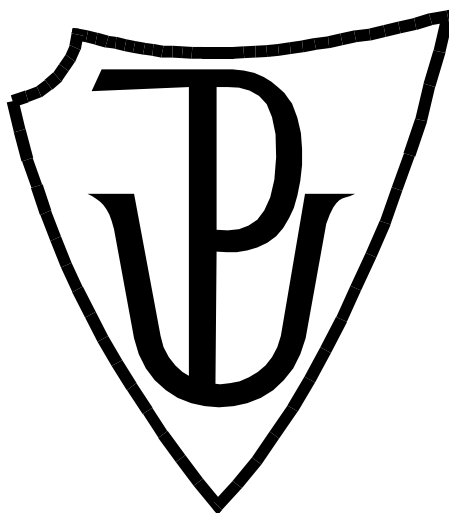


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



**Laserová mikrodisekce a analýza vybraných buněčných typů
karcinomu prostaty**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Laboratoř růstových regulátorů UP

Autor:	Silvie Kaločová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D
Pracoviště:	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP
Termín odevzdání práce	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Silvie Kaločová
Název práce	Laserová mikrodisekce a analýza vybraných buněčných typů karcinomu prostaty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Tato práce byla zaměřena na proteiny Skp2 a Slug, u nichž se předpokládá, že se podílejí na procesu epitelovo-mezenchymové přeměny, jenž vede k rozvoji agresivnější formy nádoru. Pomocí vícebarevného fluorescenčního značení byla prokázána kolokalizace těchto markerů ve stejných nádorových buňkách karcinomu prostaty.</p> <p>Byla provedena optimalizace metody RT-qPCR pro malé množství buněk. Analýza byla provedena i na FFPE a zmrazených řezech tkáně. V budoucnu by tedy mohly být nádorové buňky z tkáně získávány laserovou mikrodisekcí a dále analyzovány na úrovni exprese jednotlivých genů.</p>
Klíčová slova	Laserová mikrodisekce, karcinom prostaty, biomarkery, vícebarevné imunofluorescenční barvení, RT-qPCR
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's name	Silvie Kaločová
Title of thesis	Laser microdissection and analysis of selected cell types of prostate cancer
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>This work was focused on the Skp2 and Slug proteins, which are believed to be involved in epithelial-mesenchymal transition, which leads to the development of an aggressive form of tumor. Colocalization of these markers in the same tumor cells of prostate cancer was demonstrated by multiplex fluorescence staining.</p> <p>Optimization of the RT-qPCR method for small amount of cells was performed. The analysis was also performed on FFPE and frozen tissue sections.</p> <p>Therefore, in the future tumor cells could be obtained from the tissue by laser microdissection and further analyzed at the expression level of individual genes.</p>
Keywords	Laser microdissection, prostate carcinoma, biomarkers, multiplex imunofluorescence staining, RT-qPCR
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou prací na téma Laserová mikrodisekce a analýza vybraných buněčných typů karcinomu prostaty vypracovala samostatně za pomoci Doc. Mgr. Jana Bouchala, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu Doc. Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce. Mé poděkování patří též MUDr. Gvantse Kharashvili, Ph.D., MUDr. Mariam Gachechiladze, Ph.D., Mgr. Aleně Mičkové, Mgr. Zlatě Huškové, MUDr. Markétě Kolečkové, Mgr. Martinu Mistríkovi, Ph.D. a RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za spolupráci při získávání údajů pro experimentální část této práce.

Obsah

1. Úvod a cíle práce	10
2. Současný stav řešené problematiky	11
2.1 Prostata	11
2.2 Nezhoubná onemocnění prostaty	12
2.3 Karcinom prostaty	12
2.3.1 Prostatický specifický antigen	14
2.3.2 Gleasonovo hodnocení	15
2.3.3 TNM klasifikace a staging.....	16
2.3.4 Současné terapeutické postupy.....	17
2.3.5 Chirurgické řešení a radioterapie.....	19
2.3.6 Hormonální terapie a chemoterapie.....	19
2.4 Geny důležité pro karcinom prostaty	20
2.4.1 Biomarkery	20
2.4.2 Změny v kontrole buněčného cyklu	21
2.4.3 Epitelovo-mezenchymová přeměna	22
2.4.4 Skp2 a Slug (Snail2).....	23
2.5 Imunohistochemické barvení preparátů	27
2.5.1 Přímá a nepřímá metoda IHC	27
2.5.2 Polyklonální, monoklonální a rekombinantní protilátky.....	29
2.6 Fixace tkání a odmaskování antigenů	30
2.7 Vícebarevné fluorescenční značení	32
2.8 Laserová mikrodisekce.....	34
3. Materiál a metodika	37
3.1 Přístroje a pomůcky.....	37
3.2 Chemikálie a roztoky	38
3.3 Vícebarevné fluorescenční značení.....	40

3.4	Příprava buněčných linií pro izolaci RNA	42
3.5	Laserová mikrodisekce.....	42
3.6	Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk	43
3.6.1	SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit	43
3.6.2	RNeasy® Plus Micro kit	43
3.6.3	TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT	44
3.6.4	CelluLyser Micro Lysis buffer	44
3.6.5	AllPrep DNA/RNA FFPE kit	44
3.7	RT-qPCR.....	45
4.	Výsledky a diskuze	47
4.1	Vícebarevné fluorescenční značení pro potvrzení kolokalizace Skp2 a Slug	49
4.2	Srovnání použitelnosti specifických a náhodných primerů pro reverzní transkripci	50
4.3	Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk vzhledem k použitelnosti pro qPCR.....	51
4.4	Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk u velmi malých počtů buněk	52
4.5	Srovnání mikrodisekovaných buněk z FFPE a zmrazených tkáňových řezů.....	53
4.6	Testování primerů pro Skp2 a Slug a průkaz jejich exprese pomocí RT-qPCR.....	56
5.	Závěr	59
6.	Seznam citované literatury	61

SEZNAM ZKRATEK

AR – androgenní receptory
ATP – adenosintrifosfát
BHP – benigní hyperplazie
CaP – karcinom prostaty
CDK – cyklin-dependentní kinázy
cDNA – komplementární DNA
CgA – chromogranin A
CLSM – konfokální laserová skenovací mikroskopie
CRPC –kastračně rezistentní karcinom prostaty
Ct – „cycle of treshold“; cyklus prahu PCR
CYP17 – „cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase“
DAB – 3,3 – diaminobenzidin
DHT – dihydrotestosteron
DMEM – „Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium“
DT-PSA – zdvojovací čas PSA
EMT – epitelovo-mezenchymová tranzice
FFPE – „formalin fixed parafin embedded“
FITC – fluoresceinisothiokyanát
fPSA – volný PSA
FSH – folitropin
GnRH – gonadotropin uvolňující hormon
GS – Gleasonovo skóre
HIER – „heat-induced epitope retrieval“
hK2 – glandulární kalikrein 2
HRP – křenová peroxidáza
IHC – imunohistochemické metody
IL-6 – interleukin 6
Ki67 – marker buněčné proliferace
LHRH – hormon uvolňující luteinizační hormon
LM –laserová mikrodisekce
mIHC – multiplexní imunohistochemická metoda
NSE – neuron specifická enoláza
PIA – proliferativní zánětlivá atrofie

PIN – proliferativní intraepiteliální neoplazie
PSA – prostatický specifický antigen
PSMA – prostatický membránový antigen
RB–protein – retinoblastoma protein
SCF – „Skp, Cullin, F-box containing *complex*“
SHGB – globulin vázající pohlavní hormony
Skp2 – „S-Phase Kinase-associated Protein 2“
TBP – „house-keeping“ gen
TP53 – tumor supresorový gen
TRITC – tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát
TSA – tyramidová amplifikace signálu
UPS – ubiquitin-proteázový systém

1. Úvod a cíle práce

Karcinom prostaty je třetím onkologickým onemocněním v ČR způsobující nejvyšší mortalitu u mužů (Dušek *et al.*, 2014). Toto onemocnění může mít mnoho forem a může být zařazeno do několika klasifikačních kategorií (viz níže). Zdaleka nejnebezpečnějším typem je kastročně rezistentní forma, kdy i přes téměř nulové hladiny androgenů karcinom invaduje do okolních tkání a v konečném stádiu progreduje do metastatického onemocnění. (Bartůňková *et al.*, 2014).

V současné době se při diagnostice i terapii využívá biomarkerů, které jsou odlišně exprimovány ve zdravé a patologické tkáni. Objev významu dalších specifických markerů by mohl pomoci objasnit podstatu iniciace a růstu nádoru, ale také lépe a dříve rozpoznat, o jaký typ karcinomu prostaty se jedná a jak jej lze úspěšně léčit. Tato práce byla zaměřena na proteiny Skp2 a Slug (viz níže), u nichž se předpokládá, že se podílejí na procesu epitelovo-mezenchymové přeměny, jenž vede k rozvoji agresivnější formy nádoru.

Za účelem zkoumání kolokalizace studovaných proteinů je možné provést imunofluorescenční či imunohistochemické barvení. V budoucnu by mohla být v klinické praxi více využívána laserová mikrodisekce k získání konkrétních nádorových buněk z bioptického vzorku karcinomu, jež by mohly být dále analyzovány, např. pomocí RT-qPCR.

Pro sledování míry exprese zájmových markerů v malém množství buněk je nutné, aby tato metoda byla vhodně optimalizována.

Cíle této práce byly následující:

- Vypracovat literární rešerši zabývající se karcinomem prostaty, jeho současnou léčbou, využitím imunohistochemických metod a laserové mikrodisekce.
- Prokázat kolokalizaci proteinů Skp2 a Slug v buňkách karcinomu prostaty pomocí vícebarevného fluorescenčního barvení.
- Aplikovat vybrané metody na mikrodisekované buňky z FFPE nebo zamrazených tkání karcinomu prostaty za účelem ověření exprese Skp2 a Slug na úrovni mRNA.
- Optimalizovat metodu RT-qPCR pro malé počty vyšetřovaných buněk.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Prostata

Předstojná žláza (latinsky *prostata*) je žláznatý orgán uložený pod hrdlem močového měchýře. Prostatou prochází horní část močové trubice a ejakulární kanálek, který ústí na zadní stěně prostatické části močové trubice ve výběžek semenný (*colliculus seminalis, verumontanum*), z něhož vycházejí chámovody. Po stranách semenného výběžku se nachází 15–30 vývodů prostatických žláz. Důležitou součástí pro funkci prostaty je semenný váček, párový orgán umístěný mezi močovým měchýřem a konečníkem. Jeho vývod se spojuje s chámovodem těsně před jeho vstupem do prostaty **(Patel, 2011; Matoušková, 2004)**.

Prostata vykonává důležitou funkci v urogenitální soustavě. Produkuje a přechovává sekret, který je součástí ejakulátu. Pro homeostázu prostaty, ale také rozvoj nádorového onemocnění jsou důležité hormony, především androgeny **(Matoušková, 2004)**. Vývoj prostaty začíná již během pozdní embryogeneze epiteliálním pučením v urogenitální dutině. Díky vlivu androgenů se tyto pupeny začínají rapidně rozšiřovat a dělit. Tímto začíná formování typické struktury žláznatého orgánu. Po narození intenzivní rozvoj prostaty pokračuje a většinou je dokončen až před dosažením sexuální dospělosti. Vyvíjející se prostata je vysoce proliferativní tkáň, přičemž největší množství diferencujících se buněk lze nalézt na vrcholcích rostoucích prostatických kanálů. Naopak, v dospělosti se prostata stává poněkud neaktivní a lze nalézt pouze málo buněk ve stádiu mitotického dělení či apoptózy **(Knudsen a Vasioukhin, 2010)**.

Prostata je obalena pevným vazivovým pouzdem z hustého vaziva tvořeného kolagenem. Vazivově-svalové stroma prostaty obsahuje husté kolagenní vazivo se snopci i samostatnými buňkami hladkého svalstva. Stromatem probíhají tuboalveolární žlásky, jejichž výstelka je tvořena dvouřadým epitelem zaobleně kubických či trojbokých bazálních buněk a kubickými až cylindrickými buňkami se sekreční funkcí. Tato výstelka obsahuje velký počet androgenních receptorů a je významně ovlivňována testosteronem. Kvůli tomu může při intenzivnější hormonální stimulaci tvořit výběžky s vysokým víceřadým cylindrickým epitelem. Do lumina žláz produkují luminální buňky prostatický specifický antigen (PSA) a další látky. Také v epitelu se nacházejí endokrinní buňky. Lumen žlázek je vyplněn sekretem s alkalickou povahou, nezbytným k zahájení motility spermií **(Martínek a Vacek, 2009)**.

Homeostáza buněk prostatického epitelu je dána poměrem mezi apoptózou a proliferací buněk. Porucha homeostázy může způsobovat atrofické změny – plošné (vznikají při androgenní deprivaci) a ložiskové (nezávislé na hladině androgenů). Tyto atrofie označujeme jako proliferativní zánětlivé atrofie (PIA). Dále se může rozvinout i prekanceróza, tzv. prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN), jenž předchází vzniku karcinomu o cca 15–20 let (**Matoušková, 2006**).

2.2 Nezhoubná onemocnění prostaty

Nezhoubné nádory nejsou přímo život ohrožující, nicméně mohou ovlivňovat zdravotní stav pacienta, neboť mohou poškozovat okolní tkáň či dokonce přecházet v prekancerózy (**Velková, 2013**).

Nejčastějším typem benigního nádoru u starších mužů je benigní hyperplazie prostaty (BHP). Jedná se o onemocnění prokazatelné histologickým vyšetřením u cca 50 % mužů v šedesátých letech věku a téměř 90 % mužů starších osmdesáti pěti let (**Lukeš a Novotný, 2014**). Při BHP dochází k proliferaci buněk hladké svaloviny a epiteliálních buněk v přechodné zóně prostaty, v některých případech také v periuretrální zóně. Při BHP tedy nadměrně roste stroma i žlázy. Toto způsobuje tlak na močovou trubici, čímž dochází k nadměrnému zadržování moče (**Lüllmann-Rauch, 2012**). Kromě rizika vývoje BHP ve zhoubný nádor, BHP ohrožuje život pacienta také tím, že může dojít k selhání funkce dolních močových cest a celkovému selhání ledvin (**Lukeš a Novotný, 2014**).

2.3 Karcinom prostaty

V současné době bývá karcinom prostaty (CaP) diagnostikován u 15–20 % mužů, úmrtím však naštěstí končí jen okolo 3 % případů (**Varga et al., 2015**). Karcinom prostaty nejčastěji vzniká v periferní zóně prostatické žlázy a jeho růst probíhá pomalu. Zprvu nepůsobí žádné obtíže, klinické symptomy se objevují až při infiltraci žlázy (**Matoušková, 2004**).

Na vzniku rakovinného onemocnění se podílí mnoho faktorů a samotný proces vzniku nádoru je velmi komplikovaný. Heterogenní populace nádorových buněk se rozrůstá mezi populací nenádorových buněk a tkání tvořících složitý nádorový „ekosystém“. Během raných stádií vzniku nádoru je imunitní systém člověka schopný kontrolovat růst nádorových buněk. V pokročilejších stádiích jsou však rakovinné buňky

vůči imunitním mechanismům odolnější a mohou být paradoxně imunitními složkami v růstu podporován. (**Bartůňková et al., 2014**).

Kromě akumulovaných kancerózních epitelálních buněk, ze kterých se nádor prostaty primárně vyvíjí, hrají významnou roli při vzniku nádoru a jeho růstu také neepiteliální buněčné typy. Tedy obě buněčné struktury, epitelální i stromální, mají vliv nejen na vznik, ale také na progresi nádoru (**Knudsen a Vasioukhin, 2010**).

V posledních letech narůstá incidence CaP, nicméně příčinou vyššího počtu diagnostikovaných je zavedení testování hladiny PSA do klinické praxe, větší povědomí o této problematice v laické populaci a pokrok v technice zobrazovacích vyšetřovacích metod (**Čapoun et al., 2012**).

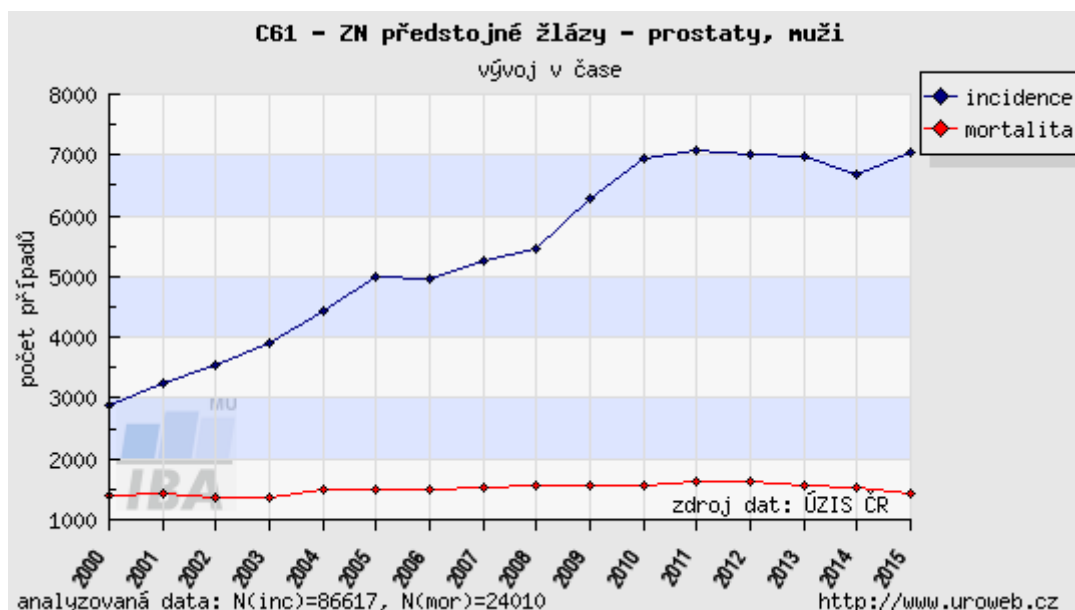
Karcinom prostaty se od ostatních solidních nádorů liší tím, že jeho růst probíhá obvykle velmi pomalu a jeho „doubling time“ (čas nutný ke zdvojnásobení velikosti) je dlouhý. CaP patří k nádorům, jež jsou citlivé, alespoň na určitou dobu, vůči nedostatku androgenů (**Matoušková, 2006**). Obecně, jako maligní karcinom prostaty je označován právě adenokarcinom s různým stupněm diferenciací buněk za současné změny jejich původní funkce (**Vránová, 2012**).

Adenokarcinom prostaty vzniká nejčastěji z epitelálních buněk žlázových acinů (acinární adenokarcinom), vzácně také z buněk žlázových vývodů (duktální karcinom), z pojivových tkání (sarkomatoidní karcinom), z neuroendokrinních buněk (malobuněčný karcinom) a dalších typů tkáně (**Humphrey, 2012**). K ostatním typům maligních nádorů prostaty patří mucinózní, dlaždicobuněčný a intraduktální, nádory z přechodného epitelu a mezenchymové tumory. Nejnebezpečnějším je právě malobuněčný karcinom, u něhož je průměrná doba přežití často kratší než jeden rok (**Hanuš a Macek, 2015**).

Acinární adenokarcinom je v raných fázích strukturně velice podobný normálním acinům. Diagnózu lze potvrdit absencí bazálních buněk. Zásadním znakem malignity je infiltrativní růst a invaze do okolních tkání (**Plecháčková, 2006**). Při vyšetřování bývá většinou nalezen jeden dominantní nádor, který bývá největší nebo je ohodnocen nejvyšším Gleasonovým skóre (GS), a v případě malignity také další menší nádorová ložiska. Při efektivní terapii i diagnóze je dobré, zaměřit se primárně na dominantní tumor, ostatně ve většině případů je právě toto ložisko zodpovědné za vznik metastáz (**Van Der Kwast, 2014**).

Nejčastějším onkologickým onemocněním u mužů jsou právě zhoubné nádory prostaty. Patří mezi druhé nejčastější onkologické onemocnění způsobující úmrtí

v rozvinutých zemích a třetí nejčastější příčina úmrtí na zhoubný nádor u mužů v ČR (Obr.1) (Matoušková a Hanuš, 2013).



Obr.1: Vývoj incidence a mortality zhoubných karcinomů prostaty v ČR v čase (převzato z <http://www.uroweb.cz>)

Příčinou úmrtí je ve většině případů kastračně rezistentní typ karcinomu (CRPC, „castration resistant prostate cancer“). Tyto karcinomy prorůstají do okolních tkání a tvoří metastázy, často do kostí, měkkých tkání či parenchymatických orgánů. Senzitivita rakovinných buněk vůči androgenní deprivaci se časem snižuje a nádor se tak vyvíjí i při kastračních hladinách testosteronu (Matoušková a Hanuš, 2013).

