

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2013**

**Bc. Adriána Petrišaková**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Expresse histonových deacetyláz u prostatických  
nádorových buněk po jejich ovlivnění inhibitory  
histonových deacetyláz a DNA metylací**

**Diplomová práce**

**Adriána Petrišaková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný-Trtková, CSc.**

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením Ing. Kateřiny Smešný-Trtkovej s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa 6.5.2013

## SÚHRN

Metylácia DNA katalyzovaná DNA metyltransferázami je epigenetickou modifikáciou DNA, ktorá obvykle súvisí s potlačením transkripcie, pokiaľ je prítomná v promotorovej oblasti príslušného génu. Naproti tomu acetylácia histónov je spojovaná s aktiváciou transkripcie, pričom hypoacetylácia histónovými deacetylázami s metyláciou promotorových CpG ostrovčekov alebo metyláciou histónových lyzínov môže mať vplyv na expresiu tumor supresorových génov alebo inhibítorov cyklin-dependentných kináz.

U prostatických nádorových buniek líšiacich sa citlivosťou na androgény bol sledovaný mechanizmus pôsobenia inhibítorov metylácie DNA (5-aza-2'-deoxycytidine; 5-Aza-CdR) a inhibítorov histónových deacetyláz (butyrát sodný; NaB) na expresiu vybraných histónových deacetyláz a DNA metyltransferáz. Boli použité nádorové línie odvodené z nádorov prostaty líšiace sa citlivosťou k androgénom. Línia LNCaP je na androgénoch-závislá a exprimuje funkčný androgénový receptor a línia DU145 reprezentuje bunky necitlivé k androgénom, ktoré sú bez expisie androgénového receptora. Bunky oboch línií boli ovplyvňované po dobu 24, 48 a 96 hodín rôznymi koncentraciami butyrátu sodného a kombináciami butyrátu sodného s 5-aza-2'-deoxycytidinom. Z ovplyvnených a neovplyvnených buniek bol pre imunoprecipitačnú analýzu použitý proteínový lyzát obsahujúci formaldehydom fixovaný chromatín. Izolovaná DNA bola precipitovaná protilátkami proti Acetyl-histone H3 a Acetyl-histone H4. Zmeny v expresii DNA metyltransferáz DNMT1 a DNMT3b na histónoch H3 a H4 boli detekované amplifikáciou imunoprecipitovanej DNA. Expesia HDAC2 a HDAC3 bola stanovená na proteínovej úrovni Western blotovou analýzou. Bola zistená znížená expresia HDAC2 a HDAC3 u línie DU145 po ovplyvnení 5mmol/l NaB a kombináciou 5mmol/l NaB s 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR. Zmeny v expresii DNMT1 a DNMT3b sú zrejme po 48 hodinách ovplyvnenia a po 96 hodinách nie sú rozdiely tak patrné. Znížená expresia DNMT3b bola detekovaná po ovplyvnení 5mmol/l NaB a kombináciou 5mmol/l NaB s 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR a korelovala so zníženou expresiou HDAC2 a HDAC3 u buniek línie DU145.

Ovplyvňovanie prostatických nádorových buniek demetylačným činidlom (5-Aza-CdR) a inhibítorom histónových deacetyláz (NaB) môže vyvolať vzájomne sa ovplyvňujúce epigenetické modifikácie, naznačujúce komplexnosť v pôsobení epigenetických mechanizmov a potrebu ďalších podrobnejších analýz.

## SUMMARY

DNA methylation catalyzed by DNA methyltransferases is an epigenetic modification of DNA associated with transcriptional repression when is present in the gene promoter region. Histone acetylation is correlated with transcriptional activation. Hypoacetylation of histones deacetylases with methylation of promoter CpG islands or methylation of histones lysines can influence an expression of the tumour suppressor genes or the inhibitors cyclin-dependent kinases. At prostate cancer cell lines with different sensitivity to androgens were observed effect of the DNA methylation inhibitor (5-aza-2'-deoxycytidine; 5-Aza-CdR) and the inhibitor of histone deacetylases (sodium butyrate-NaB) to histone deacetylases and DNA methyltransferases expressions. We used two prostate cancer cell lines with different sensitivity to androgens. The LNCaP is an androgen-dependent cell line with functional androgen receptor. The DU145 cell line is an androgen-independent cell line without AR gene expression. The both cell lines were treated with various concentrations of sodium butyrate and combinations of sodium butyrate with 5-aza-2'-deoxycytidine for 48 and 96 hours. We prepared protein lysates involving formaldehyde fixed chromatin in the control and the treated cells. Isolated DNA was precipitated with antibodies Anti-acetyl-histone H3 and Anti-acetyl-histone H4. Changes of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3b at histones H3 and H4 expressions were detected by amplification of immunoprecipitated DNA. The HDAC2 and HDAC3 protein expressions were detected by Western blot analysis. In DU145 cells, we found decrease of the HDAC2 and HDAC3 expressions after cell treatments with 5mmol/l NaB and combination of 5mmol/l NaB with 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR. We detected changes in DNMT1 and DNMT3b expressions after 48 hour treatment, no changes are visible after 96 hours. The decreased DNMT3b expressions were detected after cell treatment with 5mmol/l NaB and combination of 5mmol/l NaB with 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR. This finding correlates with decreased the HDAC2 and HDAC3 expressions in DU145 cells.

Although our findings require further precise analysis, we suppose that the treatment of prostate cancer cells with demethylated agent and histone deacetylases inhibitor could induce the epigenetic modifications which may interact and as follows to affect expression of some important genes.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
2.1	RAKOVINA PROSTATY .....	10
2.2	ANDROGÉNOVÝ RECEPTOR .....	10
2.2.1	Štruktúra a funkcie AR .....	11
2.2.2	Aktivácia androgénového receptoru .....	12
2.3	EPIGENETICKÝ APARÁT BUNKY .....	12
2.4	METYLÁCIA DNA .....	13
2.4.1	DNA metyltransferázy .....	14
2.5	ACETYLÁCIA HISTÓNOV .....	14
2.6	HISTÓNOVÉ MODIFIKÁCIE .....	15
2.6.1	Histón deacetylázy .....	17
2.7	ĎALŠIE TYPY POSTTRANSLAČNÝCH MODIFIKÁCIÍ HISTÓNOV .....	17
2.7.1	Fosforylácia .....	17
2.7.2	SUMOylácia .....	17
2.8	INHIBÍTORE HISTÓNOVÝCH DEACETYLÁZ .....	18
2.8.1	Butyrát sodný .....	18
2.9	DEMETYLAČNÉ ČINIDLA .....	19
2.9.1	5-Azacytidin .....	19
2.9.2	5-Aza-2'-deoxycytidin .....	20
<b>3</b>	<b>CIELE PRÁCE .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>23</b>
4.1	KULTIVÁCIA BUNKOVÝCH LÍNIÍ A ICH OVPLYVNĚOVANIE .....	23
4.2	PRÁCA S BUNKOVÝMI LYZÁTMI .....	24
4.2.1	Získanie celkového obsahu proteínov .....	24
4.2.2	Sonikácia bunkových lyzátov .....	26
4.2.3	Stanovenie koncentrácie proteínov metódou Bradfordovej .....	26
4.2.4	Chromatin imunoprecipitačná analýza (ChIP) s použitím protilátok Anti-acetyl-histone H3 a Anti-acetyl-histone H4 .....	27

4.3	ANALÝZA DNA Z CHROMATÍNOVÝCH IMUNOPRECIPITÁTOV.....	28
4.3.1	Amplifikácia DNA pomocou PCR.....	28
4.3.2	Vizualizácia amplifikovaných úsekov DNA .....	30
4.4	WESTERN BLOT ANALÝZA .....	31
4.4.1	Elektroforéza SDS-PAGE .....	31
4.4.2	Prenos proteínov na membránu .....	32
4.4.3	Detekcia proteínov.....	33
4.5	ZOZNAM CHEMIKÁLIÍ .....	34
4.6	POUŽITÉ ROZTOKY.....	35
4.7	MÉDIA PRE PRÁCU S BUNKOVÝMI KULTÚRAMI.....	41
4.8	VYBAVENÍ LABORATOĽE .....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>44</b>
5.1	PROTEINOVÁ ANALÝZA HISTÓNOVÝCH DEACETYLAZ.....	44
5.1.1	Expresia HDAC2 a HDAC3 u prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení butyrátom sodným a jeho kombináciou s 5-aza-2'-deoxycytidinom .....	44
5.1.2	Expresia HDAC2 a HDAC3 u prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení butyrátom sodným a jeho kombináciou s 5-aza-2'-deoxycytidinom .....	47
5.1.3	Expresia androgénového receptoru (AR) u prostatickej nádorovej línie DU145	49
5.2	KONVENČNÁ PCR AMPLIFIKÁCIA PRODUKTOV PO CHROMATÍNOVEJ IMUNOPRECIPITÁCII S PROTILÁTKAMI PROTI ACETYL-HISTONE H3 A ACETYL-HISTONE H4 S POUŽITÍM PRIMEROV PRE DNMT1 .....	50
5.3	PCR AMPLIFIKÁCIA PRODUKTOV PO CHROMATÍNOVEJ IMUNOPRECIPITÁCII S PROTILÁTKAMI PROTI ACETYL-HISTONE H3 A ACETYL-HISTONE H4 S POUŽITÍM PRIMEROV PRE DNMT3B.....	53
<b>6</b>	<b>DISKUSIA.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>LITERATÚRA .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>PRÍLOHY .....</b>	<b>68</b>

Týmto by som rada poďakovala Ing. Kateřine Smešný-Trtkovej za cenné rady, odborné vedenie a čas počas vypracovania tejto diplomovej práce. Taktiež by som rada poďakovala celému tímu Ústavu klinickej a molekulárnej patológie v Olomouci, predovšetkým doktorantkám za ochotu a pomoc pri práci v laboratóriu.



## 1 ÚVOD

Rakovina prostaty je najčastejším zhubným nádorom u mužov vo veku nad 50 rokov. Na vznik ochorenia má vplyv genetická predispozícia a získané genetické alebo tiež epigenetické zmeny. Primárne je liečená chirurgickou alebo radiačnou terapiou. Androgénový receptor, ktorý zohráva dôležitú úlohu ako v normálnom raste a vývoji prostatickej žľazy, tak v karcinogézi prostaty, patrí do rodiny jadrových hormonálnych receptorov a je lokalizovaný na X chromozóme (q11-12). Epigenetický aparát je tvorený súborom špecifických kovalentných modifikácií na histónových koncoch a metylácii DNA. Medzi epigenetické posttranslačné modifikácie histónov patrí tiež acetylácia a deacetylácia. Expresia génu môže byť ovplyvňovaná aj na transkripčnej úrovni a to metyláciou DNA umožnenou DNA metyltransferázami, ktoré katalyzujú prenos metylovej skupiny na CpG dinukleotidy a prispievajú tak k vytvoreniu hemimetylovanej alebo plne metylovanej DNA. DNA metyltransferázy sa viažu k niekoľkým histónovým modifikátorom ako sú napríklad histónové deacetylázy. Histónové deacetylázy patria do skupiny korepresorov transkripčných faktorov vrátane androgénového receptoru. Katalyzujú deacetyláciu aminoskupiny lyzínu v N-terminálnej časti jadrových histónov. Táto skupina proteínov reguluje expresiu génov zmenou konformácie nukleozómu na úrovni chromatinu a zmenami stability niekoľkých komplexov transkripčných faktorov. Inhibitory histónových deacetyláz majú široký rozsah proti-nádorových aktivít vrátane zastavenia bunkového cyklu, diferenciácie buniek a apoptózy. Vplyv butyrátu sodného, ako jedného z inhibítorov histónových deacetyláz, spočíva v zmene génovej expresie a zastavení bunkovej proliferácie inhibíciou prestavby chromatinovej aktivity histónových deacetyláz. Reverzibilita epigenetických modifikácií poskytuje lákavé ciele pre terapeutický zásah. V porovnaní s genetickými mutáciami, ktoré sú dedené pasívne procesom replikácie DNA, epigenetické mutácie musia byť aktívne udržiavané. Následkom toho farmakologická inhibícia istých epigenetických modifikácií môže opraviť chybné modifikácie, a tým priamo zmeniť génovú expresiu a odpovedajúcu bunkovú charakteristiku.

## **2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Rakovina prostaty**

Rakovina prostaty je najčastejším zhubným nádorom u mužov vo veku nad 50 rokov. Na vznik ochorenia má vplyv genetická predispozícia a získané genetické alebo tiež epigenetické zmeny. Včasná diagnostika ochorenia je dôležitá pre úspešnú liečbu. Detekcia prostatického špecifického antigénu (PSA) v sére pacientov umožňuje včasné zachytenie ochorenia (Tilandyová *et al.*, 2010). Klinicky lokalizovaná rakovina prostaty je primárne liečená chirurgickou alebo radiačnou terapiou. U pacientov so systematicky sa vracajúcim ochorením alebo s rozvinutým štádiom ochorenia je základom liečby androgén – ablačná terapia. Táto liečba je dočasná a po 18 – 24 mesiacoch dochádza k progresii ochorenia ohláseného zvýšením PSA, zväčšením nádoru a metastatickým šírením. To predstavuje letálny fenotyp ochorenia a je označovaný ako kastročne rezistentná rakovina prostaty (Lonergan *et al.*, 2011). Súčasná hormonálna liečba rakoviny prostaty pozostáva z dvoch tried liečiv, a to tie, ktoré znižujú množstvo testosterónu a antagonistov androgénového receptora, ktorých cieľom je ligand-viazajúca doména receptora. Hoci je spočiatku účinná blokácia rastu nádoru, tieto terapie nakoniec zlyhajú a vedú k smrteľnému štádiu rezistentnému na lieky, nazývaného kastročne rezistentná rakovina prostaty (CRPC). Dôkazy naznačujú, že CRPC pokračuje v závislosti na funkcii androgénového receptora pre rast a vývoj z kastročne senzitivného do kastročne rezistentného štádia zahrňuje reaktiváciu androgénového receptora v prostredí s malým množstvom androgénov (Welsbie *et al.*, 2009).

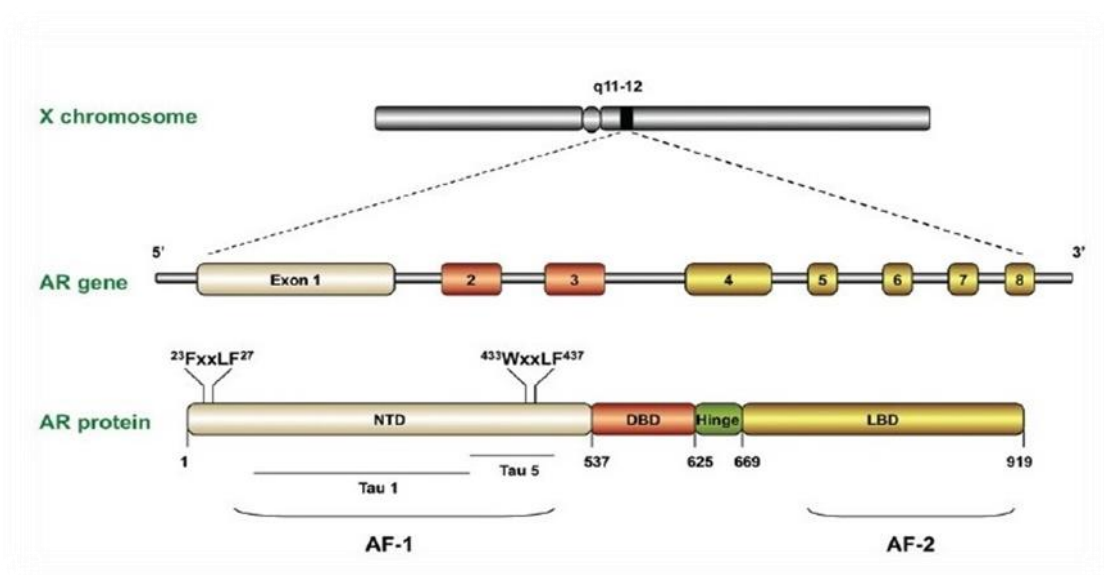
### **2.2 Androgénový receptor**

Androgénový receptor (AR) zohráva dôležitú úlohu ako v normálnom raste a vývoji prostatickej žľazy, tak v karcinogéze prostaty, zmene z androgén-závislého do androgén-nezávislého štádia a progresii androgén-nezávislého ochorenia (Lonergan *et al.*, 2011). AR patrí do rodiny jadrových hormonálnych receptorov. Väzba androgénov na AR

premení receptor do aktívnej konformácie a zahájí translokáciu do jadra, čo je nasledované väzbou špecifických elementov do oblasti promotora cieľových génov, kde je upravená génová expresia buď pozitívne alebo negatívne (Alimirah *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Štruktúra a funkcie AR

AR je lokalizovaný na X chromozóme (q11-12) a pozostáva z 8 exónov. Molekulová hmotnosť je 110 kDa a pozostáva z 919 aminokyselín (Claessens *et al.*, 2008). Skladá sa zo 4 štruktúrnej a funkčnej odlišných domén: N-terminálna doména (NTD), DNA-viazajúca doména (DBD), ligand-viazajúca doména (LBD) a „hinge region“ oddeľujúci LBD od DBD, okrem toho obsahuje časť ligand-dependentného jadrového lokalizačného signálu (NLS) pre transport AR do jadra (Lonergan *et al.*, 2011). Viz.obr.1



**Obr. 1** : Schématické znázornenie génu AR a proteínu s údajmi o doménach a motívoch (prevzaté Lonergan *et al.*, 2011).

