

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Barbora Majerová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Indukce senescence vybranými deriváty indolu

Bakalářská práce

Barbora Majerová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora MAJEROVÁ**
Osobní číslo: **R20708**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Indukce senescence vybranými deriváty indolu**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení aktivity beta-galaktosidázy v buňkách rakoviny prostaty
- 3) Stanovení hladiny exprese proteinu p16
- 4) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Gupta et al: Interleukin-23 Represses the Level of Cell Senescence Induced by the Androgen Receptor Antagonists Enzalutamide and Darolutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Hormones and Cancer*, 2020
- 2) Hessenkemper et al: A natural androgen receptor antagonist induces cellular senescence in prostate cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 2014
- 3) Fenner A: A new class of AR antagonists? *Nature Reviews. Urology*, 2019
- 4) Qin S et al: Role of senescence induction in cancer treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, 2018
- 5) Collado et al: Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 2005

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 30. září 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 6. října 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Barbora Majerová
Název práce	Indukce senescence vybranými deriváty indolu
Typ práce	Bakalářská práce
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce se vlivem indolových derivátů na vybrané markery senescence v CRPC. V literárním přehledu je popsána senescence a její nejběžnější markery, jako je p16^{INK4a} a SA-β-galaktosidáza. Další kapitoly se zabývají tématem karcinomu prostaty a vzniku jeho rezistence na anti-androgenní léčbu (CRPC). Experimentální část byla rozdělena na dvě. V první části byla měřena hladina proteinů p16^{INK4a} a p21^{WAF1} pomocí analytické metody western blot. Ve druhé části byla stanovena aktivita SA-β-galaktosidázy pomocí komerční soupravy. Výsledky ukázaly, že hladina proteinu p16^{INK4a} byla zvýšená pomocí všemi testovanými deriváty indolu, nejvyšší navýšení bylo detekováno u 4MI, 2,3-DMI a 7MeO-4MI. Hladina proteinu p21^{WAF1} nebyla pomocí indolových derivátů navýšena. Aktivita SA-β-galaktosidázy nebyla indukovaná přítomností pozitivních kontrol ani po úpravě metodologických parametrů, proto nebyl sledován vliv indolů na její aktivitu.</p>
Klíčová slova	senescence, CRPC, AR, deriváty indolu
Počet stran	38
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Barbora Majerová
Title	Senescence induction with selected indole derivatives
Type of thesis	Bachelor thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the impact of indole derivatives on selected markers of senescence in CRPC. The theoretical part describes senescence and its most common markers, such as p16^{INK4a} and SA-β-galactosidase. The other chapters deal with the topic of prostate cancer and the development of its resistance to anti-androgen therapy. The experimental part is divided into two part. First, the protein level of p16^{INK4a} and p21^{WAF1} was measured by western blot. Second, SA-β-galactosidase activity was determined fluorometrically with comercial kit. The p16^{INK4a} protein level was increased by the all tested indole derivatives, the greatest induction was observed for 4MI, 2,3-DMI and 7MeO-4MI. The protein level of p21^{WAF1} was not increased by indole derivatives. SA-β-galactosidase activity was not induced by positive controls regardless of modified parameters. Therefore, indoles were not tested in SA-β-galaktosidase aktivty assay.</p>
Keywords	senescence, CRPC, AR, indole derivatives
Number of pages	38
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. s použitím veškerých uvedených zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Barbora Majerová

Poděkování

V této části bych velice ráda poděkovala svému vedoucímu práce, doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za jeho obrovskou trpělivost, čas, profesionalitu a vstřícnost. Zároveň bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry buněčné biologie a genetiky, především však Mgr. Elišce Zgarbové, za ochotu poradit a předat zkušenosti. Velké díky patří také mé rodině a přátelům, kteří mě během studia vždy podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Buněčný cyklus a jeho regulační body	3
3.2	Senescence	4
3.2.1	Protein p16 ^{INK4a}	5
3.2.2	Protein p21 ^{WAF1}	6
3.2.3	SA – β -galaktosidáza	6
3.3	Prostata a mužské pohlavní ústrojí	7
3.4	Androgenní receptor	9
4	Rakovina prostaty	11
4.1	Kastračně rezistentní rakovina prostaty	12
4.2	Indolové deriváty a nádorové onemocnění	14
5	MATERIÁL A METODY	16
5.1	Biologický materiál	16
5.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	16
5.3	Seznam použitých laboratorních přístrojů a zařízení	19
5.4	Metodika práce	20
5.4.1	Příprava kultivačního média	20
5.4.2	Pasážování buněk a vysívání	20
5.4.3	Vystavení buněk derivátům indolu	21
5.4.4	Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace	21
5.4.5	Elektroforéza v akrylamidovém gelu	22
5.4.6	Semi – dry a vyhodnocení western blottingu	23
5.4.7	SA- β -galaktosidázová esej	24
5.4.8	Stanovení proteinů pro SA- β -galaktosidázovou esej	25
6	VÝSLEDKY	26
6.1	Detekce proteinu p16 ^{INK4a} a p21 ^{WAF1} pomocí western blot analýzy	26
6.2	Detekce SA- β -galaktosidázy	28
7	DISKUZE	32
8	ZÁVĚR	35
9	LITERATURA	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

1,3-DMI	1,3-dimethylindol
2,3,7-TMI	2,3,7-trimethylindol
2,3-DMI	2,3-dimethylindol
3MI	3-methylindol
4,6-DMI	4,6-dimethylindol
4MI	4-methylindol
4-MU	4-methylumbelliferyl
4-MUG	4-methylumbelliferyl β -D-galaktopyranosid
5,6-DMI	5,6-dimethylindol
5AR	5 α -reduktáza
7MeO-4MI	7-methoxy-4-methylindol
AA	kyselina atrarová
ANRIL	antisense nekódující RNA na INK4 lokusu
AP-1	aktivační protein-1
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenní receptor
ARE	androgen response elements
BA1	bafilomycin A1
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BSA	bovinní sérový albumin
CDK	cyklin dependentní kináza
CDKI	inhibitor cyklin dependentní kinázy
CRPC	kastračně rezistentní rakovina prostaty
DBD	DNA vázající doména
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	5 α -dihydrotestosteron

DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
ENZ	enzalutamid
Ezh2	enhancer of zeste homolog 2
FBS	fetální bovinní sérum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina
HR	pantová oblast
HSP	heat shock protein
I3C	indol-3-karbinol; 3-hydroxymethylindol
IL	interleukin
JMJD3	the jumonji domain-containing protein-3
LBD	ligand – vazebná doména
LH	luteinizační hormon
MMP	metaloproteiny
NTD	N – terminální doména
PcG	polycomb-group proteins
PRC	polycomb repressive complex
PSA	prostatický specifický antigen
PVDF	polyvinylidenfluorid
Rb	retinoblastomový protein
RFU	relativní fluorescenční jednotka
SA- β -galaktosidáza	senescencí aktivovaná β -galaktosidáza
SASP	senescence-associated secretory phenotype
Ser139	serin 139
SHBG	globuliny vázající pohlavní hormony
SSK1	senescence-specific killing compounds 1

TEMED	N, N, N', N' – tetramethylethyldiamin
TIS	terapií indukovaná senescence
UT	untreated (negativní kontrola)
V – ATPáza	vakuolární ATPáza
X-gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl β -D-galaktopyranosid

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: Popis a porovnání zdravých prostatických buněk (vlevo) a buněk rakoviny prostaty (vpravo), upraveno.

Obrázek 2: Schéma androgenního receptoru.

Obrázek 3: Chemická struktura indolu.

Obrázek 4: Výsledek western blot analýzy pro protein p16^{INK4a} a p21^{WAF1}.

Graf 1: Detekce proteinu p16INK4a pomocí metody western blot v nádorové linii 22Rv1.

Graf 2: Detekce proteinu p21WAF1 pomocí metody western blot v nádorové linii 22Rv1.

Graf 3: Hladina fluorescence indukovaná přítomností SA- β -galaktosidázy.

Graf 4: Aktivita SA- β -galaktosidázy – vliv inkubace.

Graf 5: Vliv bafilomycinu A1 (BA1) na SA- β -galaktosidázu v nádorové linii 22Rv1.

Graf 6: Koncentrace proteinů pro SA- β -galaktosidázou esej v nádorové linii 22Rv1.

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Objemy chemikálií a roztoků pro přípravu akrylamidového gelu.

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění patří mezi závažné nemoci, které nejčastěji postihují tkáně jako jsou prsa, střeva, konečník, plíce či prostata. S karcinomem prostaty se v obvyklých případech setkávají muži ve středním a vyšším věku. V raném stádiu je karcinom prostaty bezpříznakový, v jeho pozdějších fázích pak popisují pacienti erektilní dysfunkci a potíže s močením. Léčba rakoviny prostaty je obtížná, obvykle zahrnuje chirurgické odstranění nádoru i samotné prostaty, chemoterapeutickou léčbu, a také podávání anti-androgenních léků. Anti-androgenní léčba slouží pro inhibici proliferace prostatických buněk zprostředkovanou androgeny, které jsou ligandem androgenního receptoru. Přestože je léčba po určitou dobu úspěšná, velký problém nastává v situaci, kdy si prostatické nádorové buňky vytvoří rezistenci vůči anti-androgenní léčbě a stává se neúčinnou. Indukce senescence v karcinogenních buňkách by mohla mít významnou roli v pozastavení proliferace nádorových buněk a zabránění dalšímu rozšiřování nádoru v organismu. Pokud by bylo možné indukovat senescenci v nádorových buňkách, mohl by tento způsob léčby umožnit zpomalení rozšiřování onemocnění a jeho léčba by mohla být dále zprostředkována pomocí chemoterapeutické léčby, chirurgického zákroku nebo dalších léků.

Indolové deriváty představují skupinu potencionálních léků, které by mohly mít významný podíl v indukci senescence v nádorových liniích. Někteří zástupci indolových derivátů jako je 3MI, 4MI, 1,3-DMI, 2,3-DMI, 4,6-DMI, 5,6-DMI, 7MeO-4MI, 2,3,7-TMI vykazují antagonistickou aktivitu vůči androgennímu receptoru a mohly by být slibnými adepty pro další výzkum v oblasti senescence v prostatických nádorových liniích rezistentních na anti-androgenní léčbu.

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování rešerše na téma bakalářské práce

Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace

Experimentální část

Stanovení aktivity β -galaktosidázy v buňkách rakoviny prostaty

Stanovení hladiny exprese proteinu p16

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Buněčný cyklus a jeho regulační body

Buněčný cyklus je sled událostí, při kterých dochází ke zmnožení genetického materiálu v buňce a jeho následnému rovnoměrnému rozdělení do dceřiných buněk. V eukaryotické buňce se cyklus buněčného dělení skládá z několika fází předcházejících jejímu samotnému rozdělení. Fáze cyklu jsou G₁, S, G₂ a M. G₀ fáze může nastat po G₁ fázi a je důležitým regulačním bodem buněčného cyklu. Během této fáze dochází ke kontrole či opravě DNA. Jedná se o důležitý bod, kdy se buňka rozhodne, zda bude pokračovat v dělení. Kontrola kvality stavu buňky a DNA je klíčovým faktorem před samotným rozdělením. Eukaryotické buňky prochází během dělení kontrolními body zajišťující bezchybný proces rovnoměrného dělení DNA do dceřiných buněk. Pokud se v těchto kontrolních bodech odhalí chyba (např. poškození DNA), zahájí buňka proces opravy DNA, apoptózy nebo senescence (Barnum *et* O'Connell, 2014).

Buněčný cyklus je jeden z nejkontrolovanějších dějů v buňce. Tento děj je kontrolován při každém vstupu z jedné fáze do další. Aby buňka mohla vstoupit do procesu dělení, musí na ni působit růstové faktory, mezi které patří např. proteiny z rodiny Ras. Růstové faktory zajišťují vstup buňky do G₁ fáze. G₁ fáze je tak jediná dependentní fáze na růstových faktorech. Nepostradatelnou klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu hrají cyklin – dependentní kinázy (CDK), což jsou enzymy, jejichž aktivitu ovlivňují sloučeniny nazývané cykliny. V buněčném cyklu eukaryotických buněk cykliny A, B, D a E slouží jako aktivátory pro CDK. Zablokování komplexu CDK s cyklinem je zprostředkována inhibitory cyklin – dependentních kináz (CDKI) (Blagosklonny, 2001).

Během G₁ fáze musí buňka projít tzv. restričním bodem, který je zodpovědný za přechod z G₁ fáze do S fáze buněčného cyklu. V tomto bodě se na CDK 4 a 6 vážou cykliny z třídy D a díky tomuto spojení dochází k fosforylaci retinoblastomového proteinu (Rb). Transkripční faktory E2F uvolněné po fosforylaci Rb jsou zodpovědné za transkripci genů zajišťující přechod G₁/S fáze. CDKI jsou za běžných podmínek v buňce ve velmi nízkých koncentracích, protože dochází k jejich degradaci v proteazomu. CDKI jsou aktivovány, pokud dojde k poškození DNA. Aktivované CDKI inhibují CDK, zabraňují fosforylaci Rb a následné transkripci E2F. Mezi nejznámější CDKI patří protein p53, který je aktivován při poškození DNA způsobující zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu, a zároveň indukuje transkripci proteinu p21^{WAF1} zodpovědného za inhibici CDK. Dalším důležitým CDKI je protein p16^{INK4a}, který při své aktivní formě může způsobovat senescenci (Qin *et al.*, 2018).

