

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Přírodovědecká fakulta

---



**Magisterská diplomová práce  
2010**

**SCREENING KANDIDÁTNÍCH GENŮ  
KARCINOMU PROSTATY**

Bc. Michal Černý

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.**

Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK  
a Fakultní nemocnice v Motole

ČERNÝ M., (2010): Screening kandidátních genů karcinomu prostaty. [Screening of candidate genes in prostate cancer. Mgr. Thesis, in Czech.] - 55p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

In this study, the expression of three prognostically important genes, **SHB**, periostin (**POSTN**) and hepsin (**HPN**), was determined in needle biopsies of patients with prostate cancer. Relative gene expressions were correlated with clinical data: age, staging, grading and level of the PSA. Prognostic importance of positive correlations was evaluated for usage of the genes as biological markers for prostate cancer as well.

**Finanční podpora:**

Předkládaná studie byla podpořena granty VZ 21620808 a grantem GAUK 200 090.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.**

**Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.**

V Českých Budějovicích dne 30.4.2010

.....

Michal Černý

Poděkování:

Na tomto místě děkuji doc. RNDr. Jaroslavu Marešovi CSc. za cenné rady, laskavý přístup a trpělivost při vedení diplomové práce. Díky patří také MUDr. Marku Schmidtovi, FEBU a MUC. Luboši Sedláčkovi, neboť bez pomoci prvního by má práce nemohla být započata a bez pomoci druhého zakončena.

Největší poděkování patří vám, moji rodiče, za neutuchající podporu, díky níž jste mi toho tolik umožnili.

<b><u>1. Úvod</u></b>	1
1.1 Anatomie a fyziologie prostaty	1
1.2 Epidemiologická data karcinomu prostaty	2
1.3 Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty	3
1.4 Patologie karcinomu prostaty	6
1.5 Klinické příznaky karcinomu prostaty	7
1.6 Diagnóza a terapie karcinomu prostaty	9
<b><u>2. Onkogenetika karcinomu prostaty</u></b>	11
2.1 Příklady kandidátních genů odpovědných za vznik a rozvoj karcinomu prostaty	12
2.2 Geny a proteiny jako biomarkery karcinomu prostaty	13
2.2.1 Kalikreiny (KLK)	13
2.2.2 Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)	15
2.2.3 Prostatický nádorový antigen 3 (PCA3)	15
2.2.4 $\alpha$ -methylacyl-CoA-racemáza (AMACR)	16
2.2.5 Fúzní proteiny <i>TMPRSS2:ERG</i> a <i>TMPRSS2:ETV</i>	16
<b><u>3. Analyzované kandidátní geny karcinomu prostaty</u></b>	18
3.1 <i>SHB</i>	18
3.1.1 Struktura a funkce proteinu <i>Shb</i>	18
3.1.2 Role <i>Shb</i> v regulaci apoptózy	20
3.1.3 Role <i>Shb</i> v regulaci angiogeneze	21
3.2 <i>POSTN</i>	21
3.2.1 Struktura a funkce periostinu	21
3.2.2 Adhezní vlastnosti periostinu	22
3.2.3 Periostin a nádorová onemocnění	23
3.2.4 Exprese periostinu v karcinomu prostaty	23
3.3 <i>HPN</i>	24
3.3.1 Struktura a funkce hepsinu	24
3.3.2 Hepsin a karcinom prostaty	25
<b><u>4. Cíle práce</u></b>	27
<b><u>5. Materiál a metodika</u></b>	28
5.1 Pacienti	28
5.2 Odběr vzorků	28
5.3 Izolace mRNA	30
5.4 RT-PCR	31
5.5 Optimalizace annealingové teploty	33
5.6 Detekce cDNA fragmentů	34
5.7 Statistické metody vyhodnocení	35
<b><u>6. Výsledky</u></b>	36
6.1 Gen <i>SHB</i>	36
6.1.1 Relativní exprese genu <i>SHB</i> v nádorových a nenádorových tkáních	36
6.1.2 Srovnání relativní exprese genu <i>SHB</i> v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA	36
6.2 Gen pro periostin	37
6.2.1 Relativní exprese genu <i>POSTN</i> v nádorových a nenádorových tkáních	37
6.2.2 Srovnání relativní exprese genu <i>POSTN</i> v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA	38
6.3 Gen pro hepsin	39
6.3.1 Relativní exprese genu <i>HPN</i> v nádorových a nenádorových tkáních	39
6.3.2 Srovnání relativní exprese genu <i>HPN</i> v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA	40
<b><u>7. Diskuse</u></b>	42
<b><u>8. Závěr</u></b>	47
<b><u>9. Seznam citované literatury</u></b>	48
<b><u>10. Seznam zkratk</u></b>	53
<b><u>11. Přílohy</u></b>	54

# 1. Úvod

---

Karcinom prostaty (KP) nadále zůstává jedním z největších zdravotních problémů nejen České republiky, ale celého světa. Je dlouhodobě jednou z nejčastějších malignit mužské populace v České republice a díky zvyšující se incidenci za sebou postupně zanechává karcinom plic i tlustého střeva a konečníku a dostává se na pomyslnou první příčku v nádorové incidenci. Je život ohrožujícím nádorem, pro který neexistuje kauzální léčba, a třetí nejčastější příčinou úmrtí mužů na zhoubné nádory v ČR. Rostoucí trend nově identifikovaných onemocnění je alarmující. Nebezpečí nesnižuje ani fakt, že incidence vzrůstá i díky efektivnějším způsobům včasné detekce karcinomu prostaty, snižující se úmrtnosti populace a prodlužování střední délky života, právě naopak. Zastoupení lidí ve vyšším věku stále stoupá a pokud v nejbližší době nenastane zásadní zvrát v prevenci a terapii karcinomu prostaty, lze i nadále očekávat absolutní a procentuální zvyšování nových případů a toto onemocnění se může stát skutečnou metlou mužských seniorů.

Největším úkolem a výzvou při vývoji nových diagnostických a terapeutických postupů u nádorových onemocnění je lepší pochopení molekulárních mechanismů nádorového bujení a identifikace nových kandidátních genů spojených s progresí nádorů.

## 1.1 Anatomie a fyziologie prostaty

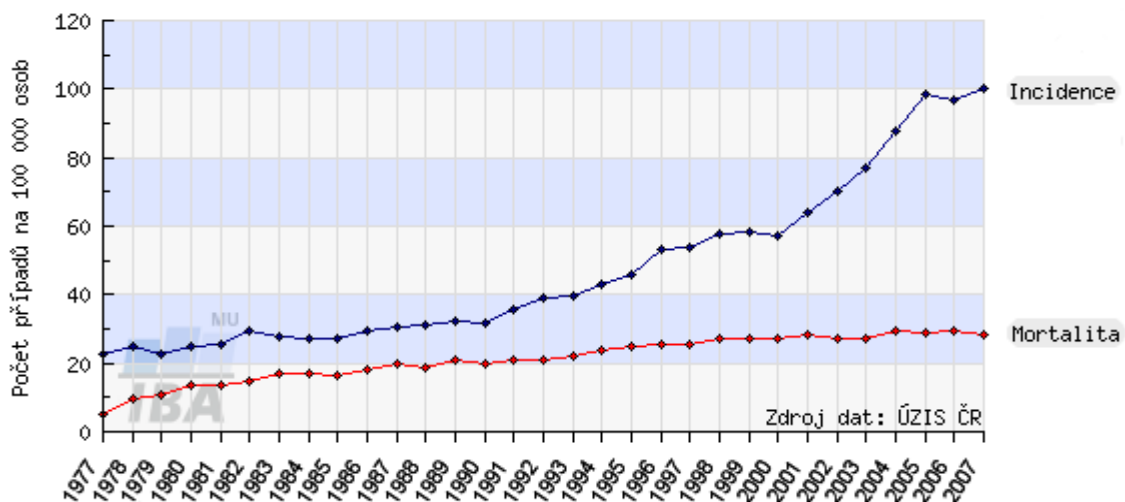
Prostata (žláza předstojná) je součástí mužského pohlavního systému. Představuje přídatnou pohlavní žlázu o velikosti kaštanu, jež obklopuje začátek močové trubice těsně pod močovým měchýřem. Pod prostatou se nachází přední stěna konečníku, po jejíž stranách vedou důležité cévy a nervy. Je tvořena tuboalveolárními žlázami, v počtu 30-50, které jsou zanořeny ve stromatu tvořeném spleť hladké svaloviny a vaziva. Stroma je uloženo okolo močové trubice, zatímco žlásky jsou situovány na periferii prostaty. Žláza je obalena vazivovým pouzdem. Prostatou prochází močová trubice a společná vývodní cesta chámovodu a vývodu semenného váčku, které ústí do prostatické části močové trubice.

Primární funkce prostaty spočívá v produkci 15-30 % objemu tekutiny ejakulátu. Sekret je tekutý, bezbarvý, kyselé reakce (pH 6,4). Obsažený zinek ovlivňuje metabolismus testosteronu v prostatě, citrát plní funkci pufru, prostaglandiny stimulují svalovinu dělohy a přispívají tím k transportu spermií, proteázy působí řídnutí ejakulátu a polyaminy spermin a spermidin ovlivňují pohyblivost spermií. Prostata je senzitivní na hormony. Testosteron se ve stromatu mění pomocí 5- $\alpha$ -reduktázy v účinnější dihydrotestosteron, který účinkuje na stroma i na žlázové buňky a udržuje prostatu v činnosti (Čihák R., 2002).

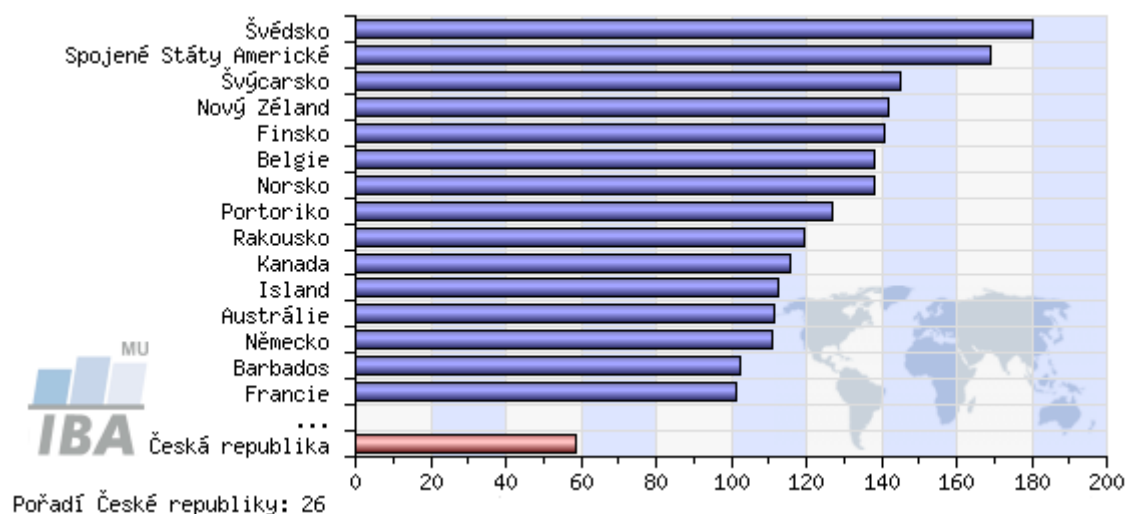
## 1.2 Epidemiologická data karcinomu prostaty

Incidence se podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) zvýšila z 54,03 diagnóz na 100 000 obyvatel v roce 1997 na 100,22/100 000 obyvatel v roce 2007. V roce 1997 bylo zaznamenáno 2706 případů, o deset let později to bylo 5094. Přestože dochází k růstu incidence, mortalita se významněji nemění. Úmrtnost v roce 2007 činila 1443 mužů (28,4/100 000), v roce 1997 pak 1283 mužů (25,6/100 000). Ve srovnání s vyspělými sousedními státy Rakouskem a Německem je incidence v ČR téměř poloviční. Je však zářející, že v Rakousku, kde lze předpokládat přibližně stejný genofond, obdobné stravovací návyky a podobný způsob života, bylo hlášeno méně úmrtí než v ČR (Študent V., et al., 2006).

**Graf 1-1** Karcinom prostaty - časový průběh incidence a mortality v ČR prostaty (zdroj dat: ÚZIS ČR; www.svod.cz)



**Graf 1-2** Srovnání incidence karcinomu prostaty s ostatními zeměmi světa. Přepočteno na 100 000 obyvatel. (Zdroj dat: GLOBOCAN 2002; www.svod.cz)



Riziko vzniku karcinomu prostaty u mužů v zemích západního světa se pohybuje mezi 11 a 13 %. Tyto hrozivé údaje jsou korigovány poznatkem, že velkou část tvoří tzv. latentní nádory, tedy tumory mikroskopických rozměrů, velmi dobře diferencované, pomalu rostoucí, bez progresu a klinicky se nemanifestující. V průmyslově vyspělých státech světa je prevalence karcinomu třikrát větší než v rozvojových zemích (Dvořáček J., et al., 2005). ČR bohužel patří k zemím s nejvyšší úmrtností na toto onemocnění při hodnocení indexu mortalita/incidence. Ačkoli se v posledních letech vývoj mortality stabilizoval, v některých zemích jako je USA se již daří díky aktivnímu přístupu úmrtnost na karcinom prostaty snižovat. Nádor prostaty je vyléčitelný za předpokladu, že nepřestoupil hranice orgánu. Bohužel v podmínkách ČR má zatím pouze přibližně třetina nemocných zjištěný lokalizovaný nádor a asi 40 % tumorů je v době diagnózy již značně pokročilých (Kolombo I., 2009).

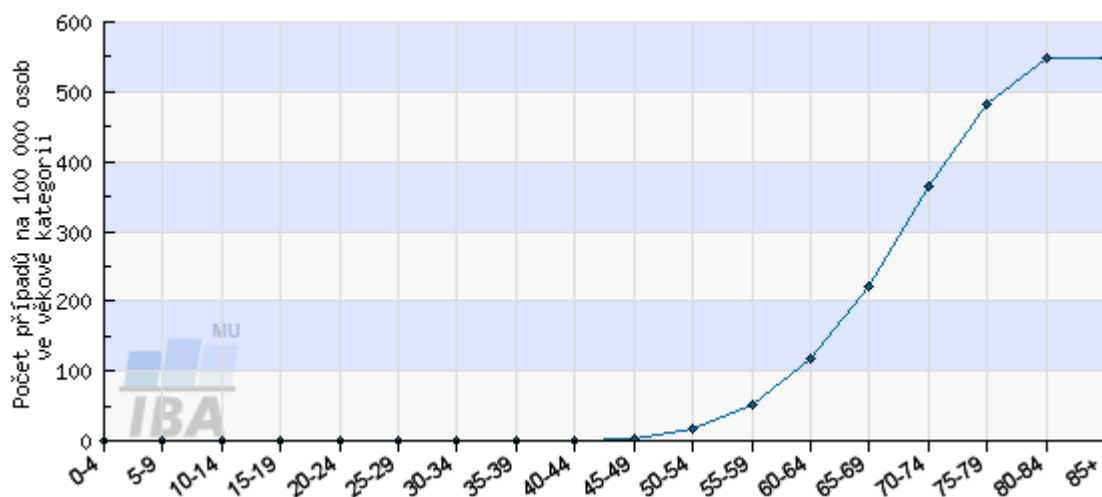
### 1.3 Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty

Stejně jako u většiny malignit jsou i rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty multifaktoriální a můžeme je schematicky rozdělit do dvou skupin. Existuje tak celá řada endogenních faktorů, mezi které můžeme zařadit věk, rodinnou

anamnézu, rasové vlivy, či hladinu hormonů a mnoho exogenních faktorů, mezi něž patří nutriční návyky, životní styl, pohybová aktivita nebo obezita.

**Věk** - Ačkoli je věk rizikovým faktorem u mnoha onemocnění, narůstá incidence s věkem u karcinomu prostaty mnohem rychleji, než u jiných malignit. Asi 80 % karcinomů prostaty je diagnostikováno u mužů ve věku nad 65 let. Během posledních dvou desetiletí lze ve vyspělých zemích vyzorovat posun k nižším věkovým skupinám. Tyto epidemiologické proměny lze přisuzovat mimo jiné zahájení vyšetřování prostatického specifického antigenu - PSA (Študent V., et al., 2006).

**Graf 1-3** Karcinom prostaty - věková struktura populace pacientů karcinomu prostaty (zdroj dat: ÚZIS ČR; www.svod.cz)



**Rasa** - Rasa patří mezi hlavní rizikové faktory vzniku onemocnění. Nej přesnější údaje jsou díky pestrému etnickému složení obyvatelstva, žijícího v přibližně stejných podmínkách, z USA. Z nich vyplývá, že černoši mají nejvyšší riziko vzniku karcinomu prostaty ze všech etnických skupin na světě. Karcinom prostaty tvoří 30 % všech nádorů u domorodých Američanů a Američanů asijského původu, u bílých a hispánských Američanů se vyskytuje v 37 % a u amerických černochoů v 50 % (Dvořáček J., et al., 2005). Postižení afroameričanů je ve srovnání s bělochy závažnější. S ohledem na socioekonomické faktory a životní styl, přispívají k tomuto nepoměru také odlišnosti na molekulární úrovni. Byly



pozorovány rozdíly mezi geny pro enzymy, které jsou zapojeny do procesů biosyntézy a metabolismu androgenů. Radikální rozdíly byly zjištěny v expresi, v délce a v opakování tripletu CAG androgenního receptoru (AR). Tento receptor vytváří nejkratší úseky u černochů, středně dlouhé u bělochů a nejdelší u Asiatů. U černochů byla zaznamenána zvýšená aktivita receptorů a vyšší účinnost stejných hladin androgenů. Mezi etnické diference vykazují také růstové faktory a jejich receptory EGFR a EphB2, či geny regulující apoptózu (Hatcher D., et al., 2009).

**Rodinná anamnéza** - Riziko nádoru prostaty, především pak jeho brzkého vzniku, je silně ovlivněno rodinnou anamnézou (počet příbuzných s karcinomem prostaty a jejich věk v době diagnózy). Epidemiologické studie prokázaly, že dominantně dědičné geny s vysokou penetrací způsobují 5-10 % všech případů nádorů prostaty a až 40 % karcinomů s raným počátkem. Hereditární karcinom prostaty je v průměru diagnostikován o 6 až 7 let dříve než karcinom sporadický, nicméně se klinicky od této formy neodlišuje. Důsledkem brzkého počátku onemocnění je vyšší procento zemřelých mužů s hereditární formou nádoru prostaty ve srovnání s formou sporadickou (Bratt O., 2002). Relativní riziko (velikost asociace mezi rizikovým faktorem a zdravotním následkem; = 0...nemá vliv; > 2,5...velké riziko ) výskytu karcinomu prostaty při postižení bratra je 3,0-4,5 a otce 1,9-2,3. Relativní riziko stoupá s počtem postižených příbuzných prvního stupně - bratr, otec (Dvořáček J., et al., 2005). Ve Skandinávské studii jednovaječných dvojčat bylo prokázáno, že hereditární faktory objasňující riziko vzniku onemocnění byly vyšší u karcinomu prostaty (42 %) než-li u karcinomu kolorekta (35 %) a karcinomu prsu (27 %). U mužů s rodinnou anamnézou se doporučuje začít s preventivním sledováním již ve 40 letech (Pacík D., 2008).

