



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Modulace steroidních receptorů
a cytoskeletu v prsních buňkách in vitro
deriváty steroidních látek**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Michaela Nováková**
Studijní program: Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Termín odevzdání práce: 2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Nováková
Název práce	Modulace steroidních receptorů a cytoskeletu v prsních buňkách in vitro deriváty steroidních látek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá vlivem derivátů steroidních látek na lokalizaci a expresi steroidních receptorů a proteinů cytoskeletu in vitro v nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od adenokarcinomu prsu. Teoretická část je zaměřena na problematiku karcinomu prsu, steroidních receptorů a cytoskeletu. Také se věnuje brassinosteroidům a jejich příznivým účinkům. V experimentální části byla studována aktivita čtyř steroidních látek na modulaci steroidních receptorů a cytoskeletu. Jejich lokalizace byla sledována imunofluorescenční analýzou a detekce změn exprese proběhla pomocí western blot analýzy.
Klíčová slova	karcinom prsu, jaderné receptory pro steroidní hormony, cytoskelet, brassinosteroidy, deriváty steroidních látek
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Michaela Nováková
Title of thesis	Modulation of steroid receptors and cytoskeleton in breast cells in vitro by steroid derivatives
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D
The year of presentation	2021
Abstract	<p>The diploma thesis deals with the influence of steroid derivatives on the localization and expression of steroid receptors and cytoskeleton proteins in vitro in the tumor cell line MCF7 derived from breast adenocarcinoma. The theoretical part deals with breast cancer, steroid receptors and the cytoskeleton. It also deals with brassinosteroids and their beneficial effects. In the experimental part, the activity of four steroid substances on the modulation of steroid receptors and the cytoskeleton was studied. Their localization was monitored using immunofluorescence analysis and detection of expression changes was performed by western blot analysis.</p>
Keywords	breast carcinoma, steroid hormone receptors, cytoskeleton, brassinosteroids, steroid derivatives
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.

V Olomouci dne 18. 5. 2021

Michaela Nováková

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady a pomoc při zpracovávání této práce. Dík patří také celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za vytvoření přátelské atmosféry a podporu. Také bych chtěla poděkovat grantu IGA_2021-007 za možnost uskutečnění mé experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji za podporu také mé rodině a přátelům, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	12
2.1 KARCINOM PRSU	12
2.1.1 Molekulárně biologická klasifikace	13
2.1.2 Hormonální léčba.....	14
2.1.3 Buněčné linie z nádorů mléčné žlázy	15
2.1.4 Cytoskelet.....	16
2.1.5 Nejčastěji používaná léčiva.....	18
2.2 STEROIDNÍ RECEPTORY	19
2.2.1 Estrogenový receptor (ER).....	20
2.2.2 Progesteronový receptor (PR)	23
2.2.3 Androgenový receptor (AR)	25
2.3 BRASSINOSTEROIDY (BR)	26
2.3.1 Funkce brassinosteroidů v rostlinách	27
2.3.2 Biosyntéza BR.....	28
2. 1. 1. Brassinosteroidy v medicíně	30
3 MATERIÁL A METODY	32
3.1 BUNĚČNÁ LINIE A TESTOVANÉ LÁTKY.....	32
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	32
3.3 POUŽITÉ PROTILÁTKY	35
3.4 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZARÍZENÍ.....	36
3.5 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	37
3.5.1 Kultivace a ovlivnění buněčné linie testovanou látkou	37
3.5.2 Sklizení a lyzování buněk pro WB	38
3.5.3 SDS-PAGE a western blot.....	39
3.5.4 Imunodetekce proteinů	40
3.5.5 Imunofluorescenční analýza.....	41
4 VÝSLEDKY.....	42
4.1 OPTIMALIZACE TESTOVÁNÍ	42
4.2 IMUNOFLUORESCENČNÍ ANALÝZA.....	44
4.3 WESTERN BLOT ANALÝZA.....	53
5 DISKUZE.....	55
6 ZÁVĚR.....	59
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	60

SEZNAM ZKRATEK

2MeO	2-methoxyestradiol
4-OHT	4-hydroxytamoxifen
AA	akrylamid
AF	aktivační funkční doména
AF488	Alexa Fluor 488
AGR2	anterior gradient protein 2
AIS	syndrom necitlivosti na androgen, z angl. androgen insensitivity syndrom
AP1	aktivační protein 1
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenový receptor
ATP	adenosintrifosfát
Bis	bisakrylamid
BR	brassinosteroidy
BSA	hovězí sérový albumin, z angl.. bovine serum albumin
NaCl	chlorid sodný
BUS	z angl. B-upstream segment
DBD	DNA vázající doména, z angl. DNA binding protein
DCIS	duktální karcinom in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E2	estradiol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, z ang. epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ER	estrogenový receptor
ERE	estrogen rezponzivní elementy, z angl. estrogen response elements
FBS	fetální telecí sérum
FULV	fulvestrant
GAR	goat-anti-rabbit
GCP	gama-tubulinové komplexní proteiny
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
H ₂ O	voda
HCl	kyselina chlorovodíková
HER-2	humánní epidermální receptor 2
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti z angl. human immunodeficiency virus
Hsp	protein tepelného šoku z angl. heat shock protein
HUVEC	lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly, z angl. human umbilical vein endothelial cells
CH ₃ COOH	kyselina octová
ID	inhibiční doména
KCl	chlorid draselný
KEB	Katedra experimentální biologie
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
KO	kontrola

LBD	ligand vázající doménu, z angl. ligand binding protein
LCIS	lobulární karcinom in situ
MAP	z angl. mitogen activated protein
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MTOC	centrum organizující mikrotubuly, z angl. the microtubule-organizing center
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný
NaF	fluorid sodný
NCoR1	z angl. nuclear receptor corepressors 1
NIL	nilutamid
NLS	nukleární lokalizační sekvence
PBS	fosfátový pufr z angl. phosphate buffered saline
PHTPP	4-[2-phenyl-5,7-bis (trifluoromethyl) pyrazolo [1,5-a]-pyrimidin-3-yl] phenol
PKC	proteinkináza C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PR	progesteronový receptor
PREs	progesteron reponzivní elementy, z angl. progesteron respondent elements
RAM	rabbit-anti-mouse

RIPA	radioimmunoprecipitation buffer
RNA	ribonukleová kyselina
SDS-PAGE	sodium dodecil sulfát-polyakrylamidová gelová elektroforéza
Ser	serin
SERM	selektivní modulátory estrogenních receptorů
SMRT	z angl. silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SP1	specifický protein 1
SRC	z angl. steroid receptor co-activator
TBS	z angl. tris-buffered saline
TEMED	tetramethylethyldiammin
TGFβ	z angl. transforming growth factor beta
TR	texas red
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚOChB	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Karcinom prsu je nejčastější maligní onemocnění žen v České republice. Více než 50 % případů vzniká bez zjištění jednoznačné příčiny. Léčba je vždy stanovena individuálně. Nejčastěji je využívána kombinace chirurgických a radioterapeutických metod s hormonoterapií, chemoterapií nebo biologickou léčbou. Účinnost hormonální léčby je založena na expresi steroidních receptorů v postižené tkáni. Hormonální terapeutika slouží k inhibici funkce těchto receptorů a umožňují ovlivnění růstu nádoru. A proto jsou stále slibným cílem výzkumu.

Za účelem najít nová léčiva proti karcinomu prsu je testováno mnoho steroidních látek, které vykazují strukturální podobnost s přirozeně vyskytujícími se ligandy steroidních receptorů. Jedními z nich jsou také deriváty brassinosteroidů, polyhydroxylových rostlinných hormonů, na které je zaměřena má diplomová práce.

Cílem teoretické části bylo vypracovat literární rešerši týkající se zadaného tématu. V experimentální části bylo cílem charakterizovat změnu exprese steroidních receptorů a proteinů cytoskeletu po účinku testovaných steroidních látek a stanovit lokalizaci steroidních receptorů a proteinů cytoskeletu pomocí imunofluorescenční analýzy v buněčné linii MCF7 odvozené od adenokarcinomu prsu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Teoretická část zahrnuje obecnou část popisující základní charakteristiku, klasifikaci a léčbu karcinomu prsu. V další části je blíže popsán cytoskelet nádorové buňky, který byl jedním z cílů testování. Dalšími cíli byly jaderné receptory, kterým je také určena jedna z kapitol. V poslední části je zahrnuta charakteristika brassinosteroidů a jejich biologické účinky.

2.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je souhrnným názvem pro maligní formy nádorů epiteliálních buněk mléčné žlázy. Je to nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen v České republice. Více než 50 % vzniká bez zjištění jednoznačné příčiny. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u žen se pohybuje okolo 10 %. V roce 2015 bylo u žen potvrzeno přes 7 000 nových případů (132,4/100 000 žen). Velmi řídké se vyskytuje u osob mladších 30 let. Incidence výskytu roste s věkem nad 50 let. Toto maligní onemocnění se nevyhýbá ani mužské populaci. Ovšem u mužů byl v tomtéž roce výskyt méně frekventovaný a byl udán pouze 1 případ na 100 000 mužů. Vznik a vývoj nádorů ovlivňuje řada rizikových faktorů jako věk, dědičnost, výskyt premaligních lézí, životní styl a hormonální změny. Se stoupajícím věkem se zvyšuje i riziko vzniku karcinomu. Toto riziko se zvyšuje i v období hormonálních změn jako je časný nástup menarche či pozdní menopauza (Bae, 2020; Brychta, 2018; Coufal & Fait., 2011; Adam *et al.*, 2010).

Terapie je vždy stanovena individuálně. Je zde uplatňován multimodální přístup. Nejčastěji je využita kombinace lokoregionálních metod v podobě chirurgie a radioterapie s hormonoterapií, chemoterapií nebo biologickou léčbou. Nejstarší z léčebných metod je terapie chirurgická. Od minulosti ovšem pokročila a odstranění celého prsu se redukovalo jen na odstranění nádorového ložiska. Další z lokoregionálních metod, radioterapie, se využívá především jako pooperační ošetření či jako samostatná kurativní radioterapie. Mezi systémové terapeutické přístupy patří chemoterapie, kdy je cílem likvidace rychle se dělících nádorových buněk. Toto působení chemoterapeutik ovšem postihuje i zdravou nenádorovou tkáň. Další systémovou metodou je hormonoterapie, které je věnována dále vlastní kapitola.

Hormonoterpie je volbou u nádorů s pozitivitou estrogenových nebo progesteronových receptorů, kterým se blíže věnuji ve své diplomové práci (Brychta, 2018).

Hlavními typy tkání tvořící mléčnou žlázu jsou žlázová tkáň, pojivová tkáň a tuková tkáň. Nejčastěji se vyskytující maligní nádory prsu jsou nádory žláznatého epitelu – adenokarcinomy. Nádory pojivové tkáně, sarkomy, představují méně než 1 % všech maligních nádorů prsu. Morfologicky lze karcinomy z epitelových buněk zjednodušeně rozdělit do dvou skupin – duktální a lobulární. Duktální karcinom je nejčastěji se vyskytující typ. Charakterizují ho preinvazivní změny bez postižení axiálních uzlin. Při větším rozšíření ložisek duktálního karcinomu in situ (DCIS) je vhodnou variantou léčby mastektomie či úplná ablace prsu, která zvyšuje úspěšnost léčby nad 95 %. V případě lobulárního karcinomu in situ (LCIS) jde o četné zvláštní formy. Jeho nálezy lze považovat jako indikaci ohrožení obou prsů invazivní formou. Proto je důležitá prevence a případná minimalizace rizika mastektomií či podání tamoxifenu (Kinkor, 2013; Coufal & Fait, 2011; Adam *et al.*, 2010; Čihák, 1997).

2.1.1 Molekulárně biologická klasifikace

Stanovení exprese steroidních hormonů v určitých subtypech karcinomu prsu lze vyjádřit klasifikací zavedené v 80. letech minulého století, která je rozděluje na nádory estrogen-dependentní a estrogen-independentní (Coufal & Fait, 2011).

Na konci 90. let byla sepsána průlomová klasifikace na základě analýzy profilu genové exprese studie Perou a *et al.* (2000) částečně shrnující dřívější rozdělení podle histologické klasifikace se zmíněnou hormonálně dependentní viz Obr. 1. Nádory prsu lze rozdělit na 4 subtypy - luminální A, luminální B, HER-2 a bazální subtyp. Luminální A subtyp je charakteristický expresí estrogenového receptoru, vyšším průměrným věkem pacientek a příznivějším klinickým průběhem. Řadíme zde většinu lobulárních karcinomů a velkou část duktálních s nízkým gradem. Luminální B subtypy se vyznačují expresí estrogenového receptoru a amplifikací onkogenu HER-2. Jsou charakteristické vyšší proliferací aktivitou. Karcinomy HER-2 typu jsou typické amplifikací HER-2 onkogenu, ovšem nevyskytuje se u nich exprese estrogenového receptoru. Karcinomy bazálního typu neobsahují estrogenový receptor,

ani aplikaci HER-2. Společně s HER-2 typem postihují především mladší ženy a jejich průběh není tolik příznivý (Coufal & Fait, 2011).

typ	typická histologie	základní biologické charakteristiky	zjednodušené klinické charakteristiky
luminální A	duktální grade 1–2, klasický lobulární, mucinózní, papilární, tubulární	ER pozitivní, HER-2 negativní, nižší proliferace	indolentní, dobrá odpověď na hormonoterapii, špatná na chemoterapii
luminální B	duktální grade 2–3	ER pozitivní, HER-2 amplifikace nebo p53 mutace, vysoká proliferace	horší průběh se špatnou odpovědí na hormonoterapii, zpravidla odpověď na chemoterapii
HER-2	duktální grade 3, medulární	ER negativní, HER-2 amplifikace, vysoká proliferace	velmi špatný průběh bez specifické biologické léčby, dobrá odpověď na chemoterapii
bazální	duktální grade 3, medulární, některé komplexní a metaplastické	negativní na receptory i HER-2 („triple negative“), extrémně vysoká proliferace, BRCA1 a p53 mutace	velmi špatný průběh, zpravidla dobrá iniciální odpověď na chemoterapii

Obr. 1 Molekulárně biologická klasifikace karcinomu prsu. Převzato z: Coufal & Fait, 2011

2.1.2 Hormonální léčba

Přítomnost hormonů je velmi důležitá pro růst tkání. Nejvýraznější korelaci nacházíme u karcinomu prsu a prostaty. Cílem léčby je zablokování vazby hormonu na receptor či potlačení fyziologické produkce hormonu. V případě karcinomu prsu závisí léčebná odpověď a počet dosažených remisí především na počtu estrogenových a progesteronových receptorů v maligních buňkách. Dalším faktorem je také věk pacienta a nástup menopauzy (Adam *et al.*, 2011). Značné množství nádorů, přibližně 60-70 %, exprimuje estrogenové a progesteronové receptory (Coufal & Fait, 2011). Hormonoterapie je tedy vedoucí volbou při léčbě nádorů s pozitivitou zmíněných estrogenových a progesteronových receptorů. U premenopauzálních pacientek se využívají antiestrogeny nebo postupy vedoucí k inhibici funkce ovaríí. U postmenopauzálních žen se volí k léčbě využití antiestrogenů a inhibitorů aromatáz (Brychta, 2018).

Antiestrogeny, antagonisté estrogenových receptorů, fungují na kompetitivní bázi účinku, kdy zaujmou pozici na receptorech, a tím znemožní vazbu ligandu, který

by podpořil růst nádorových buněk. Po vazbě antiestrogenů na receptor nedochází ke stimulaci exprese proliferačních faktorů, a to i přes přechod receptoru do jádra. Buněčný cyklus se zastaví v G₁ fázi. Jedním z nejrozšířenějších antiestrogenů je tamoxifen. Je využíván u premenopauzálních i postmenopauzálních pacientek. Dalším účinným antiestrogenem je například fulvestrant, který se používá při selhání léčby tamoxifinem a také se upřednostňuje u metastázického karcinomu prsu (Adam *et al.*, 2011). Fulvestrant ztěžuje dimerizaci receptoru a tím jeho translokaci do jádra (Dauvois *et al.*, 1993; Fawell *et al.*, 1990) Také je komplex fulvestrant a receptor transkripčně neaktivní a nestabilní, což vede ke zrychlené degradaci estrogenového receptoru (Nicholson *et al.*, 1995).

Inhibitory aromatáz blokují tvorbu příslušných hormonů. Působením aromatáz vzniká hormon testosteron a dále jeho konverzí estrogenu. Mezi nejpoužívanější řadíme anastrozol a letrozol. Tyto inhibitory třetí generace vynikají vysokou účinností a skvělou resorpcí z trávicího traktu. Oproti tamoxifenu působí bez rizika estrogení stimulace na epitel dělohy (Klener *et al.*, 2010).

Gestageny (progesterony) jsou další variantou léčby karcinomu prsu. Díky navázání gestagenu na progesteronový receptor dojde ke snížení produkce steroidních receptorů v periférii a tím se sníží množství estrogenu v nádorových buňkách. Využívá se megestrolacetát a medroxyprogesteronacetát (Adam *et al.*, 2011).

2.1.3 Buněčné linie z nádorů mléčné žlázy

Počet dostupných linií buněk karcinomu prsu je nízký a pouze jen malá část z nich byla rozsáhleji prostudována. Naše znalosti o karcinomu prsu jsou převážně založeny na testech *in vivo* a *in vitro*. Jsou často snadno kultivovatelné v jednoduchých standardních médiích a poskytují zdroj homogenního samoreplikujícího se materiálu. První linie BT-20 byla kultivována v roce 1958. Od té doby byl získán jen malý počet buněčných linií. Často docházelo k technickým obtížím spojených s extrakcí životaschopných nádorových buněk od jejich obklopujícího stromatu, což značně snižovalo úspěšnost jejich možné kultivace. Ze všech získaných buněčných linií zahrnují studie o karcinomu prsu ze dvou třetin právě linie MCF7, T-47D a MDA-MB-231. Buněčné linie mají rozsáhlé chromozomální přestavby, onkogenní mutace, místa alelických ztrát a genových amplifikací. Předpokládá se, že tyto změny

fenotypových vlastností byly zapříčiněny delší dobou zakládání samostatné buněčné kultury a jejím dalším pasážováním (Conn, 2017; Lacroix *et al.*, 2004; Lasfargues *et al.*, 1958).

Buněčná linie MCF7, původně získána z metastázy pokročilého nádoru luminálního typu, je neinvazivní a představuje model raného stádia karcinomu. Je u ní charakteristická přítomnost ER a proto je tento model důležitý při klinickém testování potenciálních antiestrogenních léčiv. Xenograft MCF7 exprimuje wild type p53 a je nemetastatický (Conn, 2017).

Další používanou buněčnou linií je T-47D, která byla izolována z pacientky s invazivním duktálním karcinomem. Díky vysoké expresi PR je linie především využívána ke studiu progesteronové signalizace a testování terapeutické účinnosti antiprogestinů. Rozdíl oproti linii MCF7 spočívá v expresi nefunkční formy p53 (Conn, 2017).

Jako model pozdního stádia rakoviny prsu se využívá linie MDA-MB-231, opět izolována z pacientky s invazivním duktálním karcinomem. Charakterizuje se jako ER negativní, PR negativní a E-kadherin negativní a spadá pod bazální typ karcinomu. Dochází i k expresi mutované formy p53. Buňkám chybí také receptor růstového faktoru HER2. Karcinomy implantovaných xenograftů se vyznačují metastatickými vlastnostmi (Conn, 2017).

2.1.4 Cytoskelet

Cytoskelet je proteinová dynamická síť buňky tvořena vláknitými proteiny. Existují tři typy vláken – mikrofilamenta, mikrotubuly a intermediální filamenta. Společně vytvářejí trojrozměrné lešení buňky a udržují tvar a pevnost buňky i jejich povrchových specializací. Také se účastní pohybu a cytoplazmatického transportu (Slipka *et al.*, 2018; Vajner *et al.*, 2018).

Mikrotubuly, které nejen určují strukturu buňky, plní mnoho jiných funkcí. Zajišťují transport různých signálů nebo materiálů a tvoří mitotická vřetenka. Jsou také důležité pro pohyblivost buňky. Mikrotubuly jsou skupiny vláken, které jsou tvořené základními proteinovými molekulami – tubuliny. Tubuliny jsou heterodimery složené ze dvou typů podjednotek α -tubulinu a β -tubulinu. Tyto podjednotky jsou spojeny nekovalentními (hydrofóbními) vazbami. Mezi každým tubulinovým

monomerem je molekula GTP. Hydrolyza GTP na GDP umožňuje navázání dalšího α -tubulinu a tím prodloužení mikrotubulu (Alberts, 2008; Wilson *et al.*, 1997). Zkracují se a prodlužují v závislosti na potřebě buňky. Jsou ukotveny v MTOC – centru organizující mikrotubuly, které je tvořeno sítí gama-tubulinových kruhů a gama-tubulinových komplexních proteinů (GCP). Na ně jsou připojeny gamatubuliny (Vinopal *et al.*, 2012; Yuba-Kubo *et al.*, 2005).

