

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV KLINICKÉ A MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

MUDr. DANIELA KURFÜRSTOVÁ

**VÝZNAM VYBRANÝCH PROTEINŮ V KLINICKO-PATOLOGICKÉM HODNOCENÍ
KARCINOMU PROSTATY**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

ŠKOLITEL: PROF. MUDr. JIŘÍ BÁRTEK, CSc.

STUDIJNÍ OBOR: PATOLOGICKÁ ANATOMIE A SOUDNÍ LÉKAŘSTVÍ

OLOMOUC 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou literaturu a jiné prameny.

V práci jsou uvedeny výsledky, které byly získány ve spolupráci s níže uvedenými kolegy. Sestavení celého studovaného souboru pacientů, vypracování metodiky fixace tkáně a imunohistochemickou analýzu 8 protilátek (NQO1, cyklinu D1, Ki67, PTEN, p53, SMAD4, SPP1 a pRb) jsem provedla pod vedením mého školitele prof. MUDr. Jiřího Bárta, CSc. z Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP. Analýzu dalších protilátek (8-oxoguanin, γ H2AX, ATM, Rev7, JMJD1C, 53BP1), tentokrát u části souboru s rychlou fixací, provedla MUDr. Jiřina Bárťková, CSc. z Institute of Cancer Biology v Kodani. Optimalizaci imunohistochemických protilátek a jejich barvení prováděla Mgr. Eva Havlíčková Sedláková z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc. Genotypizaci NQO1 provedl doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D. z Ústavu lékařské genetiky LF UP a FN Olomouc. Status TMPRSS2-ERG hodnotila Mgr. Alena Burdová z Laboratoře lékařské genetiky v Novém Jičíně pomocí metody FISH a Mgr. Alena Mičková z našeho ústavu pomocí kvantitativní PCR. Souhlasy pacientů se zařazením do studie a klinické informace doplnil MUDr. Milan Král, Ph.D. z Urologické kliniky LF UP a FN Olomouc. Koordinaci dílčích projektů a statistickou analýzu prováděl Mgr. Jan Bouchal, Ph.D. z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP.

U práce zaměřené na studium kalikreinů 7 a 11 v karcinomech prostaty jsem se podílela na sestavení souboru studovaných pacientů i vlastní analýze. Hlavní podíl na této práci měla její autorka MUDr. Tamara Jamaspishvili, Ph.D., která v té době byla postgraduální studentkou na Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP.

Tato práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NS10282.

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří mému školiteli prof. MUDr. Jiřímu Bártkovi, CSc. za jeho odborné vedení během postgraduálního studia, za cenné rady a konzultace při řešení grantového projektu a zpracování výsledků a za pomoc při zpracování dizertační práce. Velké díky patří také Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za skvělou koordinaci práce, dobré nápady a věcné připomínky v průběhu řešení grantového projektu, za velkou pomoc při zpracování výsledků a za rady při zpracování dizertační práce. Poděkování patří také prof. MUDr. Zdeňku Kolářovi, CSc. a prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za to, že mi umožnili postgraduální studium na našem ústavu, a za jejich podporu. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Havlíčkové Sedlákové za její precizní práci při optimalizaci protilátek a imunohistochemickém barvení preparátů. Velké poděkování patří MUDr. Jiřině Bártkové, CSc. z Institute of Cancer Biology v Kodani, doc. RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. z Ústavu lékařské genetiky LF UP a FN Olomouc, Mgr. Aleně Burdové z Laboratoře lékařské genetiky v Novém Jičíně, Mgr. Aleně Mičkové z našeho ústavu a MUDr. Milanu Královi, Ph.D. z Urologické kliniky LF UP a FN Olomouc za spolupráci při řešení našeho grantového projektu. Poděkovat bych chtěla také MUDr. Tamaře Jamaspishvilli, Ph.D. za možnost spolupráce při studiu kallikreinů 7 a 11 u karcinomu prostaty. Poděkovat chci také paní Lence Prokopové za její pomoc s grafickými úpravami dizertační práce. Závěrem bych chtěla poděkovat svému manželovi Pavlu Kurfürstovi za podporu, nadhled a trpělivost a svým dvěma synům za nekonečnou lásku a podporu.

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD	6
1.1. Anatomie prostaty, semenných váčků a chámovodu.....	6
1.2. Patologie prostaty.....	7
1.2.1. Benigní hyperplazie prostaty.....	7
1.2.2. Prostatická intraepitelová neoplazie (PIN).....	9
1.2.3. Nádory prostaty a jejich klasifikace.....	11
1.2.4. Karcinom prostaty	13
1.2.4.1. Makroskopický vzhled karcinomu prostaty	14
1.2.4.2. Šíření a staging karcinomu prostaty.....	14
1.2.4.3. Histologický vzhled karcinomu prostaty	16
1.2.4.4. Hodnocení stupně diferenciacie karcinomu prostaty.....	16
1.2.4.5. Diagnostické a prognostické markery karcinomu prostaty	20
1.2.5. Nenádorové léze důležité pro diferenciální diagnostiku karcinomu prostaty ...	22
1.3. Buněčný cyklus, senescence a apoptóza	24
1.4. Poškození DNA (DNA damage)	30
1.4.1. Reakce buňky na poškození DNA	30
1.4.2. Mechanismy oprav DNA v eukaryotické buňce.....	34
1.4.3. Nestabilita DNA u nádorů a DDR.....	35
1.4.4. DDR a léčba nádorů	36
1.5. Proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu či kontroly integrity genomu	37
1.5.1. NAD(P)H dehydrogenáza, chinon 1 (NQO1) a 8-oxoguanin.....	37
1.5.2. p53.....	38
1.5.3. pRb.....	39
1.5.4. Cyklin D1	39
1.5.5. PTEN.....	40
1.5.6. SMAD 4	42
1.5.7. SPP1 (secreted phosphoprotein 1).....	44
1.5.8. Ki-67 – proliferační marker	44
1.5.9. Další studované proteiny	45
1.6. Kallikreiny a prostata	46
2. CÍLE PRÁCE	48
3. MATERIÁL A METODIKA.....	49

3.1.	Výběr pacientů pro imunohistochemickou analýzu	49
3.2.	Zpracování operačního materiálu a fixace tkáně	49
3.3.	Imunohistochemie	50
3.4.	Hodnocení imunohistochemických preparátů	52
3.5.	Genová typizace NQO1	53
3.6.	TMPRSS2-ERG status.....	53
3.7.	Statistické vyhodnocení výsledků imunohistochemie	54
3.8.	Materiál a metody analýzy tkáňové exprese kalikreinů	54
4.	VÝSLEDKY	55
4.1.	Vztah mezi velikostí tkáně při fixaci a výsledky imunohistochemické analýzy	55
4.2.	Dynamické změny exprese vybraných proteinů v průběhu progresu karcinomu prostaty	55
4.3.	Odpověď na poškození DNA jako protinádorová bariéra.....	60
4.4.	Oxidativní stres a NQO1.....	63
4.5.	Poruchy DNA oprav a cílená léčba	66
4.6.	Analýza exprese kallikreinů 7 a 11 v benigních a nádorových buňkách prostaty	68
5.	DISKUZE	69
6.	SOUHRN	74
7.	SUMMARY.....	76
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	78
9.	LITERATURA	80
10.	PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA	105

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Anatomie prostaty, semenných váčků a chámovodu

Prostata je přídatná žláza mužského pohlavního ústrojí tvaru komolého kužele, uložená pod močovým měchýřem, která obepíná kraniální část uretry. Definitivní velikosti dosahuje až po pubertě, kdy váží 29-40 g. Na povrchu prostaty je tenká vazivově-hladkosvalová vrstva tkáně vytvářející zde *capsula propria*. Na ni naléhá *plexus venosus prostaticus*, který odděluje *capsula propria* od *capsula periprostatica*, což je vnější vazivové pouzdro plynule přecházející na okolní orgány. Základna (*basis prostatae*) naléhá k močovému měchýři, hrot (*apex prostatae*) směřuje dopředu dolů a dosahuje k *diaphragma urogenitale*. Zadní plocha prostaty (*facies posterior*) je konvexního tvaru a podélná plochá brázda zde neúplně rozděluje žlázu na dva laloky (*lobus dexter* a *lobus sinister*). Uvnitř probíhá prostatická část uretry, která z anatomického pohledu rozděluje prostatu na část preuretrální a retro-uretrální. Preuretrální část prostaty se nazývá *isthmus prostatae*. Ve žláze dále rozeznáváme *lobus medius*, což je označení pro úsek zanořený za uretrou do hloubky, mezi průběhem obou *ductus ejaculatorii*, které do prostaty vstupují na bázi, prostupují retrouretrální části prostaty a ústí do zadní stěny *pars prostatica urethrae* na *colliculus seminalis*, kde mezi oběma ústími *ductus ejaculatorii* se někdy nalézá slepý kanálek délky přibližně 8-10 mm – *utriculus prostaticus*, který je zbytkem Mülleroва vývodu. Funkčním základem je 30-50 tubuloalveolárních žlázek vystlaných dvouřadým kubickým až cylindrickým epitelem. Žlásky většinou ústí na *colliculus seminalis* nebo v jeho okolí. Periuretrální žlásky mohou ve stáří hypertrofovat a být příčinou zbytnění prostaty a útlaku prostatické části uretry. Mezi žlázkami je uložena hladká svalovina a vazivová tkáň (Borovanský a kol. díl 1., 1976; Čihák, Grim díl 2., 2002).

McNeal a kolektiv prokázali, že lidská prostata je orgánem složeným, skládajícím se ze tří glandulárních zón a jedné zóny bez žlázek. Ze zón glandulárních rozeznává periferní, přechodnou a centrální (McNeal, 1984; McNeal et al., 1988). Tyto zóny jsou patrné na koronárních řezech prostatou v různém rozsahu v závislosti na lokalizaci daného řezu a mají velký význam v souvislosti se vznikem některých patologických lézí v různých zónách tkáně prostaty.

Semenné váčky jsou dutm provm orgánem délky pblin 4-5 cm. Jsou uloženy laterln od *ductus deferens* mezi zadní stěnou močového měchýře a rektem. Jsou vyplněny sekretem. Stnu semenných vch tvoří sliznice, hladk svalovina a adventicie. Epitel sliznice je jednovrstevn, msty me být dvouad.

Chámovod (*ductus deferens*) sahá od *cauda epididymis* do prostatick chsti uretry a je dlouh pblin 40 cm. Za moovm měchýřem je uložen mediln od semenných vch, zde vytv zduření (*ampulla ductus deferentis*). Spojenm s vývodem semenných vch vytv *ductus ejaculatorius*, kter prochází bází prostaty a st v *pars prostatica urethrae* na *colliculus seminalis*. Jeho stěna se skládá ze sliznice kryt dvouadm epitelem s nepohyblivými řasinkami, dále pak ze svaloviny a adventicie (Borovansk a kol. dl 1., 1976).

1.2. Patologie prostaty

1.2.1. Benigní hyperplazie prostaty

Benigní hyperplazie prostaty (BPH) je jednou z nejchstjch chorob postihujících muže po 40. roce a její incidence s věkem narůstá. V 7. deceniu bývá postiženo a 69 % mužů (Povřil, Šteiner a kol., 2007). Pro onemocnění je typick uzlovit rozřen žlázy zpsoben hyperplazií glandulární i stromální složky, kter je lokalizovan v okolí uretry (Rosai, 2004). V etiologii vzniku tohoto onemocnění hraje velk význam dysbalance androgenů, androgenovch receptorů a estrogen. Nejdůležitější roli zde hraje testosteron a zejména jeho metabolit dihydrotestosteron, kter stimuluje růst žlzov i stromální komponenty svm působením a vazbou přes androgenov receptor v jádře bunek (Povřil, Šteiner a kol., 2007). Klinick přznaky pacientů s hyperplazií prostaty zahrnují zejména obstrukci doprovázenou chstm moenm malého mnostv moi a zvířenou kontrakcí stěny močového měchýře, kter se makroskopicky projev hypertrofií její svaloviny. Stagnující reziduum moi v měchýři působí na sliznici iritan a me být živnou půdou pro přpadnou infekci měchýře (Humphrey, 2003).

Histologicky rozliřujeme několik typů hyperplazie. Nejchstji se setkáváme s **hyperplazií běžnou**, kterou lze dále rozdělit na hyperplazii stromální, difúzní stromální a glandulární (tabulka č. 1). V histologick praxi je hyperplazie patrn nejchstji v podob fibroadenomatznch uzlů, kde dominuje zmnoen hladkých svalových vláken s malou přmř vláken elastických a zmnoen chsto mrn a cysticky dilatovaných prostatických žlázek,

v jejichž lumen často nacházíme zahuštěný sekret, někdy i *corpora amylacea*, která mohou kalcifikovat. Výstelka těchto žlázek je tvořená dvouřadým epitelem s vnitřními cylindrickými buňkami s uniformními okrouhlými, centrálně lokalizovanými jádry a se světlou cytoplazmou a zevními kubickými či plochými buňkami nasedajícími na bazální membránu (Rosai, 2004). Ve žlázkách jsou často patrné papilární proliferace výstelky. Další variantou vyskytující se s menší frekvencí než běžná hyperplazie je **hyperplazie bazálních buněk** a její incidence je přibližně 3-15 %. Bývá patrná v periferní zóně prostaty a často v souvislosti se zánětem, ale může být také změnou reaktivní, související s léčbou prostaty. Histologicky ji můžeme rozdělit na prostou a atypickou. Běžná hyperplazie je tvořena dvěma a více vrstvami bazálních buněk cytologicky benigního vzhledu s ovoidními či mírně elongovanými buňkami. Pro atypickou BPH jsou charakteristická jádra s promínajícími jádérky. Někdy v prostatě můžeme také zastihnout **hyperplazii mezonefických zbytků**, jejíž incidence ve tkáni získané transuretrální resekci prostaty (TURP) je přibližně 0,6 %. Histologicky je charakterizována vágně nodulárními uzly, může ale vykazovat infiltrativní typ růstu. Tvoří ji malé tubuly vystlané kubickým epitelem, přítomna bývá intraluminální sekrece eozinofilního, koloidu podobného sekretu. **Hyperplazie žlázek colikulus seminalis** a okolí, kde ústí *ductus ejaculatorii* do prostatické části uretry, je dalším typem hyperplazie. Jde o mikroacinární proliferaci těsně nakupených žlázek vystlaných buňkami benigního vzhledu se světlou cytoplazmou, vyskytující se s incidencí přibližně 14 %. Nesmíme také opomenout **atypickou adenomatózní hyperplazii (adenózu)**, proliferaci malých žlázek, které mohou být zaměněny s karcinomem. Histologicky bývá dobře ohraničená, tvořená hustě nakupenými drobnými žlázkami, někdy mohou být žlásky větší či cysticky dilatované. Jsou vystlané buňkami se světlou cytoplazmou. Imunohistochemické barvení vysokomolekulárními cytokeratiny (HMWCK) k průkazu bazálních buněk je alespoň ložiskově pozitivní (Humphrey, 2003).

Hyperplazie prostaty		
Běžná nodulární hyperplazie	Stromální	Fibrózní a fibrovaskulární noduly
		Fibromuskulární noduly
		Muskulární noduly (leiomyom)
	Difúzní stromální hyperplazie	
	Glandulární	Fibroadenomatózní noduly
		Fibromyoepiteliální noduly
Hyperplazie bazálních buněk	Běžná	
	Atypická	
Hyperplazie mezonefrických zbytků		
Hyperplazie žlázek <i>kolikulus seminalis</i>		
Atypická adenomatózní hyperplazie		

Tabulka č. 1: Hyperplazie prostaty. Vytvořeno dle Humphrey, Prostate Pathology, 2003

1.2.2. Prostatická intraepitelová neoplazie (PIN)

Prostatická intraepitelová neoplazie je atypická proliferace buněk výstelky prostatických žlázek. Je prekancerózou, tedy změnou spadající do kategorie dysplazií epitelu, která je dána abnormalitami ve fenotypu i genotypu buněk, které jsou na hranici mezi benigním a maligním. Její incidence se pohybuje v rozmezí 4-16 % (Bostwick, Liang, 2012). Často se vyskytuje multifokálně a to až v 72 % případů radikálních prostatektomií (Qian et al., 1997). Její jedinou diagnostickou metodou je biopsie. V minulosti udávané klinické změny v podobě zvýšeného prostatického specifického antigenu (PSA) nebyly potvrzeny, PSA však může být zvýšen, pokud jsou dysplastické změny doprovázeny změnami zánětlivými. Histologicky byly rozeznávány a hodnoceny tři stupně dysplastických změn, lehká, střední a těžká. V současné době jsou hodnoceny pouze stupně dva, a to lehká dysplazie (low-grade PIN) a těžká dysplazie (high-grade PIN), která zahrnuje dříve rozlišovaný grade 2 a 3 (tabulka č. 2), (Rosai, 2004).

Dysplazie lehká, grade 1	PIN 1	Low-grade PIN
Dysplazie střední, grade 2	PIN 2	High-grade PIN
Dysplazie těžká, grade 3	PIN 3	

Tabulka č. 2: Prostatická intraepitelová neoplazie. Převzato z Humphrey, Prostate Pathology, 2003

Histologický vzhled jednotlivých typů prostatické intraepitelové neoplazie se liší. Charakteristická pro všechny je abnormální proliferace epitelů vystýlajících prostatické žlázy, které proliferují směrem lumenálnímu. Mohou vytvářet různé histologické obrazy od fokálního zesílení výstelky po útvary mikropapilární, kribriformní či ploché. Další, ale velmi raritní variantou obrazu PIN může být vzhled mucinózní, mikrovakuolární, invertovaný „hobnail“, PIN se skvamózní diferenciací, PIN s prstencovými buňkami a PIN s malými buňkami neuroendokrinního vzhledu. Diagnostická kritéria pro lehkou a těžkou dysplazii se liší (tabulka č. 3), (Bostwick, Liang, 2012).

	Low-grade PIN	High-grade PIN
Architektura	Nahloučené stratifikované epitely, nepravidelně rozložené	Více nahloučené stratifikované buňky, často se překrývající, často vytváření mikropapilární, kribriformní formace
Jádra	Zvětšená s patrnou mírnou pleomorfii	Zvětšená s výraznou pleomorfii
Chromatin jader	Normální vzhled	Hyperchromní
Jadérka	Vzácně	Prominující
Vrstva bazálních buněk	Intaktní	Může být přítomná disrupce
Bazální membrána	Intaktní	Intaktní

Tabulka č. 3: Diagnostická kritéria PIN. Převzato z Bostwick, Liang, 2012

Kromě morfologického vzhledu můžeme v diagnostice PIN využít také imunohistochemického barvení, zejména HMWCK či p63. Obě tyto protilátky se využívají k průkazu bazálních buněk, které jsou u PIN, na rozdíl od karcinomu, přítomny.

Z molekulárněbiologického hlediska nacházíme u prostatické intraepitelové neoplazie změny velmi podobné těm, které jsou nacházeny u karcinomu prostaty. Jde o změny stojící na hranici mezi benigním a maligním a indikující zhoršující se diferenciaci buněk a změny v kontrole regulačních genů, které vedou ke vzniku karcinomu (Henrique et al., 2006). Zjištěna byla progresivní ztráta některých markerů, jako jsou PSA a PAP, některých cytoskeletálních proteinů a annexinu I (Kang et al., 2002). Další studované markery naopak vykazovaly progresivní zvýšení exprese. Jde například o onkoproteiny, jako jsou cerb-B-2 (Her-2/neu), cerb-B-3, nebo Bcl-2 (Nakashiro et al., 2003). Dále byla také popsána hypermetylace

promotorové oblasti GSTP1 (Meiers et al., 2007). Běžně bývá také zjišťován fúzní gen TMPRSS2-ERG, stejně jako u karcinomu (Tomlins et al., 2008).

V patologické a klinické praxi je velmi důležitá diagnostika PIN jako prekancerózy, důležité je též vzít v úvahu přítomnost PIN v okolí nádorových struktur. Z tohoto důvodu je při diagnóze PIN v punkční biopsii prostaty doporučována rebiopsie, a to dle schématu v tabulce č. 4.

Bioptický nález	Diagnostický postup
Izolovaný nebo monofokální PIN (jedno ložisko)	Opakovat biopsii do 1 roku
PIN multifokálně	Co nejdříve opakovat biopsii
PIN + ASAP	Co nejdříve opakovat biopsii

Tabulka č. 4: Doporučený postup při dg. PIN. (Bostwick, Liang, 2012)

1.2.3. Nádory prostaty a jejich klasifikace

Nádory prostaty detailně popisuje a rozděluje klasifikace Světové zdravotnické organizace z roku 2016, která je rozděluje do několika hlavních skupin (tabulka č. 5), (Moch et al., 2016).

	Typ nádoru
Epitelové nádory glandulární neoplazie	adenokarcinom (acinární)
	- atrofický
	- pseudohyperplastický
	- mikrocystický
	- pěnovitý (foamy)
	- mucinózní (koloidní)
	- z prstencových buněk
	- pleomorfni z obrovských buněk
	- sarkomatoidní
	- lymphoepitelioma-like
	prostatická intraepitelová neoplazie (PIN)
	prostatická intraepitelová neoplazie grade III (PIN III)
	intraduktální karcinom
uroteliální nádory skvamózní nádory	duktální adenokarcinom
	- kribriformní
	- papilární
	- solidní
	uroteliální karcinom
Neuroendokrinní nádory	adenokarcinom s neuroendokrinní diferenciací
	dobře diferencovaný neuroendokrinní tumor
	malobuněčný neuroendokrinní karcinom
	velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
Mezenchymové nádory	stromální tumor nejistého maligního potenciálu
	stromální sarkom
	leiomyosarkom
	rabdomyosarkom
	leiomyom
	angiosarkom
	synoviální sarkom
	zánětlivý myofibroblastický tumor
	osteosarkom
	nediferencovaný pleomorfni sarkom
	solitární fibrózní tumor
	solitární fibrózní tumor, maligní
	hemangiom
	tumor z granulárních buněk
Hematolymfoidní nádory	difúzní velkobuněčný B lymfom
	chronická lymfocytární leukémie / malobuněčný lymfocytární lymfom
	folikulární lymfom
	lymfom z plášťových buněk
	akutní myeloidní leukémie
	B-lymfoblastická leukémie/lymfom
Smišené nádory	cystadenom
	nefroblastom
	rabdoidní tumor
	nádory ze zárodečných buněk
	světlobuněčný karcinom
	melanom
	paragangliom
	neuroblastom
Metastatické nádory	

	Typ nádoru
Nádory semenných váčků	
Epitelové nádory	adenokarcinom spinocelulární karcinom
Smíšené epitelové a stromální nádory	cystadenom
Mezenchymové nádory	leiomyom schwannom mammary -type myofibroblastom gastrointestinální stromální tumor (NOS) leiomyosarkom angiosarkom liposarkom solitární fibrózní tumor hemangiopericytom
Smíšené nádory	choriokarcinom seminom dobře diferencovaný neuroendokrinní tumor lymfomy Ewingův sarkom
Metastatické nádory	

Tabulka č. 5: WHO klasifikace nádorů prostaty a semenných váčků. Převzato a upraveno z: Moch et al., WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, 2016

1.2.4. Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (PCa) je u nás nejčastějším nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním mužů. Incidence u nás dosáhla v roce 2014 66,45/100000 (<http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>). Postihuje převážně starší muže ve věku 65 let a více, ale může se vyskytnout i v mladším věku a výjimečně i u adolescentů a dětí (Eble et al., 2004). Etiologie jeho vzniku je kromě rasových vlivů a věku dáována do souvislosti s hladinou testosteronu v krevním séru, což dokládá fakt, že se nevyskytuje u jedinců kastrovaných před pubertou a u pacientů s jaterní cirhózou, kteří mají vyšší hladinu estrogenu v krvi. Karcinom prostaty ve většině případů postihuje periferní partie prostaty, zejména dorzálně či dorzolaterálně. Velmi často vzniká multifokálně, a to až ve více než 85 % případů (Eble et al., 2004). Pro urologickou praxi a diagnostiku tohoto nádoru, zejména v časných stadiích onemocnění, je důležité vyšetření per rektum, sonografické vyšetření a samozřejmě také hladina PSA v krevním séru. Dříve byly považovány hodnoty PSA nižší než 4 ng/ml za normální, u mladších pacientů je tato hranice výrazně nižší a jsou známy případy agresivních karcinomů i při nižších PSA (Grepl et al., 2010; Thompson et al., 2004). Hladina PSA může být zvýšená u zánětů, infarktu prostaty či traumatického poškození. Vysokých hodnot však

dosahuje především u nádorů. Pokud má kliník podezření na nádorové onemocnění, následuje transrektální biopsie prostaty pod ultrasonografickou kontrolou. Odebírají se tenké proužky tkáně, a to vějířovitě z obou laloků, apexu a báze v celkovém počtu 10 až 14 biopsií podle velikosti prostaty, které jsou následně histologicky vyšetřeny. Pro diagnostiku metastáz PCa je důležité vyšetření magnetickou rezonancí, CT a PET (Eble et al., 2004; Rosai, 2004).

1.2.4.1. Makroskopický vzhled karcinomu prostaty

V nativní nefixované tkáni prostaty získané radikální prostatektomií vytváří PCa většinou solidní, často lobulárně utvářená ložiska žluté či okrově žluté barvy. Ve tkáni fixované formaldehydem je PCa makroskopicky často velmi těžko odlišitelný od hyperplastických změn v prostatické tkáni. Nekrózy a hemoragie nejsou v tumoru časté (Rosai, 2004).

1.2.4.2. Šíření a staging karcinomu prostaty

Podle místa, kde PCa vzniká, můžeme rozlišovat tzv. periferní karcinom a karcinom přechodné zóny. Karcinom periferní velmi často prorůstá přes tzv. kapsulu prostaty do okolních měkkých tkání. Typicky se šíří podél periferních nervů. Větší tumory mohou přímo prorůstat do močového měchýře, semenných váčků, velmi vzácné je prorůstání do rekta. PCa metastazuje nejčastěji do regionálních lymfatických uzlin a kostní dřeně obratlů a také do kostí pánve a osového skeletu. U pokročilého onemocnění PCa mohou být přítomné metastázy také v plicích, játrech, mozku a jiných orgánech (Eble et al., 2004; Rosai, 2004). Pro hodnocení stadia onemocnění PCa se v praxi užívá TNM klasifikace zhoubných novotvarů z roku 2009 (Sobin et al., 2009). Pravidla této klasifikace se vztahují pouze na adenokarcinomy prostaty.

T- Primární nádor

- TX primární nádor nelze hodnotit
- T0 bez známek primárního nádoru
- T1 klinicky nezjistitelný nádor, ani palpačně, ani zobrazovacími vyšetřovacími metodami
- T1a nádor zjištěn náhodně histologicky v 5 % (nebo méně) resekované tkáně
- T1b nádor zjištěn náhodně histologicky ve více než 5 % resekované tkáně
- T1c nádor zastižen při punkční biopsii
- T2 nádor omezen na prostatu
- T2a nádor postihuje polovinu jednoho laloku nebo méně
- T2b nádor postihuje více než jednu polovinu jednoho laloku, ne však oba laloky
- T2c nádor postihuje oba laloky
- T3 nádor se šíří přes pouzdro prostaty
- T3a extrakapsulární šíření (jednostranné nebo oboustranné) včetně mikroskopického postižení hrdla močového měchýře
- T3b nádor infiltruje semenný váček (váčky)
- T4 nádor je fixován nebo postihuje okolní struktury jiné než semenné váčky: zevní sfinkter, rektum, muscoli levatores a/nebo stěnu pánve

N- Regionální mízní uzliny

- NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit
- N0 regionální mízní uzliny bez metastáz
- N1 metastázy v regionálních mízních uzlinách

M- Vzdálené metastázy

- MX vzdálené metastázy nelze hodnotit
- M0 bez vzdálených metastáz
- M1 vzdálené metastázy
- M1a jiná než regionální mízní uzlina (uzliny)
- M1b kost(i)
- M1c jiná (jiné) lokalizace

Je-li přítomna více než jedna metastatická lokalizace, používá se kategorie nejpokročilejší (pM1c).

Kategorie pTNM patologické klasifikace pT a pN odpovídají kategoriím T a N. Kategorie pT1 není zavedena, protože ke stanovení této kategorie pT není dostateční množství tkáně (Sobin et al., 2009).

1.2.4.3. Histologický vzhled karcinomu prostaty

Obraz karcinomu prostaty v mikroskopickém vyšetření může být různorodý a WHO klasifikace popisuje několik histologických typů tohoto karcinomu (tabulka č. 5). Ve většině případů se však jedná o acinární adenokarcinom, pro který je typická přítomnost pouze jedné vrstvy buněk a chybění buněk bazálních. Nádorové buňky mohou být, zejména u dobře diferencovaného karcinomu, poměrně uniformní a jsou velmi těžko rozlišitelné od benigních žlázek. Někdy vykazují nádorové buňky mírnou jadernou pleomorfii, přítomna mohou být jádra hyperchromní, někdy ale také vezikulární s nápadnými jádérky. Často bývají také patrná větší jádra, někdy se zřetelnými nukleoly, v některých případech může být patrné „odkapávání“ cytoplazmy připomínající apokrinní sekreci (Eble et al., 2004; Rosai, 2004). Adenokarcinom se vyskytuje v několika histologických formách. Při mikroskopickém vyšetření tkáně prostaty se můžeme setkat s formou atrofickou, pseudohyperplastickou, pěnovou „foamy gland carcinoma“, koloidní a formou tvořenou prstencovými buňkami, onkocytární, „lympho-epithelioma-like“ variantou a formou sarkomatoidní (Moch et al., 2016).

1.2.4.4. Hodnocení stupně diferenciacce karcinomu prostaty

Stupeň diferenciacce PCa se hodnotí stanovením Gleasonova skóre. V roce 1966 Donald F. Gleason popsal nový systém pro grading adenokarcinomu prostaty na základě studie 270 pacientů (Gleason, 1966). Tento systém byl založen na popisu architektury, vzhledu a velikosti nádorových žlázek adenokarcinomu a rozlišoval 5 obrazů. Sám Gleason a jeho spolupracovníci v roce 1974 systém na základě dalších studií a výzkumu upravili (Gleason et al., 1974). Další modifikaci tohoto systému provedl také Gleason společně se svými kolegy v roce 1977 (Heldap a Egevad, 2006). V této podobě byl systém používán téměř 40 let a stal se nejpoužívanějším při hodnocení diferenciacce adenokarcinomu prostaty. S rozvojem vyšetřovacích metod, které v době, kdy Gleason a jeho tým sestavovali tento systém, nebyly užívány a které se postupem času staly rutinními, jako je vyšetření hladiny PSA a zejména punkční biopsie a také

imunohistochemické barvení bazálních buněk ve žlázkách prostaty, bylo potřeba dalších modifikací tohoto hodnoticího systému. Tyto metody umožnily přesnější diagnostiku a například velká část z obrazů dříve hodnocených jako 1 a 2 je dnes hodnocena jako atypická adenomatózní hyperplazie (adenóza), kribriformní struktury zahrnuté do 3. obrazu dnes hodnotíme také daleko přísněji (Epstein et al., 2005; Lotan a Epstein, 2010). Na mezinárodní uropatologické konferenci ISUP 2005 v San Antoniu byl Gleasonův systém opět modifikován (obrázek č. 1) a byl přijat konsenzus týkající se převážně sporných oblastí Gleasonova gradingového systému. Výsledky byly prezentovány v září téhož roku v časopise The American Journal of Surgical Pathology (Epstein et al., 2005). Výsledkem těchto změn z roku 2005 bylo:

Gleason 1 – ohraničený uzel s těsně nakupenými, ale zřetelně oddělenými žlázkami, které jsou uniformní, okrouhlé či oválné a střední velikosti (jsou větší než u obrazu 3).

Gleason 2 – jde o zřetelně ohraničený uzel, který se velmi podobá Gleasonu 1, žlásky nejsou ale tak uniformní jako u Gleason 1.

Gleason 3 – typické jsou malé žlásky (menší než u obrazu 1 a 2), se zřetelnými variacemi ve tvaru a velikosti, infiltrativně rostoucí okolo nenádorových žlázek. Dále jsou zde zahrnuty i drobné, okrouhlé a hladce ohraničené kribriformní žlásky.

Gleason 4 – splývající mikroacinární žlásky, často nepravidelné, neúplné, místy s hůře viditelnými luminy. Patří sem také velké kribriformní žlásky, rovněž s nepravidelnými okraji.

Gleason 5 – nádor nevytváří žlázové formace, ale solidní a pruhovité, případně je tvořen jednotlivými buňkami.

Největší změny se týkaly především hodnocení jehlových biopsií prostaty a tkání získaných transuretrální resekci prostaty, neboť ze zkušeností uropatologů vyplynulo, že bývají často podhodnocovány, což v některých případech vede k nedostatečné léčbě pacientů s PCa. Z konsenzu vzešla závazná kritéria pro hodnocení stupně diferenciaci PCa, která byla záhy uvedena do praxe (Epstein et al., 2005). Na našem ústavu se tak stalo v roce 2006.

Z výsledků konference vyplynulo několik závažných změn:

Základem hodnocení biopsie prostaty, jak už napsal Gleason a jak bylo uvedeno na konferenci ISUP 2005, je prohlédnutí preparátu nejprve při nejmenším zvětšení, tj. 4× nebo 10×. Pokud bychom použili větší zvětšení hned v úvodu, mohlo by to vést k nadhodnocení skóre (Epstein et al., 2005).

1. Gleasonovo skóre 1+1=2 by nemělo být diagnostikováno z punkční biopsie ani při vyšetření tkáně prostaty po totální prostatektomii, protože jde většinou o adenózu čili atypickou adenomatózní hyperplazii.
2. Gleasonovo skóre 3–4 – pro tuto kategorii low-grade tumorů platí, že takto by neměl být hodnocen acinární adenokarcinom z punkční biopsie, protože zde nevidíme, zda je ohraničený, což je podmínkou pro obraz Gleason 1 a 2. Gleasonovo skóre 2+2 můžeme výjimečně diagnostikovat v materiálu z TURP.
3. Pro Gleasonovo skóre 2+3 a vyšší se pravidla mírně liší u hodnocení punkčních proužků tkáně prostaty a tkáně získané totální prostatektomií, kde většinou (alespoň na našem ústavu) vyšetřujeme prostatu celou.

Pro jehlové biopsie platí:

Gleasonovo skóre 1+1 a 1+2 – nediagnostikujeme

Gleasonovo skóre 2+2 – nediagnostikujeme, výjimečně můžeme diagnostikovat z TURP

Gleasonovo skóre (GS) 2+3 a vyšší tvoříme podle těchto pravidel:

GS – nejčastěji se vyskytující struktura + druhá nejčastější struktura, nebo

GS – nejčastěji se vyskytující struktura + nejhorší struktura (to v případě nálezů třetího typu struktur)

Dále platí:

1. Pro dvě struktury: nižší „grade“ ignorujeme, pokud je zastoupen méně než 5 % (příklad – převažuje Gleasonův obraz 4 a do 5 % se vyskytuje obraz 3, přesto napíšeme 4+4).

Naopak vyšší „grade“ musíme uvádět, i když je v minoritě (příklad – převažuje Gleasonův obraz 3 a do 5 % je přítomný Gleasonův obraz 5, pak napíšeme 3+5).

2. Pro tři struktury: v případě, že je přítomna i třetí struktura, platí: nejčastější obraz + obraz nejhorší (viz výše).

Varianty Gleasonova obrazu:

„Foamy gland” karcinom – Gleason 3

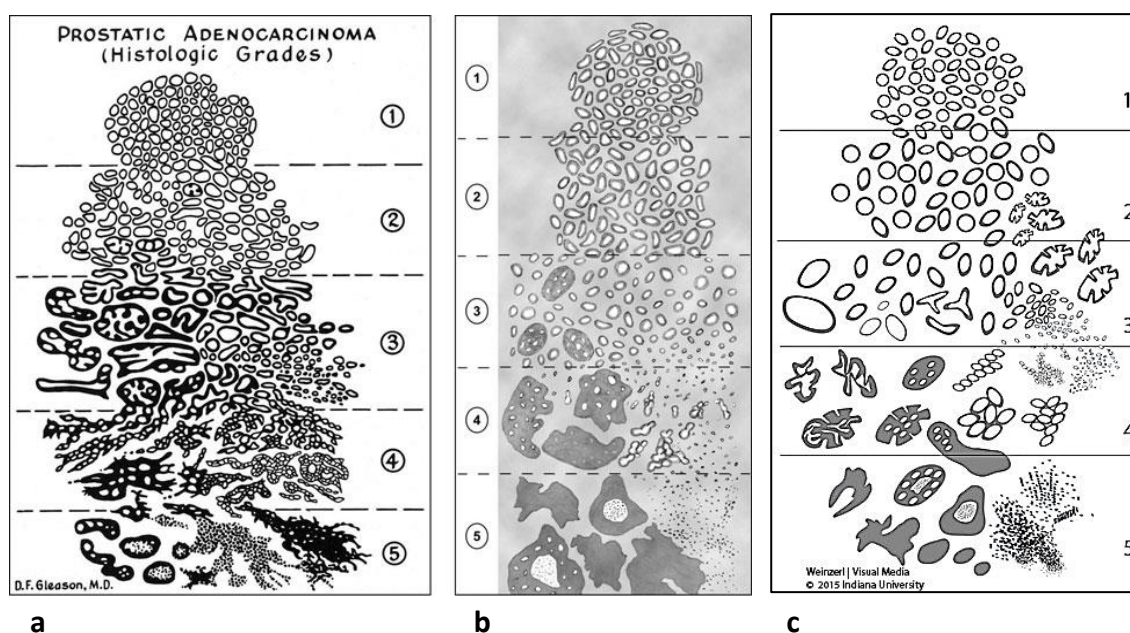
Duktální adenokarcinom – Gleason 4

Mucinózní karcinom – Gleason 3

Pseudohyperplastický karcinom – Gleason 3

Kribriformní struktury – ohraničené (většinou oválného nebo okrouhlého tvaru) jsou hodnoceny jako Gleason 3, pokud splývají, je hodnocení přísnější, tedy Gleason 4

Glomeruloidní struktury – Gleason 3



Obrázek 1: Schéma konvenčního (a), modifikovaného (b) Gleasonova systému z roku 2005 a (c) modifikace z roku 2014. K nejvýznamnějším změnám došlo v Gleasonově obraze 3 a 4. (převzato a upraveno z Helpap, Egevad, 2006; Epstein, Egevad et al, 2016).

U materiálu získaného radikální prostatektomií je situace odlišná a patolog musí mít na paměti, že se Gleasonovo skóre tvoří podle zásady: nejčastější struktura + druhá nejčastější struktura.

Dále platí, že pro terciární struktury vyššího Gleasonova obrazu (tj. 4 a 5) uvedeme procentuální zastoupení. Pokud je to možné, je třeba popsat nádorové uzly (centrálně mají většinou nižší GS, periferně vyšší GS) a popsat dominantní uzel, (to je ten největší s nejvyšším GS).

V roce 2014 proběhla The International Society of Urological Pathology Grading Consensus Conference, kde byl celý, již tak složitý systém znovu evaluován (obrázek č. 1c). Jednou ze změn bylo rozhodnutí, že okrouhlé či oválné kribriformní struktury a také struktury glomeruloidní, dříve hodnocené jako Gleason 3, se vzhledem ke svému méně příznivému chování budou hodnotit jako Gleason 4. Další, pro patologa zavazující, změnou je, že u každého jednotlivého vzorku tkáně získaného punkční biopsií prostaty se musí hodnotit Gleasonovo skóre zvlášť a musí se také zhodnotit rozsah zastižené nádorové tkáně v daném vzorku. Tato modifikace zjevně vyplývá z multifokálního vzniku PCa (Moch et al., 2016).

1.2.4.5. Diagnostické a prognostické markery karcinomu prostaty

Neustále se zvyšující incidence karcinomu prostaty a snaha diagnostikovat toto onemocnění v časných stádiích vede k intenzivnímu hledání specifických znaků umožňujících včasnou diagnostiku a screening u široké skupiny pacientů. Zčásti toto splňuje PSA, proteáza, která je velmi snadno hodnotitelná v krevním séru nebo imunohistochemicky v tkáních, čehož se využívá pro diagnostiku metastáz karcinomu prostaty. Za normální hodnoty PSA v krevním séru se obecně považují koncentrace do 4 ng/ml, u mladších pacientů je však tato hranice nižší. Hladina PSA může být zvýšená u zánětů, infarktu prostaty či traumatického poškození a především u karcinomu.

PSA není specifický pouze pro karcinom prostaty, ale byl zjištěn také v nádorech ovarií a prsu, včetně karcinomu mužského prsu (Kraus et al., 2010; Alanen et al., 1996). Naopak byly popsány i případy agresivních karcinomů prostaty při nízké hladině PSA (Grepl et al., 2010; Thompson et al., 2004).

Další důležitou skupinou jsou markery imunohistochemické. Jsou využívány zejména k diagnostice karcinomu prostaty z tkáně získané biopsií prostat, kde je karcinom zastižen v malém rozsahu. Nejvíce jsou využívány specifické znaky pro bazální buňky, jako jsou p63, HMWCK nebo CK5/6 (Signoretti et al., 2000; Weinstein et al., 2002). Je známo, že

v nádorových žlázkách nejsou bazální buňky přítomny. Průkaz bazálních buněk tedy diagnózu karcinomu vylučuje. Pro experimentální účely se k průkazu bazálních buněk mohou použít P-cadherin, D2-40, CD109 či Bcl2, nejsou však doporučeny pro běžné užití v diagnostické praxi (Kuroda et al., 2010; Hasegawa et al., 2007; Jarrard et al., 1997). Dalšími převážně experimentálně využívanými diagnostickými znaky jsou například AMACR, GOLM1, FASN, ERG a další. Alfa-methylacyl-CoA racemáza (AMACR) je mitochondriální a peroxizomální enzym zapojený do beta oxidace mastných kyselin (Lloyd et al., 2008), který je exprimován například v hepatocytech, epiteliích renálních tubulů, sliznici žlučníku a také v některých maligních tumorech, jako je karcinom tlustého střeva či papilární renální karcinom (Went et al., 2006; Dorer a Odze, 2006; Sonwalkar et al., 2010). Zvýšená exprese AMACR byla především prokázána u více jak 95 % karcinomů prostaty (Jiang et al., 2004; Herawi, Epstein, 2007). Golgiho fosfoprotein (GOLM1) byl původně popsán u onemocnění jater a u hepatocelulárního karcinomu (Bachert et al., 2007; Kladney et al., 2000; Iftikhar et al., 2004). V několika studiích byla popsána overexprese GOLM1 mRNA u karcinomu prostaty (Luo et al., 2002; Wei et al., 2008). FASN gen kóduje enzym zapojený do syntézy mastných kyselin (Menendez a Lupu, 2007). Warburg v roce 1956 popsal zvýšenou novotvorbu mastných kyselin v důsledku zvýšené aerobní glykolýzy v nádorových buňkách (Warburg, 1956). Přibližně u 50 % karcinomů prostaty byl zjištěn fúzní gen TMPRSS2-ERG, který způsobuje overexpresi zkráceného produktu ERG genu a může být také použit k diagnostice (Park et al., 2010; Miettinen et al., 2011). Tento fúzní gen byl také prokázán u malobuněčného karcinomu prostaty. Diagnostické markery využívané k diagnostice metastáz karcinomu prostaty jsou PSA, PSMA, androgenový receptor, ERG a NKX3.1. Posledně jmenovaný je androgeny regulovaný a, až na výjimky, pro prostatu specifický gen lokalizovaný na 8. chromozómu. Zjištěn byl zejména v epiteliích prostatických žlázek, a to jak benigních, tak neoplastických (Voeller et al., 1997; He et al., 1977). Zjištěn byl také v tkáni varlat a v invazivním lobulárním karcinomu prsu (Germann et al., 2003). Některými autory byla popsána ztráta exprese tohoto genu u níže diferencovaných karcinomů prostaty (Bethel et al., 2006; Bowen et al., 2000).

Prognostické znaky jsou velmi důležité pro pacienty s nádorovým onemocněním. Na základě jejich zhodnocení je rozhodováno, zda pacient bude či nebude operován a léčen radioterapií. Plánování léčby se u těchto pacientů opírá o nomogramy a prognostické modely, které zahrnují klinické, serologické a histopatologické parametry (Nam et al., 2011; Shariat et

al., 2009). Velmi důležité a standardně prováděné je průběžné sledování hladiny PSA v krevním séru. Histologické vyšetření z biopsie prostaty je pro pacienta zásadní nejen pro stanovení vlastní diagnózy, ale samozřejmě také k určení diferenciace nádoru, tj. jeho Gleasonova skóre. Velmi důležité je také stanovení počtu punkčních proužků, ve kterých byla nádorová tkáň přítomna a rozsah jejich postižení (Harnden et al., 2008; Loeb et al., 2008). Za prognostický marker může být považován také již výše zmíněný fúzní gen TMPRSS2-ERG (Tomlins et al., 2005). Prognostickými markery mohou být také různé epigenetické změny, jako je například genová metylace (Jones a Baylin, 2007). Geny, které jsou regulovány metylací a vyskytují se u karcinomu prostaty, jsou například PITX2, GST-pi, RARbeta2, APC a HOXD (Jeronimo et al., 2004; Henrique et al., 2007; Liu et al., 2011). Dalšími prognostickými znaky využívanými zejména experimentálně jsou malé nekódující mikro RNA (Iorio a Croce, 2009). Z proteinových markerů, které je možné prokázat imunohistochemicky, je nejdůležitějším marker proliferace Ki67, jehož exprese je zvýšená u maligních nádorů (Hanaban a Weinberg, 2011; Borre et al., 1998; Bubendorf et al., 1996; Laitinen et al., 2008).

1.2.5. Nenádorové léze důležité pro diferenciální diagnostiku karcinomu prostaty

Správná diagnostika karcinomu prostaty z punkční biopsie je bezpochyby stěžejní pro následující léčbu pacienta. V této kapitole proto uvádím přehled histologických lézí morfoloicky připomínajících karcinom, se kterými se může patolog ve své praxi setkat a které by neměly být jako karcinom diagnostikovány. U většiny těchto lézí si můžeme pomoci imunohistochemickým barvením bazálních buněk, které vykazují pozitivitu HMWCK. Ty jsou u většiny těchto lézí pozitivní, na rozdíl od karcinomů. Autoři souhrnného článku *The spectrum of morphology in non-neoplastic prostate including cancer mimics* názorně rozdělují tyto struktury do tří základních velkých skupin (tabulka č. 6), (Montironi et al., 2012). Z lézí uváděných v tabulce je velmi důležitá zejména skupina tvořená malými žlázkami. Sem patří **atrofie** zahrnující jak prostou, tak parciální atrofii, stejně jako postatrofickou hyperplazii. Tyto léze většinou nečiní diagnostické potíže, neboť v případě pochybností můžeme u těchto lézí prokázat imunohistochemicky přítomnost bazálních buněk pomocí HMWCK či p63.

