

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav klinické a molekulární patologie



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Vliv epigenetických inhibitorů na expresi  
androgenového receptoru u buněčných  
modelů kastrálně rezistentního  
karcinomu prostaty**

Olomouc 2022

Mgr. Barbora Brázdilová (roz. Fialová)

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci zpracovala samostatně s využitím citované literatury.

Olomouc 21. března 2022

Barbora Brázdilová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především své školitelce, Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za podporu a trpělivost během celého studia. Dále bych ráda poděkovala mým kolegyním z LMP, zejména Janě Hrubéšové za přátelskou pomoc a podporu v laboratoři tkáňových kultur, Mgr. Petře Lužné, Ph.D. za pomoc při provádění experimentů na FACS a Lence Prokopové za poskytnutí rodinného zázemí v Olomouci. Mé poděkování za výbornou spolupráci a vstřícnost patří také panu doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. a Mgr. Sylwii Jančík, Ph.D. za možnost sekvenovat buněčné linie v Laboratoři experimentální medicíny LF UP, Mgr. Jánovi Gurskému, Ph.D. za měření a vyhodnocení FACS na Biomedregu, Mgr. Janě Fialové Kučerové, Ph.D. za přípravu a provedení kvantitativní PCR na Ústavu biologie LF UP, a také všem ostatním, kteří se přímo i nepřímo podíleli na této práci. Poslední, ale největší poděkování patří mé rodině hlavně za emocionální podporu v průběhu celého studia a poté především za hlídání dětí, abych tuto práci mohla řádně dokončit.

## ABSTRAKT

Patogeneze kastročně rezistentního karcinomu prostaty, který se vyvíjí po androgenové deprivaci terapii, je ovlivňována nejen genetickými, ale i epigenetickými faktory, z nichž významné místo zauímají metylace DNA a posttranslační modifikace histonů. Pro progresi onemocnění je důležitý status a funkce androgenového receptoru, přičemž u CRPC dochází k omezeným možnostem jeho regulace v důsledku na androgenech nezávislé proliferace nádorových buněk. Činidla s potenciálem epigenetického účinku mohou vést k obnovení exprese inaktivovaného androgenového receptoru u pacientů s CRPC a případně zmírnit proliferaci aktivitu nádorových buněk.

Cílem této studie bylo analyzovat účinky dvou epigenetických činidel, inhibitoru DNA metyltransferáz (5-Aza-2'-deoxycytidin) a inhibitoru histonových deacetyláz (butyrát sodný) na potenciální změny v expresi androgenového receptoru a viabilitu prostatických nádorových buněk, které reprezentují CRPC stádium a jsou bez exprese androgenového receptoru.

Zjistili jsme, že kombinovaný účinek obou použitých činidel vedl u ovlivněných prostatických nádorových buněk k re-expresi androgenového receptoru spolu s demetylačními změnami promotoru androgenového receptoru, zvýšené acetylaci histonu H4 a indukci apoptózy.

V důsledku omezené účinnosti epigenetické monoterapie a komplexnosti epigenetických modifikací v nádorech jde mnoho recentních studií cestou kombinované terapie, která zahrnuje aplikaci více epigenetických inhibitorů a rovněž kombinace epigenetických inhibitorů s chemoterapií, hormonální terapií a/nebo inhibitory imunitních kontrolních bodů. Proto může být studium účinků epigenetických inhibitorů u kastročně rezistentního karcinomu prostaty přínosné pro pochopení dalších mechanismů vedoucích k progresi tohoto závažného nádorového onemocnění.

Klíčová slova: Epigenetika, epigenetické inhibitory, karcinom prostaty, androgenový receptor, buněčné linie

## ABSTRACT

The pathogenesis of castration-resistant prostate cancer, which manifests itself after androgen deprivation therapy, is influenced not only by genetic but also by epigenetic factors, of which DNA methylation and post-translational modifications of histones play important roles. Androgen receptor status and function are important for disease progression, and CRPC has limited regulatory potential due to androgen-independent proliferation of tumour cells. Agents with the potential for epigenetic effect may restore inactivated androgen receptor expression in patients with CRPC and possibly attenuate tumour cell proliferative activity.

The aim of this study was to analyse the effects of two epigenetic agents. A DNA methyltransferase inhibitor (5-Aza-2'-deoxycytidine) and a histone deacetylase inhibitor (sodium butyrate), on potential changes in androgen receptor expression, viability of prostate tumour cells without androgen receptor expression, and represent the CRPC stage.

We found that the combined effect of both agents used, in addition to the affected prostate tumour cells on androgen receptor re-expression with demethylation changes of the androgen receptor promoter, together with histone H4 acetylation and induction of apoptosis.

Due to effective epigenetic monotherapy and the complexity of epigenetic modifications in tumours, many recent studies have taken the path of combination therapy. This involves the administration of multiple epigenetic inhibitors, as well as a combination of epigenetic inhibitors with chemotherapy, hormonal therapy and/or immune checkpoint inhibitors. Therefore, studying the effects of epigenetic inhibitors in castration-resistant prostate cancer may be helpful in understanding other mechanisms leading to the progression of this serious cancer.

Keywords: Epigenetic therapy, epigenetic inhibitors, prostate cancer, androgen receptor, cell lines

## OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD .....	8
1.1	Chromatin a jeho epigenetický potenciál .....	8
1.2	Metylace DNA.....	8
1.3	Modifikace histonů .....	11
1.3.1	Acetylace histonů .....	11
1.3.2	Metylace histonů .....	12
1.3.3	Ostatní modifikace histonů.....	13
1.4	Karcinom prostaty .....	13
1.4.1	Prostata .....	13
1.4.2	Androgenový receptor .....	14
1.4.3	Vznik karcinomu prostaty .....	15
1.4.4	Léčba karcinomu prostaty .....	17
1.4.5	Mechanismy rezistence na ADT.....	18
1.4.6	Mechanismy progresu do kastročně rezistentního karcinomu prostaty .....	19
1.4.7	Heterogenita karcinomu prostaty.....	20
1.4.7.1	Hormonálně citlivý karcinom prostaty .....	20
1.4.7.2	Na androgenech nezávislý karcinom prostaty .....	21
1.4.7.3	Kastročně rezistentní karcinom prostaty .....	21
1.4.7.4	Neuroendokrinní karcinom prostaty .....	21
1.5	Epigenetika karcinomu prostaty .....	22
1.5.1	Metylace DNA u karcinomu prostaty.....	22
1.5.2	Modifikace histonů u karcinomu prostaty .....	25
1.5.3	Epigenetické mechanismy vývoje do CRPC .....	26
1.5.3.1	Význam metylace DNA v CRPC.....	26
1.5.3.2	Význam chromatinu v CRPC .....	28
1.5.4	Metylace AR v CRPC .....	32
1.6	Možnosti epigenetické terapie .....	34
1.6.1	Pokroky v epigeneticky cílené terapii karcinomu prostaty .....	35
2	CÍLE PRÁCE .....	38
3	METODIKA.....	39
3.1	Prostatické nádorové linie .....	39

