti androgenového receptoru na nízké hladiny androgenů a také ke schopnosti receptoru rozpoznávat širší spektrum ligandů (Gelman, 2002). Opětovný rozvoj nádoru je spojen se zvýšenou expresí AR nebo jeho koaktivátorů. Příčinou mohou být také genové mutace androgenového receptoru, které způsobují rezistenci AR k antiandrogenům (Hur *et al.*, 2004). Koaktivátory jsou schopny zvyšovat transkripci AR při snížených koncentracích ligandů. Nárůst v hladinách koaktivátorů AR proto může přispívat k vyšší citlivosti androgenového receptoru k nízkým hladinám androgenů jako důsledek absolvované léčby (Heinlein *et Chang*, 2004). Snížení exprese AR a SRC-1 a jejich vzájemných interakcí představuje nový přístup pro léčbu na androgenech-závislých i na androgenech-nezávislých nádorů prostaty (Agoulnik *et al.*, 2005).

3.3.1.1 Inhibitory histonových deacetyláz

Na rozdíl od genetických změn jsou epigenetické modifikace chemicky reverzibilní, což z nich dělá potenciální cíl v terapii nádorů. Obnovení exprese epigeneticky umlčených genů lze dosáhnout pomocí inhibitorů HDACs. Mechanismus působení těchto látek je založen na zablokování katalytické domény HDACs a tím je znemožněno rozpoznání substrátu. Důsledkem je obnovení transkripce příslušných genů zapojených v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci buněk a apoptóze. Ovlivněním nádorových buněk inhibitory HDACs se zvyšuje jejich citlivost k chemoterapii a inhibice angiogeneze v komplexní léčbě nádorů (Jerónimo *et al.*, 2011).

Inhibitory HDACs se dělí do čtyř základních skupin: hydroxamové kyseliny, cyklické tetrapeptidy, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a benzamidy (Jerónimo *et al.*, 2011). Inhibitory HDACs jsou potenciálními léky, které nabízejí protinádorový

účinek, menší toxicitu a ovlivnění signálních drah, které jsou rozhodující pro diferenciaci, proliferaci a přežívání nádorových buněk. Jejich účinek je selektivní, protože na rozdíl od nádorových buněk nepůsobí toxicky na nenádorové buňky (Kuefer *et al.*, 2004).

3.3.1.1.1 Tributyrin

Tributyrin (TB) je snadno dostupný trimer butanové kyseliny a svou strukturou se z 95 % podobá mastným kyselinám obsaženým v potravě (Clarke *et al.*, 2001). TB má vysoce lipofilní charakter a v přírodě se vyskytuje v nízkých koncentracích v některých rostlinách (Yan *et Xu*, 2003). TB představuje jednu z možností, jak by mohl být vyřešen problém klinického využití butyrátů, konkrétně butyrátu sodného, o kterých je známo, že indukují v buňkách nádorových linií zastavení buněčného cyklu (Toscani *et al.*, 1988), řídí diferenciaci mnoha typů buněk (Wächterhäuser *et Stein*, 2001), apoptózu (Chen *et al.*, 2006) a mají antiproliferativní účinky. Potenciální klinické využití butyrátu sodného (NaB) je však limitováno omezenou dobou působení *in vivo* z důvodu jeho rychlé metabolizace. Způsob jak by se tento problém rychlého metabolizování butyrátových monomerů dal obejít je aplikace analogů butyrátu, například tributyrinu (Kuefer *et al.*, 2004). Zvýšený antiproliferativní a proapoptotický účinek TB ve srovnání s butyrátem sodným je založen na skutečnosti, že úplnou hydrolýzou každé molekuly TB pomocí buněčných lipáz nebo esteráz vznikají tři molekuly butanové kyseliny (Maier *et al.*, 2000). TB je netoxická látka, která může být podávána orální formou (Clarke *et al.*, 2001) a je dostupná pro klinické testování u nádoru prostaty. TB může způsobit zastavení buněčného cyklu a následnou apoptózu prostatických nádorových buněk a mohl by tak být vhodný pro terapii pacientů v pokročilém stádiu nádoru prostaty (Maier *et al.*, 2000). Tento způsob terapie by také mohl umožnit léčbu rakoviny bez závažných vedlejších účinků, které často doprovází klasickou chemoterapii (Conley *et al.*, 1998).

3.3.1.1.2 Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) je jedním z nejvíce účinných a nejlépe prostudovaných inhibitorů HDACs (Yoshida *et al.*, 1990). TSA je původně anti-mykotické antibiotikum,

které se vyznačuje cytostatickými účinky na savčí buněčné kultury (Vigushin *et al.*, 2001). TSA působí jako kompetitivní inhibitor se schopností reverzibilně se vázat do aktivního místa HDACs. TSA nemá vliv na aktivitu jiných enzymů jako jsou proteinkinázy, proteinfosfatázy nebo DNA topoizomerázy (Yoshida *et al.*, 1990). Je prokázáno, že TSA navozuje diferenciaci buněk a způsobuje zastavení buněčného cyklu ve fázích G1 a G2 (Vigushin *et al.*, 2001, Yoshida *et al.*, 1990). TSA způsobuje buněčnou smrt u prostatických nádorových buněčných linií, přičemž hlavním mechanismem buněčné smrti navozené pomocí TSA je inhibice exprese AR. TSA může také buď snižovat hladinu koaktivátorů AR nebo zvyšovat hladinu korepresorů AR (Rokhlin *et al.*, 2006).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

V experimentální části této práce byly použity dvě prostatické buněčné linie, nádorová buněčná linie C4-2 a nenádorová buněčná linie RWPE-1.

Linie C4-2 je odvozena z karcinomu prostaty a jedná se o linii na androgenech nezávislou, jejíž buňky exprimují androgenový receptor. Tato linie vznikla odvozením ze dvou typů buněk, na androgenech závislé linie LNCaP a fibroblastů osteosarkomu (Higuchi *et al.*, 2006).

4.2 MTT test

MTT test je jednoduchá metoda, která slouží pro stanovení citlivosti buněk na chemické látky a k posouzení jejich případné toxicity. Metoda MTT testu je založena na schopnosti živých buněk redukovat tetrazoliové soli na modré krystaly formazanu působením mitochondriálních dehydrogenáz. Intenzitu modrého zbarvení je možné spektrofotometricky změřit, přičemž naměřená absorbance koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk (Carmichael *et al.*, 1987)

V tomto experimentu byly buňky prostatické nádorové linie C4-2 nasazeny na mikrotitrační 96-jamkovou destičku do 100 μ l RPMI média v počtu 5×10^3 buněk/jamka. Po 48-hodinové kultivaci při 37°C v 5% atmosféře CO₂ bylo vyměněno za médium s obsahem příslušných koncentrací testovaných látek: trichostatin A, tributyrin a jejich kombinace (Tab. I). Buňky byly ovlivňovány po dobu 48 a 96 hodin. Potom bylo do každé jamky přidáno 10 μ l 0,5% MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a následovala inkubace po dobu 4 hodin. Po uplynutí této doby bylo k buňkám do jednotlivých jamek přidáno 100 μ l 10% SDS (laurylsulfát sodný) a přibližně na 20 minut byly buňky umístěny do inkubátoru. Následovalo měření absorbance při vlnové délce 570 nm.

Tab. I: Složení roztoků testovaných látek pro MTT test

Typ ovlivnění	Složení roztoků (pro celkový objem 1 ml)			
	TSA (49,5 $\mu\text{mol/l}$) [μl]	TB (0,5 mmol/l) [μl]	10% DMSO [μl]	Médium RPMI [μl]
0,1% DMSO (kontrola)	-	-	10,00	990,00
TSA 0,5 $\mu\text{mol/l}$	10,10	-	-	989,90
TSA 0,2 $\mu\text{mol/l}$	4,04	-	-	995,96
TSA 0,1 $\mu\text{mol/l}$	2,02	-	-	997,98
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$	1,01	-	-	998,99
TB 1 mmol/l	-	2,00	8,00	990,00
TB 2 mmol/l	-	4,00	6,00	990,00
TB 2,5 mmol/l	-	5,00	5,00	990,00
TSA 0,5 $\mu\text{mol/l}$ + TB 1 mmol/l	10,10	2,00	8,00	979,90
TSA 0,5 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2 mmol/l	10,10	4,00	6,00	979,90
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + 2,5 mmol/l	10,10	5,00	5,00	979,90
TSA 0,2 $\mu\text{mol/l}$ + TB 1 mmol/l	4,04	2,00	8,00	985,96
TSA 0,2 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2 mmol/l	4,04	4,00	6,00	985,96
TSA 0,2 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2,5 mmol/l	4,04	5,00	5,00	985,96
TSA 0,1 $\mu\text{mol/l}$ + TB 1 mmol/l	2,02	2,00	8,00	987,98
TSA 0,1 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2 mmol/l	2,02	4,00	6,00	987,98
TSA 0,1 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2,5 mmol/l	2,02	5,00	5,00	987,98

Typ ovlivnění	Složení roztoků (pro celkový objem 1 ml)			
	TSA (49,5 $\mu\text{mol/l}$) [μl]	TB (0,5 mmol/l) [μl]	10% DMSO [μl]	Médium RPMI [μl]
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 1 mmol/l	1,01	2,00	8,00	988,99
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2 mmol/l	1,01	4,00	6,00	988,99
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2,5 mmol/l	1,01	5,00	5,00	988,99

4.3 Kultivace a ovlivňování buněčných linií

Kultivace buněčných linií probíhala při 37°C v 5% atmosféře CO₂. Buňky prostatické nádorové linie C4-2 byly kultivovány v médiu RPMI, buňky nenádorové linie RWPE-1 v médiu SFM. Buňky byly nasazovány na Petriho misky (10 cm) a po třech dnech kultivace, kdy konfluence dosáhla přibližně 60 %, bylo příslušné médium vyměněno za médium obsahující testované látky: trichostatin A, tributyrin a jejich kombinace (Tab. II).

Pro kultivaci ovlivněné buněčné linie C4-2 byly buňky nasazeny na Petriho misky v počtu 9 x 10⁵ buněk/miska (pro inkubaci na 48 hodin) a 9,5 x 10⁵ buněk/miska (pro inkubaci na 96 hodin). Z šesti Petriho misek byla jedna miska kontrolní obsahující 0,1% koncentraci DMSO, tedy stejnou koncentraci DMSO, která byla potřebná pro rozpuštění testovaných látek. Pro ovlivnění buněk jsme použili kombinace testovaných látek v těchto koncentracích (Tab. II) a při následujících počtech Petriho misek: jedna miska byla ovlivněna kombinací TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 1 mmol/l , dvě misky byly ovlivněny TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 2 mmol/l , zbývající dvě misky kombinací TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 2,5 mmol/l . Buňky byly s těmito látkami kultivovány po dobu 48 a 96 hodin při 37°C v 5% atmosféře CO₂. V případě 96-hodinové inkubace bylo médium po 48 hodinách vyměněno. Z takto ovlivněných buněk byla izolována RNA.

Buňky nenádorové buněčné linie RWPE-1 byly na Petriho misky nasazovány v počtu 1,2 x 10⁶ buněk/miska. Před ovlivněním byly buňky v každé misce promyty

5 ml 1x D-PBS. Pro 48-hodinovou kultivaci buněk bylo použito celkem dvacet misek. Do pěti kontrolních misek bylo přidáno 0,1% DMSO a další byly vždy po pěti ovlivňovány TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s TB o koncentracích 1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l. Ovlivněné buňky byly kultivovány při 37°C v 5% atmosféře CO₂. Pro 96-hodinové ovlivnění bylo použito pět misek s kontrolním 0,1% DMSO, deset misek pro kombinaci TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 1 mmol/l, dvanáct misek pro kombinaci TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 2 mmol/l a dvanáct také pro kombinaci TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a TB o koncentraci 2,5 mmol/l. Po 48 hodinách bylo médium vyměněno. Takto ovlivněné buňky byly použity pro izolaci RNA.

Buněčná linie C4-2 byla ovlivňována také pro získání lyzátů z proteinů a jejich následnou Western blotovou analýzu. V tomto případě byly buňky nasazeny v počtu 9×10^5 buněk/miska. Pro inkubaci buněk s testovanými látkami po dobu 48 i 96 hodin bylo použito vždy 8 misek, po dvou se shodným ovlivněním: 0,1% DMSO (kontrola), TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s TB o koncentracích 1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l. Inkubace probíhala při 37°C v 5% atmosféře CO₂.

Tab. II: Složení roztoků testovaných látek pro ovlivňování buněčných linií C4-2 a RWPE-1

Typ ovlivnění	Složení roztoků pro ovlivnění jedné Petriho misky (10 ml)			
	TSA (49,5 $\mu\text{mol/l}$) [μl]	TB (0,5 mmol/l) [μl]	10% DMSO [μl]	Médium RPMI (pro C4-2) / SFM (pro RWPE-1) [ml]
0,1% DMSO (kontrola)	-	-	100,00	9,90
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 1 mmol/l	10,10	20,00	80,00	9,89
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2 mmol/l	10,10	40,00	6,00	9,89
TSA 0,05 $\mu\text{mol/l}$ + TB 2,5 mmol/l	10,10	50,00	50,00	9,89

4.4 Izolace RNA

Z obou ovlivňovaných buněčných linií, C4-2 a RWPE-1, byla pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche) izolována RNA.

4.4.1 Izolace RNA z buněk nádorové buněčné linie C4-2

Z kultivačních Petriho misek bylo odsáto médium. Na každou misku byly napipetovány 4 ml 1x PBS, buňky byly opláchnuty a roztok PBS opět odsát. Poté byly na každou z misek napipetovány 2 ml 1x PBS a pomocí plastové stěrky byly buňky seškrábány a přeneseny do příslušné popsané 15ml zkumavky (z jedné nebo dvou Petriho misek se stejným ovlivněním byly buňky přenášeny do jedné zkumavky, z pěti misek se shodným ovlivněním pak do tří zkumavek). Na misky byly znovu napipetovány 2 ml 1x PBS a roztok se zbytky buněčných kolonií byl přenesen do příslušné zkumavky, tento krok byl ještě jednou zopakován. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 1200 rpm a pokojové teplotě (RT, Room temperature). Po odsátí supernatantu byly do všech zkumavek napipetovány 4 ml 1x PBS. Pelet na dně zkumavky byl promýván a pozvolna rozpuštěn. Následovala centrifugace 5 minut při 1200 rpm a RT. Po odsátí supernatantu byl pelet rozpuštěn ve 200 μ l 1x PBS a přenesen po 200 μ l do 1,5ml mikrozukumavek Eppendorf.

Poté byla provedena izolace RNA pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Do každé mikrozukumavky (Eppendorf) bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru (Lysis/-binding Buffer) a mikrozukumavky byly vortexovány po dobu 15 s. Vzorky (max. 700 μ l) byly přeneseny do kolonky s filtrem a centrifugovány po dobu 15 s při 10000 rpm. Supernatant ze spodní (sběrné) části kolonky byl jako odpadní vyléván. Ke každému vzorku byl připipetován roztok DNase a následovala inkubace po dobu 15 minut při teplotě 15 - 25°C. Potom bylo ke vzorkům přidáno 500 μ l promývacího pufru I (Wash buffer I), byla provedena krátká 15s centrifugace při 10000 rpm a ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant. Pokračovalo promývání s 500 μ l promývacího pufru II (Wash buffer II) a znovu centrifugace po dobu 15 s při 10000 rpm. Po přidání 200 μ l promývacího pufru II (Wash buffer II) byly vzorky centrifugovány 2 minuty při 13400 rpm. Kolonky s filtrem byly přemístěny do 1,5ml mikrozukumavek Eppendorf a vyluhování filtru (eluce) byla provedena přidáním 50 μ l elučního pufru (Elution

buffer) a následnou centrifugací po dobu 1 minuty při 10000 rpm. Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru – NanoDrop a vzorky byly uloženy do -80°C.

4.4.2 Izolace RNA z buněk nenádorové buněčné linie RWPE-1

Z kultivačních Petriho misek bylo odsáto médium. Na každou misku byly napipetovány 4 ml 1x D-PBS, rovnoměrně rozprostřeny po povrchu a opět odsáty. Poté byly na každou z misek napipetovány 2 ml 1x D-PBS a pomocí plastové stěrky byly buňky seškrábány a přeneseny do 15ml zkumavky (z pěti Petriho misek byly buňky se stejným ovlivněním přeneseny do tří zkumavek, u deseti misek do pěti zkumavek a z dvanácti misek do šesti zkumavek). Na misky byly znovu napipetovány 2 ml 1x D-PBS a roztok se zbytky buněčných kolonií byl přenesen do příslušné zkumavky. Všechny zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 1200 rpm a pokojové teplotě (RT). U ovlivnění TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s TB o koncentracích 2 mmol/l a 2,5 mmol/l po dobu 96 hodin byla kromě standardního postupu provedena ještě centrifugace při 1400 rpm po dobu 5 min při RT (získaných buněk bylo velké množství a při vyšších koncentracích TB s glycerolem se špatně usazovaly). Potom byl ze zkumavek odsát supernatant. Do všech zkumavek byly napipetovány 4 ml 1x D-PBS, aby se rozpustil a promyl pelet. Následovala centrifugace 5 minut při 1200 rpm a RT. V případě ovlivnění TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s TB o koncentracích 2 mmol/l a 2,5 mmol/l po dobu 96 hodin byla provedena navíc ještě centrifugace při 1400 rpm po dobu 5 min při RT. Po odsátí supernatantu byl pelet rozpuštěn ve 200 μl 1x D-PBS. U ovlivnění po dobu 96 hodin byl pelet rozpuštěn ve 400 μl 1x D-PBS, protože pelety byly velké. Rozpuštěný pelet byl přenesen do 1,5ml mikrozkušavek Eppendorf a poté byla provedena izolace RNA pomocí High Pure RNA Isolation Kit. Po spektrofotometrickém změření koncentrace RNA na přístroji NanoDrop byly vzorky uchovány při -80°C.

4.5 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla reverzní transkripcí (reverse transcription PCR) přepsána do cDNA, která byla použita pro analýzu genové exprese pomocí real-time PCR.

Reverzní transkripce (RT-PCR) byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Všechny komponenty kitu i vzorky byly během práce udržovány na ledu. Do PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml byla připravena směs obsahující Random hexamer primery (3 μ l), RNA (objem byl zvolen podle koncentrací RNA u jednotlivých vzorků) a H₂O (k doplnění celkového objemu 19,5 μ l). Obsah mikrozkušavek byl opatrně promíchán, krátce centrifugován a umístěn do Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad) na dobu 10 minut, kde byl inkubován při teplotě 65°C. Poté byly do mikrozkušavek připipetovány další komponenty kitu dle Tab. III.

Tab. III: Rozpis reagensí pro reverzní transkripci

Reagencie	Objem pro běžný vzorek [μ l]	Objem pro no-RT [μ l]
Pufr RT, 5x konc.	6,00	6,00
Inhibitor RNase	0,75	0,75
dNTPs mix, 10 mmol/l	3,00	3,00
Reverzní transkriptáza	0,75	-
H ₂ O, PCR grade	-	0,75
Celkový objem	30,00	30,00

Směs ve zkumavkách byla opatrně promíchána a mikrozkušavky byly krátce centrifugovány. Mikrozkušavky byly opět umístěny do Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad), přičemž teplotní průběh reakce byl následující: 10 minut při 25°C, 60 minut při 50°C a 5 minut při 85°C. Po ukončení reakce byly vzorky umístěny do ledu a uchovány při -20°C.

4.6 Real-time PCR

Získaná cDNA byla použita pro analýzu genové exprese pomocí kvantitativní real-time PCR s využitím duálně značených sond typu TaqMan. Exprese genů pro SRC-1, AR, PSA a p300 byla stanovena ve vztahu ke genu pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). GAPDH je nejčastěji používaný provozní (housekeeping) gen, který slouží pro porovnávání genové exprese (Barber *et al.*, 2005). Složení reakčních roztoků, průběh reakcí a sekvence použitých primerů a sond jsou uvedeny v Tab. IV, Tab. V a Tab. VI.

