

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta



**Molekulární mechanismy rostlinných steroidů
a studium jejich interakce s jadernými receptory
u nádorových buněk**

Diplomová práce

Bc. Zlata Hušková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Zlata Hušková
Název práce	Molekulární mechanismy rostlinných steroidů a studium jejich interakce s jadernými receptory u nádorových buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Nádorová onemocnění jsou jedním z nejvýznamnějších problémů současnosti a i vzhledem k intenzivnímu výzkumu nemocných přibývá a léčba často není efektivní. Teoretická část této diplomové práce je věnována karcinomu prostaty, jaderným receptorům, buněčným dějům a poznatkům dosaženým v oblasti výzkumu brassinosteroidů (BRs), které vykazují protinádorové, antiangiogenní a antiproliferativní účinky a v budoucnu by se mohly stát slibnými protinádorovými léčivy. Experimentální část práce se zabývá účinky těchto BRs na nádorové buňky prostaty. Bylo zjištěno, že použité látky mají určitý vliv na viabilitu buněk, expresi jaderných receptorů, buněčný cyklus a apoptózu nádorových buněk a mohly by být využity jako slibný cíl pro další výzkumy.
Klíčová slova	karcinom prostaty, brassinosteroidy, jaderné receptory pro steroidní hormony, buněčný cyklus, apoptóza
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Zlata Hušková
Title of thesis	Molecular mechanisms of plant steroids and study of their nuclear receptor interactions in cancer cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology, Medical Faculty, Palacký University Olomouc
Supervisor	MSc. Jana Steigerová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	Nowadays cancer is one of the most serious problems and despite intensive research, number of patients increases and treatment is often not effective. The theoretical part of this thesis is devoted to prostate cancer, nuclear receptors, cellular processes and knowledge in brassinosteroids research. These agents have anti-tumor, anti-angiogenic and anti-proliferative effects and in the future could become promising anticancer drugs. The experimental part of the work deals with the effects of BRs on prostate cancer cells. It was found that the BRs have a certain effect on cell viability, the expression of nuclear receptors, cell cycle and apoptosis of tumor cells and could be used as a promising target for next research.
Keywords	prostate cancer, brassinosteroids, steroid hormone receptors, cell cycle, apoptosis
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Mgr. Jany Steigerové, Ph.D. s použitím citované literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

.....

Bc. Zlata Hušková

Za dokončení své diplomové práce bych chtěla touto cestou poděkovat všem lidem, kteří mají podíl na jejím úspěšném dokončení. Děkuji především vedoucí své diplomové práce, Mgr. Janě Steigerové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále také děkuji paní laborantce Janě Holinkové a Evě Pimrové za odbornou pomoc v laboratoři. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mě po celou dobu studií podporovali.

Obsah

1. CÍLE PRÁCE.....	8
2. ÚVOD.....	10
2.1 Karcinom prostaty.....	11
2.1.1 Vznik a molekulární podstata nemoci.....	13
2.1.2 Diagnostika a léčba.....	16
2.1.3 Prognostické nádorové markery u karcinomu prostaty.....	17
2.2 Jaderné receptory.....	19
2.2.1 Androgenový receptor.....	20
2.2.2 Estrogenový receptor.....	21
2.2.3 Progesteronový receptor.....	22
2.3 Buněčné děje u karcinomu prostaty.....	24
2.3.1 Buněčný cyklus.....	24
2.3.2 Apoptóza.....	27
2.4 Brassinosteroidy (BRs).....	30
3. MATERIÁL A METODY.....	34
3.1 Přístrojové vybavení.....	34
3.2 Testované látky.....	35
3.3 Použité protilátky.....	36
3.3.1 Primární protilátky.....	36
3.3.2 Sekundární protilátky.....	36
3.4 Kultivace buněk.....	37
3.5 Stanovení čistoty buněčných linií.....	38
3.6 Test buněčné viability.....	39
3.7 Kultivace buněčných sfér z přítomnosti testovaných látek.....	39
3.8 Průtoková cytometrie.....	40
3.9 Western blot analýza.....	40
3.9.1 Příprava vzorků a stanovení koncentrace proteinů.....	40
3.9.2 Elektroforetická separace proteinů.....	41
3.9.3 Blotování proteinů na membránu.....	42
3.9.4 Imunodetekce.....	42
3.10 Fluorescenční imunocytochemická detekce.....	42

3.11	TUNEL assay.....	43
3.12	Statistická analýza dat	43
4.	VÝSLEDKY	44
4.1	Stanovení čistoty buněčných linií	44
4.2	Účinek brassinosteroidů na prostatické buněčné linie	44
4.2.1	Vliv brassinosteroidů na buněčnou viabilitu	44
4.2.2	Vliv brassinosteroidů na buněčné sféry.....	48
4.2.3	Vliv brassinosteroidů na buněčný cyklus.....	49
4.2.4	Vliv brassinosteroidů na expresi receptorů pro steroidní hormony	52
4.2.5	Vliv brassinosteroidů na indukci apoptózy	60
5.	DISKUZE	64
6.	ZÁVĚR.....	70
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	71
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73

1. CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma Molekulární mechanismy rostlinných steroidů a studium jejich interakce s jadernými receptory u nádorových buněk.
- 2) Stanovení cytotoxického účinku (IC_{50}) přírodních brassinosteroidů u nádorových i nenádorových prostatických buněčných linií.
- 3) Charakterizace účinku látek na buněčný cyklus a genovou expresi buněk nádorů prostaty.

TEORETICKÁ ČÁST

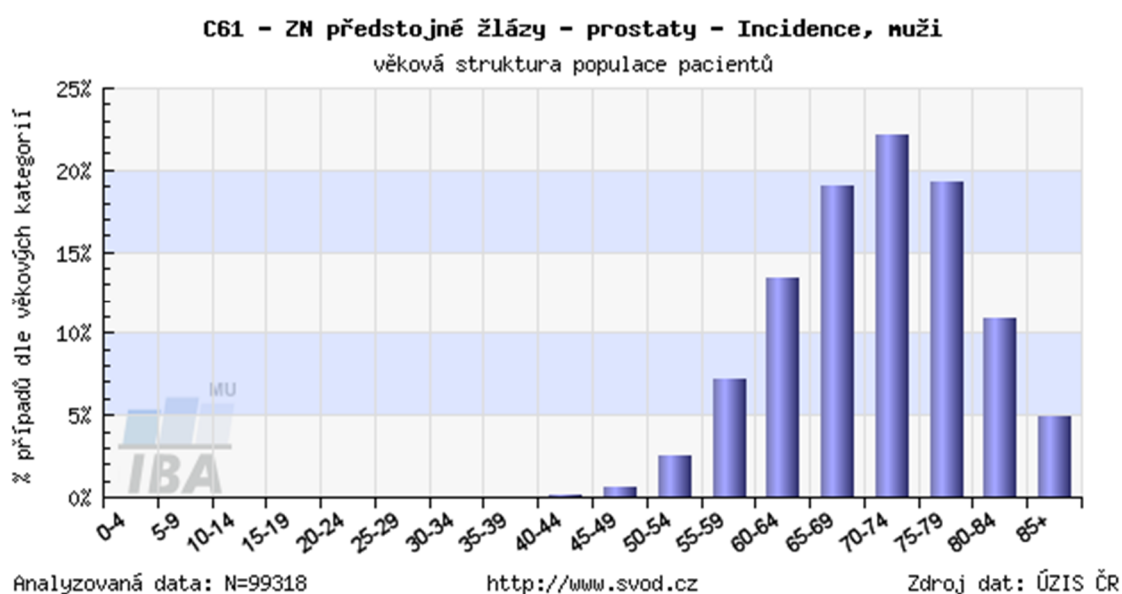
2. ÚVOD

Jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění a také jednou z nejčastějších příčin smrti mužů na rakovinu je karcinom prostaty. Toto onemocnění je často bezpříznakové a příčina jeho vzniku také není přesně známa, předpokládá se vliv životního prostředí, výživy nebo zánětu. Mezi nejčastější prognostické nádorové markery patří PSA, který je klinicky nejvýznamnější a používá se ke screeningu a včasné diagnóze, dále potom např. PSMA, p27^{kip1}, EGFR, Bcl-2 a další. Klasická léčba zahrnuje chirurgický zákrok, radioterapii nebo hormonální terapii. Léčba hormony blokuje účinek či tvorbu androgenů, což vede k navození programované buněčné smrti u androgen dependentních buněk. Receptory hormonů jsou častým terapeutickým cílem léčby a jejich zablokování může zpomalit progresi karcinomu.

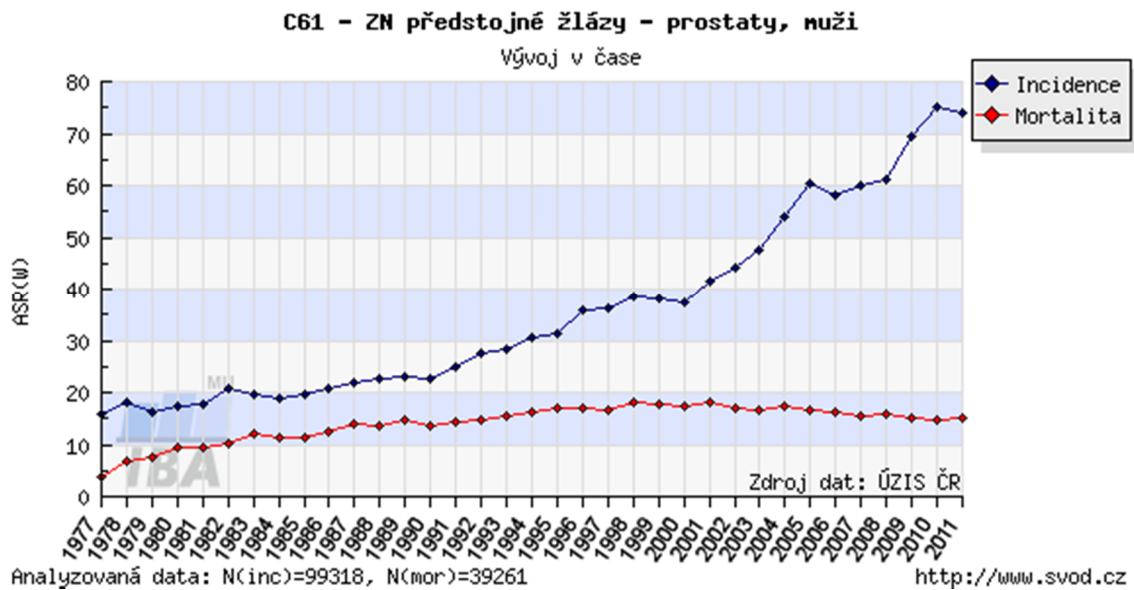
Brassinosteroidy jsou netoxické, negenotoxické a ekologicky šetrné rostlinné produkty, a proto mají široké využití v chemii, zemědělství, rostlinné fyziologii a farmakologii. Jedná se také o jednu ze skupin v současné době intenzivně studovaných látek s protinádorovým účinkem. Tyto fytohormony zastávají mnoho důležitých funkcí v rostlinách jako např. růst, buněčnou diferenciaci, prodlužování kořene a stonku atd. Bylo také zjištěno, že mají vliv na inhibici buněčného růstu, zástavu buněčného cyklu nebo zahájení apoptózy u mnoha lidských nádorových buněčných linií bez efektu na normální růst nenádorových buněk a také vykazují antiproliferativní aktivitu a antiangiogenní vlastnosti. Jedná se tedy o slibný cíl výzkumu pro léčbu karcinomu prostaty a tyto látky představují určitý potenciál do budoucna.

2.1 Karcinom prostaty

Toto onemocnění je jednou z nejčastěji se vyskytujících malignit a také třetí nejčastější příčinou úmrtí mužů na rakovinu po celém světě (Ferlay *et al.*, 2012). Přesná příčina onemocnění není jednoznačně známa. Vedle genetických predispozic se významně uplatňují environmentální podmínky, výživa a dietetické návyky, jejichž vlivu na rozvoj karcinomu je připisováno 30 – 40 %. Ačkoli tato nemoc převládá u mužů nad 65 let (Obr. 1), stále častěji je diagnostikována u mnohem mladších jedinců již okolo 40 let života. Přispívá k tomu hlavně včasná diagnóza a lepší screening prostatického specifického antigenu (PSA; Culig *et Bartsch*, 2006). Zatímco incidence onemocnění během let stále narůstá, mortalita zůstává na podobné úrovni již mnoho let s občasným mírným poklesem (Obr. 2). Pořadí České republiky ve srovnání incidence karcinomu prostaty s ostatními zeměmi je 27. místo na světě (ÚZIS ČR, www.svod.cz).



Obr. 1: Procentuální zastoupení věkových kategorií u mužů s karcinomem prostaty v České republice (převzato z ÚZIS ČR, www.svod.cz).



Obr. 2: Vývoj incidence a mortality karcinomu prostaty v čase od roku 1977 v České republice (převzato z ÚZIS ČR, www.svod.cz).

Z fyziologického hlediska je testosteron produkován Leydigovými buňkami ve varlatech a pozitivně působí na replikaci prostatických buněk. Produkci tohoto hormonu řídí osa hypotalamus-hypofýza-varlata pomocí hormonů lutropinu a folitropinu. Androgen v buňkách prostaty vzniká působením enzymu 5α -reduktázy na testosteron.

Epitel prostaty je tvořen dvěma základními typy buněk a to bazálními a luminálními. Buňky bazální mají vlastnosti kmenových buněk a nepodléhají stimulačnímu vlivu androgenů, zatímco buňky luminální mají velký počet androgenových receptorů a jejich činnost a přežití závisí na androgenech (Matoušková, 2006).

Prostata je histologicky rozdělena do tří hlavních oblastí – periferní, centrální a přechodná. Nejčastějším výskytem karcinomu je oblast periferní (68 %), méně potom přechodná (24 %) a centrální (8 %) oblast (McNeal *et al.*, 1988). Karcinom prostaty roste pomalu a potřebuje hodně času k zdvojnásobení své velikosti a z počátku je vnímavý vůči androgenní supresi.

2.1.1 Vznik a molekulární podstata nemoci

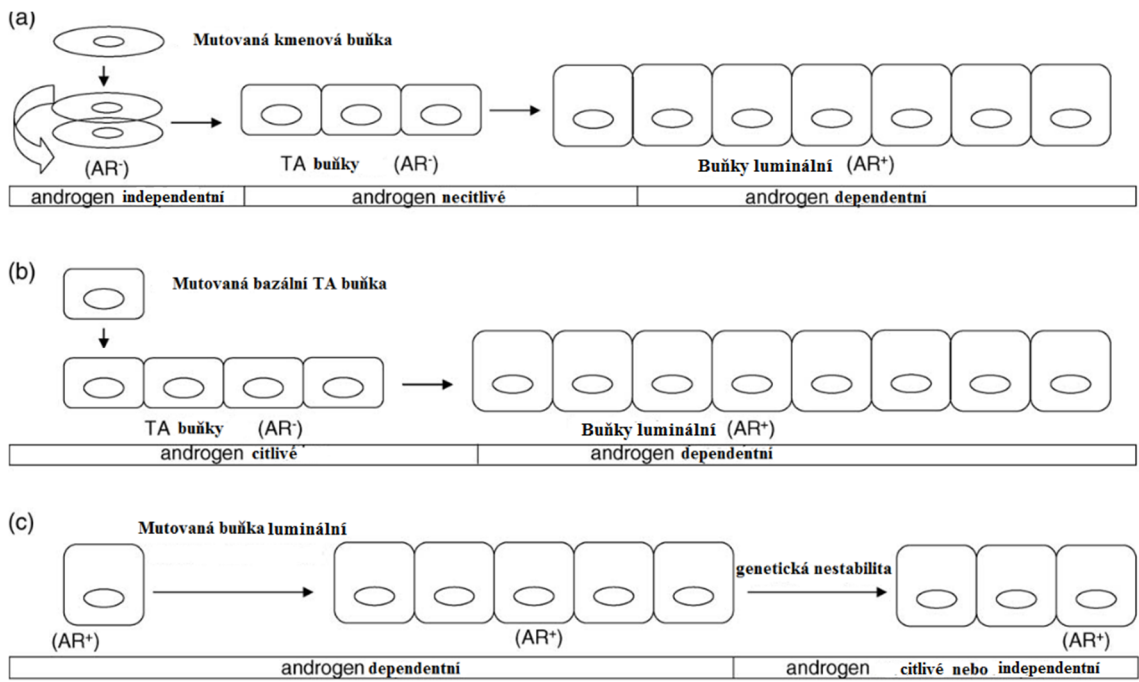
Molekulární patologie nádoru prostaty je komplexní, nejedná se pouze o geny zapojené do patogeneze, ale na rozvoji nemoci se účastní i jiné faktory, jako například vliv životního prostředí, výživa, zánět atd. Epidemiologicky lze karcinom prostaty rozdělit na dědičnou a sporadickou formu, z nichž druhá se vyskytuje častěji, ale na molekulární úrovni nelze tyto dvě skupiny rozlišit (Hughes *et al.*, 2005). Nádor prostaty je geneticky a fenotypově heterogenní a tato vlastnost může nastat v důsledku mutací v různých typech buněk (např. u bazálních kmenových buněk, luminálních buněk, apod.; Uzgare *et al.*, 2005).

Počátek rozvoje nádoru prostaty lze rozdělit na tři obecné mechanismy založené na organizaci různých typů buněk a jejich schopnosti reagovat na androgen. Prvním mechanismem (Obr. 3a) vznikají nádorové buňky z androgen negativních, bazálních kmenových buněk nezávislých na androgenu, tyto buňky získávají somatické genetické mutace jako následek jejich kontinuálního klonálního růstu.

Další možnou alternativou (Obr. 3b) nevznikají nádorové buňky z kmenových, ale androgen nezávislých tranzitně rozšířených (TA) buněk. Bez ohledu na to, zda jsou nádorové buňky odvozeny od kmenových nebo TA buněk, je klonální expanze a vyžívání ve většině maligního potomstva nakonec vyjádřena androgeny a poté se vyvíjí přes stádium androgen citlivé a nakonec androgen dependentní. Z toho důvodu má odstranění androgenů za následek ztrátu těchto androgen pozitivních podskupin androgen dependentních buněk, aniž by to vedlo k odumření buněk androgen negativních. Nízké cirkulující hladiny androgenu tak umožní nepřetržitou proliferaci těchto maligních buněk, což může vést k rezistenci na odstranění androgenu a rozvoji tzv. hormonálně rezistentního stavu.

Třetí mechanismus (Obr. 3c) se také může uplatnit při rozvoji mnoha stavů hormonální rezistence, kdy karcinom prostaty původně vzniká z androgen pozitivních, androgen dependentních luminálních buněk. Takový typ nádoru by se nejdříve skládal z homogenní populace androgen dependentních nádorových buněk, která by se teoreticky mohla léčit odstraněním androgenu. Nicméně v důsledku genetické nestability těchto buněk může jejich potomstvo ztratit svou závislost na androgenech a stát se buď citlivými, ale nezávislými nebo zcela nezávislými na androgenech. Díky tomu se tvoří heterogenní skupina složená z androgen dependentních, citlivých a nezávislých nádorových buněk uvnitř jednoho pacienta. Odstranění androgenů

vzhledem k této různorodosti indukuje první pozitivní klinickou odpověď způsobenou smrtí androgen dependentních buněk, ale nebude mít léčebný účinek na androgen citlivé a nezávislé nádorové buňky v důsledku pokračujícího růstu (jedná se o tzv. klonální selekci). Existuje mnoho popsaných mechanismů pro rozvoj hormonální rezistence karcinomu prostaty na základě buněčného původu (Uzgare *et al.*, 2005).



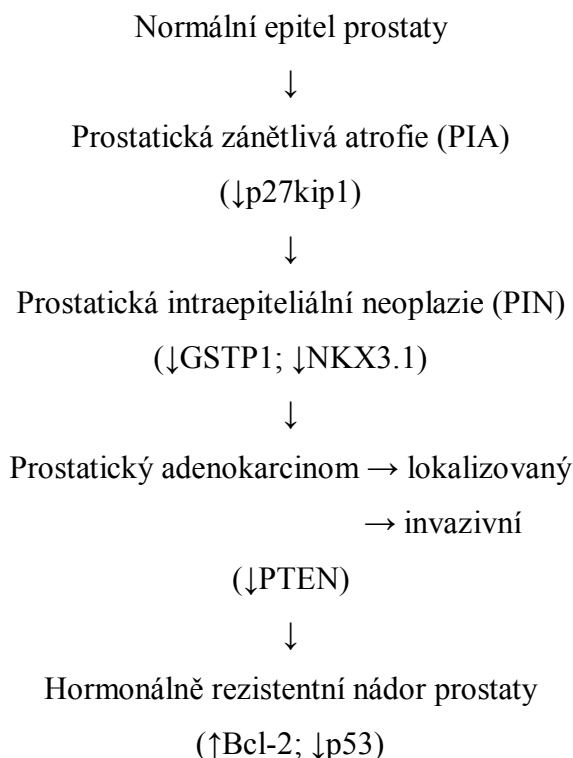
Obr. 3: Schéma tří možných mechanismů vzniku rakoviny prostaty. Somatické mutace vyvolávající nádory mohou nastat v **(a)** kmenové buňce, **(b)** TA buňce nebo **(c)** buňce luminální (převzato z Uzgare *et al.*, 2005).

Vzhledem k tomu, že léčba hormonální terapií vede v mnoha případech k získání nezávislosti na androgenech a růstu nádorových buněk i v nepřítomnosti androgenů, existují hypotézy, že nádorové buňky prostaty mohou být odvozeny také z kmenových buněk nebo TA buněk, které nejsou na přítomnosti androgenů závislé a hormonální terapie je tedy neovlivňuje (Taylor *et al.*, 2010; Zenzmaier *et al.*, 2008). Kmenové buňky se vyznačují třemi jedinečnými vlastnostmi – sebeobnovou, dormancí a pluripotencí. Základním znakem kmenových buněk je jejich schopnost dát vzniknout všem buněčným typům v rámci prostaty, buňkám bazálním, luminálním i neuroendokrinním. Prostředí (niche) kmenové buňky hraje během karcinogeneze důležitou roli. Během tohoto procesu ovlivňuje, zda se z aberantní kmenové buňky

stane buňka nádorová (Tu *et* Lin., 2012). Původ nádorových kmenových buněk není zcela jasný. Tyto buňky mohou vznikat během procesu stárnutí, kdy u kmenových buněk dochází k různým epigenetickým modifikacím a genetickým mutacím. Tyto změny mohou vést k deregulaci normálních buněčných procesů, zatímco fenotyp zajišťující sebeobnovu je udržován (Feinberg *et al.*, 2006). Jiná hypotéza popisuje vznik nádorových kmenových buněk z buněk nádorových v důsledku reaktivace určitých programů spojených se schopností jejich sebeobnovy (Kasper, 2008). Zdá se, že udržení nebo reaktivace schopnosti sebeobnovy buněk může být pro vznik a rozvoj nádorového onemocnění zásadní. Existence nádorových kmenových buněk prostaty byla prokázána v několika studiích. Epiteliální kmenové buňky prostaty jsou charakteristické vysokou expresí integrinu $\alpha 2\beta 1$ a expresí povrchové molekuly CD133 (Richardson *et al.*, 2004). Collins *et al.* (2005) vyzoloval ze vzorků nádorů prostaty málo početnou populaci buněk s tímto fenotypem. Tato subpopulace vykazovala větší schopnost tvorby kolonií *in vitro* a byla více invazivní. Další práce popisují populace nádorových buněk pozitivních na CD44 obohacené o buňky s vyšším proliferačním a metastatickým potenciálem a také vyšší klonogenitou (Patrawala *et al.*, 2006). Exprese CD44 korelovala s vysokou expresí integrinu $\alpha 2\beta 1$ a populace buněk s tímto fenotypem byla obohacena o buňky zapojené do iniciace tumoru, tedy o nádorové kmenové buňky (Patrawala *et al.*, 2007). Existence nádorových kmenových buněk je velmi zajímavou problematikou z hlediska studia vzniku, progresu a léčby nádorového onemocnění prostaty. Úlohu těchto buněk v souvislosti se vznikem a rozvojem nádorového onemocnění ukáže v budoucnu až další výzkum.

Vývoj nádoru prostaty je mnohastupňový proces vyžadující několik mutací pro zahájení, postup a rozvoj nádoru přes několik morfologicky definovaných stádií (Obr. 4). Prostatická zánětlivá atrofie (PIA) je prekurzorem prostatické intraepiteliální neoplazie (PIN) tvořící vysoce proliferační léze, které jsou viditelné v periferní oblasti, kde karcinom prostaty běžně vzniká. Vzhledem k tomu, že ložiska jsou spojena s chronickým zánětem, předpokládá se, že zánět spolu se stravovacími návyky a dědičnými faktory poškozují a ničí epiteliální buňky. PIA často sousedí s PIN lézemi nebo adenokarcinomy, které obsahují chromozomální abnormality podobně jako PIN a nádorové buňky prostaty (Nelson *et al.*, 2003). PIN je prekanceróza předcházející vznik karcinomu pravděpodobně o 15 - 20 let. Maligní buňky mohou migrovat z PIN lézí nebo adenokarcinomů a kolonizovat vzdálená místa, jako jsou kosti, lymfatické

uzliny, plíce nebo játra. Androgenová nezávislost nastane poté, když buňky z primární nebo metastatické tkáně již nepotřebují androgeny ke svému růstu (Uzgare *et al.*, 2005).



Obr. 4: Schéma vývoje nádoru prostaty se změnami v závislosti na hladině exprese genu/proteinu. Normální epitel prostaty se vyvíjí přes několik typů morfologických změn, kdy se vytvoří prostatická zánětlivá atrofie (PIA) a prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN) tvořící léze a poté se vyvíjí adenokarcinom (převzato z Uzgare *et al.*, 2005).

