

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**



**MOLEKULÁRNE MECHANIZMY PROGRESIE KARCINÓMU PROSTATY**

Dizertačná práca

**Olomouc 2022**

**Mgr. Alena Mičková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**



Dizertačná práca

**MOLEKULÁRNE MECHANIZMY PROGRESIE KARCINÓMU PROSTATY**

Mgr. Alena Mičková

Školiteľ: doc. Mgr. Jan Bouchal, PhD.

Obor: *P5152-Lékařská biologie*


Pracovisko: Ústav klinické a molekulární patologie LF UP v Olomouci

Olomouc 2022

# PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som predloženú dizertačnú prácu vypracovala samostatne s využitím citovanej literatúry.

Olomouc 7.1.2022



Alena Mičková

# POĎAKOVANIE

Moje úprimné poďakovanie patrí môjmu vedúcemu práce doc. Mgr. Janu Bouchalovi PhD. za jeho snahu, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky počas celého trvania môjho doktorského štúdia.

Obzvlášť by som chcela poďakovať kolegyniam z nášho pracoviska a to Mgr. Dane Šimkovej PhD. a Mgr. Kateřině Čížkovej PhD. za ich ochotu ma zaučiť do western blot analýzy a MUDr. Mariam Gachechiladze PhD. a MUDr. Gvantse Kharaisvili PhD., ktoré ma oboznámili s metodikou multiplexnej imunohistochemie.

Rovnako moje veľké poďakovanie patrí aj MUDr. Daniele Kurfurstovej PhD. a MUDr. Gvantse Kharaisvili PhD. za odoberanie vzoriek nádoru z čerstvého tkaniva a tiež Bc. Mgr. Monike Levkovej, ktorá zabezpečovala materiál a pomáhala pri kultivácii organoidov a tkaniva. Zároveň ďakujem tímu laborantiek z nášho laboratória molekulárnej patológie za ich ochotu a praktickú pomoc pri rutinnej laboratórnej práci.

V neposlednom rade chcem poďakovať za možnosť spolupracovať so skupinou Mgr. Karla Součka PhD. z pracoviska Cytokinetiky AV ČR v Brne, ktorí sa dlhodobo venujú štúdiu nádorovej plasticity a heterogenity predovšetkým pomocou prietokovej cytometrie, sortovania buniek a experimentov robených na myšiach.

Na záver sa chcem poďakovať blízkej rodine a priateľovi Michalovi za ich podporu a dôveru, ktorú mi dali.

## ABSTRAKT

Rakovina prostaty (PCa) patrí k najčastejšiemu onkologickému ochoreniu u mužov západného sveta a radí sa k najčastejšej onkologickej príčine ich úmrtia. Z tohto dôvodu je potrebné lepšie pochopiť progresiu ochorenia a priniesť tak nové možnosti ich liečby. Zvýšená prítomnosť Skp2, ako podjednotky E3 ubikvitín ligázového komplexu, bola opakovane zistená u agresívneho karcinómu prostaty a tento poznatok reprodukovala aj naša štúdia. Zároveň sme pozorovali koreláciu medzi Skp2 a Slug, jedným z regulátorov epitelovo-mezenchymálnej tranzície (EMT). Táto korelácia bola silnejšia u nádorov s vyšším Gleasonovým skóre v porovnaní s menej agresívnymi nádormi, ako aj u pacientov s metastázami do lymfatických uzlín v porovnaní s lokalizovaným ochorením. Multiplexnou imunohistochemickou analýzou nádorového tkaniva prostaty bola preukázaná ich vzájomná koexpresia, pričom prítomnosť oboch proteínov bola potvrdená aj v súbore prostatických mezenchymálnych línií odvodených od ich epiteliálnych náprotivkov (PC3, DU145 a E2). Chemickou inhibíciou Skp2, ale nie siRNA interferenciou, dochádzalo k čiastočnému poklesu Slug proteínu u PC3 a v ich docetaxel-rezistentnej sublíni PC3 DR12. Aktivita Skp2 v E3 ligázovom komplexe je tiež regulovaná prostredníctvom nedylácie. Použitím jej inhibítora MLN 4924 dochádzalo k nárastu p27<sup>Kip1</sup>, typického substrátu Skp2, a k poklesu expresie Slug u PC3, PC3 DR12 a LAPC4 buniek. Tieto výsledky naznačujú možnosť využitia cielenej liečby na Skp2 a Slug prostredníctvom blokovania nedylácie u pokročilého karcinómu prostaty. Expresia Slug je výrazne modulovaná počas karcinogenézy a množstvo prác popisuje jeho zvýšenú prítomnosť v pokročilých formách rakoviny. Zároveň je prítomný v bazálnych kmeňových bunkách a naša nedávna analýza normálnej myšacej prostaty ukázala, že bazálne Slug<sup>+</sup> bunky majú vyšší potenciál pre rast organoidov ako populácia Slug negatívnych buniek.

Prítomnosť fúzneho génu TMPRSS2-ERG spolu so stratou nádorového supresoru PTEN boli zvažované ako potenciálne prediktory pre terapiu PARP inhibítormi. V našom súbore pacientov sme pozorovali signifikantnú asociáciu TMPRSS2-ERG so zníženou expresiou PTEN. Aj keď klinické štúdie s veliparibom nepreukázali lepšie prežívanie pacientov s fúznym génom, iné experimentálne modely naznačujú, že strata PTEN môže inhibovať homológnu rekombináciu a senzitivovať nádory k PARP inhibícii aj rádioterapii v nádoroch bez BRCA mutácií.

Ďalej sme sa zameriavali na ustanovenie patientských *in vitro* 3D organoidov a krátkodobej *ex vivo* tkanivovej kultúry s cieľom ich možného využitia v personalizovanej

liečbe pokročilého karcinómu prostaty. Celkovo sa nám organoidy podarilo kultivovať z 58% nádorového (29/50) a 69% nenádorového (20/29) tkaniva. Imunohistochemickým farbením pan-cytokeratínu u dvoch reprezentatívnych vzoriek sme preukázali rast epiteliálnych buniek, ale nadexpresia AMACR a ERG u nádorového tkaniva nebola zachovaná v príslušných organoidov. Ďalším obmedzením tohto prístupu bol rast organoidov len po dobu 3 týždňov do prvej pasáže. Okrem toho sme využili techniku tkanivových kultúr *ex vivo* a vykonali krátkodobý chemoterapeutický test s použitím gemcitabínu a inhibítora Chk1 v 10 vzorkách pacientov. Nekonzistentná morfológia medzi fragmentmi tkaniva a nízka proliferácia vo väčšine prípadov bránili interpretácii testovania liečiv. Napriek tomu môžu byť tieto prístupy sľubné pri použití metastatických tkanív kastrocenne rezistentnej rakoviny prostaty.

**Kľúčové slová:** rakovina prostaty, Skp2, Slug, TMPRSS2-ERG, organoidy, *ex vivo* tkanivová kultúra

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the most common male cancers in the Western world and is one of the most common causes of cancer related death. For this reason, it is necessary to better understand the progression of the disease and thus bring new possibilities for their treatment. The increased presence of Skp2 as a subunit of the E3 ubiquitin ligase complex has been repeatedly found in aggressive prostate cancer and this finding was reproduced in our study. At the same time, we observed a correlation between Skp2 and Slug, one of the regulators of epithelial-mesenchymal transition (EMT). This correlation was stronger in tumors with a higher Gleason score compared to less aggressive tumors, as well as in patients with lymph node metastases compared to localized disease. Multiplex immunohistochemical analysis of prostate tumor tissue demonstrated their mutual co-expression, while the presence of both proteins was also confirmed in a set of prostatic mesenchymal lines derived from their epithelial counterparts (PC3, DU145 and E2). Chemical inhibition of Skp2, but not RNA interference, resulted in a partial decrease in Slug protein in PC3 and in their docetaxel-resistant subline PC3 DR12. Skp2 activity in the E3 ligase complex is also regulated by neddylation. Using its inhibitor MLN4924, there was an increase in p27<sup>Kip1</sup>, a typical Skp2 substrate, and a decrease in Slug expression in PC3, PC3 DR12 and LAPC4 cells. These results suggest the possibility of using a targeted treatment for Skp2 and Slug by blocking neddylation in advanced prostate cancer. Slug expression is markedly modulated during carcinogenesis and several studies have described its increased presence in advanced cancers. It is also present in basal stem cells and our recent analysis of normal mouse prostate has shown that basal Slug<sup>+</sup> cells have a higher potential for organoid growth than a population of Slug negative cells.

The presence of the TMPRSS2-ERG fusion gene with the loss of the tumor suppressor PTEN were suggested as potential predictors for PARP inhibitor therapy. In our group of patients, we observed a significant association of TMPRSS2-ERG with reduced PTEN expression. Although clinical studies with veliparib did not show better survival in patients with the fusion gene, other experimental models suggest that PTEN loss may inhibit homologous recombination and sensitize tumors to PARP inhibition and radiotherapy in tumors without BRCA mutations.

We also focused on establishing patient-derived *in vitro* 3D organoids and short-term *ex vivo* tissue culture for their potential use in personalized treatment of advanced prostate cancer. Overall, we were able to culture organoids from 58% tumor (29/50) and 69% non-tumor

(20/29) tissue. We demonstrated epithelial cell growth by immunohistochemical staining of pan-cytokeratin in two representative samples, but overexpression of AMACR and ERG in tumor tissue was not retained in the respective organoids. Another limitation of this approach was the growth of organoids for only three weeks until the first passage. In addition, we used *ex vivo* tissue culture and performed a short-term chemotherapeutic test using gemcitabine and a Chk1 inhibitor in ten patient samples. Inconsistent morphology between tissue fragments and low proliferation in most cases hindered the interpretation of drug testing. Nevertheless, these approaches may be promising when using metastatic tissues of castration-resistant prostate cancer.

**Keywords:** prostate cancer, Skp2, Slug, TMPRSS2-ERG, organoids, *ex vivo* tissue culture



# OBSAH

<b>1. LITERÁRNÝ PREHLAD .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. PROSTATA A RAKOVINA .....</b>	<b>19</b>
1.1.1. Diagnostika a histologická klasifikácia rakoviny prostaty .....	19
1.1.2. Bunkové typy v rámci tkaniva prostaty .....	21
1.1.3. Molekulárna charakterizácia rakoviny prostaty.....	23
1.1.3.1. <i>SPOP</i> .....	24
1.1.3.2. <i>Fúzia TMPRSS2 s ERG génom</i> .....	25
1.1.3.3. <i>PTEN</i> .....	25
1.1.3.4. <i>Nkx3.1</i> .....	26
1.1.3.5. <i>c-Myc</i> .....	26
1.1.3.6. <i>Rb</i> .....	26
1.1.3.7. <i>p53</i> .....	27
1.1.3.8. <i>AMACR</i> .....	28
1.1.4. Liečba a vznik rezistencie.....	28
1.1.4.1. <i>Liečba lokalizovaného karcinómu prostaty</i> .....	29
1.1.4.2. <i>Androgén-deprivačná terapia (ADT)</i> .....	30
1.1.4.3. <i>Vznik kastročne rezistentného fenotypu (CRPC) a androgénový receptor</i> .....	31
1.1.4.4. <i>Prvá línia liečby CRPC</i> .....	32
1.1.4.5. <i>Druhá línia liečby CRPC</i> .....	32
1.1.4.6. <i>Neuroendokrínny karcinóm prostaty (NED)</i> .....	33
1.1.4.7. <i>Nové prístupy v liečbe mCRPC</i> .....	33
<b>1.2. EPITELOVO-MEZENCHÝMOVÁ TRANZÍCIA .....</b>	<b>36</b>
1.2.1. Slug ako regulátor expsie E-kadherinu.....	37
<b>1.3. UBIKVITINÁCIA AKO POSTTRANSLAČNÁ MODIFIKÁCIA .....</b>	<b>38</b>
1.3.1. Cullin RING E3 ligázy a regulácia ich aktivity .....	39
1.3.1.1. <i>Skp2</i> .....	40
<b>1.4. PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA .....</b>	<b>42</b>
1.4.1. 3D organoidové modely .....	43
1.4.1.1. <i>Podmienky kultivácie patientskych organoidov prostaty</i> .....	45
1.4.2. <i>Ex vivo</i> kultivácia nádorového tkaniva .....	45

<b>2. CIELE PRÁCE.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. PROJEKT 1: VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2. PROJEKT 2: PREDIKTÍVNE MARKERY A MODELY V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE... 47</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. PROJEKT 1: VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Pacienti a štandardná imunohistochemia.....	48
3.1.2. Multiplexná imunohistochemia .....	49
3.1.3. Bunková kultúra.....	49
3.1.4. Western blot analýza.....	50
3.1.5. Chemické inhibítory .....	51
3.1.6. RNA interferencia.....	51
<b>3.2. PROJEKT 2: PREDIKTÍVNE MARKERY A MODELY V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE... 51</b>	<b>51</b>
3.2.1. Kvantitatívna PCR pre fúzny gén TMRSS2-ERG.....	51
3.2.2. Ustanovenie a pestovanie organoidov alebo sféroidov .....	52
3.2.3. R-spondin 1 a noggin kondiciované médium .....	55
3.2.4. Zaliatie organoidov a sféroidov do parafínu a imunohistochemia .....	56
3.2.5. Tkanivová kultúra ľudskej rakoviny prostaty.....	57
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY .....</b>	<b>58</b>
4.1.1. Expresia Skp2 korelovala so Slug u pacientov s vysokým Gleason skóre a s metastázami do lymfatických uzlín .....	58
4.1.2. Multiplexová imunohistochemia potvrdila kolokalizáciu Skp2 a Slug v nádorovom tkanive.....	59
4.1.3. Mezenchymálny fenotyp bol asociovaný so zvýšenou expresiou Skp2 a Slug u ľudských PC3 a myších E2 rakovinových buniek.....	61
4.1.4. Vplyv chemickej inhibície Skp2 a RNA interferencie na proteínové hladiny Slug ...	62
4.1.5. Blokáda nedylácie znížila expresiu Slug u PC3 a LAPC4 buniek .....	62
4.1.6. Myšie bazálne kmeňové bunky so Slug expresiou efektívne tvorili organoidy so všetkými diferencovanými prostatickými bunkami.....	64
<b>4.2. PREDIKTÍVNE MARKERY A MODELY V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Fúzny gén TMRSS2-ERG, nádorový supresor PTEN a terapia PARP inhibítormi... 66	66

4.2.2. Ustanovenie 3D organoidov z nádorového a nenádorového tkaniva prostaty .....	67
4.2.3. Imunohistochemická analýza organoidov prostaty .....	68
4.2.4. Krátkodobé testovanie liečiv v <i>ex vivo</i> tkanivovej kultúre .....	71
4.2.5. Porovnanie 3D organoidov a tkanivových kultúr .....	72
<b>5. DISKUSIA.....</b>	<b>73</b>
<b>6. ZÁVER.....</b>	<b>78</b>
<b>7. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A KONFERENČNÝCH PRÍSPEVKOV .....</b>	<b>80</b>
<b>8. LITERATÚRA .....</b>	<b>82</b>

## ZOZNAM SKRATIEK

A83-01	TGF $\beta$ inhibitor
ACTA2	actin alpha 2
ADMEM/F-12	advanced Dulbecco's modified eagle medium F-12
ADT	androgen deprivation therapy
AKT	protein kinase B, PKB
ALK5	activin receptor-like kinase 5
AMACR	alpha methylacyl CoA racemase
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	androgen receptor
ARv567	androgen receptor variant 567
ARv7	androgen receptor variant 7
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	base excision repair
Beta-TrCP	beta-transducin repeat containing protein
BLCL	basal-like breast cancer
BMP	bone morphogenic protein
BPH	benign prostatic hyperplasia
BRCA 1 a 2	breast cancer genes 1 and 2

BRITER	BMP Responsive Immortalized Reporter cell line
BSA	bovine serum albumin
C.M.	conditioned medium
CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1
CDH1	E-cadherin
CDH2	N-cadherin
CDK	cyklin dependent kinase
Cdk2	cyklin dependent kinase 2
CK 19	cytokeratin 19
CK 5 a CK 14	cytokeratin 5 a 14
CK 8/18	cytokeratin 8/18
CRL	Cullin RING E3 ligázy
CRPC	castration-resistant prostate cancer
CRPC-NE	neuroendocrine castration-resistant prostate cancer
CSC	cancer stem cells
CSN	COP9 signalosome
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DHT	dihydrotestosterone

DLK1	delta homolog 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMEM/F-12	Dulbecco's modified eagle medium F-12
E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E3	substrate-specific ubiquitin ligase
EGF	epithelial growth factor
EMT	epithelial to mesenchymal transition
ERG	V-ETS avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog
ETS	E-26 „transformation specific“
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FANCA	Fanconi anemia group A protein
FBS	fetal bovine serum
FBXL14	F-Box and Leucine Rich Repeat Protein 14
FBXO11	F-Box Protein 11
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
FGF10	fibroblast growth factor 10
FGF2	fibroblast growth factor 2
FOXA1	Forkhead Box A1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSK3b	Glycogen synthase kinase-3

HECT	homologous to E6-associated protein C terminus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hESC	human embryonic stem cells
HR	homologous recombination
CHIP	carboxyl terminus of the HSC70-interacting proteins
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1
IGF-1	insulin like growth factor-1
IHC	immunohistochemistry
KGF	keratinocyte growth factor
KLK3	Kallikrein Related Peptidase 3
KMT2C	Lysine Methyltransferase 2C
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D
KSFM	keratinocyte serum-free medium
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
LN	lymphatic nodes
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mCRPC	metastatic castration-resistant prostate cancer
MDM2	mouse double minute 2
MDMX	murine double minute X

MET	mesenchymal to epithelial transition
MLN4924	inhibitor of neddylation
mPSC	mouse pluripotent stem cells
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
MU380	Chk1 inhibitor
NED	Neuroendokrinný karcinóm prostaty
NGS	next-generation sequencing
Nkx3.1	NK3 Homeobox 1
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2
Pan-CK	pan-cytokeratin
PARP-1	Poly-(ADP-ribóza)polymeráza-1
PARPi	PARP inhibitor
PBS	Phosphate-buffered saline
PCa	prostate cancer
PDX	patient derived xenografts
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia
POLR2A	RNA Polymerase II Subunit A
PSA	prostate specific antigen



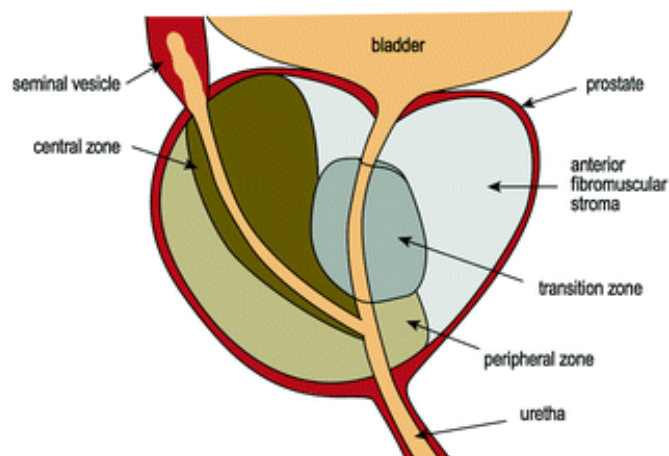
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTM	postranlačné modifikácie
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
R1881	(17b)-17-Hydroxy-17-methyl-Estra-4,9,11-trien-3-one
RAD51B	RAD51 Paralog B
RANKL	receptor activator of NFκB ligand
Rb	retinoblast protein
RBR	RING-in-between-RING
RING	Really Interesting New Gene
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROI	region of interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rs	Spearman correlation
SB 202 190	inhibitor of p38 protein
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	Skp1-cullin 1-F-box
SDS	sodium dodecyl sulphate
SIRT2	Sirtuin 2
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2
Slug	SNAI2 protein
Smad4	Mothers against decapentaplegic homolog 4

SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SPOP	Speckle Type BTB/POZ Protein
SZL-P1-41	Skp2 inhibitor
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta
Trop-2	Trophoblast cell surface antigen 2
TURP	transurethral resection of the prostate
TWIST	Twist family BHLH transcription factor
UPS	ubiquitin–proteasome system
Wnt	Wnt Family Member
Y-27632	Rho-kinase inhibitor
YFP	Yellow fluorescent protein
$\gamma$ H2AX	Phosphorylated histone H2AX

# 1. LITERÁRNY PREHĽAD

## 1.1. PROSTATA A RAKOVINA

Ľudská prostata je tubulárno-alveolárna žľaza, obklopujúca močovú trubicu v spodnej časti močového mechúra. U zdravého dospelého jedinca má veľkosť vlašského orecha a jej hlavnou funkciou je sekrécia proteínov, ktoré sú zložkou semennej tekutiny (Abate-Shen and Shen, 2000). Po anatomickej stránke McNeal (1981) definoval 4 odlišné morfológické oblasti, anatomické zóny prostaty (Obrázok 1.1) rozdelené na: prednú **fibromuskulárnu** zónu a tri žľazovité zóny rozdelené na: **centrálnu**, obklopujúcu ejakulačné kanály; **prechodovú** zónu obklopujúcu močovú trubicu a **periférnu**, obklopujúcu ejakulačné kanály aj močovú trubicu. Jeho práca tiež poukázala na význam tejto architektúry vo vzťahu k vzniku rakoviny prostaty, ku ktorej dochádza väčšinou v jej periférnej oblasti, pričom kľúčovú úlohu zohráva zloženie jednotlivých bunkových typov v rámci tejto anatomickej zóny (Abate-Shen and Shen, 2000; Henry et al., 2018).



Obrázok 1.1 Anatomické zóny prostaty (Tchrakian et al., 2016).

### 1.1.1. Diagnostika a histologická klasifikácia rakoviny prostaty

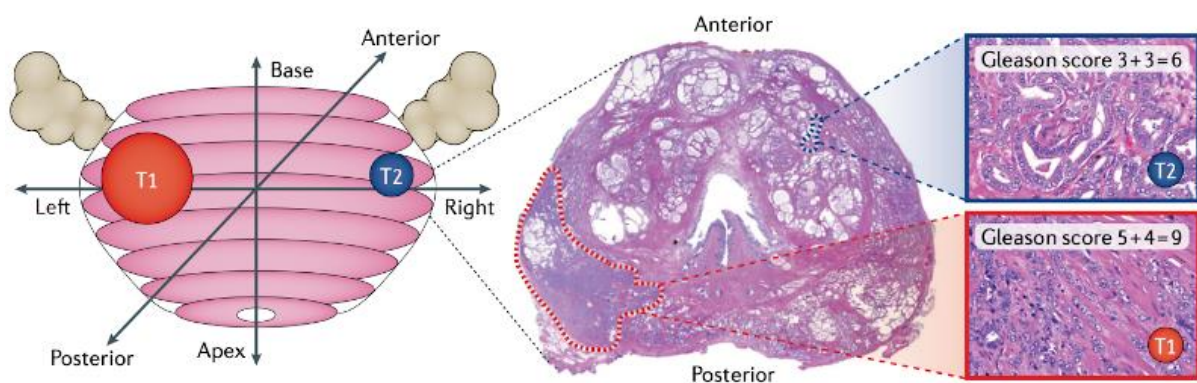
Rakovina prostaty (PCa) patrí k najčastejšiemu onkologickému ochoreniu u mužov západného sveta, pričom postihuje jedného z deviatich vo veku nad 65 rokov. Zároveň sa radí k najčastejšej príčine ich úmrtia z dôvodu onkologického ochorenia (Siegel et al., 2021). Priame príčiny vzniku nádoru prostaty nie sú doposiaľ jasné ale sú známe faktory, ktoré k tomuto ochoreniu môžu prispievať, ako je obezita (Bandini et al., 2017), zápal (Rani et al.,

2019) a dedičnosť (Das et al., 2019). Pre toto ochorenie je tiež príznačná jeho heterogenita a multifokalita, čo znamená, že na relatívne malú veľkosť prostaty je viacero subpopulácií nádorových buniek, ktoré sú geneticky odlišné (neklonálne) a to dokonca aj tie, ktoré sú vo vzájomnej blízkosti (Haffner et al., 2021) (Obrázok 1.2).

Na popísanie tejto heterogenity Gleason navrhol systém pre jej klasifikáciu, a doposiaľ je patológmi najpoužívanejší, pretože je výborným prognostickým ukazovateľom. Tento systém klasifikuje nádory od 1 až po 5 (od viac po menej diferencované) a na základe súčtu dvoch najrozšírenejších skupín neoplastických ložísk je stanovené Gleasonove skóre (Epstein et al., 2010). Nový patologický grading prijatý v roku 2014 rozdeľuje pokročilosť rakoviny na 5 stupňov (Epstein et al., 2016; Litwin and Tan, 2017. ), pričom táto kategorizácia presnejšie zodpovedá správaniu nádoru:

1. Stupeň rakoviny – Gleason skóre 3+3
2. Stupeň rakoviny – Gleason skóre 3+4
3. Stupeň rakoviny – Gleason skóre 4+3
4. Stupeň rakoviny – Gleason skóre 4+4, 3+5, 5+3
5. Stupeň rakoviny – Gleason skóre 4+5, 5+4, 5+5

Pacienti sú tiež klasifikovaní podľa stavu primárneho nádoru, od výlučne „organ-confined“ po plne invazívne štádium (T1-4) s postihnutím lymfatických uzlín alebo bez (N1 – N0) a podľa prítomnosti vzdialených metastáz (M0 - M1a-c) (Shen and Abate-Shen, 2000).



**Obrázok 1.2 Multifokálna rakovina prostaty.** Rekonštrukcia a prierez vzorky z radikálnej prostatektómie s dvoma odlišnými nádorovými ložiskami. Všimnite si, že väčšie ložisko nádoru umiestnené v ľavej zadnej prostate vykazuje agresívnu morfológiu a extraprostatickú extenziu (Gleasonovo skóre 5+4=9), zatiaľ čo menší predný nádor sa javí ako dobre diferencovaný (Gleasonovo skóre 3+3=6) (upravené Haffner et al., 2021).

### 1.1.2. Bunkové typy v rámci tkaniva prostaty

V rámci prostatického epitelu existujú najmenej štyri odlišné typy buniek, ktoré sú definované ich génovou expresiou, povrchovými antigénmi a je možné ich rozlíšiť podľa ich morfológických charakteristík (Obrázok 1.3) (Abate-Shen and Shen, 2000).

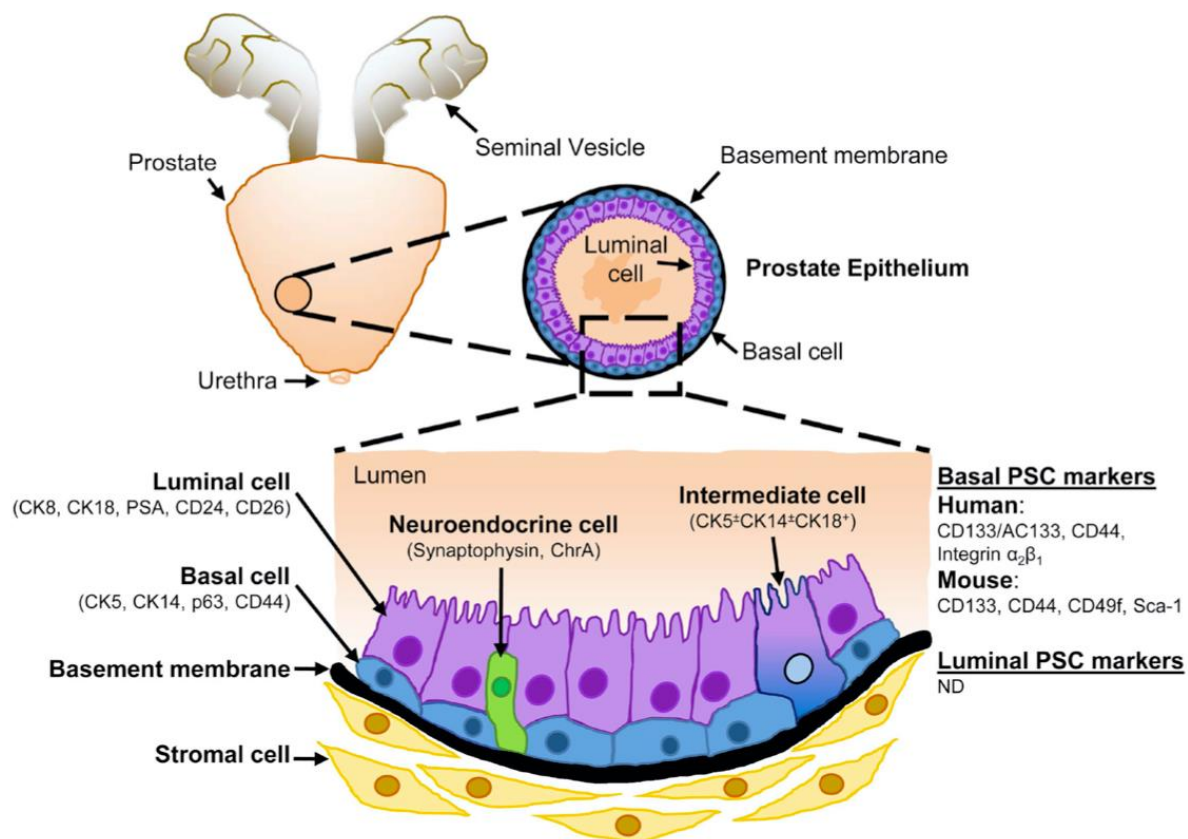
Prevládajúcim bunkovým typom sú sekrečné luminálne bunky, diferencované androgén-dependentné bunky produkujúce prostatické sekrečné proteíny ako je kalikreín 3 (KLK3), tiež označovaný „prostate specific antigen“ (PSA). Na molekulárnej úrovni sú luminálne bunky charakterizované expresiou androgénového receptora (AR) ako aj cytokeratínov 8/18 (CK 8/18) a bunkového povrchového markeru CD57 (Abate-Shen and Shen, 2000).

Druhý bunkový typ epitelových buniek zodpovedá bazálnym bunkám, ktoré sa nachádzajú medzi luminálnymi bunkami a bazálnou membránou. Bazálne bunky exprimujú cytokeratíny 5 a 14 (CK 5 a CK 14) a rovnako tak je pre tieto bunky typická prítomnosť p63 transkripčného faktora. Naproti luminálnym, bazálne bunky neprodukujú prostatické sekrečné proteíny. Bunky nesúce znaky luminálnych aj bazálnych buniek sú označované ako intermediálne epiteliálne bunky, ktoré sa tiež vyznačujú expresiou cytokeratínu 19 (CK 19) (Hudson et. al., 2001; Wang et. al., 2001).