Mikrofilamenta jsou tvořena aktinem. Aktin je jeden z nejhojnějších proteinů u eukaryot. Nachází se ve formě glomerulární molekuly G-aktinu a polymerního řetězce F-aktinu (Holmes *et al.*, 1990). Fibrilární F-aktin tvoří mikrofilamentum. Aktinová mikrofilamenta nacházíme ve svalových i nesvalových buňkách. Ve svalových buňkách jsou společně s myosinovými filamenti stabilizovány tropomyosinem. Aktinové mikrofilamenta mají průměr 5-7 nm. Tlustší myosinové nacházíme s průměrem 15-16 nm. V nesvalových buňkách tvoří dynamickou nepravidelně uspořádanou strukturu. Jen 50 % aktinu obsaženého v tomto typu buněk tvoří polymerizovanou formu (Vajner *et al.* 2018).

Vlákno F-aktinu se vyznačuje strukturální polaritou, na jejímž základě jsou všechny podjednotky orientovány stejným směrem. Negativní konec aktinové podjednotky má vazebné místo pro ATP, pozitivní konec je namířen k sousednímu monomeru G-aktinu. Cyklicky zde probíhá polymerace a depolymerizace (Vegner *et al.*, 1976). Účastní se jí aktin vázající proteiny jako je například profilin 1 a profilin 2. Velkou roli zde mají i proteiny vázající ionty vápníku, které jsou zodpovědné za změnu hladiny iontů vápníku cytoplazmě a tím určují stupeň polymerizace. Dalšími důležitými aktin vázajícími proteiny, které hrají úlohu v organizaci mikrofilament, je také α -aktinin, vinculin a částečně také tropomyosin. V mikroklcích zodpovídá za pravidelné uspořádání fimbrin a vilin (Slipka *et al.*, 2018).

Intermediální filamenta jsou další skupinou filament obsažených v cytoplazmě buněk. Jejich tloušťka se pohybuje kolem 10–12 nm. Jsou složena z vláknitých molekul – proteinů, které se liší podle typu a funkce buňky. Jeden z nejvýznamnějších zástupců této skupiny filament jsou cytokeratiny. Nachází se v epitelových buňkách a tvoří zevní tuhou vrstvu cytoskeletu. Jsou hlavní proteinovou složkou nehtů či vlasů. Pro svalovou tkáň je charakteristická přítomnost především desminu. Ten se nachází ve svalovině hladké i příčně pruhované. Ve tkáních mezenchymálního původu se nachází především filamenta vimentinu. Vimentin je také hojně zastoupen

v embryonálních a nediferencovaných buňkách. Velkou část cytoskeletu neuronů tvoří neurofilamenta. Každý z neurofilament je charakteristický odlišnou strukturou a vykazuje v nervových buňkách jinou buněčnou úlohu. Další z významných zástupců intermediálních filament jsou laminy. Nacházejí se v jádře všech buněk na vnitřní straně jaderné membrány (Slipka *et al.*, 2018; Vajner *et al.*, 2018).

2.1.5 Nejčastěji používaná léčiva

Mezi nejčastěji užívané antiestrogeny patří tamoxifen a fulvestrant. Tamoxifen je nesteroidní derivát trifenylethylenu, který se váže na estrogenový receptor. Využívá se jak k prevenci, tak k léčbě rakoviny prsu. Tamoxifen patří do skupiny selektivních modulátorů estrogeních receptorů (SERM) (Jordan, 1988; Fugh-Berman & Epstein, 1992). Jeho účinek je komplexní povahy, ovšem nejvýznamnějším účinkem je blokáda estrogeních receptorů a tím eliminace stimulace prsní tkáně pomocí estrogenů. Mimo jiné také indukuje TGF β – antiproliferační cytokinin a omezuje syntézu stimulačních faktorů. Velmi podobným léčivem ze skupiny SERM je také raloxifen nebo artoxifen (Klener & Klener, 2010). Vhodným léčivem při onemocnění rezistentním na tamoxifen je fulvestrant, jehož mechanismus působení byl popsán již v kapitole 2.1.2. Hormonální léčba. Fulvestrant je antagonist estrogenových receptorů, který postrádá agonistické účinky (Hawle *et al.*, 2010).

Další léčebnou alternativou je využití inhibiční léčby zasahující do syntézy hormonů. Tuto schopnost vykazují inhibitory aromatáz. Aromatázy jsou enzymy, které hrají důležitou roli v syntéze steroidních hormonů. Nyní je běžně užívaná třetí generace inhibitorů aromatáz, která vykazuje vyšší účinnost oproti předchozím generacím. Řadíme zde například léčivo anastrozol a letrozol (Klener & Klener, 2010).

V léčbě karcinomu prsu se také využívá podávání gestagenů. Farmakologické dávky gestagenů blokují vazbu estrogenu na hormonální receptory. Také vykazují přímý antiproliferační účinek a omezují expresi receptorů pro růstové faktory. Příkladem využívaných léčiv je medroxyprogesteronacetát či megestrolacetát (Klener & Klener, 2010).

K systémové léčbě karcinomu prsu lze mimo hormonální léčby využít také chemoterapeutik. Mezi často využívaná monochemoterapeutika patří antracykliny, epirubicin, taxany, vinorelbin či gemcitabin. Antracykliny jsou jedny z nejúčinnějších

cytostatik. Jejich dlouhodobé užívání je ovšem omezené vzhledem k jejich kardiotoxicitě. Nejstarším zástupcem této třídy chemoterapeutik je doxorubicin. Analogem doxorubicinu je epirubicin, který se vyznačuje podobnou účinností, ale nižší kardiotoxicitou. Nejčastěji užívanými cytostatiky jsou taxany, které vykazují vysokou účinnost. Podávanými taxany jsou paklitaxel a docetaxel. Dalším cytostatikem je vinorelbin, který interferuje s formováním mitotického vřeténka a tím brání dělení buněk. Jeho pozitivní stránkou oproti ostatním cytostatikům je absence alopecie. U celé řady solidních nádorů působí protinádorově gemcitabin, který je charakteristický nízkou toxicitou (Farmakoterapeutické informace: měsíčník pro lékaře a farmaceuty, 2019).

2.2 Steroidní receptory

Steroidní receptory jsou proteiny lokalizované v cytosolu buňky, které jsou fyziologicky i farmakologicky důležitou skupinou rodiny transkripčních faktorů jaderných receptorů. Řadíme sem androgenní receptor, estrogenový receptor, progesteronový receptor, mineralokortikoidní receptor a glukokortikoidní receptor (Nuclear Receptors Nomenclature Committee *et al.*, 1999). Jsou také důležitým cílem léčiv vzhledem k jejich nesprávné regulaci v chorobných stavech a schopnosti vázat malé molekuly. Přibližně 16 % léčiv se váže na jaderné receptory (Santos *et al.*, 2017). Tyto receptory po navázání extracelulárních ligandů řídí transkripci cílových genů (Zaveri & Murphy, 2007).

Jsou lokalizovány v inaktivní formě v cytoplazmě. Po navázání extracelulárních ligandů dochází k translokaci do jádra a aktivaci dějů podmiňující proteosyntézu. Přírodní ligandy steroidních receptorů jsou vypsány v Tab. 1. Podmínkou vstupu receptoru do jádra je tvorba dimerů. V této formě receptor prostupuje do jádra a působí na specifický úsek DNA – hormon responzivní element a tím je spuštěna transkripce mRNA pro regulační proteiny (Rokyta, 2015).

Tab. 1 Steroidní receptory, jejich přirozené ligandy a antagonisté

receptor	přirozený ligand	antagonista
estrogenový receptor	estradiol	fulvestrant
androgenový receptor	testosteron	nilutamid
progesteronový receptor	progesteron	mifepristone

2.2.1 Estrogenový receptor (ER)

Estrogenový receptor α byl prvně objeven v 60. letech minulého století. Současně známe již dva základní typy estrogenového receptoru, a to zmíněný ER α a ER β , jehož objev se datuje až v roce 1996 (Delaunay *et al.*, 2000, Kuiper *et al.*, 1996). Estrogenové receptory můžeme nalézt v širokém spektru tkání. Mohou být zastoupeny ve stejném poměru, či jeden typ může dominovat pouze v určitém typu buněk tkáně. Exprese ER α převažuje především v děloze, stromě prostaty, vaječnicích, Leydigových buňkách varlat, kostí, prsou a dalších. ER β je ve větší míře produkován v buňkách tlustého střeva, epitelu prostaty, varlatech, vaječnicích, kostní dřeni a slinných žlázách (Dahlman-wright *et al.*, 2006).

Estrogeny jsou klíčové ve vývoji a udržování normální sexuální a reprodukční funkce. Mají bohatý vliv na kardiovaskulární, muskuloskeletální, imunitní a centrální nervový systém (Gustafsson, 2003). Estrogenová signalizace je založena na rovnováze protichůdných sil zmíněných dvou receptorů (Heldring *et al.*, 2007). Na tyto receptory se váže estrogen, který zapříčiní změnu konformace a dojde přes řetězec událostí ke změně rychlosti transkripce estrogen regulujících genů.

ER se skládá z funkčních domén, viz Obr. 2, které mezi sebou vzájemně interagují. N-terminální doména představuje aktivační funkční doménu 1 (AF1), která je vysoce variabilní a to jak v délce, tak v sekvenci. K její aktivaci dochází díky fosforylaci na serinovém zbytku pomocí MAP kinázové signální dráhy. Další v pořadí je centrální doména ER – DNA vázající doména, která je zapojena do rozpoznávání a vazby DNA (DBD). Za ní následuje doména spojovací (H), uložena mezi DNA vazebnou a ligand vazebnou doménou. Vazba ligandu je zprostředkována přes C-terminální doménu a to ligand vázající doménu (LBD), která je zahrnuta do aktivační

funkční domény 2 (AF2). Ta slouží k dimerizaci ER a aktivaci transkripce závislé na ligandu (Nilsson *et al.*, 2001, Bunone *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 1996).

Podobnost obou receptorů na úrovni aminokyselin je vysoká. Identita DBD je dokonce až 97 %. U LBD se jedná o 56 % a N-terminální doména je homologní na pouhých 24 % (Delaunay *et al.*, 2000). Mimo homologii vykazují oba receptory i stejnou afinitu k estradiolu a vážou stejné responzivní elementy DNA (Heldring *et al.*, 2007).

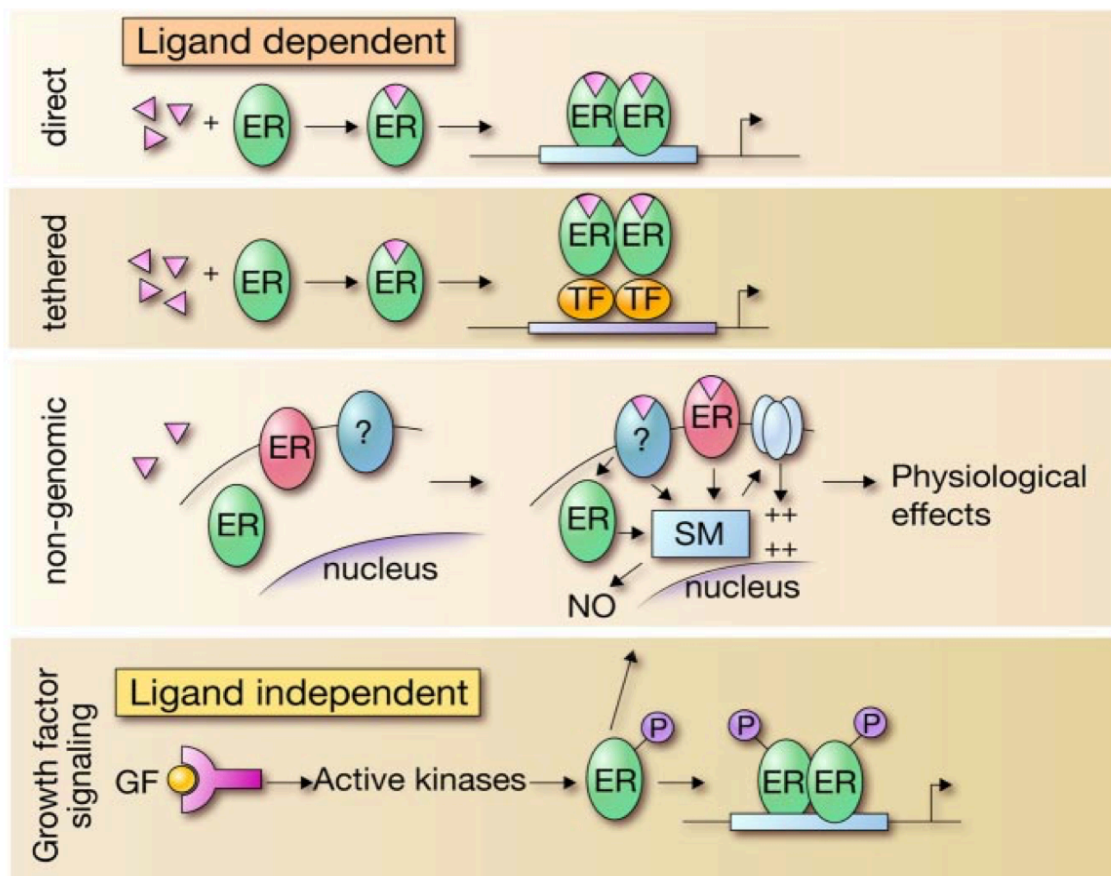


Obr. 2 Primární proteinová struktura nukleárních receptorů: AF1 - aktivační funkce jedna; DBD - DNA binding domain; H - spojovací struktura; LBD - ligand binding domain; AF2 - transaktivační funkce 2. Převzato a upraveno z: Garcia *et al.*, 2018

Existuje několik odlišných cest aktivace transkripce prostřednictvím ER, viz Obr. 3. První cestou je vazba ligandu na LBD. LBD je složena z 12 α -helixů (H1-H12), které jsou důležité pro změnu konformace. Tvoří hydrofobní dutinu, kde je estrogen schopný se vázat (Nilsson *et al.*, 2001; Brzozowski *et al.*, 1997). Po navázání ligandu tvoří estrogenové receptory homodimery (ER α -ER α , ER β -ER β) nebo heterodimery (ER α -ER β). Takto dimerizované receptory jsou schopné se vázat přes DBD na ERE (estrogen response elements) a přes ERE dále na DNA. ER jsou schopné se vázat na DNA i nepřímo a to pomocí transkripčních faktorů nazývaných jako AP1 (activating protein 1) či SP1 (specifity protein 1). Touto protein-proteinovou interakcí je ovlivněna řada genů neobsahujících ERE (Kushner *et al.*, 2000; Saville *et al.*, 2000). Prostřednictvím SP1 je například aktivován gen pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) nebo protoonkogen kódující c-fos (Duan *et al.*, 1998).

ER interagují také s koaktivátory a korepresory transkripce. Tyto molekuly jsou převážně enzymy, které jsou schopné acetylace/deacetylace, fosforylace/defosforylace a metylace/demethylace. Tím ovlivňují signalizaci ER modifikací proteinu v blízkosti míst, kde jsou na ER vázány (Smith *et al.*, 1997). Koaktivátory se váží na hydrofobní vazebné místo tvořené H3, H5 a H12 (Mak *et al.*, 1999). Interagují skrze motiv LxxLL na AF2 doméně, kdy L značí leuciny a x neurčenou aminokyselinu (Heery *et al.*, 1997). Po vazbě koaktivátorů dochází ke vzniku preiniciačního komplexu, acetylaci

histonů a možnost transkripce. Rodinou známých koaktivátorů je například SRC (steroid receptor co-activator) (Spencer *et al.*, 1997). Z korepresorových proteinů jsou to SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) a NCoR1 (nuclear receptor corepressors 1). Ty se váží na receptory až po navázání antagonistického ligandu a způsobují inhibici transkripce (Mottis *et al.*, 2013).



Obr. 3 Model odlišných molekulárních drah regulace ER. Ligand závislá aktivace transkripce přes ERE, transkripční faktory a třetí “negenomická”. A ligand nezávislá regulace s využitím kináz. Převzato z: Heldring *et al.*, 2007

Mimo dobře prozkoumané účinky ligandu na ER, existují i velmi rychlé účinky, které se objeví během několika sekund či minut po přidání ligandu. Mezi tyto účinky patří aktivace kináz a fosfátáz a zvýšení toku iontů přes membránu (Heldring *et al.*, 2007). Signalizace pravděpodobně funguje přes ER v kontaktu s cytoplazmatickou membránou. Důležitým prvkem je v tomto případě palmitoylace cysteinového zbytku ER, který ER s membránou spojuje (Acconcia *et al.*, 2005).

Další cestou je aktivace proteinu ER bez navázání ligandu - tzv. ligand nezávislou aktivací. MAP kinázová signalizace, zajištěna například růstovými faktory,

vede k fosforylaci proteinu ER na serinovém zbytku v AF1 a tím i k buněčnému růstu buněk nezávislých na estrogenu (Coutts & Murphy, 1998; Kato *et al.* 1995).

Je experimentálně podloženo, že estrogény hrají roli ve vývoji a růstu rakoviny prsu (Lupulescu, 1995). Tvorbu nádorů lze objasnit různými mechanismy. Jedním z nich je právě nadměrná stimulace orgánu, ve kterém je růst a funkce pod endokrinní kontrolou (Henderson *et al.*, 1982). Tato stimulace vede od normálního růstu k neoplazii. Riziko se vysvětluje kumulativní expozicí prsní tkáně estrogenu (Pike *et al.*, 1993). Existuje jistá korelace mezi hladinou estrogenů a zvýšeným rizikem rakoviny (Khan *et al.*, 1994). Nezáleží jen na hladině estrogenů. Dalším viníkem vzniku nádoru může být ztráta tumor-supresorového genu, což má za následek poruchu v down-regulaci ER či selhání v zastavení dělení buněk exprimující ER (Shoker *et al.*, 1999).

Existují dva typy estrogenových receptorů – ER α a ER β . ER α má vyšší afinitu k estrogenu. *In vitro* společně tvoří heterodimery a ER β touto formou funguje jako fyziologický regulátor a tím snižuje afinitu k estrogenu formy ER α (Hall *et al.*, 1999). Exprese obou receptorů v normální tkáni je neznámá. Ovšem je známo, že exprese ER α je v nádorových buňkách vyšší než exprese ER β (Leygue *et al.*, 1998). Z toho vyplývá, že poměr exprese zmíněných dvou typů receptorů je důležitý.

2.2.2 Progesteronový receptor (PR)

PR jsou exprimovány jako dvě proteinové izoformy – PR-A a PR-B, které byly objeveny počátkem sedmdesátých let. Oba receptory vychází z jednoho genu a řadí se opět do skupiny jaderných receptorů transkripčních faktorů. Bylo potvrzeno, že PR-A a PR-B mají různé ligační a transkripční aktivační vlastnosti (Conneely *et al.*, 2000). Poměry jednotlivých izoform se za normálních okolností liší v reprodukčních tkáních v závislosti na vývoji a hormonálním stavu organismu (Shyamala *et al.*, 1990).

Steroidní hormon progesteron hraje důležitou roli v reprodukčních událostech zahrnující nástup a udržování těhotenství (Conneely *et al.*, 2000).

Izoformy PR-A a PR-B mají odlišné funkční domény charakteristické pro ligandem aktivované nukleární transkripční faktory (Misrahi *et al.*, 1987). Obě formy obsahují N-koncovou doménu obsahující AF1. Ta je zodpovědná za interakci s transkripčními regulátory. Izoforma B má navíc N-koncovou část tvořenou

164 aminokyselinami nazývanou B-upstream segment (BUS) a tím tvoří specifickou AF3 doménu, která se v izoformě A nevyskytuje a tím ji dělá zkrácenou. BUS zprostředkovává tvorbu intramolekulárních struktur, které podporují účinnější vazbu na kofaktor. N-koncová část izoformy A ale obsahuje inhibiční doménu (ID), která je součástí AF1 (Tung *et al.*, 2006; Giangrande *et al.*, 1997). Dále i jako u estrogenového receptoru nacházíme DBD. Ta je zodpovědná za interakci s PREs (progesterone respondent elements) promotoru cílového genu. Následuje ji spojovací oblast H s NLS oblastí (nukleární lokalizační sekvence) a LBD s oblastí, která je důležitá pro konformační změnu a dimerizaci (DD). Další v pořadí je transaktivační doména AF2, která je aktivní až po navození dimerizace (Misrahi *et al.*, 1993; Kastner *et al.*, 1990; Misrahi *et al.*, 1987). Izoforma B obsahuje oproti A větší množství fosforylačních míst. Šest fosforylačních míst je specifických pro doménu BUS a sedm míst je společných pro obě izoformy (Ward *et al.*, 2009).