## 2.2.2 Aktivácia androgénového receptoru

AR je transkripčný faktor aktivovaný väzbou ligandu - androgénu. Testosterón, sekretovaný semenníkmi a adrenálnou žľazou, je najhojnejší androgén a ligand pre AR u mužov. V cieľových tkanivách je testosterón premenený na dihydrotestosterón (DHT) aktivovaním 5 $\alpha$ -reduktázy. DHT ako ligand má vysokú afinitu k AR aj napriek nižšiemu množstvu ako testosterón - DHT je silnejší agonista AR. Pred aktivovaním ligandu (DHT) je AR prítomný rozptýlený v cytoplazme a jadre prostatických epiteliálnych buniek a bunkách adenokarcinómu. Inaktivovanie receptora je spojené s heat-shock proteínmi v cytoplazme, ktoré tak bránia jeho novej transkripčnej aktivite v jadre. Ovšem po väzbe ligandu disociuje receptor od heat-shock proteínov a presúva sa do jadra. Aktiváciou homodimérov, AR rozpoznáva a viaže špecifické DNA sekvencie nazývané „androgen responsive elements“ (AREs) lokalizované v oblasti promotora alebo enhanceru androgénového receptora. (Burd *et al.*, 2006).

## 2.3 Epigenetický aparát bunky

Epigenetický aparát je tvorený súborom špecifických kovalentných modifikácií na histónových koncoch a metylácii DNA. Podieľa sa na štruktúre chromatinu bez zmeny sekvencie DNA a tým ovplyvňuje expresiu génov (Muthná *et al.*, 2009). Transkripcia u eukaryotických buniek je ovplyvnená spôsobom akým je DNA zabalená. V kľudových bunkách je DNA pevne utužená, aby zabránila prístupu transkripčných faktorov (Annemieke *et al.*, 2003). DNA je kondenzovaná do chromatinu, ktorého základnou jednotkou je nukleozóm pozostávajúci z oktameru štyroch jadrových histónov (H3, H4, H2A, H2B) obklopených 146bp DNA. Jadro histónov je prevažne globulárne okrem N-koncovej časti, ktorá je neštrukturovaná (Kouzaridel *et al.*, 2007). Miestne zloženie chromatinu je rozoznávané ako dôležitý faktor v regulácii génovej expresie.

Histón H1 je v chromatine prítomný v polovičnom množstve ako ostatné typy histónov a nachádza sa na vonkajšej časti nukleozómu. Viaže sa na chromatin slabšie a preto ho môžeme extrahovať a tým sa chromatin stáva rozpustný. Nukleozómy sa ďalej

skladajú do vyšších štruktúr, prechádzajú zmenami, ktoré vedú k aktivácii alebo represii transkripcie (Muthná *et al.*, 2009).

Históny H3 a H4 sú jednými z piatich proteínov chromatinu u eukaryotických buniek. Globulárna oblasť s dlhým N-terminálnym koncom histónov H3 a H4 sú zahrnuté do štruktúry nukleozómu. Histónové proteíny sú vo vysokej miere posttranslačne modifikované, vrátane acetylácie a metylácie. Histón H3 je modifikovaný v miere najvyššej.

## 2.4 Metylácia DNA

Metylácia DNA je dôležitý regulátor transkripcie génov. DNA metylácia je kovalentná modifikácia, pri ktorej sa pridáva metylová skupina na piaty uhlík cytozínu. Táto reakcia je katalyzovaná DNA metyltransferázami (DNMT). Hypermetylácia potlačuje transkripciu promotorových oblastí génov bohatých na výskyt CpG ostrovčekov vedúcich k umlčovaniu ich transkripcie (Das *et al.*, 2004). Táto modifikácia umlčuje mnoho klasických funkcií tumor supresorových génov vrátane hormonálnej signalizácie, oprav DNA, bunkovej adhézie, kontroly bunkového cyklu a apoptózy. CpG ostrovčeky sú nenáhodne distribuované a asi 1% ľudskej DNA pozostáva z krátkych CpG ostrovčekov. V nemetylovanom stave môže byť chromatin v týchto CpG oblastiach formovaný do aktívnej štruktúry, ktorá uľahčuje naviazanie RNA polymeráz do oblasti promotoru génu. V rozmedzí 60 - 90% CpG dinukleotidov je metylovaných v ľudskom génome. Metylované CpG dinukleotidy spôsobujú spontánnu deamináciu 5-metylcytozínu na thymín a táto reakcia zmení štruktúru chromatinu a znamená významnú bariéru transkripcie. CpG ostrovčeky sú v promotorových oblastiach normálnych tkanív väčšinou nemetylované bez ohľadu na transkripčnú aktivitu génu. Výnimky zahŕňujú netranskribované gény na inaktívnom chromozóme X a imprintované autozomálne gény, kde jedna z rodičovských alel môže byť metylovaná. Hypometylácia je druhou metylačnou chybou, ktorá je pozorovaná v rôznych zhubných nádoroch vrátane rakoviny prostaty. Zdá sa, že hypermetylačné zmeny predchádzajú zmenám hypometylačným, ktoré sú všeobecne detekované v rakovinách vyššieho štádia a vyskytujú sa rôzne počas priebehu rakoviny prostaty a metastatického šírenia. Hypometylácia je pozorovaná v dôsledku zníženej

metylácie hojných repetitívnych sekvencií, ktoré sú husto metylované v normálnych bunkách, ako sú LINE-1 retrotranspozóny. Predpokladá sa, že prispieva k onkogenézii skrz rozmanité mechanizmy vrátane aktivácie onkogénov ako je *c-MYC* a *H-RAS*, aktivácie latentných retrotranspozónov a prispieva k nestabilite chromozómov. Hypometylácia DNA je spojená so zvýšenou genomickou nestabilitou. (Albany *et al.*, 2011).

#### 2.4.1 DNA metyltransferázy

DNA metyltransferázy katalyzujú prenos metylovej skupiny na CpG dinukleotidy a prispievajú tak k vytvoreniu hemimetylovanej alebo plne metylovanej DNA (Patra *et al.*, 2002). Boli identifikované tri aktívne DNA metyltransferázy (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B). DNA s metylovaným cytozínom v 5. pozícii (cytozin-5) je koncovým produktom reakcie medzi DNA bohatou na CpG ostrovčeky a S-adenosylmethioninom, ktorá je katalyzovaná DNA metyltransferázovými enzýmami. DNMT1 je väčšinou zodpovedná za udržiavanie metylačného profilu a v menšej miere je zodpovedná za *de novo* metylácie tumor supresorových génov. Enzýmy DNMT3A a DNMT3B udržiavajú *de novo* metylačnú aktivitu a predpokladá sa, že sú zodpovedné za metyláciu, ktorá sa vyskytuje počas embryogenézie. Bolo zistené, že DNA metyltransferázy sa viažu k niekoľkým histónovým modifikátorom ako sú napríklad histónové deacetylázy (Albany *et al.*, 2011).

#### 2.5 Acetylácia histónov

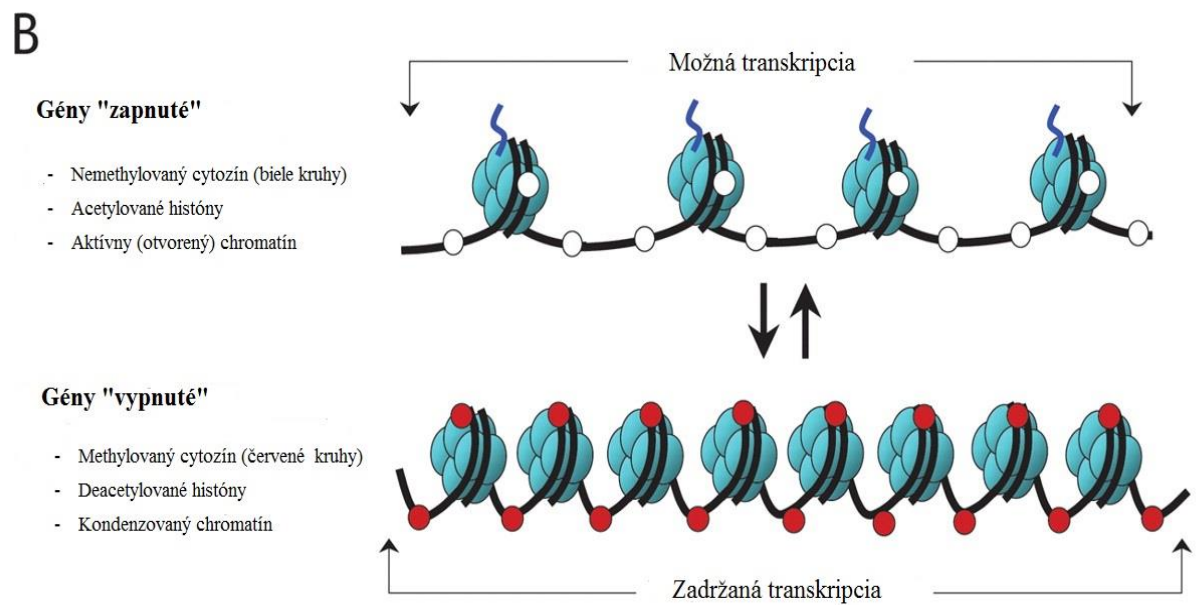
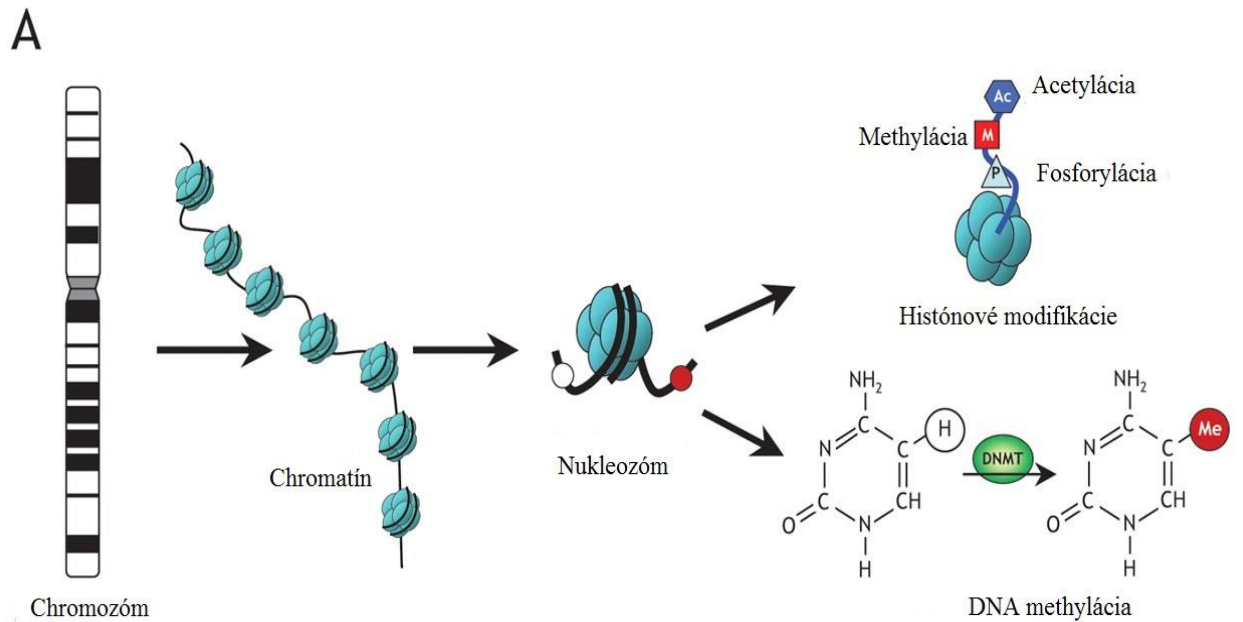
Acetylácia je pravdepodobne najlepšie pochopenou modifikáciou v porovnaní s metyláciou či fosforyláciou. Acetylácia histónov sa vyskytuje na amino skupinách evolučne konzervovaných lyzínových reziduách umiestnených na N-konci histónov, čím dochádza k zníženiu ich celkového pozitívneho náboja. Na týchto koncoch je znížená afinita k negatívne nabitej DNA, ktorá uľahčuje väzbu proteínov, ktoré majú regulačný vplyv na transkripciu chromatinových úsekov (Rice *et al.*, 2001). Acetylácia jadrových histónov je katalyzovaná histónovými acetyltransferázami (HATs) a znižovaná histónovými deacetylázami (HDACs). Ustálený stav úrovne acetylácie jadrových histónov

vyplýva z rovnováhy medzi aktivitou histónových acetyltransferáz a histónových deacetyláz. Hyperacetylácia je spojená so zvýšenou transkripčnou aktivitou, zatiaľ čo hypoacetylácia je spojená s potlačením génovej expresie.

## 2.6 Histónové modifikácie

Tri kľúčové regulátory modifikácie histónov sú histónové deacetylázy (HDACs), histónové acetyltransferázy (HATs) a histónové metyltransferázy. HDACs a HATs rozhodujú o stave acetylácii histónov. Históny už nie sú považované viac len za „DNA baliace“ proteíny, sú uznávané ako dynamické regulátory génovej aktivity, ktoré podstupujú mnoho posttranslačných chemických modifikácií, vrátane acetylácie, metylácie a fosforylácie.

N-koncová časť histónových proteínov, ktorá vyčnieva von z nukleozómu je bohatá v kladne nabitých aminokyselinách, ktoré sú predmetom rôznych posttranslačných modifikácií. Stav acetylácie a metylácie špecifických lyzínových reziduí zahrnutý v koncoch nukleozomálneho jadra histónov je známy pre svoju zásadnú úlohu v regulácii štruktúry chromatínu a génovej expresie (Albany *et al.*, 2011). Modifikácie histónov spolu s DNA metyláciou majú tiež zásadnú úlohu v rozpoznaní zloženia jadra, ktorý je zahrnutý v regulácii transkripcie a iných jadrových procesoch. Zmeny histónových modifikácií môžu potencionálne ovplyvniť štruktúru a integritu génomu a narušiť normálny priebeh génovej expresie, čo môže byť príčinným faktorom v rakovine. Acetylácia histónov sprostredkovaná HAT koreluje s transkripčnou aktiváciou a deacetylácia histónov sprostredkovaná HDACs je spojená s umlčaním génov.



**Obr. 2:** Schématické znázornenie epigenetických modifikácií (prevzaté od [www.cnx.org](http://www.cnx.org))



### **2.6.1 Histón deacetylázy**

Histónové deacetylázy (HDAC) je skupina korepresorov transkripčných faktorov vrátane androgénového receptoru. Katalyzujú deacetyláciu aminoskupiny lyzínu v N-terminálnej časti jadrových histónov. Táto skupina proteínov reguluje expresiu génov zmenou konformácie nukleozómu na úrovni chromatínu a zmenami stability niekoľkých komplexov transkripčných faktorov. Trieda I HDACs zahrňuje HDAC1 a HDAC2, ktoré sú spojené so Sin3A a Sin3B a niekoľkými ďalšími proteínmi k vytvoreniu Sin3 komplexu. Uvažuje sa, že deacetylácia histónov v blízkosti regulujúcich oblasti promotora Sin3 vedie k potlačeniu štruktúry chromatínu. Podobne trieda II HDACs, HDAC 4 a 5, tvorí komplex s korepresormi N-CoR (Nuclear receptor co-repressor) a SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors). HDAC3 je v spojení s ďalším veľkým komplexom koregulačných proteínov vytvárajúcich HDAC3/GPS/TBL/N-CoR/SMRT komplex. Tieto komplexy sú spojené s ligandom, ktorý sa viaže na diméry AR a podieľajú sa na regulácii AR ovplyvňovaných génov (Wang *et al.*, 2008).

## **2.7 Ďalšie typy posttranslačných modifikácií histónov**

### **2.7.1 Fosforylácia**

K ďalším posttranslačným modifikáciám histónov patrí fosforylácia. Hlavným substrátom je histón H3. Fosforylácia serínu S10 je nutná k zahájeniu kondenzácie chromozómu v pericentrickom heterochromatíne a má dôležitú úlohu v transkripčnej aktivácii eukaryotických génov podporujúac acetyláciu K14 (Lys 14) na rovnakom histónovom konci (Santos–Rosa *et Caldas*, 2005).

### **2.7.2 SUMOylácia**

Androgénový receptor môže byť modifikovaný SUMOyláciou, ktorá sa vzťahuje ku kovalentnému pripojeniu malých aminokyselinových (AMK) (asi 100 AMK) modifikátorov podobných ubiquitínu (SUMO) k lyzínovým postranným reťazcom.

U cicavcov sú exprimované štyri SUMO izoformy, pričom AR je modifikovaný prednostne SUMO1. SUMOylačné miesta v AR sú Lys 386 (K386) a Lys 520 (K520). SUMOylácia je reverzibilná v bunke, pretože isopeptidová väzba vytvorená medzi C-koncovým lyzínom v SUMO a  $\epsilon$ -amino skupinou v akceptorovom lyzíne môže byť štiepená SUMO proteázami. Fakta dokazujú, že SUMOylácia AR primárne na reziduách K386 znižuje transkripčnú aktivitu AR (Gioeli *et. Paschal*, 2012).

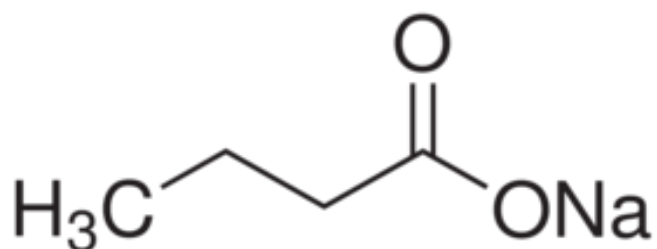
## 2.8 Inhibítory histónových deacetyláz

HDAC inhibítory (HDACi) majú široký rozsah proti-nádorových aktivít vrátane zastavenia bunkového cyklu, diferenciácie buniek a apoptózy. Štruktúrna diverzita medzi HDACi poukazuje, že mechanizmus postupu týchto zložiek môže zapríčiniť interakciu HDAC s proteínmi nezávislými na deacetylázovej aktivite. Boli identifikované prirodzene sa vyskytujúci butyrát sodný a trichostatin A a syntetické inhibítory hydroxamová kyselina, cyklické tetrapeptidy či benzamidy. Butyráty a fenylbutyráty sú látky demonštrujúce inhibičný účinok histónových deacetyláz (Trtková *et al.*, 2010).