2.1.2 Diagnostika a léčba

Včasné odhalení a diagnóza jsou velmi důležité, protože v řadě případů je toto onemocnění asymptomatické, i když se u některých pacientů mohou vyskytovat močové problémy. Diagnóza využívá stanovení hladiny prostatického specifického antigenu (PSA), který je produkován zdravými i nádorovými buňkami prostaty a jako citlivý marker může jeho vysoká hladina poukazovat na výskyt karcinomu. Dále se potom provádí vyšetření *per rectum* a transrektální ultrasonografie s odběrem tkáně pro histologické vyšetření. Diagnóza se zejména opírá o karcinom prokázaný histologicky ve vzorcích získaných při operaci, ve vzorcích biopsie prostaty nebo vzorcích aspirační

cytologie prováděné jehlou. Histopatologické vyšetření také umožňuje určení grade tumoru. Mnohočetné systematické biopsie pod ultrazvukovou kontrolou umožňují detekci většího počtu karcinomů, než digitálně nebo ultrazvukem řízené biopsie podezřelých oblastí (Ellis *et al.*, 1994). Další možnosti diagnostiky jsou histoscanning, elastografie, nukleární magnetická rezonance a molekulární metody.

Klinicky lokalizované onemocnění může být léčeno pomocí chirurgického zákroku prostatektomií, radioterapií nebo hormonální terapií. Během léčby hormony je principem blokování účinku nebo tvorby androgenů, což má za následek navození programované buněčné smrti (apoptózy) u androgen dependentních buněk (Matoušková, 2006).

2.1.3 Prognostické nádorové markery u karcinomu prostaty

PSA (prostatický specifický antigen) je serinová proteáza, která je vysoce zvýšena u karcinomu prostaty a je secernována epiteliálními buňkami prostaty, není tedy specifická jen pro karcinom. V séru se PSA vyskytuje ve dvou formách, volné a vázané na alfa-1-antichymotrypsin nebo alfa-2-makroglobulin. Hraniční hodnota PSA byla stanovena 4 ng/ml. Laboratorně stanovitelný je PSA vázaný na alfa-1-antichymotrypsin a volný PSA. Jedná se v současnosti o klinicky nejvýznamnější nádorový marker karcinomu prostaty (Lukeš *et al.*, 2001).

PSMA (prostatický specifický membránový antigen) je glykoprotein o molekulové hmotnosti 100 kDa vázaný na membránu. V nadměrné míře se vyskytuje především v pokročilém stádiu karcinomu prostaty. PSMA byl identifikován jako transportér kyseliny listové a významně zlepšuje vstup této kyseliny do buněk exprimujících PSMA, které mají její nedostatek (Yao *et al.*, 2010).

Gen **p27^{kip1}** je důležitý tumor supresorový gen u karcinomu prostaty. Snížené koncentrace p27, inhibitoru cyklin dependentní kinázy kódované genem CDKN1B, se běžně vyskytují u rakoviny prostaty se špatnou prognózou. Somatická ztráta sekvencí DNA na 12p12-3, zahrnující CDKN1B, byla popsána ve 23 % lokalizovaných nádorů prostaty, 30 % metastáz v blízkých lymfatických uzlinách a 47 % vzdálených metastáz karcinomu prostaty (Kibel *et al.*, 2000). Redukovaná exprese p27^{kip1} se našla u 20- 84% nemocných s karcinomem prostaty (Cordon-Cardo *et al.*, 1995).

EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) je exprimován v normálním epitelu prostatických žláz i v hyperplastických žlázkách. Prokázána byla jeho nadměrná

exprimace i v souvislosti s benigní hyperplazií prostaty a u nádorů prostaty (Kumar *et al.*, 1998).

Geny rodiny **Bcl-2** se běžně vyskytují v primárním a metastatickém karcinomu prostaty. Proteiny této rodiny hrají zásadní roli v regulaci apoptózy a Bcl-2 inhibuje programovanou buněčnou smrt. Bcl-2 je rovněž zapojen do vývoje androgen nezávislého karcinomu prostaty díky své zvýšené expresi v pokročilém stádiu nemoci. Identifikace proteinu Bcl-2 byla u karcinomu prostaty procentuálně potvrzena skoro až v 70 % (Catz *et al.*, 2003).

Mutace genu **p53** jsou běžné u lidských nádorů, ale existuje pouze nízká frekvence mutace tohoto genu u karcinomu prostaty. Hraje však důležitou roli při vývoji nádoru, protože abnormální exprese p53 je spojena s metastázami kostí a vývojem androgen nezávislých chorob. Abnormální exprese p53 koreluje s vysokým histologickým stupněm a progresí klinického onemocnění. Produkt nádorového supresorového genu p53 omezuje vstup buňky do S fáze buněčného cyklu a podporuje apoptózu v buňkách, které jsou narušeny nebo mají poškozenou DNA. Ztráta normální funkce p53 vede k nekontrolovatelnému růstu buňky (Gao *et al.*, 1997).

Existují i další markery např. EZH2 (enhancer zeste homolog 2), RAS onkogen, MYC onkogen, CD44, metylace genu GSTP1, p21, E-Cadherin, α/β catenin, které jsou stále předmětem a zdrojem zkoumání pro predikci a prognózu karcinomu prostaty. Ačkoli v současné době pokračuje extenzivní výzkum dalších sérových markerů pro karcinom prostaty, doposud nebyl nalezen onkomarker s lepší specificitou a senzitivitou než PSA. Jinou oblastí výzkumu jsou markery detekovatelné v moči. Výhodou je snadný odběr vzorků, v nichž lze stanovit přítomnost buněk karcinomu či jimi secernovaných produktů. Mezi nejslibnější patří GSTP1, hTERT, TMPRSS2-ERG a další.

Ukázalo se, že gen **GSTP1** (glutathione-S transferáza 1) je jeden z nejdůležitějších tumor supresorových genů u karcinomu prostaty. GSTP1 může detoxikovat přírodní elektrofilní karcinogeny a oxidanty a také hrát roli hlídače genomu tím, že brání poškození oxidační a elektrofilní DNA. Bylo prokázáno, že GSTP1 je inaktivován hypermetylací promotorové oblasti u karcinomu prostaty. Jedná se o nejčastější epigenetickou změnu u tohoto onemocnění, která se vyskytuje již na počátku vývoje nemoci. Kvantifikace hypermetylace GSTP1 může přesně detekovat přítomnost karcinomu i v malém, omezeném vzorku tkáně. Jedná se o slibný

diagnostický marker, který by se mohl použít případně jako doplnění k biopsii tkáně jako součást screeningu (Harden *et al.*, 2003).

hTERT (lidská telomerázová reverzní transkriptáza) je katalytická podjednotka telomerázy, která společně s RNA podjednotkou tvoří RNA-dependentní DNA polymerázu, která je zodpovědná za stabilní telomery. Mezi více než stovkou známých markerů užívaných pro diagnostiku nádorů je telomeráza unikátní, protože její zvýšená aktivita byla prokázána u většiny typů nádorů včetně karcinomu prostaty (Jamaspishvili *et al.*, 2009).

TMPRSS2-ERG je nejčastější fúzní gen u karcinomu prostaty. Gen pro TMPRSS2 je lokalizován na chromozomu 21q22.3 a jde o transmembránovou serinovou proteázu. Nalezení této fúze u buněk je spojeno s horší prognózou. Tento gen je možno detekovat nejen v tkáních, ale také v buňkách uvolněných do moči po prostatické masáži (Tomlins *et al.*, 2008).

2.2 Jaderné receptory

Jaderné receptory tvoří rozsáhlou skupinu transkripčních faktorů, které se podílejí na řízení mnoha významných buněčných dějů a pochodů, např. buněčného růstu, diferenciaci, homeostázy buňky či buněčné smrti. Podle typu jejich ligandů jsou rozlišovány **(a)** jaderné receptory pro klasické endokrinní hormony (např. androgeny, estrogeny, gestageny, glukokortikoidy, tyreoidální hormony, vitamin D, apod.), **(b)** jaderné receptory uplatňující se v rámci lipidového metabolismu (receptory aktivované proliferátory peroxizomů, jaterní X receptory, apod.) a **(c)** jaderné „orphan“ tzv. sirotčí receptory, u kterých ligand není doposud znám (Privalsky, 2004).

Jaderné receptory jsou typické svou konzervativní strukturou. V N-terminální oblasti se nachází A/B doména, která obsahuje AF-1 oblast zodpovědnou za aktivaci, která je nezávislá na vazbě ligandu. Za touto doménou následuje C doména obsahující 2 zinkové prsty umožňující vazbu receptoru na DNA. Následuje D doména a na C-konci se nachází E/F doména obsahující AF-2 oblast, ke které se váže ligand (Simons *et al.*, 2014).

Transkripční aktivita jaderných receptorů je regulována pomocí kofaktorů, které mohou buď snížit (korepresory) nebo zvýšit (koaktivátory) aktivitu transkripčních faktorů (Gelman *et al.*, 2006). Korepresory ve spolupráci s enzymy, které posttranslačně upravují histonové konce, zprostředkovávají aktivní potlačení transkripce.

Např. korepresor jaderného receptoru (N-CoR) potlačuje aktivitu jaderných receptorů do doby navázání ligandu, vazba ligandu na receptor způsobí výměnu korepresoru za koaktivátor, což vede k transaktivaci receptoru (Jenuwein *et* Allis, 2001). Koaktivátory mohou fungovat různými způsoby, často jsou schopny enzymatické aktivity nezbytné pro změnu ve struktuře chromatinu, která vede k aktivní genové transkripci (Spiegelman *et* Heinrich, 2004).

2.2.1 Androgenový receptor

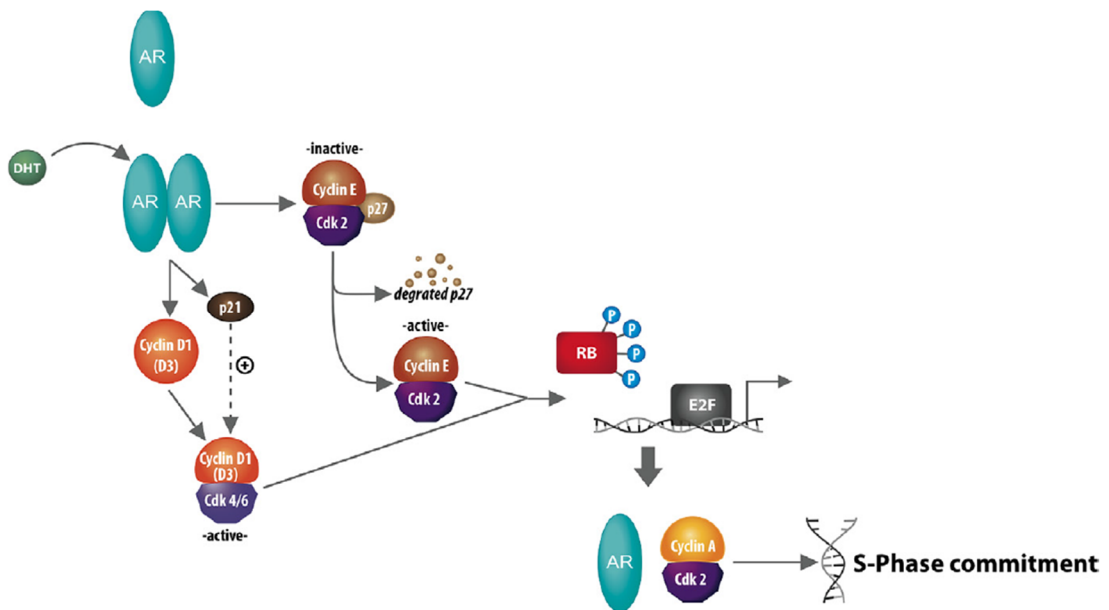
Androgeny hrají rozhodující roli ve vývoji mužského fenotypu během pohlavní diferenciaci, ale i ve vývoji karcinomu prostaty. Růst prostaty je závislý na androgenech, které působí přes intracelulární receptor nazvaný androgenový receptor (AR). Jedná se o ligand dependentní transkripční faktor, který vyvolává specifické účinky v prostatě a je nezbytný pro její správnou funkci a zachování.

Před vazbou ligandu je AR difúzně přítomen v celé cytoplazmě a je držen v neaktivní formě díky spolupráci proteinů teplotního šoku (Balk *et al.*, 2008). Vazba ligandu vyvolá rychlou jadernou translokaci a akumulaci receptoru. Chromatin se sdružuje na více místech, které řídí genovou expresi, následně přibývají kofaktory, které ovlivňují genovou expresi a dochází k zahájení genové exprese, která může podpořit nádorový fenotyp (Heinlein *et al.*, 2004). AR obsahuje polymorfni polyglutaminové (CAG)_n trinukleotidové repetice. Bylo zjištěno, že zkrácení těchto repetit je spojeno se zvýšeným výskytem rakoviny prostaty. Krátká délka CAG repetit koreluje s vysokým stupněm onemocnění, metastázemi a smrtelnými následky (Giovannucci *et al.*, 1997).

AR v karcinomu prostaty získává autonomní funkci v aktivní podpoře růstu a přežívání nádorových buněk, zčásti zprostředkovanou závislostí tumoru na schopnosti AR vyvolat progresi buněčného cyklu. AR se také uplatňuje při regulaci kontroly buněčného cyklu (Obr. 5). Vazba ligandu na AR vyvolává akumulaci D cyklinů zapojením mTOR (mammalian Target of Rapamycin) komplexu, který zprostředkovává aktivaci CDK4/6 a následnou fosforylaci a inaktivaci retinoblastomového nádorového supresoru (Rb). AR dále zasahuje do G1/S přechodu zahájením exprese p21^{Cip1} a degradace p27^{Kip1} podporuje zvýšení inaktivace Rb závislé na CDK4/6 a CDK2 a postup do G1 fáze. Dráhy potřebné pro vstup do S fáze jsou zahájeny inaktivací Rb, která indukuje aktivitu E2F rodiny transkripčních faktorů zodpovědných za produkci

cyklinu A, aktivaci CDK2 a vstup do S fáze. E2F1 přímo vyvolává expresi AR, případně zrychlení průchodu buňky buněčným cyklem (Schiewer *et al.*, 2012).

Buňky karcinomu prostaty jsou závislé na aktivitě AR z hlediska proliferace a přežití. AR hraje klíčovou roli u nádorů prostaty a v současné době je terapeutickým cílem léčby. Blokáda AR může zpomalit progresi karcinomu a slouží k léčbě pacientů s metastázemi nebo těch, kteří nemohou podstoupit radikální operaci. Z počátku je většina karcinomů prostaty citlivá na odstranění androgenů, ale u pacientů s pokročilým stádiem onemocnění již buňky karcinomu androgen ke svému růstu nepotřebují a nemohou být léčeni endokrinní terapií (Hughes *et al.*, 2005).



Obr. 5: Regulace buněčného cyklu prostřednictvím androgenového receptoru (převzato z Schiewer *et al.*, 2012).

2.2.2 Estrogenový receptor

Růst a vývoj prostaty je zprostředkováván především androgeny, ale také estrogeny mohou hrát určitou roli ve stejných procesech stejně jako v karcinogenezi prostaty. Existují dva základní estrogenové receptory ER- α a ER- β . Tyto receptory fungují jako transkripční faktory v jádře, kde jsou vázány na jejich specifické ligandy (Osborne *et al.*, 2001). ER- α a ER- β mají podobnou, ale ne identickou strukturu. Oba receptory se skládají ze šesti společných domén (A-F), ale jsou kódovány odlišnými geny (ESR1 a ESR2; Yeh *et al.*, 2014). Receptory mohou být lokalizovány v různých buněčných subtypech v rámci dané tkáně. Např. u buněk prostaty je ER- β lokalizován zejména v epitelu buněk, zatímco ER- α převažuje v buněčném stromatu (Weihua *et al.*,

2002). Bylo také zjištěno, že látky, které jsou antagonisty ER- α , mohou být zároveň agonisty ER- β . Ovšem funkce a prognostický význam ER- β jsou stále nejasné (Palmieri *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2010).

Vazbou hormonu na ER- α dochází prostřednictvím fosforylace k aktivaci proteinů, oddělení chaperonových proteinů např. proteinu teplotního šoku 90 a změně jeho konformace. Receptor poté dimerizuje s dalším receptorem a dimer se váže na specifické DNA sekvence přítomné v promotoru genů pro estrogen. Promotor s navázanými receptorovými dimery vytvoří komplex s koregulačními proteiny, které koordinovaně ovlivňují transkripci genů pro estrogen.

Transkripce mnoha genů je zvyšována estrogenem, zatímco u jiných genů je inhibována. Koregulační proteiny navázané na promotor cílových genů ER mohou být stejně důležité jako sám receptor ve zprostředkování transkripční aktivity. Některé z těchto proteinů jsou koaktivátory, které zvyšují transkripční činnost, zatímco korepresory ji inhibují. Mnoho genů regulovaných estrogény je důležitých pro buněčnou proliferaci, inhibici apoptózy, stimulaci invaze a metastáz a podporu angiogeneze (Osborne *et al.*, 2005).

Karcinom prostaty je androgen senzitivní onemocnění, ale objevuje se stále více důkazů, že estrogény a ER mohou regulovat nejen vývoj prostaty, ale také zahájení a vývoj rakoviny. Karcinom prostaty se běžně vyskytuje ve věku, kdy je hladina sérového testosteronu v poklesu. Zatímco hladina estradiolu se s věkem nesnižuje a zůstává beze změny nebo se zvyšuje (Yeh *et al.*, 2014). Podstatný pokles poměru testosteronu a estradiolu souvisí s vývojem karcinomu prostaty. Byla prokázána spojitost mezi zvýšenou hladinou plazmatických estrogénů a zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty (Barrett-Connor *et al.*, 1990).

2.2.3 Progesteronový receptor

Progesteronový receptor (PR) je zejména dobře prostudován v souvislosti s nádory prsu, kde je stanovení PR společně s ER běžnou součástí péče o pacientky s nově identifikovaným primárním nádorem. V poslední době bylo ovšem zjištěno, že PR hraje také důležitou roli v rozvoji nádoru prostaty (Yu *et al.*, 2013, 2015). Běžně se vyskytuje ve formě dvou základních izoform PR-A a PR-B, které regulují transkripci rozdílných genů, i když je izoforma PR-B aktivnějším transkripčním faktorem, existují geny, které jsou regulovány výhradně PR-A izoformou. Poměr PR-A

a PR-B má významný vliv na celkovou biologickou aktivitu progesteronu. Bylo zjištěno, že u nádorů prsu dochází ke zvýšení koncentrace izoformy PR-B a přibližně 60 % ER pozitivních nádorů je zároveň PR pozitivních a příznivě odpovídá na endokrinní léčbu (Branchini *et al.*, 2009).

Klasický mechanismus působení PR je obdobný jako u výše popsaných jaderných receptorů. Skládá se především z dimerizace cytoplazmatického PR po navázání ligandu a následném přesunu do jádra. V jádře se dimer váže na DNA na tzv. progesteron-responzivní elementy v promotorových oblastech genů. Transkripce progesteron-responzivních genů je zahájena po navázání regulačních proteinů a vytvoření transkripčního komplexu s RNA-polymerázou II. Regulace pomocí PR může probíhat také skrze negenomickou signalizaci bez vazby na DNA a to aktivací PR v cytoplasmě či ukotvených v membráně (Jacobsen *et al.*, 2012).

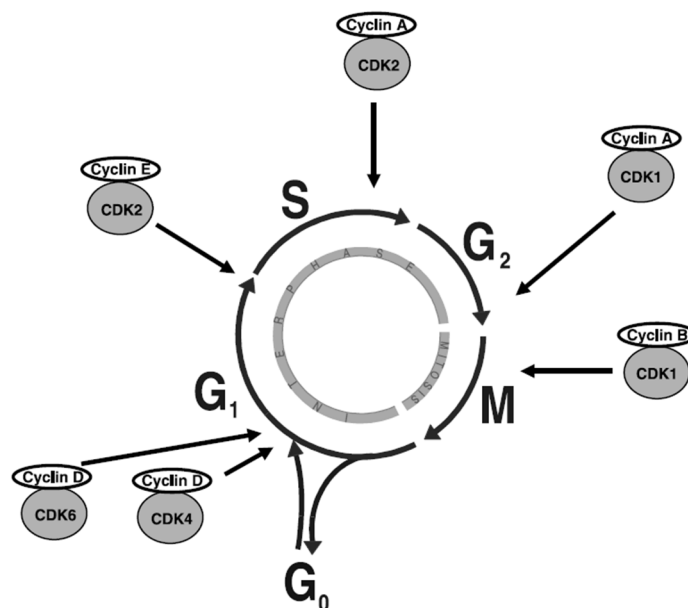
Bylo zjištěno, že PR je u buněk prostaty exprimován zejména v buněčném stromatu, kde ovlivňuje sekreci cytokinů (Yu *et al.*, 2013). Interakce mezi stromatem a epitelem hraje klíčovou roli ve vývoji prostaty, karcinogenezi, tvorbě metastáz a odpovědi nádoru na léčbu. Buňky karcinomu prostaty mění fenotyp okolních stromálních buněk z hladkých svalů na myofibroblasty. Reaktivní stroma vytváří příznivé mikroprostředí nádoru prostřednictvím sekrece cytokinů a růstových faktorů a extracelulární matrix usnadňuje migraci, invazi, angiogenezi a metastázování nádorových buněk. V práci Yu *et al.* (2015) popisují, že zvýšená exprese PR ve stromálních buňkách prostaty *in vitro* inhibovala buněčnou proliferaci a způsobovala opoždění buněčného cyklu. PR je potřebný pro stromální buňky prostaty k zachování jejich růstu a homeostázy v prostatické tkáni. Bylo prokázáno, že PR potlačil aktivitu dvou cytokinů SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) a IL-6 (Interleukin 6) ve fibroblastech asociovaných s karcinomem a tím inhiboval migraci a invazi nádorových buněk prostaty. Snížená exprese PR v nádorovém stromatu může přispívat do mikroprostředí karcinomu, které je příznivé pro invazi nádorových buněk a tvorbu metastáz. Společný vývoj stromálních buněk karcinomu a nádorových buněk může usnadnit progresi karcinomu prostaty (Yu *et al.*, 2015). Zdá se, že PR může hrát aktivní úlohu v regulaci fenotypu stromálních buněk během progresu nádoru prostaty a je zřejmé, že bude v budoucnu předmětem dalšího výzkumu.

2.3 Buněčné děje u karcinomu prostaty

Během nádorové transformace buněk dochází k akumulaci mutací a k poruchám regulace buněčné signalizace. Takto transformované buňky jsou charakterizovány nekontrolovaným růstem nezávislým na vnějších podmínkách prostředí. Velmi častými změnami buněčné signalizace jsou poruchy regulace buněčného cyklu, deregulace apoptózy a změny v epiteliálně-mezenchymálním přechodu (Hanahan *et al.*, 2000).

2.3.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus (BC) je řízen mnoha mechanismy, které zajišťují správné dělení buňky. Tento proces se skládá ze dvou po sobě následujících dějů, které se vyznačují zejména replikací DNA a rozdělení zreplikovaných chromozómů do dvou samostatných buněk. Cyklus je rozdělen do dvou fází, a to mitózy a interfáze (Obr. 6). Při první z nich dochází k rozdělení jádra a jako interfáze se označuje krátké období mezi dvěma mitózami. Interfáze se dělí na 3 fáze; G₁ fáze (příprava buňky na syntézu DNA), S fáze (syntéza DNA) a G₂ fáze (příprava buňky na mitózu). Buňky v G₁ fázi ještě před replikací DNA mohou vstoupit do klidové fáze G₀, kdy buňky nerostou, nedělí se ani neproliferují a po nějakém čase se opět mohou vrátit do G₁ fáze a vstoupit do mitózy. Mezi etapy mitózy patří profáze, metafáze, anafáze a telofáze (Vermuelen *et al.*, 2003).



Obr. 6: Fáze buněčného cyklu a místa aktivity regulačních komplexů CDK/cyklin.

Přechod z jedné fáze cyklu do druhé je střežen a přísně regulován různými buněčnými proteiny. Hlavní skupinou těchto proteinů jsou cyklin dependentní kinázy (CDK), což jsou serin/threoninové proteinkinázy, které jsou aktivovány v určitých bodech BC. V G1 fázi se uplatňují CDK2, CDK4 a CDK 6, v S fázi je aktivní CDK2, fáze G2 a mitózy se účastní CDK 1 (Obr. 6). Během buněčného dělení jsou CDK přítomny po celou dobu cyklu, ale stávají se aktivními až po navázání své specifické podjednotky cyklinu (Obr. 6). Hladina cyklinů kolísá během cyklu, a když překročí určitou hranici, dojde k nasměrování buňky do konkrétní fáze cyklu. Tímto způsobem jsou CDK periodicky aktivovány a fosforylací cílových proteinů následně iniciují jednotlivé kroky BC (Morgan, 1995). Poté hladina cyklinů opět klesá a dochází k jejich ubiquitinylationi a degradaci v proteasomu. Cykliny typu D (D1, D2, D3) se váží na CDK4 a CDK6 a tyto komplexy jsou nezbytné pro vstup do G1 fáze (Sherr, 1994). Dalším G1 cyklinem je cyklin E, který se spojuje s CDK2 a reguluje přechod z G1 do S fáze (Ohtsubo *et al.*, 1995). Cyklin A se váže na CDK2 a tento komplex je důležitý v průběhu S fáze (Walker *et al.*, 1991). V pozdní G2 a časně M fázi komplex CDK1/cyklin A podpoří vstup buňky do mitózy, která je dále regulována komplexem CDK1/cyklin B (Tab. 1; Arrelano *et al.*, 1997).