Klasický mechanismus působení je obdobný jako mechanismus působení ER. V nepřítomnosti ligandu existuje PR v komplexu s chaperonovými proteiny včetně heat shock proteinů Hsp90, Hsp70 a Hsp40 (Cheung *et al.*, 2000). Takto vytvořený komplex má nutnou konformaci k vazbě ligandu (Smith, 1993). Vazba ligandu způsobí disociaci od chaperonů a změnu konformace (Tsai *et al.*, 1994). Dimerizovaný PR se translokuje do jádra, převážně díky NLS (Kastner *et al.*, 1990). Mutace v této sekvenci vede ke kumulaci PR v cytoplasmě a opožděné reakci na přítomnost progesteronu (Kakar *et al.*, 2006). Nukleární dimery se vážou na promotorové oblasti genů a regulují jejich transkripci. I jako v případě ER, se v tomto případě na regulaci podílejí koaktivátory (SRC) a korepresory (SMRT, N-CoR) (Li *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 1999).

Transkripční aktivita je také regulována fosforylací. Mutace ve dvou klíčových serinových fosforylačních místech Ser190 a Ser294 vedou ke snížené transkripci i po navázání ligandu (Takimoto *et al.*, 1996). Ovšem mutace jiného fosforylačního místa, Ser400, vede v přítomnosti progesteronu ke zvýšení (Pierson-Mullany *et al.*, 2004).

Na buňkách rakoviny prsu bylo zjištěno, že izoforma PR-B je mnohem účinnější up-regulátor transkripce. V porovnání s PR-A je až patnáctkrát efektivnější. Na deseti testovaných genech se dokázalo, že jsou regulovány PR-A nebo PR-B a hrají důležitou roli v morfogenezi nebo tumorigenezi (Richer *et al.*, 2002). I přes vyšší aktivitu PR-B,

existují geny, které jsou regulovány pouze izoformou PR-A. Celkový poměr obou forem je velmi důležitý pro výslednou funkci progesteronu. V případě nádoru prsu je detekována zvýšená koncentrace především PR-B (Branchini *et al.*, 2009).

PR jsou důležité speciálně pro duktální proliferaci spojenou s těhotenstvím a luboalveolární diferenciací mléčného epitelu. Jejich ablace vede k výraznému snížení incidence nádoru (Lydon *et al.*, 1999). V normální zdravé tkáni je poměr izoform vyrovnaný. Mění se ovšem při vývoji rakoviny prsu (Graham *et al.*, 1995). V tomto případě je snížena exprese PR-B, a tudíž převládá PR-A (Mote *et al.*, 2002). Změněný růst v závislosti na zvýšení exprese PR-A byl demonstrován na transgenní myších, které po působení vykazovaly hyperplastický fenotyp podobný časným stádiím rakoviny prsu (Shyamala *et al.*, 1998). Transgenní myši také vykazovaly sníženou expresi p21, inhibitoru kinázy, který brání aktivaci buněčného cyklu (Chou *et al.*, 2003). Zvýšená proliferace je také zajištěna sníženou expresí TGFβ1 (Simian *et al.*, 2009). Poměr izoform lze využít jako prediktivní marker pro výběr terapie (Hopp *et al.*, 2004).

2.2.3 Androgenový receptor (AR)

AR je jaderný receptor, který se z velké části podílí na vývoji mužského fenotypu. Je aktivován především androgenními hormony testosteronem a 5α-dihydrotestosteronem (Gelman, 2002). Jelikož nadměrná aktivace AR xenobiotiky urychluje závažnost některých onemocnění jako je rakovina prostaty či syndrom necitlivosti na androgen (AIS), je AR jedním z cílů pro testování toxicity léků (Tan *et al.*, 2015; Edwards *et al.*, 1999).

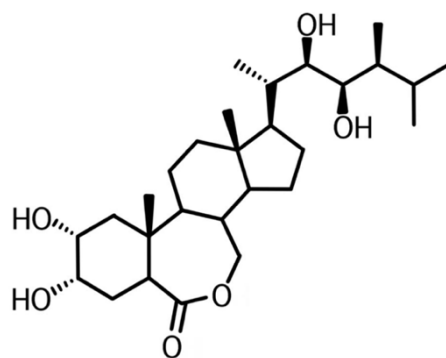
Struktura AR je velmi blízká struktuře ER a PR. Primární aminokyselinové sekvence LBD zmíněných třech receptorů jsou rozdílné, ovšem podobnost v trojrozměrné struktuře LBD AR a jiných steroidních receptorů je vysoká. Na úrovni aminokyselinové sekvence se vyskytují s maximální 20% identitou (Shiau *et al.*, 1998). Aminokyselinová sekvence DBD AR je avšak na 79 % identická s PR a na 56 % s ER α (Gelman, 2002).

Androgenní hormony regulují především expresi klíčových regulátorů buněčného cyklu – cyklin-dependentní kinázy 2 a 4 a inhibitoru buněčného cyklu p27. Exprese a funkce androgenových receptorů je často studována v buněčných liniích

získaných od pacientů s rakovinou prostaty. Je zřejmé, že ablace androgenu nebo aplikace antagonistů AR vede ke snížení růstu nádoru u většiny pacientů s rakovinou prostaty, proto je AR terapeutickým cílem při léčbě hormonálně-dependentních karcinomů prostaty (Heinlein & Chang, 2004). Jednou z možností léčby je terapie antiandrogeny. Antiandrogeny fungují na principu blokády vazby androgenů na AR. Vhodnými zástupci jsou nesteroidní antiandrogeny – flutamid, bicalutamid, nilutamid. Jejich výhody užití spočívají v nepřítomnosti „flare up“ fenoménu způsobeného zvýšenou hladinou testosteronu. Také jsou redukovány návaly horka a příznaky z nedostatku androgenů. Vykazují i nežádoucí účinky. Ty ovšem po přerušení léčby rychle mizí. U nilutamidu byla pozorována intolerance na alkohol a poruchy vidění jako je adaptace na světlo/tmu (Belej & Kaplan, 2008).

2.3 Brassinosteroidy (BR)

BR je skupina polyhydroxylových rostlinných hormonů. Na začátku 30. let minulého století si vědci všimli, že extrakty pylu určitých rostlin mají jistý vliv na růst rostlin. Pomocí biotestů byl proveden screening více než 60 druhů pylu a zjistili, že polovina z nich, zahrnující i *Brassica napus* L. neboli brukev řepka (Carl Nilsson Linnaeus), podporovaly růst prvních internodií (Mitchell *et al.*, 1941). V roce 1970 ji byl přiřazen název brassin (Mitchell *et al.*, 1970). Bylo purifikováno 10 mg krystalického brassinolidu, konečného produktu syntézy BR, ze skoro 230 kg pylu z *B. napus* a z něj byla stanovena struktura (Grove *et al.*, 1979). Ukázalo se, že je strukturálně 22R,23R,24S)-2a,3a,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7-oxa-5a-cholestan-6-on, brassinolid, který je velmi podobný zvířecímu steroidnímu hormonu, viz Obr. 4. Druhý brassinosteroid castasterone byl izolován až v roce 1982 (Yokota *et al.*, 1982).



Brassinolid

Obr. 4 Chemická struktura brassinolidu

V posledních dvou desetiletích došlo díky charakterizaci receptoru pro BR k většímu porozumění syntézy a signální cesty BR. Došlo k pochopení distribuce BR v tkáních, kdy se prokázalo, že jsou přítomny v celé rostlině, ale jejich množství se mění v závislosti na typu tkáně. Jejich větší množství je v pylu, semenech a mladých tkáních. Jejich pokles byl zaznamenán ve výhoncích a starých listech. Tudíž lze vyvodit, že jejich potřeba je v rostoucích tkáních či reprodukčních orgánech (Shimada *et al.*, 2003; Choe *et al.*, 2001). Dbalo se na pochopení principu udržení a regulování homeostázy. Bylo charakterizováno několik enzymů, které hrají klíčovou roli v jejich biosyntéze. Jeden ze zmíněných enzymů je například DWF4, v jehož přítomnosti je biosyntéza BR zpomalena (Choe *et al.*, 1998). Takové enzymy jsou součástí zpětné vazby regulace BR při jejich nadměrných hodnotách mechanismů, které stále nejsou zcela objasněny.

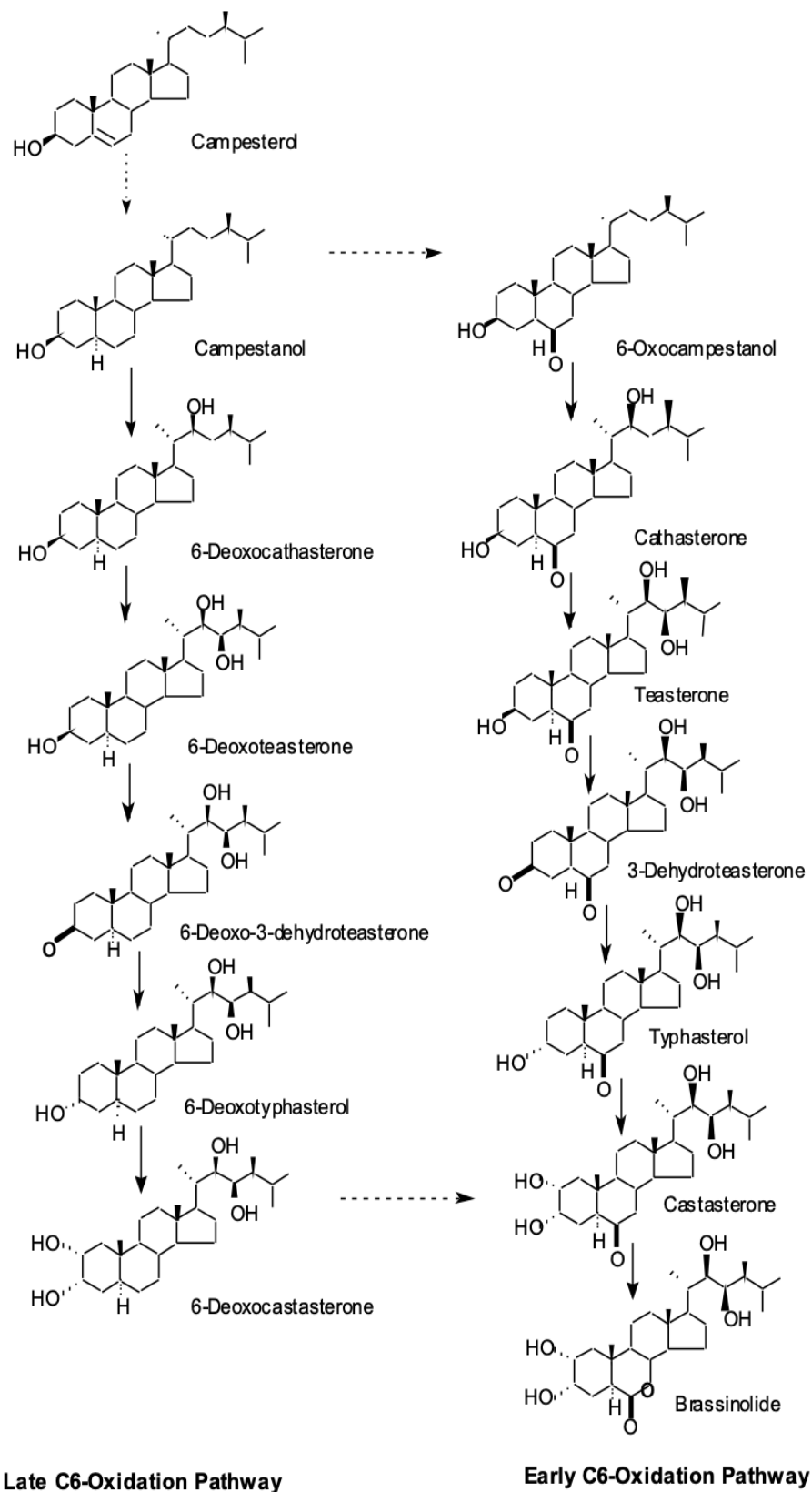
2.3.1 Funkce brassinosteroidů v rostlinách

Bylo dokázáno, že se brassinosteroidy podílejí na zvýšení výnosu u různých plodin. Využití brassinolidu při terapii rostlin rýže zapříčinilo významné zvýšení hmotnosti listů a semen (Lim & Han, 1988; Cohen & Meudt., 1983). BR také zvýšily hmotnost listů i semen v rostlinách kukuřice (Lim & Han., 1988). Mimo jiné byl pozorován vliv brassinolidu na zvýšení obsahu škrobu v bramborách (Khripach *et al.*, 1999).

Ošetřením rostliny brassinolidem se může zvýšit i její schopnost snášet výkyvy teplot a být tím odolnější proti nízké a vysoké teplotě. BR zvyšují odolnost vůči chladu v rostlinách kukuřice (He *et al.*, 1991; Katsumi *et al.*, 1991). Naopak zvyšuje brassinolid expresi heat shock proteinů v rajčatech (Dhaubhadel *et al.*, 1999). Ošetření některých rostlin také vedlo ke zvýšení tolerance na sucho, kdy pšenice vykazovala zvýšený růst i při horších podmínkách (Sairam *et al.*, 1994). Bylo také dokázáno, že brassinolid může indukovat rezistenci tabáku proti viru tabákové mozaiky či patogenu z rodu *Pseudomonas* (Nakashita *et al.*, 2003). Podporují také expanzi a prodloužení buněk modulací plasticity a relaxace buněčné stěny a stimulují dělení buněk v protoplastech (Koka *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1995). Také reagují s některými rostlinnými hormony a regulují růst a vývoj rostliny (Takeno *et al.* 1982).

2.3.2 Biosyntéza BR

BR jsou syntetizovány z rostlinných sterolů. Kampesterol a jeho analogy jsou prekurzorem brassinolidu. Syntéza BR probíhá dvěma způsoby - časnou oxidační cestou C-6 a pozdní oxidační cestou C-6 (Fujioka *et al.*, 2000). Prvním krokem je přeměna kampesterolu na kampestanol. Poté probíhá časná oxidace na 6-oxokampestanol či pozdní oxidace na 6-deoxocathasterone viz Obr. 5. Dalšími kroky probíhá syntéza až na brassinolid (Jang *et al.*, 2000).



Obr. 5 Cesty biosyntézy brassinolidu. Převzato z: Jang *et al.*, 2000

2. 1. 1. Brassinosteroidy v medicíně

Nejen, že BR našly velké uplatnění v zemědělství, jejich potenciál se využívá i v medicíně. Proběhlo několik testování na protivirovou aktivitu proti lidským a zvířecím virům. Brassinolid prokázal *in vitro* inhibiční aktivitu proti řadě DNA a RNA virům (Sharma *et al.*, 2007). Při testování proti viru spalniček bylo potvrzeno dokonce 27 derivátů/analogů BR s antivirovou aktivitou (Wachsman *et al.*, 2002). Byla prokázána i inhibice replikace viru herpes simplex typu I v přítomnosti syntetického derivátu BR (Wachsman *et al.*, 2004). Další *in vitro* studie prokázaly inhibici či úplné zastavení růstu viru HIV v infikovaných buňkách podáním 24-epibrassinolidu. Proto je 24-epibrassinolid vhodný k prevenci a léčbě infekce HIV (Khripach *et al.*, 2005).

Mimo jiné vykazují BR i antiproliferační, cytotoxický, protinádorový, neuroprotektivní či antiangiogenní účinek. Jejich antiproliferační účinky byly potvrzeny inhibicí buněčného růstu a bloádou buněčného cyklu v G₁ fázi v prsních buňkách po působení dvou přírodních brassinosteroidů 28-homokastasteronu a 24-epibrassinolidu (Steigerová *et al.*, 2010).

Byla také prokázána antiangiogenní aktivita analogu BR4848 v endotelových buňkách lidské pupečnickové žíly (HUVEC). Byly zkoumány procesy probíhající během angiogeneze – adheze a migrace buněk. Po aplikaci analogu brassinosteroidů BR4848 došlo k poklesu až k téměř úplné inhibici migrace buněk. Adheze buněk byla testována na plastovém povrchu a plastovém povrchu s kolagenem. Již po 30 minutách byla pozorována výraznější inhibice adheze buněk k obou typům povrchů po působení BR4848 vzhledem ke kontrolním buňkám bez aplikace brassinosteroidu. BR4848 snížil proliferaci a tvorbu kapilár endotelových buněk (Rárová *et al.*, 2018).

Protinádorová aktivita řady analogů přírodních BR na několika rakovinných buněčných liniích byla testována ve studii Malíková *et al.* (2008). U části BR byla zjištěna cytotoxická aktivita. Životaschopnost a proliferace buněk po působení látek 28-homocastasteron a 24-epibrassinolid byla pozorována na buněčných liniích hormonálně senzitivních/ necitlivých karcinomu prsu a prostaty, jelikož výsledky předchozích testů vedly k domněnce, zda cytotoxicita zmíněných látek není zapříčiněná interakcí brassinosteroid-steroidní receptor. Oba BR inhibovaly růst buněk v závislosti na dávce ve všech otestovaných buněčných liniích.

Ismaili *et al.* (2012) testovali neuroprotektivní účinky BR v neuronálních buňkách PC12 proti neurotoxinu o kterém je známo, že indukuje oxidační stres a degeneraci dopaminergních neuronů, které jsou charakteristické pro Parkinsonovu chorobu. Pozitivní účinek vykazovalo 6 z 9 testovaných BR a analogů BR, kdy došlo k ochraně neuronální buňky před působením neurotoxinu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Buněčná linie a testované látky

V experimentální části byla použita buněčná linie MCF7 odvozená od lidského adenokarcinomu prsu (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie).

K testování byly použity steroidní látky:

- RN6B (Miroslav Kvasnica, KEB) – analog BRs
- MK349 (Miroslav Kvasnica, KEB) – analog BRs
- triolon (Miroslav Kvasnica, KEB) – steroidní jádro látek MK349 a RN6B
- MU-5562 (Dr. Eva Kudová, ÚOChB Praha) – analog estradiolu
- MU-5611 (Dr. Eva Kudová, ÚOChB Praha) – analog estradiolu

3.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- Aprotinin (Sigma)
- Bisakrylamid (Sigma)
- Butanol (Sigma)
- Chemiluminiscenční kit West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)
- Coomassie brilliant blue (Sigma)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Panreac Applichem)
- Dithiothreitol (DTT) (Roche Diagnostics)
- Dulbecco's Modified Eagle 's Medium (DMEM) (Sigma)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Fluka)
- Etanol 95 %, 96 % (Sigma)

- Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA) (Serva)
- Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma)
- Fetální telecí sérum (FBS) (Biowest)
- Fluorid sodný (NaF) (Sigma)
- Fluorsave reagent (EMD Milipore)
- Glutaraldehyd (Fluka chemie ag)
- Glycin (Calbiochem)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Biowest)
- Kyselina fosforečná (Sigma)
- L-glutamin (Sigma)
- Leupeptin (Sigma)
- Luminol (Thermo Scientific)
- NaCl (Penta)
- Nonidet P-40 (oktylfenoxypolyethoxyethanol) (Sigma)
- Penicilin-Streptomycin (Sigma)
- Peroxid vodíku (Thermo Scientific)
- Peroxodisíran amonný (APS) (Biorad)
- Tetrametyletylendiamin (TEMED) (Biorad)
- Tris (hydroxymetyl) aminometan (TRIS) (VWR Biochemicals)
- Triton X-100 (Sigma)
- Tween 20 (MP Biomedicals)

Použité roztoky

- 0,2 % BSA v PBS: 0,2 g BSA do 100 ml PBS 1x
- 0,2 % Triton X-100 v PBS: 200 µl Triton x-100 do 100 ml PBS 1x
- 1 M TRIS/ HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/ 200 ml pH 6,8
- 1 M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/ 400 ml pH 8,8

- 10 % APS: 0,1 g / 1 ml H₂O
- 10 % DMEM: 10 % fetální sérum, L-glutamin (2 mM), streptomycin (0,1 mg/ml) a penicilin (100 U/ml)
- 10 % SDS: 5 g SDS / 50 ml H₂O
- 5 % mléko: 2,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS s 50 µl Tweenu
- AA+Bis: 30 % Akrylamid (AA) + 0,8 % Bisakrylamidu (Bis AA): 58,4 g AA + 1,6 g Bis AA/200ml
- Činidlo Bradford: 0,01 % Coomassie brilliant blue; 95 % etanol; 85 % kyselina o-fosforečná
- Elektroforetický pufr: 37,8 g TRIS, 180 g Glycin, 12,5 g SDS do 2,5 l H₂O
- Chemiluminiscenční činidlo luminol-peroxid (1:1)
- PBS + Tween: 500 ml PBS 1x + 500 µl Tweenu
- PBS: 800 g NaCl; 2 g KCl; 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 g KH₂PO₄ pH 7,4
- Ponceau S: 0,1 g rozpustit v 0,5 ml 98 % CH₃COOH a doplnit do 800 ml H₂O
- Pufr na western blotting 10x: 30,3 g TRIS, 144 g Glycin do 1 litru H₂O
- RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2 % Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2 mM NaF
- Separační gel 10 % - akrylamid+bisakrylamid (AA+Bis) 3,125 ml; H₂O 2,67 ml; TRIS pH 8,8 3,5 ml; SDS 10% 94 µl; Temed 6,25 µl; APS 37,5 µl
- Separační gel 12,5 % - akrylamid+bisakrylamid (AA+Bis) 3,9 ml; H₂O 1,94 ml; TRIS pH 8,8 3,5 ml; SDS 10% 94 µl; Temed 6,25 µl; APS 37,5 µl
- TBS 10x: pH 7,6; 24,2g TRIS, 80 g NaCl, HCl podle pH (asi 14 ml)
- TBS s 0,1 % Tweenem 20: 500 ml TBS 1x + 500 µl 0,1 % Tween 20
- TRIS-HCl pH 7,4: 24,23 g 1M Tris, cca 12 ml HCl
- Trypsin/EGTA (1:1): 0,1 % trypsin, 0,25% EGTA
- Zaostrovací gel 5% - akrylamid+bisakrylamid (AA+Bis) 420 µl; H₂O 1,755 ml; TRIS pH 6,8 315 µl; SDS 10% 25 µl; Temed 2,5 µl; APS 15 µl