### 2.8.1 Butyrát sodný

Butyrát sodný (NaB) je krátky reťazec mastnej kyseliny produkovaný anaeróbnou bakteriálnou fermentáciou vlákniny v čreve. Butyrát sodný môže inhibovať vývoj rakoviny čreva (Velázquez *et al.*, 1996). Vplyv butyrátu spočíva v zmene génovej expresie a zastavuje bunkovú proliferáciu inhibíciou prestavby chromatinovej aktivity histónových deacetyláz (Davie *et al.*, 2004). Pozoruhodne proapoptický účinok NaB nie je obmedzený na gastrointestinálny trakt, ale bol tiež vykazovaný v myeloidnej leukémii, rakovine prsu, prostaty a mnohých ďalších typov rakoviny. Butyrát sodný patrí do skupiny inhibítorov histónových deacetyláz (HDACi). Hlavnou biochemickou zmenou, ktorá sa vyskytuje v bunkách ovplyvňovaných HDACi je hyperacetylácia histónov. Histónové proteíny zabalia DNA do nukleozómov a jadro histónov môže byť acetylované na lysínových reziduách  $\text{NH}_2$ -konca. Butyrát sodný spôsobuje acetyláciu histónov reverzibilnou inhibíciou histónových deacetyláz. Hyperacetylácia histónov neutralizuje náboj medzi

histónovým koncom a DNA, sprístupňujúc túto oblasť DNA pre transkripčné faktory, čím sprostredkováva spojenie s aktiváciou špecifických génov (Pajak *et al.*, 2007).



**Obr. 3** Štruktúrny vzorec butyrátu sodného ( prevzaté z [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

## 2.9 Demetylačné činidla

Reverzibilita epigenetických modifikácií poskytuje lákavé ciele pre terapeutický zásah. V porovnaní s genetickými mutáciami, ktoré sú dedené pasívne procesom replikácie DNA, epigenetické mutácie musia byť aktívne udržiavané. Následkom toho farmakologická inhibícia istých epigenetických modifikácií môže opraviť chybné modifikácie, a tým priamo zmeniť génovú expresiu a odpovedajúcu bunkovú charakteristiku. Pokrok vo vývoji farmakologických inhibítorov sa líši medzi jednotlivými enzýmovými rodinami. Vývoj histónových metyltransferázových inhibítorov je stále v preklinickej fáze. Niekoľko HDACi je testovaných vo fáze I a II klinickej skúšky. Inhibítory DNMTs sú vo vyššom klinickom štádiu vývoja (fáze I-III klinickej skúšky) ako HDACi alebo histónové metyltransferázy. Inhibítormi DNA metyltransferáz sú 5-Azacytidin a 5-aza-2'-deoxycytidin.

### 2.9.1 5-Azacytidin

5-Azacytidin bol pôvodne vyvinutý a testovaný ako nukleosidový anti-metabolit s klinickou špecifitou k akútnej myeloidnej leukémii. Ranné správy ukázali, že 5-Azacytidin navodil zlom chromozómu a bol mutagénom. Kvôli možnosti aktivácie

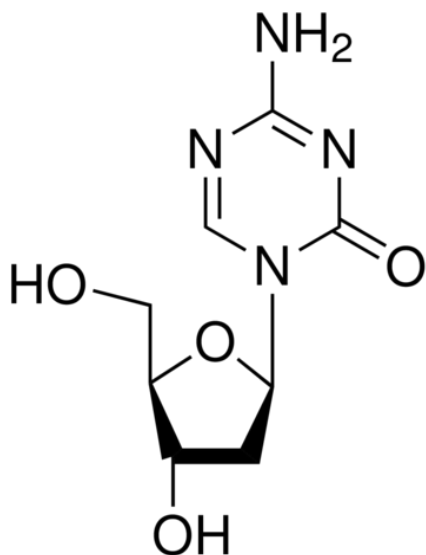
nukleosid trifosfátu a inkorporácii do DNA i RNA, liečba buniek 5-Azacytidinom vedie k inhibícii DNA, RNA a syntéze proteínov. Začlenenie 5-Azacytidinu do tRNA inhibuje tRNA metyltransferázy a zasahuje do metylácie tRNA. Metylácie hrajú dôležitú úlohu u rRNA. Vplyv začlenenia 5-Azacytidinu na funkciu RNA a stabilitu sú pravdepodobne odpoveďou jeho účinku na syntézu proteínov. Enzymatická deaminácia 5-Azacytidinu a 5-Aza-CdR vedie k 5-azauridinu a 5-aza-2'-deoxyuridinu (Christman *et al.*, 2002).

### **2.9.2 5-Aza-2'-deoxycytidin**

5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-CdR) je inkorporovaný len do DNA a je cytotoxickéjší než 5-Azacytidin. Včlenením do DNA kultivovaných buniek dochádza k rapidnému poklesu aktivity DNA metyltransferáz, pretože sa enzým ireverzibilne viaže k 5-Azacytidin reziduám v DNA. 5-Aza-2'-deoxycytidin je široko používaný ako DNA metylačný inhibítor vyvolávajúci génovú expresiu a bunkovú diferenciáciu. K biologickému účinku musí byť liek inkorporovaný do DNA. DNA nahradená 5-Aza-CdR alebo DNA nahradená ribózovým analógom 5-Aza-CdR tvorí kovalentné adukty s bunkovými DNA metyltransferázami, a tým vyčerpajú enzýmovú aktivitu buniek a zapríčinia demetyláciu genomickej DNA ako sekundárny dôsledok. Liečba 5-Aza-CdR tiež spôsobuje rôzne iné zmeny v bunkách, vrátane aktivácie umlčania génov, dekonenzácie chromatinu a zmeny času DNA replikácie. Tieto zmeny bývajú následkom liekom indukovanej demetylácie. 5-Aza-CdR je vysoko toxický v kultivovaných bunkách a u zvierat. Z tohto dôvodu je využitý ako potenciálny liek na rakovinu na liečbu určitých typov leukémií, ako je akútna myeloidná leukémia a myelodysplastický syndróm. Toxicita lieku v bunkách cicavcov je pripočítaná jeho inhibičnému účinku na DNA metyláciu. Predpokladá sa, že protinádorový účinok lieku môže byť výsledkom transkripčnej aktivácie diferenciačných génov vedúcich k terminálnej diferenciácii nediferencovaných rakovinových buniek.

Ak demetylácia genomickej DNA je prvotnou príčinou toxicity lieku, ako sa predpokladá, bunky exprimujú zníženú úroveň DNA metyltransferáz, môžu byť viac citlivé k 5-Aza-CdR ako u normálnych buniek. Naopak, ak kovalentnou väzbou enzýmu k DNA nahradenou 5-Aza-CdR je primárnym mechanizmom liekom indukovanej toxicity,

mutantné bunky exprimujú nižšiu úroveň DNA metyltransferáz, môžu byť viac rezistentné k 5-Aza-CdR (Jüttermann *et al.*, 1994).



**Obr. 4:** Štruktúrny vzorec 5-aza-2'-deoxycytidín (prevzaté od [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

### **3 CIELE PRÁCE**

1. Vypracovanie literárnej rešerše
2. Kultivácia bunkových línií (prostatické nádorové línie LNCaP na androgénoch závislé a prostatické nádorové línie DU145 na androgénoch nezávislé) a ich ovplyvňovanie inhibítorom histónových deacetyláz (butyrát sodný, NaB) alebo kombináciou histónových deacetyláz (NaB) a inhibítora DNA metylácií (5-aza – 2'- deoxycytidine, 5 – Aza – CdR)
3. Western blotovou analýzou detekovať expresiu histónových deacetyláz (HDAC2, HDAC3)
4. Chromatín imunoprecipitačná analýza (ChIP) s použitím protilátok anti-acetyl-histone H3 a anti-acetyl-histone H4
5. PCR analýza DNA izolovanej z imunoprecipitátov s využitím primerov špecifických pre DNA metyltransferázy (DNMT1, DNMT3)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

V experimentálnej časti tejto práce boli použité dve prostatické bunkové línie, a to prostatické nádorové línie LNCaP na androgénch-závislé a prostatické nádorové línie DU145 na androgénch-nezávislé.

### 4.1 Kultivácia bunkových línií a ich ovplyvňovanie

Bunkové línie boli kultivované v inkubátore pri 37°C v 5% atmosfére CO<sub>2</sub>. Pracovali sme v sterilných podmienkach v laboratóriu tkanivových kultúr v boxe s laminárnym prúdením vzduchu.

Bunky línie LNCaP boli kultivované v RPMI médiu a nasadené na 10cm Petriho misky v počte 8,5x10<sup>5</sup> buniek/miska. Kontrolné misky obsahovali 0,1% DMSO. Na ovplyvňovanie buniek sme použili koncentrácie testovaných látok, ktorých zloženie je uvedené v tab. I. Bunky boli ovplyvnené butyrátom sodným (NaB) o koncentrácii 1mmol/l a o koncentrácii 5mmol/l, kombináciou 1mmol/l NaB a 5µmol/l 5-Aza-CdR a kombináciou 5mmol/l NaB a 5µmol/l 5-Aza-CdR. Bunky ovplyvnené testovanými látkami boli kultivované po dobu 48 hodín a 96 hodín. Pri 96 hodinovej kultivácii sme po 48 hodinách vymenili médium za čerstvé. U 24 hodinového ovplyvnenia sme použili 1mmol/l a 5mmol/l koncentráciu NaB.

Bunkové línie DU145 boli kultivované v DMEM médiu v počte 6x10<sup>5</sup> buniek/miska. Misky boli ovplyvňované rovnakým spôsobom ako u línie LNCaP.

**Tab. I:** Zloženie testovaných látok použitých na ovplyvnenie 1 misky bunkových línií DU145 a LNCaP po dobu 48 a 96 hodín

<b>Použité látky→</b>	10% DMSO	0,5 mol NaB	500μmol Aza-CdR	Médium DMEM/RPMI
<b>Ovplyvnenie↓</b>				
DMSO	100	-	-	9 900
1 mmol/l NaB	80	20	-	9 900
5 mmol/l NaB	-	100	-	9 900
1 mmol/l NaB + 5μmol/ Aza-CdR	80	20	100	9 800
5 mmol/l NaB + 5μmol/ Aza-CdR	-	100	100	9 800

Pracovný postup:

1. RPMI alebo DMEM médium vytemperovať na teplotu 37°C vo vodnej lázni;
2. Pripraviť 10% DMSO –do skúmavky Falcon s modrým uzáverom napipetovať 300μl 100% DMSO a 2700μl deionizovanej vody;
3. Pripraviť jednotlivé látky v danej koncentrácii a kombinácii podľa tabuľky;
4. Z Petriho misky odsať sterilnou ihlou médium a pomocou sklenenej pipety pridať 10ml pripravených látok na ovplyvnenie;
5. Inkubovať 24, 48hodín alebo 96 hodín v inkubátore.

## 4.2 Práca s bunkovými lyzátmi

### 4.2.1 Získanie celkového obsahu proteínov

Pre získanie celkového obsahu proteínov boli použité jednotlivé Petriho misky s bunkovými líniami LNCaP a DU145 ovplyvnené butyrátom sodným (NaB) (1mmol/l a 5mmol/l) a kombináciami NaB (1mmol/l a 5mmol/l) s 5–Aza–CdR (5μmol/l) po dobu 24, 48 a 96 hodín.



### Pracovný postup:

1. Na Petriho misku napipetovať 1ml 11x Formaldehyde Stock a inkubovať 30 minút pri 4°C;
2. Napipetovať 687,8µl glycínu o koncentrácii 2mmol/l temperovaného na izbovú teplotu, krúživým pohybom premiešať a nechať 5 minút pri izbovej teplote.
3. Médium odsať a Petriho misku umiestniť na ľad;
4. Na každú misku napipetovať 4ml 10xPBS puftru a prepipetovať do 15ml skúmaviek;
5. Na misky napipetovať 1ml ChIP puftru s inhibítormi proteáz a uložiť misky na ľad;
6. Všetky 15ml skúmavky scentrifugovať 15 minút pri 600g vo vychladenej centrifúge na 4°C;
7. Z každej skúmavky odpipetovať supernatant bez poškodenia peletu a do skúmavky napipetovať 4ml ChIP puftru;
8. Z Petriho misiek zoškrabať pomocou sterilnej plastovej stierky bunky na jedno miesto a preniesť do skúmavky s ChIP pufrom;
9. Skúmavky umiestniť na tanierový rotátor v chladovej miestnosti a pri 4°C nechať otáčať po dobu 10 minút pri 5 otáčok/min;
10. Skúmavky opäť scentrifugovať: 600g/15min./4°C;
11. Odsať supernatant a následne pridať 8ml premývacieho puftru;
12. Skúmavky umiestniť na tanierový rotátor v chladovej miestnosti a pri 4°C nechať otáčať po dobu 10 minút pri 8 otáčok/min;
13. Skúmavky opäť scentrifugovať: 600g/15min./4°C;
14. Odsať supernatant, pelet resuspendovať v 140µl puftru RIPA a napipetovať do mikroskúmavky;
15. Vzorky zvortexovať, umiestniť na tanierový rotátor na dobu 30 minút a nechať otáčať pri 15 otáčok/min;
16. Vzorky uchovať pri -80°C.

#### **4.2.2 Sonikácia bunkových lyzátov**

Sonikácia bunkových lyzátov bola vykonaná na sonikátore UP200S (Hielscher Ultrasound technology) pri neprerušovanom cykle 1. Najprv boli vzorky sonikované s účinnosťou 80% po dobu 20 sekúnd, následne boli vzorky uložené na 1 minútu do ľadu. Druhý cyklus pokračoval s účinnosťou 90% po dobu 20 sekúnd. Vzorky boli ponechané na 1 minútu v ľade. Tretí cyklus s účinnosťou 100% prebehol v prvom kole po dobu 20 sekúnd, v druhom kole po dobu 10 sekúnd.

Po sonikácii boli vzorky centrifugované pri 14 000rpm po dobu 15 minút vo vychladenej centrifúge na 4°C. Supernatanty boli prenesené do nových mikroskúmaviek a z nich bolo 50µl odobraných k stanoveniu koncentrácie proteínov. Vzorky boli uchované pri -80°C.

#### **4.2.3 Stanovenie koncentrácie proteínov metódou Bradfordovej**

Bola použitá 96 jamková mikrotitračná doska, na ktorú bola najprv napipetovaná kalibračná rada štandardu  $\gamma$  – globulinu v koncentrácii 1mg/ml. Štandard bol pipetovaný do 6 jamiek o objeme 1µl, 2µl, 3µl, 4µl, 5µl a 10µl a doplnený deionizovanou vodou do objemu 10µl. Vzorky boli nanášané v tripletoch. K 1µl deionizovanej vody bol pridaný 1µl vzorky a následne ku každej jamke bolo pridané 200µl činidla Bradfordovej. Do 3 prázdnych jamiek bolo pridané 200µl činidla Bradfordovej ako blank. Činidlo Bradfordovej bolo pripravené nasledujúcim postupom: do odmerného valca bolo napipetované dané množstvo činidla Bradfordovej a deionizovanej vody v pomere 1:4. Následne bola zmes prefiltrovaná cez filtračný papier do skúmavky Falcon so žltým uzáverom (pre objem 50 ml) v chladovej miestnosti bez prístupu svetla. Množstvo činidla Bradfordovej bolo určené postupom: 1ml činidla na vzorku + 1ml na „blank“ + 1,5ml na štandardy / 5 (5x koncentrovanejší roztok). Po napipetovaní nasledovala inkubácia 5 minút pri izbovej teplote a následne spektrofotometricky pomocou ELISA reader bola zmeraná absorbancia vzoriek. Z nameraných hodnôt bola vytvorená kalibračná krivka a vypočítané koncentrácie proteínov.

#### **4.2.4 Chromatin imunoprecipitačná analýza (ChIP) s použitím protilátok Anti-acetyl-histone H3 a Anti-acetyl-histone H4**

Do mikroskúmavky bolo napipetované vypočítané množstvo vzorky obsahujúcej 450µg proteínov a doplnené do 500µl ChIP pufrom s inhibítormi proteáz. Do mikroskúmaviek s jednotlivými ovplyvneniami bolo pridané buď 2µl Anti-acetyl-histone H3 protilátky (2µg) alebo Anti-acetyl-histone H4 protilátky (2µg), 2 µl IgG (2µg) bolo používané ako negatívna kontrola. Do nových skúmaviek bolo napipetované 100µl vzorky proteínového lyzátu - Input, ktoré slúžili ako pozitívna kontrola. Precipitácia proteínových vzoriek s danou protilátkou prebiehala cez noc na tanierovom rotátore pri 4°C a 5 otáčkach za minútu.