3.2 Senescence

Senescence nebo také buněčné stárnutí, je fyziologický proces probíhající v eukaryotických buňkách, při kterém dochází k zastavení buněčného cyklu. Buněčné stárnutí může být způsobeno jak poškozením DNA, tak např. mutací v Ras proteinu. Pokud jedna z těchto událostí nastane, může buňka vstoupit do reversibilní senescence, opravit chyby a nazpět vstoupit do buněčného cyklu. Pokud buňka není schopna chyby opravit, může docházet k ireversibilní senescenci, během které jsou zachovány fyziologické funkce buňky, ale schopnost dělit se je omezena. Buněčné stárnutí patří k přirozeným dějům v buňce, mohlo by však hrát významnou roli v potlačení nádorových onemocnění. Mezi hlavní znaky senescentních buněk se řadí zploštělá a zvětšená morfologie buněk, zvýšený výskyt granul, fluorescence způsobená zvýšeným množstvím fuchsinu, vyšší obsah reaktivních forem kyslíku a zvýšená exprese genu pro SA – β -galaktosidázu. Právě SA – β -galaktosidáza je v diagnostice využívána jako jeden z markerů senescence. Jako další markery senescence jsou využívány proteiny p21^{WAF1} a p16^{INK4a}, přičemž hladina těchto proteinů se během samotného procesu senescence postupně zvyšuje (Lee *et al.*, 2006). Oba tyto proteiny nejsou přítomny v nádorových buňkách, které ztratily schopnost regulovat svou proliferaci (Collado *et al.*, 2005).

Senescentní buňky rovněž produkují různé proteiny, které mohou být využívány jako markery buněčného stárnutí. Mezi tyto sekretované proteiny patří cytokiny (IL-6), chemokiny (IL-8), metaloproteiny (MMP) a růstové faktory produkované prostřednictvím SASP (senescence-associated secretory phenotype). Přestože jsou tyto proteiny produkovány senescentními buňkami, mají velký potenciál negativně ovlivňovat okolní buňky a po jejich delší expozici vyvolat nádorové onemocnění. Při zvýšené expresi proteinu p16^{INK4a} je zaznamenáno snížení hladiny SASP. V takovém případě nedochází k vysoké tvorbě cytokinů a chemokinů, které by mohly v průběhu života nebo nádorové terapie ohrozit okolní buňky (Coppé *et al.*, 2010).

Během senescence dochází také k potlačení buněčné proliferace pomocí inhibice exprese genů podporujících buněčný cyklus. Nejčastěji bývá potlačena exprese genu pro transkripční faktor E2F. Při potlačení buněčné proliferace pomáhá SAHF (senescence-associated heterochromatin foci), což je součást fakultativního heterochromatinu. V tomto případě lze použít jako marker senescence histonový protein H2AX, který je součástí SAHF. V případě poškození DNA je H2AX fosforylován na Ser139 a změněn na γ -H2AX, který může být následně pomocí specifických protilátek detekován (Rodier *et al.*, 2011).

Ve fibroblastických buňkách bylo popsáno, že pokud dojde k expresi onkogenu, je spuštěna tzv. onkogenem indukovaná senescence zahrnující kaskádu těchto proteinů (p16^{INK4a}, p21^{WAF1} a p53), které jsou zodpovědné za nadměrnou expresi genu pro SA-β-galaktosidázu. Velkým problémem většiny nádorových onemocnění je zisk rezistence vůči dostupným chemoterapeutikům. V posledních letech je velmi slibným cílem indukce senescence u nádorových onemocnění, a tak zabránění dalšímu rozšiřování nádoru. Nádorové buňky, u kterých je indukovaná senescence, jsou následně usmrcovány např. senolytickými léky působící výhradně proti senescentním buňkám. Tento moderní přístup v léčbě nádorových onemocnění je označován jako terapií indukovaná senescence (TIS) (Valieva *et al.*, 2022).

3.2.1 Protein p16^{INK4a}

Geny pro protein p16^{INK4a} leží na chromozomu 9p21 v oblasti lokusu Ink4b/ARF/Ink4a. Tento lokus nese geny pro CDK, jako je např. protein p16^{INK4a}, p15^{INK4b} nebo p14^{ARF}, kdy čtecí rámce těchto proteinů se vzájemně překrývají. Protein p16^{INK4a} je transkribován z exonu 2, 3 a 1α, lokalizovaného 20 kb downstream od 1β exonu. Mechanismus inaktivace exprese genu pro protein p16^{INK4a}, p15^{INK4b} nebo p14^{ARF} je založena na metylaci histonu H3K27, za kterou je zodpovědný proteinový komplex PcG (Polycomb group). Součástí PcG jsou komplexy PRC1 a PRC2, kdy PRC2 se skládá ze tří komponent – Ezh2, Eed a Suz12. Ezh2 je katalytická složka PRC2, která je schopna metylovat histon H3K27. Díky této epigenetické modifikaci se může PRC1 navázat spolu s dalšími komponentami, jako je např. BMI1 a způsobit inhibici exprese genu pro protein p16^{INK4a}, p15^{INK4b} nebo p14^{ARF}. Aby se mohly komplexy navázat, musí být na lokusu přítomná lncRNA (ANRIL). Tato nekódující antisense RNA je zodpovědná za nasednutí proteinových komplexů PcG. Tato skutečnost vede ke zvýšení buněčné proliferace, která může být zaznamenána u nádorových buněčných liniích. Demethylace histonu H3K27 pomocí demetylázy JMJD3 působící současně se snižující se hladinou proteinů BMI1, Ezh2, Eed a Suz12, aktivuje expresi genu pro protein p16^{INK4a} a způsobuje indukci senescence (Kotake, 2015).

Transkripce genu pro protein p16^{INK4a} může být také aktivována transkripčními faktory AP-1, které jsou heterodimerní, reagují prostřednictvím leucinového zipu a obsahují proteiny patřící do rodiny c-Jun, Jun B nebo JDP. Proteiny z rodiny JDP inhibují nasednutí komplexů PRC1 a PRC2 zabraňující metylaci histonu H3K27. Zároveň transkripční faktor Jun B brání expresi cyklinu D1, a tím podporuje proteosyntézu proteinu p16^{INK4a}. Některá nádorová onemocnění můžou být způsobena onkogeny vyvolávající onkogenem zprostředkovanou senescenci. V takovém případě je exprese genu p16^{INK4a} v raných fázích snížena pomocí aktivace

transkripčních faktorů DMNT1 způsobující metylaci histonu. Po delší signalizaci onkogenem jsou inhibovány transkripční faktory E2F, přičemž tato inhibice zajišťuje opětovnou expresi genu p16^{INK4a}. Takto aktivovaná dráha exprese genu p16^{INK4a} je založena na skutečnosti, že v nádorových liniích je potlačena exprese genu p53. Z tohoto důvodu bývá gen pro protein p16^{INK4a} označován jako záložní supresorový gen (Rayess *et al.*, 2012).

3.2.2 Protein p21^{WAF1}

Protein p21^{WAF1} je jedním z dalších markerů senescence a jeho exprese je nezávislá na mechanismu exprese genu pro protein p16^{INK4a}. Geny pro tento protein leží na chromozomu 6p21.2 v oblasti WAF1 (Salari Fanoodi, 2015). I v tomto případě může být senescence indukovaná poškozením DNA, UV zářením či onkogeny. Transkripce genu pro protein p21^{WAF1} je aktivovaná prostřednictvím proteinu p53. V regulaci proteinu p53 hraje důležitou roli protein p14^{ARF} zachycující ubiquitin ligázu Mdm2 a narušuje vazbu ubiquitin ligázy na N-terminální konec proteinu p53, která zprostředkovává jeho degradaci. Protein p53 může způsobit apoptózu poškozené buňky nebo aktivaci transkripce proteinu p21^{WAF1} potlačující aktivitu cyklinu E a CDK4, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi (Rayess *et al.*, 2012).

3.2.3 SA-β-galaktosidáza

β-galaktosidáza je lysozomální enzym štěpící β-galaktosidy, jako je např. laktóza. Neaktivní forma tohoto enzymu (86 kDa) je aktivovaná pomocí lysozomálních proteáz na jeho aktivní formu (64 kDa). Tato β-galaktosidáza se vyskytuje ve zdravých starších buňkách jako příznak fyziologického stárnutí a je aktivní, tudíž i detekovatelná při pH 4. Tímto způsobem mohou být rozlišované buňky „mladé“ nebo „staré“ (Valieva *et al.*, 2022).

V nádorových buňkách, které jsou senescentní, je přítomna SA-β-galaktosidáza aktivní při pH 6. V některých studiích je pH upravováno pomocí lysozomálních inhibitorů udržující zásaditější pH lysozomů, které zároveň brání jejich dalšímu okyselení. Bafilomycin A1 (BA1) je antibiotikum, patřící k inhibitorům V-ATPáz umožňujícím udržení zásaditějšího pH v lysozomech (Fuhmann-Stroissnigg *et al.*, 2019).

Normální β-galaktosidáza je kódovaná genem *GLBI* ležícím na chromozomu 3p21.33. V nádorových buňkách je exprese tohoto genu výrazně zvýšená. SA-β-galaktosidáza se řadí k významným biomarkerům buněčného stárnutí, který bývá využíván pro svou jednoduchou detekci a specifickou pro senescenci. Detekce je nejčastěji prováděna přidáním X-gal substrátu, do média k buněčné linii. SA-β-galaktosidáza jej rozkládá na bezbarvý produkt galaktózu a modrý produkt 4-chlor-3-bromindigo. Uvedený modrý produkt je nejčastěji pozorován

v buněčných liniích pod mikroskopem. Podle modrého zbarvení v lysozomech je určeno, zda se jedná o senescentní buněčnou linii či nikoliv (Lee *et al.*, 2006).

Jsou známé další zobrazovací metody, ke kterým patří např. fluorescenční sondy schopné své aktivace, až po setkání se s cílovou tkání obsahující SA- β -galaktosidázu. Tento mechanismus může být pozorován u kolorektálního karcinomu *in vivo* během fluorescenční endoskopie. Léčivo SSK1 je řazeno k senolytikům, používá se k léčbě nádorových onemocnění při TIS a obsahuje látku gemcitabin. V přítomnosti SA- β -galaktosidázy je tento lék aktivován a eliminuje pouze senescentní buňky (Valieva, 2022).

3.3 Prostata a mužské pohlavní ústrojí

Prostata, nebo také předstojná žláza je přídatný orgán mužské pohlavní soustavy. Nachází se v malé pánvi. Jeho velikost a tvar je přirovnáván vlašskému ořechu. Jedná se o nepárový, svalnato-žláznatý orgán skládající se ze dvou laloků. Báze prostaty (*basis prostatae*) je přilehlá na močový měchýř, přičemž hrot (*apex prostatae*) míří dopředu. Středem samotné prostaty prochází močová trubice (*urethra*). Prostatická tkáň je tvořena pěti různými typy buněk: kmenové buňky, prekurzorové buňky, neuroendokrinní buňky, bazální epiteliální buňky a sekreční luminální buňky (Obrázek 1). Luminální buňky produkují prostatický specifický antigen (PSA), obsahují androgenní receptor a jsou závislé na androgenech. Bazální epiteliální buňky vykazují nižší expresi androgenního receptoru (Messner *et al.*).

Hlavní fyziologická funkce předstojné žlázy je produkce sekretu o mírně kyselém pH, který je součástí ejakulátu. Tento sekret obsahuje PSA, který je důležitý pro správnou aktivitu spermií (Holibková, 2002).

Muži ve starším věku mohou mít zmnoženou hladkou svalovinu a vazivo prostaty s následným utlačováním močové trubice. Toto onemocnění je označováno jako benigní hyperplazie prostaty (BHP) (Descotes, 2019).

V důsledku hormonálního řízení prostaty, je její funkce silně závislá na dostatečném množství androgenních hormonů a jejich správné vazbě na androgenní receptor. Během života muže je hladina pohlavních hormonů kolísavá a cca po čtyřicátém roku života klesá (Burianová, 2012).

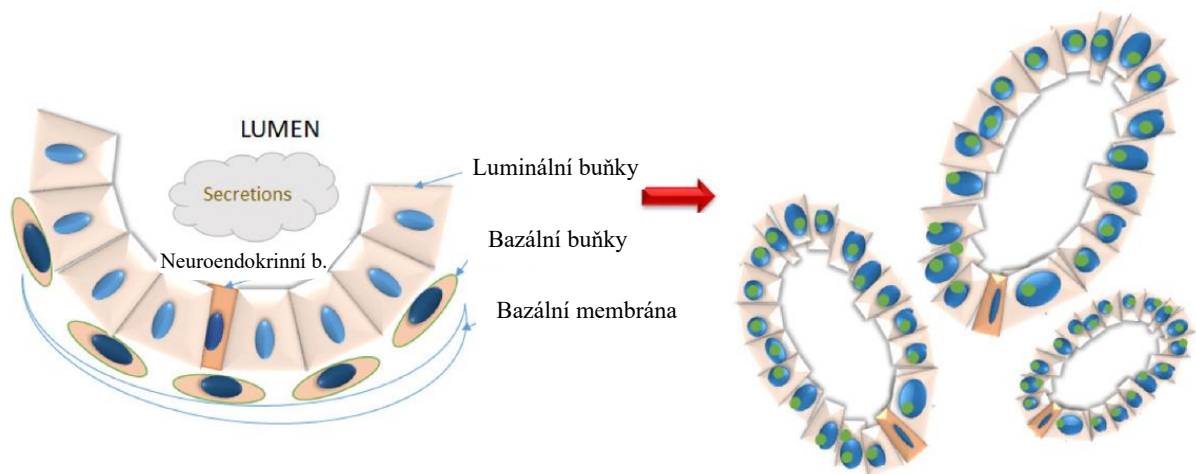
Varlata (*testis*) jsou mužský párový orgán uložený v šourku (*scrotum*). Jejich velikost je přibližně 4 cm. Vnitřní prostor varlat je rozdělen na jednotlivé lalůčky vazivovým septem (*septula testis*). V těchto lalůčcích jsou stočeny semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi contorti*). Tyto kanálky jsou důležité pro mužskou pohlavní soustavu, protože v nich probíhá

spermatogeneze (Holibková, 2002). Mezi semennými kanálky jsou přítomny Leydigovy buňky, které tvoří mužské pohlavní hormony (Heinlein *et* Chang, 2004).