2.3.1 Prostatický specifický antigen

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein kódovaný na 19. chromozomu. Prostatický specifický antigen je kalikerinu podobná serinová proteáza a je sekretován epiteliálními buňkami prostatické tkáně, a to jak zdravé, tak i nádorové, neboť fyziologickou funkcí PSA je zkapalnění spermatu. Hladina PSA koreluje s věkem pacienta a také s objemem prostaty. V krevním séru cirkuluje z části ve formě vázané na bílkoviny krevní plazmy, z části jako volný fPSA (free PSA). Při zjištění vyšší hladiny v séru, než jaká je považována za normální, se doporučuje provedení punkční biopsie prostaty (Plecháčková, 2006; Hanuš a Macek, 2015; Kolombo *et al.*, 2008).

Stanovení hladiny PSA však může být zavádějící, neboť i přes fyziologickou hodnotu PSA (**Tab.1**) nelze vyloučit přítomnost CaP. Z tohoto důvodu se v klinické praxi používají také další důležité vyšetřovací parametry (**Plecháčková, 2006**).

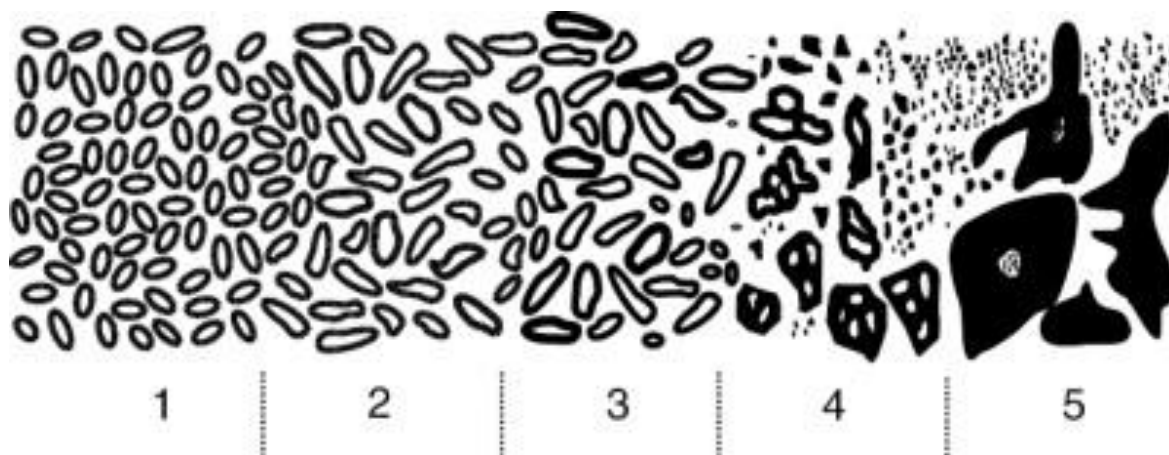
Tab.1: Referenční hladiny PSA pro věkové kategorie mužů (**Plecháčková, 2006**)

Věk pacienta	Referenční hladina PSA
40-49	≤ 2,5 ng/ml
50-59	≤ 3,5 ng/ml
60-69	≤ 4,5 ng/ml
70-79	≤ 6,5 ng/ml

2.3.2 Gleasonovo hodnocení

Existuje několik klasifikačních systémů, podle kterých lze hodnotit CaP (Broders, Bocking, Mostofi, Gaeta, MDAH) (**Král *et al.*, 2007**). Pro zhodnocení histopatologického stupně diferenciací bývá nejčastěji používán grading dle Gleasona, čímž lze získat tzv. Gleasonovo skóre (GS) (**Hradil *et al.*, 20014**). Systém Gleasonova gradingu byl prvně prezentován v roce 1966 a v současné podobě se používá od roku 2005 (**Král *et al.*, 2007**).

Gleasonova klasifikace spočívá v hodnocení architektonického uspořádání nádorových žlázek prostaty od prvního do pátého stupně, kdy první stupeň značí nejlépe diferencovaný typ nádoru a pátý stupeň představuje nejméně diferencovaný typ nádoru (**Obr. 2**). Hodnocení GS je dáno stanovováním nejčastějšího a druhého nejčastějšího histologického vzorce. Zpravidla bývají přítomny dva dominantní strukturní typy, avšak v některých případech bývá přítomen i terciální vzorec. Za předpokladu, že grade tohoto třetího typu je vyšší než u prvních dvou nejčastějších vzorců, označuje se jako terciální vzorek vyššího grade (**Král *et al.*, 2007**).



Obr.2.: Schématický diagram vzorců pro hodnocení GS v nádorech lidské prostaty. (Převzato z KNUDSEN, Beatrice S. a Valera VASIOUKHIN, 2010. Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression. Elsevier, 2010, 1-50. Advances in Cancer Research.)

Vzorec 1 – akumulace kulatých žlázek podobné velikosti, většina těchto typů rakoviny by byla klasifikována jako adenóza, a nikoliv jako rakovina, kvůli detekci vzácně se vyskytujících bazálních buněk. *Vzorec 2* – nádorová masa, která sestává z větších kancerózních žláz s mírně variabilním průměrem a ostře vymezenými okraji.

Vzorec 3 – Akumulované oddělené žlázovité jednotky s různě velkým a tvarovaným okrajem, každá obklopena stromálními buňkami, s infiltrací mezi normálními žlázkami.

Vzorec 4 – rozptýlené žlázovité jednotky, žlázy se špatně rozlišeným okrajem, kribriformní buňky, buněčné fragmenty.

Vzorec 5 – buněčné fragmenty často s nekrózou, samostatné rakovinné buňky ve stromatu. (Knudsen a Vasioukhin, 2010)

2.3.3 TNM klasifikace a staging

Pro dosažení správné interpretace výsledků mezi jednotlivými léčebnými centry a správný výběr terapie i odhad prognózy je důležité, aby informace popisující anatomický rozsah onemocnění byly co nejpřesnější a klinický popis zhoubných nádorů byl jednotný. Klasifikaci nádoru můžeme provádět pomocí různých kritérií, jako jsou například přesná anatomická lokalizace, rozsah onemocnění, udávaná doba trvání symptomů, věk pacienta, histologický typ a stupeň diferenciacie nádoru. TNM klasifikace prvotně popisuje anatomický rozsah nemoci, který je určován klinicky, popřípadě histopatologicky (**Tab. 2**). Jeho výhodou je fakt, že hlavní hodnotící kritéria jsou jednotná a použitelná pro všechny anatomické lokalizace bez ohledu na terapii. Navíc poskytuje možnost pozdějšího doplnění informací získaných histopatologickým vyšetřením nebo chirurgickým zákrokem (**Sobin et al., 2011**).

TNM systém k popisu anatomického rozsahu nemoci je založen na hodnocení tří složek:

T – rozsah primárního nádoru

N – nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách

M – nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz (**Sobin et al., 2011**)

Tab.2: Klasifikace nádorů prostaty podle TNM systému hodnocení a kritéria pro zařazení CaP do jednotlivých skupin (převzato a upraveno z **Aus et al.,2003**)

Klasifikační skupina	Kritéria pro zařazení do klasifikační skupiny
T1	tumor nehmateľný, nezobraziteľný
T1a	histologický nález v ≤ 5 % resekované tkáni
T1b	histologický nález v > 5 % resekované tkáni
T1c	nález z punkční biopsie
T2	tumor omezen na prostatu
T2a	\leq polovina jednoho laloku
T2b	$>$ polovina jednoho laloku
T2c	oba laloky
T3	šíření tumoru přes pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární rozšíření
T3b	invaze do semenného vaku
T4	infiltrace nebo postižení okolních struktur: zevní svěřač, rektum, levátory, pánevní stěna
N1	metastáze v regionální mízní uzlině
M1a	metastáze v mízní uzlině jiné než regionální
M1b	metastáze v kosti
M1c	jiná(é) lokalizace metastáze

2.3.4 Současné terapeutické postupy

Základním vyšetřením je stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) a vyšetření žlázy *per rectum*. V případě podezřelého nálezu je dále provedeno ultrasonografické vyšetření, případně histopatologické vyšetření. Teprve na základě histopatologického nálezu lze nasadit vhodnou terapii (**Matoušková, 2004**).

Zhruba 15 % pacientů má již v době stanovení diagnózy generalizované onemocnění. Pokud se onemocnění odhalí v časném stádiu (patologické T2), kdy je tumor lokalizován pouze v prostatě, volí se terapie radikální prostatektomií či primární radikální radioterapií. Větší část pacientů je zcela vyléčena, část z nich však může později relabovat (**Bartůňková et al., 2014**).

Pacienti, jejichž nádor představuje nízké riziko, (**Tab. 3**) se často mohou bezprostřední terapii vyhnout, neboť jejich tumor nebývá život ohrožující. Ovšem špatné posouzení bioptických vzorků a heterogenita nádoru mohou zapříčinit podcenění agresivity onemocnění. K tomuto dochází až u 20 % pacientů s nízkým rizikem. U pacientů se středním rizikem hrozí v případě neléčení rozvinutí metastatického onemocnění. U cca 20-40 % pacientů středního rizika primární terapie selže, zatímco dalších 10-20 % vůbec terapii potřebovat nemusí, protože jejich nádor nemá agresivní povahu (**Van Der Kwast, 2014**).

Tab.3: Rizikové skupiny karcinomu prostaty a jejich kritéria (**převzato z Hradil et al., 2014**)

Riziko	Kritéria
Nízké riziko	PSA < 10 ng/ml; GS < 7; cT1-2a
Střední riziko	PSA 10-20 ng/ml; GS = 7; cT2b-c
Vysoké riziko	PSA > 20 ng/ml; GS 8-10; cT3-4

Pacienti s lokálně pokročilým CaP (patologické T3 a T4) mívají nepříznivou prognózu. Jako terapie se opět volí operace nebo radioterapie, většinou jako součást víceúčelového postupu. Pacienti s metastázemi jsou odkázáni na androgenní deprivaci, ať už chirurgickou či farmakologickou. Androgenní deprivace navozuje apoptózu buněk primárního tumoru i případných metastáz. Jelikož ale hormon-independentní buňky nádoru i přes hormonální léčbu dále nekontrolovatelně rostou, dochází dříve či později k opětovné progresi choroby. Metastazující karcinom prostaty rezistentní vůči kastraci je charakterizován přítomností kostních nebo jiných vzdálených metastáz a trvalým zvýšením hladiny PSA, k němuž dochází i při kastracní hladině androgenů. V této fázi onemocnění lze nasadit chemoterapii (**Bartůňková et al., 2014**).

Volba vhodné terapie u CaP záleží na stádiu nemoci a přítomnosti rizikových faktorů progresu nádoru. Pro pacienty v klinickém stádiu I a II (CaP ohraničen na žlázu) se volí různé metody léčby, například „watchful waiting“ postup (metoda přísného

dohledu), v některých případech i radikálnější metody. Na výběru se z velké míry podílí i rozhodnutí poučeného pacienta. Obecně však platí, že pro nemocné s nízkým Gleasonovým skóre ve vyšším věku bývá preferován přístup „watchful waiting“ (**Matoušková, 2006**). Na rozdíl od aktivního sledování (surveillance), které se volí u pacientů s velmi nízkým rizikovým karcinomem, a při kterém probíhá pravidelné vyšetřování PSA, digitální rektální vyšetření a kontrolní biopsie za účelem odhalení agresivnější formy nádoru, se při metodě „watchful waiting“ pacient sleduje do biochemické progresse a nástupu symptomů onemocnění a teprve poté nastupuje léčba (**Král et al., 2014**).

Pro mladé pacienty s dlouhou předpokládanou dobou života se obvykle volí radikální prostatektomie, pro muže středního věku radioterapie buďto samostatně či v kombinaci s hormonální léčbou (**Matoušková, 2006**).

2.3.5 Chirurgické řešení a radioterapie

Chirurgická léčba karcinomu prostaty může být buďto kurativní nebo paliativní. Nejčastější radikální terapií je radikální prostatektomie, (**Adam, 2004**) která je volbou u lokalizovaného CaP, neprorůstajícího do prostatického pouzdra. Při této terapii se odstraní celá prostata včetně pouzdra, semenné vajíčky, a u většiny nemocných i spádové lymfatické uzliny (**Plecháčková, 2006**). Alternativou je radikální radioterapie. Tato metoda bývá volbou při stádiích T1a T2b N0 M0 a u pacientů, kteří nemohou nebo nechťejí terapii radikální prostatektomií (**Adam, 2004**).

2.3.6 Hormonální terapie a chemoterapie

Klíčovým iniciátorem replikace prostatické buňky je hormon testosteron, patřící do skupiny androgenů. Je produkován Leydigovými buňkami varlete, tvorba je inhibována zpětnovazebnými mechanismy. Produkci tohoto hormonu řídí hypothalamo-hypofyzární komplex prostřednictvím LHRH („luteinizing hormone-releasing hormone“), který dále stimuluje lutropin a folitropin. Přes 92 % testosteronu je produkováno varlaty, 5 % v kůře nadledvin a 2 % vznikají konverzí z estradiolu v tukové tkáni (**Matoušková, 2006**).

Naprostá většina testosteronu je přítomna ve vázané formě – vazbou na bílkoviny krevní plazmy (globulin vázající pohlavní hormony SHGB) (**Adam, 2004**). Enzymem 5 α -reduktázou, který se vyskytuje ve dvou izomerech, kdy především izomer II se v prostatě, tukové tkáni i kůži vyskytuje ve vysoké koncentraci, je testosteron

konvertován na dihydrotestosteron (DHT). Po navázání DHT na androgenní receptory (AR) dochází k tvorbě komplexu DHT-AR, čímž je spouštěna proteosyntéza a replikace buňky (**Matoušková, 2006; Sikorová, 2013**). Androgeny se ale podílí i na vzniku a progresi CaP. Toto tvrzení podněcuje fakt, že se tento nádor nevyskytuje u pacientů kastrovaných v předpubertálním věku, ani u pacientů s kongenitálními hormonálními abnormalitami. Zatím ovšem není známa jednoznačná korelace mezi sérovou hladinou testosteronu a rizikem vzniku CaP (**Plecháčková, 2006**).

Cílem hormonální léčby je blokáce účinku či potlačení sekrece androgenů. Absence androgenů způsobuje apoptózu androgen-dependentních buněk. Z tohoto důvodu se využívá léčba LHRH analogy, které navodí kastroční hladiny testosteronu, podobně jako chirurgická orchiektomie. V době diagnózy je většina (až 80 %) nádorů citlivá k hormonální léčbě, nicméně trvání léčebné odpovědi je cca 1 – 1,5 let (**Matoušková, 2006**). Po určité době však dochází k rozvoji kastročně-rezistentní formy onemocnění, kdy jsou možnosti léčby velice omezené. V tomto případě se volí chemoterapie, většinou doplněná léky, které tlumí komplikace způsobené tvorbou metastáz v kostech, typických pro toto stádium nemoci. Mezi používaná chemoterapeutika patří mitoxantron, docetaxel, denosumab a další (**Sikorová, 2013**).

U většiny pacientů podstupujících chemoterapii na bázi docetaxelu však časem dochází k progresi nemoci. Proto se mnoho klinických studií zabývá rozvojem dalších chemoterapeutik. Mezi nově užívaná chemoterapeutika patří například Kabazitaxel (derivát taxanů), Abirateron acetát (inhibuje CYP17, poskytuje pozitivní předběžné výsledky v klinických studiích) a Enzalutamid (antiandrogen blokující vazbu na androgenní receptor, translokaci v jádře a transkripci) (**Mottet et al., 2015**).

2.4 Geny důležité pro karcinom prostaty

2.4.1 Biomarkery

Biomarkery jsou geny s odlišnou expresí ve zdravé a patologické tkáni. Identifikace biomarkerů může probíhat analýzou krevního séra, moči, plasmy či samotných tkání. Rozlišujeme je například podle toho, ve kterém stádiu terapie je určujeme a využíváme, takže je lze rozdělit na diagnostické, prognostické, prediktivní a farmakodynamické. Diagnostické markery jsou využívány k určení patologie tkáně. Prognostické biomarkery charakterizují agresivitu nádoru a jeho pravděpodobný vývoj. Prediktivní biomarkery poskytují informace o odpovědi na léčbu a usnadňují volbu

nejpřínosnější terapie. Farmakodynamické biomarkery zkoumají účinnost léčiva. U biomarkerů je důležité, aby vykazovaly vysokou specifitu a senzitivitu. Specifita charakterizuje jistotu, že v případě zdravého pacienta bude marker nabývat negativních hodnot. Senzitivita je schopnost markeru charakterizovat patologický stav tkáně bez jasných klinických symptomů (**Sikorová, 2013**).

V současné době mnoho vědeckých výzkumů pracuje na objevu dalších specifických markerů. V rámci klinického testování můžeme mluvit o prostatickém membránovém antigenu (PSMA), Ki67 (marker buněčné proliferace), TP53 (tumor supresorový gen), IL-6 (interleukin 6), hK2 (glandulární kalikrein 2), CgA (chromogranin A), NSE (neuron specifická enoláza) a řada dalších (**Hradil *et al.*, 2014**).

V naší práci jsme se blíže zabývali proteiny Skp2 a Slug (viz níže).

2.4.2 Změny v kontrole buněčného cyklu

Buněčný cyklus je regulován různými faktory, mezi nejvýznamnější patří proteiny nazývané cykliny. Iniclace buňky pro vstup do další fáze buněčného cyklu je řízena hladinami exprese těchto proteinů. Aktivace cyklinů probíhá jejich navázáním na cyklin-dependentní kinázy (CDK). Enzymová aktivita CDK je regulována především fosforylací těchto molekul. Na řízení buněčného cyklu se podílejí hlavně komplexy CDK4 s cyklinem D, CDK6 s cyklinem D a CDK2 s cyklinem E. Tyto komplexy řídí G1 fázi a vstup do S-fáze. Cyklin-dependentní kinázy jsou schopny vyvolat cílenou fosforylací, čímž významně ovlivňují proliferaci buněk. Při fosforylací retinoblastoma-proteinu (RB-protein; jenž je považován za nádorový supresor) může docházet ke vzniku karcinomu. V některých typech karcinomu dochází ke změně funkce RB-proteinu kvůli deregulaci CDK (**Lučanová, 2013**).

Při mutaci genu RB1 se u dětí vyvíjí retinoblastom. Ve formě somatické mutace se často vyskytuje i v karcinomech, např. prostaty, plic, prsu a dalších. Inaktivní forma RB1 přispívá k vyšší proliferaci buněk. Gen RB1 produkuje retinoblastoma protein (RB-protein), jenž je zodpovědný za kontrolu G1 restričního bodu v buněčném cyklu, kdy dochází ke kontrole buňky při vstupu do S-fáze. Po hypofosforylací tohoto proteinu se k němu navazují transkripční faktory E2F, což zablokuje aktivaci genů, které jsou potřebné pro postup do další fáze buněčného cyklu. Při fosforylací tohoto proteinu komplexem cyklin D/ CDK4/6 se však faktory E2F uvolňují a při jejich navázání

na promotorové části určitých genů (např. pro DNA-polymerázu alfa) je buňce umožněn vstup do S-fáze (Lučanová, 2013; Bouchalová *et al.*, 2016).

Jedním z inhibitorů cyklin-dependentních kináz je p21, který je hlavním cílem pro Skp2. Protein p21 inhibuje především G1 a S-fázové cyklin-dependentní kinázy. Exprese p21 bývá vyvolána proteinem p53. Jelikož cílovou molekulou p21 jsou i CDK specifické pro fázi G1 (kdy jejich substrátem je retinoblastoma protein), p21 tvoří jakýsi můstek mezi důležitými nádorovými supresory – RB-proteinem a p53 (Bouchalová *et al.*, 2016).

Jaderný fosfoprotein p53 o hmotnosti 53 kDa je kódován genem TP53. V G1 fázi buněčného cyklu probíhá kontrola integrity genomu a oprava poškozených úseků DNA. Tento proces zabraňuje replikaci chybné genetické informace. Kontrolu genomu reguluje především p53. Tento protein reaguje na poškození DNA zastavením buněčného cyklu a následně aktivuje transkripci opravných enzymů pro DNA. V případě nezdaru v zastavení buněčného cyklu či nevydařené opravy DNA, p53 vyvolá apoptózu (Lukeš *et al.*, 2003). Mezi nejčastější a nejdůležitější změny, které lze detekovat v buňkách nádoru je aberace právě již zmiňovaného nádorového supresoru p53 (Dvořák *et al.*, 2008).

Pro zhoubné nádorové buňky je charakteristická ztráta kontaktní inhibice, ztráta schopnosti reagovat na signál k zastavení buněčného cyklu. V buňkách, ve kterých se vyskytují mutace regulátorů buněčného cyklu (např. p53), dochází k hromadění genetických defektů. Toto může v konečném důsledku podporovat vznik ještě agresivnějšího fenotypu. Nádor tak může získat schopnost nekontrolovatelného růstu a rychleji progradovat, či dokonce tvořit metastázy (Lukeš *et al.*, 2003).