Tretím podtypom sú prostatické neuroendokrinné epiteliálne bunky exprimujúce chromogranín A, synaptophysin, a ktorých malá populácia je rozptýlená v bazálnej vrstve. Neuroendokrinné bunky nie sú závislé na androgénoch a ich predpokladanou funkciou sú parakrinné signály podporujúce rast luminálnych buniek (Aumuller et al., 1999)

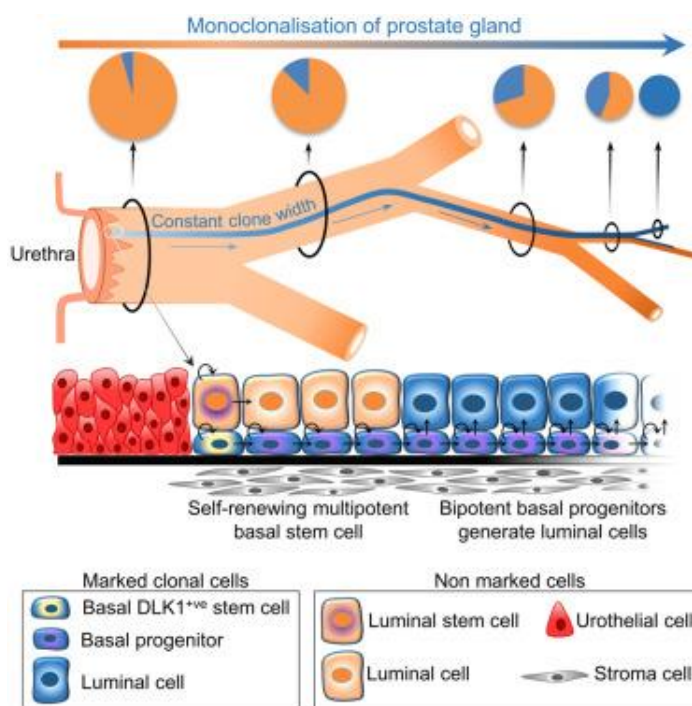
Ďalšími kľúčovými regulátormi rastu a diferenciácie prostaty dospelého človeka sú stromálne bunky. Táto populácia buniek pozostáva z dvoch hlavných bunkových typov, ako sú bunky hladkého svalstva charakteristické expresiou alfasmooth musle actin, ACTA2 (actin alpha 2) alebo desminu a populáciou fibroblastov, pre ktoré je typická expresia vimentinu a fibronectinu (Peehl and Sellers, 1997).

Prítomnosť ľudských bazálnych kmeňových buniek prostaty je podľa niektorých skupín definovaná markermi CD133, CD44 a integrínom  $\alpha_2\beta_1$  (Rybak et al., 2015, Richardson et al. 2004, Collins et al. 2001). Medzi myšacie znaky bazálnych kmeňových buniek patria taktiež CD49f, Sca-1 a Trop2 (Rybak et al., 2015, Goldstein et al. 2008).



Obrázok 1.3 Schematická reprezentácia bunkovej architektúry epitelu prostaty (Rybak et al., 2014).

Prítomnosť a pôvod kmeňových buniek študovali aj autori Moad et al. (2017), ktorí k identifikácii potenciálnej kmeňovej línie použili sporadické mutácie v mitochondriálnej DNA. 3D rekonštrukciou dospeljej ľudskej prostaty tak preukázali prítomnosť multipotentných bazálnych buniek obohatené o DLK1 (delta homolog 1), nachádzajúcich sa výhradne vo výklenkoch juxta-uretrálnych kanálov na pomedzí prostatického a uretrálneho epitelu. Odtiaľ sú generované bipotentné bazálne progenitory, ktoré postupujú do celej glandulárnej siete, kde sa delia a diferencujú do sekrečných luminálnych buniek, ktoré nakoniec odumierajú apoptózou (Obrázok 1.4).



Obrázok 1.4 Schematické znázornenie prítomnosti kmeňových buniek prostaty (Moad et al., 2017).

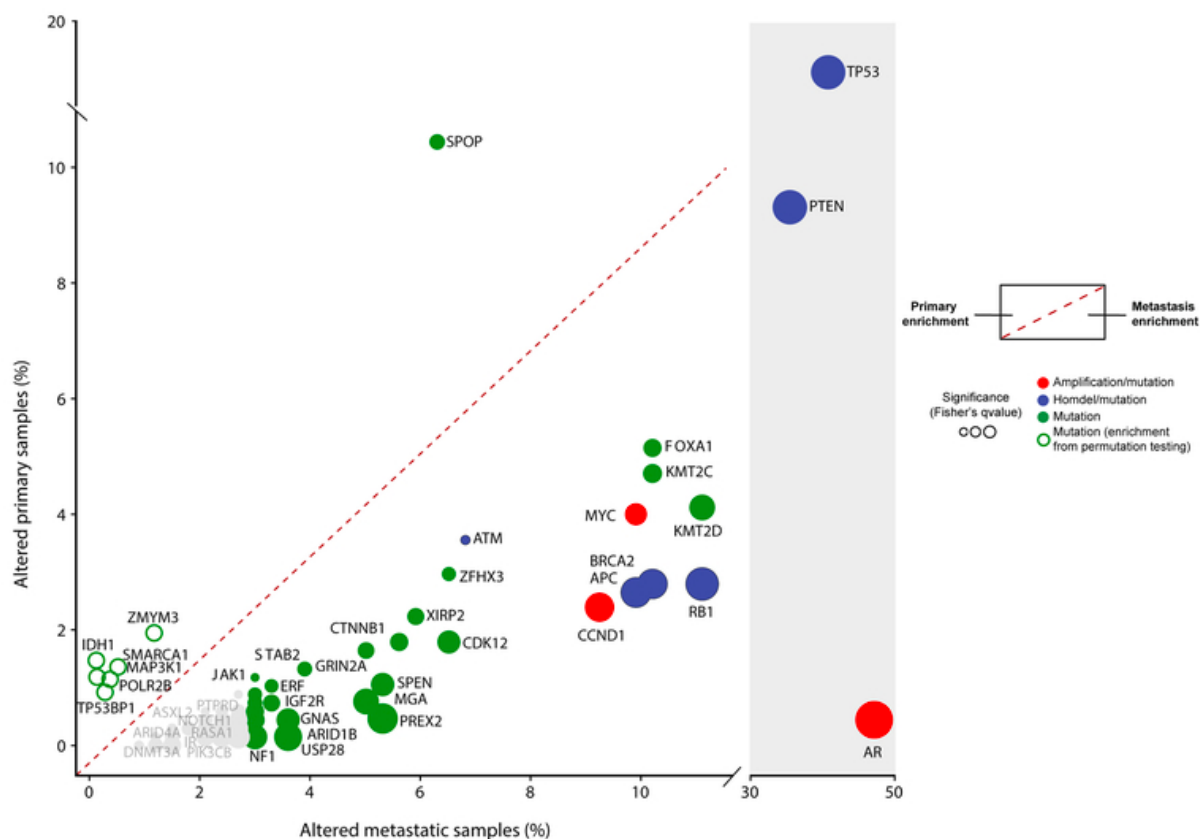
### 1.1.3. Molekulárna charakterizácia rakoviny prostaty

V predošlých štúdiách bolo genomické pozadie primárnej a metastatickej rakoviny prostaty dôkladne hodnotené prostredníctvom sekvenovania novej generácie (NGS). Tieto štúdie identifikovali viaceré rekurentne zmenené gény a dráhy, vrátane androgénovej signalizácie, opravy DNA a signalizácie fosfoinozítid 3-kinázy (PI3K)/AKT (Robinson et al., 2015; Cancer Genome Atlas Research Network, 2015). Okrem toho odhalili genomicky odlišné triedy rakoviny prostaty, definované fúziami transkripčnej rodiny ETS alebo mutáciami v SPOP, FOXA1 či IDH1. Napriek tomu, že má rakovina prostaty významnú medzi-pacientskú genómovú heterogenitu, analýzy naznačujú, že väčšie štúdie môžu odhaliť ďalšie štatisticky významné mutované gény vyskytujúce sa menej frekventovane. To naznačuje, že spektrum nových génov spájaných s rakovinou prostaty nie je úplne definované (Armenia et al., 2018).

V nedávno publikovanej práci Armenia et al. (2018) bola pomocou štatistických a biologických metód jednotne analyzovaná kohorta 1013 nádorov prostaty (680 primárnych a 333 metastatických nádorov). V závere tejto práce boli systematicky porovnávané primárne a metastatické nádory, aby sa určilo, ktoré udalosti vedú k pokročilému ochoreniu. Bolo zistené, že metastatické vzorky majú aberantne aktivovanú dráhu androgénového receptora a sú nositeľmi mutácií napr. v TP53, RB1, FOXA1, APC a BRCA2 (Obrázok 1.5). Zmeny v epigenetických regulátoroch, vrátane KMT2C a KMT2D, sú tiež významne obohatené v



metastatických nádoroch a v súhrne definujú genómové znaky vysoko rizikového ochorenia. Naopak, mutácie v SPOP boli významne obohatené v primárnych nádoroch (Obrázok 1.5).



Obrázok 1.5 Väčšina genómových zmien je prítomná u metastatického ochorenia. Percentuálne zastúpenie zmien v metastatických vzorkách (n=333) uvedené na osi x a primárne vzorky (n=680) na osi y. Významnosť zastúpenia mutácií je znázornená veľkosťou bodiek. (Armenia et al., 2018).

### 1.1.3.1. SPOP

SPOP je podjednotkou E3 ubikvitín ligázy, ktorej úlohou je rozpoznávať substrát pre následnú degradáciu v rámci proteazómového komplexu (Clark et al., 2020). Jeho mutácie sú vo väčšine prípadov v oblastiach zodpovedných za väzbu substrátu a výsledné zmeny majú vplyv na degradáciu proteínov, ktoré sú kritické pre normálne fungovanie buniek. Tak ako uvádzajú aj predchádzajúce práce, mutácie v SPOP predstavujú jedinečný molekulárny podtyp rakoviny prostaty, no zároveň vykazujú vzájomnú exkluzivitu s preskupeniami génov rodiny ETS, čo je chromozómne usporiadanie, ktoré je pri rakovine prostaty veľmi časté (Barbieri et al., 2012; Armenia et al., 2018). Pre tento fakt existuje otázka, či bunky tohto podtypu nedosahujú stabilizácie ERG proteínu (člen rodiny ETS) inak ako fúziou s TMPRSS2 génom. Autori práce Gan et al. popísali ako jednu z možných ciest jeho stabilizácie cez SPOP ubikvitín



ligázu, ktorá na báze cullin 3 riadi jeho ubikvitináciu a degradáciu. Porucha v tejto dráhe preto môže viesť k aberantnému zvýšeniu ERG onkoproteínu (Gan et al., 2015).

### ***1.1.3.2. Fúzia TMPRSS2 s ERG génom***

Prítomnosť fúzneho onkogénu TMMPRSS2-ERG patrí k najfrekvencovanejším chromozómovým prestavbám a celkovo je prítomná až u 50% prípadov, pričom frekvencia jej výskytu sa zvyšuje so štádiom pokročilosti od pre-kancerózneho štádia označovaného ako PIN (prostatic intraepithelial neoplasia) (10-20%) až po karcinóm (30-80%). ERG (ETS-related gene) je členom E-26 „transformation specific“ (ETS) rodiny transkripčných faktorov. Ako jadrový transkripčný faktor sa zapája do regulácie bunkovej architektúry, migrácie a invázie (Adamo et al., 2016; Haffner et al., 2010). Práve chromozómová prestavba spôsobí, že dôjde k nadmernej expresii proteínov tejto rodiny, ktorá vedie k približne šiestim z desiatich prípadov primárnych nádorov prostaty (Cancer Genome Atlas Research Network 2015; Labbé et al., 2018). Jednou z príčin vzniku tejto chromozómovej prestavby je nadmerná androgénová signalizácia, pri ktorej dochádza k chybám topoizomerázy II (TOP2B), čo vedie k zlomom v oblastiach TMPRSS2 a ERG génov a ich následnej fúzii. Expresia onkogénneho ERG sa tak dostáva pod androgénovú stimuláciu TMPRSS2 promótoru (Adamo et al., 2016; Haffner et al., 2010; Tomlins et al. 2008). Fúzia génu TMPRSS2-ERG patrí spolu s deléciou génu Nkx3.1 k veľmi skorým, ak nie iniciačným udalostiam, ktoré vedú k rozvoju rakoviny prostaty. Rovnako tak, táto fúzia väčšinou predchádza strate PTEN, pričom ich spoločný výskyt bol potvrdený pri progresii ochorenia (Taylor et al., 2010; Baca et al., 2013; Adamo et al., 2017)

### ***1.1.3.3. PTEN***

Gén PTEN (phosphatase and tensin homolog) sa nachádza na chromozóme 10q23 a u rakoviny všeobecne patrí medzi najčastejšie mutované supresorové gény. Úlohou PTEN je defosforylácia medziproduktov lipidovej signalizácie, čím sa deaktivuje Akt signalizácia závislá od dráhy PI3K. Mutáciou PTEN dochádza k zvýšenej aktivácii PI3K/Akt dráhy, ktorá vedie k proliferácii a invázii buniek (Adamo et al., 2017). V nedávno publikovanej práci Lotan et al. (2020) autori diskutujú o možnosti využitia straty PTEN v kombinácii s proliferačným markerom Ki-67 ako prognostických biomarkerov. V klinickej praxi by tak strata PTEN spolu so zvýšeným Ki-67 mohli pomôcť pri určení stupňa pokročilosti a zároveň by mohli byť určujúce pri stanovení vhodnej liečby pre pacienta s klinicky lokalizovaným karcinómom

prostaty. Aj keď Ki-67 a PTEN sú veľmi sľubnými prognostickými biomarkermi, pre ich definitívne použitie v klinickej praxi budú potrebné ďalšie štúdie (Lotan et al., 2020).

#### **1.1.3.4. Nkx3.1**

Nkx3.1 je homeoboxový gén, ktorý je jedným zo skorých génov exprimovaných počas maturácie a diferenciácie prostatického epitelu (Bahatia-Gaur et al., 1999). Exprimovaný je hlavne luminálnymi bunkami, ako aj podskupinou bazálnych buniek (~10%). Jeho strata vedie k vzniku dysplázie a intraepiteliálnej neoplázie (PIN). Znefunkčnením Nkx3.1 dochádza k narušeniu normálnej diferenciácie epitelu prostaty, čo pripravuje pôdu pre reťazce ďalších onkogénnych udalostí. Aj keď samotná strata Nkx3.1 nepostačuje k progresii ochorenia, je tento gén zapojený v sieti transkripčných faktorov definujúcich osud týchto buniek. Jeho vplyv bol preukázaný predovšetkým u AR a Myc, čo sú dôležité gény pri progresii primárnej aj metastatickej rakoviny prostaty. Zároveň bola preukázaná vzájomná regulácia Nkx3.1 a AR prostredníctvom pozitívnej spätno-väzobnej slučky (Tan et al., 2012) a krížová regulácia Myc a Nkx 3.1 cieľových génov pri tumorigenéze prostaty (Labbé et al., 2018).

#### **1.1.3.5. c-Myc**

Nadmerná expresia c-Myc je jednou z hnacích síl tumorigenézy (Gurel et al., 2008) a jeho fokálna amplifikácia na chromozóme 8q24.21 sa vyskytuje pri vzniku primárneho karcinómu prostaty. K jeho zvýšenej prítomnosti dochádza predovšetkým u metastatického karcinómu, kde sa vyskytuje až u 37% pacientov (Kumar et al., 2016; Armenia et al., 2018) a je spájaný s nižším prežívaním (Ribeiro et al., 2006). Nowak et al. (2015) vo svojej práci poukázali na význam deregulácie c-Myc u myši s deléciou v Pten/p53 pre vznik metastáz. Zároveň je predpoklad, že nadmerná expresia c-Myc je hlavným prvkom rezistencie rakovinových buniek na antiandrogénnu terapiu a podporuje progresiu ochorenia (Labbé et al., 2018).

#### **1.1.3.6. Rb**

Lokalizácia tumor supresorového génu retinoblastómu Rb je v chromozomálnej oblasti 13q a jeho mutácia sa prejavuje stratou heterozygotnosti lokusu až u 60% prípadov karcinómu prostaty. Funkciou Rb je udržiavanie kontroly nad prechodom z G1 do S fázy bunkového cyklu prostredníctvom interakcií s rodinou transkripčných faktorov E2F. Aj keď nie je jasná korelácia medzi stratou Rb a jeho fosforylovanou formou so štádiom progresie ochorenia, existujú štúdie

naznačujúce, že tieto udalosti sa radia k pomerne skorým pri vzniku rakoviny prostaty (Maddison et al., 2004). Mutácie v Rb môžu podporovať rozvoj rakoviny dereguláciou exprese génov vrátane cyklínu E, cyklínu A a zložiek replikačného mechanizmu DNA (Dyson et al., 1998). Zatiaľ čo deregulácia p16 inhibítora cyklín-dependentných kináz, cyklínu D a CDK4 sa podieľa na väčšine typov rakoviny (Sherr et al., 1996), mutácie v cyklíne D sú pri rakovine prostaty relatívne zriedkavé (Drobnjak et al., 2000; Gumbiner et al., 1999). Naproti tomu, p16 býva často nadmerne exprimovaný (Henshall et al., 2001; Lee et al., 1999), čo znamená, že priame znefunkčnenie Rb predstavuje jednu z kľúčových udalostí pri vzniku rakoviny prostaty (Maddison et al., 2004)

### ***1.1.3.7. p53***

Nádorový supresor p53 je sekvenčne špecifický transkripčný faktor a jeho gén sa nachádza v chromozómovej oblasti 17p13.1. K jeho zvýšenej expresii dochádza v reakcii na bunkové stresy, ktoré spôsobujú poškodenie DNA, ako je UV žiarenie, cytotoxické lieky alebo hypoxia. Pretože je kritickým prvkom v schopnosti regulovať bunkový cyklus, hrá rozhodujúcu úlohu pri prevencii onkogénnej transformácie prostredníctvom eliminácie alebo zastavenia rastu potenciálne malígnych buniek (Chappell et al., 2012). V homeostatickom stave bunky sa produkujú aj degradujú nízke koncentrácie proteínu p53, pričom jeho polčas rozpadu je približne 20 minút. Proteozomálna degradácia p53 je riadená E3 ubikvitín ligázou MDM2 (mouse double minute 2). Pri narušení homeostázy dochádza k fosforylácii p53 senzorickými kinázami (napr. ATR, ATM, Chk1, Chk2), čo vedie k jeho stabilizácii a jadrovej translokácii. Dimerizácia molekúl p53 vedie k tvorbe funkčných tetramérov, ktoré sa spájajú s konsenzuálnymi sekvenciami a tým podporujú génovú expresiu (Neilsen et al., 2011). Naopak mutácie v DNA-väzbovej doméne p53 môžu brániť tomuto proteínovému komplexu v asociácii s promotormi cieľových génov a jeho tumor supresívnym účinkom (Chappell et al., 2012). V predošlých prácach bol zdokumentovaný súbežný výskyt straty p53 a Rb proteínu u pokročilého metastatického (Kelly et al., 2017; Ku et al., 2017; Mu et al., 2017; Armenia et al., 2018) a neuroendokrinného (Tan et al., 2014; Aparicio et al., 2016) štádia rakoviny prostaty. Autori Mu et al. (2017) preukázali vzťah medzi podmienenou deléciou génu Tp53 a Rb1 u myší, ktorá bola postačujúca k vytvoreniu rakoviny vrátane varianty s častou neuroendokrinnou histológiou. Zároveň metaanalýza týchto súborov odhalila, že súbežné zmeny v génoch TP53 a Rb1 boli prítomné u 5% primárnych nádorov, 39% metastatických

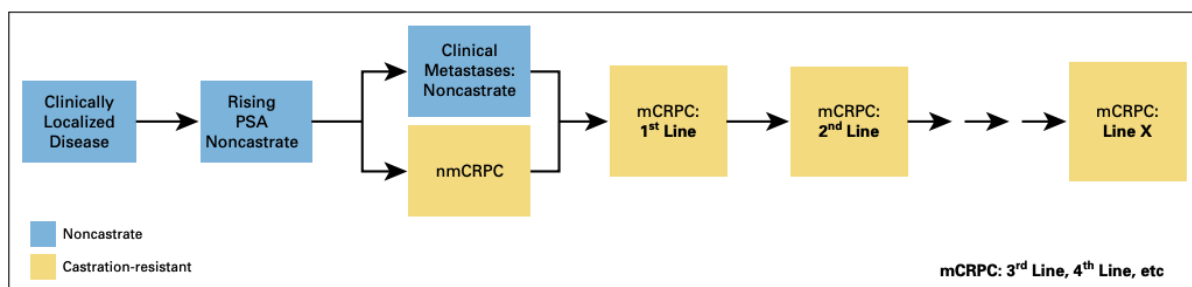
kastračne rezistentných nádorov s histológiou adenokarcinómu a u 74% metastatických kastračne rezistentných nádorov s neuroendokrinnou histológiou.

#### 1.1.3.8. AMACR

Okrem genetických zmien u rakoviny prostaty, dochádza aj k zmenám v metabolizme týchto buniek v porovnaní s benígnou hyperpláziou. Častým znakom nádorových buniek býva aj zvýšená prítomnosť mitochondriálneho a peroxizomálneho enzýmu alfa-metylacyl-CoA racemáza (AMACR, tiež známeho ako P504S), ktorý je zásadný pre metabolizmus mastných kyselín (Rubin et al., 2002; Yevglevskis et al., 2019). Zatiaľ čo niektoré benígne žľazy (napr. atrofické žľazy) a žľazy vykazujúce PIN sa môžu tiež farbiť pozitívne na AMACR, farbenie je zvyčajne viac fokálne a slabšie v porovnaní s neoplastickými žľazami. To je dôvod, prečo sa v niektorých laboratóriách používa imunohistochemické farbenie AMACR spolu s bazálnym markerom p63 pre spresnenie diagnózy rakoviny prostaty (AMACR+ p63-; Tchrakian et al., 2016).

#### 1.1.4. Liečba a vznik rezistencie

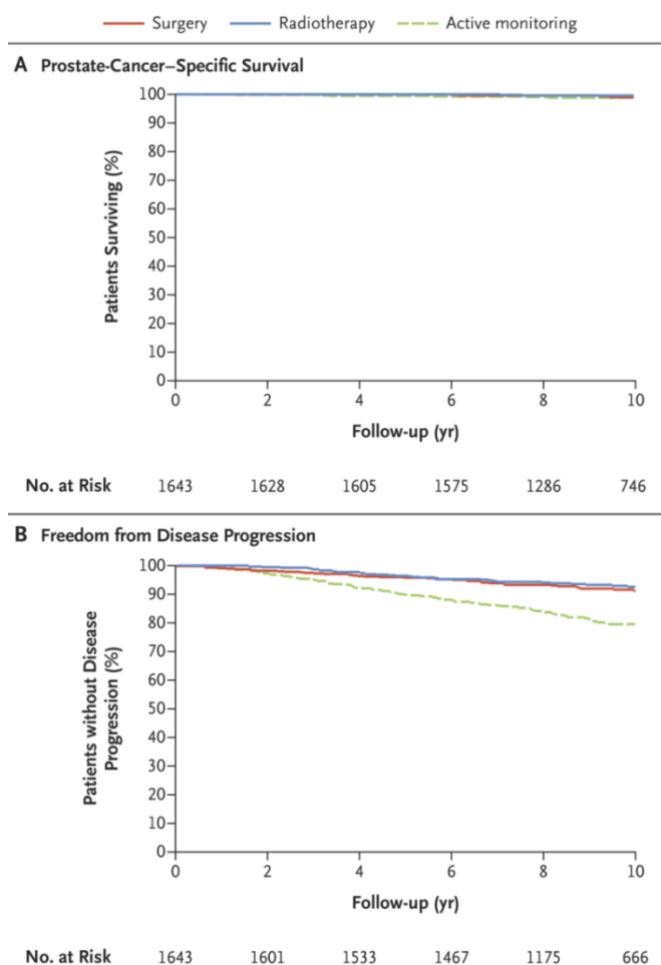
Liečba rakoviny prostaty sa odvíja od štádia pokročilosti a v princípe ju môžeme rozdeliť do dvoch kategórií tzv. androgen-senzitívnej a kastračne-rezistentnej formy. Kým do prvej skupiny pacientov označovanej aj „hormone naive“ patrí väčšina pacientov s lokalizovaným ochorením, u druhej skupiny kastračne rezistentných (CRPC) je prevažná časť metastázujúcich pacientov (mCRPC), u ktorých došlo k recidíve ochorenia po podanej androgén – depriváčnej terapii (ADT) (Scher et al., 2016).



Obrázok 1.6 Schematické znázornenie stavov pokročilosti rakoviny prostaty (Scher et al., 2016)

### 1.1.4.1. Liečba lokalizovaného karcinómu prostaty

Muži s diagnostikovaným lokalizovaným ochorením (bez pozitívnych lymfatických uzlín či vzdialených metastáz) majú primárne 3 možnosti liečby, a to manažment vyčkávania, chirurgický zákrok alebo ožarovanie. Manažment vyčkávania alebo aktívny dohľad, je obdobím kedy pacient ešte nepodstupuje definitívnu liečbu. Tieto prístupy zahŕňajú sériu testov PSA, klinických vyšetrení a biopsií prostaty s cieľom sledovať progresiu so zámerom liečiť tých, u ktorých sa rozvinie závažné ochorenie (Litwin and Tan et al., 2017).



Obrázok 1.7 Kaplan-Meierove odhady celkového prežitia a prežívania do progresie choroby podľa liečebnej skupiny (Hamdy et al., 2016).

Štúdia Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT) randomizovala 1643 mužov v Spojenom kráľovstve na aktívne monitorovanie (n = 545), chirurgický zákrok (n = 553) alebo ožarovanie (n = 545). V tejto štúdii aktívne monitorovanie zahŕňalo sériové testovanie PSA, kedy po 50% zvýšení hladiny PSA mohol pacient podstúpiť kuratívnu terapiu bez potreby opakovanej biopsie. Po 120 mesiacoch (10 rokov) ProtecT zistil, že 8 z 545 mužov (1,5 %) pri

aktívnom monitorovaní zomrelo na rakovinu prostaty, čo sa významne nelíšilo od 5 úmrtí po operácii (0,9 %) alebo od 4 úmrtí po ožiarení (0,7 %). Aj keď polovica mužov v aktívnom monitorovaní nakoniec dostala liečbu, táto skupina si zachovala lepšiu kvalitu života (Obrázok 1.7). Keďže o optimálnej stratégii sledovania sa naďalej diskutuje, tieto zistenia poskytujú podporu pre aktívny dohľad ako možnú voľbu pre mužov s nízkorizikovým ochorením (Hamdy et al., 2016; Litwin and Tan et al., 2017).

#### ***1.1.4.2. Androgén-deprivačná terapia (ADT)***

Androgén-deprivačná terapia (ADT) je prvolíniovou liečbou u mužov s metastatickým karcinómom prostaty alebo pri biochemickom relapse po prostatektómii či rádioterapii. Keďže je rakovina prostaty charakterizovaná expanziou epitelových buniek závislých od androgénového receptora, je ADT ako hormonálna terapia pomerne účinný prístup liečby pokročilých štádií ochorenia. V princípe sa zakladá na znížení hladín androgénov, ako hlavných stimulantov rastu a inhibítorov apoptózy u týchto buniek. To vedie k regresii nádorových buniek, pretože bez androgénov je pomer proliferujúcich buniek nižší voči programovanej bunkovej smrti, ktorá naopak narastá a spôsobí zánik mnohých nádorových buniek (Litwin and Tan, 2017; Crawford et al., 2019).

Primárne táto terapia cieľi na zníženie tvorby androgénov v Leydigových bunkách mužských semenníkov, čo je dosiahnuté buď chemickou kastráciou, alebo ich chirurgickým odstránením, orchiektómiou (Crawford et al., 2019).

K preukázateľným nežiaducim účinkom tejto terapie patrí znížená hustota minerálov v kostiach, metabolické zmeny, sexuálna dysfunkcia a návaly horúčav. Okrem toho bola hlásená aj srdcová morbidita a kognitívna dysfunkcia (Litwin and Tan, 2017). Ako už bolo spomenuté, aj keď sa tento prístup na počiatku zdá pomerne účinný, pri liečení pokročilého štádia ochorenia je vždy percento pacientov, u ktorých dochádza k recidíve ochorenia, a to v podobe kastračne rezistentného fenotypu (CRPC).

### **1.1.4.3. Vznik kastračne rezistentného fenotypu (CRPC) a androgénový receptor**

Do akej miery prispieva samotná ADT na vznik CRPC je stále predmetom diskusie. Je však isté, že ADT vytvára selekčný tlak podporujúci rast buniek, ktoré sú schopné proliferácie a prežívania aj pri nízkych hladinách androgénov. Značný podiel na týchto zmenách nesie samotný androgénový receptor (AR).

AR je kódovaný génom na chromozóme Xq12 a jeho transkripčný produkt plnej dĺžky má molekulovú hmotnosť 100 kDa. V normálnych bunkách sa AR skladá zo štyroch domén: trans-aktivačná doména (kódovaná exómom 1), DNA-väzbová doména (exóny 2–3), pántová oblasť (kódovaná 5' časťou exónu 4), a doména viažuca ligand (exóny 4–8). Cytosolický AR je sekvestrovaný proteínmi tepelného šoku (HSP) kým sa neviaže na androgény (Azad et al., 2015; Srinivas-Shankar et al., 2006). Ligandová doména preferuje dihydrotestosterón (DHT) a testosterón (v menšej miere), pričom vylučuje slabšie androgény a non-androgény (Azad et al., 2015; Srinivas-Shankar et al., 2006). Po väzbe ligandu prechádza AR konformačnou zmenou, v ktorej špirála 12 pokrýva vrečko viažuce hormóny, čo spôsobuje, že AR prijíma aktívnu konformáciu (Zhou et al., 2009). AR potom vytvorí homodimér, ktorý je transportovaný do jadra, kde sa viaže na DNA a aktivuje génovú transkripciu (Saraon et al., 2014; McCrea et al., 2016).

Doposiaľ boli popísané jeho viaceré modifikácie (Saraon et al., 2014; McCrea et al., 2016), ktoré umožňujú bunkám reflektovať prostredie zníženého androgénu:

- **Zvýšenie citlivosti AR na androgény** a to prostredníctvom amplifikácie AR, čo zvyšuje možnosť jeho obsadenia.
- **Lokálny nárast produkcie androgénov**, ktorý vzniká ako kompenzácia jeho celkového úbytku. S produkciou androgénov v nádorových prostatických bunkách súvisí zvýšená alebo znížená expresia enzýmov biosyntetickej dráhy androgénov alebo mutácie v génoch kódujúcich tieto enzýmy.
- **Zmena citlivosti AR** v dôsledku mutácii, ktoré vedú k jeho nešpecifickej a neselektívnej aktivácii hormónmi ako sú progesterón či estrogén. Navyše tieto mutácie paradoxne môžu viesť k aktivácii AR terapeutickými antagonistami receptora.
- **Variety androgénového receptora (AR-V)** Ich aktivácia je nezávislá od prítomnosti androgénu, pričom najfrekvencovanejšia je zostrihová varianta AR-V7 receptora.