Tab. 1: Seznam cyklin dependentních kináz a jejich cyklinů v určitých fázích buněčného cyklu.

CDK	Cyklin	Fáze BC
CDK4	Cyklin D1, D2, D3	G1
CDK6	Cyklin D1, D2, D3	G1
CDK2	Cyklin E	G1/S přechod
CDK2	Cyklin A	S
CDK1	Cyklin A	G2/M přechod
CDK1	Cyklin B	Mitóza

Kontrolní body buněčného cyklu jsou mechanismy, které regulují postup buňky cyklem a mají za úkol zabezpečit, aby každý krok proběhl pouze jednou a ve správném pořadí. Jedná se o tři hlavní oblasti buněčného cyklu, kde je kontrolován přechod do další fáze. Tyto oblasti zahrnují G1/S přechod, kde vzniká většina poškození spojených se vznikem rakoviny, dále pak G2/M kontrolní bod a jeho aktivace jako

odpověď na poškození DNA a kontrolní bod připojení mitotického vřeténka (Molinary, 2000).

G1/S přechod je regulován fosforylací nádorového supresoru Rb (Weinberg, 1995). Zastavení buněčného cyklu způsobené poškozením DNA v oblasti kontrolního bodu G1/S a přechod do S fáze jsou závislé na p53, jehož hladina je obvykle v buňce nízká, ale právě poškození DNA může vést k rychlé indukci aktivity p53 (Levine, 1997). V případě těžkého poškození buňky indukuje p53 buněčnou smrt aktivací genů, které se podílí na apoptotické signalizaci (např. Bax, Fas; Gottlieb *et al.*, 1998). Tento protein stimuluje také transkripci dalších genů, včetně p21 nebo Mdm2 (Agarwal *et al.*, 1998). Indukce p21, inhibitoru cyklín dependentních kináz, vede k inhibici CDK a zástavě BC a zabraňuje také replikaci poškozené DNA (Ko *et al.*, 1996). Mdm2 hraje důležitou roli v regulaci p53, váže se na něj a inhibuje jeho transkripční aktivitu a přispívá k proteolytické degradaci p53 usnadněním ubiquitinylation (Oren, 1999).

Mutace v těchto kontrolních bodech se často vyskytují u různých typů nádorů jako chyby v řízení buněčného cyklu, což může vést ke genetické nestabilitě (Molinary, 2000). Ve většině nádorů prostaty je snižená exprese proteinu p27^{Kip/Cip} a vlivem androgenů dochází k jeho degradaci (Schiewer *et al.*, 2012).

Retinoblastom je důležitý tumor supresorový gen v mnoha lidských nádorech včetně karcinomu prostaty a narušení normální regulace Rb je spojeno s patogenezí mnoha nádorů. Gen Rb hraje důležitou roli v G1 fázi buněčného cyklu. Protein Rb je pevně vázán na transkripční faktory rodiny E2F, a když je fosforylován, uvolňuje se z této vazby a tím je zahájena transkripce mnoha genů zapojených do růstu buňky. Inaktivace Rb hraje roli v neoplastické transformaci, protože exprese wild-type Rb v Rb negativní linii karcinomu prostaty vede ke ztrátě tumorogenicity. Převládající mechanismus inaktivace Rb zahrnuje alelickou ztrátu nebo mutaci, ale také snížení transkripce Rb (Hughes *et al.*, 2005).

2.3.2 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je velmi důležitý fyziologický proces v buňkách, který se účastní mnoha důležitých dějů. Například odstraňuje staré, poškozené a tělu cizí buňky, udržuje velikost buněčné populace a účastní se ochrany organismu při imunitní reakci, kdy jsou buňky poškozeny viry, bakteriemi, škodlivými látkami nebo onemocněním. Vyskytuje se běžně během vývoje a stárnutí jako homeostatický mechanismus. Homeostáza tkání je výsledek rovnováhy mezi buněčnou proliferací, diferenciací a apoptózou (Elmore *et al.*, 2007).

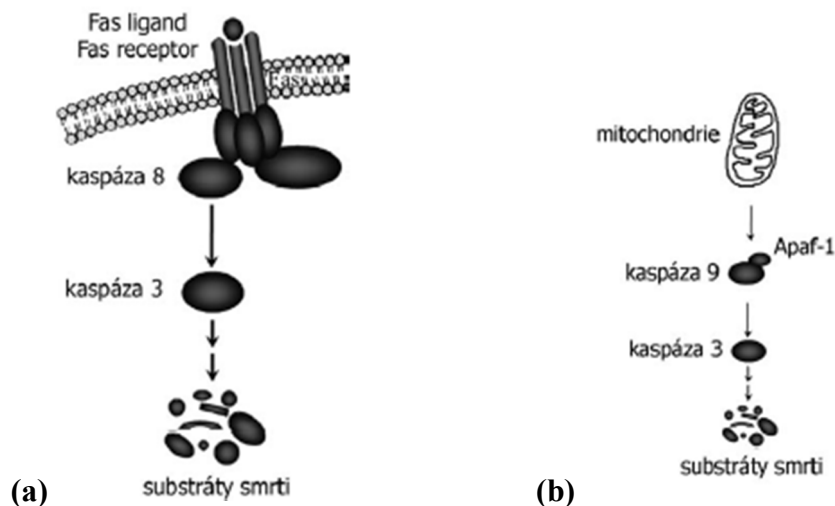
Předpokládá se, že tento proces hraje klíčovou roli ve vývoji, včetně embryonálního, a regulaci růstu normální a nádorové tkáně. Proto porucha v regulaci apoptózy může vést až ke karcinogenezi (Kerr *et al.* 1972; Wyllie *et al.*, 1992) a nadměrná nebo utlumená apoptóza je faktorem u mnoha lidských onemocnění včetně neurodegenerativních a autoimunitních chorob nebo ischemie.

Apoptotický proces se vyznačuje zřetelnými morfologickými vlastnostmi a energeticky závislými biochemickými mechanismy. Na počátku dochází ke smršťování buněk a pyknóze, kdy buněčné jádro ztrácí tekutý obsah, vnitřní struktura mizí a jádro se smršťuje. Buňky jsou menší, cytoplazma je hustá a organely jsou těsněji seskupeny. Pyknóza je výsledkem kondenzace chromatinu, což je charakteristický znak apoptózy. Plazmatická membrána puchýřkovatí a následuje karyorhexe, kdy se jádro rozpadá na malé fragmenty a dochází k separaci buněčných fragmentů do apoptotických tělísek. Ta se skládají z cytoplazmy a nahusto natěsnanými organelami, které obsahují nebo neobsahují jaderné fragmenty. Integrita organel je stále udržována a vše je uzavřeno v neporušené plazmatické membráně. Tato apoptotická tělíška jsou následně fagocytována makrofágy nebo parenchymatickými buňkami a nakonec degradována ve fagolysosomech (Elmore *et al.*, 2007).

Existují dvě hlavní apoptotické dráhy; vnější dráha uskutečňovaná přes receptory smrti a vnitřní mitochondriální dráha. Je ale zřejmé, že obě cesty jsou propojeny a molekuly jedné dráhy mohou mít vliv na druhou (Igney *et al.*, 2002).

Vnější dráha (Obr. 7a) zahrnuje interakce zprostředkované transmembránovými receptory. Jedná se o receptory smrti, které jsou členy rodiny TNF (tumor necrosis factor) receptoru (Locksley *et al.*, 2001) a sdílí podobné extracelulární domény bohaté na cystein a dále obsahují cytoplazmatickou doménu nazvanou „doména smrti“. Ligandy, které se váží na receptory smrti, jsou například FasL/FasR (Fatty acid

synthetase ligand/Fatty acid synthetase receptor), TNF- α /TNFR1 (tumor necrosis factor α /tumor necrosis factor receptor 1) a jiné (Ashkenazi *et al.*, 1998). Vazba TNF ligandu na TNF receptor vede k navázání adaptorové molekuly TRADD (TNFR associated death domain) a vazba Fas ligandu na Fas receptor (Obr. 7a) vede k navázání adaptorového proteinu FADD (Fas associated death domain), který se dále spojuje s prokaspázou 8. Následně je vytvořen komplex DISC (death-inducing signaling complex), který spouští autokalalytický proces aktivace prokaspázy 8 na kaspázu 8 (Cysteinylnyl aspartic acid-protease 8, Kischkel *et al.*, 1995). Ta aktivuje další kaspázy (např. efektorovou kaspázu 3), které proteolyticky štěpí substráty smrti (např. proteiny řídící reparaci DNA, antiapoptotické proteiny a další) a tím spouští proces apoptózy (Taylor *et al.*, 2008).



Obr. 7: Schéma (a) vnější a (b) vnitřní dráhy apoptózy.

Vnitřní dráha apoptózy (Obr. 7b) je aktivována různými stimuly, které nejsou zprostředkovány receptory a vyvolávají intracelulární signály působící přímo na cíle v buňce a mají buď pozitivní, nebo negativní účinek. Negativní signály zahrnují absenci některých růstových faktorů, hormonů a cytokinů, které potlačují apoptózu. Mezi pozitivní podněty patří záření, toxiny, hypoxie, hypertermie, virové infekce a volné radikály. Všechny tyto podněty způsobí změny ve vnitřní mitochondriální membráně, což má za následek otevření pórů, ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu a uvolnění proapoptotických proteinů z mezimembránového prostoru do cytoplazmy (Saelens *et al.*, 2004). Jedná se o cytochrom c, Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI)

a serin proteázu HtrA2/Omi (High-temperature requirement; Garrido *et al.*, 2006). Cytochrom c se váže na Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) a aktivuje tento faktor i prokaspázu 9, které společně tvoří komplex zvaný apoptozóm (Chinnaiyan, 1999). Ten zajišťuje autokatalytickou aktivaci prokaspázy 9 za vzniku kaspázy 9 a aktivace dalších exekutorových kaspáz vede ke vzniku apoptotických tělísek a buněčné smrti.

Mezi tzv. proapoptotické proteiny patří Bax, Bid, Bik, Puma. Tyto proteiny podporují průběh apoptózy. Naopak proteiny Bcl-2 a Bcl-xL průběh apoptózy potlačují. Vzájemné propojení vnější a vnitřní dráhy apoptózy může být zprostředkováno pomocí proteinu Bid, kdy kaspáza 8 je schopna štěpit Bid na tBid, který může aktivovat vnitřní apoptotickou dráhu a tím zesílit apoptotický signál (De Bruin *et al.*, 2008).

Selhání normálních mechanismů apoptózy může přispívat k vytvoření vhodného prostředí pro vznik genetické nestability, akumulaci genetických mutací, rezistenci k terapii a k celé řadě dějů souvisejících se ztrátou kontroly regulace buněčného cyklu (Hanahan *et al.*, 2000). Mezi nádory, u nichž byla prokázána inhibice apoptózy, se řadí například folikulární lymfomy, hormonálně dependentní nádory prostaty, prsu, vaječníků a také nádory s prokázanou mutací genu p53 jako je např. karcinom tlustého střeva.

U většiny nádorů prostaty dochází ke změně exprese antiapoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), jejichž množství se může během vývoje nádoru zvyšovat, ale úroveň exprese proapoptotických proteinů, jako je Bax, zůstává stejná nebo se může dokonce snižovat. Narušením rovnováhy mezi anti- a proapoptotickými proteiny může nádor získat rezistenci k apoptotickým signálům a to i k těm signálům vyvolaným pomocí protinádorových léčiv (Heinlein *et al.*, 2004). Antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny hrají zásadní roli v regulaci apoptózy a inhibují programovanou buněčnou smrt. Bcl-2 rodina reprezentuje třídu protoonkogenů (Vaux *et al.* 1988). Poruchy regulace exprese a funkce proteinů Bcl-2 rodiny jsou zapojeny v tumorigenezi a řadě dalších onemocnění a mohou se vyskytovat v primárním a metastatickém karcinomu prostaty.

2.3.3 Změny v epiteliálně-mezenchymálním přechodu

Epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT) je biologický proces, během kterého získají epitelální buňky fenotyp buněk mezenchymálních. V takovém stavu mají buňky zvýšenou schopnost migrace, invazivity a také jsou více rezistentní k apoptóze.

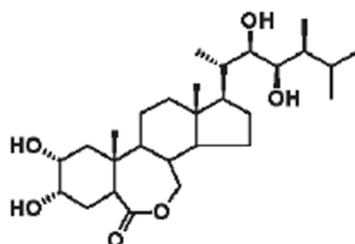
Dokončení EMT je signalizováno degradací základní bazální membrány a tvorbou mezenchymálních buněk, které migrují pryč z epiteliální vrstvy, ze které vznikly. Během EMT dochází k aktivaci transkripčních faktorů, expresi specifických povrchových molekul, reorganizaci a expresi proteinů cytoskeletu buňky. Po dokončení vývoje epiteliálních tkání, epiteliální buňky mají tkáňově specifickou funkci, zatímco mezenchymální buňky mají funkci podpůrnou. Buňky v terminálním stádiu diferenciaci mohou měnit svůj fenotyp díky aktivaci EMT, který umožňuje transdiferenciaci. Důkazem fenotypové přizpůsobivosti EMT je přítomnost opačného procesu tzv. mezenchymálně-epiteliálního přechodu (MET), který zahrnuje přeměnu mezenchymálních buněk na epitelové deriváty.

Rozlišují se tři rozdílné subtypy EMT, které mají odlišnou funkci a následky. První typ může tvořit mezenchymální buňky (primární mezenchym), které následně mohou projít MET přechodem a vytvořit sekundární epitel. EMT prvního typu také souvisí s implantací a formací embrya a vývojem orgánů. Během těchto dějů dochází k tvorbě rozdílných buněčných typů, které sdílí běžný mezenchymální fenotyp. EMT druhého typu se účastní léčby ran, regenerace tkáně a fibrózy orgánů a je spojován se zánětem až s destrukcí tkáně. Třetí typ EMT je významným a dobře prostudovaným dějem v nádorové biologii, vyskytuje se v neoplastických buňkách, u kterých došlo ke genetickým a epigenetickým změnám. K tomuto typu dochází u nádorových buněk, které díky této změně zvyšují své invazivní a metastatické schopnosti. Nádorové buňky mohou procházet EMT v různém rozsahu. Některé buňky si ponechají mnoho znaků epiteliálních a také získají nějaké mezenchymální, jiné buňky ztrácí svůj epiteliální původ a stávají se plně mezenchymálními (Kalluri *et al.*, 2009).

2.4 Brassinosteroidy (BRs)

Jedná se o steroidní rostlinné hormony neboli fytohormony, z chemického hlediska jde o skupinu polyhydroxylovaných derivátů sterolů. Tyto hormony jsou nízkomolekulární sloučeniny vyskytující se všudypřítomně v celé rostlinné říši u nižších i vyšších rostlin, zejména v květech, listech, stoncích, kořenech, plodech, zrnech, semenech a pylu (Khrípach *et al.*, 1999). První brassinosteroid s názvem brassinolid (Obr. 8; (22*R*, 23*R*, 24*S*) - 2 α ,3 α ,22,23 – tetrahydroxy – 24 – methyl – B_{homo} – 7 – oxa – 5 α – cholestan – 6 – one) byl izolován v roce 1979 z pylu olejnaté plodiny *Brassica napus* L. neboli brukev řepka, pěstované zejména pro olejnatá semena využívaná

k výrobě oleje (Grove *et al.*, 1979). Od této doby bylo objeveno více než 70 těchto rostlinných regulátorů růstu (Sakurai *et al.*, 1997).



Obr. 8: Strukturální vzorec brassinolidu.

BRs hrají velmi významnou regulační roli v mnoha různých fyziologických procesech u rostlin. Jedná se například o hormonální signalizaci a fyziologickou odpověď u rostlin, včetně růstu, buněčné diferenciace, prodlužování kořene a stonku, odolnosti k nemocem, toleranci vůči stresu a stárnutí, klíčení semen, ohýbání, reprodukčního a cévního vývoje, polarizaci membrán (Clouse *et al.*, 1998; Nemhauser *et al.*, 2004). Stimulují dělení a prodlužování buněk a účastní se také regulačních procesů specifických pro rostliny včetně fotomorfogeneze a buněčné expanze. Způsobují zvýšení rezistence na biotické a abiotické stresy u rostlin (Müssig *et al.*, 2001) a mají schopnost chránit rostliny před stresovými faktory ze životního prostředí, včetně sucha, extrémních teplot, slanosti a poškození způsobená herbicidy (Sasse *et al.*, 1999).

Mechanismus účinku BRs je u rostlinných buněk dobře popsán, u živočišných buněk zůstává zatím předmětem výzkumu. BRs jsou v rostlinných buňkách, na rozdíl od živočišných, vázány na plazmatickou membránu k extracelulární doméně BRI1 receptoru serin/threoninové kinázy. Navázání BRs iniciuje signalizační kaskádu zahrnující GSK3 kinázu, BIN2 a BSU1 fosfatázu, která upravuje hladinu fosforylace a stabilitu jaderných transkripčních faktorů BES1 a BZR1. Tyto genové produkty poskytují rámec pro regulaci rostlinného růstu (Vert *et al.*, 2005). V klasickém zvířecím modelu se lipofilní steroidy váží na steroidní receptory, které se nacházejí buď v cytosolu nebo v jádře a difundují přes plazmatickou membránu. Vazba ligandu indukuje konformační změnu a dimerizaci s jiným receptorem, který umožňuje komplexu ligand/receptor navázání na DNA a tím měnit genovou expresi po dobu několika hodin nebo dokonce dnů (Losel *et al.*, 2003).

Bylo zjištěno, že dva přírodní BRs 28-homocastasteron (28-homoCS) a 28-homobrassinolid a jejich syntetické deriváty mají antivirovou aktivitu proti různým patogenním virům, včetně herpes simplex viru typu 1 (HSV-1), viru spalniček a arenavirům (Wachsman *et al.*, 2002). 24-epibrassinolid (24-epiBL) je snadno dostupný analog BRs, který má protinádorové účinky, ale může také zvýšit mitochondriální membránový potenciál, snížit hladinu intracelulárních protilátek, zvýšit poměr buněk v G0/G1 fázi, snížit podíl buněk v S fázi (Franek *et al.*, 2003).

Přírodní BRs a jejich syntetické deriváty způsobují inhibici buněčného růstu, zástavu buněčného cyklu a zahájení apoptózy u mnoha lidských nádorových buněčných linií bez efektu na normální růst nenádorových buněk a také vykazují antiproliferativní aktivitu a antiangiogenní vlastnosti. V poslední době jsou testovány syntetické analogy BRs, u kterých bylo *in vitro* zjištěno, že jsou účinnější než přírodní typy BRs (Hoffmannová *et al.*, 2012).

Bylo prokázáno, že estrogen a androgen citlivé a necitlivé buněčné linie karcinomu prsu a prostaty reagují odlišně na léčbu přírodními BRs. Karcinom prsu se většinou skládá ze směsi estrogen citlivých a necitlivých buněk a úspěch v kontrole rakoviny prsu nejspíš spočívá v eliminaci obou typů buněk. Buněčné linie citlivé k hormonům jsou více vnímavé k léčbě BRs. Toto zjištění může poukazovat na možnou změnu steroidních receptorů vlivem přírodních BRs. Cytotoxický účinek přírodních BRs byl pozorován pouze u nádorových buněk, ale ne u netransformovaných lidských fibroblastů, což naznačuje, že BRs vyvolávají různé reakce u nádorových a normálních buněk a jsou schopné blokovat buněčný cyklus u nádorových buněčných linií prsu a prostaty. Proto jsou tyto rostlinné hormony slibnými kandidáty pro vývoj potenciálních protinádorových léčiv. Bylo prokázáno, že ovlivnění buněčných linií karcinomu prsu a prostaty dvěma přírodními BRs 28-homoCS a 24-epiBL zablokovalo buněčný cyklus v G1 fázi se snížením počtu buněk v S fázi (Malikova *et al.*, 2008).

Vaskularizace nádorů hraje důležitou roli v buněčné výživě a distribuci kyslíku. Použití nových léčiv proti novotvorbě cév (angiogenezi) u nádorů může docílit inhibice proteolytických enzymů, které rozkládají extracelulární matrix okolní kapiláry a dále inhibice endoteliální buněčné proliferace, migrace a posílení apoptózy u nádorových endoteliálních buněk. Silné angiogenní inhibitory blokující růst nádorů mají potenciál pro vývoj nové generace protinádorových léčiv. Bylo zjištěno, že BRs vykazují antiangiogenní účinky a spolu s jejich antiproliferativní aktivitou, by se mohly stát důležitým zdrojem pro vývoj nových protinádorových léčiv (Hoffmannová *et al.*, 2012).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Přístrojové vybavení

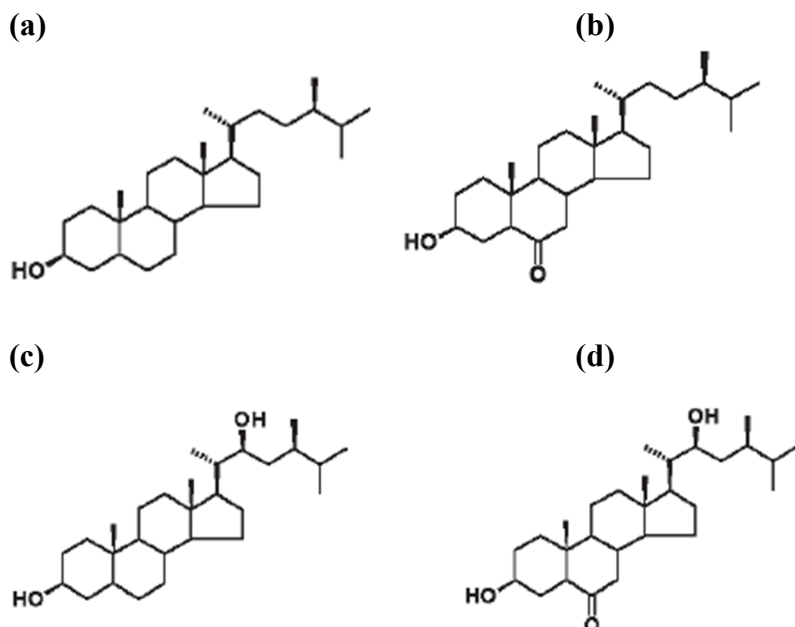
- blotovací systém Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad
- centrifuga MR22i, Jouan
- centrifuga 3K30, Sigma
- cykler T-personal Combi, Biometra
- elektroforetická vana + aparatura pro elektroforézu, Bio-Rad
- elektroforetický zdroj MP-300V, Major Science
- flow-box s vertikálním prouděním vzduchu MSC-Advantage, Thermo Scientific
- fluorescenční mikroskop BX50F, Olympus
- GBox HR-Imaging System, Syngene
- Inkubátor Class 100 HEPA, Thermo Scientific
- inkubátor CO₂ Heracell, Thermo Scientific
- odsávací systém, Millipore
- průtokový cytometr BD FACSVTMerse, Becton Dickinson Bioscience
- spektrofotometr PowerWave XS, BIOTEK®Instruments
- stolní centrifuga MiniSpin, Eppendorf
- světelný mikroskop Eclipse TS100, Nikon
- termoblok AccuBlockTM Digital Dry Bath, Labnet
- třepačka SHAKER S-3.16 L, SKYLine
- vakuová pumpa, Millipore
- vodní lázeň TW8, Julabo
- vortex MaxiMixTM II, Thermolyne

3.2 Testované látky

K testování byly použity přirozené typy brassinosteroidů:

- Campestanol [(24R)-3-β-hydroxy-24-methyl-5α-cholestane]; C₂₈H₅₀O; Mr 402,71; čistota > 90 % (HPLC)
- 6-oxocampestanol [(24R)-3-β-hydroxy-24-methyl-5α-cholestane-6-one]; C₂₈H₄₈O₂; Mr 416,69; čistota > 90 % (HPLC)
- Cathasteron [(22S,24R)-3-β,22-dihydroxy-24-methyl-5α-cholestane-6-one]; C₂₈H₄₈O₃; Mr 432,69; čistota > 95 % (HPLC)
- 6-deoxocathasteron [(22S,24R)-3-β,22-dihydroxy-24-methyl-5α-cholestane]; C₂₈H₅₀O₂; Mr 418,71; čistota > 90 % (HPLC)

Látky byly získány od firmy Olchemim Ltd. (ČR). Strukturální vzorce testovaných brassinosteroidů znázorňuje Obr. 9. Látky byly rozpuštěny v rozpouštědle v dimetylsulfoxidu (DMSO) na 10 mM zásobní koncentraci. Požadované koncentrace látek byly připraveny přidáním zásobních roztoků do příslušného média.



Obr. 9: Strukturální vzorec (a) Campestanolu, (b) 6-oxocampestanolu, (c) Cathasteronu a (d) 6-deoxocathasteronu.

3.3 Použité protilátky

3.3.1 Primární protilátky

Tab. 2: Seznam použitých primárních protilátek.