2.4.1 Epitelovo-mezenchymová přeměna

Aby rakovinné buňky mohly opustit svou lokalizaci a invadovat do okolních tkání, musí dojít ke ztrátě adheze a musí nabýt schopnosti pohybovat se. K uvolnění buněk z primárního karcinomu a jejich šíření dochází epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT). Program EMT je aktivován během řady vývojových procesů, jako například formování mesodermu či neurální lišty. Během EMT buňky ztrácejí své epitelové charakteristiky, včetně adheze a polarity a nabývají mezenchymové morfologie a schopnosti migrovat. Buňka tedy deaktivuje expresi epiteliálních markerů, jako je protein E-cadherin a navodí mezenchymální markery,

včetně vimentinu a fibronektinu. Funkční ztráta E-cadherinu v epiteliální buňce je považována za charakteristický znak EMT. Lidský promotor genu E-cadherin se skládá z elementů, které jsou zodpovědné za jeho transkripční útlum. Některé zinc-finger transkripční faktory, například Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1 a ZEB2, jsou schopny se přímo navázat na tyto elementy promotoru E-cadherinu a zabránit jeho transkripci (**Casas et al., 2011**).

Při EMT v nádorech a při embryogenezi, je mnoho transkripčních faktorů navozujících EMT často aktivováno simultánně, například exprese Twist1, Snail1, Snail2 a ZEB2. Bylo zjištěno, že indukce Snail2 je nezbytná pro Twist1 k vyvolání EMT. Deaktivace Snail2 kompletně blokuje schopnost Twist1 potlačit transkripci E-cadherinu. Twist1 svým navázáním se na promotor Snail2 vyvolá transkripci Snail2. Exprese Twist1 a Snail2 v lidských karcinomech vysoce koreluje (**Casas et al., 2011**).

Twist1 protein je vysoce exprimován v CRPC buňkách, které nabyly schopnosti rezistence vůči kastraci. Inaktivace Twist1 zmírňuje proces EMT a inhibuje buněčný růst a migraci. Protein Twist1 je pozitivně regulován ve většině (90 %) maligních prostatických rakovinných tkáních. Ve spojení s Skp2 je Twist1 kritickým komplexem pro vznik CRPC. Skp2 totiž podněcuje nedegradativní ubiquitinizaci Twist1 a stabilizuje jej, proto se podílí na vyvolání EMT. Další výzkumy zaměřující se na Skp2 a Twist1 slibují přiblížení se k poražení CRPC (**Ruan et al., 2017**).

2.4.3 Skp2 a Slug (Snail2)

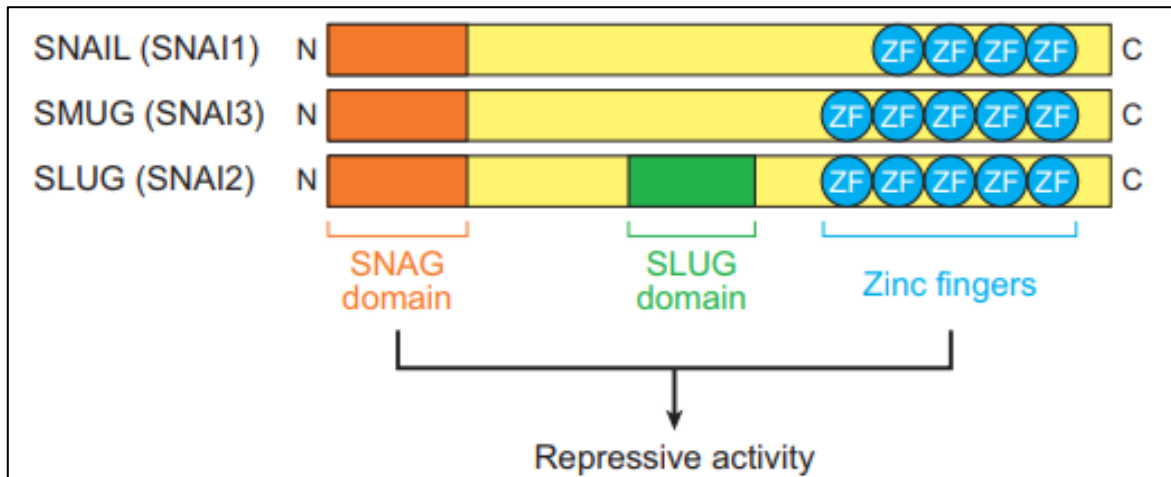
„S-Phase Kinase-associated Protein 2“ (Skp2) je gen, který byl původně klonován kvůli jeho asociaci s kinázami S-fáze a vysokou expresí v mnoha nádorových buněčných liniích. Skp2 negativně ovlivňuje regulátory buněčného cyklu a nádorové supresory a chová se tedy jako onkogenní protein. Zvýšená exprese Skp2 byla detekována v různých typech karcinomu, například lymfomu, karcinomu prostaty, melanomu, karcinomu prsu a dalších. Navíc byla objevena také významná korelace mezi expresí Skp2, histologickým grade a metastázemi v mnoha typech nádorů.

Skp2 se nachází na chromosomu 5p13.3-p13.1 a u některých pacientů s CaP bývá tento úsek amplifikován. Exprese Skp2 je regulována androgeny v normální i nádorové tkáni. Bylo prokázáno, že Skp2 patří mezi tzv. F-box proteiny a je součástí E3 ubiquitin-ligázového komplexu SCF (Skp1-Cullin 1-F-box). Rodina E3 ligáz patří k ubiquitin-proteazomovému systému (UPS), který kontroluje stabilitu klíčových

regulátorů buněk. V UPS existují tři typy enzymů: ubiquitin aktivační enzym (E1), ubiquitin konjugační enzym (E2) a ubiquitin ligáza (E3). Tyto tři enzymy řídí kaskádu reakcí zajišťující funkčnost UPS. První krok je závislý na ATP a zahrnuje vazbu ubiquitinu a E1. Ubiquitin je poté aktivován za pomoci ATP thiolesterovou vazbou a následně přemístěn na E2. E2-ubiquitin komplex poté interaguje s E3 a molekula ubiquitinu se přesune na substrát. Skp2, stěžejní komponenta SCF komplexu, rozpoznává cílové substráty pro ubiquitinizaci. Skp2-dependentní ubiquitinizaci však nemusí nutně vést k degradaci proteinu (viz níže).

Bylo objeveno, že specifickými substráty pro Skp2 jsou například inhibitory cyklin-dependentních kináz p21 a p27 a dalších. Skp2 bez pochyby hraje významnou roli v regulaci mnoha buněčných procesech, jako je buněčný cyklus, buněčná proliferace, apoptóza, diferenciací a schopnost buňky přežít. Všechny tyto procesy jsou navíc blízké rozvoji rakoviny skrz degradaci těchto substrátů. Při zvýšené expresi Skp2 v prostatice specifické tkáni dochází k výrazné proliferaci, což vede k hyperplazii, dysplazii a konečně karcinomu v prostatice žláze. Vzhledem k tomu, že zvýšená exprese Skp2 bývá spojována s vyšším grade karcinomu a recidivě onemocnění, Skp2 by mohl být významným prognostickým ukazatelem. Navíc bylo prokázáno, že deficiencie Skp2 zabraňuje rozvoji CaP spouštěním buněčného stárnutí skrz pozitivní regulaci p21, p27 a ATF4. Skp2 rovněž kontroluje proteolytickou degradaci nádorového supresoru BRCA-2 v rakovinných buňkách prostaty a podporuje buněčný růst a migraci (**Wang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2017**).

Snail proteiny patří mezi zinc finger proteiny, se čtyřmi až pěti „zinc fingers“ (speciální proteinové motivy) umístěnými na C-terminálním konci proteinu. Obsahují také konzervativní doménu na N-terminálním konci a SNAG a další domény v centrálním regionu. Právě tyto domény jsou zodpovědné za represivní vlastnosti těchto proteinů. Rodina Snail proteinů je charakteristická běžnou proteinovou organizací. Proteiny z této skupiny obsahují vysoce zachovalé oblasti na karboxylovém konci proteinu. Zinc fingers zprostředkovávají sekvenčně specifické interakce s DNA. Odpovídající místo pro navázání Snail genů obsahuje 6 bází, CAGGTG. Oblast N-konce proteinu je napříč živočišnými druhy méně zachovalá, ale většina z nich obsahuje doménu SNAG. Snail2 je od ostatních proteinů z této rodiny odlišen tzv. SLUG doménou poblíž zinc finger (**Obr. 3**) (**Cobaleda *et al.*, 2007**).



Obr.3: Schématický diagram funkčních oblastí třech členů Snail rodiny transkripčních faktorů. Tyto proteiny obsahují N-terminální doménu SNAG (oranžově) a C-terminální zinkové domény (modré kroužky). Tyto dvě domény jsou zodpovědné za represorovou aktivitu. Protein Snail2 navíc obsahuje SLUG doménu (zeleně) (Převzato z **Cobaleda et al., 2007**).

Snail2 byl prvně identifikován v neurální liště a vyvíjejícím se mezodermu v kuřecích embryích. Přítomnost Snail2 byla potvrzena v širokém spektru lidských leukémií, rhabdomyosarkomů, karcinomů jícnu a v karcinomech prsu, kde vysoce koreloval se ztrátou E-cadherinu. Nedávné studie potvrzují, že Snail2 je také aktivován v maligních mezoteliomech, kde se předpokládá, že Snail2 je zapojen do mechanismu rezistence vůči chemoterapii, neboť chrání buňky před smrtí. Proto je Snail2 považován za marker malignity a je slibným cílem pro terapeutické účely (**Cobaleda et al., 2007**).

Slug hraje roli v migraci a invazi rakovinných buněk. Mechanismus, kterým Slug podporuje migraci a invazi rakovinných buněk prostaty zatím však není znám. Slug reguluje epiteliálně-mezenchymální přechod v různých typech rakoviny a má schopnost potlačit expresi E-cadherinu a spouštět epiteliálně-mezenchymální přeměnu (EMT), což vede k tomu, že buňky rakoviny mohou uniknout z primárního tumoru a metastázovat. Obecně, Slug se podílí v různých fyziologických i patologických procesech. Například se podílí při obraně hematopoetických progenitorů před apoptózou vyvolanou radiací. Z pokusů na myších dále vyplývá, že Slug se zřejmě podílí také na vývoji urogenitálních orgánů.

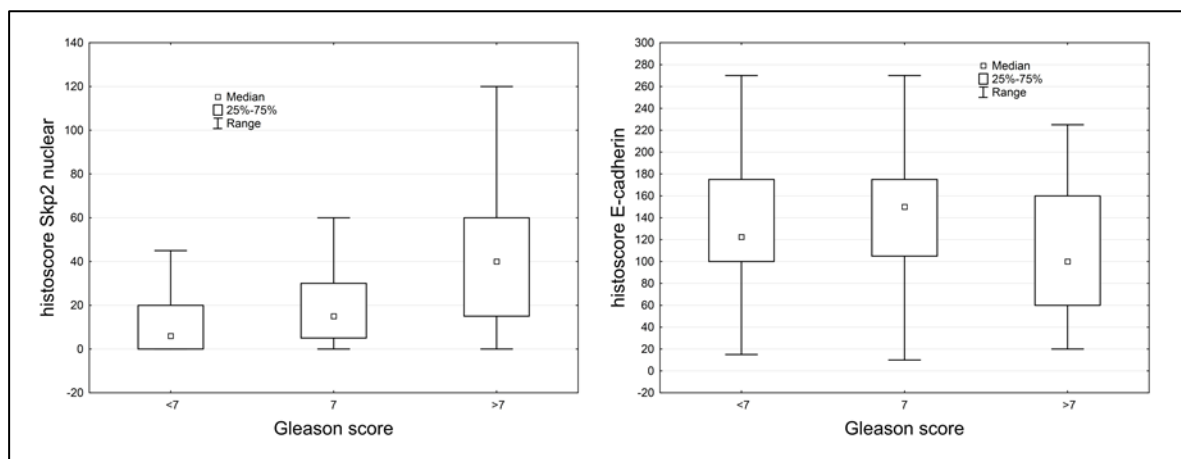
Slug je androgeně regulovaný gen v buňkách CaP. Zvýšená hladina Slug v buňkách CaP a androgenní receptory (AR) mohou formovat komplex, což může způsobovat zvýšení transkripční aktivity AR a androgeny následně podpoří růst buněk. Zvýšená exprese Slug v buňkách CaP může aktivovat buněčné geny

zodpovědné za androgenní expresi a potenciálně zapříčinit růst buněk i při absenci androgenů. Také vědecké studie potvrzují, že v buňkách CaP existuje pozitivní korelace mezi expresí Slug a nukleárními androgenními receptory.

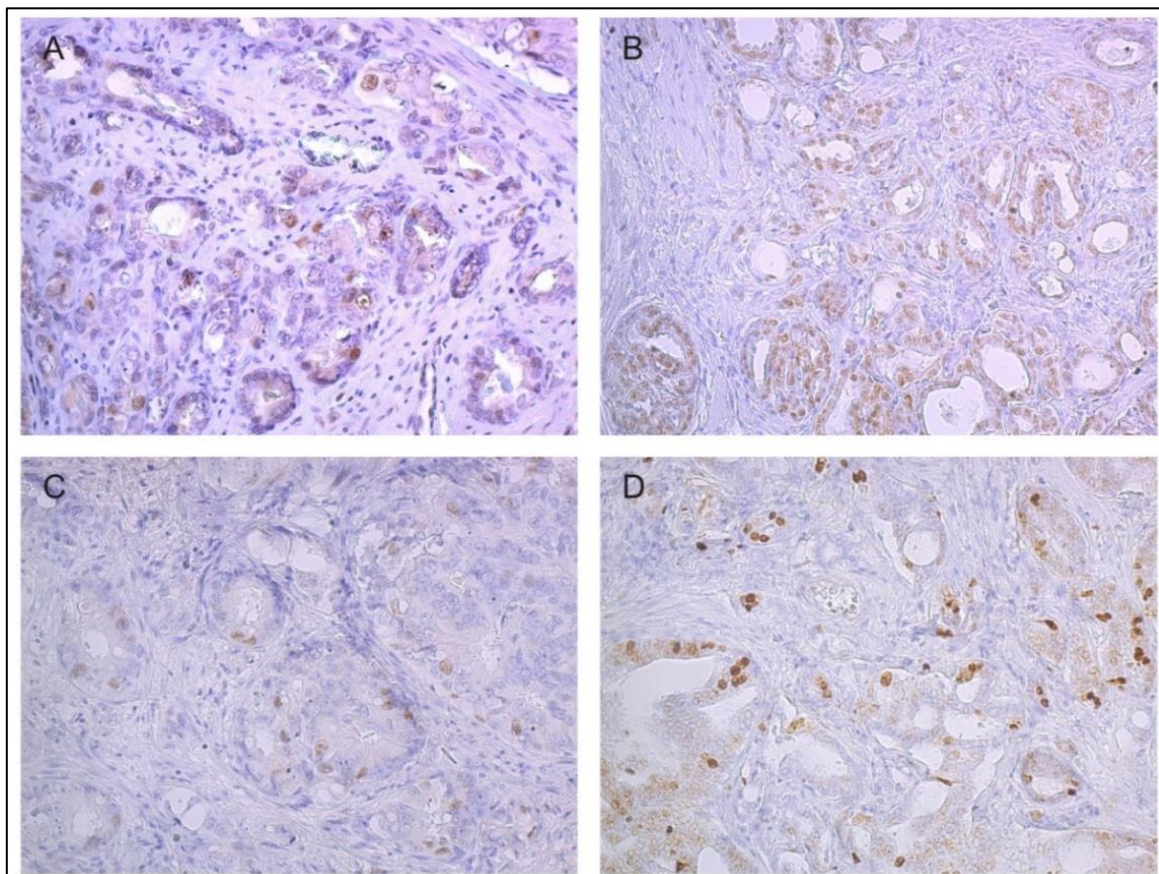
Slug-AR komplex tedy nejspíše hraje důležitou roli v urychlení růstu CaP zvyšováním exprese proteinů AR, stimulací aktivity AR a tímto se podílí na rezistenci vůči androgenní deprivaci (WU *et al.*, 2012).

Tato práce byla vypracována v návaznosti na výsledky studie na pracovišti školitele, kdy byla provedena retrospektivní analýza Skp2, Slug a dalších proteinů na souboru 101 vzorků karcinomu prostaty. Vysoké Gleasonovo skóre (8 a více) bylo spojeno s vyšší expresí nukleárního Skp2 ($p < 0.001$) a nižší expresí E-cadherinu ($p = 0.011$) (Obr. 4). Pacienti s metastázemi v lymfatických uzlinách rovněž vykazovali nižší expresi E-cadherinu ($p < 0.001$) a trend k vyšší expresi nukleárního Skp2, Slug, Ki67 a androgenového receptoru ($p = 0.176, 0.103, 0.079$ a 0.12) (Obr. 5). Nukleární Skp2 slabě koreloval s androgenovým receptorem ($R_s 0.37$) a Slug ($R_s 0.322$) v souboru primárních nádorů. Korelace pro Skp2 a Slug byla zesílena u pacientů s vysokým Gleasonovým skórem ($R_s 0.557$) i u pacientů s metastázemi v lymfatických uzlinách ($R_s 0.559$). Souvislost mezi Skp2 a Slug byla pozorována rovněž v několika *in vitro* modelech karcinomu prostaty, zejména v buňkách s mezenchymálním fenotypem (nepublikovaná data).

Z výše uvedených důvodů bylo jedním z cílů této bakalářské práce ověřit alespoň u několika patientských vzorků, zda proteiny Skp2 a Slug jsou společně přítomny ve stejných buňkách karcinomu prostaty.



Obrázek. 4: Expresie nukleárního Skp2 se zvyšuje s Gleasonovým skórem, naproti tomu E-cadherin se snižuje. (Převzato ze Závěrečné zprávy grantu NT13573 IGA MZ ČR)



Obr. 5: Příklad imunohistochemického barvení Skp2 (A), androgenového receptoru (B), Slug (C) a Ki-67 (D) v adenokarcinomu s Gleasonovým skórem 4+4 u pacienta s metastázemi do lymfatických uzlin. Zvětšení 200x. (Převzato ze Závěrečné zprávy grantu NT13573 IGA MZ ČR)

2.5 Imunohistochemické barvení preparátů

Imunohistochemické techniky (IHC) využívají vazby antigenu se specifickou protilátkou a následnou vizualizaci komplexu antigen-protilátka. Proto své uplatnění nacházejí především při hledání antigenů, ať už tkáňových, či buněčných. Pro zviditelnění jednotlivých složek tkáně se řezy histochemicky barví. K barvení se používají různá barviva, podle toho, které složky tkáně chceme vizualizovat. Plazmatická barviva (s kyselým pH) obarvují cytoplasmu buněk, nejčastěji používaným kyselým barvivem je eosin. Jaderná barviva (se zásaditým pH) vizualizují jaderný chromatin, zde se často využívá barvivo hematoxylin (Velková, 2013).

2.5.1 Přímá a nepřímá metoda IHC

U přímých metod je k detekci antigenu využívána buďto primární protilátka značená enzymem, který po reakci se speciálním substrátem vytvoří barevný komplex,

či primární protilátka přímo konjugována s fluoresceinem **(Bartůňková a Paulík, 2011)**. Přímou metodu lze použít v případě, kdy je zájmový antigen ve vzorku tkáně přítomen v dostatečné koncentraci. Konjugované protilátky jsou v současné době vyráběny pro široké spektrum antigenů. Tyto protilátky mají kvalitní využití v nativních řezech, nicméně při použití parafinových řezů tkáně tato metoda vykazuje nízkou citlivost. Nepřímé metody IHC zahrnují sice komplikovanější postup, bývají však mnohem citlivější. Principem je aplikace neznačené primární protilátky, která je specifická vůči zkoumanému antigenu. V dalším kroku je pak nanesena sekundární protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka **(Beranová a Tonar, 2002)**.

Sekundární protilátky jsou obvykle konjugovány s enzymem, nejčastěji alkalickou fosfatázou či křenovou peroxidázou. Katalytickou reakcí pomocí substrátu (např. 3,3'-diaminobenzidin s peroxidem vodíku pro křenovou peroxidázu) pak lze dokázat enzymatickou aktivitu v dané lokalizaci. Problémem této barvicí techniky je fakt, že mnoho buněk má vlastní endogenní aktivitu obou enzymů. Z tohoto důvodu je důležité nejprve tuto endogenní aktivitu specificky zablokovat. Výhodou této techniky však je, že obě enzymatické značky dobře snáší proces odvodnění. Dále je možné obarvit jádra a připravit trvalý preparát pozorovatelný světelným mikroskopem v bílém procházejícím světle **(Bartůňková a Paulík, 2011)**.