Pracovný postup:

1. Do každej mikroskúmavky napipetovať 40µl ssDNA (salmon sperm DNA) a nechať otáčať 1 hodinu na tanierovom rotátore pri 7 otáčok/min. v chladovej miestnosti pri 4°C;
2. Pripraviť pufr RIPA s Carrier salmon sperm DNA (na 1 vzorku: 10µl ssDNA salmon sperm + 990µl RIPA pufri);
3. Vzorky scentrifugovať po dobu 3 minút pri 3300g vo vychladenej centrifúge na 4°C;
4. Vzorky po celú dobu uchovávať v ľade. Odpipetovať supernatant a do každej mikroskúmavky napipetovať 1ml pufri RIPA s ssDNA, scentrifugovať pri 3300g/3min./4°C a tento postup opakovať s Low salt immune complex wash pufrom, High salt immune complex was pufrom a na záver opäť pufrom RIPA obsahujúci ssDNA. Po odpipetovaní supernatantu vzorky inkubovať pri izbovej teplote;
5. Do každej mikroskúmavky napipetovať 100µl čerstvo pripraveného elučného pufri;
6. Vzorky zvortexovať a po dobu 20 minút inkubovať v termobloku nastaveného na 65°C. Vzorky priebežne vortexovať;

7. Mikroskúmavky umiestniť na 10 minút na rotátor a nechať otáčať pri 15 otáčkach za minútu pri izbovej teplote;
8. Následne vzorky sцентрифugovať po dobu 2 minút pri 12 100g a pri izbovej teplote;
9. Supernatant prepipetovať do nových mikroskúmaviek a umiestniť na 6 hodín do termobloku nastaveného na 65°C;
10. Po 6 hodinách inkubácie pridať 1µl proteinázy K (200mg/ml) a inkubovať pri teplote 55°C na trepačke pri 50 otáčkach za minútu cez noc;
11. Izolovať DNA použitím kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) podľa doporučeného postupu.

### **4.3 Analýza DNA z chromatinových imunoprecipitátov**

#### **4.3.1 Amplifikácia DNA pomocou PCR**

Imunoprecipitovaná DNA bola amplifikovaná pomocou primerov špecifických pre DNA metyltransferázy DNMT1 a DNMT3a.

Pracovný postup:

1. Pred prácou vydezinfikovať pracovnú plochu a pipety. Pripraviť sterilné špičky, sterilné 0,2ml mikroskúmavky, stojan na mikroskúmavky, ľad. Z mrazáku (-20°C) vytiahnuť potrebné chemikálie, nechať rozmraziť a uchovávať v ľade;
2. Do popísaných 0,2ml mikroskúmaviek napipetovať sterilnú deionizovanú vodu, pufr špecifický pre danú PCR reakciu, roztok MgCl<sub>2</sub>, roztok nukleotidov a primery. Množstva jednotlivých komponent podľa použitých primerov sú uvedené v tabuľke č.III.
3. Pridať DyNAzyme Taq Polymerázu (pre DNMT1) alebo Phusion DNA polymeráza (pre DNMT3b). Vzorky aj chemikálie po celú dobu udržiavať v ľade.
4. Do jednotlivých mikroskúmaviek, s výnimkou negatívnej kontroly, pripipetovať daný objem DNA, ktorej množstvo v zmesi pre PCR zmesi by mala byť 50ng.
5. Následne mikroskúmavky uložiť do termocycleru s vyhriatym vekom a spustiť príslušný PCR program podľa použitého páru primerov (viz. Tabuľka č. IV a V).

**Tab. II:** Zloženie PCR zmesi u primerov DNMT1 a DNMT3b

	Zloženie PCR zmesi s DNMT1 primeru (μl)	Zloženie PCR zmesi s DNMT3b primeru (μl)
Forward primer o koncentrácii 25μmol/l	0,5	0,5
Reverse primer o koncentrácii 25μmol/l	0,5	0,5
Roztok dNTPs o koncentrácii X	0,5	0,8
10x PCR pufr s 15mmol/l MgCl <sub>2</sub>	2,5	-
5x Phusion GC pufr	-	5,0
MgCl <sub>2</sub> o koncentrácii 50mmol/l	0,5	1,5
DyNAzyme Taqpolymeráza	1	-
Phusion DNA polymeráza	-	0,5
Sterilná deionizovaná H <sub>2</sub> O	*	*
DNA	**	**

\*množstvo sterilnej deionizovanej vody do objemu 25 μl

\*\* množstvo DNA odpovedajúcej koncentrácii 50ng/μl

**Tab. III:** Špecifikácia použitých párov primerov

Primery	Sekvencia primerov	Veľkosť ampliconu
DNMT1	F: AGGGAAAAGGGAAGGGAAG R: AGAAAACACATCCAGGGTCCG	101bp
DNMT3B	F: CCTGCTGAATTACTCACGCCCC R: TTTTCCTGTGCACTACACAGAC	416bp

**Tab. IV:** Priebeh PCR reakcie pre primery DNMT1

Predenaturation	94°C	4min.	1x
Denaturation	94°C	45 sek.	35x
Annealing	61°C	45 sek.	
Elongation	72°C	1 min.	
Final extension	72°C	10 min.	1x

**Tab. V:** Priebeh PCR reakcie pre primery DNMT3b

Predenaturation	98°C	1min.	1x
Denaturation	98°C	10 sek.	35x
Annealing	64°C	30 sek.	
Elongation	72°C	40 sek.	
Final extension	72°C	10 min.	1x

#### 4.3.2 Vizualizácia amplifikovaných úsekov DNA

Na analýzu amplifikovaných úsekov DNA po PCR reakcii sa vykonáva elektroforetická separácia v agarózovom géle. Produkty sú vizualizované pomocou GelRed (Biotinum) farbiva a ich veľkosť je zrovnávaná pomocou markeru molekulových hmotností. Gél sa vyhodnocuje pomocou UV transiluminátoru a programu GeneSnap od spoločnosti SynGene.

Pracovný postup:

1. Do pripravenej vaničky vložiť hrebienok a umiestniť do nalievacej nádoby;
2. Odmerný valec naplniť do 40ml deionizovanou vodou a preliať do odmernej banky;
3. Na digitálnych váhach odvážiť 0,4g agarózy pre 1% agarózový gél (0,8g pre 2% gél, 1,2g pre 3% gél) a obsah vsypať do odmernej banky a krúživým pohybom obsah v banke premiešať;
4. Agarózový roztok priviesť k varu v mikrovlnnej trúbe, premiešať krúživým pohybom a opäť priviesť k varu;

5. Do roztoku agarózy pripipetovať 800 $\mu$ l 50x TAE pufru a 4 $\mu$ l GelRed (Biotinum) farbiva, premiešať krúživým pohybom a naliať do pripravenej elektroforetickej komôrky;
6. Gél nechať stuhnúť pri pokojovej teplote asi 20 minút;
7. Pripraviť 250ml elektroforetického pufru (5ml 50x TAE pufru, doplniť do 250ml deionizovanou vodou) a pridať 10 $\mu$ l GelRed (Biotinum) farbiva. Po stuhnutí gélu naliať pufr do komôrky, vytiahnuť opatrne hrebienok;
8. Najprv napipetovať marker molekulovej hmotnosti. Na parafilme pripraviť adekvátne množstvo PCR produktu a k nemu pripipetovať 1 $\mu$ l 6x LoadingDye a vzorku naniest' do jamky;
9. Po napipetovaní všetkých vzoriek komôrku prikryť vekom, pripojiť k zdroju napätia, nastaviť napätie 60V a nechať vzorky separovať 60minút;
10. Gél odfotiť pomocou UV transiluminátoru a programu GeneSnap.

#### **4.4 Western blot analýza**

##### **4.4.1 Elektroforéza SDS-PAGE**

Na elektroforetickú separáciu vzoriek proteínov bola využitá vertikálna elektroforéza. Podľa tabuľky č.VI bol pripravený 10% deliaci a 8% zaostrovací gél.

Pracovný postup:

1. Pripraviť 10% deliaci a 8% zaostrovací gél podľa tabuľky č. VI;
2. Najprv naliať 10% deliaci gél medzi 1,5mm skla, prevrstviť butanolom a nechať 30 minút stuhnúť;
3. Po stuhnutí gél opláchnuť 1mol/l Tris-HCl (pH 6,8) a vysušiť filtračným papierom;
4. Naliať 8% zaostrovací gél a vložiť hrebienok;
5. Po stuhnutí gélu opatrne vytiahnuť hrebienky, prepláchnuť deionizovanou vodou a elektroforetickým pufrom;
6. Vložiť gél do elektroforetickej aparatúry a doplniť elektroforetickým pufrom;

7. Na základe zistených koncentrácií proteínov zistiť koľko  $\mu\text{l}$  vzorky je obsiahnutých v  $30\mu\text{g}$  proteínu. K tomuto objemu vzorky pripipetovať dané množstvo 1xLSB do objemu  $50\mu\text{l}$ . Pri nízkej koncentrácii proteínov použiť 4xLSB;
8. Pripraviť marker (Full range rainbow molecular weight marker):  $2\mu\text{l}$  markeru +  $38\mu\text{l}$  1xLSB a napipetovať do 1.jamky gélu;
9. Pripravené vzorky zahriať na  $100^{\circ}\text{C}/1\text{min.}$  v DryBlock, krátko scentrifugovať na stolnej centrifúge a napipetovať do danej jamky v géle;
10. ELFO separácia  $30\text{min.}/80\text{V}$  a potom  $60\text{min.}/100\text{V}$ .

**Tab. VI:** Zloženie 10% deliaceho a 8% zaostrovacieho polyakrylamidového gélu

Chemikálie	8% Zaostrovací gél [ml]	10% Deliaci gél [ml]
Deionizovaná voda	4,100	7,900
Akrylamid mix (29:1;30%)	1,000	6,700
1,5 mol/l Tris-HCl; pH 8,8	-	5,000
1 mol/l Tris-HCl; pH 6,8	0,750	-
10% SDS	0,060	0,200
10% APS	0,060	0,200
TEMED	0,006	0,008
Celkový objem	6,000	20,00

#### 4.4.2 Prenos proteínov na membránu

Po elektroforetickej separácii boli proteíny prenesené na membránu pomocou blotovacieho zariadenia.

Pracovný postup:

1. Z gélu po separácii oddeliť zaostrovací gél, oddeliť od skla, preniesť v transfer pufri na 15 minút na trepačku;
2. Nastrihať membrány, filtračné papiere a vložiť do transfer pufri na 5 minút na trepačku;



3. Blotovacie zariadenie: navlhčiť transfer pufrom, položiť filtračný papier, zarovnať sklenenou tyčinkou, následne pokračovať s membránou, gélom a filtračným papierom na záver. Privrieť vekom;
4. Pripojiť k zdroju napätia 20V po dobu 40 minút.

#### 4.4.3 Detekcia proteínov

Pracovný postup:

1. Membrány premyť 5 minút vo farbiacom roztoku Ponceau S pri 80rpm;
2. Následne 3x premyť odfarbovacím roztokom (10% kyselina octová);
3. Na čistom skle vyrezať pomocou skalpelu úsek membrány, ktorý odpovedá podľa hmotnostného markeru molekulovej hmotnosti sledovaného proteínu;
4. Membrány na minimálne 1 hodinu premyť v blokujúcom pufre (Blocking Buffer) a následne premyť v premývacom pufre (Wash Buffer) 5 minút;
5. Primárnu protilátku aplikovať na úsek membrány o odpovedajúcej molekulovej hmotnosti proteínu: u HDAC3 králičia polyklonálna protilátka (riedenie 1:500), 48kDa; u HDAC2 králičia polyklonálna protilátka (1:2000), 55kDa; u AR monoklonálna myšia protilátka (1:200), 110kDa; GAPDH myšia monoklonálna protilátka (1:20 000), 37kDa;  $\alpha$ -tubulin myšia monoklonálna protilátka (1:2000), 55 kDa;
6. Membrány s aplikovanými primárnymi protilátkami inkubovať cez noc pri 4°C v chladovej miestnosti;
7. Po odpipetovaní primárnych protilátok premyť membrány v 1xTBS: 4x po dobu 10 minút;
8. Na membrány aplikovať sekundárne protilátky: u HDAC3 a HDAC2 anti-králičia protilátka (riedenie 1:5000), u AR,  $\alpha$ -tubulinu a GAPDH anti-myšia protilátka (riedenie 1:6000);
9. Premyť membrány v 1xTBS 4x po dobu 10 minút;
10. Vizualizovať značené proteíny aplikáciou substrátu Super signal west dura;
11. Zachytiť chemiluminiscenčný signál pomocou prístroja Li-Cor.

#### 4.5 Zoznam chemikálií

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
- 5-aza-2'-deoxycytidin (Sigma-Aldrich, Cat. No. A3656-10MG)
- Anti-Histon deacetyláza 2 králičia polyklonálna protilátka (Calbiochem)
- Anti-histon deacetyláza 3 králičia polyklonálna protilátka (Calbiochem)
- Acrylamide mix
- Agarose for electrophoresis (Serva, Cat. No. 1140405)
- Butanol
- Butyrát sodný (NaB) (Sigma-Aldrich, Cat. No. B5887-1G)
- Činidlo Bradfordovej (BioRad)
- Deionizovaná voda
- Deoxynukleotidy, 10 mmol/l (Sigma)
- Dimetylsulfoxid (DMSO), 100% roztok (Sigma-Aldrich)
- DMEM medium (Gibco)
- DyNAzyme<sup>TM</sup> EXT DNA polymerase (Thermo Scientific)
- Gamaglobulin (Bio-Rad)
- GelRed (Biotium)
- Hmotnostní standard Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences USA)
- Inhibitory proteáz Complete (Roche)
- Kyselina octová, 10%
- Laurylsulfát sodný
- LSB
- PBS
- Persulfát amónny
- Phusion High-Fidelity DNA polymerase (BioLabs)
- Ponceau S
- Primery (R a F) pre PCR – DNMT1, DNMT3b (Sigma)
- Protilátka AR(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Protilátka Anti-GAPDH (Sigma – Aldrich)

- Protilátka anti-králičia (CalBioChem)
- Protilátka anti-myšia (Santa Cruz Biotechnology)
- Roztok MgCl<sub>2</sub> 50 mmol/l (Finnzymes F-505S/L)
- QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN)
- Salmon Sperm DNA/Protein A agarose (Upstate Biotechnology, Temecula, USA)
- Super Signal West Dura (Thermo Scientific)
- Tetrametylendiamin
- Tris-HCl 1 mol/l, (pH 8,8)
- Tris-HCl 1,5 mol/l, (pH 6,8)
- Tween-20
- 50 bp DNA Ladder (BioLabs)

#### 4.6 Použité roztoky

##### 10x PBS pufr

- 160 g NaCl
- 4g KCl
- 64,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Rozpustiť v 2 l sterilnej deionizovanej vody a roztok ve sklenenej fľaši autoklávovať.
- Uchovávať pri izbovej teplote (25°C).

##### 11x Formaldehyde Stock

- 2 ml roztoku Hepes–KOH 0,5 mol/l, pH 8,0
- 40 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 100 µl roztoku EGTA 0,1 mol/l
- 2 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- 6286 µl 35% roztoku formaldehydu
- Do 20 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Pripravovať vždy čerstvý tesne pred použitím, udržiavať na ľade.

### **50x TAE pufr**

- 121 g Tris–base
- 28,6 ml ľadovej kyseliny octové
- 50 ml roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- Do 500 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať pri izbovej teplote (25°C) v sklenenej fľaši.

### **Butyrát sodný (NaB) – 10% roztok**

- 0,05505 g NaB
- rozpustiť v 1 ml 10% roztoku DMSO.
- Uchovávať v 1,5ml mikroskúmavke v mrazáku (–20°C).

### **Dezinfekční roztok**

- 3,5 l 96% ethanol (alkohol B)
- Doplniť do 5 l deionizovanou vodou.

### **Dimethylsulfoxid (DMSO) – 10% roztok**

- 1 ml 100% DMSO
- Doplniť do 10 ml sterilnou deionizovanou vodou.
- Pripravovať čerstvý alebo je možné uchovávať v plastovej skúmavke v mrazáku (–20°C).

### **Dithiothreitol (DTT) 1 mol/l – roztok**

- 0,7715 g DTT doplniť do 5 ml sterilnou deionizovanou vodou a behom rozpúšťania držať roztok na ľade.
- Do sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek rozpipetovať alikvóty po 0,5 ml a zamraziť (–20°C).

### **Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) 0,5 mol/l, pH 8,0 – roztok**

- 194,13 g EDTA

- Rozpustiť v 800 ml sterilnej deionizovanej vody a postupným pridávaním pevného NaOH upraviť pH na hodnotu 8,0. Hodnotu pH stanovovať pomocou laboratórneho pH metru.
- Po rozpustení EDTA doplniť roztok do 1 l sterilnou deionizovanou vodou a pH upraviť na hodnotu 8,0 pevným NaOH alebo 35% HCl.
- Roztok rozdeliť po 100 ml do sklenených fliaš, autoklávať a uchovávať v ľadničke (4°C) maximálne po dobu 1 roku.

#### **Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) 0,5 ml/l – roztok**

- 1,902 g EGTA
- Rozpustiť v 50 ml sterilnej deionizovanej vody a uchovávať v sklenenej fľaši v ľadničke (4°C).

#### **Elektroforetický pufr**

- 5 ml 50x TAE pufru
- Do 250 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.

#### **Elučný pufr**

- 50 µl roztoku Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- 2 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 100 µl 10% roztoku SDS
- 100 µl roztoku NaCl 1 mol/l
- Do 1 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Pripravovať vždy čerstvý tesne pred použitím.

#### **Ethidium bromid – 1% roztok**

- 100 mg ethidium bromidu
- 10 ml sterilní deionizované vody
- Uchovávať v lednici (4°C) ve skleněné láhvi obalené alobalom. Alikvóty v 1,5 ml mikrozskumavkách uchovávať také v lednici (4°C) a chrániť před světlem.

### **Glycin 2 mol/l – roztok**

- 7,507 g glycinu
- Rozpustiť v 50 ml sterilnej deionizovanej vody a sterilizovať filtráciou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši po dobu maximálne 3 mesiacov.