- **Aktivácia koaktivátormi**, proteínmi podieľajúcimi sa na transaktivácii AR, ktorá umožní jeho odpoveď aj na veľmi nízke hladiny androgénov. Zvýšená expresia koaktivátorov TIF2 a SRC1 sa vyskytuje u neliečiteľnej formy rakoviny prostaty.
- **Aktivácia AR spôsobom nezávislým od ligandu** a to faktormi ako sú IGF-1, KGF a EGF. Tieto faktory sa viažu na receptor a následne indukujú AR cieľové gény aj bez prítomnosti androgénu.

#### **1.1.4.4. Prvá línia liečby CRPC**

- **Abiraterón acetát** sa využíva v 1. línii liečby kastroch rezistentnej formy ako blokátor tvorby androgénu v nadobličkách.
- **Enzalutamid** a **bikalutamid** sú blokátormi väzobného miesta androgénového receptora a pomerne často sa kombinujú s liečbou s abiraterón acetátom (Baciarello et al., 2016).

#### **1.1.4.5. Druhá línia liečby CRPC**

Pri recidíve tejto formy ochorenia, často aj vo forme ďalších metastáz, nasleduje liečba taxánovými chemoterapeutikami (Vlajnic et al., 2021), spolu s liekmi zabraňujúcimi rastu metastáz v kostiach.

- **Docetaxel** a **kabazitaxel**, sú taxánové liečivá viažuce tubulín a sú štandardnou terapiou pri liečbe rakoviny prostaty rezistentnej na kastráciu (CRPC). Nedávna práca naznačuje, že mikrotubulová sieť buniek prostaty je rozhodujúca pre jadrovú translokáciu a aktivitu androgénneho receptora. V štúdií Thadani-Mulero et al., (2014) autori použili súbor delečných mutantov androgénneho receptora na identifikáciu domény viažucej mikrotubuly androgénneho receptora, ktorá zahŕňa DNA väzbovú doménu plus pántovú oblasť. Existencia dvoch klinicky zozriehových variantov androgénneho receptora, ARv567 a ARv7, vedie k ich odlišnému spájaniu s mikrotubulmi a motorickým proteínom dyneínu, čo vedie k rozdielnej citlivosti na taxány *in vitro* a *in vivo*. ARv7, ktorému chýba pántová oblasť, sa na rozdiel od ARv567 neusadzoval spolu s mikrotubulmi ani neprecipitoval s motorickým proteínom dyneínu. Mechanické výskumy odhalili, že jadrová akumulácia a transkripčná aktivita ARv7 nebola ovplyvnená liečbou taxánom. Na rozdiel od toho, zozriehový variant ARv567 interagujúci s mikrotubulmi bol citlivý na stabilizáciu mikrotubulov indukovanú taxánom (Thadani-Mulero et al., 2014).



- **Denosumab**, terapeutická monoklonálna protilátka pôsobiaca proti cytokínu RANKL (receptor activator of NF $\kappa$ B ligand) podporuje tvorbu a propagáciu osteoklastov. V porovnaní s kyselinou zoledrónovou, zavedenou preventívnou terapiou pre mužov s kastračne recidivujúcou rakovinou prostaty a kostnými metastázami, denosumab oddialil prvú príhodu súvisiacu so skeletom o 3,6 mesiaca s podobne vysokými hladinami toxicity, ale ľahším podávaním (Litwin and Tan et al., 2017)
- **Rádium-223**,  $\alpha$ -žiariv, ktorý sa selektívne viaže na kostné metastázy, predĺžil medián celkového prežívania o 3,6 mesiaca a čas do prvej príhody súvisiacej so skeletom o 5,8 mesiaca v porovnaní s placebom. Radium-223 tiež spomalilo pokles kvality života, pričom u niektorých mužov došlo k celkovému zlepšeniu (Litwin and Tan et al., 2017).

#### ***1.1.4.6. Neuroendokrinný karcinóm prostaty (NED)***

Neuroendokrinný karcinóm prostaty (NED) sa považuje za jednu z najagresívnejších foriem rakoviny prostaty. Približne 1% primárnych nádorov prostaty je pri diagnóze klasifikované ako NED nádory. Naproti tomu u pacientov s pokročilým nádorom prostaty je 30% zastúpenie prípadov vykazujúcich neuroendokrinné ložiská (Macedo-Silva et al., 2021; Yamada et al., 2021). Rovnako sa tento fenotyp objavuje pri rezistencii na druhú generáciu terapií zameraných na AR, a to v podobe neuroendokrinného kastračne rezistentného karcinómu prostaty (CRPC-NE). Ten je na rozdiel od ostatných kastračne rezistentných štádií charakteristický stratou androgénového receptora, čím sa stáva od neho nezávislý. Namiesto toho tieto bunky vykazujú expresiu NED markerov ako sú synaptophysin, chromogranin A a CD56, pričom tieto bunky si kompenzujú androgénovú signalizáciu zvýšením aktivity rastových faktorov ako je fibroblastový rastový faktor a MAPK. Tieto bunky sú často riadené aj amplifikáciou génu MYCN, kódujúceho N-Myc proteín a rovnako frekventovaná býva aj strata tumor supresorových génov RB1 a TP53 (Labbé et al., 2018).

#### ***1.1.4.7. Nové prístupy v liečbe mCRPC***

Keďže možnosti liečby pacientov s nevyliciteľným metastatickým karcinómom prostaty rezistentným na kastráciu (mCRPC) sú značne obmedzené, je nutné vyvíjať nové účinné terapeutické možnosti (Drápela et al., 2020).

#### 1.1.4.7.1. Imunoterapia

Imunoterapia nádorov spôsobila revolúciu v liečbe rakoviny tým, že poskytuje široký rozsah aplikácií pri liečbe mnohých druhov rakoviny (Jeong and Kwak, 2022). Pre liečbu mCRPC pacientov bola v roku 2010 v USA prijatá prvá imunoterapeutická látka, sipuleucel-T (Kantoff et al., 2010), ktorá využíva autológne mononukleárne bunky periférnej krvi aktivované *ex vivo* rekombinantným fúznym proteínom PA2024 k aktivácii cytotoxických T buniek. Sipuleucel-T zlepšuje celkové prežitie o štyri mesiace, ale prežívanie bez progresie u mCRPC pozorované nebolo (Cheever et al., 2011). Aj keď imunoterapia sipuleucelom-T pre liečbu mCRPC nie je celkom postačujúca, svoj potenciál majú inhibítory imunitných kontrolných bodov (Jeong and Kwak, 2022).

Ipilimumab je inhibítorom CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), negatívneho regulátoru funkcie T imunitných buniek. Do tretej fázy klinických skúšok tohto lieku boli zapojení mCRPC pacienti s kostnými metastázami, ktorí progredovali po liečbe docetaxelom. Ipilimumab im bol podávaný v kombinácii s rádioterapiou a hoci v primárnej analýze oproti kontrole nebol rozdiel, pri celkovom prežívaní pacientov bolo pozorované mierne zlepšenie po podaní lieku (Kwon et al., 2014).

Väzba ligandu PD-L1 na PD-1, povrchový receptor T-buniek, slúži ako ďalší dôležitý imunitný kontrolný bod, ktorý suprimuje imunitu. V mikroprostredí nádoru malígne bunky vykazujú vysokú expresiu PD-L1, čo spôsobuje vyhýbanie sa imunitnému dohľadu (Jeong and Kwak, 2022). Anti-PD/PD-L1 protilátky obnovujú aktivitu T buniek, pričom pre protinádorovú imunitnú aktivitu musia byť prítomné neoantigény exprimované na povrchu nádorových buniek (Sakuishi et al., 2010). V kohorte pacientov s pokročilým karcinómom prostaty, ktorí exprimovali viac ako 1% PD-L1 v nádore alebo stróme, vykazovalo odpoveď na pembrolizumab 17,4% pacientov. Zvyšní pacienti boli bez odpovede, alebo boli v pokročilom štádiu ochorenia, ktoré bránilo v použiteľnosti pembrolizumabu (Abida et al., 2019; Hansen et al., 2018). V dôsledku vyššej mutačnej záťaže u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc, melanómu a rakoviny obličkových buniek dochádza u týchto nádorov k lepšej odpovedi na inhibítory imunitných kontrolných bodov (Topalian et al., 2016).

#### 1.1.4.7.2. PARP inhibítory

Poly-(ADP-ribóza)polymeráza-1 (PARP-1) je jadrový enzým, ktorý slúži na PARylovanie cieľových proteínov, jednak pri poškodení DNA aj pri kontrole normálnej replikácie. Po poškodení DNA podporuje aktiváciu a BER (base excision repair) v opravách jednoreťazových zlomov (Timinszky et al., 2009). Inhibítory PARP-1 (PARPi) boli identifikované ako veľmi účinné voči nádorom s mutáciami v BRCA1/2, podľa princípu tzv. syntetickej letality (Goldstein et al., 2015). Perturbácie BRCA1/2 ohrozujú dráhu opravy homológnej rekombinácie (HR), ktorá je rozhodujúca pre bezchybnú opravu zlomov dvojláknovej DNA, čo vedie k oprave DNA pomocou NHEJ (non-homologous end joining), ktorá je náchylná na chyby, vedie k nestabilite genómu a karcinogézi. Podľa pôvodného konceptu bola kombinovaná ablácia HR (napr. prostredníctvom mutácie BRCA1/2) a BER reparačných dráh (cez PARPi) zodpovedná za nadmernú akumuláciu poškodenia DNA a smrti nádorových buniek.

Recentná práca ale odhalila, že inhibícia PARP vedie predovšetkým k zrýchleniu pohybu replikačnej vidlice a vzniku chýb, ktoré sú v kombinácii s defektom v homológnej rekombinácii pre nádorové bunky letálne (Maya-Mendoza et al. 2018). Táto terapia je už dostupná pre nádory s defektom v homológnej rekombinácii, napr. u pacientky s ovariálnym karcinómom a mutáciou BRCA1/2 (Geethakumari et al., 2017). Mateo et al. (2015) pozoroval sľubnú odpoveď na novú liečbu PARP inhibítormi aj u pokročilých kastrocačne-rezistentných nádorov prostaty, u ktorých bola pozorovaná rozsiahla chromozomálna nestabilita a defekty v proteínoch zodpovedných za opravu DNA, najmä v BRCA1/2 a ATM.

#### 1.1.4.7.3. Gemcitabín a Chk1 inhibítor

Sľubnou cestou ako účinne zabrániť proliferácii buniek je spôsob synergetickej indukcie poškodenia DNA s inhibíciou Chk1. Tento prístup bol testovaný pri mnohých typoch malignít a nedávna práca (Samadder et al., 2017; Drápela et al., 2020) ukázala možné využitie pri chemorezistentnom mCRPC. Checkpoint kináza 1 (Chk1) je konzervovaná proteínkináza zapojená do opráv poškodenia DNA, čo zabraňuje akumulácii chýb a kontroluje pravidelnú duplikáciu genómu. Použitím inhibítora Chk1 SCH900776 (tiež známeho ako MK-8776) alebo jeho účinnejšieho analógu SCH900776 (MU380) v kombinácii s antimetabolitom gemcitabínom preukázateľne dochádzalo k mitotickej katastrofe a smrti nádorových buniek. Tento prístup môže umožniť zníženie dávky gemcitabínu a tým minimalizovať nežiaducu

toxicitu a môže predstavovať terapeutickú možnosť pre pacientov s nevyliciteľnou formou mCRPC (Drápela et al., 2020) .

## **1.2. EPITELOVO-MEZENCHÝMOVÁ TRANZÍCIA**

Prechod buniek od epitelového k mezenchymálnemu stavu, nazývaný aj epitelovo-mezenchymálna tranzícia (EMT), je základným procesom v morfogénze viacbunkových organizmov. V tomto procese dochádza k vzniku mezenchymálnych buniek v dôsledku straty polarity epitelových buniek, vymiznutia bunkového spojenia, reorganizácie cytoskeletu a zmeny distribúcie organel (Alves et al., 2009). To má za následok zvýšenie motility týchto buniek a ich migráciu do cieľových oblastí embrya, kde sa diferencujú do ďalších bunčných typov. Ako prvá EMT popísala Elizabeth Hay v roku 1982 (Greenburg et al., 1982) a dnes je známe, že má zásadnú úlohu vo viacerých krokoch embryonálnej morfogénzy (Nieto et al., 2016; Lim et al., 2012). Počas vývoja tento program funguje na to, aby zabezpečil vzájomné premeny buniek, ktoré sú potrebné na vytvorenie odlišných typov buniek v metazoanoch. Napríklad počas gastrulácie program EMT vedie k vzniku mezodermy a primárneho mezenchýmu, ako aj k migračným bunkám neurálnej lišty a jeho narušenie vedie k závažným vývojovým defektom (Zhang et al., 2018).

Okrem toho má program EMT zásadnú úlohu v rôznych patologických procesoch vrátane hojenia rán, fibrózy tkaniva a progresie rakoviny (Nieto et al., 2016; Shibue et al., 2017). Vo všetkých týchto procesoch EMT a reverzná časť tohto programu, nazývaná mezenchymovo-epiteliálny prechod (MET), vyvoláva okrem vyššie uvedených morfológických rozdielov viaceré základné zmeny vo fyziológii buniek. Napríklad počas hojenia epitelovej rany sa životaschopné epitelálne bunky na okraji miesta poranenia podrobujú čiastočnému EMT, aby získali pohyblivosť a pohybovali sa ako koordinovaná skupina buniek, aby pomohli rekonštruovať vrstvu epitelových buniek. Nakoniec sa kvázi-mezenchymálne bunky vytvorené aktiváciou programu EMT vrátia k svojmu epitelálnemu fenotypu prostredníctvom MET, aby sa obnovila integrita pôvodného epitelu (Zhang et al., 2018).

U rakoviny je proces EMT spojený tiež so vznikom metastáz, kde zvýšená motilita a invazívnosť je spájaná so stavom mezenchymálnych buniek. V predošlých štúdiách na myšiacich modeloch a ľudských rakovinových bunkových kultúrach bolo preukázané, že indukcia programu EMT umožňuje rakovinovým bunkám stratiť bunkové spojenia, degradovať

lokálnu bazálnu membránu prostredníctvom zvýšenej expresie rôznych enzýmov degradujúcich maticu, a tak podporovať ich migráciu a inváziu jednotlivých alebo viacerých buniek naraz (Zhang et al., 2018).

Množstvo štúdií uvádza, že po aktivácii EMT u rakoviny pankreasu, prostaty, kolorektu a vaječníkov dochádza k získaniu kmeňovosti týchto buniek. Koncept nádorových kmeňových buniek CSC (cancer stem cells) je založený na pozorovaniach, ktoré potvrdili fenotypovo odlišné subpopulácie rakovinových buniek koexistujúcich v rámci jedného nádoru. Pritom iba veľmi malý počet rakovinových buniek vykazuje určitú podobnosť s nenádorovými kmeňovými bunkami, vrátane vlastnej obnovy a schopnosti regenerovať celé neoplastické nádorové tkanivo (Shaw et al., 2016). Preto vznikol predpoklad že, CSC hrajú zásadnú úlohu pri pokračujúcom raste nádoru, iniciácii metastáz, rezistencii na lieky a relapse nádoru po liečbe. Rovnako je diskutovaná EMT vo vzťahu ku kmeňovosti buniek, kde v prípade straty funkcie RB1 a TP53 u adenokarcinómoch prostaty umožňuje plasticitu línie lumenálnych epiteliálnych buniek závislých od androgénneho receptora, čo im umožňuje posunúť sa do AR-nezávislých bazálnych buniek, čo vedie k odolnosti na liečbu anti-androgénmi (Mu et al., 2017; Ku et al., 2017) Zároveň posledné práce ukazujú, že bunky s preukázateľne mezenchymálnym fenotypom vykazujú rezistenciu na liečbu docetaxelom (Šimečková et al., 2019)

### **1.2.1. Slug ako regulátor expresie E-kadherinu**

Slug patrí do Snail rodiny „zinc-finger“ transkripčných faktorov podieľajúcich sa na prechode od epitelového štádia buniek k mezenchymálnemu v procese epitelovo-mezenchymálnej tranzície počas embryonálneho vývoja (Cano et al., 2000; Nieto et al., 2002). Slug sa viaže v promótorovej oblasti E-cadherinu, čím inhibuje jeho expresiu (Cano et al., 2000). To má za následok stratu adherentnosti buniek, čo vedie k ich možnému uvoľňovaniu, diseminácii a extravazácii do krvného riečiska. Počas embryogenézy tento proces vedie k migrácii buniek a pri rozvoji nádoru to vedie k migrácii a invázií nádorových buniek (Cobaleda et al., 2007).

Zvýšenú hladinu Snail (gen SNAI1, Snail Family Transcriptional Repressor 1) a Slug (gen SNAI2) počas karcinogenézy popisujú viaceré práce (Cobaleda et al., 2007; Wang et al., 2013; Esposito et al., 2015) a jeho úloha bola popísaná napríklad v súvislosti s vývojom BLCL (basal-like breast cancer) (Liu et al., 2013; Proia et al., 2011). Napriek jeho častej zvýšenej prítomnosti, SNAI2 býva veľmi zriedkavo mutovaný alebo amplifikovaný u BLBC.

V normálnom tkanive má Slug proteín veľmi krátku životnosť a jeho stabilita býva podobne ako u mnohých labilných transkripčných faktorov regulovaná ich degradáciou prostredníctvom postranlačných modifikácií (PTM). Preto ako príčina jeho zvýšenej prítomnosti môže byť práve zvýšená stabilita spôsobená zníženou proteazomálnou degradáciou (Proia et al., 2011). Jedným z mechanizmov PTM je aj fosforylácia Slug prostredníctvom GSK3b kinázy, čo vedie k ubikvitinácii niekoľkými E3 ligázami (FBXL14, beta-TrCP a CHIP) (Kao et al., 2014; Wu et al., 2005, 2012; Vernon a LaBonne, 2006). Predchádzajúce štúdie však preukázali, že inaktíváciou GSK3b nedochádzalo ku korelácii s nadmerným výskytom Slug u rakoviny a jeho proteazomálna degradácia je nezávislá od fosforylácie sprostredkovej GSK3b (Lander et al., 2011; Viñ as-Castells et al., 2010). Ďalší z možných PTM mechanizmov stabilizácie Slug popisujú autori Zhou et al., (2016), ktorí pozorovali vzťah zvýšenej prítomnosti SIRT2 deacetylázy spolu so Slug proteínom, čo naznačuje význam acetylácie Slug pre jeho degradáciu na proteazómu.

### **1.3. UBIKVITINÁCIA AKO POSTTRANSLAČNÁ MODIFIKÁCIA**

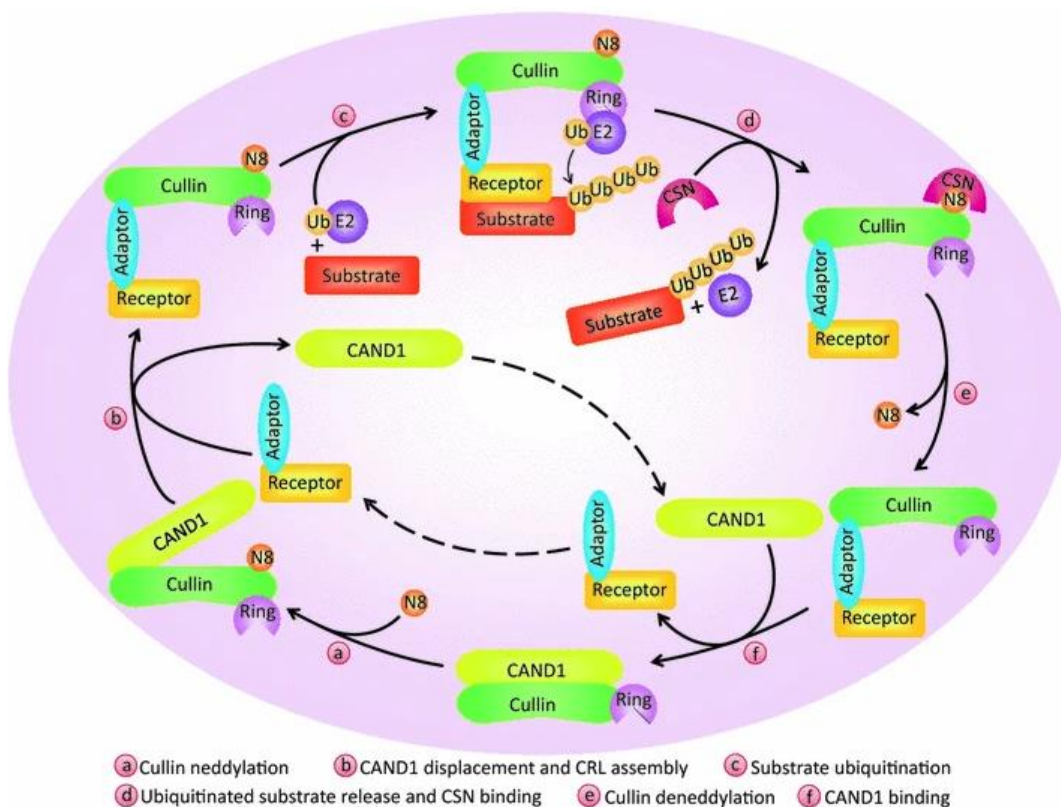
Ubikvitinácia, ako jedna z postranlačných modifikácií proteínov, zabezpečuje homeostázu a správne fungovanie buniek. Zmeny na úrovni ubikvitinácie sa ukazujú ako kľúčové pre viaceré typy ochorení, vrátane rakoviny prostaty. Ubikvitín-proteazomový systém (UPS) je proces, v ktorom sú nepotrebné a nefunkčné proteíny určené k degradácii na 26S proteazóme, značené ubikvitínom v procese ubikvitinácie. V tomto procese sú zapojené tri enzýmy a to E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) a E3 (substrate-specific ubiquitin ligase), pričom najväčšia pozornosť sa venuje hlavne E3 ligázam (Senft et al., 2018). Na základe charakteristickej domény a mechanizmu prenosu ubikvitínu na substrátový proteín možno E3 ligázy rozdeliť do troch hlavných skupín:

- HECT (homologous to E6-associated protein C terminus),
- RBR (RING-in-between-RING)
- RING (Really Interesting New Gene) E3 ligázy (Cai et al., 2020).

### 1.3.1. Cullin RING E3 ligázy a regulácia ich aktivity

Cullin RING E3 ligázy (CRL) sú jednou z najväčších skupín E3 ligáz. Ich aktivita je efektívne regulovaná prostredníctvom nedylácie a denedylácie (Obrázok 1.8). Interakcie receptor-adaptorového komplexu s N-terminálnou časťou cullinu sú blokované CAND1 (cullin-associated and neddylation-dissociated 1). V procese nedylácie dochádza k väzbe jednej molekuly Nedd8 na cullin, tým sa odstráni väzba s CAND1 a dôjde k obnove aktívnej formy ligázy. K denedylácii dochádza následne po disociácii polyubikvitinovaného substrátu od CRL. Nedd8 je oddelený pomocou CSN (COP9 signalosome) a dôjde k inaktivácii CRL (Cui et al., 2016).

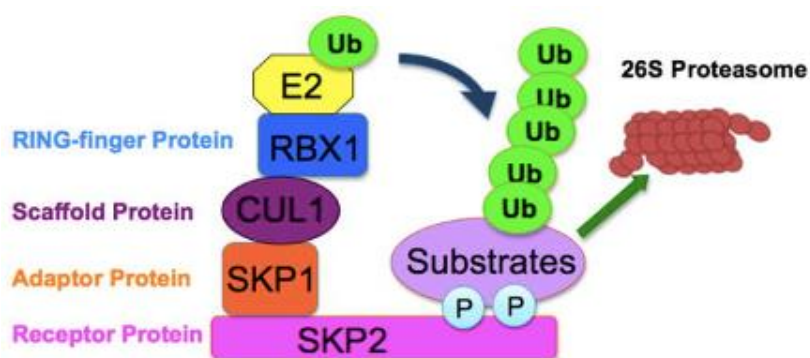
Cullin-RING ligázy sa vyznačujú prítomnosťou proteinového lešenia Cullin a sú rozdelené na niekoľko podskupín. Jednou z nich je SCF (Skp1/Cullin1/F-box), kde kľúčovú úlohu má jeho F-box podjednotka, ktorá rozpoznáva špecifickú skupinu substrátov a tým zabezpečuje ich ligáciu k ubikvitínu.



**Obrázok 1.8** Dynamická regulácia aktivity CRL (cullin ring ligase) nedyláciou a denedyláciou - väzba CAND1 na nemodifikovaný cullin blokuje interakciu cullinu s modulom substrátového receptoru a adaptéru. Nedylácia Cullinu podporuje disociáciu cullinu od CAND1 a obnovuje CRL v aktívnej konformácii, čo vedie k ubikvitinácii substrátu. Po oddelení ubikvitinovaného substrátu z CRL sa NEDD8 odstráni pomocou CSN (COP9 signalosome) z cullinu na recykláciu. Nakoniec sa CAND1 viaže na cullin a inaktivuje CRL (Cui et al., 2016).

### 1.3.1.1. Skp2

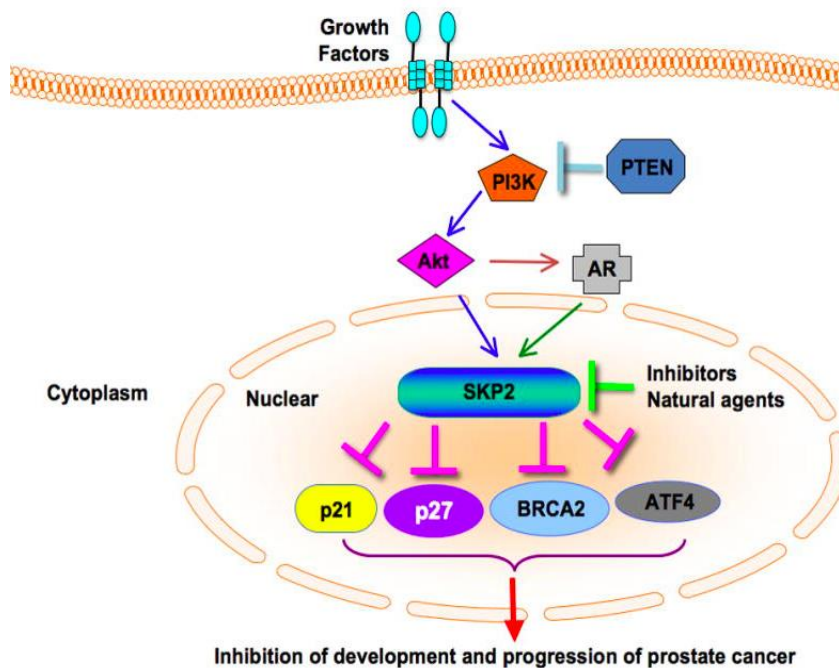
Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) je jedným z členov F-box rodiny SCF E3 ligáz (Masuda et al., 2002). Skp2 bol pôvodne objavený spolu s Skp1 ako proteín spojený s S-fázovou kinázou Cdk2 a cyklínom A, a podľa toho bol i pomenovaný (Hersko et al., 2008). Skp2 F-box podjednotka rozpoznáva a viaže ako substrát predovšetkým inhibítor cyklin-dependentných kináz p27<sup>Kip</sup>, ktorý je následne ubikvitinovaný celým SCF<sup>Skp2</sup> E3 ligázovým komplexom. Takto modifikovaný p27<sup>Kip</sup> je rozpoznávaný a degradovaný 26S proteazómom (Obrázok 1.9), čím je zabezpečený vstup bunky z G0/G1 do S-fázy (Masuda et al., 2002).



Obrázok 1.9 Schematické znázornenie SCF<sup>Skp2</sup> komplexu (Wang et al., 2012).

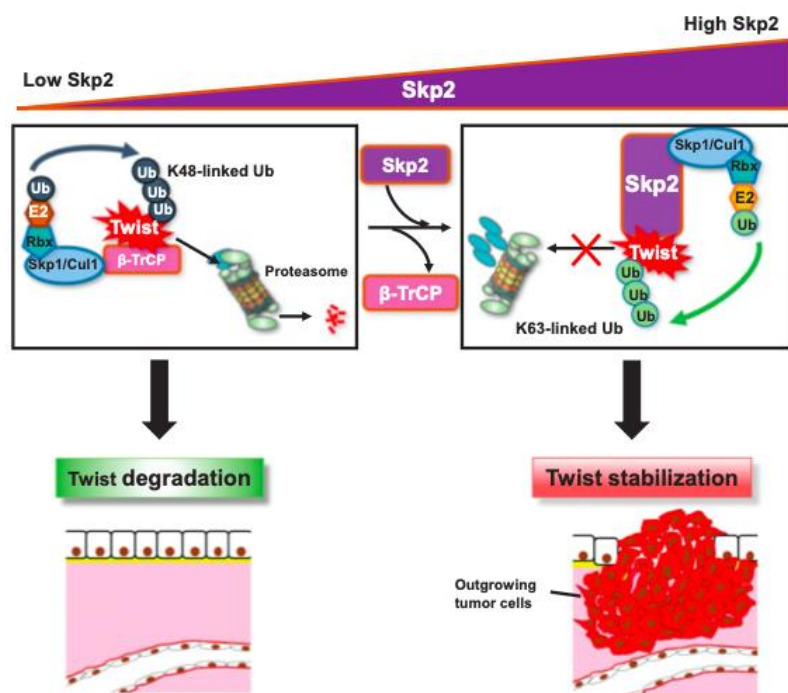
Vysoké hladiny Skp2 boli pozorované u viacerých typov rakoviny, ktoré sú spájané s nízkym prežívaním a nepriaznivými terapeutickými výsledkami, čo naznačuje, že Skp2 sa významnou mierou podieľa na tumorigénnej aktivite týchto buniek (Cai et al., 2020). Pri rakovine prostaty dochádza k zvýšenej prítomnosti Skp2, predovšetkým z dôvodu delécie PTEN a s ňou spojenou zvýšenou aktivitou PI3K/Akt dráhy (Obrázok 1.10), ktorá má vplyv na jeho zvýšenú stabilitu. To následne vplýva na ďalšie dráhy spojené s bunkovým cyklom, homológnu rekombináciu a senescenciou buniek. Mikročipovou analýzou 622 vzoriek z radikálnej prostatektómie pacientov bola preukázaná pozitívna korelácia medzi zvýšenou expresiou Skp2 a vysokým Gleason skóre s vysokými hladinami PSA v sére (Yang et al., 2002). Zároveň títo pacienti skôr podstupovali dodatočnú hormonálnu liečbu po radikálnej prostatektómii (Yang et al., 2002). Podobne autori Izhak et al. (2003) pozorovali silnú koreláciu medzi zvýšenou expresiou Skp2 a Ki67, markerom proliferácie buniek a jeho zvýšená expresia bola potvrdená pri metastatickom ochorení.