**Hormonální vlivy** - Normální růst a funkce prostaty závisí na hladině aktivního testosteronu, který je již v nízkých dávkách významným nádorovým promotorem. To podporuje i zjištění, že se tento nádor nevyskytuje u kastrovaných mužů a u jedinců s kongenitálními hormonálními abnormalitami. Karcinom prostaty je ve svých počátcích závislý na androgenech a jejich potlačením může regresovat. Studie popisující vysoké hladiny testosteronu u pacientů s nádorem prostaty jsou výjimečné (krysám ho lze indukovat dlouhodobým podáváním androgenů ve vysokých dávkách). Naopak nízké hladiny testosteronu byly označeny za produkt velmi agresivních forem nemoci s celkově horší prognózou u pokročilých stádií.

Zdá se tedy pravděpodobné, že nikoli vysoké hladiny testosteronu, ale především dlouhodobá expozice testosteronu způsobuje predispozici ke vzniku nádoru prostaty (Benešová L., et al., 2007).

**Role výživy** - Významně nejnižší incidenci karcinomu prostaty můžeme sledovat u Asiatů. Avšak asijské imigranti do USA mají zvýšené riziko vzniku karcinomu prostaty již v 1. a 2. generaci po přistěhování. Incidence je 3-9krát vyšší, než u mužů v jejich původních zemích. Tyto údaje nasvědčují tomu, že zdaleka nejen genetické faktory, ale i vlivy okolního prostředí a stravovací návyky stojí za vznikem onemocnění (Schmidt M., et al., 2007). Byla prokázána souvislost mezi vznikem karcinomu prostaty a nadměrnou konzumací tuku, obsaženého především v červeném mase. V asijských zemích s nízkou incidencí prostatického karcinomu je příjem tuků v potravě mnohem menší než v USA a západních zemích, kde se typickou stravou stává fast food občerstvení s vysokým obsahem živočišných tuků a masa. Dalšími dietními faktory, potencionálně zvyšujícími riziko nádoru prostaty, jsou mléko a mléčné výrobky. Nejsou sice známy mechanismy účinku, předpokládá se však účast vápníku v procesu snížené produkce vitamínu D a následné snížení buněčné proliferace. Inhibice růstu nádoru lze docílit nízkotučnou dietou (Clinton SK., et al., 1997). Mezi faktory snižující riziko vzniku karcinomu patří lykopen - karotenoid vyskytující se v rajčatech, vitamin D, vitamin E a selen.

Nejasné vztahy zůstávají mezi vznikem karcinomu prostaty a vazektomií, sexuální aktivitou, virovými infekcemi sexuálně přenosných chorob, či benigní hyperplazií prostaty (BPH). U hyperplázie vyvstává problém, jak rozlišit vzájemnou podmíněnost těchto onemocnění, neboť obě jsou frekventované ve vyšším věku a velmi často se vyskytují současně.

#### **1.4 Patologie karcinomu prostaty**

Makroskopické rozpoznání karcinomu prostaty je velmi obtížné, a proto má v diagnostice zásadní význam mikroskopické vyšetření. V prostatě lze nalézt široké spektrum epiteliálních atypií proliferativního charakteru, které předcházejí samotnému nádoru. Prostatické prekancerózy dělíme do dvou kategorií: *atypická adenomatózní hyperplázie* (AAH) a *prostatická intraepiteliální neoplázie* (PIN), dělí se do kategorií PIN s nízkým stupněm diferenciací (LG-PIN) a PIN vysokého

stupně diferenciaci (HG-PIN). Mnoho studií prokázalo těsnou souvislost mezi HG-PIN a karcinomem prostaty (Dvořáček J., et Babjuk M., 2005).

Nejčastější histologickou formou karcinomu prostaty je adenokarcinom. Nádory označované jako malobuněčný karcinom, karcinom přechodného epitelu nebo sarkom jsou velmi vzácnou, ale současně velmi agresivní formou nádoru prostaty, která obvykle neprodukuje prostatický specifický antigen (PSA) a není hormonálně dependentní. Vyžaduje ovšem vysoce agresivní radikální chirurgickou léčbu a chemoterapii (Pacík D., 2008). Adenokarcinomy prostaty se dají charakterizovat podle žlázek, které jsou výrazně menší než žlázy normální. Zásadní jsou také poměrně velká a výrazná jádérka a nedostatek bazálních buněk.

Z prognostického hlediska má zásadní význam vyhodnocení stupně agresivity nádoru, tzv. grading, neboť pomalou progresi můžeme pozorovat u dobře diferencovaných karcinomů a naopak málo diferencované nádory rychle zakládají metastázy. V praxi se využívá hodnocení zavedené D. Gleasonem. Gleasonův skórovací systém rozlišuje, na základě hodnocení žlázek postižených karcinomem, 5 základních vzorů. Nejlépe diferencovaný nádor je označován jako grade 1 a nejhůře diferencovaný jako grade 5. Vzhledem k častému výskytu heterogenních nádorových struktur v karcinomu prostaty je výsledkem hodnocení numerický součet dvou nejčastěji se vyskytujících vzorů. Například Gleason skóre 5 (3+2), je ještě dobře diferencovaným nádorem s nízkým rizikem. Nádor s Gleason skóre 6 je již středně diferencovaný, skóre 7-10 značí špatně diferencovaný nádor s vysokým rizikem (Kolombo I., 2009).

### **1.5 Klinické příznaky karcinomu prostaty**

Karcinom prostaty bohužel nevyvolává žádné příznaky ve stádiu, kdy je léčitelný. Pokud se příznaky objeví, bývá to až v době, kdy je jeho vyléčitelnost velmi problematická. Ovšem díky vyšetření PSA je v bezpříznakové fázi diagnostikováno 75 % nádorů. Lokálně pokročilé novotvary se manifestují častým močením, zmenšením kapacity močového měchýře, močením proti odporu, zadržení moči, otoky dolních končetin při metastatickém postižení pánevních uzlin a hlubokou žilní trombózou. Metastázy karcinomu prostaty se nejčastěji tvoří ve skeletu (internetový zdroj: [www.koc.cz](http://www.koc.cz); staženo 2010).

V případě jasné diagnózy karcinomu prostaty je pro další léčbu nesmírně důležité přesně zjistit, jak je nádor skutečně pokročilý, tedy v jakém je stádiu. K tomu slouží systém TNM.

**Tabulka 1-1** TNM klasifikace (zdroj dat: www.koc.cz; staženo 2010)

<b>T - Primární nádor</b>	
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
T1	nádor neprokazatelný klinicky ani palpačně
T1a	nádor zjištěn náhodně histologicky, v 5% nebo méně resekované tkáně
T1b	nádor zjištěn náhodně histologicky, ve více než 5% resekované tkáně
T1c	nádor zjištěn při biopsii
T2	nádor omezen na prostatu
T2a	nádor postihuje polovinu laloku nebo méně
T2b	nádor postihuje více než polovinu laloku, ale ne oba laloky
T2c	nádor postihuje oba laloky
T3	nádor se šíří přes pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární šíření jednostranné nebo oboustranné
T3b	nádor infiltruje semenné vázky
T4	nádor se šíří do okolních struktur

<b>N - Regionální mízní uzliny</b>	
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách

<b>M - Vzdálené metastázy</b>	
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	chybí vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy
M1a	mízní uzliny mimo regionální
M1b	kosti
M1c	jiné lokalizace

## 1.6 Diagnóza a terapie karcinomu prostaty

Karcinom prostaty je stejně jako jiný zhoubný nádor vyléčitelný pouze za předpokladu detekce v časně fázi onemocnění. V současné diagnostice se používá prostatický specifický antigen (PSA), a digitální rektální vyšetření prostaty (DRV). V případě podezření na karcinom prostaty se jeho přítomnost potvrzuje biopsií prostaty a následným histopatologickým vyšetřením odebrané tkáně. Bez bioptického průkazu není možné pacienta léčit. Riziko úmrtí s ohledem na stanovené Gleason skóre a TNM klasifikaci uvádí tabulka 1-2.

**Tabulka 1-2** Riziko úmrtí na nádor prostaty (zdroj dat: Stáholová V., 2009).

	<b>GS 2 - 6</b>	<b>GS 7</b>	<b>GS 8 - 10</b>
<b>T<sub>1-2</sub>N<sub>X</sub></b>	nízké riziko	střední riziko	vysoké riziko
<b>T<sub>3</sub>N<sub>X</sub></b>	střední riziko	vysoké riziko	velmi vysoké riziko
<b>N<sub>1</sub></b>	střední riziko	vysoké riziko	velmi vysoké riziko

Pacient má v dnešní době v závislosti na stádiu nemoci čtyři možnosti léčby. V případě karcinomu prostaty ohraničeného na prostatickou žlázu jsou jimi pečlivé sledování (WW - watchful waiting), operační řešení (RAPE - radikální prostatektomie) nebo ozáření (RT - radioterapie). Možností léčby pokročilejších nádorů je blokáda hormonů (HT - hormonální terapie), na kterých je rostoucí nádor závislý. Osud pacientů pouze sledovaných, nebo těch radikálně léčených operací je dramaticky odlišný. Bylo dokázáno, že u mužů s lokalizovaným karcinomem prostaty, kteří byli léčeni radikální operací, došlo k 50% snížení výskytu metastáz a úmrtí na karcinom ve srovnání se skupinou pouze sledovaných mužů. Při volbě příslušného léčebného postupu je třeba položit si dvě zásadní otázky. Jak dlouho bude pacient ještě pravděpodobně žít? A jedná se o onemocnění ve stále ještě vyléčitelném stavu? Pečlivé sledování je metodou pro pozorování pacienta a pro zásah při progresi nádoru. Bohužel interval progrese většinou není možné zachytit. Optimálním pacient je takový, který je příliš nemocný, nebo starý, radikální řešení pro něj představuje vysoké riziko a doba zbytku života je příliš krátká. Radikální prostatektomie je vhodná pro pacienta, který bude žít dostatečně dlouho a který má

nádor lokalizovaný na prostatickou žlázu, nebo má mírně postupující nádor, který lze kompletně chirurgicky odstranit. Radioterapie je lepší alternativou pro muže, který je starší a jehož šance na definitivní vyléčení operací jsou nižší, tedy i u muže, s lokálně pokročilým nádorem, který je chirurgicky neodstranitelný. U pokročilého nádoru se používá hormonální blokáda, kdy máme buď alternativu chirurgickou (odstranění varlat), nebo chemickou (zásah do různých úrovní osy hypothalamus-hypofýza-gonády-prostata). Tyto postupy způsobí blokádu tvorby a působení androgenů, především testosteronu. Je důležité si uvědomit, že vzhledem k okolnosti, že se na androgenech závislý karcinom v určitou dobu změní na nezávislý, nepůsobí hormonální léčba dlouhodobě, ale pouze limitovanou dobu. Dalšími alternativami léčby jsou imunoterapie, genová terapie, inhibice angiogeneze, či chemoterapie (Pacík D., 2008).

**Tabulka 1-3** Přehled léčebných metod KP a jejich potenciálně negativní účinky (zdroj dat: Kolombo I., 2009)

	WW	RAPE	Zevní ozáření	Brachyterapie	HT
<b>Narušení erekce a sexuálních funkcí</b>	Vzácné	60 %	45 %	45 %	10-60 % podle typu
<b>Problém s udržení moči (inkontinence)</b>	Vzácné	9 %	Vzácné	2-4 %	Vzácné
<b>Časté a bolestivé močení</b>	Vzácné	Vzácné	8 %	10-20 %	Vzácné
<b>Průjmy</b>	Vzácné	Vzácné	8 %	8 %	10-30 % podle typu
<b>Metabolické a hormonální dysbalance</b>	Vzácné	Vzácné	Vzácné	Vzácné	30-70 % podle typu

## 2. Onkogenetika karcinomu prostaty

---

Molekulární mechanismy spojené se vznikem nádorového onemocnění nejsou doposud dostatečně ozřejměny. Proces maligní transformace je podmíněn získáním mnoha genetických a epigenetických změn. Ty jsou důsledkem vzrůstající genomové nestability způsobené chybami v kontrolních mechanismech buněčného cyklu (Hahn WC., et Weinberg RA., 2002). Tyto změny dovolují nádorovým buňkám získat specifické schopnosti, jakými jsou soběstačnost buňky pro buněčné signály, deregulace kontroly buněčného cyklu, možnost úniku z přísně regulované programované buněčné smrti nebo neomezený replikační potenciál díky reaktivaci telomerázy (Hanahan D., et Weinberg RA., 2002). Genetické změny uvnitř rostoucí tumorové masy umožňují nádorové buňce získat schopnosti k indukci angiogeneze, invazi do sousedních tkání a tvorbě metastáz ve vzdálených orgánech (Cavallaro U., et Christofori G., 2000).

Přenos vlastností podporujících nádorový zvrát buňky na další generaci buněk je podle současných znalostí možný dvěma způsoby: geneticky nebo epigeneticky. Epigenetické změny jsou definovány jako možné dědičné změny genové exprese při nezměněné sekvenci DNA. V případě genetické cesty dochází buď k mutaci v genomu buňky určitého orgánu, či tkáně, nebo k získání germinální mutace od rodičů. Příkladem důležité modifikace vedoucí ke vzniku nádorové buňky je přeměna protoonkogenu v onkogen. Protoonkogeny jsou součástí buněčných regulačních kaskád a signál k proliferaci dávají pouze za přísné regulace odpovědi na podněty přicházející z okolí buňky. Jejich mutace může vést k tomu, že začnou generovat silný, neregulovaný signál vedoucí k nekontrolovatelné proliferaci buňky (Štern P., 2008). Jiným důležitým příkladem jsou produkty tumor-supresorových genů, které zastavují buněčné dělení. Mutace v obou alelách (narozdíl od mutace v jedné alele u protoonkogenů) genu na homologním páru chromosomů vede k poruše regulace buněčného cyklu a následné proliferaci.

## 2.1 Příklady kandidátních genů odpovědných za vznik a rozvoj karcinomu prostaty

Karcinom prostaty vzniká mutací, či deregulací genů, jež se účastní kontroly buněčného cyklu, signální transdukce, buněčné adheze, exprese androgenových receptorů a mnoha dalších buněčných drah (Foley R., et al., 2004). Mezi proteiny buněčného cyklu, jež jsou kódovány geny běžně mutovanými při nádoru prostaty, patří například protein Rb, p14, p16, p53, či p27 (Lee JT., et al., 2008). V kaskádách signální transdukce můžeme narazit na tumor-supresorový gen **PTEN**. Je regulátorem dráhy kinázy Akt a je lokalizovaný na úseku chromosomu 10q23, což je region, jež je u karcinomu prostaty často deletován. Snížená hladina proteinu PTEN byla zaznamenána v pokročilých stádiích nádoru prostaty, byla spojena s vyšším Gleason skóre a s rizikem opakovaného výskytu nádoru (Halvorsen OJ., et al., 2003).

Růst karcinomu prostaty je závislý na androgenech. Významná je role genů zapojených do aktivace androgenních receptorů (AR). Bohužel téměř ve všech případech nevede androgenní ablace, používaná v terapii, k permanentnímu zastavení nádorové progresi. Poté co je prostatě znemožněn dostatečný přísun androgenů, například testosteronu, ztrácejí prostatické nádorové buňky senzitivitu k androgenům a začnou proliferovat bez hormonů. Analýzy u karcinomů nezávislých na androgenech odhalily, že se v 90 % případů objevuje zvýšená exprese genu **AR**, genu pro androgenní receptor, a genů reagujících na androgeny. To značí, že je gen **AR** nepatříčně aktivován také v nepřítomnosti androgenů. Příčinami mohou být mutace **AR**, amplifikace a zvýšená exprese **AR**, nebo aktivace **AR** nesteroidními působky a deregulovanými signály (Kung HJ., et Evans CP., 2009).

Také buněčná adheze hraje roli v iniciaci a progresi karcinomu prostaty. Gorlov IP., et al., (2009), prokázal spojitost mezi nádorovým růstem a potlačením exprese integrinů. Pokles exprese vede ke zvýšené buněčné proliferaci a zvýšené malignitě. V souladu s naměřenými výsledky vyslovili kolagenovou hypotézu prostatické tumorigeneze. Ta za počáteční krok tumorigeneze považuje, s přibývajícím věkem související, sníženou expresi kolagenových genů a ostatních genů kódujících ligandy pro integriny. Vyčerpání ligandů vede k akumulaci integrinů a aktivaci buněčné smrti, do které jsou zapojeny integriny. Této smrti se buňky



snaží vyhnout potlačením exprese integrinů, která vede ke zvýšené buněčné motilitě a proliferaci. To vše zvyšuje potenciál vzniku nádoru.

## **2.2 Geny a proteiny jako biomarkery karcinomu prostaty**

Výše byly vypsány vybrané druhy buněčných drah a genů, u nichž změny regulace, či mutace přispívají k nádorovému zvratu prostatických buněk. Tumorigeneze je velmi komplexní proces a vysvětlení spletitých reakcí v ní probíhajících si vyžádá desetiletí výzkumů. Intenzivní studie genů, potencionálně zapojených do nádorové progresie, přinášejí důležité poznatky o podobě nových klinických biomarkerů, které přispívají k rané detekci karcinomu prostaty. Právě včasná detekce je nejdůležitějším faktorem pro úspěšnou léčbu nádorových onemocnění.