Architektura žlázek	Nenádorová léze	Typ karcinomu prostaty, který léze napodobuje
léze tvořené malými žlázkami	epitelové léze prostatického původu: atrofie, parciální atrofie, atypická adenomatozní hyperplazie, nahloučené benigní žlásky, sklerozující adenóza, poradiační atypie v benigních žlázkách, hyperplazie žlázek v okolí <i>colliculus seminalis</i> , hyperplazie bazálních buněk epitelové léze jiného původu: epitelie <i>ductus deferens</i> , mezinefrické zbytky nefrogenní adenom mucinózní metaplasie bulbouretrální žlásky žlásky tlustého střeva	atrofický PCa Gleason ≤ 3
velké a kribriformně utvářené žlásky	hyperplazie bazálních buněk světlobuněčná kribriformní hyperplazie hyperplastické žlásky střední a větší velikosti reaktivní epiteliální atypie	kribriformní Gleason obraz 3, 4, 5 duktální adenokarcinom pseudohyperplastický karcinom
solidní vzhled	nespecifická granulomatózní prostatitis malakoplakie xantom prostaty paraganglia	Gleason obraz 4, 5 karcinom z pěnitých buněk karcinom vzniklý po terapii

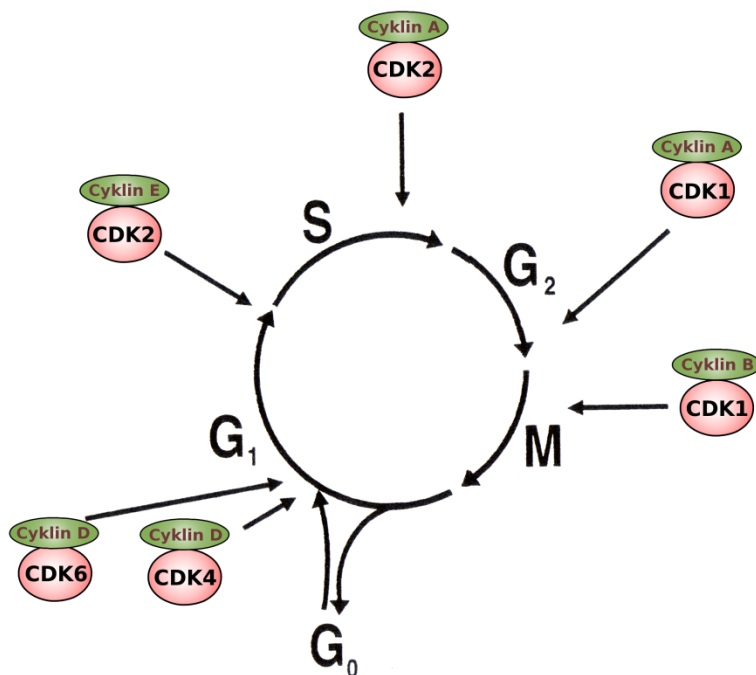
Tabulka č. 6: Spektrum morfologických nenádorových lézí napodobujících karcinom prostaty. Převzato z Montironi R. et al., 2012.

Vzácnější a méně známou atrofií je již výše zmíněná **atrofie parciální**, která nevykazuje typický obraz atrofie s bazofilní cytoplazmou buněk menší velikosti. Jde velmi často o vcelku dobře ohraničenou oblast hustě nakupených malých žlázek vystlaných buňkami střední velikosti se světlou cytoplazmou. Jádra buněk jsou okrouhlá či oválná s pravidelným rozložením chromatinu a hladkou jadernou membránou, bez jadérek. I zde využíváme pozitivitu HMWCK či p63 k průkazu bazálních buněk. **Atypická nodulární hyperplazie** je charakterizována nodulární proliferací těsně nahloučených, převážně pravidelných drobných žlázek, které jsou lemovány buňkami kubického či nízkého cylindrického tvaru se světlou či světle eozinofilní cytoplazmou. Velikost léze obvykle nepřesahuje 5 mm. Tato léze může činit někdy diagnostické potíže vzhledem k tomu, že přibližně 50 % žlázek vykazuje v imuno-histochemickém barvení absenci bazálních buněk. Vzácně, a to s incidencí přibližně 2 %, se

může v biotických vzorcích prostaty vyskytnout **sklerozující adenóza**. I zde jde o benigní proliferaci malých těsně nahloučených žlázek, které mohou vytvářet mikroacinární, kribriformní či solidní formace. Mezi žlázkami je patrné stroma s hojnými vřetenitými buňkami. Přibližně 10 % těchto lézí bývá v punkčních biopsiích prostaty špatně diagnostikováno jako karcinom (Barney et al., 2007). V diagnostice nám opět pomůže imunohistochemické barvení HMWCK a p63, které prokáže intaktní vrstvu bazálních buněk. Na tomto místě je také nutné zmínit **atypickou sklerozující adenózu**, která se od prosté sklerozující adenózy odlišuje buňkami se zvětšenými jádry s prominujícími nukleoly (Montironi et al., 2012).

1.3. Buněčný cyklus, senescence a apoptóza

Buněčným cyklem se rozumí děj, kterým prochází buňka od svého vzniku až po rozdělení na dvě dceřiné buňky. Zahrnuje dvě základní fáze, a to jednak interfázi, dále rozdělenou na G1, G2 a S fázi, jednak fázi mitotickou, během které dojde k rozdělení buňky. V G1 fázi dochází ke zdvojení buněčné hmoty a růstu buňky, tvoří se RNA a buňka se připravuje na replikaci DNA. V této fázi se také nachází hlavní kontrolní uzel. Následuje S fáze (syntéza), kdy dochází k replikaci DNA na její dvojnásobné množství. Na konci této fáze je buňka tetraploidní. V následující G2 fázi dochází ke zdvojování organel a tvorbě mitotického vřeténka potřebného pro dělení buňky. Poslední fází je mitóza, v níž dochází k dělení jádra (karyokineze), které je následováno rozdělením buňky (cytokineze) na dvě buňky o stejném počtu chromozomů (Rosypal a kol., 1987). Celý proces je kontrolován řadou regulačních proteinů, zejména cyklin-dependentními kinázami (CDK), což jsou serin/threonin protein kinázové enzymy. Jsou aktivní ve spojení s příslušným cyklinem a podílejí se na přenosu adenosintrifosfátu (ATP) na substrátové proteiny, což společně s dalším sledem dějů nakonec vede k rozdělení buňky (Nasmyth, 1996; Sherr, 1996). Buňka, která se nachází v G1 fázi buněčného cyklu, může být stimulována růstovými faktory (mitogeny), které iniciují vstup do S fáze. Nutností však je, aby tato stimulace byla dostatečná a buňka překročila tzv. restriční bod R, který se nachází v G1 fázi. V této fázi cyklu jsou pro jeho regulaci jedny z nejdůležitějších proteinů retinoblastom (Rb) a komplexy CDK2/cyklin E, CDK2/cyklin A, CDK4/cyklin D, CDK6/cyklin D (Sherr a Roberts, 1999), (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2: Regulace buněčného cyklu (obrázek převzat s laskavým svolením Mgr. Gabriely Kořínkové, Ph.D. z dizertační práce Mechanizmy účinků syntetických inhibitorů cyklin-dependentních kináz odvozených od olomoucínu).

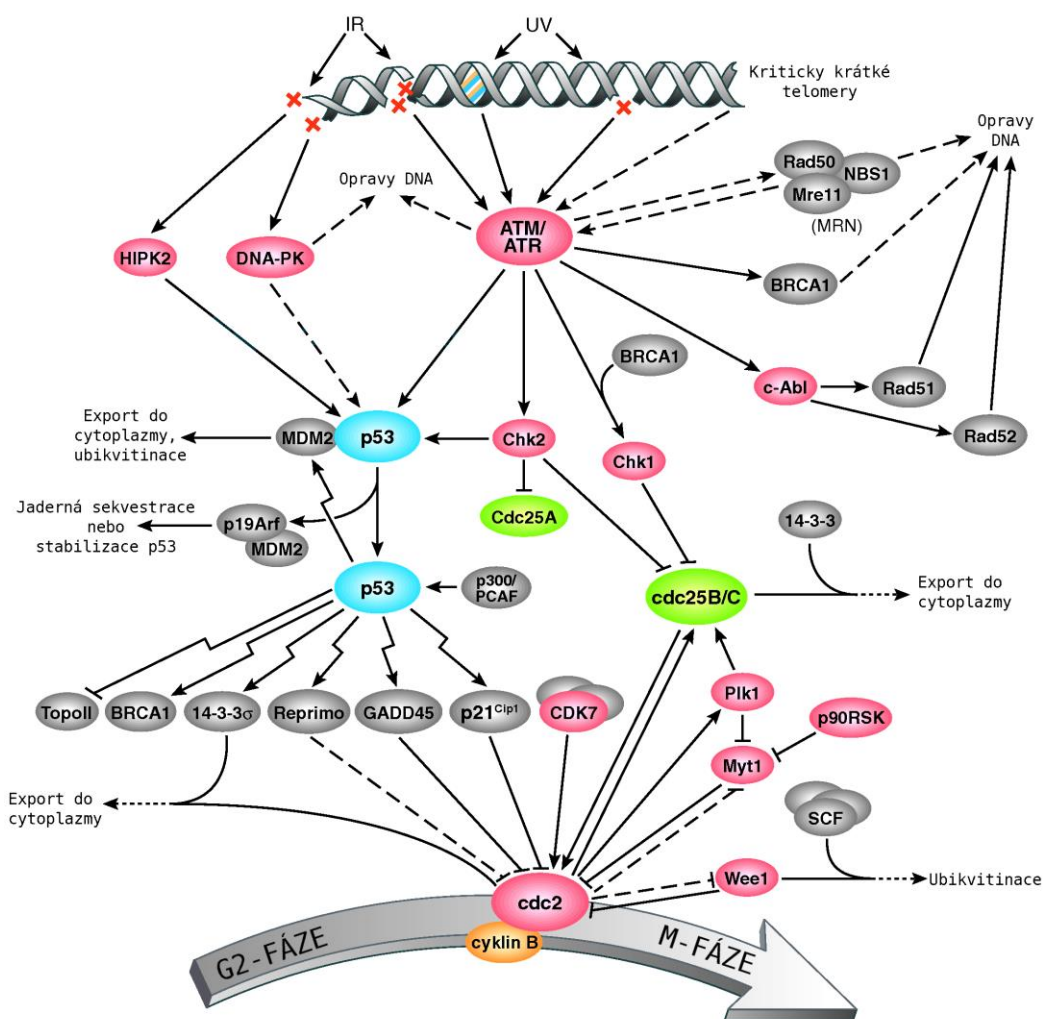
Po stimulaci buňky k proliferaci jsou nejdříve syntetizovány cykliny D, které aktivují CDK4 a CDK6, které fosforylují protein Rb za vzniku pRb, čímž dochází k uvolnění transkripčních faktorů E2F, které jsou nutné pro vstup buňky do S fáze. Faktory E2F zvyšují transkripci cyklinu E, který společně s CDK2 umožní přechod buňky z G₁ do S fáze (Kolář a kol., 2003).

Kontrolní body buněčného cyklu jsou velmi důležité a jsou zodpovědné za bezchybné dělení buněk. V těchto bodech je ověřováno, zda byly úspěšně dokončeny všechny přípravné kroky probíhající v dané fázi buněčného cyklu a zda je možné, aby buňka mohla vstoupit do fáze následující. V případě poškození dojde k zastavení buňky v této fázi a aktivaci reparačních mechanismů. Pokud ty nejsou účinné, dochází ke spuštění programované smrti buňky (Lukas et al., 2004). Na konci G₁ fáze se nachází kontrolní bod G₁/S, kde se některé buňky zastavují a přecházejí do klidové G₀ fáze buněčného cyklu. Na konci G₂ fáze je G₂/M bod, který rozhoduje o vstupu buňky do fáze vlastního dělení buňky (Kolář a kol., 2003; Sherr a Roberts, 1999).

Jak již bylo zmíněno, v kontrolních bodech dochází ke kontrole případného poškození DNA během přípravy buňky na její dělení. Na jejich regulaci se podílí velká řada proteinů.

Hlavním proteinem regulujícím bod G1/S je protein p53, který je také nazýván strážcem genomu. Jde o velmi důležitý tumor supresor, jehož hladina v nepoškozených buňkách je velmi nízká a v imunohistochemickém barvení dosahuje přibližně do 1 % pozitivních jader studovaných benigních buněk. Hlavním transkripčním cílem proteinu p53 je protein p21, jehož zvýšená exprese vede k zastavení buněčného cyklu (Sherr, 2004). Protein p53 ale může také regulovat proteiny podílející se na opravách poškozené DNA či navození apoptózy buňky (Stewart a Pietenpol, 2001), (obrázek č. 3). Kontrolní bod G2/M bývá aktivován zejména při poškození DNA, například ionizujícím či UV zářením. Hlavní roli v jeho regulaci hrají některé kinázy, například DNA-PK, ATR, ATM, které mohou v tomto kontrolním bodě buněčný cyklus zablokovat, v případě poškození DNA, prostřednictvím dráhy p53/MDM2-p21 (Lisby a Rothstein, 2005; Lukas et al., 2004), (obrázek č. 4).

Senescence – replikující se buňky mají zakódovaný omezený počet buněčných cyklů, které je buňka schopna absolvovat. Poprvé byl tento jev pozorován a popsán Hayflickem a Moorheadem u normálních lidských fibroblastů (Hayflick a Moorhead, 1961). V průběhu cyklů buněčného dělení dochází ke zkracování telomer, které jsou tvořeny repetitivními sekvencemi bází TTAGGG a jsou uloženy na koncích chromozomů, které tím chrání před jejich případnými fúzí. V normálních buňkách je délka telomer mezi 7 a 13 kb a v průběhu jednotlivých buněčných dělení dochází k jejich zkracování přibližně o 50-200 bp. Zkracování telomer souvisí s tzv. jednosměrností DNA polymeráz, které jsou schopny prodlužovat nově syntezovaný řetězec pouze z 3' konce. Těsně před ukončením replikace nového řetězce je odbourán RNA primer a 5' konec zůstává nedokončen. Při zkrácení telomer na kritickou délku vstupují buňky do stadia senescence. Buňky v tomto stadiu zůstávají stále metabolicky aktivní a také odolné vůči proapoptotickým stimulům (Matsumura et al., 1979; Wang et al., 1995). V kmenových a zárodečných buňkách je situace odlišná. Je u nich aktivován enzym telomeráza, který umí zkracování telomer zabránit. V průběhu senescence dochází k různým biochemickým změnám buněk, jako je například aktivace beta-galaktosidázy, která je také specifickým markerem senescentních buněk (Dimiri et al., 1995). Existuje celá řada proteinů zajišťujících zástavu buněčného dělení, mezi které patří například p16, Rb, p53 a p21 (Schmitt, 2003). Proces senescence může být spuštěn nejen zkracováním telomer, ale také například aberantní stimulací onkogenů a poškozením DNA (viz kapitola 4.3, Odpověď na DNA poškození jako protinádorová bariéra).



Obrázek č. 4: Regulace kontrolního bodu G2/M (upravený obrázek převzat s laskavým svolením Mgr. Gabriely Kořínkové, Ph.D. z dizertační práce Mechanizmy účinků syntetických inhibitorů cyklin-dependentních kináz odvozených od olomoucínu).

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je sled dějů vedoucích ke smrštění buňky, kondenzaci chromatinu, degradaci DNA, rozpadu jádra a buňky s tvorbou tzv. apoptotických tělísek. Apoptózu mohou kromě fyziologických podnětů navodit také ionizující záření, toxické látky, hormony, virové infekce a imunitní pochody. Nejdůležitějším dějem pro apoptózu je fragmentace DNA, za kterou jsou zodpovědné specifické endo-nukleázy (Kolář a kol., 2003). Velmi důležitou roli v apoptoticky zanikajících buňkách mají kaspázy, které jsou z velké části zodpovědné za tyto morfologické změny buňky. Jsou to enzymy, které tvoří tzv. kaspázovou kaskádu, zajišťující amplifikaci a integraci proapoptotických signálů. V savcích buňkách je apoptóza řízena dvěma dráhami. Jednou z nich je dráha receptorová, kde hlavní iniciační funkci má kaspáza-8. Tato dráha je přímá, je významná například v imunitním

systému při odstraňování nadbytečných aktivovaných T-lymfocytů a zásadní roli zde hrají tzv. receptory smrti. Tyto receptory patří do rodiny genů pro receptor TNF (tumor necrosis factor) a obsahují „doménu smrti“, která umožňuje aktivovat apoptózu. Mezi tyto receptory smrti patří např. CD95 (neboli Fas či Apo1), DR4, DR5, TNRF1 a DR3 (Ashkenazi a Dixit, 1998). Druhou dráhou řídící apoptózu je dráha mitochondriální. Efektorovou kaspázou této dráhy je kaspáza-9. Na počátku aktivace této dráhy stojí většinou faktory exogenní, často látky redukující tzv. mitochondriální transmembránový potenciál. Následuje otevření pórů ve vnější mitochondriální membráně a uvolnění faktorů zodpovědných za aktivaci prokaspázy 9. Samy mitochondrie mohou přispívat k regulaci buněčné smrti třemi způsoby, a to přerušením energetického metabolismu přerušením transportu elektronů, uvolněním proteinů spouštějících aktivaci kaspáz a změnami v buněčných oxidačně-redukčních pochodech. V mitochondriích je lokalizován například proapoptotický cytochrom c, který je během apoptózy uvolněn do cytoplazmy a spustí řadu dějů vedoucích k aktivaci kaspázy 9, která stojí na začátku mitochondriální dráhy a vede k následné aktivaci řady kaspáz a buněčné smrti (Kolář a kol., 2003).

Na tomto místě je také nutné zmínit **autofagii**. Jde o adaptační buněčný mechanismus, kdy organely buňky jsou opouzdřeny do intracelulárních vakuol a rozloženy lysozomálními proteázami. Tento proces probíhá ve všech buňkách, vystupňován bývá například při hladovění, hypoxii či vlivem působení toxických látek, jako je etopozid. Některé studie uvádějí, že proces autofagie může vyústit v apoptózu či nekroptózu jako důsledek nedostatečné schopnosti adaptace na stresové podmínky (Denton et al., 2015; Berry a Baehrecke, 2008; Maiuri et al., 2007). Autofagie je považována jednak za další ze způsobů buněčné smrti, jednak za proces adaptace na nepříznivé podmínky (Lindqvist et al., 2014; Pattingre et al., 2005). Například při léčbě nádorů může být mechanismus autofagie v buňkách aktivován, přičemž jde o jejich snahu přežít. Autofagie bývá aktivována deplecí ATP ve snaze obnovit metabolickou rovnováhu a předejít nekroptóze (Lum et al., 2005; Amaravadi et Thompson, 2007). Inhibice autofagie by mohla vést k rozvratu metabolismu a aktivaci nekroptózy (Shimizu et al., 2004). Podle velikosti autofagických vezikul rozlišujeme makroautofagii a mikroautofagii (Mizushima et al., 2010). Formování těchto autofagozomů probíhá od izolace membrán přes jejich elongaci až po fúzi s lysozomy. Zde hrají zásadní roli geny z rodiny antiapoptotických Bcl-2 genů. (Mizushima et al., 2008). Na tomto místě je také třeba zmínit Beclin 1, protein,

který svojí interakcí například s Bcl-2 hraje stěžejní roli v regulaci autofagie a programované buněčné smrti (Zong et al., 2009). Chybou by také bylo opomenout ATG proteiny (autophagy-related proteins), které také hrají stěžejní roli v regulaci autofagie (Wesselborg a Stork, 2015).

1.4. Poškození DNA (DNA damage)

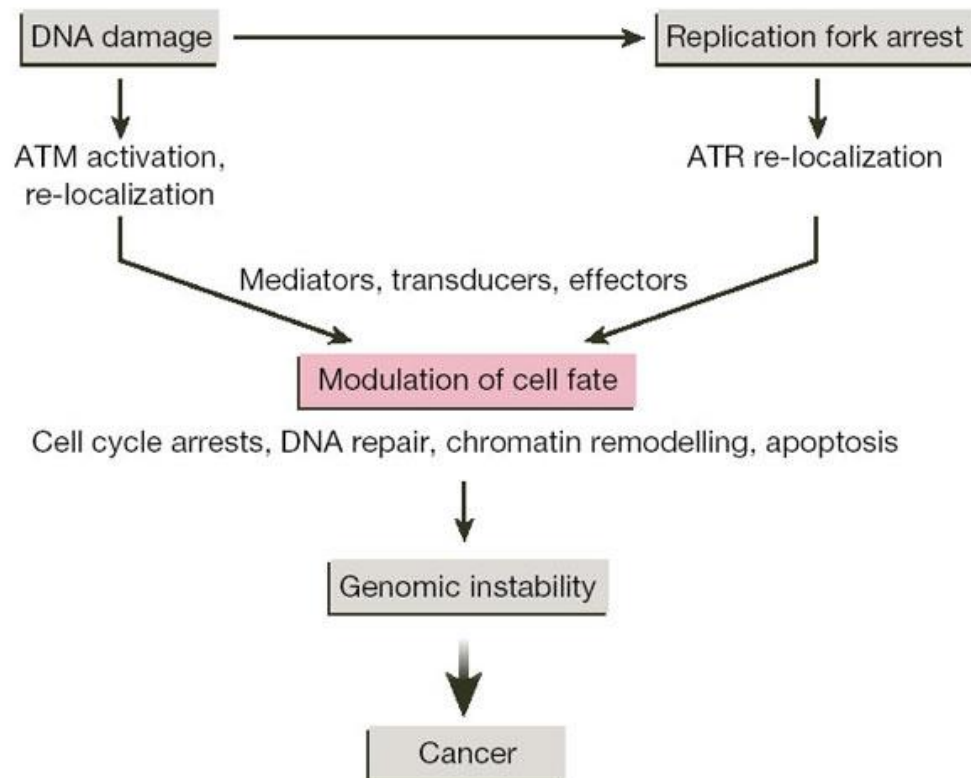
V lidském těle je denně každá z více než 10^{13} buněk postižena desítkami tisíc poškození DNA (Lindahl a Barnes, 2000; Jackson a Bartek, 2009). Tyto chyby mohou zablokovat replikaci či transkripci genomu buněk, a jestliže nejsou opraveny či jsou opraveny nesprávně, mohou vést k mutacím přenášejícím se do další generace buněk (Jackson a Bartek, 2009). Mechanismy poškození DNA jsou různorodé. K poškození může docházet během samotné replikace DNA v buňkách připravujících se na dělení, může být také způsobeno účinky volných kyslíkových radikálů a sloučeninami dusíku, které jsou produkovány v místech zánětu neutrofilními leukocyty či makrofágy (Valko et al., 2006; Kawanishi et al. 2006; Jackson a Bartek, 2009). DNA může být poškozována také vlivy z vnějšího prostředí, jako jsou chemické látky kontaminující potravu či životní prostředí, UV a jiné typy záření, kdy dochází zejména ke dvouřetězcovým zlomům DNA (DSB), (Jackson et Bartek, 2009). Poškození DNA různými vlivy je zodpovědné za vznik nádorů, ale je využíváno také k jejich léčbě ozařováním či chemoterapií. Látky užívané k chemoterapii tvoří velmi důležitou součást léčby nádorových onemocnění a patří sem látky indukující kovalentní vazby mezi bázemi DNA (např. cisplatina, karboplatina, mytomicin C), léky způsobující alkylaci bází (temozolomid, metyl metanesulfonát), také léky způsobující jednořetězcové zlomy DNA (SSB) či DSB inhibicí enzymů topoizomerázy I či II (kamptotecin, etopozid), (Ciccia a Elledge, 2010). Poškození DNA je však také zodpovědné za řadu vedlejších nežádoucích účinků této léčby, například vypadávání vlasů, supresi kostní dřeně či gastrointestinální toxicitu (Kastan a Bartek, 2004).

Změny v DNA jsou detekovány různými buněčnými mechanismy, které následně vedou k aktivaci opravných mechanismů souborně nazývaných DDR (DNA damage response), které jsou velmi různorodé a liší se podle typu poškození DNA (Jackson a Bartek, 2009).

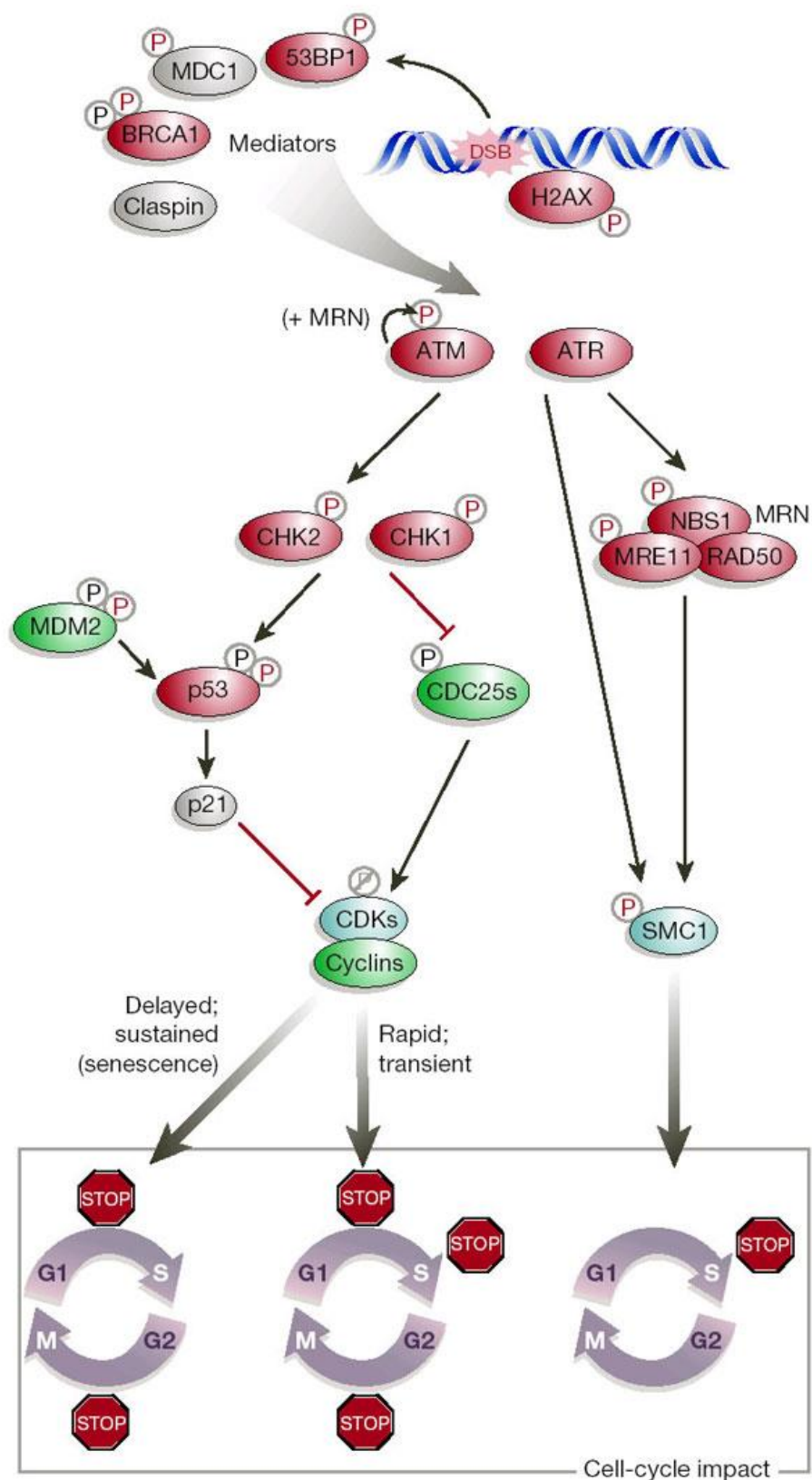
1.4.1. Reakce buňky na poškození DNA

Tak jako existují různé typy jejího poškození, jako jsou zlomy jednoho či dvou řetězců nebo „intrastrand/interstrand crosslinks“, existují i různé typy odpovědi buňky na toto

poškození. To musí být buňkou zaznamenáno, než dojde k zastavení postupu buňky buněčným cyklem směrem k replikaci a dělení. Po poškození DNA buňky dochází k aktivaci kináz ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ATM and Rad3-related), které spouští signální dráhy vedoucí k zablokování buněčného cyklu. Zdá se, že ATM kináza je aktivována zejména DSB, zatímco ATR kináza je zásadní pro odpověď na alterace DNA spojené s DNA replikací. Nejspíše ale obě kinázy v rámci reakce na poškození spolupracují (Kastan a Bartek, 2004), (obrázek č. 5). ATM kináza je v nepoškozené buňce přítomna v podobě inaktivního homodimeru. K její aktivaci dochází při reakci na DSB, a to prostřednictvím disociace homodimeru a autofosforylace (Lukas et al., 2004; Kastan a Bartek, 2004). Velmi důležitý pro celkovou aktivaci ATM kinázy a jejích substrátů je také její přesun do míst těchto DSB, který je ovlivňován pomocí MRN komplexu a tzv. mediátorů, mezi které lze řadit například proteiny MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), BRCA 1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) a 53BP1 (p53 binding protein 1). (Lukas et al., 2004; Kastan a Bartek, 2004). ATR kináza je v buňce přítomna ve formě komplexu s ATRIP (ATR interacting protein). V buňce je přítomná ve formě komplexu s ATR interagujícím proteinem a její funkčnost je rozhodující pro správný průběh replikace buňky. Díky komplexu s ATRIP se váže na replikační protein A, který je navázán na jednořetězcovou DNA, která vznikla během replikace. Poté dochází k fosforylaci substrátů, které se účastní proteiny, jako je claspin, komplexy RSR (RAD17-RFC2-5) a RHR (RAD9B-RAD1-HUS1), (Lisby a Rothstein, 2005; Zachos, 2005). Výsledkem celého tohoto mechanismu je nakonec zablokování buněčného cyklu, stabilizace aparátu DNA replikace a další efekty. Pro kontrolní bod G1 je nejdůležitější signální dráha ATM (ATR)/CHK2(CHK1)-53/MDM2-p21 (obrázek č. 6).



Obrázek č. 5: Obecné schéma odpovědi na poškození DNA, zástava replikační vidlice a vliv na buněčnou smrt, genomovou instabilitu a vývoj nádoru (převzato z Cell-cycle checkpoints and cancer Kastan a Bartek, Nature 2004).



Obrázek č. 6: Zjednodušené schéma drah aktivovaných při poškození DNA (zde typu DSB), které vedou k ovlivnění buněčného cyklu v kontrolních bodech. Tumorsupresory jsou označeny červeně, protoonkogeny zeleně (převzato z Cell-cycle checkpoints and cancer Kastan a Bartek, Nature 2004).

1.4.2. Mechanismy oprav DNA v eukaryotické buňce

Možnost oprav poškozené DNA je pro eukaryotickou buňku životně důležitá a může, v závislosti na typu poškození, probíhat několika způsoby. U SSB dochází k excizi jednotlivých bází (BER – base excision repair), u větších lézí pak k excizi nukleotidů a jejich náhradě (NER – nucleotide excision repair), (David et al., 2007; Cleaver et al., 2009). U DSB buňky využívají především homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců DNA (NHEJ – non-homologous end joining), (Bernstein et al., 2002).

„**Base excision repair**“ začíná odstraněním poškozených bází z dvoušroubovice a tato poškozená místa jsou vyplněna nově syntetizovanou DNA (David et al., 2007). Důležitými enzymy tohoto procesu jsou poly (ADP-ribose) polymeráza 1 a 2 (PARP1 a PARP2), (Nakabeppu et al., 2006).

„**Nucleotide excision repair**“ je proces, kterým jsou opravována rozsáhlejší jednořetězcová poškození DNA, často způsobená ultrafialovým zářením. Zde hraje klíčovou roli protein ERCC1 (excision repair cross-complementing protein 1), (Cleaver et al., 2009).

Homologní rekombinace probíhá zejména v S a G2 fázích buněčného cyklu. Jako matrice pro opravu DNA je využívána sesterská chromatida. Tento mechanismus je poměrně přesný a nevznikají při něm chyby. Klíčovými proteiny homologní rekombinace jsou proteiny kódované geny BRCA1, BRCA2, RAD51 a PALB2 (Moynahan a Jasin, 2010).

U mechanismu **nehomologního spojování konců DNA** je situace rozdílná. Tento mechanismus probíhá v kterékoli fázi buněčného cyklu a je nepřesný. Jde v zásadě o prostou ligaci konců dvouřetězcových zlomů. Často při něm vznikají chyby, jako je například ztráta několika nukleotidů v místě opraveného zlomu (Lees-Miller et al., 2003.) Hlavní roli zde má DNA-PK (DNA-activated protein kinase), jejímž hlavním úkolem je aktivovat zarovnání protilehlých konců dvouřetězcových zlomů a umožnit jejich spojení DNA ligázou IV. DNA-PK se také podílí na fosforylaci proteinu p53, který se poté akumuluje v jádře buňky v důsledku inaktivace fosforylovaného proteinu MDM2 (Bernstein et al. 2002; Lees-Miller et al., 2003).

Dalším typem oprav DNA je „**mismatch repair**“. Jde o proces opravující chybně spárované báze, které porušují strukturu DNA a jsou jako chyba rozeznány. To vede k vystřížení takto chybně zapojených bází a k nové syntéze DNA v tomto místě. Zásadní roli zde hrají proteiny MSH2 a MLH1 (Jiricny, 2006). Stejně jako všechny výše popsané mechanismy

také integrita telomerové DNA na koncích chromozomů hraje důležitou roli v ochraně genomu před mutacemi a genomovou nestabilitou (Artadi S. E. a DePinho R. A., 2010). Velmi důležité je, že všechny stěžejní složky mechanismu oprav poškozené DNA interagují s kontrolními body buněčného cyklu a s procesem segregace chromozomů. Tím je zajištěno, že oprava poškozené DNA proběhne před mitózou buňky a do dceřiných buněk se dostane genetický materiál nepoškozen (Warmerdam a Kanaar, 2010).

1.4.3. Nestabilita DNA u nádorů a DDR

Jedním ze známých znaků většiny nádorových onemocnění je jejich genomová nestabilita. Bohužel u většiny nádorů tyto změny nejsou doposud popsány. Několik je jich již známých. Příkladem může být kolorektální karcinom. Přibližně u 15 % sporadicky vzniklých kolorektálních karcinomů se vyskytuje abnormální zkrácení či prodloužení opakujících se sekvencí dinukleotidů, známé jako mikrosatelitní nestabilita. Ta s největší pravděpodobností vzniká při defektním „mismatch repair“. Porucha tohoto mechanismu byla popsána také u familiárně se vyskytujícího kolorektálního karcinomu. Zde jde převážně o mutaci genů MSH2 a MLH1, které ztrácejí svoji funkci (Jiricny, 2006). U části kolorektálních karcinomů, a to jak sporadických, tak familiárně se vyskytujících, byla popsána také defektní homologní rekombinace. Tato porucha je popsána také přibližně u 50 % agresivních karcinomů ovaria. Dalšími příklady mohou být familiární forma nádorů prsu či nádory pankreatu, u kterých je také popsána ztráta funkce některých genů ovlivňujících homologní rekombinaci jako například BRCA1, BRCA2, PALB2 a ATM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011).

DDR je biologický mechanismus protinádorové obrany, který bývá aktivován v časných stadiích tumorigeneze a je maximální v časných, preinvazivních stadiích nádorů. V těchto časných, preinvazivních lézích aktivace DDR předchází výskytu mutací nebo epigenetických deregulací faktorů DDR, jako jsou dráhy ATM-Chk2-p53 (Bartkova et al., 2005). Známky aktivace DDR u nádorů korelují se znaky buněčné senescence. Onkogeny indukovaná senescence vyžaduje intaktní DDR (Bartkova et al., 2006).

Endogenní aktivace DDR byla popsána u mnoha prekanceróz. Příkladem může být zvýšení markerů DSB, například jaderný γ H2AX u těchto lézí (Bartkova et al., 2006; Halazonetis et al., 2008).

1.4.4. DDR a léčba nádorů

Chemoterapie či radioterapie využívá defektů v mechanismech DDR. Příkladem může být léčba pokročilých forem nádorů ovarií solemi platiny (karboplatinou či cisplatinou). Tyto soli se používají v kombinaci s paklitaxelem a způsobují interřetězcová i intrařetězcová kovalentní propojení DNA, která jsou rozpoznávána DDR a opravována homologní rekombinací či NER. Tyto léky jsou účinné zejména proto, že u části pokročilých (high-grade) nádorů ovarií vykazují buňky defekty v homologní rekombinaci (Turner et al., 2004). Důležité je zde zmínit též inhibitory topoisomerázy (irinotekan – inhibitor topoizomerázy I, etopozid – inhibitor topoizomerázy II), které jsou považovány za první generaci léků cílících na DDR (Pommier et al., 2010). Následující generací inhibitorů DDR jsou inhibitory PARP. Jde o skupinu léků, které zajišťují inhibici enzymů poly ADP-ribóza polymerázy 1 a 2. Tyto inhibitory s největší pravděpodobností zabraňují opravám spontánně vzniklých SSB v DNA, což při replikaci vede ke vzniku dvouřetězcových zlomů (Lord a Ashworth, 2008). Jsou to také léky, které zvyšují účinky tomozolomidu (Rouleau et al., 2010; Zaremba a Curtin, 2007). Inhibitory PARP také selektivně inhibují růst buněk s defektem v genu BRCA1 či BRCA2 (Farmer et al., 2005; Bryant et al., 2005). Homologní rekombinace při opravách poškozené DNA je závislá na funkci BRCA1 a BRCA2. Pokud jsou tyto geny defektní, jak tomu u některých nádorů bývá, zůstávají zejména DSB neopraveny a inhibitory PARP u těchto buněk mohou způsobit jejich smrt. Na modelech *in vitro* byla prokázána vysoká citlivost buněk s mutací BRCA k inhibitorům PARP (Farmer et al., 2005). Zdá se, že nádory prsu, ovarií a prostaty s mutací BRCA budou vysoce citlivé k inhibitorům PARP. Jedním z testovaných inhibitorů PARP je olaparib, který ve studiích vykazoval, oproti běžným chemoterapeutikům, málo vedlejších účinků. V druhé fázi klinických studií byla prokázána u pacientů s karcinomy prsu či ovarií vysoká odpověď na léčbu tímto lékem (Fong et al., 2009; Balmana et al., 2011). Vedle PARP inhibitorů se testují inhibitory různých DDR kináz a cyklin-dependentních kináz, které modulují buněčný cyklus a procesy oprav poškozené DNA (Jackson a Bartek, 2009; Johnson et al., 2011). Studium genomu nádorových buněk a možnosti prokázat případné mutace v jejich genomu je významné pro cílenou léčbu, zejména u nádorových onemocnění rezistentních k běžné chemoterapii či aktinoterapii.

1.5. Proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu či kontroly integrity genomu

1.5.1. NAD(P)H dehydrogenáza, chinon 1 (NQO1) a 8-oxoguanin

NQO1 je flavoprotein fungující jako homodimer s jedním katalyzačním místem, který je exprimován v mnoha buňkách epiteliálních, endoteliálních i adipocytech a také v mnoha různých nádorech (Siegel a Ross, 2000; Siegel et al., 1998). Jde převážně o cytoplazmatický enzym, může být ale také lokalizován v malé míře v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu a v jádře. Původně byl popsán jako protinádorový enzym (Vasiliou et al., 2006; Ross a Siegel, 2004). NQO1 je zapojen do ochrany buněk proti mutagennímu vlivu volných kyslíkových radikálů (Strange et al., 2001). Poškození DNA tímto mechanismem je dalším druhem genomové nestability v nádorech, kdy u karcinomu prostaty je často spojen s chronickým zánětem (Sfanos a De Marzo, 2012). Tento enzym se také účastní stabilizace nádorového supresoru p53 (Anwar et al., 2003; Asher et al., 2001). U NQO1 deficientních myší byla patrná snížená indukce p53 a apoptózy a také vzrůstající senzibilita k chemicky indukovaným nádorům (Iskander et al., 2005; Long et al., 2000). Gen NQO1 je lokalizován na chromozomu 16q22 a byl u něj popsán polymorfismus jednotlivých nukleotidů, kterých může být více než 93 (Guha et al., 2008; Siegel et al., 2012; Nebert et al., 2002). Mnoho výzkumných studií je věnováno polymorfismu C609T, tranzici C za T na pozici 609 (Traver et al., 1992). Polymorfismus NQO1 C609T je homozygotní ve 4-20 % lidské populace (Kelsey et al., 1997). Buňky s homozygotní variantou NQO1 C609T nemají měřitelnou aktivitu NQO1, což znamená velmi nízké hladiny proteinu NQO1 P187S, který je velmi nestabilní vzhledem k jeho rychlému obratu v ubiquitin proteazomové dráze (Siegel et al., 2001). Tato varianta byla popsána jako silný prognostický a prediktivní faktor u karcinomu mléčné žlázy (Fagerhorlm et al., 2008). V roce 2013 vyšla metaanalýza prokazující sklon ke vzniku karcinomu močového měchýře u pacientů s mutací genu NQO1 C609T (Gong et al., 2013). Jiná metaanalýza prokázala signifikantně zvýšené riziko vzniku akutní lymfoblastické leukémie v souvislosti s polymorfismem NQO1 C609T (Cuiping a Yang, 2014). Polymorfismus NQO1 C609T vede také ke zvýšenému sklonu k onemocnění karcinomem jícnu (Hu et al., 2013). U karcinomu prostaty byla také publikována řada studií zabývajících se polymorfismem NQO1 C609T. Vzhledem k nejistým výsledkům vyplývajícím z těchto prací byla v roce 2014 provedena a publikována

metaanalýza, jež prokázala NQO1 C609T jako možný rizikový faktor vzniku karcinomu prostaty u Asiatů, ale nikoli u bělošské populace (Zhang et al., 2014).

8-oxoguanin je nejčastější modifikací bází DNA vznikající v důsledku působení volných radikálů kyslíku (Kasai a Nishimura, 1984). Protože 8-oxoguanin může tvořit v DNA páry jak s adeninem, tak cytosinem, je vysoce mutagenní (Maki, 2002). Akumulace 8-oxoguaninu jak v nukleární, tak v mitochondriální DNA je považována za jednu z významných příčin karcinogeneze (Nakabeppu et al., 2006). Mechanismem DDR je 8-oxoguanin odstraňován z DNA specifickou 8-oxoguanin glykosylázou. Dalšími enzymy podílejícími se na opravě DNA zaměřenými na chybnou bázi 8-oxoguanin jsou mutT homolog 1 (MTH1) a MYH (Maki a Sekiguchi, 1992). Deficience MTH1 byla popsána v souvislosti s akumulací 8-oxoguaninu v DNA a se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění u myší (Scott et al., 2014).

1.5.2. p53

Gen p53 je známým nádorovým supresorem, jehož proteinový produkt je transkripčním faktorem a podílí se na řízení buněčného cyklu. Za fyziologických podmínek má velmi krátkou životnost, přibližně kolem 20 minut, protože je rychle degradován ubiquitin-proteazomovým mechanismem (Li et al., 2002). V případě poškozené DNA buňky dojde ke snížení jeho degradace či zvýšení stabilizace molekuly, akumuluje se v buňce a stimuluje transkripci genů, jejichž hlavní funkcí je zástava buněčného cyklu, zahájení oprav DNA či navození apoptózy. Blokáda buněčného cyklu v G1 fázi je zajištěna inhibitorem CDK p21, jehož exprese je zvýšena po aktivaci p53 (Harper a Elledge, 1996). Protein p53 se také podílí na aktivaci transkripce genu GADD45, jehož produkt je významný v procesu reparace poškozené DNA. Pokud byla oprava DNA poškozeného genu úspěšná, p53 aktivuje gen MDM2. Tato ubiquitin ligáza směřuje protein p53 k proteazomové degradaci a dochází k opětovnému zahájení buněčného cyklu (Wang et al., 1995). Při neúspěšném pokusu o opravu poškozené DNA p53 indukuje geny spouštějící apoptózu buňky (Miyashita a Reed, 1995; Polyak et al., 1997). Mutace genu p53 byly identifikovány u mnoha nádorů (Prives a Hall, 1999). Nejčastěji jde o kombinaci mutace jedné alely a ztráty druhé alely genu p53. U syndromu Li-Fraumeni jde o vrozený defekt genu p53, u kterého mají nositelé této mutace až 25násobně vyšší pravděpodobnost vzniku maligního nádoru v raném věku (Evans a Lozono, 1997). Mutovaná

forma p53 obvykle ztrácí vlastnosti tumor supresoru a může naopak podporovat růst a přežívání nádorů (Kolář a kol., 2003; Goh et al., 2011).

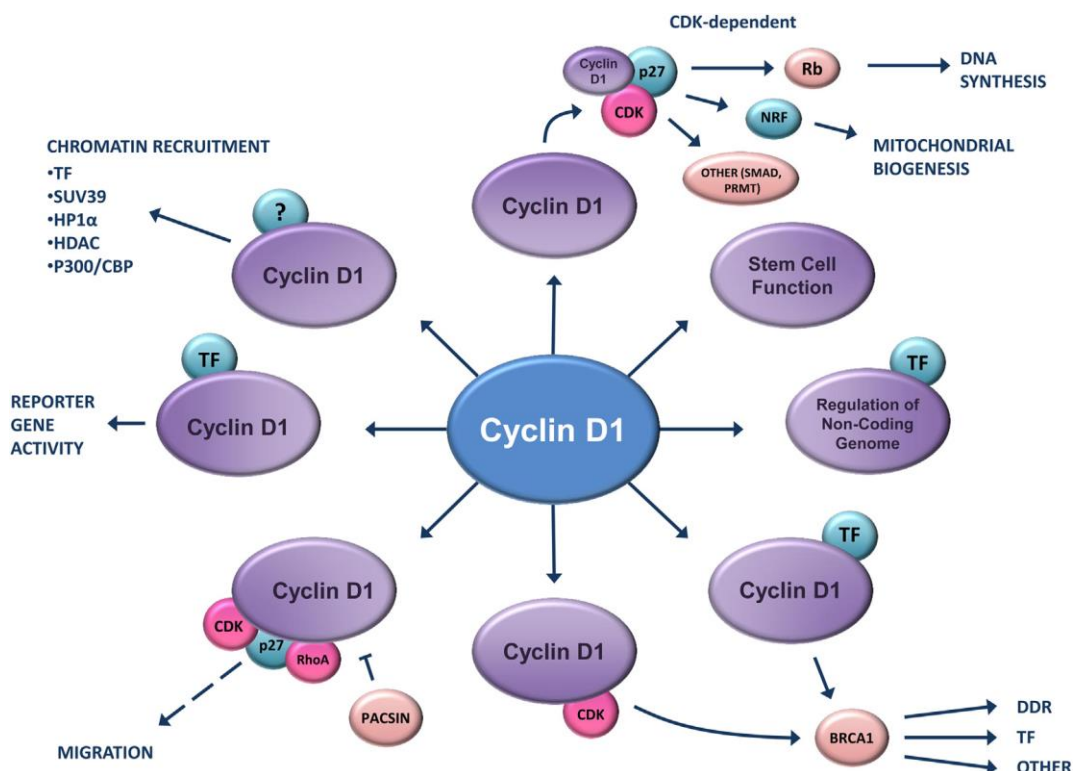
1.5.3. pRb

Gen pRb je nádorový supresor, jehož produktem je jaderný protein s velmi důležitou funkcí v regulaci buněčného cyklu. Fyziologicky se vyskytuje v hypofosforylované aktivní formě, kdy váže především transkripční faktory E2F (Weintraub et al., 1992; Trimarchi a Jacqueline, 2002). Pokud je buňka stimulována růstovými faktory, dochází ke zvýšení koncentrace cyklinu D a E, aktivují se komplexy cyklin D/CDK4, cyklin D/CDK6 a cyklin E/CDK2, což vede k fosforylaci pRb, čímž se stává inaktivní a uvolňuje faktory E2F. Ty spouští transkripci cyklinů (E a A) a dalších proteinů důležitých pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu (Adams a Kaelin, 1995). Rb protein zůstává fosforylován během S, G2 i M fáze a je opět defosforylován v G1 fázi. Získané mutace genu Rb, které vedou ke ztrátě jeho funkce, byly zjištěny v glioblastomech, karcinomu močového měchýře, mléčné žlázy, malobuněčném karcinomu plic i karcinomu prostaty. Vrozené mutace tohoto genu významně zvyšují riziko vzniku retinoblastomu a osteosarkomu u nositele této mutace (Aparicio et al., 2011).

