

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Tekutá biopsie a monitoring pokročilého
karcinomu prostaty

Autor:	Bc. Silvie Kaločová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zlata Hušková
Pracoviště:	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP
Termín odevzdání práce	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Silvie Kaločová
Název práce	Tekutá biopsie a monitoring pokročilého karcinomu prostaty
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Zlata Hušková
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu krevních vzorků pacientů s karcinomem prostaty, kdy byla sledována exprese vybraných genů z krevní plazmy a cirkulujících nádorových buněk pomocí RT-qPCR. Byla zjištěna vyšší efektivita použití cfDNA/RNA oproti CTCs a byl prokázán signifikantní vztah mezi vyšší expresí AMACR, kratší dobou užívání ARTA terapie a vyšší úmrtností pacientů. Vedle zavedených klinických parametrů může tekutá biopsie přispět k lepšímu monitoringu stavu pacienta a zpřesnit predikci jeho odpovědi na léčbu.
Klíčová slova	Karcinom prostaty, tekutá biopsie, biomarkery, cirkulující nádorové buňky, cirkulující volná DNA/RNA, RT- qPCR
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Silvie Kaločová
Title of thesis	Liquid biopsy and monitoring of advanced prostate cancer
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc
Supervisor	Mgr. Zlata Hušková
The year of presentation	2020
Abstract	This diploma thesis was focused on analysis of blood samples from patients with prostate carcinoma. The expression of selected genes was monitored from blood plasma and circulating tumor cells using RT-qPCR. Analysis of cfDNA/RNA was more efficient in comparison to CTCs. High expression of AMACR was significantly associated with shorter time of ARTA therapy and higher mortality of patients. Besides established clinical parameters, the liquid biopsy can improve disease monitoring and prediction of therapy response.
Keywords	Prostate carcinoma, liquid biopsy, biomarkers, circulating tumor cells, circulating free DNA/RNA, qPCR
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací na téma Tekutá biopsie a monitoring pokročilého karcinomu prostaty vypracovala samostatně za pomoci Mgr. Zlaty Huškové a za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 18.5.2020

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Zlatě Huškové za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce. Mé poděkování patří též doc. Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D., rovněž za cenné rady a konzultace. Dále děkuji MUDr. Denise Vitáskové, Ph.D., z Onkologické kliniky za poskytnutí patientských vzorků a klinických informací.

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČÁST	
1.1 Seznam zkratk	8
1.2 Úvod a cíle práce	10
1.3 Prostata a karcinom prostaty (KP)	11
1.4 Androgenní receptor (AR)	14
1.4.1 Varianty androgenního receptoru	16
1.4.2 AR-V7	17
1.5 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty (CRPC)	18
1.6 Možnosti terapie	18
1.6.1 Antiandrogenní léčiva	20
1.6.1.1 Současné nesteroidní antiandrogeny	23
1.6.2 Primární a sekundární rezistence	23
1.7 Tekutá biopsie	24
1.7.1 Využití tekuté biopsie	26
1.7.2 Výhody tekuté biopsie	26
1.7.3 Nevýhody tekuté biopsie	27
1.7.4 ccfDNA/RNA	27
1.7.5 Cirkulující nádorové buňky (CTCs)	28
1.8 Další zájmové geny	30
1.8.1 PSA	30
1.8.2 PTEN	31
1.8.3 AMACR	31
1.8.4 EpCAM	32
1.8.5 CD45	32
1.8.6 PCA3	33
1.8.7 TBP	34
1.8.8 TMPRSS2-ERG	34
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Ověření primerů pro geny AR, AR-V7 a PTEN	39
2.1.1 Příprava buněčné linie	39
2.1.2 Izolace RNA	39
2.1.3 Reverzní transkripce (RT-PCR)	40
2.1.4 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)	40

2.2 Pacientské vzorky	41
2.3 Zpracování krevní plazmy	41
2.4 Izolace CTC buněk pomocí CD45 deplece	41
2.5 Izolace RNA z CTCs	42
2.6 Izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy	42
2.7 Analýza exprese zájmových genů z CTCs a ccfDNA/RNA	43
2.8 Statistické zpracování dat	43
3. Výsledky	44
3.1 Ověření primerů pro geny AR, AR-V7 a PTEN	44
3.2 Porovnání plazmy s krevními destičkami a plazmy bez destiček	45
3.3 Optimalizace metody izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy a porovnání citlivosti specifických a náhodných primerů	47
3.4 Srovnání exprese zájmových genů z CTCs a plazmy.....	48
3.5 Exprese zájmových genů a význam externích kontrol.....	49
3.6 Vzájemná korelace zájmových genů.....	50
3.7 Vztah zájmových genů ke klinicky významným parametrům.....	51
4. Diskuze	54
5. Závěr	59
6. Seznam citované literatury.....	60

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Seznam zkratk

- AF1 – aktivační funkce 1
- AF2 – aktivační funkce 2
- AMACR – Alfa-metylacyl-CoA racemáza
- AR – androgenní receptor
- ARTA terapie – terapie zaměřená na androgenní receptor
- AR-V7 – varianta 7 androgenového receptoru
- Bcl-2 – protoonkogen, z angl. B-cell lymphoma
- BHP – benigní hyperplazie prostaty
- ccfDNA/RNA – volná cirkulující DNA/RNA
- CD45 – proteinová tyrozinová fosfatáza, receptor typu C
- CNAs – alterace v počtu kopií
- CPA – Cyproteron acetát
- CRPC – kastračně rezistentní karcinom prostaty
- CTCs – cirkulující nádorové buňky
- ctDNA – cirkulující nádorová DNA
- DBD – DNA-vázající doména
- DD3 – původní označení genu PCA3 (z angl.differential display clone 3)
- DHT – dihydrotestosteron
- DMEM médium – Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco
- DRE – digitální rektální vyšetření
- EMT – epiteliálně mezenchymální přechod
- EpCAM – epiteliální buněčná adhezní molekula
- ERG – gen související s ETS
- ETS – E-26 transformačně-specifická (ETS) rodina transkripčních faktorů
- FBS – fetální bovinní sérum
- FDA – úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA (z angl. Food and Drug Administration)

- FISH – fluorescence in-situ hybridizací
- fPSA – volná frakce PSA
- Hsp90 – protein teplotního šoku, z angl. heat shock protein 90
- KP – karcinom prostaty
- LBD – ligand-vázající doména
- LHRH – hormon uvolňující luteinizační hormon
- mCRPC – metastatický kastračně rezistentní karcinom prostaty
- NGS – sekvenování nové generace
- nmCRPC – nemetastazující kastračně rezistentní karcinom prostaty
- NTD – N-koncová doména
- PAP protein – rekombinantní prostatický a fosfatázový fúzní protein
- PCA3 – prostatický rakovinný antigen 3
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PIN – prostatická intraepiteliální neoplazie
- PIP3 – fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
- PSA – prostaticky specifický antigen
- PTEN – homolog fosfatázy a tenzinu
- qPCR – kvantitativní PCR
- RT-PCR – reverzní transkripce
- TBP – TATA-box vázající protein
- TMPRSS2 – transmembránová proteáza, serin 2
- TRUS – transrektální ultrasonografie
- wtAR – wild-type AR

1.2 Úvod a cíle práce

Karcinom prostaty je časté onkologické onemocnění a jeho pokročilé stádium často představuje nevléčitelnou diagnózu. V posledních letech bylo vyvinuto mnoho terapií, jež dokážou prodloužit dobu přežití a zmírnit projevy symptomů. Nicméně, ideální přístup, jak predikovat a monitorovat odpověď tumoru na danou léčbu zatím nebyl nalezen (Zainfeld a Goldkorn, 2018).

Tradiční biopsie, jakožto klasický přístup diagnostiky karcinomu prostaty, představuje invazivní proceduru, která sebou přináší mnoho rizik, a navíc je nemožné ji provést při zhoršení stavu pacienta či pokud je tumor lokalizován v nedostupné části. Navíc, genomický profil bioptického vzorku poskytuje pouze omezené informace o konkrétní části tkáně v konkrétní čas. Kvůli těmto limitům je v posledních letech trend zaměřovat se na tumorové komponenty cirkulující v krvi (Palmirotta *et al.*, 2018).

Tekutá biopsie, využívající analýzu tumorových komponent (volná cirkulující DNA/RNA, cirkulující nádorové buňky, exozomy apod.), by mohla potenciálně představovat ideální možnost hodnocení stavu pacientů v průběhu všech stádií onemocnění (Zainfeld a Goldkorn, 2018).

Cíle této diplomové práce byly následující:

- ❖ Vypracování literární rešerše na téma Tekutá biopsie a monitoring pokročilého karcinomu prostaty.
- ❖ Izolace nukleových kyselin z krve pacientů s karcinomem prostaty, jak z cirkulujících nádorových buněk, tak z plazmy (cirkulující nádorová DNA/RNA).
- ❖ Expresní analýza vybraných cílů (např. AMACR, PCA3, varianty androgenního receptoru a další).
- ❖ Zhodnocení klinického významu provedených analýz.

1.3 Prostata a karcinom prostaty (KP)

Prostata neboli žláza předstojná, je nepárový, svalově žláznatý orgán. Dorůstá velikosti a tvaru kaštanu, nachází se při bázi močového měchýře a obklopuje začátek močové trubice. Horní část se označuje jako báze a přiléhá k bázi močového měchýře. Dolní část se zužuje a označuje jako apex. Z anatomického hlediska má prostata dva postranní laloky, které se vepředu spojují vazivově svalovou šjí. Zezadu pod spodinou močového měchýře se nachází střední lalok, označován jako Mercierův (Dylevský, 2009; Fiala, Valenta a Eberlová, 2015). Z pohledu architektury prostaty ji lze rozdělit na zónu periurethrální, centrální, periferní a tranzitní čili přechodnou.

Periurethrální zóna obklopuje močovou trubici a obsahuje slizniční žlázy. Centrální zónu tvoří submukózní žlázy. Periferní zóna, jenž obklopuje zónu vnitřní, obsahuje hlavní žlázy. Z prostaty ústí cca 30–50 tuboalveolárních žlázek, jenž prorůstají do stromatu. Epitel těchto žláz je tvořen jednou či více řadami plochých až vysokých cylindrických buněk, přičemž právě vysoké cylindrické buňky jsou označovány jako žlázové. Žlázové buňky obsahují granula, vakuoly a lysozomy s kyselou fosfatázou. Kromě žlázových buněk je prostata tvořena dalšími typy funkčních buněk, např. bazálními buňkami zodpovědnými za obnovu epitelu, buňkami sekretující sialomucin a buňkami chromafinními, které produkují serotonin (Čihák, 2013).

Funkcí žlázy předstojné, resp. jejich žlázek, je tvorba sekretu, který tvoří 15–30 % ejakulátu. Sekret slouží jako energetický zdroj pro spermie a jeho povaha tak ovlivňuje motilitu i viabilitu spermií, které navíc ochraňuje před kyselým prostředím v pochvě (Dylevský, 2009). V sekretu se nachází zinek, jenž má vliv na metabolismus testosteronu v prostatě, kyselina citrónová jako pufr a prostaglandiny potřebné pro úspěšný pohyb spermií v děloze ženy. Dále se v sekretu prostaty nacházejí polyaminy spermin a spermidin ovlivňující pohyblivost spermií a oplodnění vajíčka, imunoglobuliny, kyselá fosfatáza a proteázy způsobující řidnutí ejakulátu. Prostata, stejně jako jiné pohlavní žlázy, je citlivá na hormony. Například hormon testosteron se díky enzymu 5- α -reduktázy v prostatě přeměňuje na dihydrotestosteron (DHT), který dále zajišťuje funkčnost prostaty. Ve vyšším věku (někdy už po 40. roce) u mužů často dochází k hyperplazii žláz ve vnitřní zóně prostaty, což se označuje jako adenom (nezhoubný nádor) nebo benigní hyperplazie prostaty (BHP). S rostoucím věkem

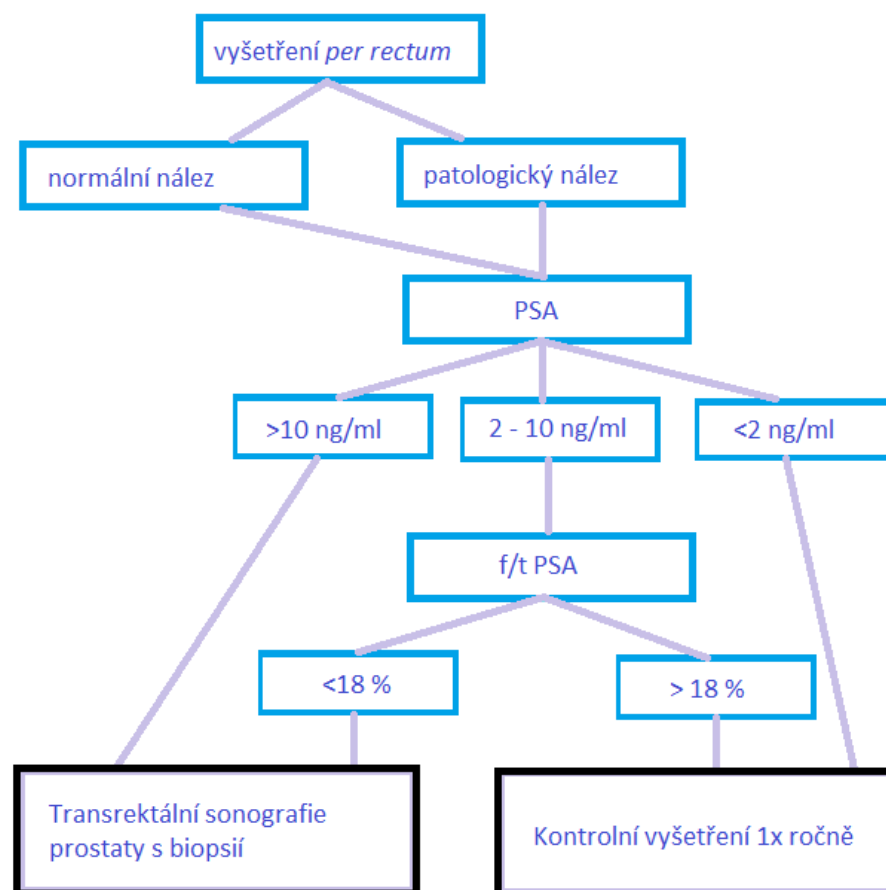
totiž prostata přestává účinně odbourávat DHT, jehož hromadění ve stromatu způsobuje zvýšenou proliferaci a novotvorbu žlázek. Zbytněná tkáň fyzicky limituje vyprazdňování močového měchýře.

Hyperplazie však může vlivem androgenů a dalších faktorů (věk, životní styl, celkový stav organismu apod.) přecházet v nádorové bujení, které se nejčastěji objevuje v zevní (periferní) zóně. Prvotní známkou nádorového bujení je zvýšení sekrece kyselé fosfatázy, jež může být detekována v krvi pacienta, čehož se využívá při diagnostice i monitoringu léčby (Čihák, 2013).

Mezi nejdůležitější etiologické faktory ovlivňující vznik karcinomu prostaty řadíme genetické vlivy (příčemž se jedná pravděpodobně o defekt autozomálně dominantního supresorového genu p53 či přítomnost onkogenu Bcl-2 (z angl. B-cell lymphoma)), zvyšující se věk, stravovací návyky (byla prokázána souvislost s vyšší četností onemocnění u mužů přijímajících nasycené mastné kyseliny, naopak nižší incidence při zdravé dietě), etnické vlivy (Židé, Číňané a Indiáni jsou mnohem méně ohroženi než Indoevropané) a především hormonální vlivy. Androgeny jsou pro vznik karcinomu prostaty nezbytné, nejsou však jeho příčinou (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004; Čapoun *et al.*, 2015). Jelikož doba potřebná ke zdvojení objemu karcinomu prostaty (angl. doubling time) bývá delší než dva roky, symptomy se často objevují až v pozdějších stádiích. Stejně jako při BHP se i zde objevují příznaky jako slabý či přerušovaný proud moči, urgentní mikce až inkontinence. Na rozdíl od BHP, která vzniká ve vnitřní zóně, se karcinom rozvíjí nejčastěji z periferní části a mikční příznaky se tak objevují relativně pozdě, teprve při výrazném zvětšení karcinomu či infiltraci močového měchýře buňkami karcinomu. Často je však onemocnění odhaleno až při vyšetření kostí při bolesti či zlomenině, kde se už mohou nacházet četné metastázy (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004).

Stanovení diagnózy (viz Obr. 1) se opírá o vyšetření *per rectum* – DRE (z angl. digital rectal examination). Provádí se v rámci skríninku mužů nad 50 let. Při vyšetření se hodnotí elasticita tkáně, symetrie, ohraničení žlázy a povrch. Ačkoliv palpačně je možné vyšetřit pouze zhruba třetinu povrchu prostaty, lze takto odhalit i zcela asymptomatické nádory. Nicméně i při normálním nálezu se stanovuje také hladina prostatického specifického antigenu (PSA) v séru. Při nejasné hodnotě PSA se stanovuje také poměr volného (fPSA) ku celkovému PSA (fPSA/PSA), čímž se specifita vyšetření výrazně zvýší. Na rozdíl od BHP jsou u KP hodnoty fPSA nižší, přičemž při hodnotách

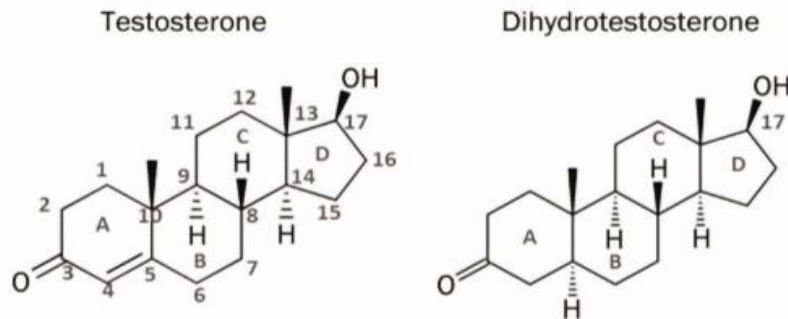
fPSA <18 % následuje transrektální ultrasonografie (TRUS). Tato metoda umožňuje zjistit objem prostaty i nádorového ložiska a orientačně také penetraci karcinomu do okolních tkání. Pro stanovení přesné diagnózy se invazivně odebírá několik bioptických vzorků prostatické tkáně. Na základě stanovení diagnózy a stádia nemoci je volen léčebný postup (viz. kapitola 1.6) (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004; Filipenský, Čapák a Katolická, 2012). Existují další typy KP, např. adenokarcinom duktální či mucinózní, KP z přechodného epitelu, dále malobuněčný, sarkomatoidní či adenoskvamózní karcinom. Ačkoliv je jejich prognóza velice špatná, výskyt těchto forem karcinomů je velmi vzácný (Filipenský, Čapák a Katolická, 2012).



Obr. 1: Schéma postupu diagnózy karcinomu prostaty. Převzato a upraveno z Filipenský, Čapák a Katolická, 2012; str. 151.