*Obrázok 1.10 Zvýšená prítomnosť Skp2 v dôsledku PTEN delécie a s ňou spojenou zvýšenou aktivitou Akt. Výsledná stabilizácia Skp2 vplýva na bunčný cyklus, homológnu rekombináciu a senescenciu buniek (Wang et al., 2012).*

Vzťah metastázovania a Skp2 bol tiež popísaný skupinou Ruan et al., (2017) kde autori preukázali možnú spojitosť práve s epitelovo-mezenchýmovou tranzíciou prostredníctvom stabilizácie Twist proteínu, jedného z markerov EMT (Obrázok 1.11). Pri zvýšenej expresii Skp2 dochádzalo k ubikvitinácii Twist proteínu cez lyzín K63 a k jeho následnej stabilizácii. Naproti tomu, pri nižších hladinách Skp2 dochádzalo k ubikvitinácii cez lyzín K48 prostredníctvom beta-TrCP E3 ubikvitín ligázou, ktorá naopak vedie k jeho degradácii. Rovnako bola skupinou Lu et al., (2017) preukázaná korelácia zvýšeného Skp2 a EZH2 u myši s rekurentnou formou rakoviny prostaty a s deléciou v génoch PTEN a p53.



Obrázok 1.11 Pri zvýšení Skp2 dochádza k ubikvitinácii cez lyzín 63 čo vedie k stabilizácii cieľového Twist proteínu u kastračne rezistentného karcinómu prostaty (Ruan et al., 2018).

## 1.4. PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

Na rozdiel od konvenčnej liečby, pri personalizovanej liečbe rakoviny môže pacient získať špecifickú liečbu „šitú na mieru“. V súčasnosti sú dostupné viaceré technológie vrátane sekvenovania alebo mikroarray, ktoré dávajú informácie o zmenách na úrovni mnohých génov (Lakshmanan et al., 2020). Sekvenovanie je jedným z prístupov k identifikácii špecifickej mutácie, na ktorú je možné uplatniť cieleňú liečbu. Mnohí pacienti s pokročilým štádiom rakoviny prostaty však môžu mať mutácie neznámeho významu alebo mutácie, na ktoré nemáme žiadnu účinnú terapiu (Gleave et al., 2020). Sekvenovanie súboru 501 pacientov s rakovinou prostaty, potvrdilo iba troch pacientov z celého súboru ako nositeľov „driving“ mutácie, na ktorú bolo možné cieľiť liečbu. Z tohto dôvodu samotné celogenómové sekvenovanie nie je postačujúci prístup pre personalizovanú medicínu (Pauli et al., 2017; Rennert et al., 2016).

Rakovina prostaty sa vyznačuje inter- aj intra-tumorovou heterogenitou, ktorá celkovo môže sťažovať klasifikáciu nádoru, a tak prispievať k terapeutickému rezistencii (Xia et al., 2019). Možným riešením je použitie vhodného modelu, zachytávajúceho prítomné mutácie a heterogenitu buniek, čo by umožnilo testovanie potenciálnych liečiv alebo ich kombinácií s už doposiaľ používanými prístupmi (Elbadawy et al., 2020). Xenoimplantáty odvodené od

pacienta (PDX) sa ukázali ako dôležitá platforma na objasnenie nových liečebných postupov a biomarkerov v onkológii. Modely PDX sa používajú na riešenie klinicky relevantných otázok, vrátane heterogenity nádoru k terapeutickému reakcii, vzorcov evolučnej dynamiky rakoviny počas progresie nádoru pod tlakom liekov a mechanizmov rezistencie na liečbu (Byrne et al., 2017).

### **1.4.1. 3D organoidové modely**

Vhodnými modelmi v personalizovanej medicíne môžu byť aj samo-organizované trojrozmerné kultúry organoidov, ktoré by mali do značnej miery rekapitulovať heterogénne zloženie pôvodného nádoru a zachovať prostredie génových mutácií (Xia et al., 2019; Pauli et al., 2017; Weeber et al., 2015; Kretschmar et al., 2016). Clevers a kolegovia boli prví, ktorí ustanovili bunkovú kultúru geneticky stabilných organoidov prostaty odvodených z dospelých lumenálnych a bazálnych kmeňových buniek (Karthaus et al., 2014; Sato et al., 2009). Dôležité je, že identifikovali potrebné faktory podporujúce proliferáciu, aktiváciu Wnt dráhy a inhibíciu BMP dráhy, čím zabezpečili rast kmeňových buniek (Xia et al., 2019). Schopnosť pestovať organoidy s vysokou účinnosťou zo zdravých dospelých ľudských kmeňových buniek pripravila cestu pre vytvorenie organoidov z nádorového tkaniva pacienta (Drost et al., 2018). Doteraz sa ukázalo, že kultúry organoidov si počas dlhodobej kultivácie zachovávajú mutačné vzory bez genetických zmien pri niekoľkých typoch rakoviny, ako sú hrubé črevo, pažerák, pankreas, žalúdok, pečeň, endometrium a prsník (Schütte et al., 2017; Sato et al., 2011; Van de Wetering et al., 2015; Fujii et al., 2016; Boj et al., 2015; Huang et al., 2015; Bartfeld et al., 2015; Broutier et al., 2017; Turco et al., 2017; Sachs et al., 2018). Podobné výsledky boli dosiahnuté s použitím bioptických vzoriek metastatického hrubého čreva a prsníka (Weeber et al., 2015; Drost et al., 2018; Sachs et al., 2018). Tento prístup k bunkovej kultivácii bol tiež testovaný na karcinóme prostaty v niekoľkých štúdiách (Gao et al., 2014; Linxweiler et al., 2019; Richards et al., 2019; Servant et al., 2021) s využitím viacerých kultivačných prístupov zhrnutých v Tabuľka 1.1.

Tabuľka 1. Kultivačné podmienky pre prostatické nádorové organoidy a sféroidy

<i>Referencie</i>	Liu et al. 2012	Drost et al. 2016	Beshiri et al. 2018	Linxweiler et al. 2019	Richards et al. 2019
<i>Médium</i>	F-medium	ADMEM/F12	ADMEM/F12	DMEM/F-12	KSFM
<i>Matrix feeder</i>	+	+	+	-	+
<i>FBS</i>	+	-	-	-	+
<i>BSA</i>	-	-	-	-	+
<i>B27 suplement</i>	+	+	+	+	-
<i>hESC suplement</i>	-	-	-	+	-
<i>EGF</i>	+	+	+	-	-
<i>FGF 2</i>	-	+	+	+	-
<i>FGF10</i>	-	+	+	-	-
<i>cholera toxín</i>	+	-	-	-	-
<i>hydrokortizón</i>	+	-	-	-	-
<i>R-spondin 1</i>	-	+	+	-	-
<i>noggin</i>	-	+	+	-	-
<i>dihydrotestosterón</i>	-	+	+	+	+
<i>nikotínamid</i>	-	+	-	-	-
<i>A 83-01</i>	-	+	+	-	-
<i>SB 202 190</i>	-	+	-	-	-
<i>Prostaglandin E2</i>	-	+	+	-	-
<i>Inzulín</i>	+	-	-	-	-
<i>Adenín</i>	+	-	-	-	-
<i>N-acetyl-L-cysteín</i>	-	+	+	-	-
<i>Y-27632</i>	+	+	+	+	-
<i>merkaptóetanol</i>	-	-	-	+	-

**A83-01** - inhibitor TGF $\beta$ , **ADMEM/F-12** - advanced Dulbecco's modified eagle medium F-12, **BSA** - bovine serum albumin, **DMEM/F-12** - Dulbecco's modified eagle medium F-12, **EGF** - epithelial growth factor, **FBS** - fetal bovine serum, **FGF10** - fibroblast growth factor 10, **FGF2** - fibroblast growth factor 2, **KSFM** - keratinocyte serum-free medium, **SB 202 190** - inhibitor p38, **Y-27632** - Rock inhibitor.

#### **1.4.1.1. Podmienky kultivácie patientskych organoidov prostaty**

Ako už bolo zmienené v predošlej kapitole, ustanoviť kultivačné podmienky zložené z potrebných rastových faktorov a inhibítorov podporujúcich rast organoidov sa podarilo kolektívu Hansa Cleversa. Vo svojej práci, zameranej predovšetkým na kultiváciu kmeňových buniek, stanovili kľúčové faktory potrebné pre zachovanie ich nediferencovaného stavu. Ich rast v bez sérovom médiu, je zabezpečený vďaka prítomnosti faktorov nogginu, inhibítora BMP4 (bone morphogenic protein 4) a R-spondinu 1, zabezpečujúceho Wnt signalizáciu dôležitú pre rozvoj organoidu (Gleave at al., 2020). Okrem toho, sú potrebné aj ďalšie faktory ako je EGF stimulujúci rast a inváziu buniek. Zároveň tento faktor redukuje apoptózu epiteliálnych buniek podobne ako Rho-kinázový inhibítor Y-27632, ktorý predchádza anoikis-sprostredkovanvej bunkovej smrti. Ďalšie potrebné faktory pre spustenie bunkovej proliferácie sú FGF2 a FGF10 (fibroblast growth factor 2 a 10). Inhibítora A83-01 blokuje ALK5 v TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) signálnej dráhe, čo taktiež zabezpečuje ich neprerušenu proliferáciu. V tomto médiu je zahrnutý aj N-acetylcysteínu ako antioxidant, chrániaci bunky pred reaktívnymi formami kyslíka a nikotínamid, poskytujúci dôležité zložky pre metabolické koenzýmy (Gleave at al., 2020).

Pre kultiváciu organoidov prostaty je potrebné do média zahrnúť aj DHT (dihydrotestosteron) a PGE2 (prostaglandín E2), mediátor zápalu slúžiaci k regulácii cytokínov (Gleave at al., 2019). Ďalším z faktorov je p38 MAPK inhibítora - SB 202 190. Aj keď ho niektoré práce uvádzajú ako esenciálny faktor (Karthaus et al., 2014; Drost et al., 2016; Sato et al., 2011), najnovšie štúdie poukazujú na to, že p38 inhibícia v skutočnosti prekáža v raste prostatických organoidov prostredníctvom znižovania aktivity PI3K/Akt dráhy (Beshiri et al., 2018).

#### **1.4.2. Ex vivo kultivácia nádorového tkaniva**

Ďalší prístup k personalizovanému skríningu liekov predstavuje krátkodobá *ex vivo* tkanivová kultúra, ktorá si zachováva všetky zložky mikroprostredia nádoru. Zároveň nádorové bunky tohto modelu vykazujú *de novo* proliferatívnu kapacitu, ktorú je možné využiť k predpovedaniu terapeutickje odpovede a identifikáciu nových cieľov pri pokročilom ochorení (Shafi et al., 2018). Niekoľko štúdií nedávno použilo rezy tkaniva pripravené vibratómom na testovanie liekov, vrátane enzalutamidu, apalutamidu, docetaxelu, gemcitabínu alebo olaparibu

(Van de Merbel et al., 2018; Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2019) a táto metodológia bola tiež použitá na analýzu agresivity nádoru v hypoxických podmienkach (Bery et al., 2020). Tento model bol okrem rakoviny prostaty použitý aj u iných typov rakovín ako u močového mechúra, prsníka, hrubého čreva alebo žalúdka (Schiewer et al., 2012; Naipal et al., 2016; Shafi et al., 2018; Van de Merbel et al., 2018; Martin et al., 2019; Chen et al., 2020). Tkanivové rezy a kultivácia *ex vivo* sa môžu použiť aj pre PDX modely, ktoré sa považujú za zlatý štandard pre výskum rakoviny a predklinické testovanie liekov (Bery et al., 2020; Van de Merbel et al., 2021). Verné zachovanie tkanivovej štruktúry a funkcie v *ex vivo* PDX kultúre ponúka príležitosť na skríning účinnosti liečby, čím sa znižujú náklady a počet experimentálnych zvierat (Zhang et al., 2019; Van de Merbel et al., 2021).

## **2. CIELE PRÁCE**

### **2.1. PROJEKT 1: VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY**

- Štúdium kolokalizácie Skp2 a Slug pomocou multiplexovej imunohistochemie
- Analýza vzájomného vzťahu Skp2 a Slug pomocou funkčných *in vitro* experimentov na prostatických bunkových líniiach po chemickej inhibícii a RNA interferencii
- Štúdium kolokalizácie Slug a bazálneho markeru p63 v myšacej prostate

### **2.2. PROJEKT 2: PREDIKTÍVNE MARKERY A MODEL Y V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE**

- Stanovenie prítomnosti fúzneho génu pomocou metódy PCR z RNA izolovanej z parafínových bločkov
- Príprava a testovanie aktivity kondiciovaného média s R-spondinom 1 a nogginom
- Optimalizácia a porovnanie viacerých kultivačných podmienok organoidov prostaty
- Analýza vybraných proteínov v organoidoch pomocou imunohistochemického farbenia
- Testovanie vplyvu gemcitabínu v kombinácii Chk1 inhibítora v natívnom tkanive

### 3. MATERIÁL A METÓDY

#### 3.1. PROJEKT 1: VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY

##### 3.1.1. Pacienti a štandardná imunohistochemia

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Fakultnej nemocnice a Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (č.j. 127/14). Archívne vzorky nádoru prostaty fixované vo formalíne a zaliate do parafínu (FFPE) získané po radikálnych prostatektómiách v rokoch 1998 až 2011 (Tabuľka 3.1) boli imunofarbené vhodnými protilátkami podľa štandardných manuálnych a automatických techník (Tabuľka 3.2). Proteínová expresia bola semikvantitatívne hodnotená patológom pomocou histoskóre, kde sa percento pozitívnych buniek (0–100 %) vynásobilo intenzitou farbenia (0–3), čo viedlo ku konečnému histoskóru medzi 0 a 300.

Tabuľka 3.1 Klinické charakteristiky retrospektívnych vzoriek pacientov s rakovinou prostaty (N=101).

Charakteristika	Podskupiny	N	%
Vek	49-60	36	35,6
	61-70	57	56,4
	71-76	8	7,9
PSA v sére (ng/ml)	<4	12	11,9
	4–10	40	39,6
	>10	48	47,5
	chýbajúce	1	1,0
Gleason skóre	<7	22	21,8
	7	49	48,5
	>7	30	29,7
Štádium nádoru	pT2a-c	42	41,6
	pT3a-b	50	49,5
	pT4	9	8,9
Stav lymfatických uzlín	pN1	29	28,7
	pN0	65	64,4
	pNx*	7	6,9

\*bez lymfadenektómie



### 3.1.2. Multiplexná imunohistochemia

Multiplexné imunofluorescenčné farbenie sa uskutočnilo pomocou súpravy Opal Fluorescent IHC Kit s amplifikáciou tyramínového signálu (Perkin Elmer) na FFPE rezoch vybraných prípadov podľa protokolu výrobcu. Expressia Skp2 a Slug bola monitorovaná pomocou Cy3 (Opal 570) a Cy5 (Opal 670), bunkové jadrá boli zafarbené DAPI. Obrázky boli zachytené konfokálnym mikroskopom LSM780 a softvérom ZEN 11 (Zeiss). Preparáty boli nasnímané aj pomocou softvéru MantraSnap 1.0.4 zahrnutého v Mantra Quantitative Pathology Workstation (Akoya Biosciences). Z každej skličky bolo náhodne vybraných 5 rôznych oblastí záujmu (ROI) so zameraním na nádorový parenchým aj strómu. Takto získané fotografie sa ďalej analyzovali pomocou softvéru InForm 2.4.6. (Akoya Biosciences) pripraveným algoritmom. Po automatickej bunkovej segmentácii boli vyhodnotené Skp2 a Slug pozitívne bunky, vrátane ich spoločnej koexpresie.

Vypreparované myšie prostaty boli upevnené v Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura) a kryokonzervované. Kryorezy myšacieho tkaniva boli fixované 4% formaldehydom počas 30 minút. Dvojité farbenie a analýza bola prevedená už popísaným postupom. Expressia p63 a Slug bola monitorovaná pomocou Cy5 (Opal 670) a Cy3 (Opal 570) a bunkové jadrá boli zafarbené DAPI.

### 3.1.3. Bunková kultúra

Na účely tejto štúdie boli použité bunkové kultúry PC3 a PC3 DR12, získané od prof. Watsona (Dublin, Írsko) a kultivované v DMEM (Dulbeccovo modifikované eagle médium; Sigma-Aldrich) doplnenom 10% FBS (fetal bovine serum) a antibiotikami. Bunky PC3 DR12 boli ošetrované 12,5 nM koncentráciou docetaxelu po dobu 48 hodín raz za mesiac (Puhr et al., 2012). Bunky DU 145 (ATCC) boli kultivované v RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) s 10 % FBS a antibiotikami. Na kultivácii buniek myšacieho adenokarcinómu prostaty E2 a cE2 a sortovaní epitelových a mezenchymálnych sublínií, odvodených z Trop-2 pozitívnych a Trop-2 negatívnych DU145 populácií, sa podieľala pracovná skupina doktora Součka v Brne (Šimečková et al., 2019). Na overenie pôvodu bunkových línií bola použitá súprava AmpFLSTR Identifier PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific) (Doc. Radek Vrtěl, Ústav lekárskej genetiky LF UP).

### 3.1.4. Western blot analýza

Bunky sa zozbierali a lyzovali v RIPA pufri (50mM Tris HCl pH 8.0; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS) doplnenom o koktejl inhibítorov proteáz/fosfatáz (Roche) po dobu 1 hodiny na ľade za neustáleho miešania. Následne boli centrifugované pri 15 000 rpm po dobu 30 min pri 4°C. Dvadsať mikrogramov lyzátu sa separovalo elektroforézou v 10% Bis-Tris polyakrylamidovom géli a prenieslo polosuchým blotterom (BioRad) na nitrocelulóзовú membránu (GE Healthcare). Vybrané proteíny boli rozpoznané špecifickými primárnymi protilátkami (Tabuľka 3.2) a sekundárnymi protilátkami spojenými s chrenovou peroxidázou. Chemiluminiscenčný signál bol zachytený na Fc Odyssey Imaging System (LI-COR) po pridaní substrátov SuperSignal West Dura alebo Femto (ThermoFisher Scientific).

Tabuľka 3.2 Zoznam použitých protilátok

Protilátka	Klon	Kat. číslo	Riedenie	Dodávateľ
Skp2	2C8D9	32-3300	1:600	Invitrogen
Slug	C19G7	9585	1:1 000	Cell signalling
Twist	2C1A	sc-81417	1:250	Santa Cruz
GAPDH	G8795	G8795	1: 10 000	Sigma
p27Kip	SX53G8.5	sc-53871	1:200	Santa Cruz
MdmX	8C6	04-1555	1:200	Merck Millipore
N-kadherin	32/N-cadherin	610920	1:2500	BD Pharmingen
E-kadherin	36/E-cadherin	610182	1:5000	BD Pharmingen
FBXO11	polyclonal	A301-177A	1:2 000	Bethyl lab.
$\alpha$ -tubulín	DM1A	T5168	1:1000	Sigma-Aldrich
AE 1-3 (pan-CK)	AE1 a AE3	MU 071-U1	1:200	Bio-Genex
AMACR	13H4	Z2001RL	1:500	Zeta Corporation
androgénový receptor	AR441	M3562	1:25	Dako
CK18	DC10	M7010	1:100	Dako
CK19	RCK 108	M0888	riedená*	Dako
ERG	EPR3864	2805-1	1:400	Epitomics
Ki67	MIB-1	M7240	1:200	Dako
p63	DAK-p63	M7317	riedená*	Dako
$\gamma$ H2AX	JBW301	05-636	1:500	Millipore

*riedená\* výrobcom na priame použitie*

### 3.1.5. Chemické inhibítory

Inhibítory Skp2 (zlúčenina 25; alias SZL-P1-41; Tocris), históndeacetylázy (sirtinol; Tocris) a nedylácie (MLN4924, Pevonedistat; Active Biochem) boli najskôr testované MTT testom viability. Testované koncentrácie inhibítorov boli 1,25-20  $\mu\text{M}$  (zlúčenina 25), 0,04-25  $\mu\text{M}$  (sirtinol) a 0,04-1  $\mu\text{M}$  (MLN4924).

Bunky PC3 a PC3 DR12 boli ošetrované koncentračnou škálou zlúčeniny 25 (10-40  $\mu\text{M}$ ) a inkubované počas 48 hodín. Po 24 hodinách inkubácii buniek s 25  $\mu\text{M}$  sirtinolom sa pridal cykloheximid (50  $\mu\text{g/ml}$ ) na 2 a 4 hodiny. Rovnako, ako PC3 a PC3 DR12, boli ovplyvnené aj bunkové línie pozitívne na androgénový receptor 22rv1, C4-2, LAPC4 1 a 2  $\mu\text{M}$  inhibítorom MLN4924 po dobu po dobu 48 a 24 hodín. Všetky experimenty boli prevedené minimálne v troch opakovaníach.

### 3.1.6. RNA interferencia

Bunky PC3 a PC3 DR12 boli ošetrované pomocou Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) s koncentráciou 20 nM kontrolnej siRNA (UAA UGU AUU GGA ACG CAU A; Eurofins Genomics) alebo siRNA proti Skp2 (EHU094381, Sigma Aldrich) počas 48 hodín. Experimenty sa uskutočnili najmenej trikrát.

## 3.2. PROJEKT 2: PREDIKTÍVNE MARKERY A MODELY V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE

### 3.2.1. Kvantitatívna PCR pre fúzny gén TMRSS2-ERG

Vybraní pacienti boli vyhodnocovaní pomocou kvantitatívnej PCR. Vzhľadom na nepriaznivý účinok spomalenej fixácie väčších kúskov tkaniva, TMRSS2-ERG bolo možné vyhodnotiť pomocou PCR iba u menšej skupiny pacientov (u 31 z 35 vzoriek) spracovaných rýchlejšou fixáciou pre menšie tkanivové kúsky (viď Kurfurstová et al., 2016). RNA bola izolovaná z parafínových rezov pomocou RNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen), kvantifikovaná pomocou Nanodropu a pre amplifikovaná pomocou **Whole Transcriptome Amplification Kit** (Sigma-Aldrich). Následne boli vzorky podrobené qPCR s pridaním špecifických primerov a prób (**TMRSS2-ERG**: forward CTG GAG CGC GGC AGG AA, reverse GTC CAT AGT

CGC TGG AGG AG, próba 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, próba No. 87 z Universal Probe Library, Roche) na prístroji Light Cycler 480 (Roche). Vzorky u ktorých nebolo možné zachytiť signál pre POLR2A boli považované za nehodnotiteľné. Celkovo sme vyhodnotili 10 pacientov ako TMPRSS2-ERG pozitívnych a 18 negatívnych. Podskupina pacientov (N=12; Kolar et al., 2014) bola vyhodnocovaná na prítomnosť chromozómovej prestavby na v pozícii 21q22 pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) s použitím Poseidon TMPRSS2-ERG (21q22) Del, Break, TC Probe (Kreatech Diagnostics). Výsledky qPCR i FISH boli v zhode.

### **3.2.2. Ustanovenie a pestovanie organoidov alebo sféroidov**

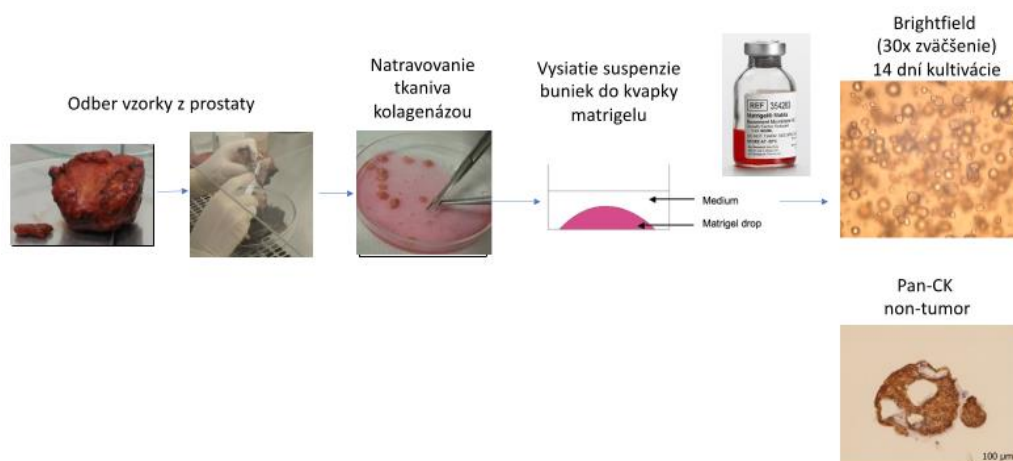
Štúdia bola schválená Etickou komisiou Fakultnej nemocnice Olomouc (č. 127/14) a všetky vzorky boli získané na Urologickej klinike Fakultnej nemocnice Olomouc (Olomouc, Česká republika) na základe informovaného súhlasu podpísaného všetkými pacientmi, ktorí podstúpili radikálnu prostatektómiu alebo transuretrálnu resekciu prostaty (TURP) v rokoch 2017-2020. Nádorové a benígne vzorky boli vybrané skúsenými patológmi.

Tkanivové vzorky umiestnené v sterilnej Petriho miske, sa trikrát premyli 1x PBS a nasekali na malé kúsky.

Na trávenie tkaniva sa použili tri prístupy:

1. kolagenáza I-A (2,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) počas 2 hodín,
2. kolagenáza typu I (125 jednotiek/ml, Worthington Biochemical Corp.) a následne Tryple (Sigma-Aldrich) počas 15 minút,
3. úprava na izoláciu nádorových buniek (Tumor Dissociation Kit) v prístroji gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec).

Jednobunková suspenzia (50 000) bola vysadená do kvapky Matrigelu (Corning) v 4-jamkovej miske (Nunc; kat. číslo:144444) alebo 24-jamkovej doštičke s nízkou príľnavosťou (Corning)(Obrázok 3.1).



Obrázok 3.1 Schematické znázornenie spracovania vzorky a následnej kultivácie organoidov prostaty.

Hlavná podskupina vzoriek bola kultivovaná podľa (Drost et al., 2016). ADMEM/F-12 (ThermoFisher Scientific) bolo doplnené o 1x Glutamax (ThermoFisher Scientific), 10 mM HEPES (ThermoFisher Scientific), 1% antibiotiká, obohatené o 1x suplement B27 (ThermoFisher Scientific), 5 ng/ml EGF (ThermoFisher Scientific), 5 ng/ml FGF2 (PeproTech), 10 ng/ml FGF10 (PeproTech), 10 mM nikotínamid (Sigma-Aldrich), 500 nM A83-01 (Tocris Bioscience), 10 µM SB 202 190 (Sigma-Aldrich), 1 µM prostaglandín E2 (Tocris Bioscience), 1 nM R1881 (Organon), 1,25 mM N-acetylcysteín (Sigma-Aldrich), 10 µM ROCK-inhibítor Y-27632 dihydrochlorid (Santa Cruz Biotechnology)(príloha 1). Dôležité je, že médium bolo tiež doplnené buď o 0,5 µg/ml rekombinantného R-spondínu 1 a 0,1 µg/ml nogginu (oba Peprotech) alebo príslušným upraveným médiom (Tabuľka 3.3).

Podskupina pacientov bola súčasne kultivovaná v modifikácii bez nikotínamidu a inhibítora p38 (SB 202 190) (Tabuľka 3.3)(Beshiri et al., 2018). Prevzali sme aj sféroidnú a organoidnú kultúru (Linxweiler et al., 2019). Použitie médium StemPro sa skladalo (pre celkový objem 100 ml) z 89,8 ml Gibco Glutamax DMEM/F-12 (ThermoFisher Scientific), 7,2 ml 25% BSA (ThermoFisher Scientific), 182 µl 2-mercaptoetanol (ThermoFisher Scientific), 2 ml StemPro hESC Supplement (ThermoFisher Scientific), 1 ml penicilín/streptomycín (Sigma-Aldrich), 1 µl 10 µM R1881 (Organon), 40 µl FGF-b (20 µg/ml; ThermoFisher Scientific) a 17,48 µl 50 mM Y-27632 (Santa Cruz Biotechnology). Organoidy v Matrigeli boli pasážované trituráciou a disociáciou s použitím dispázy (Thermo Fisher Scientific). Bunkové suspenzie z organoidov alebo sféroidov boli ďalej disociované pomocou Liberase (Roche) alebo Tryple (Sigma-Aldrich) (Strnadel et al., 2018).