3.2	Použité inhibitory .....	39
3.3	Kultivace buněčných linií .....	39
3.4	MTT test buněčné viability .....	39
3.5	Bisulfitové sekvenování .....	40
3.6	Expresní profil androgenového receptoru .....	41
3.7	Chromatinová imunoprecipitace a kvantitativní PCR (ChIP-qPCR) .....	42
3.7.1	Ovlivnění buněk DU145 a RWPE-1 .....	42
3.7.2	Fixace, promývání a lýze buněk .....	42
3.7.3	Chromatinová imunoprecipitace.....	43
3.7.4	Izolace DNA a kvantitativní PCR .....	43
3.8	Analýza buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie (FACS).....	44
3.9	Statistické analýzy .....	44
3.10	Vymezení mého podílu práce .....	44
4	VÝSLEDKY .....	46
4.1	Viabilita buněk linie DU 145 a RWPE-1 po ovlivnění Aza-dC a NaB.....	46
4.2	Demetylační účinek Aza-dC a NaB v oblastech promotoru a 5'-UTR genu <i>AR</i> .	47
4.3	Expresní profil <i>AR</i> u buněk ovlivněných Aza-dC a NaB .....	49
4.4	Ovlivnění NaB zvyšuje acetylaci histonu H4, ale ne histonu H3.....	50
4.5	Analýza buněčného cyklu a pro-apoptotický účinek NaB .....	52
5	DISKUZE .....	55
5.1	Metylace, demethylace a exprese genu <i>AR</i> .....	55
5.1.1	Exprese a re-exprese <i>AR</i> u prostatických nádorových buněk.....	58
5.2	Acetylace histonů H3 a H4 a exprese androgenového receptoru .....	60
5.3	Životaschopnost a buněčný cyklus normálních a nádorových buněk prostaty po ovlivnění Aza-dC a NaB.....	61
6	ZÁVĚR.....	64
7	ZKRATKY .....	66
8	POUŽITÁ LITERATURA .....	71
9	SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ .....	88
10	PŘÍLOHY .....	90

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Chromatin a jeho epigenetický potenciál

Chromatin je nukleoproteinový komplex složený z nukleozomálních podjednotek. Nukleozomy sestávají z negativně nabitě DNA obalující pozitivně nabitý histonový oktamer. Z každé nukleozomální podjednotky histonu, H2A, H2B, H3 a H4, vyčnívají dlouhé polypeptidové konce, které jsou zvláště náchylné na posttranslační modifikace - acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinylace, sumoylace, ADP ribosylace, deaminace a nedávno popsané propionylace, butyrylace, malonylace a další (Kebede *et al.*, 2015). Přesné umístění a typ modifikace vytváří histonový kód, který pověřuje buněčnou mašinerii k udržení souvislého chromatinu v represivním, aktivním nebo pohotovostním stavu (Jenuwein *et al.*, 2001, Bernstein *et al.*, 2006). Skládáním a tvorbou smyček jsou nukleozomy dále zhuťnuty do vysoce organizované struktury a vzniká 3D uspořádání chromatinu. Replikace DNA a transkripce jsou procesy vyžadující přístupnost k DNA přes reverzibilní dekonkondenzaci těchto chromatinových struktur. Zhuťnění chromatinu a dekonkondenzace určitých lokusů jsou přísně časově a prostorově regulované a buněčně specifické. Každá modifikace má své „psací“, „čtecí“ a „mazací“ proteiny. Mutace v těchto proteinech a nadbytek nebo nedostatek metabolitů může stejnoměrně přispět k deregulaci modifikací v chromatinu a tím se významně podílet na karcinogenezi (Dai *et al.*, 2020, Zhao *et al.*, 2021). Vzhledem k četnosti modifikací a skutečnosti, že se mohou objevovat v nespočetných kombinacích, se histonový kód jeví mnohem komplexnější než prostý genetický kód.

## 1.2 Metylace DNA

DNA metylace je epigenetický proces přidání metylové skupiny k DNA pomocí donoru S-adenosyl metioninu (SAM) a může se vyskytovat na pozici N6 adeninu, pozici N7 guaninu a N4 a C5 cytosinu (Dai *et al.*, 2021). V lidském genomu je nejčastější modifikovanou bází metylace cytosinu, která představuje asi 1 % všech nukleobází. Pozice 5 na cytosinu je jedinečně umístěná pro tolerování metylace s minimálním efektem na strukturu DNA a párování bází (Hardwick *et al.*, 2018). V normální dospělé buňce se většina 5-metylcytosinu (5mC) vyskytuje v souvislosti s dinukleotidy cytosin-fosfo-guanin (CpG), z nichž je více než 80 % obvykle metylováno (Jones, 2012). Metylace cytosinu se vyskytuje napříč genomem,



obvykle ve vyšší míře v repetitivních sekvencích a retrotranspozonech (Lister *et al.*, 2009), naopak v menší míře v promotorech aktivních genů. Hypermetylace v promotorech je obecně spojována s transkripční represí, zatímco hypermetylace v těle genů může být spojována se zvýšenou expresí (Peter *et al.*, 2021).

Vedle kanonické CpG metylace byly popsány také ne-CpG metylace, nebo mCpH (H může být adenin, thymin nebo cytosin) (shrnutí v Ramasamy *et al.*, 2021). Distribuce ne-CpG metylace je jedinečná pro každý typ buňky a tkáně a ve významně velkém zastoupení (15 %) se vyskytují v embryonálních kmenových buňkách (ESC) (Ramasamy *et al.*, 2021). mCpH pravděpodobně mohou mít spojitost i s karcinogenezí (Kinoshita *et al.*, 2000), patrně v důsledku nerovnováhy mCpH v promotorech a tělech genů; tato problematika však dosud není plně pochopena (Ramasamy *et al.*, 2021).