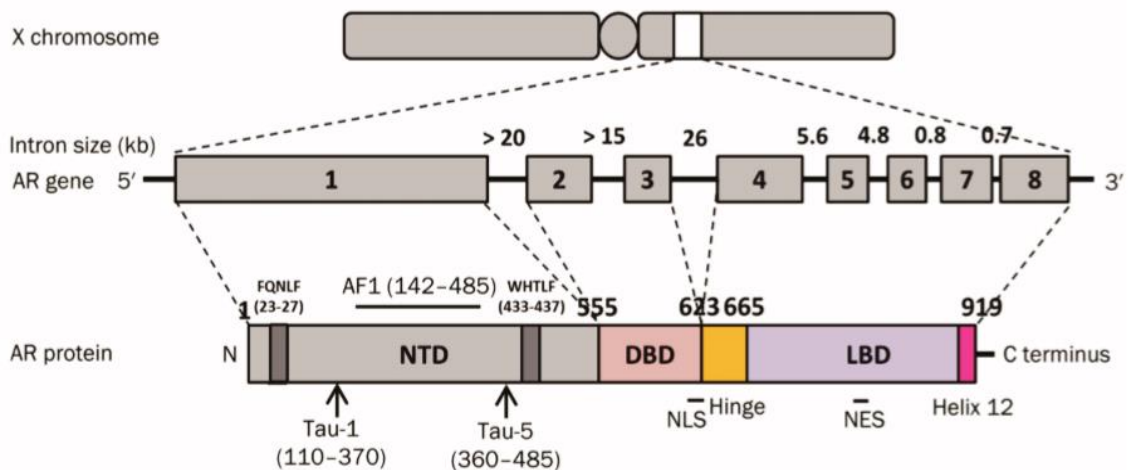
1.4 Androgenní receptor (AR)

Androgenní receptor je 110kDa protein rodiny steroidních transkripčních receptorů sestávající z 919 aminokyselin, jež zprostředkovává buněčnou odpověď na androgeny testosteron a DHT (Dehm a Tindall, 2011). DHT se od testosteronu liší absencí jedné dvojně vazby (viz Obr. 2), což v důsledku zvyšuje jeho afinitu k AR (Tan *et al.*, 2015).



Obr. 2: Chemická struktura testosteronu a dihydrotestosteronu (převzato z Tan *et al.*, 2015).

Muži mají jednu kopii AR genu na chromozomu X (na lokusu Xq11-12). Region kódující protein má 2757 nukleotidů a obsahuje 8 exonů, s introny o velikostech od 0,7 do 2,6 kb. Stejně jako ostatní členové rodiny jaderných receptorů, i AR se skládá ze tří hlavních domén: N-terminální (NTD, rezidua 1-555), dále DNA vázající doména (DBD, rezidua 555-623) a C-koncová ligand vázající doména (LBD, rezidua 665-919), která je připojena k DBD flexibilní pantovou oblastí (rezidua 623-665), viz Obr. 3 (Tan *et al.*, 2015).



Obr. 3: Struktura genu AR a proteinu AR. Převzato z Tan *et al.*, 2015.

Exon 1 kóduje celou NH₂-terminální doménu (NTD), což představuje zhruba 60 % celého AR (Dehm a Tindall, 2011). NTD obsahuje glutaminové repetic

(CAG repetice), jejichž počet se může u pacientů lišit (většina mužů má 19-25 repetice), což se projeví variacemi všech aminokyselin v AR. Bylo registrováno cca 919 aminokyselin v databázi mutací AR genu. Kratší glutaminové repetice jsou spojovány s vysokou transkripční aktivitou AR, čímž pro pacienta představují vyšší riziko vzniku KP. Naopak pacienti s Kennedyho chorobou (dědičná svalová atrofie) mají dlouhé CAG repetice (>40), čímž vzniká nízká transkripční aktivita AR, projevující se gynekomastií, erektilní dysfunkcí, testikulární a svalovou atrofií (Fujita a Nonomura, 2019).

Exon 2 kóduje první "zinc-finger" oblasti DBD, což je oblast rozpoznávající DNA. Exon 3 kóduje druhý "zinc finger" v DBD, jenž funguje jako můstek pro tvorbu dimeru se sousední molekulou AR. Exony 4-8 kódují krátkou a flexibilní pantovou oblast a COOH-koncovou doménu, ze které vychází ligand-vázací doména a transkripční oblast AF2 (z angl. activation function 2). Každá z těchto proteinových domén má důležitý význam v normální aktivaci AR androgenovými ligandy. AR protein bez navázaného ligandu je lokalizován v cytoplasmě v komplexu s Hsp90 (protein teplotního šoku, z angl. heat shock protein 90) a dalšími molekulárními chaperony. Po navázání androgenu k LBD dochází ke změně konformace a kompozice tohoto multiproteinového komplexu, čímž dojde k uvolnění jaderného lokalizačního signálu v pantové oblasti a následuje interakce s transportním proteinem (importin- α) a skrze póry translokace do jádra (Dehm a Tindall, 2011). NTD obsahuje regulační region transkripce AF-1 (z angl. activation function 1) a LBD má AF-2. Po navázání DNA dimer AR vytváří komplex s koaktivátorem a koregulačními proteiny v oblastech AF-1 a AF-2 (Fujita a Nonomura, 2019).

V jádře se AR ve formě dimeru naváže na promotor a zesilovač cílových genů (Dehm a Tindall, 2011). AR reguluje genovou expresi např. fúzních genů, růstových stimulátorů, transkripčních faktorů, regulátorů buněčného cyklu atd. AR také potlačuje transkripci. Formování aktivačního komplexu zahrnuje AR, koaktivátory a RNA polymerázu II pro navázání na zesilovač i promotor, zatímco vytvoření represivního komplexu vyžaduje navázání faktorů pouze na promotor (Fujita a Nonomura, 2019).

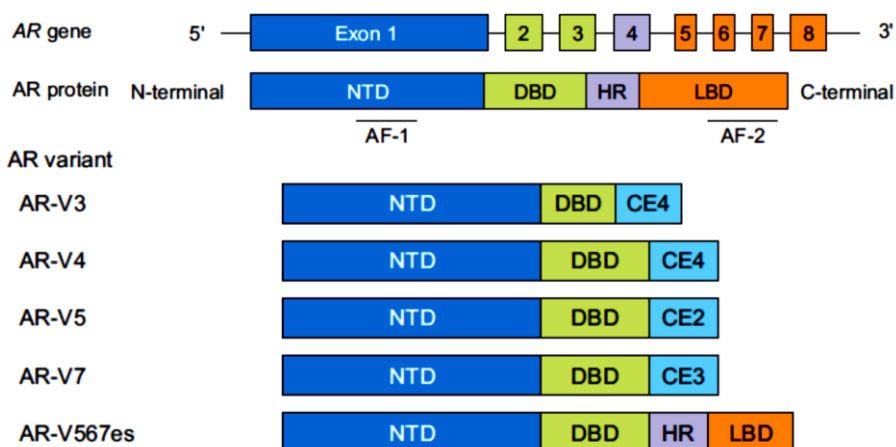
Všechny tři domény jsou pro receptor důležitou součástí. Vysoce konzervativní doména DBD připojuje AR k promotoru a zesilovači (enhanceru) cílových genů přímým navázáním k DNA, čímž je AF-1 a AF-2 z NTD a LBD umožněno stimulovat transkripci těchto genů.

Zatímco AF-1 (rezidua 142-485) v NTD je aktivní permanentně, AF-2 je závislá na ligandu (Tan *et al.*, 2015).

1.4.1 Varianty androgenního receptoru

Mechanismy rezistence KP jsou zapříčiněny variantami AR – aberacemi AR, vysokou expresí, genovou amplifikací, mutacemi. Varianty AR jsou zkrácené proteiny bez ligand-vázací domény, což umožňuje AR signalizaci i při absenci androgenů. Existují dva možné mechanismy pro vytvoření variant AR v kastročně rezistentním karcinomu prostaty (CRPC), strukturní změny v AR genu a alternativní mRNA sestřih (Sciarra *et al.*, 2019).

Již více než dvacet let je známo, že AR má různé varianty sestřihu, viz Obr. 4. Wild-type AR (wtAR) má NTD doménu kódovanou exonem 1, DBD exonem 2 a 3 a LBD exonem 4-8. Je ale známo více než 20 různých variant AR, přičemž většina z nich postrádá některé C-koncové domény, včetně LBD. Právě LBD je však cílem léčiva enzalutamidu, tudíž tyto varianty AR jsou funkčně aktivní i bez androgenů. AR hraje zásadní roli v karcinomu prostaty, především při CRPC. Androgenní deprivace sice dokáže potlačit hormonálně vnímavý karcinom prostaty, ale ten nakonec mění AR a přizpůsobí se a přežívá i při kastročních hladinách androgenu. Výzkumy dokazují, že AR je i v CRPC stále aktivní a stává se tak potenciálním cílem pro terapii CRPC (Fujita a Nonomura, 2019).



Obr. 4: Struktura AR a AR variant, které postrádají DNA-vazebnou doménu či ligand-vázací doménu. NTD – N-koncová doména, HR – pantová oblast, AF-1 – aktivační funkce 1, AF-2 – aktivační funkce 2, CE – kryptický exon. Převzato z Fujita a Nonomura, 2019.

1.4.2 AR-V7

Úloha AR ve spojitosti s jeho sestřihovou variantou 7 byla dlouho neznámá, až v roce 2014 Antonarakis *et al.* objevili souvislost mezi variantou AR-V7 v cirkulujících nádorových buňkách a výsledcích pacientů s KP léčenými androgenovými inhibitory druhé generace. Ačkoliv AR-V7 může být detekován v neléčeném KP i v benigní prostatické tkáni, jeho hladina bývá nedetekovatelná metodami hybridizace i imunohistochemickými. V CRPC bývá exprese AR-V7 výrazně vyšší, kvůli genové amplifikaci a antiandrogenní terapii (Sciarra *et al.*, 2019).

AR-V7 je zkrácena na konci exonu 3 a obsahuje 16 aminokyselin z exonu 3. AR-V7 spolu s AR-V1 bývají nejčastěji se vyskytující varianty AR u pacientů s CRPC (Fujita a Nonomura, 2019). AR-V7 je produktem alternativního sestřihu genu pro AR, obsahuje DNA-vázací doménu, avšak postrádá ligand-vázací doménu, čímž přispívá k aktivaci onkogenních signálů a proliferaci buňky (Scher *et al.*, 2018). Buňky karcinomu prostaty, jenž exprimují wtAR a sestřihové varianty AR jsou na androgenech nezávislé a rezistentní k enzalutamidu a abirateronu (Fujita a Nonomura, 2019). Varianty AR, včetně AR-V7, jsou buňkami KP vytvářeny jako reakce na stresovou situaci, jako je např. androgenní deprivace. V tomto stavu totiž dochází k vyšší transkripci AR, včetně jeho variant. Nicméně se zdá, že pozitivita AR-V7 nemá vliv na léčbu taxany, další možnost terapie mCRPC (metastatický CRPC). Navíc, jelikož produkce AR-V7 je reverzibilní, bylo prokázáno, že při léčbě taxany se mohou buňky KP stát zase AR-V7 negativními, a tedy opět citlivými na léčbu ARTA (androgen receptor axis target therapy) (Büchler, Bobek a Kološtová, 2018).

Dá se tedy předpokládat, že pozitivita/negativita AR-V7 by mohla být klíčová pro volbu léčby mezi ARTA terapií a taxany u pacientů s mCRPC. Na druhou stranu, použití mRNA jako zdroj AR-V7 jako biomarkeru při tekuté biopsii má svá omezení, neboť stabilita krve je závislá na odběrové zkumavce a době zpracování vzorku a je zde problém rozeznat, zda je u transkripčního faktoru AR-V7 kódující protein lokalizován skutečně uvnitř buněčného jádra, kde působí jako onkogenní faktor (Scher *et al.*, 2018).

1.5 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty (CRPC)

U zhruba 20 % pacientů s hormonálně naivním KP se po pěti letech androgenní deprivace rozvine CRPC. Toto stádium doprovází progresse PSA a také klinická, např. kostní komplikace. Pacienti s CRPC mívají nejhorší prognózu a většina z nich přežívá méně než dva roky (Čapoun *et al.*, 2015). CRPC je definován kastračními hladinami testosteronu v séru (<50 ng/dl nebo 1,7 nmol/l) současně s progresí biochemickou či radiologickou. Podmínkou pro potvrzení biochemické progresse tumoru jsou tři po sobě jdoucí vzestupy PSA v séru s odstupem alespoň jednoho týdne, přičemž celkové zvýšení PSA je 2x o 50 % nad PSA nadir (nejnižší hodnota

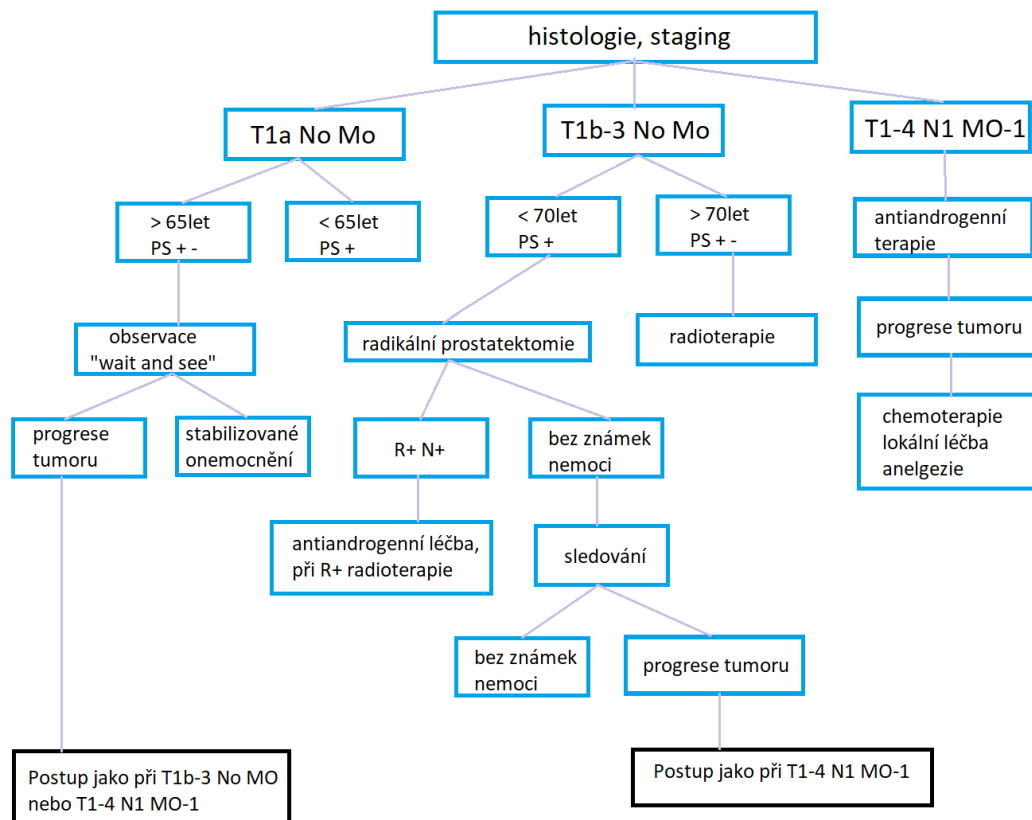
PSA po určité léčbě) a zároveň je hladina PSA > 2 ng/ml. Radiologická progresse karcinomu je potvrzena při výskytu dvou a více nových kostních lézí odhalených pomocí kostního scanu či progresse lézí měkkých tkání podle kritérií RECIST (z angl. Response Evaluation Criteria in Solid Tumor). V době této diagnózy má většina pacientů už metastázy (mCRPC), nicméně existuje i podíl pacientů bez metastáz, označovaný jako nemetastázující CRPC (nmCRPC).

Při terapii nmCRPC, kdy je volbou vyčkávání, antiandrogeny první generace (např. bicalutamid) nebo estrogy, je cílem prodloužit dobu před rozvojem metastáz. Žádná ze jmenovaných možností terapií však podle dostupných zjištění nepřispěla k prodloužení života. Teprve vývoj nejnovějších antiandrogenů v posledních letech poskytuje pro pacienty s nmCRPC naději na delší přežití (Heidegger, Brandt a Heck, 2020).

1.6 Možnosti terapie

Pro zvolení vhodné terapie je velice důležité stanovení stádia (stagingu) nemoci (viz Obr. 5). K tomu se využívá TNM klasifikace. Kategorie T posuzuje velikost nádoru, přičemž je nejčastěji používáno digitální rektální vyšetření či transrektální sonografie a následné histologické vyšetření nádorové tkáně získané při radikální prostatektomii. Písmenem N se označuje stav uzlin, které se vyšetřují metodou počítačové tomografie (CT) či magnetické rezonance (MR), bohužel s vysokým rizikem falešné negativity (> 20 %). V případě pozitivního nálezu bývá pozměněna terapie pacienta, nejčastěji na radioterapii. Označení M se používá pro vyšetření metastáz, jejichž přítomnost musí být vyloučena předtím, než je pacientovi

nasazena kurativní terapie. Mezi standardní vyšetření patří scintigrafie skeletu (jenž na rozdíl od rentgenu (RTG) dokáže odhalit metastázy dříve o několik měsíců), dále RTG plic a ultrazvukové vyšetření jater. Při sérové hladině PSA < 10 ng/ml je přítomnost vzdálených metastáz málo častá (Filipenský, Čapák a Katolická, 2012).



Obr. 5: Schéma algoritmu terapie karcinomu prostaty. Převzato a upraveno z Čapák, Kocák a Čoupek, 2004.

V případě stádia T1a N0 M0 se při terapii vychází z předpokladu, že starší muž tento karcinom vzhledem k dlouhému „doubling time“ neohrozí a díky monitorování stavu stanovováním PSA bez radikálních léčebných postupů zůstane zachována kvalita života (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004).

Lokalizovaný KP (T1b-3 N0 M0) je primárně léčen buďto radikální prostatektomií a/nebo radiční terapií a léčba je v tomto stádiu většinou velmi dobře zvládnutelná (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019). Při radikální prostatektomii je chirurgicky odstraněna prostata včetně pouzdra a semenných váčků, někdy také včetně mízních uzlin. V současné době se pořád jedná o nejčastější volbu léčby pro lokalizovaný KP. Teprve u pacientů, kteří nemohou či nechtějí podstoupit radikální prostatektomii, je volbou léčby radioterapie (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004).

Metastazující či opakující se KP (T1-4 N1 M1) se většinou léčí pomocí hormonální terapie či androgenní deprivace (kastrace) (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

Kastračních hladin androgenů lze dosáhnout orchiektomií (odstranění varlete) či podáváním analogu hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH). Oba přístupy jsou stejně účinné, co se týče navození kastračních hladin androgenů (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004). Podávání agonistů (syntetických derivátů) LHRH nepřímo způsobuje blokaci sekrece LHRH z hypotalamu, kvůli navození falešné nadbytečnosti neaktivního LHRH. Naopak, antagonisté LHRH přímo blokují receptory pro LHRH (Čapoun *et al.*, 2015).

Jako další přístup se nabízí antiandrogenní léčiva, viz kapitola 1.6.2. KP léčen androgenní deprivací mívá z počátku výborné reakce, nicméně většina případů přesto končí návratem KP v průběhu několika měsíců, díky alternativním mechanismům signalizace AR. K těmto patří například amplifikace AR či alternativní sestřih, intratumorální produkce androgenů či produkce androgenů nadledvinkami. V těchto případech je KP považován za kastračně rezistentní a v současnosti je neléčitelný.

CRPC často tvoří metastázy a je označován jako poslední fáze onemocnění se střední dobou života 9-36 měsíců. Je tedy zodpovědný za většinu úmrtí spojených s karcinomem prostaty (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019). Možnosti terapie CRPC zahrnují použití chemoterapeutik (v přední linii docetaxel, později cabazitaxel), dále ARTA terapie – použití inhibitorů androgenní signalizace (abirateron a enzalutamid), imunoterapeutik (sipuleucel-T) a radioterapie pomocí radia-223 (Komura *et al.*, 2018). Vzhledem k tomu, že jsou objevovány další a další mutace či jiné mechanismy rezistence k současným možnostem terapie, jsou vyvíjeny novější a cílenější přístupy a léčiva, jako například olaparib, PARP inhibitor, používaný jako lék po selhání terapie abirateronem či enzalutamidem (Martin, Chen a Parikh, 2017).