3.3 Použité protilátky

Tab. 3 Seznam použitých primárních protilátek

		Zdroj	Klon	Ředění	Výrobce
36	α -tubulin	myš (mono)	DM1A	WB: 100x	Sigma
136	ER β	králík (poly)	-	WB:100x IF: 200x	SantaCruz
160	β -Actin	myš (mono)	C4	WB: 5000x	Santa Cruz
369	AR	králík (mono)	D6F11	WB: 1000x	Cell Signaling
419	PR	králík (mono)	D8Q2J	WB: 250x IF: 500x	Cell Signaling
433	phospho-FAK	králík (poly)	Ser732	WB: 100x	Thermo
435	ER α	králík (mono)	D8H8	WB: 500x IF: 200x	Cell Signaling
436	ER β	myš (mono)	PPG5/10	IF: 200x	Thermo
442	AR	myš (mono)	441	IF: 500x	Santa Cruz
443	ER α	myš (mono)	F-10	IF: 200x	Santa Cruz
495	Dynein light chain	králík (poly)	-	WB: 100x IF: 200x	Abcam
496	pMARCKS	králík (poly)	S162	WB: 100x IF: 200x	Abcam
497	Profilin 2	králík (poly)	-	WB: 50x IF: 100x	Abcam
498	Vinculin	Králík (mono)	-	WB:5000x IF: 200x	Abcam

WB: western blot, IF: imunofluorescence

Tab. 4 Seznam použitých sekundárních protilátek

		Zdroj	Ředění	Výrobce
45	TR	koza (poly)	IF: 1000x	Jackson Laboratories
	Goat-anti-rabbit			
430	Alexa Fluor 488	králík (poly)	IF: 1000x	Thermo
	Rabbit-anti-mouse			
176	Alexa Fluor 488	koza (mono)	IF: 1000x	Invitrogen
	Goat-anti-rabbit			
	RAM/Px	králík	WB: 1000x	Sigma-Aldrich
	SWAR/Px	prase	WB: 1000x	Cell Signaling

3.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Aparatura pro vertikální elektroforézu, BioRad
- Aparatura pro western blotting, BioRad
- Centrifuga CompactStar CS4, VWR
- Fluorescenční mikroskop IX51, Olympus
- Gelový dokumentační systém LAS 4000, Fujifilm
- Chlazená centrifuga Heraeus Megafuge 16R, ThermoFisher Scientific
- Inkubátor MCO-19AIC, Panasonic
- Kývačka, Biosan
- Laminární box, Telstar
- Magnetická míchačka, VELP Scientifica
- Minicentrifuga D1008, DLAB Scientific
- Optický mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss
- Termoblok, ThermoFisher Scientific

- Ultrazvuková lázeň RK 31, Bandelin
- Ultrazvukový homogenizátor, Bandelin
- UV-VIS spektrofotometer UV-1800, Shimadzu
- Vakuová pumpa Vacusafe comfort, Integra Biosciences a KNF
- Vodní lázeň, GFL
- Vortex V-1 plus, Biosan
- Zdroj napětí PowerPac Basic, BioRad

Výrobce/stát:

BioRad (USA), ThermoFisher Scientific (USA), Fujifilm (Japonsko), Biosan (Litva), VELP Scientifica (Itálie), Olympus (Japonsko), VWR (USA), Bandelin (Německo), Shimadzu (Japonsko), Integra Biosciences (Švýcarsko), Gesellschaft für Labortechnik – GFL (Německo), DLAB Scientific (Čína, USA), Panasonic (Japonsko), Zeiss (Německo).

3.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

3.5.1 Kultivace a ovlivnění buněčné linie testovanou látkou

Buněčná linie MCF7 byla kultivována na Petriho misce o průměru 100 mm v kultivačním médiu DMEM. Byly udržovány optimální teplotní podmínky 37 °C, 5,5 % atmosféra oxidu uhličitého a 100 % vlhkost. Do kultivačního média 10% DMEM bylo odměřeno 20 ml fetálního bovinního séra, 2 ml penicilinu-streptomycinu, 2 ml glutaminu a vše bylo doplněno DMEM na 200 ml. Kultivační médium bylo vždy použito ohřáté ve vodní lázni na 37 °C.

Pro množení buněk byly buňky třikrát týdně pasážovány. Cílem pasážování je naředění buněk a jejich přenos do nové kultivační misky s novým médiem. Před každým pasážováním byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem, kdy se kontrolovala kondice, kontaminace a především jak buňky narostly. Staré médium bylo odsáto, narostlé buňky byly opláchnuty roztokem EGTA, pomocí trypsinu byly odlepeny od dna misek a poté centrifugovány opět s přídavkem DMEM, aby byl

trypsin jeho účinkem deaktivován. Výsledný pelet byl resuspendován v určeném objemu kultivačního média a přenesen na nové Petriho misky dle potřeb testování. Objem buněk s kultivačním médiem byl v misce vždy doplněn na 10 ml.

K testování bylo nezbytné počítání buněk. Bürkerova komůrka byla naplněna 10 μ l směsí média s buňkami. Pod mikroskopem byly spočítány buňky v šestnácti čtvercích ohraničených dvojitou čarou. Počet výsledných buněk byl vynásobený 10 000 a udával nám jejich výsledné množství v 1 ml. Pro nasazení buněk na imunofluorescenční analýzu jich bylo za potřebí 15 000 na jamku (250 μ l). Na provedení western blotu jich bylo 700 000 buněk na misku (10 ml).

Při imunofluorescenční analýze byly buňky první den po počítání rozděleny do jamek ve zmíněném počtu. V tomto vhodném počtu byly inkubovány 24 hodin a poté ovlivněny testovanými látkami ředěnými do 10% DMEM. Do jamek s kontrolními buňkami bylo přidáno DMSO ve stejné koncentraci jako testované látky. Po 1 hod/24 hod byly buňky opláchnuty PBS a zafixovány 10% glutaraldehydem. Následně zafixované destičky byly uloženy do +4 °C před nanášením protilátek.

Pro provedení WB byl nasazen určitý počet misek (6-11 podle testovaných látek a koncentrací), které se opět nechaly 24 hodin inkubovat při vhodných podmínkách. Následující den bylo odsáto médium a byly napipetovány testované látky naředěné v 10 ml média či pouze médium/médium s DMSO v případě kontrolních vzorků. Po uplynutí dalších 24 hodin byly látky připravené na sklízení.

3.5.2 Sklizení a lyzování buněk pro WB

Buňky byly z misek uvolněny seškrábáním a poté byly přepipetovány i s médiem do předem nachystaných a nachlazených zkumavek. Poté byl do misek přidán 1 ml vychlazeného PBS a stejným způsobem byly zbytky buněk seškrábány a opět přepipetovány do stejné zkumavky. Poté byly centrifugovány 10 min/1000g při 4 °C, bylo odsáto médium a přidán 1 ml PBS. Pelet byl resuspendován a opět centrifugován. Staré PBS bylo odsáto a bylo přidáno nové, ve kterém byl pelet znovu resuspendován a přenesen do nachystaných eppendorfek, které byly opět zcentrifugovány za stejných podmínek. Následovalo finální odsání supernatantu a uchování peletu v -80 °C po dobu 24 hodin. Celý proces sklízení byl prováděn na ledu.

Při lyzaci byl v prvním kroku na ledu připraven lyzační RIPA pufr. Podle množství peletu byl pufr v určitém objemu přidán ke vzorkům a společně bylo vše promícháno a inkubováno 30 minut. Během inkubace bylo vše ještě třikrát promícháno. Poté bylo vše ultrazvukováno a následně centrifugováno 10 min/14 000 g při teplotě 4 °C. Poté byl supernatant přepipetován do čistých eppendorfek, při čemž byl zjištěn jeho objem.

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bradfordovy metody. Měření se provádělo vždy v duplikátu. Do zkumavky byl přidán 1 ml Bradfordova činidla (ředěno s deionizovanou vodou 1:4) a poté 1 µl vzorku a zvortexován. Společně byl vzorek s činidlem inkubován 10 minut. Objemy zkumavek byly postupně přelity do kyvet a byla měřena jejich koncentrace na spektrofotometru pomocí měření absorbance při 595 nm. Z naměřených hodnot byly vypočteny koncentrace proteinů ve vzorcích. Následně byly potřebné vzorky naředěny lyzačním pufrem tak, aby finální koncentrace byly stejné. Opět byly změřeny koncentrace všech vzorků v duplikátu a následně doředěny lyzačním pufrem. Do finálních objemů bylo přidáno 5xSDS v poměru 1:4 ke vzorku a poté bylo vše 5 minut denaturováno v 95-98 °C. Přidáním SDS dojde při zvýšené teplotě k denaturaci a také dodá proteinům negativní náboj. V této fázi byl vzorek připraven na SDS-PAGE. Vzorky byly uchovány v -20 °C.

3.5.3 SDS-PAGE a western blot

Důležitou částí byla příprava vhodného polyakrylamidového gelu, který je běžně využíván k separaci proteinů. Pro dělení byl připraven 10% nebo 12,5% dělicí gel a 5% gel zaostřovací. Nejprve byl do elektroforetické komůrky rovnoměrně napipetován dělicí gel, který byl následně pokryt tenkou vrstvou butanolu, který ho zarovnal. Gel poté tuhnul minimálně 45 minut. Po ztuhnutí byl opláchnut butanol a napipetován zaostřovací gel. Do neztuhlého zaostřovací gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek, poté opět gel tuhl. Výsledný gel byl před SDS-PAGE uchován ve vlhkém a chladném prostředí v lednici při +4 °C.

Gely byly vloženy do elektroforetické aparatury. Mezi gely a do okolí byl nalit elektroforetický pufr. Poté byly opatrně vytaženy hřebínky. Do první jamky byly nanесeny 4 µl molekulového markeru. Do ostatních jamek bylo nanесeno 30 µg každého vzorku. Vzorky byly předem ohřáty na 96 °C po dobu 2 minut. Poté byl

připojen a zapnut zdroj s napětím 90 V. Po zajištění vzorků do dělicího gelu bylo zvýšeno napětí na 120 V. Vzorky byly dále separovány přibližně 1 hod do doby, než začaly vzorky z gelu vyjíždět. Během elektroforézy byly proteiny separovány na základě jejich molekulové hmotnosti, jelikož měly všechny proteiny po přidání SDS do vzorků stejný záporný náboj. Záporně nabitě proteiny se po zapojení zdroje pohybovaly ke kladně nabitě elektrodě a tím došlo k jejich separaci.

Dále byl připraven blotovací pufr, blotovací aparatura a blotovací kazeta s porézní podložkou, filtračními papíry a nitrocelulózovou membránou. Gel byl opatrně odebrán ze skel špachtlí a byla odstraněna jeho vrchní část obsahující zaostřovací část. Na negativní pól blotovací kazety byla prvně položena porézní podložka, na ni 2 filtrační papíry a poté gel. Směrem od gelu k pozitivnímu pólu kazety byla položena na gel membrána a poté byly opět zrcadlově poskládány 2 filtrační papíry, porézní podložka a druhá strana blotovací kazety. Společně byly všechny části zavřeny do blotovací kazety pod hladinou blotovacího pufru. Před uzavřením bylo důležité odstranění bublin z kazety postupným stlačováním a jejich vyháněním směrem ze středu na kraj. Kazeta byla vložena do blotovací aparatury do které byl nalit vychlazený blotovací pufr. Také byla důležitá správná orientace elektrod, aby došlo k úspěšnému přenosu na membránu. Celá aparatura byla průběžně chlazena chladícími vložkami na elektromagnetických míchačkách. Chladící vložky byly v průběhu blotování měněny. Poté byl přiveden zdroj s 230 mA. Samotné blotování probíhalo 3 hodiny.

Po ukončení byla membrána vyjmuta a barvena po dobu 5 minut v roztoku Ponceau S z důvodu vizualizace proteinů. Následně byla přemístěna na krátkou dobu do deionizované vody a usušena.

3.5.4 Imunodetekce proteinů

Obarvená membrána byla nařezána na proužky podle potřeby. Před následnými kroky bylo odhadnuto množství protilátek potřebné k dostatečnému pokrytí celého proužku. Takto nařezaná membrána byla odbarvena ve 1x TBS. Poté byly hodinu blokovány ponořené v 50 ml 5% mléka v 1x TBS s Tweenem. Mezitím byla připravena vlhká komůrka – plastová podložka potažena parafilmem uložena do krabičky s malým množstvím vody, která brání proti vyschnutí. Protilátky byly naředěny opět do 5%

mléka v 1x TBS s Tweenem. Po hodinové blokaci, která vedla k zablokování nespecifických vazeb na membráně v místech, kde nebyly navázány proteiny, byly proužky krátce promyty v 1x TBS. Poté byly proužky postupně přeneseny na filtrační papír, kde měly čas trochu oschnout. Následně byly opatrně přeneseny na připravenou plastovou podložku a byla na ně nanášena primární protilátka. Proteiny s protilátkami byly inkubovány v lednici přes noc. Následující den byly promyty na 5 minut v TBS, 5 minut v TBS s Tweenem, opět na 5 minut v TBS a nakonec na 10 minut v TBS, aby se odmyly zbytky nenavázané primární protilátky. Sekundární protilátky byly ředěny do 5% mléka v 1x TBS s Tweenem. Po posledním promytí byly proužky opět seřazeny na plastovou podložku, nanášeny sekundární protilátky a společně bylo vše inkubováno. Po hodině byly proužky zase promyty: 10 minut v TBS, 5 minut v TBS s Tweenem, 5 minut v TBS a nakonec na 10 minut v TBS. Díky křenové peroxidáze konjugované se sekundární protilátkou byla detekce provedena na základě chemiluminiscence. Bylo připraveno chemiluminiscenční činidlo v poměru 1:1 luminol-peroxid. Po přidání substrátu, peroxidu vodíku, křenová peroxidáza katalyzovala oxidaci luminolu a to mělo za následek emisi světla. Vzniklý světelný signál byl zachycen chemiluminiscenční kamerou.

3.5.5 Imunofluorescenční analýza

Již zafixované buňky v destičkách byly třikrát opláchnuty 300 μ l PBS. Poté bylo dosaženo permeabilizace buněk nanášením 300 μ l 0,2% Triton X-100 v PBS po dobu 2 minut a opět bylo vše opláchnuto PBS ve třech sériích. Následovalo blokování nespecifických vazeb 0,2% BSA v PBS po dobu 20 minut. Mezitím byly naředěny do 0,2% BSA v PBS primární protilátky. Po nanášení 230 μ l primárních protilátek do každé jamky byly destičky inkubovány 1 hodinu. Po inkubaci byly opět opláchnuty ve třech sériích v PBS po 5 minutách, aby došlo k úplnému odmytí nenavázané primární protilátky. Mezi promýváním byly přichystány sekundární protilátky. Ty byly na buňky nanášeny a společně inkubovány 45 minut ve tmě. Po nanášení sekundárních protilátek bylo důležité udržovat buňky mimo nezbytnou dobu ve tmě. Po uběhlé inkubační době byly destičky opět opláchnuty ve třech sériích PBS, ale vždy po uběhnutí 10 minut. Po odlití poslední série PBS byly buňky zafixovány 1 kapkou Fluorsave. Fluorsave je vodné médium, jehož funkcí je zachovat buňky fluorescenčně obarvené. Obrázky byly pořízeny mikroskopem s kamerou při zvětšení 400x.

4 VÝSLEDKY

Modulace steroidních receptorů a cytoskeletu po ovlivnění steroidními látkami byla zkoumána pomocí dvou vybraných metod – imunofluorescenční analýzy a western blot analýzy. Jedním z cílů mé diplomové práce byla také optimalizace provedení zmíněných metod. Byl kladen důraz na správný výběr protilátek, jejich koncentrací a koncentrací testovaných látek. Fixace buněk i postup provedení byl již z dřívějšíka doladěn laboratoří.

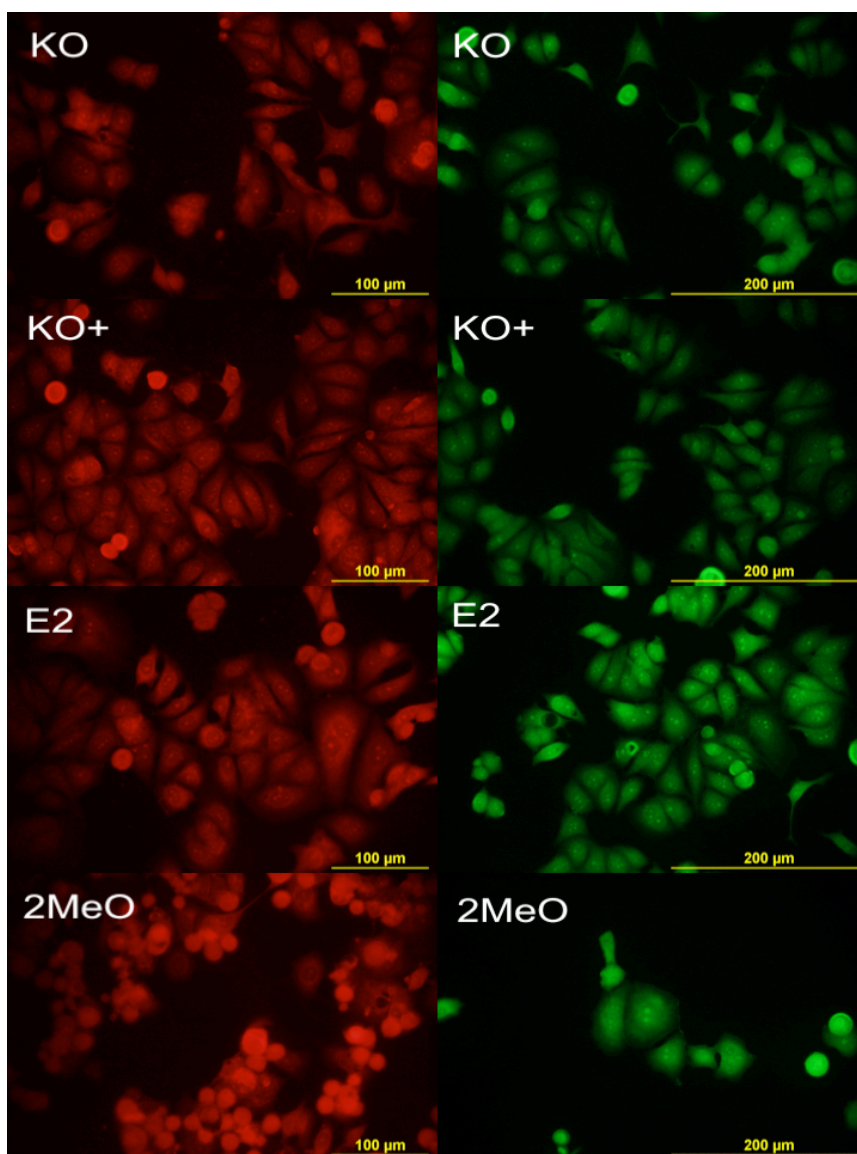
4.1 Optimalizace testování

Během optimalizace byl z počátku klíčový výběr protilátek. Na ER α byla odzkoušena primární monoklonální králičí protilátka anti-ER α (č. 435), monoklonální myší anti-ER α (č. 443) a sekundární polyklonální kozí protilátka GAR-TR (č. 45), polyklonální králičí protilátka RAM-AF488 (č. 430), monoklonální kozí GAR-AF488 (č. 176). Pro detekci ER β byla nanesena primární polyklonální králičí protilátka anti-ER β (č. 136) a monoklonální myší anti-ER β (č. 436). Sekundární protilátka byla použita polyklonální kozí GAR-TR (č. 45) a polyklonální králičí protilátka RAM-AF488. Na základě imunofluorescenční analýzy byla vybrána nejvhodnější kombinace. Pro ER α to byla kombinace monoklonální králičí anti-ER α protilátky (č. 435) a monoklonální kozí GAR-AF488 (č. 176). Pro ER β protilátky monoklonální myší anti-ER β (č. 436) a polyklonální králičí protilátka RAM-AF488 (č. 430). Sekundární protilátky byly značené fluorochromem s absorpčním maximem v zeleném spektru. Červeně svítící fluorochromy TR byly z počátku intenzivní, viz Obr. 6 a Obr. 7, ale bohužel docházelo k rychlému vysvěcování, a proto bylo od nich v dalším testování odstoupeno. U obou obrázků lze pozorovat změnu lokalizace ER po ovlivnění jejich přirozeným ligandem estradiolem (E2). Receptory se po navázání E2 přesouvají do jádra a perinukleárního prostoru.