### **2.2.1 Kalikreiny (KLK)**

Kalikreiny jsou serinproteázy, účastníci se mnoha fyziologických pochodů, mezi které patří regulace krevního tlaku, hormonálních procesů nebo remodelace tkání. Jejich exprese je obvyklá především v tkáních regulovaných steroidními hormony. KLK jsou kódovány multigenní rodinou, lokalizovanou na chromosomálním lokusu 19q13.3-4. KLK3, prostatický specifický antigen (PSA), je nejúčinnějším nádorovým biomarkerem karcinomu prostaty, který byl kdy použit (Mavridis K., et Scorilas A., 2010). Toto označení dostal, protože umožňuje nejen monitorovat progresi nádoru, jeho agresivitu, úspěšnost léčby, recidivu po léčbě, ale především přispívá k časně detekci karcinomu prostaty (Pacík D., 2008). PSA se původně používal k monitorování pacientů s karcinomem prostaty a byl následně použit pro screening. Objev PSA a jeho uvedení do klinické praxe v devadesátých letech minulého století měly zásadní vliv na zvýšení incidence nádoru. Významnou slabinou PSA je, jak naznačuje jeho název, že není specifický pouze pro karcinom prostaty, ale pro celou prostatu, a jeho hladina se zvyšuje také při jiných prostatických onemocněních a symptomech. Roste také s postupným stárnutím díky zvětšující se prostatě. Glykoprotein PSA tvoří téměř výhradně epiteliální tkáň prostaty. Jeho vyšší sérová hladina může být způsobena benigním zvětšením prostaty (BPH), nebo zánětem. Nemůžeme tedy PSA považovat za všemocný indikátor karcinomu prostaty, neboť muž může mít nízké hodnoty PSA

a přitom být postižen nádorem prostaty, nebo může být naopak zdravý i při vysokém PSA. Jako suspektní pro karcinom prostaty byla určena spodní hodnota 2,5ng/ml (Študent V., 2006).

**Tabulka 2-1** Referenční hodnoty PSA vztahované k věku (zdroj dat: Kolombo I., 2009)

Věk [roky]	Referenční hodnota PSA [ng/ml]	Věk [roky]	Referenční hodnota PSA [ng/ml]
40 - 49	< 2,5	60 - 69	< 4,5
50 - 59	< 3,5	70 - 78	< 5,5

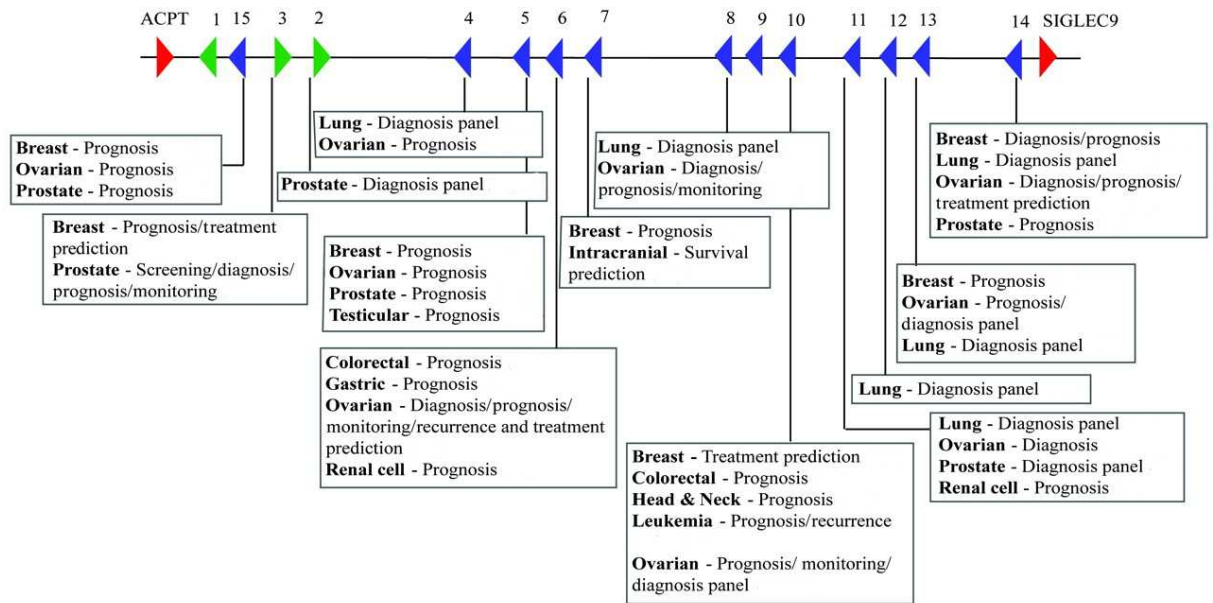
**Tabulka 2-2** Předpověď rizika pro karcinom prostaty na základě zjištěné hodnoty PSA dle údajů EAU Guidelines (European Association of Urology) (zdroj dat: Kolombo I., 2009)

PSA [ng/ml]	Pozitivní prediktivní hodnota pro karcinom prostaty
0 - 1	2,8 - 5%
1 - 2,5	10,5 - 14%
2,5 - 4	22 - 30%
4 - 10	41%
> 10	69%

Dalšími vylepšenými a specifitějšími testy PSA jsou denzita PSA (hodnota celkového PSA v séru dělená objemem prostaty), podíl vázaného a volného PSA (čím menší je podíl vázaného PSA, tím větší je pravděpodobnost karcinomu prostaty) a dynamika změny PSA (PSA-velocita), kdy při vyšším nárůstu PSA než o 0,75 ng/ml /rok vzniká podezření na vývoj nádoru. (Pacík D., 2008).

Také ostatní členové KLK jsou slibnými klinickými indikátory karcinomu prostaty. V úvahu přicházejí geny **KLK2, 4-6, 10, 11, 13-15**. Především geny **KLK5, 11, 14, 15** by se, vzhledem ke korelaci exprese a Gleason skóre nádoru, mohly stát prognostickými markery. V případě **KLK2** byly jako rizikové faktory identifikovány dva jednonukleotidové polymorfismy (SNP) mající vliv na hladinu exprese (Emami N., et Diamandis EP., 2008)

**Obrázek 2-1** Schema lokusu KLK a potenciální použití KLK genů jako nádorových biomarkerů (zdroj dat: Emami N., et Diamandis EP., 2008)



### 2.2.2 Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)

Důležitým indikátorem stupně závažnosti karcinomu prostaty mohou být hladiny exprese prostatického specifického membránového antigenu **PSMA**. PSMA je typem membránového glykoproteinu, lokalizovaného v epitelových buňkách prostaty, který má foláthydrolázovou a karboxypeptidázovou aktivitu. Narozdíl od nízkých hladin v normálním prostatickém epitelu vzrůstají několikanásobně v pokročilých stádiích prostatického nádoru, při tvorbě metastáz a u na androgenech nezávislého karcinomu. Užití PSMA zatím nebylo převedeno do klinické praxe (Colombatti M., et al., 2009).

### 2.2.3 Prostatický nádorový antigen 3 (PCA3)

Gen **PCA3** je přítomen v 95 % případů karcinomu prostaty a jeho exprese v nádoru je významně zvýšená ve srovnání s benigní tkání. PCA3 je nekódující mRNA bez svého odpovídajícího proteinu. Klinicky je detekovatelný v moči a prostatické tekutině mužů s karcinomem prostaty. PCA3 je slibným markerem pro molekulární rozbor moči (Wang R., et al., 2009).

#### 2.2.4 *$\alpha$ -methylacyl-CoA-racemáza (AMACR)*

Enzym  $\alpha$ -methylacyl-CoA-racemáza je zapojen do oxidace a syntézy řetězců mastných kyselin, které nacházíme v mléčných výrobcích a červeném mase. Kromě toho se významně tvoří v nádorové tkáni prostaty. Enzym je kódovaný genem **AMACR** na chromosomovém lokusu 5p13.3, který vykazuje polymorfismy spojované s karcinomem prostaty. Během onemocnění byla zaznamenána upregulace genu, díky imunohistochemické analýze bylo možné s 95% pravděpodobností rozlišit benigní a nádorovou tkáň a AMACR je také prognostickým faktorem biochemické rekurence, či smrti pacienta (Sardana G., et al., 2008).

#### 2.2.5 *Fúzní proteiny TMPRSS2:ERG a TMPRSS2:ETV1*

U většiny prostatických nádorů jsou silně exprimovány transkripční faktory ERG nebo ETV1 patřící do rodiny proteinů ETS (E-twenty-six), která zahrnuje transkripční faktory účastnící se nádorové progresi. Bylo identifikováno přes 200 genů, majících úlohu v buněčné proliferaci, diferenciaci, hematopoéze, či angiogenezi, které tyto proteiny regulují. Geny **ERG** a **ETV1** jsou silně exprimovány v několika nádorových buněčných liniích a v řadě vzorků z lokalizovaných i metastatických prostatických karcinomů. Ukazuje se, že příčinou aktivace těchto onkogenů je translokace promotoru pocházejícího z genu **TMPRSS2** (transmembránová serin-2-proteáza). Nejčastěji dochází k delecí proměnlivého úseku DNA mezi **TMPRSS2** (lokus 21q22.2) a **ERG** (lokus 21q22.3). Typickým produktem fúzního genu jsou vysoce exprimované varianty proteinu ERG. Obdobně vznikají translokací **TMPRSS2** fúzní geny s **ETV1** (lokus 7p21.2). Tyto translokace jsou časnou událostí v etiologii karcinomu prostaty, neboť stejná translokace byla objevena i v některých prekurzorových lézích (Štern P., et al., 2008). Fúzi **TMPRSS2:ERG** bylo možné detekovat metodou FISH (fluorescence in situ hybridization) v 80-95 % tkáně nádoru prostaty, a tak by se tato fúzní forma genu mohla stát potenciálním cílem diagnostiky (Sardana G., et al., 2008).

Další potenciální biomarkery karcinomu prostaty jsou uvedeny v tabulce 2-3.

**Tabulka 2-3** Kandidátní biomarkery karcinomu prostaty a jejich možné klinické využití (zdroj dat: Sardana G., et al., 2008)

Kandidátní biomarker KP	Možnosti klinického využití
EPCA/EPCA-2	Imunohistochemická detekce KP, sérový marker pro rozlišení lokalizovaného a metastazujícího KP
Annexin A3	Snížená produkce v prostatické nádorové tkáni, prognostický marker rizika
TGF- $\beta_1$	Zvýšené imunohistochemické a sérové koncentrace při progresi KP
EZH2	Genová exprese v KP předpovídá progresi
E - cadherin	Snížená imunohistochemická exprese v KP koreluje se stupněm KP a se sníženým přežíváním
IL-6	Zvýšená sérová koncentrace v pokročilém stádiu KP
IGF/IGFBP	hladina IGF-1 slabě stoupá v séru KP, koncentrace IGFBP nepřímo koreluje s progresí KP
PSCA	Imunohistochemický marker spojený s Gleason skóre, potenciální cíl terapie
GSTP1	Detekce hypermetylace genového promotoru v moči pro posouzení biopsie
Hepsin	Imunohistochemická detekce v PIN a KP

### 3. Analyzované kandidátní geny karcinomu prostaty

---

#### 3.1 *SHB*

Hlavními příčinami vzniku nádorových onemocnění jsou abnormality v buněčné proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk. Pro správné fungování těchto procesů je nezbytná bezchybná buněčná signalizace. Účastní se jí i adaptorový protein SHB, spolupracující s tyrosinkinázovými receptory, který je zapojen do systému regulace apoptózy, angiogeneze, buněčného cyklu atd. Při jeho zvýšené expresi je prokázána snížená proliferace prostatických nádorových buněk PC3 (Davoodpour P., et al., 2007).

##### 3.1.1 *Struktura a funkce proteinu Shb*

Protein Shb byl objeven během identifikace genů indukovaných sérem v insulinové buněčné linii  $\beta$ TC-1 (Welsh M., et al., 1994). Název Shb vznikl zkratkou ze spojení protein SH2  $\beta$ -buněk, nicméně následně bylo zjištěno, že je **SHB** exprimován v mnoha tkáních (Welsh M., et al., 1998). Lokus genu **SHB** je lokalizován na chromosomu 9p12-p11, je dlouhý 150kb a obsahuje 6 exonů (Yulug IG., et al., 1994). Gen **SHB** a jím kódovaný protein Shb se uplatňují při přenosu signálu do jádra buňky a mohou být zařazeni mezi potencionální onkogeny. Shb obsahuje silně homologní motiv doménám SH2 a byl proto zařazen do kategorie proteinů SH2. Domény SH2 hrají zásadní roli v buněčné komunikaci. Typicky se vážou na fosforylované tyrosinové postranní zbytky tyrosinkináz, které slouží jako vazebná místa pro velkou skupinu intracelulárních signálních proteinů. Proteiny SH2 dělíme do dvou skupin. Do první patří proteiny s aktivní katalytickou doménou, jež se přímo podílejí na přenosu signálu tyrosinkinázových receptorů v signalizační síti. Funkcí druhé skupiny, do které patří protein Shb, je interakce proteinů signálních kaskád s aktivovanými tyrosinkinázovými receptory. Tyto proteiny jsou označovány jako adaptorové.

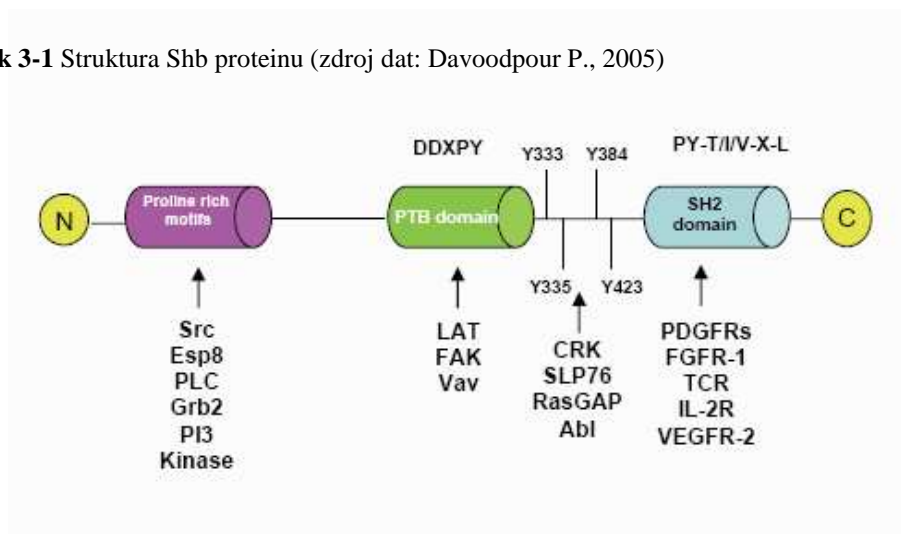
Shb je adaptorovým proteinem spolupracujícím s tyrosinkinázovými receptory, kterými jsou např. receptor pro růstový faktor krevních destiček (receptor PDGF), receptor pro epidermální růstový faktor (receptor EGF), receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor (receptor VEGF), nebo receptor pro

fibroblastový růstový faktor (receptor FGF). V reakci na aktivaci tyrosinkinázového receptoru vytváří proteinové komplexy. Dochází k seskupování signálních komponent pomocí vazby těchto složek na rozličné domény Shb (Karlsson T., et al., 1995). Strukturně rozlišujeme u proteinu Shb čtyři hlavní oblasti. Na N-konci se objevují sekvence bohaté prolinem (domény PR), díky nimž interaguje protein Shb s ostatními proteiny. Mnoho proteinů SH2 obsahuje také doménu SH3, která se může vázat na sekvenci bohatou prolinem jiných proteinů. Tímto způsobem mohou proteiny s oběma typy domén vytvářet můstky mezi receptorovými tyrosinkinázami a cílovými proteiny s doménami PR (Karlsson T. et Welsh M., 1996). Motivy bohaté na prolin vážou domény SH3 proteinů Src (Anneren C., et al., 2003) nebo c-Abl (Hägerkvist R., et al., 2007). Za doménami PR následuje sekvence vázající fosfotyrosin (doména PTB), s kterou interaguje kináza FAK, blíže k C-konci nalezneme postranní fosforylované tyrosinové zbytky vážící Crk (Anneren C., et al., 2003) a c-Abl (Hägerkvist R., et al., 2007). Na C-konci je situována doména SH2 bohatá na hydrofóbní aminokyseliny, jež se váže s receptory růstových faktorů. Přednostní složení vazebného místa je:



Je pravděpodobné, že aminokyselina leucin v pozici +3 je hlavní determinantou vazebného místa (Mareš J., 2001).

**Obrázek 3-1** Struktura Shb proteinu (zdroj dat: Davoodpour P., 2005)



### 3.1.2 Role *Shb* v regulaci apoptózy

*Shb* je pleiotropním proteinem regulujícím různorodé reakce, mezi které patří buněčná migrace, proliferace, diferenciaci a apoptóza (Anneren C., et al., 2003). Vodítko k tomu, jak *Shb* uplatňuje své funkce v procesu apoptózy můžeme vypožorovat z interakcí kinázy c-Abl s adaptorovým proteinem *Shb*.

Apoptóza je fyziologický děj, který je narozdíl od nekrózy indukován naprosto cíleně. Buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Je to tedy organizovaný a přísně regulovaný děj. Apoptózu buňky lze jednoduše rozpoznat díky morfologickým změnám zahrnujícím redukcii objemu buňky, kondenzaci chromatinu a rozpad buňky. Je nezbytná pro normální vývoj a funkci mnohobuněčného organismu. Chyby v signalizaci během apoptózy jsou typické pro tumorigeneze (Lowe SW., et al., 2004). Aktivaci apoptické reakce může způsobit například genotoxický, oxidativní nebo endoplasmatický stres (Igney FH., et Kramer PH., 2002). Buněčná, nereceptorová tyrosinkináza c-Abl patří mezi proteiny účastníci se odpovědi na stres endoplasmatického retikula. c-Abl je za normálních stavů přísně regulována. V případě poškození buňky se kináza c-Abl silně aktivuje, což může vyústit v zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu (Kumar S., et al., 2003). Složitá struktura proteinu c-Abl obsahuje domény a motivy, které umožňují interakce se signálními a adaptorovými proteiny pomocí domén SH2, SH3, PR sekvencí a domén PTB. *Shb* je substrátem pro c-Abl, neboť je tento adaptorový protein tyrosinkinázou fosforylován (Hägerkvist R., et al., 2007). Vědecká skupina pod vedením R. Hägerkvista dále zjistila, že samotný *Shb* reguluje fosforylaci c-Abl, a tak podle všeho ovlivňuje její kinázovou aktivitu. Biologický význam interakce c-Abl/*Shb* byl testován při zvýšené expresi obou proteinů a při knockoutu ***shb***. Při expozici toxickým sloučeninám spolu *Shb* a c-Abl asociují pomocí rozmanitých interakcí, což vede k regulaci nejen kinázové aktivity c-Abl, ale i signální dráhy pro buněčnou smrt.

*Shb* tak hraje ústřední roli v modulaci proapoptické signalizace mediované pomocí c-Abl. Při jeho zvýšené expresi byla prokázána redukce růstu prostatických nádorových buněk PC3. Děje se tak prostřednictvím interakcí s c-Abl. Při zvýšené expresi ***SHB*** byla prokázána redukce růstu nádoru *in vitro* a jeho exprese bývá nižší v tkáni pokročilého karcinomu prostaty (Davoodpour P., et al., 2007).