1.6.1 Antiandrogenní léčiva

Je známo, že KP je vnímavý k měnící se hladině androgenů. Především v časných stádiích zodpovídají za proliferaci KP. Částečná androgenní deprivace kastrací může nemoc zastavit i na mnoho let. Nicméně, nakonec se většina

KP stane k androgenní deprivaci rezistentní a vzniká tím CRPC. Na začátku let 1980 se totiž ukázalo, že v KP se i nadále vyskytují hladiny androgenů postačující k androgenní signalizaci i po kastraci, přestože hladina testosteronu v séru klesla o více než 95 % (Crawford *et al.*, 2018). Více než 95 % testosteronu je u mužů produkováno varlaty, přesto ale zbylých 5 % produkovaných nadledvinkami, prostatou a intratumorálně hrají významnou roli v rozvoji rezistence, jelikož i nepatrně vyšší exprese AR stačí k interakci s androgeny, čímž se tumor postupně stává citlivějším i k nižším hladinám androgenů. Navíc, celá třetina CRPC pacientů má AR amplifikován (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

Antiandrogeny jsou látky, které soutěží s cirkulujícími či lokálními androgeny o vazbu k AR. Antiandrogeny jsou obecně klasifikovány jako steroidní či nesteroidní, přičemž se dále liší chemickou strukturou, farmakologickým efektem a bezpečnostními profily.

Steroidní antiandrogeny dokážou snížit hladinu testosteronu, ale také se váží na jiné hormonální receptory (např. LHRH). Steroidní antiandrogeny byly pro léčbu KP používány dříve než nesteroidní. CPA (Cyproteron acetát), první steroidní antiandrogen, kompetitivně blokoval vazbu DHT a testosteronu k AR. Při samotném použití byl efekt CPA srovnatelný s chemickou kastrací. Další steroidní antiandrogeny jsou megestrol acetát a medroxyprogesterone acetát. Steroidní antiandrogeny mají spoustu vedlejších účinků, včetně ztráty libida a impotence – díky snižujícím se hladinám testosteronu a androgenní aktivity. Z tohoto důvodu byly hledány jiné látky s větší selektivitou pro AR.

Nesteroidní antiandrogeny byly objeveny na přelomu 60. a 70. let minulého století a cíleně účinkovaly pouze na AR bez progestativních účinků jako CPA. Při samotném podávání u nekastrovaných mužů zvyšovaly libido a potenci. Nesteroidní antiandrogeny jsou používány jako monoterapeutická léčba ke zvýšení hladiny testosteronu u intaktních jedinců a jsou více specifické k AR. Nakonec byly schváleny jako bezpečnější alternativa a v současnosti se používají k léčbě KP v západních zemích (Crawford *et al.*, 2018).

Antiandrogeny se od LHRH antagonistů liší tím, že blokují specifická místa androgenní signalizace. První generace antiandrogenů, bicalutamid, nilutamid a flutamin brání translokaci AR do jádra a předchází přirozené signalizaci. Druhá generace antiandrogenů, enzalutamid, apalutamid a darolutamid tento mechanismus ještě vylepšují (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

Abirateron, aktivní metabolit abirateron acetátu, zabraňuje biosyntéze androgenů tím, že inhibuje cytochrom P-450 c17 (CYP17), čímž dochází k potlačení syntézy androgenů v nadledvinách a intracelulárního testosteronu v nádorových buňkách (Hradec a Čapoun, 2018).

První pokusy o inhibici AR začaly s první generací antiandrogenů, steroidních analogů s cílem zablokovat aktivaci AR ligandem. Avšak brzy bylo zřejmé, že došlo k vyvinutí rezistence k těmto inhibitorům. Bylo objeveno, že při nadměrné expresi AR, což je pro agresivní KP typické, dochází u antagonistů AR první generace k přeměně a následnému chování jako agonisté, jež podněcují progresi tumoru. Tato přeměna vede ke zvýšené hladině mRNA AR a proteinů, což vede k rozvoji rezistence k antiandrogení terapii.

Tento problém vedl k vývoji druhé generace antiandrogenů, zvláštní důraz byl kladen na zachování vlastností antagonisty i při nadměrném výskytu AR. Navíc, první generace antiandrogenů téměř vůbec nezachytává mutační AR a v případě přerušení léčby bicalutamidem byl často pozorován syndrom androgenového odnětí, při kterém tumor ustupoval kvůli mutacím AR a agonistických vlastnostem bicalutamidu. Před vývojem antiandrogenů druhé generace bylo nejefektivnějším způsobem léčby CRPC taxanové chemoterapeutikum docetaxel a cabazitaxel. Jiné možnosti léčby zahrnovaly imunoterapii pomocí sipuleucel-T vakcíny. Sipuleucel-T je první vakcína založená na dendritických buňkách. Tato vakcína vychází z výzkumu Dr. Edgar G. Engelmana, ve kterém jsou sbírány dendritické buňky pacientů a ovlivňovány fúzním proteinem PAP (z angl. rekombinant prostatic acid phosphatase fusion protein) a vloženy zpět do pacienta, což vedlo ke stimulaci autoimunity ke KP (Martin, Chen a Parikh, 2017; Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

Antiandrogeny druhé generace zvýšily specifitu k AR, vykazují vyšší afinitu než předchozí generace, jsou k AR výhradně antagonistické a nevyvolávají syndrom androgenového odnětí. Tyto léčiva významně prodloužily život pacientů, zvýšily dobu přežití bez metastáz o několik měsíců a snížily cirkulující a intratumorální hladiny androgenů a sérového PSA. Bohužel ani přes tyto pokroky stále není CRPC zcela léčitelný (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

1.6.1.1 Současné nesteroidní antiandrogeny

K nejnovější generaci nesteroidních antiandrogenů řadíme enzalutamid, apalutamid, darolutamid (Crawford *et al.*, 2018).

Enzalutamid je nesteroidní antiandrogenní léčivo s vysokou afinitou k LBD (ligand binding domain) AR (Fujita a Nonomura, 2019). Tato látka je selektivní antagonist AR, který inhibuje translokaci AR do jádra, kde dochází k aktivitě kofaktorů a navázání na DNA, používá se při léčbě pacientů s CRPC (Crawford *et al.*, 2018).

Apalutamid je nesteroidní antiandrogenní léčivo s vyšší účinností než enzalutamid. Váže se k LBD a na rozdíl od enzalutamidu, postrádá agonistickou aktivitu. Apalutamid inhibuje jadernou lokalizaci a navázání DNA androgenního receptoru v buňkách karcinomu prostaty (Fujita a Nonomura, 2019).

Třetím léčivem patřící do této generace je darolutamid. Darolutamid je oproti dvěma předchozím lékům strukturálně odlišný. Na rozdíl od enzalutamidu má darolutamid nižší schopnost penetrace skrz hematoencefalickou bariéru a již po osmi hodinách je jeho množství v mozku nedetekovatelné. Díky tomuto představuje pro pacienta nižší riziko ovlivnění centrálního nervového systému. Dalším rozdílem je fakt, že při samostatném podávání darolutamidu nedochází, alespoň u myši, ke zvyšování hladiny testosteronu. Darolutamid inhibuje navázání androgenu k AR. Působí jako antagonist k mutovanému AR, včetně varianty AR-V7, která je zodpovědná za rezistenci k enzalutamidu a apalutamidu. V současnosti toto léčivo podstupuje třetí fázi testů u mužů s vysokorizikovým nemetastazujícím CRPC (Crawford *et al.*, 2018; Fujita a Nonomura, 2019).

K nově vyvinutým látkám patří i galateron. Galateron je nový androgenně zaměřený lék, jenž inhibuje CYP17, působí jako antagonist AR a redukuje expresi AR v buňkách karcinomu prostaty tak, že způsobuje zvýšení degradace wtAR i AR-V7 (Fujita a Nonomura, 2019).

1.6.2 Primární a sekundární rezistence

Nádory obecně jsou složeny z heterogenní populace buněk, jež vykazují různou senzitivitu vůči různým přístupům terapie. Během léčby, v ideálním případě, dochází ke snižování počtu nádorových buněk až po kompletní remisi.

Vzhledem k různorodosti buněk v populaci nádoru v něm ovšem existují také buňky přirozeně rezistentní k terapii, a právě tyto jsou zodpovědné za primární rezistenci. Velmi často se jedná o kmenové buňky karcinomu, které si vypěstovaly celou škálu mechanismů, jak odolat poškození během léčebných postupů. Přestože dle zobrazovacích metod je pacient v remisi, tyto rezistentní nádorové buňky bývají zodpovědné za relaps nemoci (Liberko, 2019).

Za mechanismy primární rezistence nádoru k léčbě jsou považovány genomové změny, např. bodové mutace, změny v genu AR (amplifikace, exprese sestřihových variant, jež jsou nezávislé na ligandu), ale také vnitřní nádorová exprese androgenů či potlačení mechanismů signalizace. Primární rezistence nádoru je tedy dána geneticky (Rice, Malhotra a Stoyanova, 2019).

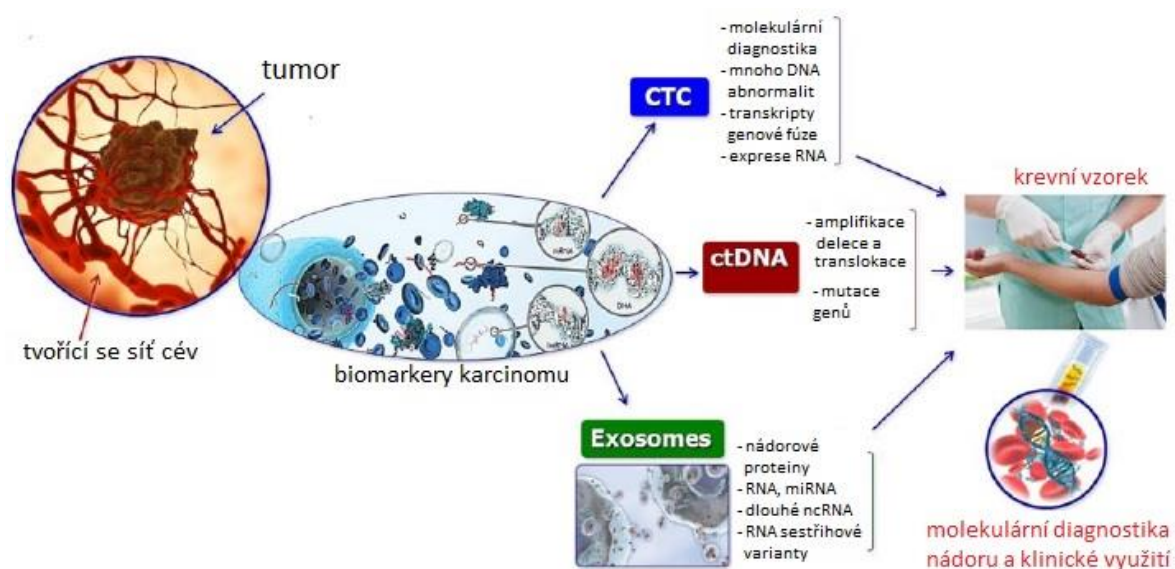
Sekundární rezistence vzniká na základě selekčního tlaku během léčby. Primárně rezistentní buňky, jimž se podařilo dosud přežít, jsou vystavovány dalším metodám terapie. Aby byly nadále schopny přežít, musí podléhat dalším a dalším mutacím, což vede k rozvoji vyšší agresivity a rezistence. Nakonec zůstává populace rezistentní k dané léčbě. Při změně terapie je znovu část buněk usmrcena, ovšem část opět podléhá genetickým změnám a přežívá. Každá další linie léčby bývá kvůli této „získané“ sekundární rezistenci méně účinná (Liberko, 2019). Pro personalizovanou medicínu a efektivní volbu léčby karcinomu prostaty je důležité identifikovat geny, jež by mohly být potenciálními zdroji rezistence k léčbě. V této diplomové práci byla zkoumána exprese vybraných genů ve vztahu ke stádiu onemocnění a zvolené terapii pomocí tekuté biopsie.

1.7 Tekutá biopsie

Tekutá biopsie je neinvazivní metodou odběru krve pacienta za účelem izolace rakovinných komponent (CTCs, ccfDNA/RNA a exozomů) z periferní krve a jejich následné analýzy (Palmirotta *et al.*, 2018). Pro pacienty s pokročilým karcinomem prostaty byla v posledních letech vyvinuta řada terapií, jež zvyšují šanci na přežití a omezují symptomy. Nicméně, optimální metoda pro predikci či monitoring odpovědi na léčbu zatím vyvinuta nebyla. Tekutá biopsie však slibuje možnost zhodnocení stavu pacienta s potenciální aplikací při všech stádiích onemocnění (Zainfeld a Goldkorn, 2018).

Skrínink krevního vzorku vysoce rizikových pacientů by v jistých případech mohl být analyzován pro genomové alterace typické pro určitý nádor, jako nástroj pro identifikaci případné malignace. Současným zlatým standardem pro klinické a výzkumné genomové profilování tumoru je paralelní srovnání tumorové a normální tkáně sekvenováním z bioptického vzorku. Po zpracování standardního vzorku může být nádorová biopsie nedostačujícím množstvím tkáně pro genomové sekvenování. Navíc, frakce nádorových buněk vzhledem k počtu normálních buněk je v každé biopsii rozdílná, tudíž opět může být nedostatek materiálu, což vyžaduje opakované biopsie, které jen dále zvyšují riziko pro pacienta. Vzorky z jediné oblasti tumoru dále omezují komplexnost genomového sekvenování nádoru, vzhledem k pravděpodobné intratumorové heterogenitě (Krishnamurthy *et al.*, 2017).

Tekutá biopsie ale otevírá zcela nové možnosti. Tato metoda zahrnuje detekci a izolaci cirkulujících nádorových buněk (CTC), cirkulující nádorové DNA/RNA (ctDNA/RNA) a exozomů, viz Obr. 6. Tyto komponenty slouží jako zdroj genomické a proteomické informace o pacientech s karcinomem (Palmirotta *et al.*, 2018).



Obr. 6: Princip tekuté biopsie; popis jednotlivých komponent tumoru izolovatelných z periferní krve pacienta a jejich vlastnosti využitelné při analýze (převzato a upraveno z Palmirotta *et al.*, 2018).

Přesnost této metody je značně zvyšována díky pokroku v molekulárních technikách, od metod založených na PCR, DNA sekvenování, digitální PCR až po moderní NGS (z angl. next generation sequencing) technologie (Cheung, Chow a To, 2018).

Ve studiích porovnávajících plazmu a nádorovou tkáň, byla potvrzena více než 80% shoda v aberacích tumorové nukleové kyseliny, přičemž některé výsledky potvrzovaly, že krevní vzorek poskytoval více kompletní profil tumoru oproti tkáňové biopsii, kvůli heterogenitě mezi primárním tumorem a metastatickými ložisky. V případě plazmy, cirkulující nádorová DNA (ctDNA) obsahovala všechny nebo většinu změn tkáňové tumorové DNA, a navíc i další dodatečné mutace. Tyto výsledky potvrzují, že analýza ctDNA může poskytovat více než 80% citlivost a 98-100% specifitu (Krishnamurthy *et al.*, 2017).

1.7.1 Využití tekuté biopsie

Původně bylo využití tekuté biopsie spojováno s prognózou, ale nyní přichází do úvahy použití při diagnostice, včetně možností skríninku a především odhadu odpovědi nebo rezistence k podané léčbě (Palmirotta *et al.*, 2018).

Pokud si totiž pacient vyvine rezistenci k cílené terapii, je pro zvolení jiné vhodné terapie velice důležitá analýza dalších vzorků nádoru, pokud možno přímo z rezistentních klonů. Nicméně, získání tkáňového či cytologického vzorku bývá invazivní a mnohdy dokonce nemožné (Cheung, Chow a To, 2018).

1.7.2 Výhody tekuté biopsie

Tradiční biopsie je limitována množstvím získané tkáně, jenž je omezeno velikostí použitého nástroje a oblastí cílové tkáně. Tekutá biopsie ovšem nabízí možnost detekovat a analyzovat karcinom z různých tělních tekutin (např. moč a krev), tudíž v porovnání s konvenčními tkáňovými či cytologickými vzorky, představuje neinvazivní, bezpečnou, levnou, rychlou, efektivní a snadno opakovatelnou metodu. Z hlediska heterogenity karcinomu se předpokládá, že ctDNA by mohla lépe reprezentovat celý tumor oproti klasickému biopsickému či cytologickému vzorku (Cheung, Chow a To, 2018).

Identifikace specifických mutací v cílových genech může pomoci při výběru terapie, určit vhodnost léčby a také identifikovat sekundární rezistenci, s cílem rozpoznat progresi nemoci mnohem dříve, než bylo možné dosud (Palmirotta *et al.*, 2018).

V případě tekuté biopsie se jedná o směsici DNA pocházející z několika nádorových ložisek, poskytující reprezentativnější informace o malignitě v porovnání s biopsií z jediné oblasti tumoru. Dále, krevní řečiště je snadno přístupný a minimálně invazivní zdroj nádorové DNA, umožňující opakované a dlouhodobé profilování nádorového genomu, pro relativně bezpečný způsob monitorování nádorové heterogenity a odpovědi či rezistenci k léčbě (Krishnamurthy *et al.*, 2017).

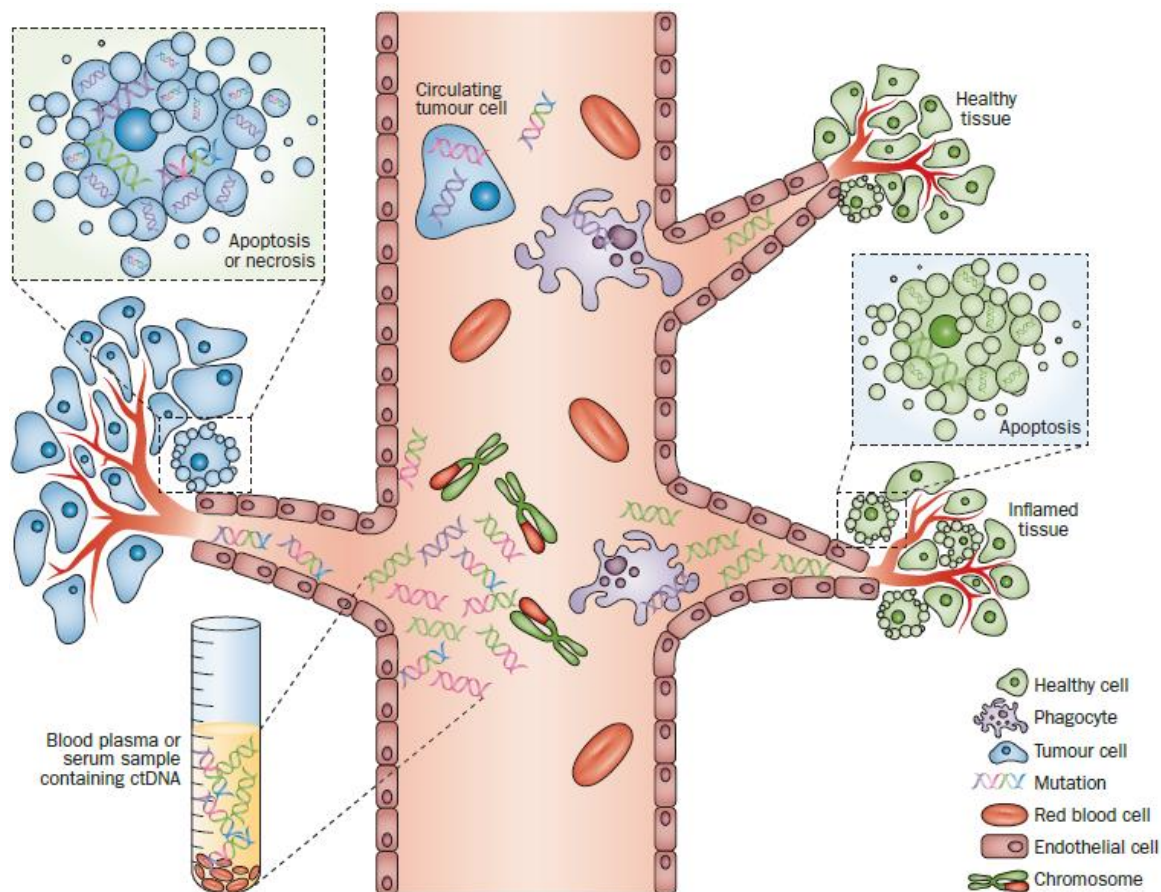
1.7.3 Nevýhody tekuté biopsie

Navzdory obrovskému potenciálu této metody se objevují také jistá omezení, a ne všechny klinicky důležité biomarkery mohou být touto technikou v současnosti detekovány. Klinická potřeba mnoha takových analýz vyžaduje další ověřování a validace. Přestože tekutá biopsie má výhodu v bezpečném sběru vzorků, množství získané tumorové DNA je většinou velice malé. Kvůli tomuto je největší překážkou v této metodě samotná analýza vzorků. K odlišení tumorové cirkulující DNA od DNA z normálních buněk jsou potřeba citlivé metody, které umí detekovat aberace specifické pro karcinom. Mezi vhodné metody proto patří například alelově specifická PCR (také známá jako ARMS), digitální PCR nebo kvantitativní PCR. Pro použití těchto metod je potřeba dobře charakterizovat zájmové mutace, aby alelově specifické primery (pro ARMS) nebo próby (pro digitální PCR) mohly být specificky navrženy pro mutaci v konkrétním lokusu (Cheung, Chow a To, 2018).