Tabuľka 3.3 Kultivačné podmienky organoidov

Kultivačné podmienky	Disociácia	No.	Vek	stage	G	N	SV	RO	Rast organoidov	
									tumor	benign
médium 1 Drost et al. 2016 CM pre noggin a R-spondin 1	kolagenáza I-A	1400	62	pT3	4+4	N0	0	0	nie	nie
	kolagenáza I-A	1402	68	pT3	5+4	N1	0	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1404	64	cT4	3+4	N0	0	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1412	65	pT3b	4+3	N0	1	0	nie	áno
	kolagenáza I-A	1418	64	pT2c	3+3+4	N0	0	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1421	67	pT4	4+5	N0	1	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1425	62	pT4	4+5	N1	1	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1429	74	pT3	4+3	N0	0	1	áno	nie
	kolagenáza I-A	1436	64	pT3b	4+3	N0	1	0	nie	áno
	kolagenáza I-A	1448	69	pT2c	3+4	N0	0	1	áno	áno
kolagenáza I-A	1481	69	pT3b	5+4	N1	1	0	áno	áno	
MACS	1486	65	pT2c	4+4	N0	0	0	áno	áno	
médium 2 Drost et al. 2016 CM iba pre R-spondin 1 noggin (Peprotech)	MACS	1488	51	pT3b	5+4	N0	1	0	nie	nie
	MACS	1490	65	pT3a	4+3	N0	0	0	áno	áno
	MACS	*1515	70	pT2c	n.d.	Nx	0	0	áno	nie
	MACS	1527	68	pT3a	4+5	N0	1	1	nie	áno
	kolagenáza I-A	1528	65	pT3b	5+4	N0	1	1	nie	nie
	kolagenáza I-A	1539	62	pT3a	3+4	N0	0	0	áno	áno
	kolagenáza I-A	1542	71	pT3b	4+5	N0	1	1	áno	áno
	kolagenáza I-A	1544	68	pT2b	4+5	N0	0	0	áno	áno
	kolagenáza I-A	1549	60	pT3a	4+5	N0	0	1	áno	áno
	kolagenáza I-A	1558	46	pT2b	3+4	N0	0	1	áno	áno
kolagenáza I-A	1658	61	pT3b	4+5	N0	1	0	áno	áno	
kol.I + Tryple	1678	65	pT2a	4+3	N0	0	0	áno	áno	
súbežná kultivácia v médiu 2	kol.I + Tryple	1591	64	pT3b	4+5	N0	1	0	áno	áno
	kol.I + Tryple	1595	70	pT3a	5+4	N0	0	0	áno	áno
	kol.I + Tryple	1597	50	pT3a	4+3	N0	0	1	áno	áno
	kol.I + Tryple	1600	72	pT3a	4+3	N0	0	1	áno	áno
	kol.I + Tryple	1611	50	pT2b	3+4	N1	0	0	áno	áno
	kolagenáza I-A	1628	67	pT3b	3+4	N0	1	0	nie	nie
a v médiu 3 Beshiri et al. 2018 modif. médium 2 bez SB 202190 a nikotínamidu	kol.I + Tryple	1591	64	pT3b	4+5	N0	1	0	áno	áno
	kol.I + Tryple	1595	70	pT3a	5+4	N0	0	0	áno	áno
	kol.I + Tryple	1597	50	pT3a	4+3	N0	0	1	áno	áno
	kol.I + Tryple	1600	72	pT3a	4+3	N0	0	1	áno	áno
	kol.I + Tryple	1611	50	pT2b	3+4	N1	0	0	áno	áno
	kolagenáza I-A	1628	67	pT3b	3+4	N0	1	0	nie	nie
médium 4 Linxweiller et al. 2019 sféroidy na „low attachement“ plaste	kolagenáza I-A	1930	75	pT3b	4+5	N1	1	1	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	1933	59	pT2c	3+4	N0	0	1	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	1942	57	pT2c	4+3	N0	0	1	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	1948	59	pT3a	4+3	N0	0	0	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	1953	61	pT3a	4+3 (+5)	N0	0	1	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	1966	58	pT2c	4+3	N0	0	1	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	**1968	83	n.d.	4+4	n.d.	n.d.	n.d.	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	1970	47	pT3a	3+4	N0	0	0	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	1981	65	pT3a	3+4+5	N0	0	1	nie	n.d.
médium 4 Linxweiller et al. 2019 organoidy v Matrigel	kolagenáza I-A	1990	64	pT3b	4+4	N1	1	0	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	1995	52	pT2c	3+4	N0	0	1	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	**1993	79	n.d.	5+5	n.d.	n.d.	n.d.	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	2002	69	pT2c	4+3	N0	0	0	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	2010	73	pT3a	4+3	N1	0	0	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	2018	63	pT3b	5+4	N1	1	0	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	**2021	85	n.d.	4+4	n.d.	n.d.	n.d.	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	2023	66	pT3a	4+3	N1	0	1	áno	n.d.
	kolagenáza I-A	2049	74	pT4	3+4	N0	0	1	nie	n.d.
	kolagenáza I-A	2053	70	pT3a	4+5	N0	0	0	áno	n.d.
kolagenáza I-A	2055	70	pT3a	3+4	N0	0	0	áno	n.d.	

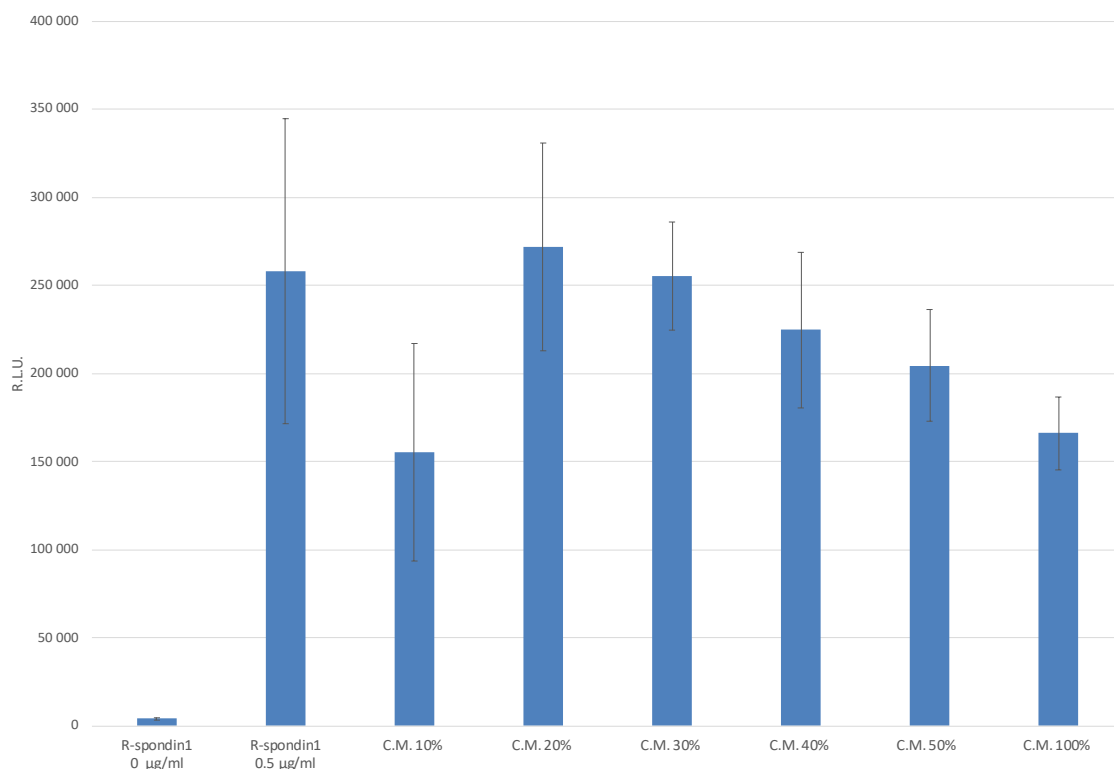
\*neoadjuvant.LHRH liečba; \*\* TURP,transuretrálna resekcia prostaty; CM, kondicionované médium

### 3.2.3. R-spondin 1 a noggin kondiciované médium

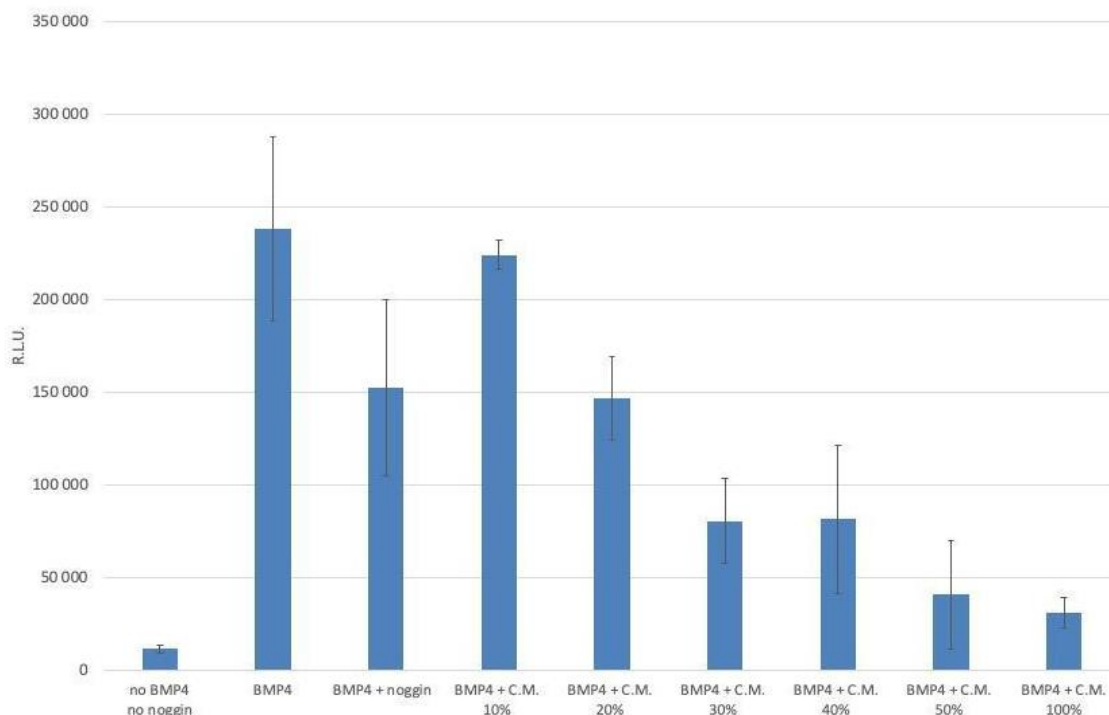
Bunky HEK 293-T produkujúce R-spondin 1 a noggin nám poskytli prof. Calvin Kuo (Stanford University, USA) a Hans Clevers (Hubrecht Institute, Holandsko)(Gao et al., 2014). Bunky produkovali R-spondin 1 a noggin počas 7 dní v ADMEM médiu bez séra (Advanced Dulbecco's Modified Eagle medium; Sigma-Aldrich) doplnenom o HEPES a Glutamax.

Aktivita kondiciovaného média s R-spondinom 1 bola potvrdená zvýšením luciferázového signálu (Luciferase Assay System, Promega) v reportérových bunkách SuperTopFlash 293T, ktoré nám poskytol Dr. Vítězslav Bryja (Masarykova univerzita, Česká republika). Dvadsať percent upraveného média R-spondinu 1 v kompletnom médiu odpovedalo aktivite 0,5  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantného R-spondinu 1 (Peprtech) (Obrázok 3.2).

Aktivita kondiciovaného média s nogginom bola potvrdená znížením luciferázového signálu (Luciferase Assay System, Promega) po pridaní 0,1  $\mu\text{g/ml}$  BMP4 k reportérovej bunkovej línii BRITER (BMP Responsive Immortalized Reporter bunková línia; zakúpená od Kerfast) (Yadav et al., 2012). Dvadsať percent upraveného nogginu v kompletnom médiu zodpovedalo aktivite 0,1  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantného nogginu (Peprtech) (Obrázok 3.3).



**Obrázok 3.2** Aktivita kondiciovaného média R-spondin 1 (C.M.). Aktivita 0,5  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantného R-spondínu 1 (Peprtech) zodpovedala 20 % upravenému médiu v luciferázovom reportérovom teste s použitím buniek SuperTopFlash (STF) 293T.



**Obrázok 3.3** Aktivita kondiciovaného média noggin (C.M.). Zvýšený signál po pridaní 0,1  $\mu\text{g/ml}$  BMP4 k bunkám BRITER (BMP Responsive Immortalized Reporter bunková linia) bol znížený pridaním 0,1  $\mu\text{g/ml}$  rekombinantného proteínového nogginu (PeproTech). Podobná down-regulácia bola dosiahnutá s 20 % koncentráciou upraveného média (C.M.).

### 3.2.4. Zaliatie organoidov a sféroidov do parafínu a imunohistochemia

Pre manipuláciu s malými organoidmi alebo sféroidmi bola použitá metóda trombínovej zrazeniny. Premytá peleta bola rozsuspendovaná v zmesi 225  $\mu\text{l}$  plazmy (aliquoty pripravené z krvi dobrovoľníkov s citrátom sodným a po centrifugácii po dobu 5 minút pri 3000 g) s 5,65  $\mu\text{l}$  1 M chloridu vápenatého. Zrazenina sa vytvorila pridaním 22,5  $\mu\text{l}$  trombínu (120 NIHU/ml, Sigma Aldrich) a preniesla sa špičkou pipety do Tissue-Tek Paraform Sectionable Cassette pre malé vzorky (Sakura). Organoidy v Matrigeli boli priamo umiestnené do rovnakej kazety pomocou železnej lyžice. Formalínová fixácia a parafínové zaliatie (FFPE) sa uskutočnili podľa štandardného protokolu. FFPE organoidy, sféroidy a vzorky tkaniva boli imunofarbené vhodnými protilátkami podľa štandardných manuálnych alebo automatických protokolov (Tabuľka 3.2).



### 3.2.5. Tkanivová kultúra ľudskej rakoviny prostaty

Pre krátkodobé ex vivo tkanivové kultúry bol prevzatý protokol od skupiny Karen Knudsen (Schiewer et al., 2012; Shafi et al., 2018). Tkanivo bolo získané od patológa bezprostredne po radikálnej prostatektómii a sterilne rozrezané na 1 mm<sup>3</sup> v boxe s laminárnym prúdením (Tabuľka 3.4). Kúsky tkaniva sa umiestnili do 24-jamkových doštičiek na špongiách (Spongostan dental, Johnson & Johnson), ktoré sa namočili do 500 µl média (DMEM/F12 doplneného 5% FBS, 0.5 µg/ml hydrokortizónom, 5 µg/ml inzulínom a antibiotikami). V čase 0 boli tkanivá ošetrené 500 nM gemcitabínom (Carbosynth Ltd) alebo čistým médiom v kontrole a doštičky sa umiestnili do inkubátora pri 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Ovplyvnenie 4µM MU380 (poskytnuté Dr. Kamilom Paruchom, Masarykova univerzita, Česká republika) sa uskutočnilo o 24 hodín neskôr a tkanivá boli spracované v časovom bode 48 hodín (Samadder et al., 2017; Drápela et al., 2020). Z každého ošetrenia boli dva kusy zmrazené a jeden fixovaný v 4% formalíne. Bloky fixované vo formalíne a zaliate do parafínu boli narezané pomocou mikrotómu a sklíčka boli podrobené štandardnému farbeniu hematoxylínom a eozínom. Vzorky s rakovinovými bunkami prítomnými vo všetkých experimentálnych podmienkach boli imunohistochemicky zafarbené na Ki67 a γH2AX (Tabuľka 3.2).

Tabuľka 3.4 Kohorta pacientov kultivovaná ex vivo tkanivovou kultúrou

Kultivačné podmienky	No.	Vek	N	SV	RO	stage
	<b>1856</b>	62	N1	1	1	pT3b
	<b>1878</b>	70	N0	1	0	pT3a
	<b>1882</b>	60	N0	0	1	pT3a
	<b>1886</b>	53	N0	0	1	pT3a
Schiewer et al., 2012	<b>1906</b>	65	N1	1	1	pT3b
ex vivo tkanivová kultúra	<b>1942</b>	57	N0	0	1	pT2c
	<b>1955</b>	72	N0	0	1	pT3a
	<b>1959</b>	74	N1	0	1	pT3a
	<b>1964</b>	67	N0	0	1	pT3a
	<b>*1968</b>	83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

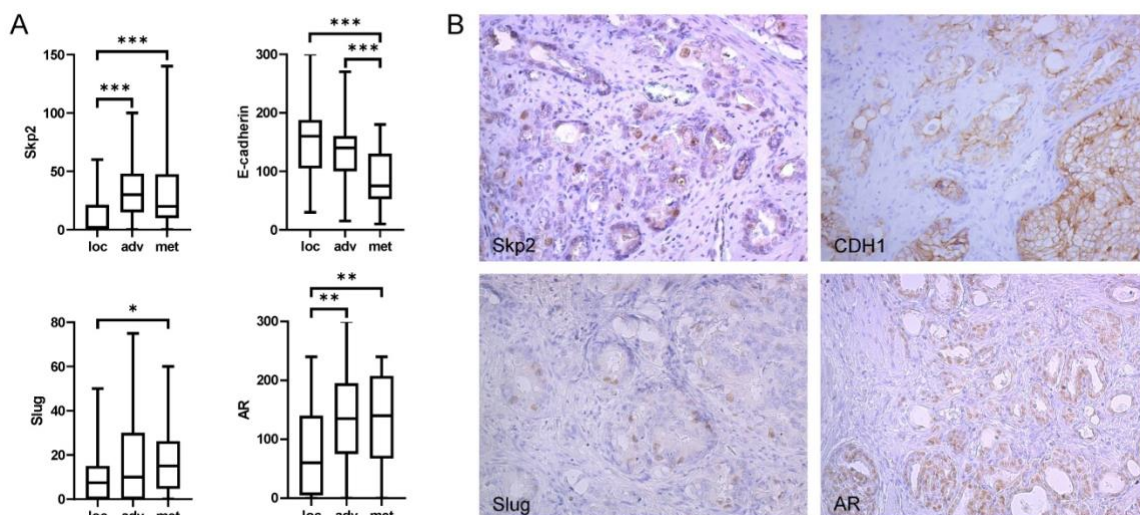
\* TURP, transuretrálna resekcia prostaty

## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1. VÝZNAM PROTEÍNOV SKP2 A SLUG V NÁDOROCH PROSTATY**

#### **4.1.1. Expresia Skp2 korelovala so Slug u pacientov s vysokým Gleason skóre a s metastázami do lymfatických uzlín**

Retrospektívnou analýzou na vzorke 101 pacientov (Tabuľka 3.1) sme zistili, že agresívny karcinóm prostaty (PCa) je asociovaný s vysokou expresiou Skp2 a nízkou expresiou E-kadherinu (Obrázok 4.1A). Výskum týchto interakcií bol rozšírený o štúdium Slug proteínu, jedného z negatívnych regulátorov E-kadherinu a tiež o AR, beta-catenin a Ki67. Signifikantný nárast expresie AR a Slug bol pozorovaný v nádoroch pacientov, ktorí mali metastázy v lymfatických uzlinách (Obrázok 4.1B). Výsledky sme tiež podrobili korelačnej analýze. Skp2 mierne korelovalo so Slug a AR v rámci celej skupiny pacientov (Rs 0,32 a 0,37; Tabuľka 4.1). Vyššia korelácia u oboch proteínov bola u pacientov s vysokým Gleason skóre (Rs 0,56 a 0,53; Tabuľka 4.1) a pre Slug aj u pacientov s metastázami do lymfatických uzlín (Rs 0,56; Tabuľka 4.1). Expresia Slug bola rovnako pozorovaná aj u 32 pacientov s benígnou hyperpláziou prostaty (BPH) v oblasti susediacej s nádorom. Tento poznatok bol v súlade s pozorovaním Esposito et al. (2015), kedy expresia Slug bola signifikantne vyššia u BPH v porovnaní s PCa ( $p < 0,001$ ; medián BPH histoskóre 30, rozsah 0-175).



**Obrázok 4.1** Imunohistochemická analýza Skp2, AR, Slug a E-kadherinu. (A) Signifikantný nárast expresie Skp2, AR a Slug spolu s nízkou expresiou E-kadherinu boli pozorované u primárneho nádoru prostaty pacientov, ktorí mali metastázy do lymfatických uzlín (met). Lokalizované (loc) a pokročilé (adv) nádory boli definované ako pT2a-c, N0 a T3-T4, N0. Krabicové grafy reprezentujú medián, percentil 25-75% a škálu hodnôt. P-hodnoty <0.05, <0.01 a <0.001 sú označené ako \*, \*\* a \*\*\*. (B) Príklady imunohistochemického farbenia pre Skp2, E-kadherin, Slug a AR v tkanive primárneho nádoru prostaty s Gleason skóre 8 (4+4).

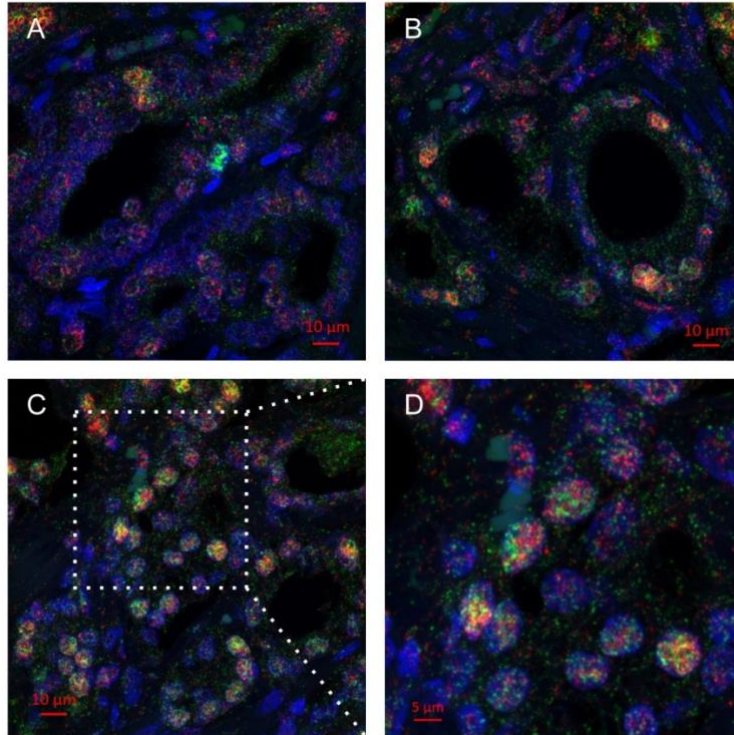
**Tabuľka 4.1** Spearmanova korelácia ( $R_s$ ) vybraných proteínov v rámci celého súboru pacientov s vysokým Gleason skóre alebo s pozitívnymi lymfatickými uzlinami.

Proteín 1	Proteín 2	celá skupina (N=101)	Gleason >7 (N=30)	pozitívne LN (N=29)
Skp2	Slug	0.322	<b>0.557</b>	<b>0.559</b>
	androgénový receptor	0.37	<b>0.535</b>	0.372
Slug	androgénový receptor	0.154	0.374	0.285
	androgénový receptor	0.054	0.246	<b>0.504</b>
Ki-67	membránový beta-katenin	-0.193	-0.234	-0.418
	membránový beta-katenin	0.106	0.423	<b>0.615</b>

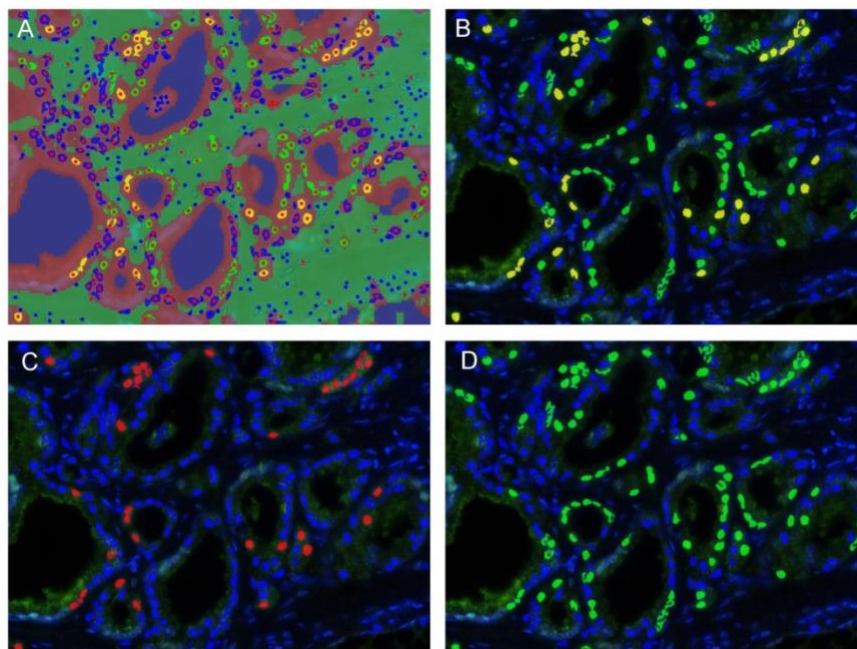
$R_s$  koeficienty nad 0,5 sú zvýraznené tučným písmom, zatiaľ čo nevýznamné hodnoty sú označené kurzívou.

#### 4.1.2. Multiplexová imunohistochemia potvrdila kolokalizáciu Skp2 a Slug v nádorovom tkanive

Pre lepšie objasnenie korelácie Skp2 a Slug bola zvolená metóda duálneho farbenia, ktorej výsledkom bolo pozorovanie dvojito pozitívnych nádorových buniek v oblastiach s vysokým Gleason skóre. Oba proteíny boli prítomné v rovnakom jadre, aj keď ich signály sa celkovo neprekrývali (Obrázok 4.2). Obrazová analýza bola robená aj Mantra systémom (Obrázok 4.3) a výsledky tejto analýzy boli v zhode s výsledkami štandardnej imunohistochemie.



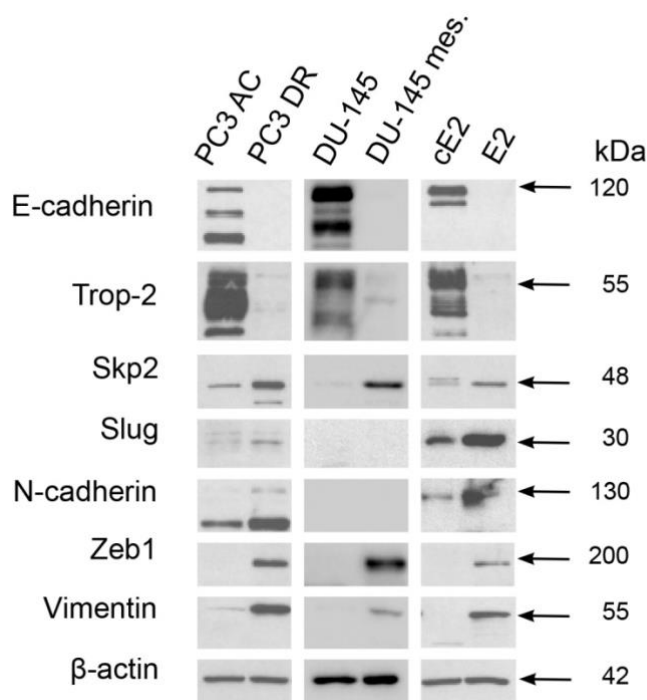
**Obrázok 4.2** Multiplexová imunohistochémia Skp2 (zelená) a Slug (červená) v primárnom nádore dvoch pacientov s metastázami do lymfatických uzlín. (A) Občasný výskyt dvojito pozitívnych jadier v tkanive s Gleason stupňom 3 u pacienta #21 (pT2c, pN1, Gleason skóre 3+2, PSA v sére 6,4 ng/ml). (B) Podobná frekvencia kolokalizácie bola pozorovaná v tkanivovej oblasti s Gleason stupňom 3 od pacienta #62 (pT3a, pN1, Gleason skóre 4+3, PSA v sére 2,78 ng/ml), zatiaľ čo bola zvýšená v oblasti s Gleason stupňom 4 (C,D). Jadrá boli farbené s DAPI (modrá). Obrázky boli zachytené konfokálnym mikroskopom LSM780 (Zeiss).



**Obrázok 4.3** Analýza multiplexovej imunohistochémie systémom Mantra (A) Schematická vizualizácia oblastí tkaniva (epiteliálneho – hnedá, mezenchymálneho – tmavozelená a prázdne oblasti – tmavomodrá) a segmentácie buniek (jednotlivé bunky s pozitivitou na Skp2 a Slug sú červené a zelené; dvojito pozitívne alebo negatívne sú žltej alebo modrej farby). (B) Rovnaká oblasť zobrazujúca segmentáciu buniek (pre Skp2 aj Slug). (C,D) Samostatné kanály pre Skp2 a Slug. Všetky obrázky sú zhotovené pri 200x zväčšení. Analýza potvrdila 5,5% dvojito pozitívnych buniek v piatich zorných poliach (9,7 % v zobrazenej oblasti) v tkanive rakoviny prostaty pacienta #62 (viď. tiež obrázok 4.2), čo bolo v zhode s výsledkami získanými štandardnou imunohistochémiou (10% Skp2 pozitívnych a 30% Slug pozitívnych buniek).

### 4.1.3. Mezenchymálny fenotyp bol asociovaný so zvýšenou expresiou Skp2 a Slug u ľudských PC3 a myších E2 rakovinových buniek

Ďalej sme analyzovali Skp2, Slug a ďalšie vybrané proteíny u troch skupín prostatických epiteliálnych bunkových línií (PC3, DU145 a E2) a ich mezenchymálnych náprotivkov. V predošlej práci bolo publikované, že vysoká expresia Skp2 je spojená s mezenchymálnym fenotypom a zvyšuje tumorigénny potenciál u DU145 prostatickej bunkovej línie (Šimečková et al. 2019). Tieto bunky však majú veľmi nízku expresiu Slug (Obrázok 4.4), čo je v zhode s inými prácami (Esposito et al. 2015). Na druhú stranu docetaxel rezistentné PC3 a myšie E2 bunky mali zvýšenú expresiu Slug, Skp2 a mezenchymálnych markerov v porovnaní s ich epiteliálnymi sublíniami.

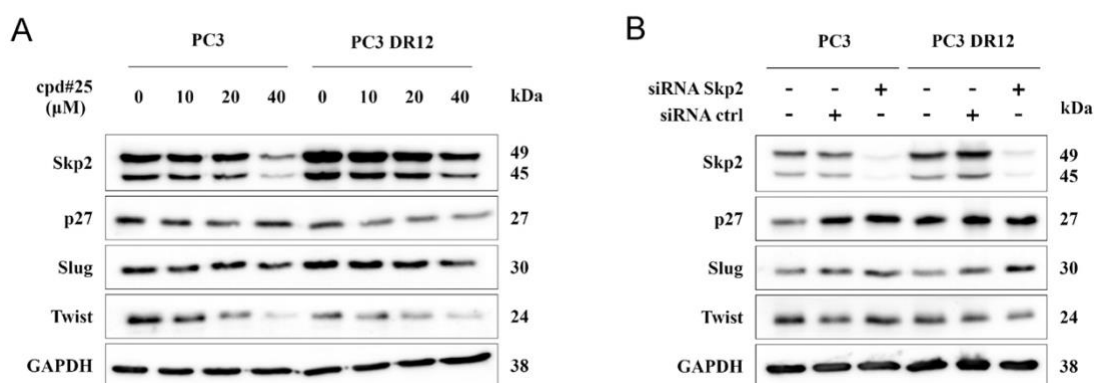


**Obrázok 4.4** Western blot analýza Skp2, Slug a ďalších vybraných proteínov spojených s epitelovým alebo mezenchymálnym fenotypom u bunkových línií rakoviny prostaty. Epitelové bunky (PC3 AC, DU145 a cE2) a ich mezenchymálne náprotivky (PC3 DR, DU145 mes. a E2) boli analyzované v troch opakovaníach. V prípade mezenchymálneho fenotypu, všetky testované bunkové línie vykazovali upreguláciu Skp2. Upregulácia Slug bola detegovaná u PC3 DR a E2, ale nie u DU145 mes. buniek. Iné epiteliálne (E-kadherin, Trop-2) a mezenchymálne (N-kadherin, Zeb1 a vimentin) markery vykazovali upreguláciu so zodpovedajúcim fenotypom, okrem N-kadherinu v bunkách DU145, pravdepodobne v dôsledku veľmi obmedzených hladín tohto proteínu.