### ***3.1.3 Role Shb v regulaci angiogenezi***

Shb má též roli v proliferaci a diferenciaci endotelových buněk, čímž se podílí na procesu angiogeneze (Lingge L., et al., 2002), při němž jsou formovány nové krevní kapiláry. Děje se tak za fyziologických podmínek v embryogenezi, nebo při hojení ran, ale též za patologických stavů při revmatoidní artritidě, diabetické retinopatii nebo při vzniku nádorů. Hlavními regulátory angiogeneze jsou růstové faktory FGF a VEGF, jež jsou zahrnuty do proliferace, migrace a diferenciaci endotelových buněk. S receptory těchto růstových faktorů spolupracuje adaptorový protein Shb. Jednou z metod nádorové terapie může být inhibice nekontrolovatelné angiogeneze v nádoru. Způsob jak toho dosáhnout, můžeme hledat v indukci apoptózy v endotelových buňkách. Knockdown **shb** zvyšuje citlivost buněk SVR (angiosarkomická buněčná linie) k apoptickým působkům (Funa NS., et al., 2008). Shb se tak stává potencionálním cílem inhibice angiogeneze.

## ***3.2 POST***

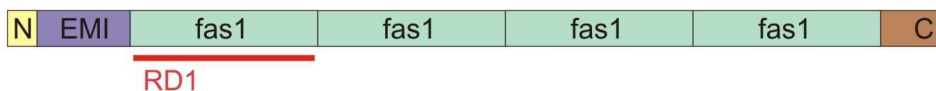
Mezi kandidátní geny karcinomu prostaty je zahrnut i gen **POSTN** kódující protein periostin. Ten je unikátním proteinem extracelulární matrix plnícím úlohy buněčné adheze. Zvýšenou expresi **POSTN** můžeme pozorovat v široké paletě lidských nádorových onemocnění, při nichž míra exprese koreluje s agresivitou nemoci (Puppin C., et al., 2008).

### ***3.2.1 Struktura a funkce periostinu***

Periostin, dříve nazýván OSF-2 (osteoblast-specific factor-2), byl identifikován v myších osteoblastech (Takeshita S., et al., 1993). Přítomnost periostinu u lidí byla potvrzena kromě osteoblastických buněčných linií také ve tkáních bohatých kolagenem, mezi které patří periodontální ligamenta, periost, fascie svalů kostí a srdeční chlopně. Jeho zásoby rostou především při mechanickém tlaku na tyto tkáně (Kikuchi Y., et al., 2008). Periostin je protein o velikosti 90 kDa, obsahuje typický signální peptid na N-konci, který je následován EMI-doménou bohatou na cystein, tandemovými opakujícími se doménami (RD1-4) a hydrofilní doménou na C-konci. Opakující se domény vykazující silné homologie s proteinem  $\beta$ ig-h3. Podobně jako periostin, tak i protein  $\beta$ ig-h3 obsahuje čtyři fasciclinové domény,

homologní s fasciclinem, který je proteinem buněčné adheze hmyzu (Sugiura T., et al., 1995).

**Obrázek 3-2** Schematická struktura periostinu



### 3.2.2 Adhezní vlastnosti periostinu

Periostin je tedy molekulou zapojenou do buněčné adheze. Adhezní molekuly jsou důležité pro organizaci extracelulární matrix, regulují buněčné interakce, ovlivňují migraci a tvar buněk. Významnou roli hrají v mnoha reakcích, např. v imunitním systému, při hojení ran, při zánětu, ale i při vzniku metastáz. Jsou lokalizovány na povrchu buňky a zprostředkovávají vazby na ostatní buňky nebo extracelulární matrix. Obecně můžeme molekuly buněčné adheze rozdělit do dvou skupin. Ta první, jejíž zástupcem jsou integriny zprostředkovává připojení buňky k substrátu (SAM - substrate adhesion molecules). Do druhé skupiny jsou zahrnuty kadheriny, selektiny, muciny, či proteiny superrodiny Ig. Tyto molekuly zprostředkovávají adhezi buněk (CAM - cell adhesion molecules). Periostin zprostředkovává adhezi vazbou s integriny  $\alpha_v\beta_3$  a  $\alpha_v\beta_5$  a zvyšuje tím motilitu buňky (Gillan L., et al., 2002). Integriny kromě adhezní funkce také umožňují přenos signálu mezi extracelulární matrix a buňkou. Integrin je transmembránovým proteinem. Vazba komponenty na vazebné místo integrinů způsobuje změny v molekule integrinu. Ke změně konformace dochází také v cytoplasmatické části integrinu, což vyvolá následné interakce s procesy, které řídí intracelulární signální dráhy (Vytásek R., 2009). Jednou z drah, která je aktivována periostinem, pomocí vazby s integriny, je signální dráha kinázy Akt, jež je spojována s nádorovými onemocněními (Bao S., et al., 2004). Kináza Akt má zásadní význam v buněčném přežívání a proliferaci. Nedávné studie prokázaly skutečnost, že neregulovaná dráha kinázy Akt je důležitým znakem mnoha lidských novotvarů a u většiny nádorových onemocnění můžeme pozorovat zvýšenou expresi a aktivaci kinázy Akt. Tento enzym se stává atraktivním cílem nádorové terapie, kdy by se inhibicí kinázy Akt mohl redukovat práh apoptózy a docházelo by k ničení nádorových buněk

(Lindsley CW., 2010). Signalizační kaskáda kinázy FAK je pak další dráhou, ve které se jako prostředník objevuje periostin a integriny, jež zde způsobují migraci hladkých svalových buněk (Li G., et al., 2010). Kináza FAK (focal adhesion kinase) je tyrosinkinázou, jejíž důležité buněčné funkce se projevují především v regulaci cytoskeletu a v buněčné migraci. Nicméně mnoho studií prokázalo její zvýšenou expresi v nádorech během tumorigeneze.

### ***3.2.3 Periostin a nádorová onemocnění***

Gen **POSTN** vykazuje zvýšenou expresi u mnohých nádorových onemocnění. Mimo jiné u nádorů vaječníků, tlustého střeva, pankreatu, štítné žlázy, prsu, plic, či u neuroblastomu. Některé studie popisují korelace mezi zvýšenou expresí periostinu a zvýšenou agresivitou tumoru. Je tomu například u plicních nádorů, neuroblastomu, či adenokarcinomu pankreatického ductu, nicméně byla zaznamenána i snížená transkripce **POSTN** v nádoru močového měchýře. Debaty se vedou o funkci periostinu během progresu nádorů. Existují důkazy jak pro podpůrné, tak pro supresivní působení periostinu na nádor (Tilman G., et al., 2007). Periostin například silně podporuje růst metastáz u nádorů tlustého střeva. V tomto případě je vylučován nádorovými buňkami a napomáhá k přežívání těchto buněk. Funguje zde jako parakrinní působek, který zvyšuje přežívání endotelových buněk a indukuje neovaskularizaci. Podporuje tím pochody úspěšné tumorové angiogeneze. Není žádným překvapením, že tyto efekty uplatňuje pomocí interakcí s integriny, neboť spojení mezi buněčným povrchem nádorových buněk a extracelulární matricí je neobyčejně důležitým krokem pro šíření nádoru, pro jeho přežívání a růst v rozdílných anatomických destinacích (Bao S., et al., 2004). Interakce s integriny také spouštějí buněčnou signalizaci a aktivaci určitých genů, které mohou exprimovat proteiny usnadňující nádorovou proliferaci a růst metastáz (Meredith J., et Schwartz M., 1997).

### ***3.2.4 Exprese periostinu v karcinomu prostaty***

K expresi genu **POSTN** dochází v široké škále zdravých tkání orgánů i nádorů, včetně prostaty, kde však chybí srovnatelná data. Tsunoda T., et al., (2009), imunohistochemickými metodami odhalil rozdílnou expresi v časných a pokročilých stádiích karcinomu prostaty. Zvýšenou expresi bylo možné pozorovat v raných stupních nemoci (u pacientů s Gleason skóre 6-7), nikoli v pozdějším

stádiu (Gleason skóre 8-10 a pacienti s metastázami v kostech). Kromě toho exprese **POSTN** v tumorovém stromatu významně korelovala se stupněm malignity. Zvýšené hladiny periostinu v časných stádiích karcinomu by mohly sloužit jako molekulární markery KP. Stejně tak by se mohly používat i k vyšetřování potenciálu vzniku metastáz.

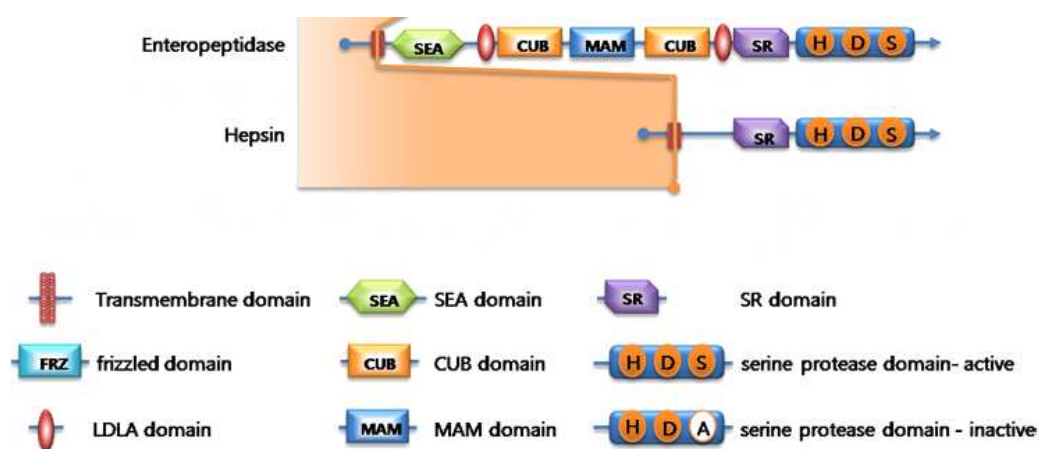
### **3.3 HPN**

Ačkoliv je dnes prostatický specifický antigen (PSA) nejpoužívanějším diagnostickým biomarkerem, můžeme v příštích letech očekávat využití dalších markerů. PSA není specifický pouze na karcinom prostaty, a tak i přes neoddiskutovatelný přínos při detekci nádoru prostaty není jeho hladina v krvi stoprocentně určující pro přesnou diagnózu. Otvírá se tak prostor například pro hepsin, jehož hladiny jsou během karcinomu prostaty významně zvýšené.

#### **3.3.1 Struktura a funkce hepsinu**

Gen **HPN**, který se nachází na lokusu chromosomu 19q11-13.2, kóduje proteázu, původně identifikovanou v lidských játrech. Proteázy obecně hrají důležitou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech, katabolismem proteinů počínaje a metastázou nádoru konče (Tsuji A., et al., 1991). Proteázy se dělí podle katalytických skupin přítomných v místě, kde proteáza na bílkovinu působí. Hepsin je jednou ze serinproteáz, mezi nimiž byl zařazen do skupiny transmembránových serinproteáz typu II (TTSP). Mezi hlavní rysy všech TTSP patří krátká cytoplasmatická doména na N-konci, dále oblast procházející přes membránu, centrální region variabilní délky obsahující strukturální domény a serinproteázová doména na C-konci s podobným uspořádáním, jako mají endopeptidázy (Netzel-Arnett S., et al., 2003).

**Obrázek 3-3** Srovnání struktury proteáz typu TTSP jmenovitě endopeptidázy a hepsinu (zdroj dat: www. http://atlasgeneticsoncology.org)



Stejně jako u většiny TTSP, nebyla ani u hepsinu fyziologická funkce plně určena, neboť bylo identifikováno jen málo jeho *in vivo* proteinových substrátů. Mezi ty rozpoznané patří například laminin-332, jež je složkou bazální membrány a účastní se buněčné adheze, či aktivace kožních buněk (Tripathy M., et al. 2008), dále pak pro-urokináza (Moran P., et al., 2006) nebo hepatocytární růstový faktor (HGF). Hepsin se účastní aktivace krevní kaogulace (uvádí v činnost koagulační faktor VII), růstu lidských hepatocytů, či vývoje myších blastocyst. Myši s deficitem hepsinu se však vyvíjely normálně, byly plodné a měly normální srážení krve i obnovu jater po hepatektomii. Pozornost na hepsin je proto upřena především díky jeho zvýšené expresi při karcinomu prostaty, ovaria, či ledvin (Herter S., et al., 2005).

### 3.3.2 Hepsin a karcinom prostaty

Gen **HPN** je jedním z genů s nejvyšší expresí během nádoru prostaty a to až u 90 % případů. Jeho hladina může být navýšena až na desetinásobek. Jeho zvýšená exprese je pozorována již od iniciace karcinomu a na vysoké hladině se udržuje také během progrese a vzniku metastáz. Exprese hepsinu významně koreluje se zjištěnými klinickými příznaky (Leman ES. et Getzenberg RH., 2009). Imunohistochemické studie dokázaly, že na rozdíl od benigní hyperplázie prostaty (BPH) můžeme produkci hepsinu pozorovat již při PIN (Dhanasekaran SM., 2001).

Zvyšující se exprese podporuje nádorovou progresi a tvorbu metastáz. U myší s lokalizovaným karcinomem prostaty podněcuje progresi a přechod z nemetastazující formy do agresivní s metastázami v kostech, játrech a plicích (Klezovitch O., et al., 2004). Molekulární mechanismy působení hepsinu na karcinom prostaty *in vivo* zůstávají neznámé. Za indicie *in vitro*, vedoucí k pochopení funkce hepsinu v tumorigenezi, můžeme považovat interakce s pro-urokinázou a HGF, které by mohly napomáhat vzniku metastáz (Chevillet JR., et al., 2008). Ačkoliv má hepsin naději stát se signifikantním biomarkerem, bude k naplnění jeho diagnostického potenciálu třeba provést analýzy ještě mnoha vzorků.

## 4. Cíle práce

---

Intenzivní studium regulace genů a proteinů karcinomu prostaty doposud nepřineslo zásadní změny do diagnostiky nádoru prostaty. Například diagnosticky nejvýznamnější, ale zároveň problematický marker PSA, se využívá již přes dvacet let. Přesto však s přibývajícími vědeckými studii rostou šance pro vznik dokonalejších nástrojů detekce karcinomu prostaty. Ty povedou také k zlepšeným způsobům léčby, neboť přesně kvantifikovaný rozsah a stupeň nádoru napomůže k výběru nejvhodnějšího terapeutického procesu. Jednou ze studií, potenciálně přispívající v hledání nových postupů, může být i předkládaná analýza tří kandidátních genů karcinomu prostaty.

Cílem této práce bylo:

- 1) Shromáždit co největší soubor pacientů diagnostikovaných na karcinom prostaty, jejich klinická data a biologický materiál.
- 2) Izolovat mRNA v dostatečné čistotě z prostatických vzorků pacientů s karcinomem prostaty.
- 3) Optimalizovat a zavést do laboratorní praxe molekulárně genetické diagnostické metody (RT-PCR) a využít tyto metody k identifikaci rozdílů v genové expresi genů **SHB**, **POSTN** a **HPN**.
- 4) Pokusit se určit korelaci exprese s molekulárně biologickými vlastnostmi karcinomu prostaty a dalším průběhem onemocnění.
- 5) Zhodnotit prognostický význam těchto korelací.

## 5. Materiál a metodika

---

### 5.1 Pacienti

Do studie bylo zařazeno 67 pacientů ve věku 46 - 82 let (průměrný věk 65,4 roku). U těchto mužů byla provedena biopsie prostaty, kontrolovaná transrektální sonografií, nebo byl materiál získán odběrem části nádoru z preparátu po radikální prostatektomii. Přítomnost karcinomu a jeho molekulárně biologická specifikace byla posouzena histologickým vyšetřením části vzorku. Při potvrzení nálezu nádoru byl stanoven grading malignity (Gleason skóre) a nádorový staging (TNM).

### 5.2 Odběr vzorků

Transrektální biopsie prostaty byla provedena pomocí speciální transrektální ultrazvukové sondy, jež umožňuje cílenou kontrolovanou punkci suspektních oblastí prostaty. Z důvodu nespecifické struktury karcinomu se kromě cílené biopsie provádí segmentární odběr 6-12 vzorků podle naléhavosti suspekce. Získané vzorky byly rozděleny na tři části, obě periferní byly vyšetřeny na Ústavu klinické patologie FN Motol a 2.LF UK. Střední segment byl okamžitě přenesen do roztoku RNAlater a uchováván při teplotě +4°C až do extrakce mRNA. Dále byly zpracovány jen vzorky s prokázaným karcinomem prostaty v obou periferních částech.

Radikální prostatektomie je kurativní výkon, při kterém dochází ke kompletnímu odstranění prostaty včetně pouzdra. Po tomto zákroku byl ze suspektní tkáně odebrán vzorek. Jeho část byla okamžitě přenesena do RNAlateru. Vzorek prostaty byl zhodnocen histologem a dále zpracován jen v případě pozitivního nálezu

Kontrolními vzorky v dané studii byly odběry z benigních hyperplázií prostaty. Ty byly získány transuretrální resekci prostaty nebo transvezikální prostatektomií. Vzorky byly vyhodnoceny jako kontrolní skupina, pakliže nebyl při histologickém vyšetření přítomen náhodný nález karcinomu.