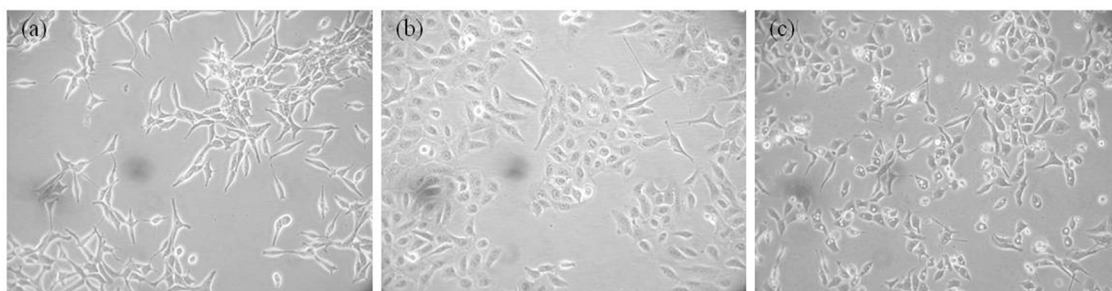
protilátka	klon	ředění WB/IF	původ	velikost (kDa)	firma
AR	N-20	1:200/1:50	králík	110	Santa Cruz
Bcl-2	N-19	1:200	králík	29	Santa Cruz
Bcl-xL	H-62	1:100	králík	29	Novocastra
Bid	-	1:1000	králík	22-15	Cell Signaling
cas-3	-	1:1000	králík	35-19-17	Cell Signaling
cas-7	C-7	1:1000	myš	35-30-20	Cell Signaling
cyklin A	H432	1:200	králík	54	Santa Cruz
cyklin B ₁	-	1:1000	králík	55	Cell Signaling
cyklin D ₁	72-13G	1:100	myš	36	Santa Cruz
cyklin E	HE12	1:200	myš	45	Santa Cruz
ER- α	D-12	1:200/1:50	myš	66	Santa Cruz
ER- β	H-150	1:100/1:50	králík	56	Santa Cruz
MCM-7	141.2	1:500	myš	80	Santa Cruz
p21	12D1	1:1000	králík	21	Cell Signaling
p53	D01	1:400	myš	53	Invitrogen
PARP	46D11	1:1000	králík	116-89	Cell Signaling
PR	6A1	1:1000/1:50	myš	90-118	Cell Signaling
pRb	S807/811	1:1000	králík	110	Cell Signaling
Rb	4H1	1:2000	myš	110	Cell Signaling

3.3.2 Sekundární protilátky

- Alexa Fluor 594 kozí anti-myší IgG, Molecular Probes, ředění 1:1000, Life Technologies;
- Alexa Fluor 488 kozí anti-králičí IgG, Molecular Probes, ředění 1:1000, Life Technologies;
- sekundární králičí protilátka proti myším imunoglobulinům (mouse anti-rabbit IG-HRP), ředění 1:5000-1:6000, Cell Signaling;
- sekundární kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům (rabbit anti-goat IG-HRP), ředění 1:6 000, Cell Signaling.

3.4 Kultivace buněk

Experimenty byly provedeny na buněčných liniích LNCaP a DU-145 odvozených od karcinomu prostaty a nenádorových prostatických buňkách RWPE-1 (Obr. 9). Buněčné linie byly získány od firmy American Type Culture Collection (ATCC). Buňky LNCaP byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma), ke kterému bylo přidáno fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen) ve výsledné 10% koncentraci (v/v), 2 M L-glutamin (Sigma), 1 mM pyruvát sodný (Sigma), antibiotika penicilin (1 U/ml, Invitrogen) a streptomycin (1 U/ml, Invitrogen). Buňky DU-145 byly kultivovány v médiu DMEM (Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco, Invitrogen) s přidavkem 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu. Obě linie byly pasážovány pomocí 0,1% trypsin-EDTA (Sigma). Nenádorové buňky RWPE-1 byly kultivovány v médiu SFM (Serum-free medium; Life Technologies) s přidavkem extraktu hovězí hypofýzy (BPE, 0,05 mg/ml, Life Technologies), epidermálního růstového faktoru (EGF, 5 ng/ml, Life Technologies), antibiotik penicilinu, streptomycinu, amphotericinu B (1 U/ml, Sigma) a gentamycinu (0,5 U/ml, Sigma). Buňky RWPE-1 byly pasážovány pomocí 0,05% trypsin-EDTA. Všechny linie byly pěstovány v kultivačních lahvích v CO₂ inkubátoru při 37°C. Veškerá práce s buňkami byla sterilní a probíhala ve flow-boxu.



Obr. 10: Morfologie buněk u lidské prostatické nádorové buněčné linie **(a)** LNCaP a **(b)** DU-145 a **(c)** lidská prostatická nenádorová buněčná linie RWPE-1. Zvětšení 20x.

3.5 Stanovení čistoty buněčných linií (detekce mykoplazmy pomocí PCR metody)

Buňky byly pasážovány a z resuspendované pelety bylo odebráno cca $0,5 \cdot 10^6$ buněk, které byly dále centrifugovány při 1200 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován, resuspendován v 1 ml sterilního fosfátového pufru (PBS) a následně centrifugován (1200 rpm, 5 minut). Supernatant byl odpipetován a zamražen na -80°C až do následného zpracování. K zamražené peletě bylo přidáno 100 μl K-pufu (30 mM TRIS*HCl pH 8,3, P-Lab; 50 mM KCl; Triton X-100, Sigma; 0,2% proteináza K, Gentra Systems; deionizovaná voda). Inkubace probíhala 1 hodinu při 56°C nebo přes noc při 37°C . Inaktivace byla provedena při 95°C 10 minut. Následně byl připraven mastermix (10 \times PCR pufr s MgCl_2 ; 10 mM dNTPs; 10 μM primery, Thermo Scientific – Tab. 3; *Taq* polymeráza, Thermo Scientific; deionizovaná voda) a napipetován do PCR-zkumavky, do které byl poté přidán 1 μl vzorku lyzátu. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v cyklu T-personal Combi při programu 94°C 15 minut, 94°C 40 sekund, 55°C 30 sekund, 72°C 1 minuty 30 sekund, 72°C 5 minut, celkově 35 cyklů po dobu 2 hodin 18 minut. PCR produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy. Pro detekci PCR produktu byl připraven 1% agarózový gel (Sigma) rozpuštěný v 0,5 \times TBE pufru (5 \times zásobní roztok 1,1 M TRIS-báze, Sigma; 900 mM kyselina boritá, Serva; 25 mM EDTA, Sigma; pH 8,3), do kterého bylo přidáno 5 μl fluorescenčního barvicího roztoku GelRed® (1 M NaCl_2 , Lachema; GelRed® 10 000 \times zásobní roztok, Bioline; deionizovaná voda). Poté bylo 10 μl vzorku smícháno s 1 μl 5 \times koncentrovaného nanášecího pufru (10 \times zásobní roztok – 40% sacharóza, Sigma; 0,25% bromfenolová modř, Sigma; v 50 mM EDTA, pH 8,0, Sigma) a napipetováno do gelu. Pro určení velikosti PCR produktů byly naneseny 3 μl DNA markeru (Top Bio). Byla provedena separace po dobu 1 hodiny při konstantním proudu 100 V v 0,5 \times TBE pufru. Po ukončení separace byl gel barven promýváním ve fluorescenčním barvicím roztoku GelRed® po dobu 30 min. Poté byl gel přenesen do misky s deionizovanou vodou a připraven k focení. Produkty PCR byly v gelu vizualizovány pod UV světlem (GBox HR-Imaging System, Syngene). Po optimálním nastavení zoomu, časovače a zaostření byly gely snímány pomocí CCD kamery. Snímky byly zpracovány na PC v programu Microsoft Photo Editor (Microsoft).

Tab. 3: Sekvence primerů a velikosti PCR produktů.

Primery pro Mykoplazmu		Primery pro β -Aktin	
My1	5'-GCTGTGTGCCTAATACATGCAT	229beta	5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC
My2	5'-CACCATCTGTCATTCTGTAAACCT	230beta	5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC
	produkt 996 pb		produkt 632 bp

3.6 Test buněčné viability

Buňky LNCaP, DU-145 a RWPE-1 byly sklizeny pomocí 0,1%, popř. 0,05% trypsinu a jejich počet byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Buňky byly nasazeny podle typu buněčné linie ve 100 μ l kultivačního média v počtu 4000 buněk (LNCaP, DU-145) a 4500 buněk (RWPE-1) na každou jamku 96-jamkových mikrotitračních destiček. Po 24 h (příp. po 48 h u buněk LNCaP a RWPE-1) bylo přidáno čerstvé médium obsahující příslušnou koncentraci testovaných látek, buňky byly inkubovány po dobu 24 a 48h. Po inkubaci buněk s látkou bylo do každé jamky přidáno 10 μ l 0,5% činidla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Serva). Žlutá tetrazoliová sůl byla v metabolicky aktivních buňkách redukována na modré krystaly formazanu, které byly po 3 h rozpuštěny ve 100 μ l 10% dodecylsulfátu sodného (SDS, Serva). Po 24 h byla na spektrofotometru (Power Wave XS) provedena kvantifikace změřením absorbance roztoku při vlnové délce 570 nm, která přímo korelovala s počtem vitálních buněk. MTT test buněčné viability je určen ke stanovení závislosti účinku dávky testovaných látek na buněčné viabilitě v různých časových intervalech. Na základě testu lze určit koncentraci IC_{50} , která inhibuje buněčnou viabilitu z 50 % po inkubaci buněk s testovanými látkami.

3.7 Kultivace buněčných sfér z přítomnosti testovaných látek

Kultivaci buněčných sfér předcházela úprava kultivačních mikrotitračních destiček. Agaróza byla rozpuštěna v DMEM médiu na výslednou koncentraci 1,5%, následně byla provedena sterilizace roztoku při 121°C. Za sterilních podmínek byla agaróza o objemu 50 μ l/jamku rychle přepipetována do 96-jamkových panelů. Po vychladnutí bylo do každé jamky přidáno 3000 buněk v 50 μ l média pro sféry (DMEM/F-12, 3:1, Invitrogen; 0,2 \times supplement B27 bez vitamínu A, Invitrogen; 10 ng/ml EGF, Sigma; 0,4% BSA – hovězí sérový albumin, Sigma). Po nanesení buněk byly panely centrifugovány při 1000 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě

a buňky poté zakapány 50 μ l čistého média. Následující den byly buňky ovlivněny testovanými látkami v daných koncentracích. Po určité době (3-12 dní) byly sféry vyfoceny a účinek testovaných látek byl porovnán vzhledem ke kontrolním neovlivněným sférám.

3.8 Průtoková cytometrie

Buňky byly kultivovány v kultivačních miskách (o průměru 60 mm) s příslušnou koncentrací látek. Po uplynutí inkubační doby (24 a 48 h) bylo médium s látkou odsáto a buňky promyty PBS a dále sklizeny pomocí 0,1% trypsinu a centrifugovány při 1500 rpm a teplotě 4°C po dobu 5 minut. K peletě buněk byl přidán 1 \times citrátový pufr (citrát trisodný dihydrát, Sigma; deionizovaná voda), buňky byly opatrně resuspendovány a následně centrifugovány (1500 rpm, 4°C, 5 minut) a supernatant odpipetován. Peleta byla po kapkách opatrně přepipetována za neustálého vortexování do vychlazeného 70% etanolu (Lachema). Zafixované buňky byly uchovávány při -20°C pro další použití. Před samotným měřením byly vzorky nejdříve centrifugovány při 1300 rpm a 4°C po dobu 7 minut. Poté byl supernatant odpipetován a buňky byly promyty ve 2 ml citrátového pufru. Po centrifugaci bylo k buňkám přidáno 600 μ l roztoku propidium iodidu (100 μ g/ml; propidium iodid, Sigma; citrátový pufr; Triton X-100; deionizovaná voda). Vše bylo inkubováno 15 minut ve vodní lázni při 37°C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 400 μ l ribonucleasy A (60 UI, Sigma) a opět inkubováno 15 minut ve vodní lázni při 37°C. Vzorky byly ponechány 30 minut na ledu (4°C) a následně analyzovány na průtokovém cytometru FACSVerse. V každém vzorku bylo analyzováno 15 \cdot 10³ -20 \cdot 10³ buněk splňujících dané parametry. Tato analýza byla použita pro stanovení účinku testovaných látek na zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

3.9 Western blot analýza

3.9.1 Příprava vzorků a stanovení koncentrace proteinů

Buňky byly nasazeny do kultivačních misek (o průměru 100 mm) a ovlivněny testovanými látkami v koncentraci (IC₅₀) po dobu 24 a 48 h. Po uplynutí inkubace bylo médium odsáto, buňky promyty vychlazeným PBS a uchovány při -80°C pro další použití. Buňky byly z povrchu misek uvolněny seškrábáním za pomoci vychlazeného lyzačního pufru (0,3 M TRIS-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NONIDET P-40, Sigma;

10% SDS; 10% deoxycholát sodný, Sigma; deionizovaná voda), ke kterému byly přidány tablety proteázových (7x konc. Roztok, Roche) a fosfatázových inhibitorů (10x konc. roztok, Roche). Buňky byly v lyzačním pufru inkubovány 60 minut při 4°C a každých 15 min vortexovány. Poté byly centrifugovány při 20 000 rpm a 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl přepipetován do čistých eppendorfek.

Koncentrace proteinů z lyzovaných buněk byla stanovena pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Byl připraven roztok Bradfordova činidla (Bio-Rad) s deionizovanou vodou (1:4). Do každé eppendorfky byl přidán 1 ml naředěného Bradfordova činidla a 1 μ l vzorku. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (1 μ g/ μ l BSA) v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7 a 10 μ l na 1 ml Bradfordova činidla. Standardy a vzorky byly přeneseny v tripletech do 96-jamkového panelu a byla změřena absorbance proteinů při 595 nm na spektrofotometru PowerWave XS. Na základě kalibrační křivky standardního roztoku BSA byl následně proveden výpočet obsahu proteinů ve vzorcích. Proteinové lyzáty byly smíchány s 4 \times koncentrovaným LSB pufrem (1 M TRIS pH 6,7, P-Lab; 40% glycerol; 10% SDS; 0,05% bromfenolová modř; 1% β -merkaptoetanol, Sigma) a doplněny do požadovaného objemu 1 \times koncentrovaným LSB pufrem. Vzorky byly připraveny pro gelovou elektroforézu a uchovávány na -20°C.

3.9.2 Elektroforetická separace proteinů

Dvacet až třicet mikrogramů proteinů bylo separováno na 10%, příp. na 12% polyakrylamidovém gelu dle rozpisu Sambrooka a Russela (2001). Gely byly připraveny za použití deionizované vody, směsi akrylamidu-bisakrylamidu (29:1; Serva), 1,5 M TRIS pufru (pH 8,8), 10% SDS, 10% persulfátu amonného (Sigma) a N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED, Promega). Separace byla provedena při konstantním proudu 125 V v pufru obsahujícím 25 mM TRIS, 250 mM glycín (Sigma) a 0,1% SDS (pH 8,3). Pro určení molekulové hmotnosti byl použit hmotnostní marker Full-Range Rainbow (Amersham).

3.9.3 Blotování proteinů na membránu

Přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu Hybon-ECL (Amersham) byl proveden pomocí blotovacího systému Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell při konstantním proudu 10 V po dobu 30-45 minut v transferovém pufru (39 mM glycin; 48 mM TRIS-báze; 0,037% SDS a 20% metanol). Membrána byla poté obarvena pomocí Ponceau S (Sigma) po dobu 5 minut na třepačce a promyta v deionizované vodě pro kontrolu kvality a množství proteinů přenesených na membránu.

3.9.4 Imunodetekce

Membrána byla nařezána na části podle molekulových hmotností sledovaných proteinů, ty byly opláchnuty v PBS a blokovány v 5% blokovacím mléku (sušené odtučněné mléko Laktino, 1,3 % tuku, PML; PBS; 0,1% Tween 20, Sigma), příp. 5% BSA naředěném v TBS-T (0,01 mM TRIS; 0,0137 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,6). Poté byly na membrány nanесeny primární protilátky (Tab. 2) naředěné do 5% mléka (sušené odtučněné mléko 1,3 % tuku; PBS), popř. v 5% BSA, jejichž inkubace probíhala přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly membrány promývány po dobu 60 minut v PBS-T (PBS; 0,1% Tween 20), příp. v TBS-T a každých 15 minut byl roztok vyměňován za čistý. Poté byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou při laboratorní teplotě 45 minut ve vlhké komůrce. Následně byly membrány promývány v PBS-T (popř. TBS-T) 60 minut za 15-ti minutové výměny promývacího pufru. Proteiny byly detekovány chemiluminiscenčním systémem DURO (1:1; Amersham), popř. FEMTO (1:1; Amersham), přičemž signál byl zachycen na fotografický film a vyvolán ve fotokomoře pomocí fotochemických roztoků – vývojka (Kodak), přerušovač (1% roztok kyseliny octové) a ustalovač (Kodak). Stejně množství proteinů ve vzorcích bylo ověřeno detekcí mcm-7, příp. α -tubulinu.

3.10 Fluorescenční imunocytochemická detekce

Buňky LNCaP a DU-145 byly nasazeny na kulatá krycí sklíčka a pěstovány v příslušném médiu v kultivačních miskách (o průměru 60 mm). Po 24 h/48 h inkubaci bylo médium odsáto, buňky propláchnuty PBS a přidáno médium obsahující určitou koncentraci (IC_{50}) testovaných látek, po dobu 24 h a 48h. Po ovlivnění bylo médium s látkou odsáto a buňky byly promyty PBS a fixovány vychlazeným roztokem aceton/metanol (1:1) po dobu 10 minut. Po fixaci byly buňky zavodněny pomocí PBS

a blokovány pomocí 1% BSA při pokojové teplotě 30 minut. Na sklíčko byla následně nanášena primární protilátka (Tab. 2) a inkubace proběhla ve tmě ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Po promytí pomocí PBS byla nanášena sekundární protilátka na 90 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po promytí pomocí PBS byla všechna buněčná jádra dobarvena 50 µg/ml DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol; Sigma) 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po promytí v PBS a následně v deionizované vodě byla sklíčka namontována na podložní skla pomocí vodného média mowiolu (Calbiochem). Detekce byla provedena na fluorescenčním mikroskopu, kde byla porovnávána exprese a lokalizace jaderných receptorů v buňkách kontrolních a ovlivněných testovanými látkami.

3.11 TUNEL assay

Tato metoda byla použita pro detekci apoptotických buněk u prostatických nádorových linií LNCaP a DU-145 po ovlivnění testovanými látkami. Buňky pro tuto metodu byly připraveny a nasazeny na kulatá krycí sklíčka stejným způsobem jako pro fluorescenční barvení (viz kapitola 3.10) a fixovány vychlazeným roztokem aceton/metanol (1:1) po dobu 10 minut. Takto připravená skla byla zavodněna pomocí PBS a inkubována ve vychlazeném permeabilizačním roztoku (0,1% Triton X-100 a 0,1% citrát sodný v PBS) po dobu 2 minut při 4°C. Dále byla skla opláchnuta v PBS a byla na ně aplikována reakční směs (In Situ Cell Death Detection KIT, Roche) složená z enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT) a tunel značící směsi fluorescenčně značených nukleotidů v poměru 1:9. Inkubace probíhala při 37°C po dobu 60 minut ve tmě. Poté byla skla opět opláchnuta pomocí PBS a jádra buněk dobarvena 50 µg/ml DAPI po dobu 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po následném oplachu deionizovanou vodou byla skla zamontována do vodného média mowiol a byla provedena analýza na fluorescenčním mikroskopu. Metoda TUNEL je založena na vazbě enzymu TdT na volné 3'-OH konce DNA, kde tento enzym syntetizuje polymer obsahující fluorescenčně značený deoxynukleotid.

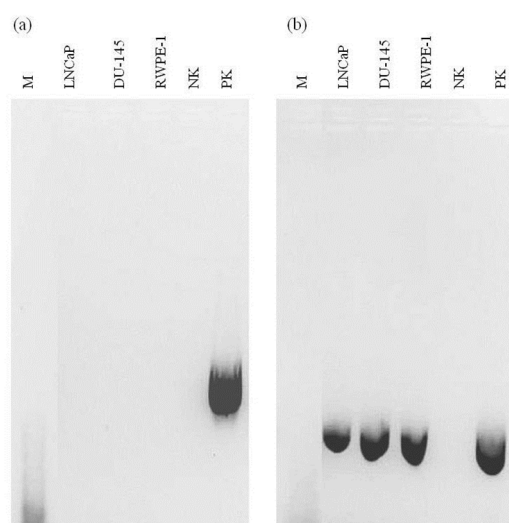
3.12 Statistická analýza dat

Všechny experimenty byly minimálně třikrát nezávisle zopakovány. Z každé série dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno Studentovým t-testem a v programu MS Excel 2000 (Microsoft, USA).

4. VÝSLEDKY

4.1 Stanovení čistoty buněčných linií

Před samotným testováním látek byla provedena u všech buněčných linií detekce mykoplazmy pomocí PCR metody. Všechny tři buněčné linie byly mykoplasma negativní (Obr. 11a), přičemž jako pozitivní kontrola byl použit vzorek plicní nádorové linie CALU-1 mykoplasma pozitivní a do negativní kontroly byla místo vzorku aplikována voda. Expres β -actinu byla použita jako vnitřní kontrola (Obr. 11b).

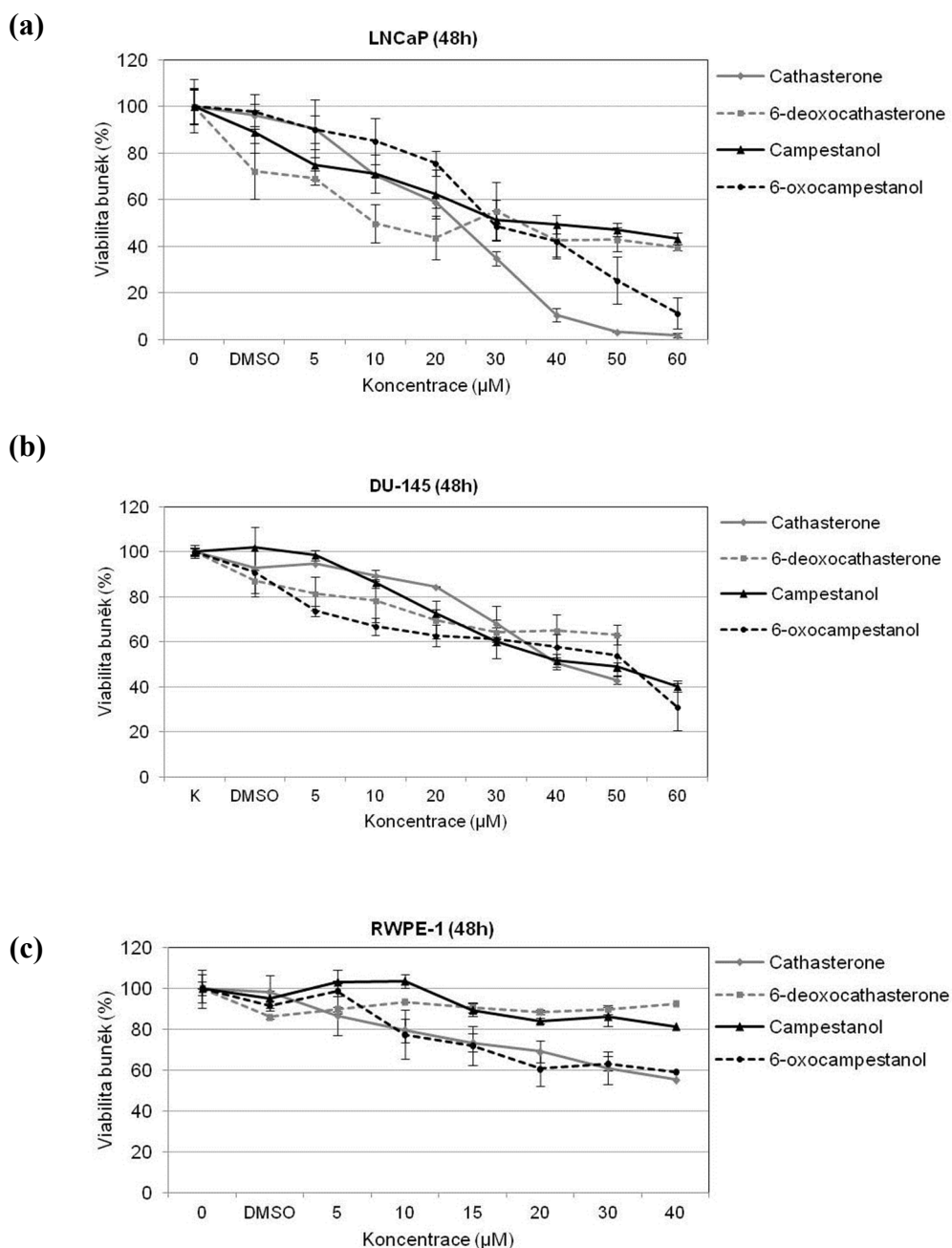


Obr. 11: Detekce (a) mykoplazmy a (b) β -actinu u buněk LNCaP, DU-145 a RWPE-1. M – DNA marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola.

4.2 Účinek brassinosteroidů na prostatické buněčné linie

4.2.1 Vliv brassinosteroidů na buněčnou viabilitu

Byl proveden MTT test buněčné viability se čtyřmi přírodními brassinosteroidy - Cathasteronem, 6-deoxocathasteronem, Campestanolem a 6-oxocampestanolem na buněčných liniích odvozených od karcinomu prostaty LNCaP a DU-145. Jejich účinek byl porovnáván s účinkem látek na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Výsledky testu jsou uvedeny v grafech na Obr. 12. Všechny testované brassinosteroidy v určité míře inhibovaly viabilitu nádorových buněk. U nenádorové linie RWPE-1 byl pozorován jen minimální pokles buněčné viability. Největší inhibiční účinek na nádorové buněčné linie LNCaP a DU-145 měly látky Cathasteron a 6-oxocampestanol, které byly použity v dalších experimentech.