### **Hepes–KOH 0,5 mol/l, pH 8,0 – roztok**

- 29,7875 g Hepes
- Rozpustiť v 200 ml sterilnej deionizovanej vody, postupným pridávaním KOH upraviť pH na hodnotu 8,0. Hodnotu pH stanovovať pomocí laboratórneho pH metru.
- Doplniť do 250 ml sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v sklenenej fľaši pri izbovej teplote (25°C).

### **High salt immune wash complex (promývací) pufr**

- 1 ml roztok 10% SDS
- 1 ml Triton X–100
- 400 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 2 ml roztoku Tris–HCl 1 mol/l, pH 8,1
- 50 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- Do 100 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši.

### **Low salt immune wash complex (promývací) pufr**

- 1 ml 10% roztoku SDS
- 1 ml Triton X–100
- 400 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 2 ml roztoku Tris–HCl 1 mol/l, pH 8,1
- 15 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- Do 100 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši

### **ChIP dilution pufr**

- 100 µl 10% roztoku SDS
- 1,1 ml Triton X-100
- 240 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 1670 µl roztoku Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- 16,7 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- Do 100 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši

### **ChIP lyzačný pufr**

- 20 ml roztoku Hepes-KOH 0,5 mol/l, pH 8,0
- 400 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 1 ml roztoku EGTA 0,1 mol/l
- 28 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- 20 ml 100% glycerolu
- 1 ml Nonidet® P40
- 500 µl Triton X-100
- Do 20 ml doplniť sterilnú deionizovanou vodou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši

### **Chlorid sodný (NaCl) 1 mol/l – roztok**

- 14,61 g NaCl
- Doplniť do 250 ml sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v sklenenej fľaši pri izbovej teplote (25°C).

### **Chlorid sodný (NaCl) 5 mol/l – roztok**

- 73,05 g NaCl
- Doplniť do 250 ml sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v sklenenej fľaši pri izbovej teplote (25°C).

### **Premývací pufr**

- 1 ml roztoku Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- 200 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 500 µl roztoku EGTA 0,1 mol/l
- 20 µl roztoku NaCl 1 mol/l
- Do 100 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v ľadničke (4°C) v sklenenej fľaši.

### **Pufr RIPA**

- 500 µl 10% roztoku SDS
- 5 ml 1% roztoku deoxycholátu sodného
- 500 µl Triton X-100
- 7 ml roztoku NaCl 1 mol/l
- 250 µl roztoku EGTA 0,1 mol/l
- 100 µl roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 500 µl roztoku Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0
- Do 50 ml doplniť sterilnou deionizovanou vodou.
- Do skleneného odmerného valca napipetovať všetky komponenty v poradí ako sú uvedené, odmerný valec prelepiť parafilmom, niekoľkokrát prevrátiť, aby sa všetko premiešalo a roztok naliať do sklenenej fľaše.
- Nakoniec do fľaše vhodiť 1 tabletu koktejlu inhibítorov proteáz a nechať rozpustiť.
- Pufr uchovávať v mrazáku (-20°C).

### **Pufr RIPA s Carrier salmon sperm DNA**

- 990 µl RIPA pufru
- 10 µl Carrier salmon sperm DNA
- Pripravovať na ľade.

### **Laurylsíran sodný (SDS) – 10% roztok**

- 40 g SDS
- Rozpustiť v 400 ml sterilnej deionizovanej vody.



- Uchovávať v tmavej sklenenej fľaši so sklenenou zátkou pri izbovej teplote (25°C).

#### **Tris-HCl 1 mol/l, pH 8,0 resp. 8,1 – roztok**

- 30,275 g Tris-base
- Rozpustiť v 200 ml sterilnej deionizovanej vody, postupným prikvapávaním 35% HCl upraviť pH na hodnotu 8,0 resp. 8,1 (podľa potreby).
- Doplniť do 250 ml sterilnou deionizovanou vodou.
- Uchovávať v sklenenej fľaši pri izbovej teplote (25°C).

#### **Xylenová modř**

- 1 mg xylenové modři
- Rozpustiť v 1 ml sterilnej deionizovanej vody.
- Uchovávať v 1,5ml mikrozskumavce v chladničke (4°C).

### **4.7 Média pre prácu s bunkovými kultúrami**

#### **DMEM**

- 100 ml DMEM
- 1 ml 10% roztoku FBS
- 1 ml roztoku glutaminu o koncentrácii 2 mmol/l
- 1 ml roztoku antibiotík PenStrep
- Uchovávať v ľadničke (4°C).

#### **RPMI**

- 100 ml RPMI – 1640 with L – glutamin and 15 mmol/l HEPES without Sodium bicarbonate
- 1 ml 10% roztoku FBS
- 1 ml roztoku glutaminu o koncentrácii 2 mmol/l
- 1 ml roztoku antibiotík PenStrep
- 1 ml roztoku pyruvátu sodného o koncentrácii 100 mmol/l

- Uchovávať v ľadničke (4°C).

#### 4.8 Vybavení laboratoře

- 0,2ml a 1,5ml mikroskúmavky (Eppendorf)
- 96-jamková mikrotitračná doštička (TPP)
- Autokláv (Systec)
- Automatická pipeta Pipets<sup>®</sup> – akku (Hirschmann Laborgeräte)
- Blotovacie filtračné papiere
- Blotovacie membrány
- Blotovacie zariadenie Trans-blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)
- Centrifuga BR4i (Jouan)
- Centrifuga Minispin (Eppendorf)
- Centrifuga MR22i (Jouan)
- Centrifugačné skúmavky o objemu 15 ml a 50 ml (TPP)
- Digitálna laboratórna váha 440–33 (Kern)
- Elektroforetická komôrka MINI-SUB<sup>®</sup> Cell GT (Bio-Rad), skla 1,5mm, hrebene 10 zubov (Bio-Rad)
- Inkubátor CO<sub>2</sub> BB 16 (Heracel)
- Inverzný mikroskop Eclipse TS 1000 (Nikon)
- Kádinka o objemu 100 ml (Fischerbrand)
- Kónická odmerná banka o objemu 100 ml (Simax)
- Laminárny box AURA Vertical SD4 (Bioair instruments)
- Li-Cor Odyssey scanner (Biosciences)
- Mastercycler gradient (Eppendorf)
- Mikropipety 0,1µl – 5 ml (Eppendorf, Gilson, Finnpiquette)
- Nalievacie zariadenie pre prípravu elektroforetického gélu (Bio-Rad)
- Odmerné valce (Simax)
- Ochranné latexové rukavice (Sempermed)

- Parafilm (Pechinery Plastic Packagink)
- Petriho misky o priemere 100 mm (TPP)
- Plastové stierky – Cell Scrapers Cat. No. 70–1180 (Biologix Research Company)
- Rotátor RS – Multi (Boeco)
- Sklenená kapilára (TPP)
- Sonikátor UP200S (Hielscher Ultrasound technology)
- Spektrofotometer ND–1000 (Nanodrop)
- Spektrofotometer Power Wave XS (Bio–Tech)
- Sterilné 15ml skúmavky (Gama group)
- Sterilné jednorazové ihly 18G x 1 ½ " Luer–Lock (Chirana T. Injecta)
- Sterilný plastový pipetovací nástavec (TPP)
- Sterilné špičky (Eppendorf)
- Sterilné špičky s filtrem (Eppendorf, Gilson)
- Tanierový rotátor SB3 (Stuart)
- Termoblok (Grant instruments)
- Termocycler T personal (Biometra)
- Trepačka Miniature Shaker KM–2 (Edmund Bühler)
- UV transiluminátor G–Box (Syngene)
- Vortex Genie–2 (Scientific Industries)
- Vortex PV–1 (Grant–bio)
- Výrobník deionizovanej vody GenePure system (TKA)
- Výrobník ľadu F1000C (Icematic)
- Výveva membránová (Laboport<sup>®</sup>)
- Zdroj elektrického prúdu MP–2AP (Bio–consult)

## 5 VÝSLEDKY

Experimentálna časť diplomovej práce v sebe zahrňovala kultiváciu prostatických nádorových bunkových línií LNCaP a DU145, ich ovplyvnenie butyrátom sodným (koncentrácia 1mmol/l a 5mmol/l) a kombináciou butyrátu sodného (NaB, 1mmol/l a 5mmol/l) a 5-Aza-2'-deoxycydidinu (5-Aza-CdR, 5 $\mu$ mol/l) po dobu 24, 48 a 96 hodín. Získanie celkového proteínového lyzátu, následná chromatin imunoprecipitačná analýza s použitím protilátok Anti-acetyl-histone H3 a Anti-acetyl-histone H4, PCR analýza DNA izolovanej z imunoprecipitátov s použitím primerov špecifických pre DNA metyltransferázy (DNMT1 a DNMT3b). Taktiež bola detekovaná expresia histónových deacetyláz HDAC2 a HDAC3 u ovplyvnených bunkových línií.

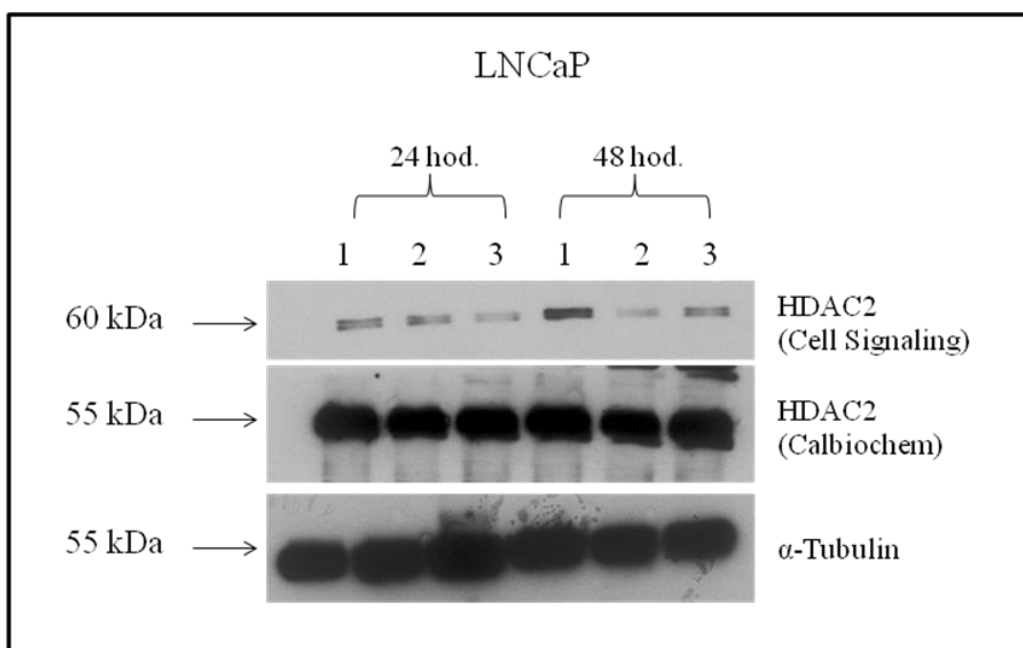
### 5.1 Proteinová analýza histónových deacetyláz

Pre získanie celkového obsahu proteínov bola vykonaná lyze buniek u bunkových línií LNCaP a DU145 neovplyvnených a u buniek týchto línií ovplyvnených NaB (1mmol/l a 5mmol/l koncentráciou) alebo kombináciou NaB (1mmol/l a 5mmol/l koncentráciou) a 5-Aza-CdR (5 $\mu$ mol/l). Získané proteíny boli podrobené nasledujúcej western blotovej analýze. Expresia proteínov HDAC2, HDAC3, AR a kontrolných  $\alpha$ -tubulinu a GAPDH bola detekovaná pomocou primárnych a sekundárnych protilátok.

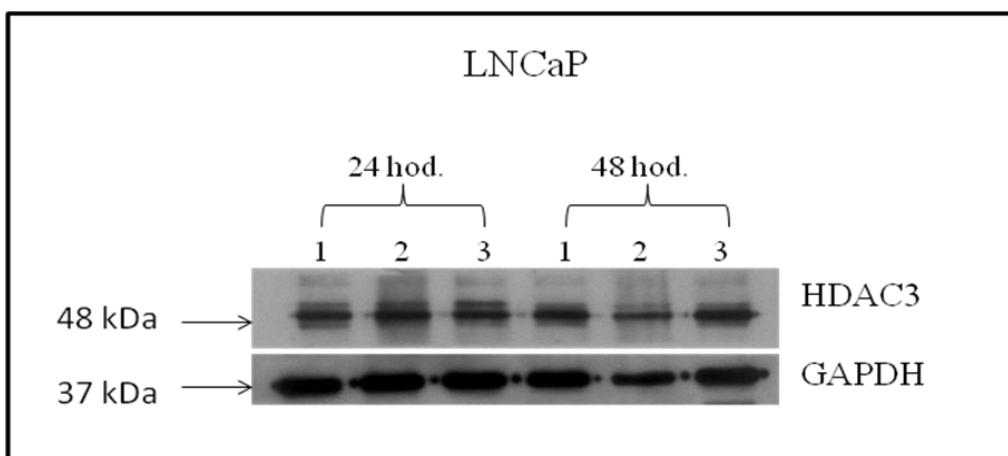
#### 5.1.1 Expresia HDAC2 a HDAC3 u prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení butyrátom sodným a jeho kombináciou s 5-aza-2'-deoxycydidinom

K zisteniu vplyvu inhibítorov histonových deacetyláz (NaB) a DNA metylácií (5-Aza-CdR) na expresiu histónových deacetyláz HDAC2 a HDAC3 u androgen-senzitívnej bunkovej línie LNCaP boli bunky ovplyvnené NaB (1 mmol/l a 5mmol/l) po dobu 24, 48 a 96 hodín a jeho kombináciou s 5-Aza-CdR (5 $\mu$ mol/l) po dobu 48 a 96 hodín. Ako negatívna kontrola boli použité bunky kultivované v médiu s DMSO

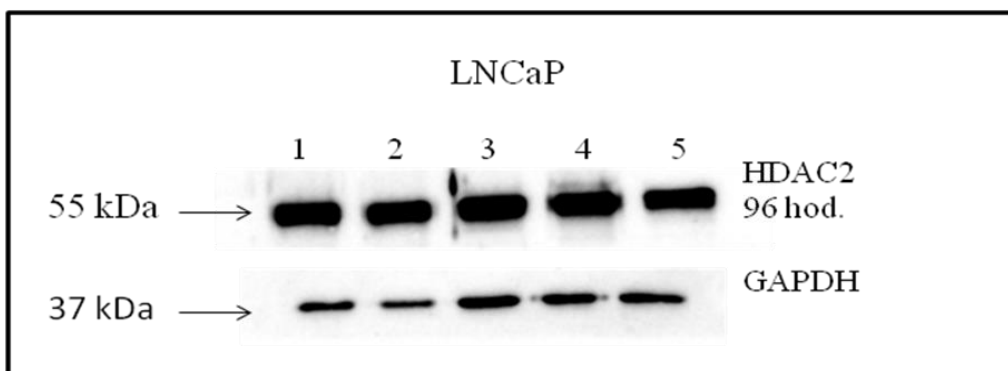
v koncentráciach, v ktorých boli inhibítory aplikované. Pre kontrolu, či boli nanesené rovnaké koncentrácie proteínu vo vzorke boli použité „housekeeping“ gény  $\alpha$ -tubulin a GAPDH. U prostatickej nádorovej bunkovej línie LNCaP bola detekovaná expresia HDAC2 a HDAC3 ako u kontrolných buniek, tak u buniek ovplyvnených NaB a kombináciou NaB + 5-Aza-CdR (**Obr.5,6,7,8**). Porovnaním dvoch HDAC2 protilátok od rôznych firiem sa protilátka od firmy Calbiochem ukázala ako citlivejšia a s touto protilátkou sa v práci pokračovalo.



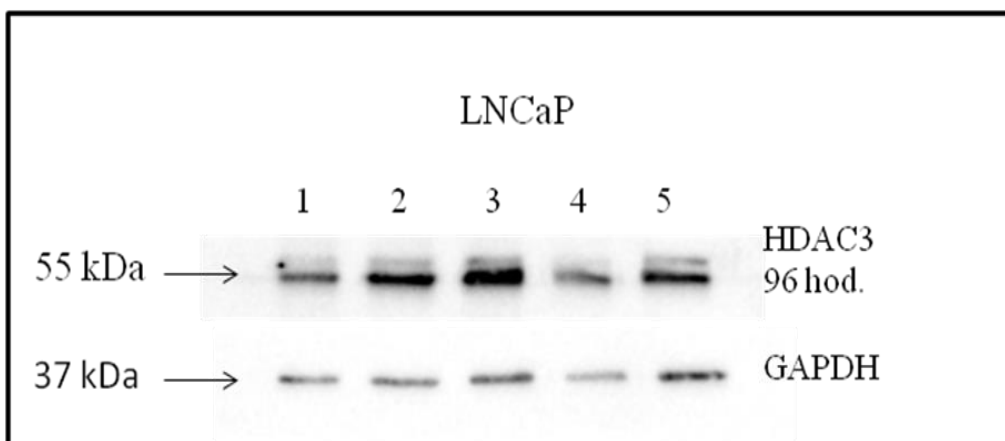
**Obr. 5:** Expresia HDAC2 s použitím protilátok od dvoch rôznych firiem (Cell Signaling a Calbiochem) u buniek prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB po dobu 24 a 48 hodín (vzorky č.1-3 typ ovplyvnenia: **č.1** – DMSO; **č.2** – 1mmol/l NaB; **č.3** – 5mmol/l NaB).