Metylace DNA je spojována s dlouhodobým potlačováním transkripce a hraje zásadní roli v diferenciaci kmenových buněk, chromozomální stabilitě, inaktivaci X chromozomu a genomickém imprintingu (Jones, 2012, Nazor *et al.*, 2012, Schübeler, 2015). U normálních buněk je typická hypometylace v oblastech genomu hustých na CpG, nazývaných CpG ostrůvky (CGIs), které leží kolem místa počátku transkripce (TSS) genů a dalších regulačních oblastí u 60 % genů (Jones, 2012). V nádorových buňkách tyto CGIs a oblasti s nižší hustotou CpG kolem těchto ostrůvků (nazývaných „břehy CpG“, *CpG shores*) mohou být abnormálně hypermetylované ve srovnání s normálními buňkami (Irizarry *et al.*, 2009). Tato hypermetylace CGI bývá často spojována s potlačováním genů ležících blízko CGIs a byla uznána jako hlavní mechanismus epigenetické genové represe, která je spojována zejména s umlčováním nádorových supresorů a genů zapojených do vývoje a diferenciaci nádorových buněk (Jones, 2012, Aryee *et al.*, 2013). Toto umlčování genů hypermetylací může být poměrně stabilní (Aryee *et al.*, 2013, Vandiver *et al.*, 2015), analogické umlčeným genům mutacemi a delecemi se ztratou funkce. Souběžně s vývojem hypermetylace DNA zprostředkované epigenetickým umlčováním v CGI a „březích“ kolem regulačních oblastí genů však mohou nádorové buňky také vykazovat postupné hypometylace mnoha CpG dinukleotidů (Yegnasubramanian *et al.*, 2008). Oproti normálním buňkám s vysokým stupněm metylace CpG v obrovských úsecích genomické DNA, v rozsahu od stovek kilobází do megabází, ukazují nádorové buňky často vymizelou metylaci (Aryee *et al.*, 2013). Tento typ hypometylace však nevede k aktivaci jakkoliv blízkých genů (Aryee *et al.*, 2013), ale soudí se, že takové genomické bloky hypometylace mohou být spojovány s více otevřeným chromatinem vedoucí k destabilizaci genomu, zahrnující aktivaci endogenních retrovirálních elementů, retrotranspozónů a dalších repetitivních sekvencí (Yegnasubramanian *et al.*, 2016).

Enzymy zprostředkovávající metylaci DNA jsou DNA metyltransferázy (DNMT) využívající SAM jako donor metylové skupiny (Hardwick *et al.*, 2018). Jsou to DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Příbuzný gen DNMT3L nemá vlastní katalytickou aktivitu, ale může tvořit komplexy s DNMT3A a DNMT3B a pomáhat jejich katalytické aktivitě. DNMT1 je hlavní DNA metyltransferáza pro udržování metylačních značek při replikaci DNA (Pradhan *et al.*, 1999). DNMT3A a DNMT3B se často označují jako *de novo* DNA metyltransferázy, protože mohou metylovat nemetylovanou DNA se stejnou katalytickou účinností jako hemimetylovanou DNA, což je důležité pro různé biologické procesy, jako je programování vývoje a diferenciaci ESC (Okano *et al.*, 1999).

Metylace DNA může být pasivně ztracena při replikaci DNA, pokud selže kopírování mCpG z rodičovského vlákna do dceřinného. DNA metylace však může být aktivně vymazána, pravděpodobně nezávisle na replikaci DNA. *Erasers* hrají důležitou roli v zajištění plasticity a dynamiky epigenetické regulace, zvláště u neuronů a ESC (Yegnasubramanian *et al.*, 2016). Za aktivní demetylaci lze považovat oxidaci 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin (5hmC), 5-formylcytosin (5fC) a poté na 5-karboxycytosin (5caC) třemi různými geny, *TET1*, *TET2* a *TET3* (Tahiliani *et al.*, 2009, Kriaucionis *et al.*, 2009). Haffner *et al.* (2011) poprvé ukázali, že množství 5-hydroxymetylcytosinu, což je hlavní oxidovaná forma 5-mC, je výrazně snižené u četných typů nádorů (Ahsan *et al.*, 2014) včetně prostaty, a také u kmenových a progenitorových buněčných kompartmentů (Haffner *et al.*, 2011).

Pro rozpoznání (přečtení) metylační značky DNA jsou do současnosti známé tři proteinové rodiny (shrnuté v Dai *et al.*, 2021): MBD, Kaiso a SRA. Rodina MBD je schopná selektivně vázat metylovanou DNA a povolávat do těchto míst korepresorové komplexy (např. Mi2-NURD) s cílem vytvořit umlčující chromatinový stav (Bird *et al.*, 1999, Klose *et al.*, 2006). Členové rodiny Kaiso transkripčně potlačují genovou expresi vazbou k metylované DNA (Filion *et al.*, 2006). Proteiny rodiny SRA udržují metylovanou DNA vazbou k hemimetylované DNA u replikační vidlice a povolávají do těchto míst DNA metyltransferázy (Hashimoto *et al.*, 2008, Rottach *et al.*, 2010), a také histonové metyltransferázy, které metylují H3K9 v místě metylované DNA (Unoki *et al.*, 2009). Kombinace těchto mechanismů má robustní potenciál pro udržování metylace DNA a zprostředkovává jednotný a kooperující epigenetický kód (Yegnasubramanian *et al.*, 2016).

### 1.3 Modifikace histonů

Nejlépe prostudované modifikace se vyskytují na N-terminálním konci histonu, který vyčnívá z nukleozomu a je přístupný na jeho povrchu (Luger *et al.*, 1997). Acetylace, metylace a fosforylace jsou dominantní posttranslační modifikace na histonech (Godini *et al.*, 2018).

#### 1.3.1 Acetylace histonů

Každá histonová modifikace je regulovaná odlišným souborem enzymů a tvoří dokovací místo pro čtecí proteiny (Zhao *et al.*, 2021). Histonové acetyltransferázy (HAT) přenosem acetylové skupiny na lyzinové reziduum uvnitř N-konce histonu neutralizují pozitivní náboj lyzinů, oslabují interakce mezi histony a DNA a zpřístupňují DNA transkripčnímu komplexu (Bannister *et al.*, 2011). Acetylace histonů jsou typicky spojovány s otevřeným a aktivním chromatinem. Acetylovaný může být histon H3 v pozicích lyzinu 4, 9, 14, 18, 23 a 27 (H3K4, H3K9, H3K14, H3K18, H3K23 a H3K27) a histon H4 v pozicích lyzinu 5, 8, 12 a 16 (H4K5, H4K8, H4K12, H4K16). Tyto modifikace jsou vysoce konzervovaná místa acetylace histonů (Kurdistani *et al.*, 2004). Existují tři hlavní rodiny HAT, jmenovitě GNAT, rodina EP300 a příbuzná CBP a rodina MYST (Zhao *et al.*, 2021). Díky úzké vazbě mezi acetylací histonů a aktivací transkripce často vedou poruchy HAT k narušení správných programů genové exprese a k rozvoji nemoci (Zhao *et al.*, 2021).