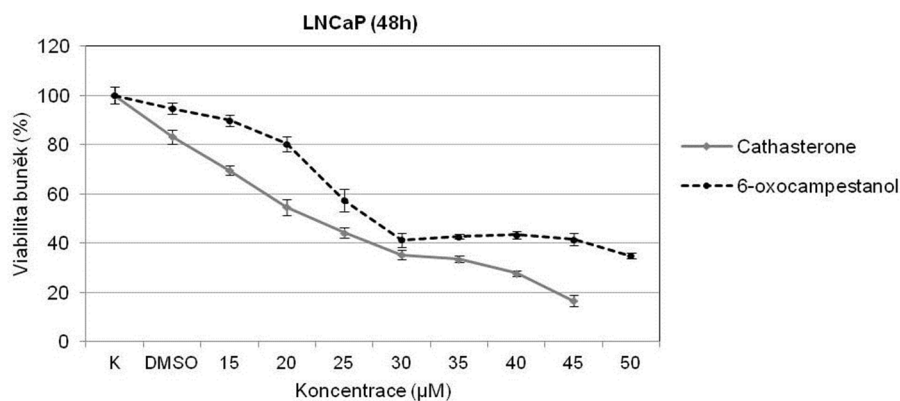


Obr. 12: Vliv testovaných brassinosteroidů v koncentracích 5 – 60 µM po dobu 48 h na buněčnou viabilitu buněk **(a)** LNCaP, **(b)** DU-145 a **(c)** RWPE-1.

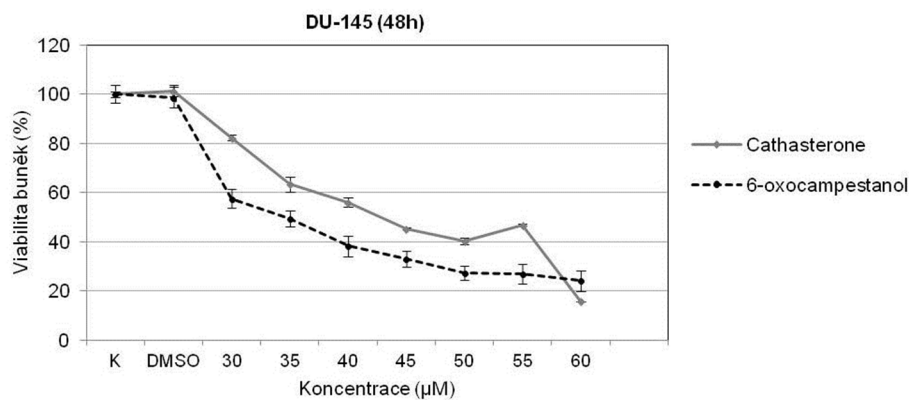
Na základě MTT testu byla určena koncentrace IC_{50} vybraných látek u buněk LNCaP a DU-145 (Obr. 13). Ta byla stanovena pro Cathasteron 20 µM a 6-oxocampestanol 25 µM u buněk LNCaP a pro Cathasteron 40 µM a 6-oxocampestanol 30 µM u buněk DU-145. Tyto koncentrace IC_{50} byly použity pro další experimenty v časovém intervalu 24 a 48 h.

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejcitlivější na účinek testovaných brassinosteroidů byly buňky LNCaP a látka Cathasteron měla u obou nádorových linií větší inhibiční účinek než ostatní. Morfologické změny buněk (LNCaP, DU-145) po 24 h ovlivnění Cathasteronem a 6-oxocampestanolem (IC_{50}) jsou znázorněny na Obr. 14 a 15 vzhledem k neovlivněné kontrole.

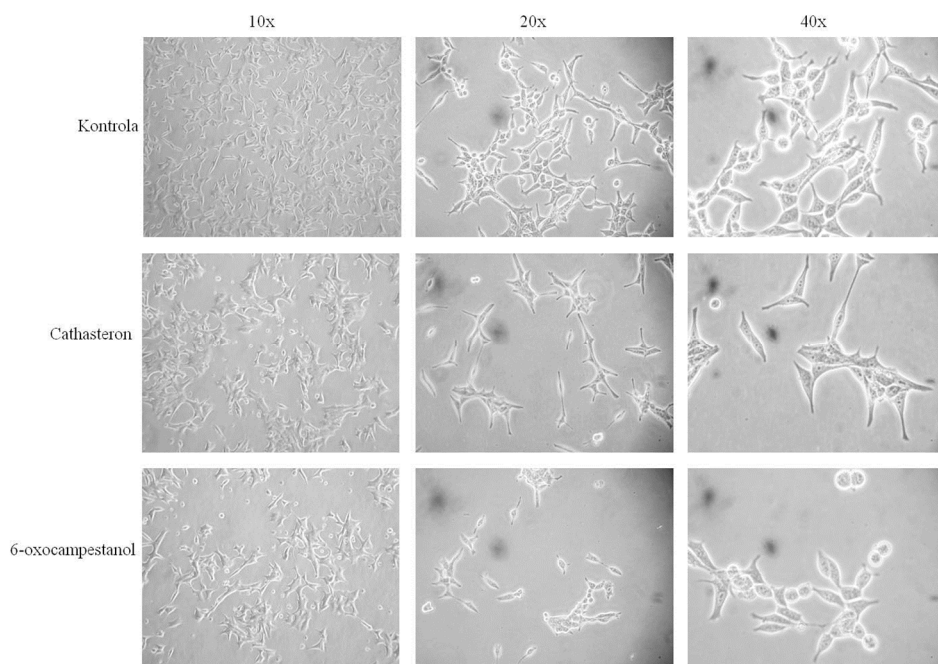
(a)



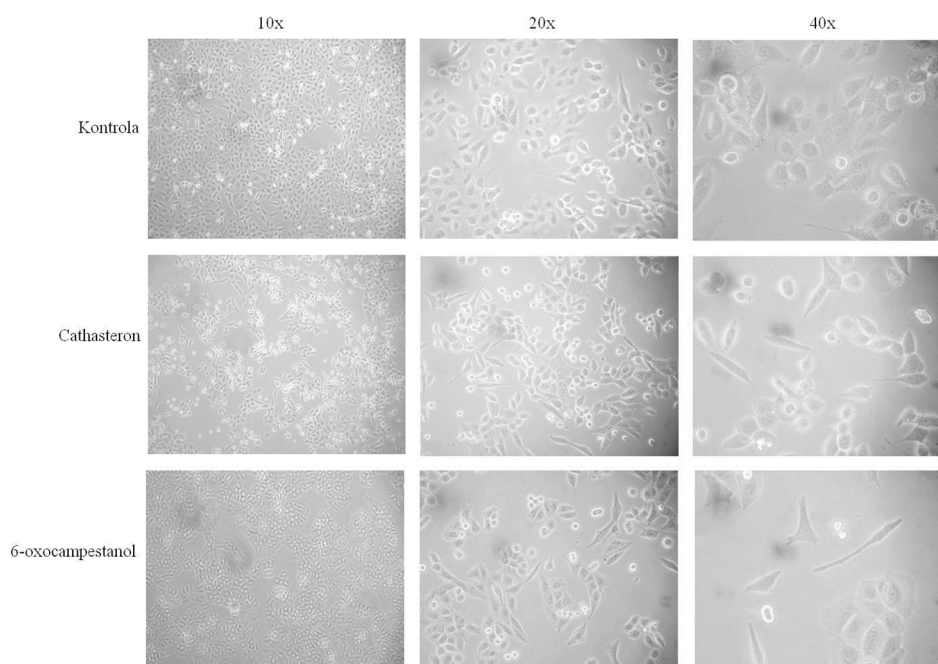
(b)



Obr. 13: Vliv vybraných brassinosteroidů Cathasteronu a 6-xocampestanolu v koncentračním rozmezí 15 – 60 μM po dobu 48 h na buněčnou viabilitu buněk (a) LNCaP a (b) DU-145.



Obr. 14: Morfologické změny buněk po ovlivnění Cathasteronem a 6-oxocampestanolem (IC_{50} ; 24 h) u buněčné linie LNCaP vzhledem k neovlivněným kontrolním buňkám. Zvětšení 10x, 20x a 40x.

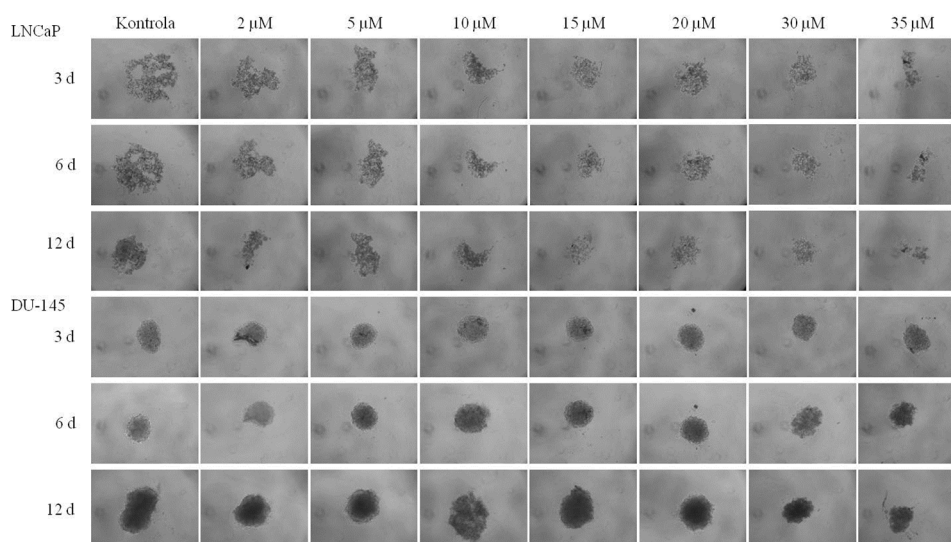


Obr. 15: Morfologické změny buněk po ovlivnění Cathasteronem a 6-oxocampestanolem (IC_{50} ; 24 h) u buněčné linie DU-145 vzhledem k neovlivněným kontrolním buňkám. Zvětšení 10x, 20x a 40x.

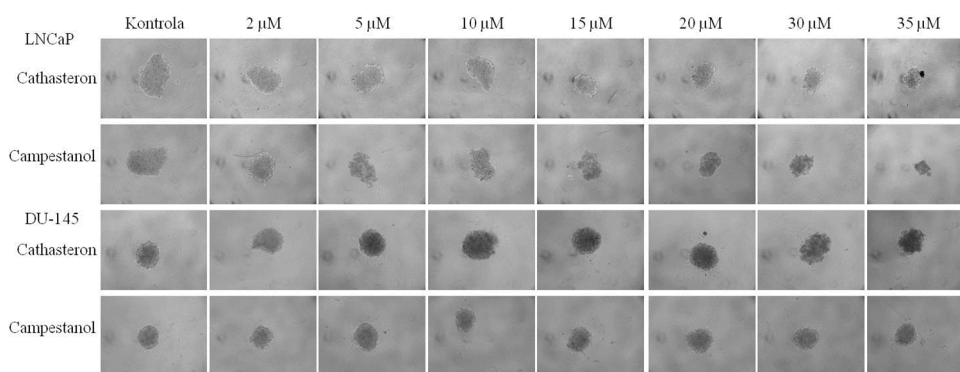
4.2.2 Vliv brassinosteroidů na buněčné sféry

Byl pozorován vliv nejúčinnějšího brassinosteroidu Cathasteronu na buněčnou integritu sfér nádorových prostatických linií LNCaP a DU-145 po dobu 3, 6 a 12 dní v rozmezí koncentrací 2 – 35 μM vzhledem k neovlivněným kontrolám (Obr. 16). U linie LNCaP byl pozorovatelný rozpad buněčných sfér v závislosti na koncentraci i čase působení. Při nejvyšší koncentraci 35 μM byla buněčná integrita sfér nejnižší v porovnání s kontrolními. Buněčné sféry linie DU-145 byly vůči látkám odolnější a svůj tvar i velikost ani po ovlivnění nejvyšší koncentrací Cathasteronu po celou dobu experimentu téměř nezměnily.

Obr. 17 vystihuje porovnání účinku Cathasteronu jako nejúčinnější látky z testovaných brassinosteroidů a Campestanolu, jehož účinek byl na buněčnou viabilitu nejmenší na základě MTT testu u obou linií. Sféry linie LNCaP byly k testovaným látkám po 3 dnech působení citlivější než DU-145 a při zvyšující se koncentraci použitých brassinosteroidů se začaly postupně zmenšovat a rozpadat a při nejvyšší koncentraci 35 μM měly již malou velikost oproti kontrolním sférám. Buněčné sféry linie DU-145 byly vůči látkám odolnější a svůj tvar a velikost ani po ovlivnění nejvyšší koncentrací látek téměř nezměnily.



Obr. 16: Vliv Cathasteronu na integritu buněčných sfér linií LNCaP a DU-145 po dobu 3 – 12 dní v různých koncentracích (2 – 35 μM) vzhledem k neovlivněným kontrolním buňkám. Zvětšení 10x.



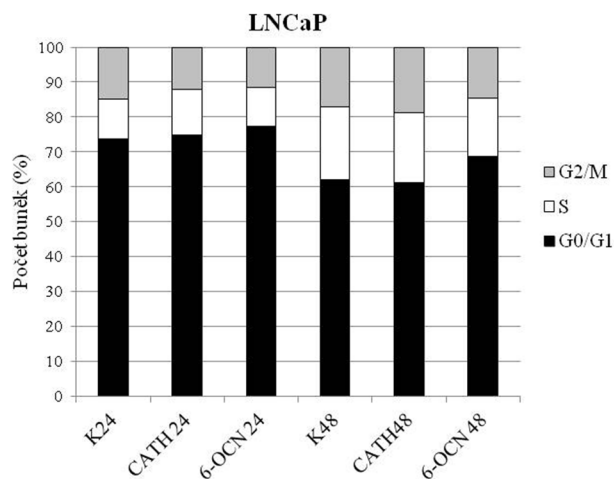
Obr. 17: Vliv Cathasteronu a Campestanolu na integritu buněčných sfér linií LNCaP a DU-145 v koncentracích (2 – 35 μM) po dobu 3 dnů vzhledem k neovlivněným kontrolním buňkám. Zvětšení 10x.

4.2.3 Vliv brassinosteroidů na buněčný cyklus

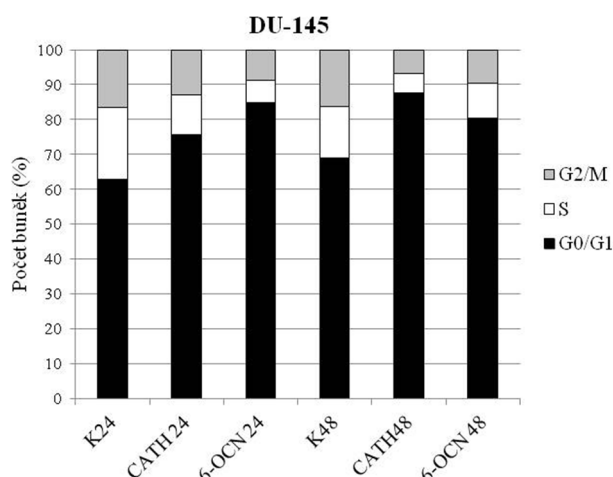
4.2.3.1 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

Vzhledem k tomu, že testované brassinosteroidy mohou u prostatických buněčných linií modulovat buněčný cyklus, analyzovali jsme zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. U buněk LNCaP testované látky neměly výraznější účinky na změnu buněčného cyklu, pouze mírně zvyšovaly zastoupení buněk v G1 fázi po 24 a 48 h působení (Obr. 18a). U buněk DU-145 byly detekovány změny v procentuálním zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, oba typy brassinosteroidů způsobily výraznou akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu v obou časových intervalech (Obr. 18b).

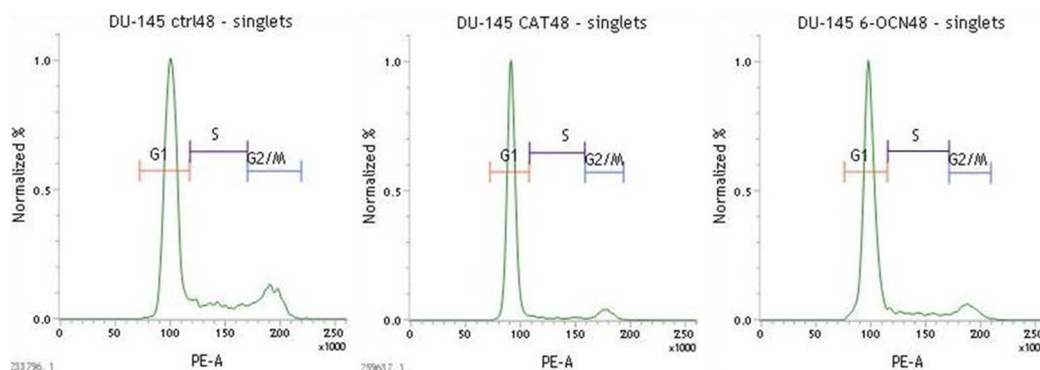
(a)



(b)



(c)



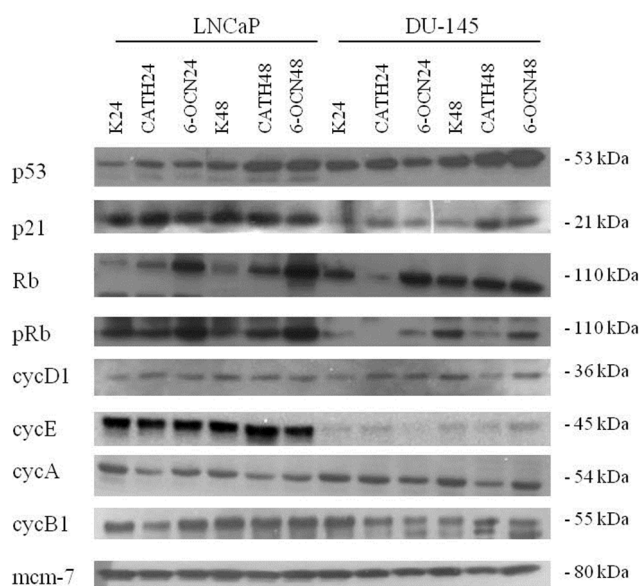
Obr. 18: Analýza buněčného cyklu u buněk (a) LNCaP a (b) DU-145 po ovlivnění testovanými látkami Cathasteronem (CATH) a 6-oxocampestanolem (6-OCN) v IC_{50} koncentraci po dobu 24 h a 48 h vzhledem k neovlivněným kontrolním buňkám (K). (c) reprezentativní histogram buněčného cyklu u buněk DU-145 po 48 h aplikaci testovaných látek.

4.2.3.2 Expres proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu

Expres proteinů regulujících buněčný cyklus byla vyjádřena pomocí Western blot analýzy. Testované látky Cathasteron a 6-oxocampestanol byly v koncentraci IC_{50} inkubovány po dobu 24 h a 48 h s buňkami LNCaP a DU-145. Jako kontrola pro porovnání exprese byly použity neovlivněné buňky. Expres proteinů p53 (53 kDa), p21 (21 kDa), Rb (110 kDa), pRb (110 kDa), cyklin D1 (36 kDa), cyklin E (45 kDa), cyklin A (54 kDa), cyklin B1 (55 kDa) a mcm-7 (80 kDa) je znázorněna na Obr. 19.

Linie LNCaP nemá mutovaný tumor supresorový gen p53, má pouze nemutovaný typ p53 (wild type), zatímco buněčná linie DU-145 exprimuje mutovaný

p53. Expresse proteinu p53 se zvýšila u obou linií po ovlivnění Cathasteronem i 6-oxo-campestanolem, kdy větší nárůst v expresi byl pozorován po 48 h ovlivnění. U hladiny exprese proteinu p21 došlo k nárůstu po ovlivnění látek u buněk LNCaP po 24 h a u buněk DU-145, kdy je nárůst lépe viditelný po 48 h. U buněčné linie LNCaP došlo ke zvýšení exprese nádorového supresoru Rb pod vlivem obou brassinosteroidů, výraznější zvýšení bylo pozorováno u 6-oxocampestanolu. Ke zvýšení exprese fosforylované formy proteinu pRb došlo u linie LNCaP po ovlivnění zejména látkou 6-oxocampestanol, zatímco u linie DU-145 byl pozorován pokles hladiny proteinu oproti kontrole po ovlivnění Cathasteronem. Proteiny cyklin A a cyklin B1 vykazovaly snížení své exprese u buněk LNCaP po aplikaci látky Cathasteron v obou časových intervalech a u buněk DU-145 byl sledován pokles cyklinu A vlivem Cathasteronu a ke snížení hladiny cyklinu B1 vlivem obou látek. Výrazné změny hladin proteinů cyklin D1 a cyklin E u linie LNCaP nebyly pozorovány, ale u buněk DU-145 byl zaznamenán slabý pokles obou cyklinů. Protein mcm-7 byl použit jako interní kontrola množství proteinů.

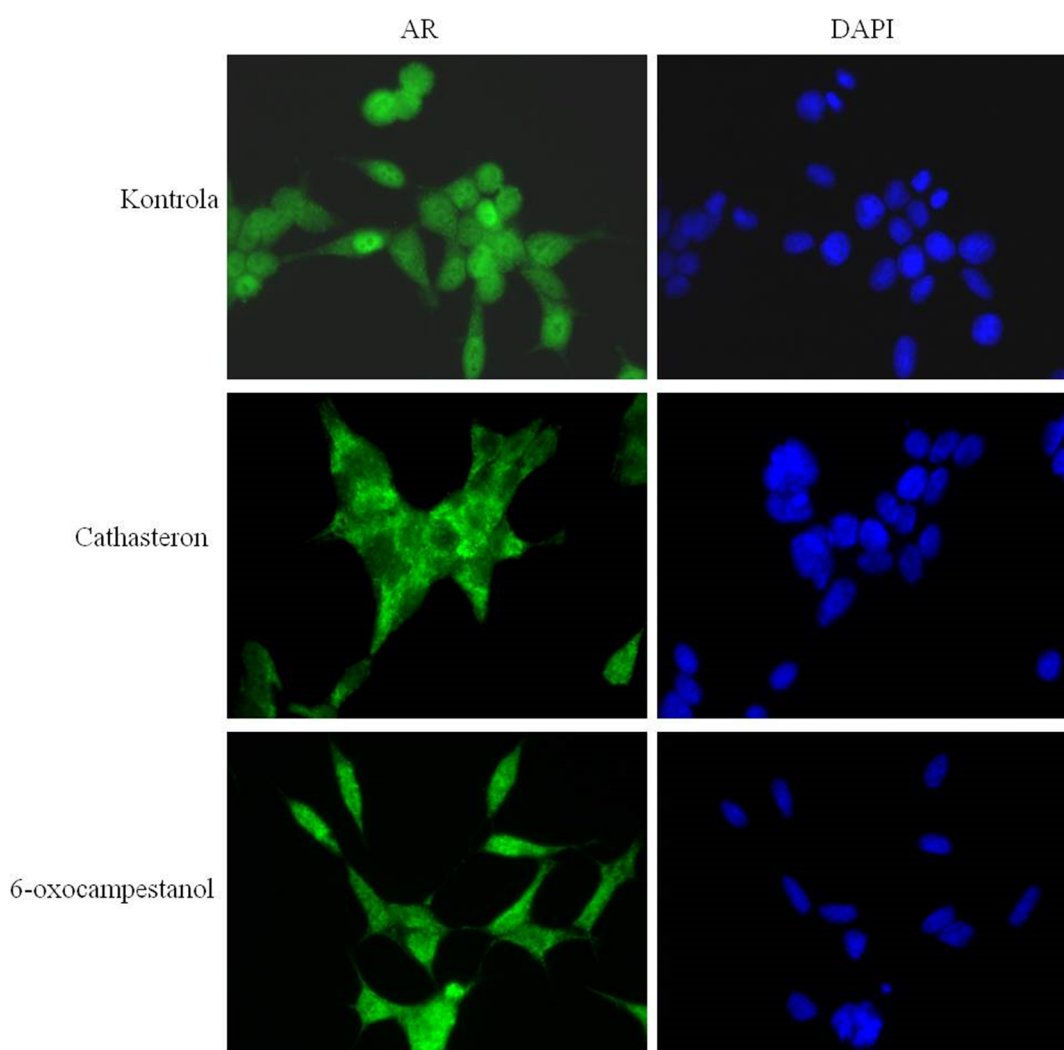


Obr. 19: Vliv Cathasteronu (CATH) a 6-oxocampestanolu (6-OCN) na expresi proteinů regulujících buněčný cyklus u linií LNCaP a DU-145. Ovlivnění buněk probíhalo po dobu 24 h a 48 h při IC₅₀ koncentraci obou látek. Expresse proteinů byla porovnáována s kontrolními neovlivněnými buňkami (K).