**Obr. 6:** Expresia HDAC3 u buniek prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB po dobu 24 a 48 hodín ( vzorky č.1-3 typ ovplyvnenia: č.1 – DMSO; č.2 – 1mmol/l NaB; č.3 – 5mmol/l NaB)



**Obr. 7 :** Expresia HDAC2 u buniek prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB a kombináciou 1mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR a 5mmol/NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR po 96 hodinách ( vzorky č.1-5 typ ovplyvnenia: č.1 – DMSO; č.2 – 1mmol/l NaB; č.3 – 5mmol/l NaB; č.4 – 1mmol/lNaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR; č.5 - 5mmol/lNaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR).

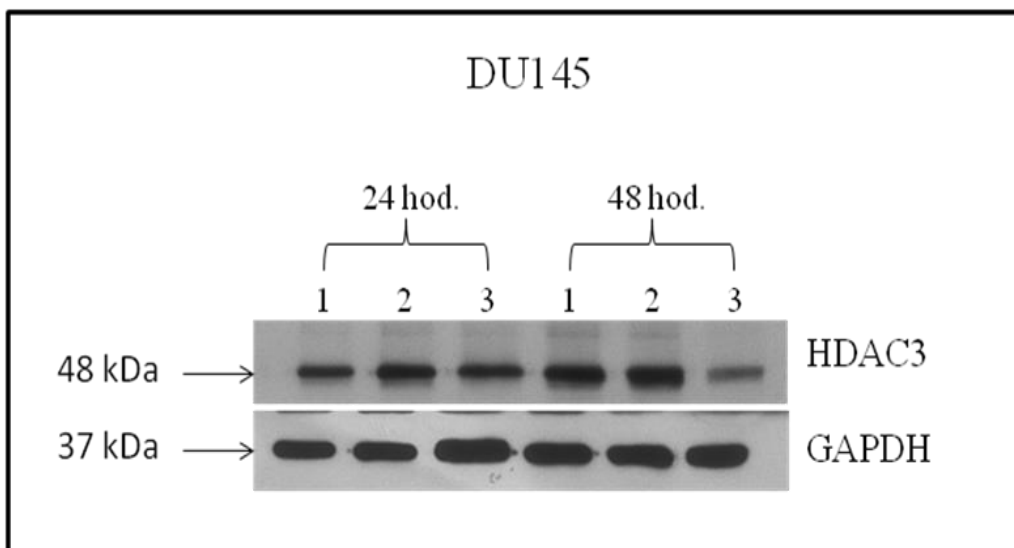


**Obr. 8:** Expresia HDAC3 u buniek prostatickej nádorovej línie LNCaP po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB a kombináciou 1mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR a 5mmol/l NaB + 5µmol/l Aza-CdR po 96 hodinách (vzorky č.1-5 typ ovplyvnenia: **č.1** – DMSO; **č.2** – 1mmol/l NaB; **č.3** – 5mmol/l NaB; **č.4** – 1mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR; **č.5** 5mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR).

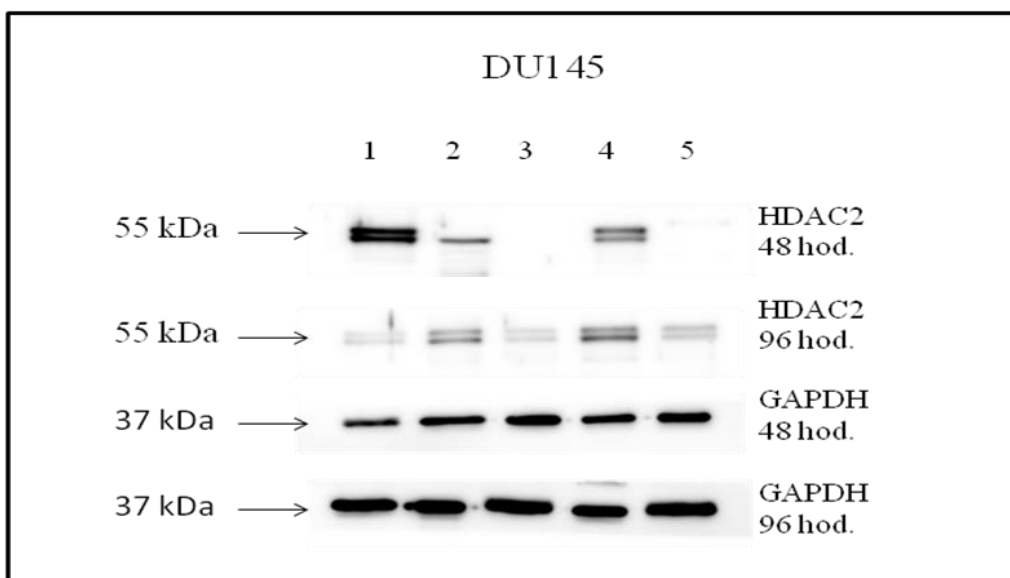
### 5.1.2 Expresia HDAC2 a HDAC3 u prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení butyrátom sodným a jeho kombináciou s 5-aza-2'-deoxycytidinom

K zisteniu vplyvu inhibítorov histonových deacetyláz (NaB) a DNA metylácií (5-Aza-CdR) na expresiu histonových deacetyláz HDAC2 a HDAC3 u androgen-senzitívnej bunkovej línie DU145 boli bunky ovplyvnené NaB (1 mmol/l a 5mmol/l) po dobu 24 , 48 a 96 hodín a jeho kombináciou s 5-Aza-CdR (5µmol/l) po dobu 48 a 96 hodín. Ako negatívna kontrola boli použité bunky kultivované v médiu s DMSO v koncentrácii odpovedajúcej koncentrácii u použitých inhibítorov. Pre kontrolu, či boli nanesené rovnaké koncentrácie proteínu vo vzorke bol použitý „housekeeping“ gén GAPDH. U prostatickej nádorovej línie DU145 bola detekovaná znížená expresia HDAC3 u 5mmol/l koncentrácie NaB po 48 hodinovom ovplyvnení (**Obr.9**). Expresia HDAC2 a HDAC3 bola znížená po 48 hodinovom ovplyvnení 5mmol/l NaB a kombinácii 5mmol/l NaB + 5µmol/l Aza-CdR (**Obr.10** a **Obr.11**). U 96 hodinového ovplyvnenia 5mmol/l NaB a kombinácii 5mmol/l NaB + 5µmol/l Aza-CdR sme detekovali pretrvávajúcu

zniženú expresiu HDAC2 (**Obr.10**), ale nie HDAC3 (**Obr.11**)v porovnaní s 48 hodinovým ovplyvnením.



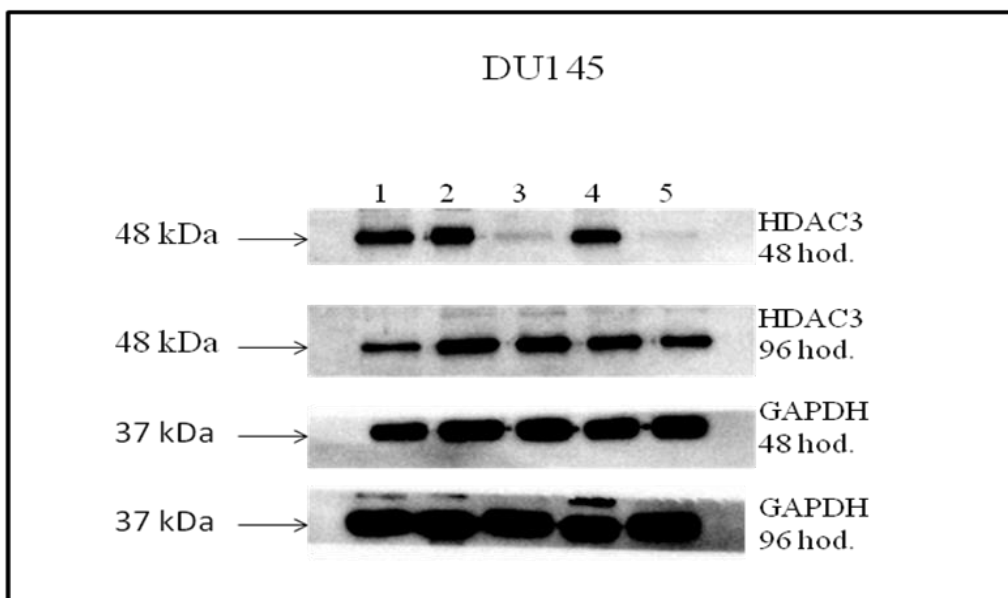
**Obr. 9:** Expresia HDAC3 u buniek prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB po dobu 24 a 48 hodín. (vzorky č.1-3 typ ovplyvnenia: **č.1** – DMSO; **č.2** – 1mmol/l NaB; **č.3** – 5mmol/l NaB).



**Obr. 10:** Expresia HDAC2 u buniek prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB a kombináciou 1mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR a



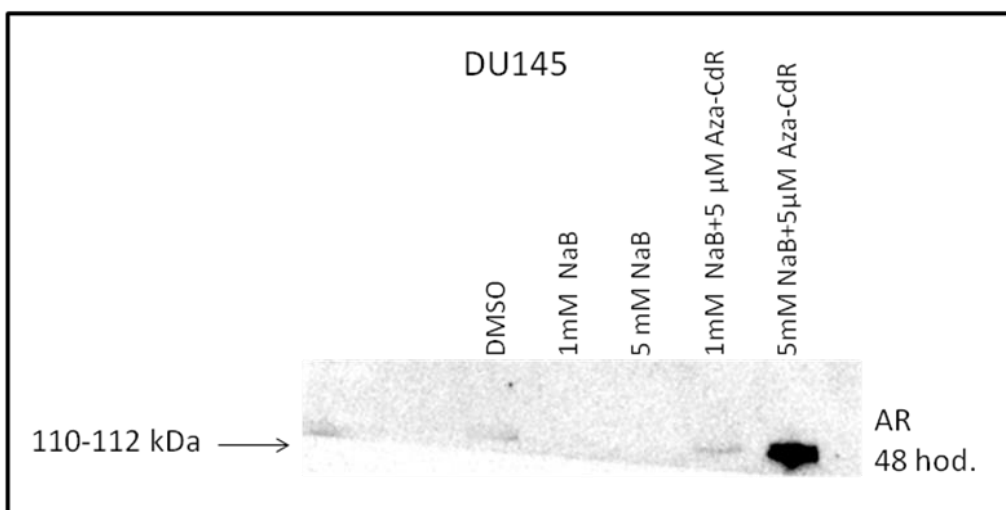
5mmol/NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR po 48 a 96 hodinách (vzorky č.1-5 typ ovplyvnenia: **č.1** – DMSO; **č.2** – 1mmol/l NaB; **č.3** – 5mmol/l NaB; **č.4** – 1mmol/lNaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR; **č.5** - 5mmol/lNaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR).



**Obr. 11:** Expresia HDAC3 u buniek prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení 1mmol/l NaB a 5mmol/l NaB a kombináciou 1mmol/l NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR a 5mmol/NaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR po 48 a 96 hodinách (vzorky č.1-5 typ ovplyvnenia: **č.1** – DMSO; **č.2** – 1mmol/l NaB; **č.3** – 5mmol/l NaB; **č.4** – 1mmol/lNaB + 5µmol/l Aza-CdR; **č.5** - 5mmol/lNaB + 5µmol/l 5-Aza-CdR)

### 5.1.3 Expresia androgénového receptoru (AR) u prostatickej nádorovej línie DU145

Androgénový receptor je exprimovaný u prostatickej bunkovej línie LNCaP, ktorá je citlivá k androgénom. U prostatickej bunkovej línie DU145, ktorá nie je citlivá k androgénom a neexprimuje androgénový receptor bola sledovaná expresia AR u kontrolných buniek a buniek ovplyvnených inhibítorom HDAC NaB a demetylačným činidlom 5-Aza-CdR. U kombinácie 5mmol/l NaB+ 5µmol/l Aza-CdR bola detekovaná expresia AR.

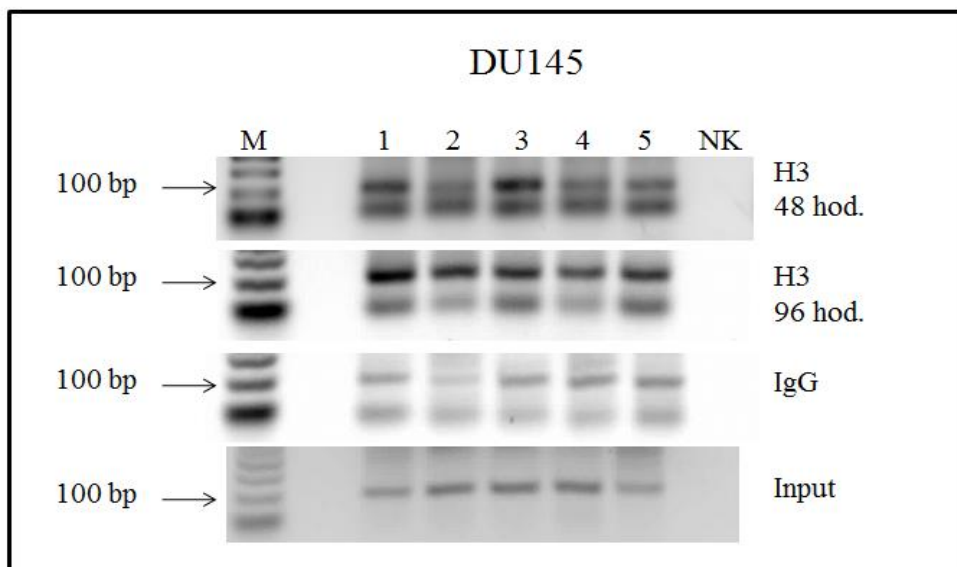


**Obr. 12:** Expresie AR u prostatickej nádorovej línie DU145 po ovplyvnení NaB (1mmol/l a 5mmol/l) alebo kombináciou NaB (1mmol/l a 5mmol/l) + 5-Aza-CdR (5 $\mu$ mol/l)

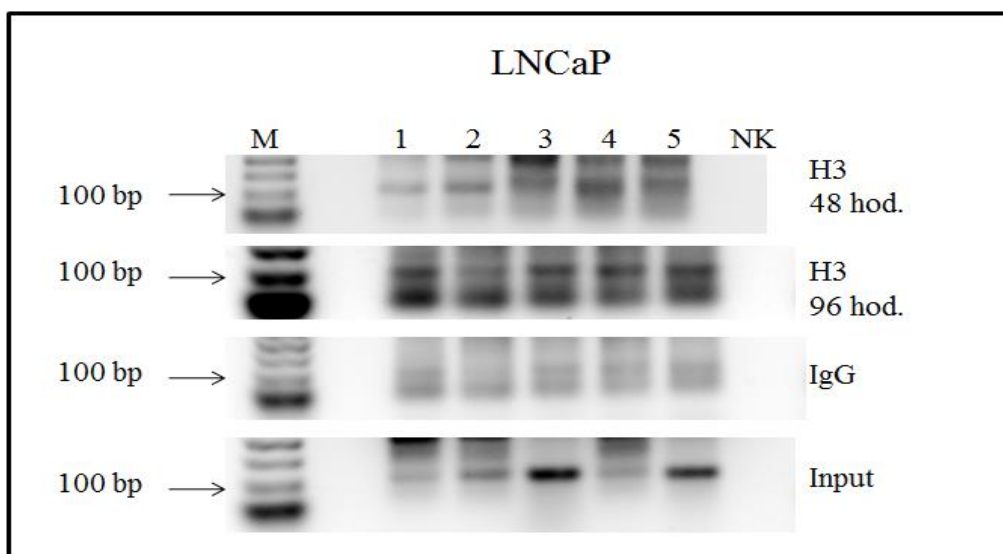
## 5.2 Konvenčná PCR amplifikácia produktov po chromatinovej imunoprecipitácii s protilátkami proti Acetyl-histone H3 a Acetyl-histone H4 s použitím primerov pre DNMT1

Chromatinové imunoprecipitáty boli pripravené z bunkovej línie DU145 a LNCaP za použitia protilátky Acetyl-histone H3 a Acetyl-histone H4. U proteínových lyzátov bola stanovená koncentrácia proteínov, ktorá bola následne využitá pri príprave imunoprecipitátov. DNA bola vyizolovaná pomocou QIAquick<sup>®</sup> PCR purification kit od firmy Qiagen. Pre PCR reakciu bola použitá koncentrácia DNA 50ng/ $\mu$ l. Je patrné, že u všetkých vzoriek po PCR amplifikácii došlo k vzniku požadovaného PCR produktu s rôznou intenzitou bandov u jednotlivých ovplyvnení. Ako pozitívna kontrola slúžil Input, tj. 100  $\mu$ l proteínového lyzátu bez použitej protilátky. Ako negatívna kontrola bol použitý imunoglobulin G (IgG), ktorý bol pridávaný do vzorky miesto príslušnej protilátky. Dráhy č.1-5 predstavujú jednotlivé typy ovplyvnenia (**Obr. 13,14,15**). U chromatinovej imunoprecipitácie s H3 protilátkou u bunkovej línie DU145 je patrná znížená expresia u 1mmol/l NaB a u oboch kombinácií 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l 5-Aza-CdR a 5mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l 5-Aza-CdR po 48 hodinovom ovplyvnení, zatiaľ čo

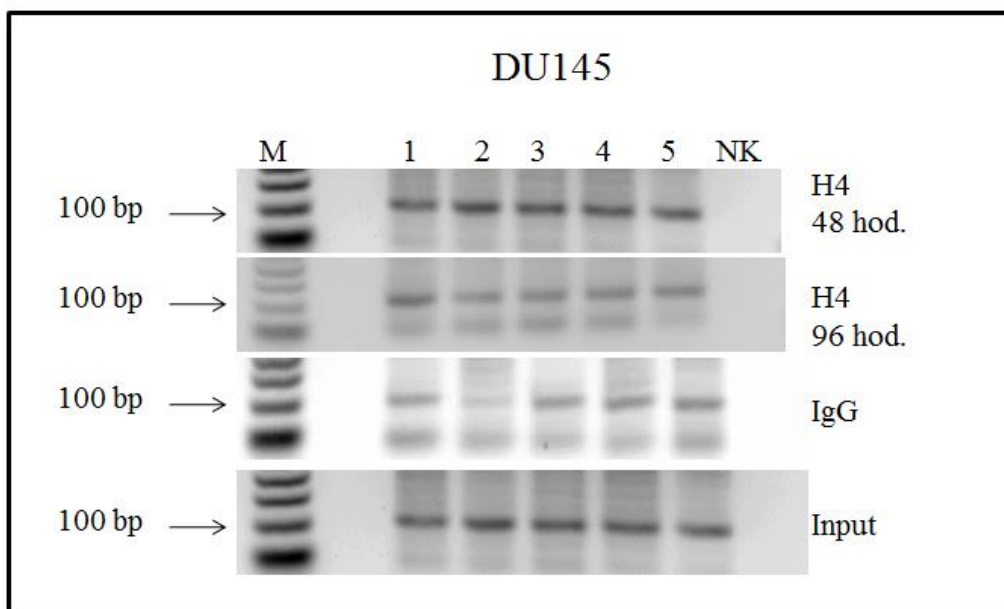
96 hodinové ovplyvnenie nejaví žiadne zmeny. Línia LNCaP nevykazuje žiadne zmeny po 48 a 96 hodinovom ovplyvnení (**Obr.14**). U ChIP s H4 protilátkou u bunkovej línie DU145 nie sú žiadne zmeny v expresii, u bunkovej línie LNCaP je zjavne zvýšená expresia u 5mmol/l NaB a u kombinácie 5mmol/l NaB a 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR u 96 hodinového ovplyvnenia.