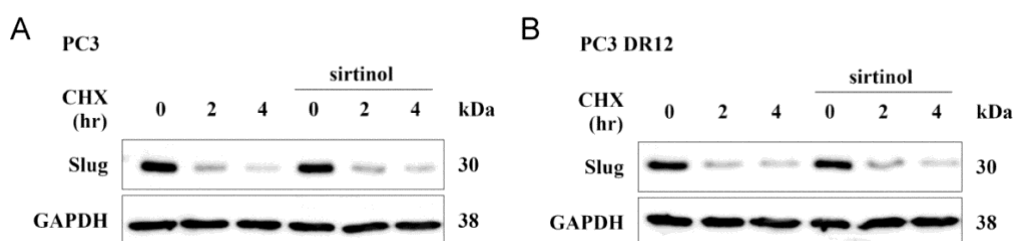


#### 4.1.4. Vplyv chemickej inhibície Skp2 a RNA interferencie na proteínové hladiny Slug

K posúdeniu možnej interakcie medzi Skp2 a Slug sme využili ako chemickú tak siRNA inhibíciu. V súlade s literatúrou, vysoké koncentrácie špecifického inhibítora Skp2 viedli k poklesu expresie transkripčného faktoru Twist (Chan et al., 2013), ale iba k malému zníženiu Slug (Obrázok 4.5A). Napriek viditeľnému poklesu expresie Skp2 po siRNA sme nepozorovali downreguláciu Slug (Obrázok 4.5B). Okrem ubikvitinácie, Slug proteín môže byť regulovaný tiež acetyláciou (Zhou et al.; 2016), ale ani po ovplyvnení inhibítorm SIRT2 deacetylázy sme nepozorovali žiadne zmeny v Slug (Obrázok 4.6)



Obrázok 4.5 Chemická inhibícia Skp2, nie však siRNA interferencia, mierne znižuje hladinu Slug proteínu. (A) Vysoké koncentrácie špecifického inhibítora Skp2 (cpd#25) znižujúceho expresiu Slug, ale nie je tak výrazná ako u Twist proteínu. (B) Napriek jasnému poklesu expresie Skp2 po špecifickom Skp2 siRNA ovplyvnení sme nepozorovali downreguláciu Slug u PC3 a PC3 DR12 buniek.



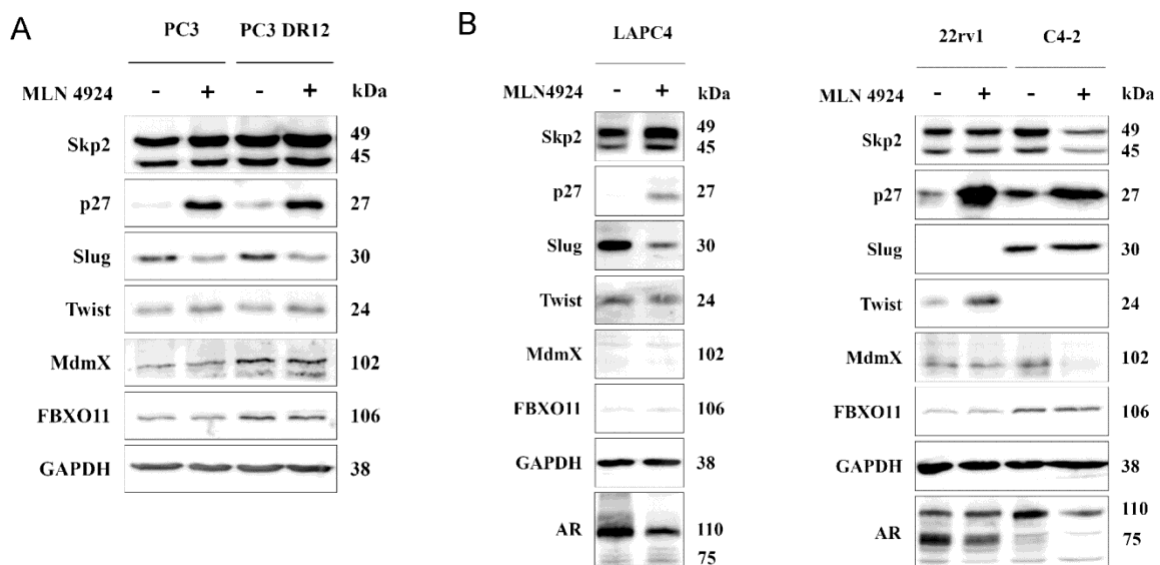
Obrázok 4.6 Inhibícia deacetylácie neovplyvnila expresiu Slug. (A) Štandardné PC3 bunky a (B) docetaxel rezistentné PC3 DR12 boli vopred ovplyvnené sirtinolom a po 24 hodinách boli ovplyvnené 50 μg/ml cykloheximidom (CHX), aby sa zabránilo de novo syntéze proteínov. Imunoblots hladín proteínov GAPDH a Slug sú zobrazené v časových intervaloch (hr, hodiny).

#### 4.1.5. Blokáda nedylácie znížila expresiu Slug u PC3 a LAPC4 buniek

Ako už bolo spomenuté v predošlých kapitolách, Skp2 F-box proteín je súčasťou SCF (Skp1-cullin 1-F-box) E3 ubikvitín-ligázového komplexu, ktorého aktivita je regulovaná prostredníctvom nedylácie. Po inhibícii MLN4924 (pevonedistat) sme pozorovali stabilizáciu p27<sup>Kip1</sup>, klasického cieľa Skp2, a pokles expresie Slug u PC3 buniek (Obrázok 4.6A). Nedávna

štúdia naznačuje, že aj E3 ligáza FBXO11 je zodpovedná za Slug degradáciu po MLN4924 ovplyvnení u uveálnych melanómových buniek (Jin et al., 2018). Blokovaním nedylácie sa nám však nepodarilo preukázať zmeny expresie tohto proteínu u prostatických buniek. Pevonedistant môže tiež zvyšovať ubikvitinačnú aktivitu MDM2, ktorého cieľom je Slug a aj MDMX proteín (Hauck et al., 2017; Wang et al., 2009). Napriek tomu sme nepozorovali žiadne zmeny v MDMX po MLN4924 ovplyvnení.

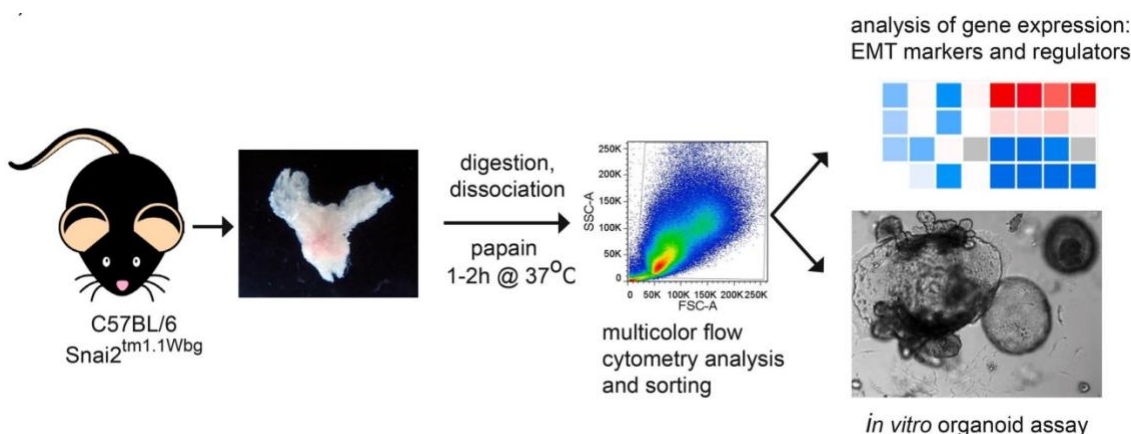
S ohľadom na kľúčovú úlohu androgénového receptoru u rakoviny prostaty boli vykonané ďalšie experimenty na niekoľkých AR-positívnych bunkových líniiach (LNCaP, C4-2, LAPC4 a 22rv1). Podobne ako u PC3 buniek sme pozorovali downreguláciu Slug po blokovaní nedylácie u LAPC4 buniek, ale nie u C4-2 buniek. V rozpore s niektorými prácami (Liu et al., 2010; Ding et al., 2015) sme nepozorovali Slug expresiu u 22rv1 buniek, aj keď sme vykonali ich autentizáciu. Dôležitým pozorovaním však bola downregulácia AR a tiež ich variantov u všetkých bunkových línii (Obrázok 4.7).



**Obrázok 4.7** Blokovaním nedylácie znižuje expresiu Slug. (A) Inhibíciou s MLN4924 (Pevonedistat) sme pozorovali zjavnú stabilizáciu p27 a pokles expresie Slug ako u PC3 tak aj u docetaxel rezistentných PC3 DR12 buniek. (B) Slug bol tiež downregulovaný po blokovaní nedylácie u androgén-závislých LAPC4 buniek, ale nie u C4-2 buniek. Zároveň sme nepozorovali žiadnu expresiu Slug u 22rv1 autentizovaných buniek.

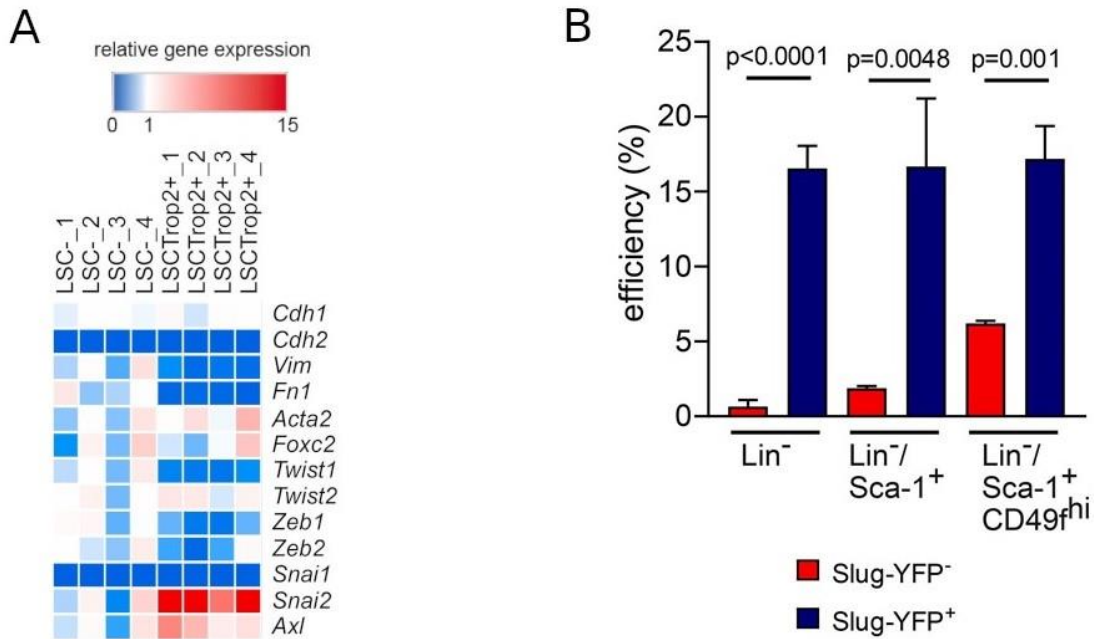
#### 4.1.6. Myšie bazálne kmeňové bunky so Slug expresiou efektívne tvorili organoidy so všetkými diferencovanými prostatickými bunkami

Dešifrovanie vlastností dospelých kmeňových buniek je kľúčové pre pochopenie ich úlohy v zdravom tkanive i v karcinogéze. Kmeňové bunky, aj rakovinové kmeňové bunky, vykazujú spojenie s epitelovo-mezenchymálnym prechodom (EMT) v rôznych typoch tkanív (Lamouille et al., 2014). V práci Kahounová et al. (2020) sa podarilo vyselektovať subpopuláciu myších prostatických bazálnych kmeňových buniek s charakteristickou expresiou  $Lin^{-}/Sca-1^{+}CD49^{fhi}/Trop-2^{+}$  (LSC Trop-2<sup>+</sup>; Goldstein et al. 2008, Lee et al. 2014). Táto subpopulácia buniek na rozdiel od kontrolnej non-mPSC (LSC-) preukazovala predovšetkým zvýšenú expresiu SNAI2 (Slug) (Obrázok 4.8). Zároveň bolo preukázané, že bunky so zvýšenou expresiou Slug (Slug-YFP<sup>+</sup> Obrázok 4.9A) mali zvýšenú schopnosť tvoriť organoidy (Obrázok 4.9B), ktoré pozostávali zo všetkých prostatických epiteliálnych buniek – luminálne, bazálne a neuroendokrinné (vid' Kahounova et al. 2020). Naším príspevkom v tejto práci bolo potvrdenie, že myšie bazálne bunky skutočne exprimujú Slug. Pomocou multiplexnej imunohistochemie boli farbené kryorezy myšieho prostatického tkaniva, pričom výsledkom bola preukázateľná kolokalizácia Slug a p63, markeru bazálnych buniek, u myších modelov C57BL/6 a Slug-YFP (Obrázok 4.10).

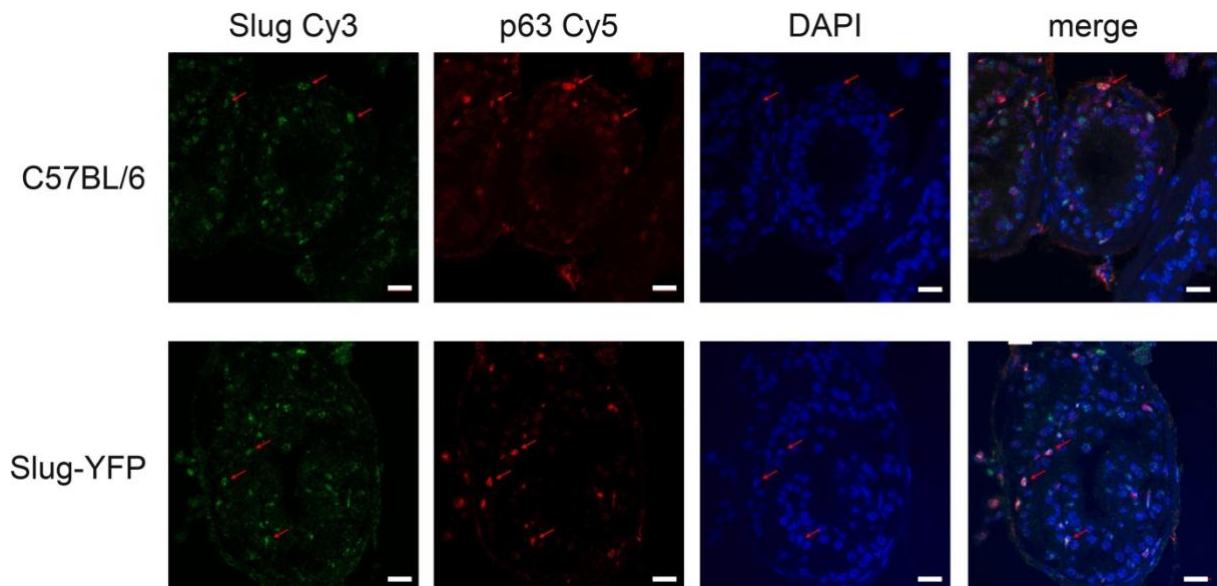


Obrázok 4.8 LSC Trop-2<sup>+</sup> mPSCs - prejavujúce sa s čiastočne mezenchymálnym fenotypom upreguláciou Snail2/Slug. Schematicky znázornený pracovný postup experimentov prezentovaných v štúdiu Kahounova et al. (2020).





**Obrázok 4.9** (A) Expresia markerov a regulátorov epitéliálno-mezenchýmálnej tranzície (EMT) v subpopuláciách LSC Trop2+ vs. LSC-. Výsledky qPCR analýzy sú prezentované ako „heat“ (tepelná) mapa relatívnej génovej expresie v štyroch nezávislých experimentoch. (B) Slug expresia je asociovaná s nárastom schopnosti buniek tvoriť organoidy. Porovnanie výsledkov kvantifikačného testu pre rast organoidov sortovaných populácií: Lin<sup>-</sup>/Slug-YFP<sup>-</sup> vs. Lin<sup>-</sup>/Slug-YFP<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/Slug-YFP<sup>-</sup> vs. Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/Slug-YFP<sup>+</sup> a Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>CD49f<sup>hi</sup>/Slug-YFP<sup>-</sup> vs. Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>CD49f<sup>hi</sup>/Slug-YFP<sup>+</sup>. Výsledky sú prezentované ako priemerná účinnosť tvorby organoidov ± S.D. tromi nezávislými opakovaniami v technickom duplikáte.



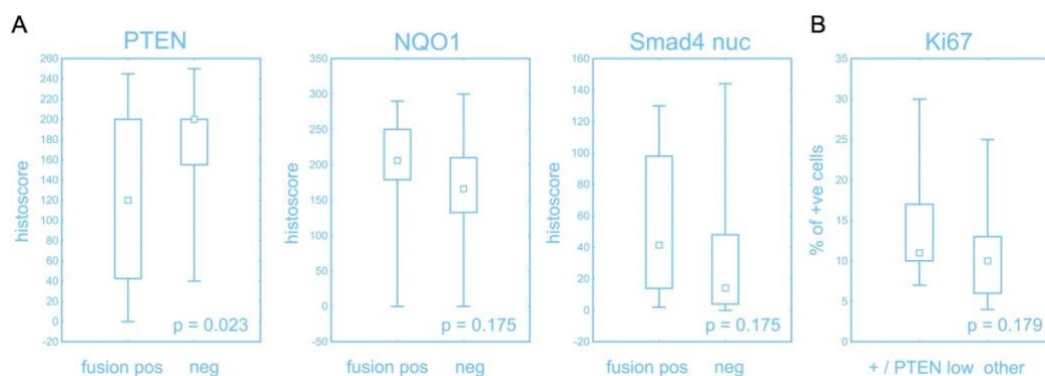
**Obrázok 4.10** Slug kolokalizuje s p63 v tkanive prostaty u C57BL/6 a aj Slug-YFP. Kryorezy prostaty boli analyzované na expresiu Slug v bazálnych bunkách exprimujúcich p63. Bunky koexprimujúce Slug a p63 (označené šípkou) boli detegované v epítete prostaty C57BL/6 a aj Slug-YFP. Mierka 20  $\mu$ m.

## 4.2. PREDIKTÍVNE MARKERY A MODELY V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE

### 4.2.1. Fúzny gén TMRSS2-ERG, nádorový supresor PTEN a terapia PARP inhibítormi

U pokročilých kastračne-rezistentných nádorov bola pozorovaná rozsiahla chromozomálna nestabilita a pacienti s defektnou opravou DNA ukazujú sľubnú odpoveď na novú liečbu PARP inhibítormi (Mateo et al., 2015). Pre karcinóm prostaty je veľmi dôležitá aj skutočnosť, že PARP1 enzymatická aktivita je potrebná na génovú expresiu riadenú AR a následnú proliferáciu buniek PCa v kontexte modelov ochorenia citlivých na hormonálnu terapiu a CRPC (Schiewer a Knudsen, 2014). PARP1 tiež reguluje aktivitu transkripčných faktorov ETS v modeloch rakoviny prostaty, čo má klinický význam vzhľadom na vysoké percento nádorov prostaty, ktoré obsahujú fúzie, ktoré spôsobujú expresiu ETS pod kontrolou aktivity AR (ako prostredníctvom TMRSS2-ERG fúzie) (Brenner a kol., 2011). Okrem mutácií v BRCA1/2 môže preskupenie TMRSS2-ERG a strata tumor supresoru PTEN predikovať odpoveď na PARP inhibítory (Brenner et al., 2011; Mendes Pereira et al., 2009).

Fúzny gén a zmieňovaný nádorový supresor sme sledovali pomocou RT-PCR a imunohistochemie spoločne s radom ďalších proteínov (Kurfurstová et al. 2016). Pozorovali sme významnú asociáciu TMRSS2-ERG so zníženou expresiou PTEN a tiež s trendom smerujúcim k vyššej expresii NQO1 a Smad4 (Obrázok 4.11A). Nádory pozitívne na TMRSS2-ERG fúzny gén a nízku expresiu PTEN (histoskóre menej ako 160) navyše vykazovali trend k vyššej proliferácii v porovnaní s inými kombináciami statusu fúzneho génu a expresie PTEN (Obrázok 4.11 B) (Kurfurstová et al., 2016).



Obrázok 4.11 Význam TMRSS2-ERG fúzneho statusu. (A) Expresia PTEN bola výrazne nižšia, zatiaľ čo NQO1 a jadrový Smad4 mali tendenciu k vyššej expresii v nádoroch s pozitívnym TMRSS2-ERG. (B) Nádory s pozitívnym TMRSS2-ERG a

nízkym PTEN (histoskóre menej ako 160) mali tendenciu k vyššej proliferácii v porovnaní s inou kombináciou stavu fúzie a expresie PTEN. Krabicové grafy predstavujú medián, percentá 25% - 75% a rozsah hodnôt.

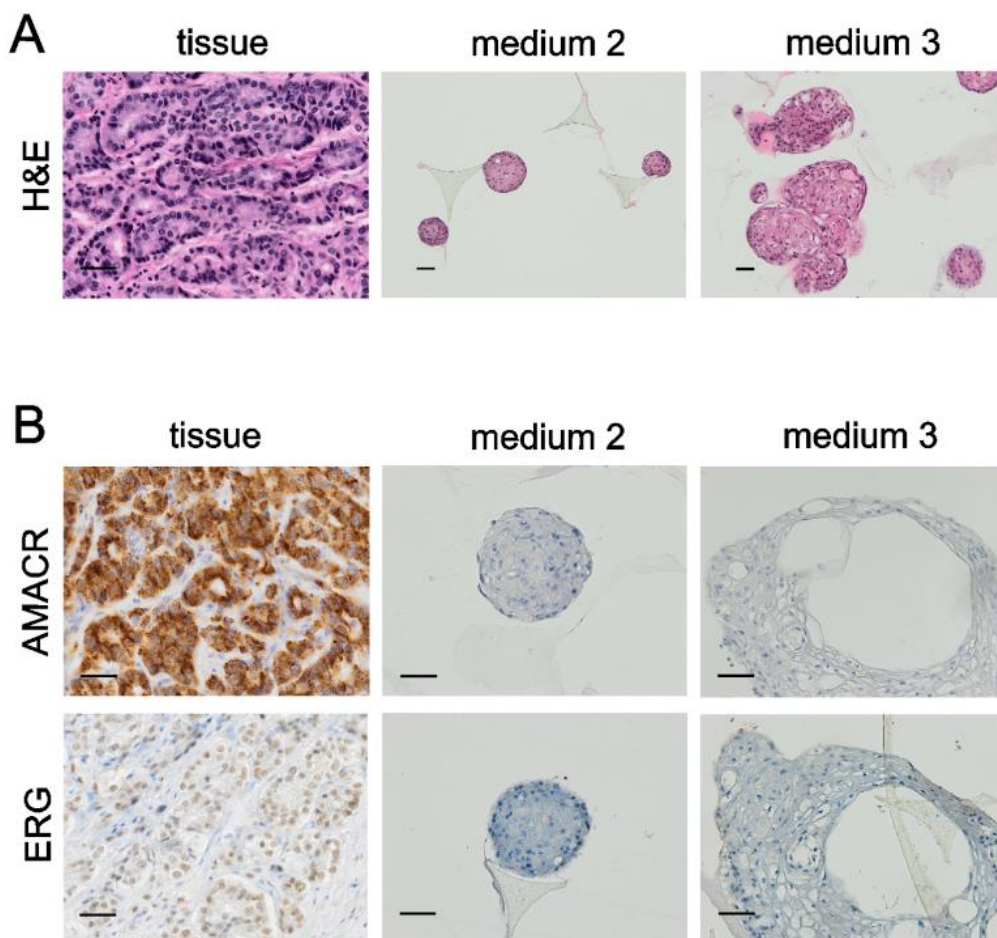
#### **4.2.2. Ustanovenie 3D organoidov z nádorového a nenádorového tkaniva prostaty**

Naším ďalším cieľom bolo vytvoriť podmienky na kultiváciu primárnych vzoriek PCa, ktoré môžu pripraviť pôdu na analýzu biopsií od pacientov s rezistentnými nádorami, čo im umožní potenciálne profitovať zo skríningu nových liekov. Medzi modely vhodné na tento účel sa radia kultivácia organoidov, kultivácia sféroidov a tkanivová kultúra *ex vivo* (kapitola 4.2.3).

V našej práci sme spracovali normálne a nádorové tkanivo 50 pacientov, ktorí podstúpili radikálnu prostatektómiu alebo transuretrálnu resekciu prostaty (TURP). Medián veku týchto pacientov bol 65 (v rozpätí od 46 po 85) rokov a medián Gleason skóre bol 7 (od 7-10). Rast organoidov v prítomnosti komerčného rekombinantného nogginu (77% nádorových aj nenádorových vzoriek; vid' Tabuľka 3.3) bol vyšší v porovnaní s noggin kondicionovaným médiom (31% a 41% pre nádorové a nenádorové vzorky; vid' Tabuľka 3.3). Aktivita kondicionovaného média pre noggin a R-spondin 1 bola overená luciferázovým testom (Obrázok 3.2; Obrázok 3.3).

Pre dosiahnutie lepšieho rastu bolo toto médium modifikované podľa Beshiri et al. (2018), ktorí odporučili vylúčiť nikotínamid a inhibítor p38 (SB 202 190). Výsledkom tejto modifikácie bolo pozorovanie rastu väčších organoidov (Obrázok 4.12). Je však nutné dodať, že žiadna z vyššie uvedených modifikácií nezabezpečila rast nádorových buniek (podľa farbenia AMACR a ERG). Rovnako tak sme použili protokol od autorov Linxweiler et al. (2018) pre kultiváciu sféroidov aj organoidov. Úspešnosť týchto kultivačných podmienok bola porovnateľná s predchádzajúcimi testami, pre sféroidy to bolo 50% (4/8) a pre organoidové kultúry to bolo 77% (7/9) (Tabuľka 3.3).

Celkovo sa nám podarilo kultivovať organoidy z 58% nádorov (29/50) a 69% (20/29) normálnych tkanív. Nepozorovali sme žiadnu súvislosť medzi Gleason skóre a schopnosťou buniek tvoriť organoidy. Vzorky nepreukazujúce signifikantný rast do siedmich dní od nasadenia sa považovali za neproliferujúce. Priemerná doba kultivácie proliferujúcich organoidov bola 21 dní, avšak v dlhodobej kultivácii sme úspešní neboli.

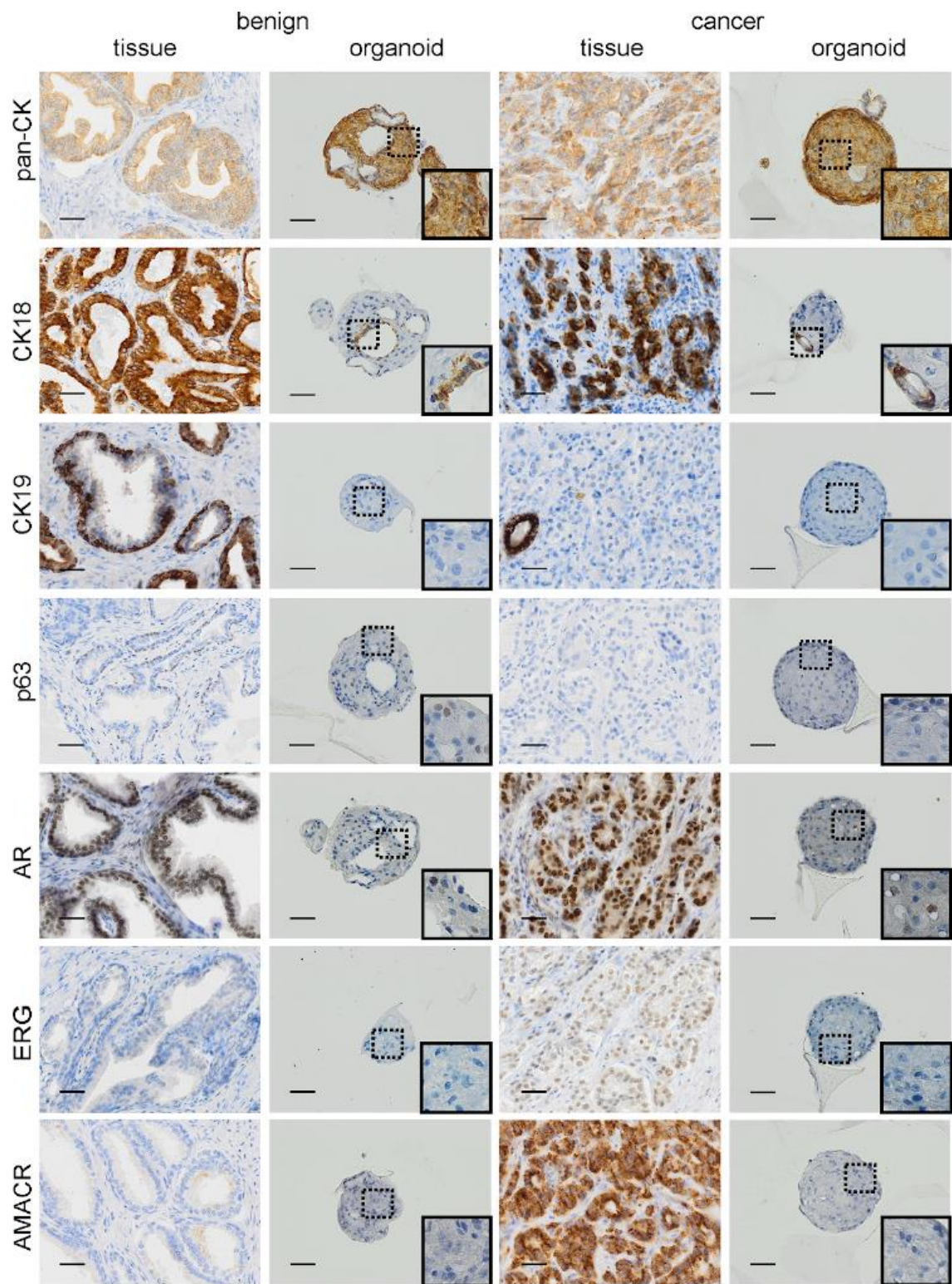


**Obrázok 4.12** Porovnanie rastu organoidov v médiu 2 a v modifikovanom médiu 3. Nádorová vzorka pacienta so štádiom pT3a s Gleason skóre 9 a bez metastáz do lymfatických uzlín (pacient č. 1595). (A) Hematoxylín-eozínové farbenie. (B) Imunohistochemické farbenie nádorových markerov AMACR a ERG. Details k použitým médiom sú v (Tabuľka 3.3). Mierka 50  $\mu$ m.