1.5.4. Cyklin D1

Rodina cyklinů D, kam patří cykliny D1, D2 a D3, je zodpovědná za regulaci buněčného cyklu, tedy přechodu z G1 do S fáze (obrázek č. 7). Cykliny D aktivují cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6 a následuje fosforylace proteinu Rb (Massague, 2004). Exprese cyklinu D1 je zvýšena například genovou amplifikací nebo stimulací signální dráhy Ras (Filmus et al., 1994). Hladina cyklinu D1 je v průběhu buněčného cyklu proměnlivá, stoupá v průběhu G1 fáze a klesá v S fázi společně se vzrůstající hladinou GSK3 β (Yang et al., 2006). Deficience cyklinu D1 v buňkách je spojena se zvětšením mitochondrií. Exprese cyklinu D1 a jeho zvýšená aktivita vede k potlačení NRF-1 (nuclear respiratory factor 1), který je zodpovědný za indukci exprese mitochondriálních genů v jádře (Wang et al. 2006; Sakamaki et al., 2006). Cyklin D1 se také významně podílí na regulaci aktivity více jak 35 transkripčních faktorů (Fu et al., 2004). Další velmi důležitou úlohou cyklinu D1 je jeho řídicí funkce při opravách DNA po jejím poškození. Buněčné linie karcinomu mléčné žlázy vykazují zvýšenou apoptózu po ozáření gamma zářením,

když je v těchto buňkách cyklin D1 overexprimován (Coco Martin et al., 1999; Zhou et al., 2000; Agami a Bernards 2000).

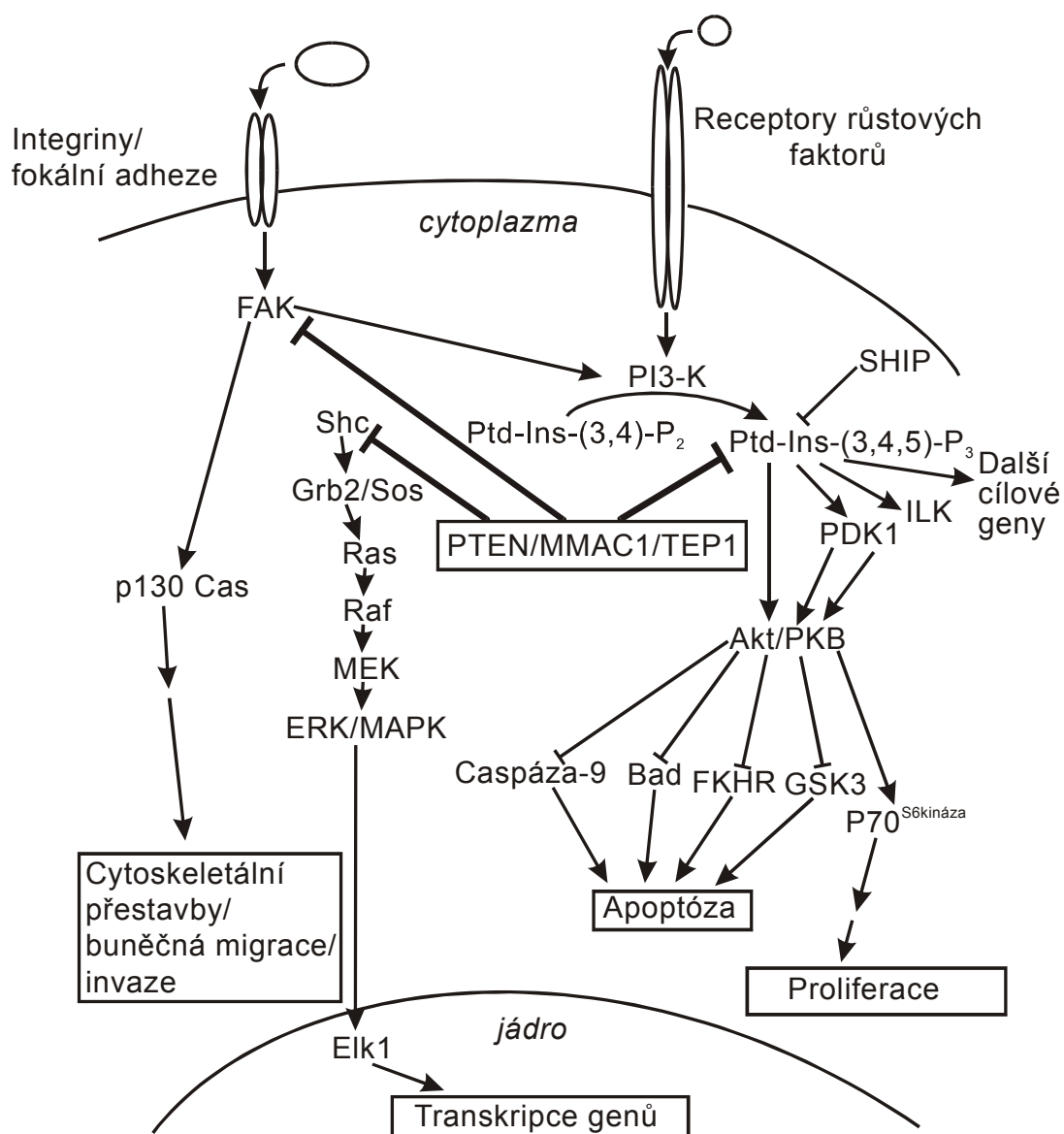


Obrázek č. 7: Schéma interakcí cyklinu D1 (převzato z Pestell, Am. J. Pathol., 2013).

1.5.5. PTEN

Gen PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) lokalizovaný na 10. chromozomu je významným nádorovým supresorem a jedním z nejčastěji mutovaných genů. Jeho mutace byly, stejně jako mutace p53, nalezeny u syndromů charakterizovaných zvýšeným rizikem vzniku maligního onemocnění, jako je například syndrom Cowdenové, Bannayanův-Riley-Ruvalcábův syndrom, juvenilní polypóza v dětském věku a jiné (Leslie a Longy, 2016). Jako souhrnný termín pro tyto různé fenotypy mutace PTEN byl použit termín PTEN hamartoma tumour syndrome (Orloff a Eng, 2008). PTEN se uplatňuje při regulaci buněčného cyklu, buněčného dělení a apoptózy (Li a Sun, 1998) a hraje významnou roli v regulaci dráhy PI3-K, která zajišťuje přenos signálu od membránových receptorů na PI3-K, dále pak PKB/Akt a dále až k cílovým genům (Besson et al., 1999), (obrázek č. 8). V regulaci buněčného cyklu má PTEN funkci inhibiční, především díky defosforylaci PIP3

(phosphoinositide 3,4,5-triphosphate), hlavního lipidového mediátoru dráhy PI3-K/Akt (Carracedo et al., 2011). V roce 1998 byla publikována studie, kde přibližně u 55 % nádorů prostaty byl nalezen defekt genu PTEN v oblasti q22-23 na 10. chromozomu (Pesche et al., 1998). McMenamin a spolupracovníci v roce 1999 publikovali práci, ve které studovali 109 archivovaných parafinových řezů karcinomu prostaty. Popsali granulární cytoplazmatickou pozitivitu PTEN v sekretorických buňkách prostaty. Cytoplazmatická pozitivita PTEN byla také přítomná v benigním prostatickém epitelu stejně jako u PIN. Homogenní cytoplazmatická exprese PTEN byla přítomna u 16 % karcinomů prostaty, v 64 % byla tato exprese nehomogenní a 20 % bylo negativních. Patrná byla korelace absence PTEN s hůře diferencovanými karcinomy s vyšším Gleasonovým skóre než 6, dále také v pokročilých stádiích nádorového onemocnění (T3b a T4), (McMenamin et al., 1999). Rovněž byla popsána zvýšená angiogeneze u lokalizovaných karcinomů prostaty v závislosti na inaktivaci PTEN, mechanismus však není znám (Giri a Iltmann, 1999). V roce 2001 byla publikována práce popisující účast PTEN na regulaci rovnováhy androgenů v prostatických buňkách. Lipidová fosfatázová doména PTEN zprostředkovala pokles vlivu androgenů a snížila endogenní aktivitu androgenů působením na přirozený promotor androgenového receptoru. V případě nefunkčního PTEN měly androgeny vyšší aktivitu, což je fakt podporující teorii, že vystavení epitelu prostaty neregulovanému množství androgenů může vést ke vzniku karcinomu. Zvýšené množství androgenů potlačilo proapoptotickou funkci PTEN, což může také vést ke vzniku nádorového onemocnění. Snížení exprese PTEN či jeho mutace mohou způsobovat neodpovídavost karcinomů prostaty na úplnou androgenovou blokádu (Li et al., 2001).



Obrázek č. 8: Model funkce PTEN. Schématický přehled známých cílových genů regulovaných PTEN prostřednictvím tyrosin-fosfatázové aktivity nebo fosfatidylinositol-3-fosfatázové aktivity. Upraveno podle Besson et al., 1999. Obrázek převzat s laskavým svolením MUDr. Alice Hlobilkové, Ph.D. z dizertační práce Některé aspekty funkce nádorového supresoru PTEN ve vztahu k regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy v nádorových buňkách).

1.5.6. SMAD 4

Tumor supresor Smad4 byl poprvé objeven u karcinomu pankreatu v roce 1996 na chromozomu 18q21.1 a byl nazván DPC4 (homozygously deleted in pancreatic carcinoma, locus 4), (Harn et al., 1996). Proteiny Smad jsou zásadní pro signální dráhu TGF β , která negativně reguluje růst epitelových buněk (Massague et al., 2000). V roce 1998 Howe a spolupracovníci publikovali studii, kde prokázali mutace genu Smad4 u 5 z 9 případů familiární

juvenilní polypózy a předpokládali, že tato mutace je stěžejní pro vznik tohoto onemocnění (Howe et al., 1998). V roce 2001 byla publikována práce, ve které nebyla imunohistochemicky přítomna exprese Smad4 u 63 z 64 polypů u pacientů s prokázanou mutací Smad4. Dále pak u rodin bez mutace Smad4 exprimovalo Smad4 37 z 38 polypů (Woodford-Richens et al., 2001). Tato data naznačují, že germinální mutace Smad4 je doprovázena ještě další, somatickou mutací Smad4 nepostižené alely (Miyaki a Kuroki, 2003). Inaktivace genu Smad4 koreluje se ztrátou exprese proteinu (Wilentz et al., 2000). Exprese proteinu Smad4 souvisí s histologickým gradem karcinomu pankreatu. Wilentz et al. ve své studii 188 karcinomů pankreatu neprokázali imunohistochemickou expresi Smad4 ve 31 % případů high-grade karcinomu pankreatu, zatímco low-grade karcinomy Smad 4 exprimovaly (Wilentz et al., 2000). Obdobná situace je i u kolorektálního karcinomu (Miyaki et al., 1999). Mutace tohoto genu byly také zaznamenány například u myeloidní leukémie, karcinomu ovarií, žaludku, hepatocelulárního a cholangiogenního karcinomu a karcinomu plic (Miyaki a Kuroki, 2003). V roce 2014 byla publikována práce, která byla zaměřena na sledování hladiny Smad4 mediátorové RNA (mRNA). Výsledky této práce prokázaly sníženou expresi Smad4 mRNA u karcinomu prostaty v porovnání s nenádorovými tkáňovými vzorky. Dále prokázaly, že snížená exprese Smad4 mRNA u karcinomu prostaty byla asociována s metastázami karcinomu do lymfatických uzlin, peroperativním PSA a Gleason skóre. Z výsledků této práce vyplývá, že Smad4 mRNA může být používána jako prediktivní biomarker (Zhang et al., 2014). Smad4 byl identifikován jako cílový gen mikroRNA-183. Exprese tohoto genu byla v buňkách PCa upregulována. Exprese mikroRNA-183 byla signifikantně vyšší také v tkáních PCa v porovnání s normální tkání prostaty. Onkogenní mikroRNA-183 může být využívána jako biomarker PCa a její inhibice může být významná pro terapii PCa (Ueno et al., 2013). Ztráta exprese Smad4 u PCa korelovala s promotorem metylace (Aitchison et al., 2008). Snížená exprese BMP (bone morphogenetic protein), jaderného Smad8 a Smad4 souvisí s progresí PCa. Částečná ztráta BMP2 a Smad4 souvisí s progresí nádoru agresivního fenotypu (Horvath et al., 2004). U PTEN negativních prostat myší byla genetická delece Smad4 spojena u 100 % případů s agresivním typem PCa. Mediátory tohoto biologického procesu byly identifikovány cyklin D1 a SPP1 jako klíčové. Ty společně s PTEN a Smad4 tvoří skupinu 4 genů, které jsou prognostickým znakem jak progresu a metastazování, tak rekurence PCa (Ding et al., 2011).

1.5.7. SPP1 (secreted phosphoprotein 1)

SPP1 je glykofosfoprotein, který je exprimován mnoha nádory lidského těla. Je znám pod mnoha synonymy, například jako osteopontin (OPN) či kostní sialoprotein 1 (BSP-1 či BNSP). Poprvé byl SPP1 popsán v roce 1979 jako protein secernovaný transformovanými maligními epitelii (Senger et al., 1979). SPP1 exprimují různé buňky lidského těla, například osteoklasty, osteoblasty, epitelie mléčné žlázy, ledvin, kůže, nervové buňky, hladká svalovina cév a endotelie (Craig a Denhardt, 1991; Denhardt a Guo, 1993). Indukovaná exprese SPP1 byla zjištěna u T-lymfocytů, makrofágů, kostních a epidermálních buněk a nádorových buněk, které byly ovlivněny například zánětlivými či ischemickými vlivy (Denhardt a Noda, 1998; O'Regan a Berman, 2000; Weber, 2001). SPP1 je ligandem pro $\alpha\beta$ integrin a CD44 receptory (Smith et al., 1996; Yokosaki et al., 1999; Liaw et al., 1994; Denda et al., 1998). SPP1 a $\alpha\beta$ integrinový receptor usnadňují adhezi B-buněk, destiček, osteoklastů a hladkých svalových buněk (O'Regan a Berman, 2000; Liaw et al., 1994; Liaw et al., 1995). Vazba SPP1 na integriny je zodpovědná za invazi a migraci nádorových buněk, SPP1 rovněž indukuje neovaskularizaci (Furger et al., 2003; Angelucci et al., 2002; Bayless et al., 2000; Arap et al., 1998).

1.5.8. Ki-67 – proliferační marker

Lidský protein Ki67 je všeobecně považován za ukazatele proliferace. Tento protein je imunohistochemicky detekován v jádře v průběhu všech „aktivních“ fází buněčného cyklu G1, S, G2 a M, tedy během proliferace. V průběhu klidové fáze G0 detekován nebývá (Scholzen a Gerdes, 2000; Gerdes et al., 1984). Jeho význam je v klinické praxi zásadní. Exprese Ki-67, zejména v nádorových buňkách, je dnes již rutinně využívána k posuzování proliferace nádorů a také jako jejich prognostický marker. Příkladem může být karcinom prostaty. V četných analýzách bylo zjištěno, že tzv. proliferační index Ki-67 je nezávislý signifikantní prognostický faktor přežití pacientů, samozřejmě společně s určením stadia a gradu onemocnění (Aaltomaa et al., 1997; Borre et al., 1998). U pacientů léčených radikální prostatektomií je exprese Ki-67 významným prognostickým faktorem nádorové rekurence a progresu (Bettencourt et al., 1996; Bai et al., 1999). Podobné výsledky byly prokázány i u pacientů léčených transuretrální resekci prostaty (Stattin et al., 1997). Kromě toho je Ki-67 také významným faktorem spojeným s rekurencí nádoru u pacientů léčených radioterapií (Scalzo et al., 1998). Biologické funkce Ki-67 byly donedávna neznámé. V letošním roce byla popsána jedna z nich, kdy Ki-67

svou vazbou na povrch chromozomů umožňuje jejich správnou separaci během mitózy (Cuylen et al., 2016).

1.5.9. Další studované proteiny

γ H2AX – histon H2AX je subtypem histonu H2A. Jeho fosforylace na pozici Ser 139 byla popsána jako reakce na DSB. Fosforylovaná forma se nazývá γ H2AX (Rogakou et al., 1998; Helt et al., 2005). Na fosforylaci H2AX se podílejí některé kinázy, jako například ATM, ATR či DNA-PK, přičemž ATM byla popsána jako hlavní mediátor fosforylace H2AX v odpovědi na DSB (Kastan a Lim, 2000; Bakkenist a Kastan, 2003). V případě ATR dochází k fosforylaci u SSB (Ward a Chen, 2001; Ward et al., 2004). Po fosforylaci H2AX je možné jej detekovat různými metodami, například imunofluorescencí, kdy je protein navázán na chromozom v místě zlomu (Lownders a Toh, 2005), což se dá využít jako indikátor úspěšnosti radioterapie (Taneja et al., 2004). Po fosforylaci γ H2AX interaguje například s BRCA1 či jinými proteiny, jako jsou 53BP1 a MDC1 (Kobayashi, 2004). Poté, co je DNA opravena, dochází k defosforylaci γ H2AX, za což je zodpovědná fosfatáza PP2A (Chowdury et al., 2005).

ATM – gen ATM kóduje protein patřící do rodiny PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Kináza ATM se podílí se na rozpoznání DSB. Přímo se váže na podjednotku NBS1 a zajistí fosforylaci histonu H2AX na pozici Ser139 (Kastan a Lim, 2000). V dalším sledu dějů fosforyluje ATM desítky až stovky různých substrátů včetně důležité kinázy CHK2 a také tumor supresor p53. Celý proces vede opět ke snaze opravit DSB. Pokud opravy nejsou možné, je aktivována apoptóza buňky.

Rev7 – v savcích buňkách je Rev7 zapojen do procesu oprav DNA, kdy společně s katalytickou podjednotkou Rev3 tvoří „translesion synthesis“ polymerázu zeta (Gan et al., 2008). Rev7 blokuje také resekci DNA v oblasti DSB a podporuje tak nehomologní spojování konců v průběhu rekombinace tříd imunoglobulinů a obecně při opravě DSB (Xu et al., 2015). Xu a spolupracovníci dále popsali, že ztráta Rev7 v myších a lidských BRCA1 deficientních buněčných liniích vede k obnovení homologní rekombinace a rezistenci k inhibitorům PARP.

JMJD1C (jumonji domain-containing protein 1C) – jde o histon demethylasu, která silně reaguje s ubiquitin ligázou RNF8 (Greer a Shi, 2012). Jde o protein důležitý v signalizaci

DSB, jehož ztráta u karcinomů prsu má vliv na odpověď nádorových buněk na léčbu radiací a inhibitory PARP (Watanabe et al., 2013).

53BP1 je poměrně velký protein tvořený 1972 aminokyselinami. Nemá vlastní enzymatickou aktivitu, ale umožňuje na svém povrchu vazbu mnoha proteinů podílejících se na DDR při DSB (Adams a Carpenter, 2006). 53BP1 patří do skupiny proteinů tzv. mediátorů/adaptorů, kam také patří například MDC1, BRCA1, TOPBP1, Caspin a PTIP (Li a Zou, 2005). Jednou z jeho funkcí je aktivace ATM, která je stimulována přímou vazbou mezi C terminální BRCT doménou a komponentou RAD50 komplexu MRE-RAD50-NBS1(MRN). Ten je zodpovědný za zapojení aktivované ATM do DDR (Lee a Paull, 2007). 53BP1 je velmi důležitým pozitivním regulačním proteinem oprav DSB prostřednictvím NHEJ. V průběhu NHEJ se také podílí na odstranění ochrany telomer (Dimitrova et al., 2008).

1.6. Kallikreiny a prostata

Kallikreiny patří do skupiny serinových proteáz a mají mnoho rozličných schopností regulace fyziologických dějů, jako jsou deskvamace kůže, regulace krevního tlaku, aktivace zánětů a další. Geny pro tkáňové kallikreiny jsou umístěny na q13.4 chromozomu 19 a jsou regulovány převážně steroidními hormony (Yousef a Diamandis, 2001; Diamandis et al., 2002; Obiezu a Diamandis, 2005). Jde o peptidázy fyziologicky se vyskytující v různých tkáních těla, často bez tkáňové specifity (Obiezu a Diamandis, 2005). V tkáni prostaty byla zjištěna exprese některých kallikreinů, a to KLK2, KLK3 (PSA), KLK4, KLK5, KLK7, KLK11/hippostasin, KLK14 a KLK15. Kallikreiny 7 a 11 jsou svojí strukturou velmi podobné KLK3 (PSA), a z tohoto důvodu by mohly být vhodnými markery pro případnou diagnostiku karcinomu prostaty. KLK7 je v tkáni prostaty výrazně exprimován a studie jeho exprese u PCa prokázala downregulaci mRNA a hladiny proteinů s negativní asociací s Gleasonovým skóre (Kishi et al., 2004; Xuan et al., 2008). Naopak studie z roku 2010 prokázala zvýšenou regulaci KLK7 u pokročilých PCa a autoři předpokládají, že KLK7 hraje důležitou roli v nádorové progresi, invazi a metastazování PCa (Mo et al., 2010). KLK11/hippostatin (trypsin-like serine protease) je regulován steroidními hormony a vyskytuje se ve třech izoformách, z nichž izoforma 2 je exprimována pouze v tkáni prostaty, izoforma 1 se vyskytuje v mozku a také v prostatě (Nakamura et al., 2001; Diamandis et al 2002). Exprese KLK11 byla prokázána jak v benigních, tak v nádorových buňkách v prostatě, signifikantně byla však u karcinomů zvýšená, a to u časných stadií

karcinomu s nižším Gleason skóre, zatímco se opět snižovala s nádorovou progresí (Nakamura et al. 2003a; Bi et al., 2010). Sérové hladiny studovaného KLK7 ukazují, že je možné považovat jej za vhodný diagnostický marker PCa a vzhledem k jeho snížené expresi u PCa lze lépe rozeznat karcinom od hyperplazie v porovnání s hladinou dnes nejvíce používaného markeru PSA (Nakamura et al., 2003b).

2. CÍLE PRÁCE

1. Přispět k pochopení vztahů mezi jednotlivými proteiny zapojenými do složitého mechanismu oprav poškození DNA ve vývoji a progresi karcinomu prostaty.
2. Zhodnotit vliv metodiky fixace prostatické tkáně na výsledky imunohistochemického barvení.
3. Sledovat rozdíl tkáňové exprese kalikreinů 7 a 11 u buněk benigní hyperplazie a karcinomu prostaty.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Výběr pacientů pro imunohistochemickou analýzu

Studovaný soubor tvoří 103 náhodně vybraných pacientů s diagnózou karcinomu prostaty, kterým byla v letech 2003-2011 ve Fakultní nemocnici Olomouc provedena radikální prostatektomie. U části souboru (68 pacientů z let 2003-2010) jde o materiál archivovaných tkání prostaty ve formě parafinových bloků, fixovaných standardními postupy používanými v tehdejší době (viz níže). Zbylá část souboru, tj. 35 pacientů, byla do studie následně postupně přiřazována. Jde opět o tkáň prostaty náhodně vybraných pacientů po radikální prostatektomii operovaných ve FN Olomouc v letech 2010 a 2011. Od předchozí části souboru se tento odlišuje způsobem fixace, který bude popsán níže.

3.2. Zpracování operačního materiálu a fixace tkáně

Je známo, že způsob fixace, tedy použitý fixační roztok a délka jejího trvání, je při zpracování tkání velmi důležitý a může ovlivnit výsledky vyšetřovacích metod, jako je PCR či imunohistochemie (Howat a Wilson, 2014). Standardním postupem je celou prostatu po vyjmutí vložit do roztoku 10% formaldehydu, kde je fixována 24 hodin. U první části souboru, tj. 68 pacientů, byla prostata se semennými váčky po vyjmutí z těla fixována standardním způsobem, tedy vložena do nádoby s roztokem 10% formaldehydu s tuší a fixována do druhého dne. Poté byla tkáň změřena, popsána a po správné stranové orientaci byly odříznuty semenné váčky a případně také části *ductus deferentes*. Z prostaty byla dále oddělena tkáň báze a apexu a rozdělena na dvě poloviny – pravou a levou. Tyto části byly posléze nakrájeny, v rovině kolmé k povrchu tkáně obarvenému černou tuší, na části o tloušťce maximálně 3-4 mm a vloženy do samostatných bločků s přesným označením topografie tkáně. Zbylá část prostaty byla rozdělena na čtyři kvadranty (pravý přední, pravý zadní, levý přední, levý zadní). Všechny tyto části byly poté nakrájeny na plátky o maximální tloušťce 4 mm, opět kolmo k povrchu obarvenému černou tuší, a vloženy do plastových krabiček určených k přípravě tkáňových bloků s přesným označením topografie tkáně.

U druhé části studovaného souboru byla metodika zpracování tkáně a fixace odlišná. Tkáň vyjmutá z těla pacienta byla vložena do prázdné nádoby a ihned transportována na oddělení patologie. Zde byla tkáň patologem popsána, změřena a topograficky zorientována.

Okraje prostaty byly obarveny černou tuší a po jejím zaschnutí (za cca 2 minuty) byly odříznuty semenné váčky a popřípadě části *ductus deferentes*. Poté byla odříznuta část apexu a báze, obě rozděleny na pravou a levou polovinu, zbytek prostaty byl rozdělen na čtyři kvadranty (pravý přední, pravý zadní, levý přední, levý zadní). Každá z takto oddělených částí tkáně prostaty byla vložena do samostatné označené nádoby s 10 % formaldehydem a fixována do druhého dne, kdy byla rozkrájena na plátky o maximální tloušťce 4 mm, které byly vloženy do označených plastových krabiček pro přípravu tkáňových bloků. Druhý den z nich byly zhotoveny základní preparáty barvené hematoxylinem-eozinem.

3.3. Imunohistochemie

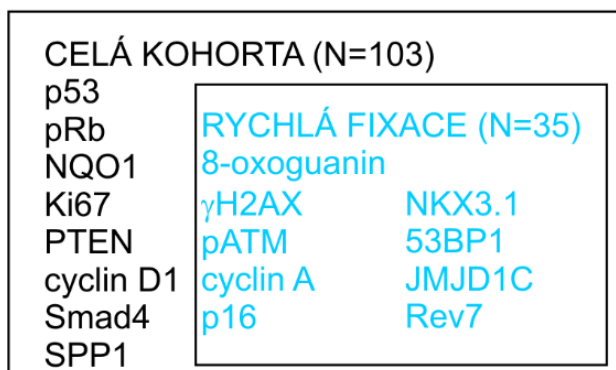
Po zhodnocení základních preparátů barvených hematoxylinem-eozinem, lokalizaci nádorového ložiska a po všech náležitostech týkajících se stanovení a popisu správné diagnózy byly vybrány vyhovující bločky tkáně pro imunohistochemické vyšetření. Hlavním kritériem byly morfologické struktury přítomné v daném bloku. U každého z pacientů byly vybrány 3 bločky, a to blok s převahou hyperplazie, blok s PIN a blok s karcinomem prostaty. Dalšími kritérii pro výběr byla kvalita tkáně v bločku. Snahou bylo vyloučit bločky s rozsáhlejšími nekrózami či zánětlivými změnami, které by mohly ovlivnit imunohistochemické barvení. V neposlední řadě bylo důležité také dostatečné množství tkáně v daném bločku.

Po optimalizaci jednotlivých protilátek, kterou prováděla Mgr. Eva Havlíčková Sedláková, byly preparáty barveny buď ručně imunoperoxidázovou metodou, nebo automatem Ventana BenchMark XT s použitím kitu i VIEW DAB Detection. Preparáty byly vždy barveny současně s pozitivní i negativní kontrolou. Typy protilátek a jejich ředění jsou uvedeny v tabulce č. 7.

A

Protilátka	Druh	Klon	Odmaskování antigenu	Ředění	Dodavatel	Kohorta
NQO1	myš	A180	CC1 standard (60 min, 32°C)	1:2000	Invitrogen	celá
pTEN	králík	D4.3	citrate buffer pH6 (MW 5 min, 120°C)	1:125	Cell Signaling	celá
p53	myš	DO-1	CC1 standard (60 min, 20°C)	1:10	Dr. Vojtesek	celá
pRb	myš	13A10	citrate buffer pH6 (MW 5 min, 120°C)	1:50	Novocastra	celá
cyclin D1	myš	DSC-6	EDTA pH9 (water bath 40°C)	1:200	Dako	celá
Smad4	myš	B-8	citrate buffer pH6 (MW 5 min, 120°C)	1:200	Santa Cruz	celá
SPP1	myš	AKm2A1	citrate buffer pH6 (MW 5 min, 120°C)	1:500	Santa Cruz	celá
Ki67	myš	MIB1	citrate buffer pH6 (MW 5 min, 120°C)	1:200	Dako	celá
8-oxoguanin	myš	15A3	No retrieval	1:1000	Rockland	rychlá fixace
NQO1	myš	A180	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:500	Santa Cruz	rychlá fixace
p53	myš	DO-1	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:4000	In-house	rychlá fixace
cyclin A	myš	NCL 6E6	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:100	Leica	fast fixation
p16	myš	JC8	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:100	Santa Cruz	rychlá fixace
NKX3.1	myš	LS-B3435	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:500	LSBio	rychlá fixace
γH2AX(Ser139)	myš	JBW301	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:2500	Millipore	rychlá fixace
pATM(S1981)	myš	7C10D8	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:50	Dr. Kastan	rychlá fixace
53BP1	králík	polyclonal	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:4000	Abcam #36823	rychlá fixace
JMJD1C	myš	DCS410	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:5	In-house	rychlá fixace
Rev7	myš	14/MAD2B/Rev7	citrate buffer pH6 (MW 15 min, 120°C)	1:100	BD Bioscience	rychlá fixace

B



Tabulka č. 7: (A) Imunohistochemie – typy protilátek a jejich ředění; **(B)** Kohorta pacientů a způsob fixace.

Imunoperoxidázová metoda

Po přichycení tkáňového řezu na plusové sklo či silanové podložní sklo natřené poly-L-lysinem necháme preparát v termostatu při 56°C do druhého dne. Po odparafinování řezů (2×10 minut xylol, 5 minut 96%, 80%, 70% alkohol, destilovaná voda) následuje zpracování preparátů, které je specifické pro danou protilátku (mikrovlnná trouba – citrátový

pufu pH 6, 5 minut při 120°C; vodní lázeň – EDTA pH 8; nebo natrávení proteinázou K). Po mikrovlnné troubě či vodní lázni necháme preparát vychladnout 20 minut, poté opláchneme destilovanou vodou. Následuje zrušení aktivity endogenní peroxidázy (50 ml destilované vody + 10 ml 30% peroxidu vodíku, 15 minut). Po následném oplachu destilovanou vodou promyjeme 2×5 minut TRIS pufrem, 2×5 minut TRIS pufrem s Tween. Dále kápneme 100 µl primární protilátky, inkubujeme 60 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Následuje 2x promytí v TRIS pufu (5 minut) a 1 × v TRIS pufu + Tween. Po tomto promytí aplikujeme sekundární protilátku (EnVision DAKO), inkubujeme 60 minut při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Opět následuje oplach TRIS pufrem 2×5 minut. Poté kápneme DAB (DAKO), opláchneme vodovodní vodou a dobarvíme jádra hematoxylinem. Po dalším oplachu vodovodní vodou následuje odvodnění preparátu 2 minuty 96% alkoholem, 2 minuty acetonem, 2 minuty aceton:xylem v poměru 1:1, na závěr pak ještě 2 minuty xylem. Takto obarvený preparát zamontujeme do bezvodého media (Pertex).

3.4. Hodnocení imunohistochemických preparátů

Každý z preparátů byl nejprve prohlédnut při malém zvětšení (objektiv 4×) a byla zhodnocena kvalita daného řezu. Z hodnocení byly vyřazeny okraje preparátů, taktéž nebyla hodnocena tkáň v okolí akutních zánětlivých změn či nekrotizací, které většinou exprimují protilátku silněji. Poté byla vyhledána studovaná struktura (hyperplazie, PIN či karcinom). U preparátů barvených protilátkami proti jaderným proteinům byl spočítán počet pozitivních jader u cca 300 buněk studované struktury (hyperplazie, PIN, karcinom). Dále byla zhodnocena intenzita této exprese.

U preparátů barvených dalšími protilátkami bylo zhodnoceno procento positivity a intenzita exprese, také ve 300 buňkách.

Intenzita exprese protilátky v obou případech byla stanovena takto: 0 – negativní, 1 – slabá exprese, 2 – středně silná exprese, 3 – silná exprese protilátky. Histoskóre bylo počítáno jako procento buněčné/nukleární positivity násobené intenzitou barvení. Výsledné histoskóre bylo tedy v rozmezí od 0 (minimum) do 300 (maximum).

3.5. Genová typizace NQO1

Tento postup prováděl doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D. z Ústavu lékařské genetiky LF UP a FN Olomouc u souboru 390 mužů vyšetřovaných v letech 2009-2011 pro BPH nebo PCa. Vzorky DNA byly genotypizovány pomocí metody RFLP (restriction fragment length polymorphism). PCR amplikon (279 bp, přímý primer 5'- CCT GAG GCC TCC TTA TCA GA- 3', zpětný primer 5' - AGG CTG CTT GGA GGA AAA TA – 3') byl navržen tak, aby obsahoval jedno HINFI restriční místo, které je specifické pro alelu C609T. Po natrávení PCR produktů enzymem HINFI (New England BioLabs) byly na elektroforéze v 2 % agarozovém gelu patrné buď fragmenty specifické pro alelu C609T (dlouhé 125 a 127 párů bází) nebo neštěpený PCR produkt (252 párů bází). Pro barvení gelu byl použit ethidium bromid.

3.6. TMPRSS2-ERG status

U podskupiny pacientů (N=12, tito pacienti byli vyšetřováni i pro další parametry ve studii Burdova et al., 2014) byla pomocí interfázové fluorescenční in situ hybridizace hodnocena přítomnost chromozomální přestavby 21q22 s použitím próby Repeat-Free Poseidon (TMPRSS2-ERG Del, Break, TC Probe; Kretech Diagnostics; hodnocení prováděla Mgr. Alena Burdová, Laboratoř lékařské genetiky, Nový Jičín). Ostatní pacienti byli hodnoceni pomocí kvantitativní PCR (Mgr. Alena Mičková z našeho ústavu). Vzhledem k možným nežádoucím efektům fixace u velkých kousků tkání byla přítomnost fúze TMPRSS2-ERG vyšetřena pomocí PCR pouze v menší skupině pacientů s rychlou fixací (N=35).

RNA byla izolována z parafinových řezů pomocí RNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen), kvantifikována přístrojem Nanodrop, předamplifikována pomocí Whole Trans-cryptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich) a podrobena kvantitativní PCR (TMPRSS2-ERG: přímý primer 5'- CTG GAG CGC GGC AGG AA, zpětný primer 5' - GTC CAT AGT CGC TGG AGG AG, próba Cy5-TGA GTG AGG ACC AGT CGT TG-BHQ2; POLR2A: přímý primer 5'- CAA GTT CAA CCA AGC CAT TG, zpětný primer 5' - CCA GCA TAG TGG AAG 11 GTA TTC A, UPL próba č. 87; LightCycler480, Roche). Případy s nedetekovaným POLR2A byly považovány za nehodnotitelné.

Celkem bylo v první fázi hodnotitelných 28 pacientů (10 pacientů vyhodnoceno jako TMPRSS2-ERG pozitivních a 18 negativních). Pro ověření pozorovaných asociací (viz výsledky) jsme doplnili imunohistochemické barvení PTEN, NQO1 a Ki67 na dalších 16 pozitivních a 12 negativních karcinomech prostaty ze studie Kolar Z. et al. (2014).

3.7. Statistické vyhodnocení výsledků imunohistochemie

Statistické hodnocení vztahů mezi analyzovanými proteiny a klinicko-patologickými parametry bylo provedeno softwarem Statistica 12. Párové vzorky byly hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu, zatímco rozdíly mezi nezávislými skupinami byly srovnávány pomocí Mannova-Whitneyova nebo Kruskalova-Wallisova testu. Korelace byly vyhodnoceny pomocí Spearmanova testu.

3.8. Materiál a metody analýzy tkáňové exprese kalikreinů

Do studie bylo zařazeno 70 případů pacientů s diagnostickým karcinomem prostaty, kteří byli operováni ve FN Olomouc v letech 2003-2006. Žádný z pacientů nepodstoupil neoadjunvntní léčbu. Klinická diagnóza, TNM a také patologická diagnóza včetně pTNM byly provedeny v souladu s WHO klasifikací platnou v té době (Eble et al., 2004). U každého pacienta byly vybrány reprezentativní vzorky tkáně se strukturami PCa a BPH a tkáňové řezy z těchto oblastí byly použity pro následnou imunohistochemickou (IHC) analýzu dle běžného protokolu pro imunoperoxidázovou metodu. K IHC barvení byly použity polyklonální králičí primární protilátky KLK7 a KLK11, které nám poskytla laboratoř prof. Diamandise z Toronta (ředění obou protilátek 1:200). PSA (klon ER-PR8, Dako, ředění 1:25) a PSMA (klonYPSMA-1, Abcam, ředění 1:1000) byly monoklonální myší protilátky. U obou kategorií, tedy BPH a PCa, byla hodnocena intenzita barvení, frakce pozitivních buněk, heterogenita barvení a buněčná lokalizace. Pozitivita byla klasifikována podle procentuálního zastoupení všech pozitivních nádorových buněk a intenzita IHC barvení byla kategorizována následovně: 0 – negativní, 0,5 – velmi nízká, 1 – střední, 1,5 – vysoká, 2 – silná pozitivita. Histoskóre pro následnou statistickou analýzu bylo odvozeno ze vzorce: intenzita barvení × procento pozitivních buněk. Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Statistica 8.0.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vztah mezi velikostí tkáně při fixaci a výsledky imunohistochemické analýzy

Je známo, že délka trvání fixace tkáně a fixační roztok jsou velmi důležité pro kvalitu fixované tkáně a mohou ovlivnit výsledky vyšetřovacích metod jako je PCR či imunohistochemie (Howat et Wilson, 2014). Standardní postup při fixaci tkáně prostaty po jejím vyjmutí je vložit ji celou do 10% roztoku formaldehydu na 24 hodin. Poté je tkáň zpracovávána k dalšímu vyšetření. Při tomto postupu se často stává, zvláště když je prostata větší, že její centrální oblasti jsou i po 24 hodinách nefixované a podléhají degenerativním změnám. Z tohoto důvodu jsme u vzorku 35 pacientů optimalizovali postup fixace pro imunohistochemické vyšetření. Celý postup je detailně popsán v kapitole 3.2. Zpracování operačního materiálu a fixace tkáně. Imunohistochemicky byly u této skupiny pacientů vyšetřeny stejné proteiny jako u skupiny fixované standardně (tabulka č. 7, kapitola 3.3. Imunohistochemie) a výsledky byly porovnány. Histoskóre pro Rb a Ki67 bylo nižší u tkání se standardní fixací ve srovnání s rychlou fixací (pro oba $p < 0,01$), nicméně procento pozitivních buněk bylo nezměněné. Na druhou stranu jak histoskóre, tak procento pozitivních buněk bylo u standardní fixace vyšší pro NQO1, cyklin D1 a jaderný PTEN ($p = 0,029$, $p = 0,049$ a $p = 0,001$).

4.2. Dynamické změny exprese vybraných proteinů v průběhu progresu karcinomu prostaty

K posouzení možné souvislosti dynamické progresu nádorového onemocnění v několika hlavních drahách vedoucích k patologicko-biologické a genomové nestabilitě karcinomu prostaty jsme imunohistochemicky vyšetřili 17 markerů u BPH, PIN a karcinomu prostaty u skupiny 103 pacientů, kteří byli pro karcinom prostaty operováni ve FN Olomouc v letech 2003-2011 (tabulka č. 7). Studované znaky jsme rozdělili podle jejich charakteristických vlastností na skupinu proteinů regulujících buněčný cyklus a proliferaci (Ki67, cyklin A, cyklin D1, inhibitor CDK p16 a Rb tumor supresor) a proteiny regulující genomovou integritu (supresor p53, ATM kináza a její regulátor NKX3.1, γ H2AX, 53BP1, Rev7 a JMJD1C). Další skupinou jsou znaky oxidativního stresu (8-oxoguanin, NQO1, p53). Studovali jsme také fúzní gen TMPRSS2-ERG a další nádorové supresory (PTEN, Smad4 společně s p53, Rb a NKX3.1).

Pozitivita barvení NQO1, 8-oxoguaninu, aktivovaného ATM, γ H2AX, cyklinu D1, p53, p16, SPP1, jaderného PTEN a jaderného Smad4 měla v průběhu progresu nádorového onemocnění stoupající tendenci, zatímco exprese Rb, Rev7, JMJD1C a 53BP1 klesala (obrázek č. 9, tabulka č. 9). Signifikantní korelace byly nalezeny u řady parametrů, což bude popsáno v následujících odstavcích (tabulka č. 10). Hladiny cyklinu D1 zapojeného do Rb dráhy, která reguluje přechod G1/S, vzrůstaly od hyperplazie přes PIN ke karcinomu prostaty, kde jeho hodnoty byly nejvyšší, zatímco Rb protein vykazoval trend opačný s častou ztrátou exprese u karcinomu (obrázek č. 9). Tento pokles či ztráta Rb supresoru korelovala se vzrůstající expresí p53 ($R_s -0,35$, tabulka č. 10), což je vzorec často odrážející proteinovou stabilizaci kvůli mutaci p53 (Iggo et al., 1990; Bartek et al., 1990). V souladu s dříve publikovanými studiemi byl inhibitor CDK4/6 p16 stěžejí detekovatelný u benigní hyperplazie, nicméně jeho exprese byla zvýšená u PIN a dosahovala maximálních hodnot u karcinomu (obrázek č. 9). Exprese cyklinu D1 vykazovala pozitivní korelaci s proliferačním znakem Ki67 ($R_s 0,506$), věkem pacientů ($R_s 0,352$) i hladinou sérového PSA ($R_s 0,369$). Není překvapením, že ve srovnání s jinými nádory bylo u karcinomů prostaty procentuální zastoupení buněk vykazujících pozitivitu Ki67 obecně nižší (přibližně kolem 10 % buněk karcinomu prostaty). Navíc frakce buněk v S/G2 fázi, které byly cyklin A pozitivní, byla rovněž nižší než Ki67 a pozitivita cyklinu A se pohybovala mezi 1-5 % pozitivitu nádorových buněk, což napovídá, že většina Ki67 pozitivních nádorových buněk se nachází v G1 fázi. Velmi důležité je, že exprese většiny studovaných proteinů vykazovala dynamické změny v průběhu progresu onemocnění směrem od benigních lézí k maligním.

Charakteristické rozpětí / počty pacientů			
Věk	51-60 32 (5)	61-70 56 (24)	71-81 15 (6)
Sérový PSA (ng/ml)	<4 15 (4)	4-10 59 (23)	>10 29 (8)
Gleasonovo skóre	<7 28 (8)	7 51 (21)	>7 24 (6)
Stadium nádoru	pT2a-c 80 (29)	pT3a-b 20 (5)	pT4 3 (1)
Riziko	nízké 24 (8)	střední 41 (16)	vysoké 38 (11)
NQO1 genotyp	CC 9 (6)	CT 13 (5)	TT 5 (4)

Stadia nádorů byla rozdělena na lokalizovaná (pT2) a pokročilá (pT3 and pT4).

Rizikové skupiny byly určeny na základě klinických a patologických dat: nízké riziko (pT1–T2a, GS ≤ 6 a PSA≤10 ng/ml), střední (alespoň jedno z následujících: pT2b-c, G=7, nebo 10<PSA≤20 ng/ml) a vysoké (alespoň jedno z následujících: pT3–T4, GS>7, nebo PSA>20 ng/ml).

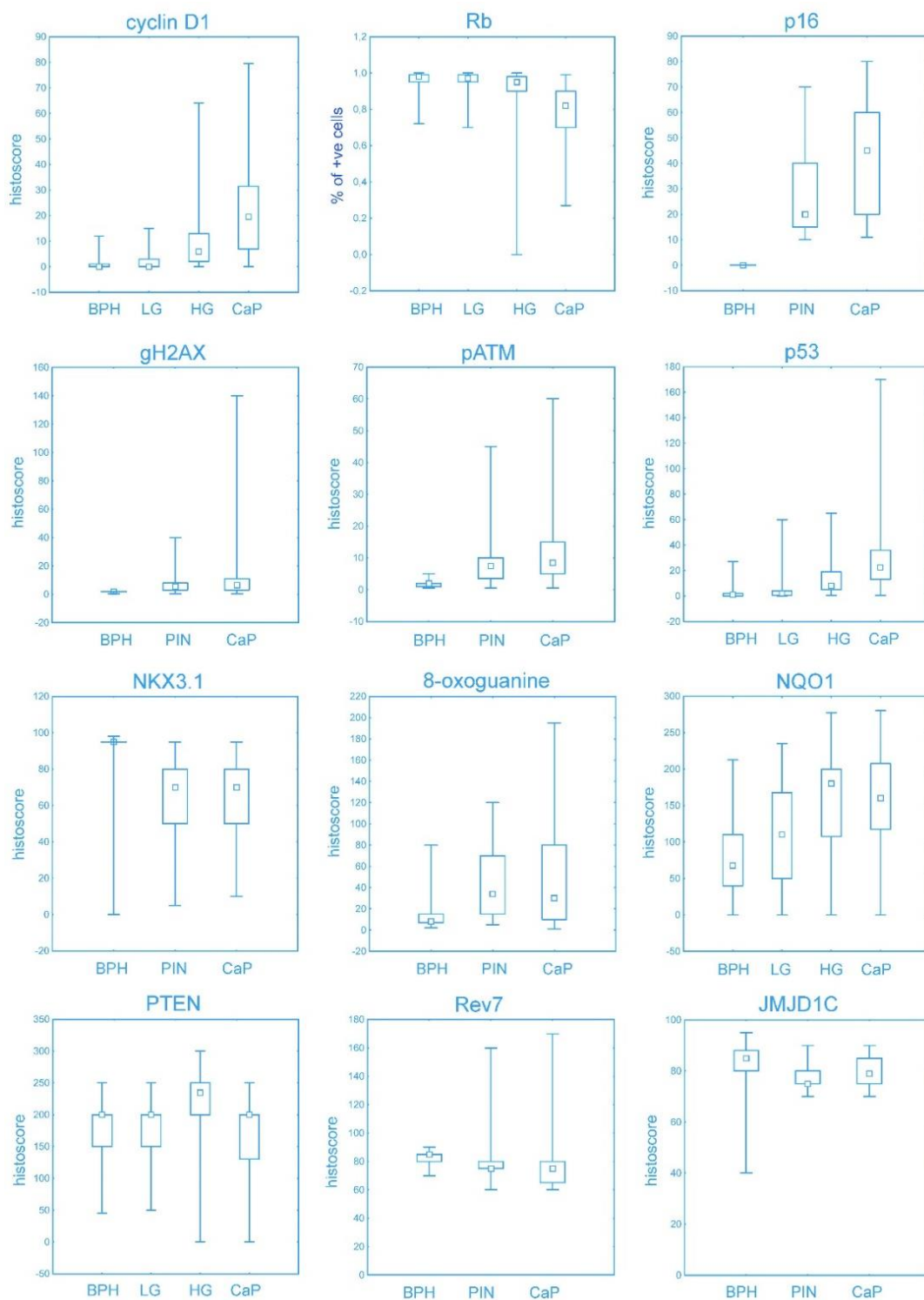
Tabulka č 8.: Kohorta pacientů vyšetřených imunohistochemicky (N=103; skupina 35 pacientů, jejichž tkáň byla fixována optimalizovanou „rychlou fixací“, je uvedena v kulatých závorkách).

proměnná 1	proměnná 2	NQO1	D1	p53	Rb	PTEN	PTEN nuc	SMAD4	SPP1
BPH vs.	LGPIN	<0,001	<0,001	<0,001	nesig.	nesig.	nesig.	0,003	nesig.
	HGPIN	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	CaP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	not sig.	<0,001	<0,001	<0,001
LGPIN vs.	HGPIN	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	CaP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	not sig.	<0,001	<0,001	<0,001
HGPIN vs.	CaP	nesig.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	nesig.	nesig.
proměnná 1	proměnná 2	8-oxo	gH2AX	pATM	53BP1	JMJD1C	Rev7	p16	NKX3.1
BPH vs.	PIN	<0,001	<0,001	<0,001	nesig.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	CaP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,002	<0,001	<0,001
PIN	CaP	nesig.	0,009	0,04	<0,001	nesig.	nesig.	<0,001	nesig.