**Obr. 13:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromatinových imunoprecipitátov prostatickej bunkovej línie DU145 s použitím DNMT1 primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **č.5** 5mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).

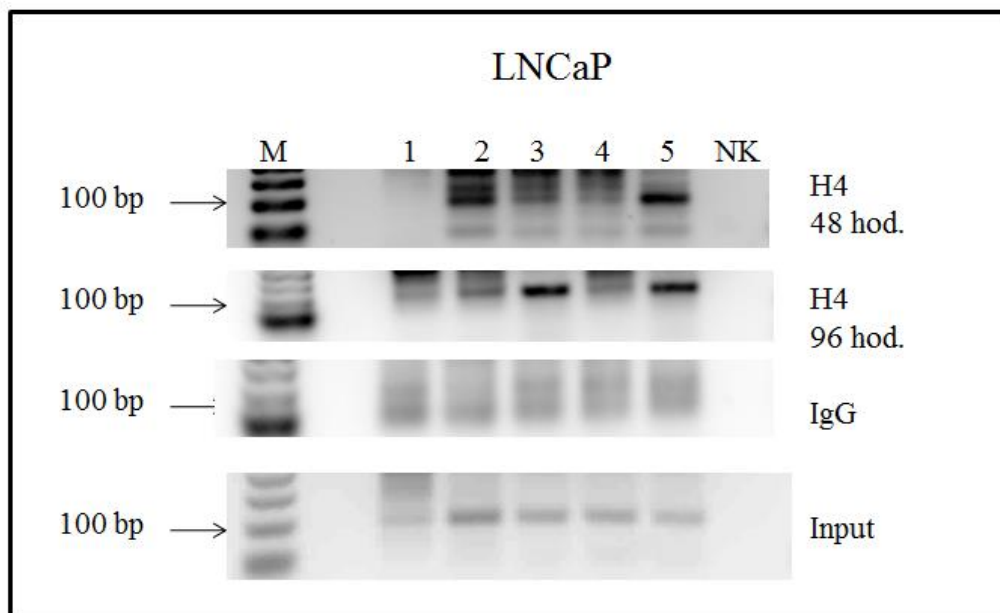


**Obr. 14:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromatinových imunoprecipátov prostatickej bunkovej línie LNCaP s použitím DNMT3b primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **č.5** 5mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).



**Obr. 15:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromatinových imunoprecipátov prostatickej bunkovej línie DU145 s použitím DNMT1 primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO,

č.2 1mmol/l 1 NaB, č.3 5mmol/l NaB, č.4 1mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, č.5 5mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).

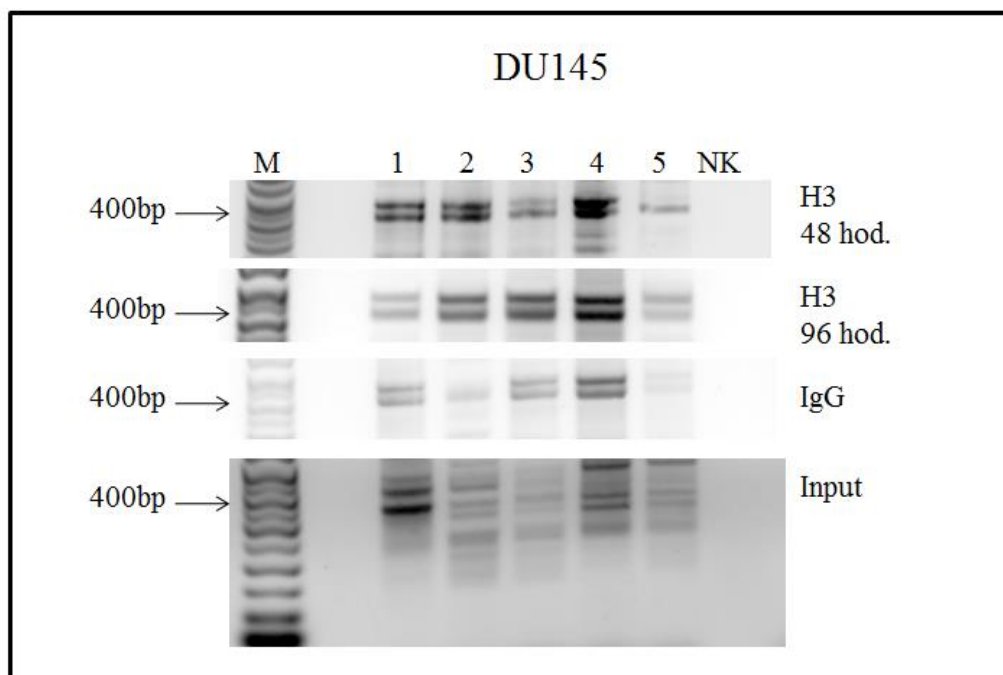


**Obr. 16:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromaťínových imunoprecipitátov prostatickej bunkovej línie LNCaP s použitím DNMT3b primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, **č.5** 5mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).

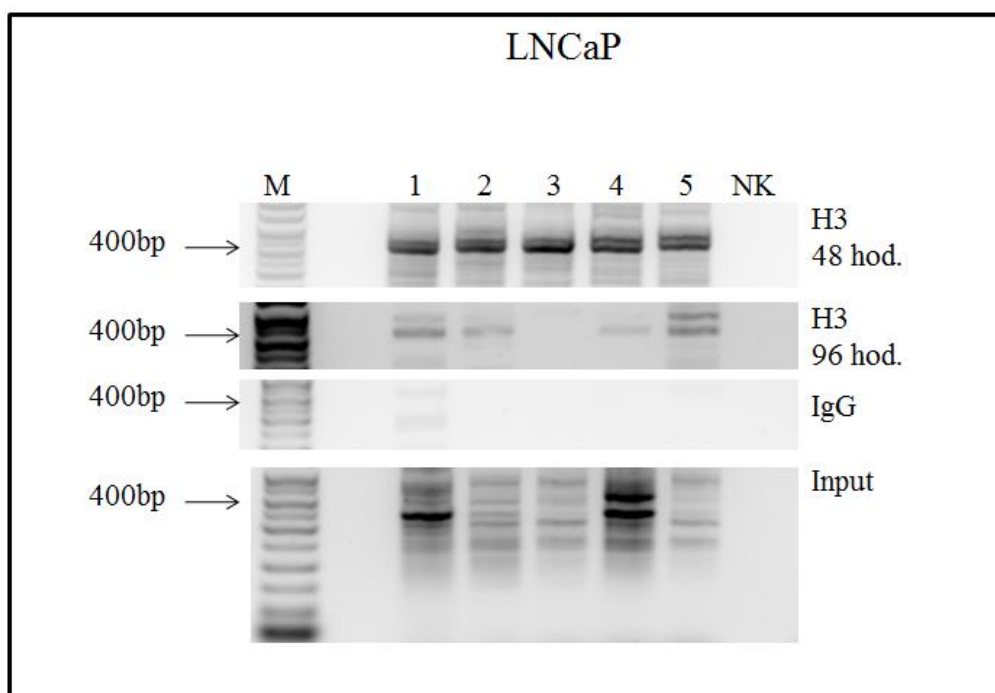
### 5.3 PCR amplifikácia produktov po chromaťínovej imunoprecipitácii s protilátkami proti acetyl-histone H3 a acetyl-histone H4 s použitím primerov pre DNMT3b

Chromaťínové imunoprecipitáty boli pripravené z bunkovej línie DU145 a LNCaP za použitia protilátky acetyl-histone H3 a acetyl-histone H4. Z pripravených bunkových lyzátov bola stanovená koncentrácia proteínov, ktorá bola následne využitá pri príprave imunoprecipitátov. DNA bola vyizolovaná pomocou QIAquick® PCR purification kit od

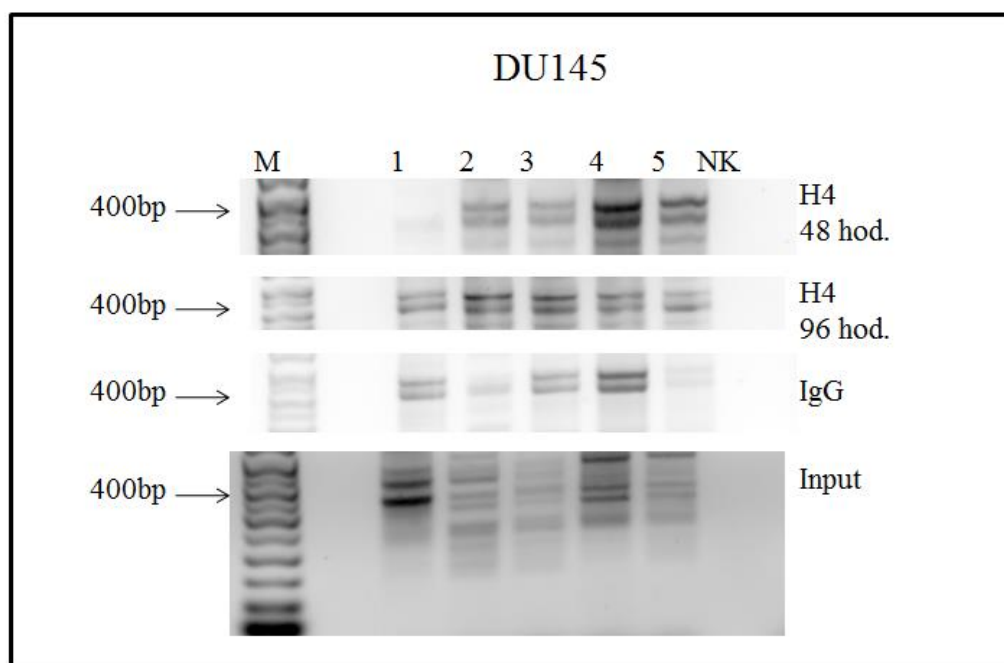
firmy Qiagen. Pre prácu bola použitá koncentrácia DNA 50ng/μl. Je patrné, že u všetkých vzoriek po PCR amplifikácii došlo k vzniku požadovaného PCR produktu s rôznou intenzitou bandov u jednotlivých ovplyvnení. Ako pozitívna kontrola slúžil input bez použitej protilátky. Ako negatívna kontrola bol použitý imunoglobulín G (IgG). Dráhy č.1-5 predstavujú jednotlivé typy ovplyvnenia. U chromatinovej imunoprecipitácie s H3 protilátkou u bunkovej línie DU145 je patrná znížená expresia u 1mmol/l NaB a u oboch kombinácii 1mmol/l NaB + 5μmol/l Aza-CdR a 5mmol/l NaB + 5μmol/l Aza-CdR po 48 i 96 hodinovom ovplyvnení. Tiež bunková línia LNCaP nevykazuje žiadne zmeny. U ChIP imunoprecipitácii s H4 protilátkou u bunkovej línie DU145 nie sú žiadne zmeny v expresii, u bunkovej línie LNCaP je zjavne znížená expresia u 5mmol/l NaB a u kombinácie 5mmol/l NaB a 5μmol/l Aza-CdR u 48 hodinového ovplyvnenia.



**Obr.17:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromatinových imunoprecipitátov prostatickej bunkovej línie DU145 s použitím DNMT3b primerov ( **M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, **č.5** 5 mmol/l NaB + 5μmol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).

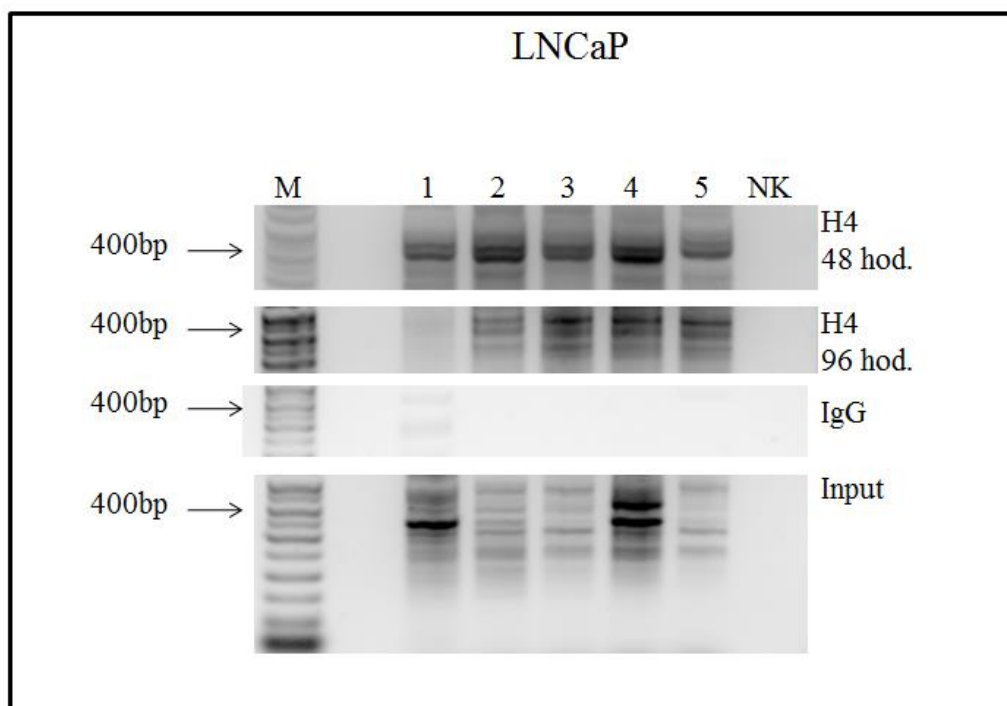


**Obr. 18:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromatinových imunoprecipátov prostatickej bunkovej línie LNCaP s použitím DNMT3b primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **č.5** 5 mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).



**Obr. 19:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromaťinových imunoprecipitátov prostatickej bunkovej línie DU145 s použitím DNMT3b primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **č.5** 5 mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).





**Obr. 20:** Elektroforetická separácia po PCR amplifikácii DNA izolovanej z chromaťínových imunoprecipitátov prostatickej bunkovej línie LNCaP s použitím DNMT3b primerov (**M** marker Step Ladder 50bp, vzorky č.1 – 5: **č.1** 0,1% DMSO, **č.2** 1mmol/l 1 NaB, **č.3** 5mmol/l NaB, **č.4** 1mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **č.5** 5mmol/l NaB + 5 $\mu$ mol/l Aza – CdR, **NK** negatívna kontrola).