**Tabulka 5-1** Pacienti zařazení do studie - klinická data

Kód	Rok	TNM	GS	PSA	Terapie
A2	1941	T2a	3+3	6,8	RAPE
B0	1948	T2b	3+2	5,7	RAPE
B4	1928	T4	4+3	383	HT
B41	1931	T3b	5+4	15	RT
B5	1944	T2b	5+4	11	RAPE, LAD
C1	1936	BPH		12,6	
C2	1935	BPH		3,33	
C3	1953	T2c	2+3	13,1	RAPE, LAD
C4	1949	T2a	3+3	7,1	RAPE
C5	1950	T2b	5+5	8,8	RAPE
C6	1945	T2a	2+2	5,6	RAPE
C7	1951	T2a	3+4	5,92	RAPE
D1	1948	T2a	3+3	11,57	RAPE, LAD
D2	1943	T4	4+3	31,38	HT, RT
D3	1947	T2b	3+3	11,63	RAPE, LAD
D4	1939	T2a	3+2	8,4	RAPE
D6	1944	T3a	4+4	6,6	RAPE + RT
E1	1946	T2a	2+4	7,94	RAPE
E2	1941	T2c	3+3	6,25	RAPE
E3	1948	BPH		3,91	
E4	1938	BPH		7,63	
E6	1952	BPH		4,16	
F1	1941	BPH		9,31	
F2	1945	T2a	4+3	4,1	RAPE
F3	1937	T3a	2+3	9,2	RAPE + RT
F4	1935	T3a	3+3	6,2	RT
F5	1940	BPH		18,36	
F6	1941	BPH		8,37	
G1	1939	T1c	2+2	10,3	WW
G2	1939	BPH		16,7	
G3	1944	BPH		9,1	
G4	1961	T3b	4+4	131	HT
G5	1950	T2a	4+4	7,7	RAPE
G6	1944	T2b	3+4	6,9	RAPE
G7	1946	T3b	3+3	9,8	RAPE + RT
G9	1938	T2a	2+3	7,1	RAPE
I1	1948	T2a	2+2	7	RAPE
I2	1942	BPH		6,7	
I3	1949	T2b	3+3	4,1	RAPE
I4	1952	T2a	3+3	5,7	RAPE
I5	1941	BPH		5,6	
I6	1953	BPH		6,8	
I7	1950	T3a	3+4	7,5	RAPE + RT
I8	1946	T2a	2+2	4,9	RAPE
K1	1940	BPH		4,89	
K2	1946	BPH		8,3	
K3	1933	T3a	3+3	15,3	RT
K4	1943	BPH		6,49	
K5	1952	BPH		32,16	
K6	1948	T2c	3+3	8	RAPE
K7	1964	BPH		1,9	
K8	1941	BPH		2,9	
M1	1952	T3a	3+4	5,05	RAPE
M2	1947	T2a	3+4	5,07	RAPE
M3	1961	T2a	3+2	5,62	RAPE, LAD
M4	1944	T2c	3+4	11,9	RAPE, LAD
M5	1942	T2c	3+4	10,69	RAPE, LAD
M6	1938	T3a	3+4	4,33	RAPE
M7	1941	T3aN1	4+4	7,99	RAPE, LAD
M8	1936	T2a	3+4	5,72	RAPE
M9	1950	T2b	3+4	8	RAPE
M10	1941	T2c	3+3	6,9	RAPE
M11	1957	T2c	3+4	5,4	RAPE
M12	1940	T2c	3+4	4,58	RAPE, LAD
M13	1940	BPH		14,12	
M14	1951	BPH		3,09	
M15	1943	T2c	3+4	10,54	RAPE, LAD

Legenda:

**BPH** - benigní hyperplazie prostaty  
**GS** - Gleason skóre  
**HT** - hormonální terapie  
**LAD** - lymfadenektomie  
**RAPE** - radikální prostaektomie  
**RT** - radioterapie  
**TNM** - stupeň karcinomu prostaty  
**WW** - pečlivé sledování

### 5.3 Izolace mRNA

mRNA byla izolována ze získaných prostatických tkání. Množství vzorku se pohybovalo v rozmezí od 50 do 100 mg. K izolaci mRNA byla použita souprava *Oligotex Direct mRNA Midi/Maxi Kit* firmy Qiagen.

1) K odebrané tkáni bylo přidáno 0,6 ml lyzačního pufru OL1 s přidavkem  $\beta$ -merkптоethanolu ( $\beta$ -ME) a vzorek byl homogenizován 45 vteřin pomocí rotor-statorového homogenizátoru. Směs OL1 a  $\beta$ -ME vznikla přidáním 30  $\mu$ l  $\beta$ -ME k 1 ml pufru OL1.

2) Ke zhomogenizované směsi, přepipetované do 2 ml centrifugačních zkumavek, bylo přidáno 1,2 ml pufru ODB a tato směs byla 4 minuty centrifugována při rychlosti 13000 rpm.

3) Supernatant, teď již bez buněčných zbytků a proteinů, byl přenesen do nové centrifugační zkumavky, bylo k němu přidáno 110  $\mu$ l suspenze Oligotexu, předem zahřáté na 37°C, vše bylo důkladně promícháno a 10 minut ponecháno při pokojové teplotě. Při tomto kroku došlo k navázání polyA-konců mRNA k oligodT-řetězcům Oligotexu.

4) Po šestiminutové centrifugaci při rychlosti 13000 rpm, byl odstraněn supernatant a zbylý pelet byl smíchán s 100  $\mu$ l směsi OL1 a  $\beta$ -ME.

5) Bylo přidáno 400  $\mu$ l pufru ODB. Centrifugační zkumavky se vzniklou směsí byly po 3 minuty zahřívány při teplotě 70°C a poté nechány 10 minut při pokojové teplotě. Tímto krokem se snížilo množství rRNA ve vzorku.

6) Zkumavky byly centrifugovány při rychlosti 13000 rpm po dobu 6 minut a supernatant byl odstraněn. Pelet byl rozpuštěn v 350  $\mu$ l pufru OW1 a rozmíchán na vortexu.

7) Vzniklá směs byla nanesena na kolonky s Oligotexem umístěné v centrifugačních zkumavkách, jež jsou součástí soupravy. Po minutové centrifugaci byl odstraněn filtrát ve zkumavce, na kolonky bylo napipetováno 350  $\mu$ l pufru OW2, kterým se opatrně, vzhledem k nebezpečí protržení membrány špičkou pipety, rozmíchal sediment na dně kolonky.

9) Následovala minutová centrifugace při rychlosti 13000 rpm a předchozí krok s puforem OW2 se zopakoval.

10) Posledním krokem pak bylo nanesení 60  $\mu$ l horkého pufru OEB zahřátého na 70°C na kolonku, tento krok je nutný k vymytí mRNA z Oligotexu, a následná centrifugace při rychlosti 13000 rpm po dobu 1 minuty. K zajištění maximálního výtěžku bylo stejné množství horkého pufru OEB přidáno znovu a opět následovala centrifugace.

11) Ze vzniklého supernatantu bylo odebíráno 30  $\mu$ l do mikrozkušavky jako alikvot. Všechna izolovaná mRNA byla okamžitě zamrazena na -70°C a při této teplotě uchována až do okamžiku dalších analýz.

## 5.4 RT-PCR

RT-PCR je jednou z modifikací klasické PCR, což je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Tato chemická reakce umožňuje z nepatrných množství DNA vybrat a namnožit známý úsek DNA. Počáteční množství kopií  $n$  se po 30 cyklech namnoží exponenciálně na  $n \times 2^{30}$ . RT-PCR se používá, pokud je potřeba amplifikovat mRNA namísto DNA. Vlákna mRNA jsou nejprve pomocí enzymu reverzní transkriptázy převedena na cDNA (complementary DNA) a poté jsou úseky takto vzniklé cDNA namnoženy pomocí tradiční PCR.

Jednotlivé komponenty RT-PCR reakce:

Každý vzorek mRNA byl analyzován pomocí *Qiagen OneStep RT-PCR Kitu* firmy *Qiagen*, který obsahoval:

*QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (obsahoval reverzní transkriptázu*

*+ HotStarTaq DNA Polymerázu)*

*QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer, 5x*

*Mix dNTP*

*Voda RNase-free*

*Q-solution (roztok byl použit pouze pro analýzu genu **HPN**)*

Dále byl použit *templát mRNA* izolovaný z prostatických tkání pacientů a *primery* specifické pro jednotlivé kandidátní geny. Primery použité pro amplifikaci těchto genů byly převzaty z literatury nebo byly sestrojeny pomocí programu Primer

3. Seznam všech primerů a jejich sekvencí použitých v této práci je zobrazen v tabulce 5-2.

**Tabulka 5-2** Sekvence primerů použitých v této práci

Lokus	Kód primeru	5´- 3´- sekvence primeru
<i>GAD 62</i>	GAPD2-R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
	GAPD2-L	CGAGATCCCTCCAAAATCAA
<i>SHB</i>	shb-200-R	GGTAGCTTTCTGGTGGTGTA
	shb-200-L	GACTCTGCAAGGAGTGTAGC
<i>POSTN</i>	POSTN-R	TGCTGGTCCCGCTTAATTACTGCA
	POSTN-L	AATATCAAAAGATACAGCTACA
<i>HPN</i>	HPN207s	CTTCGCTATGATGGAGCACA
	HPN207a	GTCCCGAAAGGGAAGATAGC

**Tabulka 5-3** Množství jednotlivých složek mastermixů (přepočteno na PCR pro 10 vzorků) pro vybrané geny.

***GAD 62***

Komponenta	Složení 10 PCR reakcí
<i>templát mRNA</i>	10 µl
<i>Mix dNTP</i>	4 µl
<i>Primer 1</i>	1 µl
<i>Primer 2</i>	1 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	4 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Pufnr, 5x</i>	20 µl
<i>voda RNase-free</i>	60µl

***SHB***

Komponenta	Složení 10 PCR reakcí
<i>templát mRNA</i>	10 µl
<i>Mix dNTP</i>	4 µl
<i>Primer 1</i>	0,6 µl
<i>Primer 2</i>	0,6 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	4 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Pufnr, 5x</i>	20 µl
<i>voda RNase-free</i>	60,8 µl

***POSTN***

Komponenta	Složení 10 PCR reakcí
<i>templát mRNA</i>	10 µl
<i>Mix dNTP</i>	4 µl
<i>Primer 1</i>	1 µl
<i>Primer 2</i>	1 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	4 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Pufnr, 5x</i>	20 µl
<i>voda RNase-free</i>	60 µl

***HPN***

Komponenta	Složení 10 PCR reakcí
<i>templát mRNA</i>	10 µl
<i>Mix dNTP</i>	4 µl
<i>Primer 1</i>	1 µl
<i>Primer 2</i>	1 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	4 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Pufnr, 5x</i>	20 µl
<i>voda RNase-free</i>	40 µl
<i>Q-solution</i>	20 µl

## 5.5 Optimalizace annealingové teploty

Annealingová teplota pro každý gen byla určena experimentálně pomocí gradientového programu na cykleru Biometra T-Gradient. Tento přístroj umožňuje nastavit rozmezí teplot v řadě mezi 12 jamkami. Po gradientové RT-PCR byla exprese jediného vybraného vzorku při různých teplotách gradientu vizualizována pomocí elektroforézy a dle výsledků byla určena optimální annealingová teplota pro zkoumaný gen (viz. tabulka 5-4 pro gen *HPN*)

**Tabulka 5-4** Rozmezí teplot během gradientového programu pro určení annealingové teploty genu *HPN*

Číslo jamky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Teplota °C	55	55,3	56,4	58	59,8	61,6	63,4	65,1	66,9	68,6	69,6	70

**Tabulka 5-5** Určené optimální annealingové teploty pro jednotlivé geny při RT-PCR

Vybraný gen	Teplota	Vybraný gen	Teplota
<i>GAD</i>	65°C	<i>POSTN</i>	58°C
<i>SHB</i>	55°C	<i>HPN</i>	60°C

S výjimkou rozdílné annealingové teploty probíhaly jednotlivé kroky RT-PCR pro všechny geny stejně. Popis jednotlivých stádií RT-PCR uvádí tabulka 5-6. Kroky III. – V. se cyklicky opakovaly. V průběhu polymerázové reakce proběhlo 35 cyklů.

**Tabulka 5-6** Teplotní profily RT-PCR pro vybrané geny

KROK	PROGRAM RT-PCR PRO GEN SHB	TEPLOTA	ČAS
I.	<b>reverzní transkripce</b>	50°C	30 min
	- pomocí reverzní transkriptázy dochází k transkripci mRNA na cDNA		
II.	<b>aktivace <i>HotStarTaq DNA Polymerázy</i></b>	95°C	15 min
	- při této inkubaci se inaktivuje reverzní transkriptáza		
III.	<b>denaturace</b>	94°C	1 min
	- rozvolnění dvoušroubovice na samostatné řetězce		
IV.	<b>annealing</b>	[°C] dle analyzovaného genu	1 min
	- nasednutí primerů		
V.	<b>elongace</b>	72°C	1 min
	- ke 3' - konci primeru navázaná polymeráza syntetizuje pomocí volných dNTP nový řetězec podle komplementarity		
VI.	<b>konečná elongace</b>	72°C	10 min
	- dochází k dokončení polymerizace		

## 5.6 Detekce cDNA fragmentů

Výsledek RT-PCR byl verifikován gelovou elektroforézou. Tato metoda je založena na rozdílné rychlosti putování různě dlouhých fragmentů DNA v gelu v elektrickém poli. DNA putuje ke kladné elektrodě. Kratším fragmentům je v matrix gelu kladen menší odpor a proto putují rychleji. Byl použit 2% agarózový gel (2,4 g agarózy, 120 ml pufru 1x TBE), který byl před nalitím do vaničky obarven 12 µl barviva GelRed (Biotium, Inc.) Fragmenty putovaly elektrickým polem po dobu 30 minut při napětí 130V. Výsledky byly vizualizovány pomocí zobrazovacího přístroje *MiniBIS PRO* (firmy Bio – Imaging Systems) a optická hustota byla měřena na denzitometru Kodak Digital Science ID (Kodak Rochester, NY).

Důležitým krokem analýzy genové exprese je výběr vhodného referenčního genu. V předkládané práci byl pro výpočet relativní exprese jednotlivých genů vybrán provozní gen **GAD** kódující glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu. Relativní exprese genu u daného pacienta byla určena pomocí vztahu:

## optická hustota proužku exprese příslušného genu

optická hustota proužku exprese genu GAD

### **5.7 Statistické metody vyhodnocení**

Normálnost dat byla ověřena kritériem šikmosti (skew) a zvolenými mezemi. Pro všechny výběry vyšla ve zvolených mezích.

Pro porovnání, zda se signifikantně liší relativní exprese daného genu u pacientů s nádorem od relativní exprese kontrol, byla formulována nulová hypotéza, že se exprese obou zmíněných výběrů statisticky významně neliší. Alternativní hypotézou byla signifikantně odlišná exprese genu v jednom výběru (u genů **SHB** a **POSTN** byla předpokládána vyšší exprese u kontrol u **HPN** naopak). Byl proveden jednostranný t-test, který vrátil hladinu významnosti p nulové hypotézy dle Studentova t-rozdělení. Byla-li hladina významnosti p nižší než standardních 5 %, zamítli jsme nulovou hypotézu ve prospěch alternativní. Jednostranný t-test byl použit i pro vzájemné porovnání relativních expresí genů u pacientů se stádiem nádoru (TNM) T1 a T2 ve srovnání s pacienty se stádiem T3 a T4.

Pro zjišťování signifikance rozdílu v expresích genu pro jednotlivé součty Gleason skóre byla zvolena komplexní analýza rozptylu, tzv. ANOVA. Nulovou hypotézou bylo, že žádné dva výběry nejsou od sebe v expresi genu statisticky odlišné, alternativní hypotézou pak to, že alespoň některé dva se signifikantně liší.

Pro analýzu závislosti relativní exprese genu na věku a produkci PSA posloužil Pearsonův korelační koeficient. Nulová hypotéza o nezávislosti obou faktorů stála proti alternativní hypotéze, že jsou na sobě faktory závislé.

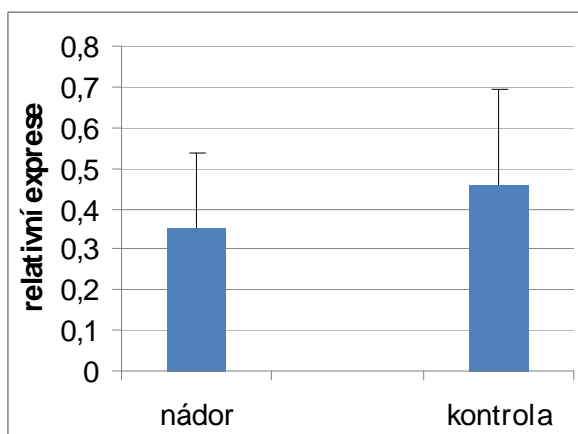
## 6. Výsledky

### 6.1 Gen *SHB*

#### 6.1.1 Relativní exprese genu *SHB* v nádorových a nenádorových tkáních

Předkládaná studie je první prací v odborné literatuře popisující expresi genu ***SHB*** v nádorových biopsiích prostaty. Davenport P., et al., (2007) popisovala expresi genu pouze v buněčných liniích nádoru. Exprese byla stanovena pomocí RT-PCR, její hodnota byla průměrem tří měření a byla relativizována s mírou exprese genu ***GAD***. Průměrná hodnota relativní exprese ***SHB*** byla signifikantně vyšší u kontrolních vzorků ( $\bar{x}=0,459 \pm 0,298$ ) než u nádorových biopsií ( $\bar{x}=0,354 \pm 0,188$ ,  $p<0,042$ ).

**Graf 6-1** Relativní exprese genu *SHB* u pacientů s KP a u kontroly



**Obrázek 6-1** Vizualizace exprese genu *SHB* v 2% agarózovém gelu



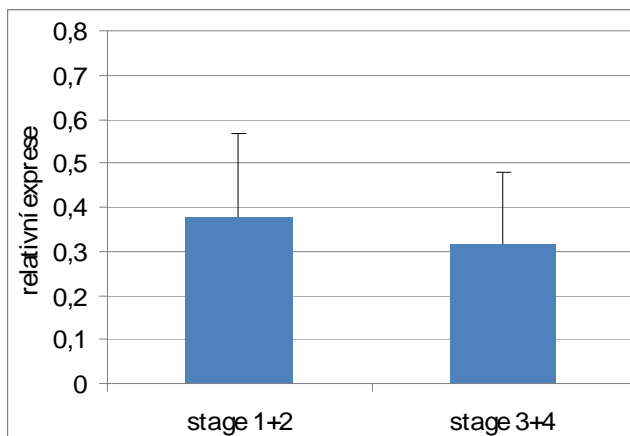
#### 6.1.2 Srovnání relativní exprese genu *SHB* v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA

Za účelem bližšího ozřejmení funkce proteinu Shb v karcinomu prostaty byly analyzovány možné korelace relativní exprese genu ***SHB*** pacientů s novotvarem a klinickými daty těchto nemocných. K dispozici byly informace o věku pacienta, stádiu karcinomu prostaty (TNM), gradingu tumoru (Gleason skóre) a hladině PSA. Ve stádiích prostatického karcinomu T1 a T2 se průměrná exprese genu ***SHB*** ( $\bar{x}=0,377 \pm 0,182$ ) signifikantně nelišila od průměrné exprese ***SHB*** ve stádiích T3 a T4

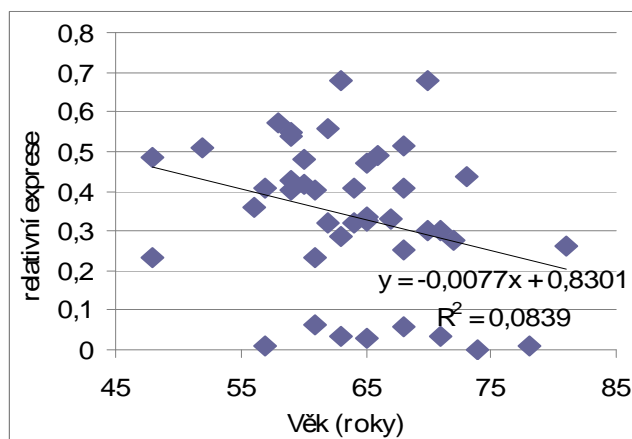


( $\bar{x}=0,318 \pm 0,210$ ,  $p<0,168$ ). Nebyla zjištěna korelace mezi relativní expresí **SHB** a věkem, ani závislost mezi expresí a hladinou PSA. Signifikantní rozdíl relativních expresí **SHB** nebyl pozorován ani v jednotlivých součtech Gleason skóre.