1.7.4 Cirkulující volná DNA (ccfDNA)

Cirkulující volná DNA (z angl. circulating cell-free DNA) je extracelulární DNA přítomná v nízkých koncentracích u zdravých jedinců, zvýšená hladina bývá u patologických stavů (zánět, stres, autoimunitní onemocnění). Může vznikat apoptózou i nekrózou (viz Obr. 7) a bývá přítomna v plazmě v množství 10-1500 ng/ml a její velikost se pohybuje mezi 60 až 200 bp. Může pocházet také z maligní tkáně (z angl. circulating tumor DNA, ctDNA) hlavně u pacientů s malignitami v pokročilém stádiu. Je uvolňována nekrózou z buněk primárního nádoru nebo metastáz. V současnosti lze ctDNA izolovat z plné krve pacientů purifikací plazmy. I jednoduchá kvantifikace poměru ctDNA/ccfDNA může být

použita jako marker, neboť jak zjistil Carreira *et al.*, hladina ctDNA u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty koreluje se stádiem nádoru a odpovědí na léčbu abirateronem. Oproti CTCs je ctDNA snadněji dostupná, neboť je z nádorového ložiska vyplavována běžně, kdežto počet CTCs v periferní krvi může být dosti omezený. Nicméně, CTCs pravděpodobně reprezentují ty nejagresivnější a nejnebezpečnější stránky fenotypu karcinomu, ale ctDNA může pocházet i z buněk, jež umírají v odpovědi na léčbu a nemusí tudíž poskytovat adekvátní informace (Morrison a Goldkorn, 2018).



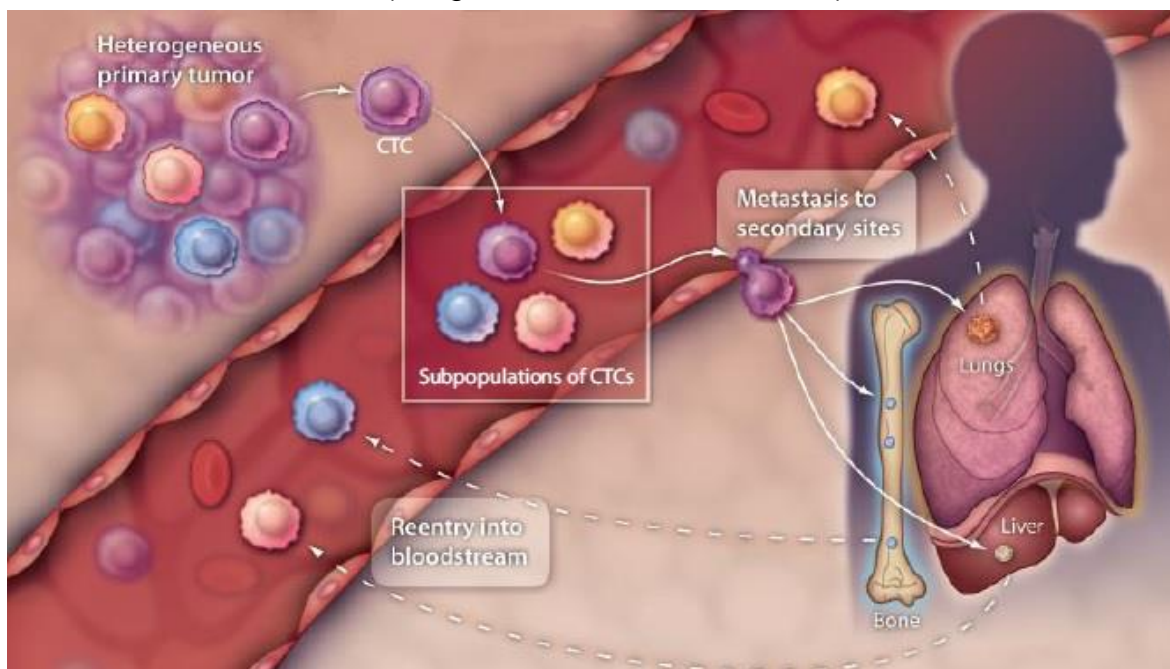
Obr. 7: Uvolnění a extrakce ccfDNA z krve. ccfDNA je uvolňována jak ze zdravých, tak ze zánětlivých či patologicky změněných (rakovinných) buněk podstupující apoptózu či nekrózu. ccfDNA lze extrahovat ze vzorku krve a detekovat i kvantifikovat genetické změny v DNA nádoru. Mezi rakovinné změny v genomu buňky patří bodové mutace (na obrázku fialové, červené, zelené a modré řetězce DNA), změny v počtech kopií genů (na obrázku červené části chromozomů) a strukturální přeměny (na obrázku zelené a červené řetězce DNA). Převzato z Crowley *et al.*, 2013.

1.7.5 Cirkulující nádorové buňky (CTCs)

Cirkulující nádorové buňky jsou buňky nádoru vyplaveny do krevního řečiště pocházející z primárního ložiska či metastáz a disponují schopností zakládat nové metastázy, viz Obr. 8. Mimo to představují také potenciální neinvazivní

a reprodukovatelný prostředek pro analýzu. Přestože byly objeveny již v 19. století, teprve pokročilé technologie umožnily objevit jejich pravý potenciál (Morrison a Goldkorn, 2018).

CTCs lze získat pozitivní selekcí založenou na expresi membránových molekul (např. EpCAM) či negativní selekcí na základě fyzickochemických vlastností CTC, jako je např. velikost, hustota, povrchový náboj atd. k rozlišení CTCs od ostatních buněk (Lang, Casavant a Beebe, 2012).



Obr. 8: Z heterogenní populace nádoru se mohou některé buňky uvolňovat do krevního řečiště (CTCs) a představují potenciální riziko tvorby metastáz. Převzato a upraveno z Lang, Casavant a Beebe, 2012.

Důležitost CTCs pro diagnostiku KP spočívá v tom, že rakovinné metastázy, vzniklé kolonizací vzdálenějších tkání a orgánů CTC buňkami, jsou zodpovědné za většinu úmrtí spojených s rakovinou. Ačkoliv se CTCs objevují v krevním řečišti jen ve velmi malém počtu (většinou okolo 1 – 10 CTCs na 10 ml krve, cca 1 CTC na 10^7 leukocytů), hrají významnou roli v progresi karcinomu (Li, Wu a Bai, 2018).

Tvorba metastáz, jenž umožňuje karcinomu se rozšířit a kolonizovat další části organismu, je zodpovědná za více než 90 % úmrtí spojených s rakovinou. Aby mohlo k tvorbě metastáz dojít, musí buňky primárního tumoru proniknout do okolních tkání skrze bazální membránu, přežít po čas apoptózy, přejít do nové tkáně a adaptovat se novým podmínkám. Novodobé technologie ukazují, že CTCs rychle odpovídají na změny průběhu nemoci, díky jejich krátké době

života (méně než 24 hodin). Jejich počet po resekci karcinomu prostaty rapidně upadá. Bylo prokázáno, že 45-60 % těchto buněk má dostatečnou integritu na to, aby mohly být sekvenovány. CTCs navíc vykazují relativně rychlou odpověď na změny v průběhu nemoci a nabízejí možnosti analýzy po jejich izolaci (Woo a Yu, 2018).

Avšak nízká četnost CTCs pokládá otázku, zda izolace tak malé frakce buněčné populace tumoru může adekvátně reflektovat status nemoci jako celku. Dosavadní studie však opravdu poukazují na shodu mezi mutacemi nalezenými v CTCs a nádorové populaci. Byla prokázána vysoká shoda CNAs (z angl. copy number alterations – počet kopií určitého genu u daného jedince) mezi CTCs. Např. Ni *et al.*, 2013 objevil průměrnou 83% shodu v CNAs mezi různými 2 CTCs z 8 z jednoho pacienta s plicním adenokarcinomem (Woo a Yu, 2018).

Exozomy, váčky veliké pouze 40-100 nm jsou vylučovány buňkami a je možné je identifikovat ve většině tělních tekutin. Pocházejí z vnitřních výklenků plazmatické membrány. Původně byly pokládány za buněčný odpad, nyní je ale zřejmé, že se účastní mezibuněčné komunikace a přenosu látek mezi buňkami (proteiny, RNA, miRNA). Exozomy hrají důležitou roli v různých procesech a bylo dokázáno, že exozomy produkované nádorovými buňkami se účastní progresu karcinomu a rozvoje metastáz, neboť ovlivňují proliferaci, migraci a invazi nádorových buněk, dále také angiogenezi a imunosupresi. Exozomy by tedy mohly být vedle ccfDNA/RNA a CTCs dalším zdrojem informací o stavu nádoru a pomocníkem při monitoringu terapie (Palmirotta *et al.*, 2018).

1.8 Další zájmové geny

1.8.1 PSA

Prostatický specifický antigen (PSA, z angl. prostate specific antigen) je serinová proteáza produkovaná prostatickými buňkami. Je kódovaný na 19. chromozomu a účastní se hydrolýzy proteinů v ejakulátu a zkapalnění spermatu. PSA lze detekovat i v krevním séru, kde se nachází z většiny ve formě vázané na inhibitory proteáz (α 2-makroglobulin a zejména α 1-antichymotrypsin) a z menší části ve volné formě (Racek, 2006).

Za normální horní hranici PSA v séru je považována hodnota 4 ng/ml. Hladina PSA v séru se zvyšuje u pacientů s KP, ale i při BHP, bakteriálních

prostatitidách, traumatech prostaty. Díky zavedení dalších laboratorních kritérií (stanovení referenčních hodnot podle věku, vztažení hladiny PSA k objemu prostaty, určení rychlosti zvyšování PSA v séru a stanovování poměru volného PSA ku celkovému PSA) se značně zvýšila specifičnost PSA jako nádorového markeru až na 80 % a senzitivita až na 91 % (Čapák, Kocák a Čoupek, 2004; Racek, 2006). PSA není tumor specifický, ale orgánově specifický marker.

1.8.2 PTEN

PTEN (z angl. Phosphatase and tensin homolog, homolog fosfatázy a tenzinu) je tumorsupresorový gen kódující fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát-3-fosfatázu, která tlumí účinek fosfoinosol-3-kináz pomocí defosforylace z D3 pozice fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP3), což představuje lipidovou část AKT-kinázy a dochází tak k její inhibici. Takto kontroluje několik procesů nutných pro udržení homeostázy života buňky a buněčných funkcí jako je růst, proliferace, metabolismus, migrace a buněčná struktura.

Gen PTEN je lokalizován na chromozomu 10q23 a je složen z 9 exonů a celkem kóduje 403 aminokyselin. Mezi funkce tohoto genu patří transkripční a posttranskripční regulace, posttranslační modifikace a interproteinové interakce. Tyto funkce bývají v KP často pozměněny, neboť PTEN u KP velice často podléhá hyper/hypometylacím či dokonce delecím a jeho exprese tak bývá výrazně snížena, čímž zůstává AKT trvale aktivována a podporuje proliferaci buněk, angiogenezi apod. Úplná ztráta PTEN je proto typická pro lokálně pokročilé KP s vysokým gradingem malignity, přičemž více než polovina případů metastáz má v tomto genu alteraci (Schmidt *et al.*, 2010; Rathinavelu a Levy, 2016).

1.8.3 AMACR

Gen pro AMACR (z angl. Alpha-methylacyl-CoA racemase) se nachází na chromozomu 5p13 a kóduje 382 aminokyselinový protein, jenž se účastní beta oxidace postranních řetězců mastných kyselin. Přesněji, AMACR slouží jako katalyzátor konverze (2R) α -methyl postranních řetězců mastných kyselin na jejich (S) stereoizomery. AMACR se nachází v peroxizomech a mitochondriích. (Evans, 2003) Zheng *et al.* potvrzují, že jisté varianty sekvence genu AMACR silně korelují s rozvojem KP u mužů s pozitivní rodinnou anamnézou.

Je známo, že muži konzumující stravu bohatou na mléčné produkty a červené maso čelí vyššímu riziku vzniku KP. Tato strava rovněž představuje bohaté zdroje rozvětvených mastných kyselin jakožto substrátů pro AMACR, což představuje nepřímý důkaz toho, že vyšší exprese AMACR společně s dietními návyky může hrát roli při progresi KP.

Přesný mechanismus účinku na KP zatím není znám. Nicméně, zvýšená exprese AMACR není omezena pouze na KP, a jako takový nemůže být považován za specifický marker k identifikaci KP z biopsií obsahující metastatický adenokarcinom z neznámého primárního ložiska. AMACR je exprimován také v normální tkáni – v nervovém systému, střevě, ledvinách, prsu, slinivky ale i v krevních elementech. Nicméně bylo prokázáno, že v maligních novotvarech je vyšší exprese AMACR než v normální tkáni, ze které malignita pochází (Evans, 2003).

1.8.4 EpCAM

Epiteliální buněčná adhezní molekula (EpCAM, z angl. epithelial cell adhesion molecule) je transmembránový glykoprotein, složen z 314 aminokyselin, zprostředkávající buněčný kontakt v epitelech. Byl objeven před téměř 40 lety. Gen EpCAM je velký 14 kb a je umístěn na chromozomu 2 (2p21).

Jelikož míra exprese EpCAM se v normální a maligní tkáni liší, bývá využíván při detekci nádorových buněk v mezenchymálních tkáních, jako jsou lymfatické uzliny, krev či kostní dřeň. V posledních několika letech je snaha o detekci EpCAM pozitivních cirkulujících nádorových buněk (CTCs) v krvi onkologických pacientů, jako nového markeru při tekuté biopsii.

Kromě adhezního charakteru této molekuly je jí přisuzována zodpovědnost za další vlastnosti buňky, jako je regulace buněčné proliferace a počátku tumorigeneze (Keller, Werner a Pantel, 2019).

1.8.5 CD45

Protein CD45 (z angl. protein tyrosine phosphatase, receptor type C) je tyrozinová fosfatáza specifická pro leukocyty a je nejhojněji zastoupeným glykoproteinem na povrchu lymfocytů. Hraje důležitou roli při přenosu signálu z T a B buněk během jejich vývoje i antigen dependentní aktivaci v organismu. Je zřejmé,

že fosfatázová aktivita CD45 je potřebná pro efektivní signalizaci receptorových komplexů T-lymfocytů.

Nicméně není zatím mnoho známo o tom, jak je fosfatázová aktivita tohoto glykoproteinu regulována (Ng, Felberg a Johnson, 2000). Molekula CD45 je využívána při tekuté biopsii, kdy metodou CD45 deplece lze účinně obohatit výtěžek CTCs ze vzorku, jelikož dojde k negativní selekci CD45+ buněk (tedy lymfocytů), které normálně představují vysoký podíl získaných buněk.

1.8.6 PCA3

PCA3 (z angl. prostatic cancer antigen 3) v roce 1999 objevil Bussmakers *et al.* Tento gen byl původně označován jako DD3 (z angl. differential display clone 3) a nachází se na chromozomu 9q21-22. PCA3 obsahuje velké množství stop kodónů, kvůli nimž není translatován do proteinu (Yang, Yu a Wang, 2016). Tento 25kb gen obsahuje 4 exony a jeho primární transkript může podléhat alternativním sestřihům a poskytovat tak různě dlouhé transkripty. Dlouhá nekódující RNA genu PCA3 hraje důležitou roli v různých biologických procesech tím, že kontroluje expresi genů a jejich deregulace bývá spojována s progresí tumorů.

Lemos *et al.* zjistili, že transkripce PCA3 ovlivňuje cílové geny pro AR, epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT), transkripci, signální transdukci, buněčnou adhezi, invazi buněk a tvorbu metastáz, opravy DNA, angiogenezi, apoptózu a senescenci buněk.

PCA3 je nejspecifičtější gen KP. Na rozdíl od PSA je totiž hladina PCA3 zřejmě nezávislá na věku pacienta, přítomnosti zánětu, poškození či předchozích biopsiích a může být detekována a kvantifikována v moči i krvi. Stanovení PCA3 v moči pacienta jako marker existence KP je schváleným postupem podle FDA (Lemos *et al.*, 2019).

Pro využití PCA3 jako možného biomarkeru KP se sleduje tisícinásobek poměru exprese PCA3 ku PSA ($\text{PCA3 mRNA/PSA mRNA} \times 1000$). Takto zjištěná hodnota se označuje jako PCA3 skóre (Yang, Yu a Wang, 2016).

V posledních letech je tento gen a jeho nekódující mRNA studován jako možný biomarker pro detekci a stanovení prognózy KP. Jeho význam spočívá v možnosti potvrzení potřeby opakované biopsie a vyloučení agresivní formy KP po negativních biopsických nálezech. Nedávné klinické studie rovněž potvrzují,

že PCA3 skóre vysoce pozitivně koreluje s rizikem pozitivního bioptického nálezu. Vyrůstající PCA3 skóre navíc koreluje s rizikem tvorby jakéhokoliv karcinomu a je potenciálně důležitějším markerem než samotná hladina PSA (Ploussard a de la Taille, 2018).

1.8.7 TBP

Protein vázající se na TATA-box (TBP, z angl. TATA-Box Binding Protein) je důležitý pro iniciaci transkripce eukaryotických buněk. Tento 30kD univerzální transkripční faktor se jako jediný váže specificky k DNA a je také nezbytný pro iniciaci transkripce RNA polymerázy. Ve většině eukaryot se TBP váže na promotorovou oblast konzervované sekvence označované jako TATA-box.

TBP je důležitou součástí transkripčního faktoru IID (TFIID) a společně s dalšími transkripčními faktory vytváří komplex podílející se na iniciaci transkripce a regulaci transkripční aktivity (Song *et al.*, 2020).

V této diplomové práci byl gen pro TBP použit jako housekeepingový gen.

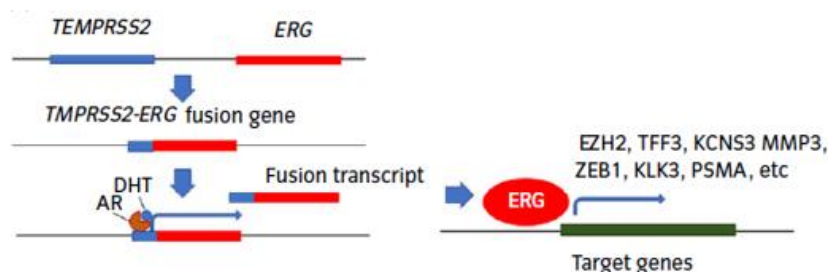
1.8.8 TMPRSS2-ERG

V roce 2005 bylo objeveno, že většina (až 70 %) karcinomů prostaty má fúzi androgenně senzitivních genů – transmembránová proteáza, serin 2 (TMPRSS2) a estrogeně regulovaný gen (ERG).

TMPRSS2 je androgenně regulovaný prostatický specifický protein, transmembránová serinová proteáza, která je exprimována na buněčném povrchu za účelem regulace mezibuněčných a intrabuněčných interakcí. Rodina genů serinových proteáz je významná pro různé fyziologické i patologické procesy, jako je digesce, krevní koagulace, remodelace tkání, invaze kancerózních buněk, zánětlivé reakce a apoptóza. ERG patří do onkogenní rodiny erytroblastického viru E26 (ETS) spolu s dalšími více než 230 transkripčními faktory.