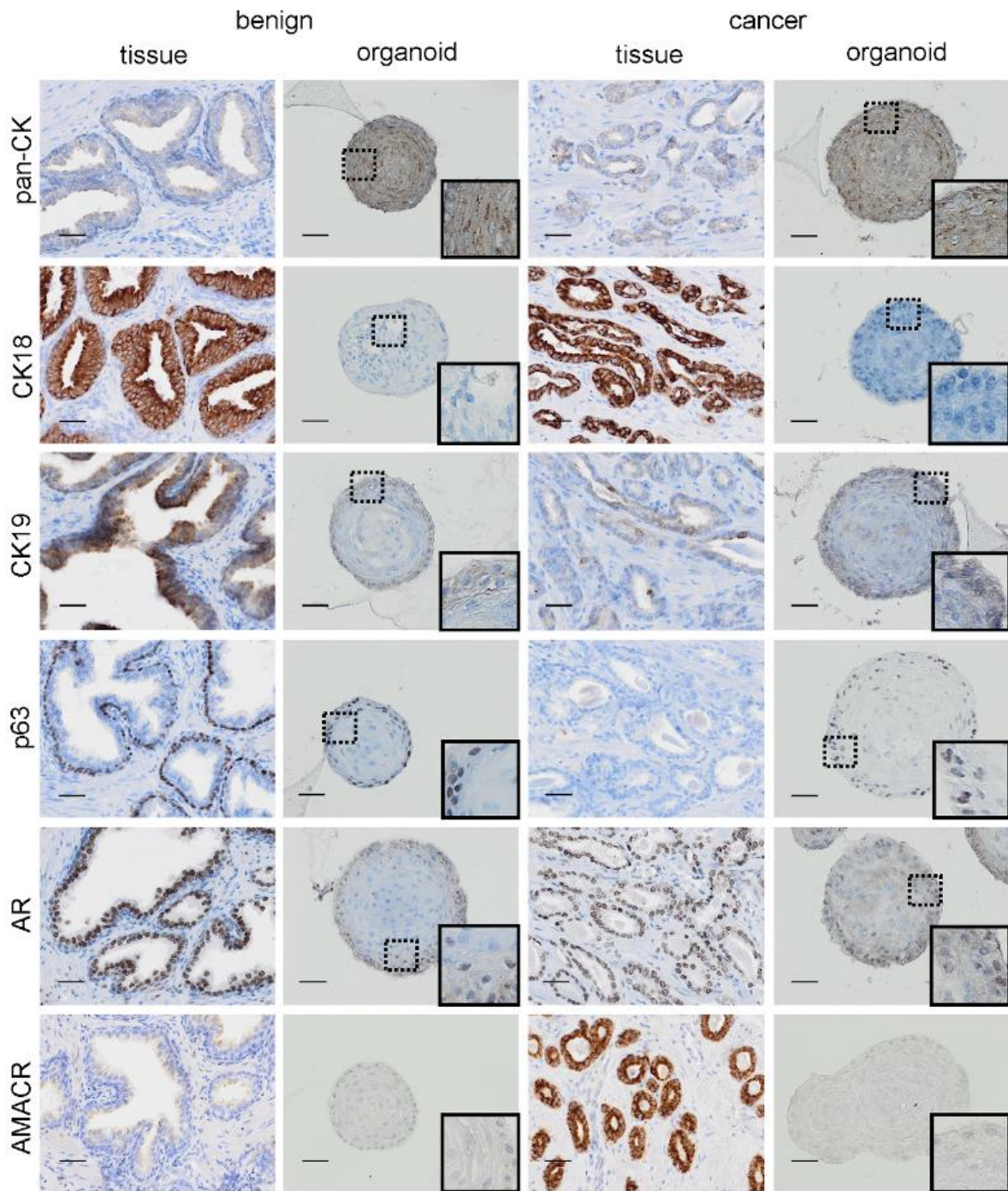
### 4.2.3. Imunohistochemická analýza organoidov prostaty

Dve reprezentatívne vzorky (č. 1595, Obrázok 4.13 a č. 1558, Obrázok 4.14) boli vybrané pre porovnávacie analýzy vybraných proteínov u organoidov a primárneho tkaniva pacienta. Ich patologické štádium bolo pT3a a pT2b s Gleason skóre 9 a 7, pričom obaja pacienti boli bez metastáz do lymfatických uzlín. Pozitívne imunohistochemické farbenie organoidov na pan-cytokeratín u oboch vzoriek preukázalo prítomnosť epiteliálnych buniek. V oboch prípadoch bola čiastočná pozitivita na androgénový receptor a p63 proteín. Časť buniek z prvého prípadu bola pozitívna na luminálny marker CK18 a niekoľko buniek v druhom prípade bolo pozitívnych na CK19, marker intermediálnych buniek. Aj napriek tomu sa nám nepodarilo preukázať rast nádorových buniek, a to prostredníctvom zachovanej overexpresie AMACR a ERG proteínov.





Obrázok 4.13 Imunohistochemická analýza organoidov a primárneho tkaniva pacienta č.1595. Farbenie pan-CK, CK18, CK19, p63, AR, ERG a AMACR u prípadu pT3 s Gleasonovým skóre 9 a bez metastáz do lymfatických uzlín. Zväčšenie 200x, mierka 50  $\mu$ m.

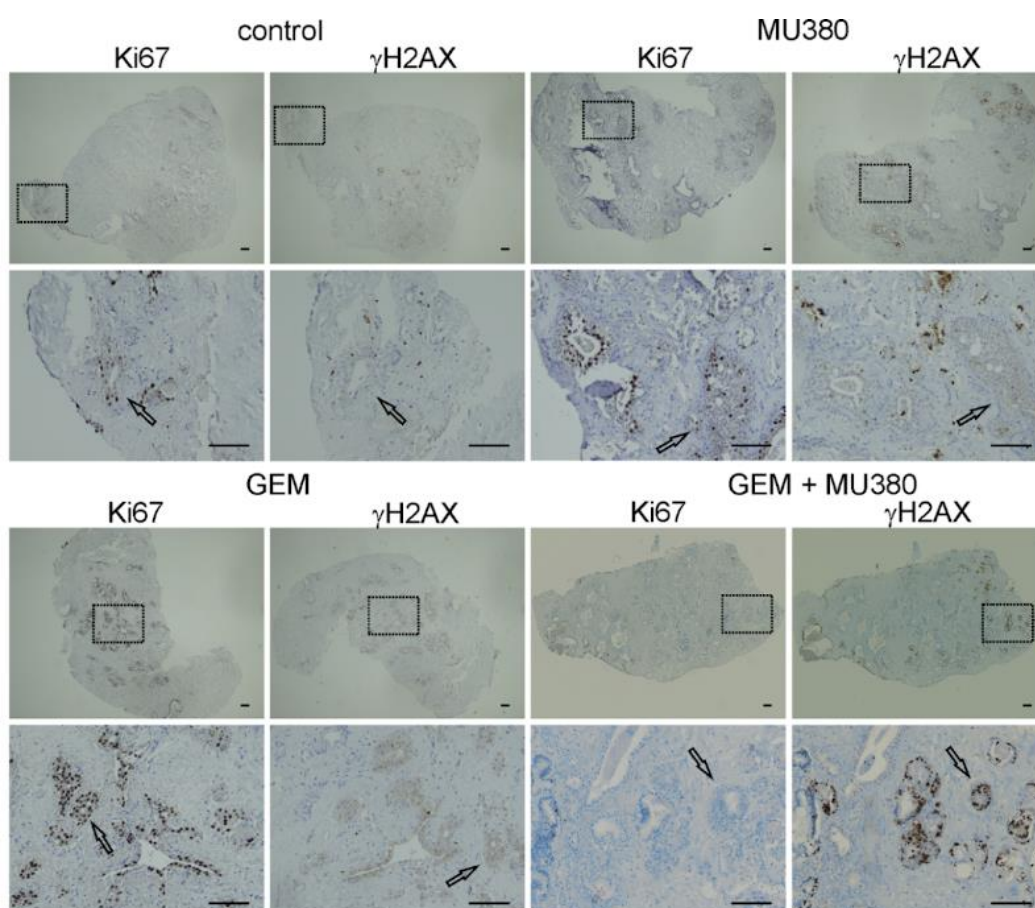


**Obrázok 4.14** Imunohistochemická analýza organoidov a primárneho tkaniva pacienta č.1558. Farbenie pan-CK, CK18, CK19, p63, AR a AMACR u prípadu pT2b s Gleasonovým skóre 7 a bez metastáz do lymfatických uzlín. ERG proteín nebol v nádorovom tkanive prítomný, preto nebol v organoidoch farbený. Zväčšenie 200x, mierka 50  $\mu$ m.



#### 4.2.4. Krátkodobé testovanie liečiv v *ex vivo* tkanivovej kultúre

Úspešnosť ustanovenia PCa organoidov je aj napriek intenzívnemu úsiliu viacerých laboratórií veľmi nízka. Ako alternatívny prístup pre personalizovanú medicínu je možné použiť aj krátkodobú tkanivovú kultúru. Podľa protokolu skupiny Karen Knudsen (Schiewer et al. 2012 a Shafi et al. 2018) sme kultivovali malé kúsky tkaniva po dobu dvoch dní a testovali nový inhibítor Chk1 kinázy v kombinácii s gemcitabínom. Hoci bolo spracovaných desať prostatektomických vzoriek, mnohé z nich vykazovali veľmi nízku proliferáciu alebo chýbajúce nádorové bunky vo vybranom tkanivovom fragmente. Iba jeden experiment poskytol dobré výsledky s dostatočnou proliferáciou nádorových buniek a ich prítomnosťou vo všetkých tkanivách. Kombinovaným ovplyvňovaním Chk1 inhibítorom a gemcitabínom došlo k inhibícii proliferácie a značnému poškodeniu DNA, čo bolo hodnotené farbením Ki67 a  $\gamma$ H2AX (Obrázok 4.15).



**Obrázok 4.15** Krátkodobý test protinádorových liečiv pri *ex vivo* kultivácii nádorového tkaniva. Čerstvé tkanivo bolo získané od patológa bezprostredne po radikálnej prostatektómii. Kúsky tkaniva 1 mm<sup>3</sup> boli umiestnené do 24-jamkových doštičiek na špongiách, ktoré sa namočili do 500  $\mu$ l média a v čase 0 sa primerane ošetrili (kontrola alebo gemcitabín). Ošetrovanie MU380 prebehlo o 24 hodín neskôr a tkanivá boli spracované v časovom bode 48 hodín. Šípky označujú oblasti zodpovedajúce rakovinovému tkanivu. Mierka 50  $\mu$ M.

#### 4.2.5. Porovnanie 3D organoidov a tkanivových kultúr

Na základe praktických skúseností v našich laboratórnych podmienkach sme vyhodnotili výhody a nedostatky oboch modelov s ich potenciálnym využitím v personalizovanej medicíne. Ich vzájomné porovnanie je zhrnuté v prehľadnej tabuľke (Tabuľka 4.2).

Tabuľka 4.2 Porovnanie tkanivových kultúr a 3D organoidov

Kultúra	Výhody	Nevýhody	Zlepšenia
<b>Organoidy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- potenciálne dlhodobá kultúra a opakované testy na liečivá</li> <li>- potenciálne rozšírenie malej vzorky nádoru a biobankovanie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nízka efektivita pri ustanovovaní nádorových organoidov z prostatektómie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zlepšenie podmienok pre dlhodobú kultiváciu nádoru</li> <li>- metastatické vzorky od CRPC pacientov</li> </ul>
<b>Tkanivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kultivácia neporušeného tkaniva</li> <li>- výsledky dostupné v rámci jedného týždňa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nerovnomerné zloženie kúskov tkaniva</li> <li>- iba jedno krátke ovplyvnenie</li> <li>- nízka rýchlosť proliferácie primárneho nádoru prostaty</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rezanie vibratomom po kontrole prítomnosti nádoru v kryorezoch</li> <li>- metastatické vzorky od CRPC pacientov</li> </ul>



## 5. DISKUSIA

Zvýšená expresia Skp2 bola opakovane zistená u agresívneho karcinómu prostaty a tento poznatok reprodukovala aj naša štúdia (Lu et al., 2002; Tsai et al., 2014; Šimečková et al., 2019; Mičková et al., 2021). Rovnako sme pozorovali koreláciu Skp2 s androgénovým receptorom, najmä u pacientov s vysokým Gleasonovým skóre. V predchádzajúcej štúdii bolo preukázané, že deplécia androgénov znížila proliferáciu buniek rakoviny prostaty čiastočne prostredníctvom downregulácie Skp2 (Pernicová et al., 2011). Hoci bola opisovaná androgénová regulácia Skp2 u LNCaP a C4-2 buniek (Wang et al., 2012), iné práce popisujú význam Skp2 pre progresiu rakoviny prostaty aj nezávisle od androgénového receptora (Ruan et al., 2017; Lu et al., 2017; Šimečková et al., 2019).

V našej práci sme pozorovali koreláciu medzi Skp2 a Slug, jedným z regulátorov EMT. Táto korelácia bola silnejšia u nádorov s vyšším Gleasonovým skóre v porovnaní s menej agresívnymi nádormi, ako aj u pacientov s metastázami do lymfatických uzlín v porovnaní s lokalizovaným ochorením. Naše výsledky boli v súlade s predchádzajúcou prácou Esposito et al. (2015), ktorí pozorovali zvýšenú expresiu Slug spolu s pluripotenciálnymi proteínmi Sox2 a Notch1 u nádorov vo vysokom štádiu pokročilosti s metastázami do lymfatických uzlín a nádorových buniek s neuroendokrinnými vlastnosťami. Knock-down Slug u PC3 buniek viedol k downregulácii génov pluripotencie, ako aj neuroendokrinných markerov (Esposito et al., 2015).

Je dôležité poznamenať, že expresia Slug je výrazne modulovaná počas karcinogenézy a je prítomná v bazálnych kmeňových bunkách. Naša nedávna analýza normálnej myšacej prostaty ukázala, že bazálne Slug<sup>+</sup> bunky majú vyšší potenciál pre rast organoidov ako populácia Slug negatívnych buniek (Kahounová et al., 2020). Podobne ako my tak aj iné pracoviská zistili vyššiu expresiu u benígnej hyperplázie na rozdiel od nádoru prostaty buď imunohistochemicky, alebo profilovaním expresie mRNA (Urbanucci et al., 2012; Tomlins et al., 2007). Práca Esposito et al. (2015) preukázala v neoplastickom epiteli metyláciu Slug promótoru, ktorý bol znovu aktívny v bunkách na invazívnom okraji nádoru v pokročilom štádiu. Rad prác popisuje vysokú expresiu Slug u viacerých agresívnych typov rakoviny rôzneho pôvodu (Cobaleda et al., 2007; Wang et al., 2013; Esposito et al., 2015).

Ako už bolo spomenuté, Skp2 aj Slug sú spojené s procesom EMT, ktorý môže prispievať k rezistencii na chemoterapiu. Yang et al. zistili, že oba proteíny sú upregulované

v mammárných bunkách rezistentných na paklitaxel a zvýšený Skp2 sa vyskytuje u rakoviny prostaty rezistentnej na taxány (Yang et al., 2014; Yang et al., 2016). Skp2 tiež prispieva ku kastročne rezistentnému fenotypu prostredníctvom stabilizácie Twist, ďalšieho regulátora EMT (Ruan et al., 2017). Podarilo sa nám reprodukovať down-reguláciu Twist po chemickej inhibícii Skp2 u buniek PC3, ale expresia Slug sa znížila len mierne. Slug ani Twist sa významne nezmenili ani po siRNA proti Skp2.

Aktivita komplexu SCF<sup>Skp2</sup> je regulovaná nedyláciou, pričom jej inhibícia pomocou MLN4924 (pevonedistat) viedla k zjavnej stabilizácii p27<sup>Kip1</sup> a zníženiu expresie Slug v bunkách PC3, PC3 DR12 a LAPC4, ktoré sú pozitívne na androgénový receptor. Pevonedistat bol nedávno navrhnutý ako potenciálny liek na inhibíciu metastáz prostredníctvom down-regulácie Slug u uveálneho melanómu (Jin et al., 2018). Títo autori vysvetlili degradáciu Slug prostredníctvom FBXO11 E3 ligázy po MLN 4924 ovplyvnení, ale na našich modeloch sme nepozorovali žiadnu zmenu v jej expresii. Bolo tiež publikované, že pevonedistat zvyšuje ubikvitinačnú aktivitu MDM2, ktorá sa zameriava na Slug aj MDMX (Hauck et al., 2017; Wang et al., 2009). Napriek tomu, sme na našich bunkových modeloch nepozorovali žiadnu zmenu hladín MDMX po blokovaní nedylácie, s výnimkou C4-2 buniek. Je dôležité uviesť, že MLN4924 znižoval androgénový receptor alebo jeho varianty vo všetkých bunkových líniiach, čo nedávno publikovali aj Zhou et al. (2019). Tiež je potrebné poznamenať, že Zhou et al. preukázali synergický účinok blokovania nedylácie s enzalutamidom a kastráciou *in vivo*. Nepodarilo sa im však objasniť presný mechanizmus inhibície signalizácie androgénového receptoru po zablokovaní nedylácie. Expresia Slug môže byť regulovaná aj acetyláciou (Zhou et al., 2016), ale opäť sme nepozorovali žiadne zmeny v expresii Slug po ovplyvnení inhibítorom histonových deacetyláz sirtinolom u PC3 a ich docetaxel rezistentnej sublínie.

V našej štúdií sme boli zameraní iba na Skp2 a Slug, avšak aj ďalšie proteíny (napr. Twist, Zeb1, vimentin) prispievajú k EMT, rezistencii na liečbu a progresii nádoru a monitorovanie ich expresie by mohlo poskytnúť dodatočné informácie využiteľné pre interpretáciu našich výsledkov. V neposlednom rade, down-regulácia Slug blokovaním nedylácie bola pozorovaná len u niektorých bunkových línii a lepšie pochopenie jej regulácie závislej od typu buniek bude kľúčové pre budúce terapie. Napriek tomu, že sme neidentifikovali priame spojenie medzi Skp2 a Slug, mohli sme pri blokovaní nedylácie pozorovať down-reguláciu Slug a inhibíciu Skp2, čo dokazovala up-regulácia p27 u niekoľkých nádorových

buniek prostaty. Presnejšie pochopenie vzťahu medzi Skp2 a Slug prinesú budúce experimenty, napr. s využitím imunoprecitácie či bunečnej frakcionácie.

V našej práci sme po prvýkrát dokázali výskyt Skp2 a Slug v rovnakých jadrách rakovinových buniek v nádorovom tkanive s vysokým Gleasonovým skóre a metastázami do lymfatických uzlín. Nové liečebné stratégie zamerané na reguláciu Skp2 a Slug blokovaním nedylácie by mohli byť sľubnou liečebnou stratégiou pri pokročilom karcinóme prostaty, tak ako to bolo nedávno zdokumentované pre iné solídne nádory (Jin et al., 2018; Lockhart 2019 et al., Zhou et al., 2019).

Terapia metastatických kastroch rezistentných karcinómov zostáva veľkým problémom uroonkológie. Jednou z nových možností je využitie PARP inhibítorov, predovšetkým u pacientov s defektom v homológnej rekombinácii a génoch BRCA1/2 a ATM (Mateo et al. 2015, Hussain et al. 2020).

Za ďalšie potenciálne prediktory tejto terapie boli považované strata nádorového supresoru PTEN a prítomnosť TMPRSS2-ERG (Brenner et al., 2011; Mendes Pereira et al., 2009). V našom súbore pacientov sme pozorovali významnú asociáciu TMPRSS2-ERG so zníženou expresiou PTEN (Kurfurstová et al., 2016), čo je v súhlase s ďalšími štúdiami (Ahearn et al., 2016; Kang et al., 2021; Wei et al., 2021). Klinická štúdia s veliparibom však nepreukázala lepšie prežívanie pacientov s fúznym génom (Hussain et al. 2018). V rámci tejto štúdie bolo tiež pozorované, že strata PTEN väčšinou nebola spojená s defektom v DNA reparačných génoch (BRCA1/2, ATM, PALB2, FANCA, RAD51B a C). Avšak, experimentálne modely ukazujú, že strata PTEN môže inhibovať homológnu rekombináciu a senzitivovať nádory k PARP inhibícii aj rádioterapii v nádoroch bez BRCA mutácií (van de Ven et al., 2017; Mansour et al., 2018). Klinický význam tohto prediktora bude nutné overiť v budúcich klinických štúdiách.

Naším ďalším cieľom bolo vytvoriť podmienky na kultiváciu primárnych vzoriek PCa, ktoré môžu pripraviť pôdu na analýzu biopsií od pacientov s rezistentnými nádormi, čo im umožní potenciálne profitovať zo skríningu nových liekov. Medzi modely vhodné na tento účel sa radia kultivácia organoidov, kultivácia sféroidov a tkanivová kultúra *ex vivo*. Keďže kultivačné podmienky pre organoidy nádoru prostaty nie sú zatiaľ striktné definované, v kapitole 1.4.1 (Tabuľka 1.1) sú zhrnuté doteraz publikované práce. Prevzatím protokolu Drost et al. sme dokázali v našich laboratórnych podmienkach kultivovať 77 % nádorových aj

nenádorových vzoriek (Drost et al., 2016). Organoidy rástli efektívnejšie v prítomnosti rekombinantného noginu v porovnaní s kondiciovaným médiom. Tieto kultivačné podmienky podporovali rast epitelových buniek, napriek tomu sme v dvoch reprezentatívnych prípadoch nedokázali potvrdiť rast nádorových buniek s nadmernou expresiou AMACR alebo ERG. Ustanoviť primárne nádorové organoidy sa zatiaľ nepodarilo ani iným pracoviskám, pretože menej agresívne vzorky sú náchylné na prerastanie z normálneho epitelu prostaty vo vzorkách biopsie (Gao et al., 2014; Gleave et al., 2020). Nádorové organoidy boli úspešne pripravené z metastáz a cirkulujúcich nádorových buniek (Gao et al. 2014, Servant et al., 2021, Mout et al. 2021). Nevýhodou vzoriek z prostatektómii bola tiež krátka organoidná kultivácia, ktorá netrvala dlhšie ako 3 týždne do prvej pasáže. Zamerali sme sa preto aj na ďalšie úpravy protokolu, ako je nedávna práca (Beshiri et al., 2018), ktorá navrhuje vynechať z média inhibítor p38 SB202190 a nikotínamid. Pomocou tejto modifikácie sme skutočne pozorovali väčšie organoidy, opäť však nebol potvrdený rast AMACR- a ERG-pozitívnych nádorových buniek. Linxweiler et al. (2019) publikovali kultiváciu sféroidov z orgánovo ohraničeného PCa, vrátane krátkodobého testovania liekov. V uvedenom médiu sme však nepozorovali ani zlepšený rast sféroidov alebo organoidov. Jedným z dôvodov mohlo byť obmedzené množstvo použitého materiálu a prítomnosť nenádorových buniek.

Tento rok bola publikovaná komplexná analýza organoidov z 81 klinických vzoriek kultivovaných v prítomnosti R-spondinu 1 a nogginu (Servant et al., 2021). Napriek počiatočnému úspechu pri vytváraní nádorových organoidov boli všetky postupne prerastené normálnymi bunkami a získali benígny fenotyp. Autori vykonali IHC analýzu ERG a PTEN v skorých časových bodoch (do 30 dní). Podobne ako v našej práci, žiadna zo štyroch organoidných kultúr odvodených zo vzoriek s nadmernou expresiou ERG (a pozitivitou PTEN) nevykazovala pozitivitu na ERG. Autori tiež spracovali 9 metastatických vzoriek a vytvorili jeden nový organoidný model odvodený z hormonálne naivných pľúcnych metastáz. Ďalšia nedávna štúdia poukázala na zásadnú úlohu stromálnej parakrinnej signalizácie na rast organoidov a ich fenotyp (Richards et al., 2019). Spoločná kultivácia so stromálnymi bunkami získanými od pacientov spôsobila zvýšené rozvetvenie a pučanie prostatických organoidov, ktoré dobre mimikovali normálnu acinárnú štruktúru *in vivo*. Dôležité je, že organoidy odvodené z oblastí PCa si zachovali expresiu AMACR a vykazovali zvýšenú životaschopnosť. Stromálne bunky získané od pacientov exprimovali množstvo faktorov, ktoré však neboli pozorované v bežne používaných NIH3T3 myšacích embryonálnych fibroblastoch.

Aj keď kultivácia nádorových organoidov, pripravených z primárných hormonálne naivných nádorov, nebola úspešná, tak ich príprava u metastatických pacientov môže byť efektívnejšia. Pre vybraných pacientov potom môžu slúžiť ako testovací model pre opakovaný výber možnej účinnej terapie.

Ďalším prístupom pre krátkodobý skrining liekov je použitie tkanivovej kultúry, ktorá zachováva všetky zložky mikroprostredia nádoru. Podľa protokolu skupiny Karen Knudsen (Schiewer et al. 2012 a Shafi et al. 2018) sme kultivovali malé kúsky tkaniva po dobu dvoch dní a testovali nový inhibítor Chk1 kinázy v kombinácii s gemcitabínom. Kombinovaným ovplyvňovaním Chk1 inhibítorom a gemcitabínom došlo k inhibícii proliferácie a značnému poškodeniu DNA, čo bolo hodnotené farbením Ki67 a  $\gamma$ H2AX. Tieto výsledky sú v súlade s *in vitro* a *in vivo* experimentmi v predchádzajúcej štúdií (Drápela et al., 2020). Na druhej strane väčšina prípadov vykazovala buď nízku mieru proliferácie alebo chýbajúce rakovinové bunky vo vybraných kúskoch tkaniva. Toto by sa dalo zlepšiť prípravou po sebe idúcich rezov pomocou vibrátomu, zariadenia určeného k rezaniu čerstvých tkanív. Nízka rýchlosť proliferácie je typická pre primárne nádory prostaty, ale vysoká hladina je očakávaná vo vzorkách od pacientov s CRPC, najmä z metastáz. Napriek multiklonalite a heterogenite primárnej rakoviny sa zdá, že prekážky spôsobené metastatickým procesom a ďalej terapeutickými intervenciami selektujú pri letálnej metastatickej rakovine prostaty jediný dominantný klon (Haffner et al., 2021). Niekoľko štúdií nedávno už úspešne použilo rezy tkaniva pripravené vibrátomom na testovanie liekov, vrátane enzalutamidu, apalutamidu, docetaxelu, gemcitabínu alebo olaparibu (Van de Merbel et al., 2018; Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2019). Táto metodológia bola tiež použitá na analýzu agresivity nádoru v podmienkach hypoxie (Bery et al., 2020). Tkanivové rezy a kultivácia *ex vivo* sa môžu použiť aj pre myšacie modely, ktoré sa považujú za zlatý štandard pre výskum rakoviny a predklinické testovanie liekov (Bery et al., 2020; Van de Merbel et al., 2021). Verné zachovanie tkanivovej štruktúry a funkcie v *ex vivo* PDX kultúre ponúka ideálnu príležitosť na skrining účinnosti liečby, čím sa znižujú náklady a počet experimentálnych zvierat (Zhang et al., 2019; Van de Merbel et al., 2021).

Na základe praktických skúseností v našich laboratórnych podmienkach sme vyhodnotili výhody a nedostatky *ex vivo* aj organoidovej kultivácie. Naše závery sú v dobrej zhode s podobným porovnaním v recentnom článku v prestížnom časopise Nature Reviews Urology (Van de Merbel et al., 2021).

## 6. ZÁVER

V mužskej populácii západného sveta sa podľa aktuálnych štatistík, z hľadiska frekvencie výskytu, rakovina prostaty radí na prvé miesto a je druhou najčastejšou príčinou úmrtia spojenou s nádorovými ochoreniami. Ranné štádiá tohto ochorenia je možné pomerne efektívne liečiť ožarovaním, alebo radikálnou prostatektómiou. V prípade pokročilého metastatického štádia je využívaná liečba androgén deprivačnou terapiou (ADT), po ktorej však môže dochádzať k relapsu v podobe kastračne rezistentnej formy (CRPC), proti ktorej má súčasná medicína veľmi obmedzené možnosti liečby. Preto je nevyhnutné priniesť nové, efektívne prístupy liečby, ktorých je možné docíliť iba pochopením progresie ochorenia a analýzou markerov spojených s pokročilým štádiom rakoviny prostaty.

Zvýšená prítomnosť Skp2 podjednotky E3 ligázového komplexu bola opakovane potvrdená u agresívneho karcinómu prostaty. V našej práci sme ako prví potvrdili jeho koreláciu a kolokalizáciu so Slug, jedným z regulátorov epitelovo-mezenchymálnej tranzície (EMT). Táto korelácia bola silnejšia u nádorov s vyšším Gleasonovým skóre a s metastázami do lymfatických uzlín v porovnaní s menej agresívnymi nádormi s lokalizovaným ochorením. Koexpresia oboch proteínov bola preukázaná multiplexnou imunohistochemickou analýzou nádorového tkaniva prostaty a rovnako bola pozorovaná aj u docetaxel rezistentnej (DR12) PC3 sublinie a ďalších mezenchymových línií odvodených z ich epiteliálnych náprotivkov. S cieľom potvrdiť vzájomný vzťah Skp2 a Slug boli robené *in vitro* experimenty zahrňujúce chemickú inhibíciu a siRNA interferenciu, kde po chemickej inhibícii dochádzalo k čiastočnému poklesu Slug, avšak tento pokles po siRNA pozorovaný nebol. Aktivita Skp2 v E3 ligázovom komplexe je tiež regulovaná prostredníctvom nedylácie. Použitím jej inhibítora MLN 4924 dochádzalo k nárastu p27<sup>Kip1</sup>, typického substrátu Skp2, a poklesu expresie Slug u PC3, PC3 DR12 a LAPC4 buniek. Inhibítora nedylácie, pevonedistat, je v súčasnosti vo fáze klinických skúšok pre liečbu viacerých solídnych nádorov a výsledky našich *in vitro* experimentov naznačujú možnosť jeho využitia aj pri cielej liečbe pokročilého docetaxel-rezistentného karcinómu prostaty.

Počas karcinogenézy je expresia Slug výrazne modulovaná a jeho zvýšená prítomnosť je spájaná s pokročilými formami rakoviny. Zároveň je prítomný v bazálnych kmeňových bunkách a naša nedávna analýza normálnej myšacej prostaty ukázala, že bazálne Slug<sup>+</sup> bunky majú vyšší potenciál pre rast organoidov ako populácia Slug negatívnych buniek.