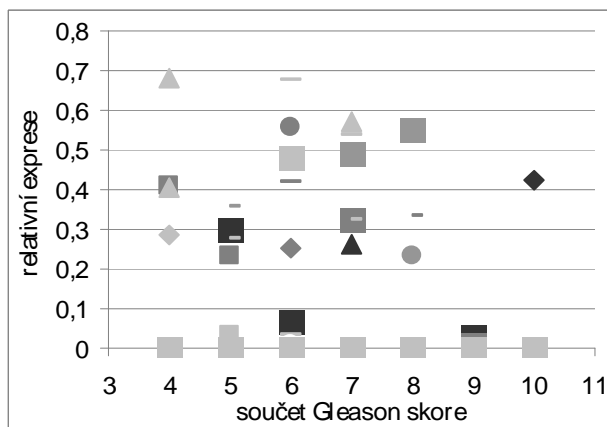
**Graf 6-2** Relativní exprese genu **SHB** ve stádiích T1+T2 a T3+T4



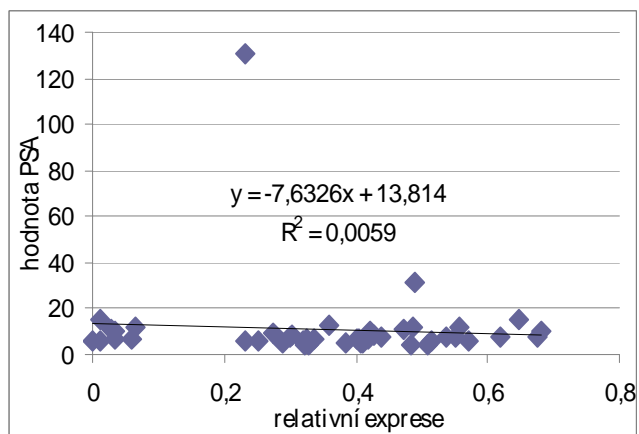
**Graf 6-3** Závislost relativní exprese genu **SHB** pacientů s KP na věku



**Graf 6-4** Závislost relativní exprese genu **SHB** pacientů s KP na součtu Gleason skóre



**Graf 6-5** Závislost relativní exprese genu **SHB** pacientů s KP na hladině PSA



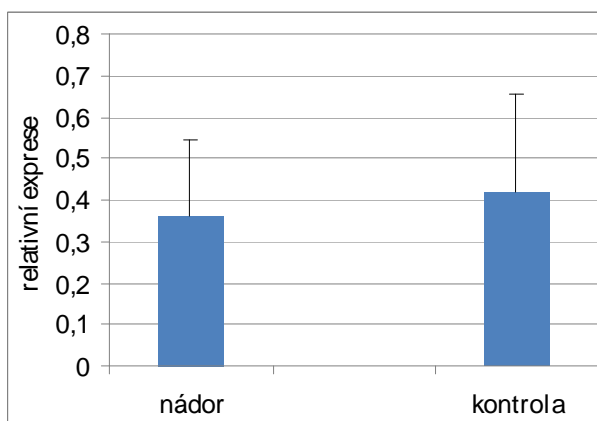
## 6.2 Gen pro periostin

### 6.2.1 Relativní exprese genu **POSTN** v nádorových a nenádorových tkáních

V dané studii exprese kandidátních genů karcinomu prostaty bylo analyzováno 46 vzorků s histologicky potvrzeným karcinomem a 21 vzorků s BPH,

kteře sloužily jako kontroly. Při srovnání průměrné relativní exprese genu **POSTN** u těchto dvou skupin nebyl na hladině významnosti  $p=5\%$  prokázán statisticky významný rozdíl v expresi ve prospěch jedné skupiny. Průměrná relativní exprese **POSTN** u kontrolních vzorků byla  $\bar{x}=0,421 \pm 0,235$ , ve srovnání s průměrnou relativní expresí **POSTN** nádorových vzorků  $\bar{x}=0,362 \pm 0,180$ ,  $p<0,139$ .

**Graf 6-6** Relativní exprese genu **POSTN** u pacientů s KP a u kontroly



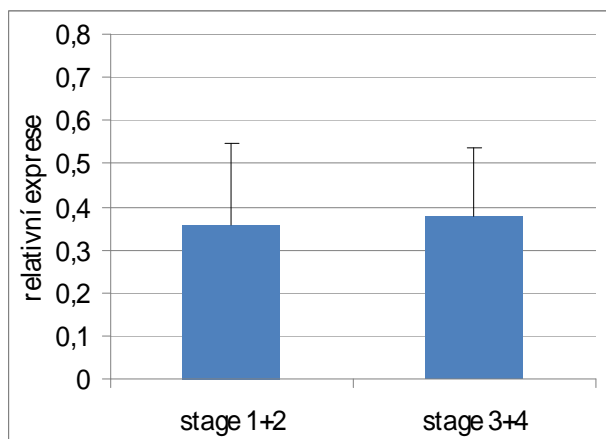
**Obrázek 6-2** Vizualizace exprese genu **POSTN** v 2% agarózovém gelu



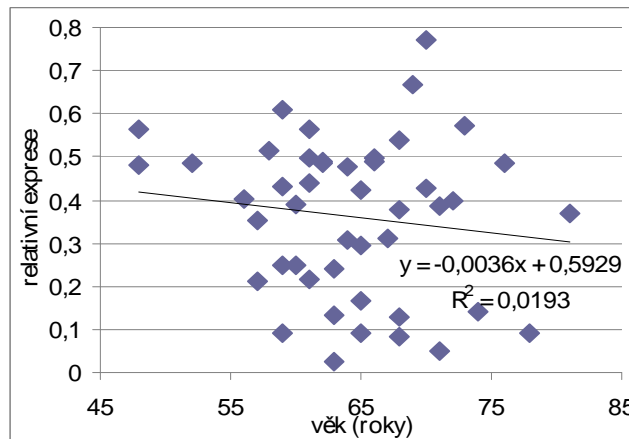
### 6.2.2 Srovnání relativní exprese genu **POSTN** v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA

Také u genu **POSTN** bylo provedeno srovnání relativní exprese genu v nádorových vzorcích s klinickými veličinami jednotlivých pacientů. V souboru pacientů mělo 33 mužů diagnostikován karcinom ve stádiu T2c a nižší, naopak pokročilejší stádium bylo určeno u 13 mužů. U genu **POSTN** nebylo prokázáno, že by relativní exprese genu ve stádiích T1+T2 ( $\bar{x}=0,358 \pm 0,190$ ) byla signifikantně odlišná od exprese ve stádiích T3+T4 ( $\bar{x}=0,380 \pm 0,159$ ,  $p<0,357$ ). U tohoto genu nebyl dále prokázán signifikantní rozdíl mezi žádnou porovnávanou dvojicí výběru (porovnání relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA).

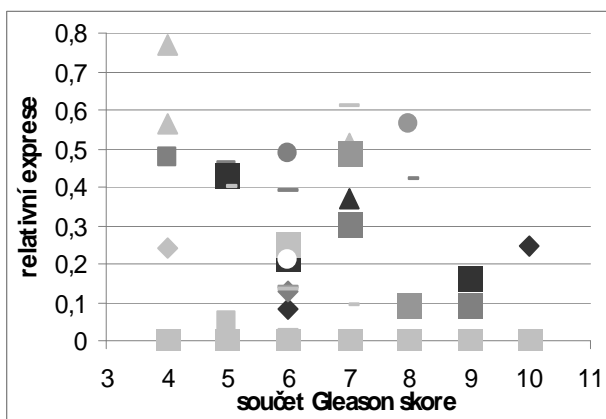
**Graf 6-7** Relativní exprese genu *POSTN* ve stádiích T1+T2 a T3+T4



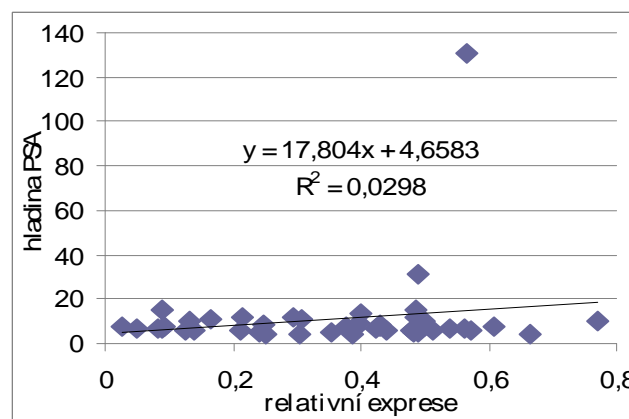
**Graf 6-8** Závislost relativní exprese genu *POSTN* pacientů s KP na věku



**Graf 6-9** Závislost relativní exprese genu *POSTN* pacientů s KP na součtu Gleason skóre



**Graf 6-10** Závislost relativní exprese genu *POSTN* pacientů s KP na hladině PSA

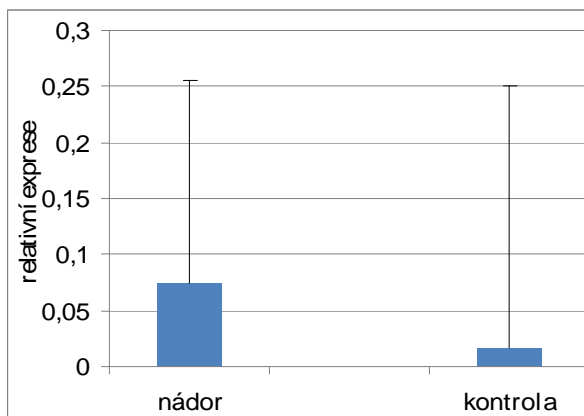


## 6.3 Gen pro hepsin

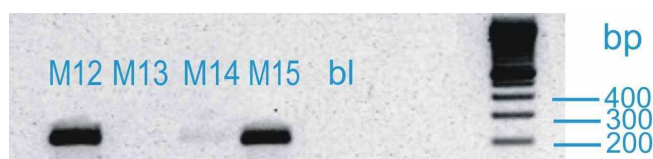
### 6.3.1 Relativní exprese genu *HPN* v nádorových a nenádorových tkáních

Pro potvrzení spojitosti mezi zvýšenou expresí genu *HPN* a progresí karcinomu prostaty (Magee JA., et al., 2001, Klezovitch O., et al., 2004; Leman ES., et Getzenberg RH., 2009) byla porovnána průměrná relativní exprese *HPN* u vzorků nádorů a kontrolní skupiny. Na hladině významnosti  $p=5\%$  byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi genu ve prospěch pacientů s nádory (oproti kontrole). Pro vzorky s karcinomem prostaty byla naměřena průměrná relativní exprese  $\bar{x} = 0,075 \pm 0,061$ , u kontrolních vzorků pak  $\bar{x} = 0,016 \pm 0,013$ ,  $p < 0,5$ .

**Graf 6-11** Relativní exprese genu *HPN* u pacientů s KP a u kontroly



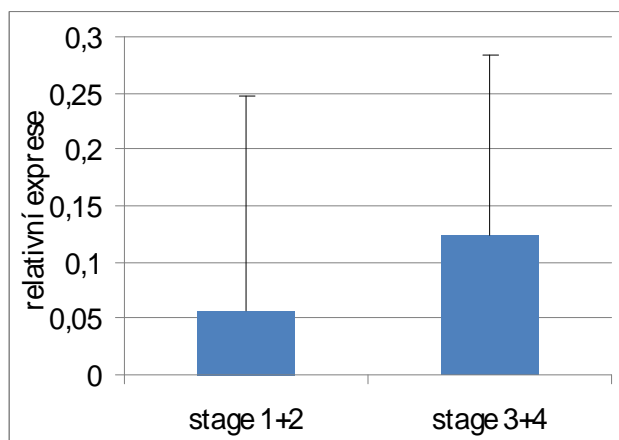
**Obrázek 6-3** Vizualizace exprese genu *HPN* v 2% agarózovém gelu



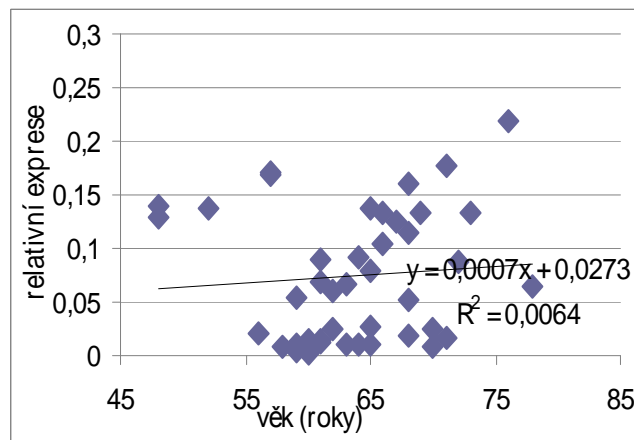
### 6.3.2 Srovnání relativní exprese genu *HPN* v různých stádiích KP (TNM), korelace relativní exprese s věkem, Gleason skóre a hladinou PSA

Při porovnání průměrné relativní exprese genu *HPN* v raných a pokročilých stádiích karcinomu prostaty byla na hladině významnosti  $p=5\%$  prokázána signifikantně vyšší exprese genu *HPN* ve stádiích T3+T4 ( $\bar{x} = 0,124 \pm 0,062$ ) ve srovnání se stádiem T1+T2 ( $\bar{x} = 0,058 \pm 0,052$ ,  $p < 0,05$ ). Zbytek analýz neukázal statisticky významný rozdíl mezi ostatními výběry, resp. nezamítl nezávislost výběrů na sobě.

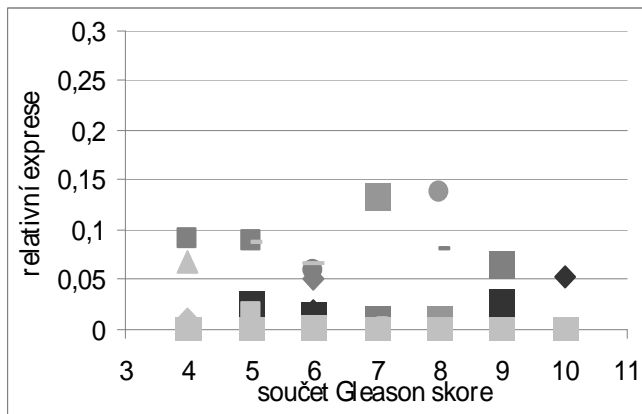
**Graf 6-12** Relativní exprese genu *HPN* ve stádiích T1+T2 a T3+T4



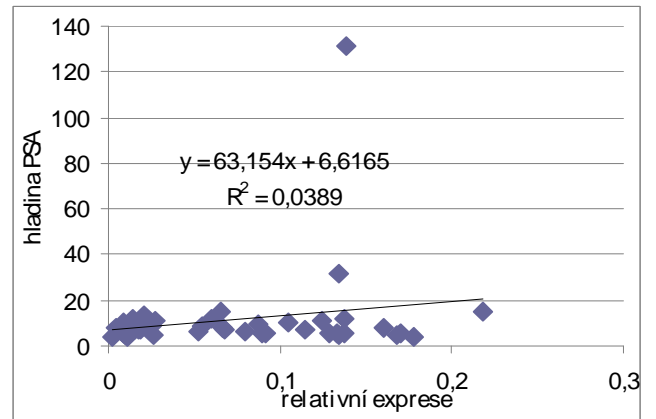
**Graf 6-13** Závislost relativní exprese genu *HPN* pacientů s KP na věku



**Graf 6-14** Závislost relativní exprese genu *HPN* pacientů s KP na součtu Gleason skóre



**Graf 6-15** Závislost relativní exprese genu *HPN* pacientů s KP na hladině PSA



## 7. Diskuse

---

Karcinom prostaty je onemocnění, u kterého nejsme schopni zajistit prokazatelně účinnou prevenci, a nemůžeme tak zabránit jeho vzniku. Proto nezbyvá než diagnostikovat onemocnění v raném stádiu, kdy je nádor ještě léčitelný. Velká pozornost je proto celosvětově věnována možnostem včasného zachytu karcinomu prostaty, a to především pomocí nádorových biomarkerů. K jejich hledání napomáhají analýzy exprese genů potenciálně zapojených do vzniku a progresu karcinomu, neboť podstatou nádorového růstu je především zásadní změna v expresi a regulaci genů.

Ačkoli je skupina námi vybraných kandidátních genů karcinomu prostaty funkčně značně odlišná, můžeme v mnoha nádorových tkáních sledovat jejich abnormální exprese, především pak u genů **POSTN** a **HPN** (Tilman G., et al., 2007, Miao J., et al., 2008). Exprese genu **SHB** byla doposud analyzována pouze v buněčných liniích nádorů prostaty a u myší, a tak je předkládaná studie vůbec první, která zkoumá expresi tohoto genu v souboru vzorků karcinomu prostaty u člověka. Po úspěšné izolaci mRNA z 67 vzorků prostatických tkání a optimalizaci všech kroků RT-PCR, především pak určení annealingové teploty, byla stanovena exprese kandidátních genů každého ze vzorků, jež byla relativizována na expresi genu **GAD**.

Shb je pleiotropním adaptorovým proteinem, který reguluje např. buněčnou migraci, proliferaci, diferenciaci, či apoptózu (Anneren c., et al., 2003). Jednou z odpovědí na jeho knockout je změna endotelového fenotypu, což je významný děj tumorové angiogeneze (Funa NS., et al., 2009). V předkládané práci byla relativní exprese genu **SHB** u pacientů s karcinomem prostaty signifikantně nižší než u kontrolních vzorků. Tento výsledek je v souladu se studií Davoodpour P., et al., (2007), která při zvýšené expresi genu **SHB** pozorovala redukci růstu prostatických nádorových buněk PC3, neboť protein Shb hraje roli v modulaci proapoptických signálů. V předkládané studii zjištěná nižší exprese ve tkáních karcinomu prostaty poukazuje na zmenšenou míru apoptózy v nádorových buňkách, jež vyúsťuje ve zvýšení nádorové proliferace. Vliv Shb na angiogenezi není možné z naměřených hodnot posoudit, neboť k inhibici angiogeneze vlivem

působení apoptických činitelů dochází při úplné inaktivaci **SHB** (Funa NS., et al., 2007). Navíc doposud nebyly publikovány žádné studie zabývající se souvislostmi mezi expresí **SHB** a tumorovou angiogenezí u souboru pacientů.

Ačkoli nebyl porovnáním genové exprese v raném (T1-T2) a pokročilém stádiu (T3-T4) karcinomu prostaty zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami, byla pozorována nepatrně nižší exprese ve stádiích pokročilých. Také Davoodpour P., et al., (2007), zaznamenala nižší expresi **SHB** v buněčných liniích pokročilého KP.