Tab. IV: Rozpis reagensií pro real-time PCR (objem reakce 25 µl)

Detekovaný gen	Reagencie	Objem [µl]	Koncentrace	Množství v reakci	Výsledná koncentrace
AR	Primer AR F	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Primer AR R	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Sonda AR	4,0	1,25 µmol/l	5 pmol	200 nmol/l
	dNTPs	0,5	10 mmol/l	5 nmol	200 nmol/l
	Thermo-Start DNA polymeráza	0,2	5 U/µl	1 U	0,04 U/µl
	Mg ²⁺	3,0	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
	Pufr	2,5	10 x	1 x	1 x
	cDNA	1,0	0,1 µg/µl	100 ng	4 ng/µl
	H ₂ O	9,8	-	-	-
PSA	Primer PSA F	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Primer PSA R	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Sonda PSA	4,0	1,25 µmol/l	5 pmol	200 nmol/l
	dNTPs	0,5	10 mmol/l	5 nmol	200 nmol/l
	Thermo-Start DNA polymeráza	0,2	5 U/µl	1 U	0,04 U/µl
	Mg ²⁺	3,0	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
	Pufr	2,5	10 x	1 x	1 x
	cDNA	1,0	0,1 µg/µl	100 ng	4 ng/µl
	H ₂ O	9,8	-	-	-
SRC-1	Primer SRC-1 F	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Primer SCR-1 R	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Sonda SRC-1	4,0	1,25 µmol/l	5 pmol	200 nmol/l
	dNTPs	0,5	10 mmol/l	5 nmol	200 nmol/l
	Thermo-Start DNA polymeráza	0,2	5 U/µl	1 U	0,04 U/µl
	Mg ²⁺	3,0	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
	Pufr	2,5	10 x	1 x	1 x
	cDNA	1,0	0,1 µg/µl	100 ng	4 ng/µl
	H ₂ O	9,8	-	-	-

Detekovaný gen	Reagencie	Objem [μ l]	Koncentrace	Množství v reakci	Výsledná koncentrace
p300	Primer p300 F	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Primer p300 R	2,0	0,005 mmol/l	10 pmol	400 nmol/l
	Sonda p300	4,0	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
	dNTPs	0,5	10 mmol/l	5 nmol	200 nmol/l
	Thermo-Start DNA polymeráza	0,2	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
	Mg ²⁺	2,0	25 mmol/l	50 nmol	2 mmol/l
	Pufr	2,5	10 x	1 x	1 x
	cDNA	1,0	0,1 μ g/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
	H ₂ O	10,8	-	-	-
GAPDH	Primer GAPDH F	1,0	7,5 μ mol/l	7,5 pmol	300 nmol/l
	Primer GAPDH R	1,0	7,5 μ mol/l	7,5 pmol	300 nmol/l
	Sonda GAPDH	4,0	1,25 μ mol/l	5 pmol	200 nmol/l
	dNTPs	0,5	10 mmol/l	5 nmol	200 μ mol/l
	Thermo-Start DNA polymeráza	0,2	5 U/ μ l	1 U	0,04 U/ μ l
	Mg ²⁺	3,0	25 mmol/l	75 nmol	3 mmol/l
	Pufr	2,5	10 x	1 x	1 x
	cDNA	1,0	0,1 μ g/ μ l	100 ng	4 ng/ μ l
	H ₂ O	11,8	-	-	-

Tab. V: Teplotní průběh real-time PCR

Detekovaný gen	Děj	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
AR	aktivace polymerázy, denaturace cDNA	96	15 min	50
	amplifikace	95	15 s	
		62	15 s	

Detekovaný gen	Děj	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
PSA	aktivace polymerázy, denaturace cDNA	96	15 min	50
	amplifikace	95	15 s	
		62	15 s	
SRC-1	aktivace polymerázy, denaturace cDNA	96	15 min	50
	amplifikace	95	15 s	
		60	15 s	
p300	aktivace polymerázy, denaturace cDNA	96	15 min	50
	amplifikace	95	15 s	
		60	15 s	
GAPDH	aktivace polymerázy, denaturace cDNA	96	15 min	50
	amplifikace	95	15 s	
		60	30 s	

Tab. VI: Sekvence primerů a sond použitých v real-time PCR

Detekovaný gen (velikost produktu)	Primer/sonda	Sekvence	Velikost primeru/sondy [bp]
AR (137 bp)	Primer F	5'-ATCCCAGTCCCCTTGTGTC-3'	20
	Primer R	5'-GGTCTTCTGGGGTGGAAAGT-3'	20
	Sonda AR	5'-AAGCGAAATGGGCCCTGGA-3'	20
PSA (95 bp)	Primer F	5'-CGGAGAGCTGTGTCACCAT-3'	19
	Primer R	5'-CACAATCCGAGACAGGATGA-3'	20
	Sonda PSA	5'-CGTGGATTGGTGCTGCACCC-3'	20
SRC-1 (116 bp)	Primer F	5'-CAAACCCACTCCTGAGGAAA-3'	20
	Primer R	5'-ATAAGCCTGGCAACTGTGCT-3'	20
	Sonda SRC-1	5'-CTGCCACGCTGGAGAAGGC-3'	20

Detekovaný gen (velikost produktu)	Primer/sonda	Sekvence	Velikost primeru/sondy [bp]
p300 (118 bp)	Primer F	5'-CAAACGCCGAGTCTTCTTTC-3'	20
	Primer R	5'-GTTGAGCTGCTGTTGGCATA-3'	20
	Sonda p300	5'-CCAGTGTGCCCTCCCTGGGT-3'	20
GAPDH (226 bp)	Primer F	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	20
	Primer R	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'	18
	Sonda GAPDH	5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'	20

4.7 Práce s buněčnými lyzáty

4.7.1 Promývání a lyze buněk pro získání celkového obsahu proteinů

Celkem šestnáct Petriho misek s buňkami linie C4-2 (osm s ovlivněním po dobu 48 hodin a osm po dobu 96 hodin), a to vždy po dvou se stejnou koncentrací testovaných látek) bylo použito pro získání celkových proteinů. Buňky byly vysévány na misku v počtu 9×10^5 - 1×10^6 buněk/jamka.

Na Petriho misku s buňkami byl rovnoměrně napipetován 1 ml roztoku 11x Formaldehyde Stock a misky byly po dobu 30 minut inkubovány v lednici (4°C). Potom bylo na každou misku napipetováno 687,8 µl vychlazeného roztoku glycinu o koncentraci 2 mol/l (konečná koncentrace glycinu na misce byla 125 mmol/l). Krouživým pohybem Petriho misky byl glycin rovnoměrně rozprostřen a takto byly misky ponechány po dobu 5 minut při pokojové teplotě (RT). Poté bylo odsáto médium a misky umístěny na led. Na každou Petriho misku byly napipetovány 4 ml 10x PBS pufru a roztoky byly přeneseny do příslušných 15ml zkumavek, tento krok byl opakován. Následně byl na každou misku napipetován 1 ml ChIP pufru s inhibitory proteáz (cOmplete, Roche) a misky byly umístěny na led. Všechny 15ml zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 600 g a 4°C v předem vychlazené centrifuze. Poté byly odsáty ze zkumavek supernatanty tak, aby nedošlo k porušení peletů na dně zkumavek. Do každé zkumavky byly napipetovány 4 ml ChIP pufru. Ze dna Petriho misky (umístěny stále na ledu) byly pomocí plastové stěrky seškrábány buňky do jednoho místa a buněčný lyzát byl přenesen do příslušné 15ml zkumavky s 5 ml ChIP lyzačního pufru. Všechny zkumavky s buněčnými lyzáty byly umístěny na talířový

rotátor (Stuart) a v chladové místnosti (4°C) byly po dobu 10 minut promíchávány při 5 otáčkách/min. Poté byly zkumavky znovu centrifugovány po dobu 5 min při 600 g a 4°C. Po odsátí supernatantu bylo do každé zkumavky přidáno 8 ml promývacího (Wash) pufu a zkumavky byly umístěny na 10 minut na talířový rotátor (Stuart), kde byl obsah promýván při 8 otáčkách/min. Následovala centrifugace 5 minut při 600 g a 4°C. Po odsátí supernatantu byl buněčný pelet rozsuspendován ve 140 µl RIPA pufu a rozdělen do dvou 1,5ml příslušných mikrozkuvek (umístěny v ledu). Obsah mikrozkuvek byl důkladně zvortexován, poté byly mikrozkuvky umístěny na talířový rotátor a po dobu 30 minut byl jejich obsah promýván při 15 otáčkách/min. Vzorky byly uchovávány při -80°C.

4.7.2 Získávání jednotlivých proteinových frakcí

Pro získání cytoplazmatické a jaderné frakce z neovlivněných a ovlivněných buněk linie C4-2 bylo použito 16 Petriho misek (osm s ovlivněním po dobu 48 hodin a osm po dobu 96 hodin). Buňky byly vysévány na misku v počtu 1×10^6 buněk/jamka. Pro izolaci těchto dvou proteinových frakcí byl použit Kit Qproteome Cell Compartment (Qiagen).

4.7.3 Sonikace buněčných lyzátů

Sonikace buněčných lyzátů s celkovým obsahem proteinů (kapitola 4.7.1) probíhala následujícím způsobem. Na sonikátoru UP200S (Hielscher Ultrasound technology) byl nastaven cyklus 1 (nepřerušovaný). Nejprve byly vzorky sonikovány při účinnosti 80 % po dobu 20 s, na 1 minutu byly umístěny do ledu a poté znovu sonikovány 20 s při stejné účinnosti. Potom probíhala sonikace s účinností 90 %, opět po dobu 20 s. Po vychlazení v ledu (1 minuta), byl tento krok opakován. Třetí sonikace při účinnosti 100 % byla po dobu 10 s, na 1 minutu byly lyzáty opět umístěny do ledu a poté sonikovány ještě jednou 10 s při účinnosti 100 %.

Po sonikaci buněčných lyzátů byly vzorky centrifugovány po dobu 15 minut při 14000 rpm a 4°C. Supernatanty byly přeneseny do nových příslušných mikrozkuvek. Z každého vzorku bylo odebráno 50 µl pro stanovení koncentrace proteinů. Vzorky byly uloženy při -80°C.

4.7.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Množství roztoku činidla Bradfordové bylo stanoveno následovně: 1 ml roztoku na každý vzorek + 1 ml roztoku pro slepý vzorek (blank) + 1 ml roztoku na kalibraci / 5 (5x koncentrovaný roztok).

Příprava roztoku činidla Bradfordové byla následující: do kádinky bylo napipetováno odpovídající množství činidla Bradfordové, ke kterému byla přidána sterilní deionizovaná H₂O v poměru 1 : 4. Tento roztok byl přenesen na filtrační papír umístěný ve zkumavce Falcon (50 ml). Filtrace roztoku probíhala v chladové místnosti (4°C) bez přítomnosti světla.

Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byla nejprve napipetována koncentrační řada standardu, přičemž jako standard byl použit gamaglobulin (γ -globulin) v koncentraci 1 mg/ml. Standard byl napipetován do šesti jamek v množství 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l a 10 μ l, a sterilní deionizovaná H₂O sloužila pro doplnění k získání celkového objemu 10 μ l. Vzorky byly pipetovány vždy v tripletech tak, že k 1 μ l sterilní deionizované H₂O byl přidán 1 μ l vzorku. Potom bylo do jednotlivých jamek napipetováno 200 μ l roztoku činidla Bradfordové. Do tří prázdných jamek bylo jako slepý vzorek (blank) použito 200 μ l roztoku činidla Bradfordové. Následovala inkubace po dobu 5 minut při RT a poté byla spektrofotometricky změřena absorbance všech vzorků. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka a stanovena koncentrace proteinů.

4.8 Western blot analýza

4.8.1 Elektroforéza

Podle Tab. VII byl připraven 5% zaostřovací a 8% (pro detekci AR a PSA) nebo 10% (pro detekci SRC-1) dělicí polyakrylamidový gel. Dělicí gel byl napipetován do aparatury mezi skla tloušťky 1,5 mm, převrstven butanolem a ponechán polymerovat po dobu minimálně 20 minut. Poté byl butanol vylit (zbytek odsát pomocí filtračního papíru) a prostor nad gelem byl promyt přibližně 500 μ l Tris-HCl, pH 6,8. Na dolní gel byl nanesen zaostřovací gel a do něj vložen hřebínek. Po ztuhnutí horního gelu (minimálně 1 hodinu nebo bylo možno oba gely uchovat v chladu do druhého dne) byla skla s gely umístěna do elektroforetické aparatury a zalita elektroforetickým pufrem.

Vzorky pro elektroforetické dělení byly v závislosti na zjištěných koncentracích proteinů smíchány s 1x LSB tak, aby bylo v celkovém objemu 50 μ l vždy 30 μ g proteinů. Nejprve byl na gel nanesen hmotnostní standard – Full Range , který byl připraven smícháním 2 μ l hmotnostního standardu – Full range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences USA) s 38 μ l 1x LSB. Všechny vzorky byly před nanesením na gel denaturovány při 100°C po dobu 1 minuty a poté krátce centrifugovány.

Elektroforetická separace probíhala 30 minut při napětí 80 V, poté 3 hodiny (pro detekci AR a PSA) nebo 4 hodiny a 15 minut (pro detekci SRC-1) při napětí 100 V.

Tab. VII: Složení zaostřovacího a dělicích polyakrylamidových gelů

	Objem pro 5% zaostřovací gel [ml]	Objem pro 8% dělicí gel [ml]	Objem pro 10% dělicí gel [ml]
Deionizovaná voda	4,100	9,300	7,900
Acrylamide Mix (30%)	1,000	5,300	6,700
Tris-HCl 1,5 mol/l, (pH 6,8)	0,750	-	-
Tris-HCl 1 mol/l, (pH 8,8)	-	5,000	5,000
SDS (10%)	0,060	0,200	0,200
APS (10%)	0,060	0,200	0,200
TEMED	0,006	0,012	0,008
Celkový objem	6,000	20,000	20,000

4.8.2 Přenos proteinů na membránu

Dolní dělicí gel, obsahující separované proteiny, byl po odřezání horního zaostřovacího gelu promýván 20 minut v transferovém pufru (50 rpm, RT). Membrány a filtrační papíry byly v transferovém pufru promývány 5 minut. Na blotovací zařízení navlhčené transferovým pufrem byl položen filtrační papír, na něj přiložena membrána, na membránu byl umístěn gel a nahoru opět filtrační papír. Vždy před přiložením další vrstvy byla daná vrstva stlačena pomocí skleněné tyčinky a navlhčena transferovým pufrem. Blotování probíhalo 40 minut při napětí 20 V.

4.8.3 Detekce proteinů

Membrány byly 5 minut promývány v Ponceau S (80 rpm, RT). Následovalo odbarvení 10% kyselinou octovou. Z membrány byly vyřezány úseky, které odpovídaly molekulovým hmotnostem sledovaných proteinů. Pro kontrolu, zda byla v jednotlivých vzorcích stejná koncentrace proteinů, byla provedena detekce GAPDH.

4.8.3.1 Detekce SRC-1 a GAPDH

Proužky membrán obsahující protein SRC-1 (180 kDa) a GAPDH (37 kDa) byly promývány v 1x TBS po dobu 5 min. Následovalo blokování po dobu 1 hodiny (50 rpm, RT) v blokovacím pufru. Poté byly úseky membrán 5 minut promývány v pufru TBS s Tween (0,1% Tween-20 v 1x TBS). Následovala inkubace s primárními protilátkami: Proužky membrány obsahující protein SRC-1 byly inkubovány s králičí monoklonální protilátkou SRC-1 128E7 (ředění 1 : 750) (Cell Signaling Technology). Úseky membrány odpovídající proteinu GAPDH byly inkubovány s myší monoklonální protilátkou Anti-GAPDH (ředění 1 : 20000) (Sigma-Aldrich). Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 50 rpm v chladové místnosti (4°C). Poté byly úseky membrán promývány po dobu 1 hodiny při 80 rpm a RT v promývacím pufru TBS s Tween, přičemž vždy po 15 minutách byl roztok vyměněn. Inkubace se sekundárními protilátkami trvala 1 hodinu (50 rpm, RT). Pro detekci SRC-1 byla použita sekundární anti-králičí protilátka (ředění 1 : 5000) (Cell Signaling Technology), pro GAPDH sekundární anti-myší protilátka (ředění 1 : 6000) (Santa Cruz Biotechnology). Potom byly úseky membrán opět promývány 1 hodinu (výměna roztoku vždy po 15 minutách) v promývacím pufru TBS s Tween. Vizualizace proteinů byla provedena pomocí chemiluminiscenční reakce, membrány byly s chemiluminiscenčním roztokem inkubovány po dobu 5 minut v chladové místnosti (4°C) a ve tmě. Signál byl zachycen na fotografický film.

4.8.3.2 Detekce AR a PSA

Proužky membrán obsahující proteiny AR (110, 112 kDa) a PSA (47 kDa) byly promývány 5 minut v 1x PBS a poté byly vysušeny (uchovány pro pozdější zpracování). Membrány byly za účelem důkladného zvlhčení inkubovány při pokojové

teplotě po dobu 6 hodin v blokovacím pufru při 70 rpm. Následovalo promývání 5 minut v promývacím pufru PBS s Tween (0,1% Tween-20 v 1x PBS) při 70 rpm a RT. Myší monoklonální protilátka AR 441 (ředění 1 : 200) (Santa Cruz Biotechnology) byla aplikována na úseky membrány odpovídající proteinu AR. Na proužky membrány odpovídající proteinu PSA byla nanesena králičí polyklonální protilátka PSA-AMACR P504S (ředění 1 : 500) (Chemicon). Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc (ON, Over Night) v chladové místnosti při 4°C. Po odpipetování primárních protilátek byly proužky membrán promývány 1 hodinu v promývacím pufru PBS s Tween při 70 rpm a RT, přičemž vždy po 15 minutách byl pufr vyměněn. Na proužky membrány byly aplikovány sekundární protilátky. Na úsek odpovídající AR byla aplikována anti-myší protilátka (ředění 1 : 6000) (Santa Cruz Biotechnology), na úsek odpovídající PSA anti-králičí sekundární protilátka (ředění 1 : 5000) (Cell Signaling Technology). Inkubace se sekundárními protilátkami trvala 45 minut a probíhala při pokojové teplotě. Následovalo znovu promývání v promývacím pufru PBS s Tween po dobu 1 hodiny s výměnou roztoku vždy po 15 minutách (80 rpm, RT). Proteiny byly vizualizovány pomocí chemiluminiscenční reakce. Inkubace s chemiluminiscenčním roztokem trvala 5 minut (4°C, ve tmě). Signál byl zachycen na fotografický film.

4.9 Použité roztoky

Promývací (Wash) pufr

- 1 ml Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl EDTA 0,5 mol/l
- 500 µl EGTA 0,1 mol/l
- 20 µl NaCl 1 mol/l
- doplnit do 100 ml sterilní deionizovanou vodou

Glycin 2 mol/l

- 7,507 g glycinu
- rozpustit v 50 ml sterilní deionizované vody

1x RIPA pufr

- 500 µl Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- 100 µl EDTA 0,5 mol/l
- 250 µl EGTA 0,1 mol/l
- 7 µl NaCl 1 mol/l
- 500 µl Triton-X 100
- 5 ml 1% deoxycholátu sodného
- 500 µl 10% SDS
- Inhibitory proteáz (cOmplete, Roche)
- doplnit do 50 ml sterilní deionizovanou vodou

11x formaldehyde stock

- 2 ml Hepes-KOH 0,5 mol/l, pH 8,0
- 40 µl EDTA 0,5 mol/l
- 100 µl EDTA 0,1 mol/l
- 2 ml NaCl 1 mol/l
- 5,5 ml 40% formaldehyde
- doplnit do 20 ml sterilní deionizovanou vodou

Chro-IP lyzační pufr

- 20 ml Hepes-KOH 0,5 mol/l, pH 8,0
- 400 µl EDTA 0,5 mol/l
- 1 ml EGTA 0,1 mol/l
- 28 ml NaCl 1 mol/l
- 20 ml 100% glycerolu
- 1 ml NP-40
- 500 µl Triton-X 100
- doplnit do 200 ml sterilní deionizovanou vodou

10x TBS

- 24,2 g Tris-base
- 80 g NaCl
- rozpustit v 1 l sterilní deionizované vody, pH upravit na 7,6 (pomocí HCl)

Blokovací pufr pro detekci SRC-1 a GAPDH

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

Blokovací pufr pro detekci AR a PSA

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

Primary AG dilution pufr

- 2 ml 10x TBS
- 1 g BSA
- 20 µl Tween-20
- doplnit do 20 ml sterilní deionizovanou vodou

1x TBS

- 50 ml 10x TBS
- 450 ml sterilní deionizované vody

1x PBS

- 10 ml 10x PBS
- 90 ml sterilní deionizované vody

Promývací pufr pro detekci SRC-1

- 500 ml 1x TBS
- 500 µl Tween-20

Promývací pufr pro detekci AR a PSA

- 500 ml 1x PBS
- 500 µl Tween-20

4.10 Média pro práci s buněčnými kulturami:

RPMI

- RPMI 1640 obsahující L – glutamin a 15 mmol/l HEPES bez hydrogenuhličitanu sodného (Gibco)
- roztok FBS (fetal bovine serum), výsledná koncentrace 10 %
- roztok antibiotik (penicilin a streptomycin), výsledná koncentrace 0,01 %
- L-glutamin, výsledná koncentrace 2 mmol/l
- pyruvát sodný, výsledná koncentrace 1 mmol/l

SFM

- Keratinocyte-SFM Medium (Kit) obsahující L-glutamin, EGF (human recombinant epidermal growth factor) a BPE (bovine pituitary extract) (Gibco)
- roztok antibiotik (penicilin a streptomycin), výsledná koncentrace 0,01 %
- roztok amfomycinu, výsledná koncentrace 0,01 %
- roztok gentamycinu, výsledná koncentrace 0,005 %