ERG je ale ETS transkripční faktor primárně se podílející na fúzi genů v KP. Protein ERG zajišťuje regulaci transkripční aktivity různých cílových genů, jež jsou zásadní pro poškození DNA, buněčnou invazi a proliferaci, epiteliálně-mezenchymální přechod, ale také pro buněčnou diferenciaci a epigenetickou kontrolu (Rathinavelu a Levy, 2016).

TMPRSS2-ERG je fúzován v KP skrz delecii v genomové DNA přes homogenní deleční oblast mezi ERG a TMPRSS2 na chromozomu 21q22.2 nebo přes translokaci obou genů. Důsledkem těchto přeskupení je TMPRSS2-ERG fúzní transkript a nadměrná exprese ERG, viz Obr. 9. Oba geny se nacházejí na stejném chromozomu (21q) a vzdálenost mezi nimi je relativně malá - 3 MB. Takto malá vzdálenost je nejspíše důvod vyšší frekvence fúze těchto genů.



Obr. 9: Schéma regulace genu TMPRSS2 pomocí AR vedoucí ke zvýšené regulaci ERG. Vysoká exprese ERG může vést ke stimulu exprese cílových genů. Převzato z Fujita a Nonomura, 2018.

TMPRSS2-ERG fúze se objevuje brzy při karcinogenezi, při přechodu z benigní fáze do prostatické prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN). Přibližně 50 % pacientů ze souborů KP s vyšším PSA bývá pozitivní na přítomnost fúzního genu a více než 90 % KP vykazujících nadměrnou expresi ERG genu rovněž má tuto fúzi. Dosud bylo identifikováno více než osm variant fúzního transkriptu, které se liší mírou exprese u různých vzorků KP. Nejčastěji nacházená verze je TMPRSS2-ERG fúze, což je delece mezi 5'UTR koncem TMPRSS2 exonu 1 a 5'konci ERG exonu 4 (Rathinavelu a Levy, 2016; Yang, Yu a Wang, 2016).

TMPRSS2 je androgenně senzitivní gen a regulace exprese skrz AR fúzního genu TMPRSS2-ERG je důležitá pro rozvoj a progresi KP, jelikož přítomnost fúzního genu je nezbytná pro vznik kancerózy v EST pozitivních tumorech. Fúzní gen zapříčiňuje pozměnění transkripčních vzorců a buněčných drah, díky čemuž následně dochází ke vzniku PIN. Prognostický potenciál TMPRSS2-ERG spočívá v možnosti detekce v moči, krvi a tkáni pomocí qPCR, fluorescence in-situ hybridizací (FISH), DNA sekvenováním a pomocí technologie Genechip. Expresa TMPRSS2 a TMPRSS2-ERG se po androgen-deprivační terapii v primární KP snižuje (Rathinavelu a Levy, 2016).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části této diplomové práce bylo pro analýzu exprese zájmových genů pacientů s pokročilým karcinomem prostaty z CTCs a ccfDNA/RNA z krevní plazmy nutné provést nejprve ověření funkčnosti specifických primerů pro dosud neověřené geny (AR, AR-V7 a PTEN) na buněčných liniích odvozených od karcinomu prostaty pomocí qPCR.

Poté byla provedena optimalizace metody (použití specifických primerů, ověření kroku přečištění v postupu izolace z plazmy, výběr plazmy s krevními destičkami). Následně proběhla izolace RNA z CTCs a izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy pacientů. Získané nukleové kyseliny byly použity pro reverzní transkripci a následnou qPCR za sledování exprese genů AMACR, AR, AR-V7, CD45, EpCAM, PCA3, PSA, PTEN, TBP a TMPRSS2-ERG.

Chemikálie:

- 0,1M DTT (INVITROGEN)
- 10 μ M specific primers (směs rv primerů)
- 10 mM PCR dNTP mix (TOP-BIO s.r.o.)
- 10 μ M fw a rv primery (Generi Biotech)
- 10 μ M próba (UPL, Universal probe library) (Roche)
- 10x Dnase I Reaction Buffer (INVITROGEN)
- 25 mM EDTA (Thermo fisher scientific)
- 2x LightCycler 480 Probe Master (Roche)
- 5x First strand Buffer (INVITROGEN)
- AR primer and probe mix (qA-01-0364P_AR) (TATAA Biocenter)
- AR-V7 primer and probe mix (qA-01-0368P_ARV7) (TATAA Biocenter)
- CD45 20x TaqMan Gene Expression Assay (Hs04189704 m1 PTPRC) (Thermo fisher scientific)
- Dnase I Amplification Grade (1 U/ μ l) (Thermo fisher scientific)
- Lymphoprep médium (StemCell Technologies)
- Protector Rnase Inhibitor (40 U/ μ l) (Roche)
- PTEN primer and probe mix (qA-010239P) (TATAA Biocenter)
- RNAfree water
- RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies)

- Spike I (TATAA Universal RNA Spike I, Probe FAM a primermix) (TATAA Biocenter)
- Spike II (TATAA Universal RNA Spike II, Probe FAM a primermix) (TATAA Biocenter)
- SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μ l) (INVITROGEN)

Pasáž buněk

- 1 mM pyruvát sodný (Sigma)
- 2 mM L-glutamin (Sigma)
- antibiotika penicilin a streptomycin 1U/ml (Invitrogen)
- DMEM médium (Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco, Invitrogen)
- DMSO 10% (dimethylsulfoxide)
- FBS 10% (fetální bovinní sérum, Invitrogen)
- Glutamax (Sigma)
- PBS 1x (sterilní fosfátový pufr, phosphate buffered saline)
- RPMI médium 1640 (Sigma)
- Trypsin 0,25% (Sigma)

Izolace ccfDNA/RNA z plazmy pomocí QIAmp kitu (QIAGEN)

- 100% etanol
- 80% etanol
- Isopropanol
- RPE pufr
- RPL pufr
- RPM pufr
- RPP pufr
- RWT pufr

Izolace DNA + RNA z CTCs pomocí AllPrep DNA/RNA Micro kitu (QIAGEN)

- 70% etanol
- AW 1 pufr
- AW 2 pufr
- EB pufr

- RLT pufr
- RNA carrier
- RPE pufr
- RW1 pufr
- β -merkaptotoetanol

Přístroje a pomůcky:

- 96-ti jamkové destičky + fólie (Roche)
- AllPrep DNA spin column (QIAGEN)
- Automatická pipeta (Eppendorf) + špičky
- Bürkerova komůrka
- centrifuga 3K30 (Sigma)
- centrifuga MR22i (Jouan)
- flow-box s vertikálním prouděním vzduchu MSC-Advantage (Thermo Scientific)
- Inkubátor Class 100 HEPA (Thermo Scientific)
- Kryoampule
- LoBind zkumavky (1,5 ml, Eppendorf)
- Mikrocentrifuga DW-41 (Qualitron)
- Mikrozukmavky (1,5ml)
- Minicentrifuga Blue (Labnet)
- Namražovací stojan na 96-ti jamkovou destičku
- NanoDrop (Thermo Fisher)
- PCR stripy
- Petriho misky
- Pinzeta
- Rneasy Midi spin column (QIAGEN)
- Rneasy MinElute spin column (QIAGEN)
- led
- světelný mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
- Termoblok AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet)
- Termocykler Mastercycler gradient (EPPENDORF)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Biologický materiál:

- Nádorové buňky linie CWR22rv1, VCaP a DU-145 odvozené od rakoviny prostaty. Buněčné linie byly získány od firmy American Type Culture Collection (ATCC).
- Plná krev pacientů (N=35) s karcinomem prostaty.

2.1 OVĚŘENÍ PRIMERŮ PRO GENY AR, AR-V7 A PTEN**2.1.1. Příprava buněčné linie**

Buněčná linie CWR22rv1 odvozená od kastračně rezistentního karcinomu prostaty byla kultivovaná v médiu RPMI 1640, ke kterému bylo přidáno fetální bovinní sérum (FBS) ve výsledné 10% koncentraci (v/v), antibiotika penicilin a streptomycin (1U/ml), 1 mM pyruvát sodný a glutamax. Nádorové buňky linie VCaP a DU-145 rakoviny prostaty byly kultivovány v médiu DMEM (Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco) s přísadkou 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu (1 U/ml). Linie byly pasážovány pomocí 0,1% trypsin-EDTA a pěstovány v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C za přítomnosti CO₂ a za sterilních podmínek spasážovány. Pomocí Bürkerovy komůrky byly připraveny suspenze těchto buněk (o počtu 100 000 CWR22rv1, směs buněk 90 000 DU-145 a 10 000 VCaP) v 10% médiu. Pro uchování byly vzorky umístěny do kryoampulí spolu s 10% DMSO v RPMI/DMEM médiu a zamraženy v tekutém dusíku.

2.1.2. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN). Vzorky byly rozmrazeny a přeneseny na gDNA Eliminator spin column (z kitu) se sběrnou zkumavkou a centrifugovány (30 s, 10 000 RPM). K eluátům bylo přidáno 350 µl 70% ethanolu a propipetováno. Každý vzorek byl přenesen na RNeasy MinElute spin column (z kitu) se sběrnou zkumavkou a centrifugován (30 s, 10 000 RPM). Na kolonky bylo následně přidáno 700 µl RW1 pufru a proběhla centrifugace (30 s, 10 000 RPM). Dále bylo na kolonky napipetováno 500 µl RPE pufru, následovala centrifugace (30 s, 10 000 RPM). Poslední krok promývání obnášel nanesení 500 µl 80% etanolu na kolonky a další stočení

(2 min, 10 000 RPM). Poté byly kolonky přeneseny do nových sběrných zkumavek a s otevřeným víčkem byly centrifugovány (5 min, 14 000 RPM). Po přenesení kolonek do LoBind zkumavek (1,5 ml, Eppendorf) bylo na střed obou kolonek nanášeno 14 μ l RNase-free water a izolace byla dokončena elucí RNA (1 min, 14 000 RPM).

Bylo provedeno kontrolní měření koncentrace RNA z eluátu na NanoDropu pro vzorky vyizolované RNA.

2.1.3. Reverzní transkripce (RT-PCR)

Byla namíchána reakční směs pro každý vzorek (Dnase I, Amp Grade, 1 U/ μ l, 10x DNase I Reaction Buffer, RNase-free water, 100 ng RNA). Tyto směsi byly napipetovány do stripu a inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Následně byla deaktivována Dnase I přidávkem 25 mM EDTA. Vzorky směsí byly poté pomocí thermocykleru zahřívány na 65 °C po dobu 10 min. V mikrozkušavce byla namíchána směs nespecifických (random) primerů (10 μ M) s nukleotidy dNTP (10 mM). Směs spolu se vzorky byla po dobu 5 minut zahřívána v thermocykleru při teplotě 65°C. Následovalo ochlazení na ledu po dobu minimálně 1 min.

Poté byla připravena směs 5x first strand buffer, 0,1 M DTT, Protector RNase Inhibitor (40 U/ μ l) a SuperScript III Reverse transcriptase. Pomocí thermocykleru proběhla reverzní transkripce (inkubace 5 min při 25 °C, RT-PCR 60 min při 50 °C, inaktivace 15 min při 70 °C). Vzorky cDNA byly dále uchovány v -20 °C pro další použití.

2.1.4. Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Pro každý studovaný gen byl v 96-ti jamkovém panelu připraven premix (2x LightCycler 480 Probes Master Mix, RNase-free water, 10 μ M próby a 10 μ M fv, rv primery), celkový objem tohoto premixu v každé jamce byl 18 μ l. Následně byla přidána cDNA (1 μ l /1 jamka). Panel byl stočen (2 min, 1200 RPM) a pomocí LightCycleru byla provedena qPCR pro vzorky z buněčné suspenze linie CRW22rv1 (o počtu buněk 100 000) a směsi linií DU-145 (90 000 buněk) s VCaP (10 000 buněk) za sledování exprese genů AR, AR-V7 a PTEN, včetně negativních i pozitivních kontrol.

2.2 Pacientské vzorky

Plná krev od pacientů (N=35) s karcinomem prostaty použitá v experimentální část diplomové práce byla odebrána na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Studii schválila Etická komise FN a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Písemný informovaný souhlas byl získán od všech jednotlivých účastníků pro měření nádorových markerů a pro anonymní analýzu dat v této studii.

2.3 Zpracování krevní plazmy

Vzorky krve pacientů byly stočeny (20 min, při 908 RPM, 25 °C), čímž byla získána plazma bohatá na krevní destičky. Plazma byla následně rozdělena do dvou zkumavek. První polovina plazmy byla opětovně stočena (20 min, 3210 RPM, 25 °C), čímž došlo k sedimentaci destiček a byla tedy získána plazma bez destiček. Následně byly vytvořeny alikvoty po 1000 µl z obou typů plazmy (s destičkami i bez) a uchovány při teplotě -80 °C. Zbýlý pelet byl promyt v PBS a přepipetován do mikrozkušavky a následně stočen (10 min, 3200 RPM, 25 °C). Supernatant byl odpipetován a pelet obsahující krevní destičky byl zamražen (-80 °C).

2.4 Izolace CTC buněk pomocí CD45 deplece

Ze vzorku pacientské krve byly odebrány 4 ml a přeneseny do 10ml zkumavky. Následně byl přidán RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies) ke vzorku krve (50 µl/ml vzorku), vzorek byl propipetován a inkubován 20 min při pokojové teplotě. Vzorek byl poté naředěn přidáním 4 ml PBS + 2% FBS a propipetován. Do 14ml zkumavky byly napipetovány 4 ml Lymphoprep média. Následovalo opatrné přenesení vzorku krve po 1 ml do zkumavky s Lymphoprep médiem, aniž by došlo k jejich promíchání. Následovala centrifugace vzorku (20 min, 2871 RPM, 25 °C s vypnutou brzdou). Z vrstvy vzniklé na rozhraní plazmy a média byly pomocí automatické pipety odpipetovány CTC buňky do nové 14ml zkumavky. Objem zkumavky byl doplněn PBS + 2% FBS a CTC buňky tak byly promyty. Následovalo stočení vzorku

(10 min, 1435 RPM, 25 °C). Následně bylo ke vzorku přidáno 350 µl RLT pufru s 3,5 µl β-merkaptetanolu a byla provedena lýza buněk. Vzorky byly zamraženy při -80°C.

2.5 Izolace RNA z CTCs

Zlyzované CTC buňky získané z krve pacientů pomocí CD45 deplece byly zvortexovány a bylo přidáno 2 µl RNA spike I (pro kontrolu výtěžnosti) a 5 µl dvakrát zředěného RNA carrier (ředění: 5 µl zásobního roztoku RNA carrier + 34 µl RLT pufru, následně 6 µl zředěného roztoku + 54 µl RLT pufru). Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí AllPrep DNA/RNA Micro kitu (QIAGEN). Každý vzorek byl přenesen na AllPrep DNA spin column a zcentrifugován (30 s, 10 000 RPM). Byla získána kolona se zachycenou DNA a eluát obsahující RNA.

K eluátu obsahujícímu RNA bylo přidáno 350 µl 70% etanolu a propipetováno. Vzorek byl dále přenesen na RNeasy MinElute spin column a stočen (30 s, 10 000 RPM). Na kolonku bylo nanášeno 700 µl RW1 pufru, vzorek byl stočen (30 s, 10 000 RPM). Následovalo přidání 500 µl RPE pufru k eluátu, centrifugace (30 s, 10 000 RPM), přidání 500 µl 80% etanolu a znovu centrifugace (2 min, 10 000 RPM). Kolonka byla následně přenesena do nové mikrozkušavky (2 ml) a s otevřeným víčkem vysušena centrifugací (5 min, 14 000 RPM). Pro eluci byla kolonka přenesena do LoBind mikrozkušavky (1,5 ml) a na střed kolony bylo nanášeno 14 µl RNase-free water s následnou centrifugací (1 min, 14 000 RPM). K eluátu obsahující RNA bylo připipetováno 2 µl RNA spike II pro kontrolu inhibice při následné qPCR. Vzorky byly skladovány při -80 °C.

Z kolony obsahující DNA byla pomocí AllPrep kitu vyizolována DNA a vzorky byly uchovány (zamraženy při -80 °C) pro pozdější použití.

2.6 Izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy

Pro izolaci ccfDNA/RNA z krevní plazmy pacientů byl použit QIAamp ccfDNA/RNA kit (QIAGEN). Ke vzorkům krevní plazmy pacientů (2 ml) byl přidán RNA spike I (1µl/1ml). Byl přidán RPL pufr (300 µl/1 ml) a vzorky byly zvortexovány (>5 s). Následovala inkubace (pokojová teplota, 3 min). Po přidání RPP pufru (100 µl /1 ml) opět následovalo promíchání vortexem (>20 s)

a inkubace (3 min, na ledu). Poté byl vzorek stočen 3 min při 11 300 RPM. Následně byl přidán 1 objem vychlazeného isopropanolu a promíchán vortexem. Vzorek byl přenesen na RNeasy Midi spin column a zcentrifugován (1 min, 7300 RPM). Po přidání RWT pufru (4 ml) na kolonu opět následovala centrifugace (1 min, 7300 RPM) a promývání bylo zakončeno přidáním RPE pufru (2,5 ml) na kolonu a stočením (5 min, 7300 RPM). Kolona byla následně přenesena do nové zkumavky (15 ml) a na střed kolony bylo přidáno 200 μ l RNase-free water. Po inkubaci (1 min, pokojová teplota) proběhla eluce vzorku (1 min, 7300 RPM).

Pro přečištění (CleanUp) vzorku následovaly tyto kroky: přidání 200 μ l RPL pufru k 200 μ l eluátu, přidání 800 μ l 100% etanolu, propipetování a nanesení vzorku na RNeasy MinElute spin column. Dále pak proběhla centrifugace (30 s, 9200 RPM), přidání RPE pufru (500 μ l) na kolonu a stočení (30 s, 9200 RPM), přidání 80% etanolu (500 μ l) na kolonu a centrifugace (30 s, 9200 RPM). Následně byla kolona přenesena do nové mikrozukavky (2 ml) a opět zcentrifugována (5 min, 14 000 RPM). Kolona pak byla vložena do LoBind mikrozukavky (1,5 ml) a na střed kolony bylo naneseo 20 μ l RNase-free water. Po inkubaci (1 min, pokojová teplota) proběhla centrifugace (1 min, 14 000 RPM) a k eluátu obsahujícímu ccfDNA/RNA bylo přidáno 2 μ l RNA spike II. Vzorky byly skladovány při -80 °C.

2.7 Analýza exprese zájmových genů z CTCs a ccfDNA/RNA

Z RNA získané izolací z CTCs a z ccfDNA/RNA získané z krevní plazmy pacientů s pokročilým karcinomem prostaty byla provedena reverzní transkripce s náhodnými (random) nebo specifickými primery (směs rv primerů testovaných genů o celkové koncentraci 10 μ M) s následnou qPCR stejnými postupy, které byly použity při ověřování funkčnosti primerů na buněčných liniích v kapitole 2.1. Při tomto experimentu byla sledována exprese vybraných genů, konkrétně AMACR, AR, AR-V7, CD45, EpCAM, PCA3, PSA, PTEN, TBP a T-ERG.

2.8 Statistické zpracování dat

Ke statistickému zpracování dat byl použit program Statistica 12 (Mann–Whitney test, Spearmanova korelace a Pearson's chi-squared test).