Přestože je věk jedním z rizikových faktorů, nebyla nalezena korelace mezi ním a relativní expresí **SHB**. Tento fakt je způsoben skutečností, že ve vybrané skupině pacientů není statistická závislost mezi stářím muže a stádiem jeho nemoci. Ani zbytek statistických šetření (závislost relativní exprese **SHB** na hladině PSA a závislost relativní exprese **SHB** na Gleason skóre) neukázal statisticky významný rozdíl mezi vybranými parametry. Vzhledem k malým počtům pacientů s jednotlivými součty Gleason skóre (řádově jednotky) nemohla být signifikace rozdílu ani předpokládána. Problematická je také závislost mezi stádiem karcinomu prostaty a hladinou PSA. Stamey TA., et al., (2004), srovnával korelace PSA s mnoha patologickými nádorovými daty, jež byly zaznamenávány více než dvacet let, a vyhodnotil PSA spíše jako marker BPH. Éra PSA pro karcinom prostaty, podle jeho slov, již skončila. Hodnoty PSA v souboru pacientů předkládané studie mají s pokročilejším stádiem mírně rostoucí trend, nicméně statisticky významná závislost mezi relativní expresí **SHB** a hladinou PSA nebyla potvrzena.

Gen **POSTN** kóduje protein rodiny fasciclinů a buněčné adheze, který je spojován s regulací řady buněčných aktivit, jakými jsou např. adheze, proliferace, migrace či diferenciaci. Hladiny jeho exprese jsou vysoce variabilní v normálních tkáních, ale také v nádorech. Ačkoli není zvýšená exprese **POSTN** systematickým jevem lidských malignit, mnoho studií popisuje zvýšenou expresi během některých z nich. Silně zvýšená exprese byla zaznamenána v mnoha epiteliálních neopláziích, např. v karcinomu ovaria, ledvin, nebo tlustého střeva (Wallace DP., et al., 2008). V předkládané studii nebyl při porovnání průměrné relativní exprese genu **POSTN** nádorových a kontrolních vzorků karcinomu prostaty prokázán statisticky významný rozdíl v expresi genu ve prospěch jedné skupiny. Velká

srovnávací analýza exprese **POSTN** v normálních a nádorových tkáních, kterou provedl Tilman G., et al., (2007), také neprokázala signifikantní rozdíl v expresi mezi vzorky karcinomu prostaty a kontrolou.

Rozdíly v expresi **POSTN** mezi časnými a pokročilými stádii karcinomu prostaty byly odhaleny imunohistochemickými metodami. Tsunoda T., et al., (2009) pro toto srovnání rozdělil stádia karcinomu prostaty v závislosti na součtu Gleason skóre (za méně agresivní stanovil stádium s Gleason skóre 6-7, za pokročilé stádium s Gleason skóre 8 a vyšším). Po tomto rozdělení prokázal vyšší expresi u méně agresivních forem nádoru. Narozdíl od uvedené studie, kde byla agresivita určena pomocí Gleason skóre - tzv. gradingem, byly v předkládané práci porovnány relativní exprese mezi stádii T1+T2 a T3+T4 (rozdělení na stádia pomocí TNM klasifikace - tzv. staging KP). Mezi dvojicí T1+T2 a T3+T4 však nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Různé výsledky mohou být zapříčiněny odlišným způsobem rozdělení porovnávaných skupin. Po porovnání průměrné relativní exprese **POSTN** mezi stádii rozdělenými podle studie Tsunoda T., et al., (2009), byl také v předkládané studii zřejmý nárůst exprese u méně agresivních forem nádoru. Vystává tedy otázka, které rozdělení je relevantnější. Vzhledem k devítibodové škále hodnot Gleason skóre se nejeví být ideálním řešením použití pouze pěti nejvyšších stupňů.

Hodnoty relativní exprese **POSTN** nekorelovaly s ostatními klinickými parametry karcinomu prostaty (závislost relativní exprese **POSTN** na věku, závislost na součtu Gleason skóre jednotlivých vzorků a závislost na hladině PSA). Bylo to především z důvodů uvedených v diskusi o expresi genu **SHB**.

Gen **HPN**, kódující proteázu patřící do skupiny TTSP, je normálně exprimován během vývoje a jeho snížená hladina byla zaznamenána ve zdravé prostatě, či v BPH (Singh D., et al., 2002). Jeho trvalou upregulaci je možné sledovat v karcinomu prostaty. Srovnání hladin exprese mezi vzorky karcinomu prostaty a BPH vykazuje značné rozdíly a co více, jeho exprese je zvýšená již při prekurzorových lézích (PIN) a také v nádorech nezávislých na androgenech (Kelly KA., et al., 2008). Jeho možný markerový potenciál zvyšuje také lokalizace jím kódovaného proteinu na buněčném povrchu. Také v předkládané studii byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi genu mezi nádorovými vzorky



a kontrolní skupinou. Expresí genů u pacientů s nádory byla signifikantně vyšší, což je v souladu s naprostou většinou prací na toto téma.

Zvyšující se exprese hepsinu koreluje s rozvojem karcinomu (Wu Q., et Parry G., 2007). Signifikantně vyšší exprese u stádií T3+T4, ve srovnání se stádií T1+T2, byla zaznamenána také v předkládané studii. Molekulární mechanismy zapojení hepsinu do procesů během tumorigeneze karcinomu prostaty nejsou objasněny. Není známo, zda-li zvýšená exprese aktivně přispívá k nádorové progresi, nebo reprezentuje určitý typ ochranné zpětné vazby. Proteázy se běžně zapojují do vývoje nádoru, ale jsou i důkazy, že některé serinproteázy fungují jako negativní regulátory nádorové invaze. Srikantan V., et al., (2002), odhalil protinádorový efekt hepsinu na buňky karcinomu prostaty a spojitost mezi sníženou expresí **HPN** a negativní nádorovou prognózou. Naopak Chevillet JR., et al., (2008), prokázal aktivační efekt hepsinu v procesu prostatické nádorové progresi a při tvorbě metastáz. Vytvořil inhibitory hepsinu, a to i ve formě orálně aplikovaných léčiv, které by mohly být použity k terapeutickým účelům.

Analýza korelace ostatních klinických dat na relativní expresi genu **HPN** nepřinesla statisticky prokazatelný rozdíl mezi porovnávanými dvojicemi. Nebyla tak zamítnuta nezávislost mezi relativní expresí **HNP** a věkem, součtem Gleason skóre a hladinou PSA.

Při hodnocení postupu této práce je nutné si uvědomit, jak byla měřena relativní exprese ve vzorcích, které byly získány bioptickou cestou ze tkání pacientů, či po prostatektomii. Expresí vytipovaných genů byla stanovena ze směsných vzorků nádorových a nenádorových buněk solidního tumoru (KP). Příměs nenádorových buněk ve směsi může způsobit změnu genové exprese. Bohužel během práce na této studii nebyly k dispozici techniky pro oddělení nádorových a nenádorových buněk (např. laserové disekční zařízení). Nevhodným odebráním vzorku biopsie může být ovlivněno také Gleason skóre, které je tak zatíženo chybou a ve skutečnosti poskytuje nesprávné informace o reálném stavu nádoru. Tento fakt pak negativně ovlivňuje hledání korelací mezi expresí genu a stádiem tumoru a projevuje se změnou hodnotou exprese.

Pomocí zjištěných výsledků byl zhodnocen prognostický význam jednotlivých korelací. Nejslibnějším biomarkerem mezi vybranými kandidátními geny se jeví být gen **HPN**. V předkládané práci byl zaznamenán signifikantní rozdíl jak mezi průměrnou relativní expresí genu v tkáních nádorových a kontrolních, tak mezi průměrnou relativní expresí ve stádiích raných a pokročilých. Zvýšená exprese v 90 % vzorků karcinomu prostaty a až na desetinásobek zvýšená hladina jím kódovaného proteinu během progresu nádoru (Chevillet JR., et al., 2008), předurčují hepsin k diagnostickému použití. Detekce může být usnadněna i díky jeho lokalizaci na povrchu zdravé i maligní prostatické buňky. Hepsin se jako potenciální biomarker objevil již v dalších publikacích (Sardana G., et al., 2008, Leman ES. et Getzenberg RH., 2009). Prognostický potenciál má díky signifikantně rozdílné expresi v nádorových a kontrolních vzorcích také gen **SHB**. Jeho rozdílné exprese je, vzhledem k absenci podobně uspořádaných analýz, třeba potvrdit dalšími studii. V odborných vědeckých publikacích nebyl doposud kromě stanovení PSA doporučen žádný jiný nádorový diagnostický marker karcinomu prostaty. Význam slibných biomarkerů, mezi které můžeme řadit **SHB** a **HPN** je nutno ověřit v klinických studiích na širokém souboru pacientů.

Často se přistupuje také ke srovnávání exprese genů, zapojených do karcinogeneze s dobou přežívání pacientů (Kaplan-Meierovy křivky). V případě karcinomu prostaty není výběr parametru dožití ideální, neboť doba přežití nemocných s touto chorobou je víceméně shodná s normální délkou života. Desetileté přežití nemocných léčených pro lokalizovaný karcinom prostaty radikální prostatektomií je udáváno v intervalu 75-93 %, u pacientů léčených zevní radioterapií pak 55-74 %. Hormonální léčba diseminovaného onemocnění umožňuje pacientovi přežít zpravidla 18–30 měsíců (internetový zdroj: <http://www.andrologie.cz>, staženo 2010). Mnohem významnějším prognostickým parametrem karcinomu prostaty by bylo srovnání relativní exprese vybraných genů s biochemickou rekurencí PSA. Ukazatelem úspěšnosti terapie karcinomu prostaty je nedetekovatelnost PSA. Jeho opětovně zvýšená hladina (a to i po prostatektomii) je známkou opětovného výskytu nemoci, často s nižší pravděpodobností přežití.

## 8. Závěr

---

1) V předkládané studii byl sebrán soubor nádorových tkání a kontrolních vzorků od pacientů se suspektním karcinomem prostaty, nebo benigní hyperplázií prostaty

2) Z tohoto souboru byla izolována mRNA.

3) Po úspěšné optimalizaci jednotlivých kroků RT-PCR byla změřena exprese vybraných kandidátních genů, **SHB**, **POSTN**, **HPN**, prostatického nádoru.

4) Jejich relativní exprese byla, za účelem nalezení korelací, porovnávána s molekulárně biologickými daty karcinomu prostaty a dalším průběhem onemocnění.

5) Pomocí zjištěných závislostí byly geny **SHB** a **HPN** vyhodnoceny jako potenciální biomarkery pro diagnostiku a sledování vývoje karcinomu prostaty.

Výsledky předkládané práce byly součástí odborné přednášky a posteru, prezentovaných na vědecké konferenci 2.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze konané ve dnech 7- 8.4.2010 (viz příloha).

## 9. Seznam citované literatury

---

ANNEREN C., LINDHOLM CK., KRIZ V., WELSH M: *The FRK/RAK - SHB signaling cascade: a versatile signal - transduction pathway that regulates cell survival, differentiation and proliferation.* Curr Mol Med 3: 313 - 324, 2003

BAO S., OUYANG G., BAI X., HUANG Z., MA C., LIU M., SHAO R., ANDERSON RM., RICH JN., WANG XF: *Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway.* Cancer Cell 5: 329 - 339, 2004

BENEŠOVÁ L., FANTOVÁ L., HERÁČEK J., URBAN M., SACHOVÁ J., MINÁRIK M: *Frekvence výskytu vrozených DNA polymorfismů genů syntetické dráhy testosteronu v české populaci pacientů s karcinomem prostaty.* Ces Urol 11(2): 80 – 84, 2007

BRATT O: *Hereditary prostate cancer: clinical aspects.* J Urology 168(3): 906 – 913, 2002

CAVALLARO U., CHRISTOFORI G: *Molecular mechanism of tumor angiogenesis and tumor progression.* J Neuro-Oncol 50: 63 - 70, 2000

CLINTON SK., MULLOY AL., LI SP., MANIGIAN HJ., VISEK WJ: *Dietary fat and protein intake differ in modulation of prostate tumor growth, prolactin secretion and metabolism, and prostate gland prolactin binding capacity in rats.* J Nutr 127: 225 - 237, 1997

COLOMBATTI M., GRASSO S., PORZIA A., FRACASSO G., SCUPOLI MT., CINGARLINI S., POFTE O., NAIM HY., HEINE M., TRIDENTE G., MAINIERO F., RAMARLI D: *The prostate specific membrane antigen regulates the expression of IL-6 and CCL5 in prostate tumour cells by activating the MAPK pathways.* PloS One 4(2): e4608, 2009

ČIHÁK R: *Anatomie 2, druhé upravené a doplněné vydání.* Nakladatelství Grada Publishing, ISBN 80-247-0143-X, 2002

DAVOODPOUR P., LANDSTRÖM M., WELSH M: *Reduced tumor growth in vivo and increased c-Abl activity in PC3 prostate cancer cells overexpressing the Shb adapter protein.* BMC Cancer 7: 161, 2007

DAVOODPOUR P: *2-ME-Induced apoptotic signalling in prostate cancer PC3 cells.* Digital comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of medicine 87, Uppsala Universitet, 2005

DHANASEKARAN SM., BARRETTE TR., GHOSH D., SHAH R., VARAMBALLY S., KURACHI K., PIENTA KJ., RUBIN MA., CHINNAIYAN AM: *Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer.* Nature 412: 822 - 826, 2001

DVOŘÁČEK J., BABJUK M., et al: *Onkourologie.* Nakladatelství Galén, ISBN 80-7262-349-4, 2005

EMAMI N., DIAMANDIS EP: *Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers.* Clin Chem 54: 1600 - 1607, 2008

FOLEY R., HOLLYWOOD D., LAWLER M: *Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease.* Endoc-Relat Cancer 11: 477 - 488, 2004

FUNA NS., REDDY K., BHANDARKAR S., KURENOVA EV., YANG L., CANCE WG., WELSH M., ARBISER JL: *Shb gene knockdown increases the susceptibility of SVR endothelial tumor cells to apoptotic stimuli in vitro and in vivo*. J Invest Dermatol 128: 710 - 716, 2008

FUNA NS, KRIZ V., ZANG G., CALOUNOVA G., ÅKERBLUM B., MARES J., LARSSON E., SUN Y., BETSHOLTZ C., WELCH M: *Dysfunctional microvasculature as a consequence of Shb gene inactivation causes impaired tumor growth*. Cancer Res 69(5):2141 - 2148, 2009

GILLAN L., MATEI D., FISHMAN DA., GERBIN CS., KARLAN BY., CHANG DD: *Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins and promotes cell motility*. Cancer Res 62: 5358 - 5364, 2002

GORLOV IP., BYUN J., GORLOVA OY., APARICIO AM., EFSTATHIOU E., LOGOTHETIS CJ: *Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data*. BMC Medical Genomics 2:48, 2009

HÄGERKVIST R., MOKHTARI D., LINDHOLM C., FARNEBO F., MOSTOSLAVSKY G., MULLIGAN RC., WELSH N., WELSH M: *Consequences of Shb and c-Abl interactions for cell death in response to various stress stimuli*. Exp Cell Res 313: 284 - 291, 2007

HAHN WC., WEINBERG RA: *Modeling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer 2: 331 - 341, 2002

HALVORSEN OJ., HAUKASS SA., AKSLEN LA: *Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer*. Clin Cancer Res 9: 1474 - 1479, 2003

HANAHAHAN D., WEINBERG RA: *The hallmarks of cancer*. Cell 100: 57 - 70, 2000

HATCHER D., DANIELS G., OSMAN I., LEE P: *Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity*. Am J Transl Res 1(3): 235 – 48, 2009

HERTER S., PIPER DE., AARON W., GABRIELE T., CUTLER G., CAO P., BHATT AS., CHOE Y., CRAIK CS., WALKER N., MEININGER D., HOEY T., AUSTIN RJ: *Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers*. Biochem J 390(1): 125 – 136, 2005

CHEVILLET JR., PARK GJ., BEDALOV A., SIMON JA., VASIOUKHIN VI: *Identification and characterization of small-molecule inhibitors of hepsin*. Mol Cancer Ther 7(10): 3343 - 3351, 2008

IGNEY FH., KRAMMER PH: *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer 2: 277 - 288, 2002

KARLSSON T., SONGYANG Z., LANDGREN E., LAVERGNE C., DI FIORE PP., ANAFI M., PAWSON T., CANTLEY LC., CLEASSON-WELSH M: *Molecular interactions of the Src homology 2 domain protein Shb with phosphotyrosine residues, tyrosine kinase receptors and Src homology 3 domain proteins*. Oncogene 10: 1475 - 1483, 1995

KARLSSON T., WELSH M., *Modulation of Src homology 3 proteins by the proline-rich adaptor protein Shb*. Exp Cell Res 231: 269 – 275, 1997

KELLY KA., SETLUR SR., ROSS R., ANBAZHAGAN R., WATERMAN P., RUBIN MA., WEISSLEDER R: *Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent*. Cancer Res 68(7): 2286 - 2291, 2008

KIKUCHI Y., KASHIMA TG., NISHIYAMA T., SHIMAZU K., MORISHITA Y., SHIMAZAKI M., KII I., HORIE H., NAGAI H., KUDO A., FUKAYAMA M: *Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon.* J Histochem Cytochem 56(8): 753 – 764, 2008

KLEZOVITCH O., CHEVILLET J., MIROSEVICH J., ROBERTS RL., MATUSIK RJ., VASIOUKHIN V: *Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis.* Cancer Cell 6: 185 - 195, 2004

KOLOMBO I: *Rakovina prostaty, informace pro muže, jejich rodiny a lékaře.* Arcus – onko centrum, Tiskárny Křupka Mohelnice, 2009

KUMAR S., MISHRA N., RAINA D., SAXENA S., KUFE D: *Abrogation of the cell death response to oxidative stress by the c-Abl tyrosine kinase inhibitor STI571.* Mol Pharmacol 63: 276 - 282, 2003

KUNG HJ., EVANS CP: *Oncogenic activation of androgen receptor.* Urol Oncol 27(1): 48 - 52, 2009

LEE JT., LEHMANN BD., TERRIAN DM., CHAPPELL WH., STIVALA F., LIBRA M., MARTELLI AM., STEELMAN LS., McCUBREY JA: *Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways.* Cell Cycle 7(12): 1745 – 1762, 2008

LEMAN ES., GETZENBERG RH: *Biomarkers for prostate cancer.* J Cell Biochem 108: 3 - 9, 2009

LI G., JINA R., NORRIS RA., ZHANG L., YUA S., WUA F., MARKWALD RR., NANDA A., CONWAY SJ., SMYTH SS., GRANGER DN: *Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  and focal adhesion kinase (FAK) pathway.* Arteriosclerosis 208(2): 358 - 365, 2010