4.11 Použité chemikálie

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
- Acrylamide mix
- Butanol
- Činidlo Bradfordové
- Deoxynukleotidy, 100 mmol/l (Promega)
- Dimetylsulfoxid, 100% roztok
- D-PBS
- Gamaglobulin (Bio-Rad)
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
- Hmotnostní standard Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences USA)
- Inhibitor RNázy RNase Zap (Sigma – Aldrich)
- Inhibitory proteáz Complete (Roche)
- Kyselina octová, 10%
- Laurylsulfát sodný

- LSB
- PBS
- Persulfát amonný
- Ponceau S
- Primery (R a F) pro real-time PCR – AR, PSA, SRC-1, p300, GAPDH (Generi Biotech)
- Protilátka Anti-GAPDH (Sigma – Aldrich)
- Protilátka anti-králičí (Cell Signaling Technology)
- Protilátka anti-myší (Santa Cruz Biotechnology)
- Protilátka AR 441 (Santa Cruz Biotechnology)
- Protilátka PSA-AMACR P504S (Chemicon International a Serologicals Company)
- Protilátka SRC-1 128E7 (Cell Signaling Technology)
- Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen)
- Sondy pro real-time PCR – AR, PSA, SRC-1, p300, GAPDH (Generi Biotech)
- Super Signal West Dura (Thermo Scientific)
- Tetrametylendiamin
- Thermo-Start DNA polymeráza (ABgene)
- Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
- Tributyrin (Sigma – Aldrich)
- Trichostatin A (Sigma – Aldrich)
- Tris-HCl 1 mol/l, (pH 8,8)
- Tris-HCl 1,5 mol/l, (pH 6,8)
- Tween-20

4.12 Vybavení laboratoře

- 96-jamková mikrotitrační destička
- Automatická pipeta Pipets - akku (Hirschman Laborgerate)
- Blotovací filtrační papír
- Blotovací membrány
- Blotovací zařízení Trans-blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)

- Centrifuga Minispin (Eppendorf)
- Centrifuga MR22i (Jouan)
- Centrifugační zkumavky, 15 ml
- Digitální váha 440-33 (Kern)
- Elektroforetická aparatura, skla 1,5mm, hřebeny 10 zubů (Bio-Rad)
- Fotografický film
- Inkubátor CO2 BB 16 (Heracel)
- Laminární box Aura Vertical SD4 (Biotech)
- Mikropipety (Eppendorf)
- Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
- Mikrozukavky (Eppendorf)
- Petriho misky, 10 cm
- Plastové stěrky Cell Scraper (Biologix Research Company)
- Rotor gene RG-3000 (Corbett Research)
- Skleněné kapiláry
- Sonikátor UP200S (Hielscher Ultrasound technology)
- Spektrofotometr ND-1000 (Nanodrop)
- Spektrofotometr PowerWave XS (Bio-Tek)
- Sterilní jehly
- Sterilní mikrozukavky (Eppendorf)
- Sterilní pipetovací nástavce
- Sterilní špičky (Eppendorf)
- Sterilní zkumavky, 15 ml (Gama group)
- Talířový rotátor (Stuart)
- Termoblok
- Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad)
- Vodní lázeň Julabo TW8 (Biotech)
- Vortex Maxi Mix II (Thermolyne)
- Vývěva
- Zkumavky Falcon, 50 ml

5 VÝSLEDKY

5.1 Viabilita buněk linie C4-2 po ovlivnění TSA a TB

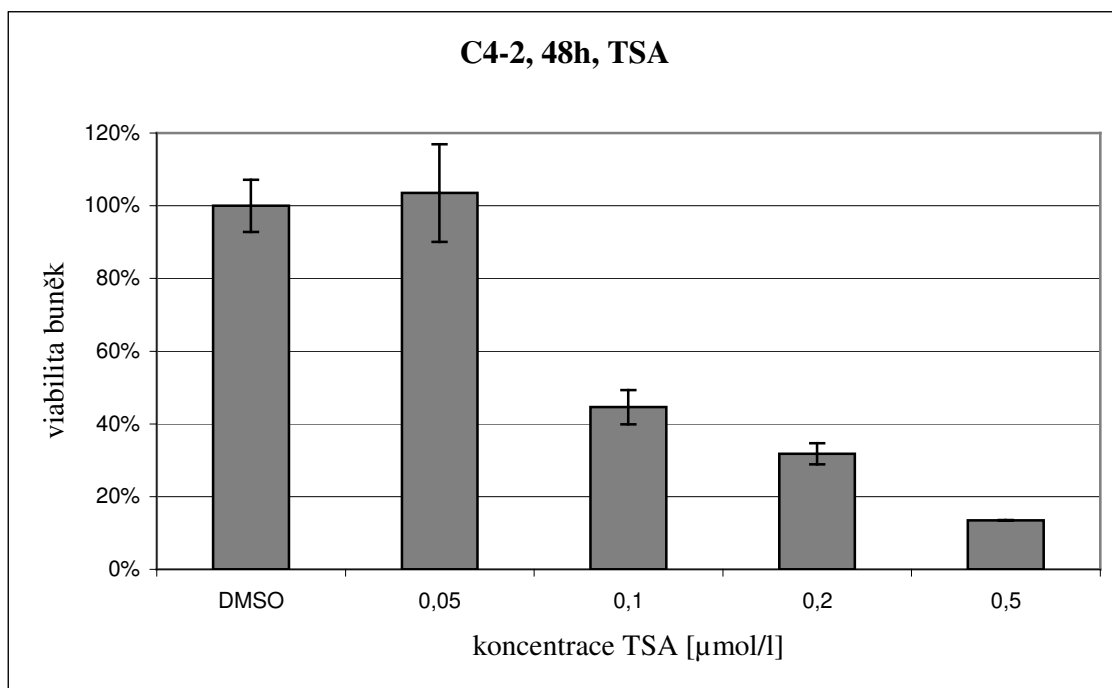
Vliv dvou testovaných inhibitorů HDACs, TSA a TB, na viabilitu buněk linie C4-2 byl sledován pomocí MTT testu. Byly testovány různé koncentrace TSA, TB a jejich kombinace. Buňky byly s uvedenými inhibitory HDACs inkubovány po dobu 48 a 96 hodin, poté byl proveden MTT test a spektrofotometricky změřena absorbance při 570 nm.

U ovlivnění TSA byl u koncentrace 0,05 $\mu\text{mol/l}$ zjištěn nejmenší cytotoxický efekt, který byl srovnatelný s efektem u kontrolních neovlivněných buněk (0,1% DMSO). Se zvyšující se koncentrací TSA docházelo k poklesu buněčné viability, přičemž nejvyšší cytotoxický efekt vykazovala 0,5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace TSA (**Obr. 1**). Viabilita buněk po ovlivnění TB byla naopak při použití nejnižší koncentrace 1 mmol/l oproti kontrole snížena na 66 %, s rostoucími koncentracemi TB se zvyšovala a v případě nejvyšší koncentrace 2,5 mmol/l byla srovnatelná s kontrolou (**Obr. 2**). Při ovlivnění buněk kombinacemi TSA a TB došlo po 48 hodinách ke snížení viability buněk v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami. Pokud byl TB použit v kombinaci s TSA o koncentracích 0,5 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$, byla buněčná viabilita velmi nízká (kolem 20 - 30 %). U nižších koncentrací TSA (0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,05 $\mu\text{mol/l}$) v kombinacích s TB (1 mmol/l, 2 mmol/l, 2,5 mmol/l) bylo přežívání buněk vyšší, viabilita se pohybovala v rozmezí 40 – 60 %. (**Obr. 3**). Po opakování MTT testu s koncentracemi TSA 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA v kombinaci s TB byla u koncentrace 0,1 $\mu\text{mol/l}$ TSA v kombinaci s TB buněčná viabilita snížena na hodnoty pohybující se kolem 40 %. U koncentrace 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA v kombinaci s TB došlo také ke snížení viability buněk vzhledem ke kontrole, ne však tak výraznému jako v předchozím případě (**Obr. 4**).

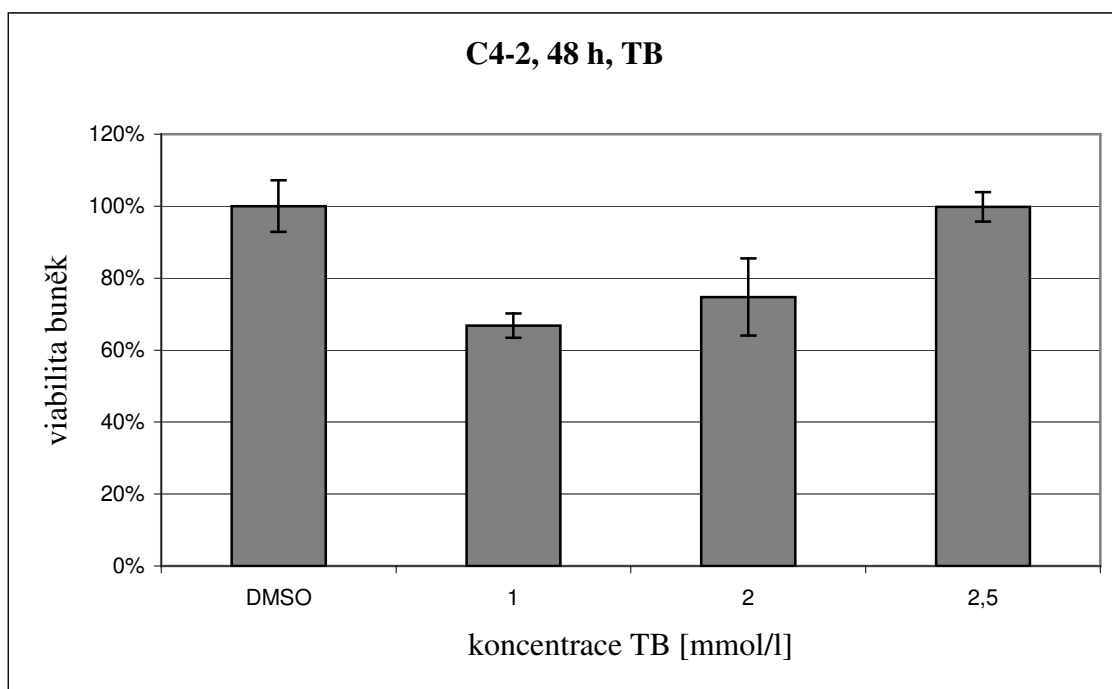
U 96-hodinové inkubace buněk s TB se snižuje přežívání buněk v koncentracích 1 mmol/l a 2 mmol/l přibližně o polovinu při porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami a u koncentrace 2,5 mmol/l klesá viabilita na 35 % (**Obr. 5**). Buňky ovlivňované 0,1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrací TSA v kombinaci se třemi koncentracemi TB (1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l) (**Obr. 6**) po dobu 96 hodin dosahují buněčné viability kolem 40 %. V případě kombinací TB s 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA je viabilita také snížena v porovnání s kontrolou, ale ne tak výrazně. Výraznější cytotoxický efekt

porovnáním s kombinacemi dvou koncentrací TB (1 mmol/l a 2 mmol/l) a TSA má kombinace 2,5 mmol/l TB a TSA (**Obr. 6**).

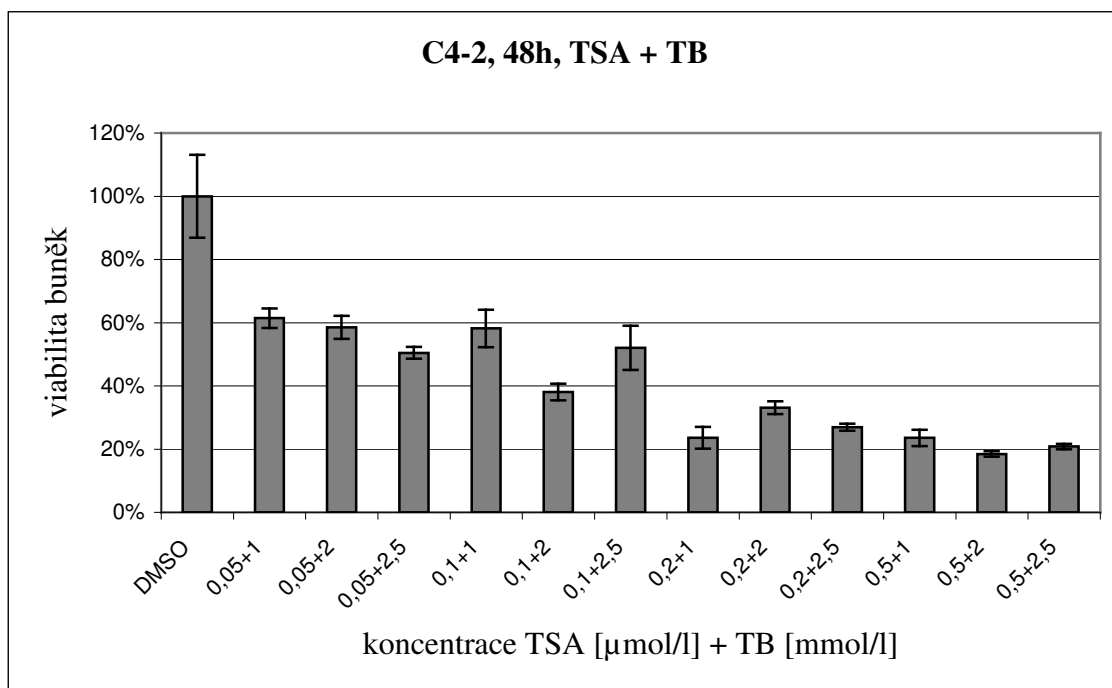
Na základě těchto výsledků byly pro další práci s buněčnými kulturami zvoleny následující kombinace: TSA o koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s TB, který byl aplikován v koncentracích 1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l. U těchto kombinací TSA a TB docházelo ke snížení viability C4-2 buněk v porovnání s kontrolou, ale tento pokles nebyl tak velký jako u zbývajících testovaných koncentrací.



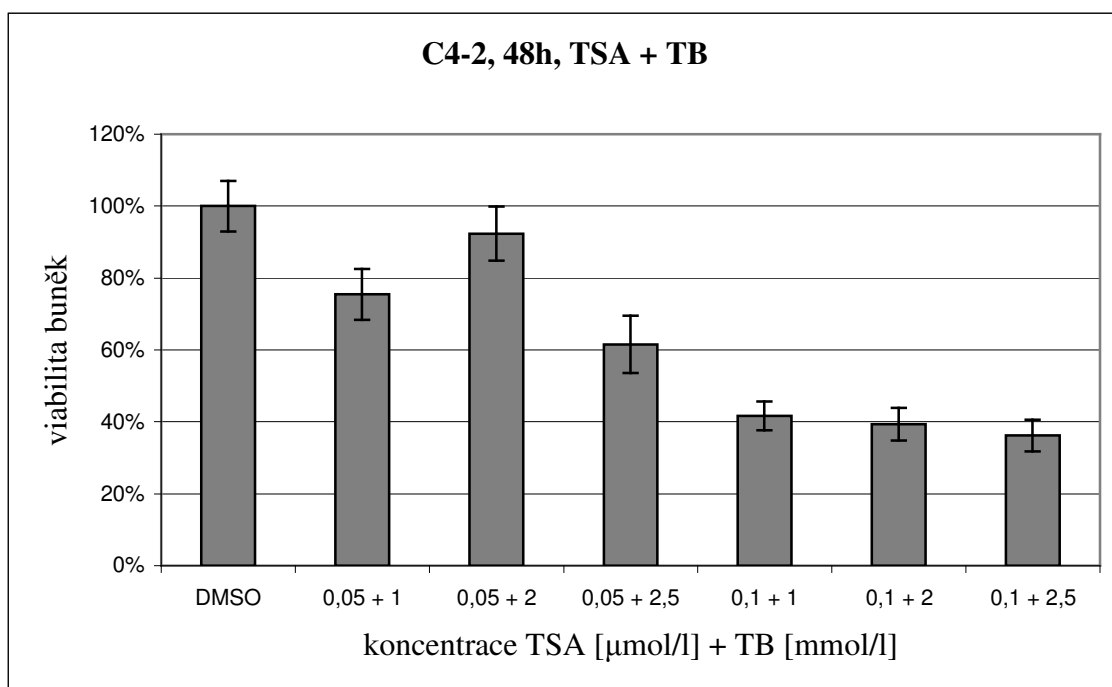
Obr. 1: Viabilita buněk linie C4-2 po 48-hodinovém ovlivnění různými koncentracemi TSA



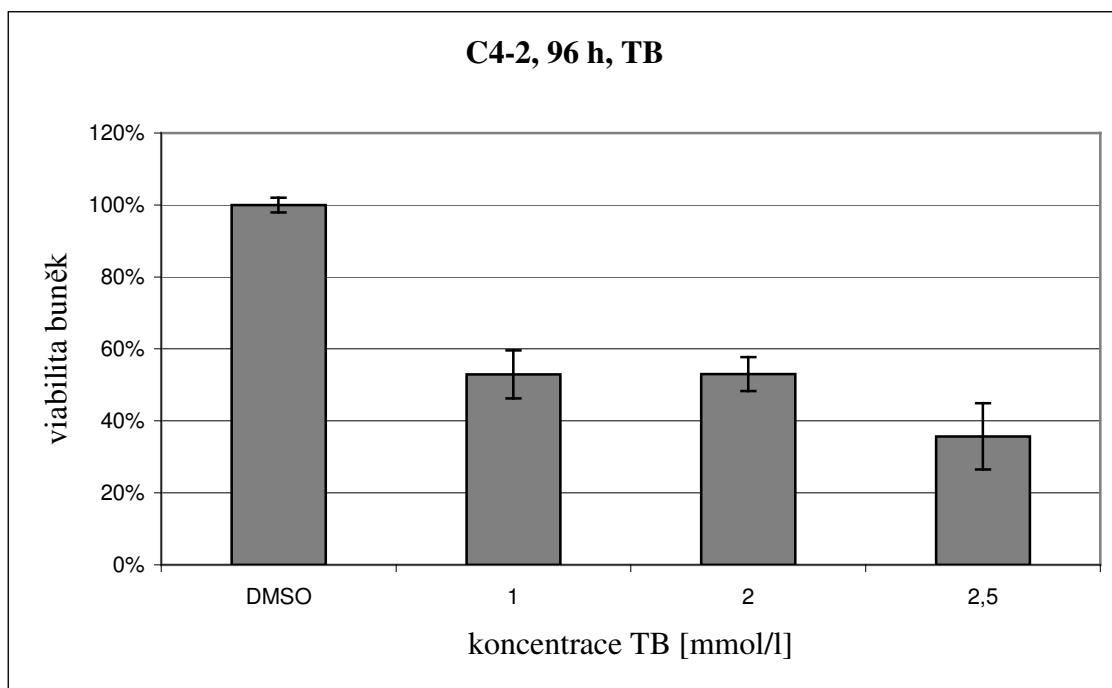
Obr. 2: Viabilita buněk linie C4-2 po 48-hodinovém ovlivnění různými koncentracemi TB



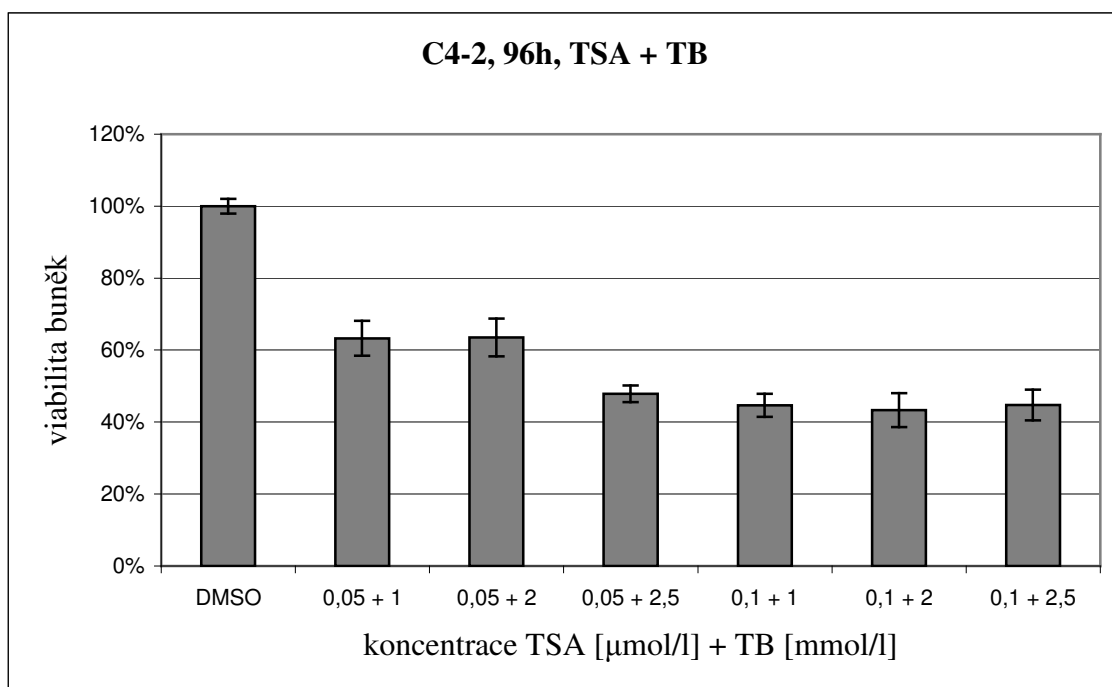
Obr. 3: Viabilita buněk linie C4-2 po 48-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$; 0,1 $\mu\text{mol/l}$; 0,2 $\mu\text{mol/l}$ a 0,5 $\mu\text{mol/l}$) a TB