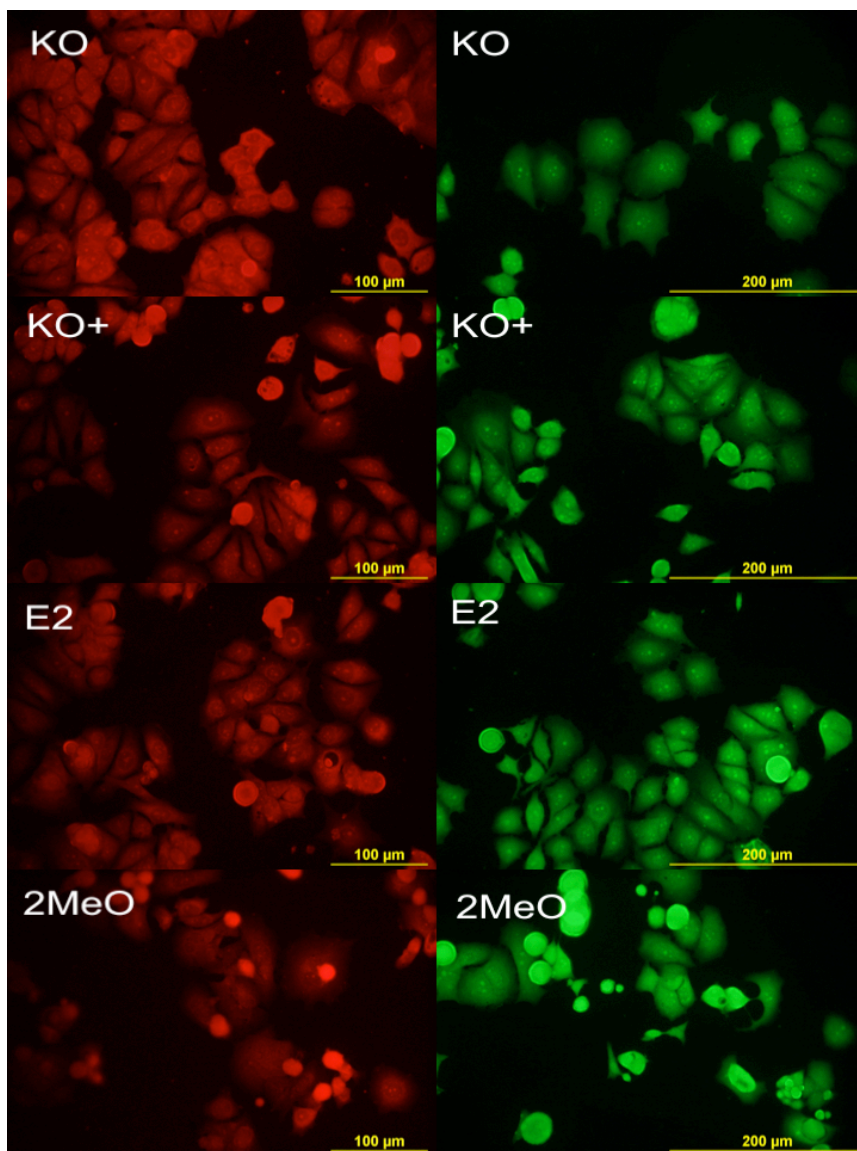
Primární protilátky na imunofluorescenční analýzu byly odzkoušeny v ředění 200x a 500x. Následně bylo vybráno ředění 500x, jelikož bylo dostačující a intenzita byla vyhovující. Na western blot analýzu byly použity již předem laboratoří odzkoušené koncentrace protilátek viz. Tab 3 a Tab 4.

Testované steroidní látky MK349 a RN6B byly aplikovány v koncentraci 10 μ M. U látek MU-5562 a MU-5611 došlo v koncentraci 10 μ M k vysoké

cytotoxicitě, proto byla u western blot analýzy také použita koncentrace 5 μM . U imunofluorescenční analýzy potom koncentrace 1 μM , jelikož je množství používaných buněk v testu značně nižší.



Obr. 6 Imunofluorescenční lokalizace ER α v buňkách MCF7 ovlivněných estradiolem (E2) v koncentraci 10 μM a 2-methoxyestradiolem (2MeO) v koncentraci 10 μM po 24 hodinách působení. Vlevo barvení protilátkami: monoklonální králičí anti-ER α primární protilátka a polyklonální kozí GAR-TR sekundární protilátka. Vpravo použity protilátky: monoklonální myší anti-ER α primární protilátka a polyklonální králičí protilátka RAM-AF488 sekundární protilátka.

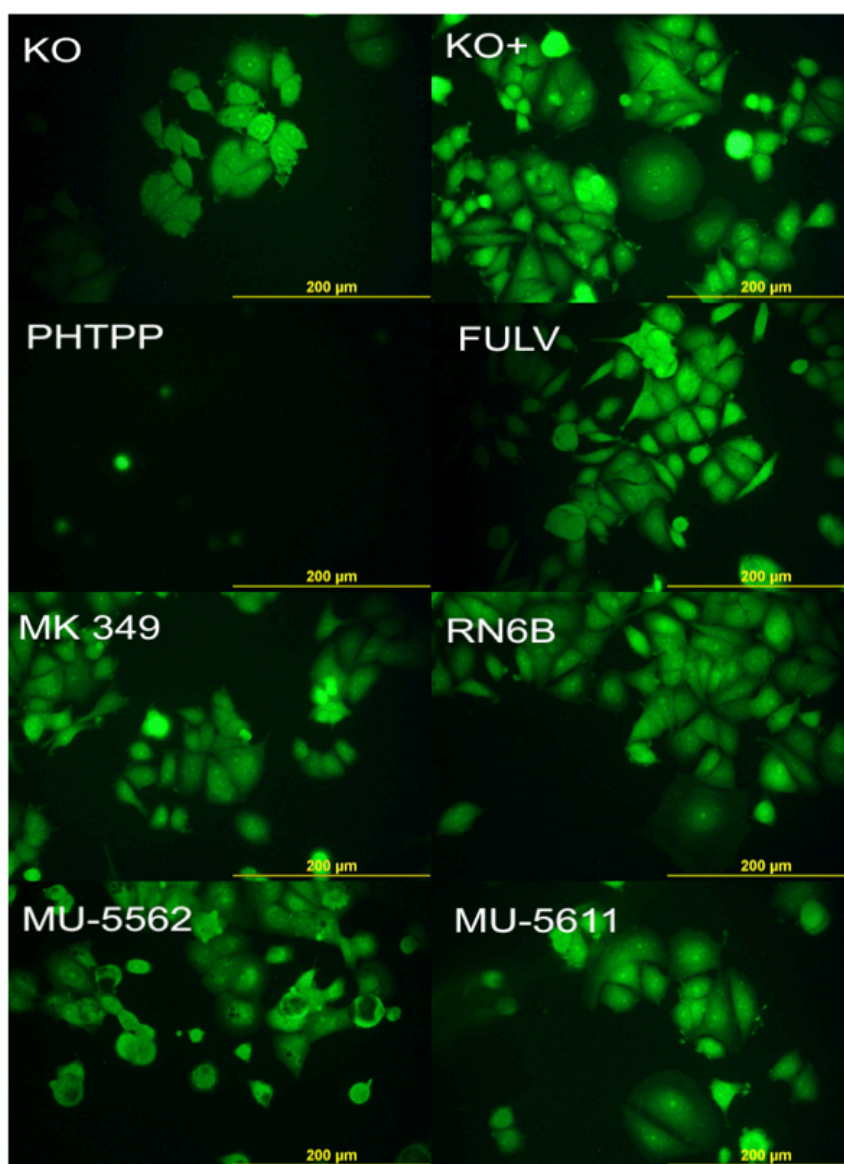


Obr. 7 Imunofluorescenční lokalizace ER β v buňkách MCF7 ovlivněných estradiolem (E2) v koncentraci 10 μ M a 2-methoxyestradiolem (2MeO) v koncentraci 10 μ M po 24 hodinách působení. Vlevo barvení protilátkami: primární polyklonální králičí protilátka anti-ER β a sekundární polyklonální kozí protilátka GAR-TR. Vpravo použity protilátky: primární monoklonální myší anti-ER β protilátka a sekundární polyklonální králičí protilátka RAM-AF488.

4.2 Imunofluorescenční analýza

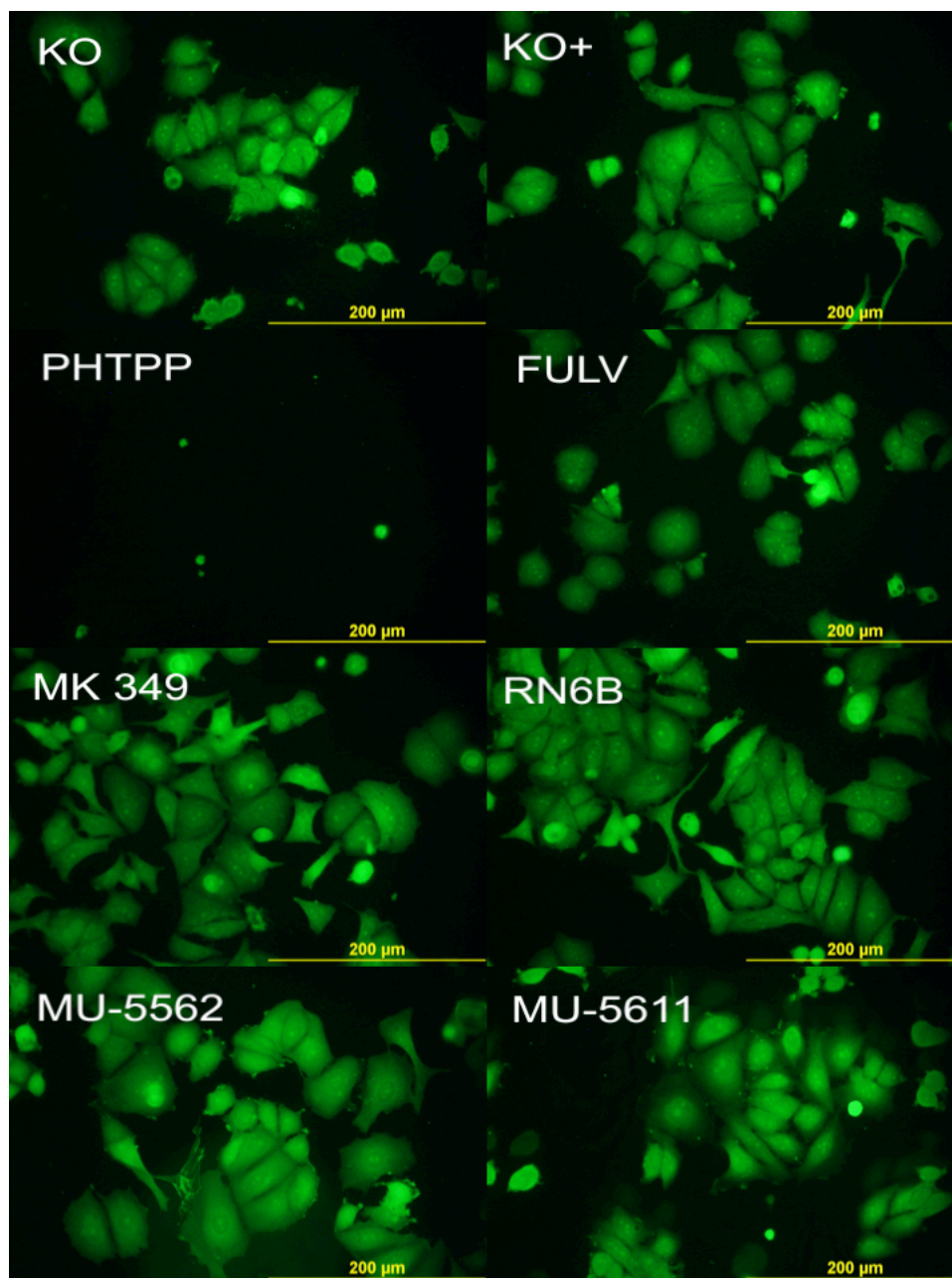
Pro sledování lokalizace proteinů byla využita imunofluorescenční analýza. Buněčná linie MCF7 byla po dobu 24 hodin ovlivněna steroidními látkami MK349 v koncentraci 10 μ M, RN6B 10 μ M, MU-5562 1 μ M a MU-5611 1 μ M. Odkoušeno bylo také působení testovaných látek pouze 1 hod. Oproti 24 hodinám ovšem nedošlo k žádným změnám, a proto byly pro prezentování výsledků využity snímky po působení 24 hod.

Expres ER α byla detekována v kontrolních buňkách v cytosolu i jádře buněk. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno čisté DMEM médium (KO) a DMEM médium s přísadkou DMSO (KO+). Působením látky PHTPP došlo k usmrcení buněk. Po aplikaci fulvestrantu došlo k většímu nahromadění receptorů do cytosolu buňky. V případě MK349, MU-5562 se lokalizace ER α nezměnila oproti kontrole. U látky RN6B lze pozorovat lehké snížení exprese receptorů v jádře a jejich nahromadění v cytosolu na povrchu jádra. Látka MU-5611 způsobila translokaci receptoru z cytosolu do jádra.



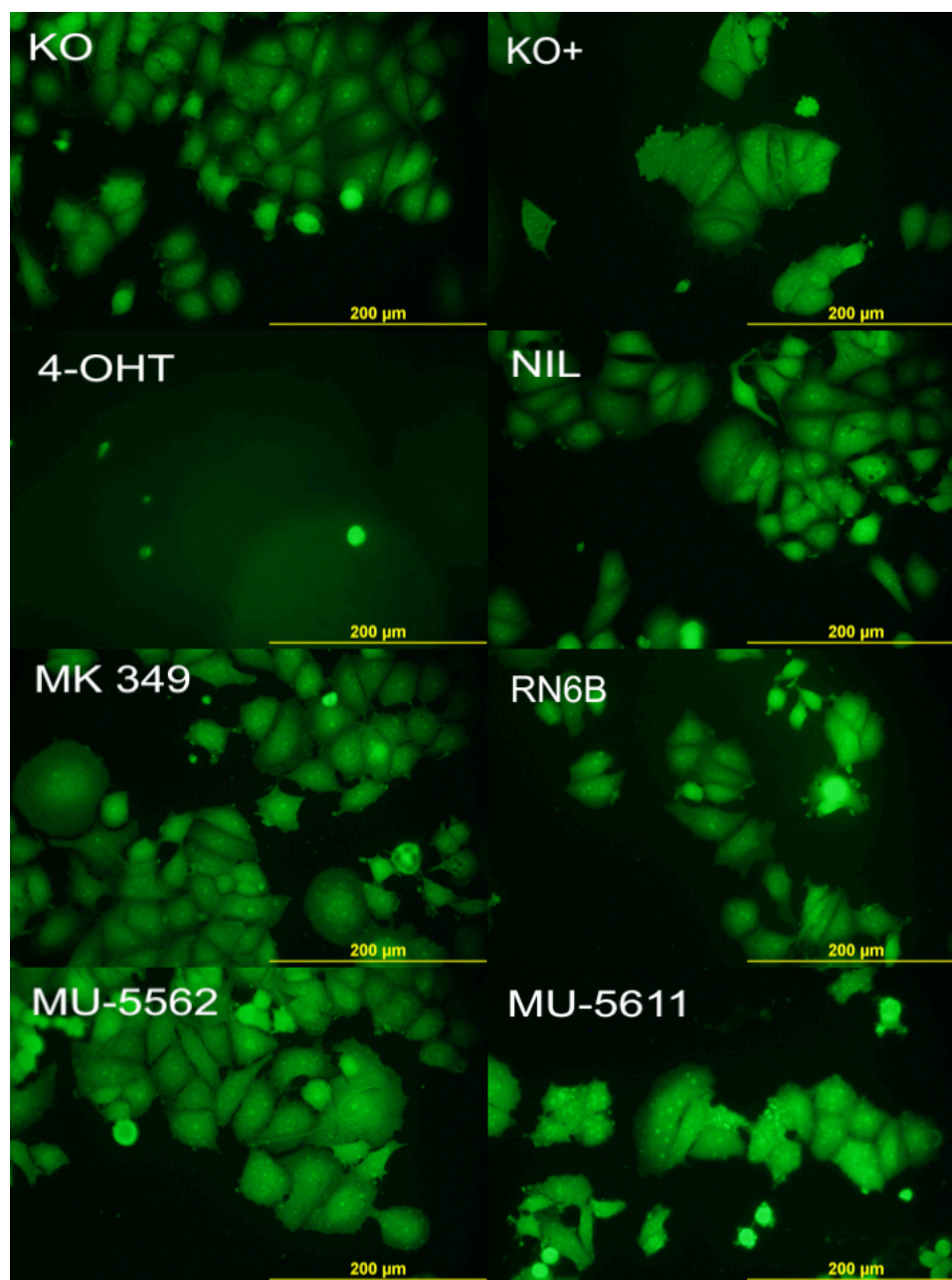
Obr. 8 Imunofluorescenční lokalizace ER α v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami PHTPP 1 μM , fulvestrant (FULV) 0,1 μM , MK349 10 μM , RN6B 10 μM , MU-5562 1 μM , MU-5611 1 μM

Expresi ER β byla prokázána v cytosolu i jádře buněk v kontrolních buňkách i buňkách ovlivněných všemi testovanými látkami. V případě fulvestrantu, látky MK349 a RN6B nedošlo k výrazným změnám. Působením látky PHTPP došlo k usmrcení buněk. Vliv látky MU-5562 způsobil lehce sníženou expresi receptoru v jádře. Látka MU-5611 zapříčinila translokaci receptoru do jádra.



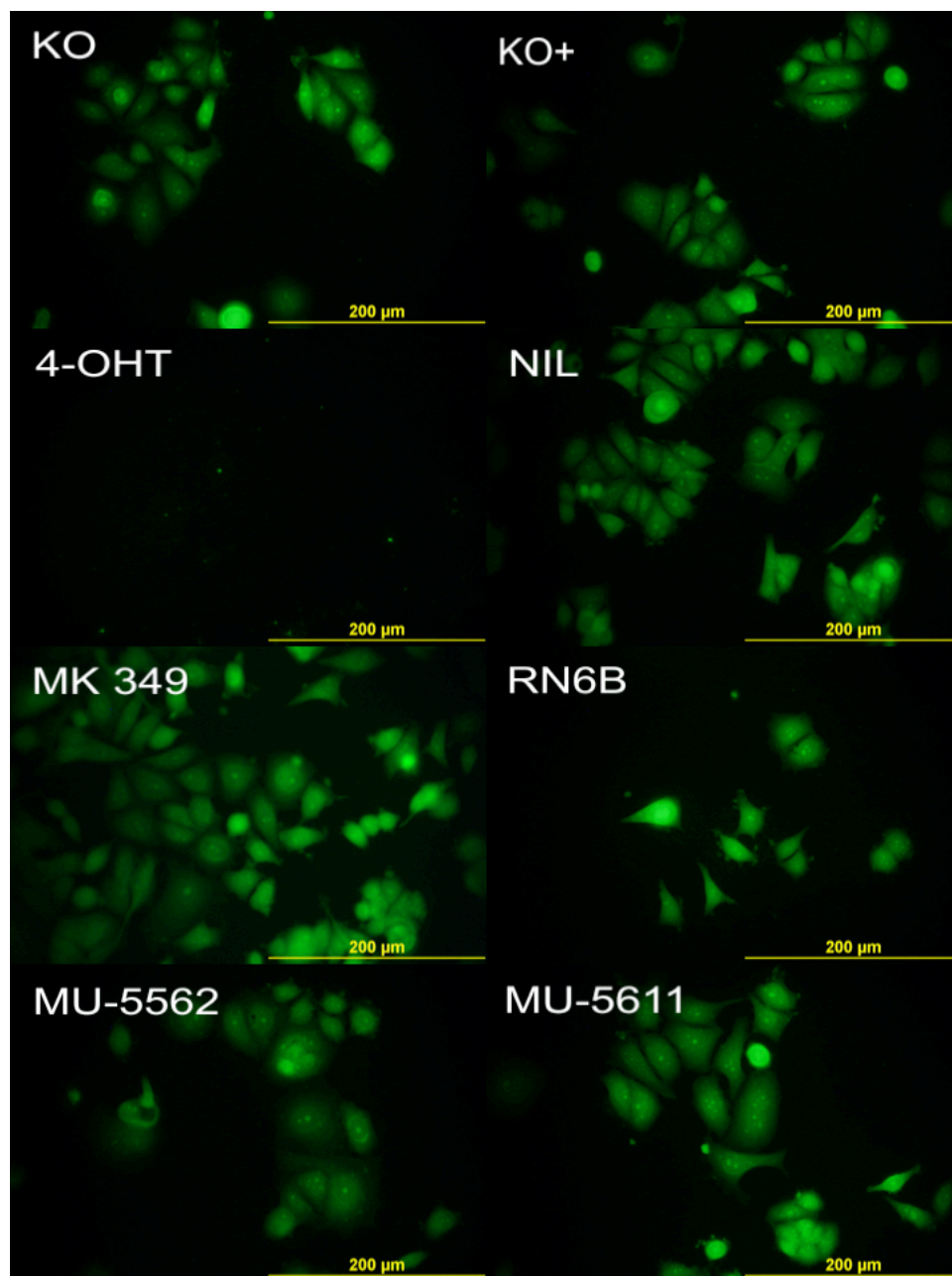
Obr. 9 Imunofluorescenční lokalizace ER β v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami PHTPP 1 μ M, fulvestrant (FULV) 0,1 μ M, MK349 10 μ M, RN6B 10 μ M, MU-5562 1 μ M, MU-5611 1 μ M

Expres PR byla prokázána v cytosolu i jádře buněk kontrolních buněk i všech testovaných látek, kromě 4-OHT, kde došlo k usmrcení buněk. Látky MU-5562 a MU-5611 způsobily lokalizaci receptoru pouze v cytosolu. Ve všech ostatních případech nedošlo k výrazným změnám.