V případě, že množství studovaného antigenu v tkáni je velmi malé, lze použít třístupňovou metodu k zesílení signálu. Prvním krokem je reakce primární specifické protilátky se zkoumaným antigenem ve tkáni, následuje aplikace neznačené sekundární protilátky proti imunoglobulinům zvířete, který byl zdrojem primární protilátky a zároveň i protilátky použité ve třetím kroku. Tato sekundární protilátka vytváří jakýsi můstek a je nutné ji přidávat v nadbytku, aby nebyly vazebně nasyceny oba Fab-fragmenty jeho molekuly (IgG). Na druhý Fab-fragment se totiž ve třetím kroku váže konjugovaný komplex s enzymem (např. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex, PAP), což zprostředkuje konečnou vizualizaci. Tato třístupňová metoda je mnohem citlivější než přímá i dvojstupňová metoda, nicméně je časově náročnější **(Beranová a Tonar, 2002)**.

2.5.2 Polyklonální, monoklonální a rekombinantní protilátky

Polyklonální protilátky představují směs protilátek proti různým epitopům na celé molekule antigenu. Většinou se izolují z imunizovaného zvířete (z tzv. antiséra) **(Bartůňková a Paulík, 2011)**. Při imunizaci organismu jsou stimulovány různé B-lymfocyty, které následně proliferují a diferencují se v plazmatické buňky **(Beranová a Tonar, 2002)**. Každý jednotlivý klon lymfocytů generuje protilátku rozeznávající jednu antigenní determinantu (s jedinou specifitou), která zapříčinila jeho proliferaci. Jelikož takovýchto klonů je spousta, odpověď je polyklonální. Sérum odebrané ze zvířete po opakované imunizaci obsahuje velice heterogenní směs protilátek. Tyto protilátky vykazují různou specifitu, odlišnou afinitu k antigenu a fyzikálně-chemické vlastnosti. Specifita protilátky je určena převážně prostorovou komplementaritou vazebného místa protilátky a epitopu. Svou roli zde také hraje komplementarita elektricky nabitých skupin či hydrofobní vazby **(Dvořák et al., 2008)**.

Monoklonální protilátky jsou protilátky jednoho izotypu (G, M, A, D nebo E) a mají stejnou i variabilní část – tudíž mají jedinou specifitu. Monoklonální protilátky jsou vytvářeny jediným buněčným klonem, plazmatickými buňkami odvozenými od jediného B-lymfocytu. V organismu se nejčastěji vyskytují při onemocnění plasmocytomem (nádor z plazmatických buněk). Výroba monoklonálních protilátek *in vitro* přinesla diagnostice velké výhody **(Bartůňková a Paulík, 2011)**. První krok přípravy se shoduje s přípravou polyklonálních protilátek. Zvíře (často myš) je imunizováno antigenem, následně je z jeho sleziny připravena buněčná suspenze. Dále probíhá fúze normálních B-lymfocytů z imunizovaného zvířete s neoplastickými myelomovými buňkami, které mají schopnost produkovat monoklonální protilátky. Tato fúze se obvykle provádí v prostředí, které podporuje fúzi membrán, poté dochází k fúzi jader **(Dvořák et al., 2008; Beranová a Tonar, 2002)**. Hybridom po mateřském normálním B-lymfocytu zdědí specifitu produkované protilátky, po myelomové buňce schopnost neomezené proliferace **(Beranová a Tonar, 2002)**.

Takto připravené monoklonální protilátky se využívají v diagnostice infekcí (bakteriálních i virových), jako léky (např. při léčbě akutního odvržení orgánu po transplantaci, při autoimunitních chorobách a při léčbě některých nádorů) **(Bartůňková a Paulík, 2011)**.

V posledních letech se stále více používají rekombinantní protilátky, což jsou protilátky, které byly připraveny rekombinantní technologií. Oproti monoklonálním

či polyklonálním protilátkám lze díky genové manipulaci v procesu přípravy u rekombinantních protilátek dosáhnout větší specifity, senzitivity i stability, a především minimální variability mezi jednotlivými šaržemi. Při přípravě těchto protilátek je nejprve izolován gen kódující zájmovou protilátku, následuje jeho klonování a exprese. Nejprve se izoluje mRNA z buněk, které produkují protilátky (např. lymfocyty, hybridomové buňky či buňky slezinné). Následně je reverzní transkripcí získána komplementární DNA a metodou PCR je tento gen pro vazebný fragment protilátky namnožen. Poté je gen naklonován do vhodného vektoru a transportován do vhodných buněk (např. buňky kvasinek, bakterií, hmyzu či savců). Pro produkci protilátek k terapeutickým účelům je však jediným vhodným expresním systémem právě savčí buňka, neboť pouze při použití savčího expresního systému dochází k těm správným posttranslačním modifikacím exprimované molekuly (Fojtíková, 2013; Ma a O'Kennedy, 2016).

Specifita polyklonálních protilátek je zvyšována pomocí afinitní purifikace nebo afinitní chromatografií, kdy dochází k izolaci specifických protilátek. Zájmový protein je specificky zachycen na koloně (nebo např. agarozových kuličkách), kdy se využívá afinita purifikovaného imunoglobulinu k antigenu, proti němuž byl vyvinut. Ostatní klony jsou odmyty a specifické protilátky jsou uvolněny změnou iontové síly, pH nebo polaritě. Touto metodou lze tedy odstranit nespecifické frakce imunoglobulinů (Růčková *et al.*, 2014).

2.6 Fixace tkání a odmaskování antigenů

Vzorky tkáňových řezů pro imunohistochemické vyšetření lze připravit z biopsie nebo z biologického materiálu získaného při chirurgickém zákroku (např. radikální prostatektomie). Biologický materiál musí být zafixován, aby nedocházelo k znehodnocování tkáně (především kvůli aktivitě proteolytických enzymů, působení mikroorganismů apod.) (Poláková, 2011). Nicméně určitým modifikacím v tkáni nelze zcela zabránit. Fixace tkání způsobuje konformační změny v terciární struktuře proteinů, jenž mohou vést k biologické inaktivaci molekul. Navíc v porovnání s nativními tkáněmi dochází k významným transformacím vlastností proteinů. Nejužívanějším způsobem fixace tkání v imunohistochemii je fixace aldehydy, acetonem či proteiny-denaturujícími činidly (alkoholy). Ovšem při zvážení možností, jak zachovat cytologické vlastnosti a imunolokalizaci, se jako nejlepší kompromis jeví právě formaldehydová fixace,

kteřá způsobuje jen minimální maskování antigenů. Formaldehyd (HCHO) je plyn s nízkou molekulovou hmotností. Jeho molekuly snadno disociují ve vodě a tvoří methylenhydrát (HO-CH₂-OH), který má stejné reaktivní vlastnosti jako formaldehyd. Ve stavu, kdy je část formaldehydu ve vodě přeměněna na methanol, hovoříme o formalínu. Molekuly methanolu reagují navzájem za vzniku polymerů (**Renshaw, 2007**).

Aby bylo dosaženo vhodné fixace, je potřeba tuto polymerizaci zvrátit. Degradace těchto polymerů lze dosáhnout použitím pufru o fyziologickém pH, v přítomnosti hydroxidových iontů v mírně alkalickém prostředí. Aldehydové skupiny molekuly formaldehydu tvoří methylenové můstky (tzv. „cross-links“) mezi sousedními lyzinovými zbytky na povrchu proteinů. Množství těchto nežádaných vazeb se zvyšuje s delší dobou působení. Ostatní buněčné komponenty (např. nukleové kyseliny, lipidy apod.) nejsou formalínem přímo fixovány, nicméně jsou „uvězněny“ v síti nerozpustných vazeb. Formaldehyd přímo reaguje s nukleovými kyselinami pouze při 65 a 45 °C. V FFPE tkáních je takových teplot dosaženo pouze v tkáňovém procesoru, kde je již odmyta většina fixačního činidla. Formaldehyd zvyšuje hydrofobní charakter tkáně, což může vést k obarvení pozadí při metodách IHC. Pokud je formaldehyd použit pro fixaci zmražených či cytologických vzorků, expozice by neměla trvat déle než 5-10 minut, aby se zabránilo vytvoření většího množství „cross-links“. Z tohoto důvodu je vhodnější použít pro fixaci zmražených řezů tkání alkoholy. Tato činidla ovlivňují terciární strukturu proteinů, přičemž sekundární struktura zůstává zachována. Jelikož při této fixaci nedochází k tvorbě „cross-links“, není potřeba ani tzv. antigen retrieval (viz. níže). Nicméně jelikož alkoholy pronikají do tkáně jen obtížně, obecně se používají pro tkáňové řezy a cytologické preparáty spíše než pro větší části tkáně (**Renshaw, 2007**).

Jakmile je tkáň zafixována, musí být zpracována tak, aby bylo možné připravit tenké tkáňové řezy vhodné pro mikroskopickou vizualizaci. Nejprve jsou vzorky dehydratovány (jelikož do tkáně obsahující vodu parafin nepronikne) a očištěny, následně ponořeny v roztoku mísitelném s parafinem. Proces zalívání tkáně do parafínu bývá většinou automatizován. Vzorky, které byly zafixovány formalínem a zality do parafínu jsou připraveny k tvorbě tenkých řezů (4-5 um), nejčastěji pomocí mikrotomu (**Canene-Adams, 2013**).

Před zahájením imunohistochemického barvení je třeba pomocí procesu zvaného „antigen retrieval“ zvrátit vedlejší efekt formaldehydové fixace, jímž je maskování antigenů. Při tomto procesu je tkáň vystavena vysokým teplotám

(heat-induced epitope retrieval, HIER) či proteolytickým enzymům. Nicméně úspěšnost obnovení antigenů závisí na délce expozice tkáně s fixativem (v našem případě formaldehyd), na množství přítomného antigenu a na podmínkách při samotném procesu obnovy. Tkáň procházející tímto krokem by měla být umístěna na adhezivním skle, jelikož vysoké teploty potřebné k obnově antigenů často způsobují „odlepení“ tkáně ze skla či poničení struktury vzorku. Podrobný mechanismus „antigen retrieval“ není ještě zcela pochopen. Předpokládá se, že dochází k degradaci methylenových můstků vytvořených během formaldehydové fixace, čímž je molekulám proteinů umožněno formovat strukturu podobnou jejich původní terciární struktuře a protilátky tak získají přístup k epitopu. Co se týče enzymatické obnovy antigenů, používají se zejména trypsin, pepsin a proteináza K, ovšem v poslední době se této metody již nevyužívá tak často, neboť bylo prokázáno, že pomocí HIER lze demonstrovat daleko větší škálu antigenů. Navíc práce s enzymy může být problematická, kvůli jejich citlivosti vůči změnám pH a teploty. Během HIER bývají tkáňové řezy vystaveny různým pufrům a může být použito několik prostředků, např. mikrovlnné trouby, tlakového hrnce, páry či autoklávu. Každý z těchto přístupů má své výhody i nevýhody. Souhrnně lze říci, že mezi faktory nejvíce ovlivňující výsledek tohoto procesu patří čas, teplota, složení pufru a pH. Důležité je také vzorky po ovlivnění vysokými teplotami řádně ochladit (**Renshaw, 2007**).

2.7 Vícebarevné fluorescenční značení

Fluorescenční techniky využívají schopnosti molekul fluoroforů absorbovat světlo určité vlnové délky a emitovat záření o větší vlnové délce. Při fluorescenčním značení tkáňových či buněčných struktur je k jejich pozorování využíván fluorescenční mikroskop, kde jako světelný zdroj slouží často rtuťová či xenonová výbojka. U konfokálního mikroskopu bývá zdrojem světla i laserový paprsek. Fluorescenční mikroskopy jsou vybaveny sestavou vhodných filtrů. Některé fluorofory mají schopnost specificky se navázat na konkrétní komponenty buňky, např. DAPI se váže na DNA. Fluoroforů se využívá také při imunofluorescenčním vyšetření tkáně, kdy kombinace vysoce citlivého fluoroforu a specifické primární protilátky zajišťuje především vysokou citlivost tohoto vyšetření (**Brychtová a Hlobilková, 2008**).

Při excitaci fluorochromů ale intenzita emitovaného světla slábne (tzv. vysvícení, např. v důsledku nespecifických reakcí fluorochromu s okolními

molekulami). Nejběžnějšími fluorochromy, které bývají používány při imunofluorescenčních technikách jsou fluoresceinisothiokyanát (FITC, zelená barva), tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát (TRITC, červená barva) nebo texaská červeň (červená barva) (**Beranová a Tonar, 2002**). Existuje mnoho dalších fluoroforů pro použití v IHC (např. Alexa nebo Cy barvy) a nově také fluorescenční kvantové tečky nanokrystalů, které disponují užšími emisními píky v porovnání se standardními fluorofory. Často je počet fluoroforů omezován na tři, společně s DAPI (**Stack *et al.*, 2014**).

Pokud je cílem imunofluorescenčního vyšetření prokázat v tkáni více molekul (např. kolokalizaci molekuly se známým významem a molekuly, jejíž výskyt je mapován), lze využít metody multiplexního barvení. V tomto případě je vhodnější použít sekundární protilátky značené fluorescenčně. Při použití nejčastějších enzymatických značek je totiž výsledný produkt modrý nebo hnědý a jejich vizualizace za použití světelného mikroskopu je obtížná (**Bartůňková a Paulík, 2011**).

Fluorescenční mikroskopie umožňuje snímání jednotlivých fluorochromů v oddělených kanálech a následnou fúzi obrazu. Jelikož mIHC využívá fluorescence, může docházet k překryvu emisních spekter jednotlivých fluoroforů a tímto ke zhoršení rozlišení a komplikacím při vizuálním posuzování. U formalínem fixovaných parafinových tkání (FFPE) představuje problém také autofluorescence, která výrazně komplikuje vizuální interpretaci (**Stack *et al.*, 2014**).

Problém autofluorescence je možné odstranit pomocí tzv. „linear unmixing“. Jedná se o technologii, kdy při fluorescenčním multiplexním barvení je každý fluorofor nejprve vizualizován samostatně, teprve poté jsou obrazy sloučeny. Díky tomuto lze touto metodou potvrdit kolokalizace, nicméně kvantifikace jednotlivých signálů je poněkud omezena, především kvůli již zmiňované autofluorescenci. Řešením tohoto problému může být použití konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM), tato technologie využívá k detekci několika laserů a speciálního optického vybavení, které umožňuje spektrální detekci, tudíž může být odlišeno spektrum každého jednotlivého fluoroforu a provedena kvantifikace fluorescenčního signálu. Nicméně stejného výsledku lze dosáhnout také použitím standardního fluorescenčního mikroskopu vybaveného multispektrální kamerou, která zachycuje multispektrální informace. Aby však mohla být spektra správně rozlišitelná a jejich kvantifikace byla spolehlivá, je využívána multispektrální knihovna, kde jsou registrovány správná spektra každého fluoroforu i reprezentativní spektra autofluorescence z neobarveného vzorku. Tato knihovna spekter

je pro tuto metodu zásadní, neboť intenzita každého fluorescenčního signálu je extrahována z multispektrálních dat, pomocí tzv. „linear unmixing“. Kromě multispektrálních vizualizačních metod založených na mikroskopii se v nedávné době začala používat také laserová mikroskopie na principu hmotnostní spektrometrie, jež využívá primární protilátky konjugované s lanthanoidy (**Stack *et al.*, 2014**).

Dalším způsobem, jak zlepšit fluorescenční barvení tkání fixovaných formalinem, je využití tzv. tyramidové amplifikace signálu (TSA, příkladem je Multiplex Opal kit firmy Perkin Elmer). Značení probíhá v obvyklé sekvenci primární protilátka proti cílovému proteinu a následně sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Poté je přidán fluorochrom konjugovaný s tyramidem, který je aktivován křenovou peroxidázou a dochází ke kovalentnímu navázání fluorochromu v místě komplexu antigen – primární protilátka – sekundární protilátka. Celý postup je pak zopakován pro další cílové proteiny, přičemž je důležité, že je vždy opakován krok „antigen retrieval“ v mikrovlnné troubě v citrátovém pufru v kdy dochází k odstranění předchozí primární i konjugované sekundární protilátky. To umožňuje použití primárních protilátek ze stejného živočišného druhu pro více cílových proteinů (**Stack *et al.*, 2014**).

K ověření správnosti výsledků je důležité porovnat výsledky s kontrolními vzorky. Nejčastější příčina falešně pozitivních výsledků bývá nespecifická vazba protilátky na studovanou tkáň. Falešnou negativitu pak běžně vyvolávají metodické chyby, např. nevhodná fixace či zpracování tkáně. Pro negativní kontrolu se specifická primární protilátka často nahrazuje protilátkou ze stejného zvířete a stejného izotypu proti antigenu, který ve studované tkáni není přítomen (**Bartůňková a Paulík, 2011**).

2.8 Laserová mikrodisekce

Laserová mikrodisekce (LM) je rychlá bezkontaktní metoda, jak lze izolovat mikroskopické objekty z jejich matrice (**Poláková, 2011**). Patologicky postižená tkáň je obvykle „mozaika“ zdravých a poškozených buněk. Jednotlivé buňky lze rozlišit a označit imunohistochemickým či imunofluorescenčním barvením dle jejich fenotypových projevů. Laserovou mikrodisekcí je pak možné je izolovat a analyzovat jednotlivě. Tato metoda je výjimečná v tom, že umožňuje izolovat vysoce homogenní populaci buněk, za současného zachování původní tkáně bez poškození, použitelné pro další analýzy (**Faltýsková, 2007**).

Cílovými objekty mohou být kromě částí tkáně a jednotlivých buněk také jejich segmenty – buněčné organely, membrány, chromozomy (**Poláková, 2011**). Na monitoru počítače, který zobrazuje skutečný obraz studované tkáně pomocí digitální kamery lze vybrat objekty, které chceme izolovat (**Lužná a Ehrmann Jr., 2013**). První metoda laserové mikrodisekce (popsána v roce 1996) využívala termoplastického filmu (**Dudová a Hájek, 2008**). Technika laserové mikrodisekce byla prvotně sestrojena pro rozšíření možností analýzy solidních nádorů. Laserové mikrodisektory začala vyrábět firma Arcturus, současně i německá firma Zeiss.

V dnešní době jsou k dostání čtyři typy laserových mikrodisektorů, kromě dvou výše zmiňovaných dodavatelů ještě firmy Olympus a Leica. Přístroje různých firem se liší technologií izolace objektů a také transportu objektů do sběrací mikrozkušavky (**Chottová-Dvořáková a Mistrová, 2016**).

Zařízení PALM Microlaser Technologies od firmy Carl Zeiss využívá izolaci a katapultaci objektů vysokoenergetický laser (tzv. laser pressure catapulting). Izolovaný objekt je silou laseru vystřelen a přichycen na víčko Eppendorfovy zkumavky. Po celou dobu lze průběh mikrodisekce sledovat kamerovým systémem, což umožňuje vizuální kontrolu katapultovaných objektů i tkáně, ze které byly vyjmuty (**Chottová-Dvořáková a Mistrová, 2015; Poláková, 2011**). Systém laserové mikrodisekce od firmy Leica Microsystems k transportu mikrodisekovaných objektů do mikrozkušavky využívá prostou gravitaci, objekty tudíž jednoduše padají na adhezni víčko. Firma Olympus ve spolupráci s Molecular Machines and Industries (MMI) vyrábí zařízení CellCut, kdy kontaktem adhezni vrstvy víčka mikrozkušavky s vyříznutými buňkami dojde k jejich nalepení a přichycení k tomuto víčku. Při práci s LM používající infračervený laser lze použít běžné mikroskopické sklo. Avšak systémy využívající ultrafialový laser vyžadují práci se sklem potaženým speciální membránou. Tato membrána často nahrazuje celé podložní sklo preparátu a bývá uchycena v kovovém rámečku (**Chottová-Dvořáková a Mistrová, 2015**).

Laserová mikrodisekce vyniká rychlostí, přesností a použitelností pro široké spektrum vzorků. Manipulace se vzorkem je bezdotyková a jednoduchá. Tyto vlastnosti zabraňují mechanickému poškození nebo ztráty buněk a tkání (**Faltýsková, 2007**). Mezi nevýhody této metody patří především omezené množství získaného materiálu (**Poláková, 2011**). Další nevýhodou je vysoká pořizovací cena a náklady na údržbu laserového mikrodisektoru. Navíc je potřeba používat preparáty bez krycího sklíčka,

tudíž je nutná šetrná manipulace (**Faltýsková, 2007**). Mikrodisekce zájmových buněk bývá navíc ovlivněna kvalitou tkáně, barvení a umístěním laseru (**Poláková, 2011**).