4.2.4 Vliv brassinosteroidů na expresi receptorů pro steroidní hormony

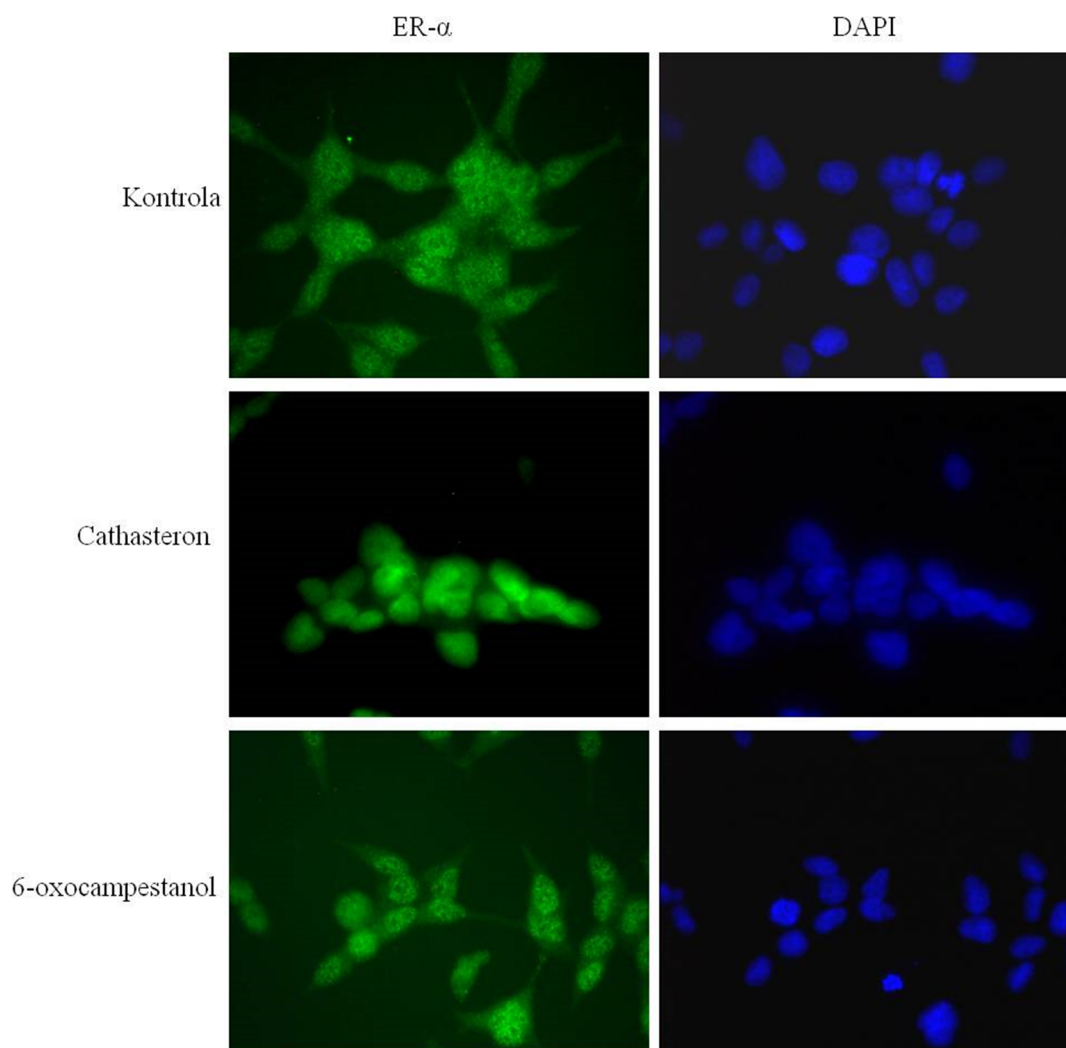
4.2.4.1 Expresce receptorů pro steroidní hormony

Pro sledování lokalizace a exprese proteinů receptorů pro steroidní hormony bylo využito imunofluorescenční barvení a následná detekce fluorescenční mikroskopií. Expresce androgenového receptoru (AR) byla prokázána v jádrech kontrolních buněk linie LNCaP. Ovlivnění látkou Cathasteron vyvolalo nahromadění receptoru v cytoplazmě okolo jader buněk a 6-oxocampestanol vyvolal translokaci AR do cytoplazmy buněk (Obr. 20).



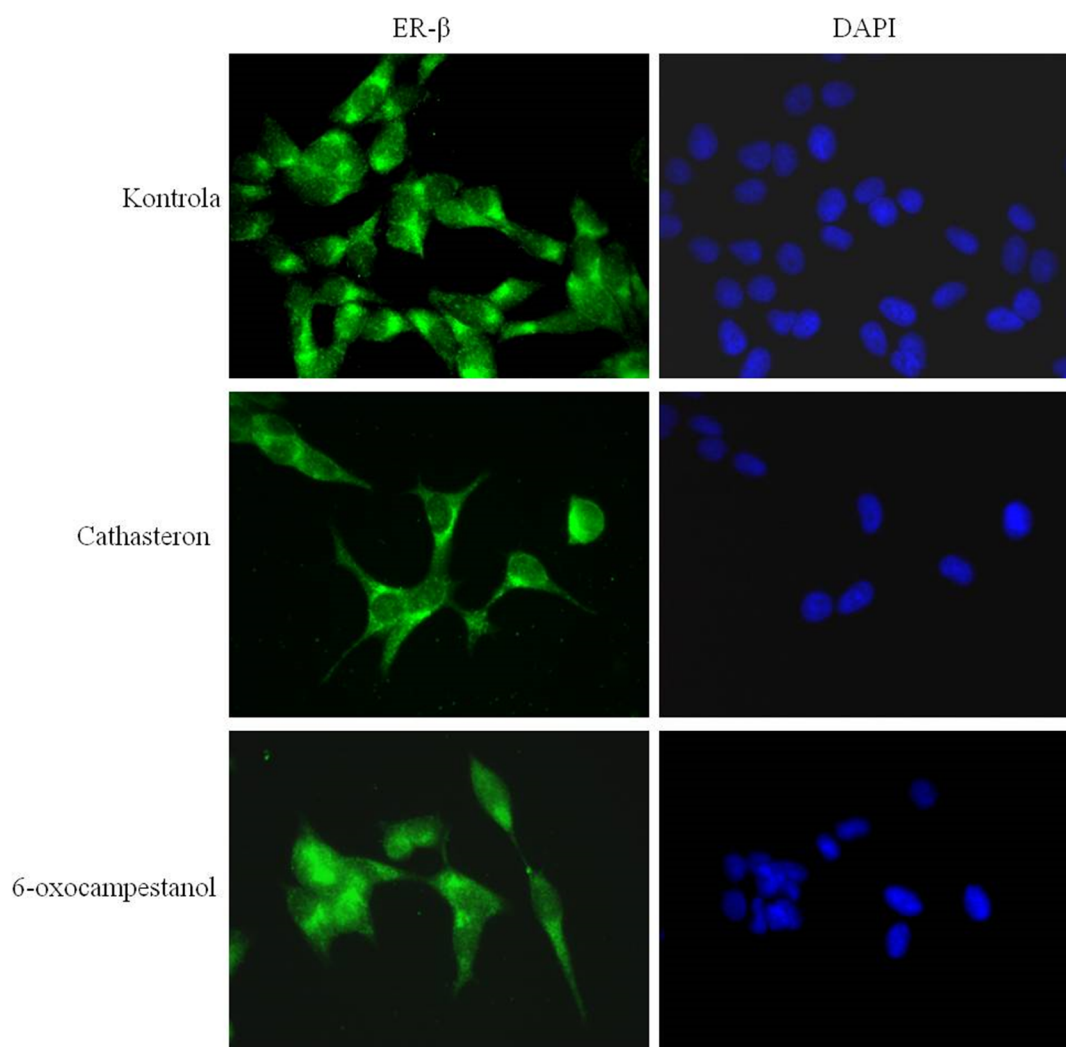
Obr. 20: Imunofluorescenční barvení AR v buňkách LNCaP ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (20 μ M, 24 h) a 6-oxocampestanol (35 μ M, 24 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Expresi estrogenového receptoru α (ER- α) byla prokázána v jádře i cytoplazmě kontrolních buněk LNCaP. Po ovlivnění buněk látkou Cathasteron došlo ke zvýšené expresi ER- α v jádře, zatímco v cytoplazmě exprimován nebyl. Vlivem 6-oxocampestanolu nebyla pozorována žádná změna exprese oproti kontrole (Obr. 21).



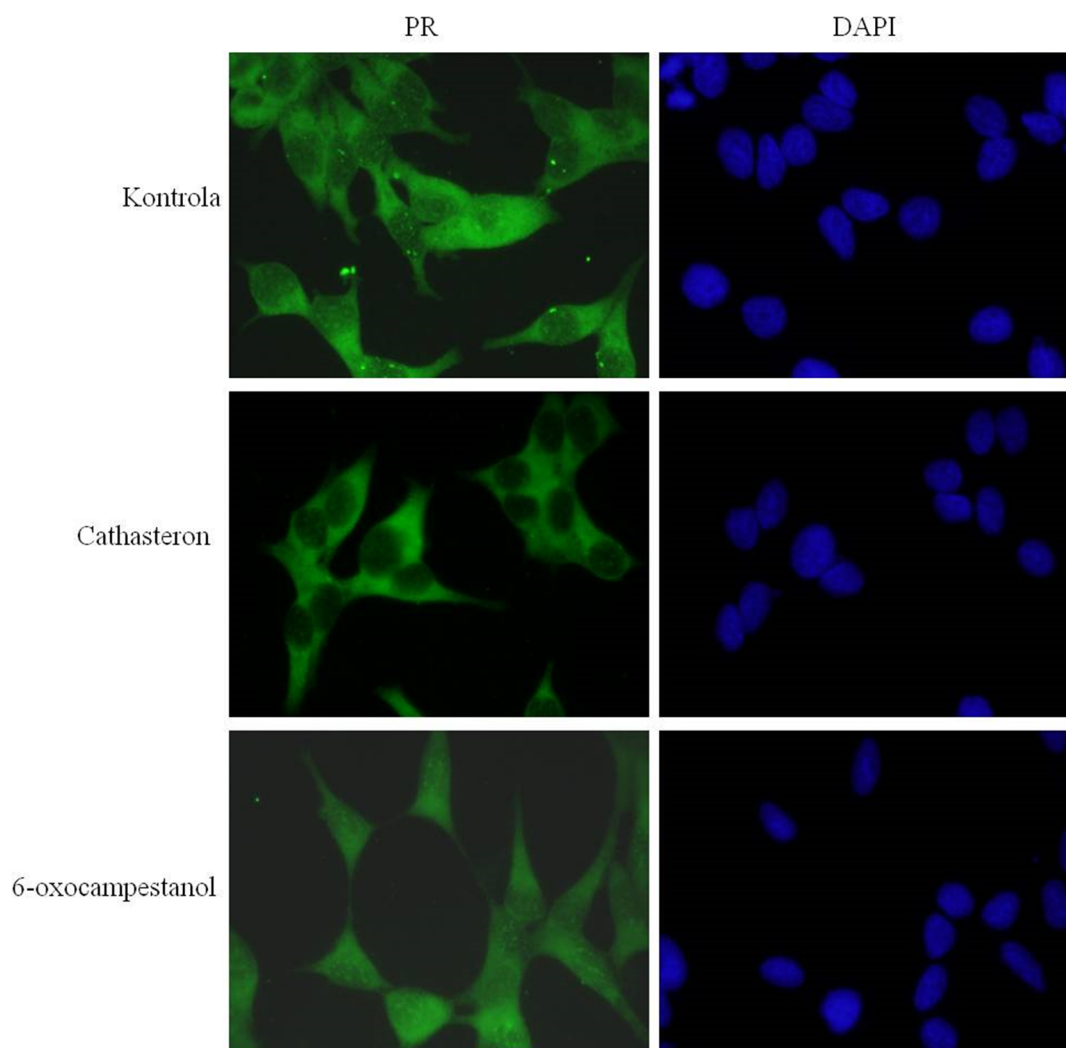
Obr. 21: Imunofluorescenční barvení ER- α v buňkách LNCaP ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (20 μ M, 24 h) a 6-oxocampestanol (25 μ M, 48 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Výsledky imunofluorescenční metody prokázaly expresi estrogenového receptoru β (ER- β) v jádře a cytoplasmě převážně u pólů kontrolních buněk LNCaP. Cathasteron vyvolal nahromadění receptoru na povrch jaderné membrány. Vlivem 6-oxocampestanolu se ER- β exprimoval podobně jako u kontrolních buněk (Obr. 22).



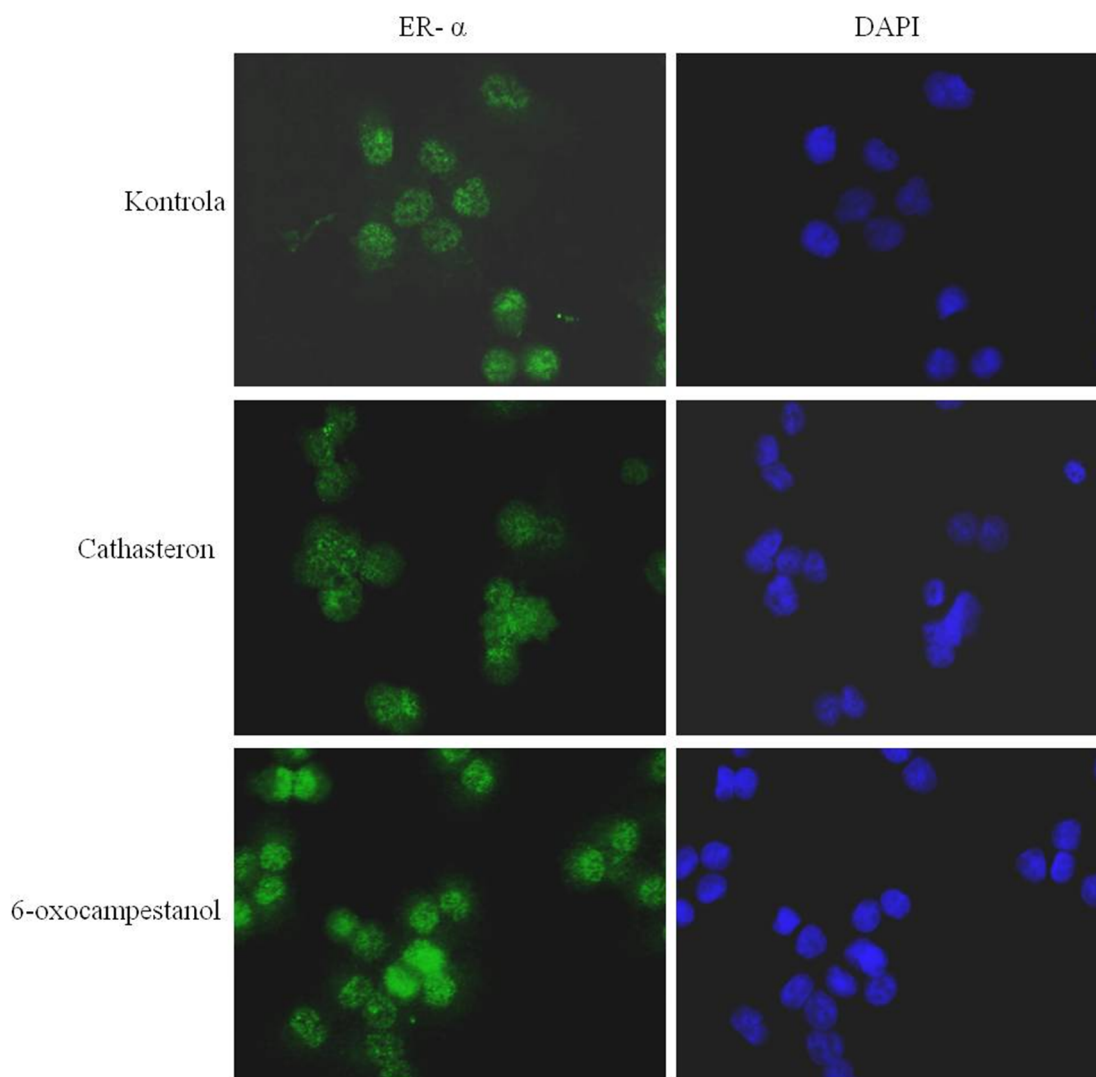
Obr. 22: Imunofluorescenční barvení ER- β v buňkách linie LNCaP ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (20 μ M, 24 h) a 6-oxocampestanol (25 μ M, 48 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Expres progesteronového receptoru (PR) byla prokázána v cytoplazmě a částečně v jádře u buněk kontroly LNCaP. Na Obr. 23 je znázorněna lokalizace PR pouze v cytoplazmě po ovlivnění látkou Cathasteron a exprese receptoru rovnoměrně rozptýlena v cytoplazmě i jádře vlivem 6-oxocampestanolu.



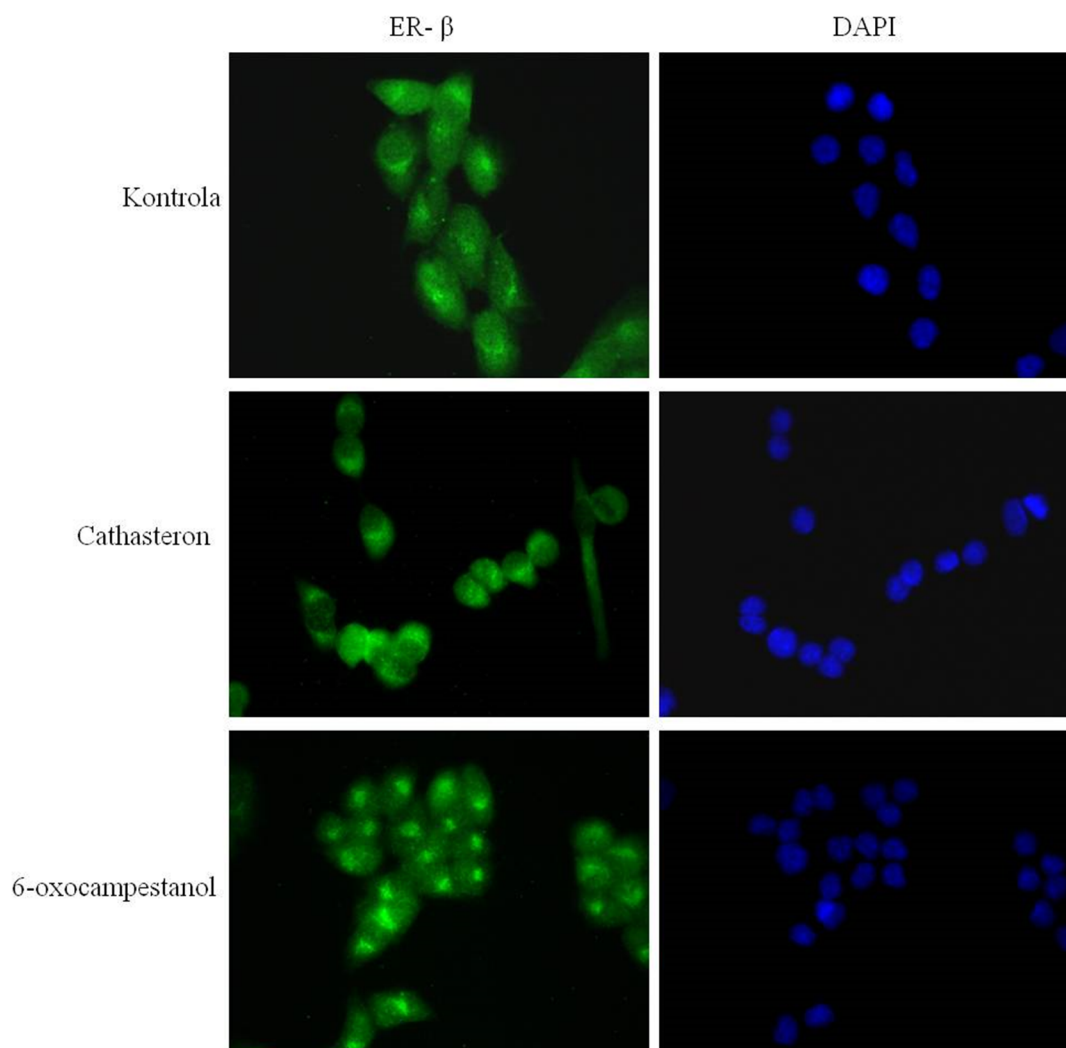
Obr. 23: Imunofluorescenční barvení PR v buňkách LNCaP ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (20 μM , 24 h) a 6-oxocampestanol (25 μM , 24 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

U buněk DU-145 nebyla imunofluorescenční metodou detekována exprese AR u kontrolních ani ovlivněných buněk. Velmi slabá jaderná exprese ER- α byla zjištěna u kontrolních i ovlivněných buněk Cathasteronem. U buněk ovlivněných 6-oxocampestanolem byla jaderná exprese ER- α zvýšená vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám (Obr. 24).



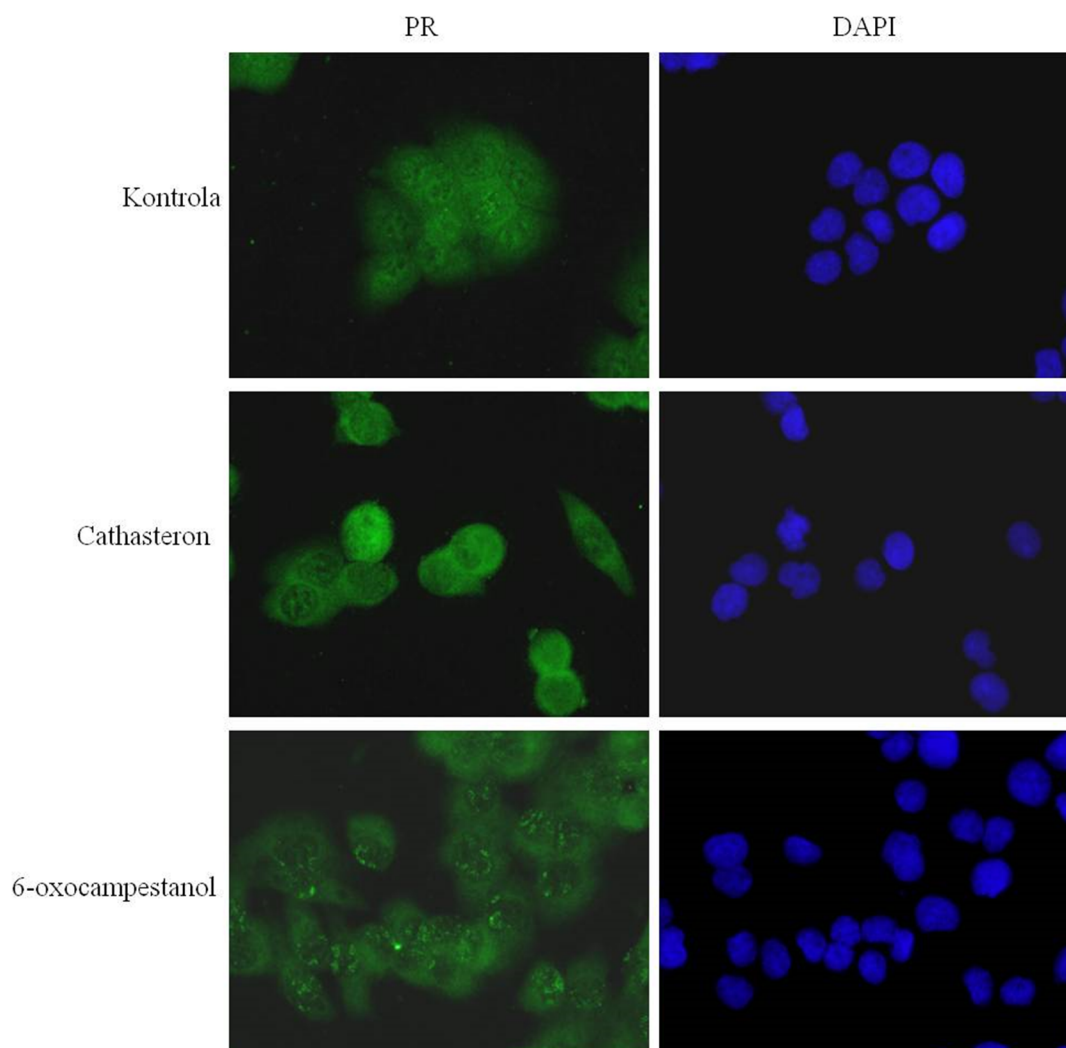
Obr. 24: Imunofluorescenční barvení ER- α u buněk DU-145 ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (40 μ M, 24 h) a 6-oxocampestanol (30 μ M, 24 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Expres ER- β byla u buněk DU-145 prokázána v cytoplazmě převážně u jaderné membrány a v jádře kontrolních buněk. Obr. 25 znázorňuje zvýšenou expresi ER- β u jaderné membrány po ovlivnění látkou Cathasteron a 6-oxocampestanol vyvolal translokaci a nahromadění receptoru do jader buněk.



Obr. 25: Imunofluorescenční barvení ER- β v buňkách DU-145 ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (40 μ M, 24 h) a 6-oxocampestanol (30 μ M, 24 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

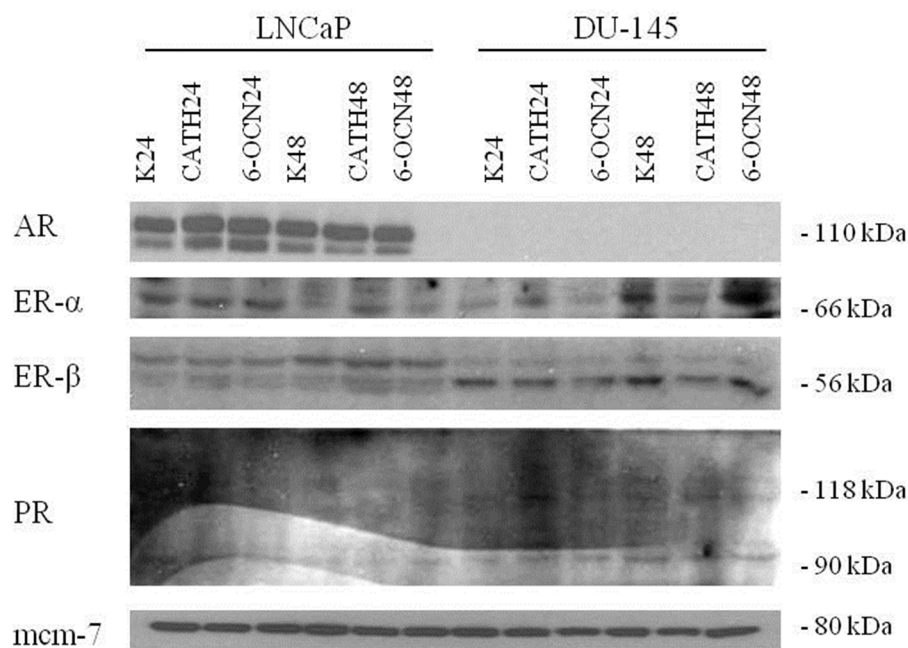
Expres PR byla u kontrolních buněk DU-145 prokázána v cytoplasmě. Po ovlivnění látkou Cathasteron došlo ke zvýšení exprese receptoru v jádrech. Buňky po aplikaci 6-oxocampestanolu vykazovaly výraznou difúzní jadernou lokalizaci PR (Obr. 26).