Normální funkce prostaty je zajišťována pomocí steroidních hormonů, tzv. androgenů. Mezi tyto hormony patří testosteron a 5 α -dihydrotestosteron (DHT). Testosteron je aktivován enzymem nazývaným 5 α -reduktáza (5AR), pomocí které dochází ke vzniku jeho aktivnější formy DHT s až 5x větší afinitou k androgennímu receptoru. Volný testosteron se váže v krvi buď na globulin (SHBG) nebo na albumin (Heinlein *et* Chang, 2004).

Vazba testosteronu k 5 α -reduktáze je rozdílná u jejích dvou izoform. 5 α -reduktáza 1 (5AR1) je exprimována v játrech, kůži či vlasových folikulech, a její afinita k testosteronu je nižší. Izoforma 5 α -reduktázy 2 (5AR2) exprimována převážně v prostatické tkáni má afinitu k testosteronu podstatně vyšší (Messner *et al.*, 2020).

Testosteron je produkován v Leydigových buňkách varlat, které jsou ovlivňovány luteinizačním hormonem (LH). Luteinizační hormon je tvořen v předním laloku hypofýzy, odkud je transportován do pohlavních orgánů. Podávání léků blokující tvorbu luteinizačního hormonu je jednou z metod využívanou v léčbě rakoviny prostaty (Rao, 2001).



Obrázek 1: **Popis a porovnání zdravých prostatických buněk (vlevo) a buněk rakoviny prostaty (vpravo), upraveno (Messner *et al.*, 2020).**

Nalevo jsou znázorněny luminální a bazální buňky epitelu prostatické tkáně. Bazální membrána je vystýlána bazálními buňkami. Jak lze pozorovat, menší část tvoří neuroendokrinní buňky, které mohou také sloužit jako kmenové buňky pro opravu poškozené tkáně. Napravo je znázorněn epitel rakoviny prostaty. Ztráta bazálních buněk má za následek rozpad bazální membrány. Dochází k hyperproliferační lumínálních buněk, u kterých se zvětšuje jádro (modré) s jadérkem (zelené).

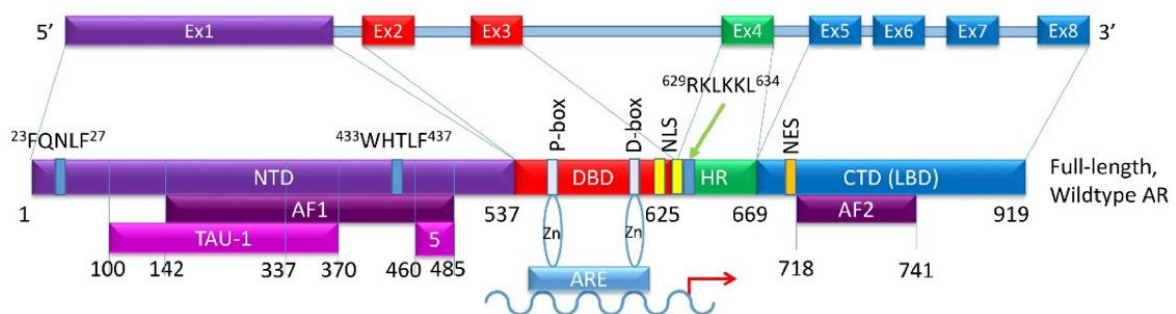
3.4 Androgenní receptor

Androgenní receptor (AR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Gen pro androgenní receptor se nachází na chromozomu Xq11-12. Kódovaný AR má velikost 110 kDa a sestává z 920 aminokyselin. Samotný receptor se skládá z několika částí: N – terminální domény (NTD), DNA – vazebné domény (DBD), pantové oblasti (HR) a C – terminální domény, která nese ligand – vazebnou doménu (LBD). Na úseku DNA, která nese gen pro AR se nachází 8 exonů, ze kterých jsou následně kódovány všechny jeho domény. Exon 1 kóduje NTD, exony 2 a 3 kódují DBD, exon 4 kóduje HR a exony 5-8 kódují LBD. NTD obsahuje aktivační oblast AF-1, zodpovědnou za jeho maximální aktivitu. LBD nese aktivační oblast AF-2 důležitou pro dimerizaci receptoru po translokaci AR do jádra buňky (Obrázek 2). V cytoplazmě buňky je AR chráněn chaperony (HSP 27, 40, 70 a 90), aby nedocházelo k jeho degradaci. Při navázání androgenu na AR dojde ke konformační změně receptoru, fosforylaci HSP27, a následně pak k odštěpení ostatních chaperonů. Fosforylovaný komplex AR s androgenem tak může být translokován do jádra buňky, kde dochází k jeho dimerizaci a následné vazbě do tzv. androgen response element (ARE). Pro přesnou translokaci do jádra slouží pantová oblast receptoru. Vazba do ARE je zprostředkována pomocí motivu zinkových prstů, které jsou součástí DBD, nacházející se v oblasti P a D-boxu (Obrázek 2). Vazba aktivovaného AR do ARE bývá ovlivňována dalšími proteiny označovány jako koregulátory a jsou zodpovědné za finální aktivaci či inhibici transkripce cílových genů. Mezi koaktivátory patří např. SRC1 nebo TIF2, které interagují s AF-2 za účelem podpoření aktivity AR. Naopak, mezi korepresory se řadí např. kalretikulín bránící vazbě translokovaného AR do DNA v jádře. Mezi další transkripční faktory pomáhající regulovat transkripci cílových genů patří Tau-1 a Tau-5. Tyto transkripční faktory se váží společně s koregulátory na aktivovaný AR (Messner *et al.*, 2020).

Na genu pro androgenní receptor se nacházejí dvě tripletové repetice CAG a GGN variabilní ve své délce. Oblast (CAG)_n kóduje polyglutamin a (GGN)_n kóduje polyglycin (Heinlein, 2004). Nadměrný počet repetice GGN může být zodpovědný za sníženou funkci tvorby spermií (Grigorova *et al.*, 2017).

Pro zkoumání rakoviny prostaty je zajímavější oblast CAG repetice, která se nachází na NTD. Tato oblast AR je důležitá pro správnou ligandem aktivovanou transkripci cílových genů. Čím nižší je počet repetice CAG, tím je lépe zprostředkována signalizace pomocí vazby testosteronu na AR. Všeobecně je nadměrná délka CAG oblastí na genech v posledních letech spojována s některými vážnými nemocemi, jako je např. Huntingtonova nebo Kennedyho choroba (Chamberlain *et al.*, 1994).

Běžný počet CAG repetice bývá mezi 8-30, přičemž větší množství repetice je zodpovědné za sníženou transkripční aktivitu AR. V některých studiích byl zkoumán vztah počtu CAG s karcinomem prostaty. Mechanismus principu účinku repetice CAG není zcela objasněn, protože u některých karcinomů prostaty nehrála délka repetice CAG významnější roli. Je ovšem možné, že repetice CAG potřebují pro své působení další genetické nebo environmentální faktory. Jedním z takových faktorů by mohly být např. koregulátory AR, přičemž čím větší je počet repetice CAG, tím slabší je vazba mezi koregulátorem a AR, v takovém případě se tedy snižuje transkripční aktivita AR. Některé karcinomy prostaty mají zvýšené hladiny koaktivátoru SCR1 a TIF2, z čehož vyplývá, že pokud mají zdraví jedinci zvýšené hladiny koaktivátoru a kratší repetice CAG na AR, mají větší riziko karcinomu prostaty. Je velmi zajímavé, že počet těchto repetice se liší mezi různými etnickými skupinami v souvislosti s incidencí karcinomu prostaty. V asijské populaci je nejnižší incidence karcinomu prostaty, a zároveň je jejich délka repetice CAG nejdelší (21-22 repetice). Naopak černošská populace má nejvyšší incidenci karcinomu prostaty a délku repetice CAG nejkratší (18 repetice) (Heinlein *et* Chang, 2004).



Obrázek 2: Schéma androgenního receptoru.

V horní části obrázku je znázorněn gen pro AR s exony. Na spodní části obrázku je kódovaný AR, který je přepisován z těchto exonů. Na schématu jsou zobrazeny i některé aminokyselinové sekvence určitých částí AR, transkripční faktory ovlivňující expresi cílových genů a vazba receptoru do ARE místa na DNA v jádře buňky (Messner *et al.*, 2020).

4 Rakovina prostaty

Rakovina prostaty je jednou z nejběžnějších onemocnění diagnostikovaných v Evropě a druhou nejčastější příčinou úmrtí v Západní Evropě. V roce 2018 bylo 3,8 % z celkových úmrtí zapříčiněno rakovinou prostaty. Toto onemocnění je diagnostikováno převážně mužům starších 65 let, přičemž pravidelné vyšetření prostaty je doporučováno mužům s rodinnou anamnézou nemoci od 45 let (Rawla, 2019).

Růst rakoviny prostaty je zajišťován pomocí aktivní dráhy androgenního receptoru, a proto je inhibice signální dráhy androgenního receptoru využívána v medicíně jako hlavní cíl protinádorové terapie (Gupta *et al.*, 2020).

Vyšetření prostaty a správná diagnóza je důležitým krokem v odhalení rakoviny prostaty, která nemusí být vždy příznaková. Nejběžnější vyšetřovací technikou je stanovení hladiny PSA v krvi. Tento biomarker není jednoznačný, protože zvýšená hladina PSA je přítomna jak u karcinomu prostaty, tak i u benigní hyperplazie prostaty. Pokud je tedy hladina PSA zvýšená ($>2,5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), je nutné provést další diagnostická měření, aby mohlo být onemocnění správně diagnostikováno. Mezi takové vyšetření patří biopsie prostatické tkáně a určení tzv. Gleasonova skóre. Několik odebraných vzorků prostatické tkáně je mikroskopicky hodnoceno na základě fáze karcinogeneze, kdy je každému vzorku přiřazeno číslo od 1 do 5. Čím vyšší číslo je vzorku přiřazeno, tím jsou buňky prostaty více postihnuty karcinogenezí. Pro získání finální hodnoty Gleasonova skóre jsou sečtena pouze dvě nejvíce zastoupená čísla v hodnocení vzorků prostatické tkáně. Gleasonova skóre tak může nabývat hodnot od 2 do 10. Podle hladiny PSA a hodnoty Gleasonova skóre je karcinom prostaty zařazen do pěti skupin podle nebezpečnosti a rizika pro pacienta. V dnešní době je však od biopsie prostatické tkáně ustupováno a vyšetření karcinomu prostaty se provádí pomocí magnetické rezonance s výrazně nižší invazivitou. Po důkladném vyšetření je zahájena léčba, která je vždy rozhodnuta nejen na základě získaných výsledků, ale i na stavu pacienta, rodinné anamnézy nebo předchozí léčbě. U méně rizikových karcinomů prostaty je léčba často založena na pozorování a kontrolování hladiny PSA. Agresivnější a nebezpečnější karcinomy prostaty jsou léčeny operativně, ozařováním nebo chemoterapeutiky (Litwin *et Tan*, 2017).

Velmi významná je také hormonální léčba zahrnující léky ze skupiny anti-androgenů blokující aktivitu androgenního receptoru. Tato účinná léčba se potýká s velkým problémem, kterým je vznik rezistence na inhibici androgenního receptoru (Gupta *et al.*, 2020). Problémy spojeny se vznikem této rezistence budou popsány v následujících kapitolách.

4.1 Kastrálně rezistentní rakovina prostaty

Princip, funkce androgenů a androgenního receptoru byl v souvislosti s rakovinou prostaty popsán již v roce 1941 urology Ch. Hugginsem a C. Hodgesem. Jejich studie popisující význam androgenů a hormonální léčby rakoviny prostaty získala v roce 1966 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství (Messner *et al.*, 2020). Tato práce byla velkým milníkem v léčbě rakoviny prostaty, protože byla počátkem v pochopení funkce androgenů a jejich účinku na proliferaci prostatických buněk (Huggins, 1941).

Je známo, že anti-androgenní léčba bývá úspěšná, avšak po několika letech léčby se rakovinné buňky stávají vůči této léčbě rezistentní. Přestože se sníží hladina androgenů v krvi, některé rakovinné buňky jsou schopny i s tímto deficitem proliferovat, protože mají vyvinutý jiný mechanismus růstu. Tento typ rakoviny prostaty je označován jako kastrálně rezistentní (CRPC) (Heinlein *et al.*, 2004).

Jednou z možností vzniku CRPC je exprese genů blokující apoptózu, mezi které řadíme geny z rodiny bcl. Proteiny, které jsou kódovány těmito geny a mají anti-apoptotický potenciál jsou např. bcl-2 nebo bcl-x (Blagosklonny, 2001).

Další možností vzniku kastrálně rezistentního nádoru je mutace androgenního receptoru. Obecně je dokázáno, že mutace androgenního receptoru nejsou ovlivňovány protinádorovou terapií, protože 21–44 % rakovinných tkání odebraných před zahájením léčby již mutaci androgenního receptoru obsahovalo. Většina těchto mutací se nachází v oblasti LBD, jsou často bodové a dochází k substituci aminokyseliny na kódovaném vlákně proteinu. V *in vivo* podmínkách bylo dokázáno, že bodové mutace způsobují zvýšený počet ligandů schopných aktivovat AR a spouštět expresi cílových genů. Jsou uváděny dva důsledky vzniku bodových mutací androgenního receptoru. Z důvodu bodové mutace dochází ke snížení specifity vazby na AR. Anti-androgeny jsou tak schopné fungovat jako androgeny stimulující karcinom prostaty. Druhý důsledek bodové mutace může být umožnění transkripce cílových genů pomocí androstendiolu a dehydroepiandrosteronu (DHEA) (Heinlein *et al.*, 2004).