Histonové deacetylázy (HDAC) jsou také nazývány jako lyzinové deacetylázy (KDAC), neboť přesněji popisují jejich funkci než cíl, který zahrnuje také množství nehistonových proteinů (Tambaro *et al.*, 2010). HDAC odstraňují acetylové skupiny z lyzinových reziduí, což umožňuje histonům pevně se vázat k DNA. Tím dojde ke kompaktnější konfiguraci chromatinu a následné inhibici transkripce. HDAC jsou proteinové komplexy tvořené četnými podjednotkami, vyskytují se u kvasinek a vyšších *Eukaryot* (Tambaro *et al.*, 2010) a podle strukturní podobnosti s kvasinkovými HDACs, enzymatickou aktivitou a vnitrobuněčné lokalizace se do současnosti uvádí 18 HDAC seskupených do 4 tříd (HDAC I – HDAC IV) a 2 rodin (podle jejich závislosti na zinku nebo kofaktorech NAD; Haberland *et al.*, 2009, Misztak *et al.*, 2018).

Dalšími členy této modifikace jsou proteiny schopné selektivně rozpoznat acetylační status histonů, vázat se k nim a přenést epigenetický signál povoláním vhodných efektorů aktivačních nebo represivních komplexů. Nejlépe prostudovanými proteiny z této řady jsou bromodoménové BET proteiny zapojené do přenosu signálu acetylovaného histonu a podporující aktivaci genu a otevření chromatinu (Filippakopoulos *et al.*, 2010).

Kurdistani *et al.* (2004) porovnávali úroveň acetylace jednotlivých lyzinů s aktivitou genů a ukázali, že acetylace i deacetylace specifických lyzinů koreluje s transkripcí. Například, hyperacetylace histonu H3K9/18/27 a hypoacetylace H4K16 a H2BK11/16 významně korelují s transkripcí v intergenových a kódujících oblastech v celém genomu (Kurdistani *et al.*, 2004). Dále, jak globálně, tak v identifikovaných klastrech, jsou H3K18 a H4K16 acetylovány nápadně inverzním způsobem jedna k druhé. Postavení acetylace těchto míst může být znakem transkripčního stavu (Kurdistani *et al.*, 2004).

### 1.3.2 Metylace histonů

Metylace histonů může být spojována s otevřeným nebo zavřeným chromatinem, v závislosti na pozici a počtu metylací (Jenuwein *et al.*, 2001, Bernstein *et al.*, 2006). K metylaci histonů může dojít na lyzinech a argininech. Metylace argininů je spouštěna rodinou proteinů arginin metyltransferáz (PRMT) a metylace lyzinů rodinou lyzinových metyltransferáz (KMT). Lyziny mohou být mono-, di- nebo trimetylovány, zatímco argininy mohou být mono- a dimetylovány. Například metylace lyzinu 27 na histonu H3 (H3K27me) je obvykle spojovaná s formací heterochromatinu a koreluje s genovou represí, stejně tak metylace H3K9, avšak metylace v pozici H3K4 je známkou otevřeného chromatinu a bývá v místech poblíž aktivně transkribovaných genů. Aktivní chromatinové značky, jako např. H3K4me3 zabraňují metylaci metyltransferázami DNMT3a a DNMT3b, zatímco H3K36me tyto enzymy rekrutuje, aby zametylovaly těla aktivně transkribovaných genů (Rondelet *et al.*, 2016; Weinberg *et al.*, 2019). Ukázalo se, že aktivní a represivní značky metylovaného chromatinu (tj. např. H3K4 a H3K9) mohou být nalezeny ve stejném lokusu. Jedná se o tzv. bivalentní typ signálu, který udržuje chromatin v pohotovostním stavu a nachází se např. u ESC a jiných tkáňových kmenových buněk (Bernstein *et al.*, 2006).

JMJC a LSD1 jsou hlavní lyzinové demetylázy a někteří členové rodiny JMJC (jako KDM3A, KDM4E a KDM5C) jsou známé také pro svou demetylázovou aktivitu argininů (Dai *et al.*, 2021).

Některé z modifikací na N-terminálních koncích mohou přímo ovlivnit interakce mezi nukleozomy. Například, přidání acetylových skupin na H4K16 redukuje kompaktnění chromatinu (Shogren-Knaak *et al.*, 2006) a zvyšuje transkripci jak *in vitro* tak *in vivo* (Akhtar *et al.*, 2000). Modifikace histonových konců však mohou způsobit i opačný efekt a zvýšit zkompaktnění DNA. Například di- a tri-metylace H4K20 zesiluje *in vitro* kondenzaci chromatinu (Lu *et al.*, 2008). Kromě těchto přímých účinků působí modifikace histonů obvykle nepřímo a povolávají efektorové proteiny, které aktivují signální dráhy (Wysocka,

2006), blokují přístup remodelujících komplexů (Margueron *et al.*, 2005) nebo ovlivňují povolávání chromatinových modifikátorů a transkripčních faktorů (Clements *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Ostatní modifikace histonů

Většina modifikací se vyskytuje na lyzinech, nicméně i jiná rezidua histonového jádra mohou být modifikována. Tan *et Davey* (2011) popsali metylace argininových reziduí na povrchu nukleozomu. Fosforylace tyrosinu je typem modifikace, která se může objevovat v globulární části histonu. Příkladem je H3Y41, která je součástí výstupního místa DNA z nukleozomu (Dawson *et al.*, 2009). Fosforylace serinu H3S10 kombinovaná s acetylací histonů H3K9 a H3K14 na promotoru, je vyžadována pro aktivaci transkripce (Zippo *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2008) objevil páteří modul skládající se z 17 modifikací, které byly nalezeny u 25 % lidských promotorů. Tyto modifikace mají tendenci kolokalizovat v promotorech genů, mohou vytvářet kombinace a v kooperaci regulovat transkripci genů (Wang *et al.*, 2008). Například fosforylace H3S10 ovlivňuje metylaci H3K9 a acetylaci H4K16, což naznačuje na kombinatorické vztahy mezi těmito modifikacemi (Zippo *et al.*, 2009).

## 1.4 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (PC) je nejběžnějším nádorovým onemocněním u mužů v západních zemích (Díaz-Mejía *et al.*, 2021). Histologická klasifikace nádorů prostaty uvádí PC jako acinární adenokarcinom, tj. invazivní maligní epitelový nádor tvořený žlázovými buňkami. PC bývá často multifokální, klinicky a molekulárně heterogenní (Conteduca *et al.*, 2021) a ve stádiu primárního nádoru také asymptomatický. Mezi nejběžnější rizikové faktory spojené s PC patří vyšší věk, etnický původ, rodinná historie a environmentální faktory, jako jsou dietní návyky, časná sexuální aktivita a sexuálně přenosné infekce. V České republice byl během posledních let pozorován zvýšený výskyt PC, avšak úmrtnost má klesající trend (www.svod.cz). Je to částečně dáno včasným zachytem onemocnění díky rozšířenému zavedení testování prostatického specifického antigenu (PSA) a významným pokrokům v léčbě PC (viz kapitola 1.4.4).