Tabulka č. 9: Porovnání BPH, PIN a PCa pomocí Wilcoxonova signed-rank testu.

	věk	NQO1	8-oxo	p53	Rb	Smad4	D1	SPP1	PTEN	Ki67	PSA	p16	NKX3.1	gH2AX	pATM	53BPP1	JMJD1C	Rev7
věk	1,000																	
NQO1	-0,125	1,000																
8-oxo	-0,280	0,527	1,000															
p53	-0,094	0,301	0,189	1,000														
Rb	-0,052	-0,180	0,096	-0,350	1,000													
Smad4	0,115	-0,187	0,028	0,018	-0,024	1,000												
D1	0,352	0,089	-0,150	0,275	-0,091	0,228	1,000											
SPP1	0,130	-0,330	-0,151	-0,145	0,223	-0,171	0,108	1,000										
PTEN	-0,145	-0,114	-0,086	0,008	0,198	0,028	-0,187	0,092	1,000									
Ki67	0,126	-0,118	-0,177	-0,023	-0,176	0,330	0,506	0,004	0,023	1,000								
PSA	0,560	-0,208	-0,146	0,014	0,088	-0,123	0,369	0,220	-0,041	0,211	1,000							
p16	0,009	-0,009	0,027	0,165	0,126	-0,113	0,133	0,068	-0,218	0,235	0,157	1,000						
NKX3.1	0,021	-0,273	-0,257	0,054	-0,078	0,208	-0,006	-0,006	-0,448	0,048	-0,080	0,259	1,000					
gH2AX	0,115	0,125	-0,027	0,303	-0,022	0,146	-0,060	-0,036	-0,260	-0,150	-0,117	0,018	0,076	1,000				
pATM	0,017	0,203	0,175	0,257	-0,017	0,107	-0,063	0,042	-0,281	-0,041	-0,245	0,128	0,140	0,763	1,000			
53BPP1	-0,154	-0,176	-0,076	-0,078	0,108	0,224	-0,092	0,110	-0,167	-0,041	-0,081	0,253	0,553	-0,007	0,004	1,000		
JMJD1C	-0,121	-0,256	-0,104	0,111	0,201	0,223	0,314	0,208	0,092	0,263	0,140	0,087	0,424	-0,209	-0,210	0,410	1,000	
Rev7	0,017	-0,131	-0,046	-0,065	0,183	-0,135	0,140	0,293	-0,254	-0,059	0,135	0,314	0,325	-0,115	-0,058	0,221	0,360	1,000

Tabulka č. 10. Spearmanova korelace v souboru s rychlou fixací (N=35).



Obrázek č. 9: Expres vybraných proteinů v BPH, PIN (low-grade, high-grade) a PCa. Low-grade PIN a high-grade PIN byly rozlišeny pro uvedné proteiny. Procento pozitivních buněk je ukázáno pro Rb protein. Krabicové grafy reprezentují medián, 25%-75% percentily a rozsah hodnot. Expres proteinů byla signifikantně rozdílná u nádorů a benigních oblastí ($p < 0,001$; porovnání s PIN je v tabulce č. 9).

4.3. Odpověď na poškození DNA jako protinádorová bariéra

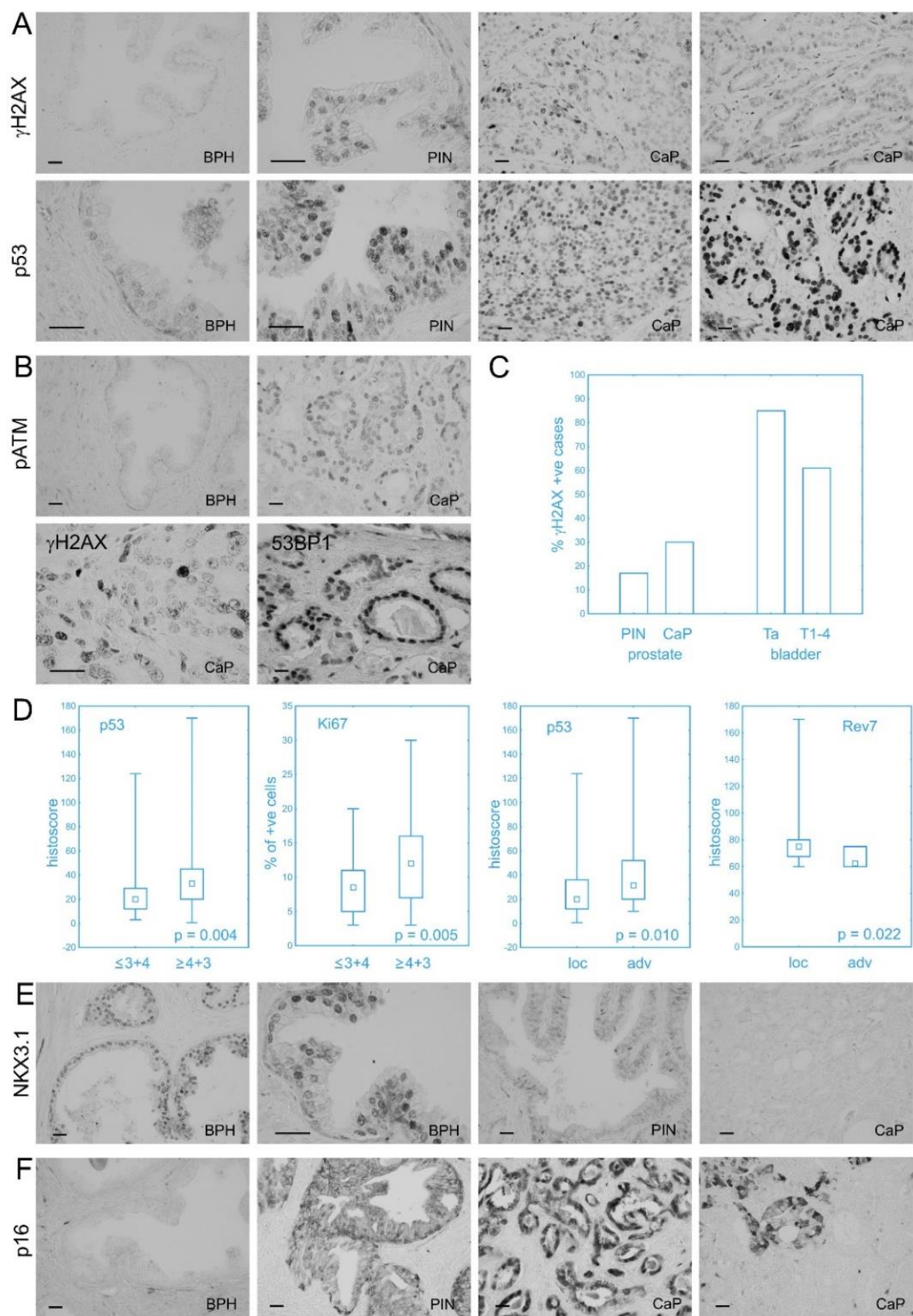
Jedním z hlavních cílů, kterým jsme se chtěli věnovat v této studii, byl rozsah a sled aktivace odpovědi na DDR v průběhu karcinogeneze (Halazonetis et al., 2008). Úroveň této aktivace byla posuzována podle exprese γ H2AX, který je zásadním znakem aktivovaných kináz podílejících se na odpovědi buněk na poškození DNA, jako jsou ATM či ATR. Protein γ H2AX byl detekován pouze ojediněle v buňkách BPH (přibližně 2 %), nárůst jeho exprese byl fokálně pozorován u PIN, avšak zde exprese dosahovala výrazné variability u jednotlivých pacientů (obrázek č. 9). U PCa v několika případech pozitivita γ H2AX dosáhla 40-70 % nádorových buněk. Příklady imunohistochemického barvení γ H2AX jsou zobrazeny v obrázku č. 10A. Kromě těchto výsledků jsme dále zaznamenali podobný trend také u aktivované ATM (fosforylované na serinu 1981), hlavní kinázy zodpovědné za fosforylaci histonu H2AX (obrázek č. 9, obrázek č. 10B). Ze všech námi testovaných proteinů γ H2AX a pATM spolu korelovaly nejsilněji (R_s 0,763, tabulka č. 10). Dalším aspektem aktivace DDR, zejména odpovědi na DSB, je charakteristické formování tzv. nukleárních fokusů, akumulace proteinů zapojených do oprav DNA (Lukas et al., 2011). Fokální nukleární pozitivita byla zjevná pro γ H2AX a 53BP1 v jádrech některých nádorových buněk (obrázek č. 10). Navzdory detekované aktivaci DDR byl celkový rozsah signálů jednoznačně nižší, než bylo pozorováno u jiných typů solidních nádorů, a maximum aktivace bylo patrné až ve stadiu karcinomu. Jako příklad je uvedeno srovnání aktivace DDR (hodnocené počtem případů s alespoň 10 % γ H2AX pozitivních buněk) u PCa a karcinomu močového měchýře (obrázek č. 10C).

S ohledem na klinicko-patologické parametry, aberantní exprese p53 (pozitivita p53 v nádorech obvykle souvisí s jeho mutací a defektním odbouráváním pomocí proteazomu) a pozitivita proliferčního markeru Ki67 byly signifikantně vyšší v nádorech s Gleasonovým skóre 4+3 a vyšším (obrázek č. 10D). Kromě toho, exprese p53 byla také vyšší u pokročilých karcinomů v porovnání s lokalizovaným typem onemocnění. Exprese Rev7 (viz níže) byla v tomto srovnání naopak nižší (obrázek č. 10D).

Ztráta NKX3.1 je jedním z charakteristických znaků karcinomu prostaty, přičemž zásadní funkcí tohoto tumor supresoru je pozitivní regulace aktivace ATM kinázy (Bowen et al., 2013). Stav NKX3.1 jsme proto považovali za možnou součást mechanismu DDR. Zatímco obraz barvení NKX3.1 byl poměrně variabilní mezi pacienty, pozorovali jsme jasný trend s maximem detekovaného proteinu u BPH v porovnání s aberantně nízkou hladinou u PIN a PCa (obrázek

č. 9., obrázek č. 10E). V neposlední řadě jsme do kontextu naší studie zahrnuli vyšetření tumor supresoru p16, schopného v obou kontrolních bodech buněčného cyklu navodit buněčnou senescenci. Jak bylo krátce zmíněno výše, exprese p16 měla vzrůstající tendenci od BPH přes PIN a maximálních hodnot dosahovala u PCa (obrázek č. 10F). Zajímavé je, že exprese p16 byla u PCa často heterogenní a v některých oblastech nádorů dokonce kompletně chyběla (obrázek č. 10F), pravděpodobně proto, že v těchto místech došlo ke ztrátě tohoto tumor supresoru.

Naším závěrem je, že opravy poškození DNA jsou aktivovány v premaligních lézích lidské prostaty a následně silněji v nádorových buňkách karcinomu prostaty. Na druhé straně je celkový rozsah DDR méně výrazný než u jiných typů nádorů a kulminuje později během karcinogeneze. Toto odpovídá nižší frekvenci zvýšené exprese p53 , která může indikovat jeho mutaci. Význam těchto výsledků a mechanismus oprav DNA bude zmíněn s ohledem na cílenou léčbu detailně v diskuzi.



Obrázek č. 10. Odpověď na poškození DNA jako protinádorová bariéra u karcinomu prostaty. Vyrůstající genotoxický stres od BPH přes PIN až po PCa ilustruje γ H2AX, p53 a fosfo-ATM barvení (A a B). Silná pozitivita p53 může indikovat mutaci p53 (A, vpravo). Jaderná pozitivita γ H2AX a 53BP1 jako markeru aktivace mechanismů odpovědi na poškození DNA u PCa (B). Celkový rozsah signálů DDR je méně vyjádřený u PCa, než u jiných typů nádorů (například karcinomu močového měchýře) a kulminuje spíše u maligních stadií než u stadií premaligních (C). Vyšší Gleasonovo skóre bylo spojeno se silnou expresí p53 (pravděpodobně mutovaného) a vyšší proliferací (imunohistochemické barvení Ki67). Kromě zmíněného p53 byla patrná také snižující se exprese Rev7, kterou jsme zaznamenali u pokročilých PCa v porovnání s lokalizovanými karcinomy (D). Kompletní (NKX3.1) a parciální (p16) ztráta tumor supresorů byla zastižena u invazivních PCa (E a F vpravo). Měřítko reprezentuje 50 mikrometrů.

4.4. Oxidativní stres a NQO1

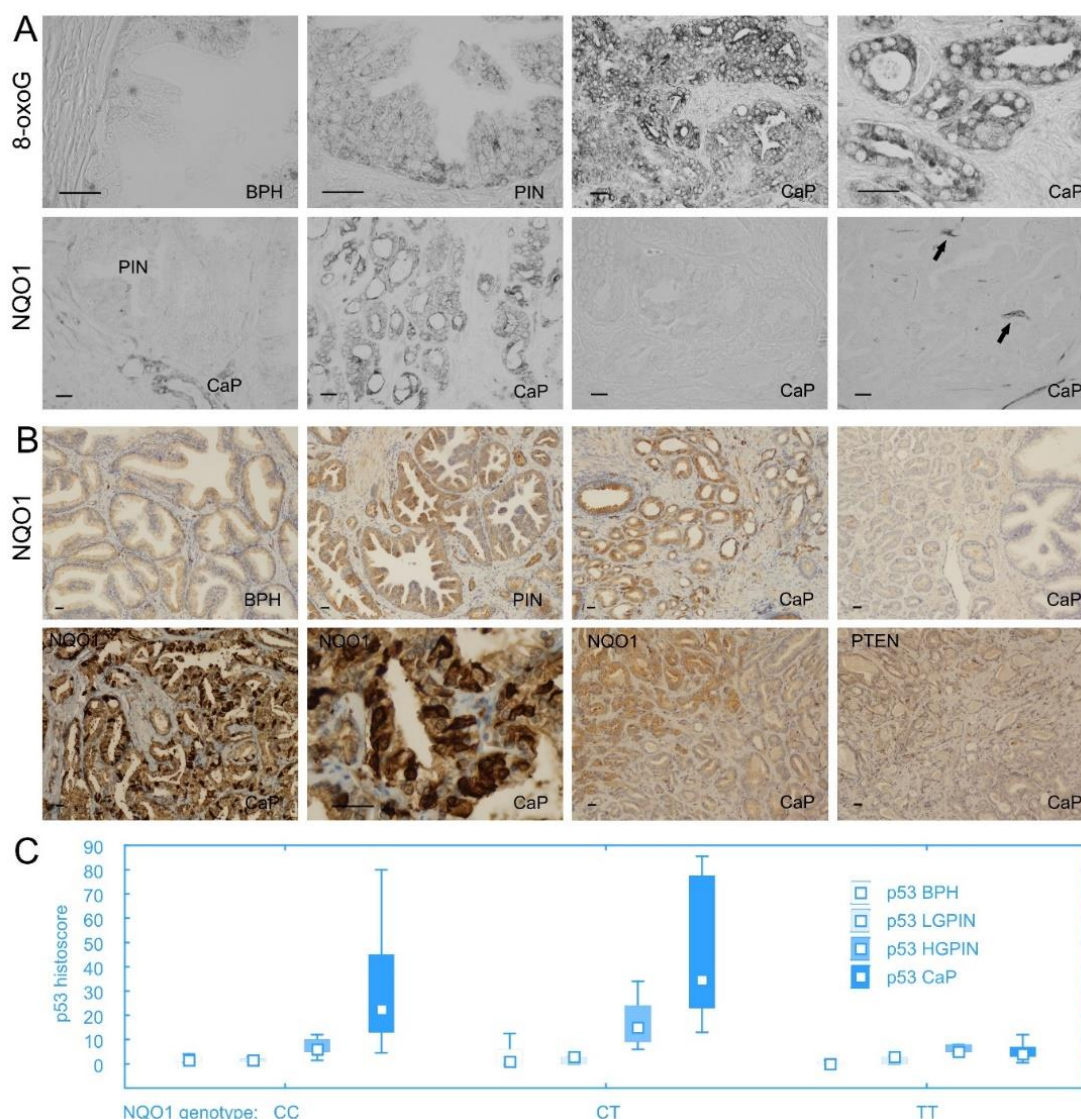
Chronický zánět a oxidativní stres jsou jedněmi z hlavních známek PCa a přispívají také ke genovému nestabilitě. Ve snaze získat lepší přehled o kinetice a rozsahu oxidativního stresu v procesu karcinogeneze u lidské prostaty jsme imunohistochemicky vyšetřili 8-oxoguanin a NQO1, cytoprotektivní enzym důležitý v ochraně proti oxidativnímu stresu a faktor stabilizující p53 (Dinkova-Kostova a Talalay P., 2010). Dále jsme stanovili genetický status NQO1, jeho C609T variantu, u kontrolní skupiny 390 mužů (tabulka č. 11).

	Genotyp NQO1 (rs1800566)				Frekvence alel	
	N	609 CC	609 CT	609 TT	C	T
Karcinom prostaty	171	110 (64,3%)	56 (32,8%)	5 (2,9%)	276 (80,7%)	66 (19,3%)
Benigní struktury	219	149 (68,1%)	64 (29,2%)	6 (2,7%)	362 (82,6%)	76 (17,4%)
Souhrn	390	259 (66,4%)	120 (30,8)	11 (2,8%)	638 (81,8%)	144 (18,2%)

Tabulka č. 11: Frekvence genotypů a alel NQO1.

Pozorovali jsme vyrůstající expresi 8-oxoguaninu a také NQO1 od BPH přes PIN s maximem u PCa (obrázek č. 9). U obou znaků dominovala zejména cytoplazmatická lokalizace, a to zejména ve skupině PCa (obrázek č. 11A, B), v několika případech byla také zachycena nukleární pozitivita NQO1 (obrázek č. 11B). Zjistili jsme také pozitivní korelaci mezi nárůstem NQO1 a 8-oxoguaninem (R_s 0,527, tabulka č. 11). Podle očekávání všechny nádory u pacientů s homozygotním TT genotypem NQO1 v pozici 609 vykazovaly výpadek v imunohistochemickém barvení tohoto proteinu (obrázek č. 11A, B). Dále jsme zaznamenali u několika pacientů s heterozygotním genotypem (CT) či normálním homozygotním

genotypem (CC) negativní oblasti pro tento protein (obrázek č. 11A, B). Zároveň byly pozitivní cévy ve stromatu, což ukazuje správný průběh imunohistochemického barvení NQO1 (obrázek č. 11A). I když exprese dalších proteinů v těchto NQO1 negativních oblastech se obvykle nelišila od oblastí pozitivních, v jednom případě jsme pozorovali ztrátu barvení PTEN i NQO1 ve stejném místě (obrázek č. 11B). Současně a ve shodě s funkcí NQO1 jako protektivního faktoru před oxidativním stresem a před proteolýzou p53 byla u pacientů s homozygotním TT genotypem zaznamenána signifikantně nižší exprese p53 v porovnání s heterozygotním a normálním homozygotním NQO1 genotypem (obrázek č. 11C, $p < 0,005$). Výsledky barvení ostatních vyšetřovaných proteinů byly nezávislé na genotypu NQO1. Nebyla také zaznamenána žádná asociace mezi expresí NQO1 s klinicko-patologickými parametry (sérová hladina PSA, Gleasonovo skóre a rizikové skupiny).



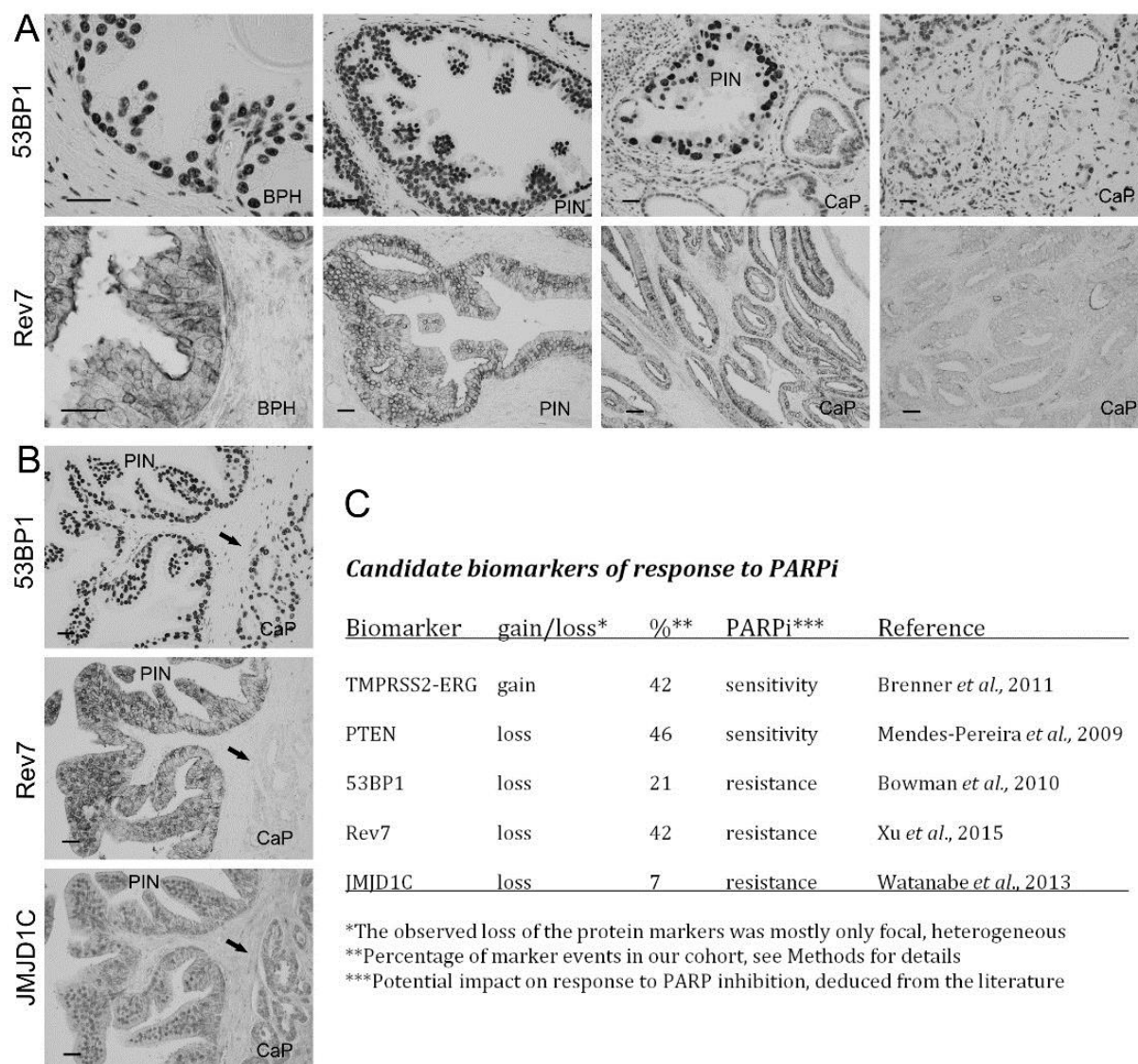
Obrázek č. 11: Oxidativní stres a NQO1 u karcinomu prostaty. Expres obou proteinů 8-oxoguaninu a NQO1 vzrůstala od BPH přes PIN k PCa (A; rozdílná barvicí metoda je ukázána v horním panelu B). Všechny nádory od pacientů s geneticky vyšetřenou homozygotní variantou genotypu NQO1 (TT na pozici 609) ztratily detekovaný protein NQO1 (A, třetí obrázek v dolním panelu; B, pravý obrázek v horním panelu). Zastihli jsme několik rozsáhlejších NQO1 protein-negativních oblastí u pacientů s heterozygotním genotypem (CT), tento jev byl zjevný v barvení imunoperoxidázou bez dobarvení jader, krevní cévy ve stromatu vykazovaly zřetelnou NQO1 pozitivitu, v kontrastu s okolními negativními buňkami nádoru (A, pravý obrázek v dolním panelu). Expres dalších proteinů, které jsme vyšetřovali v naší studii, tyto výpadky exprese nevykazovaly. V jednom z případů oblast s výpadkem exprese NQO1 korelovala s lokální ztrátou IHC barvení PTEN ve stejné lokalizaci (B, dva spodní obrázky vpravo). Mimoto silná perinukleární exprese NQO1 byla zaznamenána u některých pacientů (B, dva spodní obrázky vlevo). Měřítka představuje 50 mikrometrů. V souladu s funkcí NQO1 v ochraně základních hladin p53 před proteolýzou nádory u pacientů s homozygotní TT variantou genotypu NQO1 vykazovaly signifikantně nižší expresi p53 v porovnání s pacienty s heterozygotním a normálním homozygotním genotypem NQO1 (obrázek č. 11C, $p < 0,005$). Rámečky reprezentují medián, 25-75 % percentil a rozsah hodnot.

Naše genetická analýza NQO1 u 171 pacientů s PCa a u 219 zdravých mužů neprokázala žádný vztah genotypu NQO1 k prevalenci vzniku karcinomu prostaty (tabulka č. 11). Tyto výsledky nepodporují hypotézu o přímé korelaci nedostatečné funkce NQO1 s predispozicí ke vzniku karcinomu prostaty, alespoň ne v populaci mužů z České republiky, kteří byli v této studii vyšetřováni. Na druhé straně data o expresi NQO1 a 8-oxoguaninu ukazují na možnou souvislost mezi odpovědí na oxidativní stres a progresí karcinomu prostaty.

4.5. Poruchy DNA oprav a cílená léčba

Výhodou pro léčbu inhibitory PARP jsou určité abnormality v odpovědi buňky na poškození DNA a také stav proteinů, které mohou směřovat opravy dvouvláknových zlomů buď k HR, nebo k NHEJ, (Lord a Ashworth, 2012). Vyšetřili jsme 5 proteinů, které mají pravděpodobně vliv na odpověď k inhibitorům PARP u skupiny pacientů s pokročilým PCa. Dva z těchto faktorů, a to výskyt fúzního genu TMPRSS2-ERG a ztráta nádorového supresoru PTEN, byly již studovány extenzivně, a proto jsme si tyto znaky vybrali pro porovnání s ostatními. Exprese 53BP1, JMJD1C a Rev7, jejichž aberantní ztráta může způsobit rezistenci k inhibitorům PARP (Bouwman et al., 2010; Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2015), nebyla dosud u karcinomu prostaty studována. V průběhu progresu od BPH přes PIN až po PCa jsme pozorovali snižující se expresi u PTEN, 53BP1, Rev7 a JMJD1C (obrázek č. 9).

Aberantní pokles či ztráta 53BP1, Rev7 a JMJD1C byly heterogenní, často patrné v nádorových buňkách pouze okrskově, ačkoli u Rev7 postihovala ztráta exprese v některých případech rozsáhlejší oblasti nádoru (obrázek č. 12A, B). Zaznamenaná ztráta exprese těchto reparačních faktorů byla většinou omezena pouze na jeden z těchto proteinů (obrázek č. 12B), což naznačuje, že absence jednotlivých proteinů byla selektivní a nerefletovala problémy při fixaci tkáně nebo nekrotické změny. Porovnáním dat získaných vyšetřením těchto 5 znaků byla prokázána prevalence aberantních případů u skupiny PCa. Tyto změny mohou mít vliv na odpověď k léčbě inhibitory PARP, které jsou považovány za jedny ze slibných možností léčby pokročilého karcinomu prostaty (obrázek č. 12C).



Obrázek č. 12: Potenciální prediktivní znaky pro terapii karcinomu prostaty pomocí inhibitorů PARP. Aberantní pokles či ztráta 53BP1 a Rev7 byly heterogenní, výrazněji patrné u ojedinělých nádorových buněk (A, horní panel), i když pro Rev7 může ztráta exprese postihnout poměrně rozsáhlé oblasti nádoru (A, zcela vpravo v dolním panelu). Pozorovaná ztráta těchto reparačních faktorů byla běžně omezena na jeden z proteinů (B, paralelní sekce PCa barvení IHC pro proteiny, kde pouze Rev7 vykazuje ztrátu v nádorové oblasti označené šipkou), předpokládáme, že heterogenní absence těchto reparačních proteinů byla selektivní a nereflektovala změny způsobené fixací či oblastí nekróz. Souhrnná data pěti potenciálních markerů ukazuje prevalenci u případů z naší studie a jejich potenciální dopad na odpověď léčby inhibitory PARP (C).

4.6. Analýza exprese kallikreinů 7 a 11 v benigních a nádorových buňkách prostaty

Imunohistochemická analýza exprese KLK7 a KLK11 v buňkách benigních a nádorových na nezávislém souboru pacientů prokázala sníženou expresi obou proteinů u PCa v porovnání s BPH ($P=0,026$ a $P=0,001$). Zaznamenána byla pozitivní korelace KLK7 ($R_s=0,74$) a KLK11 ($R_s=0,35$) mezi jejich expresí v PCa a BPH. Byla také zaznamenána statisticky významná korelace mezi KLK7 a KLK11 ($R_s=0,242$) v místech hyperplazie, ale nikoli v nádorové tkáni. Paralelně bylo provedeno barvení PSA (KLK3) a PSMA, ale nepozorovali jsme korelaci s expresí KLK7 a KLK11. Exprese PSA byla signifikantně snížena u PCa ($P<0,001$) a zvýšena v případě PSMA ($P<0,001$). Nebyly zjištěny výrazné rozdíly mezi nádory s Gleasonovým skóre <7 a Gleasonovým skóre ≥ 7 či rozdíly u různě pokročilých karcinomů (tj. mezi pT2 a pT3-pT4) nebo s ohledem na hladiny sérového PSA. Zaznamenali jsme pouze slabě zvýšenou expresi KLK11 ($P=0,049$) a PSMA ($P=0,114$) u pokročilého karcinomu prostaty v porovnání s lokalizovaným onemocněním.

5. DISKUZE

Jedním z cílů naší studie bylo porovnání výsledků imunohistochemie u tkání prostaty fixované standardním postupem, nebo v podobě malých kousků (tzv. rychlá fixace). U Rb a Ki67 bylo patrné snížení histoskóre při standardní fixaci ve srovnání s rychlou fixací, nicméně procento pozitivních buněk zůstalo nezměněné. Vzhledem k pomalé penetraci folmaldehydu (cca 1 mm za hodinu) do středových partií tkáně mohly být epitopy Rb a Ki67 během standardní fixace poškozeny, což mohlo vést k nižší intenzitě barvení (Howat a Wilson, 2014). Jak histoskóre, tak procento positivity u NQO1, cyklinu D1 a jaderného PTEN byly překvapivě zvýšené v tkáních fixovaných standardním postupem, což může souviset s ischemickými změnami před fixací tkáně. Znak oxidativního poškození DNA 8-oxoguanin jsme analyzovali pouze u případů s rychlou fixací, kde pozitivně koreloval s hodnotami NQO1. Poškození DNA, vyšší hladiny 8-oxoguaninu a výraznější oxidace lipidů a proteinů byly popsány u chronicky ischemické tkáně prostaty králíků (Thurmond et al., 2015). Toto může být také příčina zvýšené exprese NQO1 jako enzymu s cytoprotektivní funkcí (Dinkova-Kostova a Talalay, 2010). Rovněž jaderný PTEN a cyklin D1 mohou být zapojeny do odpovědi buňky na poškození DNA. Jaderný PTEN je důležitý pro udržení chromozomální stability ve spolupráci s CENP-C a Rad51 (Shen et al. 2007). Kromě své hlavní role v regulaci buněčného cyklu cyklin D1 interaguje s Rad51 a napomáhá opravám DNA pomocí homologní rekombinace (Jirawatnotai et al., 2011). Tyto výsledky podtrhují význam rychlé fixace malých částí tkáně.

Hlavní část dizertační práce poskytuje nové informace o dynamice klíčových faktorů zapojených do regulace genomové integrity včetně signalizace poškození DNA, mechanismů jejich oprav, oxidativního stresu a regulace buněčného cyklu v průběhu tumorigeneze karcinomu prostaty. Předchozí studie ukazují, že je možné predikovat progresi PCa a odpověď na terapii podle alterace proteinů Rb dráhy (zde cyklin D1, p16, Rb), (Aparicio et al., 2011). Podobně jsme z našich výsledků chtěli zdůraznit ty, které by mohly být potenciálně významné pro klinickou praxi. Patří sem 1) aktivace odpovědi na poškození DNA jako biologická bariéra karcinogeneze PCa, 2) oxidativní stres a role NQO1 a 3) aberace v mechanismech oprav DNA, které jsou důležité pro možnou léčbu inhibitory PARP.

Na základě exprese γ H2AX, pATM, fokální exprese 53BP1 a akumulace p53 jsme došli k závěru, že podle očekávání dochází v průběhu nádorové progresy k aktivaci odpovědi na

poškození DNA jako protinádorové bariéry. Jakkoli je zde patrná analogie s progresí nádorů jiných somatických typů jako například plic, mléčné žlázy, tlustého střeva či močového měchýře (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Bartkova et al., 2010; Evangelou et al., 2013), chtěli jsme zdůraznit některé neobvyklé znaky této protinádorové bariéry v prostatě, rozdílné od jiných typů malignit (obrázek č. 10C, srovnání s nádory močového měchýře). Mezi takové znaky patří například málo výrazná a pozdě kulminující DDR v průběhu progresu od BPH přes PIN s vrcholem u PCa. Předpokládáme, že rozdíl v tom, jak funguje DDR u prostaty, může odrážet kombinaci příčin, která zahrnuje všeobecně nižší proliferaci (zde dokumentována nízkou jadernou expresí Ki67 a velmi nízkou expresí cyklinu A), nízkou expresí histonu H2AX (popsáno pro lumenální buňky prostaty), (Jaamaa et al., 2010) a také častou ztrátu tumor supresoru NKX3.1, jehož normální funkcí je aktivace ATM kinázy (Bowen et al., 2013). Tato nízká proliferace prostatických nádorových buněk je na rozdíl od jiných závažných malignit doprovázena poměrně nízkým replikačním stresem. Ve skutečnosti je vysoký replikační stres u jiných typů nádorů jednou z hlavních příčin častého endogenního poškození DNA, což aktivuje bariéru DDR, která následně vytváří selekční tlak na nádorové klony s mutantním p53 (Halazonetis et al., 2008). To odpovídá skutečnosti, že frekvence mutací p53 je obecně u PCa nižší než u jiných typů karcinomů. Recentní publikovaná metaanalýza ukázala u PCa pouze 17% frekvenci genetické mutace p53 (Williams et al., 2014). Tento výsledek je velmi blízký výsledku naší studie ve skupině případů PCa (14 %), které vykazovaly vysoké procento p53 pozitivních buněk. Tento znak byl popsán v roce 1990 jako charakteristický pro stabilizující mutace proteinu p53 (Iggo et al., 1990; Bartek et al., 1990). Vzhledem k výše uvedeným zjištěním předpokládáme, že protinádorová bariéra DDR je mnohem méně aktivní u PCa, což znamená, že tlak na kontrolní body je daleko nižší, čímž je také nižší selekce buněk s mutovaným p53 genem, než je tomu u jiných nádorů. Podobně testikulární nádory ze zárodečných buněk vykazují minimální aktivaci odpovědi na poškození DNA a zároveň mají velmi nízkou frekvenci mutovaného p53 (Bartkova et al., 2007; Bartkova et al., 2014). V souladu s těmito poznatky je i pozitivní korelace mezi aberantní ztrátou tumor supresoru Rb a vysokou expresí p53 (mutovaného p53) v naší studii (tabulka č. 10). Jelikož ztráta Rb vede k deregulaci kontrolního restričního bodu G1/S (Bartek et al., 1996) a způsobuje replikační stres i aktivaci DDR (Tort et al., 2006), předpokládáme, že v tomto kontextu může být preferován výběr nádorových buněk s mutantním p53 ve snaze vyhnout se senescenci či apoptóze. Hypotézu podporuje nejen

korelace mezi ztrátou Rb a aberantním p53, ale také asociace mezi aberantním p53 a agresivitou PCa.

Druhým hlavním tématem, které jsme zde zmiňovali, byly změny v oxidativním poškození DNA související s nádorovou progresí a role hlavního antioxidačního enzymu NQO1 v predispozici či progresi PCa. Na genetické úrovni jsme nezjistili žádné asociace mezi genotypem NQO1 a incidencí PCa, což je v souladu s jinými studiemi bělošské populace (Steiner et al., 1999; Ergen et al., 2007; Steinbrecher et al., 2010; Stoehr et al., 2012). Na úrovni znaků studovaných imunohistochemicky jsme zjistili, že exprese NQO1 a detekce 8-oxoguaninu se zvyšovaly od BPH přes PIN k PCa. To svědčí pro zvyšující se oxidativní stres v průběhu karcinogeneze a pro potenciální přínos NQO1 jako protektora genomové integrity. Zvyšující se exprese 8-oxoguaninu v souvislosti s věkem a s přítomností PCa byla zjištěna různými metodami v tkáních, moči a krevním séru (Malins et al., 2001; Miyake et al., 2004; Kosova et al., 2014). Role NQO1 jako supresoru progresi PCa byla nedávno zkoumána na myších modelech TRAMP (Thapa et al., 2014; Bouchal et al., 2011). Experimentální snížení exprese NQO1 v buňkách karcinomu prostaty zvyšovalo hladiny nukleárního IKK α a NF- κ B, což bylo spojeno s prozánětlivou signalizací a horší odpovědí na androgen deprivaci terapii (Thapa et al., 2014; Bouchal et al., 2011). Role NQO1 jako protektivního faktoru udržujícího bazální hladiny p53 před proteozomální degradací je dobře popsána (Dinkova-Kostova a Talalay, 2010) a tyto poznatky jsou konzistentní i s námi pozorovanou nízkou hladinou proteinu p53 u pacientů s homozygotní variantou C609T genotypu NQO1, který eliminuje funkci NQO1. Neobvyklá a zatím nepopsaná byla úplná absence proteinu NQO1 v poměrně rozsáhlých nádorových partiích, kde byla ale zřetelná pozitivita NQO1 v endotelu krevních cév. Toto jsme pozorovali v několika případech PCa a domníváme se, že tato tumor-selektivní ztráta NQO1 může reflektovat tlak ke zmírnění protinádorové funkce NQO1, která zahrnuje schopnost stabilizace „wild-type“ p53 jako součást buněčného protinádorového mechanismu. Dále jsme zvažovali, že fokální ztráta exprese NQO1 u pokročilých nádorů PCa podporuje teorii o funkci NQO1 jako tumor supresoru, jehož ztráta může umožnit nádorovou progresi. Tato teorie je konzistentní s výše uvedeným faktem, že potlačení exprese NQO1 podpořilo prozánětlivou signalizaci a nádorový růst nezávislý na androgenech (Thapa et al., 2014).

Výrazným rysem nádorů prostaty je podle recentní práce chromozomální nestabilita a pacienti s PCa s defektním mechanismem oprav DSB vykazovali velmi slibnou odpověď na

léčbu inhibitory PARP (Mateo et al., 2015). V tomto smyslu jsou důležité námi pozorované defekty DSB reparačních faktorů a další aberace jako kandidáti možných prediktivních biomarkerů pro terapii inhibitory PARP. Vysoce relevantní pro karcinom prostaty je také fakt, že enzymatická aktivita PARP1 je nutná pro transkripční aktivitu androgenového receptoru a následující proliferaci buněk, a to jak androgen-dependentních, tak kastročně rezistentních PCa (Schiewer a Knudsen, 2014). PARP1 také reguluje aktivitu ETS transkripčních faktorů v modelech nádorů prostaty, což je klinicky signifikantní vzhledem k vysokému procentu nádorů s fúzním genem TMPRSS2-ERG (Brenner et al., 2011). V současnosti probíhá klinická studie fáze II u pacientů s metastatickým PCa, kdy je kombinován inhibitor PARP veliparib s abirateronem (NCT01576172). Kromě fúzního genu TMPRSS2-ERG byla popsána rovněž ztráta tumor supresoru PTEN jako prediktor dobré odpovědi na inhibici PARP (Brenner et al., 2011; Mendes-Pereira et al., 2009).

Dále jsme identifikovali podskupinu PCa s různým stupněm aberantně snížené exprese či její ztráty u 53BP1, JMJD1C a Rev7, které doposud nebyly u karcinomů prostaty studovány. U těchto proteinů byly popsány defekty u lidských „triple-negativních“ karcinomů prsu (Bouwman et al., 2010; Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2015). Jejich aberantní ztráta má vliv na rovnováhu mezi HR a NHEJ v opravě DSB, čímž způsobují rezistenci k inhibitorům PARP u nádorů s defektní HR, které jsou jinak velmi citlivé k inhibici PARP. Prezentované výsledky naší práce ukazují, že všechny tyto tři proteiny vykazují fokální defekty u některých případů PCa. Úplná ztráta exprese 53BP1 a JMJD1C nebyla zaznamenána, nicméně aberantní ztráta Rev7 byla pozorována v poměrně velkých oblastech nádoru u malé části případů PCa (obrázek č. 12). Proto se domníváme, že aberantní redukce či ztráta těchto faktorů, zvláště Rev7, mohou reprezentovat jednu z překážek nové cílené terapie PCa inhibitory PARP. Mimoto jsme zaznamenali, že nádory v naší kohortě byly primární léze PCa, přičemž u některých pacientů se následně vyskytly metastázy. Toto je stadium nejvhodnější pro léčbu inhibitory PARP (Mateo et al., 2015), a to z toho důvodu, že sekundární PCa často vykazují více reparačních defektů, které jsou patrné jen ojediněle u nádoru primárního. Dále předpokládáme, že zvýšená exprese cyklinu D1 a ztráta NKX3.1, které jsme zaznamenali v souboru námi vyšetřených PCa, by také mohly být považovány za možné prediktory citlivosti k inhibici PARP. Vedle základní funkce v buněčném cyklu může cyklin D1 podporovat proces homologní rekombinace (Jirawatnotai et al., 2011;

Bartek a Lukas, 2011) a NKX3.1 napomáhá signalizaci ATM, která byla popsána jako prediktor odpovědi na inhibitory PARP (Bowen et al., 2013; Mateo et al., 2015; Helleday, 2016).

Závěrem lze říci, že naše studie pomáhá zmapovat genomovou nestabilitu a vliv oxidativního stresu ve vzniku a progresi PCa. Nedávno byl pro klinické použití schválen první inhibitor PARP Lynparza (olaparib), který vykazuje slibné výsledky i v léčbě metastatických karcinomů prostaty rezistentních k antiandrogenní terapii (Kim et al., 2015; Mateo et al., 2015). Naše výsledky mohou být cenné pro výběr vhodných prediktivních znaků pro možnou cílenou léčbu inhibitory PARP.

Naše další studie zaměřená na hodnocení tkáňové exprese kallikreinů 7 a 11 společně s PSA a PSMA prokázala snížené hladiny KLK7 v buňkách karcinomu prostaty v porovnání s benigními epiteliemi. Toto je v souladu se studií, která prokázala sníženou expresi KLK7 a jeho inhibitoru antileukoproteázy a také jejich negativní asociaci s Gleasonovým skórem (Xuan et al., 2008). Rovněž jsme zjistili nižší expresi KLK11 v nádorové tkáni, což odpovídá hladinám KLK11 v krevním séru (Nakamura et al., 2003b). Dále jsme prokázali sníženou expresi PSA u PCa v porovnání s BPH. Tento trend snižující se exprese PSA byl dále patrný u nízce diferencovaných karcinomů, což je v souladu s již dříve publikovanými studiemi (Weir et al., 2000; Erbersdobler et al., 2009). Exprese PSMA byla u PCa vyšší, což je také v souladu s dalšími studiemi (Mhawech-Fauceglia et al, 2007; Perner et al., 2007). Na druhé straně jsme neprokázali žádnou statisticky významnou korelaci mezi Gleasonovým skórem, stadiem nádorového onemocnění či PSA/PSMA expresí. Naše výsledky ukazují na možný diagnostický potenciál KLK7/KLK11 u časných stadií karcinomu, nicméně studie na větším souboru pacientů je nutná pro lepší zhodnocení klinického významu i biologické role obou proteinů.

6. SOUHRN

Hlavním cílem dizertační práce bylo přispět k pochopení vztahů mezi proteiny zapojenými do složitého mechanismu oprav poškozené DNA ve vývoji a progresi karcinomu prostaty. Provedli jsme imunohistochemickou analýzu exprese proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a proliferace (Ki67, cyklin A, cyklin D1, inhibitory CDK p16 a Rb tumor supresor), proteinů regulujících genomovou integritu (supresor p53, ATM kináza a její regulátor NKX3.1, γ H2AX, 53BP1, Rev7 a JMJD1C) a skupiny znaků oxidativního stresu (8-oxoguanin, NQO1, p53). Studovali jsme také další nádorové supresory (PTEN, SMAD4 společně s p53, Rb a NKX3.1). Imunohistochemickou analýzu jsme prováděli u 103 pacientů, použili jsme formaldehydem fixovanou tkáň prostaty zalitou do parafinových bloků. Předmětem vyšetřování byly benigní hyperplazie prostaty, prostatická intraepiteliální neoplazie a karcinom prostaty. Dále jsme provedli genovou typizaci NQO1 pomocí RFLP „restriction fragment length polymorphism“. U části souboru byl pak vyšetřen status fúzního genu TMPRSS2-ERG pomocí interfázové fluorescenční in situ hybridizace a kvantitativní PCR.