3. VÝSLEDKY

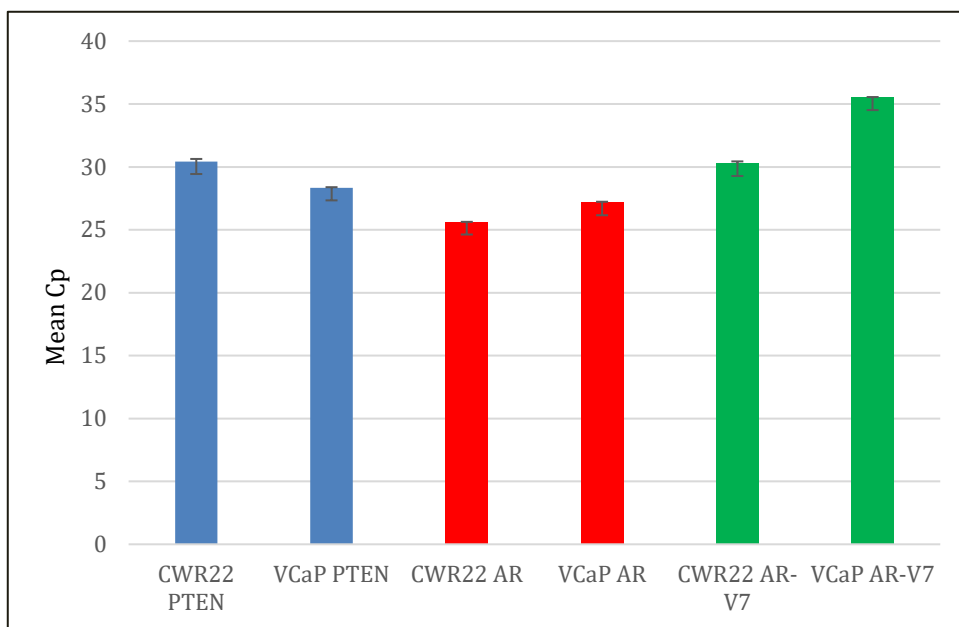
V experimentální části diplomové práce byla provedena optimalizace vyšetřovací metody a následně byly analyzovány krevní vzorky od 35 pacientů s pokročilým karcinomem prostaty, jejichž klinické informace jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Charakteristika souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.

POČET PACIENTŮ	
Celkem	35
Věk	
< 65 let	12
65 - 70 let	14
> 70 let	9
PSA v době diagnózy (ng/ml)	
0 - 2,5	0
2,5 - 10	14
> 10	19
neznámo	2
Klasifikace TNM v době diagnózy	
T2 N0 M0	9
T2-3 N0 M0	9
T4 N0 M0	2
T2-4 N1 M0-1	14
neznámo	1
Gleason skóre	
< 7 (nízké)	4
7	10
> 7 (vysoké)	21
Přežití od stanovení diagnózy	
< 1 rok	0
1 - 5 let	9
6 - 10 let	15
> 10 let	11

3.1 Ověření primerů pro geny AR, AR-V7 a PTEN

Nejprve byla potvrzena funkčnost primerů pro nově vyšetřované geny (AR, AR-V7 a PTEN) na buněčných liniích CWR22rv1 a směs linií DU-145 a VCaP odvozených od pokročilého karcinomu prostaty pomocí RT-qPCR (viz. Obr. 10).

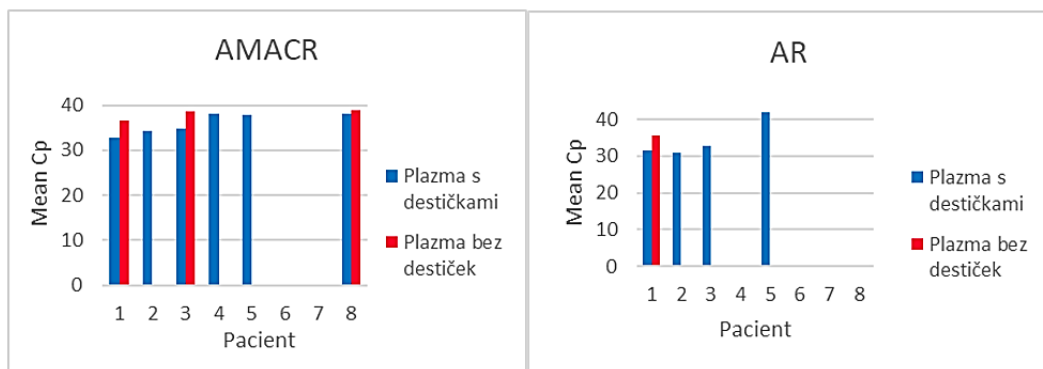


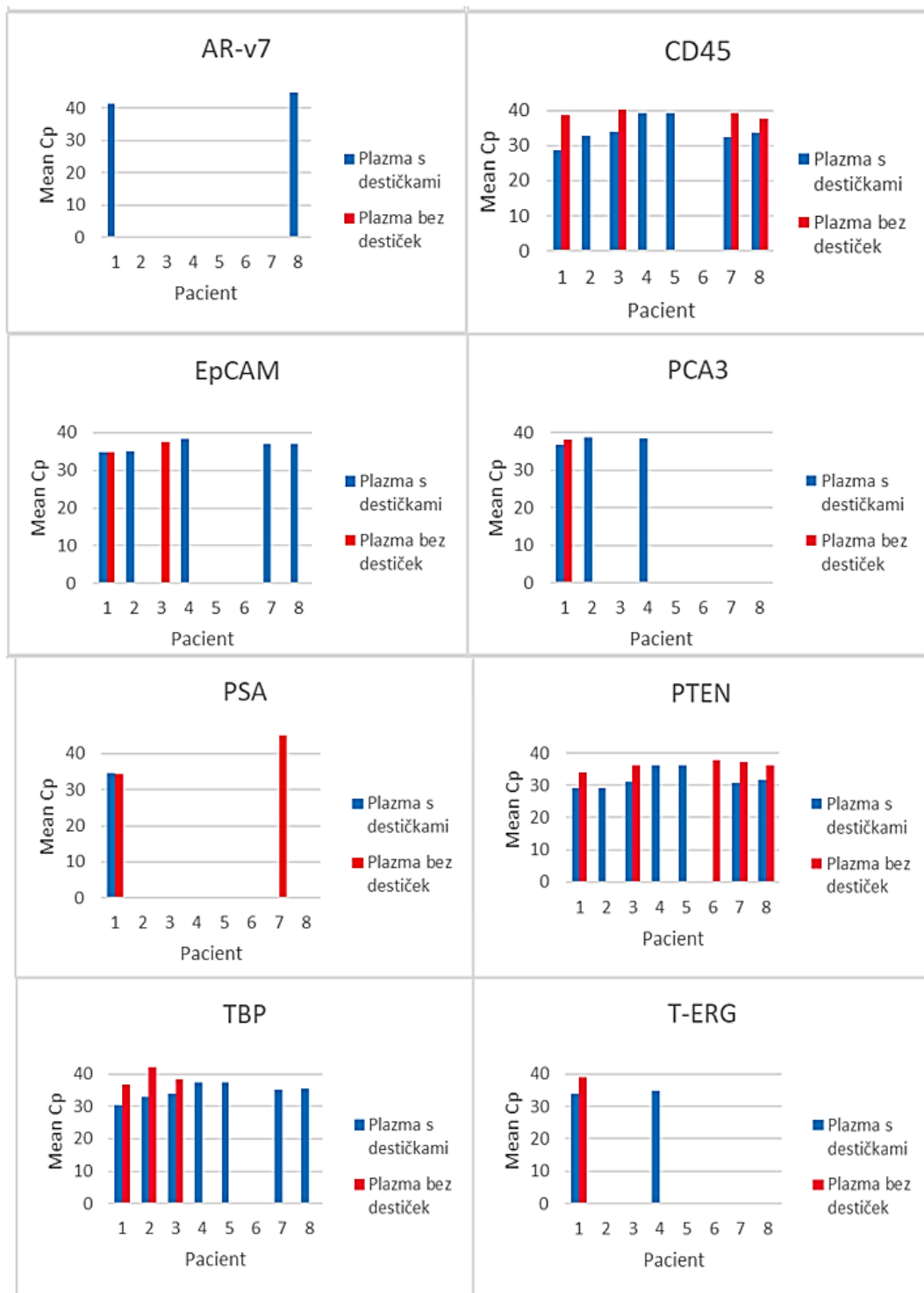
Obr. 10: Ověření funkčnosti specifických primerů pro geny PTEN, AR a AR-V7 na buněčných liniích CWR22rv1 a VCaP.

Tyto linie byly vybrány jako kontrolní na základě toho, že exprimují testované geny (PTEN, AR, AR-V7). Z Obr. 10 je patrné, že specifické primery spolehlivě detekovaly všechny testované geny.

3.2 Porovnání plazmy s krevními destičkami a plazmy bez destiček

Ze vzorků krve osmi náhodně vybraných pacientů bylo provedeno srovnání exprese každého genu při použití plazmy s přítomností krevních destiček a plazmy bez destiček (viz Obr. 11).





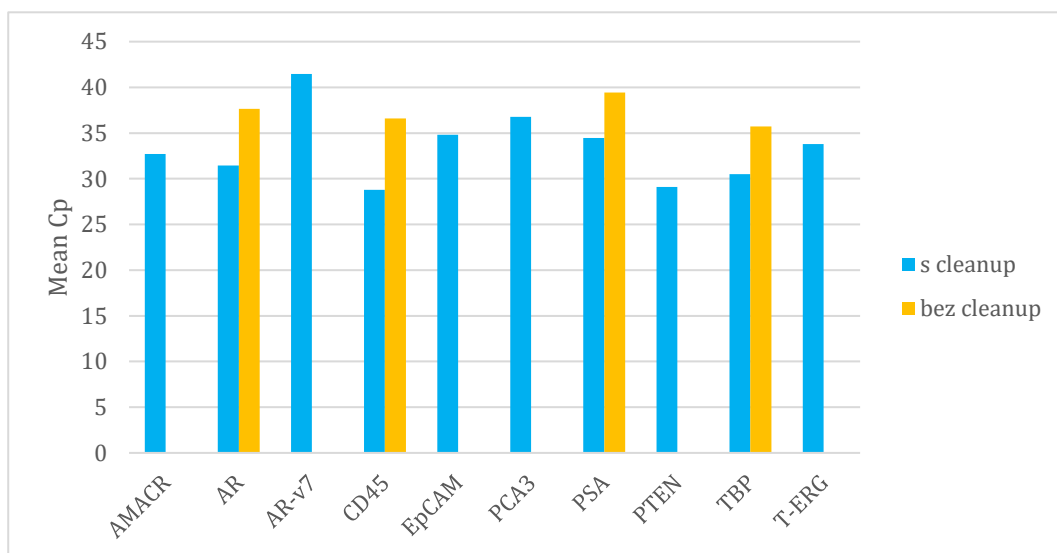
Obr. 11: Grafy znázorňující hodnoty Cp pro všechny zájmové geny při použití krevní plazmy s destičkami a bez destiček.

Jak je patrné z grafů (Obr. 11), u většiny pacientů byly výrazně lépe detekovány sledované geny v plazmě s přítomností krevních destiček ve srovnání s plazmou bez krevních destiček. Proto byly pro další experimenty dále použity pouze vzorky plazmy obsahující krevní destičky.

Pouze u genu PSA, který byl však detekován pouze u dvou pacientů z osmi, byla detekce účinnější při použití krevní plazmy bez destiček. U všech zbylých genů výrazně převažovala efektivita použití plazmy s destičkami.

3.3. Optimalizace metody izolace ccfDNA/RNA z krevní plazmy a porovnání citlivosti specifických a náhodných primerů

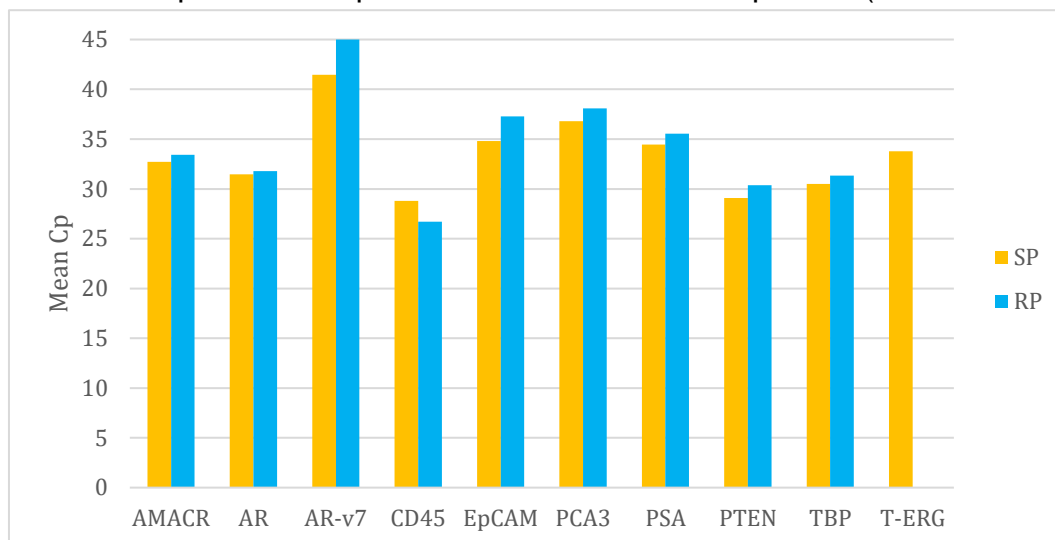
Ze vzorku krevní plazmy s destičkami náhodně vybraného pacienta byly provedeny srovnávací analýzy pro optimalizaci metody izolace volných nukleových kyselin z krevní plazmy pomocí kitu QIAamp ccfDNA/RNA kit (QIAGEN) a porovnání citlivosti specifických a náhodných (random) primerů použitých při reverzní transkripci. Mezi tyto analýzy patřilo srovnání výtěžnosti RT-qPCR (Cp hodnoty) z krevní plazmy s destičkami při provedení přečištění nukleových kyselin (CleanUp) a bez přečištění (bez CleanUp, viz Obr. 12) kvůli podezření na ztrátu materiálu při tomto kroku.



Obr. 12: Srovnání metody izolace nukleových kyselin z krevní plasmy s destičkami pomocí CleanUp (přečištění) a bez CleanUp.

Z Obr. 12 je patrné, že při použití přečišťovacího kroku „CleanUp“ byly detekovány všechny geny, zatímco při vynechání tohoto kroku byly detekovány pouze čtyři geny. Navíc u vzorků bez přečištění byly pozorovány vyšší hodnoty Cp a tudíž méně efektivní RT-qPCR.

Bylo rovněž provedeno porovnání výtěžnosti RT-qPCR při použití specifických a random primerů při reverzní transkripci (viz Obr. 13).



Obr. 13: Srovnání výtěžnosti qPCR při použití specifických (SP) a random (RP) primerů pro všechny zájmové geny.

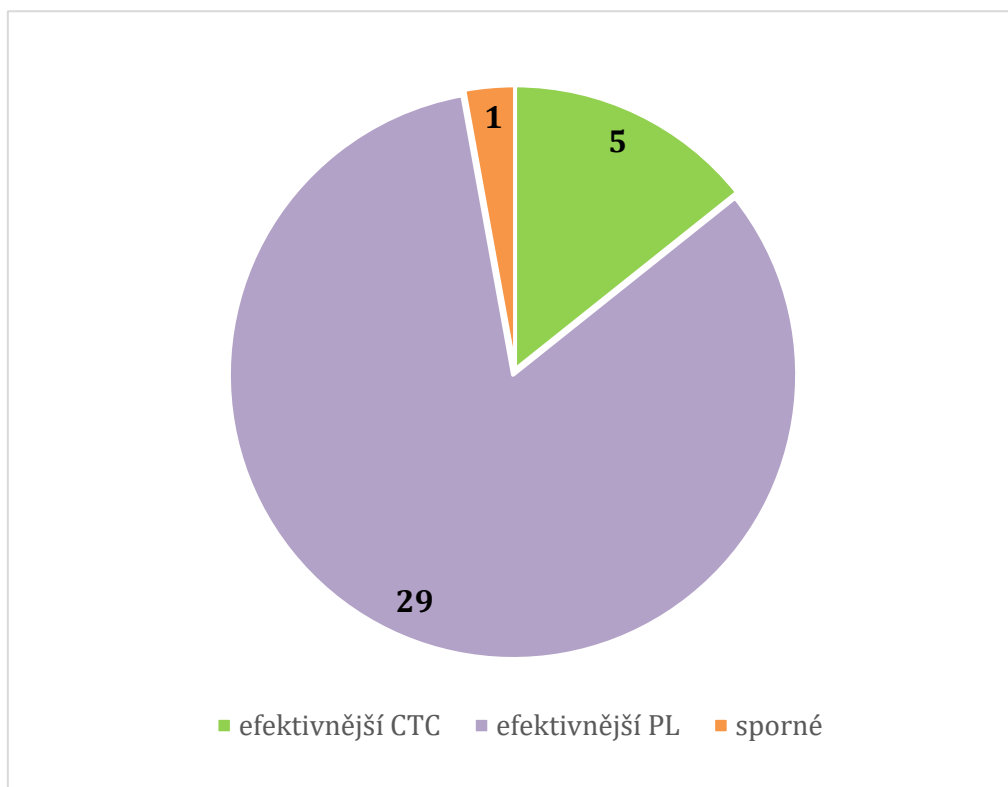
Při porovnání efektivity specifických a random primerů (viz Obr. 13) se ukázalo, že při použití specifických primerů byly u většiny genů zajištěny nižší hodnoty Cp, a tudíž časnější detekce jejich exprese. Opačně tomu bylo pouze u genu CD45, který byl použit jako marker abundantních leukocytů. U genu TMPRSS2-ERG nebyla při použití random primerů zaznamenána dokonce žádná exprese. Použití specifických primerů tedy vykazovalo vyšší specifitu i senzitivitu metody.

Při těchto srovnávacích analýzách bylo zjištěno, že je výhodnější provést po izolaci nukleových kyselin jejich přečištění (CleanUp) a pro reverzní transkripci použít specifické primery.

3.4. Srovnání exprese zájmových genů z CTCs a plazmy

Dále byla provedena qPCR analýza všech 35 pacientů, kdy byla sledována exprese zájmových genů z volné cirkulující ccfDNA/RNA v krevní plazmě s destičkami a paralelně také z RNA izolované z cirkulujících nádorových buněk (CTC), které byly získány po tzv. CD45 depleci (viz kapitola 2.4). Celkem se jednalo o více než 1400 RT-qPCR reakcí.

Při porovnání vzorků ccfDNA/RNA a CTC byl pozorován mnohem vyšší záchyt exprese sledovaných genů u metody izolace volných nukleových kyselin (viz Obr. 14).



Obr. 14.: Porovnání záchytu exprese vybraných genů při qPCR analýze RNA z CTCs a ccfDNA/RNA z krevní plazmy (PL) s destičkami od 35 pacientů na základě vyššího počtu detekovaných genů a jejich vyšší exprese (= nižší hodnoty Cp). Číslo uvádí počet pacientů.

Proto byly pro následné statistické vyhodnocení (viz kapitola 3.6 níže) použity pouze výsledky z analýz ccfDNA/RNA z plazmy s krevními destičkami.

3.5. Exprese zájmových genů a význam externích kontrol

U sledovaných zájmových genů byla prokázána různá úspěšnost záchytu jejich exprese z ccfDNA/RNA z krevní plazmy s destičkami (viz Tab. 2)

Tab. 2: Úspěšnost detekce zájmových genů ve vzorcích z krevní plazmy s destičkami.

sledovaný gen	pacienti	pozitivní exprese (%)
AMACR	32	91,43
AR	15	42,86
AR-V7	11	31,43
CD45	34	97,14
EpCAM	29	82,86
PCA3	23	65,71

PSA	6	17,14
PTEN	33	94,29
TBP	35	100,00
TMPRSS2 -ERG	5	14,29

Z uvedené tabulky 2 vyplývá, že největší záchyt exprese vykazovaly geny AMACR, CD45, EpCAM, PTEN a TBP. Menší, než očekávaný záchyt byl naopak potvrzen u genů AR, AR-V7, PCA3, PSA a TMPRSS2-ERG.

S ohledem na lepší standardizaci vyšetření byly použity také externí kontroly (viz kapitola 2.6.) pro monitorování izolace RNA (tzv. spike I) a přítomnosti inhibitorů RT-qPCR (tzv. spike II). Na základě těchto kontrol bylo ze statistického zpracování vyřazeno 7 pacientů z celkových 35. Dva pacienti, kteří neprošli kontrolou kvality podle externích kontrol, avšak měli pozitivní geny AR či TMPRSS2-ERG byli zahrnuti do vybraných statistických analýz.

3.6 Vzájemná korelace zájmových genů

Finálně bylo provedeno statistické vyhodnocení získaných RT-qPCR dat z krevní plazmy s destičkami.