### 1.4.1 Prostata

Normální prostatická žláza je tvořena bazální a luminální vrstvou epitelových buněk obklopených stromatem. Luminální buňky jsou orientované směrem k žlázovému lumen

a reprezentují hlavní epitelovou buněčnou populaci. Bazální buňky oddělují lumen od stroma a zahrnují také vzácné neuroendokrinní buňky (Kukkonen *et al.*, 2021). Luminální buňky exprimují ve vysokých hodnotách androgenový receptor (AR) potřebný pro růst a přežívání, jsou proto závislé na AR. Luminální buňky jsou citlivější na místní mikroprostředí a mnohem vnímavější na genetické a epigenetické modifikace při vystavení oxidativnímu stresu a poškození DNA (Di Zazzo *et al.*, 2015). Bazální epitelové buňky exprimují AR v nízkých hodnotách a jsou na androgenech nezávislé. Vzácný buněčný typ uvnitř tohoto prostoru jsou neuroendokrinní buňky, které neexprimují AR (Di Zazzo *et al.*, 2015). Embryonální a postnatální vývoj prostaty závisí na četných kritických regulátorech diferenciaci, jako jsou NKX3-1, FOXA1 a AR (Kukkonen *et al.*, 2021). Během vývoje a dospívání prostaty zajišťují tyto a další geny formaci žláz a buněčnou diferenciaci. Jejich chybná aktivace během diferenciaci epitelu prostaty může podpořit hyperplastickou proliferaci (benigní hyperplazii prostaty, BPH) a/nebo progresi do karcinomu prostaty (Schrecengost *et al.*, 2013).

#### 1.4.2 Androgenový receptor

Androgenový receptor patří do rodiny jaderných steroidních transkripčních faktorů, jehož transkripční aktivita závisí na androgenech. Lidský gen pro androgenový receptor leží na chromozomu Xq11-12, je tvořený 919 aminokyselinami a skládá se z osmi exonů. Protein AR o velikosti 110 kDa je složený z N-koncové domény (NTD), DNA vázající domény (DBD) a ligand vázající domény (LBD). Jsou zde dvě transkripční aktivační jednotky (TAU), TAU-1 a TAU-5, obsažené uvnitř NTD, která zároveň obsahuje fosforylační místa nezbytná pro transkripční aktivitu. DBD obsahuje dva motivy zinkových prstů a podporuje homodimerizaci a vazbu k androgen responzivním elementům (ARE) v genomické DNA, což vede k zahájení transkripce cílových genů (Horie-Inoue *et al.*, 2004, Desai *et al.*, 2021). Tzv. *hinge* oblast odděluje DBD a LBD a je tvořená krátkou aminokyselinovou sekvencí, která obsahuje část jaderného lokalizačního signálu zodpovídající za translokaci AR do jádra (Claessens *et al.*, 2008).

Pro fyziologický vývoj a udržování prostatické žlázy je základem signální dráha androgenového receptoru. Hlavní androgen přítomný všude v těle je testosteron (T). V prostatě je lokálně konvertován na 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (DHT) enzymem 5 $\alpha$ -reduktázou. DHT se váže na LBD androgenového receptoru s vyšší afinitou než T, aktivuje proto cílové geny při nižších koncentracích než T. Po vazbě ligandu AR dimerizuje, stává se fosforylovaným a translokuje se do jádra, kde vazbou na ARE v promotorových nebo enhancerových oblastech a s pomocí koaktivátorů a epigenetických faktorů reguluje expresi

cílových genů (Maughan *et al.*, 2015). Tím podporuje buněčnou proliferaci, diferenciaci, sekreci a přežívání (Tindall *et al.*, 2011, Desai *et al.*, 2021). V nepřítomnosti ligandu je AR lokalizován v cytoplazmě, kde asociuje s *heat shock* proteiny, s cytoskeletálními proteiny a dalšími chaperony (Smith *et al.*, 2008).

### 1.4.3 Vznik karcinomu prostaty

Základem vzniku PC jsou těžké diferenciační a proliferační abnormality, které v různé kombinaci zahrnují více genetických změn, jakými jsou ztráta heterozygoty, aktivace onkogenů a ztráta nádorových supresorů. Dalšími faktory, které přispívají ke karcinogenezi prostaty, jsou zánět, oxidativní stres a poškození DNA, zkracování telomer a telomerová aktivita, změny na genomu (Felgueiras *et al.*, 2014) a v neposlední řadě epigenetické modifikace (podrobněji viz kapitola 1.5).

Studie ukazují, že ve srovnání s jinými typy nádorů je v nádorech prostaty spíše nižší rychlost mutací (Abeshouse *et al.*, 2015). Celková mutační zátěž odvozená z celoexomového sekvenování byla 0,94 mutací na megabázi, což odpovídá 19 nesynonymním mutacím na genomu tumoru (Abeshouse *et al.*, 2015). To je v souladu s předchozími exomovými a celogenomovými výsledky sekvenování pro lokalizovaný karcinom prostaty (Barbieri *et al.*, 2012, Baca *et al.*, 2013) a méně, než mutační zátěž u metastatického PC (Grasso *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2015).

Nejběžnější genomickou změnou identifikovanou u PC je fúze 5'-UTR genu *TMPRSS2* s genem *ERG*, způsobená delecemi nebo translokacemi na chromozomu 21, která bývá nalezená ve 40 - 50 % případů (Tomlins *et al.*, 2007). Abeshouse *et al.*, (2015) identifikovali fúze s jinými, dříve popsány a androgeny regulovanými partnerskými geny na 5' konci, např. *SLC45A3* a *NDRG1*. Také identifikovali několik nádorů se zvýšenou expresí transkriptů *ETS* v plné délce, které se vzájemně vylučují s *ETS* fúzemi (Abeshouse *et al.*, 2015). Zvýšená exprese *ETS* v těchto případech může být pravděpodobně zprostředkována epigenetickými mechanismy nebo kryptickými translokacemi celého genomového lokusu do transkripčně aktivního sousedství (Abeshouse *et al.*, 2015). Tyto změny vedou k podstatné heterogenitě v nádorech a jsou používány k definování molekulárních subtypů PC, založené na fúzi rodiny genů *ETS* (*ERG*, *ETV*, *ETV4* nebo *FLII*) a mutacích v genech *SPOP*, *FOXA1* nebo *IDH1* (Abeshouse *et al.*, 2015).

Mutace *SPOP* se vyskytují až u 15 % primárních nádorů prostaty a řídí molekulární změny související s iniciací a progresí PC (Tong, 2021). Nádory definované mutacemi genu *SPOP* působí jako další podtyp PC a vykazují několik specifických molekulárních vlastností,

jako je vzájemné vyloučení se všemi případy ETS fúzí (Abeshouse *et al.*, 2015), hypermetylace DNA, delece *CHDI* a zvýšenou expresi *SPINK1* (Shi *et al.*, 2019). Mutace v genu *SPOP* regulují AR a jeho koaktivátory, ovlivňují signalizaci dráhy AR a tím transkripci cílových genů (Geng *et al.*, 2014).