Pozitivita barvení NQO1, 8-oxoguaninu, aktivovaného ATM, γ H2AX, cyklinu D1, p53, p16, SPP1, jaderného PTEN a jaderného SMAD4 měla v průběhu progresu nádorového onemocnění stoupající tendenci, zatímco exprese Rb, Rev7, JMJD1C a 53BP1 klesala. Exprese cyklinu D1 vykazovala pozitivní korelaci s proliferčním znakem Ki67, věkem pacientů i hladinou sérového PSA. Rozsah aktivace odpovědi na poškození DNA byl posuzován podle exprese γ H2AX. Tento znak byl pouze ojediněle detekován v buňkách BPH, nárůst jeho exprese byl ložiskově pozorován u PIN, u PCa jeho pozitivita v některých případech dosáhla 40-70 % nádorových buněk. Podobné trendy jsme zaznamenali také u aktivované ATM. Studovaný protein NKX3.1 jsme považovali za možnou součást mechanismu DDR. Pozorovali jsme u něj trend s maximem exprese u BPH v porovnání s nízkou hladinou u PIN a PCa. Z našich výsledků vyplývá, že mechanismy signalizace poškození a opravy DNA jsou aktivovány v premaligních lézích prostaty a následně silněji v nádorových buňkách karcinomu prostaty.

Dále jsme se zaměřili na oxidativní stres v procesu karcinogeneze a vyšetřili jsme 8-oxoguanin a NQO1 protein, u kterého jsme také stanovili genetický status, tedy jeho variantu C609T variantu. Exprese 8-oxoguaninu a NQO1 vzrůstala od BPH přes PIN s maximem u PCa. Všechny nádory u pacientů s homozygotním TT genotypem NQO1 v pozici 609

vykazovaly výpadek v imunohistochemickém barvení tohoto proteinu. U pacientů s homozygotním TT genotypem byla signifikantně nižší exprese p53 v porovnání s heterozygotním a normálním homozygotním genotypem NQO1. Výsledky barvení ostatních vyšetřovaných proteinů byly nezávislé na genotypu NQO1. Genetická analýza neprokázala žádný vztah genotypu NQO1 k prevalenci vzniku karcinomu prostaty.

Dalším cílem práce bylo zhodnotit vliv fixace na kvalitu a výsledky imunohistochemického barvení. Některé vzorky z celkového počtu 103 byly fixovány roztokem 10% formaldehydu standardním postupem, některé jsme fixovali tzv. rychlou fixací. U obou skupin byla zhodnocena a porovnána exprese stejných proteinů. Z výsledků bylo zajímavé, že histoskóre Rb a Ki67 bylo nižší u tkání se standardní fixací ve srovnání s fixací rychlou, ale procento pozitivních buněk bylo nezměněné. Toto mohlo být způsobeno pomalou penetrací formaldehydu do centrálních partií prostaty. U NQO1, cyklinu D1 a jaderného PTEN bylo jak histoskóre, tak procento pozitivních buněk u standardní fixace vyšší. To může souviset s ischemickými změnami před fixací tkáně. Znak poškození DNA 8-oxoguanin jsme analyzovali pouze u případů s rychlou fixací, kde pozitivně koreloval s hodnotami NQO1.

Dalším z cílů práce byla analýza kallikreinů 7 a 11 v benigních a nádorových buňkách prostaty. U souboru 70 pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty byla provedena imunohistochemická analýza, která prokázala sníženou expresi obou těchto proteinů u PCa v porovnání s BPH. Pozitivní korelace byla zaznamenána mezi KLK7 a KLK11, mezi jejich expresí v PCa a BPH. Statisticky významná korelace mezi KLK7 a KLK11 byla u hyperplazie, nikoli v nádorové tkáni. Paralelně bylo provedeno barvení PSA (KLK3) a PSMA, ale nepozorovali jsme korelaci s expresí KLK7 a KLK11.

7. SUMMARY

The main objective of the dissertation was to contribute to the understanding of relationships between proteins involved in the complex mechanism of DNA damage repair in the development and progression of prostate cancer. We performed an immunohistochemical analysis of expression of proteins involved in cell cycle control and proliferation (Ki67, cyclin A, cyclin D1, CDK inhibitor p16 and Rb tumor suppressor), proteins controlling genome integrity (p53 suppressor, ATM kinase and its regulator NKX3.1, γ H2AX, 53BP1, Rev7 and JMJD1C) and a group of oxidative stress markers (8-oxoguanine, NQO1 and p53). Other tumor suppressors (PTEN, SMAD4 together with p53, Rb and NKX3.1) were also studied. The immunohistochemical analysis was carried out in 103 patients using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded prostate tissue. The analysis focused on benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate cancer. Furthermore, genotyping of NQO1 was performed by restriction fragment length polymorphism. In some subjects, the TMPRSS2-ERG fusion gene status was evaluated using fluorescence in situ hybridization and quantitative PCR.

Whereas the positivity of staining of NQO1, 8-oxoguanine, activated ATM, γ H2AX, cyclin D1, p53, p16, SPP1, nuclear PTEN and nuclear SMAD4 tended to increase during the progression of cancer, the expression of Rb, Rev7, JMJD1C and 53BP1 decreased. Cyclin D1 expression was found to positively correlate with the proliferation marker Ki67, patient age and serum PSA levels. The extent of activation of DNA damage response (DDR) was assessed by expression of γ H2AX. While this marker was only rarely detected in BPH cells, γ H2AX foci were elevated in PIN. In prostate cancer, 40-70% of tumor cells were positive in some cases. Similar trends were noted for activated ATM. The studied protein NKX3.1 was considered a potential part of the DDR mechanism. It tended to show maximum expression in BPH as compared with low levels in PIN and prostate cancer. The results suggest that DNA damage response pathways are activated in premalignant lesions of the prostate and, subsequently, more strongly activated in prostate cancer tumor cells.

Additionally, we focused on oxidative stress in the process of carcinogenesis and studied 8-oxoguanine and the NQO1 protein in which the genetic status was also determined, that is, the protein-destabilizing C609T variant. The expression of 8-oxoguanine and NQO1

was found to increase from BPH to PIN and to maximum levels in prostate cancer. All tumors in patients with the homozygous variant TT genotype of NQO1 at position 609 lacked immunohistochemical staining for this protein and significantly lower p53 expression. Patients with the homozygous TT genotype showed significantly lower p53 expression compared to the heterozygous and normal homozygous genotype of NQO1. Genetic analysis failed to show an association between the NQO1 genotype and prevalence of prostate cancer development.

Another objective was to determine the effect of fixation on the quality and results of immunohistochemical staining. Some of the 103 samples were fixed with 10% formaldehyde solution using the standard procedure; in the others, the so-called rapid fixation was used. In both groups, expression of the same proteins was assessed and compared. Interestingly, the histoscores for Rb and Ki67 were lower in traditionally fixed tissues as compared with rapid fixation but the percentages of positive cells were unchanged. This may be explained by slow penetration of formaldehyde into the central parts of the prostate. In NQO1, cyclin D1 and nuclear PTEN, both the histoscores and positive cell percentages were higher with standard fixation. This may be due to ischemic changes prior to tissue fixation. The marker of DNA damage 8-oxoguanine was analyzed only in cases with rapid fixation where it was positively correlated with NQO1 levels.

Finally, the dissertation aimed at analyzing kallikreins 7 (KLK7) and 11 (KLK11) in benign and tumor prostate cells. In 70 patients diagnosed with prostate cancer, an immunohistochemical analysis was performed that showed lower expression of the two proteins in prostate cancer than in BPH. Positive correlations were noted between KLK 7 and KLK 11 and their expression in prostate cancer and BPH. There was a statistically significant correlation between KLK7 and KLK 11 in hyperplasia but not in tumor tissue. At the same time, staining for PSA (KLK3) and PSMA was performed but no correlation with expression of KLK7 and KLK11 was observed.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMACR	alfa-metylacyl-CoA racemáza
ASAP	atypická proliferace malých žlázek (atypical small acinar proliferation suspicious for but not diagnostic of malignancy)
ATM	ataxia telangiectasia mutated kinase
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase
ATRIP	ATR interagující protein
BPH	benigní hyperplazie prostaty
BCH	hyperplazie bazálních buněk
Bcl2	genová rodina, název odvozen od „B-cell lymphoma“ u jehož buněk byly poprvé popsány
BRCA1	gen/protein (BReast CAncer 1), lidský tumor-supresorový gen
CDK	cyklin-dependentní kináza
CENP-C	centromere protein C
DDR	DNA damage response (odpověď buňky na poškození)
DNA-PK	DNA protein kináza
DSB	double strand break (dvoužetězcový zlom DNA)
FASN	fatty acid synthase
GOLM1	Golgiho fosfoprotein
HMWCK	vysokomolekulární cytokeratiny, imunohistochemické barvení (34βE12)
HR	homologní rekombinace
IHC	imunohistochemie
IKKalpha	kináza z rodiny IKK
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint protein 1

mRNA	mediátorová RNA
MYH	(MUTYH) glykosiláza zapojená do oxidativní DNA damage repair
NER	nucleotide excision repair
NF-kb	nukleární faktor kappa B
NHEJ	nehomologní spojování konců DNA (non-homologous end joining)
PAP	prostatická kyselá fosfatáza
PARP1	poly (ADP-ribose) polymeráza I
PARP2	poly (ADP-ribose) polymeráza II
PCa	karcinom prostaty (prostate carcinoma)
PI3-K	fosfatidyl-inositol-3-kináza
PIN	prostatická intraepitelová neoplazie
PKB/Akt	protein kináza B/Akt
pRb	retinoblastomový protein
PSA	prostatický specifický antigen
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
PTIP	pax transcription activation domain interacting protein
RAD50	DNA repair protein podílející se na opravách dvouřetězcových zlomů DNA
RAD51	DNA repair protein podílející se na opravách dvouřetězcových zlomů DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SSB	single strand break (jednořetězcový zlom DNA)
TNF	tumor necrosis factor
TOPBP1	DNA topoizomeráza 2-binding protein 1
TURP	transuretrální resekce prostaty

9. LITERATURA

1. Aaltomaa S., Lipponen P., Vasalainen S., Ala-Opas M., Eskelinen M., Syrjänen K. Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur. Urol.* 32: 410-415 (1997)
2. Adams P. D., Kaelin W. G. Jr., Transcriptional control by E2F. *Semin. Cancer Biol.* 6: 99-108 (1995)
3. Adams M. M., Carpenter P. B. Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Division* 1: 19 (2006)
4. Agami R., Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell* 102: 55-66 (2000)
5. Aitchison A. A., Veerakumarasivam A., Vias M., Kumar R., Hamdy F. C., Neal D. E., Mills I. G. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. *Prostate* 68: 661-674 (2008)
6. Alanen K. A., Kuopolo T., Koskinen P. J., Nevalainen T. J. Immunohistochemical labelling for prostate specific antigen in non-prostatic tissues. *Pathol. Res. Pract.* 196: 233-237 (1996)
7. Amaravadi R. K., Thompson C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* 13: 7271-7279 (2007)
8. Angelucci A., Festuccia C., D'Andrea G., Teti A., Bologna M. Osteopontin modulates prostate carcinoma invasive capacity through RGD-dependent upregulation of plasminogen activators. *Biol. Chem.* 383: 229 (2002)
9. Anwar A., Dehn D., Siegel D., Kepa J. K., Tang L. J., Pietenpol J. A., Ross D. Interaction of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J. Biol. Chem.* 278: 10368-10373 (2003)
10. Aparicio A., Den R. B., Knudsen K. E., Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 8: 562-568 (2011)
11. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377-380 (1998)
12. Artandi S. E., DePinho R. A. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31: 9-18 (2010)
13. Asher G., Lotem J., Cohen B., Sachs L., Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1188-1193 (2001)

14. Ashkenazi A., Dixit V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308 (1998)
15. Bachert C., Fimmel C., Linstedt A. D. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma. *Traffic* 8: 1415-1423 (2007)
16. Bai X. Z., Masters J. R., O'Donoghue N., Kirby R., Pan L. X., Young M., Stafford M., Parkinson M. C. Prognostic markers in clinically localised prostate cancer. *Int. J. Oncol.* 14: 785-791 (1999)
17. Bakkenist C. J., Kastan M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506 (2003)
18. Balmana J., Domchek S. M., Tutt A., Garber J. E. Stumbling blocks on the path to personalized medicine in breast cancer: the case of PARP inhibitors for Brca1/2-associated cancers. *Cancer Discov.* 1: 29-34 (2011)
19. Barney D. M., Fisher G., Kattan M. W. et al. Pitfalls in the diagnosis of prostatic cancer: retrospective review of 1791 cases with clinical outcome. *Histopathology* 51: 452-457, (2007)
20. Bartek J., Iggo R., Gannon J., Lane D. P. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5: 893-899 (1990)
21. Bartek J., Bartkova J., Lukas J. The retionblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 805-814 (1996)
22. Bartek J., Bartkova J., Lukas J., DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26: 7773-7779 (2007)
23. Bartek J., Bartkova J., Lukas J., DNA damage response as an anti-cancer barrier, *Cell Cycle* 6: 19, 2344-2347 (2007)
24. Bartek J., Lukas J., DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr. Opin. in Cell Biol.* 19: 238-245 (2007)
25. Bartek J., Lukas J. DNA repair: Cyclin D1 multitasks. *Nature* 474: 171-172 (2011)
26. Bartkova J., Rezaei N., Liontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L. V., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V. C., Takaoka M., Nakagawa H., Tort F., Fugger K., Johansson F., Sehested M., Andersen C. L., Dyrskjot L., Orntoft T., Lukas J., Kittas C., Helleday T., Halazonetis T. D., Bartek J., Gorgoulis V. G. Oncogene-induced senescence is part of the rumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633-637 (2006)

27. Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K., Guldberg P., Sehested M., Nesland J. M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434: 864-870 (2005)
28. Bartkova J., Horejsi Z., Sehested M., Nesland J. M., Rajpert-De M. E., Skakkebaek N. E., Stucki M., Jackson S., Lukas J., Bartek J. DNA damage response mediators MDC1 and 53BP1 constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours. *Oncogene* 26: 7414-7422 (2007)
29. Bartkova J., Hamerlik P., Stockhausen M. T., Ehrmann J., Hlobilkova A., Laursen H., Kalita O., Kolar Z., Poulsen H. S., Broholm H., Lukas J., Bartek J. Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene* 29: 5095-5102 (2010)
30. Bartkova J., Hoei-Hansen C. E., Krizova K., Hamerlik P., Skakkebaek N. E., Rajpert-De M. E., Bartek J. Patterns of DNA damage response in intracranial germ cell tumors versus glioblastomas reflect cell of origin rather than brain environment: implications for the anti-tumor barrier concept and treatment. *Mol. Oncol.* 8: 1667-1678 (2014)
31. Bayless K. J., Salazar R., Davis G. E. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(5)\beta(1)$ integrins. *Am. J. Pathol.* 156: 1673-1683 (2000)
32. Bernstein C., Bernstein H., Payne C. M., Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.* 511: 145-178 (2002)
33. Berry D. L., Baehrecke E. H. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy* 4: 359-360 (2008)
34. Besson A., Robbins S. M., Yong V. W. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur. J. Biochem.* 263: 605-611 (1999)
35. Bethel C. R., Faith D., Li X. et al. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with Gleason score and chromosome 8p detection. *Cancer Res.* 66: 10683-10690 (2006)
36. Bettencourt M. C., Baure J. J., Sesterhenn I. A., Mostofi F. K., McLeod D. G., Moul J. W., Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J. Urol.* 156: 1064-1068 (1996)
37. Bi X., He H., Ye Y., Dai Q., Han Z., Liang Y., Zhong W., Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer. *Med. Oncol.* 27: 145-151 (2010)

38. Borre M., Bentzen S. M., Nerstrom B., Overgaard J. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J. Urol.* 159: 1609-1614 (1998)
39. Borovanský L. a kol. *Soustavná anatomie člověka, díl 1.*, Avicenum Praha, (1976)
40. Bostwick D. G., Liang C. Precursors of prostate cancer, review. *Histopathology* 60: 4-27 (2012)
41. Bouchal J., Santer F. R., Hoschele P. P., Tomasikova E., Neuwirt H., Culig Z. Transcriptional coactivators p300 and CBP stimulate estrogen receptor-beta signaling and regulate cellular events in prostate cancer. *Prostate*: 71, 431- 437 (2011)
42. Bouwman P., Aly A., Escandell J. M., Pieterse M., Bartkova J., van der Gulden H., Hiddingh S., Thanasoula M., Kulkarni A., Yang Q., Haffty B. G., Tommiska J., Blomqvist C., Drapkin R., Adams D. J., Nevanlinna H., Bartek J., Tarsounas M., Ganesan S., Jonkers J. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 688-695 (2010)
43. Bowen C., Bubendorf L., Voeller H. J., Slack R., Willi N., Sauter G., Gasser T. C., Koivisto P., Lack E. E., Kononen J., Kallioniemi O. P., Gelmann E. P. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* 60: 6111-6115 (2000)
44. Bowen C., Ju J. H., Lee J. H., Paull T. T., Gelmann E. P. Functional activation of ATM by the prostate cancer suppressor NKX3.1. *Cell Rep.* 4: 516-529 (2013)
45. Bryant H. E., Schultz N., Thomas H. D., Parker K. M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N. J., Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917 (2005)
46. Brenner J. C., Ateeq B., Li Y., Yocum A. K., Cao Q., Asangani I. A., Patel X., Liang H., Yu J., Palanisamy N., Siddiqui J., Yan W., Cao X., Mehra R., Sabolch A., Basrur V., Lonigro R. J., Yang J., Tomlins S. A., Maher C. A., Elenitoba-Johnson K. S., Hussain M., Navone N. M., Pienta K. J., Varambally S., Feng F. Y., Chinnaryan A. M. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell* 19: 664-678 (2011)
47. Bubendorf L., Sauter G., Moch H., Schmid H. P., Gasser T. C., Jordan P., Mihatsch M. J. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J. Pathol.* 178: 437-441 (1996)
48. Burdova A., Bouchal J., Tavandzis S., Kolar Z. TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Boimed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 158: 502-510 (2014)

49. Carracedo A., Alimonti A., Pandolfi P. P. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* 71: 629-633 (2011)
50. Ciccia A., Elledge S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40: 179-204 (2010)
51. Cleaver J. E., Lam E. T., Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Rev. Genet.* 10: 756-768 (2009)
52. Coco Martin J. M., Balkenende A., Verschoor T., Lallemand F., Michalides R. Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line. *Cancer Res.* 59: 1134-1140 (1999)
53. Craig A. M., Denhardt D. T. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* 100: 163-171 (1991)
54. Cuiping L., Yang Z. Association between NQO1 C609T polymorphism and acute lymphoblastic leukemia risk: evidence from an updated meta-analysis based on 17 case-control studies. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140: 873-881 (2014)
55. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A. Z., Müller-Reicher T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A. A., Gerlich D. W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 535: 308-312 (2016)
56. Čihák L., Grim M. *Anatomie 2*, Grada Publishing 321-325 (2002)
57. David S. S., O'Shea V. L., Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447: 941-950 (2007)
58. Denda S., Reichard L. F., Müller U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha 8 \beta 1$ and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 9: 1425-1435 (1998)
59. Denhardt D. T., Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 7: 1475-1482 (1993)
60. Denhardt D. T., Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30-32: 92-102 (1998)
61. Denton D., Xu T., Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol. Cell Biol.* 93: 35-42 (2015)
62. Diamandis E. P., Okui A., Mitsui S., Luo L. Y., Soosaipillai A., Grass L., Nakamura T., Howarth D. J., Yamaguchi N. Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 62: 295-300 (2002)

63. Dimiri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A Biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9363-9367 (1995)
64. Dimitrova N., Chen Y. C. M., Spector D. L., de Lange T. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456: 524-528 (2008)
65. Ding Z., Wu C. J., Chu G. C., Xiao Y., Ho D., Zhang J., Perry S. R., Labrot E. S., Wu X., Lis R., Hoshida Y., Hiller D., Hu B., Jiang S., Zheng H., Stengh A., H., Scott K. L., Signoretti S., Bardeesy N., Wang A., Hill D. E., Golub T. R., Stampfer M. J., Wong W. H., Loda M., Mucci L., Chin L., DePinho R. A. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470: 269-273 (2011)
66. Dinkova-Kostova A. T., Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* 501: 116-123 (2010)
67. Dorer R., Odze R. D. AMACR immunostaining is useful in detecting dysplastic epithelium in Barrett's esophagus, ulcerative colitis, and Crohn's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 30: 871-877 (2006)
68. Eble J. N., Sauter G., Epstein J. I., Sesterhenn I. A. WHO Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: IARC Press, Lyon; 159-214 (2004)
69. Epstein J. I., Allsbrook W. C. Jr., Amin M. B., Egevad L. L., ISUP Grading Committee The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 29: 1228-1242 (2005)
70. Epstein J. I., Egevad L., Amin M. B., Delahunt B., Srigley J. R., Humphrey P. A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 40: 244-252 (2016)
71. Erbersdobler A., Isbarn H., Steiner I., Scholmm T., Chun F., Mirlacher M., Sauter G. Predictive value of prostate specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 74: 1169-1173 (2009)
72. Ergen H. A., Gormus U., Narter F., Zeybek U., Bulgurcuoglu S., Isbir T. Investigation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism in prostate cancer. *Anticancer Res.* 27: 4107-4110 (2007)

73. Evangelou K., Bartkova J., Kotsinas A., Pateras I. A., Lontos M., Velimezi G., Kosar M., Liloglou T., Trougakos I. P., Dyrskjot L., Andersen C. L., Papaioannou M., Drosos Y., Papafotiou G., Hodny Z., Sosa-Pineda B., Wu X. R., Klinakis A., Orntoft T., Lukas J., Bartek J., Groulis V. G. The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 20: 1485-1497 (2013)
74. Evans S. C., Lozono G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Mol. Med. Today* 3: 390-395 (1997)
75. Fagerholm R., Hofstetter B., Tommiska J., Aaltonen K., Vrtel R., Syrjakoski K., Kallioniemi A., Kilpivaara O., Mannermaa A., Kosma V. M., Uusitupa M., Eskelinen M., Kataja V., Aittomaki K., Heikkila P., Lukas J., Holli K., Bartkova J., Blomqvist C., Bartek J., Nevanlinna H. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat. Genet.* 40: 844-853 (2008)
76. Farmer H. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921 (2005)
77. Filmus J., Robles A. I., Shi W., Wong M. J., Colombo L. L., Conti C. J. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9: 3627-3633 (1994)
78. Fong P. C., Boss D. S., Yap T. A., Tutt A., Wu P., Merqui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M. J., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S. B., Schellens J. H., de Bono J. S. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* 361: 123-134 (2009)
79. Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R. G. Minireview: cyclin D1: normal and abnormal function. *Endocrinology* 145: 5439-5447 (2004)
80. Furger K. A., Allan A. L., Wilson S. M., Hota C., Vantyghem S. A., Postenka C. O., Al-Katib W., Chambers A. F., Tuck A. B. Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol. Cancer. Res.* 1: 810-819 (2003)
81. Gan G. N., Wittschieben J. P., Wittschieben B. O., Wood R. D. DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Res.* 18: 174-183 (2008)
82. Gelmann E. P., Bowen C., Bubendorf L. Expression of NKX3.1 in normal and malignant tissues. *Prostate* 55: 111-117 (2003)
83. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H-H., Schwab U., Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133: 1710-1715 (1984)

84. Giri D., Ittmann M. Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum. Pathol.* 30: 419-424 (1999)
85. Gleason D. F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* 50: 125-128 (1966)
86. Gleason D. F., Mellinger G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* 111: 58-64 (1974)
87. Goh A. M., Coffill C. R., Lane D. P. The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* 223: 116-126 (2011)
88. Gong M., Yi Q., Wang W. Association between NQO1 C609T polymorphism and bladder cancer susceptibility: a systemic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 34: 2551-2556 (2013)
89. Gorgoulis V. G., Vassilou L. V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Ditullio R. A. Jr., Kastrinakis N. G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907-913 (2005)
90. Greer E. L., Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13: 343-357 (2012)
91. Grepl M., Král M., Burešová E., Študent V. Agresivní karcinom prostaty u pacientů s nízkým PSA. *Čes. Urol.* 14: 48 -53 (2010)
92. Guha N., Chang J. S., Chokkalingam A. P., Wiemels J. L., Smith M. T., Buffler P. A. NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 168: 1221-1232 (2008)
93. Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319: 1352-1355 (2008)
94. Hanabán D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674 (2011)
95. Harn S. A., Schuttle M., Hoque A. T. M. S., Moskaluk C. A., da Costa L. T., Rozenblum E., Weinstein C. L., Fischer A., Yeo C. J., Hruban R. H., Kern S. C. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353 (1996)
96. Harnden P., Naylor B., Shelley M. D., Clements H., Coles B., Mason M. D. The clinical management of patients with a small volume of prostatic cancer on biopsy: what are the risks of progressions? A systematic review and meta-analysis. *Cancer* 112: 971-981 (2008)

97. Harper J. W., Elledge S. J. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 56-64 (1996)
98. Hasegawa M., Hagiwara S., Sato T., Jijiwa M., Murakumo Y., Maeda M., Moritani S., Ichihara S., Takahashi M. CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary and lacrimal glands and prostate basal cells. *Pathol. Int.* 57: 245-250 (2007)
99. Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25: 585-621 (1961)
100. He W. W., Sciavolino P. J., Wing J., Augustus M., Hudson P., Meissner P. S., Curtis R. T., Shell B. K., Bostwick D. G., Tindall D. J., Gelmann E. P., Abate-Shen C., Carter K. C. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* 43: 67-77 (1997)
101. Helleday T. PARP inhibitor receives FDA breakthrough therapy designation in castration resistant prostate cancer: beyond germline BRCA mutations. *Ann. Oncol.* 27: 755-757 (2016)
102. Helpap B., Egevad L. The significance of modified Gleason grading of prostatic carcinoma in biopsy and radical prostatectomy specimen. *Virchows Arch.* 449: 622-627 (2006)
103. Helt C. E., Cliby W. A., Keng P. C., Bambara R. A., O'Reilly M. A. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J. Biol. Chem.* 280: 1186-1192 (2005)
104. Henrique R., Jeronimo C., Teixeira M. R., Hoque M. O., Carvalho A. L., Pais I., Ribeiro F. R., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* 4: 1-8 (2006)
105. Henrique R., Ribeiro F. R., Fonseca D., Hoque M. O., Carvalho A. L., Costa V. L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M. R., Sidransky D., Jerónimo C. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 13: 6122-6129 (2007)
106. Herawi M., Epstein J. I. Immunohistochemical antibody cocktail staining (p63/HMWCK/AMACR) of ductal adenocarcinoma and Gleason pattern 4 cribriform and noncribriform acinar adenocarcinomas of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 31: 889-894 (2007)
107. Hlobilková A. Některé aspekty funkce nádorového PTEN ve vztahu k regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy v nádorových buňkách, Dizertační práce LF UP Olomouc (2003)

108. Horvath L. G., Henshall S. M., Kench J. G., Turner J. J., Golovsky D., Brenner P. C., O'Neill G. F., Kooner R., Stricker P. D., Grygiel J. J., Sutherland R. L. Loss of BMP2, Smad8, and Smad4 expression in prostate cancer progression. *Prostate* 59: 234-242 (2004)
109. Howat W. J., Wilson B. A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70:12-19 (2014)
110. Howe J. R., Roth S., Ringold J. C., Summers R. W., Jarvinen H. J., Sistonen P., Tomlinson I. P. M., Houlston R. S., Bevan S., Mitros F. A., Stone E. M., Aaltonen L. A. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280: 1086-1088 (1998)
111. Hu Y., Zhang Y., He W., Xian L., Chen M. NQO1 C609T polymorphism and esophageal cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 14: 1-8 (2013)
112. Humphrey P. A. *Prostate Pathology*, ASCP Press, Chicago (2003)
113. Chowdhury D., Keogh M.-C., Ishii H., Peterson C. L., Buratowski S., Lieberman J. γ H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* 20: 801-809 (2005)
114. Iftikhar R., Kladney R. D., Havlioglu N., Schmitt-Gräff A., Gusmirovic I., Solomon H., Luxon B. A., Bacon B. R., Fimmel C. J. Disease and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 99: 1087-1095 (2004)
115. Iggo R., Gatter K., Bartek J., Lane D., Harris A. L. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679 (1990)
116. Iorio M. V., Croce C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J. Clin. Oncol.* 27: 5848-5856 (2009)
117. Iskander K., Gaikwad A., Paquet M., Long D. J., Brayton C., Barrios R., Jaiswal A. K. Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 65: 2054-2058 (2005)
118. Jaamaa S., Af Hallstrom T. M., Sankila A., Rantanen V., Koistinen H., Stenman U. H., Zhang Z., Yang Z., De Marzo A. M., Taari K., Ruutu M., Andersson L. C., Laiho M. DNA damage recognition via activated ATM and p53 pathway in nonproliferating human prostate tissue. *Cancer Res.* 70: 8630-8641 (2010)
119. Jackson S. P., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078 (2009)

120. Jarrard D. F., Paul R., van Bokhoven A., Nguyen S. H., Bova G. S., Wheelock M. J., Johnson K. R., Schalken J., Bussemakers M., Isaacs W. B. P-cadherine is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 3: 2121-2128 (1997)
121. Jeronimo C., Henrique R., Hoque M. O., Ribeiro F. R., Oliveira J., Fonseca D., Teixeira M. R., Lopes C., Sidransky D. Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin. Cancer Res.* 10: 4010-4014 (2004)
122. Jiang Z., Wu C. L., Woda B. A., Iczkowski K. A., Chu P. G., Tretiakova M. S., Young R. H., Weiss L. M., Blute R. D. Jr., Brendler C. B., Krausz T., Xu J. C., Amin M. B., Yang X. J. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology* 45: 218-225 (2004)
123. Jirawatnotai S., Hu Y., Michowski W., Elias J. E., Becks L., Bienvenu F., Zagozdzon A., Goswami T., Wang Y. E., Clark A. B., Kunkel T. A., van Harn T., Xia B., Correll M., Quackenbush J., Livingstone D. M., Gygi S. P., Sicinski P. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* 474: 230-234 (2011)
124. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 335-346 (2006)
125. Johnson N., Li Y. C., Walton Z. E., Cheng K. A., Li D., Rodig S. J., Moreau L. A., Unitt C., Bronson R. T., Thomas H. D., Newell D. R., D'Andrea A. D., Curtin N. J., Wong K. K., Shapiro G. I. Compromised CKD1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition. *Nat. Med.* 17: 875-882 (2011)
126. Jones P. A., Baylin S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692 (2007)
127. Kang J. S., Calvo B. F., Maygarden S. J., Caskey L. S., Mohler J. L., Ornstein D. K. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 8: 117-123 (2002)
128. Kasai H., Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12: 2137-2145 (1984)
129. Kastan M. B., Lim D. S. The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 179-186 (2000)
130. Kastan M. B., Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323 (2004)
131. Kawanishi S., Hiraku Y., Pinalaor S., Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 387: 365-372 (2006)

132. Kelsey K. T., Ross D., Traver R. D., Christiani D. C., Zuo Z. F., Spitz M. R., Wang M., Xu X., Lee B. K., Schwartz B. S., Wiencke J. K. Ethnic variation in the prevalence of common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *Br. J. Cancer* 76: 852-854 (1997)
133. Kim G., Ison G., McKee A. E., Zhang H., Tang S., Gwise T., Sridhara R., Lee E., Tzou A., Philip R., Chiu H. J., Ricks T. K., Palmby T., Russell A. M., Ladouceur G., Pfuma E., Li H., Zhao L., Liu Q., Venugopal R., Ibrahim A., Pazdur R. FDA approval summary: olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21: 4257-4261 (2015)
134. Kishi T., Soosaipillai A., Grass L., Little S. P., Johnstone E. M., Diamandis E. P. Development of an immunofluorometric assay and quantification of human kallikrein 7 in tissue extracts and biological fluids. *Clin. Chem.* 50: 709-716 (2004)
135. Kladney R. D., Bulla G. A., Guo L., Mason A. L., Tollefson A. E., Simon D. J., Koutoubi Z., Fimmel C. J. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene* 249: 53-55 (2000)
136. Kobayashi J. Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to γ H2AX through FHA/BRCT domain. *J. Radiat. Res.* 45: 473-478 (2004)
137. Kolář Z. a kol. Molekulární patologie nádorů, Olomouc, 15-20 (2003)
138. Kořínková G., Mechanismy účinku syntetických inhibitorů cyklin-dependentních kináz odvozených od olomoucínu. Dizertační práce LF UP Olomouc (2006)
139. Kosova F., Temeltas G., Ari Z., Lekili M. Possible relations between oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer patients. *Tumour Biol.* 35: 4295-4299 (2014)
140. Král, M., Študent V., Kurfürstová D., Vidlář A., Kučerová L. Gleasonovo skóre v biopsii a po radikální prostatektomii – změny po konferenci ISUP 2005 a význam pro urologa. *Urologie pro praxi* 4: 173-178 (2007)
141. Kraus T. S., Cohen C., Siddiqui M. T. Prostate-specific antigen and hormone receptor expression in male and female breast carcinoma. *Diagn. Pathol.* 5: 63 (2010)
142. Kurfürstová D., Král M. Adenokarcinom prostaty a hodnocení stupně jeho diferenciací: Změny v hodnocení Gleasonova skóre od jeho vzniku po současnost a jeho význam pro praxi patologa a urologa. *Urologie pro praxi* 14: 157-159 (2013)

143. Kuroda N., Katto K., Tamura M., Shiotsu T., Nakamura S., Ohtsuki Y., Hes O., Michal M., Inoue K., Ohara M., Mizuno K., Lee G. H. Immunohistochemical application of D2-40 as basal cell marker in evaluating atypical small acinar proliferation of initial routine prostatic needle biopsy materials. *Med. Mol. Morphol.* 43: 165-169 (2010)
144. Laitinen S., Martikainen P. M., Tolonen T., Isola J., Tammela T. L., Visakorpi T. EZH2, Ki67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *Int. J. Cancer* 122: 595-602 (2008)
145. Lee J. H., Paull T. T. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double strand breaks. *Oncogene* 26: 7741-7748 (2007)
146. Lees-Miller S. P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* (2003)
147. Leslie N. R., Longy M. Inherited PTEN mutations and the prediction of phenotype. *Semin. Cell Dev. Biol.* 52: 30-38 (2016)
148. Li D. M., Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and includes G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15406-15411 (1998)
149. Li L., Zou L., Sensing, signaling and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 94: 298-306 (2005)
150. Li M., Chen D., Shiloh A., Luo J., Nikolaev A. Y., Qin J., Gu W., Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416: 648-653 (2002)
151. Li P., Nicosia S. V., Bai W. Antagonism between PTEN/MMAC1/TEP-1 and androgen receptor in growth and apoptosis of prostatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276: 20444-20450 (2001)
152. Liaw L., Almeida M., Hart C. E., Schwartz S. M., Giachelli C. M. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 74: 214-224 (1994)
153. Liaw L., Skinner M. P., Raines E. W., Ross R., Cheres D. A., Schwartz S. M., Giachelli C. M. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J. Clin. Invest.* 95: 713-724 (1995)
154. Lindahl T., Barnes D. E. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65: 127-133 (2000)

155. Lindqvist L. M., Heinlein M., Huang D. C., Vaux D. L. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 8512-8517 (2014)
156. Liu L., Kron K. J., Pethe V. V., Dementrashvili N., Nesbitt M. E., Trachtenberg J., Ozcelik H., Fleshner N. E., Briollais L., van der Kwast T. H., Bapat B. Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGFbeta2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *Int. J. Cancer* 129: 2454-2462 (2011)
157. Lloyd M. D., Darley J. D., Wierzbicki A. S., Threadgill M. D. Alpha-methylacyl-CoA racemase - an "obscure" metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J.* 275: 1089-1102 (2008)
158. Loeb S., Rochl K. A., Thaxon C. S., Catalona W. J. Combined prostate-specific antigen density and biopsy features to predict "clinically insignificant" prostate cancer. *Urology* 72: 143-147 (2008)
159. Long D. J., Waikel R. L., Wang X. J., Perlaky L., Roop D. R., Jaiswal A. K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 60: 5913-5915 (2000)
160. Lord C. J., Ashworth A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8: 363-369 (2008)
161. Lord C. J., Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287-294 (2012)
162. Lotan T. L., Epstein J. I. Clinical implications of changing definitions within the Gleason grading system. *Nat. Rev. Urol.* 7: 136-142 (2010)
163. Lownders N. F., Toh G. W., DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr. Biol.* 15: 99-102 (2005)
164. Lukas J., Lukas C., Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 3: 997-1007 (2004)
165. Lukas J., Lukas C., Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell. Biol.* 13: 1161-1169 (2011)
166. Lum J. J., Bauer D. E., Kong M., Harris M. H., Li C., Lindsten T., Thompson C. B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237-248 (2005)

167. Luo J. H., Yu Y. P., Cieply K., Lin F., Deflavia P., Dhir R., Finkelstein S., Michalopoulos G., Becich M. Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol. Carcinog.* 33: 25-35 (2002)
168. Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 741-752 (2007)
169. Maki H., Sekiguchi M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355: 273-275 (1992)
170. Maki H. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu. Rev. Genet.* 36: 279-303 (2002)
171. Malins D. C., Johnson P. M., Wheeler T.M., Barker E. A., Polissar N. L., Vinson M. A. Age-related radical induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 6025-6028 (2001)
172. Massague J., Blain S. W., Lo R. S. TGF β signalling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309 (2000)
173. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298-306 (2004)
174. Mateo J., Carreira S., Sandhu S., Miranda S., Mossop H., Perez-Lopez R., Nava R. D., Robinson D., Omlin A., Tunariu N., Boysen G., Porta N., Flohr P., Gillman A., Figueiredo I., Paulding C., Seed G., Jain S., Ralph C., Protheroe A., Hussain S., Jones R., Elliott T., McGovern U., Bianchini D., Goodall J., Zafeiriou Z., Williamson C. T., Ferraldeschi R., Risnaes R., Ebbs B., Flower G., Roda D., Yuan W., Wu Y. M., Cao X., Brough R., Pemberton H., A'Hern R., Swain A., Kunju L. P., Eles R., Attard G., Lord C. J., Ashworth A., Rubin M. A., Kundsén K. E., Feng F. Y., Chinnaiyan A. M., Hall E., de Bono J. S. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 373: 1697-1708 (2015)
175. Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol* 34: 328-334 (1979)
176. McMenamin M. E., Soung P., Perera S., Kaplan I., Loda M., Saller W. R., Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 59: 4291-4296 (1999)
177. McNeal J. E. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog. Clin. Biol. Res.* 145: 27-53 (1984)
178. McNeal J. E., Stamey T. A., Hodge K. K. The prostate gland: morphology, pathology, ultrasound anatomy. *Monogr. Urol.* 9: 36-54 (1988)

179. Meiers I., Shanks J. H., Bostwick D. G. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* 39: 299-304 (2007)
180. Mendes-Pereira A. M., Martin S. A., Brough R., McCarthy A., Taylor J. R., Kim J. S., Waldman T., Lord C. J., Ashworth A. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.* 1: 315-322 (2009)
181. Menendez J. A., Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7: 763-777 (2007)
182. Mhawech-Fauceglia P., Zhang S., Terracciano L., Sauter G., Chadhuri A., Herrmann F. R., Penetrante R. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* 50: 472-483 (2007)
183. Miettinen M., Wang Z. F., Pictet A., Tan S. H., Dobi A., Srivastava S., Sesterhenn I. ERG transcription factor as an immunohistochemical marker for vascular endothelial tumors and prostatic carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 35: 432-441 (2011)
184. Miyake H., Hara I., Kamidono S., Eto H. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *J. Urol.* 171: 1533-1536 (2004)
185. Miyake H., Muramaki M., Kurahashi T., Tadenaka A., Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol. Oncol.* 28: 145-151 (2010)
186. Miyaki M., Iijima T., Konishi M., Sakai K., Ishii A., Yasuno M., Hishima T., Koike M., Shitara N., Iwama T., Utsunomiya J., Kuroki T., Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18: 3098-3103 (1999)
187. Miyaki M., Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 306: 799-804 (2003)
188. Miyashita T., Reed J. C. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299 (1995)
189. Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069-1075 (2008)
190. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140: 313-326 (2010)

191. Mo L., Zhang J., Shi J., Xuan Q., Yang X., Qin M., Lee C., Klocker H., Li Q. Q., Mo Z. Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res.* 30: 3413-3420 (2010)
192. Moch H., Humphrey P. A., Ulbright T. M., Reuter V. E. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Lyon: 135-183 (2016)
193. Montironi R., Scarpelli M., Mazzucchelli R., Cheng L., Lopez-Beltran A. The spectrum of morphology in non-neoplastic prostate including cancer mimics. *Histopathology* 60: 41-58 (2012)
194. Moynahan M. E., Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 196-207 (2010)
195. Nakabeppu Y., Sakumi K., Sakamoto K., Tsuchimoto D., Tsuzuki T., Nakatsu Y. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol. Chem.* 387: 373-379 (2006)
196. Nakamura T., Mitsui S., Okui A., Kominami K., Nomoto T., Ukimura O., Kawauchi A., Miki T., Yamaguchi N. Alternative splicing isoforms of hippostasin (PRSS20/KLK11) in prostate cancer cell lines. *Prostate* 49: 72-78 (2001)
197. Nakamura T., Stephan C., Scorilas A., Yousef G. M., Jung K., Diamandis E. P. Quantitative analysis of hippostasin/KLK11 gene expression in cancerous and noncancerous prostatic tissues. *Urology* 61: 1042-1046 (2003a)
198. Nakamura T., Scorilas A., Stephan C., Jung K., Soosaipillai A. R., Diamandis E. P. The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res.* 63: 6543-6546 (2003b)
199. Nakashiro K., Hayashi Y., Oyasu R. Immunohistochemical expression of hepatocyte growth factor and c-Met/HGF receptor in benign and malignant human prostate tissue. *Oncol. Rep.* 10: 1149-1153 (2003)
200. Nam R. K., Kattan M. W., Chin J. L., Trachtenberg J., Singal R., Rendon R., Klotz L. H., Sugar L., Sherman C., Izawa J., Bell D., Stanimirovic A., Vankateswaran V., Diamandis E. P., Yu C., Loblaw D. A., Narod S A. Prospective multi-institutional study evaluating the performance of prostate cancer risk calculators. *J. Clin. Oncol.* 29: 2959-2964 (2011)
201. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274: 1643-1645 (1996)
202. Nebert D. W., Roe A. L., Vandale S. E., Bingham E., Oakley G. G. NAD(P)H:quinone oxidoreductase I (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a HuGE review. *Genet. Med.* 4: 62-70 (2002)

203. Obiezu C. V., Diamandis E. P. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett.* 224: 1-22 (2005)
204. O'Regan A., Berman J. S. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* 81: 373-390 (2000)
205. Orloff M. S., Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene* 27: 5387-5397 (2008)
206. Park K., Tomlins S. A., Mudallar K. M., Chiu Y. L., Esqueva R., Mehra R., Suleman K., Varambally S., Brenner J. C., MacDonald T., Srivastava A., Tewari A. K., Sathyanarayana U., Nagy D., Pestano G., Kunju L. P., Demichelis F., Chnnaian A. M., Rubin M. A. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* 12: 590-598 (2010)
207. Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider M. D., Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939 (2005)
208. Perner S., Hofer M. D., Kim R., Shah R. B., Li H., Möller P., Hautmann R. E., Gschwend J. E., Kuefer R., Rubin M. A. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum. Pathol.* 38: 696-701 (2007)
209. Pesche S., Latil A., Muzeau F., Cussenot O., Fournier G., Longy M., Eng C., Lidereau R. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancer. *Oncogene* 16: 2879-2883 (1998)
210. Pestell R. G. New roles of cyclin D1. *Am. J. Pathol.* 183: 3-9 (2013)
211. Planchon S. M., Waite K. A., Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J. Cell Sci.* 121: 249-253 (2008)
212. Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K. W., Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305 (1997)
213. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* 17: 421-433 (2010)
214. Povýšil C., Šteiner I. a kol. Speciální patologie. Galén (2007)
215. Prives C., Hall P. A. The p53 pathway. *J. Pathol.* 189: 112-126 (1999)
216. Qian J., Wollan P., Bostwick D. G. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 28: 143-148 (1997)

217. Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273: 5858-5868 (1998)
218. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 1361-1411, Mosby (2004)
219. Ross D., Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1 DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol.* 382: 115-144 (2004)
220. Rosypal S. a kol. Přehled biologie, Praha (1987)
221. Rouleau M., Patel A., Hendzel M. J., Kaufmann S. H., Poirier G. G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10: 293-301 (2010)
222. Sakamaki T., Casimiro M. C., Ju X., Quong A. A., Katiyar S., Liu M., Jiao X., Li A., Zhang X., Lu Y., Wang C., Byers S., Nicholson R., Link T., Shemluck M., Yang J., Fricke S. T., Novikoff P. M., Papanikolaou A., Arnold A., Albanese C., Pestell R. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5449-5469 (2006)
223. Scalzo D. A., Kallakury B. V., Gaddipati R. V., Sheehan C. E., Keys H. M., Savage D., Ross J. S. Cell proliferation rate by MIB-1 immunohistochemistry predicts postradiation recurrence in prostatic adenocarcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 109: 163-168 (1998)
224. Scott T. L., Rangaswamy S., Wicker C. A., Izumi T. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxid. Redox Signal.* 20: 708-726 (2014)
225. Senger D. R., Wirth D. F., Hynes R. O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 16: 885-893 (1979)
226. Sfanos K. S., De Marzo A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 60: 199-215 (2012)
227. Shariat S. F., Kattan M. W., Vickers A. J., Karakiewicz P. I., Scardino P. T. Critical review of prostate cancer predictive tools. *Future Oncol.* 5: 1555-1584 (2009)
228. Shen W. H., Balajee A. S., Wang J., Wu H., Eng C., Pandolfi P. P., Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128: 157-170 (2007)
229. Sherr C. J. Cancer cell Cycles. *Science* 274: 1672-1977 (1996)
230. Sherr C. J., Robert J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512 (1999)
231. Sherr C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* 116: 235-246 (2004)

232. Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B., Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6: 1221-1228 (2004)
233. Schiewer M. J., Knudsen K. E. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol. Cancer Res.* 12: 1069-1080 (2014)
234. Schmitt C. A. Senescence, apoptosis and therapy – cutting the lifelines of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3: 286-295 (2003)
235. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 Protein: from the known and unknown. *J. Cell. Physiol.* 182: 311-322 (2000)
236. Siegel D., Franklin W. A., Ross D. Immunohistochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clin. Cancer Res.* 4: 2065-2070 (1998)
237. Siegel D., Bolton E. M., Burr J. A., Liebler D. C., Ross D. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.* 52: 300-305 (1997)
238. Siegel D., Ross D. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 246-253 (2000)
239. Siegel D., Anwar A., Winski S. L., Kepa J. K., Zolman K. L., Ross D. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol. Pharmacol.* 59: 263-268 (2001)
240. Siegel D., Gustafson D. L., Dehn D. L., Han J. Y., Boonchoong P., Berliner L. J., Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* 65: 1238-1247 (2004)
241. Siegel D., Yan C., Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.* 83: 1033-1040 (2012)
242. Signoretti S., Waltregny D., Dilks J., Isaac B., Lin D., Garraway L., Yang. A., Montironi R., McKeon F., Loda M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol.* 157: 1769-1775 (2000)
243. Smith L. L., Cheung H. K., Ling L. E., Chen J., Sheppard D., Pytela R., Giachelli C. M. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* 271: 28485-24891 (1996)
244. Sobin L. H., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 7. vydání: 196-200 (2009), česká verze (2011)