LINDSLEY SW: *The Akt/PKB family of protein kinases: A review of small molecule inhibitors and progress towards target validation: A 2009 update.* Curr Top Med Chem 10: 458 - 477, 2010

LINGGE L., HOLMQUIST K., CROSS M., WELSH M: *Role of the Src homology 2 domain-containing protein Shb in murine brain endothelial cell proliferation and differentiation.* Cell Growth Differ 13(3): 141 - 148, 2002

LOWE SW., CEPERO E., EVAN G: *Intrinsic tumour suppression.* Nature 432: 307 - 315, 2004

MAGEE JA., ARAKI T., PATIL S., EHRIG T., TRUE L., HUMPHREY PA., CATALONA WJ., WATSON MA., MILBRANDT J: *Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer.* Cancer Res 61: 5692 - 5696, 2001

MAREŠ J., *Buněčná proliferace pankreatických  $\beta$ -buněk.* Edice ALMA MATER, nakladatelství Galén, ISBN 80-7262-098-3, 2001

MAVRIDIS K., SCORILAS A: *Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidase in human malignancies.* Future Oncol 6(2):269 - 285, 2010

MEREDITH J., SCHWARTZ M: *Integrins, adhesion and apoptosis.* Trends Cell Biol 7: 146 - 150, 1997

MIAO J., MU D., ERGEL B., SINGAVARAPU R., DUAN Y., POWERS S., OLIVA E., ORSULIC S: *Hepsin colocalizes with desmosomes and induces progression of ovarian cancer in a mouse model*. Int J Cancer 123(9):2041 - 2047, 2008

MORAN P., LI W., FAN B., VIJ R., EIGENBROT C., KIRCHHOFER D: *Pro-urokinase-type plasminogen activator is a substrate for hepsin*. J Biol Chem 281(41): 30439 - 30446, 2006

NETZEL-ARNETT S., HOOPER JD., SZABO R., MADISON EL., QUIGLEY JP., BUGGE TH., ANTALIS TM: *Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer*. Cancer Metast Rev 22(2-3): 237 - 58, 2003

PACÍK D: *Karcinom prostaty (informace pro praktické lékaře)*. Zdroj dostupný z: www.preventio.cz, 2008

PUPPIN C., FABBRO D., DIMA M., LORETO DC., PUXEDDU E., FILETTI S., RUSSO D., DAMANTE G: *High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas*. J Endocrinol 197: 401 - 408, 2008

SARDANA G., DOWELL B., DIAMANDIS EP: *Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer*. Clin Chem 54(12): 1951 - 1960, 2008

SCHMIDT M., JAROLÍM L., KAWACIUK I., VESELÝ Š., CHOCHOLATÝ M: *Role výživy při vzniku a průběhu onemocnění karcinomem prostaty*. Urol Prax 8(4): 167 – 169, 2007

SUGIURA T., TAKAMATSU H., KUDO A., AMANN E: *Expression and characterization of murine osteoblast-specific factor 2 (OSF-2) in a baculovirus expression system*. Protein Expres Purif 6: 305 - 311, 1995

SINGH D., FEBBO PG., ROSS K: *Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior*. Cancer Cell 1: 203 - 209, 2002

SRIKANTAN V., VALLADARES M., RHIM JS., MOUL JW., SRIVASTAV S: *HEPSIN inhibits cell growth/invasion in prostate cancer cells*. Cancer Res 62: 6812 - 6816, 2002

STÁHALOVÁ V: *Primární hormonální léčba lokalizovaného karcinomu prostaty*. Urol Prax 10(4): 215 - 217, 2009

STAMEY TA., CALDWELL M., McNEAL JE., NOLLEY R., HEMENEZ M., DOWNS J: *The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years?* J Urology 172(4 Pt 1):1297 - 1301, 2004

ŠTERN P., VRANOVSKÝ K., ŠAFARČÍK K: *Karcinom prostaty - molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence*. Klin Biochem Met 16(37): 19 - 26, 2008

ŠTUDENT V., GREPL M., KRÁL M., HARTMANN I: *Má vyšetření PSA stále význam při hledání karcinomu prostaty?* Urol Prax 5: 214 – 218, 2006

TAKESHITA S., KIKUNO R., TEZUKA K., AMANN E: *Osteoblast-specific factor 2: cloning of putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fascilin I*. Biochem J 294: 271 - 278, 1993

TILMAN G., MATTIUSSI M., BRASSEUR F., BAREN NV., DECOTTIGNIES A: *Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells*. Mol Cancer 6: 80, 2007

TRIPATHI M., NANDANA S., YAMASHITA H., GANESAN R., KIRCHHOFER D., QUARANTA V.: *Laminin-332 is a substrate for hepsin, a protease associated with prostate cancer progression.* J Biol Chem 283(45): 30576 - 30584, 2008

TSUJI A., TORRES ROSADO A., ARAI T., LE BEAU MM., LEMONS RS., CHOU SH., KURACHI K.: *Hepsin, a cell membrane-associated protease.* J Biol Chem 266(25): 16948 - 16953, 1991

TSUNODA T., FURUSATO B., TAKASHIMA Y., RAVULAPALLI S., DOBI A., SRIVASTAVA S., McLEOD DG., SESTERHENN IA., ORNSTEIN DK., SHIRASAW S.: *The increased expression of periostin during early stages of prostate cancer and advanced stages of cancer stroma.* Prostate 69:1398 - 1403 , 2009

VYTÁSEK R.: *Signalizace integriny.* Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 2. Lékařské fakulty dostupný z <http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=414>, 2009

WALLACE DP., QUANTE MT, REIF GA., NIVENS E., AHMED F., HEMPSON SJ., BLANCO G., YAMAGUCHI T.: *Periostin induces proliferation of human autosomal dominant polycystic kidney cells through alphaV-integrin receptor.* Am J Physiol 295(5): 1463 - 1471, 2008

WANG R., CHINNAIYAN AM., DUNN RL., WOJNO KJ., WEI JT: *Rational approach to implementation of PCA3 into clinical care.* Cancer 115(17): 3879 – 3886, 2009

WELSH M., MARES J., KARLSSON T., LAVERGNE C., BREANT B., CLEASSON-WELSH L: *Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein.* Oncogene 9: 19 - 27, 1994

WELSH M., SONGYANG Z., FRANTZ JD., TRUB T., REEDQUIST KA., KARLSSON T., MIYAZAKI M., CANTLEY LC., BAND H., SHOELSON SE: *Stimulation through the T cell receptor leads to interaction between SHB and several signaling proteins.* Oncogene 16: 891 - 901, 1998

WU Q., PARRY G: *Hepsin and prostate cancer.* Front Biosci 12: 5052 - 5059, 2007

YULUG IG., HILLERMANN R., FISHER EM: *The Shb adaptor protein maps to human chromosome 9.* Genomics 24: 615 - 617, 1994

Internetové zdroje:

[www.koc.cz/pro\\_lekare/seznam\\_diagnoz\\_dle\\_mkn/c61.pdf](http://www.koc.cz/pro_lekare/seznam_diagnoz_dle_mkn/c61.pdf)

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TMPRSS4ID42594ch11q23.html>

<http://www.andrologie.cz/page/320.prognoza-prevence/>



## 10. Seznam zkratek

<b>AAH</b>	atypická adenomatózní hyperplázie	atypical adenomatous hyperplasia
<b>AMACR</b>	$\alpha$ -methyl-CoA-racemáza	$\alpha$ -methyl-CoA racemase
<b>AR</b>	androgenní receptor	androgen receptor
<b>BPH</b>	benigní hyperplázie prostaty	benign prostatic hyperplasia
<b>CAM</b>	molekuly buněčné adheze	cell adhesion molecules
<b>cDNA</b>	komplementární DNA	complementary DNA
<b>doména EMI</b>	doména přítomná v proteinech rodiny emilinů	domain of emilins family
<b>doména PR</b>	prolinem bohatá doména	proline-rich domain
<b>doména SH2</b>	Src homologní 2 doména	Src homology domain 2
<b>doména SH3</b>	Src homologní 3 doména	Src homology domain 3
<b>DRV</b>	digitální rektální vyšetření	
<b>EGF</b>	epidermální růstový faktor	epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	receptor epidermálního růstového faktoru	epidermal growth factor receptor
<b>EphB2</b>	ephrinový receptor B2	ephrin receptor B2
<b>ERG</b>	geny rodiny ETS	ETS related gene
<b>ETS</b>	traskripční faktory rodiny E-twenty six	E-twenty six family of transcription factors
<b>ETV1</b>	translokační varianta 1 ETS	ETS translocation variant 1
<b>FGF</b>	fibroblastový růstový faktor	fibroblast growth factor
<b>FISH</b>	fluorescenční in situ hybridizace	fluorescence in situ hybridization
<b>GAD</b>	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>GS</b>	Gleason skóre	Gleason score
<b>HGF</b>	hepatocytární růstový faktor	hepatocyte growth factor
<b>HG-PIN</b>	PIN vysokého stupně	high grade prostatic intraepithelial neoplasia
<b>HPN</b>	hepsin	hepsin
<b>HT</b>	hormonální terapie	hormonal therapy
<b>kináza c-Abl</b>	nereceptorová tyrosinkináza	nonreceptor tyrosine kinase
<b>kináza Akt</b>	serin/treonin-specifická proteinkináza	serine/threonine-specific protein kinase
<b>kináza FAK</b>	fokální adheze	focal adhesion kinase
<b>KLK</b>	kalikreiny	kallikrein
<b>KP</b>	karcinom prostaty	
<b>LAD</b>	lymfadenektomie	lymfadenectomy
<b>LG-PIN</b>	PIN nízkého stupně	low grade prostatic intraepithelial neoplasia
<b>OSF-2</b>	osteoblastický specifický faktor 2	osteoblast-specific factor-2
<b>PC3</b>	linie lidských nádorových prostatických buněk	human prostate cancer cell line
<b>PCA3</b>	prostatický nádorový antigen 3	prostate cancer antigen 3
<b>PDGF</b>	růstový faktor krevních destiček	platelet-derived growth factor
<b>PIN</b>	prostatická intraepiteliální neoplázie	prostatic intraepithelial neoplasia
<b>POSTN</b>	periostin	periostin
<b>PSA</b>	prostatický specifický antigen	prostate-specific antigen
<b>PSMA</b>	prostatický specifický membránový antigen	prostate specific membrane antigen
<b>PTEN</b>	homolog fosfatázy a tensinu	phosphatase and tensin homolog
<b>RAPE</b>	radikální prostatektomie	radical prostatectomy
<b>Rb</b>	retinoblastom	retinoblastom
<b>RT</b>	radioterapie	radiotherapy
<b>RT-PCR</b>	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí	reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SAM</b>	molekuly substrátové adheze	substrate adhesion molecules
<b>SNP</b>	jednonukleotidový polymorfismus	single-nucleotide polymorphism
<b>TMPRSS2</b>	transmembránová serinproteáza typu II	transmembrane serine protease 2
<b>TTSP</b>	transmembránová serinproteáza typu II	type II transmembrane serine protease
<b>ÚZIS</b>	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR	
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor	vascular endothelial growth factor
<b>WW</b>	pečlivé sledování	waitchfull waiting
<b>βig-H3</b>	transformujícím růstovým faktorem indukovatelný gen H3	TGF-β-inducible gene H3
<b>βTC-1</b>	buněčná linie βTC-1	cell lineage βTC-1

## 11. Přílohy

**Obrázek 11-1** Vědecký program a sbírka abstraktů (titulní strana), vydaná ke konferenci 2.lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

**2. lékařská fakulta  
UNIVERZITY KARLOVY**

hlavní hosté:  
**viktor ČERNÝ**  
**stanislav KOMÁREK**

**7. - 8.4.**  
po oba dny od 10:30 do 16:30  
ve velké posluchárně 2.lf uk

**ceny:**  
za nejlepší přednášku (40 tisíc Kč)  
prodejkann pro vědu & výzkum (10 tisíc Kč)  
za nejlepší poster (10 tisíc Kč)  
za nejlepší práci pregraduálního studenta (10 tisíc Kč)  
pro nejpočetnějšího posluchače (podle námo 160) – povalek (napech znova a av vltav)

vyzvání řečníci:  
petr SEDLÁČEK  
pavel DŘEVÍNEK  
markéta HELLEROVÁ  
michael HALÁŠKA jr.  
tomáš SEEMAN

**vědecký výbor:**  
doc. jan ruma (předseda)  
dr. barbara fišárková  
doc. jánub hort  
dr. miloslav oya  
doc. radek špiček  
doc. zdeněk sumník  
doc. Josef támančík  
dr. marie kaloudíková

tradiční doprovodné akce:  
**motolská mše & veselý večírek**

organizační výbor:  
prof. jan trka (předseda)  
mgr. gabriela hlaváčková  
martin šilichman  
ales hubš  
mikáš procházka  
ivana tinská  
helena ulovcová

Výstava zrušena po oba dny od 10:30  
svetm v sechbu studenty a pedagogy 2.lf uk

dva básníci & jeden spisovatel z matfyzu  
**JANOTA, KUNA, MALJEVSKÝ**

**vědecký program**  
přednášky a postery pre- a postgraduálních studentů 2.lf

**vědecká  
konference 2010**

**Obrázek 11-2** Abstrakta prezentace a posteru, v nichž byla publikována data analyzovaná předkládanou studií

### **P69. EXPRESE GENU PRO PERIOSTIN V KARCINOMU PROSTATY A JEJÍ PROGNOSTICKÝ VÝZNAM**

Luňák T. (1), Mareš M. (1), Černý M. (2), Schmidt M. (3), Mareš J. (1)

1 – Ústav biologie a lékařské genetiky, UK 2. LF, 2 – Přírodovědecká fakulta, JČU, 3 – Urologická klinika, UK 2. LF

*Pregraduální student*

*Školitel:* Doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc. (1)

**Úvod:** Periostin (POSTN) je proteinem rodiny fasciclinů a proteinem buněčné adheze. Nedávné studie prokázaly, že se účastní vzniku mnohých nádorových onemocnění. Imunohistochemickými metodami byly zjištěny rozdíly jeho exprese mezi časnými a pokročilými klinickými stádii karcinomu prostaty.

**Cíl:** Cílem studie bylo změřit relativní expresi genu POSTN v nádorové tkáni metodou RT-PCR a hledat možné korelace mezi expresí genu a klinickými parametry karcinomu prostaty.

**Materiál a metody:** V 31 vzorcích nádorové tkáně a v 17 kontrolních vzorcích se exprese genu POSTN určovala semikvantitativně pomocí metody RT-PCR (One Step RT-PCR Kit, Qiagen). Její hodnocení se provádělo srovnáním s expresí provozního genu GAD (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza). Velikost exprese se měřila densitometricky.

**Výsledky:** Studie prokázala, že exprese genu POSTN v nádorové tkáni je nižší než v kontrolní nenádorové tkáni (benigni hyperplázii). Hodnota relativní exprese POSTN však nekorelovala se stagingem (klinickým stádii) a klinickými parametry. V současné době se stanovuje korelace s délkou přežíváním pacientů za tříleté období.

**Závěr:** Předběžné výsledky poukazují na možný prognostický význam stanovení relativní exprese POSTN u karcinomu prostaty. Pro získání relevantních výsledků shromažďujeme další biopsie, abychom rozšířili soubor pacientů.

**Podpora projektu:** Studie byla podpořena VZ 21620808 a grantem GAUK 200 090.

## 20. IZOLACE mRNA Z TKÁNĚ KARCINOMU PROSTATY A STANOVENÍ GENOVÉ EXPRESE GENŮ SHB A POSTN

Schmidt M. (1), Černý M. (2), Mareš J. (3), Soukup J. (4), Jarolím L. (1)  
1 – Urologická klinika UK 2. LF a FN Motol, 2 – Přírodovědecká fakulta JČU,  
3 – Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol,  
4 – Ústav klinické patologie UK 2.LF a FN Motol

*Školitel:* Doc. MUDr. Ladislav Jarolím, CSc.

**Úvod:** Familiární a hereditární výskyt karcinomu prostaty (CaP) vede současný výzkum k odhalování genetických dispozic jedince k vzniku tohoto onemocnění. Adaptorový protein SHB je regulátorem apoptózy. Při jeho zvýšené expresi je prokázána redukce růstu prostatických nádorových buněk PC3 a jeho exprese bývá nižší v tkáni pokročilého CaP. Periostin (POSTN) patří mezi 3DC-asociované geny a jeho produkt je proteínem buněčné adheze. Hraje určitou roli v tumorigenezi CaP. Exprese POSTN bývá vyšší u méně agresivních forem.

**Cíl:** Cílem práce byla izolace mRNA z tkáně CaP a stanovení genové exprese SHB a POSTN, která byla korelována s molekulárně biologickými vlastnostmi karcinomu.

**Materiál a metody:** Do studie bylo dosud zařazeno 31 nemocných s CaP, u kterých byla v letech 2008–2009 provedena izolace mRNA z tkáně nádoru, získaného transrektální biopsií nebo odběrem části nádoru z preparátu po radikální prostatektomii. Přítomnost CaP a jeho molekulárně biologická specifikace byly zhodnoceny histologickým vyšetřením části vzorku. Ze získaných vzorků byla izolována mRNA a pomocí RT-PCR byla semikvantitativně stanovena genová exprese SHB a POSTN. Její hodnocení bylo provedeno korelací s expresí provozního genu GAD. Výsledky byly porovnány s patologicko-anatomickým stádiem a gradingem karcinomu. Jako kontrolní skupina byl použit soubor 17 pacientů s benigní hyperplazií prostaty.

**Výsledky:** Z dosažených výsledků je zřejmá nižší genová exprese SHB ve tkáni CaP než ve tkáni benigní hyperplazie (0,329 vs. 0,480). Při porovnání skupiny lokálně pokročilých a lokalizovaných karcinomů byla detekována nižší relativní exprese SHB u vyššího stadiu (T3,T4) (0,313 vs. 0,336). Relativní exprese POSTN byla v nádorové tkáni nižší než v tkáni hyperplastické prostaty (průměrná relativní exprese 0,342 vs. 0,375). U karcinomu bez výskytu GG 4 a 5 byla vyšší než u skupiny s přítomností této agresivní formy nádoru (0,350 vs. 0,329).

**Závěr:** SHB i POSTN jsou potenciálními biomarkery v predikci patologického gradingu, stadiu a prognóze dalšího průběhu onemocnění. Relativní exprese SHB klesá při přítomnosti karcinomu a při jeho lokálně pokročilé formě. Přítomnost agresivní formy (GG 4 resp. 5) nemá signifikantní vliv na genovou expresi. Relativní exprese POSTN bývá nižší v případě karcinomu a klesá při přítomném GG 4 resp. 5. Role SHB a POSTN jako prediktorů dalšího průběhu onemocnění musí být vyjasněna a zhodnocena na větším souboru pacientů s delší dobou sledování.

**Podpora projektu:** GA UK 200 090 a VZ 21620808