Obr. 4: Viabilita buněk linie C4-2 po 48-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$ a 0,1 $\mu\text{mol/l}$) a TB



Obr. 5: Viabilita buněk linie C4-2 po 96-hodinovém ovlivnění různými koncentracemi TB



Obr. 6: Viabilita buněk linie C4-2 po 96-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$ a 0,1 $\mu\text{mol/l}$) a TB

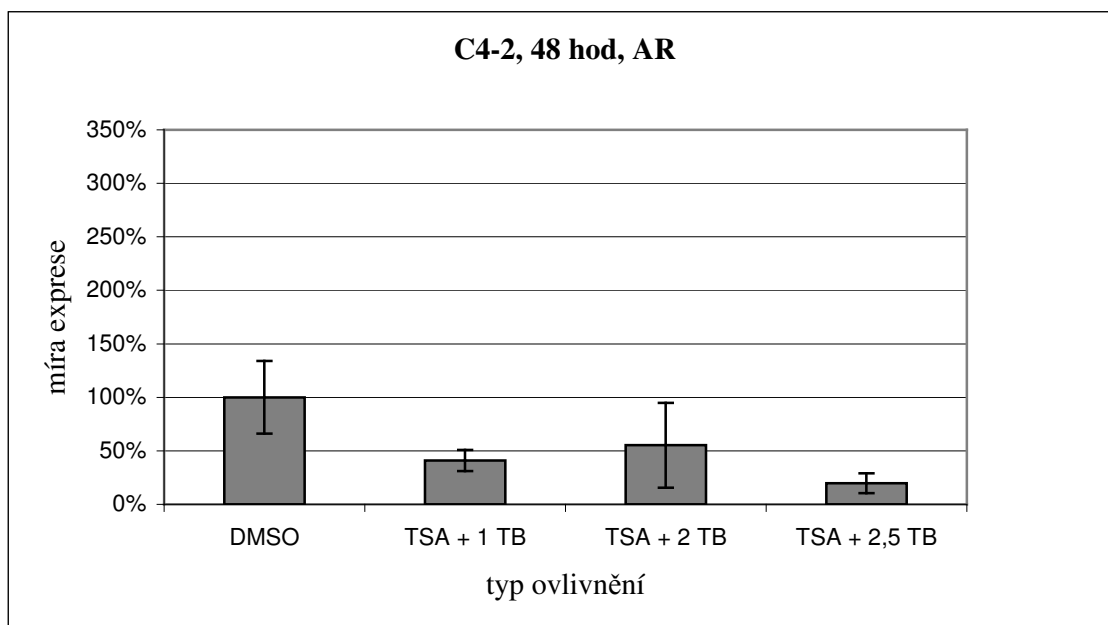
5.2 Real-time PCR analýza

Nádorové buňky linie C4-2 a buňky nenádorové linie RWPE-1 byly ovlivňovány kombinacemi dvou inhibitorů HDACs - TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB (1 mmol/l , 2 mmol/l a 2,5 mmol/l). Kombinacemi těchto inhibitorů HDACs byly buňky inkubovány po dobu 48 a 96 hodin. Z ovlivněných buněk byla izolována RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA a analyzována kvantitativní RT-PCR. Byla sledována exprese genů AR, PSA, SRC-1 a p300. Exprese těchto genů byla stanovena vzhledem k provoznímu (housekeeping) genu GAPDH.

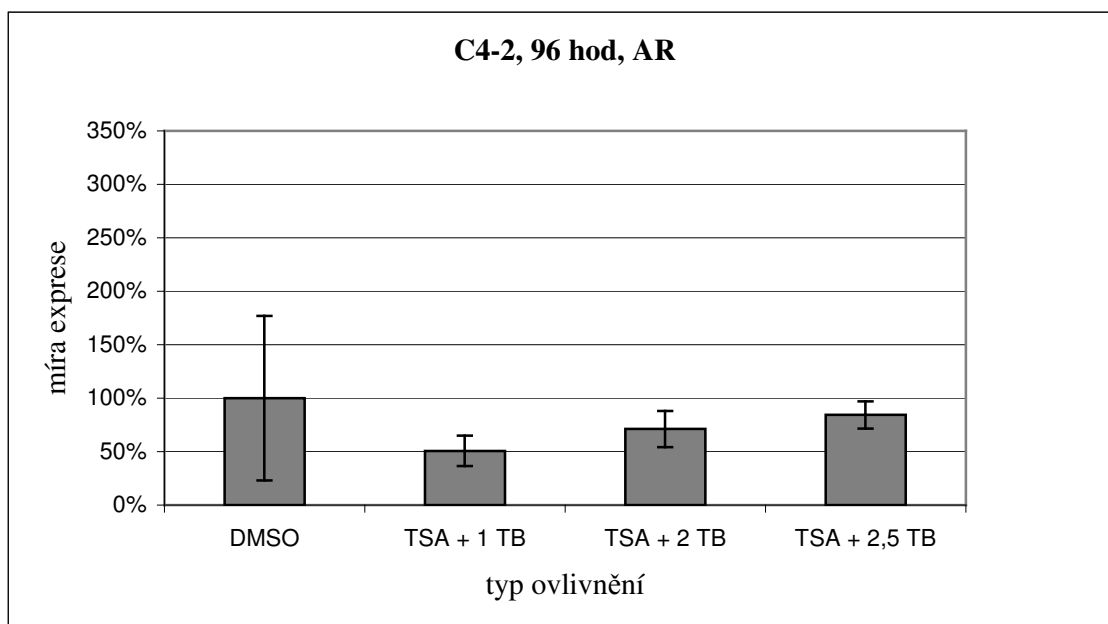
5.2.1 Exprese AR a PSA u buněčné linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

Výsledky kvantitativní RT-PCR genu AR jsou na **Obr. 8** a **Obr. 9**. U nádorové buněčné linie C4-2 byla pozorována snížená exprese AR při porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami (0,1% DMSO). U ovlivnění po dobu 48 hodin kombinací TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB v koncentraci 1 mmol/l byla exprese AR snížena na méně než polovinu oproti kontrolním buňkám. V případě TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) v kombinaci s 2 mmol/l TB došlo k mírnému zvýšení exprese AR vzhledem k předchozímu ovlivnění, dále pak se zvýšenou koncentrací TB (2,5 mmol/l) exprese AR výrazně klesla (**Obr. 8**). Pokud byly buňky s danými inhibitory HDACs inkubovány po dobu 96 hodin, byl u ovlivnění TSA v kombinaci s 1 mmol/l TB pozorován pokles v expresi AR a se zvyšující se koncentrací TB se exprese AR postupně zvyšovala (až na 84 % ve srovnání s kontrolními buňkami) (**Obr. 9**).

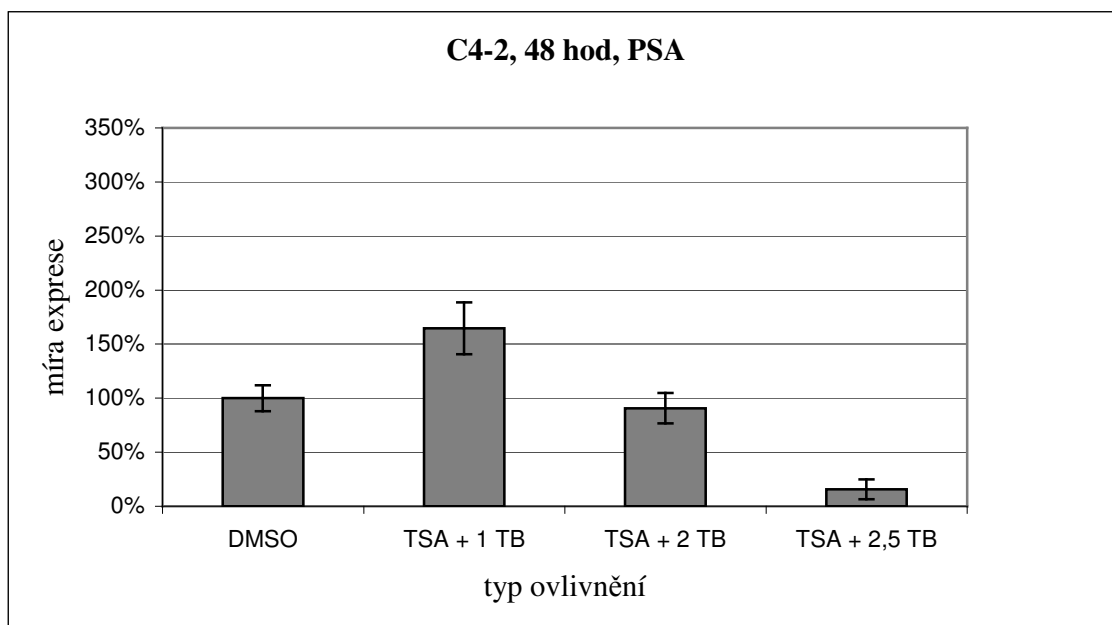
Porovnáním s kontrolními neovlivněnými buňkami byla u ovlivněných nádorových buněk detekována nižší exprese genu PSA. V případě 48-hodinového ovlivnění způsobuje kombinace TSA s 1 mmol/l TB zvýšení exprese PSA vzhledem ke kontrole, dále však se zvyšující se koncentrací TB exprese PSA postupně klesá (**Obr. 10**). Prodloužená 96-hodinová inkubace buněk s kombinací TSA a TB vede k výraznému snížení exprese PSA (**Obr. 11**).



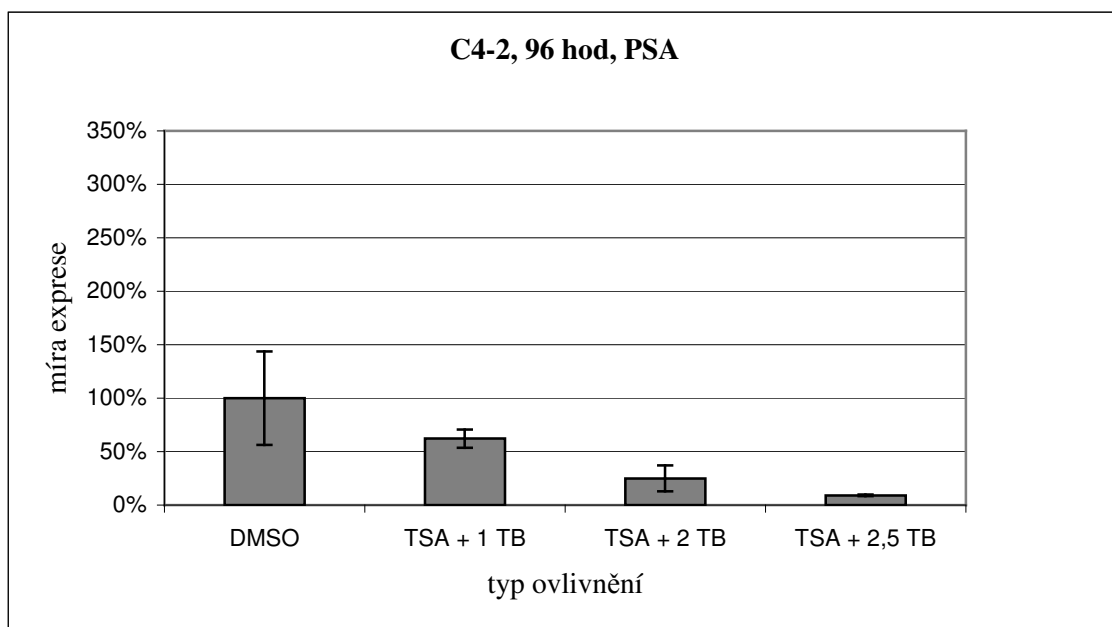
Obr. 8: Expresa AR u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 9: Expresa AR u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



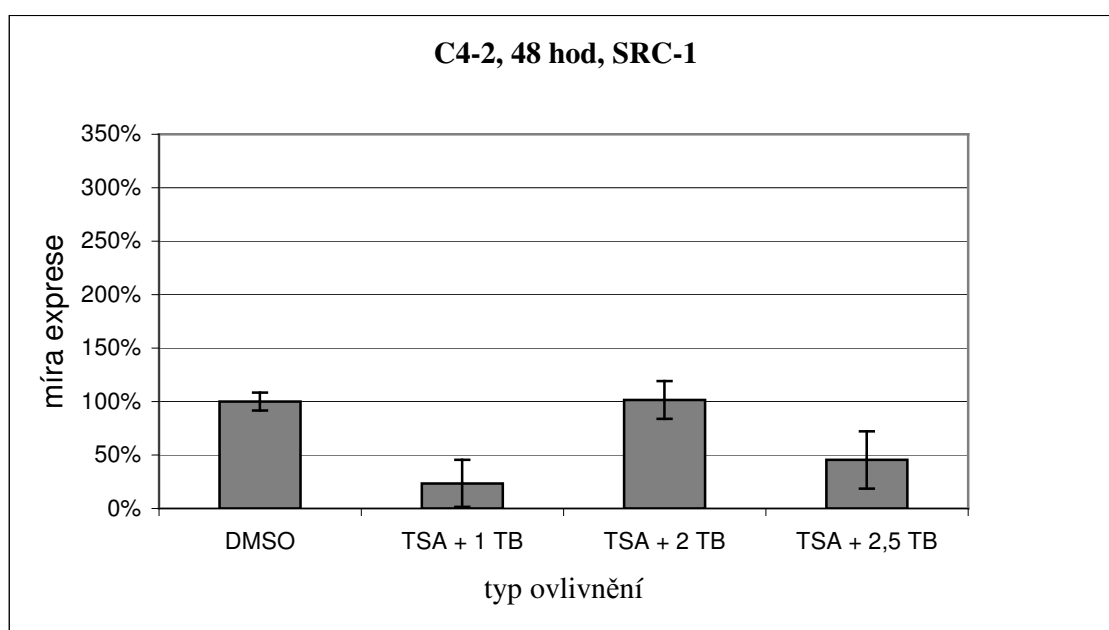
Obr. 10: Expres PSA u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



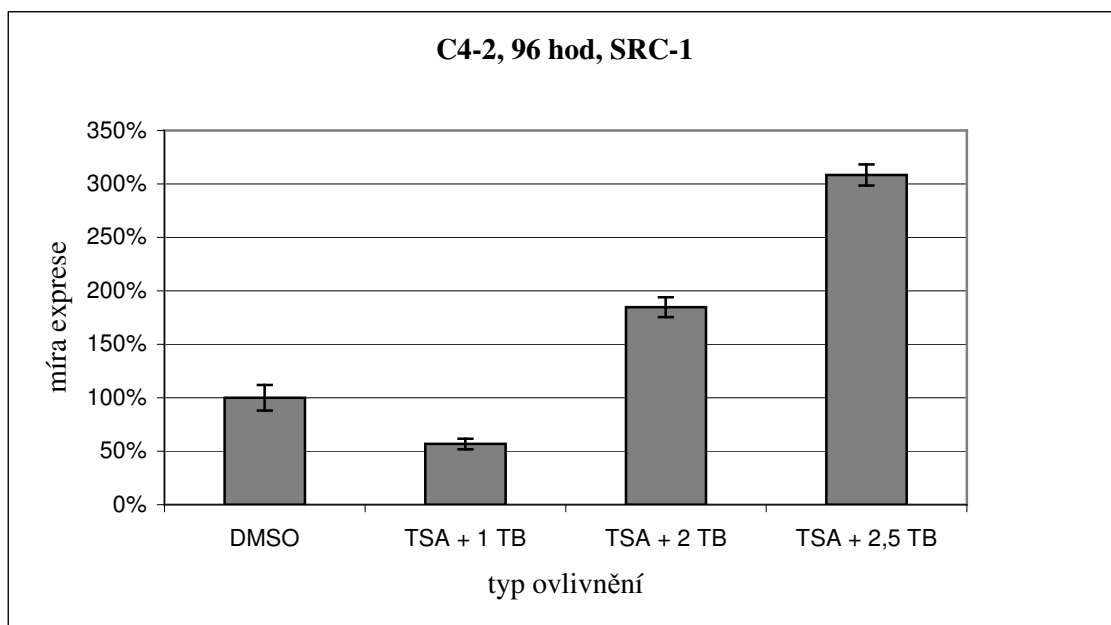
Obr. 11: Expres PSA u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).

5.2.2 Exprese koaktivátorů SRC-1 a p300 u buněčné linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

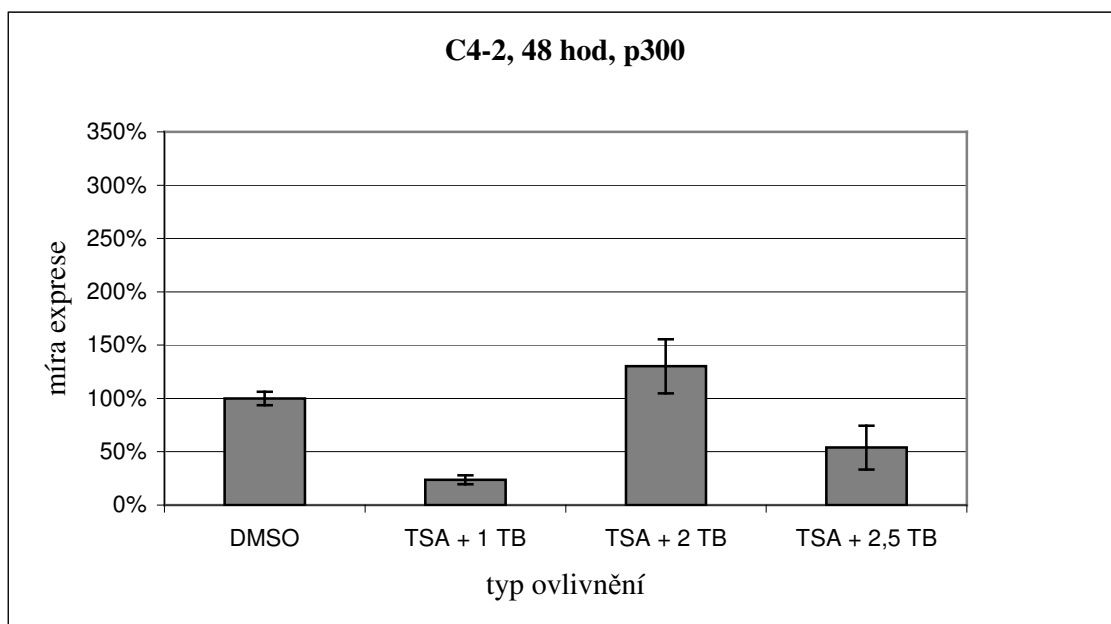
U nádorových buněk C4-2 způsobilo jejich 48-hodinové ovlivnění kombinacemi TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB (1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l) kolísání v expresi genu SRC-1 (**Obr. 12**) a genu p300 (**Obr. 14**). Po 96-hodinové inkubaci však buňky odpovídají zvyšující se expresí SRC-1 (**Obr. 13**) a p300 (**Obr. 15**) v závislosti na zvyšující se koncentraci TB.



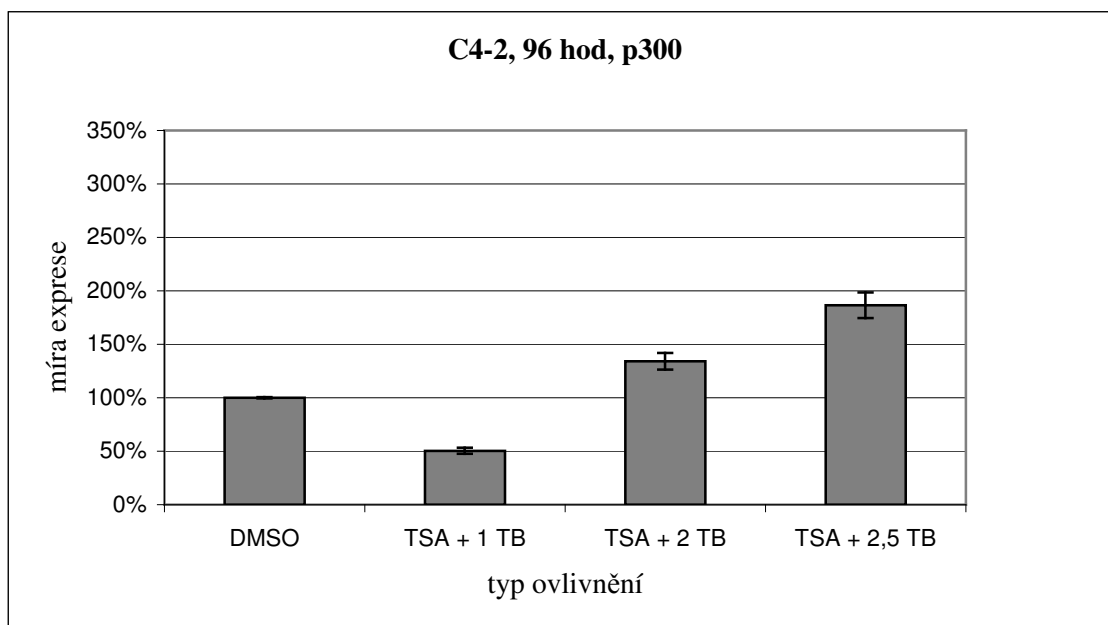
Obr. 12: Exprese SRC-1 u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 13: Expres SRC-1 u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 14: Expres p300 u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 15: Expres p300 u buněk linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).