Význam mikrodisekce pro výzkum je značný, neboť s pomocí této technologie je možné analyzovat nejen morfologii buněk, ale kvalita získaného biologického materiálu umožňuje provést molekulární analýzy (v našem případě RT-qPCR) a sledovat úroveň exprese studovaných genů. Kromě mRNA můžeme z takto získaných vzorků analyzovat i DNA či proteiny. Cílená analýza konkrétních (nádorových) buněk izolovaných z tkáňového řezu, například na základě fenotypových rozdílů či imunochemického barvení, umožňuje lepší pochopení procesů probíhajících v těchto buňkách, což je přínosem pro vývoj cílené terapie (**Chottová-Dvořáková a Mistrová, 2015**).

3. Materiál a metodika

Cílem této práce bylo blíže prozkoumat kolokalizace Skp2 a Slug ve stejných nádorových buňkách karcinomu prostaty. Proto bylo nejprve provedeno vícebarevné fluorescenční značení FFPE tkáňových řezů karcinomu prostaty metodou MultiplexOpal.

Za účelem analýzy kolokalizace těchto dvou markerů na úrovni exprese pomocí RT-qPCR bylo nutné provést optimalizaci této metody na buňkách linie PC-3 a PC-3 DR12. Optimalizace obnášela porovnání specifických a náhodných (random) primerů pro reverzní transkripci a přímé lýzy buněk a izolované RNA pomocí různých kitů. Tyto postupy byly použity pro různé počty buněk za účelem zjištění, jaký nejmenší počet buněk je nutný pro efektivnost vybraných kitů a správnost výsledků. Optimalizace byla prováděna za sledování kontrolního genu TBP.

Jelikož laserová mikrodisekce by mohla v budoucnu být častěji využívána pro izolaci konkrétních nádorových buněk a jejich další analýzu (v tomto případě RT-qPCR pro zjištění exprese Skp2 a Slug), bylo potřeba porovnat kvalitu biologického materiálu získaného z buněk mikrodisekovaných z FFPE řezů tkáně a zmrazených řezů tkáně (tzv. „frozen sections“). Opět byly porovnávány různé počty vyzolovaných buněk, které byly dále zpracovány různými izolačními kity. Po optimalizaci zpracování buněk a postupu pro RT-qPCR byla testována exprese Skp2 a Slug v buňkách PC-3 DR12. Tento experiment byl proveden pro možnost budoucího sledování těchto dvou biomarkerů v patientských vzorcích CaP.

3.1 Přístroje a pomůcky

- automatické pipety
- centrifuga (LMC-3000, Biosan)
- centrifuga (Jouan, MR22i)
- digestoř (MSC-Advantage; THERMO Scientific)
- inkubátor (HeraCELL, Heraeus)
- lednice (Whirpool AFG 7050)
- mikrocentrifuga (Eppendorf, MiniSpin)
- mikrocentrifuga (Qualitron, DW-41)
- mikrodisektor (PALM MicroBeam, Zeiss)
- histoprocessor (Histos Pro, Milestone)

- mikroskop
- minicentrifuga Blue (Labnet)
- spektrofotometr NanoDrop (ND-1000; M.G.P.)
- světelný mikroskop (Nicon, Eclipse TS-100F)
- špičky
- termoblok (ThermoMixer C, Eppendorf)
- termocyklér (LightCycler® 480, Roche)
- termocyklér (Mastercycler gradient Pro S, Eppendorf)
- vodní lázeň (termolázeň TW8, Julaba)
- vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries)
- zkumavky

3.2 Chemikálie a roztoky

- xylén
- 96% ethanol, 80% ethanol, 70 % ethanol
- destilovaná voda
- citrátový pufr (pH 6,2) (připraveno v LMP)
- Tris (1x), 0,5 mM, pH 7,6 (připraveno v LMP)
- TNB pufr (PerkinElmer)
- primární protilátka Slug (C19G7) Rabbit mAb (zásobní roztok v 10 mM pufru sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% glycerol a méně než 0.02% azidu sodného NaN₃) (CellSignaling Technology) + Amplification diluent (1x) (PerkinElmer)
- primární protilátka Mouse anti-p45SKP2 (zásobní roztok 200 µl (0.5 mg/ml v PBS, pH 7.4), obsahuje 0,1% azidu sodného NaN₃, vysoce purifikovaná protilátka z myšního ascitu. (1:75) (Thermo Fisher Scientific) + Amplification diluent (1x) (PerkinElmer)
- sekundární protilátka Dako EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako)
- TSA Cyanine 5 (Cy5) + Amplification diluent (1x) (PerkinElmer)
- TSA® Cyanine 3 (Cy3) + Amplification diluent (1x) (PerkinElmer)
- Mowiol (SIGMA-ALDRICH)
- DAPI (SIGMA-ALDRICH)

- DMEM s přidavkem 10% FBS sérem a antibiotiky (SIGMA-ALDRICH, připraveno v laboratoři LMP)
- PBS pufr („Phosphate Buffered Saline“; připraveno v LMP)
- 0,25% trypsin v roztoku EDTA (SIGMA-ALDRICH)
- SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit (Fisher Scientific)
 - RNA Elution Buffer
 - Lysis Solution
 - Wash Solution
- β-mercaptoethanol (SIGMA-ALDRICH)
- RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen)
 - Buffer RLT Plus
 - Buffer RW1
 - Buffer RPE
 - Carrier RNA, poly-A (310ug/ml)
 - RNase-free water
- 70% Ethanol
- 80% Ethanol
- TaqMan® Gene Expression *Cells-to-CT* (Ambion)
 - Stop Solution
 - DNase I
 - 20x RT Enzyme Mix
 - Lysis Solution
 - 2x RT Buffer
 - TaqMan® Gene Expression Master Mix
- CelluLyser Micro Lysis buffer (Tataa Biocenter)
- AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen)
 - pufr PKD
 - proteináza K
 - pufr RLT
 - pufr FRN
 - pufr RPE
 - pufr RDD
 - RNase-Free DNase I

- 10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen™) (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl)
- DNase I, Amp Grade, 1 U/μl (Invitrogen™)
- 25 mM EDTA (pH 8.0) (Invitrogen™)
- random primers 10 uM (Top-Bio)
- specifické primery TBP 10 uM (GeneryBiotech)
- PCR dNTP mix, pH 7,5, 10 mM (Top-Bio s.r.o.)
- Protector RNase Inhibitor (40 U/ul) (v pufru 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM dithiothreitol, 50% glycerol (v/v), pH cca 7.6 (+4°C)) (Roche)
- SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200 U/ul), (Invitrogen™)
- 5X first-strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] (Invitrogen™)
- 0,1 M DTT (Invitrogen™)
- 2x LightCycler 480 Probes Master (ROCHE)
- 10 uM probe TBP Cy5 (GeneryBiotech)
- 10 uM fw/rv primer Slug (GeneryBiotech)
- 10 uM probe UPL7 (Universal Probe Library No.7, ROCHE)
- 10 uM fw/rv primer Skp2 (GeneryBiotech)
- 10 uM probe UPL 44 (Universal Probe Library No.44, ROCHE)

3.3 Vícebarevné fluorescenční značení

Nejprve bylo provedeno fluorescenční barvení tkáňových řezů karcinomu prostaty od šesti různých pacientů metodou MultiplexOpal. Byly sledovány biomarkery Slug a Skp2, přesněji jejich kolokalizace ve stejných nádorových buňkách.

Vzorky byly inkubovány cca 12 hodin při 37 °C. Poté byly vzorky deparafinizovány a rehydratovány v alkoholové řadě (xylén (8 min) – xylén (8 min) – 96% ethanol (5 min) – 80% ethanol (5 min) – 70% ethanol (5 min), opláchnuty destilovanou vodou (3x2 min) a vloženy do mikrovlnné trouby (120°C, 15 min) v citrátového pufru o pH 6,2. Dále byly promyty destilovanou vodou (2 min) a opláchnuty v Tris (1x) o pH 7,6 (2x2 min). Následovala blokáce nespecifických vazeb nanesením TNB pufru (100ul/sklíčko) bez přímého světla (10 min, laboratorní teplota). Poté byla nanesena monoklonální primární protilátka Slug (C19G7) Rabbit mAb proti

Slug, která byla naředěna v poměru 1:40 ve svém diluentu. Následovala inkubace primární protilátky (1 hodina, laboratorní teplota) a oplach v Tris (1x) o pH 7,6 (3x2 min).

Po oplachu byla nanášena sekundární protilátka Dako EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (100 ul/sklíčko), jež je směsí anti-králíčích a anti-myších protilátek a inkubována ve tmě (10 minut, laboratorní teplota). Následoval oplach vzorků v Tris (1x) (3x2 min) o pH 7,6 a destilované vodě. Poté byl aplikován fluorofor konjugovaný s TSA - TSA Cyanine 5 (Cy5) zředěný v poměru 1:70 v 1X Amplification Diluent, proběhla inkubace (10 min, laboratorní teplota, ve tmě), následoval oplach v Tris (1x) o pH 7,6 (3x2 min). Vzorky byly dále vloženy do mikrovlnné trouby (120 °C, 15 min) v citrátovém pufru o pH 6,2. Po tomto kroku byly tkáňové řezy opět ošetřeny TNB puftrem (100ul/sklíčko), (10 min, laboratorní teplota, ve tmě). Byla aplikována primární protilátka Mouse anti-p45^{SKP2} proti antigenu Skp2 a inkubována (1 hodina, laboratorní teplota). Po oplachu v Tris (pH 7,6) (3x2 min) byla nanášena sekundární protilátka Dako EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (100 ul/sklíčko). Po inkubaci (10 min, laboratorní teplota) a oplachu v Tris (pH 7,6) (3x2 min). byl aplikován TSA konjugovaný fluorofor TSA[®] Cyanine 3 (Cy3), který byl zředěn v poměru 1:70 v 1X Amplification Diluent, proběhla inkubace (10 min, laboratorní teplota, ve tmě), následoval oplach v Tris (1x) o pH 7,6 (3x2 min). Následně byly vzorky opět vloženy do mikrovlnné trouby (120 °C, 15 min) v citrátovém pufru o pH 6,2.

Na závěr byly vzorky zamontovány pomocí lepidla Mowiol. Současně byly barveny také kontrolní vzorky: negativní kontrola pro Skp2; Slug (kdy jediný rozdíl spočíval v aplikaci primárních protilátek – byl nanášen pouze diluent), vzorek se samostatně obarvenými jádry pomocí DAPI (ředění 1:200) (místo primární protilátky byl opět nanášen pouze diluent, taktéž místo fluoroforu Cy3/Cy5 byl nanášen pouze diluent) a kontrolní vzorek pro autofluorescenci (namísto primární protilátky opět nanášen pouze diluent, taktéž místo fluoroforu Cy3/Cy5 byl nanášen pouze diluent). Takto nabarvené preparáty byly poté pozorovány konfokálním fluorescenčním mikroskopem a kolokalizace Skp2 a Slug byla kvantitativně vyhodnocena systémem „Mantra[™] quantitative pathology workstation”.

3.4 Příprava buněčných linií pro izolaci RNA

Biologický materiál: buňky karcinomu prostaty linie PC-3 (ATCC; American Tissue Culture Collection) a PC-3 DR12 (Dr. Martin Pühr; Innsbruck Medical University).

Pro optimalizaci metody RT-qPCR byly přichystány buňky karcinomu prostaty linie PC-3 a PC-3 DR12. Tyto buněčné linie byly zpasážovány a kultivovány v 10% médiu DMEM. Buňky z linie PC-3 byly spočítány a buněčná suspenze byla naředěna tak, aby bylo získáno 5 vzorků obsahujících 100 buněk, 5 vzorků obsahujících 1000 buněk, 5 vzorků obsahujících 10 000 buněk a 5 vzorků obsahujících 100 000 buněk. Bylo tedy připraveno 5 řad vzorků, kdy každá řada obsahovala vzorky s počtem buněk 100, 1000, 10 000 a 100 000. Buňky z linie PC-3 DR12 byly naředěny a bylo získáno 5 vzorků s počtem buněk 25, 50, 100, 200 a 400. Takto připravené vzorky buněčných linií PC-3 a PC-3 DR12 o výše zmíněných počtech buněk byly dále použity při porovnávání metody izolace RNA a přímé lýzy buněk.

3.5 Laserová mikrodisekce

Laserová mikrodisekce představuje snadný způsob, jak získat konkrétní nádorové buňky z jejich okolní tkáně. Podle předpokladů měla být mikrodisekce zmrazených řezů tkáně snazší než mikrodisekce FFPE řezů tkáně. Pro ověření byla tedy provedena mikrodisekce obou typů tkáňových preparátů.

Pomocí systému P.A.L.M. (od firmy Zeiss) byla provedena laserová mikrodisekce dvou patientských vzorků. Prvním vzorkem byl FFPE tkáňový řez karcinomu prsu. Tento vzorek byl použit pouze jako srovnávací z hlediska efektivnosti použité metodiky. Druhým vzorkem byl zmrazený tkáňový řez (tzv. „frozen section“) karcinomu prostaty.

Na obrazovce počítače (který je napojen na systém laserové mikrodisekce) byly nejprve označeny (nádorové) buňky určené k mikrodisekci. Tyto buňky byly vybrány na základě přehledového barvení (kresyl violet) a znalostí morfologie nádorových buněk. Z FFPE vzorku řezu karcinomu prsu bylo pomocí LM vyizolováno cca 100, 1000 a 10 000 buněk. Ze zmrazeného vzorku řezu tkáně rakoviny prostaty bylo získáno cca 1000 a 10 000 buněk. Mikrodisekované buňky byly zachyceny na adhezní víčko mikrozkuhavky (AdhesiveCap, Zeiss) a použity pro další analýzu.

3.6 Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk

Pro co nejlepší optimalizaci RT-qPCR je důležité také zpracování buněčného materiálu. Za tímto účelem byla porovnána efektivita izolované RNA (kdy izolace byla prováděna pomocí SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit, RNeasy® Plus Micro Kit či AllPrep DNA/RNA FFPE kit) a přímo lyzovaných buněk (lýza probíhala pomocí TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT kit či CelluLyser Micro Lysis pufru). Tyto izolace RNA/lýzy buněk byly prováděny na vzorcích o různých počtech buněk, získaných z různých zdrojů (buněčná kultura, FFPE řezy tkáně či zmrazené řezy tkáně), což umožnilo porovnat šetrnost těchto metod k buněčné RNA.

3.6.1 SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit

RNA (z linie PC-3, ze vzorků obsahujících odlišné počty buněk) byla vyizolována pomocí SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kitu podle protokolu *SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification Kit Instruction Manual* udávaného výrobcem Thermo Fisher Scientific.

Z další řady buněk linie PC-3 obsahující vzorky o odlišných počtech buněk byla opět vyizolována RNA pomocí SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kitu podle protokolu *SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification Kit Instruction Manual* udávaného výrobcem Thermo Fisher Scientific. Na rozdíl od první sady vzorků, však bylo k těmto buňkám přidáno po 5 ul ($c=4$ ng/ul) Carrier RNA (poly A).

Pro důkaz přítomnosti RNA v získaných vzorcích byla koncentrace RNA změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

Koncentrace vyizolované RNA pomocí kitu SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit nebyla dostačující ani za použití Carrier RNA (poly A). Proto nebyly takto zpracované vzorky dále použity k analýze a tento postup nebyl k další optimalizaci metody RT-qPCR použit.

3.6.2 RNeasy® Plus Micro kit

Za další možnou metodu pro optimalizaci RT-qPCR byla předpokládána izolace RNA ze studovaných vzorků (z linie PC-3) pomocí RNeasy® Plus Micro Kit podle protokolu *RNeasy® Plus Micro Kit Quick-Start Protocol* dodávaného výrobcem Qiagen® za přidání 5 ul ($c=4$ ng/ul) Carrier RNA (poly A).

Následně byly použity docetaxel rezistentní buňky karcinomu prostaty PC-3 DR12, u nichž se vyskytuje mezenchymální fenotyp a očekává se tedy i vyšší exprese zájmových markerů – Skp2 a Slug. K suspenzi buněk o počtu buněk 25, 50, 100, 200 a 400 bylo opět přidáno 5 ul (c = 4 ng/ul) Carrier RNA (poly A) a poté byla provedena izolace RNA pro vzorky o počtu buněk 25, 50, 100 a 200 pomocí RNeasy® Plus Micro Kit. Pro důkaz přítomnosti RNA v získaných vzorcích byla koncentrace RNA změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

Tento kit byl použit také pro izolaci RNA z buněk karcinomu prostaty získaných mikrodisekcí ze zmrazeného tkáňového řezu („frozen sections“), neboť podle předpokladu měly být takto získané buňky vhodné k další analýze. Pro izolaci byly použity dva vzorky, obsahující cca 1000 a 10 000 buněk.

3.6.3 TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT

Prvním zástupcem metody přímé lýzy buněk byl kit TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT kit (Ambion). Byla provedena přímá lýze buněk linie PC-3, vzorků obsahujících 100, 1000, 10 000 a 100 000 buněk. Bylo postupováno podle protokolu *TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit USER GUIDE* udávaného výrobcem Ambion. Z důvodu malých objemů vzorků nebylo provedeno kontrolní měření koncentrace RNA.

3.6.4 CelluLyser Micro Lysis buffer

K dalšímu pokusu o přímou lýzi buněk pro účely RT-qPCR byl použit CelluLyser Micro Lysis pufr (výrobce TATAA Biocenter). K peletám vzorků obsahujících 100, 1000, 10 000 a 100 000 buněk (z linie PC-3) bylo přidáno 5, 10, 15 a 15 ul tohoto lyzačního pufru. Stejná metoda použita také pro srovnání s docetaxel-rezistentními buňkami karcinomu prostaty PC-3 DR12, které již získaly mezenchymální vlastnosti. Bylo použito 5 vzorků o počtu buněk 25, 50, 100, 200 a 400. K peletám vzorků buněk bylo ke každému vzorku přidáno 5 ul CelluLyser Micro Lysis pufru (výrobce TATAA Biocenter). Z důvodu malých objemů vzorků nebylo provedeno kontrolní měření koncentrace RNA.

3.6.5 AllPrep DNA/RNA FFPE kit

Jelikož zatím nebyly prozkoumány limity pro zacházení s mikrodisekovaným biologickým materiálem, byl pro izolaci RNA z takto získaných buněk (zde z FFPE

tkáňového řezu karcinomu prsu) zvolen AllPrep DNA/RNA FFPE kit. Bylo postupováno podle protokolu *AllPrep[®] DNA/RNA FFPE Handbook* udávaného výrobcem Qiagen[®] za sledování postupu pro purifikaci totální RNA bez smallRNA. Pro kontrolu byla změřena koncentrace vyizolované RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.

3.7 RT-qPCR

Všechny výše zmiňované metody izolace RNA/přímé lýzy buněk směřovaly k využití v metodě RT-qPCR. Výsledky této analýzy totiž umožňují srovnání použitých postupů, neboť kvalita získané RNA se přímo odráží ve výstupu z qPCR. Touto metodou lze tedy nejen detekovat zkoumané markery, ale také porovnat šetrnost a výnosnost použitých postupů.

Cílem RT-PCR (reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce) je detekovat hledaný znak nádorových epitelálních buněk na úrovni RNA sekvence (mRNA). Nejprve je za pomoci reverzní transkriptázy (metoda RT-PCR) izolovaná RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA), která je pak použita jako templát pro PCR reakci (**Bouchalová, et al., 2016**).

V této práci byl při optimalizaci postupu pro RT-qPCR sledován „house-keeping“ gen TBP, geny pro Skp2 a Slug byly sledovány teprve v poslední fázi, ze vzorku buněčné linie PC-3 DR12 o počtu buněk 200.

Pro všechny vzorky (**Tab. 4**) byla nejprve provedena RT-PCR. Pro tento účel bylo smícháno 0,25 ul 10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen[™]) s 0,25 ul DNase I, Amp Grade, 1 U/μl a přidány 2 ul RNA (cca 100 ng). Následovala inkubace (15 min, laboratorní teplota). Poté bylo přidáno 0,25 ul 25mM EDTA k inaktivaci Dnasy I a směs byla vložena do cycleru a zahřáta na 65 °C (10 min). Následně byla připipetováno 0,25 ul směsi primerů (10 uM random primers/ specific primers TBP s 0,25 ul nukleotidů (10 mM dNTP). Vzorky byly opět zahřáty na 65 °C (5 min). Dále byla ke vzorkům přidána směs 1 ul 5x first standard buffer, 0,25 ul 0,1 M DTT, 0,25 ul Protector RNase Inhibitor, 40 U/ul a 0,25 ul SuperScript III Reverse transcriptase, 200 U/ul. Vzorky byly vloženy do cycleru Mastercycler[®] gradient (výrobce Eppendorf), kde byly nejprve inkubovány (25 °C, 5 min), následovala reverzní transkripce (50 °C, 60 min) a inaktivace (70°C, 15 min). Takto byla získána cDNA pro každý vzorek.