Obě tyto látky jsou součástí biosyntézy testosteronu. DHEA je samotným prekurzorem a androstendiol je meziproduktem v kaskádě procesů vedoucích k vytvoření testosteronu. Z důvodu mutace AR může být jeho transkripční funkce aktivována jak anti-androgeny, tak prekurzory androgenů, resp. testosteronu. V takovém případě dochází k problému s běžnými léky, jako jsou např. bicalutamid nebo flutamid, které blokují pouze vazbu androgenů na AR, nikoliv jeho prekurzorů (Miyamoto *et al.*, 1998).

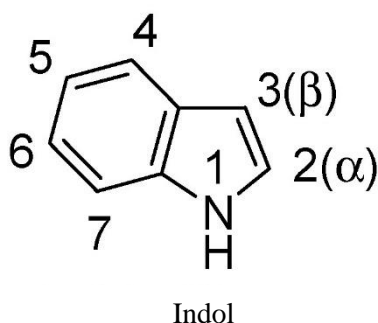
Ve studii z roku 2019 byly uvedeny nové třídy antagonistů androgenního receptoru, které byly aktivní i v přítomnosti mutace AR-T877A, AR-F876L a AR-W741C u linie LNCaP. Autoři studie využívali halogenem substituované estery kyseliny athranilové jejímž základem byl extrakt z rostliny saw palmetto (*Serenoa repens*). Zajímavým poznatkem je, že halogenem substituované sloučeniny byly jak antagonisty mutantního i nemutantního AR, tak indukovaly senescenci, která byla stanovena pomocí markeru SA- β -galaktosidázy. Bylo také zjištěno, že u rakovinné linie LNCaP s mutací AR-F876L nebyla zprostředkovaná inhibice proliferace buněk enzalutamidem, což znamená, že halogenem substituovaná sloučenina v této studii působí jiným mechanismem. Tento způsob léčby, při kterém jsou buňky rakoviny prostaty uvedeny do stavu senescence, je jedním ze studovaných mechanismů, jak bojovat proti rezistenci na anti-androgenní léčbu (Roell *et al.*, 2019).

Jedním z objevených přirozených androgenních antagonistů je methyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoát (kyselina atrarová, AA). Tato sloučenina je získána izolací z kůry slivoně africké (*Pygeum africanum*) a je jedna z prvních popsanych látek indukujících v rakovinných buňkách prostaty senescenci *ex vivo*. Po vystavení prostatických rakovinných buněk AA dochází ke snížení jaderné translokace a vazby androgenního receptoru do DNA, a to jak v nemutovaných, tak v mutovaných AR. V této studii bylo pracováno se dvěma rakovinnými buněčnými liniemi s mutací AR T877A – LNCaP a C4-2. Nádorová buněčná linie LNCaP je závislá na androgenech, ale nádorová buněčná line C4-2 nikoliv, patří tedy do skupiny CRPC. Pomocí AA byla zastavena proliferace obou těchto nádorových linií (Papaioannou *et al.*, 2009).

Zpomalení buněčného cyklu a indukce senescence je vyvoláno hypofosforylací Rb proteinu a zvýšenou expresí p16^{INK4a} a p21^{WAF1}. Možnost indukce senescence v CRPC, ale i nádorových liniích prostaty závislé na androgenech by bylo velkým přínosem pro celkovou terapii rakoviny prostaty (Hessenkemper *et al.*, 2014).

4.2 Indolové deriváty a nádorové onemocnění

Indol je heterocyklická sloučenina skládající se z pyrrolového a aromatického kruhu (Obrázek 3). Je součástí přirozeně se vyskytujících sloučenin v přírodě. Rostlinné deriváty indolů jsou nedílnou součástí alkaloidů a glykosidů. Mezi nejznámější živočišné deriváty indolu patří skatol (3-methylindol), který je typický pro svůj zápach ve výkalech. Deriváty indolu jsou zajímavé pro své léčivé vlastnosti, proto se hojně využívají ve farmaceutickém průmyslu (Van Order *et* Lindwall, 1942).



Obrázek 3: Chemická struktura indolu.

Heterocyklické sloučeniny jsou využívány pro svou podobnost s různými látkami v organismu. Jedná se o podobnost s hormony vázající se na receptor, aktivátory enzymů nebo sloučeniny podobající se neurotransmiterům. Díky této podobnosti mohou být tyto sloučeniny použity pro léčbu různých nádorových, autoimunitních a jiných onemocnění, protože mohou simulovat přítomnost různých látek, agonistů či antagonistů různých enzymů nebo receptorů. Jak v živočišné, tak v rostlinné říši jsou indolové deriváty hojně zastoupeny a jsou nedílnou součástí různých biochemických procesů odehrávajících se v tělech živočichů i rostlin. Zřejmě nejčastěji zastoupenou látkou indolového charakteru je aminokyselina tryptofan, rostlinami rozkládaný na heteroauxin. Živočiškové přijímají tryptofan v potravě a pomocí symbiotických bakterií ve střevním mikrobiomu je rozkládán na tryptamin, který je součástí důležitých neurotransmiterů, jako je např. serotonin (5-hydroxytryptamin). Mezi hormony indolové struktury patří např. melatonin regulující biorytmus živočichů (Kaushik, 2013). Pomocí symbiotických bakterií je tvořen také indol, který je součástí střevního biofilmu a tvoří spolu s imunitním systémem imunitní ochranu živočichů (Lee *et* Lee, 2010).

Jako příklady léčiv s indolovou strukturou lze uvést např. sumatriptan využívaný na léčbu migrény a svou strukturou je schopen vázat se na receptor pro serotonin. Další léky fungující podobným principem jsou např. ondansetron používaný na léčbu nevolnosti a zvracení při chemoterapii i radioterapii. Léky, které obsahují indolovou strukturu mají široké spektrum

využití. Jedná se o protirakovinné léky (vincristin, vinblastin, cediranib atd.), antidepresiva (amedalin, binedalin), léky na léčbu schizofrenie (roxindol), lék na poruchu sexuální dysfunkce (yohimbine), léky na léčbu hypertenze (reserpin, pindolol atd.), a léky na léčení dalších onemocnění či jejich příznaků, jako je horečka či záněty. Indolové deriváty jsou velmi zajímavou skupinou hlavně v protinádorové terapii. Do této skupiny léčiv patří některé rostlinné alkaloidy, jako je např. mitraphyllin. Tato látka je přítomná v listech rostliny *Mitragyna speciosa* přezdívaná kratom a je zkoumána pro svůj anti-proliferační účinek na buňky karcinomu prsu či leukemické buněčné linie (Kaushik *et al.*, 2013).

Jak bylo zmíněno dříve, jedním z cílů protinádorové terapie je objevit látku schopnou pozastavit buněčnou proliferaci konkrétní rakoviny. Jednou velmi potencionální sloučeninou je I3C (indol-3-karbinol; 3-hydroxymethylindol), obsažený v zelenině z čeledi brukvovitých (*brassicaceae*), jako je brokolice, květák, kapusta nebo zelí. I3C je látka významná pro svůj vliv na prevenci proti některým typům nádorového onemocnění, jako je rakovina prsu, prostaty nebo lymfatických uzlin. Nicméně, co se týče samotné léčby nádorových onemocnění, byla prokázána zvýšená exprese proteinu p16^{INKa4} a p21^{WAF1} v prostatické rakovinné buněčné linii LNCaP *in vitro* vystavené po dobu 48 hodin působení I3C v 100μM koncentraci. Jedná se tedy o velmi slibnou sloučeninu, která by mohla sloužit pro pozastavení buněčné proliferace nádorových buněk (Zhang *et al.*, 2003).

Podobně i u rakovinné line PC-3 po vystavení I3C došlo k indukci exprese genu pro protein p16^{INKa4} a p21^{WAF1}, což způsobilo zastavení buněčného cyklu s následným vstupem buněk do apoptózy (Chinni *et al.*, 2001).

Působení látek indolového charakteru je tak slibným přístupem k indukci senescence u rakovinných buněk prostaty. Náplní této bakalářské práce bylo sledovat, zda vybrané deriváty indolu vyvolávají indukci senescence v rakovinné linii 22Rv1. Látky byly vybrány na základě schopnosti antagonistického chování vůči androgennímu receptoru (Zgarbová *et Vrzal*, 2023).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Biologický materiál

- Buněčná linie 22Rv1 (ECACC 05092802) karcinom prostaty

5.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie a roztoky

- fosfátový pufr PBS (Serana, kat. č. BDL-001)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, kat. č. T4049)
- 2x Loading Buffer (treatment sample buffer)
 - 2,5 ml 4x Stacking Buffer
 - 4 ml 10% SDS
 - 2 ml glycerol
 - 2 mg Bromphenol Blue
 - 0,31 g DTT
 - do 10 ml doplnit ddH₂O
- bafilomycin (Sigma Aldrich, kat. č. 19-148)
- bovinní sérový albumin (Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- bradfordovo činidlo (Sigma Aldrich, kat. č. B6916)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D8418)
- dodecylsírán sodný, 10% (BioRad, kat. č. 1610302)
- enzalutamid 10 μ M (MDV3100; sc-364354, Santa Cruz Biotechnology)
- ethanol (Lach-ner, kat. č. 20025-A99)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, kat. č. F6178)
- HCl (8%) (Lach-ner, kat. č. 10033)
- chemiluminiscenční substrát WesternSure[®]PREMIUM (Li-Cor, kat. č. 926-95000)
- inhibitory fosfatáz PhosSTOP[™] (Roche, kat. č. 04906837001)
- inhibitory proteáz cOmplete[™] ULTRA Tablets, Mini (Roche, kat. č. 04693159001)
- isopropanol (Sigma Aldrich, kat. č. I9516)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, kat. č. F6178)
- lyzační pufr (Promega, E3971)
- medium 1640 – RPMI s 25mM HEPES (Sigma Aldrich, kat. č. R5886)
- methanol (Penta, kat. č. 67-56-1)

- migrační pufr, Tris/Glycin/SDS, 10x koncentrovaný (BioRad, kat. č. A0031)
- neesencialní aminokyseliny (Sigma Aldrich, kat. č. M7145)
- penicilin/streptomycin (Biosera, kat. č. XC-A4122)
- persíran amonný (Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
- PMSF (Sigma Aldrich, kat. č. 329-98-6)
- Ponceau S. Rouge (Sigma Aldrich, kat. č. P7170)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, kat. č. 1610374)
- protilátky
 - Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 7076S)
 - Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 7074S)
 - β -Actin (8H10D10) Mouse mAb (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 3700S)
 - α -tubulin Mouse mAb (A-6) (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-398103)
 - p16^{INK4a} (D3W8G) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 92803)
 - p21^{WAF1} (12D1) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 2947)
- pufr do dělicího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 161-0798)
- pufr do zaostřovacího gelu, 4x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 161-0799)
- Re-Blot Plus Strong Solution, 10x koncentrovaný (Merck Millipore, kat. č. 2504)
- roztok akrylamid/bis-akrylamid, poměr 29:1 (Sigma Aldrich, kat. č. A2792)
- sušené mléko (Laktino)
- TBS pufr, 20 x koncentrovaný (Thermo Scientific, kat. č. 28358)
- TEMED (Merck Millipore, 110-18-9)
- testované indolové deriváty
- 3-methylindol (Sigma Aldrich, kat. č. M51458)
- 4-methylindol (Energy Chemical, kat. č. E020483)
- 1,3-dimethylindol (Shsnghai SINKH Pharmaceuticals Tech. Co., Ltd. kat. č. 875-30-9)
- 2,3-dimethylindol (Sigma Aldrich, kat. č. 120812)
- 4,6-dimethoxyindol (Sigma Aldrich, kat. č. 75066-1G-F)
- 5,6-dimethoxyindol (Sigma Aldrich, kat. č. 246255)
- 2,3,7-trimethylindol (Sigma Aldrich, kat. č. CDS014194)
- 7-methoxy-4-methylindol (Click Chemistry Inc, kat. č. 1C72757)
- transferový pufr, Tris/Glycin, 10x koncentrovaný (BioRad, kat. č. 161-0771)
- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)

- Tween® 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)
- WesternSure®Pen (Li-Cor®, kat. č. 926-91000)
- β – merkapt ethanol (Serva, kat. č. 28625)

Použité soupravy

- Senescence β -galaktosidase Activity Assay kit (Cell Signaling Technology®, kat. č. 23833)

5.3 Seznam použitých laboratorních přístrojů a zařízení

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- aparatura pro western blotting Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- Bürkerova komůrka (Brand GmbH + CO, kat. č. 1822-0021)
- Buničina (Tork)
- centrifuga 5418 R (Eppendorf)
- digitální mikroskop (Novel Optics)
- elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- inkubátor NB-203XL (N-Biotek)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- hřebínek pro elektroforézu (Biorad)
- krycí sklíčka 22x22 (Menzel Gläser)
- laminární box Labculture® (ESCO)
- Li-COR C-DiGit™ blot scanner (Li-Cor Biosciences)
- mikrocentrifuga 5414 R (Eppendorf)
- minikývačka MR-1 (Biosan)
- přístroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic)
- plastové mikrozskumavky 0,5; 1,5; 2; 5 ml (BIOplast)
- plastové zkumavky 15 a 50 ml (TPP)
- plastové špičky 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 100 – 100 μ l (Eppendorf)
- PVDF membrána Immobilon-P (Millipore®, kat. č. 617203)
- sérologické pipety 2, 5, 10, 25 ml (SPL, kat. č. 91002, 91005, 91010, 91025)
- sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin electronic)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- stolní centrifuga Z 100M (Hermle)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- vodní lázeň LCB11D (Daihan LabTech)
- vortex Combi-Spin, FVL-2400N (Biosan)
- zdroj napětí Enduro™ 300V (Labnet)

5.4 Metodika práce

5.4.1 Příprava kultivačního média

Obecně jsou kultivační média důležitá pro proliferaci buněk rostoucích v kultivačních lahvích. Zajišťují fyziologické podmínky a dostatečný přísun všech potřebných živin. Kultivační médium se musí připravovat ve sterilním prostředí. Do 500 ml komerčního kultivačního média s přesně definovaným složením se přidá 50 ml roztoku FBS, 5 ml neesenciálních aminokyselin a 5 ml L-glutaminu. Během této práce se používalo kultivační médium již obsahující HEPES, do kterého bylo navíc přidáno 5 ml směsi antibiotik (penicilin/streptomycin).