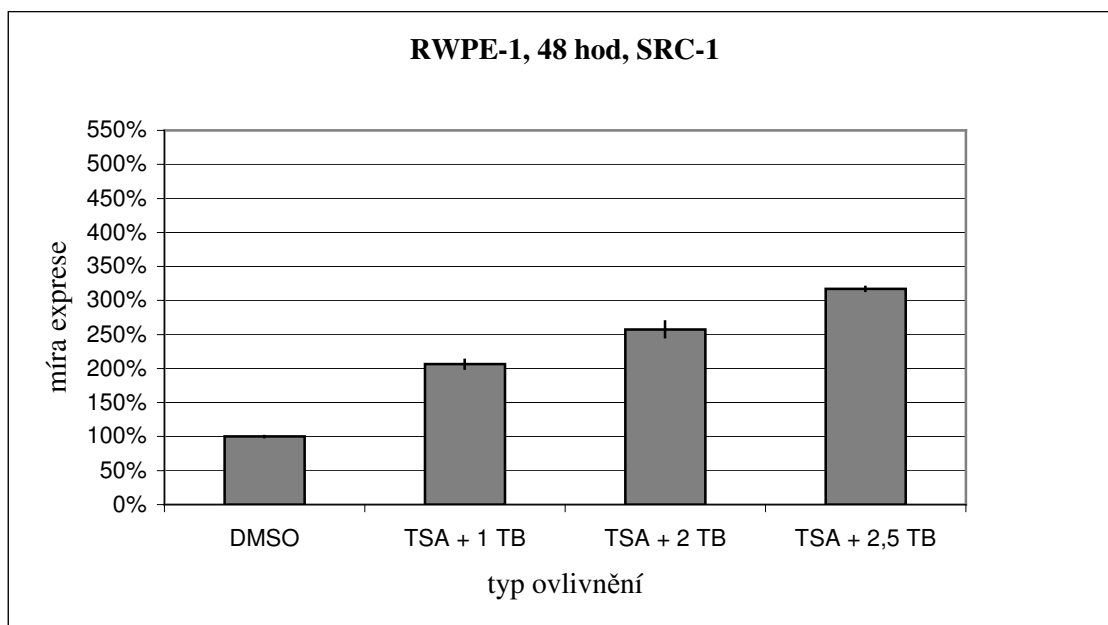
5.2.3 Expres AR a PSA u buněčné linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

U nenádorové buněčné linie RWPE-1 nebyla téměř vůbec pozorována expres AR nebo k amplifikaci docházelo až po 30 cyklu reakce. Expres PSA nebyla u této buněčné linie vůbec pozorována.

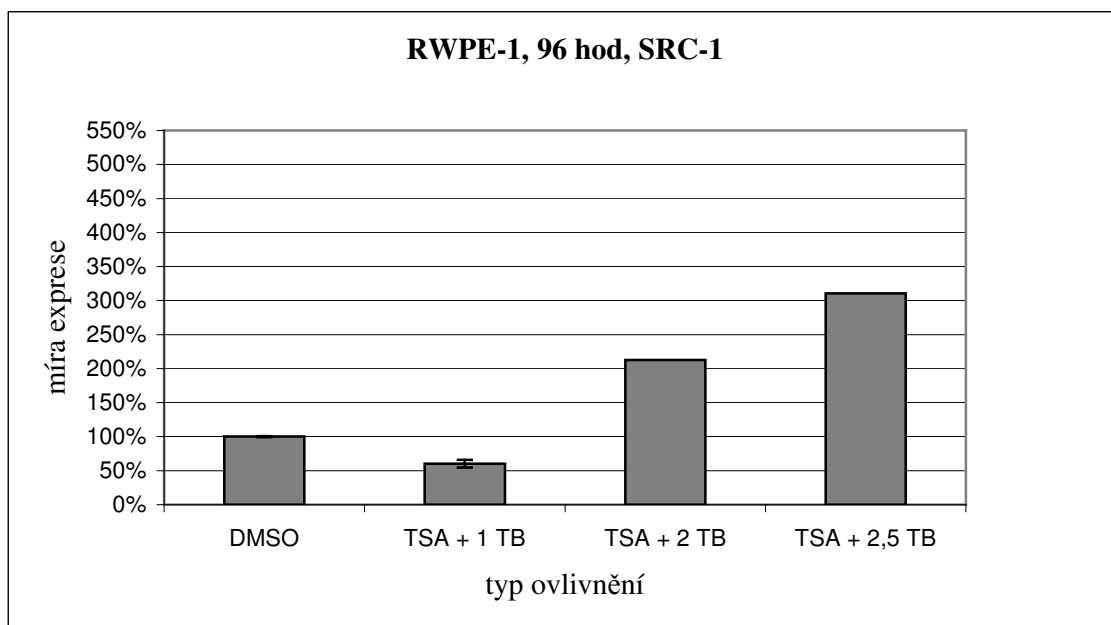
5.2.4 Expres koaktivátorů SRC-1 a p300 u buněčné linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

U nenádorových buněk RWPE-1 mají testované inhibitory HCACs vliv na expresi koaktivátorů SRC-1 a p300. Po 48-hodinové inkubaci s kombinací TSA a TB se expres SRC-1 ve srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami (0,1% DMSO) zvyšuje v závislosti na zvyšující se koncentraci TB (**Obr. 16**). Stejný trend lze pozorovat i u buněk ovlivňovaných po dobu 96 hodin (**Obr. 17**). Koaktivátor p300 je po 48-hodinové inkubaci buněk s kombinací TSA a TB výrazněji exprimován

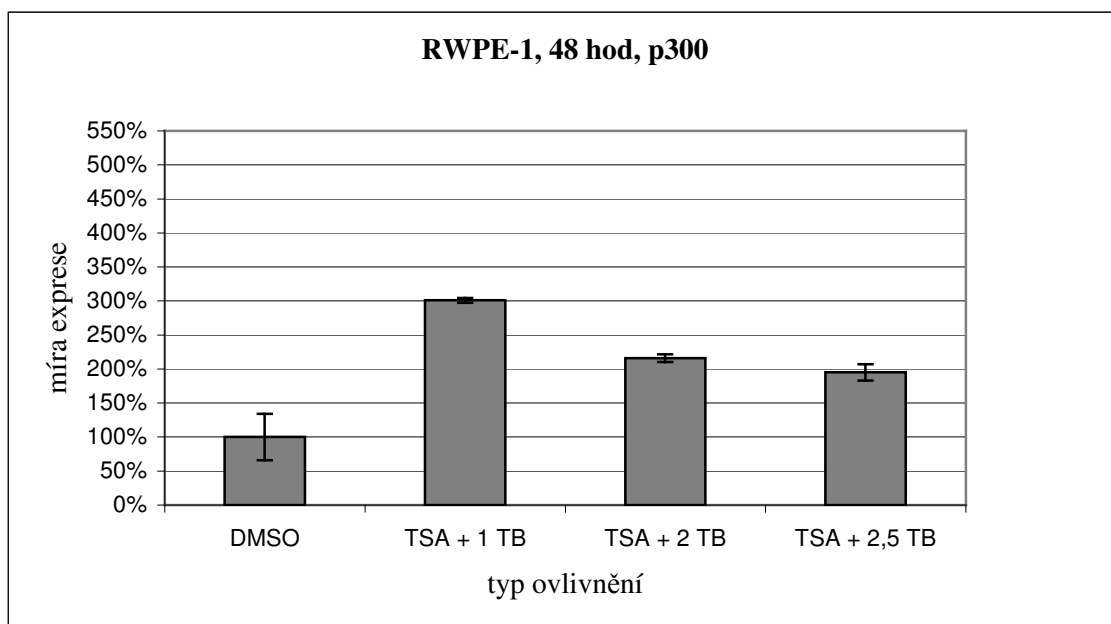
porovnáním s kontrolou u nejnižší koncentrace TB (1 mmol/l) (**Obr. 18**). U buněk ovlivněných na dobu 96 hodin je naopak exprese p300 nejvyšší u kombinace TSA s nejvyšší koncentrací TB (2,5 mmol/l) (**Obr. 19**).



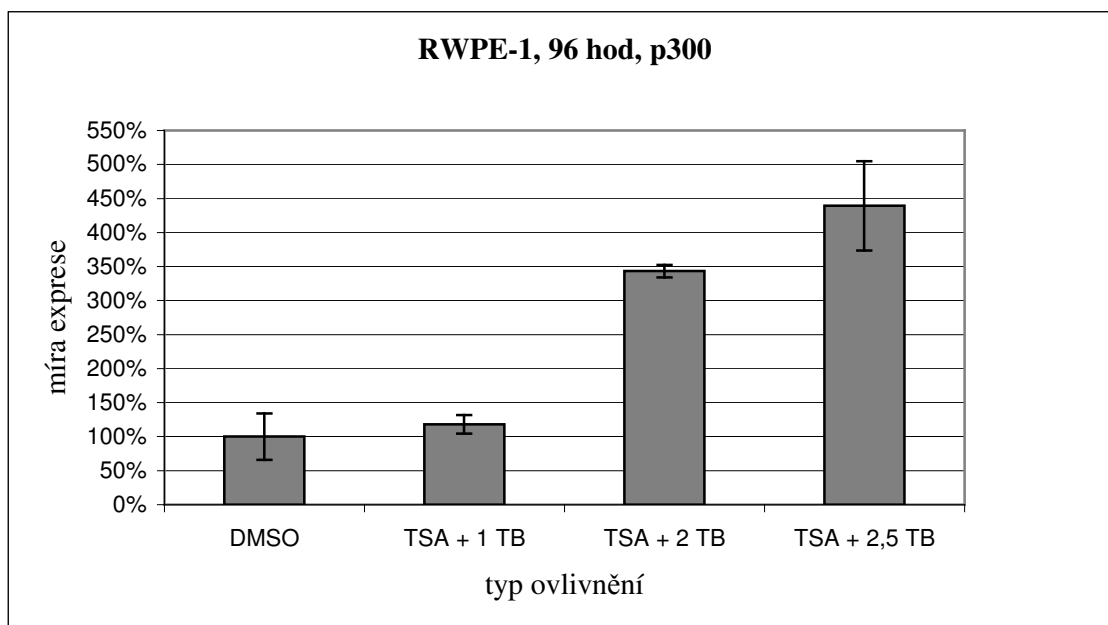
Obr. 16: Exprese SRC-1 u buněk linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 μ mol/l TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 μ mol/l TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 μ mol/l TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 17: Expres SRC-1 u buněk linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 18: Expres p300 u buněk linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 48 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA + 2,5 mmol/l TB).



Obr. 19: Exprese p300 u buněk linie RWPE-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB na 96 hodin (DMSO...kontrola; TSA + 1 TB...0,05 μ mol/l TSA + 1 mmol/l TB; TSA + 2 TB...0,05 μ mol/l TSA + 2 mmol/l TB; TSA + 2,5 TB...0,05 μ mol/l TSA + 2,5 mmol/l TB).

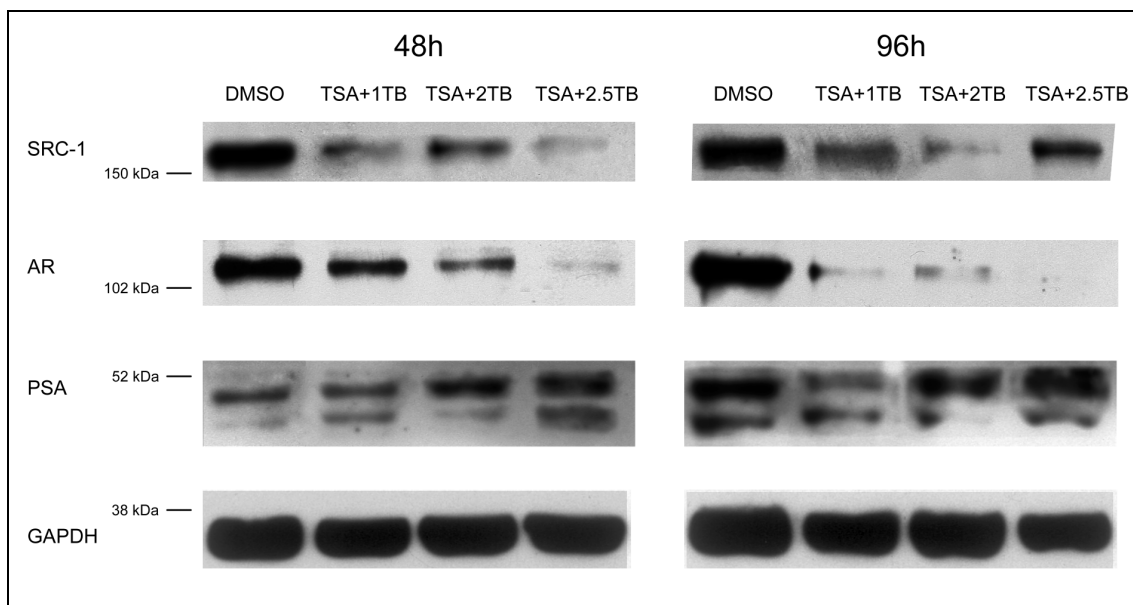
5.3 Western blot analýza

U neovlivněných nádorových buněk linie C4-2 a buněk této linie ovlivněných kombinací inhibitorů HDACs, tributyrinu a trichostatinu A, byla provedena lyze buněk pro získání celkového obsahu proteinů a získání jednotlivých proteinových frakcí (kapitola 4.7.2), které byly podrobeny western blot analýze. Exprese genů AR, PSA, SRC-1 a GAPDH byly detekovány pomocí příslušných primárních a sekundárních protilátek.

5.3.1 Exprese AR a PSA po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

Exprese AR byla detekována v cytosolické proteinové frakci. U 48-hodinového ovlivnění je patrná snížená exprese AR ve srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami, přičemž se zvyšujícími se koncentracemi kombinace TB a TSA dochází k poklesu exprese AR. Výrazný pokles v expresi AR byl pozorován také u 96-hodinové inkubace. V případě kombinace 0,05 μ mol/l TSA a nejvyšší 2,5 mmol/l koncentrace TB

nebyla exprese AR zaznamenána (**Obr. 20**). Po 48 a 96 hodinách byla exprese PSA vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám zvýšena u buněk ovlivněných kombinacemi 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA s 2 mmol/l a 2,5 mmol/l koncentracemi TB (**Obr. 20**).



Obr. 20: Expres SRC-1, AR, PSA a GAPDH v cytosolické proteinové frakci buněčné linie C4-2 po ovlivnění kombinacemi TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB (1 mmol/l, 2 mmol/l a 2,5 mmol/l) po dobu 48 a 96 hodin.

5.3.2 Expres koaktivátoru SRC-1 po ovlivnění kombinacemi TSA a TB

Expres koaktivátoru SRC-1 byla detekována v cytosolické proteinové frakci. Buňky nádorové linie C4-2 vykazovaly po 48-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA a TB pokles v expresi SRC-1 ve srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami (**Obr. 20**). Mezi buňkami ovlivněnými po dobu 48 hodin byla exprese SRC-1 nejvyšší u kombinace TSA (0,05 $\mu\text{mol/l}$) s 2 mmol/l TB. U ovlivnění na dobu 96 hodin byla také exprese SRC-1 snížena vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám, přičemž největší pokles byl zaznamenán u kombinace TSA s 2 mmol/l TB (**Obr. 20**).

6 DISKUZE

Inhibitory histonových deacetyláz představují potenciální léky pro terapii nádorových onemocnění (Kuefer *et al.*, 2004). V této práci byl sledován vliv kombinace dvou inhibitorů HDACs, tributyrinu a trichostatinu A, na expresi koregulačního proteinu SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), který je koaktivátorem androgenového receptoru a přispívá ke zvýšení transkripce cílových genů AR (Powell *et al.*, 2004). Kromě SRC-1 byla sledována také exprese AR, PSA a koaktivátoru p300. Dvě prostatické buněčné linie, nádorová linie nezávislá na androgenech, která exprimuje AR (C4-2), a nenádorová buněčná linie (RWPE-1), byly ovlivňovány třemi různými kombinacemi TSA a TB.

Pro ovlivňování buněk byly koncentrace TSA a TB zvoleny na základě MTT testu. Byla vybrána koncentrace 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA v kombinaci se třemi různými koncentracemi TB (1 mmol/l , 2 mmol/l a 2,5 mmol/l). U těchto koncentrací obou inhibitorů HDACs byla buněčná viabilita nižší vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám (0,1% DMSO), nedošlo však k tak výraznému snížení buněčné viability jako u jiných testovaných koncentrací. Pokud byl TB použit v kombinaci s vyššími koncentracemi TSA (0,5 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$), byla viabilita buněk velmi nízká a tyto koncentrace nebyly následně zvoleny s ohledem na možnou toxicitu pro nenádorové prostatické buňky linie RWPE-1 (Přílohy 1, 2 a 3).

Na základě výsledků kvantitativní RT-PCR bylo zjištěno, že po ovlivnění kombinacemi TSA a TB dochází u nádorové buněčné linie C4-2 ke snížení exprese androgenového receptoru. Tento pokles je zřetelný při ovlivněních po dobu 48 i 96 hodin (**Obr. 8** a **Obr. 9**). Při 96-hodinové inkubaci se exprese genu AR s rostoucí koncentrací TB postupně zvyšovala, stále však byla nižší než u kontrolních neovlivněných nádorových buněk. Tento výsledek je v kontrastu se snížením exprese genu PSA. Při použití kombinace s nejnižší koncentrací tributyrinu (0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 1 mmol/l TB) došlo u 48-hodinového ovlivnění nejprve ke zvýšení exprese PSA, tato však se zvyšující se koncentrací TB (2 mmol/l a 2,5 mmol/l) postupně klesala (**Obr. 10**). Velmi výrazný pokles byl pozorován u 96-hodinové inkubace (**Obr. 11**). Pokud dochází u 96-hodinového ovlivnění nádorových prostatických buněk kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2,5 mmol/l TB (**Obr. 9**) ke zvýšení exprese AR na 80 – 90 % porovnáním s kontrolními neovlivněnými buňkami (100 %), kterému na druhé straně odpovídá velmi výrazný pokles exprese PSA (do 25 %) (**Obr. 11**), lze předpokládat, že tato

kombinace TSA a TB by mohla u na androgenech-nezávislých prostatických nádorových buněk podmínit jejich regulační schopnost projevující se snížením exprese PSA jako jednoho z cílových genů androgenového receptoru. S tím souvisí zjištění, že u nenádorové linie RWPE-1 nebyla po ovlivnění TSA v kombinaci s TB zaznamenána exprese AR ani PSA (Příloha 4).

U ovlivněných nádorových buněk C4-2 byla v cytosolické proteinové frakci zjištěna snížená až takřka nedetekovatelná exprese androgenového receptoru při 96-hodinovém ovlivnění buněk kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2,5 mmol/l TB. Snižující se úroveň hladiny cytoplazmatického AR v závislosti na zvyšující se koncentraci TB v kombinaci s TSA (**Obr. 20**) neodpovídá snížené expresi AR (porovnávanou s expresí AR u neovlivněných buněk) na post-transkripční úrovni detekované RT-PCR. U 96-hodinového ovlivnění buněk kombinací TSA a 2,5 mmol/l TB je úroveň transkripce AR dokonce vyšší než u ovlivnění kombinacemi s nižšími koncentracemi TB (1 mmol/l a 2 mmol/l) (**Obr. 9**). Tato velmi vysoká 80 – 90% úroveň exprese AR tak neodpovídá jen obtížně detekovatelnému AR z cytosolické proteinové frakce po 96-hodinovém ovlivnění buněk výše uvedenou kombinací TSA a TB. Transkripční úroveň PSA po 96-hodinové inkubaci se u všech tří ovlivnění kombinacemi TSA a TB snižuje v závislosti na zvyšující se koncentraci TB (1 mmol/l , 2 mmol/l a 2,5 mmol/l) (**Obr. 11**). Protikladem je také zvýšená exprese PSA detekovaná na proteinové úrovni z cytosolické frakce buněk po jejich 48- i 96-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA a TB o koncentracích 2 mmol/l a 2,5 mmol/l porovnávaná s detekcí po ovlivnění kombinací TSA a 1 mmol/l TB (**Obr. 20**). Lze tedy konstatovat, že úroveň transkripce AR a PSA se neshoduje s úrovní exprese těchto dvou genů v cytosolické proteinové frakci prostatických nádorových buněk ovlivňovaných kombinacemi dvou inhibitorů HDACs, TSA a TB. Jedním z možných vysvětlení by mohlo být, že vliv obou inhibitorů na AR a následně na jeden z jeho cílových genů – PSA, posuzovaný v jednom okamžiku na dvou různých úrovních – post-transkripční a post-translační, nám logicky přináší dvojí výsledek v časovém posunu.