## 6 DISKUSIA

Histónové deacetylázy hrajú dôležitú úlohu v génovej regulácii. Inhibítory histónových deacetyláz sú nové proti-rakovinové liečivá, ktoré navodia acetyláciu histónov a pôsobia proti odchýlnej génovej represii. (Buchwald *et al.*, 2009). Taktiež metylácia DNA má dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie. Cicavčie bunkové línie umlčujú gény pri výskyte metylácie promotorových sekvencií. Tieto umlčané gény môžu byť opäť aktivované vo vysokom výskyte použitím demetylačného činidla 5-aza-2'-deoxycytidinu (Holliday *et al.*, 2002). V tejto práci bol na ovplyvnenie prostatických bunkových línií LNCaP a DU145 použitý inhibítor histónových deacetyláz butyrát sodný a demetylačné činidlo 5-aza-2'-deoxycytidin. Pri sledovaní vplyvu týchto látok na expresiu HDAC2 a HDAC3 u prostatickej bunkovej línie LNCaP, ktorá je na androgénoch-závislá a exprimuje androgénový receptor, nebola detekovaná žiadna zmena v expresii v porovnaní s kontrolnými neovplyvnenými bunkami. Naproti tomu u prostatickej bunkovej línie DU145, ktorá je na androgénoch-nezávislá a v jej promotorovom úseku boli evidované abnormálne metylačné zmeny u hojne sa vyskytujúcich CpG ostrovčekoch (Jarrard *et al.*, 1998), sme zistili zmeny v expresii u oboch sledovaných histónových deacetyláz. Toto zistenie je v súlade s už predtým popísaným účinkom dvoch inhibítorov HDACs – NaB a Trichostatinu A (TSA) na expresiu HDAC2 a HDAC3 u štyroch prostatických nádorových línií (Trtkova *et al.*, 2010). Butyrát sodný a TSA nemali vplyv na zmenu expresie týchto dvoch histónových deacetyláz u inej na androgénoch-nezávislej prostatickej bunkovej línie C4-2. Autori vysvetľovali vymizenie expresie HDAC2 a HDAC3 u na androgenoch-nezávislej bunkovej línie DU145, ktorá nemá exprimovaný androgénový receptor, nemožnosťou vytvoriť komplex medzi AR/HDAC3 a korepresormi SMRT/N-CoR, ktorý tak chráni histónové deacetylázy pred účinkom použitých inhibítorov HDACs (Trtkova *et al.*, 2010). Tomuto vyslovenému predpokladu ale neodpovedá naša detekcia obnovenej expresie génu AR na proteínovej úrovni u buniek DU145 ovplyvnených kombináciou inhibítorov HDACs a DNA metylácie (5mmol/l NaB a 5µmol/l 5-Aza-CdR) (**Obr. 12**). Je známe, a ako je uvedené i v úvodných kapitolách tejto diplomovej práce, modifikácia chromatinu a DNA (metylácia DNA), majú vplyv na expresiu génov a môžu spôsobiť umlčanie (gene silencing) príslušných génov. Asociácia

medzi metyláciami DNA a hypoacetyláciami ako komplexne pôsobiacich epigenetických udalostí bola popísaná (Dobosy and Selker, 2001; Patra *et al.*, 2001) a ako komplexný epigenetický mechanizmus podmienený spoločným alebo vzájomne sa ovplyvňujúcim účinkom inhibítorov histónových deacetyláz a metylácií DNA by sme mohli vysvetliť i obnovenú expresiu androgénového receptora u buniek línie DU145, ktorá tak môže súvisieť alebo závisieť na inhibícii deacetylácie, prejavujúcej sa zníženou expresiou niektorých histónových deacetyláz (**Obr. 9, 10 a 11**).

Je známych 18 izoforiem histónových deacetyláz, ktoré môžeme rozdeliť do štyroch tried (Weichert, 2009). Prvá trieda HDACs (class I.) zahrňuje izoformy 1, 2, 3 a 8, ktoré sú tiež najlepšie charakterizovanými proteínmi. Izoformy 4, 5, 6, 7, 9 a 10 patria do II. triedy HDACs; nie príliš dobre je preštudovaná III. trieda HDACs a HDAC11. Pre histónové deacetylázy je charakteristický tzv. pleiotropný efekt. Teda tieto jednotlivé izoformy môžu mať rôzne prejavy svojho účinku. Zatiaľ čo expresia HDAC2 bola u línie DU145 znížená u NaB a kombinácii NaB s 5-Aza-CdR ako u 48 hodín, tak aj po 96 hodinovom ovplyvnení (**obr.10**), expresia HDAC3 bola znížená u týchto dvoch ovplyvnení len po 48 hodinách (**Obr. 11**).

DNA metyltransferáza 1 (DNMT1) zohráva dôležitú úlohu vo vývoji a je považovaná za enzým zodpovedný za udržiavanie jednotného metylačného stavu v genomickej DNA (Baylin and Jones, 2011). Naproti tomu DNA metyltransferáza 3b (DNMT3b) je zodpovedná za *de novo* metyláciu DNA a často býva aktivovaná v ľudských nádoroch. Aj napriek tomu, že sme vplyv použitých inhibítorov HDACs a DNMTs na expresiu DNMT1 a DNMT3b u acetylovaných H3 a H4 detekovali len konvenčnou PCR, zistili sme rozdiely v úrovniach expresie týchto dvoch DNA metyltransferáz medzi bunkami oboch použitých línií a tiež medzi oboma sledovanými DNA metyltransferázami. Zmeny v expresii DNMT1 a DNMT3b sú zrejmé po 48 hodinách ovplyvnenia a po 96 hodinách nie sú rozdiely tak patrné. Podobne ako u proteínovej expresie HDAC2 a HDAC3 sme zistili zmeny u na androgénch-nezávislej línie DU145. Tiež zmeny v génovej expresii DNMT1 a DNMT3b boli výraznejšie u imunoprecipitovanej DNA izolovanej z buniek tejto línie. Rovnako ako u expresie histónových deacetyláz aj u DNA metyltransferázy 3b bola znížená expresia pri ovplyvnení 5mmol/l NaB a kombinácii 5mmol/l NaB s 5µmol/l Aza-CdR u línie DU145. DNMT1 nevykazovala žiadne výrazné zmeny v expresii, čo môže byť podmienené jej konzervatívnou funkciou pri kopírovaní

metylácie po replikácii DNA. DNMT3b, ktorá sa podieľa na tvorbe nových metylačných vzorov (Baylin and Jones, 2011), ktoré môžu byť dôsledkom epigenetických modifikácií, tak zcela prirodzene citlivejšie reaguje na účinok použitých deacetylačných alebo metylačných inhibítorov. Pre potvrdenie zistených zmien v expresiach týchto dvoch DNA metyltransferáz je samozrejme nutné naviazať na konvenčnú PCR a podporiť ju kvantitatívnymi Real-Time PCR analýzami.

## 7 ZÁVER

V rámci tejto diplomovej práce bola sledovaná expresia vybraných histónových deacetyláz a DNA metyltransferáz u buniek dvoch prostatických nádorových línii, líšiacich sa citlivosťou k androgénom a expresiou génu androgénového receptoru, po ich ovplyvnení inhibítormi histónových deacetyláz a DNA metylácií. U línie LNCaP, ktorá exprimuje funkčný androgénový receptor neboli detekované zmeny v proteínovej expresii sledovaných histónových deacetyláz HDAC2 a HDAC3. U línie DU145, necitlivej k androgénom, bola detekovaná znížená expresia HDAC2 pri ovplyvnení 5mmol/l NaB a kombinácii 5mmol/l NaB s 5 $\mu$ mol/l Aza-CdR po 48 i 96 hodinovom ovplyvnení, zatiaľ čo znížená expresia HDAC3 bola detekovaná len u 48 hodinového ovplyvnenia. Zaujímavým zistením bola obnovená expresia génu AR na proteínovej úrovni u línie DU145 pri jej ovplyvnení kombináciou 5mmol/l NaB a 5 $\mu$ mol/l 5-Aza-CdR. Obnovená expresia AR u buniek tejto línie by mohla byť podmienená spoločným či vzájomne sa ovplyvňujúcim účinkom inhibítorov histónových deacetyláz a metylácií DNA.

Konvenčnou PCR analýzou bol detekovaný vplyv inhibítorov HDACs a DNMTs na expresiu DNMT1 a DNMT3b u acetylovaných histónov H3 a H4. Zmeny v expresii DNMT1 a DNMT3b sú zrejmé po 48 hodinách, avšak po 96 hodinách zmeny nie sú tak výrazné. Zmeny v expresii DNMT1 a DNMT3b boli výraznejšie u línie DU145, podobne ako u HDAC2 a HDAC3. Expresia DNMT3b bola podobne ako u zmien v proteínovej expresii sledovaných histónových deacetyláz výrazná u ovplyvnenia kombináciou 5mmol/l NaB s 5 $\mu$ mol/l 5-Aza-CdR. Expresia DNMT1 nevykazovala tak výrazné zmeny v expresii porovnaním s DNMT3b, ktorá ako *de novo* DNA metyltransferáza podieľajúca sa na tvorbe nových metylačných vzorov a môže citlivejšie reagovať na epigenetické zmeny vyvolané použitím deacetylačných a metylačných inhibítorov.

Naše výsledky naznačujú komplexnosť v pôsobení epigenetických mechanizmov. Pre potvrdenie výsledkov rôznej úrovne génovej expresie DNA metyltransferáz získaných konvenčnou PCR je nutné ich potvrdenie kvantitatívnymi Real-Time PCR analýzami.

## 8 LITERATÚRA

Albany C., Alva A.S., Aparicio A.M., Singal R., Yellapragada S., Sonpavde G., Hahn N.M. (2011): Epigenetics in prostate cancer. *Prostate Cancer* 2011: 580318.

Alimirah F., Chen J., Basrawala Z., Xin H., Choubey D. (2006): DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters* 580: 2294-2300

Baylin S.B., Jones P.A. (2011): A decade of exploring the cancer epigenome – biological a translational implications. *Nature Reviews Cancer* 11: 726-734.

Buchwald M., Krämer O.H., Heinzl T. (2009): HDACi – Targets beyond chromatin. *Cancer Letters* 280(2): 160-7.

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

Claessens F., Denayer S., Van Tiborgh N., Kerkhofs S., Helsen Ch., Haelens A. (2008): Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal*. 2008; 6: e008

Culig Z., Klocker H., Bartsch G., Hobisch A. (2002): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 9: 155-170.

Davie J.R. (2003): Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The journal of nutrition* 133(7 Suppl):2485S-2493S.

De Rijter A.J.M., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.P. (2003): Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370: 737-749

Dobosy J.R., Selker E.U. (2001): Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Science* 58: 721-727.

Gioeli D., Pachal B.M. (2011): Post-translational modification of the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 352: 70-78

Holliday R., Ho T. (2002): DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods* 27(2): 179-83.

Christman J.K. (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21: 5483-5495.

Jarrard D.F., Bova G.S., Ewing C.M., Pin S.S., Nguyen S.H., Baylin S.B., Cairns P., Sidransky D., Herman J.G., Isaacs W.B. (1997): Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 19(2):90-6.

Jüttermann R., Li E., Jaenich R. (1994): Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 11797–11801.

Kouzarides T. (2007): Chromatin modifications and their function. *Cells* 128: 693-705

Lonergan P.E., Tindall D.J. (2011): Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis* 10: 20

Muthná D., Řezáčová M., Stoklasová A., Vávrová J. (2009): Histone deacetylázy a jejich inhibitory. *Postgraduální medicína* 11. č.3

Pajak B., Orzechowski A., Gajkowska B. (2007): Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Advances in Medical Sciences* 52: 83-8

Patra S.K., Patra A., Zhao H., Dahiya R. (2002): DNA Methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Molecular carcinogenesis* 33: 163-171.

Patra S.K., Patra A., Dahiya R. (2001): Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287: 705-713.

Rice J.C., Allis C.D. (2001): Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 263-273

Santos-Rosa H., Caldas C. (2005): Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European Journal of Cancer* 41(16):2381-402.

Tilandyová P., Kajo K., Kliment J., Plank L., Lasabová Z. (2010): Detekcia hypermetylácie DNA jako potenciálny biomarker pre karcinóm prostaty. *Klin Onkol* 23(5): 293-299

Trtková K., Paskova L., Matijescikova N., Strnad M., Kolar Z. (2010): Binding of AR to SMRT/N-CoR complex and its co-operation with PSA promoter on prostate cancer cells treated with natural histone deacetylase inhibitor NaB. *Neoplasma* 57,5 : 406-14.

Velázquez O.C., Zhou D., Seto R.W., Jabbar A., Choi J., Lederer H.M., Rombeau J.L. (1996): In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2: 243 – 250

Wang L., Zou X., Beger A.D., Twiss Ch., Peng Y., Li Y., Chiu J., Guo H., Satagopan J., Wilton A., Gerald W., Bach R., Wang Z., Osman I., Lee P. (2009): Increased expression of



histone deacetylases (HDACs) and inhibition of prostate cancer growth and invasion by HDAC inhibitor SAHA. *Am J Transl Res* 1(1): 62–71.

Weichert W. (2009): HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Letters* 280: 168-179.

Welsbie D.S., Xu J., Chen Y., Borsu L., Scher H.I., Rosen N., Sawyers Ch.L. (2009): Histone Deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 69: (3)

## 9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5-Aza-CdR	5-Aza-2'-deoxycytidin
APS	peroxodisíran amónny
AR	androgénový receptor
AREs	androgen responsive elements
bp	pár bázi
CRPC	kastračne rezistentná rakovina prostaty
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DBD	DNA viazajúca doména
DHT	dihydrotestosterón
DMSO	dimethylsulfoxid
DNMT	DNA methyltransferáza
dNTPs	deoxynukleosid trifosfáty
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
HATs	histón acetyltrasnferázy
HDACi	HDAC inhibítory
HDACs	histón deacetylázy
ChIP	chromatínová imunoprecipitácia
K	lyzín
kDA	kiloDalton

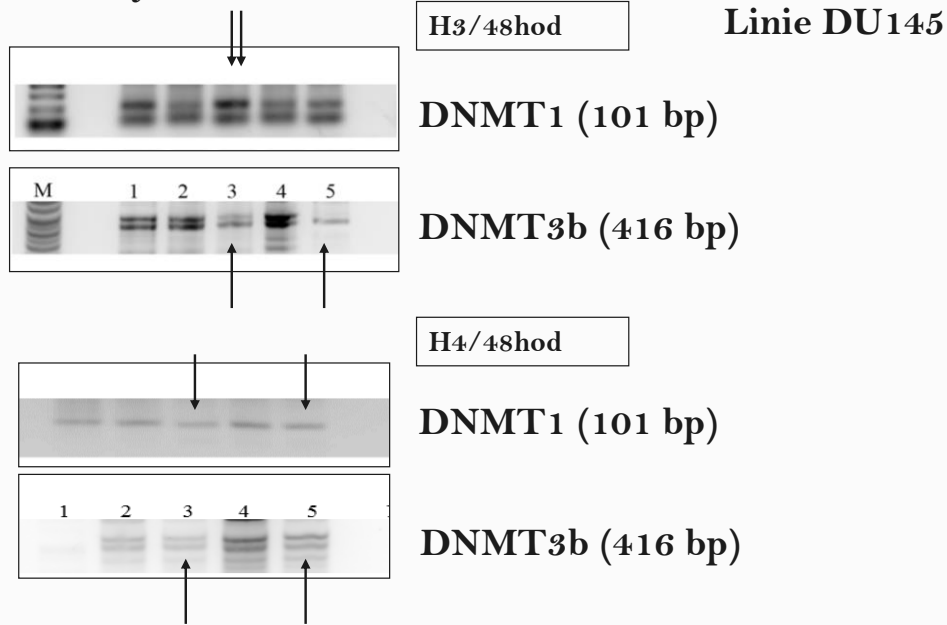
LBD	ligand viazajúca doména
NaB	butyrát sodný
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
NTD	N – terminálna doména
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PSA	prostatický špecifický antigén
S	serín
SDS	laurylsíran sodný
SDS – PAGE	SDS -polyakrylamidová gélová elektroforéza
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	trishydroxymethylaminomethan
TSA	trichostatin A
X <sub>q</sub>	dlhé rameno chromozómu X

## 10 PRÍLOHY

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP) s protilátkami:

Acetyl-Histone H3

Acetyl-Histone H4



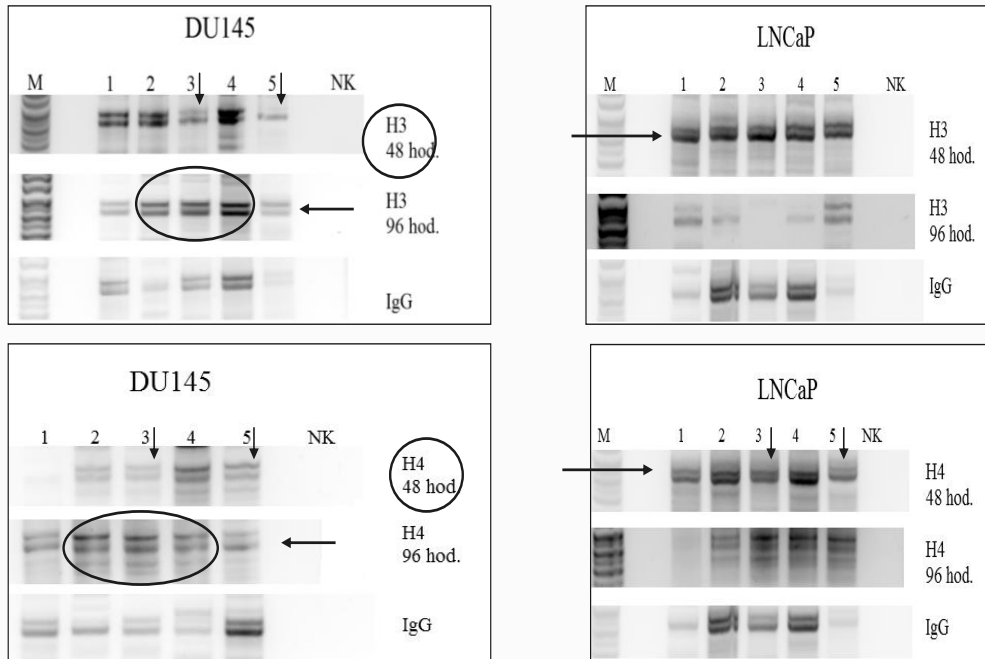
**Príloha č. 1:** Chromatinová imunoprecipácia po 48 hodinovom ovplyvnení buniek línie DU145 s protilátkami proti Acetyl-Histone H3 a Acetyl-Histone H4 s následnou konvenčnouPCR s primery špecifickými pro DNMT1 (produkt PCR o veľkosti 101 bp) a DNMT3b (produkt PCR o veľkosti 416 bp). (Konferencie XXVII. Brněnské onkologické dny, 18.-19.4.2013)

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP) s protilátkami:

Acetyl-Histone H3

Acetyl-Histone H4

DNMT3b (416 bp)



**Príloha č. 2:** Porovnanie výsledkov konvenčnej PCR s primery špecifickými pre DNMT3b a templátu DNA po chromatinovej imunoprecipitácii buniek línií DU145 a LNCaP ovplyvňovanými po dobu 48 a 96 hodín. (Konferencia XXVII. Brněnské onkologické dny, 18.-19.4.2013)