5.4.2 Pasážování buněk a vysívání

Pasážování se provádí z důvodu redukce nádorových buněk rostoucích v kultivačních lahvích, a z důvodu vyčerpání živin v kultivačním médiu. Adherentní nádorovou linii 22Rv1 je nutné pasážovat každé 3-4 dny, kdy dojde k nárůstu buněk po celé ploše dna láhve. V laminárním boxu bylo sterilně odsáto staré médium a celá plocha láhve (75 cm²) byla promyta 5 ml PBS pufrem. Po odsátí PBS pufrem byl na dno láhve přidán 1 ml trypsinu, který buňky uvolnil z povrchu. Trypsin působí 3-5 min v 37 °C, v prostředí 5% CO₂. Reakce s trypsinem byla zastavena přidáním zahřátého kultivačního média (37 °C), ve kterém byly uvolněné buňky resuspendovány pomocí pipetoru a serologické pipety. Suspenze s buňkami byla přenesena do sterilní falkony, ze které byl následně odebrán 1 ml suspenze zpět do kultivační láhve. K takto připraveným buňkám bylo přidáno 20 ml kultivačního média. Láhev byla uzavřena a vložena do inkubátoru (37 °C, v prostředí 5% CO₂).

Pro vyšetí buněk na mikrotitrační destičky je třeba spočítat koncentraci buněk v suspenzi. Buněčná suspenze byla 5x naředěna trypanovou modří a na Bürkerovu komůrku, pod krycí sklíčko, bylo nanášeno 10 µl této směsi. V 10 zorných polích bylo spočítáno množství buněk. Ze sumy buněk byl spočítán aritmetický průměr buněk na 10 µl 5x naředěné buněčné suspenze. V tuto chvíli bylo možné spočítat celkovou koncentraci buněk na 1 ml buněčné suspenze.

Pro stanovení SA-β-galaktosidázy bylo na 96 jamkovou destičku vyseto 10 000 buněk na jamku v celkovém objemu 100 µl. Pro tento experiment bylo vyseto 6 jamek.

Pro přípravu vzorků na western blotting byly použity dvě 6 jamkové destičky vysety po 2 mil. buněk na jamku v celkovém objemu 2 ml. Takto vyšeté buňky byly inkubovány 24 h v inkubátoru při 37 °C, v prostředí 5% CO₂.

5.4.3 Vystavení buněk derivátům indolu

Zásobní roztoky indolů (4MI; 1,3-DMI; 2,3-DMI; 4,6-DMI; 5,6-DMI; 7MeO-4MI; 2,3,7-TMI) byly v koncentraci $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 3MI byl v koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Připravované roztoky byly naředěny 1000x, aby výsledná koncentrace 3MI byla $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace ostatních indolů byla $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola byl použit DMSO, který byl naředěn 1000x. Jako pozitivní kontrola byl použit enzalutamid ve finální koncentraci $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a doxorubicin ve finálních koncentracích $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Všechny mikrotitrační desky byly přeneseny z inkubátoru do laminárního boxu, kde bylo postupně, pomocí odsávačky a plastové špičky odsáto médium z jednotlivých jamek. K buňkám, které zůstaly přisedlé na dně jamek, bylo přidáno potřebné množství média s deriváty indolů a kontrolami. Takto připravené destičky byly inkubovány 24 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v prostředí 5% CO_2 .

Po 24 h byly destičky přeneseny do laminárního boxu, kde bylo opět odsáto médium pomocí odsávačky a plastové špičky. Do jednotlivých jamek byl přidán potřebný objem čerstvého kultivačního média. Takto byly destičky inkubovány v inkubátoru 72 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v prostředí 5% CO_2 .

5.4.4 Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace

Po 72 h inkubaci byly 6 jamkové destičky vyjmuty z inkubátoru a promyty PBS pufrem, který byl následně opatrně vyklepnut do výlevky a do každé jamky byl přidán 1 ml chladného PBS pufru. Škrabkou byly buňky ze dna jamek seškrábnuty a přeneseny do plastových zkumavek. Od tohoto okamžiku bylo třeba buňky udržovat na ledu. Všechny zkumavky byly zcentrifugovány (4600 rpm, 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a k peletu bylo přidáno cca 150 μl lyzačního pufru s inhibitory fosfatáz a proteáz. Zhomogenizovaná směs byla vložena na 10 s do ultrazvukové vany a následně nechána 10 min na ledu. Po uplynutí této doby byly mikrozkušavky opět centrifugovány (13200 rpm, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Supernatant, který obsahoval izolované proteiny, byl přenesen do čistých plastových mikrozkušavek. Takto připravené izoláty proteinů byly do nových mikrozkušavek naředěny 5x s dH_2O . Na 96 jamkovou destičku bylo napipetováno 10 μl naředěných izolátů v triplikátu. Pro přípravu kalibrační řady byly použity roztoky BSA v koncentracích 0,2; 0,4; 0,6 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Do každé, takto připravené, jamky bylo přidáno 100 μl Bradfordova činidla. Pomocí spektrofotometru bylo možné změřit absorbanci jednotlivých jamek, spočítat kalibrační řadu a následně i koncentraci proteinů v každém izolátu.

5.4.5 Elektroforéza v akrylamidovém gelu

Podle předchozího výpočtu byly připraveny do jednotlivých mikrozkušavek izoláty tak, aby obsahovaly 40 µg proteinů ve 35 µl Pro vizualizaci v gelu a lepší nanášení tvoří vždy ½ objemu směsi 2x LB pufr, který obsahuje glycerol a bromfenolovou modř. Pro dosažení požadovaného objemu se ke směsi izolátů a 2x LB pufru přidává dH₂O. Takto připravené směsi izolátů byly zvortexovány, poté 5 min denaturovány při 95 °C v termobloku a následně vloženy opět na led.

Akrylamidový gel se připravuje mezi dvě sklazajšťující požadovaný tvar a velikost. Podle uvedené tabulky byly připraveny gely pro elektroforézu (Tabulka 1). Nejprve byl připraven 15% dělicí gel, který se před zpolymerizováním převrstvil vrstvou isopropanolu zajišťující rovinu gelu a odstranění případných bublin. Po ztuhnutí dělicího gelu byl isopropanol odstraněn a připravený 4% zaostřovací gel byl nanesen na dělicí gel. Do, takto připraveného, zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek. Zpolymerizované gely byly přeneseny do elektroforetické vany, která byla doplněna migračním pufrem. Hřebínky byly z gelů opatrně vyjmuty a do první jamky byly nanesly 2 µl markeru molekulové hmotnosti. Do ostatních jamek byly napipetovány připravené směsi izolovaných proteinů. Elektroforetická vana byla uzavřena a po dobu 15 min gely procházel proud o síle 15 mA (pro jeden gel). Po 15 min byl proud zvýšen na 30 mA (pro jeden gel) na tak dlouhou dobu, dokud jednotlivé separované proteiny nebyly 2 cm před koncem gelu.

Tabulka 1: Objemy chemikálií a roztoků pro přípravu akrylamidového gelu.

15% dělicí gel	
Akryl/bis-akrylamid	3,75 ml
dH ₂ O	3,65 ml
Pufr do dělicího gelu	2,5 ml
10% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl
4% zaostřovací gel	
Akryl/bis-akrylamid	400 µl
dH ₂ O	1 ml
Pufr do zaostřovacího gelu	2,56 ml
10% SDS	40 µl
APS	30 µl
TEMED	4 µl

5.4.6 Semi – dry a vyhodnocení western blottingu

PVDF membrány byly nejprve namočený na 2 min v methanolu a následně hydratovány 2x 10 min v dH₂O. Gely byly přeneseny z elektroforetické vany do transferového pufru. Do transferového pufru byly namočený také hrubé filtrační papíry, které byly skládané spolu s gelem a membránou na semi – dry aparaturu v následujícím pořadí: 2x filtrační papír, membrána, gel a 2x filtrační papír. Každá vrstva byla uhlazena válečkem, aby nedocházelo ke vzniku bublinek. Semi-dry bylo zapojeno do elektrického zdroje nastaveného na 2 h, 350 mA a 23 V.

Po uplynutí 2 h byla semi – dry aparatura vypojena z elektrického zdroje a membrány opláchnuty v dH₂O a následně obarvený Ponceau S. Rouge barvicí pouze proteiny. Díky tomuto kroku bylo možné zkontrolovat, zda se proteiny z gelu přenesly na PVDF membránu. Po obarvení proteinů byly membrány opláchnuty v dH₂O od přebytečného barviva. Každá membrána byla vysušena a podle velikosti detekovaných proteinů byla nařezána na menší části. Pro orientaci v membráně slouží marker molekulové hmotnosti, podle kterého je určováno, v jakých místech bude membrána nařezána. V této bakalářské práci byly detekovány proteiny o velikosti 16 kDa (p16^{INK4a}), 21 kDa (p21^{WAF1}). V rámci jedné membrány musí být proteiny kvantifikovány vzhledem k housekeeping proteinu, jako je β -actin (43 kDa) nebo α -tubulin (55 kDa), který je vyhodnocován spolu s detekovaným proteinem.

Poté, co byly membrány nařezány a opět hydratovány, byly vloženy na 1 h do 5% BSA v TBS/Tween pufru. Do čistého 5% BSA v TBS/Tween pufru byly přidány primární protilátky (1:1000). V takto připravené směsi byly membrány inkubovány přes noc na kývačce ve 4 °C. Membrány, na kterých se detekoval β -actin nebo α -tubulin, byly inkubovány s primárními protilátkami pouze 1 h. Po inkubaci byly membrány 3x po 10 min promyty TBS/Tween pufrem a následně vloženy do 5% mléka v TBS/Tween pufru se sekundárními protilátkami (1:2000) na 1 h (v případě β -actin a α -tubulin na 35-45 min.). Po uplynutí 1 h (35-45 min), byly membrány promyty 3x po 5 min TBS/Tween pufrem. Do plastové zkumavky byl připraven chemiluminiscenční substrát v poměru 1:1. Na každé membráně byl marker molekulové hmotnosti označen WesternSure perem a celá plocha membrány byla na 5 min převrstvena chemiluminiscenčním substrátem. Následně byly membrány vloženy do skeneru, který tvoří snímek, vyhodnocený programem Image StudioTM Software. Zde byly u jednotlivých signálů odečteny jejich číselné hodnoty intenzit pixelů. Všechny signály jednotlivých proteinů byly normalizovány k příslušnému β -actinu nebo α -tubulinu a z těchto hodnot byly následně sestrojeny příslušné grafy.

5.4.7 SA- β -galaktosidázová esej

Pro stanovení aktivity β -galaktosidázy byla použita komerční souprava od firmy Cell Signaling Technology[®], obsahující nefluorescenční substrát 4-methylumbelliferyl β -D-galaktopyranosid (4-MUG). Tato nefluorescenční sloučenina je pomocí β -galaktosidázy štěpena na fluorescenční produkt 4-methylumbelliferyl (4-MU), jehož intenzita fluorescence je měřena pomocí spektrofotometru.

Nejprve bylo připraveno 10 ml lyzačního pufru s 1 tabletou inhibitoru fosfatáz a 1 tabletou inhibitoru proteáz. Tablety byly řádně rozpuštěny a následně bylo do lyzačního pufru přidáno 10 μ l roztoku PMSF. Substrát byl smíchán s 348 μ l DMSO. Před každým experimentem bylo odebráno potřebné množství reakčního pufru, do kterého byl přidán β -merkaptoethanol tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Po 72 h inkubaci buněk v čerstvém médiu v 96 jamkové destičce, bylo médium ze všech jamek vylito do výlevky a následně byla každá jamka promyta chladným PBS pufrem. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru a celá destička byla 5 min inkubována na ledu. Pomocí špičky pipety byly buňky uvolněny ze dna jamek a celý objem s uvolněnými buňkami byl přenesen do plastových zkumavek a ty vloženy do centrifugy (14000 rpm, 5 min, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do plastových mikrozkušavek a udržován na ledu. Připravený supernatant v mikrozkušavkách mohl být uschován v -80 °C pro případné další měření. Z připravených mikrozkušavek byl odebírán supernatant pro stanovení obsahu proteinů, které je uvedeno v kapitole č. 5.4.8.

Potřebné množství substrátu bylo 20x naředěno připraveným reakčním pufrem. Do neprůhledné 96 jamkové destičky bylo napipetováno 50 μ l supernatantu a 50 μ l reakčního pufru se substrátem. Destička byla přikryta, aby se zamezilo přístupu světla a inkubována 1 h při 37 °C, v prostředí bez CO₂.

Po inkubaci bylo do čisté neprůhledné 96 jamkové destičky přeneseno v duplikátech 50 μ l inkubovaných buněk a k nim přidáno 50 μ l stop solution.

Hodnoty fluorescence byly odečítány pomocí spektrofotometru při excitaci 360 nm a emisi 465 nm.

Experiment č. 1 byl proveden podle protokolu bez jakýchkoli úprav. Protože nebyla zaznamenána indukovaná aktivita SA- β -galaktosidázy (Graf 3), musely být v dalších experimentech upraveny některé parametry v protokolu.

Při experimentu č. 2 bylo pH reakčního pufru upraveno pomocí 8% HCl na hodnotu pH 6 a následně byl experiment č. 2 dokončen podle protokolu, kde inkubace se substrátem byla provedena při 37 °C, v prostředí bez CO₂ ve třech časových blocích. Hodnota fluorescence tak byla odečítána po 0,5; 2 a 3 hodinách inkubace.