Tributyryn v kombinaci s trichostatinem A má vliv na expresi koaktivátorů SRC-1 a p300 jak u nádorových, tak u nenádorových buněk. Existují dva hlavní mechanismy, kterými koaktivátory ovlivňují funkční aktivitu jaderných steroidních receptorů (Culig *et al.*, 2004). Koaktivátor p300 a jeho funkční homolog CBP jsou koaktivátory I. třídy, které zprostředkovávají přenos transkripčních signálů k jaderným receptorům. Naproti tomu členové proteinové rodiny p160, ke které patří koaktivátor

SRC-1, mohou prostřednictvím acetyltransferáz modifikovat chromatinovou strukturu (Heinlein *et* Chang, 2002). Koaktivátor p300 se váže k hormonu-regulovaným elementům prostřednictvím jeho vazby s některým z proteinů p160 a tato aktivace koaktivátorů má za následek zvýšení úrovně histonových acetylací v promotorových oblastech cílových genů (Dilworth *et* Chambon, 2001). V této práci bylo pozorováno, že po 96-hodinové inkubaci buněk linie C4-2 se dvěma inhibitory histonových deacetyláz (TSA a TB) dochází se zvyšující se koncentrací TB k postupnému zvyšování exprese obou koaktivátorů (**Obr. 13** a **Obr. 15**). Rovněž buňky linie RWPE-1 vykazovaly po ovlivnění TSA a TB zvýšení exprese genu SRC-1 (**Obr. 17**) a genu p300 (**Obr. 19**). Tyto výsledky by tak mohly navazovat na výše uvedené literární údaje s tím, že použité inhibitory histonových deacetyláz – TSA a TB mohou svým re-acetylačním účinkem zvyšovat úroveň acetylace histonů. Pokud byla detekována zvýšená exprese obou koaktivátorů u nádorových buněk C4-2 i nenádorových buněk RWPE-1, je možné předpokládat, že také interakce koaktivátorů SRC-1 a p300 může podmínit acetylaci histonů v regulační oblasti androgenového receptoru a přispět tak společně s re-acetylačním účinkem obou inhibitorů HDACs k modulaci exprese AR (**Obr. 8** a **Obr. 9**), která se následně projevuje snížením exprese PSA (**Obr. 10** a **Obr. 11**).

7 ZÁVĚR

V experimentální části této práci byl sledován vliv kombinace dvou inhibitorů HDACs – TSA a TB na expresi koaktivátorů SRC-1 a p300, androgenového receptoru a PSA. Buňky prostatické nádorové buněčné linie C4-2 a nenádorové buněčné linie RWPE-1 byly ovlivňovány kombinacemi trichostatinu A (0,05 $\mu\text{mol/l}$) a tributyrinu (1 mmol/l , 2 mmol/l a 2,5 mmol/l). Kombinace s výše uvedenými koncentracemi obou inhibitorů HDACs byly zvoleny na základě MTT testů prováděných u obou testovaných buněčných linií.

Bylo zjištěno, že na úrovni RNA dochází po ovlivnění kombinacemi TSA a TB u nádorových buněk (C4-2) ke změnám v expresi androgenového receptoru i jeho cílového genu PSA. U inkubace po dobu 96 hodin byla detekována zvyšující se exprese AR doprovázená klesající expresí PSA. U nenádorových buněk (RWPE-1) nebyla exprese AR ani PSA detekována. Lze tedy předpokládat, že tato koncentrace TB (2,5 mmol/l) použitého v kombinaci s TSA (0,05 $\mu\text{mol/ TSA}$) by mohla mít modulující účinek na expresi androgenového receptoru, který je exprimován u těchto na androgenech-nezávislých prostatických nádorových buněk. Dalším závěrem je zjištění, že třebaže byla na RNA úrovni detekována u ovlivněných nádorových buněk snižující se úroveň exprese genu PSA, na proteinové úrovni nebyl tento výsledek potvrzen a exprese genu PSA byla stejná nebo i vyšší při porovnání s neovlivněnými nádorovými buňkami.

Kombinace inhibitorů HDACs, TSA a TB, má vliv na expresi koaktivátorů AR u nádorových i nenádorových prostatických buněk. U buněk C4-2 dochází po ovlivnění uvedenými inhibitory HDACs ke zvýšení exprese koaktivátorů SRC-1 a p300 v závislosti na zvyšující se koncentraci TB. Nenádorové buňky odpovídají na inkubaci s kombinacemi TSA a TB rovněž zvýšením exprese obou koaktivátorů SRC-1 a p300. Na úrovni RNA i proteinu byl růst exprese SRC-1 mezi ovlivněnými buňkami nejvýraznější u 48-hodinové inkubace při použití TSA v kombinaci s 2 mmol/l TB , u 96-hodinového ovlivnění v případě nejvyšší použité koncentrace TB (2,5 mmol/l) byla exprese SRC-1 podobně jako p300 nejvyšší. Zvýšená exprese obou koaktivátorů by mohla být v přímé souvislosti s jejich potenciálním kumulativním pleiotrofním účinkem projevujícím se změnami v expresi androgenového receptoru. Pro terapii nádorů prostaty je použití kombinace těchto dvou inhibitorů HDACs – TSA a TB nadějně zejména důsledkem jejich aplikace projevující se na úrovni RNA snižující se

úrovní exprese PSA v závislosti na použitých koncentracích obou inhibitorů HDACs a čase inkubace.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Agoulnik, I.U., Vaid, A., Bingmann III, W.E., Erdeme, H., Frolov, A., Smith, C.L., Ayala, G., Ittmann, M.M., Weigel, N.L. (2005): Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Research* 65 (17): 7959 – 7967

Agoulnik, I.U., Weigel, N.L. (2009): Coactivator selective regulation of androgen receptor activity. *Steroids* 74: 669 – 674

Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J. (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* 21: 389 – 395

Bevan, C.J., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D.M., Parker, M.G. (1999): The AF1 and AF2 domains of androgen receptor interact with distinct regions of SRC-1. *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8383 – 8392

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

Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936 – 942

Chen, J., Ghazawi, F.M., Bakkar, W., Li, Q. (2006): Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Molecular Cancer* 5: 71

Clarke, K.O., Feinman, R., Harrison, L.E. (2001): Tributyrin, an oral butyrate analog, induces apoptosis through the activation of caspase-3. *Cancer Letters* 171: 57 – 65

Conley, B.A., Egorin, M.J., Tait, N., Rosen, D.M., Sausville, E.A., Dover, G., Fram, R.J., Van Echo, D.A. (1998): Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors, *Clinical Cancer Research* 4: 629 – 634

Culig, Z., Comuzzi, B., Steiner, H., Bartsch, G., Hobisch, A. (2004): Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 92: 265 – 271

Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., Klocker, H. (1994): Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research* 54: 5474 - 5478

Dehm., S.M., Tindall, D.J. (2006): Molecular regulation of androgen receptor. *Journal of Cellular Biochemistry* 99: 333 – 344

Dilworth, F.J., Chambon, P. (2001): Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodelling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20: 3047 – 3054

Estébanez-Perpiñá, E., Moore, J.M.R., Mar, E., Delgado-Rodrigues, E., Nguyen, P., Baxter, J.D., Buehrer, B.M., Webb, P., Fletterick, R.J., Guy, R.K. (2005): The molecular mechanism of coactivator utilization in ligand-dependent transactivation by the androgen receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 8060 – 8068

Gelmann, E.P. (2002): Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology* 20 (13): 3001 – 3015

Heinlein, C.A., Chang, C. (2004): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews* 25 (2): 276 – 308

Higuchi, M., Kudo, T., Suzuki, S., Evans, T.T., Sasaki, R., Wada, Y., Shirakawa, T., Sawyer, J.R., Gotoh, A. (2006): Mitochondrial DNA determines androgen dependence in prostate cancer cell lines. *Oncogene* 25: 1437-1445

Hur, E., Pfaff, S.J., Payne, E.S., Grøn, H., Buehrer, B.M., Fletterick, R.J. (2004): Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biology* 2 (9): e274

Jerónimo, C., Bastian, P.J., Bjartell, A., Carbone, G. M., Catto, J.W.F., Clark, S.J., Henrique, R., Nelson, W.G., Shariat, S.F. (2011): Epigenetics in prostate cancer: Biological and clinical relevance. *European Urology* 60: 753 – 766

Kuefer, R., Hofer, M.D., Altug, V., Zorn, C., Genze, F., Kunzi-Rapp, K., Hautmann, R.E., Gschwend J.E. (2004): Sodium butyrate and tributyrin induce *in vivo* growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *British Journal of Cancer* 90: 535 – 541

Lavery, D.N., Bevan, C.L. (2011): Androgen receptor signalling in prostate cancer: The functional consequences of acetylation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, Article ID 862125, 7 pages

Lin, D-L., Whitney, M.C., Yao, Z., Keller, E.T. (2001): Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clinical Cancer Research* 7: 1773 – 1778

Maier, S., Reich, E., Martin, R., Bachem, M., Altug, V., Hautmann, R.E., Gschwend, J.E. (2000): Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *International Journal of Cancer* 88: 245 – 251

Powell, S.M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F., Bevan, C.L. (2004): Mechanism of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 11: 117 – 130

Richter, E., Sristava S., Dobi, A. (2007): Androgen and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 10: 114 – 118

Rokhlin, O.W., Glover R.B., Guseva, N.V., Taghiyev, A.F., Kohlgraf, K.G., Cohen, M.B. (2006): Mechanism of cell death induced by histone deacetylase inhibitors in androgen receptor-positive prostate cancer cells. *Molecular Cancer Research* 4 (2): 113 – 123

Toscani A., Soprado D.R., Soprano K.J. (1988): Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogene Research* 3 (3): 223 – 238

Trtková, K., Bouchal, J., Kolář, Z. (2006): Histone acetylation and methylation in the signaling of steroid hormone receptors. *Cellular and Molecular Biology* 53: 928 – 940

Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C. (2001): Trihostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*. *Clinical Cancer Research* 7: 971 – 976

Wächterhäuser, A., Stein, J. (2001): Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells occurs independently from p27. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 295 – 299

Wang, L., Hsu, C.-L., Chány, C. (2005): Androgen receptor corepressors: an overview. *The Prostate* 63: 117 – 130

Xu, J., Wu, R.-C., O'Malley, B.W. (2009): Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor coactivator (SRC) family. *Nature Reviews Cancer* 9: 615 – 630

Yan, J., Xu, Y.-H. (2003): Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. *World Journal of Gastroenterology* 9 (4): 660 – 664

Yoon, H-G., Wong, J. (2006): The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist- and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Molecular Endocrinology* 20 (5): 1048 – 1060

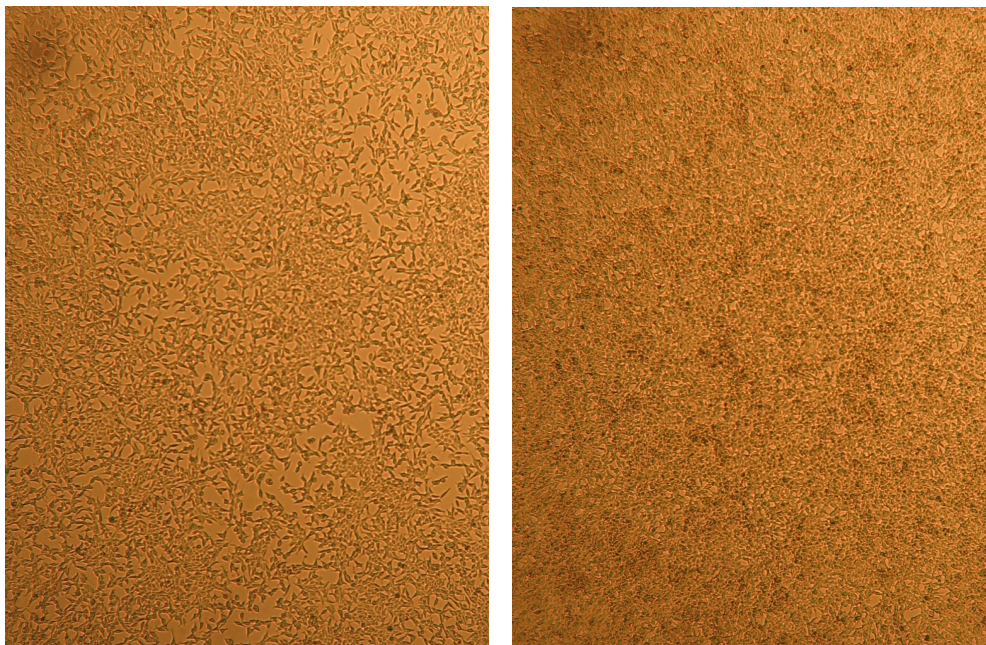
Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. (1990): Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. The Journal of Biological Chemistry 256 (28): 17174 – 17179

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

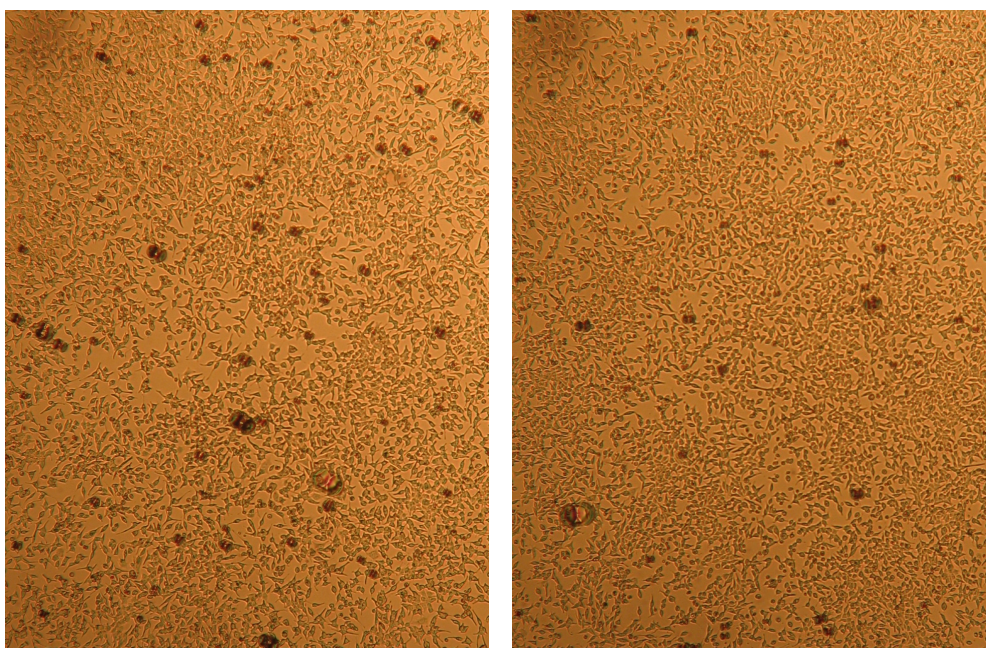
AF-1	transkripční aktivační funkční doména 1 (activation function-1)
AF-2	transkripční aktivační funkční doména 2 (activation function-2)
APS	persulfát amonný
AR	androgenový receptor
AREs	androgen response elements
CaP	nádor prostaty (prostate cancer)
CBP	cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein
DBD	DNA-vazebná doména (DNA-binding domain)
DHT	dihydrotestosteron
DMSO	dimetylsulfoxid
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HAT	histon acetyltransferáza (histone acetyltransferase)
HDAC	histon deacetyláza (histone deacetylase)
HDAC3	histon deacetyláza 3 (histone deacetylase 3)
HSPs	proteiny tepelného šoku (heat shock proteins)
LBD	ligand-vazebná doména (ligand-binding domain)
NaB	butyrát sodný (sodium butyrate)
N-CoR	nuclear receptor corepressor
NLS	jaderná lokalizační sekvence (nuclear localization signal)
NTD	N-terminální doména (N-terminal domain)
pCAF	p300/CBP associate factor
PSA	prostatický specifický antigen (prostate specific antigen)
SDS	laurylsulfát sodný
SMRT	the silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SRC-1	steroid receptor coactivator-1
SRC-2	steroid receptor coactivator-2
SRC-3	steroid receptor coactivator-3
SRCs	proteiny skupiny SRC
TB	tributylin
TEMED	tetrametylendiamin
Tip60	Tat interactive protein, 60 kDa
TSA	trichostatin A

10 PŘÍLOHY

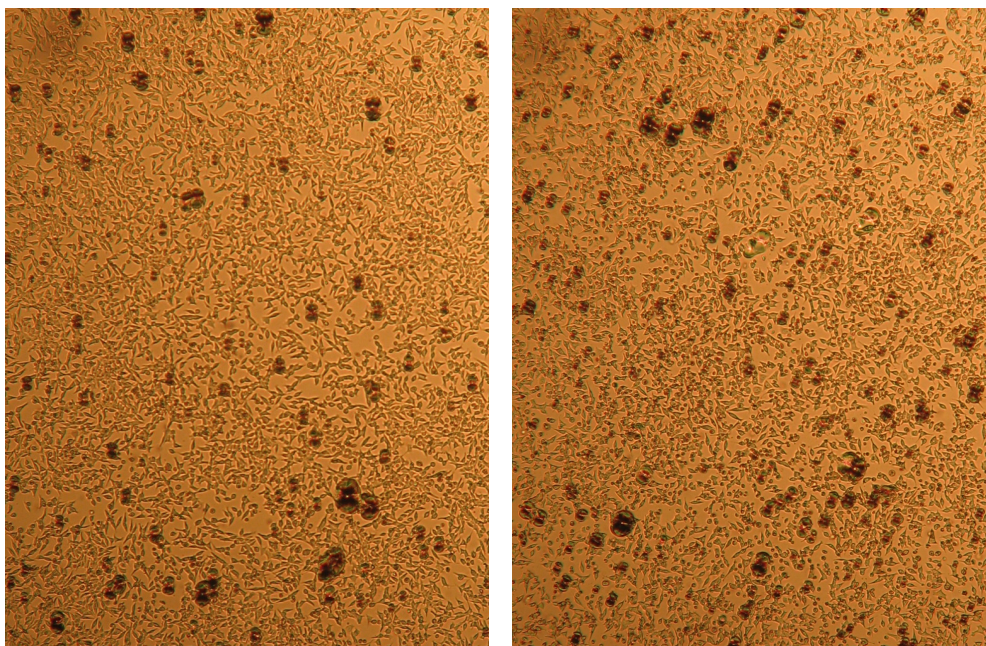
Příloha 1: Fotografie buněk prostatických buněčných linií C4-2 (nádorová) a RWPE-1 (nenádorová) ovlivňovaných kombinacemi TSA a TB



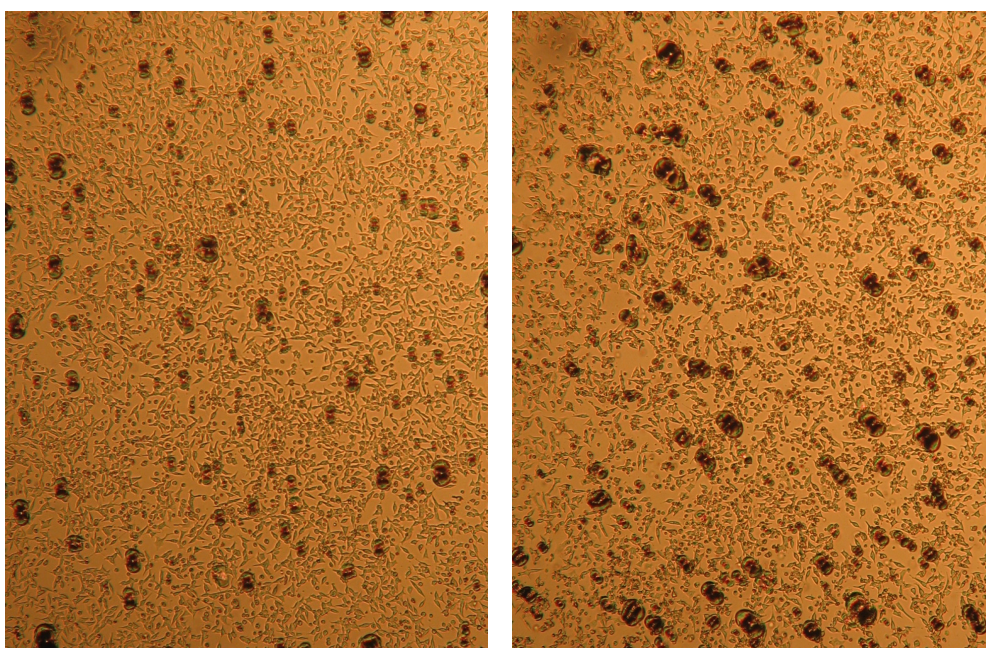
Buňky linie C4-2 inkubované s 0,1% DMSO po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)