FOXAI je průkopnický transkripční faktor AR s prokazatelnou rolí v onkogenezi PC (Jin *et al.*, 2013), má význam pro remodelaci chromatinu a jeho mutantní formy byly nalezeny ve všech stádiích PC (Tong, 2021). Mutace v genu *FOXAI* se většinou vzájemně vylučují s fúzními geny *ETS* a také s mutacemi *SPOP* (Tong, 2021). Nádory prostaty s mutacemi *FOXAI* obecně vykazují podobné molekulární vlastnosti jako nádory s mutantním *SPOP*, včetně profilu genové exprese, genomických změn a metylace DNA (Tong, 2021).

Nádory s mutací v genu *IDHI* byly nalezeny pouze v 1 % případech primárních PC a přestože jsou vzácné, tyto mutace jsou spojovány s nástupem nemoci v časném věku a definují podskupinu PC (Abeshouse *et al.*, 2015). Podskupina vzorků primárních PC s mutacemi v genu *IDHI* vykazovala vysoké hladiny celogenomové DNA hypermetylace a vyznačovala se nejvyšším počtem epigeneticky umlčených genů ze všech studovaných primárních PC (Abeshouse *et al.*, 2015).

Abeshouse *et al.*, (2015) zjistili, že u všech nádorů prostaty, i mezi genotypovými podskupinami, existuje široké spektrum aktivity AR. Například podskupiny vzorků pozitivní na *ETS* fúzní geny měly variabilní aktivitu AR. Naproti tomu nádory s mutacemi v genech *SPOP* nebo *FOXAI* vykazovaly nejvyšší transkripční aktivitu AR ze všech podskupin PC (Abeshouse *et al.*, 2015).

Další často pozorovaná změna u primárního PC je rekurentní genomické získání chromozomu 7 a 8q (na 8q leží gen *MYC*, 8 % případů), heterozygotní ztráty chromozomů 8p, 13q, 16q a 18, homozygotní delece zasahující gen *PTEN* (15 % u primárního PC) nebo ztráty genů *NKX3-1*, *TP53*, *RBI* nebo *CHDI* (Abeshouse *et al.*, 2015). Kromě *PTEN* byly mutace ostatních členů PI3K signální dráhy zjištěné v nízkém výskytu (~ 1 %) (Abeshouse *et al.*, 2015).

Abeshouse *et al.* (2015) našli pozoruhodnou shodu heterozygotní ztráty tumor supresorových genů *BRCA2* spolu se ztrátou genu *RBI* (oba geny leží na chromozomu 13q). Skutečnost, že téměř 20 % primárních PC nese genomické defekty DNA reparačních drah je zajímavá v souvislosti s nedávnými výsledky studie u pacientů s mCRPC (TOPARP-A fáze), které naznačují, že klinická odpověď na PARP inhibitor olaparib pravděpodobně nastává u podskupiny nádorů nesoucích defekty v DNA reparačních genech (Robinson *et al.*, 2015).



#### 1.4.4 Léčba karcinomu prostaty

Více než 90 % případů nádorů prostaty je způsobeno androgenovým receptorem (Epstein *et al.*, 2014, Mohler *et al.*, 2021). Toto procento v pozdějších stádiích nemoci klesá, stále však asi 70 – 80 % nádorů vyžaduje pro přežití AR (Epstein *et al.*, 2014, Mohler *et al.*, 2021) a proto řada léčebných postupů cílí převážně na antagonismus osy AR (Mohler *et al.*, 2021). Lokalizovaný PC je v jeho rané fázi často kategorizován na indolentní nebo agresivní (v závislosti na jeho klinických a patologických vlastnostech) a optimální možnosti léčby zahrnují chirurgickou a radiační terapii a méně často farmakologickou androgenovou deprivaci (ADT) (Arora *et Barbieri*, 2018). ADT je doporučenou terapií první volby až pro pacienty s metastázami (Wade *et Kyprianou*, 2018). ADT inhibuje působení testosteronu a DHT na osu dráhy AR a udržuje celkovou sérovou hladinu testosteronu pod 50 ng/dl (Wade *et Kyprianou*, 2018).

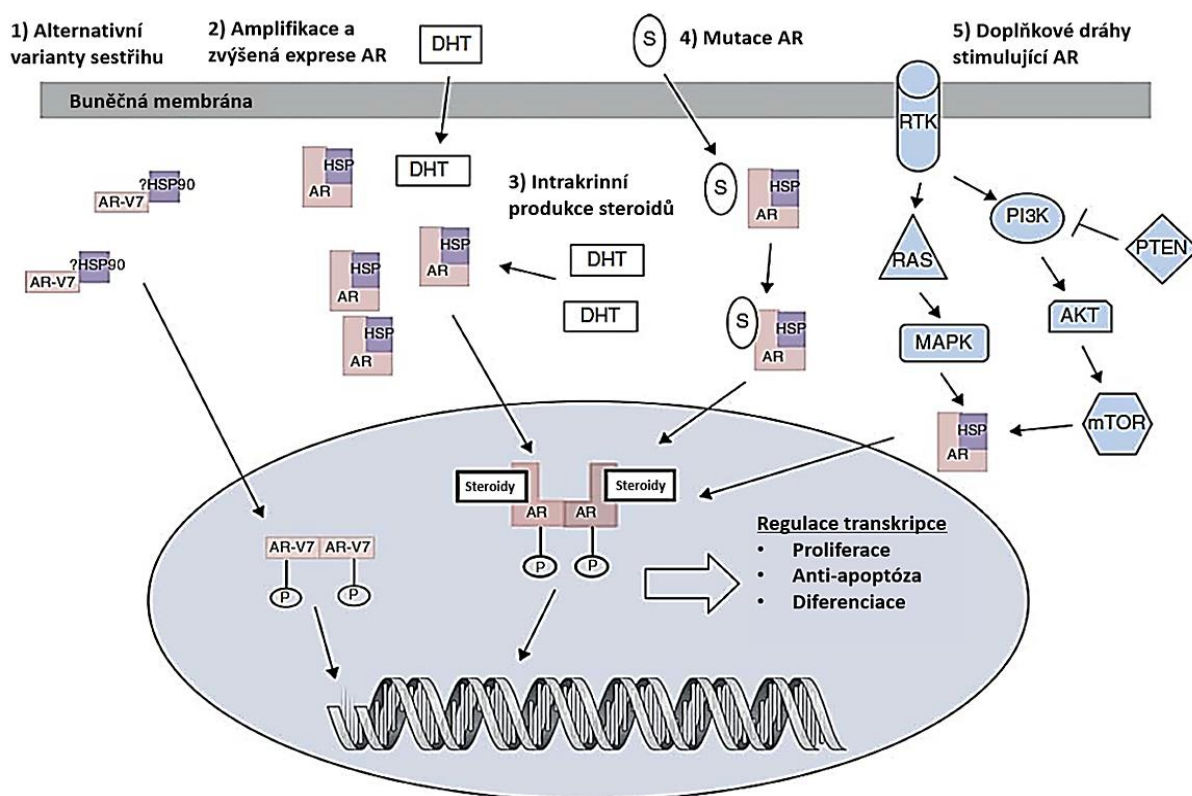
ADT tzv. první generace cílila na AR a jeho translokaci do jádra, což mělo za následek zhoršené navázání k DNA na ARE a sníženou transkripci genů řízených androgeny (Maughan *et Antonarakis*, 2015, Bouleftour *et al.*, 2021, Mitsiades *et Kaochar*, 2021). Mezi tyto antiandrogeny se řadí flutamid, bicalutamid, nilutamid a cyproteron acetát, který byl vůbec prvním schváleným antiandrogenem pro léčbu PC (Davies *et Zoubeidi*, 2021). První snahy o rozšíření ADT vedly k přidání léčiv cílených na nadledvinky (aminoglutethimid, ketokonazol), nepodařilo se však dosáhnout přínosu celkového přežití (Mitsiades *et Kaochar*, 2021). Antiandrogeny druhé generace mechanismus výše popsaného účinku na AR zlepšují (Rice *et al.*, 2019) a do této skupiny patří abirateron acetát (AA), jenž selektivně a irreverzibilně inhibuje enzym CYP17A1 a snižuje produkci prekurzorů testosteronu z varlat a nadledvinek (Bouleftour *et al.*, 2021), dále enzalutamid, apalutamid a darolutamid. Enzalutamid je inhibitor LBD domény AR bez známých agonistických vlastností k *wild type* AR (Maughan *et Antonarakis*, 2015), apalutamid je kompetitivní inhibitor AR (Clegg *et al.*, 2012) a darolutamid je nesteroidní antagonist AR s nízkou penetrací hematoencefalické bariéry (Moilanen *et al.*, 2015, Bouleftour *et al.*, 2021). Antiandrogeny první a druhé generace jsou také označovány jako inhibitory signalizace AR (ARSI).