Inhibítory PARP-1 boli identifikované ako veľmi účinné voči nádorom s mutáciami v BRCA1/2, podľa princípu tzv. syntetickej letality. Zároveň sú predmetom diskusie aj ďalšie potenciálne prediktory na túto terapiu, ako je strata nádorového supresoru PTEN a prítomnosť TMPRSS2-ERG. V našom súbore pacientov sme pozorovali signifikantnú asociáciu TMPRSS2-ERG so zníženou expresiou PTEN, čo je v súhlase s ďalšími štúdiami. Aj keď klinické štúdie s veliparibom nepreukázali lepšie prežívanie pacientov s fúznym génom, iné experimentálne modely naznačujú, že strata PTEN môže inhibovať homológnu rekombináciu a senzitivovať nádory k PARP inhibícii aj rádioterapii v nádoroch bez BRCA mutácií.

Ďalším z našich cieľov bolo ustanovenie patientských 3D organoidov a *ex vivo* tkanivového modelu, ktoré by mohli pomôcť vo výbere terapie pacientov s pokročilým ochorením. Celkovo sa nám podarilo kultivovať organoidy z 59% nádorového a 69% nenádorového tkaniva. Imunohistochemickým farbením pan-cytokeratínu u dvoch reprezentatívnych vzoriek sme preukázali rast epiteliálnych buniek. Naproti tomu nadexpresia AMACR a ERG prítomná u nádorového tkaniva nebola zachovaná v príslušných organoidoch. Ďalším obmedzením tohto prístupu bol rast organoidov len po dobu 3 týždňov do prvej pasáže.

Ako ďalšiu sme využili techniku tkanivových kultúr *ex vivo* a vykonali krátkodobý chemoterapeutický test s použitím gemcitabínu a inhibítora Chk1 na 10 vzorkách od pacientov. Nekonzistentná morfológia medzi fragmentmi tkaniva a nízka proliferácia vo väčšine prípadov bránili interpretácii testovania liečiv. Naproti tomu, ustanovenie týchto modelov by mohlo byť efektívnejšie pri rýchlejšie proliferujúcich metastatických vzorkách pacientov s kastročne rezistentným karcinómom, u ktorých môžu poslúžiť pre opakovaný výber účinnej terapie.

## 7. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A KONFERENČNÝCH PRÍSPEVKOV

1. **Mickova A**, Kharraishvili G, Kurfurstova D, Gachechiladze M, Kral M, Vacek O, Pokryvkova B, Mistrik M, Soucek K, Bouchal J. **Skp2 and Slug Are Coexpressed in Aggressive Prostate Cancer and Inhibited by Neddylation Blockade.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22: 2844. IF2020 5,923
2. Kahounová Z, Remšík J, Fedr R, Bouchal J, **Mičková A**, Slabáková E, Binó L, Hampl A, Souček K. **Slug-expressing mouse prostate epithelial cells have increased stem cell potential.** *Stem Cell Res.* 2020; 46: 101844. IF 2,020
3. Kurfurstova D, Bartkova J, Vrtel R, **Mickova A**, Burdova A, Majera D, Mistrik M, Kral M, Santer FR, 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.* 2016; 10: 879-94. IF 5,314
4. **Mickova A**, Morong M, Levkova M, Kurfurstova D, Kharraishvili G, Uberall I, Student V jr, Student V, Drapela S, Soucek K, Bouchal J. **Advantages and limitations of 3D organoids and ex vivo tumor tissue culture in personalized medicine for prostate cancer.** *Klinická Onkologie*, přijato do tisku



## **Zoznam posterov/prednášok prednesených uchádzačom na verejných odborných fórach**

**Alena Mickova**, Gvantsa Kharaishvili, Milan Kral, Mariam Gachechiladze, Martin Mistrik, Jan Bouchal. Colocalization of Skp2 and Slug proteins and their possible interaction in aggressive prostate cancer. *Dni molekulovej patológie, 15. ročník s medzinárodnou účasťou a 3. martinské nelekárske dni pracovníkov v (molekulovej) patológii, Martin 23. a 24. 5 2019* (poster)

**Alena Mickova**, Gvantsa Kharaishvili, Milan Kral, Mariam Gachechiladze, Martin Mistrik, Jan Bouchal. Colocalization of Skp2 and Slug proteins and their possible interaction in aggressive prostate cancer. *31<sup>st</sup> European Congress of Pathology, Nice, Francúzsko 7-11. 9. 2019* (poster), The best poster session (abstrakt+prezentácia) 8. 9.2019

**Mickova A**, Levkova M, Kurfurstova D, Kharaishvili G, Morong M, Student V, Drapela S, Soucek K, Bouchal J. Pros and cons of in vitro culture of prostate organoids and tissue fragments. *11<sup>th</sup> International Conference Analytical Cytometry 2021, Ostrava 2-5 10: 2021* (poster)

**Alena Mickova**, Gvantsa Kharaishvili, Milan Kral, Mariam Gachechiladze, Martin Mistrik, Jan Bouchal. Colocalization of Skp2 and Slug proteins and their possible interaction in aggressive prostate cancer. *Olomouc for personalized medicine, Olomouc 25-27. 10. 2021* (poster)

**Mickova A**, Levkova M, Kurfurstova D, Kharaishvili G, Morong M, Student V, Drapela S, Soucek K, Bouchal J. Pros and cons of in vitro culture of prostate organoids and tissue fragments. *Olomouc for personalized medicine, Olomouc 25-27. 10. 2021* (poster)

## 8. LITERATÚRA

Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000; **14**: 2410–2434.

Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA *et al.* Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol* 2019; **5**: 471–478.

Adamo P, Ladomery MR. The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene* 2016; **35**: 403–414.

Adamo P, Porazinski S, Rajatileka S, Jumbe S, Hagen R, Cheung M-K *et al.* The oncogenic transcription factor ERG represses the transcription of the tumour suppressor gene PTEN in prostate cancer cells. *Oncol Lett* 2017; **14**: 5605–5610.

Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, Gerke T, Graff RE, Morais CL *et al.* A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2016; **108**: djv346

Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, Becker K-F. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; **14**: 3035–3050.

Aparicio AM, Shen L, Tapia ELN, Lu J-F, Chen H-C, Zhang J *et al.* Combined Tumor Suppressor Defects Characterize Clinically Defined Aggressive Variant Prostate Cancers. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 1520–1530.

Armenia J, Wankowicz SAM, Liu D, Gao J, Kundra R, Reznik E *et al.* The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* 2018; **50**: 645–651.

Aumüller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A, Abrahamsson PA. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 1999; **53**: 1041–1048.

Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, Chi KN. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2015; **12**: 26–36.

Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; **153**: 666–677.

Baciarello G, Sternberg CN. Treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) with enzalutamide. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **106**: 14–24.

Bandini M, Gandaglia G, Briganti A. Obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2017; **27**: 415–421.

Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology* 2012; **60**: 187–198.

Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, Huch M, Begthel H, Kujala P *et al.* In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology* 2015; **148**: 126–136.e6.

Ben-Izhak O, Lahav-Baratz S, Meretyk S, Ben-Eliezer S, Sabo E, Dirnfeld M *et al.* Inverse relationship between Skp2 ubiquitin ligase and the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 in prostate cancer. *J Urol* 2003; **170**: 241–245.

Bery F, Figiel S, Kouba S, Fontaine D, Guéguinou M, Potier-Cartereau M *et al.* Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 4786.

Beshiri ML, Tice CM, Tran C, Nguyen HM, Sowalsky AG, Agarwal S *et al.* A PDX/Organoid Biobank of Advanced Prostate Cancers Captures Genomic and Phenotypic Heterogeneity for Disease Modeling and Therapeutic Screening. *Clin Cancer Res* 2018; **24**: 4332–4345.

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P *et al.* Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 1999; **13**: 966–977.

Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015; **160**: 324–338.

Brenner JC, Ateeq B, Li Y, Yocum AK, Cao Q, Asangani IA *et al.* Mechanistic rationale for inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell* 2011; **19**: 664–678.

Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR *et al.* Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 2017; **23**: 1424–1435.

Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV *et al.* Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**: 254–268.

Cai Z, Moten A, Peng D, Hsu C-C, Pan B-S, Manne R *et al.* The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy. *Semin Cancer Biol* 2020; **67**: 16–33.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 76–83.

Clark A, Burleson M. SPOP and cancer: a systematic review. *Am J Cancer Res* 2020; **10**: 704–726.

Cobaleda C, Pérez-Caro M, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu Rev Genet* 2007; **41**: 41–61.

Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha (2) beta (1)-integrin expression. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3865–3872.

Crawford ED, Heidenreich A, Lawrentschuk N, Tombal B, Pompeo ACL, Mendoza-Valdes A *et al.* Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2019; **22**: 24–38.

Cui D, Xiong X, Zhao Y. Cullin-RING ligases in regulation of autophagy. *Cell Div* 2016; **11**: 8.

Das S, Salami SS, Spratt DE, Kaffenberger SD, Jacobs MF, Morgan TM. Bringing Prostate Cancer Germline Genetics into Clinical Practice. *J Urol* 2019; **202**: 223–230.

Ding G, Fang J, Tong S, Qu L, Jiang H, Ding Q *et al.* Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer. *Prostate* 2015; **75**: 957–968.

Drápela S, Khirsariya P, van Weerden WM, Fedr R, Suchánková T, Búzová D *et al.* The CHK1 inhibitor MU380 significantly increases the sensitivity of human docetaxel-resistant prostate cancer cells to gemcitabine through the induction of mitotic catastrophe. *Mol Oncol* 2020; **14**: 2487–2503.

Drobnjak M, Osman I, Scher HI, Fazzari M, Cordon-Cardo C. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1891–1895.

Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**: 407–418.

Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y *et al.* Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016; **11**: 347–358.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; **12**: 2245–2262.

Elbadawy M, Abugomaa A, Yamawaki H, Usui T, Sasaki K. Development of Prostate Cancer Organoid Culture Models in Basic Medicine and Translational Research. *Cancers (Basel)* 2020; **12**: 777.

Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C *et al.* A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol* 2016; **69**: 428–435.

Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol* 2010; **183**: 433–440.

Esposito S, Russo MV, Airoidi I, Tupone MG, Sorrentino C, Barbarito G *et al.* SNAI2/Slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression. *Oncotarget* 2015; **6**: 17121–17134.

Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K *et al.* A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 2016; **18**: 827–838.

Gan W, Dai X, Lunardi A, Li Z, Inuzuka H, Liu P *et al.* SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of the ERG Oncoprotein to Suppress Prostate Cancer Progression. *Mol Cell* 2015; **59**: 917–930.

Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A *et al.* Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; **159**: 176–187.

Gleave AM, Ci X, Lin D, Wang Y. A synopsis of prostate organoid methodologies, applications, and limitations. *Prostate* 2020; **80**: 518–526.

Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 20882–20887.

Goldstein M, Kastan MB. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med* 2015; **66**: 129–143.

Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; **95**: 333–339.

Gumbiner LM, Gumerlock PH, Mack PC, Chi SG, deVere White RW, Mohler JL *et al.* Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma. *Prostate* 1999; **38**: 40–45.

Gurel B, Iwata T, Koh CM, Jenkins RB, Lan F, Van Dang C *et al.* Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol* 2008; **21**: 1156–1167.

Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, Esopi DM, Albadine R, Gurel B *et al.* Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* 2010; **42**: 668–675.

Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, True LD, Nelson WG, Epstein JI *et al.* Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2021; **18**: 79–92.

Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P *et al.* 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2016; **375**: 1415–1424.

Hansen AR, Massard C, Ott PA, Haas NB, Lopez JS, Ejadi S *et al.* Pembrolizumab for advanced prostate adenocarcinoma: findings of the KEYNOTE-028 study. *Ann Oncol* 2018; **29**: 1807–1813.

Hauck PM, Wolf ER, Olivos DJ 3rd, McAtarsney CP, Mayo LD. The fate of murine double minute X (MdmX) is dictated by distinct signaling pathways through murine double minute 2 (Mdm2). *Oncotarget* 2017; **8**: 104455–104466.

Henry GH, Malewska A, Joseph DB, Malladi VS, Lee J, Torrealba J *et al.* A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep* 2018; **25**: 3530–3542.e5.

Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC *et al.* Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4A in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia predicts early relapse in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 544–550.

Hershko DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* 2008; **112**: 1415–1424.

Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N *et al.* Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 2015; **21**: 1364–1371.

Hudson DL, Guy AT, Fry P, O'Hare MJ, Watt FM, Masters JR. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**: 271–278.

Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S *et al.* Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2345–2357.

Chan C-H, Morrow JK, Li C-F, Gao Y, Jin G, Moten A *et al.* Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression. *Cell* 2013; **154**: 556–568.

Chappell WH, Lehmann BD, Terrian DM, Abrams SL, Steelman LS, McCubrey JA. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle* 2012; **11**: 4579–4588.

Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 3520–3526.

Chen S, Chen C, Hu Y, Zhu C, Luo X, Wang L *et al.* Three-Dimensional Ex Vivo Culture for Drug Responses of Patient-Derived Gastric Cancer Tissue. *Front Oncol* 2020; **10**: 614096.

Jeong S-H, Kwak C. Immunotherapy for prostate cancer: Requirements for a successful regime transfer. *Investig Clin Urol* 2022; **63**: 3–13.

Jin Y, Zhang P, Wang Y, Jin B, Zhou J, Zhang J *et al.* Neddylation Blockade Diminishes Hepatic Metastasis by Dampening Cancer Stem-Like Cells and Angiogenesis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res* 2018; **24**: 3741–3754.

Kahounová Z, Remšík J, Fedr R, Bouchal J, Mičková A, Slabáková E *et al.* Slug-expressing mouse prostate epithelial cells have increased stem cell potential. *Stem Cell Res* 2020; **46**: 101844.

Kang M, Lee H, Byeon S-J, Kwon GY, Jeon SS. Genomic Features and Clinical Implications of Intraductal Carcinoma of the Prostate. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 13125

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**: 411–422.

Kao S-H, Wang W-L, Chen C-Y, Chang Y-L, Wu Y-Y, Wang Y-T *et al.* GSK3 $\beta$  controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by. *Oncogene* 2014; **33**: 3172–3182.

Karthaus WR, Iaquinta PJ, Drost J, Gracanin A, van Boxtel R, Wongvipat J *et al.* Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 2014; **159**: 163–175.

Kelly K, Balk SP. Reprogramming to resist. *Science* 2017; **355**: 29–30.

Kolar Z, Burdova A, Jamaspishvili T, Bouchal J, Kucerova R, Bienova M *et al.* Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2 $\beta$  expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer. *Neoplasma* 2014; **61**: 9–16.

Kretschmar K, Clevers H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev Cell* 2016; **38**: 590–600.

Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW *et al.* Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* 2017; **355**: 78–83.



Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R *et al.* Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2016; **22**: 369–378.

Kurfurstova D, Bartkova J, Vrtel R, Mickova A, Burdova A, Majera D *et al.* DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Mol Oncol* 2016; **10**: 879–894.

Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM *et al.* Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 700–712.

Labbé DP, Brown M. Transcriptional Regulation in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; **8**: a030437.

Lakshmanan V-K, Ojha S, Jung YD. A modern era of personalized medicine in the diagnosis, prognosis, and treatment of prostate cancer. *Comput Biol Med* 2020; **126**: 104020.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 178–196.

Lander R, Nordin K, LaBonne C. The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J Cell Biol* 2011; **194**: 17–25.

Lee CT, Capodieci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI *et al.* Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 977–983.

Lee D-K, Liu Y, Liao L, Wang F, Xu J. The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. *Int J Biol Sci* 2014; **10**: 1007–1017.

Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 2012; **139**: 3471–3486.

Linxweiler J, Hammer M, Muhs S, Kohn M, Pryalukhin A, Veith C *et al.* Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; **145**: 551–559.

Litwin MS, Tan H-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* 2017; **317**: 2532–2542.

Liu J, Uygur B, Zhang Z, Shao L, Romero D, Vary C *et al.* Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression. *Prostate* 2010; **70**: 1768–1777.

Liu T, Zhang X, Shang M, Zhang Y, Xia B, Niu M *et al.* Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *J Surg Oncol* 2013; **107**: 188–194.

Liu X, Ory V, Chapman S, Yuan H, Albanese C, Kallakury B *et al.* ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol* 2012; **180**: 599–607.

Lockhart AC, Bauer TM, Aggarwal C, Lee CB, Harvey RD, Cohen RB *et al.* Phase Ib study of pevonedistat, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, in combination with docetaxel, carboplatin and paclitaxel, or gemcitabine, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2019; **37**: 87–97.

Lotan TL, Tomlins SA, Bismar TA, Van der Kwast TH, Grignon D, Egevad L *et al.* Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers. I. Molecular Biomarkers in Prostate Cancer. *Am J Surg Pathol* 2020; **44**: e15–e29.

Lu L, Schulz H, Wolf DA. The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 2002; **3**: 22.

Lu W, Liu S, Li B, Xie Y, Izban MG, Ballard BR *et al.* SKP2 loss destabilizes EZH2 by promoting TRAF6-mediated ubiquitination to suppress prostate cancer. *Oncogene* 2017; **36**: 1364–1373.

Macedo-Silva C, Benedetti R, Ciardiello F, Cappabianca S, Jerónimo C, Altucci L. Epigenetic mechanisms underlying prostate cancer radioresistance. *Clin Epigenetics* 2021; **13**: 125.

Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, Greenberg NM. Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 6018–6025.

Mansour WY, Tennstedt P, Volquardsen J, Oing C, Kluth M, Hube-Magg C *et al.* Loss of PTEN-assisted G2/M checkpoint impedes homologous recombination repair and enhances radio-curability and PARP inhibitor treatment response in prostate cancer. *Sci Rep* 2018; **8**: 3947.

Martin SZ, Wagner DC, Hörner N, Horst D, Lang H, Tagscherer KE *et al.* Ex vivo tissue slice culture system to measure drug-response rates of hepatic metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2019; **19**: 1030.

Masuda T, Inoue H, Sonoda H, Mine S, Yoshikawa Y, Nakayama K *et al.* Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res* 2002; **62**: 3819–3825.

Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R *et al.* DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1697–1708.

Maya-Mendoza A, Moudry P, Merchut-Maya JM, Lee M, Strauss R, Bartek J. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 2018; **559**: 279–284.

McCrea E, Sissung TM, Price DK, Chau CH, Figg WD. Androgen receptor variation affects prostate cancer progression and drug resistance. *Pharmacol Res* 2016; **114**: 152–162.

Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim J-S *et al.* Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med* 2009; **1**: 315–322.

Mickova A, Kharraishvili G, Kurfurstova D, Gachechiladze M, Kral M, Vacek O *et al.* Skp2 and Slug Are Coexpressed in Aggressive Prostate Cancer and Inhibited by Neddylation Blockade. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 2844.

Moad M, Hannezo E, Buczacki SJ, Wilson L, El-Sherif A, Sims D *et al.* Multipotent Basal Stem Cells, Maintained in Localized Proximal Niches, Support Directed Long-Ranging Epithelial Flows in Human Prostates. *Cell Rep* 2017; **20**: 1609–1622.

Mout L, van Dessel LF, Kraan J, de Jong AC, Neves RPL, Erkens-Schulze S *et al.* Generating human prostate cancer organoids from leukapheresis enriched circulating tumour cells. *Eur J Cancer* 2021; **150**: 179–189.

Mu P, Zhang Z, Benelli M, Karthaus WR, Hoover E, Chen C-C *et al.* SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and. *Science* 2017; **355**: 84–88.

Naipal KAT, Verkaik NS, Sánchez H, van Deurzen CHM, den Bakker MA, Hoeijmakers JHJ *et al.* Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer* 2016; **16**: 78.

Neilsen PM, Noll JE, Suetani RJ, Schulz RB, Al-Ejeh F, Evdokiou A *et al.* Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome. *Oncotarget* 2011; **2**: 1203–1217.

Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; **166**: 21–45.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 155–166.

Nowak DG, Cho H, Herzka T, Watrud K, DeMarco DV, Wang VMY *et al.* MYC Drives Pten/Trp53-Deficient Proliferation and Metastasis due to IL6 Secretion and AKT Suppression via PHLPP2. *Cancer Discov* 2015; **5**: 636–651.

Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A *et al.* Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov* 2017; **7**: 462–477.

Peehl DM, Sellers RG. Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 208–215.

Pernicová Z, Slabáková E, Kharashvili G, Bouchal J, Král M, Kunická Z *et al.* Androgen depletion induces senescence in prostate cancer cells through down-regulation of Skp2. *Neoplasia* 2011; **13**: 526–536.

Proia TA, Keller PJ, Gupta PB, Klebba I, Jones AD, Sedic M *et al.* Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 2011; **8**: 149–163.

Puhr M, Hoefler J, Schäfer G, Erb HHH, Oh SJ, Klocker H *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *Am J Pathol* 2012; **181**: 2188–2201.

Ramakrishnan Geethakumari P, Schiewer MJ, Knudsen KE, Kelly WK. PARP Inhibitors in Prostate Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017; **18**: 37.

Rani A, Dasgupta P, Murphy JJ. Prostate Cancer: The Role of Inflammation and Chemokines. *Am J Pathol* 2019; **189**: 2119–2137.

Rennert H, Eng K, Zhang T, Tan A, Xiang J, Romanel A *et al.* Development and validation of a whole-exome sequencing test for simultaneous detection of point mutations, indels and copy-number alterations for precision cancer care. *NPJ Genom Med* 2016; **1**: 16019–.

Ribeiro FR, Jerónimo C, Henrique R, Fonseca D, Oliveira J, Lothe RA *et al.* 8q gain is an independent predictor of poor survival in diagnostic needle biopsies from prostate cancer suspects. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 3961–3970.

Richards Z, McCray T, Marsili J, Zenner ML, Manlucu JT, Garcia J *et al.* Prostate Stroma Increases the Viability and Maintains the Branching Phenotype of Human Prostate Organoids. *iScience* 2019; **12**: 304–317.

Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3539–3545.

Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J-M *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015; **161**: 1215–1228.

Ruan D, He J, Li C-F, Lee H-J, Liu J, Lin H-K *et al.* Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene* 2017; **36**: 4299–4310.

Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG *et al.* alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; **287**: 1662–1670.

Rybak AP, Bristow RG, Kapoor A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget* 2015; **6**: 1900–1919.

Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F *et al.* A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 2018; **172**: 373–386.e10.

Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010; **207**: 2187–2194.

Samadder P, Suchánková T, Hylse O, Khirsariya P, Nikulenkov F, Drápela S *et al.* Synthesis and Profiling of a Novel Potent Selective Inhibitor of CHK1 Kinase Possessing Unusual N-trifluoromethyl pyrazole Pharmacophore Resistant to Metabolic. *Mol Cancer Ther* 2017; **16**: 1831–1842.

Saraon P, Drabovich AP, Jarvi KA, Diamandis EP. Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC* 2014; **25**: 42–54.

Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van den Brink S *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1762–1772.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; **459**: 262–265.

Senft D, Qi J, Ronai ZA. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**: 69–88.

Servant R, Garioni M, Vlajnic T, Blind M, Pueschel H, Müller DC *et al.* Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. *J Pathol* 2021; **254**: 543–555.

Shafi AA, Schiewer MJ, de Leeuw R, Dylgjeri E, McCue PA, Shah N *et al.* Patient-derived Models Reveal Impact of the Tumor Microenvironment on Therapeutic Response. *Eur Urol Oncol* 2018; **1**: 325–337.

Shaw TJ, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Curr Opin Cell Biol* 2016; **42**: 29–37.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; **274**: 1672–1677.

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; **14**: 611–629.

Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, Higano C, Basch E, Fizazi K *et al.* Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 1402–1418.

Schiewer MJ, Goodwin JF, Han S, Brenner JC, Augello MA, Dean JL *et al.* Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discov* 2012; **2**: 1134–1149.

Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res* 2014; **12**: 1069–1080.

Schütte M, Risch T, Abdavi-Azar N, Boehnke K, Schumacher D, Keil M *et al.* Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat Commun* 2017; **8**: 14262.

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**: 7–33.

Srinivas-Shankar U, Wu FCW. Drug insight: testosterone preparations. *Nat Clin Pract Urol* 2006; **3**: 653–665.

Strnadel J, Woo SM, Choi S, Wang H, Grendar M, Fujimura K. 3D Culture Protocol for Testing Gene Knockdown Efficiency and Cell Line Derivation. *Bio Protoc* 2018; **8**: e2874.

Subudhi SK, Vence L, Zhao H, Blando J, Yadav SS, Xiong Q *et al.* Neoantigen responses, immune correlates, and favorable outcomes after ipilimumab treatment of patients with prostate cancer. *Sci Transl Med* 2020; **12**: 537.

Šimečková Š, Kahounová Z, Fedr R, Remšík J, Slabáková E, Suchánková T *et al.* High Skp2 expression is associated with a mesenchymal phenotype and increased tumorigenic potential of prostate cancer cells. *Sci Rep* 2019; **9**: 5695.

Tan H-L, Sood A, Rahimi HA, Wang W, Gupta N, Hicks J *et al.* Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 890–903.

Tan PY, Chang CW, Chng KR, Wansa KDSA, Sung W-K, Cheung E. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 399–414.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010; **18**: 11–22.

Thadani-Mulero M, Portella L, Sun S, Sung M, Matov A, Vessella RL *et al.* Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Res* 2014; **74**: 2270–2282.

The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015; **163**: 1011–1025.

Tchrakian N, Cotter M.B, Loda M. Pathology and Molecular Pathology of Prostate Cancer. In: Loda M, Mucci L, Mittelstadt M, Van Hemelrijck M, Cotter M. (eds) Pathology and Epidemiology of Cancer. *Springer* 2017; ISBN: 978-3-319-81738-5.

Timinszky G, Till S, Hassa PO, Hothorn M, Kustatscher G, Nijmeijer B *et al.* A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 923–929.

Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE *et al.* Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008; **10**: 177–188.

Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM *et al.* Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 2007; **39**: 41–51.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; **366**: 2443–2454.

Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**: 275–287.

Tsai Y-S, Lai C-L, Lai C-H, Chang K-H, Wu K, Tseng S-F *et al.* The role of homeostatic regulation between tumor suppressor DAB2IP and oncogenic Skp2 in prostate cancer growth. *Oncotarget* 2014; **5**: 6425–6436.



Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L *et al.* Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol* 2017; **19**: 568–577.

Urbanucci A, Marttila S, Jänne OA, Visakorpi T. Androgen receptor overexpression alters binding dynamics of the receptor to chromatin and chromatin structure. *Prostate* 2012; **72**: 1223–1232.

Van de Merbel AF, van der Horst G, van der Mark MH, van Uhm JIM, van Gennep EJ, Kloen P *et al.* An ex vivo Tissue Culture Model for the Assessment of Individualized Drug Responses in Prostate and Bladder Cancer. *Front Oncol* 2018; **8**: 400.

Van de Merbel AF, van der Horst G, van der Pluijm G. Patient-derived tumour models for personalized therapeutics in urological cancers. *Nat Rev Urol* 2021; **18**: 33–45.

Van de Ven AL, Tangutoori S, Baldwin P, Qiao J, Gharagouzloo C, Seitzer N *et al.* Nanoformulation of Olaparib Amplifies PARP Inhibition and Sensitizes PTEN/TP53-Deficient Prostate Cancer to Radiation. *Mol Cancer Ther* 2017; **16**: 1279–1289.

Van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015; **161**: 933–945.

Vernon AE, LaBonne C. Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Development* 2006; **133**: 3359–3370.

Viñas-Castells R, Beltran M, Valls G, Gómez I, García JM, Montserrat-Sentís B *et al.* The hypoxia controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 3794–3805.

Vlajnic T, Bubendorf L. Molecular pathology of prostate cancer: a practical approach. *Pathology* 2021; **53**: 36–43.

Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 2001; **68**: 270–279.

Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; **13**: 963–972.

Wang YV, Wade M, Wahl GM. Guarding the guardian: Mdmx plays important roles in setting p53 basal activity and determining biological responses in vivo. *Cell Cycle* 2009; **8**: 3443–3444.

Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L *et al.* Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1825**: 11–17.

Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, Dijkstra KK, Krijgsman O, Kuilman T *et al.* Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 13308–13311.

Wei T, Lu J, Ma T, Huang H, Kocher J-P, Wang L. Re-Evaluate Fusion Genes in Prostate Cancer. *Cancer Inform* 2021; **20**: 11769351211027592.

Wu W-S, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM *et al.* Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 2005; **123**: 641–653.

Wu Z-Q, Li X-Y, Hu CY, Ford M, Klee CG, Weiss SJ. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 16654–16659.

Xia X, Li F, He J, Aji R, Gao D. Organoid technology in cancer precision medicine. *Cancer Lett* 2019; **457**: 20–27.

Yadav PS, Prashar P, Bandyopadhyay A. BRITER: a BMP responsive osteoblast reporter cell line. *PLoS One* 2012; **7**: e37134.

Yamada Y, Beltran H. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep* 2021; **23**: 15.

Yang G, Ayala G, De Marzo A, Tian W, Frolov A, Wheeler TM *et al.* Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 3419–3426.

Yang Q, Huang J, Wu Q, Cai Y, Zhu L, Lu X *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Br J Cancer* 2014; **110**: 1958–1967.

Yang Y, Lu Y, Wang L, Mizokami A, Keller ET, Zhang J *et al.* Skp2 is associated with paclitaxel resistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2016; **36**: 559–566.

Yevglevskis M, Nathubhai A, Wadda K, Lee GL, Al-Rawi S, Jiao T *et al.* Novel 2-arylthiopropionyl-CoA inhibitors of  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase 1A (AMACR; P504S) as potential anti-prostate cancer agents. *Bioorg Chem* 2019; **92**: 103263.

Zhang W, Liao C-Y, Chtatou H, Incrocci L, van Gent DC, van Weerden WM *et al.* Apalutamide Sensitizes Prostate Cancer to Ionizing Radiation via Inhibition of Non-Homologous End-Joining DNA Repair. *Cancers (Basel)* 2019; **11** (10): 1593.

Zhang W, van Weerden WM, de Ridder CMA, Erkens-Schulze S, Schönfeld E, Meijer TG *et al.* Ex vivo treatment of prostate tumor tissue recapitulates in vivo therapy response. *Prostate* 2019; **79**: 390–402.

Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018; **12**: 361–373.

Zhou J, Geng G, Shi Q, Sauriol F, Wu JH. Design and synthesis of androgen receptor antagonists with bulky side chains for overcoming antiandrogen resistance. *J Med Chem* 2009; **52**: 5546–5550.

Zhou L, Jiang Y, Luo Q, Li L, Jia L. Neddylation: a novel modulator of the tumor microenvironment. *Mol Cancer* 2019; **18**: 77.

Zhou W, Ni TK, Wronski A, Glass B, Skibinski A, Beck A *et al.* The SIRT2 Deacetylase Stabilizes Slug to Control Malignancy of Basal-like Breast Cancer. *Cell Rep* 2016; **17**: 1302–1317.