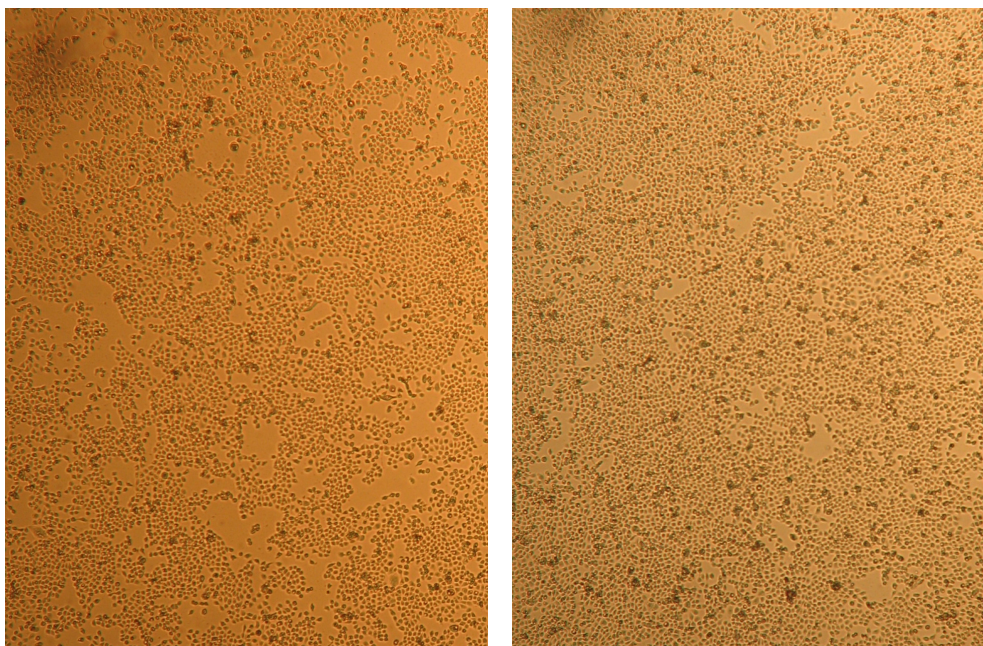
Buňky linie C4-2 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 1 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)



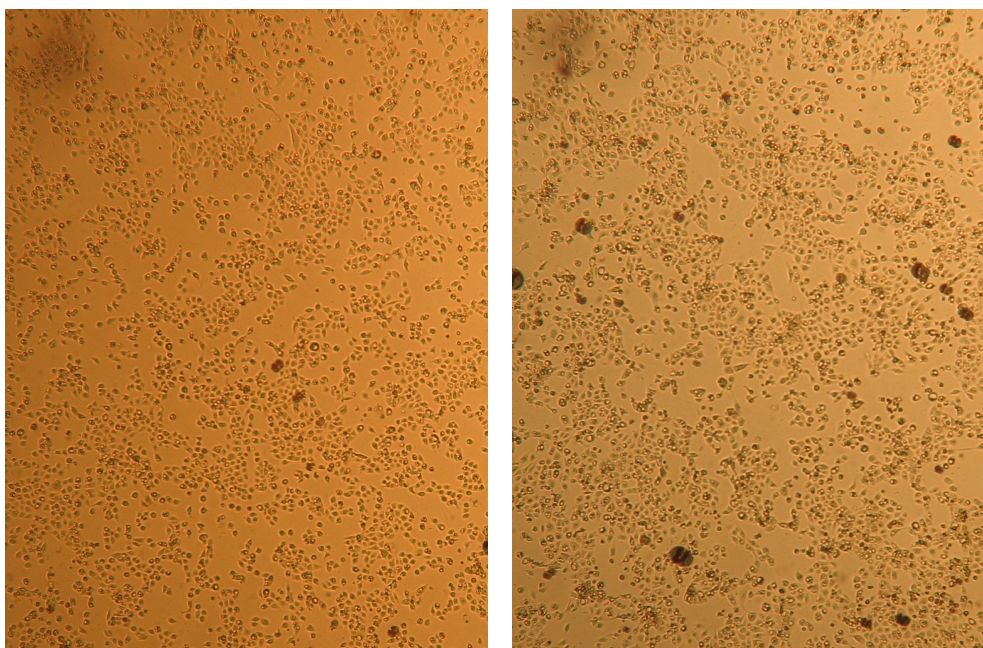
Buňky linie C4-2 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)



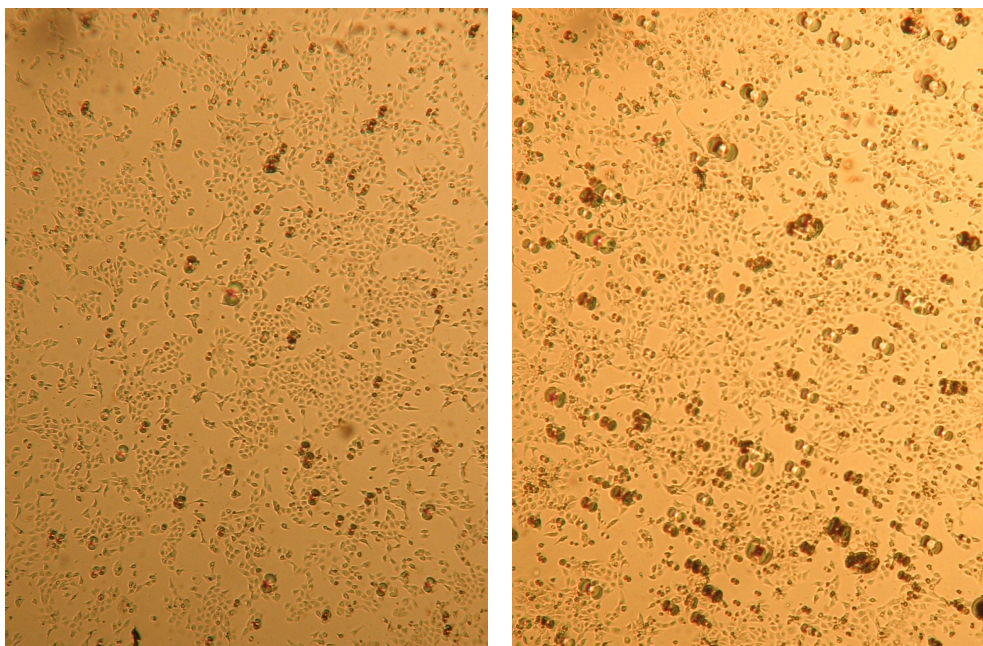
Buňky linie C4-2 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2,5 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)



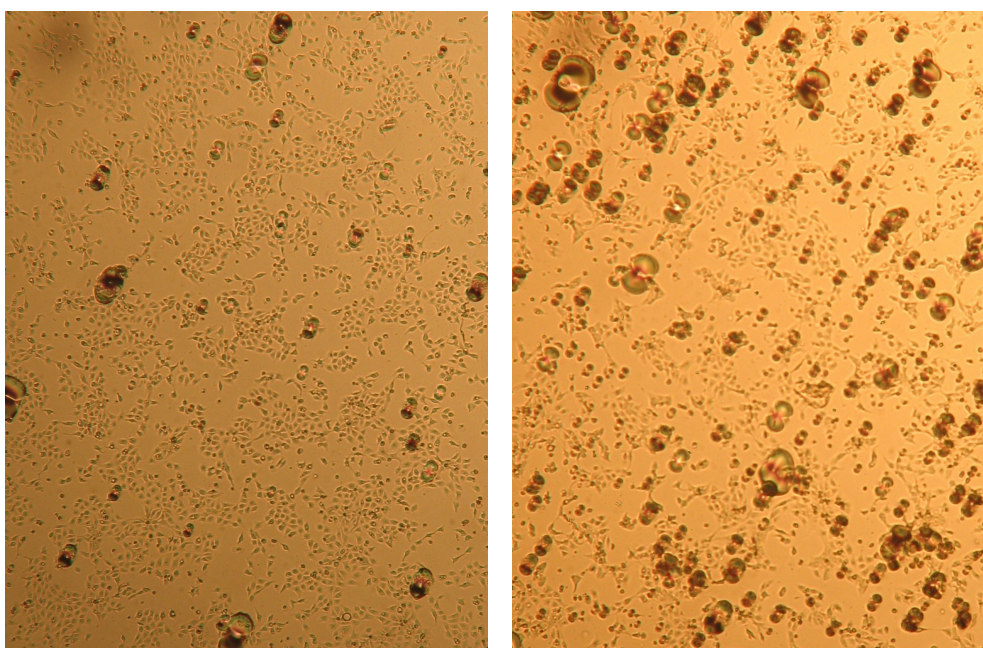
Buňky linie RWPE-1 inkubované s 0,1% DMSO po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)



Buňky linie RWPE-1 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 1 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)

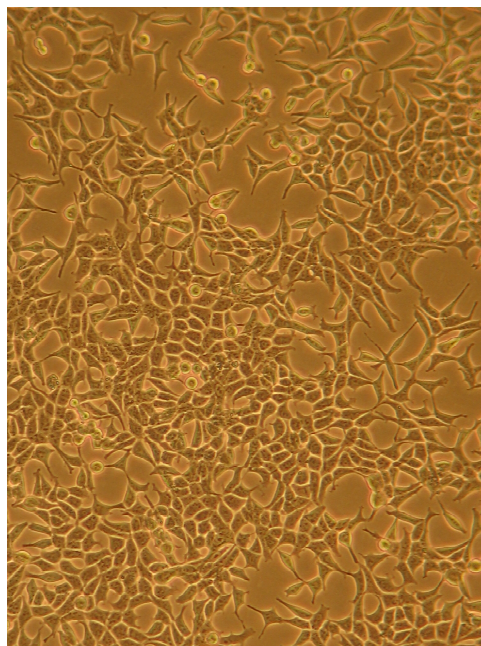
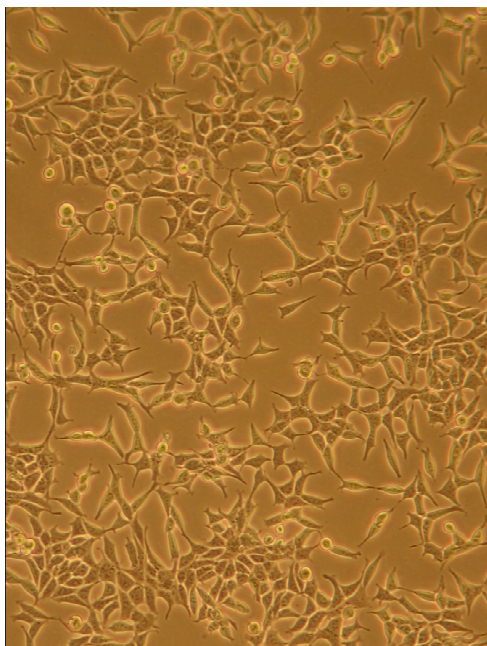


Buňky linie RWPE-1 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)

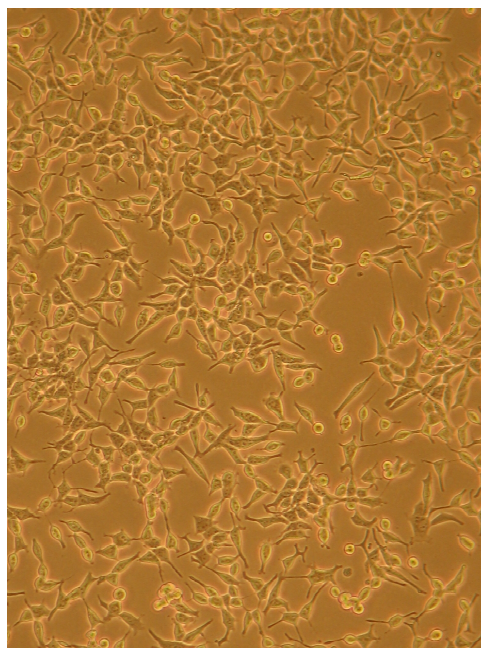
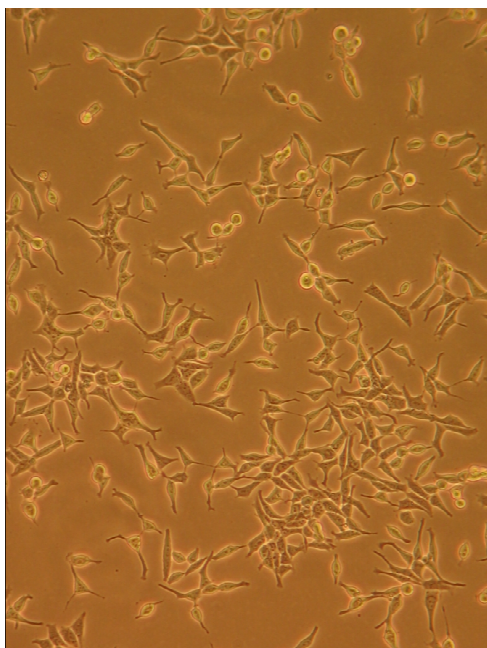


Buňky linie RWPE-1 ovlivněné kombinací 0,05 $\mu\text{mol/l}$ TSA a 2,5 mmol/l TB po dobu 48 hodin (vlevo) a 96 hodin (vpravo) (zvětšení 196x)

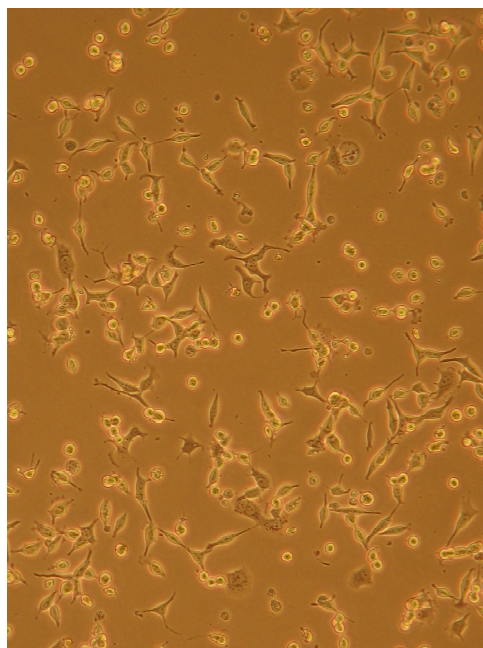
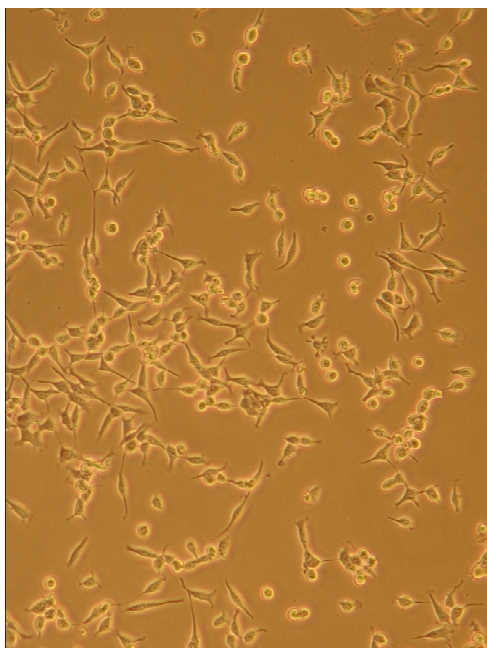
Příloha 2: Fotografie buněk prostatických buněčných linií C4-2 (nádorová) a RWPE-1 (nenádorová) ovlivňovaných NaB



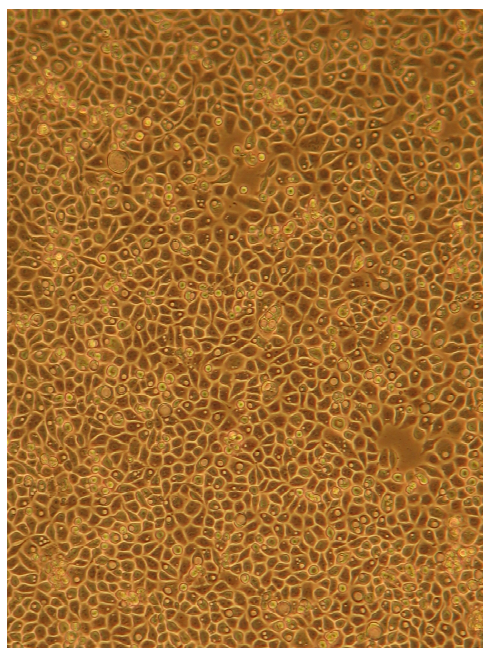
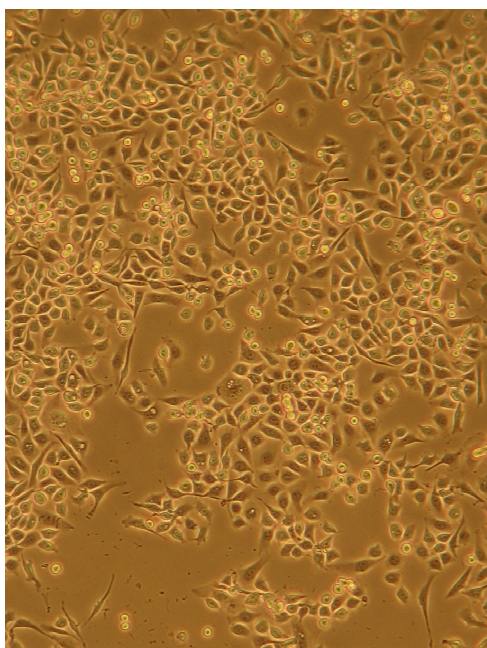
Buňky linie C4-2 inkubované s 0,1% DMSO po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)



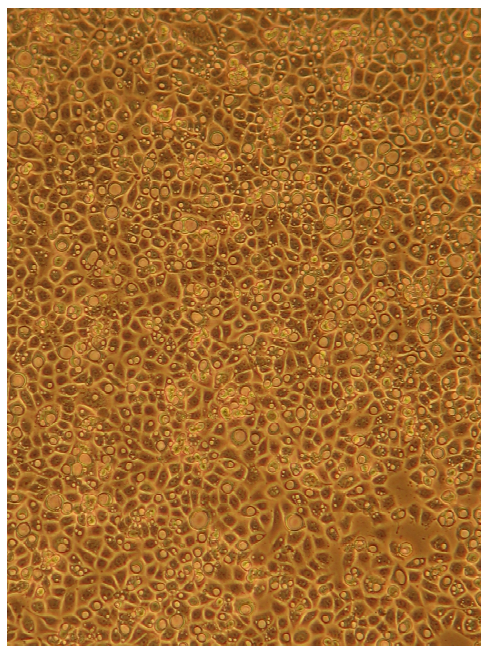
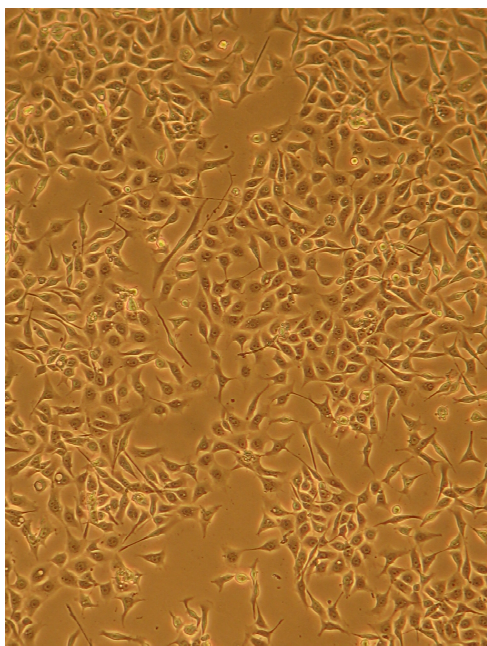
Buňky linie C4-2 ovlivněné 1 mmol/l NaB po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)