V prvním kroku byla statisticky vyhodnocena Spearmanova korelace mezi vybranými parametry (viz Tab. 3.)

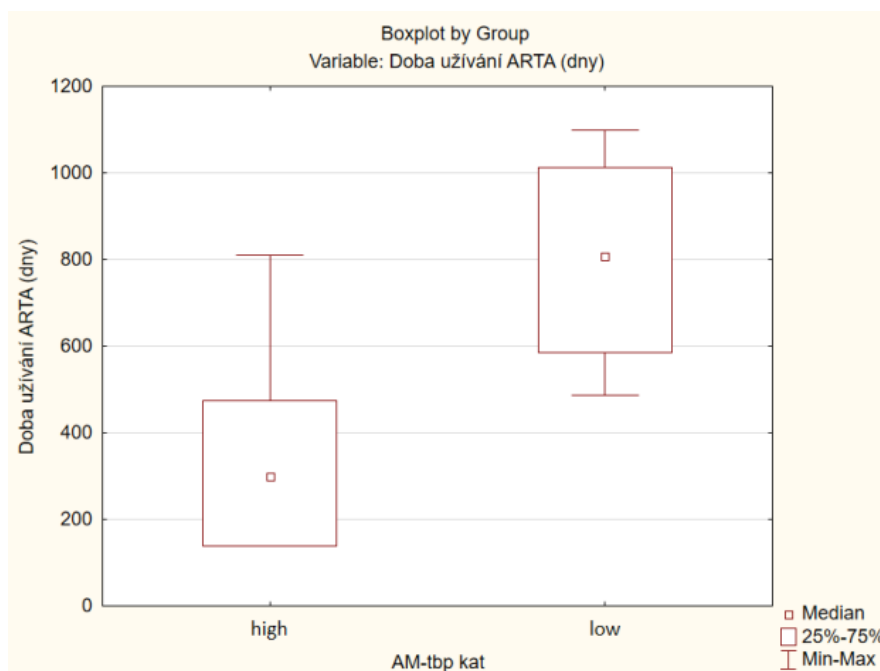
Byla zjištěna silná korelace (R_s 0,92) mezi expresí genů TBP a CD45. Zajímavá silná korelace (R_s 0,74) byla pozorována mezi expresí genů AMACR a EpCAM. Podobně silná korelace (R_s 0,75) byla nalezena mezi geny PTEN a TBP. Byla sice nalezena i silná korelace mezi AR-V7 a PSA (R_s 0,88), ale zde se zřejmě jedná o artefakt. Vyšší hodnoty C_p znamenají nižší expresi AR-V7, přičemž byla detekována pouze u 11 vzorků.

Tab. 3: Spearmanova korelace jednotlivých genů. Důležitá je zde signifikantní korelace mezi expresí genů AMACR a EpCAM, rovněž mezi PTEN a TBP.

Proměnná	Spearmanovy korelace (souhrn PL+CTC). ChD vynechány párově. Označ. korelace jsou významné na hl. $p < .05000$.												
	PSA ze dne doručeno	LDH ze dne doručeno	AMACR	AR	AR-v7	CD45	EpCAM	PCA3	PSA	PTEN	TBP	Spike I	Spike II
PSA ze dne doručeno	1,000000	0,199435	0,124348	0,43956	0,883333	0,153913	0,215038	-0,012281	0,14286	0,104743	0,150435	-0,005082	-0,043491
LDH ze dne doručeno	0,199435	1,000000	0,139891	0,11559	0,393939	0,095897	0,177577	-0,031593	-0,02857	0,010169	0,027682	-0,169300	-0,163718
AMACR	0,124348	0,139891	1,000000	-0,15604	0,139394	0,613675	0,742518	0,509774	0,65714	0,750769	0,773675	0,455534	0,444884
AR	0,439560	0,115587	-0,156044	1,000000	0,616667	0,472527	-0,087912	0,100000	-1,00000	0,285714	0,314286	0,263636	0,363636
AR-v7	0,883333	0,393939	0,139394	0,616667	1,000000	0,612121	0,212121	0,166667		0,357576	0,345455	-0,071429	-0,071429
CD45	0,153913	0,095897	0,613675	0,47253	0,612121	1,000000	0,481649	0,633083	0,20000	0,630769	0,922735	0,632411	0,481958
EpCAM	0,215038	0,177577	0,742518	-0,08791	0,212121	0,481649	1,000000	0,301471	0,80000	0,606494	0,662338	0,264912	0,185250
PCA3	-0,012281	-0,031593	0,509774	0,10000	0,166667	0,633083	0,301471	1,000000	-0,14286	0,447368	0,554887	0,267157	0,496628
PSA	0,142857	-0,028571	0,657143	-1,00000		0,200000	0,800000	-0,142857	1,00000	0,600000	0,257143	-0,100000	-0,200000
PTEN	0,104743	0,010169	0,750769	0,28571	0,357576	0,630769	0,606494	0,447368	0,60000	1,000000	0,753846	0,457933	0,556497
TBP	0,150435	0,027682	0,773675	0,31429	0,345455	0,922735	0,662338	0,554887	0,25714	0,753846	1,000000	0,648221	0,477509
Spike I	-0,005082	-0,169300	0,455534	0,26364	-0,071429	0,632411	0,264912	0,267157	-0,10000	0,457933	0,648221	1,000000	0,729610
Spike II	-0,043491	-0,163718	0,444884	0,36364	-0,071429	0,481958	0,185250	0,496628	-0,20000	0,556497	0,477509	0,729610	1,000000

3.7 Vztah zájmových genů ke klinicky významným parametrům

Dále byl zjištěn vztah mezi expresí AMACR, která byla normalizována podle hladin TBP (pacienti rozděleni do kategorií AMACR/TBP high – vysoká exprese a low – nízká exprese) a dobou užívání ARTA terapie, tzn. užívání abirateronu či enzalutamidu (viz Obr. 15).



Obr. 15: Vyšší exprese genu AMACR (normalizovaného na TBP) souvisí s kratší dobou užívání ARTA ($p=0.024$). Krabicové grafy představují medián, 25 %-75 % percentil a rozsah hodnot.

Z Obr. 15 je patrné, že pacienti s vyšší expresí AMACR užívali ARTA terapii signifikantně kratší čas než pacienti s nižší expresí genu AMACR ($p=0.024$).

Významná data týkající se genu AMACR byla nalezena také ve vztahu k celkovému přežití (viz Tab. 4).

Tab. 4: Pacienti s vyšší expresí genu AMACR (kat. „high“ normalizovaná na gen TBP) vykazovali vyšší úmrtnost než pacienti s nízkou expresí AMACR ($p=0,011$).

Úmrtí (0/1)	2 – Way Summary Table: Observed Frequencies		
	AM-TBP kat high	AM-TBP kat low	celkem
0	6	12	18
1	7	1	8
Celkem	13	13	26

Ze statistického vyhodnocení se jako zajímavý ukázal rovněž gen EpCAM, jehož vyšší exprese byla spojena s pokročilejším stadiem onemocnění v době kastrace (Tab. 5, $p=0,010$) avšak nikoli v době nasazení ARTA terapie (Tab. 6, $p=0,51$). Expresa EpCAM rovněž korelovala s hladinou laktátdehydrogenázy (LDH) při zahájení ARTA ($R_s 0,496$).

Tab. 5: Vyšší exprese EpCAM (při normalizaci na TBP) byla spojena s pokročilejším onemocněním v době kastrace ($p=0,010$). High volume (1) = přítomnost viscerálních metastáz nebo ≥ 4 kostních metastáz s ≥ 1 lézí mimo pánev a vertebraální tělíska.

High volume (1) vs. Low volume (0) (v době kastrace)	2-Way Summary Table: Observed Frequencies		
	Ep_cat_low_ep	Ep_cat_high_ep	celkem
0	9	3	12
1	2	8	10
Celkem	11	11	22

Tab. 6: Expresa EpCAM nesouvisí s rozsahem onemocnění v době nasazení ARTA terapie ($p=0,50989$).

High volume (0/1) vs. Low volume (v době nasazení ARTA)	2-Way Summary Table: Observed Frequencies		
	Ep_cat_low_ep	Ep_cat_high_ep	celkem
0	2	3	5
1	8	6	14
Celkem	10	9	19

Pro další sledované geny, PCA3, PSA, TMPRSS2-ERG, CD45, PTEN, androgenní receptor ani jeho sestřihovou variantu 7 nebyly pozorovány signifikantní vztahy s klinicky významnými parametry.

V rámci statistické analýzy klinických parametrů (Tab. 7) bylo zjištěno, že vstupní PSA (iPSA) silně koreluje s PSA po kastraci (R_s 0.749), s LDH při zahájení ARTA (R_s 0.744) a především negativně s dobou užívání ARTA (R_s -0.897).

Tab. 7: Signifikantní korelace iPSA s PSA po kastraci, s LDH při zahájení ARTA terapie a s dobou užívání ARTA terapie.

	Spearman Rank Order Correlations (souhrn PL+CTC stat II)MD pairwise deletedMarked correlations are significant at p <.05000										
	PSA ze dne doručeno	LDH ze dne doručeno	iPSA	Věk v době dg.	Doba od kastrace do rozvoje kastroační rezistence (dny)	PSA nadir (po kastraci)	PSA (při zahájení ARTA)	LDH (při zahájení ARTA)	ALP (při zahájení ARTA)	Doba užívání ARTA (dny)	Věk v době zahájení ARTA
PSA ze dne doručeno	1,000000	0,278817	0,466087	0,216410	-0,315217	0,529685	0,576522	0,051899	0,485380	-0,533031	0,097826
LDH ze dne doručeno	0,278817	1,000000	0,173505	0,253174	-0,294832	0,285714	0,393220	0,390522	0,298833	-0,359910	0,056512
iPSA	0,466087	0,173505	1,000000	0,102222	-0,454545	0,748574	0,477273	0,743635	0,309139	-0,897497	-0,140599
Věk v době dg.	0,216410	0,253174	0,102222	1,000000	-0,183077	0,243089	0,319231	0,019493	0,230509	0,185640	0,776522
Doba od kastrace do rozvoje kastroační rezistence (dny)	-0,315217	-0,294832	-0,454545	-0,183077	1,000000	-0,622517	-0,504941	-0,214447	-0,110461	0,304729	0,275692
PSA nadir (po kastraci)	0,529685	0,285714	0,748574	0,243089	-0,622517	1,000000	0,660944	0,489526	-0,006608	-0,778249	-0,111847
PSA (při zahájení ARTA)	0,576522	0,393220	0,477273	0,319231	-0,504941	0,660944	1,000000	0,213125	0,205650	-0,521892	0,093913
LDH (při zahájení ARTA)	0,051899	0,390522	0,743635	0,019493	-0,214447	0,489526	0,213125	1,000000	0,380364	-0,728311	-0,155296
ALP (při zahájení ARTA)	0,485380	0,298833	0,309139	0,230509	-0,110461	-0,006608	0,205650	0,380364	1,000000	-0,255126	0,016949
Doba užívání ARTA (dny)	-0,533031	-0,359910	-0,897497	0,185640	0,304729	-0,778249	-0,521892	-0,728311	-0,255126	1,000000	0,171629
Věk v době zahájení ARTA	0,097826	0,056512	-0,140599	0,776522	0,275692	-0,111847	0,093913	-0,155296	0,016949	0,171629	1,000000

4. DISKUZE

V této diplomové práci byla provedena celá řada srovnávacích testů pro optimalizaci vyšetřovací metody pro cirkulující biomarkery.

Nejprve byla provedena kontrolní RT-qPCR pro ověření funkčnosti primerů pro nově analyzované geny AR, AR-V7 a PTEN na buněčných liniích CWR22rv1 a směs linií DU-145 a VCaP odvozených od pokročilého karcinomu prostaty. Tato pilotní analýza dle očekávání potvrdila, že použité primery jsou schopny detekovat zájmové geny.

Dále bylo testováno, zda je z hlediska výtěžnosti výhodnější použít pro izolaci cfDNA/RNA krevní plazmu s či bez destiček. Samoila *et al.*, 2020 uvádí, že se cfDNA/RNA v krevní plazmě nachází ve velmi nízké koncentraci, a je tedy před extrakcí nutné odstranit zbylé buněčné elementy (včetně krevních destiček), neboť ty mohou obohatit vzorek o wild-type genomickou DNA/RNA a tímto zhoršit senzitivitu metody pro záchyt mutací související s karcinomem. V této diplomové práci však bylo jasně prokázáno, že použití krevní plazmy s destičkami bylo efektivnější, co se týče detekce zkoumaných genů. Možným vysvětlením může být, že při centrifugaci, která se používá k odseparování krevních destiček z plazmy, může docházet k poškození křehkých fragmentů cfDNA/RNA.

V rámci optimalizace protokolu byla také porovnána výtěžnost metody při použití random či specifických primerů při reverzní transkripci. Jak potvrdili i Morel and Raccurt, 2002, specifické primery obecně vykazují tu nejvyšší možnou specifitu pro detekci hledaného genu, což bylo jednoznačně potvrzeno i v této diplomové práci.

Dále bylo kontrolováno, zda krok zahrnující přečištění získaného materiálu v průběhu izolace cfDNA/RNA z krevní plazmy s destičkami nezpůsobil ztrátu materiálu, což byla původní obava. Kontrolní RT-qPCR ale ukázalo, že krok přečištění výtěžnost naopak zvyšuje.

Následně byl analyzován pilotní soubor 35 pacientů s pokročilým karcinomem prostaty. Jak uvádí Bettgowda *et al.*, 2014, mnoho studií již prokázalo, že při pokročilých neoplaziích jsou v tělních tekutinách pacientů přítomny ctDNA/RNA i CTCs. Dodnes však pouze málo studií věnovalo pozornost srovnání množství ctDNA/RNA a CTCs ve vzorcích stejných pacientů. Navíc, studie, ve kterých bylo toto srovnání provedeno (viz dále v textu), došly k různým závěrům, zřejmě kvůli omezením použitých metod. Nicméně,

Bettegowda *et al.*, 2014 ve své studii rovněž porovnávali množství ctDNA a CTCs v krvi stejných pacientů pomocí nezávislých objektivních postupů. V jejich studii nebyl nalezen žádný pacient, u kterého by detekovali CTCs, ale nedetekovali ctDNA. Naopak, v 81 % případů, kdy detekovali ctDNA, nebyly u stejného pacienta detekovány CTCs. V jediných třech případech, kdy byly detekovány CTCs i ctDNA, bylo průměrné množství mutačních fragmentů v plazmě více než 50krát vyšší než počet CTCs (což je ale vzhledem k jejich obecně nízkému počtu v cirkulaci očekáváno). Předchozí studie ale zveřejnily zcela různé výsledky. Např. Maheswaran *et al.*, 2008, zabývající se karcinomem plic, kteří použili nejmodernější metody k detekci CTCs, ale nepoužili vysoce citlivé techniky k detekci ctDNA, zveřejnili závěr, že ctDNA byla detekována méně často než CTCs. Naopak, Dawson *et al.*, 2013, zkoumající karcinom prsu došli k závěru, že ctDNA byla detekována daleko častěji než CTCs za použití citlivých metod pro analýzu ctDNA ale relativně málo citlivých metod pro analýzu CTCs. V této diplomové práci se jako jednoznačně efektivnější (u > 85 % pacientů) ukázala analýza ctDNA oproti CTCs. Důvodem může být spousta vnějších vlivů, například velmi nízký počet CTCs běžně se vyskytující v krvi pacientů a s tím související potřeba vyvinutí citlivějších metod pro jejich záchyt.

Pro gen PCA3, Bussemakers *et al.* již v roce 1999 potvrdili, že 53 z 56 patientských vzorků tkáně karcinomu prostaty vykazovaly 10 – 100x vyšší hladiny exprese PCA3 oproti normálním prostatickým tkáním. Wei *et al.* v roce 2014 došel k závěru, že stanovování hladiny PCA3 přispívá k nižšímu počtu podceněných rizikových KP diagnostikovaných z prvotních biopsií. Další studie, Auprich *et al.*, 2012 a Merola *et al.*, 2015, potvrdily, že analýza exprese PCA3 v diagnostice KP může být dokonce signifikantnější než stanovování celkového PSA i fPSA. Ačkoliv PCA3 zřejmě nenahradí PSA jako primární biomarker pro diagnostiku KP, kombinované stanovení obou by mohlo pomoci zvýšit specifitu diagnózy. V současnosti by hladina PCA3 mohla být nápomocná při zvažování opakované biopsie (Duffy, 2020). Nicméně, v této diplomové práci nebyl zjištěn žádný signifikantní vztah mezi expresí PCA3 a klinicky významnými daty, jež by potvrdzoval jeho možné využití v diagnostice, monitoringu stavu pacienta či dokonce predikci odpovědi na léčbu, podobně jako pro geny TMPRSS2-ERG, CD45 (marker leukocytů) a PTEN.

Romanel *et al.*, 2015 uvádí, že progrese CRPC souvisí se zmnožením počtu kopií AR či jeho mutacemi a domnívali se, že mutace v genu pro AR souvisely

s rezistencí k abirateronu skrze reaktivaci androgenní signalizace. V jejich studii analyzovali ctDNA z plazmy z opakovaně odebíraných vzorků krve pacientů s CRPC a pomocí NGS sekvenovali všechny regiony kódující AR před nasazením ARTA terapie, v průběhu léčby a po progresi onemocnění. Pozorovali existující souvislost mezi nárůstem počtu kopií AR (a s tím související vyšší expresí) a rezistencí k ARTA terapii. Antonarakis *et al.*, 2014 provedli studii zaměřenou na detekci AR-V7 z CTCs z krve pacientů s CRPC, kteří se chystali podstoupit ARTA terapii. Výsledky této studie potvrzují možnou souvislost mezi pozitivitou AR-V7 a rezistencí k ARTA terapii. Annala *et al.*, 2018 však zveřejnili pozorování, že většina pacientů, u kterých byla potvrzena pozitivní exprese AR-V7 současně vykazovali také vysokou expresi fyziologického AR a ojedinělá exprese AR-V7 bez positivity wtAR u pacientů s mCRPC je vzácná a nemá žádnou výpovědní hodnotu o možné reakci na ARTA terapii. Tento názor byl potvrzen také v této diplomové práci, kdy z už tak malého počtu AR-V7 pozitivních pacientů z ctDNA/RNA (n = 11) bylo AR pozitivních > 81 % pacientů. Ani v souvislosti s androgenním receptorem ani jeho sestřihovou variantou 7 a odpovědí na ARTA terapii nebyl potvrzen žádný klinicky významný vztah. Ačkoliv Büchler, Bobek a Kološtová v roce 2018 také potvrdili, že pacienti s pozitivní expresí AR-V7 vykazují menší pravděpodobnost odpovědi na ARTA terapii a odpověď na léčbu taxany není nijak snížena, Takeuchi *et al.* již v roce 2016 však zveřejnil práci, kde sice byl potvrzen vztah mezi vyšší expresí AR-V7 a přítomností metastáz v době diagnózy, avšak autoři rovněž poukazují na fakt, že AR-V7 je zřejmě exprimována také normálními hematopoetickými buňkami, což může překrývat skutečné projevy agresivity KP v krvi. V této studii zároveň nebyl potvrzen vztah mezi rezistencí k antiandrogenní terapii a expresí AR-V7 v krvi pacientů. Navíc potvrzují, že množství AR-V7 transkriptů v krvi je obvykle velmi malé a je vyžadováno mnoho cyklů amplifikace k potvrzení positivity exprese tohoto genu. I tento fakt může být důvodem, proč se v této diplomové práci tento gen nepodařilo efektivně detekovat a prokázat jeho korelaci s klinicky významnými parametry, především s rezistencí k abirateronu či enzalutamidu.