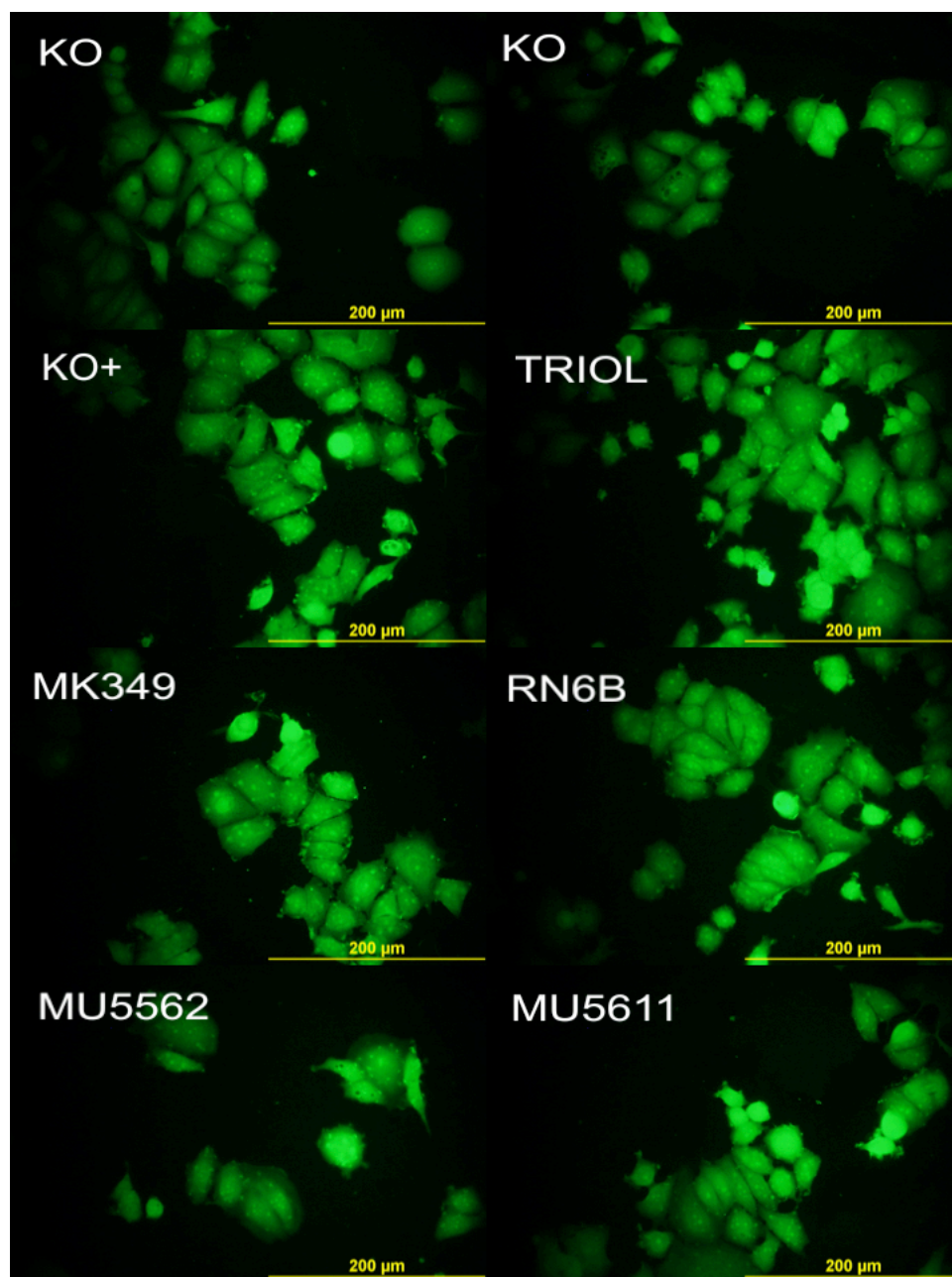
Obr. 10 Imunofluorescenční lokalizace PR v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 1 μM, nilutamide (NIL) 1 μM, MK349 10 μM, RN6B 10 μM, MU-5562 1 μM, MU-5611 1 μM

Expres AR byla prokázána v cytosolu i jádře buněk u kontrolních buněk i všech testovaných látek kromě 4-OHT, kde došlo k usmrcení buněk. U látky nilutamide došlo ke snížení exprese receptoru v jádře. Ve všech ostatních jamkách nedošlo k výrazným změnám.



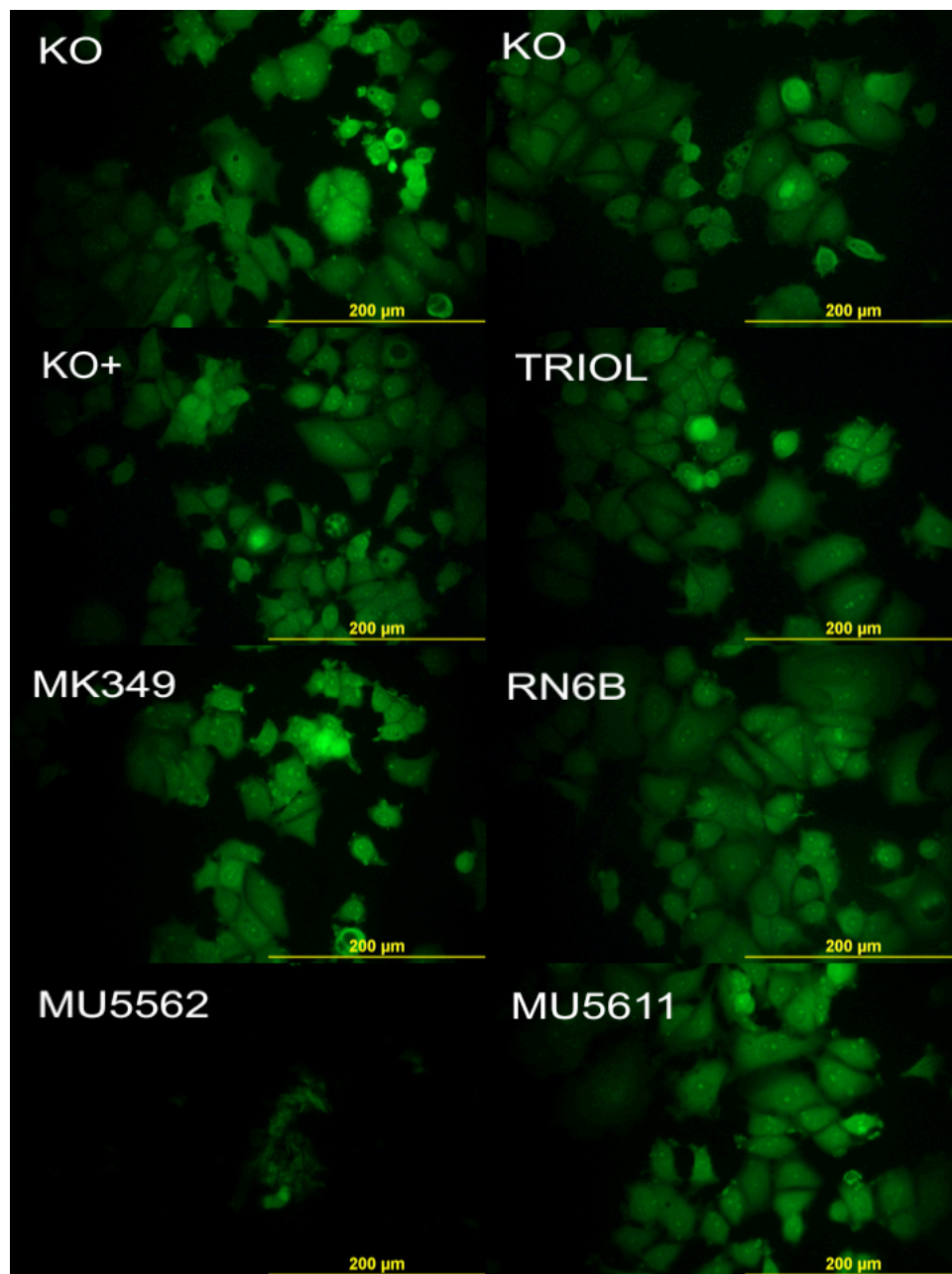
Obr. 11 Imunofluorescenční lokalizace AR v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 1 μ M, nilutamide (NIL) 1 μ M, MK349 10 μ M, RN6B 10 μ M, MU-5562 1 μ M, MU-5611 1 μ M

Exprese pMARCKS byla prokázána v cytosolu i jádře buněk v kontrolních buňkách a také po působení všech testovaných látek. Nedošlo k žádným výrazným změnám lokalizace oproti kontrole.



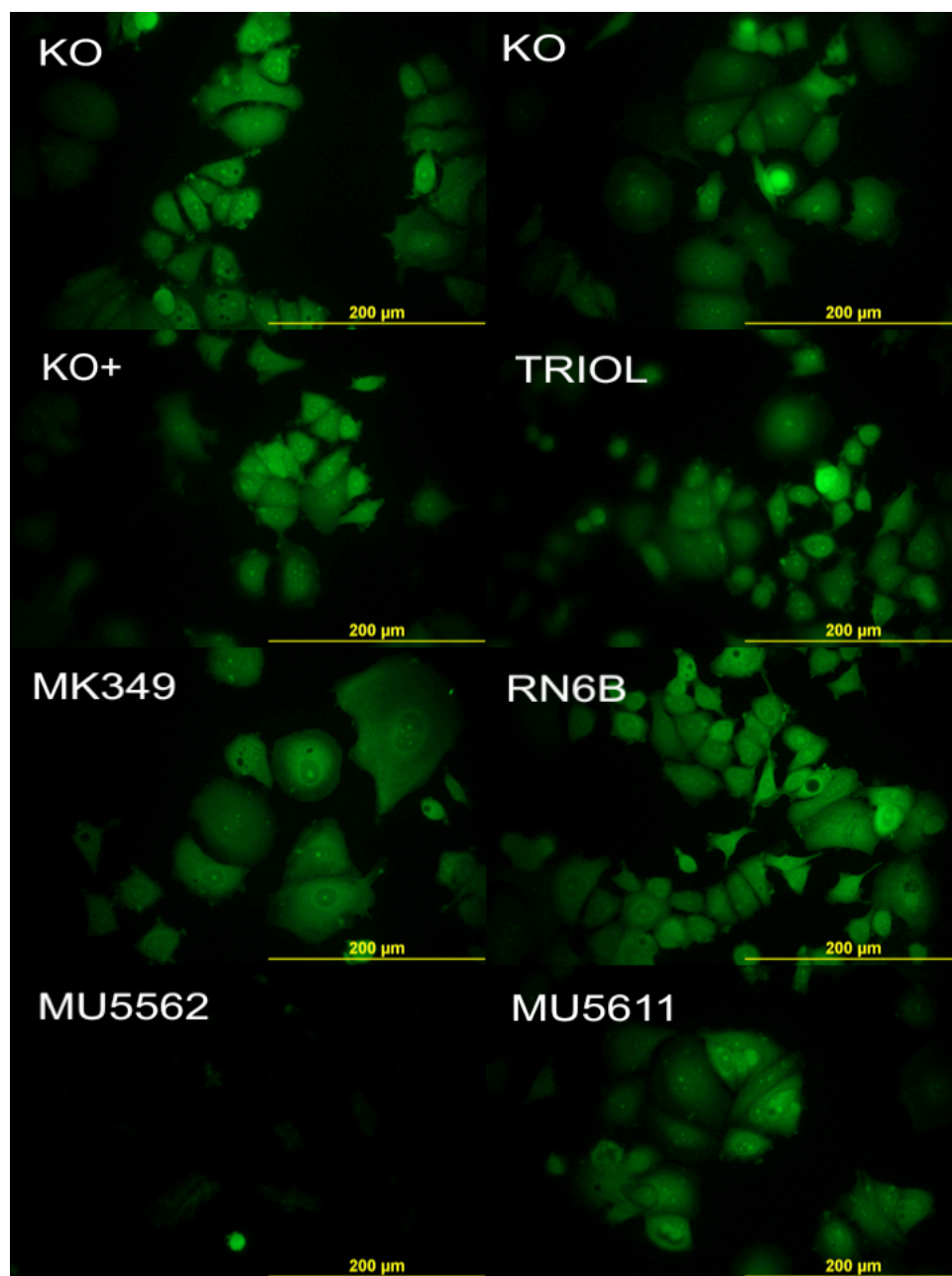
Obr. 12 Imunofluorescenční lokalizace pMARCKS v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami triolon (TRIOL) 10 μM, MK349 10 μM, RN6B 10 μM, MU-5562 1 μM, MU-5611 1 μM

Expres dyneinu byla prokázána rovnoměrně v cytosolu všech buněk. V jádře buněk je exprese u kontrolních buněk i po působení všech testovaných látek nízká. V porovnání s kontrolními snímky k žádným výrazným změnám nedošlo.



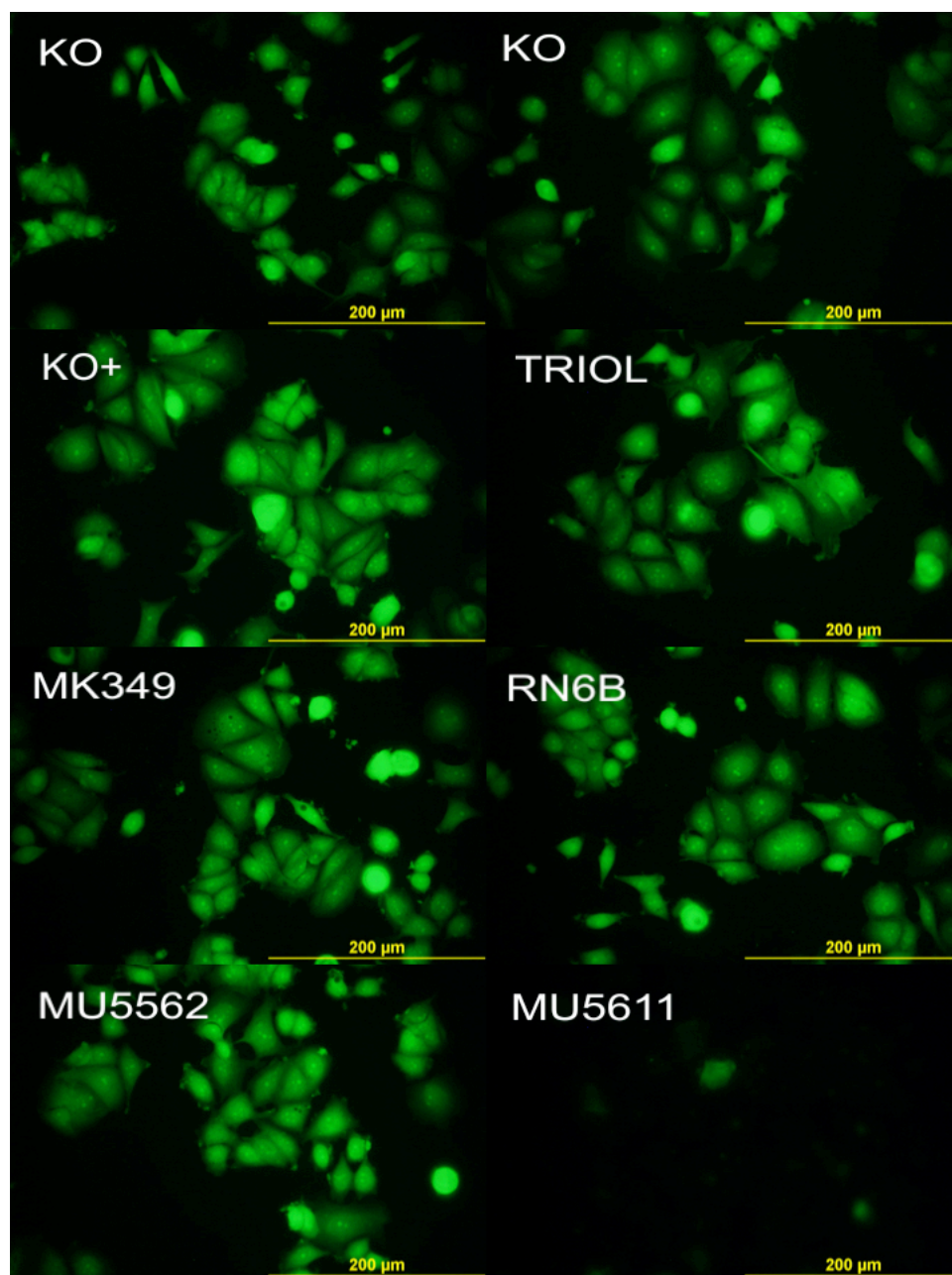
Obr. 13 Imunofluorescenční lokalizace dyneinu v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami triolon (TRIOL) 10 μM, MK349 10 μM, RN6B 10 μM, MU-5562 5 μM, MU-5611 5 μM

Expresi profilinu 2 byla prokázána rovnoměrně v cytosolu všech buněk. V jádře buněk je exprese u kontrolních buněk i po působení všech testovaných látek nízká. Látka RN6B způsobila sníženou expresi profilinu 2 v jádře. V porovnání s kontrolními snímky v ostatních jamkách k žádným výrazným změnám nedošlo.



Obr. 14 Imunofluorescenční lokalizace profilinu 2 v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami triolon (TRIOL) 10 μM, MK349 10 μM, RN6B 10 μM, MU-5562 5 μM, MU-5611 5 μM

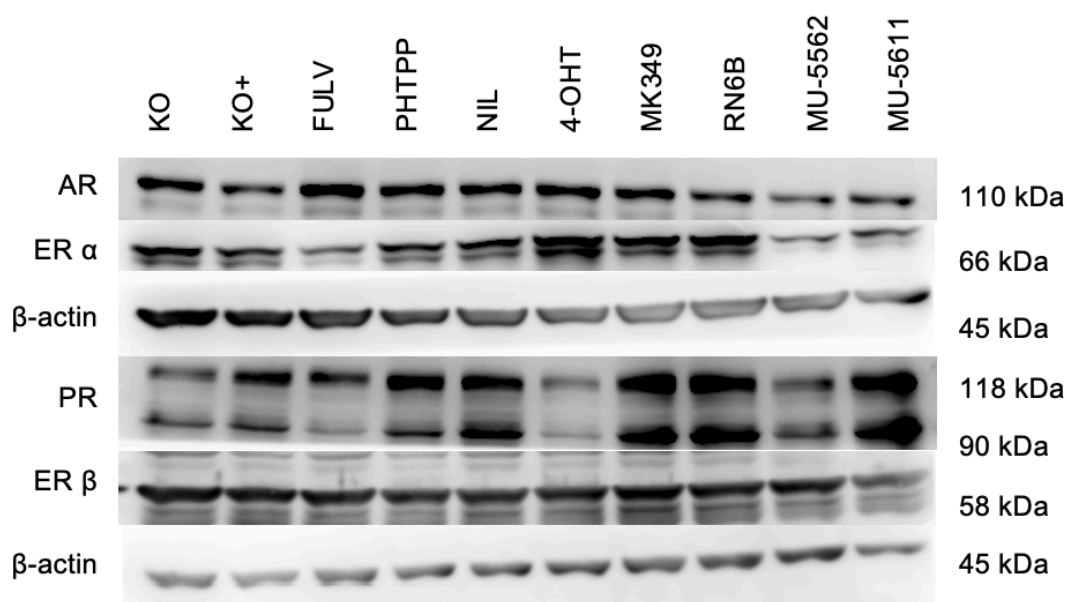
Exprese vinculinu byla prokázána v cytosolu i jádře buněk u kontrolních buněk a také po působení všech testovaných látek. Nedošlo k žádným výrazným změnám oproti kontrole.