Pro vzorek 200 buněk linie PC-3 DR12 a sledování genů Skp2 a Slug probíhala RT-PCR stejně jako pro gen TBP (viz výše), rozdíl spočíval pouze v objemech

jednotlivých chemikálií. V první části bylo smícháno 3,4 ul Rnase-free water, 1 ul 10x DNase I Reaction Buffer, 1 ul Dnase I a 4,65 ul RNA. Ve druhé fázi se odlišnosti týkaly objemů primerů a nukleotidů, konkrétně byl přidán 1 ul uM random primers a 1 ul 10 mM dNTP. Před samotnou reverzní transkripcí pak bylo přidáno 4 ul 5x first standard buffer, 1 ul 0,1 M DTT, 1 ul Protector RNase Inhibitor, 40 U/ul a 1 ul SuperScript III Reverse transcriptase, 200 U/ul.

Dále byla pro všechny výše uvedené vzorky provedena qPCR. Byl napipetován 1 ul cDNA z každého vzorku (v doubletech) do 96-ti jamkového panelu a do každé jamky se vzorkem cDNA bylo napipetováno 18 ul Mastermix TBP/Slug/Skp2 (dle toho, který gen byl sledován, viz Tab.5). Dále proběhla kvantitativní PCR v reálném čase pomocí LightCycler® 480 Instrument II, výrobce Roche. Tato metoda umožňuje přesnou a absolutní kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku (**Bouchalová, et al., 2016**).

Technika je založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence. Ta je úměrná množství PCR produktu (**Dvořák et al., 2008**).

4. Výsledky a diskuze

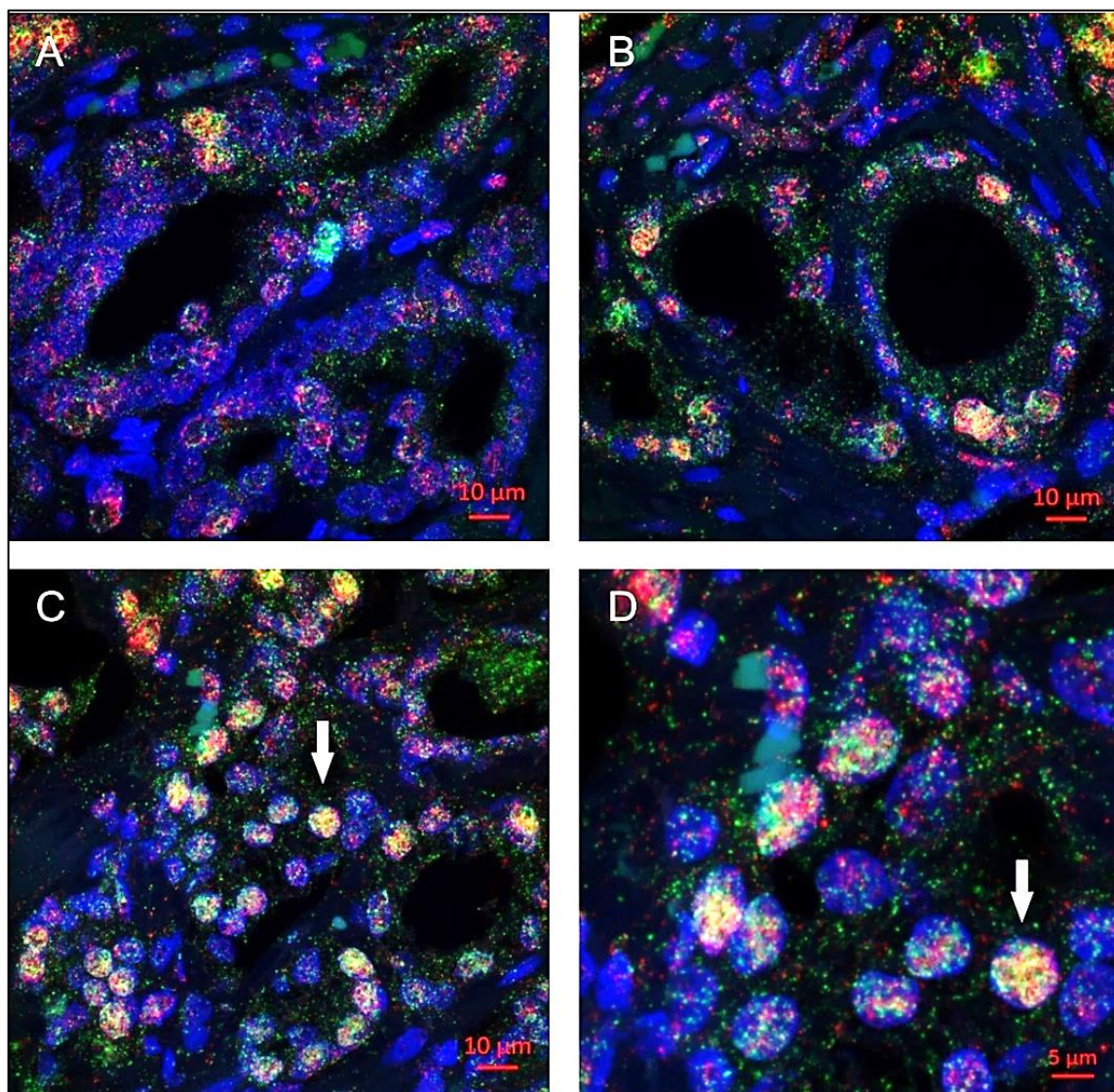
Tato část bakalářské práce navazuje na předchozí imunohistochemickou studii, ve které byla pozorována korelace mezi expresí Skp2 a Slug, zejména u pacientů s vysokým Gleasonovým skóre nebo s metastázemi v lymfatických uzlinách (viz kapitola 2.4.4). Pomocí multiplexního fluorescenčního barvení novou metodou Multiplex Opal (viz kapitola 2.7) byla potvrzena kolokalizace biomarkerů Skp2 a Slug ve stejných nádorových buňkách, zejména v místech s vysokým Gleasonovým skóre (**Obr.6 a 7**). To podporuje představu, že Skp2 a Slug společně přispívají k progresi karcinomu prostaty, což si zasluhuje další výzkum. Jednou z možností je bližší charakterizace nádorových buněk, které jsou pozitivní pro oba proteiny. Tyto dvojité pozitivní buňky je možné získat z tkáňových řezů pomocí laserové mikrodisekce. Před další analýzou takto získaných buněk je však nutné optimalizovat metody detekce. V první fázi jsme se rozhodli pro ověření citlivosti metody RT-qPCR pro „house-keeping“ gen TBP v malém počtu buněk, jak mikrodisekovaných, tak kultivovaných *in vitro* (viz kapitoly níže). Přehled vzorků použitých pro metodu RT-qPCR viz **Tab. 4**.

Tab.4: Přehled vzorků použitých pro RT-qPCR, použitých postupů pro lýzi buněk/izolaci RNA, primerů použitých pro reverzní transkripci a sledovaných genů.

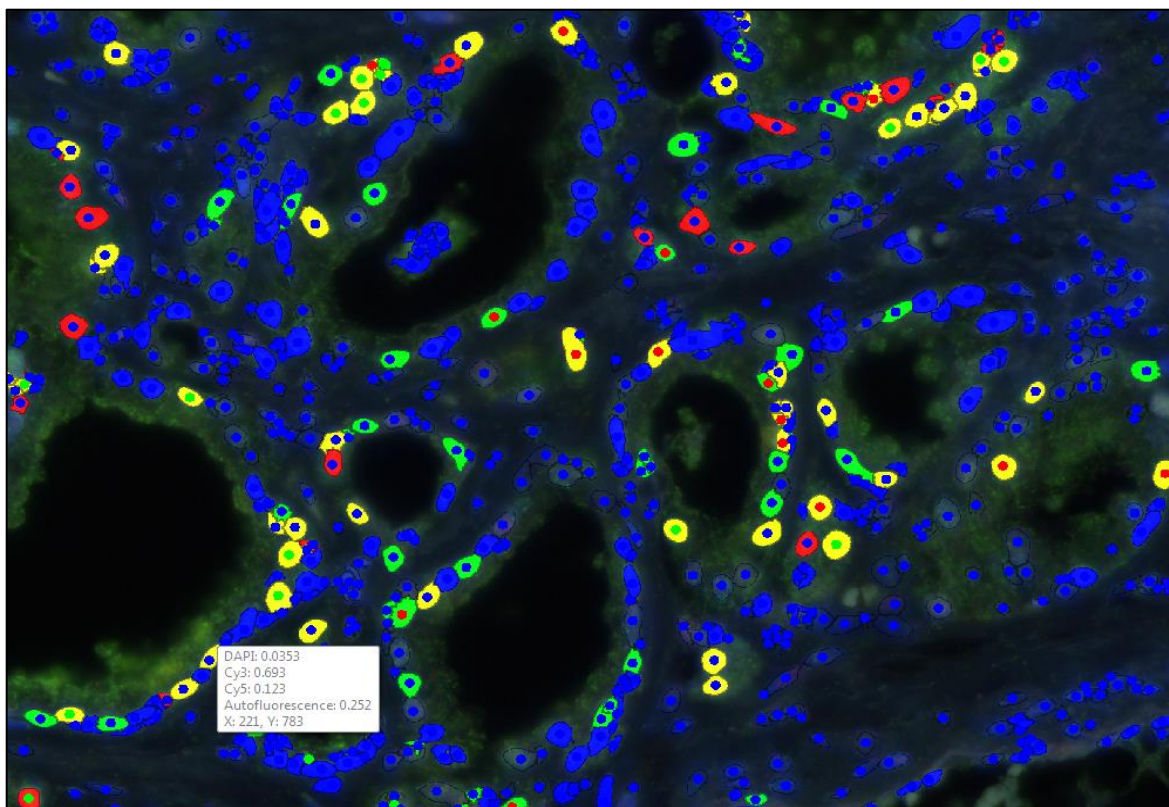
Sledovaný gen	Původ buněk	Počet vzorků	Počet buněk ve vzorcích	Kit/metoda použitá při lýze/izolaci RNA	Použité primery při RT-PCR
TBP	Buněčná linie PC-3	5	100	RNeasy® Plus Micro kit	Náhodné
			1000	+ Carrier RNA (poly A)	
			10 000	RNeasy® Plus Micro kit	
			100 000	+ Carrier RNA (poly A)	
				TaqMan® Gene Expression <i>Cells-to-CT</i>	
		<u>CelluLysér Micro Lysis buffer</u>			
	Buněčná linie PC-3 DR12		25	RNeasy® Plus Micro kit	
			50	+ Carrier RNA (poly A)	
			100	<u>CelluLysér Micro Lysis buffer</u>	
			200	<u>buffer</u>	
400					
Mikrodisekované buňky z FFPE tkáně CaP	3	100	AllPrep DNA/RNA FFPE kit		
		1000			
		10 000			
Mikrodisekované buňky zamrazeného tkáňového řezu CaP	2	1000	RNeasy® Plus Micro kit		
		10 000	+ Carrier RNA (poly A)		
Slug	Buněčná linie PC-3 DR12	1	200		Náhodné
Skp2					

4.1 Vícebarevné fluorescenční značení pro potvrzení kolokalizace Skp2 a Slug

Pomocí multiplexního fluorescenčního barvení metodou MultiplexOpal byla potvrzena kolokalizace biomarkerů Skp2 a Slug ve stejných nádorových buňkách (Obr.6 a 7). Kolokalizace byla častější v buňkách karcinomu s vyšším GS.



Obr.6: Kolokalizace byla častější v oblasti s vyšším GS (v tomto případě s GS=4; obrázky C,D) v porovnání s nižším GS (zde GS=3; obrázky A,B). Na obrázku D lze pozorovat příklad jádra s kolocalizovanými proteiny Skp2 (zeleně) a Slug (červeně). Vyhodnoceno konfokálním mikroskopem Zeiss, vyhodnotil Martin Mistrík, LIG



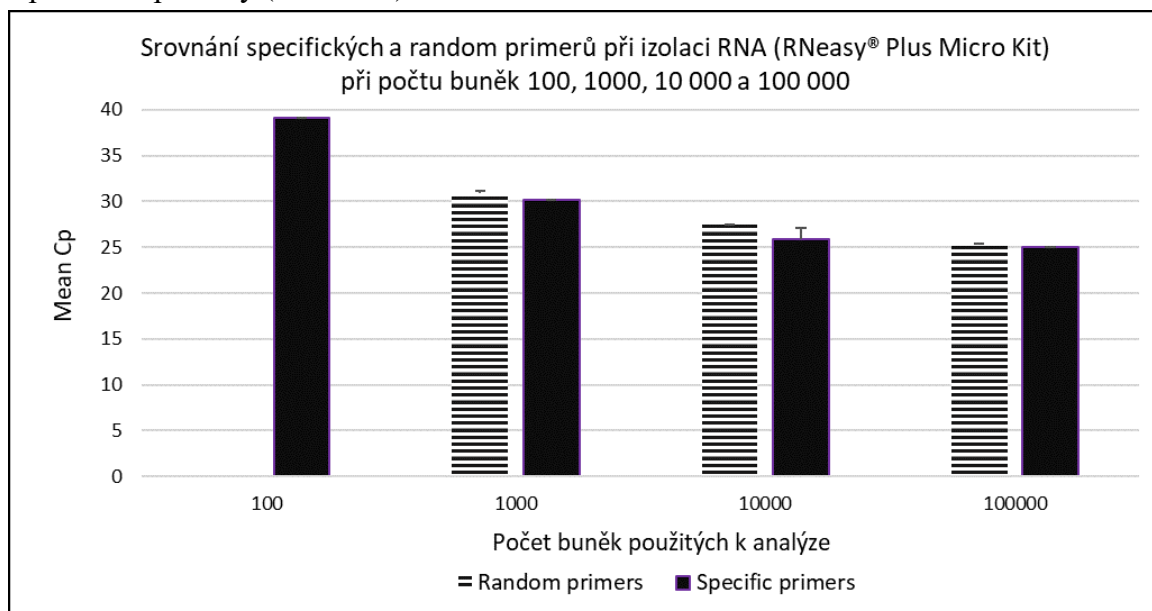
Obr.7: Kvantitativní vyhodnocení kolokalizace Skp2 a Slug pomocí systému The Mantra™ quantitative pathology workstation. Lze pozorovat buněčná jádra (modře – DAPI), pozitivitu Skp2 (zeleně) v 12,43 % buněk, Slug (červeně) v 6,35 % buněk a kolokalizaci Slug a Skp2 (žlutě) v 15,87 % buněk).

4.2 Srovnání použitelnosti specifických a náhodných primerů pro reverzní transkripci

Náhodné (random) primery jsou směsí náhodných hexamerů či oligo-dT primerů. V podstatě se jedná o směs všech možných kombinací šesti nukleotidových sekvencí, které se mohou náhodně napojit na mRNA a iniciovat tak reverzní transkripci jakékoliv oblasti RNA. Použití specifických primerů je zatím omezeno, neboť jejich příprava vyžaduje syntézu sekvencí nukleotidů, které se selektivně vážou na hledanou mRNA molekulu. Výhodou specifických primerů je skutečnost, že se reverzní transkripce stává procesem se specifickým cílem (Nikiforova a Nikiforov, 2011).

Podle předpokladů tedy měly specifické primery vykazovat zvyšovat míru exprese při qPCR a naše výsledky toto tvrzení podporují. Například, při počtu buněk 100 a použití náhodných primerů nebyla exprese TBP vůbec prokázána. Nicméně kromě neefektivnosti náhodných primerů je nutno vzít do úvahy také možnou ztrátu materiálu (buněk) během přípravy a samotné lýzy.

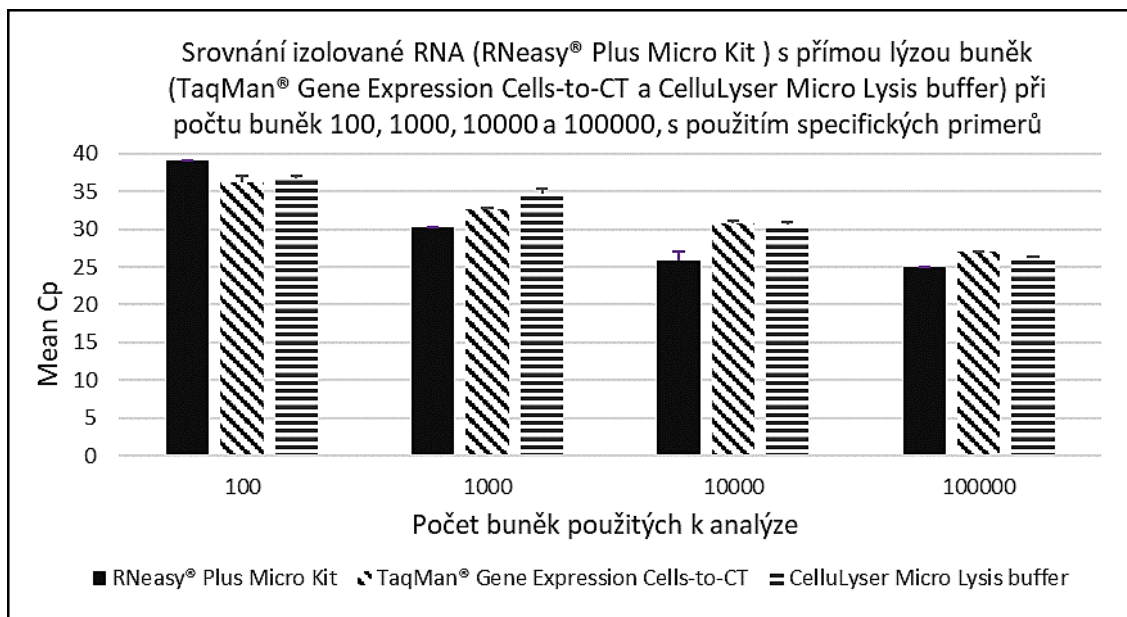
Při počtech buněk 1000, 10 000 a 100 000 však již můžeme pozorovat výhodnost použití specifických primerů. Ačkoliv největší rozdíl (který lze uvažovat) mezi specifickými a random primery byl pouze 1,665 cyklu, dále jsme již používali pouze specifické primery. Z výsledků vyplývá, že u menšího počtu buněk je vhodnější použít specifické primery (viz Obr.8).



Obr.8: Srovnání specifických (SP) a random primerů (RP) pro reverzní transkripci s použitím izolované RNA pomocí RNeasy® Plus Micro Kit při počtu buněk 100, 1000, 10 000 a 100 000.

4.3 Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk vzhledem k použitelnosti pro qPCR

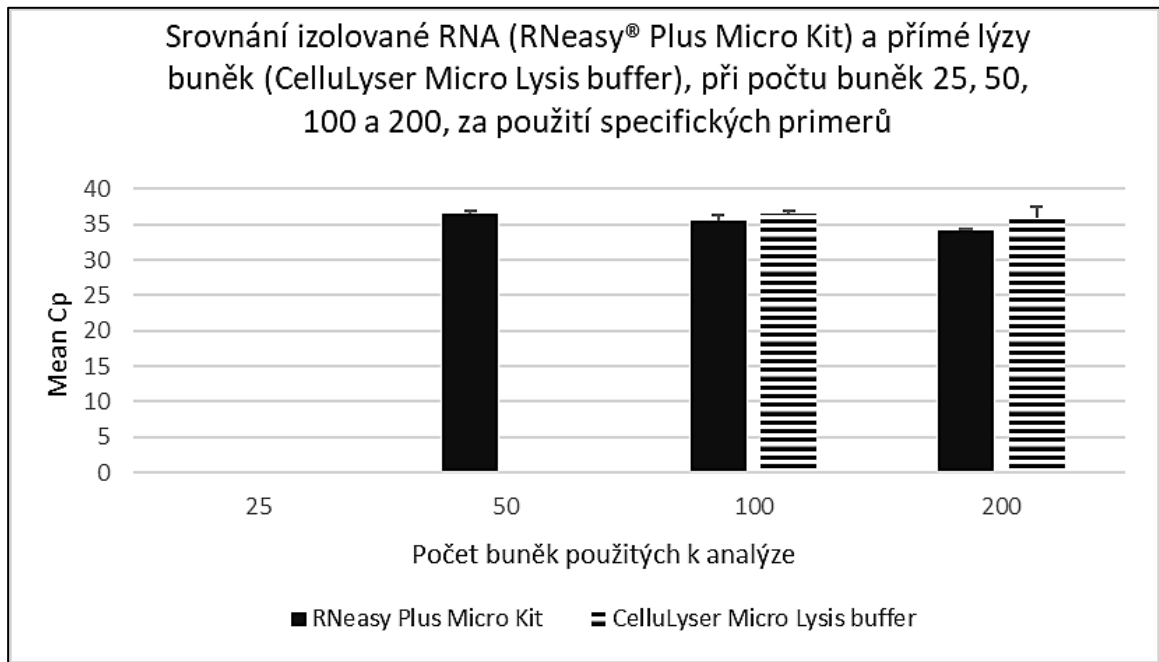
Bylo předpokládáno, že přímá lýze malého počtu buněk by měla být šetrnější a výhodnější (osobní doporučení prof. Dr. Mikaela Kubišty, PhD, odborníka na single-cell analýzu; viz publikace: STÅHLBERG, Anders a Mikael KUBISTA. The workflow of single-cell expression profiling using quantitative real-time PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2014, 14(3), 323-331, DOI: 10.1586/14737159.2014.901154. ISSN 1473-7159.) Byla provedena RT-qPCR pro všechny uvedené vzorky (**Tab.4**) a bylo zjištěno, že ačkoliv při nejnižším počtu buněk (100) se jeví jako výhodnější přímá lýze buněk (a to oběma způsoby), při vyšších počtech buněk je jednoznačně výhodnější použití izolované RNA (**Obr. 9**). Vzhledem k těmto odlišným výsledkům bylo provedeno další srovnání izolované RNA a přímé lýze (tentokrát pouze za použití CelluLyser Micro Lysis buffer), za účelem zjištění výhodnosti těchto dvou metod pro ještě nižší počty buněk.