Z důvodů nezaznamenání aktivity SA-β-galaktosidázy v experimentu č. 2 (Graf 4), byl v experimentu č. 3 (Graf 5) v určitých krocích postupu přidán BA1 a samotný experiment č. 3 rozdělen na tři dílčí experimenty obnášející menší změny v provedení.

V první části byly buňky před SA-β-galaktosidázovou esejí přeneseny do laminárního boxu, kde bylo médium odsáto pomocí odsávačky. Do mikrozkušavky bylo připraveno čerstvé médium, do kterého byl přidán BA1 tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 nmol·l⁻¹. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl média s BA1 a následně byly takto připravené buňky inkubovány 1 h při 37 °C, bez CO₂. Po inkubaci byl experiment dokončen podle protokolu. Ve druhé části byly buňky také 1 h inkubovány s BA1 (100 nmol·l⁻¹), ale navíc byl BA1 přidán do lyzačního a reakčního pufru, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 nmol·l⁻¹. Třetí část byla provedena stejně jako první, pouze BA1 s médiem byl připraven v poměru 3:1000.

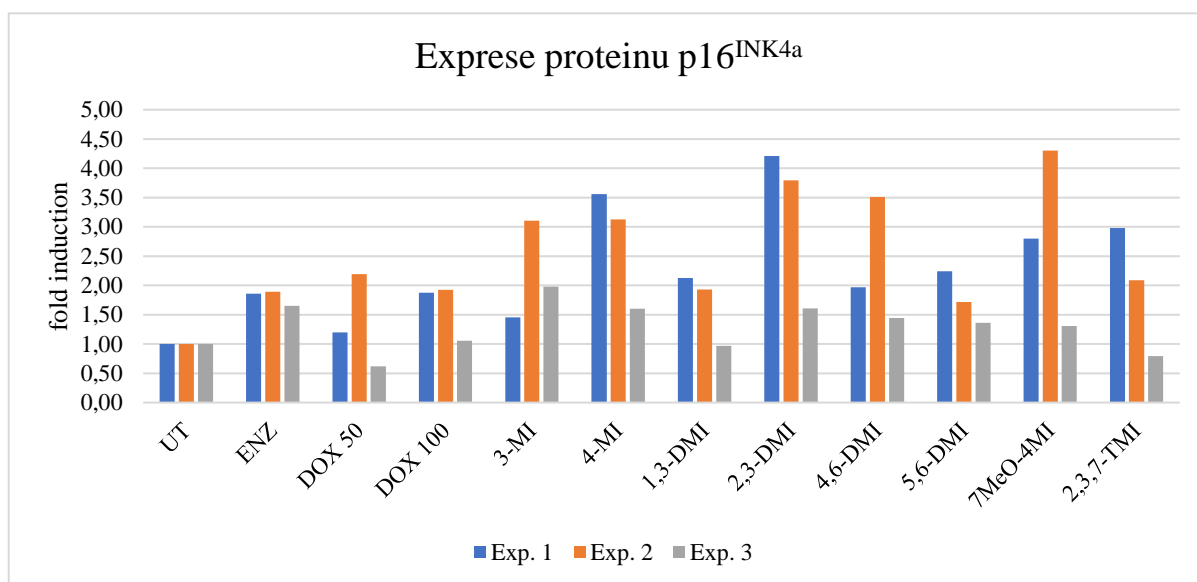
5.4.8 Stanovení proteinů pro SA-β-galaktosidázovou esej

Stanovení proteinů v buněčných lyzátech pro SA-β-galaktosidázovou esej bylo provedeno pomocí Bradfordova činidla. Do připravených mikrozkušavek byly napipetovány supernatanty připravené v kapitole č. 5.4.7. s H₂O v poměru 1:4. Pro přípravu kalibrační řady byly použity roztoky BSA v koncentracích 0,2; 0,4; 0,6 μg·μl⁻¹. Naředěné supernatanty a všechny koncentrace BSA byly napipetovány na 96 jamkovou destičku po 10 μl. Následně bylo do každé jamky přidáno 100 μl Bradfordova činidla tak, aby se na hladině roztoku netvořily vzduchové bubliny. Hodnoty absorbance byly odečítány pomocí spektrofotometru při 595 nm. Díky těmto hodnotám bylo možné spočítat koncentrace proteinů v jednotlivých buněčných lyzátech.

6 VÝSLEDKY

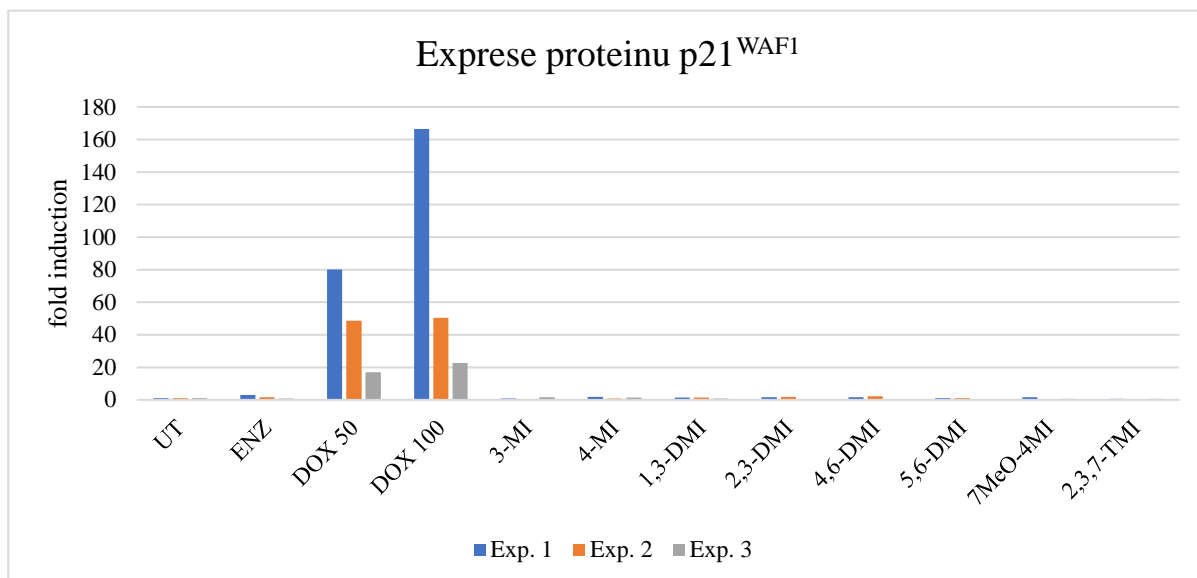
6.1 Detekce proteinu p16^{INK4a} a p21^{WAF1} pomocí western blot analýzy

Pomocí metody western blot byla zjišťována exprese proteinu p16^{INK4a} a p21^{WAF1} v nádorové linii 22Rv1, na kterou bylo působeno osmi různými deriváty indolu. Ve třech nezávislých experimentech byl pozorován nárůst hladiny proteinu p16^{INK4a} ve srovnání s negativní kontrolou (Graf 1, Obrázek 4). Zvýšená hladina proteinů p16^{INK4a} byla detekována u všech vzorků vystavených jednotlivým derivátům indolu, včetně doxorubicinu a antagonisty AR, enzalutamidu. Opakovaně nejvyšší zvýšení bylo zaznamenáno pro 4MI, 2,3-DMI a 7MeO-4MI (Graf 1). Protein p21^{WAF1} byl detekován u všech vzorků, jeho indukce byla pozorována pouze pro pozitivní kontrolu, doxorubicin (Graf 2, Obrázek 4). Žádný z testovaných indolů významně nezvyšoval hladinu p21^{WAF1} (Graf 2, Obrázek 4).



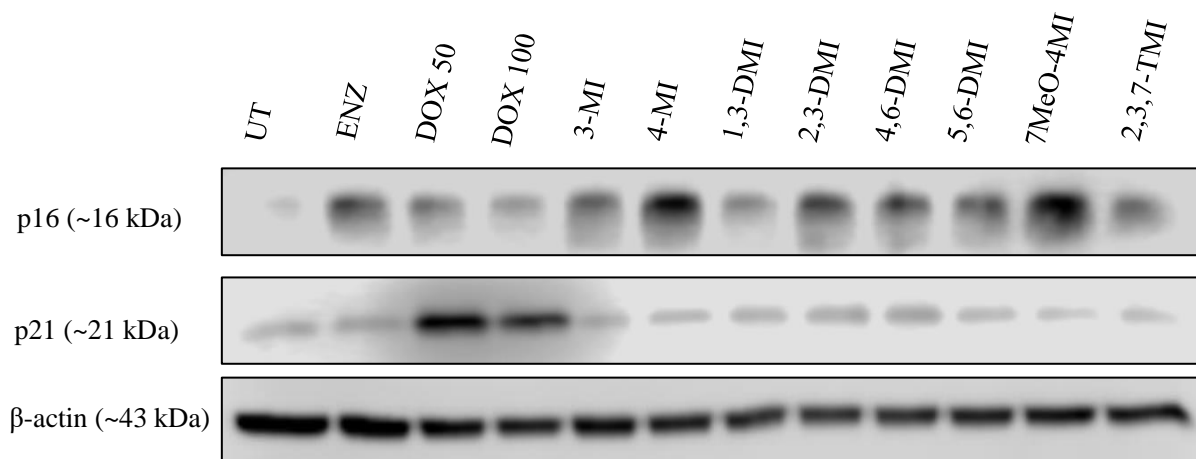
Graf 1: Detekce proteinu p16^{INK4a} pomocí metody western blot v nádorové linii 22Rv1.

Intenzita exprese proteinu p16^{INK4a} byla stanovena v rámci třech experimentů. Pomocí získaných hodnot β -actinu byly všechny experimenty znormalizovány a vyjádřeny jako násobek negativní kontroly (UT), který představoval hodnotu 1.



Graf 2: Detekce proteinu p21^{WAF1} pomocí metody western blot v nádorové linii 22Rv1.

Během třech nezávislých experimentů byla stanovena exprese proteinu p21^{WAF1} v nádorové linii 22Rv1 po jejím vystavení derivátům indolu. Pomocí získaných hodnot β -actinu byly všechny experimenty znormalizovány a vztaženy k hodnotě odpovídající 1 (UT).



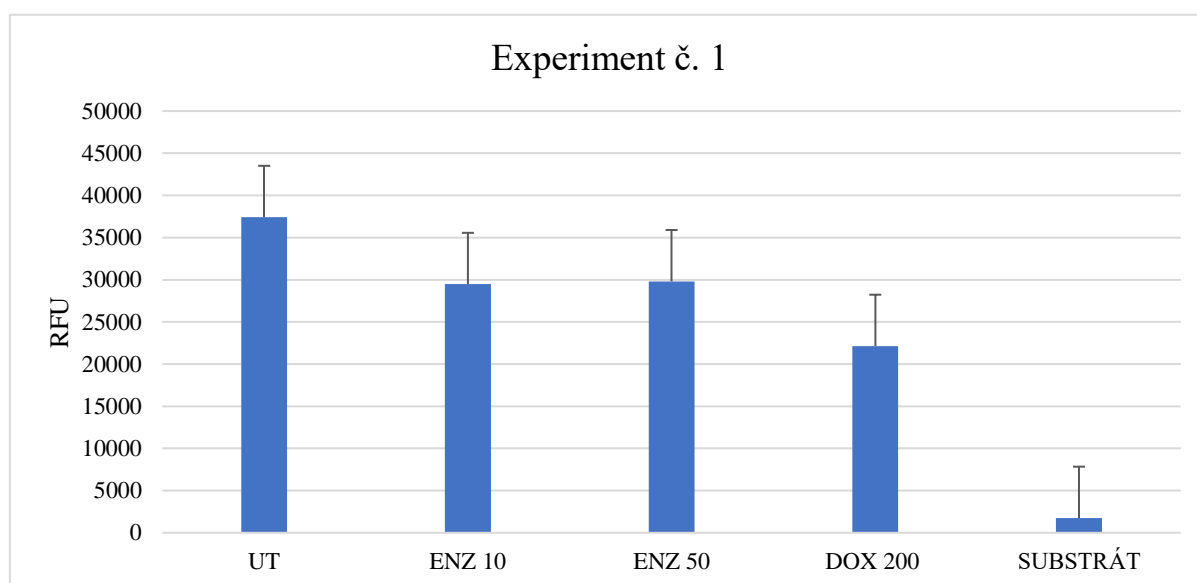
Obrázek 4: Výsledek western blot analýzy pro protein p16^{INK4a} a p21^{WAF1}.

Detekce proteinů p16^{INK4a} a p21^{WAF1} byla provedena po vystavení nádorové linie 22Rv1 derivátům indolu v koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3MI byl v koncentraci 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Jako pozitivní kontrola byl použit ENZ (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DOX (50 a 100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Jako negativní kontrola bylo použito médium RPMI-1640 s HEPES a antibiotiky (P/S) s DMSO (1:1000). Zobrazeny jsou reprezentativní bloty ze 3 nezávislých experimentů.