Obr. 26: Imunofluorescenční barvení PR v buňkách DU-145 ovlivněných brassinosteroidy Cathasteron (40 μM , 24 h) a 6-oxocampestanol (30 μM , 24 h). Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

4.2.4.2 Expres proteinů podílejících se na expresi receptorů pro steroidní hormony

Expres receptorů pro steroidní hormony byla také u buněk LNCaP a DU-145 sledována pomocí Western blot analýzy (Obr. 27). Jednalo se o proteiny pro androgenový receptor (AR, 110 kDa), estrogenový receptor α (ER- α , 66 kDa), estrogenový receptor β (ER- β , 56 kDa) a progesteronový receptor (PR, 118 kDa). Protein mcm-7 byl použit jako interní kontrola množství proteinů vzorku. Buňky byly ovlivňovány látkami Cathasteronem a 6-oxocampestanolem v koncentraci IC₅₀ po dobu 24 h a 48 h. U buněk LNCaP byla zaznamenána slabě zvýšená exprese AR po ovlivnění oběma typy brassinosteroidů, buňky linie DU-145 tento receptor neexprimují. Vliv testovaných látek na expresi ER- α byl prokázán u buněk LNCaP i DU-145. Aplikace Cathasteronu vedla po 48 h ke zvýšení hladiny ER- α oproti kontrole u buněk LNCaP a u DU-145 naopak došlo ke snížení exprese receptoru. Na základě Western blot analýzy nebyl zjištěn vliv brassinosteroidů na expresi ER- β ani PR u obou linií.

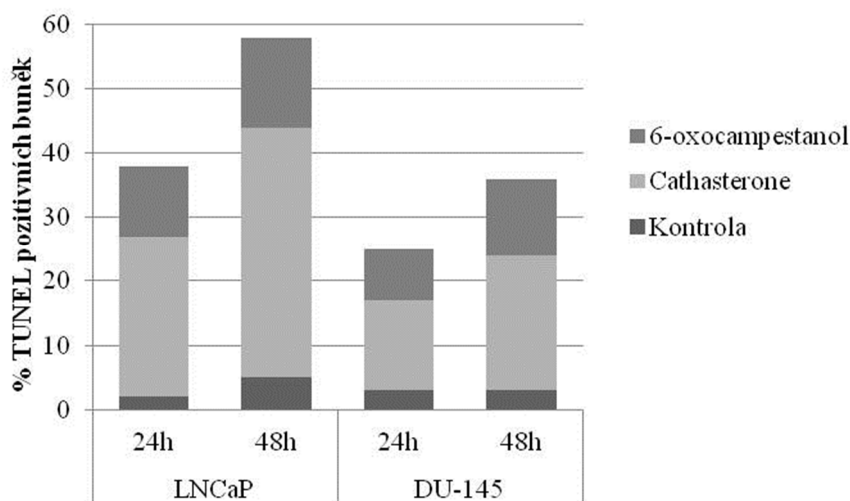


Obr. 27: Vliv brassinosteroidů Cathasteronu (CATH) a 6-oxocampestanolu (6-OCN) na expresi AR, ER- α , ER- β a PR u buněčných linií LNCaP a DU-145. Buňky byly ovlivňovány látkami v IC₅₀ koncentraci po dobu 24 h a 48 h. Expres proteinů byla porovnávána s kontrolními neovlivněnými buňkami (K).

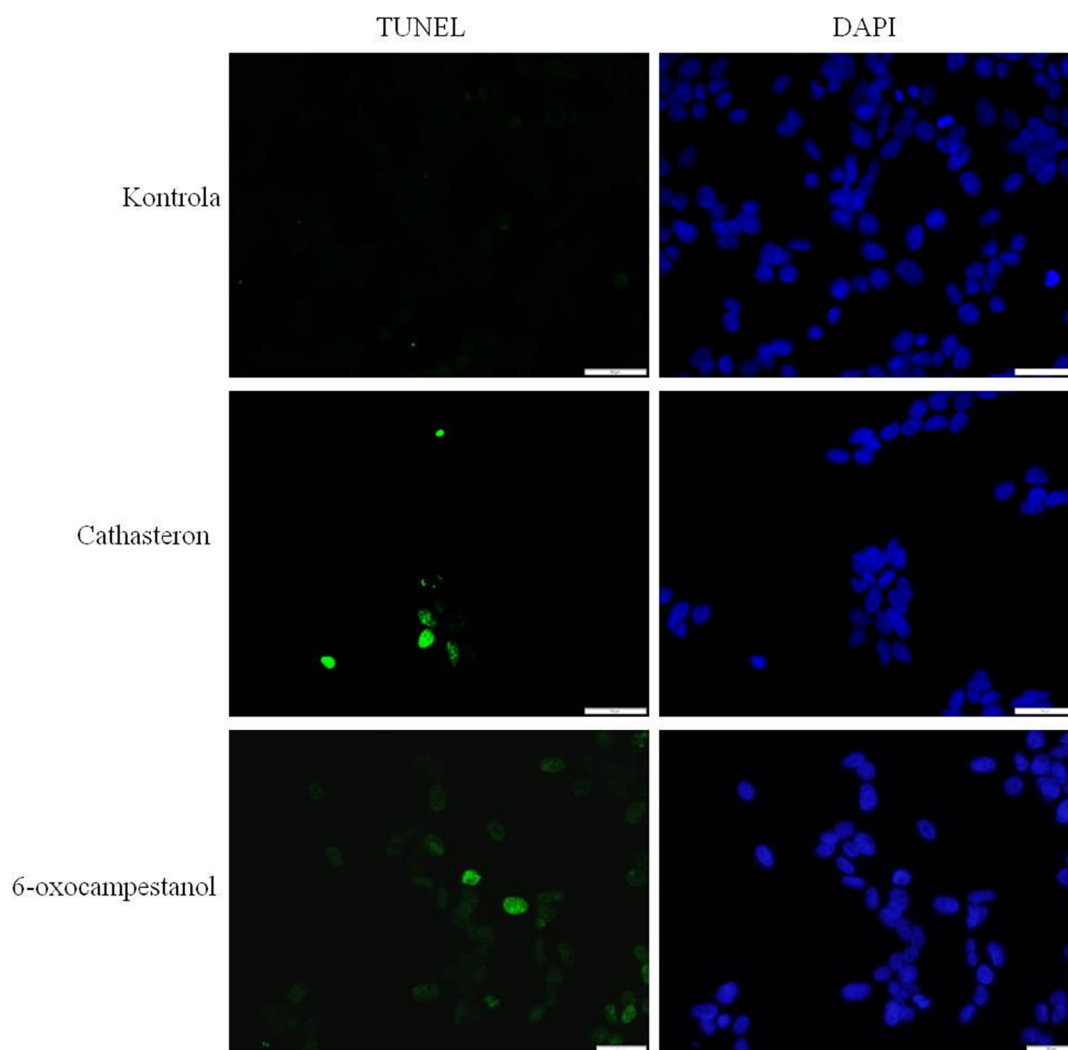
4.2.5 Vliv brassinosteroidů na indukci apoptózy

4.2.5.1 TUNEL

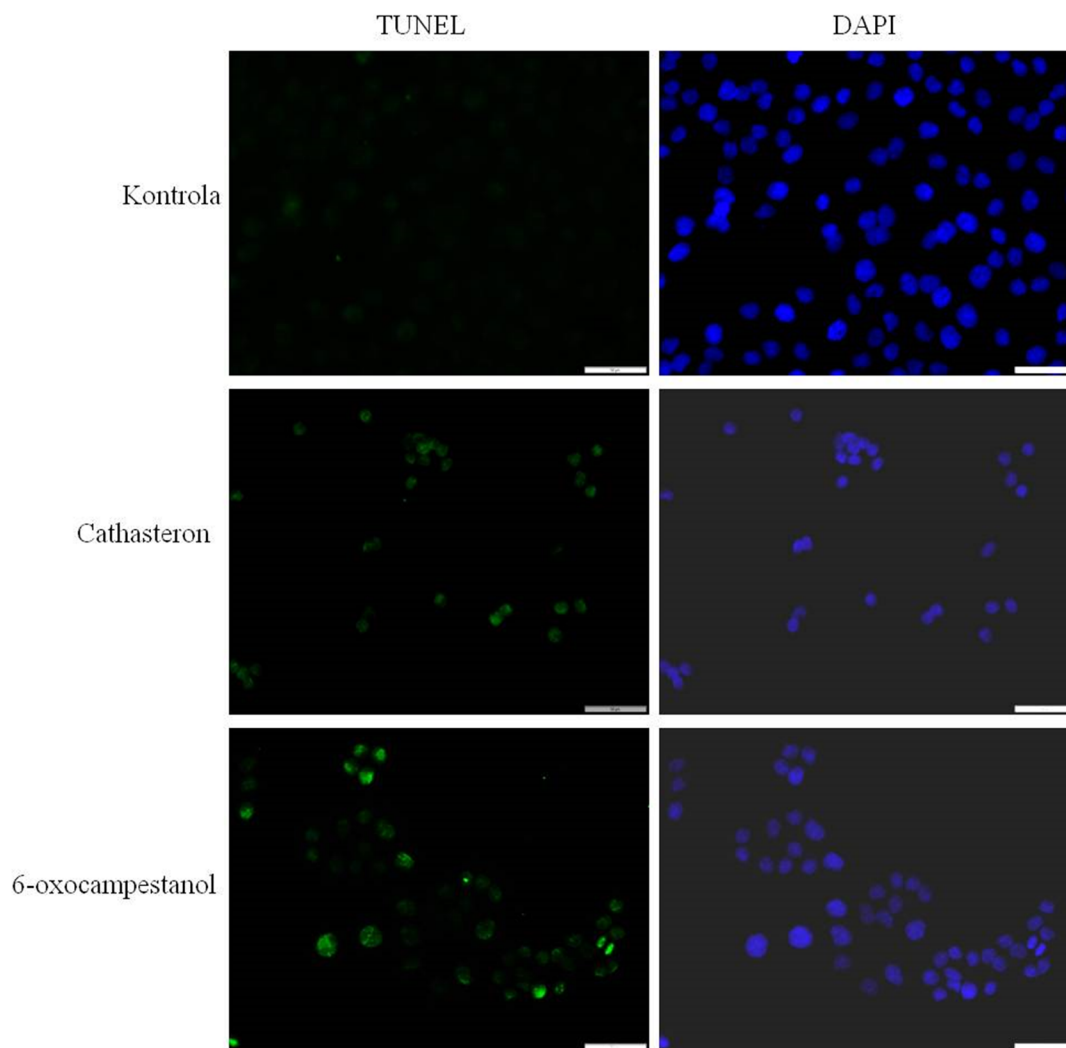
Oba testované brassinosteroidy Cathasteron a 6-oxocampestanol zvyšovaly počet apoptotických buněk u linií LNCaP a DU-145 po ovlivnění koncentrací IC_{50} po dobu 24 h a 48 h (Obr. 28). Na základě stanovení apoptotických buněk metodou TUNEL vykazovaly obě linie po ovlivnění Cathasteronem větší procento buněk v apoptóze než pod vlivem 6-oxocampestanolu a to výrazněji po 48 h. Na obrázcích 29; 30 jsou znázorněny účinky obou testovaných brassinosteroidů na buňky LNCaP a DU-145 vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám.



Obr. 28: Detekce apoptotických buněk stanovená na základě metody TUNEL u buněk LNCaP a DU-145 ovlivněných Cathasteronem a 6-oxocampestanolem v IC_{50} koncentraci po dobu 24 h a 48 h ve srovnání s neovlivněnými buňkami kontroly.



Obr. 29: Detekce apoptotických buněk metodou TUNEL u buněk LNCaP ovlivněných Cathasteronem (20 μM) a 6-oxocampestanolem (25 μM) po dobu 48 h. Buňky v apoptóze jsou zbarveny zeleně. Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 20x.

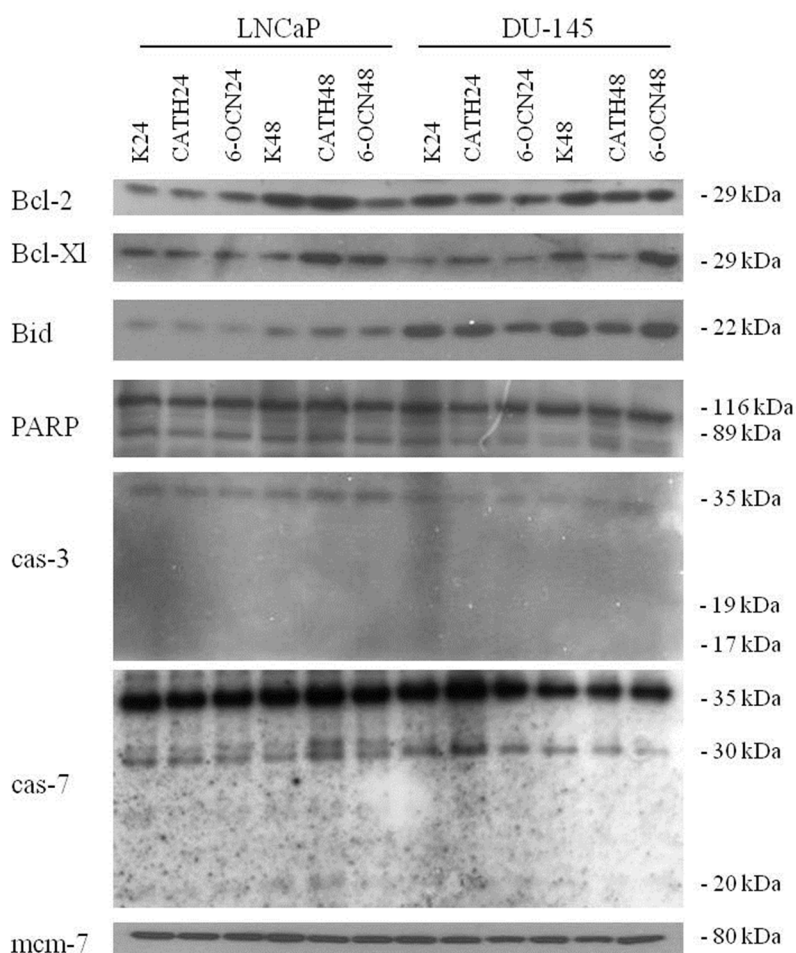


Obr. 30: Detekce apoptotických buněk metodou TUNEL u buněk DU-145 ovlivněných Cathasteronem (40 μ M) a 6-oxocampestanolem (30 μ) po dobu 48 h. Buňky v apoptóze jsou zbarveny zeleně. Buněčná jádra obarvena pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 20x.

4.2.5.2 Expres proteinů regulujících apoptózu

Expres proteinů regulujících apoptózu byla sledována pomocí Western blot analýzy. Testované látky Cathasteron a 6-oxocampestanol byly v koncentraci IC_{50} inkubovány s buňkami LNCaP a DU-145 po dobu 24 h a 48 h. Jako kontrola pro porovnání exprese byly použity neovlivněné buňky nádorových prostatických linií. Expres proteinů Bcl-2 (29 kDa), Bcl-xL (29 kDa), Bid (22 kDa), PARP (116, 89 kDa), cas-3 (35, 19, 17 kDa), cas-7 (35, 30, 20 kDa) a mcm-7 (80 kDa) je znázorněna na Obr. 31. Protein mcm-7 byl použit jako interní kontrola množství proteinů. U Bcl-2 proteinu došlo po použití 6-oxocampestanolu k poklesu exprese po 48 h u buněk

LNCaP, zatímco u DU-145 se snížila exprese proteinu po vlivu obou testovaných látek. U buněčné linie LNCaP byl pozorován pokles exprese Bcl-xL po léčbě oběma studovanými látkami po 24 h, zatímco po 48 h jsme detekovali nárůst hladiny Bcl-xL působením obou látek a u buněk DU-145 byl sledován pokles hladiny proteinu Bcl-xL vlivem Cathasteronu po 48 h. U buněk LNCaP byla hladina proapoptotického proteinu Bid mírně zvýšena účinkem obou látek po 48 h, u buněk DU-145 se snížila při působení 6-oxocampestanolu po dobu 24 h a Cathasteronu po dobu 48 h. Detekce odhalila štěpené fragmenty cas-7 (20 kDa) u buněk LNCaP ovlivněných oběma typy látek po 48 h působení a u buněk DU-145 po 24 h působení. Při sledování exprese proteinů PARP a cas-3 nebyla zjištěna žádná změna po ovlivnění studovanými brassinosteroidy ani u jedné z testovaných buněčných linií.



Obr. 31: Vliv brassinosteroidů Cathasteronu (CATH) a 6-oxocampestanolu (6-OCN) na expresi proteinů regulujících apoptózu u buněčných linií LNCaP a DU-145. Buňky byly ovlivňovány látkami v IC_{50} koncentraci po dobu 24 h a 48 h. Expresy proteinů byla porovnávána s kontrolními neovlivněnými buňkami (K).

5. DISKUZE

Brassinosteroidy (BRs) jsou rostlinné hormony, polyhydroxylované deriváty sterolů, které mají mnoho důležitých funkcí v rostlinách. Byla také objevena jejich antivirová, protinádorová, antiangiogenní a antiproliferativní aktivita u živočišných organismů (Hoffmannová *et al.*, 2012). Existuje celá řada látek derivovaných z rostlin s prokázanými protinádorovými vlastnostmi (Newman *et al.*, 2004). Přibližně 25 % léčiv objevených za posledních 20 let jsou rostlinného původu, např. vincristin, irinotecan, taxany či camptothecin jsou rostlinné látky s protinádorovou aktivitou. BRs by se v budoucnu mohly stát důležitým zdrojem pro vývoj nových protinádorových léčiv, a proto byla skupina přírodních BRs vybrána pro studium jejich účinku na buňky karcinomu prostaty.

Nádory prostaty se řadí mezi hormonálně závislé epiteliální nádory, které vznikají nekontrolovaným růstem a množением geneticky transformovaných buněk prostaty (Sampson *et al.*, 2013). Léčba těchto nádorů v prvních fázích vývoje je u většiny pacientů relativně úspěšná. Je založená na androgenní deprivaci, která vede ke stabilizaci onemocnění a zástavě růstu nádoru. Problém ovšem nastává vznikem na androgenech nezávislých klonů nádorových buněk (Cannata *et al.*, 2012).

V předkládané diplomové práci jsme se zaměřili na působení BRs, jako látek se základní strukturou podobnou živočišným hormonům odvozených od cholesterolu, na model nádorových buněčných linií prostaty a pokusili se objasnit některé mechanismy účinků, zejména úlohu jaderných receptorů pro steroidní hormony. Vycházeli jsme z předpokladu, že jaderné receptory se podílejí na regulaci celé řady dějů probíhajících v buňce, od růstu, diferenciaci, udržení homeostázy až po buněčnou smrt. Na základě strukturálních motivů BRs je možné předpokládat, že molekulární mechanismus těchto látek by mohl být založen na interakci s receptory pro steroidní hormony.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na sledování účinku BRs na buněčné linie LNCaP a DU-145 odvozené od karcinomu prostaty. Efekt látek byl porovnán s účinkem na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Linie LNCaP je odvozena od metastatické léze lidského adenokarcinomu prostaty a je hormonálně citlivá na androgen, nemá mutovaný tumor supresorový gen p53, ale pouze nemutovanou formu p53 (wild type) a exprimuje androgenové, estrogenové i progesteronové receptory. Androgen necitlivá linie DU-145 má mutovaný p53

na kodonu 274 a 223 a exprimuje jaderné receptory ER- β , PR a velmi slabě ER- α . V této práci byl testován vliv BRs na buněčnou viabilitu, velikost a integritu buněčných sfér, buněčný cyklus, expresi jaderných receptorů a apoptózu.

V experimentální části této diplomové práce byly testovány čtyři typy přírodních BRs – Cathasteron, 6-deoxocathasteron, Campestanol a 6-oxocampestanol a na základě testu buněčné viability a proliferace jsme zjistili, že Cathasteron a 6-oxocampestanol mají největší inhibiční účinek ze všech testovaných látek na obě nádorové linie, přičemž buňky LNCaP byly na účinky BRs citlivější než buňky DU-145. Ani jeden z použitých BRs výrazně nesnižoval buněčnou viabilitu u nenádorové linie RWPE-1. Dále byla stanovena koncentrace IC₅₀ u nádorových buněk pro Cathasteron (20 μ M u LNCaP, 40 μ M u DU-145) a 6-oxocampestanol (25 μ M u LNCaP, 30 μ M u DU-145) po inkubaci látek s buňkami po dobu 48 h. Dvě práce Obakan *et al.* (2014) popisují vliv přirozeného brassinosteroidu – epibrassinolidu (EBR) na nádorové prostatické buňky LNCaP, DU-145 a PC-3. EBR inhiboval u všech linií buněčnou viabilitu v závislosti na koncentraci a čase. Zjistili také, že buňky LNCaP byly k EBR aplikaci citlivější než ostatní buňky. Ke sledování účinku EBR na indukci apoptózy vybrali koncentraci 25 μ M u všech buněčných linií. V práci Rárová *et al.* (2012) testovali skupinu 21 přirozených BRs na lidské endoteliální buňky HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) a HMEC-1 (human microvascular endothelial cells). Z této skupiny 13 látek, včetně čtyř námi testovaných BRs, inhibovalo růst endoteliálních buněk. Látka 6-deoxocathasteron byla velmi účinná, vykazovala IC₅₀ (24 h) 4,3 μ M u buněk HUVEC a 9,2 μ M u buněk HMEC. Látky Cathasteron a 6-oxocampestanol také inhibovaly viabilitu buněk, jejich IC₅₀ se pohybovala v rozmezí 21,5-45,5 μ M. Látka Campestanol vliv na viabilitu a proliferaci endoteliálních buněk neměla. Tyto rozdíly v citlivosti buněk na působení BRs mohou souviset s rozdílným genetickým základem použitých buněčných linií. Například buňky DU-145 představují, na rozdíl od buněk LNCaP, rychleji proliferující linii s kratším „doubling time“, proto se u buněk DU-145 může uplatnit zásah do buněčného cyklu za daný časový úsek častěji.

Na základě hypotézy, že nádorové buňky prostaty mohou být odvozeny také z kmenových buněk, které nejsou na přítomnosti androgenů závislé, a hormonální terapie je tedy neovlivňuje (Taylor *et al.*, 2010), jsme kromě účinku BRs na viabilitu a proliferaci buněk sledovali také vliv vybraných látek na integritu a růst buněčných sfér, které jsou obohaceny o tzv. nádorové kmenové buňky (cancer stem-like cells). Průkaz schopnosti buněk tvořit buněčné sféry ověřuje intenzitu sebeobnovy nádorových

kmenových buněk, kdy v podmínkách zabraňující adhezenci vznikají kulovité „kolonie“ plovoucí v médiu s obsahem definovaných růstových faktorů. Vzniklé sféry lze izolovat, enzymaticky rozvolnit na jednotlivé buňky, znovu převést do podmínek umožňujících tvorbu sfér a celý proces opakovat, čímž se prokazuje také schopnost klonogenity testovaných buněk. Naše výsledky ukazují, že vliv Cathasteronu na integritu buněčných sfér byl viditelný pouze u linie LNCaP, kdy při zvyšující se koncentraci látky a čase působení došlo k postupnému zmenšování a rozpadu sfér oproti kontrolním neovlivněným buňkám. Sféry linie DU-145 byly vůči látkám odolnější a svůj tvar a velikost ani po ovlivnění nejvyšší koncentrací látky po celou dobu experimentu (12 dnů) téměř nezměnily. Výsledky naznačují, že tzv. nádorové kmenové buňky obsažené v buněčných sférách mohou být příčinou rozdílné citlivosti buněk na aplikaci látek. Podobný experiment popisuje práce Pollock *et al.* (2012) zabývající se studiem účinku fytohormonů strigolaktonů na buněčné sféry linie MCF-7 odvozené od karcinomu prsu. Testovali účinky pěti strigolaktonů (EG5, EG 9c, ST357, ST362, MEB55) na sféry MCF-7, které zcela blokovaly tvorbu sfér v koncentraci 5 ppm a výše. Tyto výsledky naznačují, že tyto strigolaktony jsou slibnými inhibitory růstu buněk v tzv. mammosférách v porovnání s jejich účinkem na buňky rostoucí v monovrstvě (Pollock *et al.*, 2012). Tuto problematiku nádorových kmenových buněk z hlediska studia vzniku, progresu a léčby nádorového onemocnění prostaty by bylo zajímavé v budoucnu rozšířit více.

Účinky BRs byly také studovány na modulaci buněčného cyklu. Buněčný cyklus představuje složitý a důkladně regulovaný buněčný děj, ale v nádorových buňkách dochází k jeho narušení ať už s ohledem na jeho rychlost či poruchy kontrolních bodů. Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že BRs neměly u buněk LNCaP výrazný vliv na buněčný cyklus, zatímco u buněk DU-145 jsme detekovali účinkem obou typů látek výrazný blok v G0/G1 fázi. Změny distribuce buněk v rámci buněčného cyklu byly popsány v literatuře. Zablokování cyklu v G0/G1 fázi bylo zjištěno u buněk myší hybridomové linie ME-750 ovlivněných 24-epiBL (Franěk *et al.*, 2003). Blokáda buněk v G1 fázi buněčného cyklu byla popsána u buněk odvozených od karcinomu prsu MCF-7 a MDA-MB-468, také u buněk LNCaP po ovlivnění přírodními BRs – 28-homoCS a 24-epiBL (Steigerová *et al.*, 2010, 2012). V práci Obakan *et al.* (2014a) výrazné změny zastoupení buněk v rámci buněčného cyklu po ovlivnění buněk LNCaP a DU-145 epibrassinolidem nezaznamenali, pouze slabý pokles zastoupení buněk v G1 fázi. Podobně i v práci Rárová *et al.* (2012) nebyly zjištěny změny profilu buněčného

cyklu u buněk HMEC-1 ovlivněných BRs – 28-homoCS a 24-epiBL. Ovšem účinkem syntetického derivátu BRs – cholestanonu se počet buněk v S-fázi zvýšil za současného poklesu buněk ve zbývajících fázích buněčného cyklu.