Obr. 15 Imunofluorescenční lokalizace vinculinu v kontrolních buňkách MCF7 (KO, KO+ s DMSO) a v buňkách MCF7 po 24 hodinách ovlivnění látkami triolon (TRIOL) 10 μM, MK349 10 μM, RN6B 10 μM, MU-5562 1 μM, MU-5611 1 μM

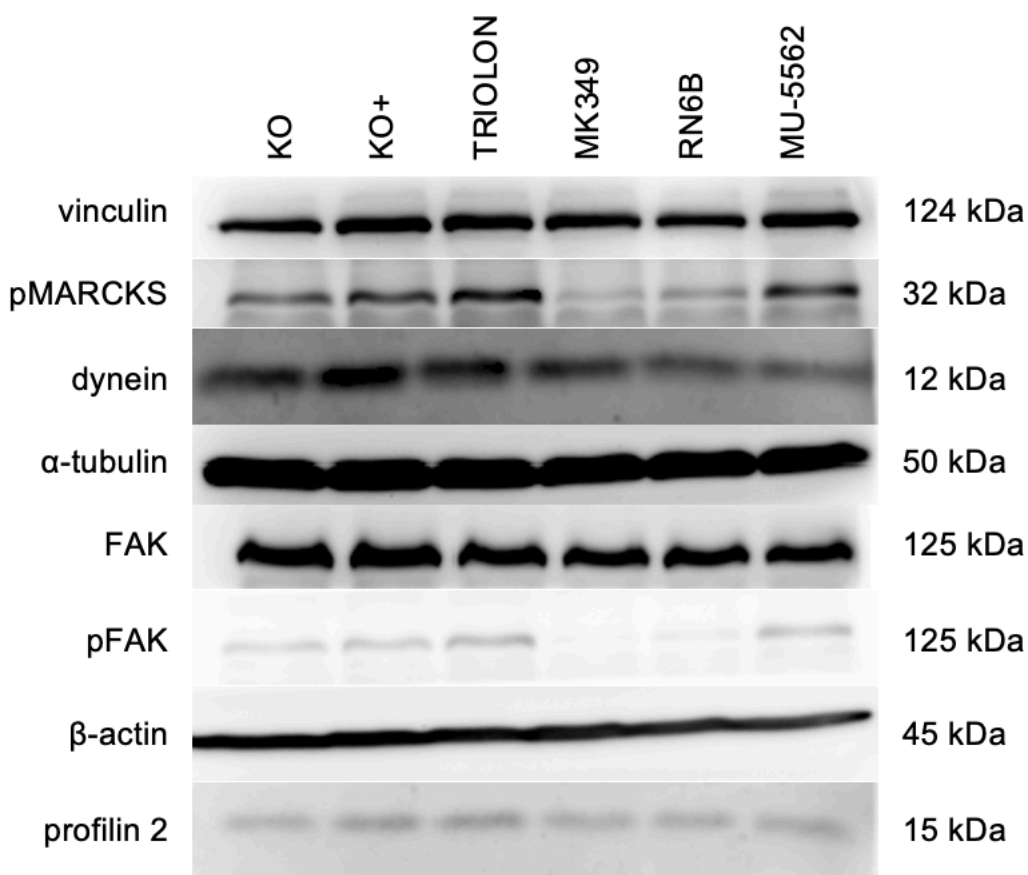
4.3 Western blot analýza

Pro detekci změn v expresi jaderných receptorů byla pro buněčnou linii MCF7 použita analýza Western blot. Byly sledovány proteiny pro progesteronový receptor (PR), androgenový receptor (AR), estrogenový receptor α (ER α) a estrogenový receptor β (ER β). Jako kontrola pro množství buněk byla stanovena hladina β -actinu. Buněčná linie byla po dobu 24 hodin ovlivněna steroidními látkami MK349, RN6B, MU-5562 a MU-5611. Poté byly porovnány hladiny exprese jednotlivých proteinů, které jsou znázorněny na Obr. 16. Tento experiment byl proveden dvakrát s podobnými výsledky. Vliv testovaných látek byl prokázán u PR. Snížená exprese obou izoform se projevila u látky MU-5562. U AR byla opět zaznamenána snížená exprese po ovlivnění látkou MU-5562, ale také po ovlivnění MU-5611. Přítomnost látky MU-5562 a MU-5611 také snížila expresi ER α .



Obr. 16 Vliv steroidních látek na expresi jaderných receptorů v buněčné linii MCF7. Ovlivnění buněk probíhalo po dobu 24 hodin v koncentracích: fulvestrant (FULV) 10 nM, PHTPP 10 nM, nilutamide (NIL) 10 nM, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 10 nM, MK349 10 μ M, RN6B 10.

Na základě dosud nepublikovaných výsledků z proteomické analýzy byl v případě sledování exprese cytoskeletárních proteinů test zaměřen na proteiny FAK, pFAK, vinculin, pMARCKS, profilin 2 a dynein. Jako kontrolu pro množství buněk bylo použito stanovení β -actinu a α -tubulinu. Buněčná linie byla po dobu 24 hodin ovlivněna steroidními látkami MK349, RN6B, MU-5562. Látka MU-5611 byla z důvodu jejího nedostatku vynechána. K žádným změnám v expresi proteinu nedošlo u proteinu FAK, vinculinu a profilinu viz Obr. 17. U proteinu pFAK a pMARCKS došlo ke snížení exprese po působení látky MK349 a RN6B. Množství dyneinu oproti kontrole mírně kleslo po působení látky RN6B a MU-5562.



Obr. 17 Vliv steroidních látek na expresi proteinů cytoskeletu u buněčné linie MCF7. Ovlivnění buněk probíhalo po dobu 24 hodin v koncentracích: triolon 10 μ M, MK349 10 μ M, RN6B 10 μ M, MU-5562 5 μ M

5 DISKUZE

Cílem experimentální části mé diplomové práce bylo sledovat modulaci steroidních receptorů a cytoskeletu v prsních nádorových buňkách *in vitro* po ovlivnění steroidními látkami pomocí imunofluorescenční analýzy a western blot analýzy. Dalším cílem byla optimalizace zmíněných metod pro vhodné provedení testování. Steroidní receptory ER α , ER β , AR a PR byly vybrány jako cíl testování na základě podobnosti určených testovaných steroidních látek s živočišnými hormony odvozenými od cholesterolu, které slouží jako ligandy zmíněných receptorů. Na základě dosud nepublikovaných výsledků z proteomické analýzy se zabývalo také expresí a lokalizací různých typů cytoskeletálních proteinů.

Výběr vhodné protilátky pro ER byl proveden s využitím látek estradiolu (E2) a 2-methoxyestradiolu, jelikož jejich působení na ER jsou již dobře známé. V roce 1971 Jensen *et al.* zjistili, že se E2 váže na ER v cytoplazmě, který je poté transformován a translokován do jádra. Tam je vyvolána exprese určitých genů a syntéza proteinů, což vede až k hyperplazii buňky (Jordan *et al.*, 1977). Naopak přirozeně vyskytující se metabolit estradiolu, 2-methoxyestradiol, ztrácí oproti estradiolu estrogení aktivitu a vykazuje silné inhibiční účinky na růst buněk u různých druhů rakoviny. Projevuje se antiproliferačními, proapoptickými, antiangiogenními, antitubulinovými a antimetastickými účinky (Mueck *et al.*, 2010).

Western blot analýzou byl detekován vliv testovaných steroidních látek jak v případě exprese receptorů, tak i cytoskeletu. Snížení exprese ER α došlo u látky MU-5562 a MU-5611 stejně jako po ovlivnění fulvestrantem. Fulvestrant byl vybrán jako kontrolní látka, jelikož jsou jeho vlastnosti již dobře prozkoumány. Ve vazbě s ER zhoršuje dimerizaci receptoru a tím jeho přesun z cytoplazmy do jádra (Fawell *et al.*, 1990; Dauvois *et al.*, 1993). Komplex ER-fulvestrant je také nestabilní a oproti komplexu ER-estradiol dochází k jeho zrychlené degradaci (Nicholson *et al.*, 1995). Po ovlivnění fulvestrantem byla imunofluorescenční analýzou detekována translokace ER α z jádra do cytosolu buněk. Z výsledků lze usoudit, že pravděpodobně ještě nedošlo k degradaci ER, a proto jsme byli schopni ER α v cytosolu ve větší míře pozorovat. Působením látky MU-5611 byla imunofluorescenční analýzou detekována v opačném případě translokace z cytosolu do jádra, a tím došlo k podpoření transkripční aktivity receptoru. Výsledek tedy nekoreluje s výsledkem hladin exprese

z western blot analýzy. U ER β nedošlo na rozdíl od ER α k žádným výrazným změnám a to ani v případě PHTPP, jakožto antagonisty tohoto receptoru. PHTPP vykazuje vyšší selektivitu k ER β a proto se často využívá k rozlišení různých aktivit dvou estrogenových receptorů (Compton *et al.*, 2004). U AR došlo k velmi malému snížení exprese po ovlivnění MU-5562 a MU-5611. K lehkému snížení exprese došlo i v případě PR u látky MU-5562. Voňka *et al.* (2020) testovali vliv řady steroidních látek na funkci ER α . Pomocí luciferázového reporterového testu byla otestována jejich inhibiční aktivita, kdy MU-5562 a MU-5611 vykazoval inhibici srovnatelnou s již využívanými antiestrogeny v klinické praxi. Imunochemickou analýzou také byla potvrzena po působení látky MU-5611 snížená hladina exprese proteinu AGR2, která je spojená se snížením hladiny ER α . Také obě látky, MU-5562 a MU-5611, vykazovaly zvýšení exprese proteinu p21, který hraje roli v inhibici buněčného cyklu (Voňka *et al.*, 2020). Testováním steroidních látek, konkrétně derivátů cholestanů blízkých k brassinosteroidům, na buněčné linii MCF7 se zabývala také Rárová *et al.* (2016), kdy u dvou látek byl blíže studovaný jejich vliv na expresi steroidních receptorů. Působení cholestanových derivátů vedlo ke snížení exprese ER α po 24 hod i 48 hod. Exprese ER β byla snížena až po působení 48 hod. U AR došlo po 24 hod ke zvýšení jeho exprese, ale po 48 hod již k jeho snížení. U PR nedošlo k žádným změnám (Rárová *et al.*, 2016).

V expresi cytoskeletálních proteinů došlo k výrazným změnám u proteinů pFAK a pMARCKS. FAK (fokální adhezivní kináza) je kináza ze skupiny tyrosinkináz, která hraje důležitou úlohu v základních funkcích buňky. FAK je nadměrně exprimována u mnoha typů rakoviny (Golubovskaya *et al.*, 2009). Fosforylaci FAK lze vyvolat řadou extracelulárních podnětů jako je navázání integrinů či růstových faktorů a může dále vést k aktivaci signalizačních kaskád, které dávají buňce signály k jejímu přežití. Mimo jiné se také podílí na procesu angiogeneze a metastázování (Parsons, 2003; Astier *et al.*, 1997, Golubovskaya & Cance, 2010). FAK má čtyři serinová místa umístěná na C-konci – Ser722, Ser732, Ser843, and Ser910 (Parsons, 2003). V mém testování došlo ke snížení fosforylované formy FAK na serinovém místě 732, ovšem celkový protein FAK zůstal beze změn. Fosforylace Ser732 je zapojena do buněčné migrace (Xie & Tsai, 2014). MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate) je hlavní substrát proteinkinázy C podílející se na regulaci dynamiky aktinových vláken. MARCKS se váže na aktinová vlákna a zesiluje je. Tím se účastní

různých buněčných procesů včetně buněčné adheze. V nefosforylované formě je vázán na buněčnou membránu, po fosforylaci se disociuje z plazmatické membrány a je translokován do cytosolu, kde plní svou funkci zesíťování (Disatnik *et al.*, 2002; Manenti *et al.*, 1997; Aderem *et al.*, 1995; Hartwig *et al.*, 1992). Opět došlo ke snížení exprese aktivované fosforylované formy MARCKS, což staví protein spolu s pFAK do pozice slibných cílů působení steroidních látek. Rárová *et al.* (2018) testovali vliv analogu brassinosteroidů BR4848, který vykazuje podobnost s testovanou látkou MK349. Byla sledována exprese FAK a její fosforylace na serinovém místě 732. Po působení 10 a 20 μM BR4848 došlo ke snížení hladiny pFAK, zatímco hladina celkové FAK zůstala nezměněna (Rárová *et al.*, 2018)

Pomocí imunofluorescenčního barvení nebyly v případě steroidních receptorů detekovány žádné výrazné změny v lokalizaci po působení testovaných látek. U kontrolních látek PHTPP a 4-OHT došlo k usmrcení buněk v koncentraci 1 μM , která byla pro použité buňky pravděpodobně vysoká. Ovšem koncentrace 1 μM obou látek byla opakovaně odzkoušena a nejevila žádnou cytotoxicitu, proto lze umrtí buněk přisuzovat kondici použitých buněk. Látka MU-5611 způsobila translokaci obou estrogenních receptorů do jádra. Působení látky MU-5562 a MU-5611 zapříčinilo lokalizaci PR pouze v cytosolu, a tudíž pravděpodobně došlo k inhibici jejich transkripční aktivity. Western blot analýzou bylo ovšem potvrzeno snížení exprese PR jenom po působení látky MU-5562. Po ovlivnění látkou MU-5611 nedošlo k žádným změnám exprese receptoru. Lokalizací steroidních receptorů v buněčné linii MCF7 se zabývali Rárová *et al.* (2016), kde testovali blíže vliv dvou cholestanů blízkých k brassinosteroidům po 24 hodinách jejich působení. V kontrolních buňkách byl ER α lokalizován především v cytoplazmě. Obě analoga způsobila buď částečnou translokaci receptorů do jader nebo rozptřeni receptorů po celém cytosolu a jádru. U ER β i u AR se po působení obou látek přesunuly receptory v cytoplazmě blíže k periférii jader. V kontrolních i ovlivněných buňkách se PR nacházel v jádře (Rárová *et al.*, 2016).

Sledování lokalizace proteinů cytoskeletu byla zaměřena na proteiny dynein, profilin 2, pMARCKS a vinculin. Dynein je cytoplazmatický protein, který využívá ATP k pohybu podél mikrotubulů (Cianfrocco, 2015; Kikkawa, 2013). Je zapojen do mnoha buněčných procesů včetně tvorby dělicího vřeténka při mitóze nebo transportu různých molekul (Lipka *et al.*, 2013). Inhibitory funkce dyneinu se

staly již cílem studia při léčbě leishmaniózy, kdy inhibitory ATPázy byly schopné v závislosti na koncentraci inhibovat motilitu pomocí bičků (Reddy *et al.*, 2017). Dalším studovaným proteinem byl profilin 2. Profilinem 2 se zabývali Mouneimne *et al.* (2012) ve své studii, kdy porovnávali rozdíly funkcí mezi profilinem 1 a profilinem 2 v buňkách rakoviny prsu. Změna hladin obou typů profilinu mění stavbu aktinového cytoskeletu buňky a tím ovlivňuje mnoho buněčných procesů spojených s invazí rakoviny. Profilin 1 podporoval motilitu a invazi na rozdíl od profilinu 2 (Mouneimne *et al.*, 2012). Dále byl sledován pMARCKS, fosforylovaná forma proteinu asociovaného s upregulací protein kinázy C (PKC). Upregulace PKC byla detekována u různých druhů rakoviny. Inhibitory PKC byly prvně považovány za silné molekulární kandidáty pro terapeutické cílení (Raab *et al.*, 2009; Podar *et al.*, 2006). Ovšem jejich velký počet izoformami znesnadnil vývoj léků zaměřených na tyto enzymy, proto může být vhodnou alternativou inhibice pMARCKS, mediátoru PKC (Roffey *et al.*, 2009). Posledním sledovaným proteinem byl vinculin. Vinculin reguluje adhezi buňky přímou vazbou na aktin a stimuluje polymeraci aktinu. Při absenci vinculinu je adheze buněk dramaticky narušena. Homeostáza ve zdravé tkáni silně závisí na adhezi mezi buňkami a interakci mezi buňkami a extracelulární matrix. Buňky ve zdravé epitelové tkáni udržují správnou strukturu tím, že navzájem adherují mezi sebou a zároveň současně adherují k extracelulární matrix. Mutace a změny exprese proteinů s touto funkcí jsou často spojovány s rakovinným onemocněním, a proto se tyto proteiny jeví jako slibný cíl výzkumu (Bays & DeMali, 2017). V analýze lokalizace proteinů cytoskeletu nedošlo k žádným výrazným změnám až na profilin 2, u kterého došlo ke snížené expresi v jádře buněk po působení látky RN6B.

V experimentální části byl pomocí imunofluorescenční a western blot analýzy prokázán účinek derivátů steroidních látek na modulaci steroidních receptorů a cytoskeletu. Výsledky mohou dále posloužit pro studium nových derivátů steroidních látek jako potenciálních inhibitorů funkce steroidních receptorů či proteinů cytoskeletu.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly studovány účinky derivátů steroidních látek na nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od adenokarcinomu prsu. Studované látky s označením MK349, RN6B, MU-5562 a MU-5611 vykazují strukturální podobnost s živočišnými hormony odvozenými od cholesterolu (MK349 a RN6B) nebo od estradiolu (MU-5562 a MU-5611). Takovéto hormony slouží jako ligandy steroidních receptorů.

V předkládané diplomové práci byly splněny vytyčené cíle. Experimentální část byla provedena pomocí dvou hlavních metod – western blot analýzy a imunofluorescenční analýzy. Stanoveným cílem bylo detekovat expresi a lokalizaci steroidních receptorů a proteinů cytoskeletu po 24 hodinách působení testovaných látek. Z výsledků lze usoudit, že jistý antiestrogenní a antiandrogenní potenciál vykazují látky MU-5562 a MU-5611. U látek MK349 a RN6B došlo k poklesu hladin fosforylovaných forem cytoskeletálních proteinů MARCKS a FAK, které hrají důležitou roli v buněčné adhezi.

Karcinom prsu je nejčastější zhoubné nádorové onemocnění žen v České republice. Více než 50 % vzniká bez zjištění jednoznačné příčiny. Doba celkového přežití se neustále zvyšuje díky novým poznatkům v jeho léčbě. Z tohoto důvodu je důležité, aby steroidní látky byly stále předmětem studia.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., & Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Molecular biology of the cell*, 16(1), 231–237. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0547>

Adam, Z., Krejčí, M., & Vorlíček, J. (2010). *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Galén.

Adam, Z., Krejčí, M., & Vorlíček, J. (c2011). *Obecná onkologie*. Galén.

Aderem, A. (1995). The MARCKS family of protein kinase-C substrates. *Biochemical Society Transactions*, 23(3), 587-591. <https://doi.org/10.1042/bst0230587>

Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th ed). Garland Science.

Astier, A., Avraham, H., Manie, S. N., Groopman, J., Canty, T., Avraham, S., & Freedman, A. S. (1997). The Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase Is Tyrosine-phosphorylated after β 1-Integrin Stimulation in B Cells and Binds to p130cas. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 228-232. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.228>

Bae M. S. (2020). Using Deep Learning to Predict Axillary Lymph Node Metastasis from US Images of Breast Cancer. *Radiology*, 294(1), 29–30. <https://doi.org/10.1148/radiol.2019192339>

Bays, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2999-3009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00018-017-2511-3>

Belej K, Kaplan O. Hormonální regulace a možnosti jejího ovlivnění v léčbě karcinomu prostaty. *Urolog. pro Pra-xi* 2008; 9(1): 10–15.

Branchini, G., Schneider, L., Cericatto, R., Capp, E., & Brum, I. S. (2009). Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal

breast tissue and fibroadenomas. *Endocrine*, 35(3), 459–466.
<https://doi.org/10.1007/s12020-009-9176-0>

Brychta, M. (2018). Breast cancer. *Onkologie*, 12(2), 68-73.
<https://doi.org/10.36290/xon.2018.014>

Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. -Å., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753-758. <https://doi.org/10.1038/39645>

Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., & Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO journal*, 15(9), 2174–2183.

Cianfrocco, M. A., DeSantis, M. E., Leschziner, A. E., & Reck-Peterson, S. L. (2015). Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31(1), 83-108. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125438>

Cohen, J. D., & Meudt, W. J. (1983). Investigations on the Mechanism of the Brassinosteroid Response: I. Indole-3-acetic Acid Metabolism and Transport. *Plant physiology*, 72(3), 691–694. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.691>

Compton, D. R., Sheng, S., Carlson, K. E., Rebacz, N. A., Lee, I. Y., Katzenellenbogen, B. S., & Katzenellenbogen, J. A. (2004). Pyrazolo[1,5- a]pyrimidines: Estrogen Receptor Ligands Possessing Estrogen Receptor β Antagonist Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(24), 5872-5893.
<https://doi.org/10.1021/jm049631k>

Conn, M. (2017). *Animal Models for the Study of Human Disease*(2.nd ed.).Available at:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=485976&lang=c s&site=ehost-live> (Accessed: 15 February 2021)

Conneely, O. M., Lydon, J. P., De Mayo, F., & O'Malley, B. W. (2000). Reproductive Functions of the Progesterone Receptor. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 7(1), 25-32. <https://doi.org/10.1177/1071557600007001S09>

Coufal, O., & Fait, V. (2011). *Chirurgická léčba karcinomu prsu*. Grada.