6.2 Detekce SA- β -galaktosidázy

Pro předkládanou bakalářskou práci byla použita komerční souprava Senescence β -galaktosidase Activity Assay kit sloužící pro detekci SA- β -galaktosidázy jako markeru senescence. V rámci optimalizace metody byla použita pouze negativní kontrola (UT), obsahující čisté médium RPMI-1640 (s HEPES a antibiotiky) s DMSO (1:1000) a pozitivní kontroly v různých koncentracích (ENZ 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DOX 50, 100 a 200 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

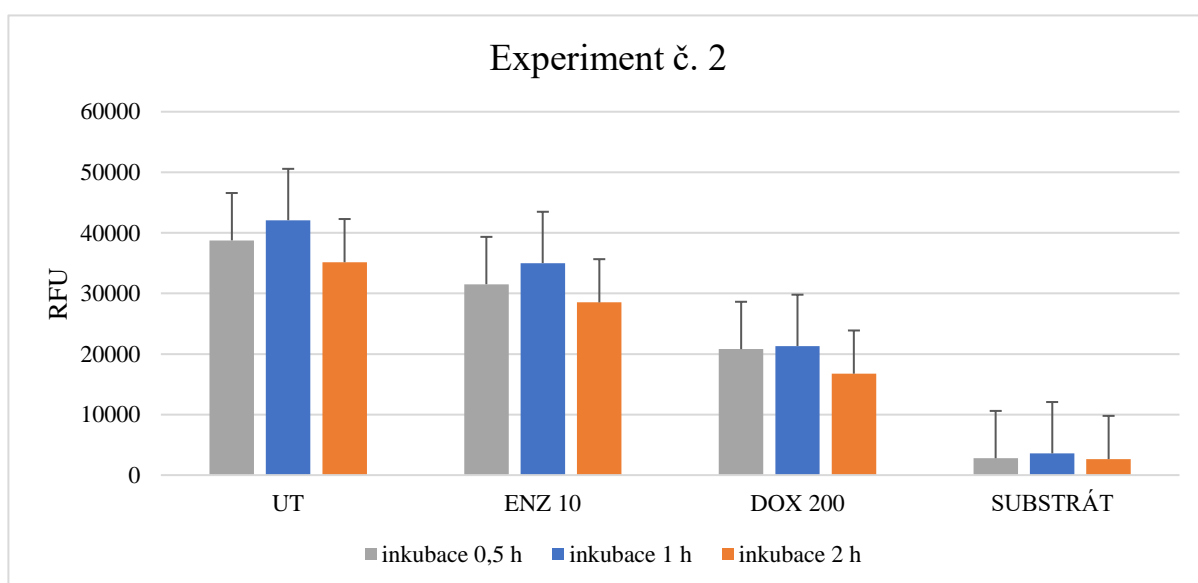
V první fázi optimalizace, v experimentu č. 1, nebylo zaznamenáno žádné navýšení SA- β -galaktosidázy, resp. byl zaznamenán výrazný pokles fluorescence u jednotlivých pozitivních kontrol (Graf 3). Z těchto důvodů byla provedena úprava parametrů pro následující opakování experimentů. U všech měření byla také stanovena fluorescence samotného substrátu. Jeho hodnota byla vždy výrazně nižší, než hodnota fluorescence nádorové linie 22Rv1 vystavené negativní i pozitivní kontrole. Z vyhodnocených výsledků usuzují, že galaktosidázová enzymatická aktivita byla přítomna.



Graf 3: Hladina fluorescence indukovaná přítomností SA- β -galaktosidázy.

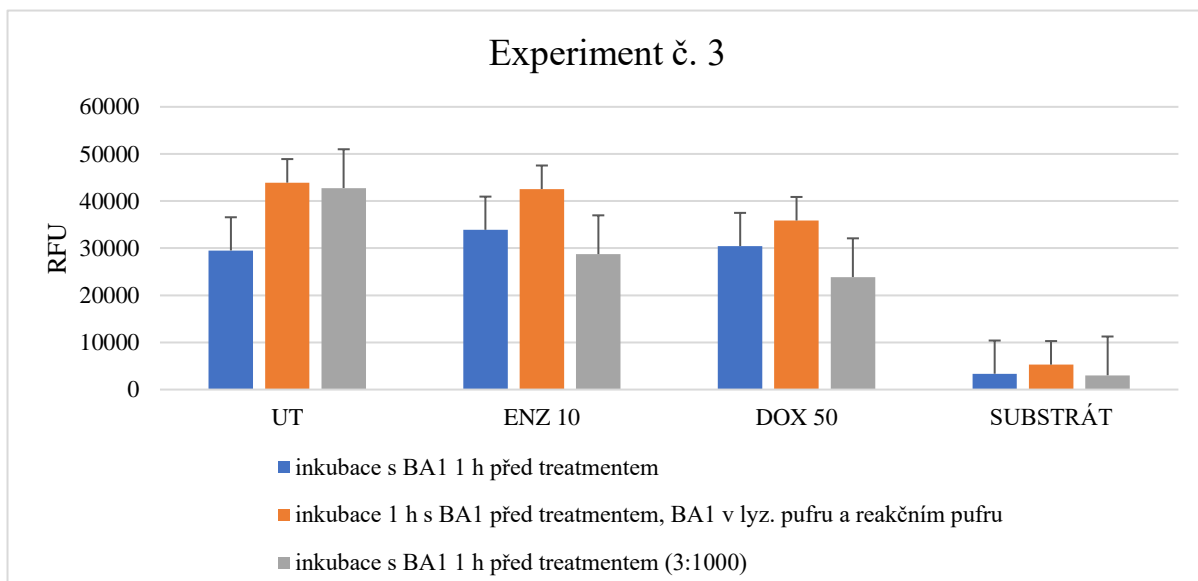
Nádorová linie 22Rv1 byla vystavena pozitivním kontrolám ENZ 10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DOX 200 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní hodnota fluorescence (RFU). Hodnoty jsou průměrem ze 3 technických opakování.

Vzhledem ke skutečnosti, že přítomnost antagonisty AR a nanomolárních koncentrací doxorubicinu mělo dle dostupné literatury indukovat aktivitu SA- β -galaktosidázy (Fuhrmann-Stroissnigg, 2019), rozhodla jsem se upravit podmínky experimentu pro dosažení konzistence s uváděnými vědeckými pracemi. V rámci experimentu č. 2 bylo upraveno pH reakčního pufru pomocí 8% HCl na pH 6, a zároveň inkubace se substrátem bez CO₂ probíhala ve třech různých časových blocích (Graf 4). Z důvodu opětovného nezaznamenání nárůst SA- β -galaktosidázy, byl v experimentu č. 3 v různých krocích postupu přidán bafilomycin (BA1). Buňky, které byly 1 h před zahájením detekce SA- β -galaktosidázy inkubovány s BA1 (100 nmol·l⁻¹), vykazovaly mírný, pouze nevýznamný nárůst fluorescence u pozitivních kontrol ve srovnání s negativní kontrolou (Graf 5).



Graf 4: Aktivita SA- β -galaktosidázy – vliv inkubace.

Reakční pufr byl upraven pomocí 8% HCl tak, aby jeho výsledné pH bylo rovno 6. Inkubace se substrátem proběhla ve třech časových blocích (0,5; 1; 2 h), po kterých byla odečítána hodnota fluorescence. Hodnoty jsou průměrem ze 3 technických opakování. V tomto experimentu byly použity pozitivní kontroly ENZ (10 μ mol·l⁻¹) a DOX (200 nmol·l⁻¹).

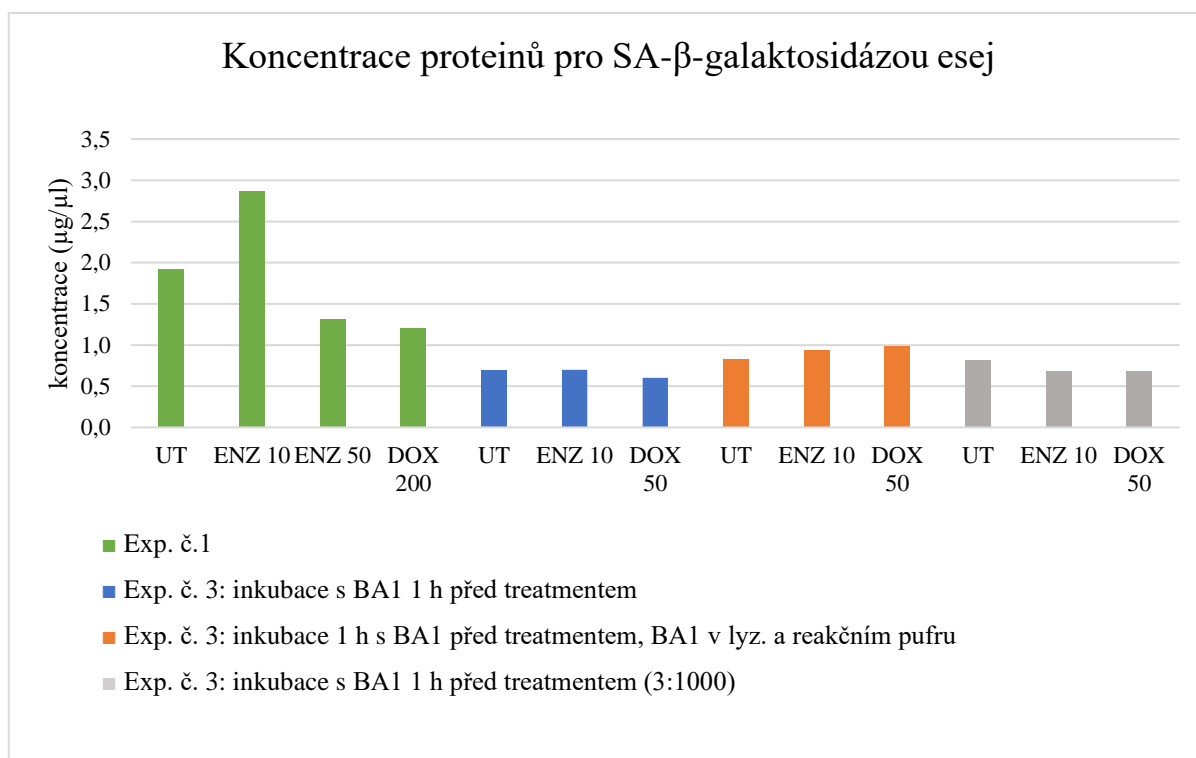


Graf 5: Vliv bafilomycinu A1 (BA1) na SA-β-galaktosidázu v nádorové linii 22Rv1.

Nádorová linie 22Rv1 byla vystavena ve třech dílčích experimentech BA1. Hodnoty jsou průměrem ze 3 technických opakování. Jako pozitivní kontroly byl použit ENZ ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DOX ($50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Indukce senescence by měla zastavit buněčný cyklus, a tím způsobit zvýšení hodnoty negativní kontroly vzhledem k vyššímu počtu buněk. Z tohoto důvodu bylo třeba provést normalizaci pomocí stanovení koncentrace proteinů (Graf 6).

Přestože u prvního experimentu byl pozorován pokles v koncentraci proteinů po vystavení nádorové linie 22Rv1 ENZ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DOX $50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, normalizační krok nevedl k přesvědčivému navýšení SA-β-galaktosidázové aktivity (pro data z Grafu 3) a aktivita byla spíše konstantní. U dalších experimentů byly hodnoty koncentrací proteinů u pozitivních kontrol srovnatelné s kontrolou negativní. Na základě těchto výsledků jsem učinila závěr, že v tomto systému a za těchto podmínek nelze danou komerční soupravu využít k potvrzení vlivu indolových látek s antagonistickou aktivitou vůči AR k průkazu indukce SA-β-galaktosidázy jako markeru senescence.



Graf 6: Koncentrace proteinů pro SA-β-galaktosidázou esej v nádorové linii 22Rv1.

Na tomto grafu jsou vyneseny koncentrace jednotlivých buněčných lyzátů nádorové linie 22Rv1, která byla vytavena negativní kontrole (UT) a pozitivním kontrolám ENZ (10 a 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DOX (50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Stanovení koncentrací proteinů bylo provedeno pro experimenty č. 1 a 3.

7 DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývá tématem senescence v prostatické nádorové linii 22Rv1. Rakovina prostaty je jedním z nejběžnějších nádorových onemocnění u mužů. Operativní, anti-androgenní ani chemoterapeutická léčba není u většiny případů dostačující. Velkým problémem nádorových prostatických buněk je jejich náchylnost k rezistenci vůči anti-androgenní léčbě. Indukce senescence v CRPC by mohla hrát významnou roli v další léčbě popisovaného onemocnění. V rámci práce bylo cílem otestovat osm indolových derivátů a jejich vliv na indukci senescence v nádorových buňkách prostaty. Zgarbová *et Vrzal* (2023) popsali osm látek indolového charakteru vykazujících antagonistickou aktivitu vůči AR, mezi které patří 3MI, 4MI, 1,3-DMI, 2,3-DMI, 4,6-DMI, 5,6-DMI, 7MeO-4MI a 2,3,7-DMI. Na základě uvedené publikace bylo těchto osm indolových derivátů zvoleno pro mou bakalářskou práci. Potlačení proliferace nádorových buněk prostaty 22Rv1 bylo testováno analytickou metodou western blot, pomocí které byla stanovena hladina proteinů p16^{INKa4} a p21^{WAF1}. Hladina proteinu p16^{INK4a} byla v rámci jednotlivých opakování kolísavá, což by mohlo naznačovat, že buňky byly v různých fázích senescence, jak zmínil Lee *et al.* (2006). Hladina proteinu p21^{WAF1} nebyla navýšena po vystavení nádorové linie 22Rv1 derivátům indolu, podobně jako popsal ve své práci Hessenkemper *et al.* (2014), kdy byla prostatická nádorová linie LNCaP vystavována kyselině atrarové (AA). V rámci této práce došlo díky AA k indukci senescence, při které byla zaznamenána exprese proteinu p16^{INKa4}, nikoliv však exprese proteinu p21^{WAF1}. Jak ve své práci píše Gupta *et al.* (2020), ENZ je jedním z antagonistů AR a indukuje zvýšenou hladinu proteinu p16^{INK4a} v nádorové linii 22Rv1 a C4-2. V rámci této bakalářské práce byl ENZ použit jako pozitivní kontrola pro indukci senescence, kdy zvyšoval hladinu proteinu p16^{INK4a} v porovnání s negativní kontrolou.