Změny průběhu buněčného cyklu byly provázeny také změnami exprese klíčových proteinů regulujících buněčný cyklus. Western blot analýza odhalila, že obě testované látky Cathasteron a 6-oxocampestanol zvýšily u buněk LNCaP expresi nádorového supresoru p53, expresi inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21 a expresi nádorového supresoru Rb a jeho fosforylované formy pRb. Současně byl detekován mírný pokles hladin cyklinů A a B1, které souvisí se vstupem buňky do S fáze a mitózy, zatímco hladiny cyklinů D1 a E, podporující přechod z G1 do S fáze, nebyly účinkem látek ovlivněny.

U buněk DU-145 byla po ovlivnění testovanými BRs zjištěna zvýšená exprese p53 i p21 v obou časových intervalech. Hladina fosforylované i nefosforylované formy Rb byla snížena účinkem Cathasteronu po 24 i 48 h. Současně byl detekován slabý pokles exprese cyklinů D1 a E, který koreloval se zástavou buněčného cyklu v G1 fázi u této buněčné linie. Mírné snížení exprese bylo zjištěno i u cyklinu A a B1.

Podobné účinky přírodních BRs (28-homoCS; 24-epiBL) na modulaci buněčného cyklu u buněk LNCaP a DU-145 byly testovány ve studii Steigerová *et al.* (2012). Existuje také celá řada prací zabývajících se studiem účinku přírodních isoflavonoidů na nádory prostaty – jako genisteinu či daidzeinu, které se řadí mezi fytoestrogeny (Agarwal, 2000; Hedlund *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011). U buněk LNCaP a PC-3 byla zjištěna genisteinem zprostředkovaná blokáde buněčného cyklu doprovázená zvýšenou expresí p53 a p21, poklesem hladiny cyklinu B1, zatímco u buněk DU-145 byla popsána indukce p21 a p27, snížení hladiny cyklinů D1 a E (Zhao *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011). Na základě genové expresní analýzy bylo zjištěno, že genistein a daidzein u buněčných linií karcinomu prostaty ovlivňují celou řadu klíčových genů regulujících buněčný cyklus (Rabiau *et al.*, 2010).

V souvislosti se strukturou testovaných látek BRs podobnou živočišným hormonům odvozených od cholesterolu byl v této práci sledován vliv BRs na expresi a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony AR, ER- α , ER- β a PR u prostatických nádorových buněčných linií. U androgen citlivé linie LNCaP jsme pomocí imunofluorescenčního barvení zjistili, že účinkem Cathasteronu došlo k nahromadění receptorů AR a ER- β do cytoplazmy na povrch jaderné membrány a k přesunu PR do cytoplazmy buňky. Cytoplazmatická lokalizace receptorů může být

pravděpodobně způsobena jejich transportem z jádra do cytoplazmy buňky. Tento transport receptoru do cytoplazmy je využíván při inhibici transkripční aktivity. Je tedy možné, že Cathasteron ovlivnil aktivaci receptorů, následně došlo k inhibici jejich aktivace a přesunu receptorů z jádra do cytoplazmy. Po přesunu proteinu pravděpodobně ještě neproběhla degradace proteinu, proto je patrná po aplikaci látky cytoplazmatická lokalizace receptoru. Současně Western blot analýza odhalila zvýšenou expresi AR po ovlivnění buněk. Vlivem Cathasteronu došlo k výrazné zvýšené expresi ER- α v jádře buněk, která byla detekována i pomocí Western blot analýzy. Látka 6-oxo-campestanol vedla u buněk LNCaP ke zvýšené expresi a translokaci AR do cytoplazmy za současné detekce i pomocí Western blot analýzy. U ostatních receptorů nebyly imunofluorescenční detekcí ani Western blot analýzou zjištěny výraznější změny v jejich expresi či lokalizaci vzhledem ke kontrolním buňkám. U androgen necitlivých buněk DU-145 imunofluorescenční barvení ukázalo po ovlivnění Cathasteronem zvýšenou expresi ER- β u jaderné membrány a jadernou expresi PR. Tyto změny se nepromítly na expresi receptorů u Western blot analýzy. Buňky DU-145 exprimují ER- α jen velmi slabě na hranici detekovatelnosti, po ovlivnění Cathasteronem nebyla zjištěna žádná změna. Western blot analýza odhalila mírné zvýšení exprese ER- α po 24 h působení, zatímco po 48 h působení vedla k poklesu jeho exprese. 6-oxo-campestanol vyvolal zvýšenou jadernou expresi ER- α , translokaci a nahromadění ER- β do jader buněk a difúzní jadernou lokalizaci PR. Výsledky doplněné Western blot analýzou neukázaly žádné změny v porovnání s neovlivněnými buňkami. Detekce PR pomocí Western blot analýzy bohužel nebyla příliš úspěšná ani po provedení několika opakování.

O mechanismu účinku BRs na molekulární úrovni je zatím v současné době známo jen velmi málo. Také by bylo práci vhodné doplnit o zjištění, zda jsou testované BRs schopné antagonistického či agonistického působení na jaderné receptory s využitím např. reporterových buněčných linií. V práci Rárová *et al.* (2012) zjistili, že BRs – 28homoCS a 24-epiBL a syntetický derivát BRs – cholestanon mají schopnost modulovat hladiny ER- α a PR u buněk HUVEC. Na rozdíl od přírodních BRs se cholestanon na základě reporterové assay choval jako silný agonista ER- α se schopností vázat se na steroidní receptory ER- α a ER- β .

Uvádí se, že inhibice buněčného růstu může mít souvislost se zvýšenou apoptózou buněk. Proto byl v této práci také studován vliv BRs na indukci apoptózy u nádorových buněk prostaty. Pomocí metody TUNEL bylo zjištěno, že obě látky

zvyšovaly počet apoptotických buněk u nádorových linií oproti kontrolním buňkám. Větší vliv na indukci apoptózy u obou linií vykazoval Cathasteron. Na základě Western blot analýzy byl pozorován vliv testovaných látek na expresi proteinů účastnících se procesu apoptózy. U buněk LNCaP byl zjištěn pokles antiapoptotických proteinů Bcl-2 vlivem 6-oxocampestanolu po 48 h a Bcl-xL po 24 h aplikací Cathasteronu i 6-oxocampestanolu. Zatímco po 48 h jsme detekovali nárůst hladiny Bcl-xL působením obou látek. Hladina proapoptotického proteinu Bid byla mírně zvýšena účinkem obou. Detekce odhalila štěpené fragmenty cas-7 u buněk LNCaP ovlivněných oběma typy BRs. Žádné změny nebyly nalezeny při sledování štěpení cas-3 a PARP. U buněk DU-145 došlo k poklesu exprese Bcl-2 vlivem obou látek, snížení exprese Bcl-xL po ovlivnění Cathasteronem a poklesu hladiny Bid při působení 6-oxocampestanolu (24 h) a Cathasteronu (48 h). Detekce také odhalila štěpení cas-7 po ovlivnění buněk oběma typy BRs. Výsledky by bylo vhodné ještě doplnit o další detekce apoptózy buněk, aby bylo zřejmé, jakou signální dráhou je buněčná smrt po ovlivnění BRs indukována a zda je zapojena mitochondriální cesta aktivace kaspáz. Ve studii Steigerová *et al.* (2012) zjistili vysoký nárůst podílu apoptotických TUNEL-pozitivních buněk ovlivněných 28-homoCS a 24-epiBL u buněk LNCaP, zatímco u buněk DU-145 obě látky zvýšily počet apoptotických buněk jen mírně. Western blot analýza odhalila změny exprese proteinů Bcl-2 rodiny u obou buněčných linií. Ve studii Obakan *et al.* (2014a) sledovali u buněk LNCaP a DU-145 účinek EBR (25 μ M, 24 h) na indukci apoptózy ve spojitosti s katabolismem polyaminů, které hrají důležitou úlohu během diferenciací buněk prostaty. Také zjistili pokles exprese antiapoptotických proteinů Mcl-1 a Bcl-xL a proapoptotických proteinů Bax, Bid a Puma, detekovali štěpení cas-3 a PARP u buněk LNCaP ovlivněných EBR, zatímco u buněk DU-145 po ovlivnění výrazné změny exprese apoptotických proteinů Bcl-2 rodiny nenašli, detekovali pouze štěpení cas-7. Rozdílnou modulaci anti- a proapoptotických proteinů si vysvětlují různou citlivostí a apoptotickou odpovědí buněk na účinek EBR, který pravděpodobně indukuje apoptózu aktivací různých kaspáz v závislosti na buněčné linii. Podobné účinky přírodního isoflavonoidu – genisteinu, který se řadí mezi antagonisty jaderných receptorů, byly prokázány u nádorových buněk prostaty LNCaP, DU-145 a PC-3 (Kumi-Diaka *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2011). Zdá se, že efekt genisteinu na indukci apoptózy je závislý na jeho koncentraci a může rozdílně ovlivnit buněčné linie nádoru prostaty v závislosti na jejich AR statutu (Mahmoud *et al.*, 2014).

6. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo studovat a charakterizovat účinek přírodních brassinosteroidů na buňky karcinomu prostaty, zejména na jejich viabilitu, integritu sfér, buněčný cyklus, expresi jaderných receptorů a apoptózu. Buněčnou viabilitu nádorových buněk nejúčinněji inhibovaly dva BRs Cathasteron a 6-oxocampestanol. Testovaná látka Cathasteron se jevila jako nejúčinnější ze všech a její inhibiční vliv byl pozorován také na integritu buněčných sfér, u kterých došlo k postupnému rozpadu. Bylo zjištěno, že oba BRs po stanovení IC_{50} neměly u buněk LNCaP výrazný vliv na buněčný cyklus, zatímco u buněk DU-145 byl pozorován výrazný blok v G₀/G₁ fázi vlivem látek, které také účinně zvyšovaly procento apoptotických buněk u obou linií. Vliv BRs na jaderné receptory pro steroidní hormony AR, ER- α , ER- β a PR se projevil změnou jejich exprese a lokalizace, jejichž úloha bude předmětem dalšího výzkumu. Studium brassinosteroidů prokázalo jejich jednoznačný vliv na nádorové buňky karcinomu prostaty a bylo by tedy možné jejich potenciální využití ve výzkumu protinádorových léčiv a léčbě nádorových onemocnění.

Léčba pokročilých nádorů prostaty je obtížná a málo účinná a z tohoto důvodu jsou studovány nové mechanismy buněčné signalizace v nádorových buňkách prostaty a hledány nové léčebné postupy a látky, které by mohly vést ke zvýšení účinnosti této léčby. Zdá se, že BRs, popř. jejich analoga, představují vhodný nástroj ke studiu vzájemných vztahů mezi faktory zapojenými v signálních drahách proliferace, přežití a smrti buněk. Další studie zaměřené na mechanismus účinku těchto látek u nádorových buněk prostaty ve spojitosti s modulací jadernými receptory by mohly přispět k objasnění genetických a proteomických změn a k upřesnění regulačních drah zahrnutých do procesu buněčného dělení a programované buněčné smrti u těchto nádorů.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
AR	androgen receptor
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BES1	BRI1 (Brassinosteroid-insensitive 1) – EMS (Ethylmethane Sulphonate) – supressor 1
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
BIN2	Brassinosteroid-insensitive 2
BPE	bovine pituitary extract
BRs	brassinosteroids
BSA	bovine serum albumine
BSU1	BRI1 (Brassinosteroid-insensitive 1) suppressor 1
BZR1	Brassinazole-resistant 1
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIABLO	Direct IAP (inhibitor of apoptosis protein) binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
EZH2	Enhancer zeste homolog 2
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fatty acid synthetase ligand
FasR	Fatty acid synthetase receptor
FBS	fetal bovine serum
GSK3	Glycogen synthase kinase 3

GSTP1	Glutathione S-transferase 1
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IL-6	Interleukin 6
LSB	Laemmli sample buffer
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N-CoR	nuclear receptor co-repressor 1
PARP	poly ADP ribose polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIA	Proliferative inflammatory atrophy
PIN	Prostatic intraepithelial neoplasia
PR	progesterone receptor
PSA	Prostate specific antigen
PSMA	Prostate-specific membrane antigen
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	sodiumdodecylsulphate
SFM	serum-free medium
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
TBE	tris/borate/EDTA
tBid	truncated Bid
TBS	tris-bufferedsaline
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFR associated death domain
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TUNEL	Terminal deoxy - nucleotide transferase (TdT) - mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., Stark, G. R. (1998): The p53 network. *J. Biol. Chem.* (273), 1.

Agarwal, R. (2000): Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents, *Biochem. Pharmacol.* (60), 1051–1059.

Amanatullah, D. F., Reutens, A. T., Zafonte, B. T., Fu, M., Mani, S., Pestell, R. G. (2000): Cell-cycle dysregulation and the Molecular mechanisms of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* (5), 372–390.

Arellano, M., Moreno, S. (1997): Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (29), 559.

Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* (281), 1305–8.

Balk, S. P., Knudsen, K. E. (2008): AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl. Recept. Signal.* (6), e001.

Barrett-Connor, E., Garland, C., McPhillips, J. B., Khaw, K. T. and Wingard, D. L. (1990): A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. *Cancer Res* (50), 169-173.

Branchini, G., Schneider, L., Cericatto, R., Capp, E. and Brum, I. S. (2009): Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas. *Endocrine* (35), 459-466.

Cannata, D. H., Kirschenbaum, A., Levine, A. C. (2012): Androgen deprivation therapy as primary treatment for prostate cancer: *J Clin Endocrinol Metab.* (97), 360-5.

Catz, S. D., Johnson, J. L. (2003): BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis* (8), 29–37.

Clouse, S. D., Sasse, J. M. (1998): Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (49), 427-451.

Cordon-Cardo, C. (1995): Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol.* (147), 545–560.

Culig, Z. and Bartsch G. (2006): Androgen axis in prostate cancer: *J Cell Biochem*, (99), 373-81.

De Bruin, E. C., Medema, J. P. (2008): Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response: *Cancer Treat Rev* (34), 737-49.

Ellis, W. J., Chwtner, M. P., Preston, S. D., et al. (1994): Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *JUrol.* (152), 1520-1525.

Elmore, S. (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol pathol* (35), 495-516.

Feinberg, A. P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006): The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* (7), 21-33.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., et al. (2013): Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer.* (49), 1374–1403.

Franěk, R., Eckschlager, T., Kohout, L. (2003): 24-Epibrassinolide at subnanomolar concentrations modulates growth and production characteristics of a mouse hybridoma. *Collect. Czech Chem. Commun.* (68), 2190–2200.

Gao, X., Porter, A. T., Grignon, D. J., et al. (1997): Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* (31), 264–81.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006): Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* (13), 1423–33.

Gelman, L., Feige, J. N., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., Desvergne, B. (2006): Integrating nuclear receptor mobility in models of gene regulation. *Nucl Recept Signal.* (4), e010.

Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Krithivas, K., et al. (1997): The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* (94), 3320–3.

Gottlieb, T. M., Oren, M. (1998): p53 and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* (8), 359.

Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K. et al. (1979): Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* (281), 216-217.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer: *Cell* (100), 57-70.

Harden, S. V., Guo, Z., Epstein, J. I., et al. (2003): Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* (169), 1138–42.

Hedlund, T. E., Johannes, W. U., Miller, G. J. (2003): Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro, *Prostate* (54), 68–78.

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

Hoffmannová, L., Steigerová, J., Strnad, M. (2012): Anticancer activities of brassinosteroids. *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health*, 84-93.

Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., O’Leary, J. (2005): Molecular pathology of prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* (58), 673-684.

Chinnaiyan, A. M. (1999): The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* (1), 5–15.

Igney, F. H., Krammer, P. H. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* (2), 277–288.

Jacobsen, B. M., Horwitz, K. B. (2012): Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* (357), 18-29.

Jamaspishvili, T., Kral, M., Khomeriki, I., et al. (2009): Urine markers in monitoring for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*

Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001): Translating the histone code: *Science* (293), 1074-80.

Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition: *J Clin Invest* (119), 1420-8.

Kasper, S. (2008): Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev* (4), 193-201.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972): Apoptosis: A basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue-kinetics. *Br J Cancer* (26), 239 – 257.

Khripach, V. A., Zhabinskii, V. N., de Groot, A. E. (1999): *Brassinosteroids. A new class of plant hormones.* San Diego:Academic Press, 456p.

Kibel, A. S., Suarez, B. K., Belani, J., et al. (2003): CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res* (63), 2033–2036.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* (14), 5579–5588.

Ko, L. J., Prives, C. (1996): p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* (10), 1054.

Kumar, R., Verma, V., Jain, A., Jain, R. K., Maikhuri, J. P., et al. (2011): Synergistic chemoprotective mechanisms of dietary phytoestrogens in a select combination against prostate cancer. *J. Nutr. Biochem* (22), 723–731.

Kumar, V. L., Majumder, P., Gujral, S., et al. (1998): Comparative Analysis Of Epidermal Growth Factor Receptor Mrna Levels In Normal, Benign, Hyperplastic And Carcinomatous Prostate. *Cancer Lett.* (134), 177–180.

Kumi-Diaka, J., Sanderson, N. A., Hall, A. (2000): The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. *Biol. Cell* (92), 595–604.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* (88), 323.

Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* (104), 487–501.

Losel, R., Wehling, M. (2003): Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* (4), 46-56.

Lukeš, M., Záleský, M., Zchoval, R., Urban, M., Heráček, J. (2001): Prostatický specifický antigen a karcinom prostaty. *Klinická onkologie* (14), 114-118.

Mahmoud, A. M., Yang, W., Bosland, M. C. (2014): Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (140), 116-32.

Malikova, J., Swaczynova, J., Kolar, Z., Strnad, M. (2008): Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochem* (69), 418-26.

Matoušková, M. (2006): Farmakoterapie karcinomu prostaty. *Remedia*, 84-90.

McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., & Stamey, T. A. (1988): Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: Correlation with histologic pattern and direction of spread. *American Journal of Surgical Pathology* (12), 897–906.

Molinary, M. (2000): Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* (33), 261-274.

Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* (374), 131.

Müssig, C., Altman, T. (2001): Brassinosteroid signaling in plants. *Trends Endocrinol Metab* (12), 398-402.

Nakamura, Y., Felizola, J. A., Kurotaki, Y., Fujishima, F., McNamara, K. M., i Suzuki, T., Arai, Y. and Sasano, H. (2013): Cyclin D1 (CCND1) expression is involved in estrogen receptor beta (ERb) in human prostate cancer. *Prostate* (73), 590-5.

Nakayama, M., Bennett, C. J., Hicks, J. L., Epstein, J. I., Platz, E. A., Nelson, W. G., et al. (2003): Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-p gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate. A detailed study using laser-capture microdissection. *American Journal of Pathology* (163), 923–933.

Nelson, W. G., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. (2003): Prostate cancer. *New England Journal of Medicine* (349), 366–381.

Nemnhauer, J. L., Chory J. (2004): BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteorid action. *J Exp Bot* (55), 265-270.

Newman, D. J., Cragg, G. M. (2004): Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr Med Chem* (11),1693–1713.

Obakan, P., Arisan, E. D., Calcabrini, A., Agostinelli, E., Bolkent, S., Palavan-Unsal, N. (2014a) Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines. *Amino Acids.* (46), 553-64.

Obakan, P., Arisan, E. D., Coker-Gurkan, A., Palavan-Unsal, N. (2014b): Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells. *Prostate.* (74), 1622-33.

Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., Pagano, M. (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* (15), 2612.

Oren, M. (1999): Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* (274), 36031.

Osborne, C. K., Schiff, R. (2005): Estrogen-Receptor Biology: Continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* (23), 1616-1622.

Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A., et al (2001): Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* (7), 4338-4342.

Palmieri, C., Saji, S., Sakaguchi, H., Cheng, G., Sunter, A., O'Hare, M. J., Warner, M., Gustafsson, J. A., Coombes, R. C., Lam, E. W. (2004): The expression of oestrogen receptor (ER)-beta and its variants, but not ERalpha, in adult human mammary fibroblasts. *J Mol Endocrinol.* (33), 35-50.

Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J. G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., Coghlan, L., and Tang, D. G. (2006): Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* (25), 1696-1708.

Patrawala, L., Calhoun-Davis, T., Schneider-Broussard, R., and Tang, D. G. (2007): Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Res* (67), 6796-6805.

Pollock, C. B., Koltai, H., Kapulnik, Y. (2012): Strigolactones: a novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast Cancer Res Treat* (134), 1041-1055.

Privalsky, M. L. (2004): The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors: *Annu Rev Physiol*, (66), 315-60.

Rabiau, N., Kossai, M., Braud, M., Chalabi, N., Satih, S. et al. (2010): Genistein and daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by polymerase chain reaction arrays in human prostate cancer cell lines, *Cancer Epidemiol.* (34), 200–206.

Rárova, L., Zahler, S., Liebl, J., Kryštof, V., Sedlák, Bartůněk, P., Kohout, L., Strnad, M. (2012): Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids* (77), 1502-1509.

Richardson, G. D., Robson, C. N., Lang, S. H., Neal, D. E., Maitland, N. J., and Collins, A. T. (2004): CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* (117), 3539-3545.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., Vandenameele, P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* (23), 2861–74.

Sakurai, A., Fujioka, S. (1997): Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci Biotechnol Biochem* (61), 757-62.

Sampson, N., Neuwirt, H., Pühr, M., Klocker, H., Eder, I. E. (2013): In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. (20), R49-64.

Sasse, J. M., (1999): Physiological actions of brassinosteroids. In: Sakurai, A., Yokota, T., Clouse, S. D. (Eds.), *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 137–161.

Seo, Y. J., Kim, B. S., Chun, S. Y., Park, Y. K., Kang, K. S. et al. (2011): Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC-3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1, *J. Korean Med. Sci.* (26), 1489–1494.

Sherr, C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* (79), 551.

Schiewer, M. J., Augello, M. A., Knudsen, K. E. (2012): The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance. *Molecular and Cellular Endocrinology* (352), 34-46.

Simons, S. S. Jr, Edwards, D. P., Kumar, R. (2014): Minireview: dynamic structures of nuclear hormone receptors: new promises and challenges. *Mol Endocrinol.* (28), 173-82.

Spiegelman, B. M and Heinrich, R. (2004): Biological control through regulated transcriptional coactivators: *Cell* (119), 157-67.

Steigerová, J., Okleštková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., Strnad, M. (2010): Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* (188), 487-96.

Steigerová, J., Rárová, L., Okleštková, J., Křížová, K., Levková, M., Šváchová, M., Kolář, Z., Strnad, M. (2012): Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* (50), 4068-4076.

Taylor, R. A., Toivanen, R., Risbridger, G. P. (2010): Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem: *Endocr Relat Cancer* (17), R273-85.

- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (9), 231-241.
- Tomlins, S. A., Laxman, B., Varambally, S., et al. (2008): Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* (10), 177 - 88.
- Tu, S. M., Lin, S. H. (2012): Prostate cancer stem cells: *Clin Genitourin Cancer* (10), 69-76.
- Uzgare, A. R., Isaacs, J. T. (2005): Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (37), 707-714.
- Vermuelen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* (36), 131-149.
- Vert, G., Nemhauser, J. L., Geldner, N., Hong, F., Chory, J. (2005): Molecular mechanisms of 477 steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* (21), 177–201.
- Wachsman, M. B., Ramirez, J. A., Galagovsky, L. R., Coto, C. E. (2002): Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antivir. Chem. Chemother.* (13), 61–66.
- Walker, D. H., Maller, J. L. (1991): Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* (354), 314.
- Wang, B. F., Wang, J. S., Lu, J. F., Kao, T. H., Chen, B. H. (2009): Antiproliferation effect and mechanism of prostate cancer cell lines as affected by isoflavones from soybean cake, *J. Agric. Food Chem.* (57), 2221–2232.
- Weihua, Z., Warner, M., Gustafsson, J. A. (2002): Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* (193), 1-5.
- Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* (81), 323.
- Wyllie, A. H. (1992): Apoptosis & regulation of cell numbers in normal & neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev* (11), 95–103.
- Yao, V., Berkman, C. E., Choi, J. K., O’Keefe, D. S., Bacich, D. J. (2010): Expression of prostatespecific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the nonpolyglutamatedfolate, folic acid. *Prostate* (70), 305-16.

Yeh, Ch. R., Da, J., Song, W., Fazili, A., Yeh, Shuyuan (2014): Estrogen receptors in prostate development and cancer. *Am J Exp Urol* (2), 161-168.

Yu, Y., Liu, L., Xie, N., Xue, H., Fazli, L., Buttyan, R., Wang, Y., Gleave, M., Dong, X. (2013): Expression and function of the progesterone receptor in human prostate stroma provide novel insights to cell proliferation control. *J Clin Endocrinol Metab* (98), 2887-96.

Yu, Y., Yang, O., Fazli, L., Rennie, P. S., Gleave, M. E., Dong, X. (2015): Progesterone receptor expression during prostate cancer progression suggests a role of this receptor in stromal cell differentiation. *Prostate* 2015, Apr 1. doi: 10.1002/pros.22988. [Epub ahead of print].

Zenzmaier, C., Untergasser, G., Berger, P. (2008): Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp Gerontol* (43), 981-985.

Zhao, R., Xiang, N., Domann, F. E., Zhong, W. (2009): Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells, *Nutr. Cancer* (61), 397-407.