Kompletní remise po léčbě ARSI jsou vzácné, což vede k vývoji nových farmakologických přístupů s cílem nadále potlačovat aktivitu AR v nádorech prostaty (Labrecque *et al.*, 2021), např. nového potenciálního léčiva EPI-001, které cílí na N-konec AR a blokuje transkripční aktivitu plné délky AR i jeho variant sestřihu (AR-SV) (Myung *et al.* 2013, De Mol *et al.* 2016). AR-SV se ukáží být rozhodujícími hráči ve vývoji a progresi mCRPC, přičemž varianta sestřihu AR-V7 je u karcinomu prostaty jedna z nejhojnějších (Xu

et Qiu, 2016). Nové přístupy zahrnují také řadu potenciálních antiandrogenů, které se zaměřují na degradaci AR (Proteolysis Targeting Chimeras, PROTAC), např. MTX-23, který dokáže cílit na obě varianty AR (AR-V7 a plné délky) pomocí proteazomem zprostředkované proteolýzy (Lee *et al.* 2021).

### 1.4.5 Mechanismy rezistence na ADT

V důsledku tlaku androgenové deprivace terapie si nádory prostaty vytvořily únikové mechanismy pro udržení aktivity AR (viz Obr. 1).



**Obrázek 1.** Mechanismy rezistence na ADT zobrazující na ligandu závislé a nezávislé aktivace AR. Zkratky: AR-V7, varianta sestřihu 7 AR; DHT, dihydrotestosteron; HSP, *heat shock* proteiny; P, fosforylace; RTK, receptorová tyrosinkináza, S, jiné steroidy (např. glukokortikoidy). Převzato a upraveno od Maughan *et Antonarakis*, 2015.

Tyto mechanismy rezistence na ADT ovlivňují každou část osy dráhy AR a zahrnují amplifikace genu AR nebo enhancerů, které zvyšují expresi AR (Quigley *et al.*, 2018, Takeda *et al.*, 2018), mutace v LBD doméně genu AR, ztráta AR, zvýšená *de novo* intratumorální syntéza androgenů nebo konverze steroidních prekurzorů z nadledvinek, konstitutivně aktivní varianty sestříhu AR (AR-SV) (Wadosky *et Koochekpour*, 2017), aktivace alternativních signálních drah s dominující PI3K/Akt kaskádou nebo zesílené posttranslační fosforylace AR cyklin dependentními kinázami (Chen *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2009).

#### **1.4.6 Mechanismy progresu do kastračně rezistentního karcinomu prostaty**

CRPC se v důsledku léčby ADT vyvine během jednoho až tří let (Oudard, 2013). Dříve byl CRPC popisován jako nezávislý na androgenech, současné poznatky však dokázaly, že rekurentní aktivita AR je klíčovým prostředníkem progresu do kastračně rezistentního stádia. Mechanismy obnovení aktivity AR využívané v CRPC a dostačující k řízení progresu, jsou popsány výše (viz kapitola 1.4.5). K dalším známým způsobům získání kastrační rezistence je ztráta některých nádorových supresorů, aktivace onkogenů a samozřejmě epigenetické modifikace (viz kapitola 1.5). Spolu s těmito změnami bývá CRPC později podpořen také zánětem, epitelovo-mezenchymální tranzicí (EMT) a/nebo nádorovými kmenovými buňkami (CSC) (Knudsen *et Vasioukhin*, 2010).

Robinson *et al.* (2015) provedli studii na CRPC vzorcích a identifikovali genetické změny u téměř všech mCRPC vzorků, kde všechny zahrnovaly nejméně jednu spouštěcí jednonukleotidovou variantu nebo inserci/deleci a přibližně polovina měla spouštěcí genové fúze, amplifikace nebo homozygotní delece. V téměř 90 % případů mCRPC autoři studie identifikovali potenciálně nebezpečné somatické nebo zárodečné zásahy s vysokou četností změn u dráhy AR, což silně naznačuje, že velká většina mCRPC pacientů zůstává pro přežití závislá na signalizaci AR (Robinson *et al.*, 2015). Distribuce změn u primárních a metastatických vzorků byly neobvykle podobné a se zvyšující se rychlostí změn u metastatických vzorků, avšak s tou výjimkou, že metastatický soubor neobsahoval žádné nádory s mutacemi v *IDH1* (Abeshouse *et al.*, 2015). Abeshouse *et al.* (2015) porovnávali také četnost rekurentně pozměněných genů popsaných ve studii od Robinson *et al.* (2015) a zjistili, že podobně jako celkové zatížení genetickými změnami, také mnoho genů a signálních drah zvýšilo míru změn v metastatických vzorcích. Signalizace AR byla mnohem častěji pozměněná u metastatických vzorků, kde bylo nejvíce amplifikací nebo mutací AR, což jsou události absolutně chybějící u primárních PC (Abeshouse *et al.*, 2015). Zajímavé byly poněkud méně časté mutace genu *SPOP* u metastatických vzorků (8 % vs. 11 % u