245. Sonwalkar S. A., Rotimi O., Scott N., Verghese E., Dixon M., Axon A. T., Everett S. M. A study of indefinite for dysplasia in Barrett's oesophagus: reproducibility of diagnosis, clinical outcomes and predicting progression with AMACR (alpha-methylacyl-CoA-racemase). *Histopathology* 56: 900-907 (2010)
246. Stattin P., Damber J. E., Karleberg L., Bergh A. Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. *J. Urol.* 157: 219-222 (1997)
247. Steinbrecher A., Rohrmann S., Timofeeva M., Risch A., Jansen E., Linseisen J. Dietary glucosinolate intake, polymorphisms in selected biotransformation enzymes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19: 135-143 (2010)
248. Steiner M., Hillenbrand M., Borkowski M., Seiter H., Schuff-Werner P. 609 C→T polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene in patients with prostatic adenocarcinoma or benign prostatic hyperplasia. *Cancer Lett.* 135: 67-71 (1999)
249. Stewart Z., Pietenpol J. A. p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 234-263 (2001)
250. Stoehr C. G., Nolte E., Wach S., Wieland W. F., Hofstaedter F., Hartmann A., Stoehr R. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) P187s polymorphism and prostate cancer. *Int. J. Moc. Sci.* 13: 10959-10969 (2012)
251. Strange R. C., Spiteri M. A., Ramachandran S., Fryer A. A. Gluthatione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* 482: 21-26 (2001)
252. Taneja N., Davis M., Choy J. S., Beckett M. A., Singh R., Kron S. J., Weichselbaum R. R. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and targer for radiotherapy. *J. Biol. Chem.* 279: 2273-2280 (2004)
253. Thapa D., Meng P., Bedolla R. G., Reddick R. L., Kumar A. P., Ghosh R. NQO1 suppresses NF-kappaB-p300 interaction to regulate inflammatory mediators associated with prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 74: 5644-5655 (2014)
254. Thompson I. M., Pauler D. K., Goodman P. J., Tangen C. M., Lucia M. S., Parnes H. L., Minasian L. M., Ford L. G., Lippman S. M., Crawford E. D., Crowley J. J., Coltman C. A. Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* 350: 2239-2246 (2004).
255. Thurmond P., Yang J. H., Lerner L. B., Azadzo K. M. Structural modifications of the prostate in hypoxia, oxidative stress, and chronic ischemia. *Korean J. Urol.* 56: 187-196 (2015)

256. Tomlins S. A., Laxman B., Varambally S., Cao X., Yu J., Helgeson B. E., Cao Q., Prensener J. R., Rubin M. A., Shah R. B., Mehra R., Chinnaiyan A. M. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10: 177-188 (2008)
257. Tomlins S. A., Rhodes D. R., Perner S., Dhanasekaran S. M., Mehra R., Sun X. W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C., Montie J. E., Shah R. B., Pienta K. J., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M. Recurrent fusion of TMPRSS2-and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310: 644-648 (2005)
258. Tort F., Bartkova J., Sehested M., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. Retinoblastoma pathway defects show differential ability to activate the constitutive DNA damage response in human tumorigenesis. *Cancer Res.* 66: 10258-10263 (2006)
259. Traver R. D., Horikoshi T., Danenberg K. D., Stadlbauer T. H., Danenberg P. V., Ross D., Gibson N. W. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res.* 52: 797-802 (1992)
260. Trimarchi J. M., Jacqueline A. L. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 11-20 (2002)
261. Turner N., Tutt A., Ashworth A. Hallmarks of "BRCAness" in sporadic cancers. *Nature Rev. Cancer* 4: 814-819 (2004)
262. Ueno K., Hirata H., Shahryari V., Deng G., Tanaka Y., Tabatabai Z. L., Hinoda Y., Dahiya R. microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. *Br. J. Cancer* 108: 1659-1667 (2013)
263. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* 160: 1-40 (2006)
264. Vasiliou V., Ross D., Nebert D. W. Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum. Genomics* 2: 329-335 (2006)
265. Voeller H. J., Augustus M., Madike V., Bova G. S., Carter K. C., Gelmann E. P. Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res.* 57: 4455-4459 (1997)
266. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 55: 2284-2292 (1995)
267. Wang C., Li Z., Lu Y., Du R., Katiyar S., Yang J., Fu M., Leader J. E., Quong A., Novikoff P. M., Pestell R. G. Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11567-11572 (2006)

268. Wang X. W., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V., Egly J. M., Wang Z., Friedberg E. C., Evans M. K., Taffe B. G., Bohr V. A., Weeda G., Hoeijmakers J. H. J., Forrester K., Harris C. C. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* 10: 188-194 (1995)
269. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314 (1956)
270. Ward I. M., Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replication stress. *Journal of Biol. Chem.* 276: 47759-47762 (2001)
271. Ward I. M., Minn K., Chen J. UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J. Biol. Chem.* 279: 9677-9680 (2004)
272. Warmerdam D. O., Kanaar R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat. Res.* 704: 2-11 (2010)
273. Watanabe S., Watanabe K., Akimov V., Bartkova J., Blagoev B., Lukas J., Bartek J. JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1425-1433 (2013)
274. Weber G. F. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1552: 61 (2001)
275. Wei S., Dunn T. A., Isaacs W. B., De Marzo A. M., Luo J. GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. *Prostate* 68: 1387-1395 (2008)
276. Weinstein M. H., Signoretti S., Loda M., Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod. Pathol.* 15: 1302-1308 (2002)
277. Weintraub S. J., Prader C. A., Dean D. C. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358: 259-261 (1992)
278. Weir E. G., Partin A. W., Epstein J. I. Correlation of serum prostate specific antigen and quantitative immunohistochemistry. *J. Urol.* 163: 1739-1742 (2000)
279. Went P. T., Sauter G., Oberholzer M., Bubendorf L. Abundant expression of AMARC in many distinct tumour types. *Pathology* 38: 426-432 (2006)
280. Wesselborg S., Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol. Life Sci.* 72: 4721-4757 (2015)
281. Wilentz R. E., Su G. H., Dai J. L., Sparks A. B., Argani P., Sohn T. A., Yao C. J., Kern S. E., Hruban R. H. Immunohistochemical labeling for Dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 156: 37-43 (2000)

282. Wilentz R. E., Iacobuzio-Donahue C. A., Argani P., McCarthy D. M., Parsons J. L., Yeo C. J., Kern S. E., Hruban R. H. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that Dpc4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 60: 2002-2006 (2000)
283. Williams J. L., Greer P. A., Squire J. A. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet.* 207:474-488 (2014)
284. Woodford-Richens K. L., Rowan A. J., Poulsom R., Bevan S., Salovaara R., Aaltonen L. A., Houlston R. S., Wright N. A., Tomlinson I. P. M. Comprehensive analysis of SMAD4 mutations and protein expression in juvenile polyposis. Evidence for a distinct genetic pathway and polyp morphology in SMAD4 mutation carriers. *Am. J. Pathol.* 159: 1293-1300 (2001)
285. Xu G., Chaman R., Brandsma I., Yuan J., Mistrik M., Bouwman P., Bartkova J., Gogola E., Warmerdam D., Barazas M., Jaspers J. E., Watanabe K., Pieterse M., Kersbergen A., Sol W., Celie P. H. N., Schouten P. C., van den Broek B., Salman A., Nieuwland M., de Rink I., de Ronde J., Jalink K., Boulton S. J., Chen J., van Gent D. C., Bartek J., Jonkers J., Borst P., Rottenberg S. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 28: 541-544 (2015)
286. Xuan Q., Yang X., Mo L., Huang F., Pang Y., Qin M., Chen Z., He M., Wang Q., Mo Z. N. Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132: 1796-1801 (2008)
287. Yang K., Guo Y., Stacey W. C., Harwalkar J., Fretthold J., Hitomi M., Stacey D. W. Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels. *BMC Cell Biol.* 7: 33 (2006)
288. Yokosaki Y., Matsuura N., Sasaki T., Murakami I., Schenider H., Higashiyama S., Saitoh Y., Yamakido M., Taooka Y., Sheppard D. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334 (1999)
289. Yousef G. M., Diamandis E. P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function and disease. *Endocr. Rev.* 22: 184-204 (2001)
290. Zachos G., Rainey M. D., Gillespie D. A. F. CHK1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cell is linked to maintenance of viable replication structures. *Moll. Cell Biol.* 25: 563-574 (2005)
291. Zaremba T., Curtin N. J. PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. *Anticancer Agents Med. Chem.* 7: 515-532 (2007)

292. Zhang Q., Zheng M., Qi X. L., Liu F., Mao Z. J., Zhang D. H. Effect of NQO1 C609T polymorphism on prostate cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 7: 907-914 (2014)
293. Zhang D. T., Shi J. G., Liu Y., Jiang H. M. The prognostic value of Smad4 mRNA in patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* 35: 3333-3337 (2014)
294. Zhou Q., Fukushima P., DeGara W., Mitchell J. B., Stetler Stevenson M., Ashkenazi A., Steeg P. S. Radiation and the Apo2L/TRAIL apoptotic pathway preferentially inhibit the colonization of premalignant human breast cells overexpressing cyclin D1. *Cancer Res.* 60: 2611-2615 (2000)
295. Zhong Y., Wang Q. J., Li X., Yan Y., Backer J. M., Chait B. T., Heintz N., Yue Z. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 11: 468-476 (2009)
296. <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>

10. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace související s tématem práce:

Kurfurstova D., Bartkova J., Vrtel R., Mickova A., Burdova A., Majera D., Mistrik M., Kral M., Santer F. R., Bouchal J., Bartek J. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Mol. Oncol.* 10: 879-894 (2016)

Jamaspishvili T., Scorilas A., Kral M., Khomeriki I., Kurfurstova D., Kolar Z., Bouchal J. Immunohistochemical localization and analysis of kallikrein-related peptidase 7 and 11 expression in paired cancer and benign foci in prostate cancer patients. *Neoplasma* 58: 298-303 (2011)

Kurfürstová D., Král M. Adenokarcinom prostaty a hodnocení stupně jeho diferenciací: Změny v hodnocení Gleasonova skóre od jeho vzniku po současnost a jeho význam pro praxi patologa a urologa. *Urologie pro praxi* 14: 157-159 (2013)

Publikace nesouvisející s tématem práce:

Zizkova V., Skarda J., Janikova M., Luzna P., Radova L., Kurfurstová D., Kolar Z. The relationship of miR-21, miR-126 and miR-205 to P-glycoprotein Mrp1 and Lrp/Mvp in non-small cell lung cancer. *Austin J. Cancer Clin. Res.* 2: 1042/1047 (2015)

Mihál V., Michálková K., Prášil V., Malý T., Novák Z., Kurfürstová D., Geierová M. Krvácení do lymfoangiomu hrudní stěny a levé axily jako příčina náhlého zduření. *Pediatric pro praxi* 12: 348-350 (2011)

Absktrakta prezentací přímo nesouvisející s tématem práce

Kurfürstová D., Janková J., Tichý M. Benigní smíšený duktuloinsulární tumor pankreatu, *Onkologie* 5, Suppl. B, 2011 (VII. Dny diagnostické prediktivní a experimentální onkologie, XIX. Sjezd českých a slovenských patologů, XCVII. Diagnostický seminář české divize IAP, XIX. Sjezd České společnosti histologických laborantů Olomouc (9.-11. 11. 2011)

Kurfürstová D., Tichý T. Extraoseální Ewingův sarkom/PNET u pacienta s neurofibromatózou 1. typu. 9. Symposium a workshop molekulární patologie a histo(cyto)chemie, 99. Diagnostický seminář české divize IAP, 5. Olomoucké dny histologických laborantů (26. 4. 2013)

Turcsányi P., Urbanová R., Hluší A., Papajík T., Kurfürstová D., Indrák K. Úspěšná kombinace splenektomie s následnou imunosupresivní terapií u refrakterní trombocytopenie pacienta s chronickou lymfocytární leukemií. Olomoucké hematologické dny Olomouc: vydavatelství UP s. 57. ISBN: (OCoLC)855465345, (2012)-2013

Obrová J., Kaletová M., Táborský M., Kurfürstová D., Klváček A. Primární synoviální sarkom srdce. Vnitřní lékařství roč. 59, č. 4 (XXXII. Dny mladých internistů Olomouc, 30-31. 5. 2013 Sborník abstrakt), s 1P18. ISSN: 0042-773X; 1801-7592 (elektronická veze)

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/molonc

DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer

Daniela Kurfurstova^a, Jirina Bartkova^{b,c,*}, Radek Vrtel^{d,e}, Alena Mickova^a, Alena Burdova^a, Dusana Majera^e, Martin Mistrik^e, Milan Kral^f, Frederic R. Santer^g, Jan Bouchal^{a,**}, Jiri Bartek^{b,c,e,***}

^aDepartment of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

^bDanish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

^cScience for Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

^dDepartment of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

^eLaboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

^fDepartment of Urology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

^gDivision of Experimental Urology, Department of Urology, Medical University of Innsbruck, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2016

Received in revised form

23 February 2016

Accepted 24 February 2016

Available online ■

Keywords:

Prostate tumorigenesis

DNA damage response barrier

p53 and NKX3.1 tumour suppressors

NQO1 and oxidative stress

TPRSS2-ERG

PARP inhibitor biomarkers

ABSTRACT

The DNA damage checkpoints provide an anti-cancer barrier in diverse tumour types, however this concept has remained unexplored in prostate cancer (CaP). Furthermore, targeting DNA repair defects by PARP1 inhibitors (PARPi) as a cancer treatment strategy is emerging yet requires suitable predictive biomarkers. To address these issues, we performed immunohistochemical analysis of multiple markers of DNA damage signalling, oxidative stress, DNA repair and cell cycle control pathways during progression of human prostate disease from benign hyperplasia, through intraepithelial neoplasia to CaP, complemented by genetic analyses of TPRSS2-ERG rearrangement and NQO1, an anti-oxidant factor and p53 protector. The DNA damage checkpoint barrier (γ H2AX, pATM, p53) mechanism was activated during CaP tumorigenesis, albeit less and with delayed culmination compared to other cancers, possibly reflecting lower replication stress (slow proliferation despite cases of Rb loss and cyclin D1 overexpression) and progressive loss of ATM activator NKX3.1. Oxidative stress (8-oxoguanine lesions) and NQO1 increased during disease progression. NQO1 genotypes of 390 men did not indicate predisposition to CaP, yet loss of NQO1 in CaP suggested potential progression-opposing tumour suppressor role. TPRSS2-ERG rearrangement and PTEN loss, events sensitizing to PARPi, occurred

* Corresponding author. Science for Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Tel.: +46 70 431 60 92.

** Corresponding author. Department of Clinical and Molecular Pathology, Palacky University, Hnevotinska 3, 77515 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420 585 639 570.

*** Corresponding author. Danish Cancer Society Research Center, Strandboulevarden 49, DK-2100 Copenhagen, Denmark. Tel.: +45 35 25 73 57.

E-mail addresses: jib@cancer.dk (J. Bartkova), jan.bouchal@upol.cz (J. Bouchal), jb@cancer.dk (J. Bartek).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2016.02.005>

1574-7891/© 2016 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

frequently along with heterogeneous loss of DNA repair factors 53BP1, JMJD1C and Rev7 (all studied here for the first time in CaP) whose defects may cause resistance to PARPi. Overall, our results reveal an unorthodox DNA damage checkpoint barrier scenario in CaP tumorigenesis, and provide novel insights into oxidative stress and DNA repair, with implications for biomarker guidance of future targeted therapy of CaP.

© 2016 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (CaP) is the most frequently diagnosed malignancy in men and one of the major causes of cancer-related death in developed countries (Siegel et al., 2014). There is currently some uncertainty about the value of systematic screening for prostate-specific antigen (PSA), reflecting an ongoing debate on potential CaP overdiagnosis and over-treatment with no major benefits in terms of overall patient survival (Andriole et al., 2012; Schroder et al., 2014). Prostate cancer develops as androgen-dependent and initially responds to androgen deprivation therapies, however, ultimately the disease progresses into a hormone-independent and largely incurable stage with metastases to the bones, lung, brain or liver. Therefore, there is a pressing need for better understanding of molecular mechanisms underlying CaP progression to inspire discoveries and validation of new treatment strategies. Among the key factors implicated in CaP pathogenesis are genomic alterations such as the TMPRSS2-ERG and related fusion oncogenes, loss of tumour suppressors such as PTEN, p53 or NKX3.1, inflammation, enhanced DNA damage and chromosomal instability (Felgueiras et al., 2014).

Cellular DNA damage response (DDR) represents a dynamic network of proteins capable of detecting DNA lesions and signalling their presence to numerous effector pathways including cell-cycle checkpoints, regulation of transcription, chromatin remodelling, DNA repair and cell death mechanisms (Jackson and Bartek, 2009). Proper DDR is essential for genome maintenance, organismal development and tissue homeostasis, while DDR malfunction may lead to grave pathological consequences such as neurodegeneration, immunodeficiency, premature aging or cancer (Kastan and Bartek, 2004; Jackson and Bartek, 2009). During the early stages of cancer development, the DDR machinery becomes activated in response to oncogene-triggered replication stress and ensuing DNA breaks, thereby providing an inducible biological barrier against malignant transformation and tumour progression (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Halazonetis et al., 2008). Such DDR activation can be documented by immunohistochemical analyses of tissue sections from human clinical specimens, with antibodies against activated (phosphorylated) forms of checkpoint kinases ATM, Chk1 and Chk2, phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) and p53, as well as foci formation characteristic of response to DNA double strand breaks (DSBs), such as those of the 53BP1 protein (Bartkova et al., 2005; Evangelou et al.,

2013). The observed DDR activation is at its maximum in the early, pre-invasive stages of human tumours yet it also persists, at least in subsets of lesions at their fully developed malignant stages (Bartkova et al., 2005, 2006; Gorgoulis et al., 2005; Di Micco et al., 2006; Bartkova et al., 2010). The observed partial decrease of the DDR activation in advanced tumours likely reflects the selective pressure to bypass or inactivate p53, ATM, Chk2 or other components of the DNA damage checkpoints in the incipient cancer cells, as the fully operational DDR would otherwise induce cellular senescence or death and thus block further progression of the tumour (Bartkova et al., 2005, 2006; Gorgoulis et al., 2005; Halazonetis et al., 2008). While the DDR barrier concept has been well documented for diverse types of major solid tumours derived from somatic cells, such as carcinomas of the colon, breast, lung, urinary bladder or brain gliomas (Bartkova et al., 2005, 2010; Gorgoulis et al., 2005; Evangelou et al., 2013), it does not seem to apply for germ-cell tumours (Bartkova et al., 2007, 2014). Most relevant for our present study, the question to what extent is the DDR barrier model applicable to prostate cancer pathogenesis has remained largely unexplored.

Apart from oncogene-induced replication stress, oxidative stress (reactive oxygen species) and the ensuing DNA damage is another source of genomic instability in cancer, a notion particularly relevant for prostate tumours that are commonly associated with chronic inflammation (Sfanos and De Marzo, 2012). One of the major factors involved in cellular protection against oxidative stress is NQO1 (Siegel et al., 1997, 2004; Beyer et al., 1996; Dinkova-Kostova and Talalay, 2010), an enzyme that has also been implicated in carcinogenesis, including stabilization of the p53 (Anwar et al., 2003; Asher et al., 2001) tumour suppressor. NQO1-deficient mice show reduced p53 induction and apoptosis, increased susceptibility to chemically induced tumours (Iskander et al., 2005; Long et al., 2000), and impaired NF- κ B function (Ahn et al., 2006). NQO1 C609T is a missense variant that is homozygous in 4–20% of human population (Kelsey et al., 1997). Cells with the homozygous NQO1 C609T genotype have no measurable NQO1 activity, reflecting the very low levels of the NQO1 P187S protein, which is inherently very unstable due to its rapid turnover via the ubiquitin proteasome pathway (Siegel et al., 2001). We previously reported this variant as a strong prognostic and predictive factor in breast cancer (Fagerhorlm et al., 2008). Although NQO1 status has not been directly linked to prostate carcinogenesis (Steiner et al., 1999) here we wished to analyse the patterns

of NQO1 during the course of prostate tumorigenesis, along with assessment of a spectrum of other proteins involved in the maintenance of genome integrity (checkpoint signaling and DNA repair), and 8-oxoguanine, an indicator of oxidative DNA lesions detectable directly in archival clinical specimens.

Another major motivation to carry out our present analyses was the emerging notion that defects in the DDR machinery, particularly those in some DNA repair pathways, represent vulnerabilities that can be effectively targeted by innovative cancer treatments. Possibly the best example of such treatment strategy is the application of small molecule inhibitors of PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1), an enzyme that participates in several functions within the DDR network, and whose inhibition is highly toxic to cells that are defective in homologous recombination (HR) repair, such as cancer cells with mutant BRCA1 or BRCA2 repair genes (Lord and Ashworth, 2012). This concept, known as ‘synthetic lethality’, reflects selective killing of cells with a defective pathway (here HR) by inhibition of a complementary/redundant function (here PARP1 activity). Very relevant to prostate cancer, recent studies suggested that also some other features of cancer cells may sensitize to PARP inhibitors (PARPi), including aberrant transcription due to the androgen-driven occurrence of fusion oncogenes such as TMPRSS2-ERG (Brenner et al., 2011), or loss of the PTEN tumour suppressor (Mendes-Pereira et al., 2009). Despite their promise, and recent approval of the first PARPi for clinical cancer treatment, both in the USA and Europe, there are also emerging aberrations that can cause enhanced resistance to PARPi in cancers that are otherwise inherently sensitive, such as those with mutant BRCA1. The latter scenario is often referred to as ‘synthetic viability’, enhancing fitness of cancer cells by a secondary mutation in a certain context, here the lack of BRCA1 function. Among examples of synthetic viability in BRCA1-defective tumours, several of which have been identified in our laboratory, are loss of factors involved in regulation of DSB repair by HR versus non-homologous end joining (NHEJ), including 53BP1 (Bouwman et al., 2010), Rif1 (Zimmermann et al., 2013), JMJD1C (Watanabe et al., 2013) or Rev7 (Xu et al., 2015). We have also documented that several of these factors are aberrantly lost or their abundance decreased in subsets of human breast carcinomas, especially those of the so-called triple-negative type (Bouwman et al., 2010; Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2015) that have been regarded as promising for personalized treatment by PARPi (Anders et al., 2010). On the other hand, prevalence of potential aberrations of these DDR proteins remains unknown in prostate cancer, a gap in our knowledge that we wished to fill by our present study. Such analyses are even more desirable at present, as the most recent Phase II clinical trial showed high rate of positive responses to PARPi among prostate cancer patients whose metastatic tumours were no longer responding to standard treatments (Mateo et al., 2015). Overall, with this work, we hoped to provide insights into both patho-biology of CaP progression (status of DDR activation, oxidative stress, tumour suppressors), as well as information about prevalence of candidate biomarkers of response to PARPi treatment, both in terms of predicted enhanced sensitivity (occurrence of TMPRSS2-

ERG fusions, defective PTEN) or resistance (decrease or loss of 53BP1, JMJD1C or Rev7).

2. Material and methods

2.1. Patients

The immunohistochemistry cohort study included 103 randomly selected patients with prostate cancer diagnosis, who underwent radical prostatectomy at the University Hospital in Olomouc between years 2003 and 2011. One of the two subsets of our cohort from this pathology database consisting of 68 patients from the years 2003 and 2010, was in the form of the archived material of prostate tissue stored as paraffin blocks, and fixed by standard procedures. Samples from 35 patients obtained between 2010 and 2011 include prostate tissue that was fixed in small pieces (see below and Table 1). NQO1 genotype was assessed in blood samples from 390 men (see below and Table 3). This study was approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University.

2.2. Tissue processing and immunohistochemical staining and scoring

It is known that the method of fixation, that is, its duration and the fixation solution used, is very important in tissue processing and may influence results of examination methods such as PCR or immunohistochemistry (Howat and Wilson, 2014). In the standard procedure, the entire prostate, after its surgical removal, is immersed in 10% formaldehyde solution for 24-h fixation. Then it is prepared for histological

Table 1 – Patient cohort whose tumours were examined by immunohistochemistry (N = 103; distribution of the 35 samples processed by optimized ‘fast fixation’ is indicated in parentheses).

	Characteristic range/Number of patients		
Age	51–60 32 (5)	61–70 56 (24)	71–81 15 (6)
Serum PSA (ng/ml)	<4 15 (4)	4–10 59 (23)	>10 29 (8)
Gleason scores	<7 28 (8)	7 51 (21)	>7 24 (6)
Cancer stages	pT2a-c 80 (29)	pT3a-b 20 (5)	pT4 3 (1)
Risk groups	low 24 (8)	intermediate 41 (16)	high 38 (11)
NQO1 Genotype	CC 9 (6)	CT 13 (5)	TT 5 (4)

Cancer stages were evaluated as localized (pT2) and advanced (pT3 and pT4).

Risk categories were determined based on both clinical and pathological data: low (pT1–T2a, GS ≤ 6 and PSA ≤ 10 ng/ml), intermediate (at least one of the following: pT2b–c, GS = 7, or 10 < PSA ≤ 20 ng/ml) and high (at least one of the following: pT3–T4, GS > 7, or PSA > 20 ng/ml).

See Table 3 for genotype details.

Table 2 – Spearman correlations within the cohort with fast fixation (N = 35, significant correlations with p value less than 0.05 are highlighted in bold).

	Age	NQO1	8-oxo	p53	Rb	Smad4	D1	SPP1	PTEN	Ki67	PSA	p16	NKX3.1	gH2AX	pATM	53BPP1	JMJD1C	Rev7
Age	1.000																	
NQO1	-0.125	1.000																
8-oxo	-0.280	0.527	1.000															
p53	-0.094	0.301	0.189	1.000														
Rb	-0.052	-0.180	0.096	-0.350	1.000													
Smad4	0.115	-0.187	0.028	0.018	-0.024	1.000												
D1	0.352	0.089	-0.150	0.275	-0.091	0.228	1.000											
SPP1	0.130	-0.330	-0.151	-0.145	0.223	-0.171	0.108	1.000										
PTEN	-0.145	-0.114	-0.086	0.008	0.198	0.028	-0.187	0.092	1.000									
Ki67	0.126	-0.118	-0.177	-0.023	-0.176	0.330	0.506	0.004	0.023	1.000								
PSA	0.560	-0.208	-0.146	0.014	0.088	-0.123	0.369	0.220	-0.041	0.211	1.000							
p16	0.009	-0.009	0.027	0.165	0.126	-0.113	0.133	0.068	-0.218	0.235	0.157	1.000						
NKX3.1	0.021	-0.273	-0.257	0.054	-0.078	0.208	-0.006	-0.006	-0.448	0.048	-0.080	0.259	1.000					
gH2AX	0.115	0.125	-0.027	0.303	-0.022	0.146	-0.060	-0.036	-0.260	-0.150	-0.117	0.018	0.076	1.000				
pATM	0.017	0.203	0.175	0.257	-0.017	0.107	-0.063	0.042	-0.281	-0.041	-0.245	0.128	0.140	0.763	1.000			
53BPP1	-0.154	-0.176	-0.076	-0.078	0.108	0.224	-0.092	0.110	-0.167	-0.041	-0.081	0.253	0.553	-0.007	0.004	1.000		
JMJD1C	-0.121	-0.256	-0.104	0.111	0.201	0.223	0.314	0.208	0.092	0.263	0.140	0.087	0.424	-0.209	-0.210	0.410	1.000	
Rev7	0.017	-0.131	-0.046	-0.065	0.183	-0.135	0.140	0.293	-0.254	-0.059	0.135	0.314	0.325	-0.115	-0.058	0.221	0.360	1.000

examination. It commonly happens, especially if the prostate is large, that its central parts are poorly fixed even after 24-h fixation period, and such areas may undergo degenerative changes. To control for such unwanted fixation bias, a different approach to fixation was used in subset of samples (n = 35) to assess the effect of more optimal fixation on immunohistochemistry (IHC) staining results. In the latter protocol, the surgically removed prostate was measured and annotated; the apex and base were removed and subsequently divided into the right and left halves. The remaining tissue was divided into the right anterior and posterior quadrants and the left anterior and posterior quadrants. Then each prostate part was put in a separate labeled container with 10% formaldehyde and fixed until the following day. When immunohistochemistry results obtained with sections from the same prostate yet fixed in the two ways indicated above were compared, histoscores (see below for histoscore calculation) for Rb and Ki67 (both $p < 0.01$), but not percentage of cell positivity, were decreased in those tissues exposed to standard fixation as compared to the modified fixation protocol of small tissue pieces. On the other hand, both histoscore and percentage of cell positivity for NQO1, cyclin D1 and nuclear PTEN were increased in tissues with standard fixation (p values for histoscores were $p = 0.029$, $p = 0.049$ and $p = 0.001$, respectively). For consistency, data for these affected proteins that are shown in Figures and Tables, are calculated from the sub-cohort subjected to the small-piece faster fixation, although similar results could be seen across the entire cohort. In order to avoid any misinterpretation due to delayed fixation, several proteins were analysed only in the sub-cohort (n = 35) the tissues from which were subject to the optimized fixation protocol in smaller tissue pieces ([Supplementary Table 1](#)).

After evaluating the slides stained with hematoxylin-eosin, for each patient three blocks with predominance of benign hyperplasia (BPH), prostate intraepithelial neoplasia (PIN), and cancer (CaP), respectively, were selected for further study. The stage of disease progression was estimated according to morphological criteria recommended by the World Health Organization Classification of Tumours ([Eble et al., 2004](#)). Tissue sections of 5- μ m thickness were cut and subjected to optimized, sensitive immunoperoxidase staining protocols, performed either manually: using either the Vectastain Elite kit and nickel enhancement procedure without nuclear counterstaining ([Bartkova et al., 2005](#)) or by the Ventana Benchmark XT workstation, using a kit and DAB Detection View (see [Supplementary Table 1](#) for antibody list and staining methods). Each stained tissue section was first examined at a low magnification, and slice margins, as well as potential areas of acute inflammation or necrosis were excluded from the scoring. Within the areas of BPH, PIN and CaP of each case, 3 microscope fields at the 200 $\times$ magnification (for each of the BPH, PIN and CaP stages) were randomly chosen and carefully evaluated. In the slides stained with the antibodies against nuclear proteins, the percentage of positive nuclei was counted from the overall 300 nuclei from each of the structures of interest (hyperplasia, PIN and carcinoma, respectively). For slides stained with antibodies against largely cytosolic proteins, percentage of positive cells was assessed by examination of at least 200–300 cells (in 2 cases,

Table 3 – Frequencies of NQO1 genotypes and alleles.

	N	NQO1 genotype (rs1800566)			Allele frequency	
		Pro187Pro	Pro187Ser	Ser187Ser	Wild type	Variant allele
		609 CC	609 CT	609 TT	C	T
Prostate cancer	171	110 (64.3%)	56 (32.8%)	5 (2.9%)	276 (80.7%)	66 (19.3%)
Benign disease	219	149 (68.1%)	64 (29.2%)	6 (2.7%)	362 (82.6%)	76 (17.4%)
Sum	390	259 (66.4%)	120 (30.8)	11 (2.8%)	638 (81.8%)	144 (18.2%)

only some 200 cells in the BPH structures could be found, while a minimum of 300 cells was examined in all other cases and in all cases for the PIN and CaP stage). The staining intensity for both nuclear and cytoplasmic antigens was scored as follows: 0 – negative, 1 – weak, 2 – moderate, 3 – strong signal. Histo score was then calculated as percentage of cell/nuclear positivity multiplied by staining intensity, resulting in histo score values ranging from 0 (minimum) to 300 (maximum). In the vast majority of cases (all but 2 specimens) 300 cells were examined for each of the stages. For 2 patients, the specimens contained enough PIN and CaP regions to evaluate 300 cells but only a small region of BPH that was sufficient for only 200 cells to be evaluated.

2.3. NQO1 genotyping

DNA samples were genotyped using a restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay reported earlier (Fagerholm et al., 2008). Briefly, PCR amplicon (279 bp; forward primer 5' – CCT GAG GCC TCC TTA TCA GA – 3', reverse primer 5' – AGG CTG CTT GGA GCA AAA TA – 3') was designed to contain one *HinfI* restriction site specific to the C609T allele. After digestion according to the enzyme manufacturer's instructions (New England BioLabs), PCR products containing the C609T allele are cleaved into fragments of 152 and 127 base pairs, readily distinguishable on regular 2% agarose gels, whereas wild-type amplicons remain intact. EtBr was used for staining the PCR products.

2.4. TMPRSS2-ERG status

In a subset of patients (N = 12, Kolar et al., 2014), presence of the chromosomal rearrangement at 21q22 was evaluated by interphase fluorescence *in situ* hybridization using Poseidon TMPRSS2-ERG (21q22) Del, Break, TC Probe (Kreatech Diagnostics). Additional patients were evaluated by quantitative PCR. With respect to the potential adverse effect of delayed fixation in large pieces of tissue (see section 2.2 above), the TMPRSS2-ERG status as examined by PCR was evaluated only in the smaller cohort of patients (in 31 of the 35 samples) processed with the optimized faster fixation protocol of smaller tissue pieces. RNA was isolated from paraffin sections by RNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen), quantified by Nanodrop, preamplified by Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma–Aldrich) and subjected to qPCR with specific primers and probes (TMPRSS2-ERG: forward CTG GAG CGC GGC AGG AA, reverse GTC CAT AGT CGC TGG AGG AG, probe Cy5-TGA GTG AGG ACC AGT CGT TG-BHQ2; POLR2A: forward CAA GTT CAA

CCA AGC CAT TG, reverse CCA GCA TAG TGG AAG GTA TTC A, UPL probe No. 87; LightCycler480, Roche). Samples with undetectable POLR2A were considered as non-evaluable. In total, 10 patients were classified as TMPRSS2-ERG positive and 18 as negative (8 positive and 11 negative within the fast fixation cohort).

2.5. Statistical analysis

Relationships among expression of the analysed proteins, NQO1 genotype and clinicopathological parameters were statistically evaluated using Statistica 12 software. Paired samples were assessed by Wilcoxon signed rank test while different subgroups were compared either by Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test. Correlations were evaluated by Spearman correlation test.

3. Results

3.1. Markers and general trends of dynamic alterations during CaP progression

To assess disease progression-related dynamics of potential alterations in several important pathways governing pathobiology and genome (in)stability of CaP, we examined a total of 17 distinct antibody-defined markers (Supplementary Table 1) in benign prostate hyperplasia (BPH), PIN and CaP lesions from a cohort of prostate cancer patients (Table 1). The markers studied here were selected to characterize aspects of the lesions including cell proliferation and cell cycle control (Ki67, cyclin A, and the key components of the RB pathway: cyclin D1, CDK inhibitor p16 and Rb tumour suppressor), genome integrity control (p53 tumour suppressor, ATM kinase and its regulator NKX3.1, general DNA damage signalling marker γ H2AX, and DNA repair factors: 53BP1, Rev7 and JMJD1C), oxidative stress parameters (8-oxoguanine lesions and the anti-oxidant factor NQO1, along with p53), as well as the most CaP-relevant oncogene (TMPRSS2-ERG fusion) and tumour suppressors (PTEN and its related Smad4, along with p53, Rb and NKX3.1). While most of the parameters will be presented and evaluated in detail in the subsequent sections of the Results devoted to specific areas of CaP biology, here we mention some of the general trends related to disease progression, and comment on the Rb pathway and proliferation rate. In general, immunohistochemically assessed expression of NQO1, 8-oxoguanine, activated ATM (phospho-ATM), γ H2AX, cyclin D1, p53, p16, SPP1, nuclear PTEN and nuclear

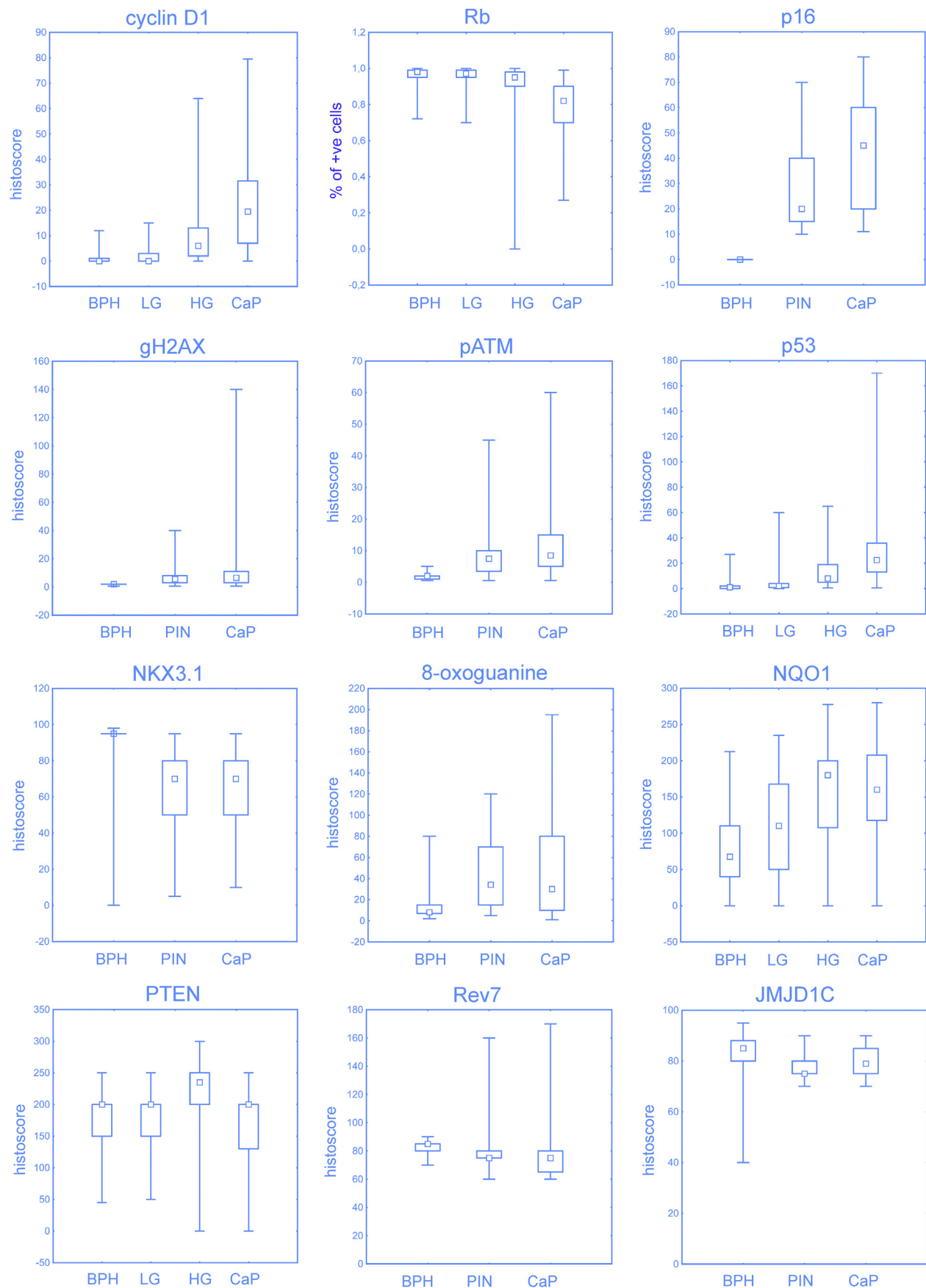


Figure 1 – Expression of selected proteins in benign hyperplasia (BPH), prostate intraepithelial neoplasia (PIN; LG, low-grade; HG, high-grade) and prostate cancer (CaP). Low and high-grade PINs were distinguished for indicated proteins. Percentage of positive cells is shown for Rb protein. Box-plots represent median, 25%–75% percentiles and range of values. Expression of all proteins were significantly different between tumour and benign areas ($p < 0.001$; comparisons to PIN are available in [Supplementary Table 2](#)).

Smad4 were mostly increasing during the disease progression, while abundance of Rb, Rev7, JMJD1C and 53BP1 were decreasing (Figure 1, Supplementary Figure 1A, Supplementary Table 2). Significant correlations were found between some pairs or among groups of the studied markers (Table 2) and these relationships as well as the pathogenetic relevance will be discussed in the following paragraphs. In the G1/S regulatory Rb pathway, levels of the oncogenic cyclin D1 increased from benign hyperplasia through PIN to the highest levels seen at the CaP stage, whereas Rb showed the opposite trend with CaP stage marked by the highest frequency of Rb loss (Figure 1). Consistent with previous studies, the CDK4/6 inhibitor p16 was barely detectable in benign hyperplasia, elevated in the PIN lesions, and reached maximum at the CaP stage (Figure 1). Aberrant decrease or loss of Rb correlated with increased abundance of p53, the pattern often reflecting protein stabilisation due to missense mutations of p53 (Iggo et al., 1990; Bartek et al., 1990). Furthermore, cyclin D1 expression correlated positively with Ki67 (general proliferation), with patients' age and serum PSA level (a commonly used marker of androgen receptor signalling), the latter also correlating with the age of the patients. Inspired by a 4-marker signature of aggressive CaP (PTEN, Smad4, cyclin D1 and SPP1; Ding et al., 2011) we analysed also osteopontin (alias SPP1, secreted phosphoprotein 1), an important cytokine affecting cancer progression (Shevde and Samant, 2014). SPP1 was increased in PIN and CaP which is in line with its role in tumour microenvironment, however we did not observe any correlation with other markers in our study (data not shown).

Finally not surprisingly for a CaP cohort, yet very relevant for the context with other markers, the overall proliferation rate deduced from the percentage of cells positive for the Ki67 marker was generally low (around 10% of cancer cells at the CaP stage). In addition, the fraction of S/G2 phase cells, as judged by cyclin A positivity, was even much lower than Ki67, within the range of 1–5% of cancer cells (data not shown), suggesting that most of the Ki67-positive tumour cells are in the G1 phase.

Overall, we conclude that the proliferation rate of the lesions is generally very low and, more importantly, that the expression patterns of most of the examined markers show dynamic changes during progression of the disease from the benign lesions towards full malignancy.

3.2. DNA damage signalling barrier

One of the key issues, we wished to address in this study, was the extent and timing of potential DNA damage signalling activation during CaP progression, as a sign of the endogenous DNA damage response barrier against tumour progression analogous to other major solid tumours (Halazonetis et al., 2008). The level of DNA damage signalling, judged from the staining patterns of γ H2AX as a general marker of active DDR kinases such as ATM or ATR, was detectable in a small fraction (around 2%) of cells at the BPH stage, usually increased several fold at the PIN stage of the same patient, and was highly variable, in a few cases even reaching 40–70% of positive tumour cells at the CaP stage. The graphical summary of the data is presented in Figure 1, and

examples of immunohistochemical staining for γ H2AX are shown in Figure 2A, along with aberrantly enhanced abundance of p53 protein, the major downstream effector of DDR signalling. Furthermore, we observed a very similar trend to that seen for γ H2AX also for the activated, serine1981-phosphorylated form of ATM (pATM), the major kinase responsible for histone H2AX phosphorylation, increasing from BPH through PIN towards the CaP stage (Figures 1 and 2B, top images). Indeed, among all the biomarkers tested in our present study, γ H2AX and pATM correlated most closely with each other (Table 2). Another aspect of DDR activation, especially response to DNA double strand breaks (DSBs) is the characteristic formation of so-called nuclear foci that mark accumulation of DDR proteins such as 53BP1 in the DSB-flanking chromatin (Lukas et al., 2011). Indeed, focal nuclear staining was apparent at closer inspection of slides stained for γ H2AX and 53BP1, at least in some tumour cell nuclei (Figure 2B, lower images). Despite the detectable DDR activation, however, the overall extent of such signalling was clearly below that seen in other major solid tumour types, and the maximum was seen later during CaP progression. This intriguing difference can be exemplified by an overall graphical comparison of the extent of DDR signalling activation in CaP versus urinary bladder tumour progression (Bartkova et al., 2005), depicting subsets of cases with at least 10% of γ H2AX-positive tumour cells (Figure 2C).

Regarding clinicopathological parameters, aberrantly enhanced expression of p53 and positivity for the proliferation marker Ki67 were significantly higher in tumours with Gleason score 4 + 3 or worse (Figure 2D). Furthermore, overabundant p53 (the highest levels of which likely reflect missense mutations of the p53 gene) was also higher in the advanced CaP tumours in comparison with the localized ones (Figure 2D).

Given that loss of the NKX3.1 is one of the characteristic features of CaP, and that one of the emerging functions of this tumour suppressor is a positive regulation of ATM kinase activation (Bowen et al., 2013), we regarded the status of NKX3.1 as a potential component of the DDR barrier mechanism. While the patterns of NKX3.1 were variable, there was a clear trend of maximum protein detection at the BPH stage, compared to generally aberrantly lower levels in both PIN and CaP lesions. The graphical summary of these results is presented in Figure 1 (bottom right graph) and representative examples of immunohistochemical staining patterns for NKX3.1 shown are shown in Figure 2E. Last but not least, since both the DDR checkpoint signalling and the p16 tumour suppressor can induce cellular senescence, we also considered p16 in the context of the potential anti-tumour barriers. As briefly mentioned in section 3.1, abundance of p16 was increasing from BPH, through PIN to maximal levels in CaP lesions. Notably, this trend is overall reminiscent of the increasing DDR signalling, and examples of p16 staining patterns at various stages of CaP progression are shown in Figure 2F. What was also apparent at closer inspection, however, was that at both the PIN and the CaP stages, p16 expression was often heterogeneous and completely missing in some tumour areas (Figure 2F, far right), possibly reflecting focal loss of this tumour suppressor.