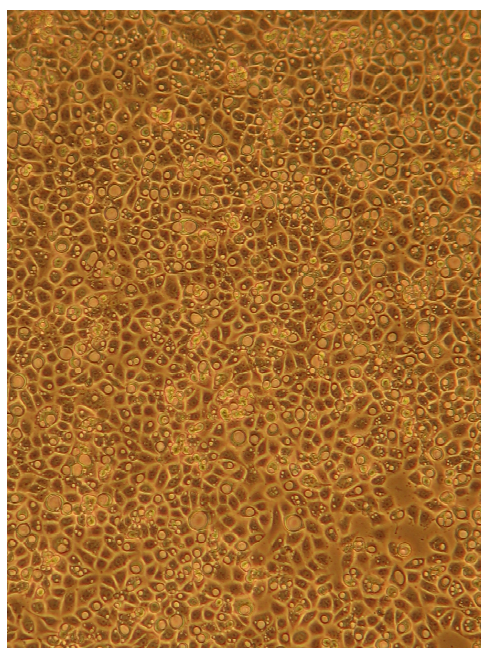
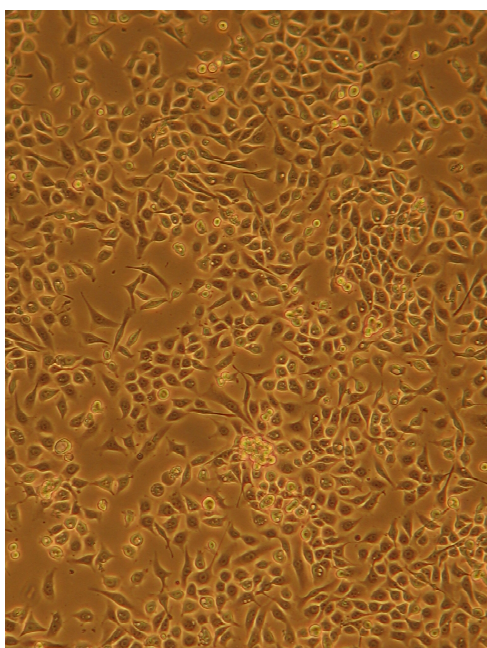
Buňky linie C4-2 ovlivněné 5 mmol/l NaB po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)



Buňky linie RWPE-1 inkubované s 0,1% DMSO po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)

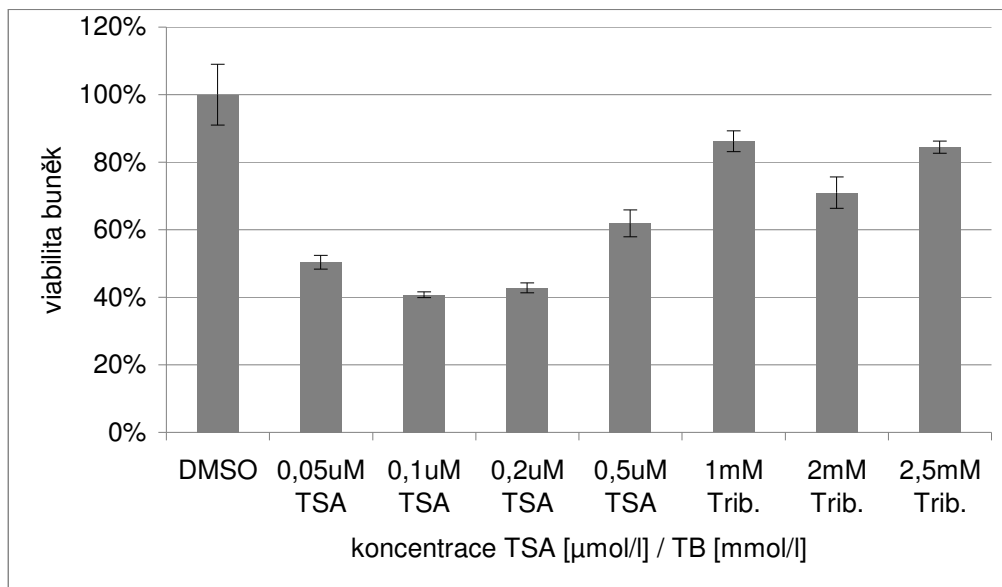


Buňky linie RWPE-1 ovlivněné 1 mmol/l NaB po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)

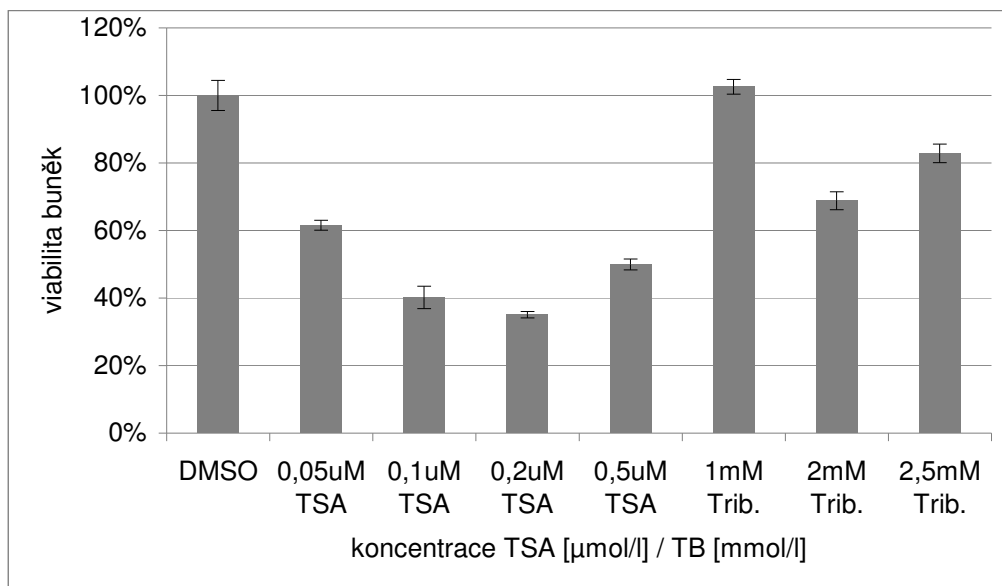


Buňky linie RWPE-1 ovlivněné 5 mmol/l NaB po dobu 24 hodin (vlevo) a 48 hodin (vpravo) (zvětšení 490x)

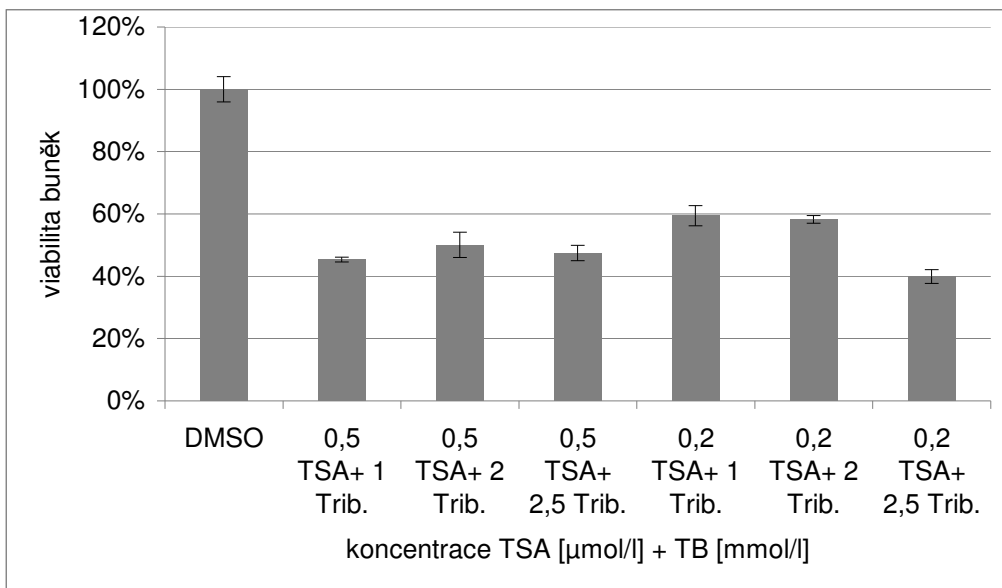
Příloha 3: Viabilita buněk linie RWPE-1 po ovlivnění TSA a TB



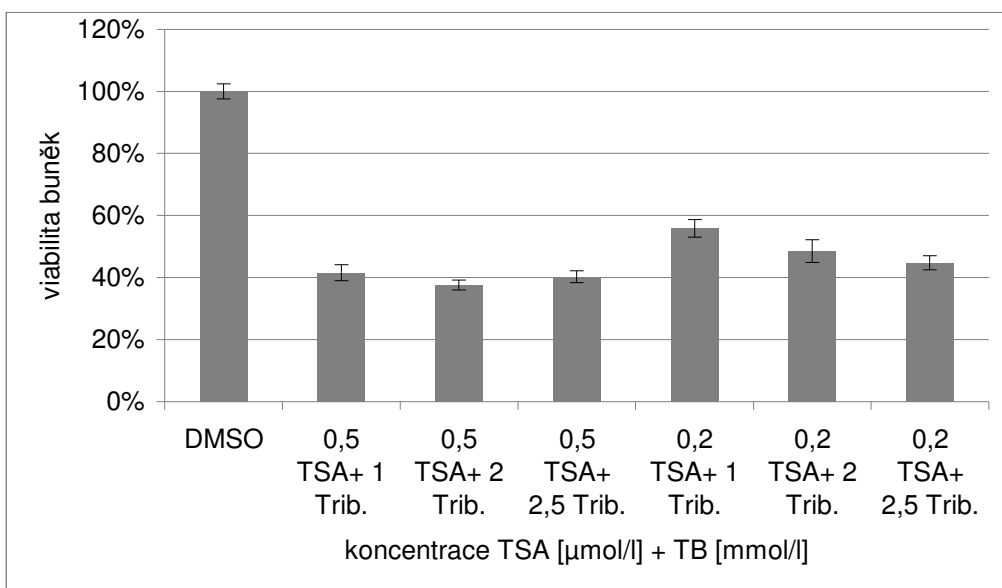
Graf 1: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 48-hodinovém ovlivnění různými koncentracemi TSA a TB



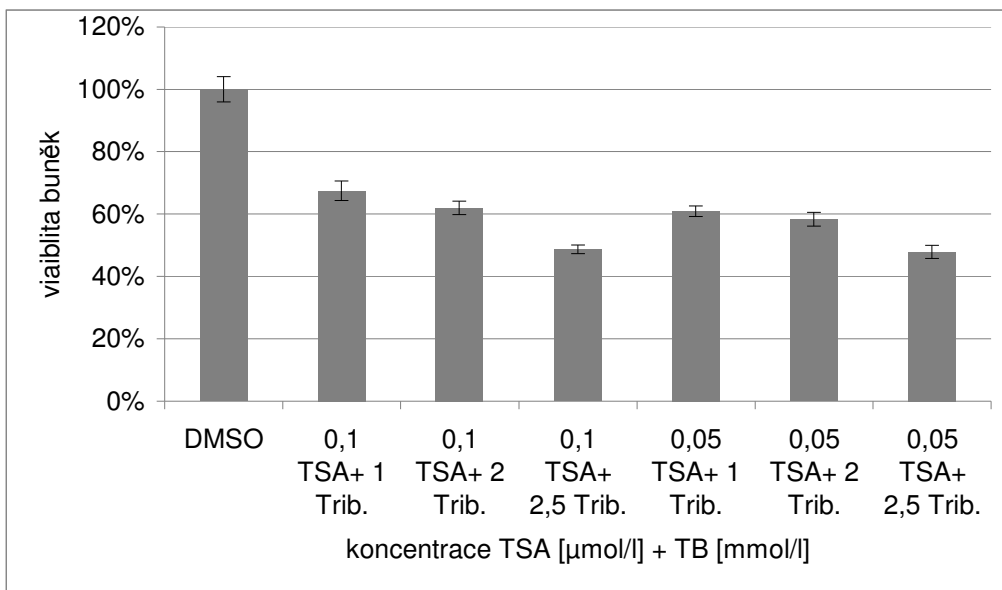
Graf 2: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 96-hodinovém ovlivnění různými koncentracemi TSA a TB



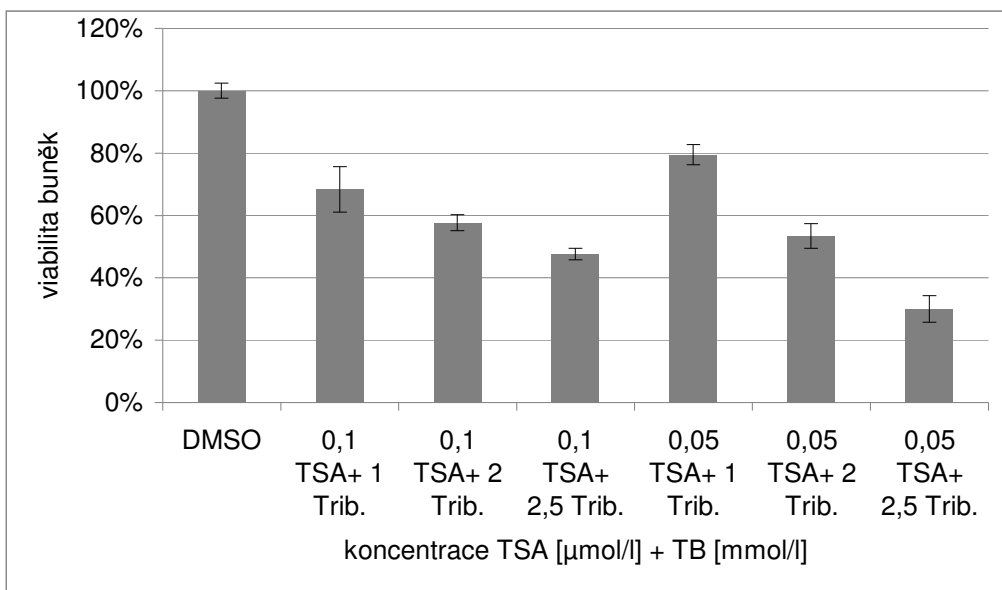
Graf 3: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 48-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,5 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$) a TB



Graf 4: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 96-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,5 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$) a TB



Graf 5: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 48-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB



Graf 6: Viabilita buněk linie RWPE-1 po 96-hodinovém ovlivnění kombinacemi TSA (0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,05 $\mu\text{mol/l}$) a TB

Příloha 4: Výsledky a výpočty k real-time PCR

marker	vzorek	Ct ₁	Ct ₂	průměr Ct	směrodatná odchylka	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
GAPDH	C4-2 48 h DMSO	17,12	17,05	17,085	0,049497475			
	C4-2 48 h TSA + 1 TB	14,49	14,53	14,51	0,02828427			
	C4-2 48 h TSA + 2 TB	19,51	18,53	19,17	0,480833			
	C4-2 48 h TSA + 2,5 TB	15,12	15,15	15,135	0,021213			
	C4-2 96 h DMSO	15,76	15,96	15,86	0,141421356			
	C4-2 96 h TSA + 1 TB	16,63	16,62	16,625	0,00707107			
	C4-2 96 h TSA + 2 TB	17,82	18,15	17,985	0,233345			
	C4-2 96 h TSA + 2,5 TB	18,46	18,52	18,49	0,042426			
	RWPE-1 48 h DMSO	14,89	15,10	14,995	0,148492424			
	RWPE-1 48 h TSA + 1 TB	16,95	16,99	16,97	0,02828427			
	RWPE-1 48 h TSA + 2 TB	16,18	16,25	16,215	0,049497			
	RWPE-1 48 h TSA + 2,5 TB	17,91	17,48	17,695	0,304056			
	RWPE-1 96 h DMSO	16,50	16,47	16,485	0,021213203			

marker	vzorek	Ct ₁	Ct ₂	průměr Ct	směrodatná odchylka	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
GAPDH	RWPE-1 96 h TSA + 1 TB	18,14	18,10	18,12	0,02828427			
	RWPE-1 96 h TSA + 2 TB	19,80	20,18	19,99	0,268701			
	RWPE-1 96 h TSA + 2,5 TB	20,49	20,36	20,425	0,091924			
AR	C4-2 48 h DMSO	19,61	19,13	19,37	0,339411	2,285	0	1
	C4-2 48 h TSA + 1 TB	18,15	18,01	18,08	0,099	3,57	1,285	0,410371
	C4-2 48 h TSA + 2 TB	22,03	22,59	22,31	0,39598	3,14	0,855	0,552865
	C4-2 48 h TSA + 2,5 TB	19,83	19,70	19,765	0,091924	4,63	2,345	0,196827
	C4-2 96 h DMSO	18,60	17,51	18,055	0,770746	2,195	0	1
	C4-2 96 h TSA + 1 TB	19,9	19,7	19,8	0,141	3,175	0,98	0,50698
	C4-2 96 h TSA + 2 TB	20,55	20,79	20,67	0,169706	2,685	0,49	0,712025
	C4-2 96 h TSA + 2,5 TB	21,02	20,84	20,93	0,127279	2,44	0,245	0,843816
	RWPE-1 48 h DMSO	34,95	35,12	35,035	0,120208	20,04	0	1
	RWPE-1 48 h TSA + 1 TB	30,76	30,39	30,575	0,262	13,605	-6,435	86,52229
	RWPE-1 48 h TSA + 2 TB	30,35	30,10	30,225	0,176777	14,01	-6,03	65,34478

marker	vzorek	Ct ₁	Ct ₂	průměr Ct	směrodatná odchylka	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
PSA	RWPE-1 48 h TSA + 1 TB	-	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 48 h TSA + 2 TB	34,82	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 48 h TSA + 2,5 TB	-	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 96 h DMSO	-	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 96 h TSA + 1 TB	-	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 96 h TSA + 2 TB	35,06	-	-	-	-	-	-
	RWPE-1 96 h TSA + 2,5 TB	-	-	-	-	-	-	-
SRC-1	C4-2 48 h DMSO	19,18	19,06	19,12	0,084853	2,035	0	1
	C4-2 48 h TSA + 1 TB	18,48	18,79	18,635	0,219	4,125	2,09	0,234881
	C4-2 48 h TSA + 2 TB	21,06	21,31	21,185	0,176777	2,015	-0,02	1,013959
	C4-2 48 h TSA + 2,5 TB	18,12	18,50	18,31	0,2687006	3,175	1,14	0,45376
	C4-2 96 h DMSO	18,40	18,57	18,485	0,120208	2,625	0	1
	C4-2 96 h TSA + 1 TB	20,10	20,03	20,065	0,049	3,44	0,815	0,568408
	C4-2 96 h TSA + 2 TB	19,79	19,66	19,725	0,091924	1,74	-0,885	1,846765

marker	vzorek	Ct ₁	Ct ₂	průměr Ct	směrodatná odchylka	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
SRC-1	C4-2 96 h TSA + 2,5 TB	19,56	19,42	19,49	0,0989949	1	-1,625	3,084422
	RWPE-1 48 h DMSO	20,84	20,85	20,845	0,007071	5,85	0	1
	RWPE-1 48 h TSA + 1 TB	21,82	21,73	21,775	0,064	4,805	-1,045	2,063366
	RWPE-1 48 h TSA + 2 TB	20,62	20,78	20,7	0,113137	4,485	-1,365	2,575763
	RWPE-1 48 h TSA + 2,5 TB	21,86	21,90	21,88	0,0282843	4,185	-1,665	3,171137
	RWPE-1 96 h DMSO	20,55	22,56	20,555	0,007071	4,07	0	1
	RWPE-1 96 h TSA + 1 TB	20,96	22,88	22,92	0,057	4,8	0,73	0,602904
	RWPE-1 96 h TSA + 2 TB	22,97	-	22,97	-	2,98	-1,09	2,12874
	RWPE-1 96 h TSA + 2,5 TB	22,86	-	22,86	-	2,435	-1,635	3,105876
p300	C4-2 48 h DMSO	18,87	18,78	18,825	0,06364	1,74	0	1
	C4-2 48 h TSA + 1 TB	18,35	18,29	18,32	0,042	3,81	2,07	0,238159
	C4-2 48 h TSA + 2 TB	20,71	20,35	20,53	0,254558	1,36	-0,38	1,301342
	C4-2 48 h TSA + 2,5 TB	17,62	17,91	17,765	0,205061	2,63	0,89	0,539614
	C4-2 96 h DMSO	17,76	17,77	17,765	0,007071	1,905	0	1

marker	vzorek	Ct ₁	Ct ₂	průměr Ct	směrodatná odchylka	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
p300	C4-2 96 h TSA + 1 TB	19,50	19,54	19,52	0,028	2,895	0,99	0,503478
	C4-2 96 h TSA + 2 TB	19,41	19,52	19,465	0,077782	1,48	-0,425	1,342573
	C4-2 96 h TSA + 2,5 TB	19,58	19,41	19,495	0,1202082	1,005	-0,9	1,866066
	RWPE-1 48 h DMSO	19,79	20,27	20,03	0,339411	5,035	0	1
	RWPE-1 48 h TSA + 1 TB	20,44	20,39	20,415	0,035	3,445	-1,59	3,010493
	RWPE-1 48 h TSA + 2 TB	20,10	20,18	20,14	0,056569	3,925	-1,11	2,158456
	RWPE-1 48 h TSA + 2,5 TB	21,85	21,68	21,765	0,1202082	4,07	-0,965	1,952064
	RWPE-1 96 h DMSO	20,31	19,83	20,07	0,339411	3,585	0	1
	RWPE-1 96 h TSA + 1 TB	21,56	21,37	21,465	0,134	3,345	-0,24	1,180993
	RWPE-1 96 h TSA + 2 TB	21,86	21,73	21,795	0,091924	1,805	-1,78	3,434262
	RWPE-1 96 h TSA + 2,5 TB	21,41	22,34	21,875	0,6576093	1,45	-2,135	4,392371