Coutts, A. S., & Murphy, L. C. (1998). Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer research*, 58(18), 4071–4074.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., & Gustafsson, J. -Å. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 773-781. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>

Dauvois, S., White, R., & Parker, M. G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of cell science*, 106 (Pt 4), 1377–1388. <https://doi.org/10.1242/jcs.106.4.1377>

Dauvois, S., White, R., & Parker, M. G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of cell science*, 106 (Pt 4), 1377–1388.

Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., & Gustafsson, J. -Å. (2000). Functional Differences between the Amino-Terminal Domains of Estrogen Receptors α and β . *Molecular Pharmacology*, 58(3), 584-590. <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.584>

Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K. F., & Krishna, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of Brassica napus and tomato seedlings. *Plant molecular biology*, 40(2), 333–342. <https://doi.org/10.1023/a:1006283015582>

Disatnik, M. H., Boutet, S. C., Lee, C. H., Mochly-Rosen, D., & Rando, T. A. (2002). Sequential activation of individual PKC isozymes in integrin-mediated muscle cell spreading: a role for MARCKS in an integrin signaling pathway. *Journal*

of cell science, 115(10), 2151-2163.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1242/jcs.115.10.2151>

Duan, R., Porter, W., & Safe, S. (1998). Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*, 139(4), 1981–1990.

<https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5870>

Edwards, J. P., Higuchi, R. I., Winn, D. T., Pooley, C. L., Caferro, T. R., Hamann, L. G., Zhi, L., Marschke, K. B., Goldman, M. E., & Jones, T. K. (1999). Nonsteroidal androgen receptor agonists based on 4-(trifluoromethyl)-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-one. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 9(7), 1003–1008.

[https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00118-3](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00118-3)

Farmakoterapeutické informace: měsíčník pro lékaře a farmaceuty. (2019): Praha : Státní ústav pro kontrolu léčiv.

Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG (1990) Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the 'pure' antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6883–6887

Fawell, S. E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M., & Parker, M. G. (1990). Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6883–6887. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6883>

Fugh-Berman, A., & Epstein, S. (1992). Tamoxifen: disease prevention or disease substitution? *The Lancet*, 340(8828), 1143-1145. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93161-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)93161-F)

Fujioka, S., Noguchi, T., Sekimoto, M., Takatsuto, S., & Yoshida, S. (2000). 28-Norcasterone is biosynthesized from castasterone. *Phytochemistry*, 55(2), 97–101. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00261-2)

Garcia, M., Thirouard, L., Sedès, L., Monrose, M., Holota, H., Caira, F., Volle, D. H., & Beaudoin, C. (2018). Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3630.

<https://doi.org/10.3390/ijms19113630>

Gelmann E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(13), 3001–3015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.018>

Giangrande, P. H., Pollio, G., & McDonnell, D. P. (1997). Mapping and Characterization of the Functional Domains Responsible for the Differential Activity of the A and B Isoforms of the Human Progesterone Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(52), 32889-32900. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32889>

Golubovskaya, V. M., & Cance, W. (2010). Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *15*, 901–912. <https://doi.org/10.2741/3653>

Golubovskaya, V. M., Kweh, F. A., & Cance, W. G. (2009). Focal adhesion kinase and cancer. *Histology and histopathology*, *24*(4), 503–510. <https://doi.org/10.14670/HH-24.503>

Graham, J. D., Yeates, C., Balleine, R. L., Harvey, S. S., Milliken, J. S., Bilous, A. M., & Clarke, C. L. (1995). Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer research*, *55*(21), 5063–5068.

Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L., & Cook, J. C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, *281*(5728), 216-217. <https://doi.org/10.1038/281216a0>

Gustafsson J. A. (2003). What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends in pharmacological sciences*, *24*(9), 479–485. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00229-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00229-3)

Hall, J. M., & McDonnell, D. P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, *140*(12), 5566–5578.

<https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7179>

Hartwig, J. H., Thelen, M., Resen, A., Janmey, P. A., Nairn, A. C., & Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium–calmodulin. *Nature*, *356*(6370), 618–622.

<https://doi.org/10.1038/356618a0>

Hawle, H., Hess, D., Mueller, A., & Thuerlimann, B. (2010). Low-Dose Fulvestrant Maintained Long-Term Complete Remission after Poor Response to Previous Endocrine Therapies in a Patient with Advanced Breast Cancer. *Case Reports in Oncology*, *3*(2), 131–136. <https://doi.org/10.1159/000313838>

He, R. -yun, Wang, G. -jie, & Wang, X. -shu. (1991). Effects of Brassinolide on Growth and Chilling Resistance of Maize Seedlings. *Brassinosteroids*, 220–230.

<https://doi.org/10.1021/bk-1991-0474.ch019>

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., & Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, *387*(6634), 733–736. <https://doi.org/10.1038/42750>

Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, *25*(2), 276–308. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J. -Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, *87*(3), 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>

Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., & Casagrande, J. T. (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer research*, *42*(8), 3232–3239.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, *347*(6288), 44–49. <https://doi.org/10.1038/347044a0>

Hopp, T. A., Weiss, H. L., Hilsenbeck, S. G., Cui, Y., Allred, D. C., Horwitz, K. B., & Fuqua, S. A. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(8), 2751–2760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0141>

Cheung, J., & Smith, D. F. (2000). Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(7), 939–946. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0489>

Choe, S., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., & Feldmann, K. A. (1998). The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant cell*, 10(2), 231–243. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.231>

Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Feldmann, K. A. (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(6), 573-582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01055.x>

Chou, Y. -C. (2003). Mammary epithelial cells of PR-A transgenic mice exhibit distinct alterations in gene expression and growth potential associated with transformation. *Carcinogenesis*, 24(3), 403-409. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.3.403>

Ismaili, J., Boisvert, M., Longpré, F., Carange, J., Gall, C. L., Martinoli, M. -G., & Daoust, B. (2012). Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure–activity relationships. *Steroids*, 77(1-2), 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.10.009>

Jang, M., Han, G.S., & Kim, S. (2000). Identification of Brassinosteroids and Their Biosynthetic Precursors from Seeds of Pumpkin. *Bulletin of The Korean Chemical Society*, 21, 161-164.

Jensen, E. V., Block, G. E., Smith, S., Kyser, K., & DeSombre, E. R. (1971). Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *National Cancer Institute monograph*, 34, 55–70.

Jordan V. C. (1988). Long-term tamoxifen therapy to control or to prevent breast cancer: laboratory concept to clinical trials. *Progress in clinical and biological research*, 262, 105–123.

Jordan, V. C., Dix, C. J., Rowsby, L., & Prestwich, G. (1977). Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I.C.I. 46,474) in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 7(2), 177-192.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(77\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0303-7207(77)90066-1)

Kakar, M., Kanwal, C., Davis, J. R., Li, H., & Lim, C. S. (2006). Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, blocks cytoplasmic retention of progesterone receptors and glucocorticoid receptors via their respective ligand binding domains. *The AAPS journal*, 8(4), 718–728. <https://doi.org/10.1208/aapsj080481>

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., & Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal*, 9(5), 1603–1614.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., & Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5241), 1491–1494.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1491>

Katsumi, M. (1991). Physiological Modes of Brassinolide Action in Cucumber Hypocotyl Growth. *Brassinosteroids*, 246-254. <https://doi.org/10.1021/bk-1991-0474.ch021>

Khan, S. A., Rogers, M. A., Obando, J. A., & Tamsen, A. (1994). Estrogen receptor expression of benign breast epithelium and its association with breast cancer. *Cancer research*, 54(4), 993–997.

- Khripach, A., Zhabinskii, V., & de Groot, A. (1999). *A new class of plant hormones*
- Khripach, V., Altsivanovich, K., Zabinskii, V. and Samusevich, M. (2005). Natural plant compound with anti-HIV activity. (Patent) www.freshpatents.com.
- Kikkawa, M. (2013). Big steps toward understanding dynein. *Journal of Cell Biology*, 202(1), 15-23. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304099>
- Kinkor Z.. *Primární sarkomy prsu – vzácná a obtížná realita diagnostiky patologa. Sborník abstrakt XX. Jihočeských onkologických dnů. Klin Onkol 2013. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/primarni-sarkomy-prsu-vzacna-a-obtizna-realita-diagnostiky-patologa/>*
- Klener, P., Klener, P., & Vorlíček, J. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada.
- Koka, C. V., Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Clouse, S. D. (2000). A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant physiology*, 122(1), 85–98. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.85>
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5925–5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>
- Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., & Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 74(5), 311–317. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00108-4](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00108-4)
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment*, 83(3), 249–289. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc>

LASFARGUES, E. Y., & OZZELLO, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 21(6), 1131–1147.

Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P. H., & Murphy, L. C. (1998). Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer research*, 58(15), 3197–3201.

Li, X., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2004). A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mechanisms of ageing and development*, 125(10-11), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.04.007>

Lim, U.K., and Han, S. S (1988). The effect of plant growth regulating brassinosteroid on early state and yield of corn. *Seoul. Natl. Univ. Agricul. Sci.* 13, 1-14.

Lipka, J., Kuijpers, M., Jaworski, J., & Hoogenraad, C. C. (2013). Mutations in cytoplasmic dynein and its regulators cause malformations of cortical development and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1605-1612. <https://doi.org/10.1042/BST20130188>

Lupulescu A. (1995). Estrogen use and cancer incidence: a review. *Cancer investigation*, 13(3), 287–295. <https://doi.org/10.3109/07357909509094464>

Lydon, J. P., Ge, G., Kittrell, F. S., Medina, D., & O'Malley, B. W. (1999). Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer research*, 59(17), 4276–4284.

Mak, H. Y., Hoare, S., Henttu, P. M., & Parker, M. G. (1999). Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.5.3895>

Malíková, J., Swaczynová, J., Kolář, Z., & Strnad, M. (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*, 69(2), 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.028>

Manenti, S., Malecaze, F., & Darbon, J. -M. (1997). The major myristoylated PKC substrate (MARCKS) is involved in cell spreading, tyrosine phosphorylation of

paxillin, and focal contact formation. *FEBS Letters*, 419(1), 95-98.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01438-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01438-5)

McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews*, 20(3), 321–344.

<https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0366>

Misrahi, M., Atger, M., d'Auriol, L., Loosfelt, H., Meriel, C., Fridlansky, F., Guiochon-Mantel, A., Galibert, F., & Milgrom, E. (1987). Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143(2), 740-748.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91416-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91416-1)

Misrahi, M., Venencie, P. -Y., Saugier-veber, P., Sar, S., Dessen, P., & Milgrom, E. (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1216(2), 289-292.

[https://doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90156-8](https://doi.org/10.1016/0167-4781(93)90156-8)

Mitchell, J. W., & Whitehead, M. R. (1941). Responses of Vegetative Parts of Plants Following Application of Extract of Pollen from *Zea mays*. *Botanical Gazette*, 102(4), 770-791.

<https://doi.org/10.1086/335010>

Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., & Smith, M. V. (1970). Brassins--a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, 225(5237), 1065–1066.

<https://doi.org/10.1038/2251065a0>

Mote, P. A., Bartow, S., Tran, N., & Clarke, C. L. (2002). Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast cancer research and treatment*, 72(2), 163–172.

<https://doi.org/10.1023/a:1014820500738>

Mottis, A., Mouchiroud, L., & Auwerx, J. (2013). Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes & development*, 27(8), 819–835.

<https://doi.org/10.1101/gad.214023.113>

Mouneimne, G., Hansen, S. D., Selfors, L. M., Petrak, L., Hickey, M. M., Gallegos, L. L., Simpson, K. J., Lim, J., Gertler, F. B., Hartwig, J. H., Mullins,

- R. D., & Brugge, J. S. (2012). Differential Remodeling of Actin Cytoskeleton Architecture by Profilin Isoforms Leads to Distinct Effects on Cell Migration and Invasion. *Cancer Cell*, 22(5), 615-630. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.027>
- Mueck, A. O., & Seeger, H. (2010). 2-Methoxyestradiol—Biology and mechanism of action. *Steroids*, 75(10), 625-631. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.016>
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., & Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 33(5), 887–898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01675.x>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Manning, D. L., Wakeling, A. E., Montano, M. M., & Katzenellenbogen, B. S. (1995). Responses to Pure Antiestrogens (ICI 164384, ICI182780) in Estrogen-Sensitive and-Resistant Experimental and Clinical Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 761(1), 148-163. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb31376.x>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., Manning, D. L., Wakeling, A. E., Montano, M. M., & Katzenellenbogen, B. S. (1995). Responses to Pure Antiestrogens (ICI 164384, ICI182780) in Estrogen-Sensitive and-Resistant Experimental and Clinical Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 761(1), 148-163. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb31376.x>
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*, 81(4), 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee. (1999). *Cell*, 97(2), 161-163. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80726-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80726-6)
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science*, 116(8), 1409-1416. <https://doi.org/10.1242/jcs.00373>

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. -L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Pierson-Mullany, L. K., & Lange, C. A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Molecular and cellular biology*, *24*(24), 10542–10557. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10542-10557.2004>

Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouh, L., & Press, M. F. (1993). Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic reviews*, *15*(1), 17–35. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036102>

Podar, K., Raab, M. S., Zhang, J., McMillin, D., Breitkreutz, I., Tai, Y. -T., Lin, B. K., Munshi, N., Hideshima, T., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2006). Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). *Blood*, *109*(4), 1669-1677. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-042747>

Raab, M. S., Breitkreutz, I., Tonon, G., Zhang, J., Hayden, P. J., Nguyen, T., Fruehauf, J. H., Lin, B. K., Chauhan, D., Hideshima, T., Munshi, N. C., Anderson, K. C., & Podar, K. (2009). Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood*, *113*(7), 1513-1521. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157040>

Rárová, L., Sedlák, D., Oklestkova, J., Steigerová, J., Liebl, J., Zahler, S., Bartůněk, P., Kolář, Z., Kohout, L., Kvasnica, M., & Strnad, M. (2018). The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *178*, 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.005>

Rárová, L., Steigerová, J., Kvasnica, M., Bartůněk, P., Křížová, K., Chodounská, H., Kolář, Z., Sedlák, D., Oklestkova, J., & Strnad, M. (2016). Structure activity

relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 159, 154-169. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.017>

Reddy, G. S., Mukhopadhyay, A. G., & Dey, C. S. (2017). Characterization of ciliobrevin A mediated dynein ATPase inhibition on flagellar motility of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 214, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.04.003>

Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., & Horwitz, K. B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(7), 5209–5218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110090200>

Roffey, J., Rosse, C., Linch, M., Hibbert, A., McDonald, N. Q., & Parker, P. J. (2009). Protein kinase C intervention—the state of play. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 268-279. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.019>

Rokyta, R. (2015). *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Grada Publishing

Sairam, R. K. (1994). Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation*, 14(2), 173-181. <https://doi.org/10.1007/BF00025220>

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>

Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., & Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *The Journal of biological chemistry*, 275(8), 5379–5387. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5379>

- Sharma, P., & Bhardwaj, R. (2007). Effect Of 24-Epibrassinolide On Seed Germination, Seedling Growth And Heavy Metal Uptake In Brassica Juncea L. *Gen. Appl. plant physiology*, (33 (1-2), 59-73. <https://doi.org/10.1021/bk-1991-0474.ch021>
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81717-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81717-1)
- Shimada, Y., Goda, H., Nakamura, A., Takatsuto, S., Fujioka, S., & Yoshida, S. (2003). Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in Arabidopsis. *Plant physiology*, 131(1), 287–297. <https://doi.org/10.1104/pp.013029>
- Shoker, B. S., Jarvis, C., Clarke, R. B., Anderson, E., Hewlett, J., Davies, M. P., Sibson, D. R., & Sloane, J. P. (1999). Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *The American journal of pathology*, 155(6), 1811–1815. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65498-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65498-3)
- Shyamala, G., Yang, X., Silberstein, G., Barcellos-Hoff, M. H., & Dale, E. (1998). Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 696–701. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.696>
- Simian, M., Bissell, M. J., Barcellos-Hoff, M. H., & Shyamala, G. (2009). Estrogen and progesterone receptors have distinct roles in the establishment of the hyperplastic phenotype in PR-A transgenic mice. *Breast cancer research : BCR*, 11(5), R72. <https://doi.org/10.1186/bcr2408>
- Slipka, J., & Tonar, Z. (2018). Základy histologie: Vol. Druhé vydání. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Smith D. F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Molecular*

endocrinology (Baltimore, Md.), 7(11), 1418–1429.
<https://doi.org/10.1210/mend.7.11.7906860>

Smith, C. L., Nawaz, Z., & O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and Corepressor Regulation of the Agonist/Antagonist Activity of the Mixed Antiestrogen, 4-Hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, 11(6), 657-666.
<https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0009>

Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389(6647), 194–198. <https://doi.org/10.1038/38304>

Steigerová, J., Okleštková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., & Strnad, M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 487-496.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.006>

Takeno, K., & Pharis, R. P. (1982). Brassinosteroid-Induced Bending of the Leaf Lamina of Dwarf Rice Seedlings: An Auxin-Mediated Phenomenon. *Plant and Cell Physiology*, 23(7), 1275-1281. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076471>

Takimoto, G. S., Hovland, A. R., Tasset, D. M., Melville, M. Y., Tung, L., & Horwitz, K. B. (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *The Journal of biological chemistry*, 271(23), 13308–13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13308>

Tan, M. H., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*, 36(1), 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>

Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry*, 63, 451–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>

Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Shen, T., Harvell, D. M. E., Nitao, L. K., Richer, J. K., Sartorius, C. A., Takimoto, G. S., & Horwitz, K. B. (2006). Progesterone Receptors

(PR)-B and -A Regulate Transcription by Different Mechanisms: AF-3 Exerts Regulatory Control over Coactivator Binding to PR-B. *Molecular Endocrinology*, 20(11), 2656-2670. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0105>

Vajner, L., Uhlík, J., & Konrádová, V. (2018). *Lékařská histologie*. Charles University in Prague, Karolinum Press.

Vinopal, S., Cernohorská, M., Sulimenko, V., Sulimenko, T., Vosecká, V., Flemr, M., Dráberová, E., & Dráber, P. (2012). γ -Tubulin 2 nucleates microtubules and is downregulated in mouse early embryogenesis. *PloS one*, 7(1), e29919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029919>

Voňka, P., & Hrstka, R. (2019). Overview of Current Findings about the Role of Oestrogen Receptor α in Cancer Cell Signalling Pathways. *Klinická Onkologie*, 32(3), 34-38. <https://doi.org/10.14735/amko20193S34>

Voňka, P., Rárová, L., Bazgier V., Berka K., Kvasnica M., Oklešťková J., Kudová E., Strnad M., Hrstka R. (2020). Molecular docking and structure-function relationship to identify novel anti-oestrogens. *Czech chemical society symposium series*, 18 (2020)(4). <http://www.interdisciplinarymeeting.cz/shell/sbornik-2020.pdf>

Wachsman, M. B., Castilla, V., Talarico, L. B., Ramirez, J. A., Galagovsky, L. R., & Coto, C. E. (2004). Antiherpetic mode of action of (22S,23S)-3 β -bromo-5 α ,22,23-trihydroxystigmastan-6-one in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23(5), 524-526. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.10.002>

Wachsman, M. B., Ramirez, J. A., Galagovsky, L. R., & Coto, C. E. (2002). Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 13(1), 61–66. <https://doi.org/10.1177/095632020201300105>

Ward, R. D., Weigel, N. L., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. -Å., & Carlquist, M. (2009). Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *BioFactors*, 35(6), 528-536. <https://doi.org/10.1002/biof.66>

Wegner A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology*, 108(1), 139–150. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(76\)80100-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(76)80100-3)

Wilson, P. G., & Borisy, G. G. (1997). Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 19(6), 451–454. <https://doi.org/10.1002/bies.950190603>

Xie, Z., & Tsai, L. -H. (2014). Cdk5 Phosphorylation of FAK Regulates Centrosome-Associated Microtubules and Neuronal Migration. *Cell Cycle*, 3(2), 105-108. <https://doi.org/10.4161/cc.3.2.646>

Xu, W., Purugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., & Braam, J. (1995). Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *The Plant cell*, 7(10), 1555–1567. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1555>

Yokota, T., Arima, M., & Takahashi, N. (1982). Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters*, 23, 1275-1278.

Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M., & Tsukita, S. (2005). Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice. *Developmental biology*, 282(2), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.031>

Zaveri, N. T., & Murphy, B. J. (2007). *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier.

Zsarnovszky, A., Kiss, D., Jocsak, G., Nemeth, G., Toth, I., & Horvath, T. L. (2018). Thyroid hormone- and estrogen receptor interactions with natural ligands and endocrine disruptors in the cerebellum. *Frontiers in neuroendocrinology*, 48, 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.10.001>