Obr.9: Srovnání izolované RNA (pomocí RNeasy® Plus Micro Kit) a přímo lyzovaných buněk (pomocí TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT a CelluLyser Micro Lysis buffer) při počtu buněk 100, 1000, 10 000 a 100 000 s použitím specifických primerů.

4.4 Srovnání izolované RNA a přímo lyzovaných buněk u velmi malých počtů buněk

Z grafu (**Obr. 10**) je zřejmé, že i při velmi nízkých počtech buněk je izolovaná RNA (RNeasy® Plus Micro Kit) vhodnější než přímá lyze buněk (CelluLyser Micro Lysis buffer). Při počtu buněk 25 se nepodařilo expresi TBP z izolované RNA prokázat ani jedním postupem. Příčinou byla pravděpodobně ztráta materiálu (buněk) při přípravě vzorku nebo je hladina exprese pod detekčním limitem metody. Pokud bereme v potaz pouze výsledky z 50, 100 a 200 buněk, vhodnější je jednoznačně izolace RNA s použitím RNeasy® Plus Micro Kit.

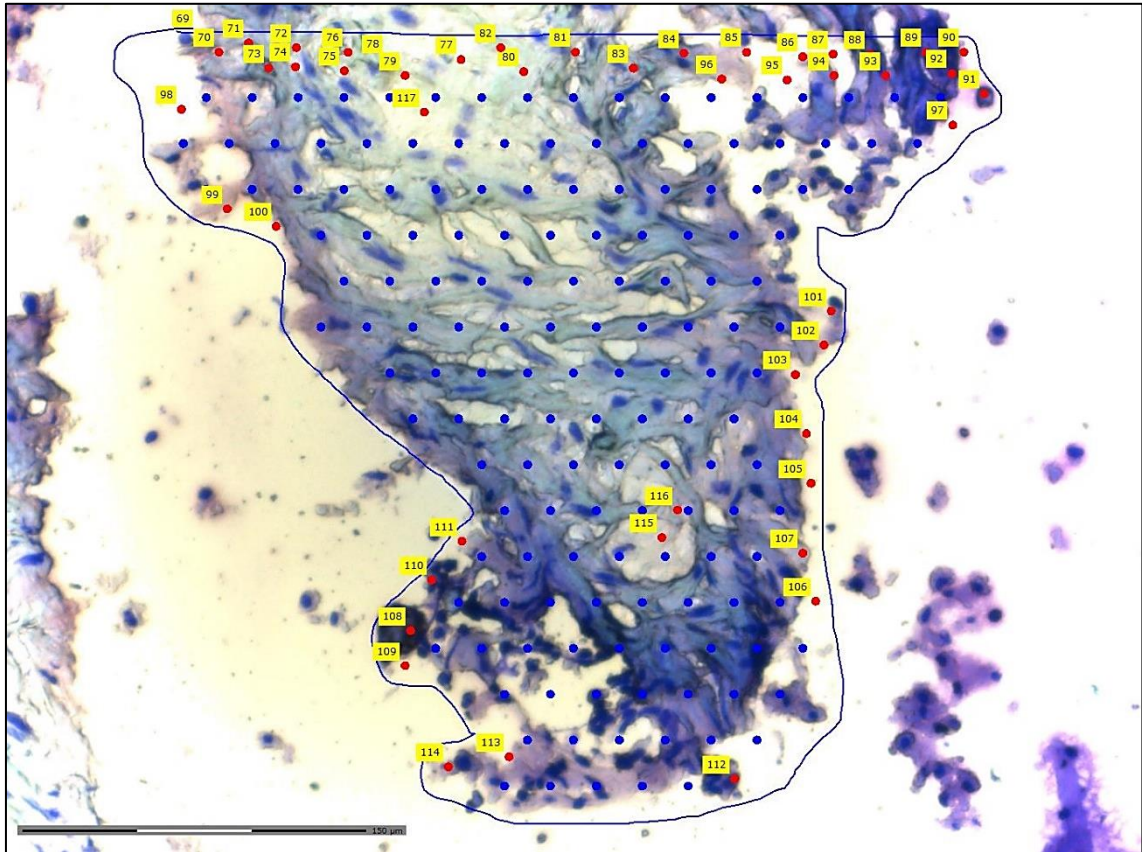


Obr.10: Srovnání izolované RNA (pomocí RNeasy® Plus Micro Kit) a přímo lyzovaných buněk (pomocí CelluLyser Micro Lysis buffer) při počtech buněk 25, 50, 100 a 200, za použití specifických primerů.

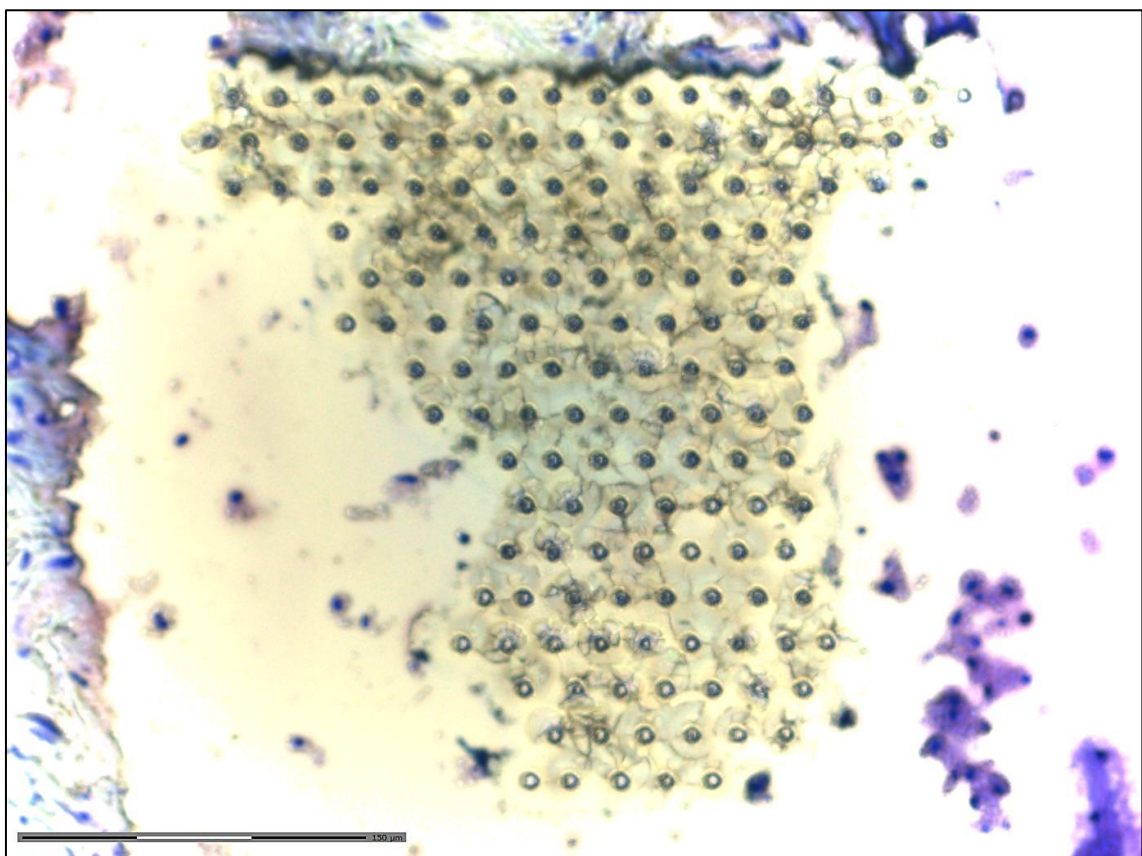
4.5 Srovnání mikrodisekovaných buněk z FFPE a zmrazených tkáňových řezů

Byly mikrodisekovány řezy karcinomu, konkrétně FFPE a zmrazené řezy tkáně. Dle předpokladů měla být mikrodisekce „frozen sections“ snazší a analýza takto získaných buněk měla být efektivnější než při použití tkání fixovaných ve formalínu (**Fend et al., 1999**).

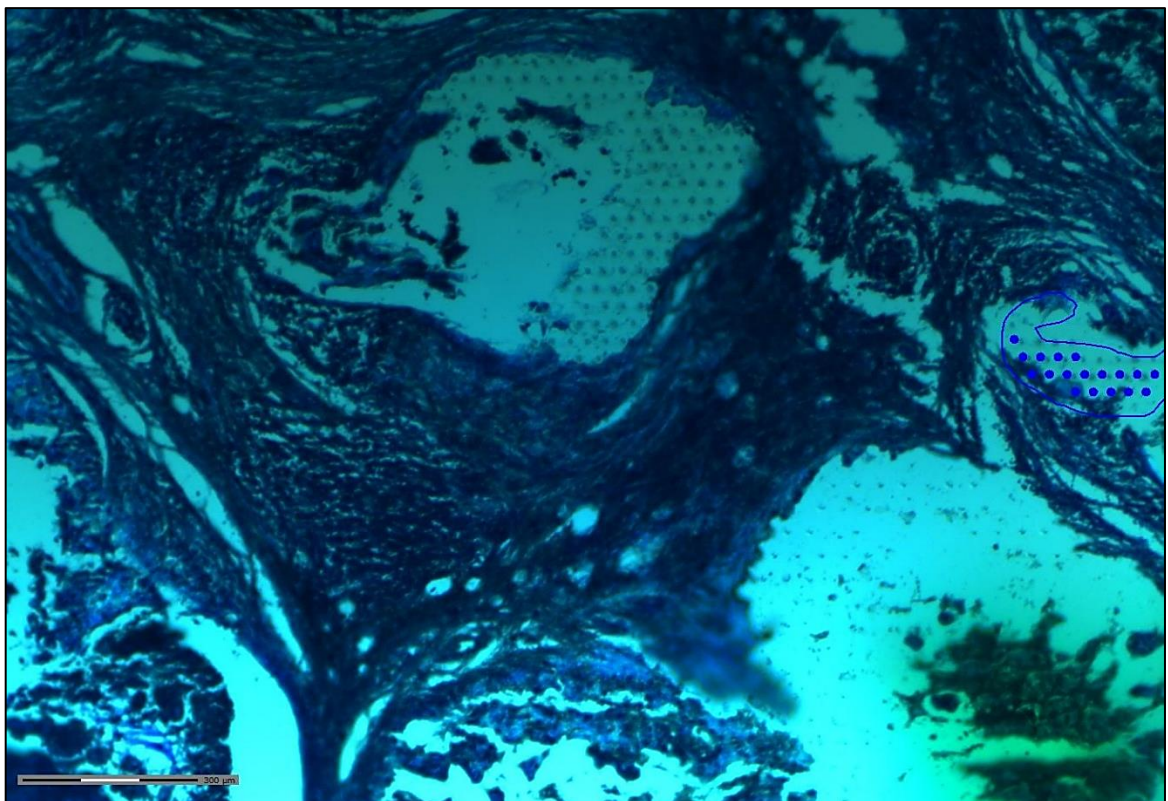
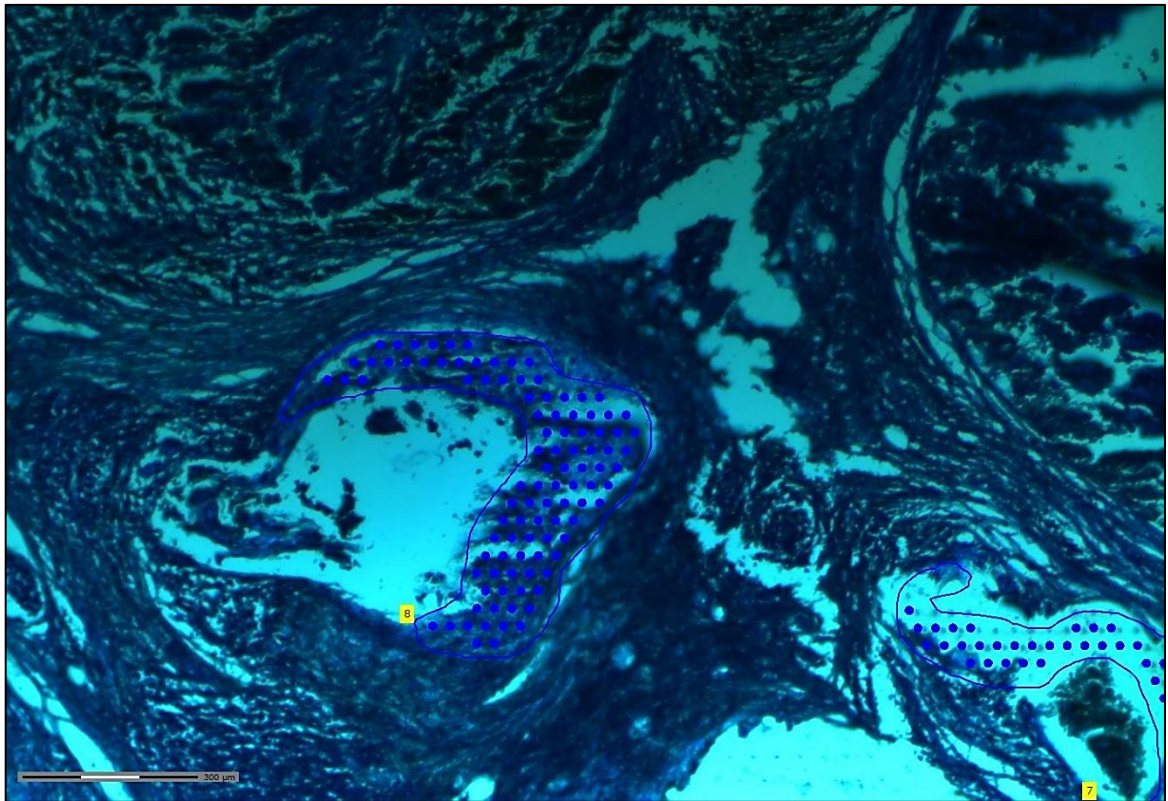
Ovšem již mikrodisekce buněk ze zmrazené tkáně probíhala komplikovaně, neboť byla pozorována vyšší adhezivita tkáně k podložnímu sklu. Proto bylo nutné zvýšit energii laseru, aby bylo dosaženo oddělení buněk z původní tkáně (**Obr. 11 a 12**). Zřejmě při tom došlo k poškození RNA, protože při RT-qPCR nebyla v těchto buňkách detekována žádná exprese genu TBP. Preparáty FFPE se pro tuto metodu ukázaly jako vhodnější, mikrodisekce probíhala bez problémů (**Obr. 13 a 14**) a vzorky byly použitelné pro RT-qPCR (**Obr. 15**).



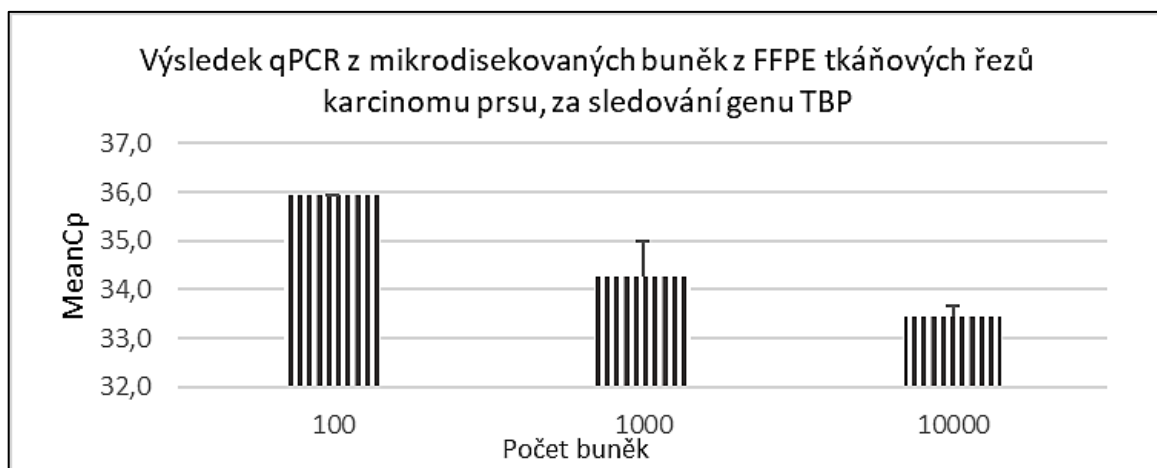
Obr. 11: Oblast buněk ze zmrazené tkáně CaP vybraná k mikrodisekci.



Obr. 12: Oblast po aplikaci laseru. Je zřejmé, že oproti mikrodisekci FFPE vzorku (Obr. 13 a 14), zde došlo k mírnému poničení okolní tkáně a kvůli vysoké energii použitý laser zanechal také stopy na podložním skle.



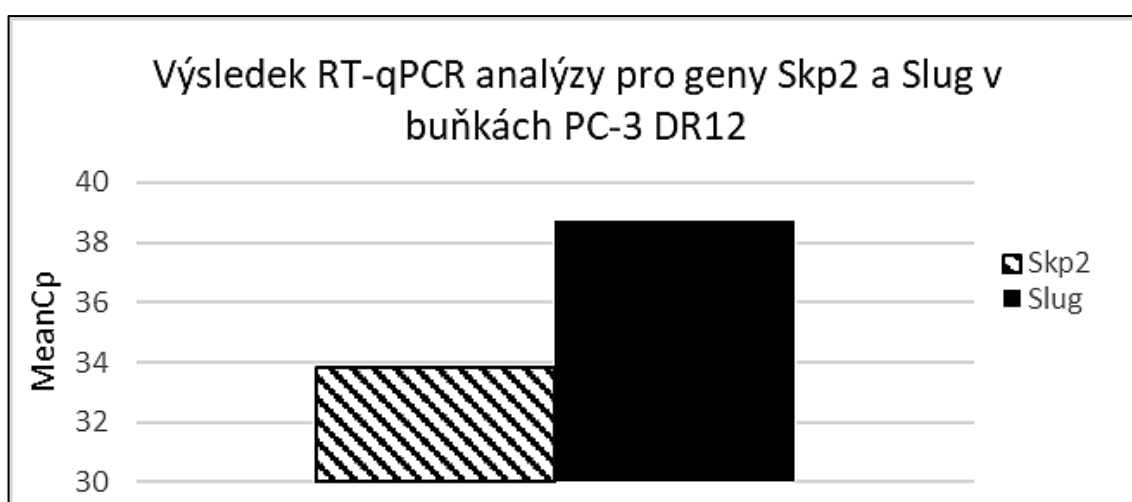
Obr. 13 a 14: Laserová mikrodisekce FFPE vzorků řezů tkáně karcinomu prsu. Obr. 13 znázorňuje oblast určenou k mikrodisekci, Obr. 14 ukazuje tkáň po aplikaci laseru, kdy zvolené buňky jsou již přichyceny na adhezním víčku mikrozkuhavky.



Obr.15: Znázornění výsledků qPCR analýzy z FFPE tkáňových řezů karcinomu prsu, byla sledována exprese genu TBP. Exprese genu TBP ze zmrazených mikrodisekovaných buněk nebyla vůbec detekována.

4.6 Testování primerů pro Skp2 a Slug a průkaz jejich exprese pomocí RT-qPCR

RT-qPCR z buněk linie PC-3 DR12, kdy byla použita izolovaná RNA, potvrdila společnou expresi těchto dvou biomarkerů (**Obr. 16**). Pro tento experiment byly použity buňky linie PC-3 DR12 (docetaxel rezistentní). Exprese byla prokázána ve 200 buňkách, což je počet, který je reálně získat i pomocí mikrodisekce fluorescenčně značených tkáňových řezů. V další práci se chceme zaměřit na bližší charakterizaci takto mikrodisekovaných buněk a další geny, které mohou být zodpovědné za agresivitu těchto nádorových buněk.



Obr. 16: Výsledek qPCR z buněk linie PC-3 DR12, byla sledována exprese genů Skp2 a Slug. Z buněk byla RNA vyizolována pomocí RNeasy® Plus Micro Kit, byly použity specifické primery.