Pokud jde o gen AMACR, Arthi a Dhanalakshmi v roce 2019 zveřejnili studii, která potvrdila, že vysoká exprese genu AMACR úzce souvisí s KP, jelikož je detekována v téměř všech stádiích a rovněž u neléčených pacientů s hormonálně independentním KP. Tang *et al.*, 2006 ve své studii uvedli, že v *in vitro* experimentech provedených pomocí imunohistochemických metod korelovala

nižší hladina exprese AMACR s nižší proliferací buněk adenokarcinomu. Uvádí, že podobně jako androgeny, také AMACR podporuje růst buněk KP a zároveň androgeny podporují funkci genu AMACR stimulací akumulace lipidů. Exprese AMACR tedy do jisté míry pravděpodobně může být potlačena hormonální terapií. Zároveň tato studie ale neprokázala žádný vztah mezi hladinou exprese AMACR a efektem hormonální léčby na KP. Carnell *et al.*, 2013 zveřejnili závěry, že vysoká exprese AMACR začíná již brzy při onkogenezi a jeho hladina nadále roste souběžně s progresí tumoru, přestože některé studie tvrdí, že v pokročilých stádiích se jeho exprese naopak snižuje. Nicméně, ve výše zmíněné studii byla rovněž naznačena možná souvislost mezi androgenní senzitivitou tumoru a expresí AMACR a také to, že inhibice genu AMACR by mohla zvrátit fenotyp některých buněčných linií, které se staly androgen nezávislými. Potvrzení tohoto zjištění by potenciálně mohlo vést k souběžné léčbě inhibitory genu AMACR při antiandrogenní terapii u pacientů s CRPC. V této diplomové práci bylo zjištěno, že vyšší exprese genu AMACR (při normalizaci na TBP) korelovala s kratší dobou užívání ARTA terapie, tudíž užívání abirateronu nebo enzalutamidu. Tyto výsledky naznačují, že KP pacientů s vyšší expresí AMACR byl agresivnější a rychleji progredoval, což vyžadovalo ukončení ARTA terapie a nasazení další linie léčby. Rovněž bylo prokázáno, že pacienti s vyšší expresí AMACR vykazovali vyšší úmrtnost než pacienti s nižší expresí tohoto genu. Gen AMACR proto představuje nový potenciální cíl dalších výzkumů a terapií.

Také gen EpCAM vykazoval zajímavé souvislosti, například korelaci s AMACR. Trzpis *et al.*, 2007 zmiňují různé studie, podle nichž má vyšší exprese genu EpCAM zcela opačné významy pro prognózu onkologických pacientů. Spizzo *et al.*, 2006 a Spizzo *et al.*, 2004 totiž uvádí, že vyšší exprese genu EpCAM ve tkáni karcinomu je obecně spojována s nižším celkovým přežitím u karcinomu prsu a vaječníku. Naopak, dle Seligson, 2004, u pacientů s karcinomem ledvin souvisí exprese genu EpCAM s delší očekávanou dobou života. Co se týče karcinomu prostaty, Benko *et al.*, 2013 provedli analýzu 102 pacientů po radikální prostatektomii kvůli lokalizovanému KP. Imunohistochemickými metodami došli k závěru, že v maligní tkáni byla exprese EpCAM mnohonásobně vyšší oproti expresi v benigní tkáni. Navíc, vysoká exprese tohoto genu byla asociována s horší prognózou a vyšším Gleason skóre, zároveň také s kratší dobou přežití bez biochemického relapsu onemocnění. V této diplomové práci byla u KP potvrzena vyšší exprese genu EpCAM z ctDNA

při pokročilejších stádiích onemocnění (v době kastrace), podobně jako je tomu u karcinomu prsu či vaječníku. Tento vztah však nebyl pozorován v době nasazení ARTA terapie. Vzhledem k tomu, že krevní vzorky byly v tomto pilotním souboru odebrány pouze jedenkrát během roku 2018, je třeba zjištěná pozorování ověřit na větším souboru pacientů, a především v opakovaných odběrech před danou terapií, během ní a po ukončení. V pilotním souboru byly vzorky odebrány od pacientů v různě dlouhé době po kastraci (androgen deprivativní terapie). U některých pacientů již také probíhala ARTA terapie, ale u jiných byla nasazena až později. Větší soubor pacientů umožní také analýzu krevních biomarkerů také ve vztahu k chemoterapii docetaxelem, která z důvodu velmi malého počtu vzorků nebyla v této diplomové práci blíže popisována.

Dále byla zjištěna silná korelace mezi expresí genů TBP a CD45, jenž napovídá, že většina transkriptů pravděpodobně pochází z leukocytů, avšak nemá význam pro léčbu pacientů. Gen TBP rovněž silně koreloval s genem PTEN. Exprese nádorového supresoru PTEN bývá u pokročilého KP často snížena či úplně potlačena (Schmidt *et al.*, 2010; Rathinavelu a Levy, 2016), avšak v periferní krvi jsme toto snížení nepozorovali. Protein PTEN je exprimován i v normálních buňkách včetně leukocytů, což pravděpodobně vysvětluje pozorovanou korelaci.

V rámci diplomové práce byla provedena i analýza zavedených klinických parametrů. Zajímavým zjištěním je, že vstupní PSA z doby diagnózy (iPSA) silně korelovalo se sérovým PSA po kastraci, s LDH při zahájení ARTA terapie, a především negativně s dobou užívání ARTA terapie. I tato pozorování si zaslouží ověření na větším souboru pacientů.

5. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu exprese vybraných genů u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty za využití tekuté biopsie. Byly analyzovány krevní vzorky pacientů s KP (n=35), z nichž byly vyizolovány CTCs a cfDNA/RNA z krevní plazmy s destičkami a bez destiček, přičemž vyšší výtěžnost cfDNA/RNA vykazovalo použití krevní plazmy s destičkami. Při optimalizaci postupu byly rovněž porovnávány specifické a náhodné primery pro RT-qPCR, přičemž efektivní se ukázalo použití specifických primerů. Pomocí optimalizované metody byla vyšetřena exprese genů AMACR, AR, AR-V7, CD45, EpCAM, PCA3, PSA, PTEN, TBP a TMPRSS2-ERG.

Nejvyšší záchyt exprese těchto genů byl zjištěn při použití cfDNA/RNA z krevní plazmy s destičkami. Ze získaných dat byla provedena statistická analýza, do níž bylo po kontrole kvality dat zařazeno 26 vzorků. Pro geny PCA3, PSA, TMPRSS2-ERG, CD45, PTEN, androgenní receptor ani jeho sestřihovou variantu 7 nebyly pozorovány signifikantní vztahy s klinicky významnými parametry. Jako signifikantní a klinicky potenciálně významný se ukázal vztah mezi expresí genu AMACR a dobou užívání ARTA terapie. KP pacientů s vyšší expresí AMACR byl agresivnější a rychleji progredoval, což vyžadovalo ukončení ARTA terapie a nasazení další linie léčby. Rovněž vyšší exprese AMACR souvisela s vyšší úmrtností pacientů. Také gen EpCAM vykazoval zajímavá data. Jeho vyšší exprese byla spojena s pokročilejším stadiem onemocnění v době kastrace a také s hladinou laktátdehydrogenázy (LDH) při zahájení ARTA terapie. Význam genů EpCAM a AMACR je podpořen jejich vzájemnou korelací. Při analýze zavedených klinických parametrů bylo zjištěno, že vstupní PSA (iPSA) silně korelovalo s PSA po kastraci, s LDH při zahájení ARTA terapie, a především negativně s dobou užívání ARTA terapie.

Ačkoliv v této diplomové práci nebyl prokázán předpokládaný klinický význam androgenního receptoru a jeho sestřihové varianty 7 jako slibného biomarkeru pro monitoring stavu pacientů s pokročilým KP pomocí tekuté biopsie ani několika dalších genů, byla objevena zajímavá a klinicky významná data týkající se exprese genů AMACR a EpCAM, jež by v budoucnosti mohla být využita pro predikci odpovědi pacientů s pokročilým KP na terapii a prognózu jejich onemocnění.

6. Seznam citované literatury

1. Annala, M. *et al.* (2018) „Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer“, *Cancer Discovery*, 8(4), s. 444–457. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0937.
2. Antonarakis, E. S. *et al.* (2014) „AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer“, *New England Journal of Medicine*, 371(11), s. 1028–1038. doi: 10.1056/NEJMoa1315815.
3. Arthi, L. a Dhanalakshmi, A. (2019) „Expression of AMACR (α -Methylacyl CoA racemase) in Prostatic Lesion.“, *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*, 18(9), s. 43–47. doi: 10.9790/0853-1809114347.
4. Auprich, M. *et al.* (2012) „A comparative performance analysis of total prostate-specific antigen, percentage free prostate-specific antigen, prostate-specific antigen velocity and urinary prostate cancer gene 3 in the first, second and third repeat prostate biopsy“, *BJU International*, 109(11), s. 1627–1635. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10584.x.
5. Benko, G. *et al.* (2013) „Impact of the EpCAM expression on biochemical recurrence-free survival in clinically localized prostate cancer“, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(4), s. 468–474. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.03.007.
6. Bettegowda, C. *et al.* (2014) „Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies“, *Science Translational Medicine*, 6(224), s. 224ra24-224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
7. Büchler, T., Bobek, V. a Kološtová, K. (2018) „Testování varianty androgenového receptoru AR-V7 pro výběr pacientů s kastročně refrakterním metastazujícím karcinomem prostaty k léčbě novými hormonálními léky“, *Klinická Onkologie*, 31(1). doi: 10.14735/amko20189.
8. Bussemakers, M. J. G. *et al.* (1999) „DD3:A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer“, *Cancer Research*, 59(23), s. 5975 LP – 5979. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/23/5975.abstract>.
9. Čapák, I., Kocák, I. a Čoupek, P. (2004) „Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob“, in *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 169–183.
10. Čapoun, O. *et al.* (2015) „Nádory prostaty“, in *Urologie pro mediky*. 1. vydání.

Praha: Karolinum.

11. Carnell, A. J. *et al.* (2013) „Inhibition of Human α -Methylacyl CoA Racemase (AMACR): a Target for Prostate Cancer", *ChemMedChem*. doi: 10.1002/cmdc.201300179.
12. Cheung, A. H.-K., Chow, C. a To, K.-F. (2018) „Latest development of liquid biopsy.", *Journal of thoracic disease*. China, 10(Suppl 14), s. S1645–S1651. doi: 10.21037/jtd.2018.04.68.
13. Čihák, R. (2013) *Anatomie 2*. 3. vydání. Editoval M. Grim a R. Čihák. Grada Publishing, a.s.
14. Crawford, E. D. *et al.* (2018) „Androgen Receptor Targeted Treatments of Prostate Cancer: 35 Years of Progress with Antiandrogens.", *The Journal of urology*. United States, 200(5), s. 956–966. doi: 10.1016/j.juro.2018.04.083.
15. Crowley, E. *et al.* (2013) „Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), s. 472–484. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.
16. Dawson, S.-J. *et al.* (2013) „Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer", *New England Journal of Medicine*, 368(13), s. 1199–1209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261.
17. Dehm, S. M. a Tindall, D. J. (2011) „Alternatively spliced androgen receptor variants.", *Endocrine-related cancer*. England, 18(5), s. R183-96. doi: 10.1530/ERC-11-0141.
18. Duffy, M. J. (2020) „Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(3), s. 326–339. doi: 10.1515/cclm-2019-0693.
19. Dylevský, I. (2009) „Mužský pohlavní systém", in *Funkční anatomie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 365–372.
20. Evans, A. J. (2003) „Alpha-methylacyl CoA racemase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies.", *Journal of clinical pathology*. England, 56(12), s. 892–897. doi: 10.1136/jcp.56.12.892.
21. Fiala, P., Valenta, J. a Eberlová, L. (2015) *Stručná anatomie člověka*. 1. vydání. Praha: Karolinum.
22. Filipenský, P., Čapák, I. a Katolická, J. (2012) „Karcinom prostaty", in *Speciální onkologie*. Praha: Galén, s. 149–157.
23. Fujita, K. a Nonomura, N. (2018) „Urinary biomarkers of prostate cancer",

- International Journal of Urology*, 25(9), s. 770–779. doi: 10.1111/iju.13734.
24. Fujita, K. a Nonomura, N. (2019) „Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review.", *The world journal of men's health*. Korea (South), 37(3), s. 288–295. doi: 10.5534/wjmh.180040.
25. Heidegger, I., Brandt, M. P. a Heck, M. M. (2020) „Treatment of non-metastatic castration resistant prostate cancer in 2020: What is the best?", *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.11.007.
26. Hradec, T. a Capoun, O. (2018) „Efektivita a bezpecnost lecbu abirateron acetatem u pacientu s metastatickym kastracne rezistentnim karcinomem prostaty po chemoterapii", *Urology for Practice*, 19(2), s. 61–63. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-201802-0002.php>.
27. Keller, L., Werner, S. a Pantel, K. (2019) „Biology and clinical relevance of EpCAM", *Cell Stress*, 3(6), s. 165–180. doi: 10.15698/cst2019.06.188.
28. Komura, K. *et al.* (2018) „Current treatment strategies for advanced prostate cancer.", *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*. Australia, 25(3), s. 220–231. doi: 10.1111/iju.13512.
29. Krishnamurthy, N. *et al.* (2017) „Liquid Biopsies for Cancer: Coming to a Patient near You.", *Journal of clinical medicine*. Switzerland, 6(1). doi: 10.3390/jcm6010003.
30. Lang, J. M., Casavant, B. P. a Beebe, D. J. (2012) „Circulating tumor cells: getting more from less.", *Science translational medicine*. United States, 4(141), s. 141ps13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004261.
31. Lemos, A. E. G. *et al.* (2019) „The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer.", *Oncotarget*, 10(61), s. 6589–6603. doi: 10.18632/oncotarget.27284.
32. Li, Y., Wu, S. a Bai, F. (2018) „Molecular characterization of circulating tumor cells-from bench to bedside.", *Seminars in cell & developmental biology*. England, 75, s. 88–97. doi: 10.1016/j.semcd.2017.09.013.
33. Liberko, M. (2019) „Biologie nádorových onemocnění", in *Onkologie, Učební texty pro studenty 3. lékařské fakulty UK*. 2. Praha, s. 19–20. Dostupné z: https://www.lf3.cuni.cz/3LF-1478-version1-2019_soumarova_onkologie_978_80_87878_37.pdf.
34. Maheswaran, S. *et al.* (2008) „Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells", *New England Journal of Medicine*, 359(4), s. 366–377.

doi: 10.1056/NEJMoa0800668.

35. Martin, G. A., Chen, A. H. a Parikh, K. (2017) „A Novel Use of Olaparib for the Treatment of Metastatic Castration-Recurrent Prostate Cancer.", *Pharmacotherapy*. United States, 37(11), s. 1406–1414. doi: 10.1002/phar.2027.
36. Merola, R. *et al.* (2015) „PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: a National Cancer Institute experience", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1), s. 15. doi: 10.1186/s13046-015-0127-8.
37. Morel, G. a Raccurt, M. (2002) *PCR/RT-PCR in situ: Light and Electron Microscopy*. 1 edition. CRC Press.
38. Morrison, G. J. a Goldkorn, A. (2018) „Development and Application of Liquid Biopsies in Metastatic Prostate Cancer", *Current Oncology Reports*, 20(4), s. 35. doi: 10.1007/s11912-018-0683-0.
39. Ng, D. W. H., Felberg, J. a Johnson, P. (2000) „Determination of CD45 tyrosine phosphatase activity in T lymphocytes.", *Methods in molecular biology*, 134, s. 289–300. doi: 10.1385/1-59259-682-7:289.
40. Ni, X. *et al.* (2013) „Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), s. 21083–21088. doi: 10.1073/pnas.1320659110.
41. Palmirotta, R. *et al.* (2018) „Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology.", *Therapeutic advances in medical oncology*. England, 10, s. 1758835918794630. doi: 10.1177/1758835918794630.
42. Ploussard, G. a de la Taille, A. (2018) „The role of prostate cancer antigen 3 (PCA3) in prostate cancer detection", *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(10), s. 1013–1020. doi: 10.1080/14737140.2018.1502086.
43. Racek, J. (2006) „Klinická biochemie", in. Galén, s. 252.
44. Rathinavelu, A. a Levy, A. (2016) „Key Genes in Prostate Cancer Progression: Role of MDM2, PTEN, and TMPRSS2-ERG Fusions", in *Prostate Cancer - Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments*. InTech, s. 178–188. doi: 10.5772/64337.
45. Rice, M. A., Malhotra, S. V a Stoyanova, T. (2019) „Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer.", *Frontiers in oncology*. Switzerland, 9, s. 801. doi: 10.3389/fonc.2019.01801

- 10.3389/fonc.2019.00801.
46. Romanel, A. *et al.* (2015) „Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer", *Science Translational Medicine*, 7(312), s. 312re10-312re10. doi: 10.1126/scitranslmed.aac9511.
47. Samoila, A. *et al.* (2020) „Developing Quality Programs for Cell-Free DNA (cfDNA) Extraction from Peripheral Blood", *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. doi: 10.1093/jalm/jfaa050.
48. Scher, H. I. *et al.* (2018) „Assessment of the Validity of Nuclear-Localized Androgen Receptor Splice Variant 7 in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer", *JAMA Oncology*, 4(9), s. 1179. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.1621.
49. Schmidt, M. *et al.* (2010) „Molekulární vlastnosti klinicky signifikantního karcinomu prostaty", *Czech urology*, 14(3), s. 129–138. Dostupné z: <https://czechurol.cz/artkey/cur-201003-0002.php>.
50. Sciarra, A. *et al.* (2019) „Androgen receptor variant 7 (AR-V7) in sequencing therapeutic agents for castration resistant prostate cancer: A critical review.", *Medicine*. United States, 98(19), s. e15608. doi: 10.1097/MD.00000000000015608.
51. Seligson, D. B. (2004) „Epithelial Cell Adhesion Molecule (KSA) Expression: Pathobiology and Its Role as an Independent Predictor of Survival in Renal Cell Carcinoma", *Clinical Cancer Research*, 10(8), s. 2659–2669. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1132-03.
52. Song, C. *et al.* (2020) „Study on Interaction Between TATA-Box Binding Protein (TBP), TATA-Box and Multiprotein Bridging Factor 1(MBF1) in *Beauveria bassiana* by Graphene-Based Electrochemical Biosensors", *Frontiers in Chemistry*, 8. doi: 10.3389/fchem.2020.00278.
53. Spizzo, G. *et al.* (2004) „High Ep-CAM Expression is Associated with Poor Prognosis in Node-positive Breast Cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 86(3), s. 207–213. doi: 10.1023/B:BREA.0000036787.59816.01.
54. Spizzo, G. *et al.* (2006) „Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer", *Gynecologic Oncology*, 103(2), s. 483–488. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.03.035.
55. Takeuchi, T. *et al.* (2016) „Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant

- prostate cancer", *Research and Reports in Urology*, s. 21. doi: 10.2147/RRU.S98877.
56. Tan, M. H. E. *et al.* (2015) „Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery.", *Acta pharmacologica Sinica*. United States, 36(1), s. 3–23. doi: 10.1038/aps.2014.18.
57. Tang, X. *et al.* (2006) „Variation of α -methylacyl-CoA racemase expression in prostate adenocarcinoma cases receiving hormonal therapy", *Human Pathology*, 37(9), s. 1186–1192. doi: 10.1016/j.humpath.2006.04.019.
58. Trzpis, M. *et al.* (2007) „Epithelial Cell Adhesion Molecule", *The American Journal of Pathology*, 171(2), s. 386–395. doi: 10.2353/ajpath.2007.070152.
59. Wei, J. T. *et al.* (2014) „Can Urinary PCA3 Supplement PSA in the Early Detection of Prostate Cancer?", *Journal of Clinical Oncology*, 32(36), s. 4066–4072. doi: 10.1200/JCO.2013.52.8505.
60. Woo, D. a Yu, M. (2018) „Circulating tumor cells as ‚liquid biopsies‘ to understand cancer metastasis.", *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. United States, 201, s. 128–135. doi: 10.1016/j.trsl.2018.07.003.
61. Yang, Z., Yu, L. a Wang, Z. (2016) „PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer.", *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 28(1), s. 65–71. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.01.05.
62. Zainfeld, D. a Goldkorn, A. (2018) „Liquid Biopsy in Prostate Cancer: Circulating Tumor Cells and Beyond.", *Cancer treatment and research*. United States, 175, s. 87–104. doi: 10.1007/978-3-319-93339-9_4.