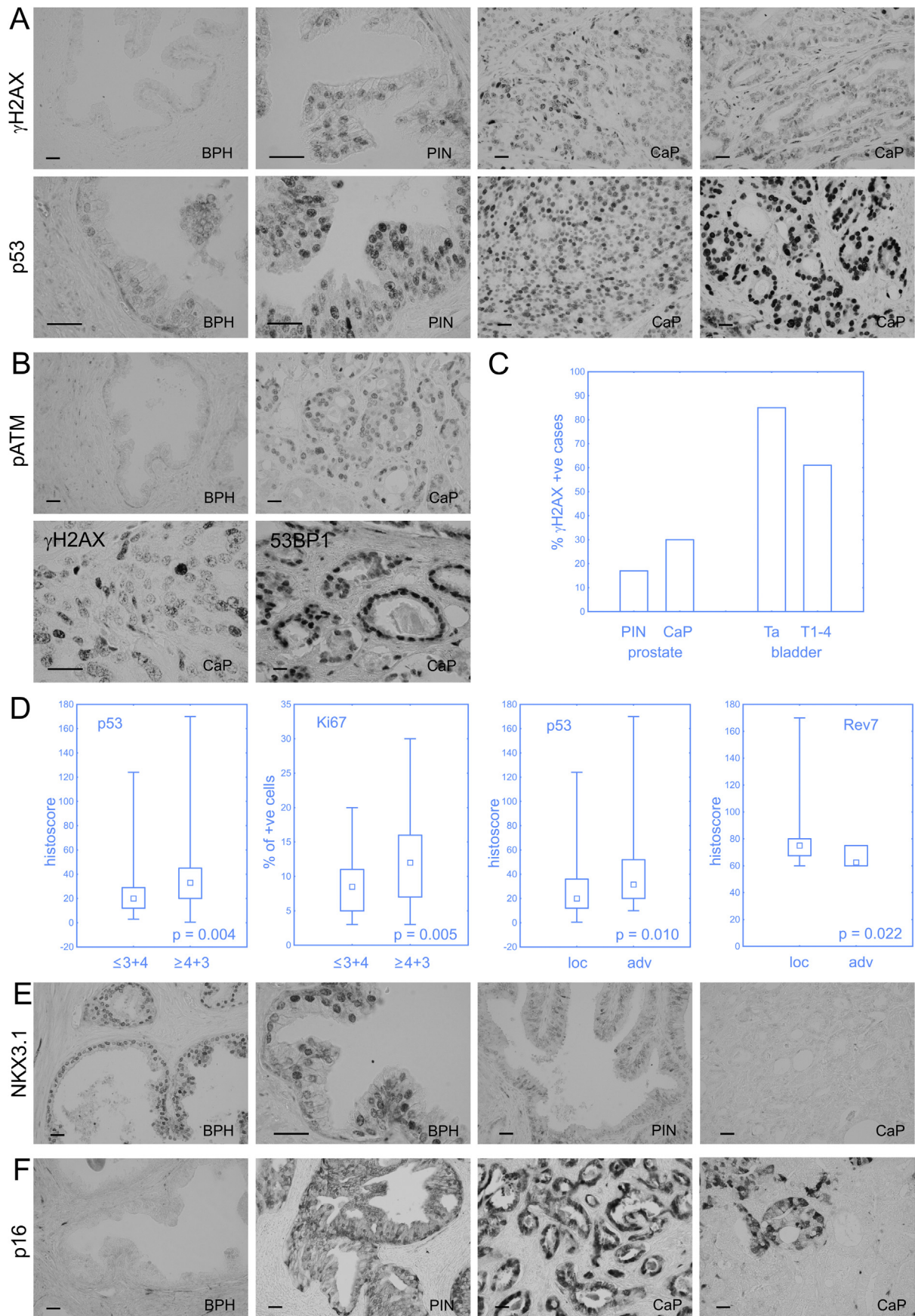


Figure 2 – DNA damage response as an anticancer barrier in prostate cancer. Increasing genotoxic stress from BPH to PIN and CaP is illustrated by γ H2AX, p53 and phospho-ATM staining (A and B). Strong p53 positivity may indicate p53 mutation (A, far-right image). Nuclear foci of

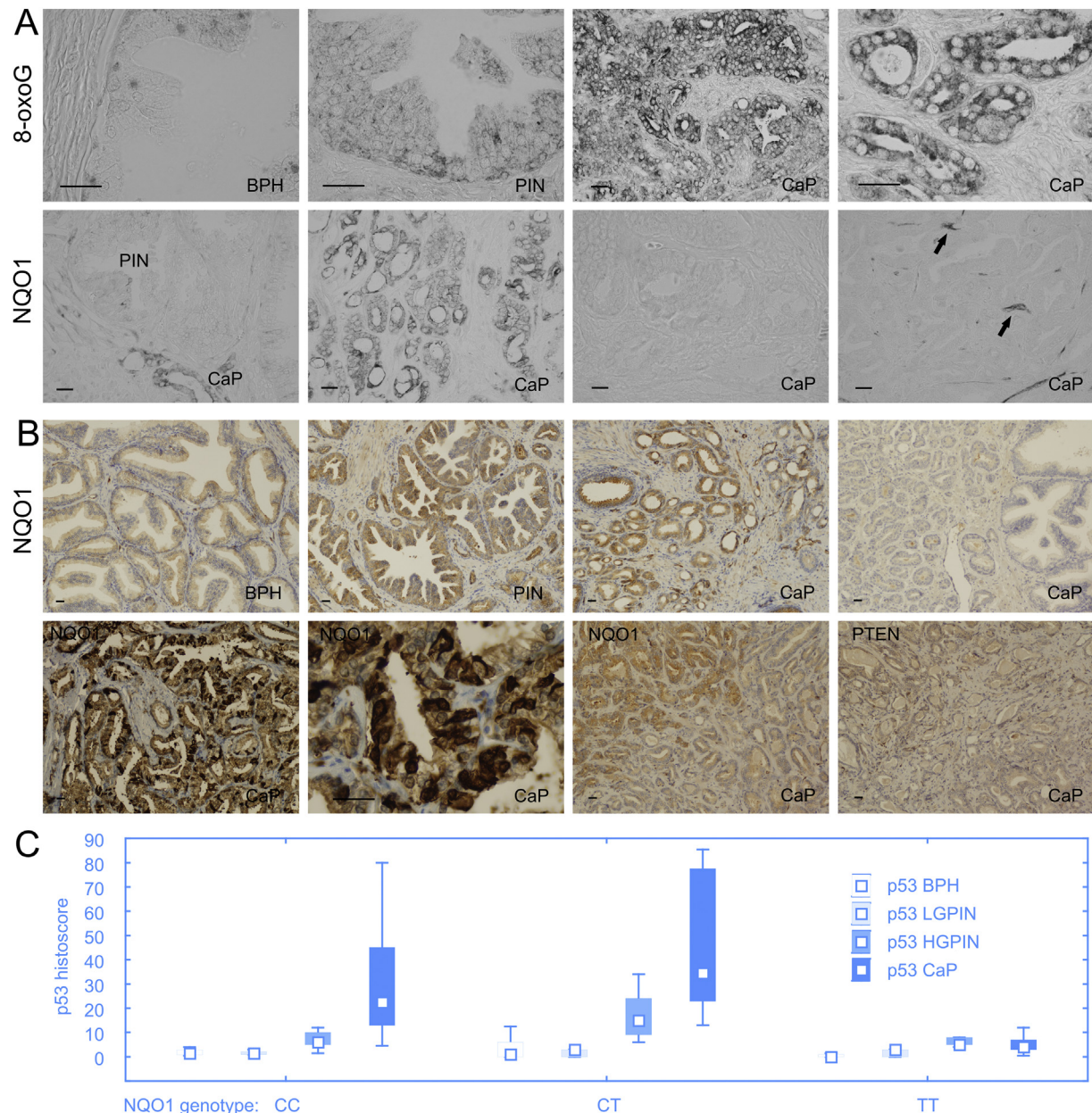


Figure 3 – Oxidative stress and NQO1 in prostate cancer. Both 8-oxoguanine and NQO1 increase from BPH to PIN and CaP (A; different staining method is shown in upper panel of B). All tumours from patients with the genetically confirmed NQO1 variant homozygote genotype (TT at position 609) lacked detectable NQO1 protein (A, the third image in the lower panel; B, far-right image in the upper panel). Notably, we found several large NQO1 protein-negative areas in tumours from patients with the heterozygous (CT) genotype, a phenomenon that was particularly apparent in the immunoperoxidase-stained sections without nuclear counterstaining, where the stromal blood vessels showed clear NQO1 positivity (arrows) in contrast to surrounding negative cancer cells (A, far-right image in the lower panel). Whereas expression of the other protein markers examined in our present study remained apparently unaffected by the lack of NQO1, in one case the area-restricted lack of NQO1 correlated with the local loss of PTEN staining on parallel sections (B, the two bottom right images). Furthermore, strong perinuclear expression of NQO1 expression was observed in some patients (B, the two bottom left images). Scale bars represent 50 μ m. Consistent with the role of NQO1 in protecting basal levels of p53 from proteolysis, tumours from patients with the homozygous TT variant of NQO1 featured significantly lower expression of p53 in comparison with both heterozygous and normal homozygous NQO1 genotypes (Figure 3C, $p < 0.005$). Box-plots represent median, 25%–75% percentiles and range of values.

H2AX and 53BP1 as markers of DNA damage response activation in CaP (B). The overall extent of DDR signalling is less pronounced in CaP than in other somatic tumour types (e.g. bladder cancer), and it culminates at the malignant, rather than pre-malignant stage. (C). Higher Gleason score was associated with stronger staining of p53 (probably mutated) and faster proliferation (assessed by Ki67). Enhanced p53 and, more importantly, decreased Rev7 staining were observed in advanced CaP compared to localized ones (D). Complete (NKX3.1) and partial (p16) loss of tumour suppressors can be observed in invasive CaP (E and F). Scale bars represent 50 μ m.

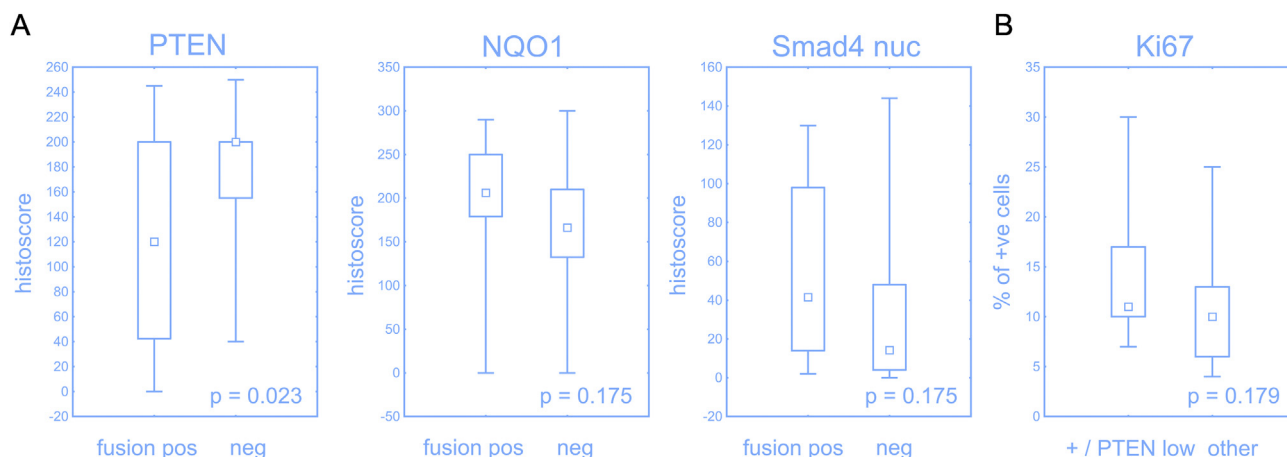


Figure 4 – Effect of TMPRSS2-ERG status. Expression of PTEN was significantly lower, while NQO1 and nuclear Smad4 had a trend towards higher expression in tumours with positive TMPRSS2-ERG (A). Tumours with positive TMPRSS2-ERG and low PTEN (histoscore less than 160) had a trend to a higher proliferation compared to other combination of fusion status and PTEN expression (B). Box-plots represent median, 25%–75% percentiles and range of values.

We conclude that the DNA damage checkpoint signalling is indeed activated in human prostate premalignant lesions and even more so in subsets of CaP lesions. On the other hand, the overall extent of DDR signalling is less pronounced than in other somatic tumour types such as carcinomas of the urinary bladder and colon (Bartkova et al., 2005), lung carcinomas (Gorgoulis et al., 2005), or gliomas (Bartkova et al., 2010), and it culminates at the malignant, rather than pre-malignant stage, a pattern that is consistent also with the lower frequency of p53 overexpression (mutation) in CaP. The potential mechanisms and significance of these results including the apparent presence of DSB foci that we observe, will be considered in a broader context and more details in the Discussion section.

3.3. Oxidative stress and NQO1

Chronic inflammation and oxidative stress are among the hallmarks of CaP, and such conditions can also contribute to genomic instability. To gain a better insight into the kinetics and extent of oxidative stress in the course of human prostate tumorigenesis, we next examined 8-oxoguanine (8-oxoG, a key oxidative DNA lesion) and the status of NQO1, a cytoprotective enzyme of major importance in combating oxidative stress and a factor that stabilizes p53 (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010) by immunohistochemistry in our cohort of 103 prostatic lesions. In addition, we also established the genetic status of NQO1 with respect to its protein-destabilizing polymorphism (C609T variant) as a candidate cancer-predisposing or -promoting factor in the blood of a control cohort of 390 men (Table 3).

Our immunohistochemical analysis showed that abundance of 8-oxoG as well as NQO1 was increasing from BPH, through PIN to CaP stages (see summary graphs in Figure 1). While both markers localized mainly in the cytoplasmic compartment of tumour cells (Figure 3A, B), nuclear positivity was also detectable and in a few cases, NQO1 was

predominantly perinuclear (Figure 3B and data not shown). Consistent with their mutual functional link we also found a positive correlation between increasing NQO1 and 8-oxoG (Table 2). As expected, all tumours from patients with the genetically confirmed NQO1 variant homozygote genotype (TT at position 609) lacked detectable NQO1 protein (see examples in Figure 3A, B). Notably, however, we also found several large NQO1 protein-negative areas in tumours from patients with the heterozygous (CT) or wild-type homozygous (CC) genotype (see Figure 3A, B for examples), a phenomenon that was particularly apparent in the immunoperoxidase-stained sections without nuclear counterstaining, where the stromal blood vessels showed clear NQO1 positivity in contrast to surrounding negative cancer cells (Figure 3A, far-right image). Whereas expression of the other protein markers examined in our present study remained apparently unaffected by the lack of NQO1 (see Supplementary Figure 1B for an example of parallel sections stained for NQO1 and 53BP1, respectively), in one case the area-restricted lack of NQO1 correlated with the local loss of PTEN staining on parallel sections (Figure 3B, the two bottom right images). Notably, the area was positive for the other markers examined on parallel sections, thereby excluding false negative results for NQO1 and PTEN due to fixation problems or tissue necrosis. Furthermore, consistent with the role of NQO1 in protecting basal levels of p53 from proteolysis, tumours from patients with the homozygous TT variant of NQO1 featured significantly lower expression of p53 in comparison with both heterozygous and normal homozygous NQO1 genotypes (Figure 3C, $p < 0.005$). Patterns of other examined proteins were unaffected by the NQO1 genotype, further supporting the intimate functional relationship between NQO1 and p53. There was no association of NQO1 expression with clinicopathological parameters (serum PSA, Gleason score, or risk groups).

Our genetic analysis of NQO1 status in the cohort of 171 CaP patients and 219 healthy men did not reveal any increased prevalence of the variant NQO1 genotype with prostate cancer

(Table 3). These results do not support a role of NQO1 'insufficiency' in genetic predisposition to prostate cancer, at least not in the population of men in the Czech republic studied here. On the other hand, the NQO1 protein expression data that we obtained suggest a potential contribution to oxidative stress response and CaP progression (see Discussion for more details on the potential relevance and implications of these findings).

3.4. Treatment-relevant aberrations in DNA repair

Treatment with PARP inhibitors takes advantage of certain cancer-predisposing or –promoting abnormalities in the DDR machinery, particularly status of proteins that impact the choice of DNA repair pathway by deregulating the balance of DSB repair through homologous recombination (HR) versus non-homologous end joining (NHEJ) mechanisms (Lord and Ashworth, 2012). Motivated by emerging promising results from clinical trials with PARPi in several types of malignancies including castration-resistant CaP (Mateo et al., 2015), we examined 5 markers that are likely to impact response to PARPi in our CaP progression cohort. Two of these factors, occurrence of the TMPRSS2-ERG fusion oncogene and loss of the PTEN tumour suppressor have been extensively studied and we chose these for comparison with the other markers and due to their relevance for genome instability. On the other hand, expression of the 3 chosen DNA repair proteins, 53BP1, JMJD1C and Rev7, whose aberrant loss in certain genetic backgrounds, as we recently showed for breast cancer (Bouwman et al., 2010; Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2015), can cause resistance to PARPi, has not been examined in the context of CaP so far.

Based on our genetic data for TMPRSS2-ERG, and immunohistochemistry analyses of PTEN and the 3 DNA repair proteins, we found that fusion of TMPRSS2-ERG occurred in 42% of tumours (Figure 5c), while expression of PTEN, 53BP1, Rev7 and JMJD1C was decreasing during the progression from BPH, through PIN to CaP (see Figure 1 and Supplementary Figure 1A, for graphical overviews). The TMPRSS2-ERG fusion was associated with lower expression of PTEN and with a trend towards higher expression of NQO1 and nuclear Smad4, a factor involved in PTEN-related cellular signalling (Figure 4A). Furthermore, tumours positive for TMPRSS2-ERG and low in PTEN expression (histoscore below 160) showed a trend towards higher proliferation compared to other combinations of the TMPRSS2-ERG fusion status and PTEN expression (Figure 4B).

As to the overall patterns of the 3 repair proteins, 53BP1 and JMJD1C correlated with each other, while JMJD1C correlated also with Rev7 (Table 2). Notably, the aberrant decrease or loss of 53BP1, Rev7 and JMJD1C was heterogeneous, largely evident in only patches of cancer cells, though for Rev7 such apparent loss could affect very large areas of the tumour (Figure 5A and B). The observed lack of these repair factors was commonly restricted to only one of the proteins (see Figure 5B for parallel sections of a CaP stained for the 3 factors, with only Rev7 missing in the tumour area marked by the arrow) suggesting that such heterogeneous absence of these repair proteins was selective and did not simply reflect some tissue fixation problems or areas of necrosis, for example.

The summary of the data for the 5 markers, showing prevalence of the aberrant cases within our cohort of CaP tumours, along with their potential impact on response to PARPi treatment of cases deemed suitable for this emerging therapy, is presented in Figure 5C. Functional ramifications and pathogenetic as well as treatment-related relevance of these results are discussed below.

4. Discussion

This study provides multiple insights into the dynamically changing landscape of key factors implicated in genome integrity control including DNA damage signalling and repair, oxidative stress and cell cycle regulation during the natural course of human prostate tumorigenesis. Apart from complementing previous studies (Aparicio et al., 2011) on CaP progression-related alterations of the Rb pathway components (here cyclin D1, p16 and Rb), we wish to highlight the conceptual advances and potential clinical relevance of three separate yet related topics from the dataset we present: i) DNA damage response activation as a candidate biological barrier against CaP progression; ii) Oxidative stress and the role of NQO1; and iii) DNA repair-related aberrations in CaP relevant for the emerging treatment strategy with PARP inhibitors.

First, based on the overall patterns of the DNA damage signalling markers γ H2AX, pATM, focal pattern of 53BP1, and accumulation of p53, we conclude that in the course of human prostate tumour progression, the DNA damage checkpoint 'barrier' indeed becomes activated. While this phenomenon is conceptually broadly analogous to scenarios seen in progression of other somatic tumour types such as carcinomas of the lung, breast, colon or urinary bladder (Bartkova et al., 2005, 2010; Gorgoulis et al., 2005; Evangelou et al., 2013), we would like to emphasize some unorthodox features of this DDR barrier concept in prostate, distinct from other types of malignancies (see e.g. the comparison with urinary bladder tumours, Figure 2C). Such unorthodox aspects include the overall lesser extent, and later culmination of the DDR signalling during the progression from BPH and PIN, to culminate only at the CaP stage. We propose that the biological basis for this different DDR barrier scenario may reflect a combination of reasons, including the overall slower proliferation rate (documented here by the low Ki67 scores and very low fraction of S/G2 cells as revealed by cyclin A staining), possibly the low expression of histone H2AX *per se*, as reported for prostate luminal cells (Jaamaa et al., 2010), and also tumorigenic events characteristic for CaP, such as the very frequent loss of NKX3.1 tumour suppressor whose function is normally required for proper activation of the ATM kinase (Bowen et al., 2013). The observed slow proliferation rate of prostate tumours is furthermore likely to cause less replication stress compared to other major malignancies. Indeed, replication stress is commonly high in other types of tumours where it represents the major source of endogenous DNA damage, thereby inducing the DDR checkpoint barrier which consequently provides selective pressure to favour outgrowth of tumour clones with mutant p53 (Halazonetis et al., 2008). This line of thought appears consistent with the fact that the frequency of

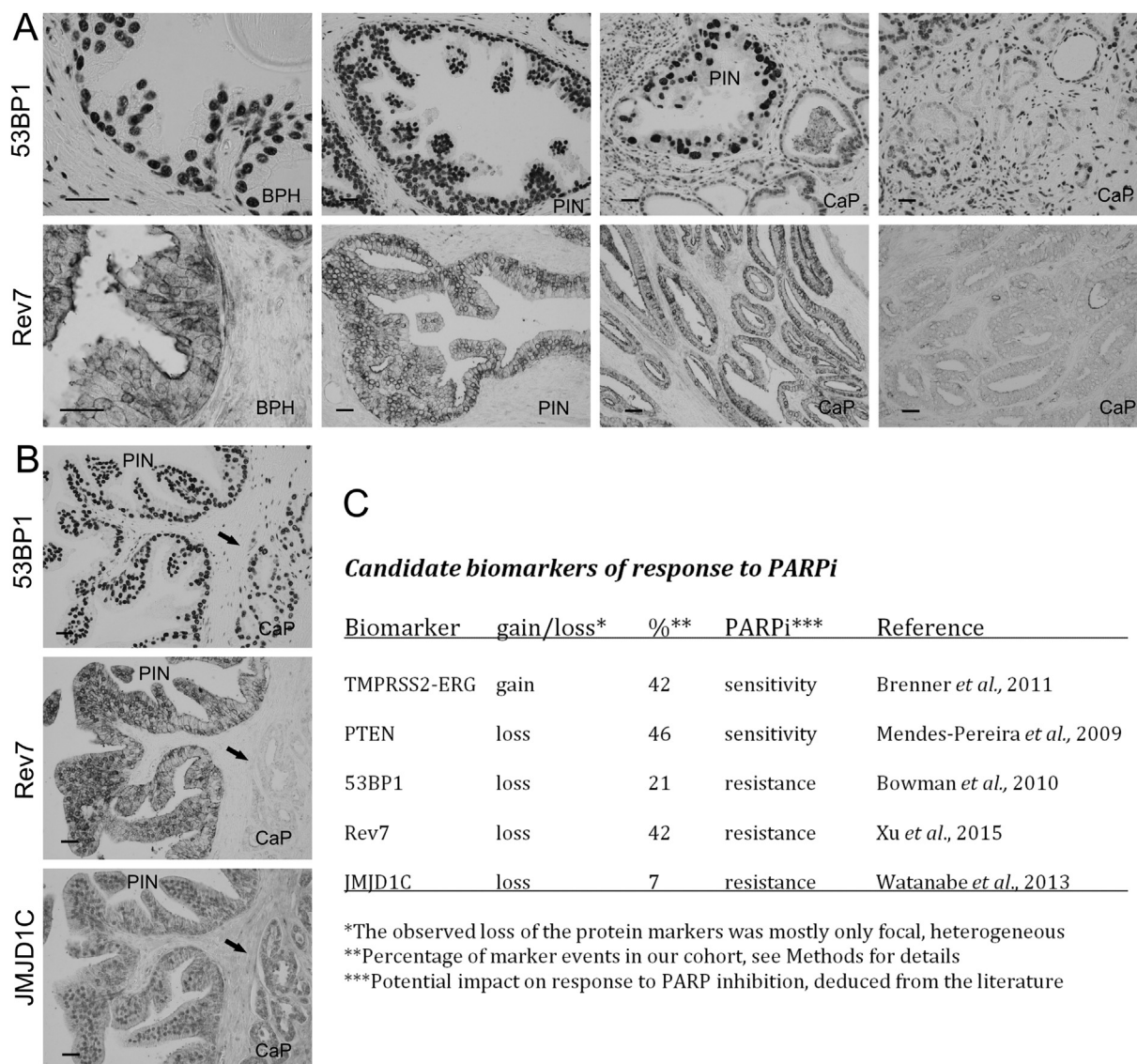


Figure 5 – Potential predictive markers for prostate cancer therapy with PARP inhibitors. The aberrant decrease or loss of 53BP1 and Rev7 was heterogeneous, largely evident in only patches of cancer cells (A, upper panel), though for Rev7 such apparent loss could affect very large areas of the tumour (A, far-right image in the lower panel). The observed lack of these repair factors was commonly restricted to only one of the proteins (B, parallel sections of a CaP stained for the indicated proteins with only Rev7 missing in the tumour area marked by the arrow) suggesting that such heterogeneous absence of these repair proteins was selective and did not simply reflect some tissue fixation problems or areas of necrosis. The summary of data for five potential predictive markers, showing prevalence of the aberrant cases within our cohort, along with their potential impact on response to PARPi treatment (C).

missense mutations of the *p53* gene is generally much lower in CaP compared to most other carcinoma types. Indeed, based on a recent meta-analysis of public cancer genetics databases the frequency of *p53* mutations is only 17% in CaP (Williams *et al.*, 2014), and this parallels very closely the subset of CaP cases (14%) which in our present study showed high percentage of *p53*-positive cells, a feature that we showed in the past was characteristic for stabilized mutant *p53* proteins (Iggo *et al.*, 1990; Bartek *et al.*, 1990). In this context, we propose that the DDR checkpoint barrier is generally less active in CaP (our current results), hence causing less pressure for checkpoint bypass, and thereby a lower ‘need’ to select for *p53* mutations than in other tumours. This overall

concept of the DDR barrier as a pressure selecting for *p53* mutations is further supported by testicular germ cell tumours, which show hardly any evidence of the DDR barrier activation and, consistent with our arguments, show an exceptionally low *p53* mutation rate (Bartkova *et al.*, 2007, 2014). Also relevant to this topic is the positive correlation between aberrant loss of the Rb tumour suppressor and the high expression of *p53* (the ‘mutation pattern’) in our cohort (Table 2). Since loss of Rb deregulates the G1/S controlling ‘restriction point’ (Bartek *et al.*, 1996) and causes replication stress and DDR barrier activation (Tort *et al.*, 2006), we would predict that such context should favour selection of *p53*-mutant cancer cells in order to avoid DDR-evoked senescence or apoptosis that

would prevent tumour growth, a notion supported by the correlations between Rb loss and aberrant p53, and between aberrant p53 and advanced/aggressive CaP stage, observed in our present dataset.

The second major topic addressed here was the character of progression-related changes in oxidative DNA lesions and the role(s) of the major anti-oxidant enzyme NQO1 in predisposition to, or progression, of CaP. At the genetic level, we have not observed any association between NQO1 genotype and CaP incidence which is in line with other studies of Caucasian populations (Steiner et al., 1999; Ergen et al., 2007; Steinbrecher et al., 2010; Stoehr et al., 2012). At the biomarker level studied by immunohistochemistry, we found that both NQO1 expression and 8-oxoG detection were increasing from BPH to PIN and CaP, indicating an increase of oxidative stress during carcinogenesis and a potential contribution of NQO1 to genome integrity protection. Increased 8-oxoG with age and in CaP has been found by different methods in tissues, urine and serum (Malins et al., 2001; Miyake et al., 2004; Kosova et al., 2014). Also, a role of NQO1 in blocking CaP progression has been recently proposed for the mouse TRAMP CaP model (Thapa et al., 2014). Furthermore, NQO1 silencing in CaP cells enhanced the levels of nuclear IKK α and NF- κ B while decreasing the levels of p53, leading to interactions between NF- κ B and p300 that reinforce cellular pro-survival signalling (Thapa et al., 2014; Bouchal et al., 2011). The role of NQO1 in protecting basal levels of p53 from proteasomal degradation is well established (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010) and consistent with our present findings of low p53 protein levels in patients with the homozygous C609T variant genotype of NQO1 that basically eliminates the function of NQO1 from such cells and tissues. What was intriguing and not reported before was the total absence of NQO1 protein in large tumour areas in which NQO1 was clearly expressed in blood vessel endothelium. We observed this scenario in several cases of CaP, and suggest that this cancer-selective loss of NQO1 may reflect a pressure to mitigate the anti-tumour functions of NQO1, including its ability to stabilize wild-type p53 as a critical component of the cellular anti-cancer mechanism. In other words, we speculate that such focal loss of NQO1 in advancing CaP lesions supports the candidacy of NQO1 for a tumour suppressor whose loss may facilitate tumour progression. This model is also consistent with the fact that NQO1 attenuation fueled proinflammatory signalling and promoted androgen-independent prostate cancer cell survival (Thapa et al., 2014).

Last but not least, as prostate tumours feature extensive chromosomal instability, and patients with CaP tumours harbouring defective DSB repair have recently shown promising response to the emerging treatment with PARPi (Mateo et al., 2015), we wish to highlight our present results related to defects in DSB repair factors and aberrations relevant for cellular responses to PARPi, as candidate future predictive biomarkers. Highly relevant for CaP is also the fact that PARP1 enzymatic activity is required for AR-driven gene expression and ensuing CaP cell proliferation in the context of both hormone therapy-sensitive and CRPC models of disease (Schiewer and Knudsen, 2014). PARP1 also regulates the activity of ETS transcription factors in models of prostate cancer,

which is of clinical significance, given the high percentage of prostate tumours that harbor fusions that put ETS expression under the control of AR activity (as through the TMPRSS2–ERG fusion) (Brenner et al., 2011). As such, regulation of both AR and ETS transcription factors by PARP1 are now being exploited in a clinical trial combining PARPi and an AR-directed drug (abiraterone acetate) for patients with metastatic CRPC (NCT01576172). Among the factors reported to sensitize prostate cancer cells to PARPi is the most frequent oncogenic TMPRSS2-ERG rearrangement and loss of the PTEN tumour suppressor (Brenner et al., 2011; Mendes-Pereira et al., 2009). Here, we have confirmed the occurrence of these pathogenic events in sizeable subsets of CaP cases in our cohort (Figure 5C), and showed that at least in terms of PTEN loss, such aberrations may occur in a heterogeneous manner within a given lesion, likely reflecting clonal evolution of the advancing tumours. Notably, nuclear PTEN is important for chromosome stability maintenance, regulation of DNA replication and replication fork recovery (Shen et al., 2007; He et al., 2015).

In addition, we have identified subsets of CaP cases with various degrees of aberrantly reduced or lost expression of DNA repair factors 53BP1, JMJD1C and Rev7, none of which has been examined in CaP to date. The reason for analysing these three repair proteins is that we previously found their defects in cohorts of human triple-negative breast carcinomas (Bouwman et al., 2010; Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2015) and showed that their aberrant loss impacts the balance between the HR and NHEJ repair pathways, thereby causing resistance to PARPi in HR-defective tumours which are otherwise very sensitive to PARP inhibition. Our present work established that all 3 proteins show some focal defects in subsets of CaP cases, however a substantial loss of 53BP1 and JMJD1C was not observed, a feature different from more pronounced defects among triple negative breast cancers. This difference is in fact hopeful for responses to treatment with PARPi in prostate cancer patients, as the potential problem of treatment resistance caused by extensive loss of 53BP1 or JMJD1C is likely to be greater in breast cancer compared with CaP. On the other hand, we did find aberrant lack of Rev7 in large tumour areas in a small fraction of the tumours (Figure 5). Therefore, we suggest that aberrant reduction or loss of these factors, particularly of Rev7 might represent one of the hurdles for the new targeted therapy of CaP with PARP inhibitors. We furthermore note that tumours in our cohort were primary CaP lesions and by the time metastatic spread occurs, i.e. at the stage most relevant for PARPi treatment (Mateo et al., 2015) at least some of the secondary CaP clones may show more pronounced defects in the repair factors which show only patchy loss in the primary tumour. In addition, we suggest that also overexpression of cyclin D1 and loss of NKX3.1, which both occurred in our cohort and are frequent in CaP, should be considered as potential biomarkers of response to PARPi, as cyclin D1 promotes HR (Jirawatnotai et al., 2011; Bartek and Lukas, 2011) and NKX3.1 facilitates ATM signalling that is important for DNA repair (Bowen et al., 2013).

Taken together, our current study helps to elucidate the role of the genome integrity machinery and oxidative stress

in the patho-biology of CaP. In addition, given that the first PARPi called Lynparza (formerly olaparib) has recently been approved for clinical use (Kim et al., 2015), and also showed promise in treatment of a subset of castration-resistant metastatic CaP (Mateo et al., 2015), our present findings can be of value in future biomarker studies, especially related to targeted treatment with the PARP inhibitors.

Disclosure statement

Nothing to declare.

Acknowledgements

This work was supported by grants NT13573 from the Czech Ministry of Health, the Danish Cancer Society, the Danish Council for Independent Research (DFF-1331-00262B), the Danish National Research Foundation (Centre of Excellence: CARD), CancerFonden (grant 150733), the Swedish Research Council, NPU ILO1304 and RVO: 61989592 from the Czech Ministry of Education, Grant Agency of the Czech Republic 13-17555S, EU operation program CZ.1.07/2.3.00/30.0041, and the Kellner Family Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2016.02.005>.

REFERENCES

- Ahn, K.S., Sethi, G., Jain, A.K., Jaiswal, A.K., Aggarwal, B.B., 2006. Genetic deletion of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 abrogates activation of nuclear factor-kappaB, IkappaBalpha kinase, c-Jun N-terminal kinase, Akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 19798–19808.
- Anders, C.K., Winer, E.P., Ford, J.M., Dent, R., Silver, D.P., Sledge, G.W., Carey, L.A., 2010. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: “targeted” therapy for triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 4702–4710.
- Andriole, G.L., Crawford, E.D., Grubb, R.L., Buys, S.S., Chia, D., Church, T.R., Fouad, M.N., Isaacs, C., Kvale, P.A., Reding, D.J., Weissfeld, J.L., Yokochi, L.A., O’Brien, B., Ragard, L.R., Clapp, J.D., Rathmell, J.M., Riley, T.L., Hsing, A.W., Izmirlian, G., Pinsky, P.F., Kramer, B.S., Miller, A.B., Gohagan, J.K., Prorok, P.C., 2012. Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 125–132.
- Anwar, A., Dehn, D., Siegel, D., Kepa, J.K., Tang, L.J., Pietenpol, J.A., Ross, D., 2003. Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J. Biol. Chem.* 278, 10368–10373.
- Aparicio, A., Den, R.B., Knudsen, K.E., 2011. Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 8, 562–568.
- Asher, G., Lotem, J., Cohen, B., Sachs, L., Shaul, Y., 2001. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1188–1193.
- Bartek, J., Bartkova, J., Lukas, J., 1996. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 805–814.
- Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J., Lane, D.P., 1990. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5, 893–899.
- Bartek, J., Lukas, J., 2011. DNA repair: cyclin D1 multitasks. *Nature* 474, 171–172.
- Bartkova, J., Hamerlik, P., Stockhausen, M.T., Ehrmann, J., Hlobilkova, A., Laursen, H., Kalita, O., Kolar, Z., Poulsen, H.S., Broholm, H., Lukas, J., Bartek, J., 2010. Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene* 29, 5095–5102.
- Bartkova, J., Hoei-Hansen, C.E., Krizova, K., Hamerlik, P., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De, M.E., Bartek, J., 2014. Patterns of DNA damage response in intracranial germ cell tumors versus glioblastomas reflect cell of origin rather than brain environment: implications for the anti-tumor barrier concept and treatment. *Mol. Oncol.* 8, 1667–1678.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., Bartek, J., 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Sehested, M., Nesland, J.M., Rajpert-De, M.E., Skakkebaek, N.E., Stucki, M., Jackson, S., Lukas, J., Bartek, J., 2007. DNA damage response mediators MDC1 and 53BP1: constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours. *Oncogene* 26, 7414–7422.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J., Gorgoulis, V.G., 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633–637.
- Beyer, R.E., Segura-Aguilar, J., Di, B.S., Cavazzoni, M., Fato, R., Fiorentini, D., Galli, M.C., Setti, M., Landi, L., Lenaz, G., 1996. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2528–2532.
- Bouchal, J., Santer, F.R., Hoschele, P.P., Tomastikova, E., Neuwirt, H., Culig, Z., 2011. Transcriptional coactivators p300 and CBP stimulate estrogen receptor-beta signaling and regulate cellular events in prostate cancer. *Prostate* 71, 431–437.
- Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., Haffty, B.G., Tommiska, J., Blomqvist, C., Drapkin, R., Adams, D.J., Nevanlinna, H., Bartek, J., Tarsounas, M., Ganesan, S., Jonkers, J., 2010. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 688–695.
- Bowen, C., Ju, J.H., Lee, J.H., Paull, T.T., Gelmann, E.P., 2013. Functional activation of ATM by the prostate cancer suppressor NKX3.1. *Cell Rep.* 4, 516–529.
- Brenner, J.C., Ateeq, B., Li, Y., Yocum, A.K., Cao, Q., Asangani, I.A., Patel, S., Wang, X., Liang, H., Yu, J.,

- Palanisamy, N., Siddiqui, J., Yan, W., Cao, X., Mehra, R., Sabolch, A., Basrur, V., Lonigro, R.J., Yang, J., Tomlins, S.A., Maher, C.A., Elenitoba-Johnson, K.S., Hussain, M., Navone, N.M., Pienta, K.J., Varambally, S., Feng, F.Y., Chinnaiyan, A.M., 2011. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell* 19, 664–678.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G., d'Adda di, F.F., 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638–642.
- Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A.H., Scott, K.L., Signoretti, S., Bardeesy, N., Wang, Y.A., Hill, D.E., Golub, T.R., Stampfer, M.J., Wong, W.H., Loda, M., Mucci, L., Chin, L., DePinho, R.A., 2011. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470, 269–273.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P., 2010. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 116–123.
- Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I., Sesterhenn, I.A., 2004. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon.
- Ergen, H.A., Gormus, U., Narter, F., Zeybek, U., Bulgurcuoglu, S., Isbir, T., 2007. Investigation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism in prostate cancer. *Anticancer Res.* 27, 4107–4110.
- Evangelou, K., Bartkova, J., Kotsinas, A., Pateras, I.S., Liontos, M., Velimezi, G., Kosar, M., Liloglou, T., Trougakos, I.P., Dyrskjot, L., Andersen, C.L., Papaioannou, M., Drosos, Y., Papafotiou, G., Hodny, Z., Sosa-Pineda, B., Wu, X.R., Klinakis, A., Orntoft, T., Lukas, J., Bartek, J., Gorgoulis, V.G., 2013. The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 20, 1485–1497.
- Fagerholm, R., Hofstetter, B., Tammiska, J., Aaltonen, K., Vrtel, R., Syrjakoski, K., Kallioniemi, A., Kilpivaara, O., Mannermaa, A., Kosma, V.M., Uusitupa, M., Eskelinen, M., Kataja, V., Aittomaki, K., von, S.K., Heikkila, P., Lukas, J., Holli, K., Bartkova, J., Blomqvist, C., Bartek, J., Nevanlinna, H., 2008. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat. Genet.* 40, 844–853.
- Felgueiras, J., Silva, J.V., Fardilha, M., 2014. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 15, 16–42.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio Jr., R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., Halazonetis, T.D., 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907–913.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., Bartek, J., 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319, 1352–1355.
- He, J., Kang, X., Yin, Y., Chao, K.S.C., Shen, W.H., 2015. PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery. *Nat. Commun.* 6, 7620.
- Howat, W.J., Wilson, B.A., 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70, 12–19.
- Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D., Harris, A.L., 1990. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335, 675–679.
- Iskander, K., Gaikwad, A., Paquet, M., Long, D.J., Brayton, C., Barrios, R., Jaiswal, A.K., 2005. Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 65, 2054–2058.
- Jaamaa, S., Af Hallstrom, T.M., Sankila, A., Rantanen, V., Koistinen, H., Stenman, U.H., Zhang, Z., Yang, Z., De Marzo, A.M., Taari, K., Ruutu, M., Andersson, L.C., Laiho, M., 2010. DNA damage recognition via activated ATM and p53 pathway in nonproliferating human prostate tissue. *Cancer Res.* 70, 8630–8641.
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jirawatnotai, S., Hu, Y., Michowski, W., Elias, J.E., Becks, L., Bienvenu, F., Zagodzdzon, A., Goswami, T., Wang, Y.E., Clark, A.B., Kunkel, T.A., van, H.T., Xia, B., Correll, M., Quackenbush, J., Livingston, D.M., Gygi, S.P., Sicinski, P., 2011. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* 474, 230–234.
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kelsey, K.T., Ross, D., Traver, R.D., Christiani, D.C., Zuo, Z.F., Spitz, M.R., Wang, M., Xu, X., Lee, B.K., Schwartz, B.S., Wiencke, J.K., 1997. Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *Br. J. Cancer* 76, 852–854.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A.E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R., Chiu, H.J., Ricks, T.K., Palmby, T., Russell, A.M., Ladouceur, G., Pfuma, E., Li, H., Zhao, L., Liu, Q., Venugopal, R., Ibrahim, A., Pazdur, R., 2015. FDA approval summary: olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 4257–4261.
- Kolar, Z., Burdova, A., Jamaspishvili, T., Bouchal, J., Kucerovala, R., Bienova, M., Kral, M., Student, V., 2014. Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2beta expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer. *Neoplasma* 61, 9–16.
- Kosova, F., Temeltas, G., Ari, Z., Lekili, M., 2014. Possible relations between oxidative damage and apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer patients. *Tumour. Biol.* 35, 4295–4299.
- Long, D.J., Waikel, R.L., Wang, X.J., Perlaky, L., Roop, D.R., Jaiswal, A.K., 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 60, 5913–5915.
- Lord, C.J., Ashworth, A., 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287–294.
- Lukas, J., Lukas, C., Bartek, J., 2011. More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.
- Malins, D.C., Johnson, P.M., Wheeler, T.M., Barker, E.A., Polissar, N.L., Vinson, M.A., 2001. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 6025–6028.
- Mateo, J., Carreira, S., Sandhu, S., Miranda, S., Mossop, H., Perez-Lopez, R., Nava, R.D., Robinson, D., Omlin, A., Tunariu, N., Boysen, G., Porta, N., Flohr, P., Gillman, A., Figueiredo, I., Paulding, C., Seed, G., Jain, S., Ralph, C., Protheroe, A., Hussain, S., Jones, R., Elliott, T., McGovern, U., Bianchini, D., Goodall, J., Zafeiriou, Z., Williamson, C.T., Ferraldeschi, R., Riisnaes, R., Ebbs, B., Fowler, G., Roda, D., Yuan, W., Wu, Y.M., Cao, X., Brough, R., Pemberton, H., A'Hern, R., Swain, A., Kunju, L.P., Eeles, R., Attard, G., Lord, C.J., Ashworth, A., Rubin, M.A., Knudsen, K.E., Feng, F.Y., Chinnaiyan, A.M., Hall, E., de Bono, J.S., 2015. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 373, 1697–1708.

- Mendes-Pereira, A.M., Martin, S.A., Brough, R., McCarthy, A., Taylor, J.R., Kim, J.S., Waldman, T., Lord, C.J., Ashworth, A., 2009. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.* 1, 315–322.
- Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S., Eto, H., 2004. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *J. Urol.* 171, 1533–1536.
- Schiewer, M.J., Knudsen, K.E., 2014. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol. Cancer Res.* 12, 1069–1080.
- Schroder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Maattanen, L., Lilja, H., Denis, L.J., Recker, F., Paez, A., Bangma, C.H., Carlsson, S., Puliti, D., Villers, A., Rebillard, X., Hakama, M., Stenman, U.H., Kujala, P., Taari, K., Aus, G., Huber, A., van der Kwast, T.H., van Schaik, R.H., de Koning, H.J., Moss, S.M., Auvinen, A., 2014. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 384, 2027–2035.
- Sfanos, K.S., De Marzo, A.M., 2012. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 60, 199–215.
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., Yin, Y., 2007. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157–170.
- Shevde, L.A., Samant, R.S., 2014. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* 37, 131–141.
- Siegel, D., Anwar, A., Winski, S.L., Kepa, J.K., Zolman, K.L., Ross, D., 2001. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol. Pharmacol.* 59, 263–268.
- Siegel, D., Bolton, E.M., Burr, J.A., Liebler, D.C., Ross, D., 1997. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.* 52, 300–305.
- Siegel, D., Gustafson, D.L., Dehn, D.L., Han, J.Y., Boonchoong, P., Berliner, L.J., Ross, D., 2004. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* 65, 1238–1247.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A., 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 64, 9–29.
- Steinbrecher, A., Rohrmann, S., Timofeeva, M., Risch, A., Jansen, E., Linseisen, J., 2010. Dietary glucosinolate intake, polymorphisms in selected biotransformation enzymes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 135–143.
- Steiner, M., Hillenbrand, M., Borkowski, M., Seiter, H., Schuff-Werner, P., 1999. 609 C→T polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene in patients with prostatic adenocarcinoma or benign prostatic hyperplasia. *Cancer Lett.* 135, 67–71.
- Stoehr, C.G., Nolte, E., Wach, S., Wieland, W.F., Hofstaedter, F., Hartmann, A., Stoehr, R., 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) P187S polymorphism and prostate cancer risk in Caucasians. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10959–10969.
- Thapa, D., Meng, P., Bedolla, R.G., Reddick, R.L., Kumar, A.P., Ghosh, R., 2014. NQO1 suppresses NF-kappaB-p300 interaction to regulate inflammatory mediators associated with prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 74, 5644–5655.
- Tort, F., Bartkova, J., Sehested, M., Orntoft, T., Lukas, J., Bartek, J., 2006. Retinoblastoma pathway defects show differential ability to activate the constitutive DNA damage response in human tumorigenesis. *Cancer Res.* 66, 10258–10263.
- Watanabe, S., Watanabe, K., Akimov, V., Bartkova, J., Blagoev, B., Lukas, J., Bartek, J., 2013. JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1425–1433.
- Williams, J.L., Greer, P.A., Squire, J.A., 2014. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet.* 207, 474–488.
- Xu, G., Chapman, J.R., Brandsma, I., Yuan, J., Mistrik, M., Bouwman, P., Bartkova, J., Gogola, E., Warmerdam, D., Barazas, M., Jaspers, J.E., Watanabe, K., Pieterse, M., Kersbergen, A., Sol, W., Celie, P.H.N., Schouten, P.C., van den Broek, B., Salman, A., Nieuwland, M., de Rink, I., de Ronde, J., Jalink, K., Boulton, S.J., Chen, J., van Gent, D.C., Bartek, J., Jonkers, J., Borst, P., Rottenberg, S., 2015. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 521, 541–544.
- Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A., de Lange, T., 2013. 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* 339, 700–704.

Immunohistochemical localization and analysis of kallikrein-related peptidase 7 and 11 expression in paired cancer and benign foci in prostate cancer patients

T. JAMASPIHVILI¹, A. SCORILAS³, M. KRAL², I. KHOMERIKI³, D. KURFURSTOVA¹, Z. KOLAR¹, J. BOUCHAL¹

¹Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc 77515, Czech Republic, ² Department of Urology, University Hospital, Olomouc 77900, Czech Republic, e-mail: jan.bouchal@gmail.com, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Athens 15701, Greece

Received January 3, 2011

Kallikrein-related peptidases 7 and 11 (KLK7/KLK11) share a high degree of structural similarity with PSA (KLK3) and other KLKs. The aim of this study was to evaluate differences in KLK7/ KLK11 expression in paired cancer/benign prostate foci and to determine possible associations with clinicopathological parameters.

Seventy archived paraffin-embedded tissue samples obtained from radical prostatectomy were stained for KLK7, KLK11, PSA and PSMA and expression was evaluated semiquantitatively.

The results showed statistically significant differences for all studied proteins between BPH and CaP foci. Both KLK7 ($P=0.026$) and KLK11 ($P<0.001$) expressions were decreased in prostate cancer cells compared to normal/benign prostate cells. Positive correlations were found for both KLK7 ($R_s=0.74$, $P<0.001$) and KLK11 ($R_s=0.35$, $P=0.003$) between CaP and BPH. We found a statistically significant upregulation of KLK11 in advanced cases compared to localized ones ($P=0.026$).

For the first time, we report lower expression of KLK11 in CaP compared to BPH and slight upregulation of KLK11 in advanced tumors compared to localized ones. Our observations support the diagnostic potential of KLK7/KLK11 for early prostate cancers but further studies on larger cohorts are needed in order to validate the clinical value of these biomarkers and clarify their biological role in prostate development and tumorigenesis.