Metodou vícebarevného fluorescenčního značení jsme tedy úspěšně prokázali kolokalizaci markerů Skp2 a Slug, jejichž společné působení nejspíše přispívá k progresi karcinomu prostaty. Tento předpoklad je navíc podpořen faktem, že míra kolokalizace těchto markerů se zvyšovala se vzrůstajícím GS v patientských vzorcích karcinomů prostaty. Společně s Skp2 a Slug se na vzniku CRPC podílejí také další biomarkery, například Twist1 (**Ruan et al., 2017**) a EZH2 (**Lu et al., 2017**).

Pro získání dvojité pozitivních buněk karcinomu prostaty (pro Skp2 a Slug) laserovou mikrodisekcí z řezů tkáně a jejich další analýzy byla prováděna optimalizace metody RT-qPCR při použití malého počtu buněk.

Pro optimalizaci byly vybrány kultivované buněčné linie PC-3 a PC-3 docetaxel-rezistentní. Bylo zjištěno, že použití specifických primerů při reverzní transkripci je oproti náhodným primerům výhodnější, neboť se specifickými primery byly při qPCR detekovány nižší Ct hodnoty, což vypovídá o vyšší expresi hledaného genu. Ve vzorku o počtu buněk 100 nebyla exprese genu TBP při použití náhodných primerů vůbec detekována. Lze tedy říci, že specifické primery zvyšují citlivost a výnosnost metody RT-PCR. Pro zpracování buněk nám byla doporučena přímá lýze buněk, která je obecně považována za šetrnější a efektivnější. Ovšem při provedených experimentech bylo jasně prokázáno, že izolací RNA lze oproti přímé lýze buněk detekovat hledané geny v mnohem nižším počtu buněk a s mnohem vyšší citlivostí. Tyto výsledky byly potvrzeny i v případě použití FFPE řezů tkáně. Ukázalo se, že citlivost metody izolace RNA (v našem případě pomocí RNeasy® Plus Micro Kit, Qiagen) ještě podporuje přidaný nosič RNA, který stabilizuje a chrání molekulu RNA. Takto se nám podařilo detekovat kontrolní gen TBP v pouze 50 buňkách. V budoucnu by však určitě bylo přínosem prozkoumat limity této metody i při daleko nižších počtech buněk.

Po optimalizaci metody RT-qPCR byly porovnány FFPE vzorky a „frozen sections“ vzhledem k jejich použitelnosti pro laserovou mikrodisekci. Ačkoliv „frozen sections“ nepodléhají výrazným změnám díky šetrnější fixaci, pro laserovou mikrodisekci se v pilotních pokusech ukázaly jako nevhodné. Problém tkvěl v přílišné adhezivitě tkáně k podložnímu sklu a při izolaci buněk musela být energie laseru velmi vysoká, což pravděpodobně zničilo izolované buňky. Naopak, buňky získané laserovou mikrodisekcí z formalín fixované tkáně byly relativně nepoškozené a mikrodisekce probíhala snadno. I při relativně nízkém počtu takto získaných buněk (1000) byla úspěšně provedena RT-qPCR a byla detekována exprese TBP.

Pro budoucí experimenty zaměřené na zkoumání exprese Skp2 a Slug bylo provedeno ještě otestování specifických primerů pro tyto dva geny. Metodou qPCR byla potvrzena exprese obou genů ve 200 buňkách linie PC-3 DR12.

Jelikož byla dokázána kolokalizace Skp2 a Slug ve stejných nádorových buňkách CaP, byla vhodně optimalizována metoda RT-qPCR pro analýzu exprese těchto genů a byly otestovány možnosti laserové mikrodisekce, je možné v budoucnu využít těchto získaných poznatků k dalším experimentům.

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala detekcí kolokalizace biomarkerů Skp2 a Slug, které pravděpodobně hrají důležitou roli při vzniku agresivnějších forem karcinomu prostaty.

První část literární rešerše byla zaměřena na obecné informace o prostatě, mechanismu vzniku a rozvoji karcinomu prostaty a současné diagnostické a terapeutické postupy. Další část se zabývá imunohistochemickými metodami a jejich využitím v diagnostice CaP. Závěr literární části se týkal metody laserové mikrodisekce a postupů při zpracování vzorků tkáně.

V experimentální části byla nejprve studována kolokalizace Skp2 a Slug v několika patientských FFPE tkáňových vzorcích CaP. Pomocí vícebarevného fluorescenčního barvení a systému „Mantra™ quantitative pathology workstation” (Perkin Elmer) byla kolokalizace těchto markerů potvrzena a byla provedena orientační kvantifikace exprese těchto genů (viz kapitola 4.1).

Dalším cílem bylo optimalizovat metodu RT-qPCR pro budoucí využití v detekci studovaných biomarkerů (Skp2, Slug, ale i dalších možných zájmových genů). Při optimalizaci této metody za sledování “house-keeping” genu TBP bylo zjištěno, že pro analýzu malého počtu kultivovaných buněk je výhodnější použít specifické primery oproti náhodným. Byla také porovnávána izolovaná RNA a přímá lýze buněk pomocí různých kitů. Z dosažených výsledků je patrné, že nejvýhodnější volbou je izolace RNA z kultivovaných buněk pomocí kitu RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen) s přidaným nosičem RNA.

Dále byla provedena izolace RNA z buněk linie PC-3 DR12, které mají mezenchymální fenotyp a předpokládá se u nich vysoká exprese Skp2 i Slug. Testovaný vzorek obsahoval cca 200 buněk, izolace byla provedena pomocí uvedeného kitu s přidavkem nosiče RNA a byly použity specifické primery pro Skp2 a Slug.

Výsledky ukázaly, že Skp2, Slug a pravděpodobně i další geny je možné sledovat v malém počtu buněk, které je reálné získat i z tkáňových řezů pomocí mikrodisekce. Řezy formalin fixovaných tkání bylo možné snadno mikrodisekovat, avšak dosažené Ct hodnoty byly nižší než u kultivovaných buněk. Kvalita RNA by měla být lepší z řezů připravených ze zmrazených tkání, ale mikrodisekce pilotních vzorků nebyla úspěšná.

V optimalizaci tohoto postupu budeme dále pokračovat, v budoucnu by mohly být sledovány také jiné důležité markery, které jsou zodpovědné za progresi nádorového onemocnění.

6. Seznam citované literatury

- 1) **ADAM**, Zdeněk, Jiří **VANÍČEK** a Jiří **VORLÍČEK**. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0896-5.; str. 170
- 2) **AUS**, G., C.C. **ABBOU**, D. **PACIK**, H-P. **SCHMID**, H. **VAN POPPEL**, J.M. **WOLFF** a F. **ZATTONI**. GUIDELINES EAU PRO DIAGNOSTIKU A TERAPII KARCINOMU PROSTATY. *Urologické listy* [online]. 2003, 2003, **2003**(1), 32-69 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?id=ul_03_01_07.pdf
- 3) **BARTUŇKOVÁ**, Jiřina a Milan **PAULÍK**. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2011, 164 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3533-7., str. 76-79
- 4) **BARTUŇKOVÁ**, Jiřina, Radek **ŠPÍŠEK**, Michal **PODRAZIL** a Ladislav **JAROLÍM**. Imunoterapie a karcinom prostaty. *Česká urologie*. 2014, 18(4), 273-278.
- 5) **BERANOVÁ**, Milena a Zbyněk **TONAR**. Principy a příklady imunohistochemie: příručka pro studenty[online]. 2002 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni
- 6) **BOUCHALOVÁ**, Kateřina a Marián **HAJDÚCH**. *Prediktivní a prognostická onkologie*. I. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. ISBN 978-80-244-3188-8.
- 7) **BRYCHTOVÁ**, Svetlana a Alice **HLOBILKOVÁ**. *Histopatologický atlas*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1650-3.
- 8) **CANENE-ADAMS**, Kirstie. Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue for Immunohistochemistry. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate* [online]. Elsevier, 2013, 2013, , 225-233 [cit. 2018-04-16]. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00015-5. ISBN 9780124200678. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124200678000155>
- 9) **CASAS**, E., J. **KIM**, A. **BENDESKY**, L. **OHNO-MACHADO**, C. J. **WOLFE** a J. **YANG**. Snail2 is an Essential Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(1), 245-254 [cit.

- 2018-03-07]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2330. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-2330>
- 10) **COBALEDA**, César, María **PÉREZ-CARO**, Carolina **VICENTE-DUEÑAS** a Isidro **SÁNCHEZ-GARCÍA**. Function of the Zinc-Finger Transcription Factor SNAI2 in Cancer and Development. *Annual Review of Genetics*[online]. 2007, **41**(1), 41-61 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130146. ISSN 0066-4197. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.41.110306.130146>
- 11) **ČAPOUN**, Otakar, Roman **SOBOTKA**, Petr **MACEK** a Tomáš **HANUŠ**. PREDIKTIVNÍ PARAMETRY ZÁCHYTU KARCINOMU PROSTATY V SATURAČNÍ BIOPSII PROSTATY. *Česká urologie*. 2012, 16(3), 163-170.
- 12) **DUDOVÁ**, Silvie a Roman **HÁJEK**. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*, Aps Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, roč. 21, S1, s. 220-222. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3337.pdf>
- 13) **DUŠEK**, Ladislav, Jan **MUŽÍK**, Denisa **MALÚŠKOVÁ**, et al. Cancer Incidence and Mortality in the Czech Republic. *Klinická onkologie*[online]. 2014, **27**(6), 406-423 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.14735/amko2014406. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4575/>
- 14) **Dvořáček**, J.; Šafařík, L.: Nádory prostaty. Terapie. In: Dvořáček, J.; Babjuk, M., et al.: *Onkourologie*. Galén a Karolinum 2005, 225–431.
- 15) **DVOŘÁK**, Karel, Zdeňka **DVOŘÁKOVÁ**, Josef **FEIT**, Zdeněk **LUKÁŠ** a Jana **ŠMARDOVÁ**. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod* [online]. 12.5.2008 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLHM0422c/um/Zaklady_histopatologickych_vysetrovacich_metod.pdf
- 16) **FALTÝSKOVÁ**, Zuzana. Aplikace laserové mikrodisekce v oblasti forenzní genetiky [online]. Praha, 2007 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/92820/BPTX_2006_2_11310_MDIPL001_170663_0_33079.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Martin Krátký.

- 17) **FEND**, Falko, Michael R. EMMERT-BUCK, Rodrigo CHUAQUI, Kristina COLE, Jeff LEE, Lance A. LIOTTA a Mark RAFFELD. Immuno-LCM: Laser Capture Microdissection of Immunostained Frozen Sections for mRNA Analysis. *The American Journal of Pathology* [online]. 1999, **154**(1), 61-66 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65251-0. ISSN 00029440. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010652510>
- 18) **FOJTÍKOVÁ**, Lucie. Příprava rekombinantních protilátek. *Bioprospect* [online]. Praha, 2013, **23**(2), 27-29 [cit. 2018-04-14]. ISSN 1210-1737. Dostupné z: http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprospect_c2_2013.pdf
- 19) **HANUŠ**, Tomáš a Petr MACEK a kolektiv!! Urologie pro mediky [online]. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015 [cit. 2018-01-17]. ISBN 978-802-4630-083., str.100-113
- 20) **HRADIL**, David, Vladimír ŠTUDENT JR., Milan KRÁL a Vladimír ŠTUDENT. Diagnostika a staging karcinomu prostaty. *Onkologie* [online]. 2014, 2014, **8**(1), 15-18 [cit. 2018-01-17]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/01/04.pdf>
- 21) **HUMPHREY**, Peter A. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*[online]. 2012, **60**(1), - [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04039.x. ISSN 03090167. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2011.04039.x>
- 22) **CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ**, Magdalena a Eliška MISTROVÁ. LASEROVÁ MIKRODISEKCE – HISTORIE A SOUČASNOST. PLZEŇSKÝ LÉKAŘSKÝ SBORNÍK [online]. Karolinum, 2016, 2016, **81/2015**, 125-128 [cit. 2018-01-19]. ISSN 0551-1038. Dostupné z: https://www.cupress.cuni.cz/ink2_stat/dload.jsp?prezMat=88010
- 23) **KNUDSEN**, Beatrice S. a Valera VASIOUKHIN, 2010. Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression. Elsevier, 2010, 1-50. *Advances in Cancer Research*. DOI: 10.1016/B978-0-12-380890-5.00001-6. ISBN 9780123808905.
- 24) **Kolombo**, I.; Poršová, M.; Zemanová, I.; Horecký, M.; Antonová, P.; Vlášek, T.; Porš, J.; Poněšický, J.; Bartůněk, M., Prostatický specifický antigen (PSA) - situace v roce 2007. *Onkologie* 2008, **2** (1), 39-43.
- 25) **KRÁL**, Milan, Vladimír ŠTUDENT, Daniela KURFŮRSTOVÁ, Aleš VIDLÁŘ a Ladislava KUČEROVÁ. GLEASONOVO SKÓRE V BIOPSII LEASONOVO SKÓRE V BIOPSII A PO RADIKÁLNÍ PROSTATEKTOMII – PO RADIKÁLNÍ

- PROSTATEKTOMII – ZMĚNY PO KONFERENCI ISUP 2005 MĚNY PO KONFERENCI ISUP 2005 A VÝZNAM PRO UROLOGA. UROLOGIE PRO PRAXI [online]. 2007, 2007, 8(4), 173-178 [cit. 2018-01-17]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2007/04/07.pdf>
- 26) **KRÁL**, Milan, Vladimír ŠTUDENT ML., Michal GREPL, Aleš VIDLÁŘ, František HRUŠKA a Vladimír ŠTUDENT. Aktivní sledování u karcinomu prostaty. *Česká urologie* [online]. 2014, 1.6.2014, **18**(3), 208-215 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.czechurol.cz/pdfs/cur/2014/03/05.pdf>
- 27) **LIN**, Hui-Kuan, Zhenbang CHEN, Guocan WANG, et al. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* [online]. 2010, **464**(7287), 374-379 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1038/nature08815. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature08815>
- 28) **Lu W.**, Liu S., Li B., Xie Y., Izban M.G., Ballard B.R., Sathyanarayana S.A., Adunyah S.E., Matusik R.J., Chen Z. SKP2 loss destabilizes EZH2 by promoting TRAF6-mediated ubiquitination to suppress prostate cancer. *Oncogene* [online]. 2017, **36**(10), 1364-1373 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1038/onc.2016.300. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/onc2016300>
- 29) **LUČANOVÁ**, Světlana. *CYKLIN-DEPENDENTNÍ KINÁZY V PATOGENEZI MNOHOČETNÉHO MYELOMU* [online]. Brno, 2013 [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/375703/prif_b/Final_4..pdf. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav Biochemie. Vedoucí práce RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
- 30) **LUKEŠ**, Martin a Tomáš NOVOTNÝ. Současná farmakoterapie benigní hyperplazie prostaty. *Remedia* [online]. 2014, 24.6.2014, (6), 454-458 [cit. 2018-01-15].
- 31) **LUKEŠ**, M., M. ZÁLESKÝ, J. HERÁČEK a A KOL. P53 A KARCINOM PROSTATY. *Klinická onkologie* [online]. 2003, 2003, 16(3), 141-144 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/40/843.pdf>
- 32) **LÜLLMANN-RAUCH**, Renate, 2012. *Histologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3729-4., str. 415
- 33) **LUŽNÁ**, Pavla a Jiří EHRMANN JR. Laserová mikrodisekce a její praktické aplikace. *Česko-slovenská patologie* [online]. 2013, 2013, 49(4), 123-125 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <http://www.cspatologie.cz/docs/598-abstraktCZ.pdf>

- 34) **MA**, H. a R. O'KENNEDY. Recombinant antibody fragment production. *Methods* [online]. 2017, **116** [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.11.008. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202316304492>
- 35) **MARTÍNEK**, Jindřich a Zdeněk VACEK. Histologický atlas [online]. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8. str. 78
- 36) **MATOUŠKOVÁ**, Michaela a Miroslav HANUŠ. MOŽNOSTI LÉČBY KASTRAČNĚ REFRAKTERNÍHO KARCINOMU PROSTATY, CO NOVÉHO K ROKU 2013: New therapeutic modalities for castrate resistant prostate cancer at the beginning of 2013. *Česká urologie* [online]. Praha, 17(3), 141-153.
- 37) **MATOUŠKOVÁ**, Michaela. Zhoubné nádory prostaty. *Vesmír*, 2004, 83(5), s. 263-267. ISSN 0042-4544.
- 38) **MATOUŠKOVÁ**, MUDr. Michaela. Farmakoterapie karcinomu prostaty. *Remedia*. Praha, 2006, (12006).
- 39) **MOTTET**, N., P.J. BASTIAN, J. BELLMUNT, et al. Guidelines pro léčbu karcinomu prostaty 4. část. *Urologické listy* [online]. 2015, 2015, **13**(1), 47-74 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://www.urologickelisty.cz/pdf?id=51727>
- 40) **NIKIFOROVA**, Marina N. a Yuri E. NIKIFOROV. Molecular Anatomic Pathology. *Diagnostic Immunohistochemistry* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 42-57 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5766-6.00006-6. ISBN 9781416057666. Dostupné z: http://www.crossref.org/deleted_DOI.html
- 41) **PATEL**, Uday. The prostate and seminal vesicles. *Clinical Ultrasound* [online]. Elsevier, 2011, 2011, , 572-592 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3131-1.00030-4. ISBN 9780702031311. Dostupné z: http://www.crossref.org/deleted_DOI.html
- 42) **PLECHÁČKOVÁ**, Anna. Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty: Risk factors of prostate cancer. Praha, 2006. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA – 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA. Vedoucí práce MUDr. Martin Lukeš.
- 43) **POLÁKOVÁ**, Jana. AKTUÁLNÍ MOŽNOSTI LASEROVÉ MIKRODISEKCE PRO STUDIUM JEDNOTLIVÝCH BUNĚK NA ÚROVNI GENOMU, TRANSKRIPTOMU A PROTEOMU. Brno, 2011. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA. Vedoucí práce RNDr. Eva Matalová, Ph.D.
- 44) **RENSHAW**, S. *Immunohistochemistry*. Bloxham: Scion, 2007. ISBN 9781904842170.

- 45) **RUAN, D, J HE, C-F LI, H-J LEE, J LIU, H-K LIN a C-H CHAN.** Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene* [online]. 2017, **36**(30), 4299-4310 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1038/onc.2017.64. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2017.64>
- 46) **RŮČKOVÁ, Eva, Petr MÜLLER a Bořivoj VOJTĚŠEK.** Protein Expression and Purification. *Klinická onkologie* [online]. 2014, **27**(Suppl 1), S92-S98 [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.14735/amko20141S92. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4494/>
- 47) **SIKOROVÁ, Kateřina.** Metylační analýza genu ZNF185 u karcinomů prostaty. Olomouc, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Mgr. Barbora Fialová; str. 19
- 48) **SOBIN, L.H., M.K. GOSPODAROWICZ a Ch. WITTEKIND.** TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 7. 2011. ISBN 978-80-904259-6-5.
- 49) **STACK, Edward C., Chichung WANG, Kristin A. ROMAN a Clifford C. HOYT.** Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* [online]. 2014, **70**(1), 46-58 [cit. 2018-03-10]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.08.016. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202314002837>
- 50) **VAN DER KWAST, Theodorus H.** Prognostic prostate tissue biomarkers of potential clinical use. *Virchows Archiv* [online]. 2014, 464(3), 293-300 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1007/s00428-014-1540-7. ISSN 0945-6317. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1540-7>
- 51) **VARGA, Gabriel, Pavel KRUPA, Pavel ŠLAMPA a Dalibor Pacík.** Léčba lokalizovaného a lokálně pokročilého karcinomu prostaty z pohledu urologa a radiačního onkologa. *Česká urologie*. 2015, 19(4), 256-269.
- 52) **VELKOVÁ, Michaela.** Uplatnění imunohistochemických metod v diagnostice novotvarů. 2013. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce MUDr. Pavel Holan.
- 53) **VRÁNOVÁ, Jana.** Radioterapie nádorů prostaty technikou IMRT a její toxicita. 2012. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce MUDr. Hana Šiffnerová, Ph.D.

- 54) WANG, Zhiwei, Daming GAO, Hidefumi FUKUSHIMA, Hiroyuki INUZUKA, Pengda LIU, Lixin WAN, Fazlul H. SARKAR a Wenyi WEI. Skp2: A novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2012, **1825**(1), 11-17 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.09.002. ISSN 0304419X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X11000461>
- 55) WU, Kaijie, Crystal GORE, Lin YANG a et al. Slug, a Unique Androgen-Regulated Transcription Factor, Coordinates Androgen Receptor to Facilitate Castration Resistance in Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology* [online]. 2012, 2012, 26(9), 1496–1507 [cit. 2018-01-17]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mend/article/26/9/1496/2614915>