Pro stanovení dalšího markeru senescence byla použita komerční souprava od firmy Cell Signaling Technology® sloužící pro detekci SA-β-galaktosidázy nacházející se v lysozomech senescentních buněk. Výsledky ukázaly, že úprava pH na hodnotu 6 pomocí HCl a použití BA1 pro udržení této hodnoty pH v experimentech č. 2 a 3 nezpůsobilo dostatečné ovlivnění prostředí a podmínek pro detekci SA-β-galaktosidázy, přestože Fuhmann-Stroissinigg *et al.* (2019) zaznamenala ve své práci zvýšení SA-β-galaktosidázy po vystavení myších embryonálních buněk BA1. Komerční souprava použitá pro detekci SA-β-galaktosidázy byla firmou Cell Signaling Technology® testována na nádorové linii děložního čípku HeLa. Lze proto usoudit, že souprava by nemusela být vhodná pro detekci SA-β-galaktosidázy v nádorové prostatické linii 22Rv1.

Gupta *et al.* (2020) ve své publikaci uvedl, že enzalutamid jako antagonist AR indukuje zvýšenou hladinu SA- β -galaktosidázy. Během experimentu č. 3 bylo zaznamenáno mírné zvýšení fluorescence SA- β -galaktosidázy indukované ENZ o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, navýšení této hodnoty v porovnání s UT bylo nízké, až zanedbatelné. Vzhledem k faktu, že v předchozích studiích enzalutamid i doxorubicin indukoval v nádorových liniích zvýšení hladiny SA- β -galaktosidázy, předpokládám za vhodné pro její stanovení v nádorové linii 22Rv1 vystavené derivátům indolu, použití jiné analytické metody.

Přestože jsou jednotlivé proteiny důležité pro stanovení senescenčního stavu buňky, Carpenter *et al.* (2021) zmiňuje některé markery senescence, které mohou u senescentních buněčných linií vykazovat různou hladinu exprese podle toho, jakým způsobem u nich byla senescence indukována. Jedním takovým příkladem je Lamin B1, který je součástí jaderné laminy. Ve fibroblastických buněčných liniích byl v úbytku, pokud byla senescence indukována onkogenem nebo ionizačním zářením. Naopak pokud byla ve stejné buněčné linii indukovaná senescence pomocí H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$) způsobující oxidativní stres, došlo k akumulaci Laminu B1 v buňkách.

V experimentální části byl podle protokolu používán pro pozitivní kontrolu DOX v koncentraci $200 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzhledem k nepříznivým výsledkům byla koncentrace používaného DOX snížena na $50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, která byla použita v práci Yang *et al.* (2012) pro indukci senescence v buňkách myeloidní leukémie K562. V těchto buňkách způsoboval DOX zvýšenou hladinu SA- β -galaktosidázy, nezpůsoboval ovšem zvýšení hladiny proteinu p53 a p16^{INK4a}. Z uvedených důvodů by mohlo stát za zmínku, že každá buněčná linie může mít jinou reakci na látky, kterými je na ně působeno a ty nemohou být využívány jako univerzální.

Zgarbová *et Vrzal* (2023) se také ve své publikaci zmiňují o 3MI, který by mohl mít významnou roli v mechanismu omezení růstu karcinomu prostaty. Tato endogenní látka způsobovala ve vyšších koncentracích ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) expresi enzymu CYP1A1 s kladným pozorováním jeho apoptotických účinků na různé nádorové linie (Rasmussen *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že vyšší koncentrace 3MI působily na nádorové buňky apoptoticky, byla pro mou bakalářskou práci zvolena nižší koncentrace 3MI, rovna $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Přesto i uvedená nízká koncentrace indukovala protein p16^{INK4a} a dává smysl se více věnovat zmíněnému indolovému derivátu, jakožto jedinému, fyziologicky přítomnému u člověka.

Jak bylo zmíněno v literárním přehledu této bakalářské práce, senescence je velmi komplexní událost odehrávající se v buňce. Rozhodnutí, že se buňka nachází v procesu senescence, není možné určit na základě jednoho markeru. Pro přesnější informaci, zda působení indolových derivátů na nádorovou linii 22Rv1 indukuje senescenci, by bylo adekvátní detekovat její další markery, jako jsou proteiny H2AX, IL-6, MMP-3 atd.

8 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala indukcí senescence v nádorové linii 22Rv1 pomocí indolových derivátů (3MI, 4MI, 1,3-DMI, 2,3-DMI, 4,6-DMI, 5,6-DMI, 7MeO-4MI, 2,3,7-TMI) v koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3MI v koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Všechny tyto indolové deriváty jsou potencionálními antagonisty androgenního receptoru.

V rámci experimentální části bylo testováno, zda v prostatické nádorové linii 22Rv1 byla indukována senescence po jejím vystavení indolovým derivátů po dobu 24 h. Zda byla v nádorové linii 22Rv1 indukována senescence bylo určeno na základě stanovení jejich markerů. Hladina proteinů p16^{INK4a} a p21^{WAF1} byla stanovena analytickou metodou western blot sloužící k detekci proteinů. Pomocí této metody bylo zjištěno, že po vystavení nádorové line 22Rv1 osmi indolovými deriváty došlo ke zvýšení hladiny proteinu p16^{INK4a}. Opakovaně bylo zaznamenáno významné navýšení hladiny tohoto proteinu pro 4MI, 2,3-DMI a 7MeO-4MI. Žádný z testovaných indolů neindukoval zvýšenou hladinu proteinu p21^{WAF1}, pouze pozitivní kontrola, doxorubicin, způsobovala navýšení hladiny tohoto proteinu. Další z testovaných látek byla SA- β -galaktosidáza patřící mezi nejběžnější markery senescence. Její hladina byla testována pomocí komerční soupravy od firmy Cell Signaling Technology®. Z důvodu neúspěšnosti prvního experimentu provedeného podle protokolu, byly provedeny další experimenty s upravenými podmínkami, jako je pH, pomocí 8% HCl a BA1. Vzhledem ke skutečnosti, že žádná z provedených změn nevedla k indukci SA- β -galaktosidázy v prostatické nádorové linii 22Rv1 po jejím vystavení pozitivním kontrolám (ENZ a DOX) zmiňovaných v literatuře, nebyla tato aktivita dále sledována vůči vybraným indolovým sloučeninám.

Pro přesnější výsledky o účinku indolových derivátů na prostatickou nádorovou linii 22Rv1 by bylo vhodné využít jiných analytických metod pro stanovení indukce aktivity SA- β -galaktosidázy, a navíc stanovit hladinu dalších proteinů jako markerů senescence.

Cíle této bakalářské práce byly splněny, jen částečně.

9 LITERATURA

- Barnum K. J., O'Connell M. J. (2014): Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Cell Cycle Control*, 29-40.
- Blagosklonny, M. V. (2001): Cell Cycle Checkpoints and Cancer (2. vydání). Landes Bioscience, Texas.
- Burianová L. (2012): Význam IMRT techniky v radioterapii karcinomu prostaty. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno.
- Carpenter V. J., Saleh T., Gewirtz D. A. (2021): Senolytics for Cancer Therapy: Is All that Glitters Really Gold?. *Cancers*, **13**(4).
- Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A. J., Barradas M., Benguría A., Zaballos A., Flores J. M., Barbacid M., Beach D., Serrano M. (2005): Senescence in premalignant tumours. *Nature*, **436**(7051), 642-642.
- Coppé J. -P., Desprez P. -Y., Krtolica A., Campisi J. (2010): The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **5**(1), 99-118.
- Descotes J. -L. (2019): Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, **6**(2), 129-136.
- Ewald J. A., Desotelle J. A., Wilding G., Jarrard D. F. (2010): Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **102**(20), 1536-1546.
- Ewald J. A., Desotelle J. A., Wilding G., Jarrard D. F. (2010): Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **102**(20), 1536-1546.
- Fuhrmann-Stroissnigg H., Santiago F. E., Grassi D., Ling Y. Y., Niedernhofer L. J., Robbins P. D. (2019): SA- β -Galactosidase-Based Screening Assay for the Identification of Senotherapeutic Drugs. *Journal of Visualized Experiments*, (148), 1-12.
- Grigorova M., Punab M., Kahre T., Ivandi M., Tõnisson N., Poolamets O., Vihljajev V., Žilaitienė B., Erenpreiss J., Matulevičius V., Laan M. (2017): The number of CAG and GGN triplet repeats in the Androgen Receptor gene exert combinatorial effect on hormonal and sperm parameters in young men. *Andrology*, **5**(3), 495-504.
- Gupta S., Pungsrinont T., Ženata O., Neubert L., Vrzal R., Baniahmad A. (2020): Interleukin-23 Represses the Level of Cell Senescence Induced by the Androgen Receptor Antagonists Enzalutamide and Darolutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Hormones and Cancer*, **11**(3-4), 182-190.
- Heinlein C. A., Chang C. (2004): Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, **25**(2), 276-308.
- Heinlein C. A., Chang, C. (2004): Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, **25**(2), 276-308.

- Hessenkemper W., Roediger J., Bartsch S., Houtsmuller A. B., van Royen M. E., Petersen I., Grimm M. -O., Baniahmad A. (2014): A Natural Androgen Receptor Antagonist Induces Cellular Senescence in Prostate Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, **28**(11), 1831-1840.
- Holibková A., Laichman S. (2002): *Přehled anatomie člověka* (3. vydání). Univerzita Palackého, Olomouc.
- Huggins C. (1941): Studies on prostatic cancer. *Archives of Surgery*, **43**(2), 293–297.
- Chamberlain N. L., Driver E. D., Miesfeld R. L. (1994): The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Research*, **22**(15), 3181-3186.
- Chinni S. R., Li Y., Upadhyay S., Koppolu P. K., Sarkar F. H. (2001): Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene*, **20**(23), 2927-2936.
- Kaushik N., Kaushik N., Attri P., Kumar N., Kim C., Verma A., Choi E. (2013): Biomedical Importance of Indoles. *Molecules*, **18**(6), 6620-6662.
- Kotake Y., Naemura M., Murasaki C. H., Inoue Y., Okamoto H. (2015): Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene. *Anticancer research international journal of cancer research and treatment*, **35**(8), 4397-4402.
- Lee B. Y., Han J. A., Im J. S., Morrone A., Johung K., Goodwin E. C., Kleijer W. J., DiMaio D., Hwang E. S. (2006): Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, **5**(2), 187-195.
- Lee J. -H., Lee J. (2010): Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**(4), 426-444.
- Litwin M. S., Tan H. -J. (2017): The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *JAMA*, **317**(24), 1-11.
- Messner E. A., Steele T. M., Tsamouri M. M., Hejazi N., Gao A. C., Mudryj M., Ghosh P. M. (2020): The Androgen Receptor in Prostate Cancer: Effect of Structure, Ligands and Spliced Variants on Therapy. *Biomedicines*, **8**(10), 1-19.
- Miyamoto H., Yeh S., Lardy H., Messing E., Chang C. (1998): $\Delta 5$ -Androstenediol is a natural hormone with androgenic activity in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(19), 11083-11088.
- Papaioannou M., Schleich S., Prade I., Degen S., Roell D., Schubert U., Tanner T., Claessens F., Matusch R., Baniahmad A. (2009): The natural compound atraric acid is an antagonist of the human androgen receptor inhibiting cellular invasiveness and prostate cancer cell growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13**(8b), 2210-2223.
- Qin S., Schulte B. A., Wang G. Y. (2018): Role of senescence induction in cancer treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, **9**(8), 180-187.

- Rao C. V. (2001): Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, **76**(6), 1097-1100.
- Rasmussen M. K., Balaguer P., Ekstrand B., Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S., Ryffel B. (2016): Skatole (3-Methylindole) Is a Partial Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist and Induces CYP1A1/2 and CYP1B1 Expression in Primary Human Hepatocytes. *PLOS ONE*, **11**(5).
- Rawla P. (2019): Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, **10**(2), 63-89.
- Rayess H., Wang M. B., Srivatsan E. S. (2012): Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, **130**(8), 1715-1725.
- Rodier F., Muñoz D. P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J. -P., Campeau E., Beauséjour C. M., Kim S. -H., Davalos A. R., Campisi J. (2011): DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science*, **124**(1), 68-81.
- Roell D., Rösler T. W., Hessenkemper W., Kraft F., Hauschild M., Bartsch S., Abraham T. E., Houtsmuller A. B., Matusch R., van Royen M. E., Baniahmad A. (2019): Halogen-substituted anthranilic acid derivatives provide a novel chemical platform for androgen receptor antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **188**, 59-70
- Salari Fanoodi T., Motalleb G., Yegane Moghadam A., Talaei R. (2015): P21 Gene Expression Evaluation in Esophageal Cancer Patients. *Gastrointestinal Tumors*, **2**(3), 144-164.
- Valieva Y., Ivanova E., Fayzullin A., Kurkov A., Igrunkova A. (2022): Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. *Diagnostics*, **12**(10), 1-14.
- Van Order R. B., Lindwall H. G. (1942): Indole. *Chemical Reviews*, **30**(1), 69-96.
- Wagner J., Damaschke N., Yang B., Truong M., Guenther C., McCormick J., Huang W., Jarrard D., Kyprianou N. (2015): Overexpression of the Novel Senescence Marker β -Galactosidase (GLB1) in Prostate Cancer Predicts Reduced PSA Recurrence. *PLOS ONE*, **10**(4), 1-15.
- Yang M. -Y., Lin P. -M., Liu Y. -C., Hsiao H. -H., Yang W. -C., Hsu J. -F., Hsu C. -M., Lin S. -F., Chuang E. Y. (2012): Induction of Cellular Senescence by Doxorubicin Is Associated with Upregulated miR-375 and Induction of Autophagy in K562 Cells. *PLOS ONE*, **7**(5).
- Zgarbová E., Vrzal R. (2023): The Impact of Indoles Activating the Aryl Hydrocarbon Receptor on Androgen Receptor Activity in the 22Rv1 Prostate Cancer Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(1).
- Zhang J., Hsu B. A. J. C., Kinseth B. A. M. A., Bjeldanes L. F., Firestone G. L. (2003): Indole-3-carbinol induces a G1 cell cycle arrest and inhibits prostate-specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells. *Cancer*, **98**(11), 2511-2520.