Key words: kallikrein-related peptidases, KLK7, KLK11, prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, immunohistochemical analysis.

Prostate cancer (CaP) is the second most frequently diagnosed cancer and the third most common cause of cancer-related deaths in men [1]. Determination of the prostate specific antigen (PSA) also known as kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) [2] has improved the detection and awareness of this malignancy. However, nonmalignant prostatic diseases, especially benign prostatic hyperplasia (BPH), acute prostatitis and prostate manipulations also cause serum PSA elevation, resulting in high false-positive rates of detection. This complicates the diagnosis of prostate cancer using PSA measurement alone [3]. Efforts have thus been made to increase the diagnostic specificity of PSA using concepts such as free to total PSA ratio (fPSA/tPSA), PSA velocity, PSA density and age specific PSA ranges [4]. Recently, the more accurate *phi* test (prostate health index) has emerged in clinical practice which is a combination of serum tPSA, % free PSA and p2PSA ([–2] proPSA isoform). *Phi* significantly increases the predictive

value and specificity for CaP detection as well as reduces the number of negative biopsies within the tPSA range of the 2.5–10 ng/ml, i.e. “grey zone” [5].

Kallikrein-related peptidases (KLK-genes, KLK-proteins) represent a subgroup of the serine protease family consisting of 15 members located at q13.4 of chromosome 19. KLKs are tandemly arranged from centromere (KLK1, KLK15, KLK3, KLK2) to telomere (KLK4–KLK14) and are mainly under steroid hormone regulation [6, 7, 8]. The majority of kallikrein-related peptidases do not exhibit tissue specificity and are co-expressed in various organs such as CNS, skin, breast and almost all salivary glands, as proven in RT-PCR studies [8]. Both centromeric and telomeric groups of KLKs are highly expressed in the prostate suggesting their potential as novel diagnostic/prognostic markers [9].

Human kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) was first found in the human stratum corneum where it plays a role

in desquamation processes. KLK7 is differentially expressed in ovarian and breast cancer and has been proposed as an unfavorable prognostic marker for these malignancies [10, 11]. A single study on KLK7 expression in CaP has shown its down-regulation at both mRNA (semiquantitative PCR) and protein level (western blot analysis, immunohistochemistry (IHC)) with a significant negative association to Gleason grade [12].

Human kallikrein-related peptidase 11 (KLK11), which was originally isolated from the human hippocampus, is under steroid hormone regulation and has three isoforms derived from alternative splicing: isoform 1 (brain-type), isoform 2 (prostate-type) and isoform 3 [13, 14]. The prostate-type variant is expressed only in the prostate while the brain-type can be detected in both brain and prostate [13]. High expression of *KLK11* mRNA and protein has been demonstrated in many normal tissues, including prostate, stomach, trachea, colon, brain, skin and salivary gland [6, 15]. KLK11 is a well-studied biomarker for ovarian cancer yielding high serum levels in 70% of cancer patients [15, 16]. Recent studies have shown that KLK11 serum levels are down-regulated and better discriminate CaP from BPH than total PSA, especially KLK11:total PSA ratio in combination with % free PSA (90% sensitivity, 51.5% specificity) (17). Overall, KLK11 seems to be a favorable prognostic marker for prostate cancer and could be used for discriminating BPH from CaP.

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a type II transmembrane glycoprotein playing a role in folic acid utilization and metabolism [18]. PSMA is highly expressed in normal prostate tissue [19] and it is negatively regulated by androgens (20). The expression increases in hPIN and is further enhanced in advanced, poorly-differentiated tumors, especially in androgen-independent prostate cancer [19, 20, 21].

The aim of this study was to analyze IHC expression of KLK7/KLK11, in parallel with well-known markers PSA and PSMA, in non-cancerous (normal/BPH) and cancerous foci and to determine any association with clinicopathological parameters.

Materials and methods

Patient and tissue specimen selection. Seventy cases of prostate cancer were identified as clinically localized (T1-T2, n=39) or locally advanced (T3-4, N0-1, M0, n=31). The study included patients who had not received neoadjuvant treatment but who had undergone radical prostatectomy (RP) as initial treatment following positive biopsy results. The study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty of Palacky University. Clinical (TNM, clinical stage, serum total PSA) and pathologic (pT, Gleason score and grade, pN) characteristics were defined according to the WHO classification (Table 1). Paired CaP and BPH foci were identified in each patient and tissue sections from these were then used for further IHC analysis.

Table 1. Clinical and pathologic characteristics of patients

		Localized tumors (n)*	Advanced tumors (n)*
Age	51-59	15	8
	60-69	26	15
	70-73	1	5
Gleason Score	<7	21	8
	≥ 7	18	23
Clinical Stage	II	39	0
	III	0	25
	IV	0	6
Serum PSA	<4 ng/ml	8	3
	<8 ng/ml	14	10
	≥8 ng/ml	17	18

* Localized cases defined as pT1-pT2, advanced pT3-pT4

Immunohistochemistry. IHC was performed according to our routine protocol. 70 archived paraffin-embedded tissues were dewaxed and rehydrated with xylene and ethanol. After immersion in citrate buffer (pH 6), the sections underwent pressure cooking pretreatment for 5 minutes for optimal antigen retrieval. The slides were immunostained for KLK7 and KLK11 by rabbit polyclonal primary antibodies (Abs) provided by Prof. Diamandis Lab "Mount Sinai" hospital, Toronto, Canada (dilution 1:200). PSA (clone ER-PR8, Dako, Denmark, dilution 1:25) and PSMA (clone YPSMA-1, Abcam, UK, dilution 1:1000) were stained by mouse monoclonal Abs and the secondary antibodies were applied for 60 minutes at room temperature. Specific binding was detected using the peroxidase/DAB based detection kit EnVision, Dako. Staining intensity, positive cell fraction, staining heterogeneity and cellular localization were determined for all four genes in both BPH and CaP foci for each patient. Positivity was classified according to the percentage of all positively stained tumor cells and the intensity of the IHC staining was categorized 0 to 2 as: 0 no staining, 0.5-very low, 1-moderate, 1.5-high and 2 strong positive staining. Staining intensity was then divided into a 3 grade scoring system, indicating 0-0.5 as no staining, 1-low, 1.5-moderate and 2 high staining, respectively. Histoscores were also derived for further statistical analysis (staining intensity x percentage of cells). Intracellular localization of the staining was determined and patterns of apical surface, cell membrane or cytoplasmic staining were documented.

Statistical analysis. The software Statistica 8.0 version for windows (Statsoft, CZ) was used for statistical analysis. As the distribution of variables was non Gaussian, the analysis of differences in protein expression between CaP and BPH was done using the nonparametric Wilcoxon Signed Ranks Test. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by ranks was used to test the equality of population means between low and high grade CaP (Gleason score <7 vs. ≥ 7), in organ-confined and advanced prostate cancers (pT2 vs. ≥ pT3, pT4)

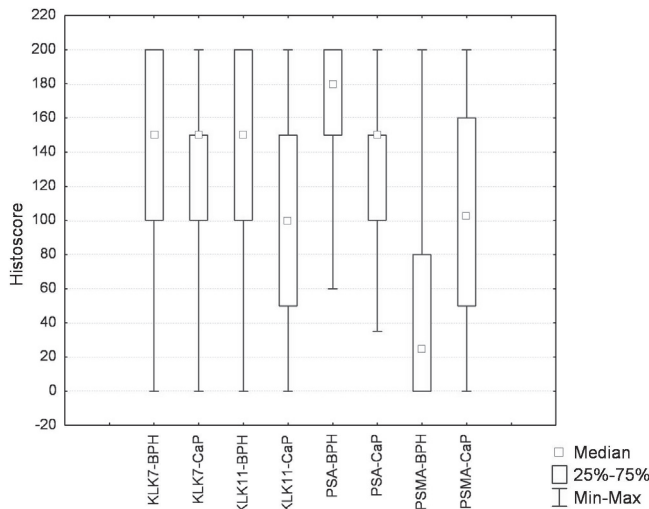


Figure 1. Differences in expression of selected proteins between BPH and CaP.

and in different clinical stages (II, III, IV). The correlation between different variables was assessed by the Spearman Rank correlation coefficient. $P < 0.05$ was chosen as the level of significance.

Results

Staining was always cytoplasmic for both KLK7 and KLK11. Noteworthy was the positive staining of tumor neovasculture and muscle cells with both anti- KLK7 and anti- KLK11 Abs in some cases. Prostatic secretions were always strongly positive for KLK7/11. We also observed positive staining of urothelium

and seminal vesicle epithelium for KLK7. The majority of CaP foci showed decreased expression of both KLK7 and KLK11 against BPH per section per patient ($P=0.026$ and $P=0.001$, respectively) (Figure 1), though expression heterogeneity was quite common, especially for KLK7 (Figure 2). Positive correlations were found for both KLK7 ($R_s=0.74$) and KLK11 ($R_s=0.35$) between CaP and BPH foci (Table 2). Moreover, a statistically significant correlation was found between KLK7 and KLK11 ($R_s=0.242$, $P=0.043$) for the BPH foci. This correlation did not seem to arise in the CaP foci. In addition, there was no significant correlation or significant differences in the staining intensity or percentage of cells stained between a Gleason score of <7 and ≥ 7 in prostate carcinoma, between pT2 and pT3-pT4 tumors and serum PSA values. However, we found a slight difference in KLK11 expression between advanced and localized cases with up-regulation in advanced ones ($P=0.049$).

We observed positive staining of both non-cancerous and cancerous foci with anti-PSA Abs which was cytoplasmic with apical accentuation. Prostatic secretions were strongly positive in almost all cases. Staining intensity was greater in BPH than prostate carcinoma ($P < 0.001$) with a trend to further decrease in less differentiated cancers ($P=0.077$, Figure 3). PSA expression did not correlate significantly with other proteins or clinicopathological data.

We also detected high PSMA expression at the luminal-apical surface of glandular structures and in the neovasculture associated with cancer. Strong positive staining was also seen in some muscle cells and prostatic secretions. Cancer cells showed intense, significantly higher expression than normal/BPH glands (Figures 2 and 3), though cells lacking PSMA staining could also be identified close to the most intensively stained tumor cells indicating staining heterogeneity of tumor cells.

Table 2. Spearman's correlation coefficient (R_s) for biomarker expressions in BPH and CaP

		BPH				CaP			
		KLK7	KLK11	PSA	PSMA	KLK11	KLK7	PSA	PSMA
KLK7-BPH	R_s	1.000	.242	-.224	.125	.094	.738	-.082	.107
	P	.	.043	.062	.304	.437	.000	.502	.378
KLK11-BPH	R_s		1.000	.039	-.117	.348	.202	-.126	-.080
	P		.	.751	.335	.003	.093	.300	.512
PSA-BPH	R_s			1.000	-.040	.068	-.140	.130	.118
	P			.	.740	.579	.247	.282	.331
PSMA-BPH	R_s				1.000	.071	.168	.036	.240
	P				.	.562	.165	.764	.046
KLK11-CaP	R_s					1.000	.155	-.107	-.020
	P					.	.200	.377	.872
KLK7-CaP	R_s						1.000	-.226	.144
	P						.	.060	.235
PSA-CaP	R_s							1.000	-.024
	P							.	.842
PSMA-CaP	R_s								1.000
	P								.

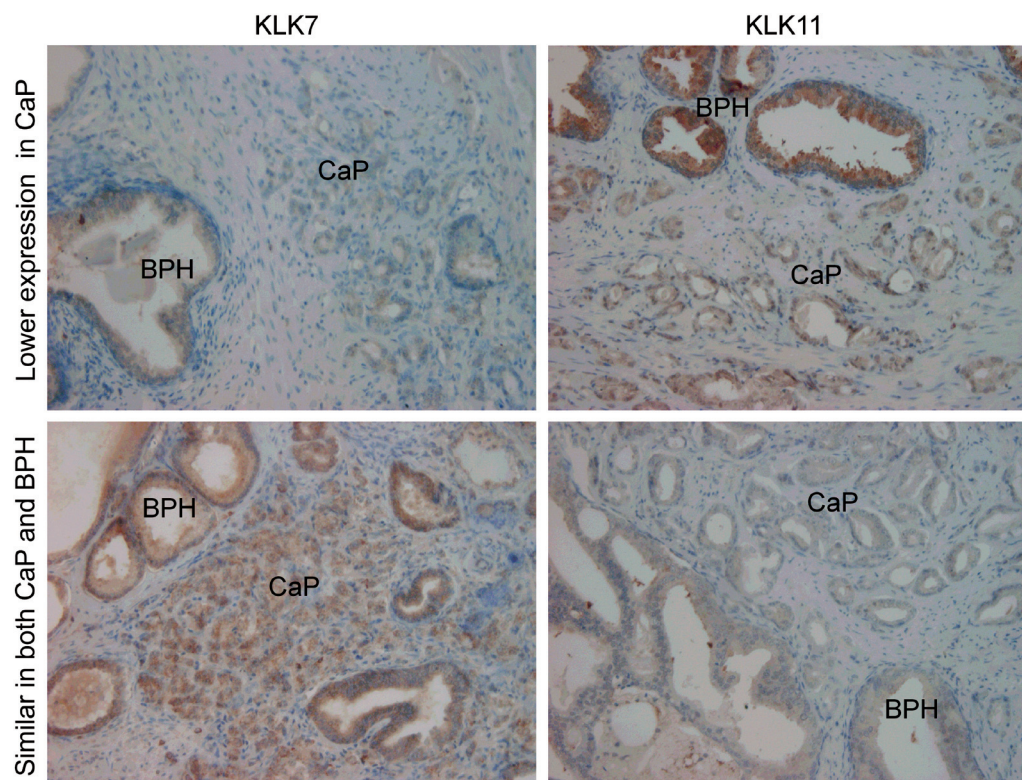


Figure 2. Heterogeneity of KLK7/11 expression in BPH and CaP.

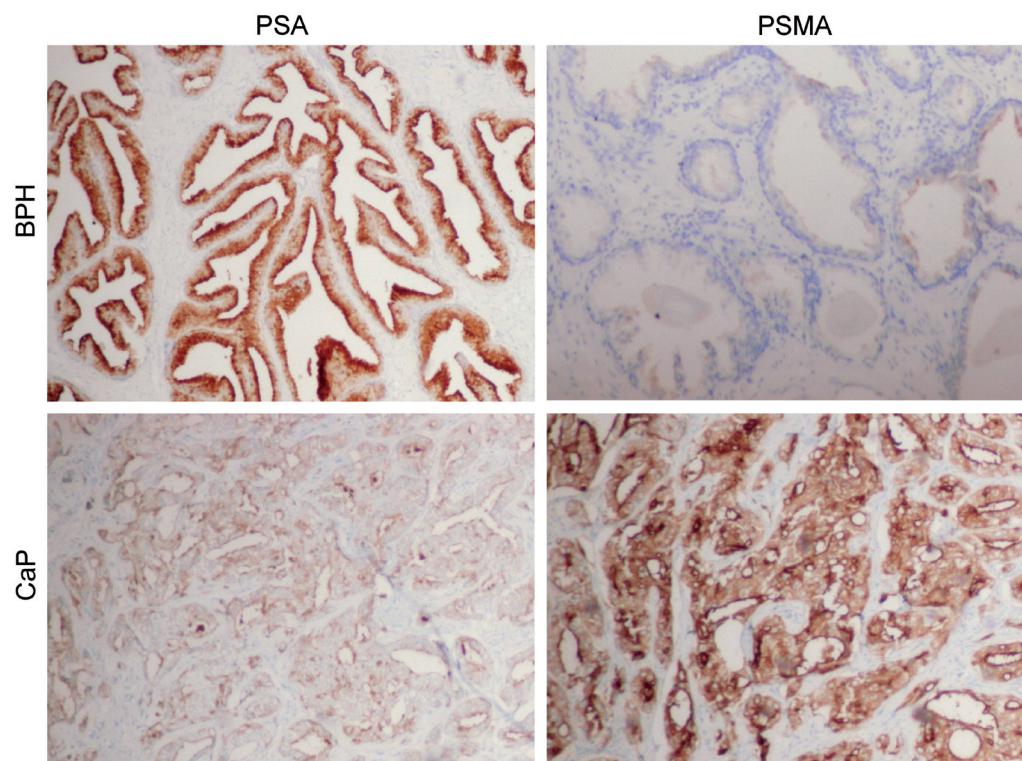


Figure 3. Expression of PSA and PSMA in BPH and CaP.

We also found a trend to increased PSMA expression in less differentiated cancer cells in relation to Gleason score (<7 vs. ≥ 7 ; $P=0.114$) and pT stage (pT2 vs. pT3-pT4; $P=0.083$).

Discussion

Our study focused on evaluation of KLK7 and KLK11 tissue expression along with PSA and PSMA. So far, KLK7 expression in prostate cancer has only been evaluated in a single study along with ALP (antileukoprotease) as a specific inhibitor of KLK7 (12). Both KLK7 and ALP have been shown to be down-regulated at mRNA and protein level, assessed by semi-quantitative PCR, western blot analysis and IHC. Significant negative association was found between Gleason grade and both KLK7 and ALP expression. In concordance with this study we confirmed down-regulation of KLK7 in malignant prostate epithelial cells compared to benign/normal prostate epithelial cells. We also observed positive staining of tumor neovasculature, some muscle cells, urothelium and seminal vesicle epithelium.

For the first time, we report down-regulation of KLK11 protein at tissue level. This is consistent with the serum levels reported by Nakamura et al (17). These authors evaluated different patients while we confirmed KLK11 down-regulation in the paired tissues of BPH and prostate carcinoma in the same patients. Expression differences for CaP and BPH foci were more significant for KLK11 than for KLK7. In other words, more heterogeneity was found for KLK7 than for KLK11. This could be related to their different regulation. Interestingly, *KLK11* mRNA expression in prostate cancer does not correspond with its protein levels. Such discordance has also been reported for other genes, for example in breast cancer, indicating complex regulation of protein expression (22). *KLK11* mRNA expression has been detected in both normal and cancerous prostate tissue but with significant up-regulation in cancer (14). Up-regulation of prostate-type *KLK11* was significantly associated with earlier stage, lower Gleason score and lower tumor grade but expression was again lowered with tumor progression (advanced stage, less-differentiated CaP) as confirmed by qRT-PCR analysis (23, 24). Also noteworthy was the inverse association between serum total PSA and *KLK11* mRNA overexpression, i.e. serum total PSA concentration was found to be lower in patients with overexpression of *KLK11* (25). No correlation or significant differences in relation to Gleason score, tumor grade, pT stage or serum PSA values were found. We observed slight up-regulation of KLK11 in advanced cases compared to localized cancers. However, this needs further validation by larger studies.

We confirmed decreased PSA expression in CaP compared to BPH. The trend to decreased PSA expression was also found in less differentiated cancers which is also in agreement with other IHC studies (26, 27). PSMA expression in cancer was the reverse of its PSA expression, i.e. PSMA expression was up-regulated in CaP vs BPH, in concordance with other IHC studies (19, 21). No statistically significant correlation with

either Gleason score, tumor stage or PSA/PSMA expression was found. However, we detected high PSMA expression in the cancer-associated neovasculature, in some muscle cells and in prostatic secretions as reported in other studies [18, 19].

In conclusion, we report lower IHC expression of KLK11 in CaP tissue compared to normal/benign prostate tissue and also slight up-regulation of KLK11 in advanced tumors compared to localized ones. In concordance with the literature, we confirm both higher expression of PSMA, lower expression of KLK7 and PSA in CaP compared to BPH. Our observations support the diagnostic potential of KLK7/KLK11 for early prostate cancers but further studies on larger cohorts are needed in order to validate the clinical value of these biomarkers and clarify their biological role in prostate development and tumorigenesis.

Acknowledgements. This work was supported by grants NS 9940-4 from the Czech Ministry of Health, MSM 6198959216 from the Czech Ministry of Education and EU infrastructure support CZ.1.05/2.1.00/01.0030. This work was also supported by a Greek-Czech joint research and technology grant (EPAN.M.4.3.6.1) co-funded by the European Regional Development Fund (70%) and National Resources (30%) – Ministry of Development – General Secretariat for Research & Technology of Greece. Tamar Jamaspishvili was also supported by GACR 303/09/H048 and LF_2010_006.

References

- [1] J. DAMBER, G. AUS. Prostate cancer. *Lancet* 2008; 371: 1710–21. doi:10.1016/S0140-6736(08)60729-1
- [2] E.P. DIAMANDIS, G.M. YOUSEF, J. CLEMENTS, L.K. ASHWORTH, S. YOSHIDA et al. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin Chem* 2000; 46: 1855–8.
- [3] S.J. FREEDLAND, A.W. PARTIN. Prostate-specific antigen: update 2006. *Urology* 2006; 67: 458–60. doi:10.1016/j.urology.2005.12.026
- [4] S.F. SHARIAT, J.A. KARAM, V. MARGULIS, P.I. KARAKIEWICZ. New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU Int* 2008; 101: 675–83. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07283.x
- [5] F.H. JANSEN, R.H. VAN SCHALK, J. KURSTJENS, W. HORNINGER, H. KLOCKER et al. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA in Combination with Total PSA and Free PSA Improves Diagnostic Accuracy in Prostate Cancer Detection. *Eur Urol* 2010; (Epub ahead of print). doi:10.1016/j.eururo.2010.02.003
- [6] G.M. YOUSEF, E.P. Diamandis. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001; 22: 184–204. doi:10.1210/er.22.2.184
- [7] E.P. DIAMANDIS, A. OKUI, S. MITSUI, L.Y. LUO, A. SOOSAI-PILLAI, L et al. Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 295–300.
- [8] C.V. OBIEZU, E.P. DIAMANDIS. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* 2005; 224: 1–22.

- [9] G.M. YOUSEF, C.V. OBIEZU, L.Y. LUO, A. MAGKLARA, C.A. BORGONO et al. Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem* 2005; 39: 11–79. [doi:10.1016/S0065-2423\(04\)39002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(04)39002-5)
- [10] S.J. SHAN, A. SCORILAS, D. KATSAROS, I. RIGAULTT DE LA LONGRAIS, M. MASSOBRIO et al. Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. *Clin Chem* 2006; 52: 1879–86. [doi:10.1373/clinchem.2006.071456](https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.071456)
- [11] X. LI, J. LIU, Y. WANG, L. ZHANG, L. NING et al. Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci* 2009; 100: 601–7. [doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01090.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01090.x)
- [12] Q. XUAN, X. YANG, L. MO, F. HUANG, Y. PANG et al. Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1796–801.
- [13] T. NAKAMURA, S. MITSUI, A. OKUI, K. KOMINAMI, T. NOMOTO et al. Alternative splicing isoforms of hippostasin (PRSS20/KLK11) in prostate cancer cell lines. *Prostate* 2001; 49: 72–8. [doi:10.1002/pros.1119](https://doi.org/10.1002/pros.1119)
- [14] T. NAKAMURA, S. MITSUI, A. OKUI, T. MIKI, N. YAMAGUCHI. Molecular cloning and expression of a variant form of hippostasin/KLK11 in prostate. *Prostate* 2003; 54: 299–305. [doi:10.1002/pros.10191](https://doi.org/10.1002/pros.10191)
- [15] E.P. DIAMANDIS, G.M. YOUSEF. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002; 48: 1198–205.
- [16] A. SCORILAS, A.K. GREGORAKIS mRNA expression analysis of human kallikrein 11 (KLK11) may be useful in the discrimination of benign prostatic hyperplasia from prostate cancer after needle prostate biopsy. *Biol Chem* 2006; 387: 789–93. [doi:10.1515/BC.2006.099](https://doi.org/10.1515/BC.2006.099)
- [17] T. NAKAMURA, A. SCORILAS, C. STEPHAN, K. JUNG, A.R. Soosaipillai et al. The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res* 2003; 63: 6543–6.
- [18] S.S. CHAMG. Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev Urol* 2004; 6 Suppl 10 S13–8.
- [19] P. MHAWECH-FAUCEGLIA, S. ZHANG, L. TERRACCIANO, G. SAUTER, A. CHADHURI et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* 2007; 50: 472–83. [doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02635.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02635.x)
- [20] G.P. MURPHY, A.A. ELGAMAL, S.L. SU, D.G. BOSTWICK, E.H. Holmes Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. *Cancer* 1998; 83: 2259–69. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19981201\)83:11<2259::AID-CNCR5>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19981201)83:11<2259::AID-CNCR5>3.0.CO;2-T)
- [21] S. PERNER, M.D. HOFER, R. KIM, R.B. SHAH, H. LI et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 2007; 38: 696–701. [doi:10.1016/j.humpath.2006.11.012](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.11.012)
- [22] S. TROUP, C. NJUE, E.V. KLIEWER, M. PARISIEN, C. ROSKELLEY et al. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 207–14.
- [23] T. NAKAMURA, C. STEPHAN, A. SCORILAS, G.M. YOUSEF, K. JUNG et al. Quantitative analysis of hippostasin/KLK11 gene expression in cancerous and noncancerous prostatic tissues. *Urology* 2003; 61: 1042–6. [doi:10.1016/S0090-4295\(02\)02443-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(02)02443-3)
- [24] X. BI, H. HE, Y. YE, Q. DAI, Z. HAN et al. Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer. *Med Oncol* 2010; 27: 145–51. [doi:10.1007/s12032-009-9185-0](https://doi.org/10.1007/s12032-009-9185-0)
- [25] P. STAVROPOULOU, A.K. GREGORAKIS, M. PLEBANI, A. SCORILAS. Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 357: 190–5. [doi:10.1016/j.cccn.2005.03.026](https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.03.026)
- [26] E.G. WEIR, A.W. PARTIN, J.I. EPSTEIN Correlation of serum prostate specific antigen and quantitative immunohistochemistry. *J Urol* 2000; 163: 1739–42. [doi:10.1016/S0022-5347\(05\)67532-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67532-5)
- [27] A. ERBERSDOBLER, H. ISBARN, I. STEINER, T. SCHLOMM, F. CHUN et al. Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 2009; 74: 1169–73. [doi:10.1016/j.urology.2009.02.061](https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.02.061)

Adenokarcinom prostaty a hodnocení stupně jeho diferenciaci: změny v hodnocení Gleasonova skóre od jeho vzniku po současnost a jeho význam pro praxi patologa a urologa

MUDr. Daniela Kurfürstová¹, MUDr. Milan Král, Ph.D.²

¹Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

²Urologická klinika FN Olomouc

Karcinom prostaty je u nás nejčastějším nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním mužů. Ze strany patologů a urologů je vyvíjena maximální snaha o co nejpresnější diagnostiku a nejlepší možnou léčbu pacientů postižených tímto nádorovým onemocněním. V důsledku toho byla původní klasifikace diferenciaci acinárního adenokarcinomu prostaty navržena profesorem Gleasonem a jeho spolupracovníky několikrát modifikována. Výrazné změny v hodnocení, zejména tkáně prostaty získané punkční biopsií, byly dohodnuty v roce 2005 v rámci uropatologického kongresu v San Antoniu (ISUP 2005). V průběhu následujících let bylo publikováno několik recentních prací zabývajících se přínosem těchto změn v praxi. Jejich výsledky ukazují výrazné zpřesnění hodnocení bioptických vyšetření prostaty a mnohem vyšší míru shody Gleasonova skóre u histologických vyšetření punkcí prostaty a Gleasonova skóre u tkáně získané radikální prostatektomií.

Klíčová slova: adenokarcinom prostaty, Gleasonovo skóre, biopsie prostaty, radikální prostatektomie, konsenzus.

Prostate adenocarcinoma and assessing the degree of its differentiation: changes in Gleason score grading from its development until now and its significance in pathology and urology practices.

Prostate cancer is the most frequent newly diagnosed cancer in males in the Czech Republic. Pathologists and urologists put maximum effort into as accurate diagnosis and good treatment of patients affected by this type of cancer as possible. As a result, the original system for grading acinar adenocarcinoma of the prostate proposed by Gleason and co-workers has been modified several times. Significant changes in evaluation of tissue samples, especially those obtained by needle biopsy, were agreed at the 2005 urological pathology conference in San Antonio (ISUP 2005). Over the next years, several studies on the benefit of the changes for clinical practice have been published. Their results showed significantly more accurate results of prostate needle biopsy evaluation and much higher levels of agreement in the Gleason score in tissue samples obtained by prostate needle biopsy and radical prostatectomy.

Key words: prostate adenocarcinoma, Gleason score, prostate needle biopsy, radical prostatectomy, consensus.

Urol. praxi, 2013; 14(4): 157–159

Úvod

Karcinom prostaty (PC) je u nás nejčastějším nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním mužů. Incidence u nás dosáhla v roce 2010 131/100,000 a mortalita 28,38/100,000 (1). Postihuje převážně starší muže ve věku 65 let a více, ale může se vyskytnout i v mladším věku a výjimečně i u adolescentů a dětí (2, 3, 4). Karcinom prostaty ve většině případů postihuje periferní partie prostaty, zejména dorzolaterálně. Velmi často vzniká multifokálně, a to až ve více než 85 % případů (2).

Pro urologickou praxi a diagnostiku tohoto nádoru, zejména v časných stadiích onemocnění, je důležité vyšetření per rektum, sonografické vyšetření a na prvním místě hladina prostatického specifického antigenu (PSA) v krevním séru. Dříve byly považovány hodnoty PSA nižší než 4 ng/ml za normální. Výsledky prací hodnotících prevalenci karcinomu u pacientů s PSA ≤ 4 ng/ml poukázaly na fakt, že i při těchto

hladinách PSA může být karcinom přítomen, a to dokonce i níže diferencovaný. V současné době je tak situace s PSA mnohem složitější – normální hladina PSA se liší u různých věkových skupin (tzv. věkově specifické PSA) a u mladších pacientů je tedy medián normy mnohem nižší. Například pro věkovou hranici do 49 let je to 0,7 ng/ml, u pacientů do 59 let hodnota 0,9 atd. (5, 6, 7). Hladina PSA může být zvýšená u zánětů, infarktu prostaty či traumatického postižení. V praxi platí, že pokud nalezneme i při opakovaném vyšetření hladinu PSA v rozmezí 2,6–4,0 ng/ml (a vyšší) nebo je suspektní rektální nález při palpačním vyšetření prostaty či transrektální sonografii (TRUS), je nutné zvažovat biopsii prostaty (8, 9, 10). Odebírají se tenké proužky tkáně, a to vějířovitě z obou laloků, apexu a báze v celkovém počtu 10 až 14 proužků podle velikosti prostaty pod TRUS kontrolou. Jednak se pátrá po ložiscích v prostatě a tato ložiska jsou cíleně bioptována, nebo je

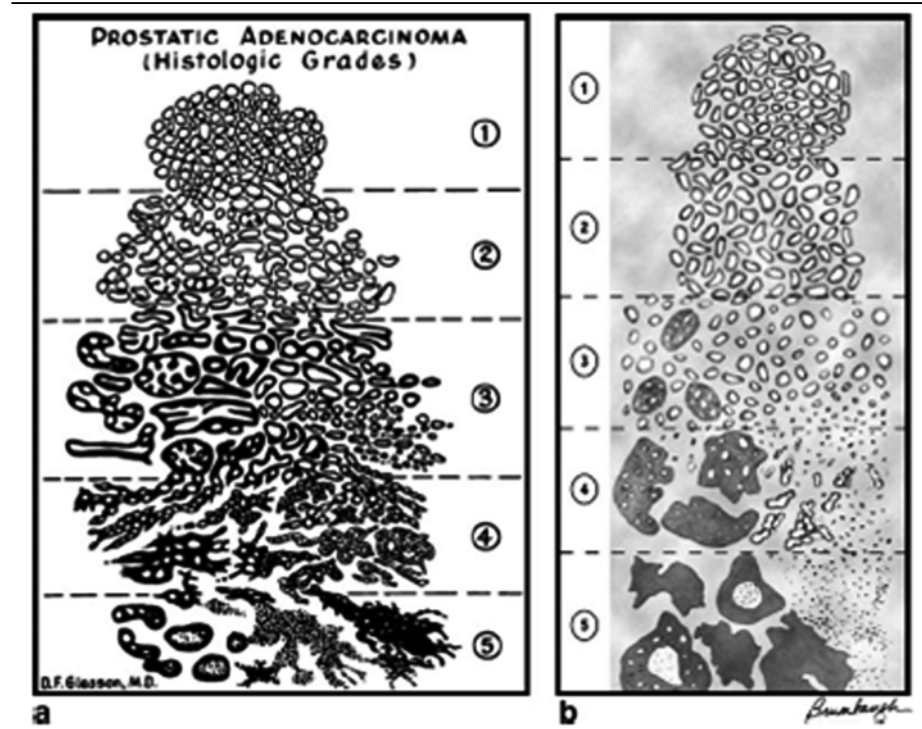
prováděna systematická biopsie. Vzorky jsou následně histologicky vyšetřeny.

Makroskopický a histologický vzhled PC

Makroskopicky je PC velmi těžko odlišitelný od hyperplastických změn v prostatické tkáni. Někdy je patrný zejména v periferních oblastech jako tužší, solidní bílošedé, někdy žluté ložisko. Nicméně až je tento jeho makroskopický vzhled popisován v mnoha učebnicích a monografiích týkajících se prostaty jako běžný, v praxi není pravidlem a většinou není na řezu formaldehydem fixovanou prostatou okem rozlišitelný od benigních změn (2, 4). Nekrózy a hemoragie nejsou v tumoru časté.

Histologicky se jedná převážně o acinární adenokarcinom, pro který je typická přítomnost pouze jedné vrstvy buněk a chybění buněk bazálních. Nádorové buňky mohou být, zejména u dobře diferencovaného karcinomu, poměrně

Obrázek 1. Schéma konvenčního (a) a modifikovaného (b) Gleasonova systému. K nejvýznamnějším změnám došlo v Gleasonově obraze 3 a 4. V modifikovaném systému jsou zahrnuty křibiformní žlázy a špatně ohraničené žlázy v Gleasonově obraze 4 (převzato z Helpap, Egevad, 2006)



uniformní a jsou velmi těžko rozlišitelné od benigních žlázek. Někdy vykazují nádorové buňky mírnou jadernou pleomorfii, přítomná mohou být jádra hyperchromní, někdy ale také vezikulární s nápadnými jádřky. Často bývají také patrná větší jádra, někdy se zřetelnými nukleoly, v některých případech může být patrné „odkapávání“ cytoplazmy připomínající apokrinní sekreci (2, 3, 11). Adenokarcinom se vyskytuje v několika histologických formách. Při mikroskopickém vyšetření tkáně prostaty se můžeme setkat s formou atrofickou, pseudohyperplastickou, pěnovou (foamy gland carcinoma), koloidní a formou tvořenou prstenčovitými buňkami, onkocytární, lymphoepithelioma-like variantou a formou sarkomatoidní (2, 11).

Grading karcinomu

Stupeň diferenciace PC se hodnotí stanovením Gleasonova skóre. V roce 1966 Donald F. Gleason popsal systém pro „grading“ adenokarcinomu prostaty na základě studie 270 pacientů. Tento systém byl založen na popisu architektury, vzhledu a velikosti nádorových žlázek adenokarcinomu a rozlišoval 5 obrazů (12). Sám Gleason a jeho spolupracovníci v roce 1974 systém na základě dalších studií a výzkumu upravili (13). Další modifikaci tohoto systému provedl také Gleason společně se svými kolegy v roce 1977 (14). V této podobě byl systém používán téměř 40 let a stal se nejpoužívanějším při hodnocení diferenciace adenokarcinomu prostaty. V době, kdy Gleason a jeho tým sestavoval tento sys-

tém, nebyly v běžné praxi používány vyšetření PSA, multiplikovaná biopsie prostaty nebo např. imunohistochemické barvení bazálních buněk prostaty protilátkou proti vysokomolekulárním cytokeratinům. Zejména metody molekulární patologie umožnily přesnější diagnostiku a staly se nezbytnou součástí vyšetřovacího algoritmu. Např. velká část z obrazů dříve hodnocených jako Gleasonův typ 1 a 2 je dnes hodnocena jako atypická adenomatózní hyperplazie (adenóza), křibiformní struktury zahrnuté do Gleasonova typu 3 dnes hodnotíme také daleko přísněji (15, 16). V roce 2005 v San Antoniu (ISUP 2005) na mezinárodní uropatologické konferenci byl Gleasonův systém opět modifikován (obrázek 1) a byl přijat konsenzus týkající se převážně sporných oblastí Gleasonova gradingového systému. Výsledky byly prezentovány v září téhož roku v časopise The American Journal of Surgical Pathology (15).

Největší změny se týkaly především hodnocení jehlových biopsií prostaty a tkání získaných transuretrální resekci prostaty, neboť se zkušeností všech uropatologů prokázalo, že bývají často podhodnocovány, což v některých případech vede k nedostatečné léčbě pacientů s PC. Z konsenzu vzešla závazná kritéria pro hodnocení stupně diferenciace PC, která byla záhy uvedena do praxe (15).

Z výsledků konference vyplynulo několik závažných změn:

- Gleasonovo skóre 2 (tj. 1 + 1) by nemělo být diagnostikováno z punkční biopsie ani

při vyšetření tkáně prostaty po radikální prostatektomii, až na velmi výjimečné případy, protože jde většinou o adenózu čili atypickou adenomatózní hyperplazii.

- Gleasonovo skóre 3–4 (tj. 1 + 2 a 2 + 2) – by nemělo být výsledkem hodnocení punkční biopsie prostaty, neboť tato vzácná léze je ohraničená, což z punkce, vzhledem k tomu, že bývá zastižena pouze její část, nelze posoudit. Gleasonovo skóre 2 + 2 můžeme výjimečně diagnostikovat v materiálu z transuretrální resekce prostaty (TURP).
- PC diagnostikovaný z biopsie odebraných punkčních proužků tkáně prostaty by měl mít GS minimálně 6 (tj. 3 + 3).
- Gleasonovo skóre je dáno součtem nejčastějšího Gleasonova obrazu a nejhoršího obrazu PC. Tímto se tvorba GS u PC u punkcí liší od GS PC v tkáni získané radikální prostatektomií, kde se tvoří podle zásady: nejčastější struktura + druhá nejčastější struktura. Terciární struktury Gleason vyšší (tj. 4 a 5) v malém procentu – uvedeme procentuální zastoupení.

Důsledky ISUP 2005

Závěry z konference v San Antoniu (ISUP 2005) nás a kolegy z Urologické kliniky FN Olomouc vedly k myšlence porovnat míru shody Gleasonova skóre mezi vzorky tkáně získanými jehlovou biopsií, popřípadě transuretrální resekci prostaty se vzorky definitivními, získanými po radikální prostatektomii (RP) a hodnocenými jak podle konvenčního postupu doporučeného WHO (tj. před rokem 2005), tak podle nového konsenzu. Výsledky byly publikovány v roce 2007 v Urologii pro praxi (17). Z nich bylo patrné, že procentuální shoda Gleasonova skóre karcinomu prostaty v biopsickém vyšetření materiálu získaného jehlovou biopsií, popřípadě transuretrální resekci prostaty s tkání prostaty po následné RP hodnocené konvenčním způsobem byla 34,6 %, zatímco u modifikovaného systému to bylo už 59,7 %. Podhodnoceno bylo poměrně mnoho případů, tj. 62,2 % při hodnocení konvenční metodou, na rozdíl od 28,3 % u nové modifikace po konsenzu, která ale naopak vykazovala vyšší počet nadhodnocených vyšetření (11,9 %) (17). V roce 2006 vyšla v časopise Virchows Archiv práce srovnávající také míru shody modifikovaného Gleasonova skóre u punkčních biopsií a definitivních vzorků z radikální prostatektomie (14). V roce 2008 a 2009 byly publikovány další práce zabývající se mírou shody výsledků histologického vyšetření punkčních biopsií a vyšetření tkáně prostaty po totální

prostatektomii (18, 19). Zde se objevilo i srovnání s mírou shody u biopsií provedených před konsenzem v roce 2005. Autoři uvedli, že míra shody obou vyšetření před rokem 2005 byla v rozmezí 28–68 %, což bylo způsobeno převážně podhodnocováním low-grade tumorů. Vyšší míra shody byla u high-grade tumorů. Punkční biopsie byly ve 24–60 % podhodnoceny a v 5–32 % nadhodnoceny (18, 21, 22). Další studie ukázala, že míra shody punkčních biopsií s histologickým vyšetřením prostaty po totální prostatektomii vzrostla po zavedení konsenzu ISUP 2005 do praxe a dosáhla rozmezí 58–76 % (19, 22). To jsou výsledky srovnatelné s již zmiňovanými výsledky naší práce (17). Z výsledků je u punkčních biopsií prostaty patrný výrazný posun k přesnějšímu hodnocení diferenciaci PC. Nicméně nejen patologové, ale i klinici musí mít na paměti, že je velmi obtížné porovnávat pacienty s PC v průběhu času vzhledem ke změnám v hodnocení jednotlivých obrazů PC. Například karcinomy hodnocené jako GS 6 v současné době jsou homogenní skupinou nádorů s lepší prognózou než u GS 6 před konsenzem v roce 2005. Může se tak falešně zdát, že se zlepšila míra přežití pacientů. Tento jev, kdy nedošlo ke zlepšení míry přežití, ale ke změně v klasifikaci, byl nazván Will Rogersův fenomén (20).

Závěr

Z výsledků několika studií, které byly publikovány po roce 2005 a zabývaly se jednak změnami v Gleasonově skóre, jednak důsledky v diagnostické praxi, jednoznačně vyplývá výrazné zpřesnění hodnocení punkčních biopsií prostaty. V urologické praxi to znamená reálnější pohled na onemocnění konkrétního pacienta a dále umožňuje přesnější predikci průběhu onemocnění a zlepšení léčby. Zejména diskrepance mezi výsledky histologického vyšetření punkčních proužků tkáně prostaty a skutečnou diferenciací karcinomu u pacienta činí v klinické praxi značné potíže. Velmi důležité pro urologa je, že všechny výsledky histologického vyšetření punkčních biopsií, jejichž GS je nižší než 6, by měly být podezřelé z podhodnocení (23). V těchto případech je zvykem urologů ve FN Olomouc žádat patologa o druhé čtení a přehodnocení GS.

Způsob léčby je zcela závislý na výsledcích histologického vyšetření. Standardní léčbou lokalizovaného karcinomu prostaty je radikální prostatektomie či radioterapie. U pacientů, kteří splňují přísná kritéria pro tzv. aktivní monitoring (tj. karcinom s Gleasonovým skóre méně než 3 + 3, máloobjemové ložisko – maximálně dva pozitivní vzorky, v každém méně než 50 % postižené tkáně, PSA denzita $\leq 0,15$ ng/ml/cm³), je možno nabídnout i tuto alternativu. Aktivní léčba je u těchto pacientů zahájena v okamžiku zjištění biochemické či klinické progresy karcinomu (vyšší PSA, zhoršení grádingu či větší rozsah pozitivních vzorků). Právě zde je přesné odečtení histologie a grádingu karcinomu krucální.

S odstupem několika let je prokazatelný kladný význam modifikace Gleasonova skóre v roce 2005. V současnosti se stále více otevírají diskuze týkající se Gleasonova skóre 7. Jde totiž o heterogenní skupinu, kde je nutné odlišit GS 3 + 4 a GS 4 + 3. Zde se nádory liší svojí prognózou. Je prokázáno, že skupina nádorů s GS 3 + 4 se více podobá nádorům se středním rizikem, zatímco skupina s GS 4 + 3 spadá již do skupiny nádorů s vysokým rizikem (24). I z těchto výsledků je zřejmé, že se podobá Gleasonova skóre nejspíše bude dále vyvíjet, a že tento systém bude dále modifikován na základě výsledků výzkumných studií a vzhledem k potřebám klinické praxe.

Literatura

1. <http://www.uroweb.cz/index.php?pg=dg--nador-y-prostaty--epidemiologie-ceska-republika--vyvoj-incidence-mortalita>.
2. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO Classification of tumours, tumours of the urinary system and male genital organs. IARC Press, Lyon; 2004: 159–214.
3. Humphrey PA. Prostate Pathology. ASCP Press. Chicago; 2003: 226–422.
4. Povýšil C, Šteiner I. Speciální patologie. Galén. Praha; 2007: 244–248.
5. Grepl M, Král M, Burešová E, Študent V. Agresivní karcinom prostaty u pacientů s nízkým PSA. Ces Urol 2010; 14(1): 48–53.
6. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < 4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004; 350(22): 2239–2246.
7. Hornirger W, et al. Screening for prostate cancer: updated experience from the Tyrol study. Can J Urol 2005; 12(Suppl 1): 7–13, 92–93.
8. http://www.nccnorg/professionals/physician_gls/PDF/prostate.pdf.

9. Študent V, Grepl M, Král M, Hartmann I. Má vyšetření PSA stále význam při vyhledávání karcinomu prostaty? Urol. praxi 2006; 5: 214–218.

10. Kolombo I, Poršová M, Zemanová I, et al. Prostatický specifický antigen (PSA) a digitální rektální vyšetření (DRE) v diagnostice karcinomu prostaty. Urol. praxi 2008; 9(2): 83–88.

11. Rosai J. Surgical Pathology (9th ed). Mosby; 2004: 1361–1385.

12. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother. Rep. 1966: 125–128.

13. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J. Urol. 1974: 58–64.

14. Helpap B, Egevad L. The significance of modified Gleason grading of prostatic carcinoma in biopsy and radical prostatectomy specimen. Virchows Archiv 2006; 449: 622–627.

15. Epstein JI, Allsbrook WC Jr., Amin MB, Egevad LL. ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am. J. Surg. Pathol. 2005; 29: 1228–1242.

16. Lotan TL, Epstein JI. Clinical implications of changing definitions within the Gleason grading system. Nat. Rev. Urol. 2010; 7: 136–142.

17. Král M, Študent V, Kurfürstová D, Vidlár A, Kučerová L. Gleasonovo skóre v biopsii a po radikální prostatektomii – změny po konferenci ISUP 2005 a význam pro urologa. Urol. praxi 2007; 4: 173–178.

18. Egevad L, Allsbrook WC Jr., Epstein JI. Current practice of Gleason grading among genitourinary pathologists. Human Pathology; 36: 5–9.

19. Helpap B. and Egevad L. Modified Gleason grading. An update review. Histolo. Histopathol. 2009; 24: 661–666.

20. Gofrit ON, Zorn KC, Steinberg GD, Zagaja GP, Shalhav AL. The Will Rogers phenomenon in urological oncology. J. Urol. 2008; 179: 28–33.

21. Fine SW, Epstein JI. A contemporary study correlating prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason score. J. Urol. 2008; 179: 1335–1339.

22. Epstein J. I. An Update of the Gleason Grading System. J. Urol. 2010; 183: 433–440.

23. Hes O, Hora M. Současný pohled na Grading karcinomu prostaty: modifikace Gleasonova systému dle ISUP 2005 – přehled. Ces Urol 2007; 2: 112–114.

24. Helpap B, Ringli D, Shaikhibrahim Z, Wernert N, Kristiansen G. The heterogenous Gleason 7 carcinoma of the prostate: Analyses of low and high grade (risk) carcinomas with criteria of the International Society of Urological Pathology (ISUP). Pathol Res Pract 2013; 209: 190–194.

Článek přijat redakcí: 20. 2. 2013

Článek přijat k publikaci: 1. 4. 2013

Autorka prohlašuje, že zpracování článku nebylo podpořeno farmaceutickou firmou.

MUDr. Daniela Kurfürstová

Ústav klinické a molekulární patologie

LF UP a FN Olomouc

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

daniela.kurfurstova@seznam.cz