primárních) (Abeshouse *et al.*, 2015). Změny v DNA reparačních genech a dráze PI3K byly častější u metastatických vzorků, stejně jako mutace nebo delece TP53, RB1, KMT2C a KMT2D (Abeshouse *et al.*, 2015). Časté změny v počtu kopií ve smyslu zisků (8q) a ztrát (8p, 13q, 16q a 18q) byly také pozorovány, s očekávanou rekurentní amplifikací u AR a chromozomu 8q a delecí (*CHD1*, *PTEN*, *RBI*, *TP53*). Další časté fokální amplifikace byly pozorovány v oblastech zahrnující *CCND1* (v 9 % případů) (Robinson *et al.*, 2015). Nejčastěji aberující geny u mCRPC zahrnují AR (63 %), rodinu *ETS* (57 %), *TP53* (53 %), *PTEN* (41 %), *RBI* (21 %) (Robinson *et al.*, 2015). Rekurentní ETS fúze byly pozorovány v 56 % případů, většinou ve variantě ERG, ale také s variantami FLI1, ETV4 a ETV5 (Robinson *et al.*, 2015).

Změny byly pozorovány také v dráze PI3K (ve 49 % případů), v DNA reparačních dráhách (19 %), RAF kinázách (3 %), inhibitech CDK (7 %) a ve WNT dráze (5 %) (Robinson *et al.*, 2015).

Klíčové geny v signalizaci AR a pozměněné ve vzorcích mCRPC byly *FOXAI*, *NCOR1/2* a *SPOP* (Geng *et al.*, 2013). RNA-seq analýza AR-SV ukázala distribuci variant sestříhu napříč všemi případy CRPC a analýza souboru prostat odhalila, že mnoho těchto variant bylo přítomno v různém množství také v primárních PC a tkáních BPH (Robinson *et al.*, 2015). Varianta AR-V7, která je zapojená do rezistence na AA a enzalutamid (Antonarakis *et al.*, 2014), byla pozorovaná ve velmi malém množství také u většiny vzorků již před zahájením léčby AA nebo enzalutamidem (Robinson *et al.*, 2015).

CRPC s následnými metastázami představuje letální stádium v důsledku omezených možností terapie, s mediánem přežití 30 měsíců od data diagnózy pro nmCRPC a 13 měsíců pro mCRPC stádium (Aly *et al.*, 2020).

#### **1.4.7 Heterogenita karcinomu prostaty**

Vývoj PC je velmi komplexní proces odvíjený od aktivity androgenů a AR. Z počáteční fáze androgenové závislosti s funkčním a aktivním AR se PC dostane do androgenové nezávislosti, doprovázenou současně sérií genetických a epigenetických změn.

##### **1.4.7.1 Hormonálně citlivý karcinom prostaty**

PC v rané fázi se označuje jako hormonálně citlivý (HSPC), vyznačující se velkým rozsahem aktivity AR (Tong *et al.*, 2021). V tomto stádiu standardně nastupuje chirurgická a/nebo radiační terapie. Charakteristickými znaky stádia HSPC jsou: 1) Pozitivní odpověď na androgenové stimuly a ADT; 2) Přítomnost fúzního genu *ETS* nebo mutace ve *SPOP*,

*FOXA1*, nebo *IDH1*; 3) Převaha nádorových buněk citlivých na androgeny nad necitlivými (Tong, 2021). Pokročilý HSPC lze rozdělit na dva další stavy, biochemicky rekurentní a metastatický PC (mHSPC) (Moul, 2015; Iacovelli *et al.*, 2019), přičemž někteří pacienti mohou mít diagnostikováni mHSPC *de novo* již před terapií a toto stádium předchází vývoji do mCRPC (Tong, 2021).

#### **1.4.7.2 Na androgenech nezávislý karcinom prostaty**

Na androgenech nezávislé PC (AIPC) může být definované jako přechodné stádium mezi HSPC a CRPC (Tong, 2021). V tomto stádiu dosahují buňky AIPC vlastní androgenové syntézy a přestávají být citlivé na tradiční ADT. Účinnou léčbou zůstávají antiandrogeny druhé generace (AA a enzalutamid) (Tong, 2021). Charakteristickými znaky AIPC jsou: 1) Syntéza androgenů a jejich využití z nádorových buněk a nadledvin; 2) Adaptace a selekce prostatických nádorových buněk na různé hladiny androgenů; 3) Pokračující genetické změny a cílená aktivace signálních drah (např. PI3K/Akt/mTOR) (Cai *et al.*, 2020); 4) Častější změny AR a zvýšená transkripční aktivita AR (Xu *et al.*, 2019).

#### **1.4.7.3 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty**

Kastrálně rezistentní PC (CRPC) lze rozdělit do dvou základních typů: nemetastatické CRPC (nmCRPC nebo jen CRPC) a metastatické CRPC (mCRPC). CRPC stádium se plně adaptovalo na nízké hladiny androgenů a vytváří pozitivní zpětnou vazbu s nádorovým mikroprostředím (TME) (Tong, 2021). Hlavní děje v CRPC stádiu zahrnují selekci a rezistenci buněk na ADT, aktivaci signálních drah i bez AR, velmi časté genetické změny, progresse epitelovo-mezenchymální tranzice a nádorových kmenových buněk, *crosstalk* signálních drah, metastázy a adaptivní TME. Charakteristické znaky CRPC zahrnují: 1) Kastrální hladina a průběžné zvyšování PSA; 2) Mutace genů *TP53*, *RBI*, *PTEN* a genů zapojených do oprav poškození DNA; 3) Aktivace koaktivátorů AR (např. *FOXA1*, *KMT2D*); 4) Aktivace signálních drah Wnt, SRC, STAT3, PI3K; 5) EMT a progresse nádorových kmenových buněk (Arora *et Barbieri*, 2018, Tong, 2021).

#### **1.4.7.4 Neuroendokrinní karcinom prostaty**

S příchodem účinnější terapie druhé generace byl pozorován vznik nádorů prostaty využívající četné a na AR závislé mechanismy, které přispívaly k rezistenci na terapii (Labrecque *et al.*, 2021). Tyto mechanismy rezistence závislé na AR si udržují program luminální diferenciace s trvalou signalizací AR. Jedná se zejména o neuroendokrinní (NE) karcinomy prostaty (NEPC) a na základě exprese AR a/nebo neuroendokrinních markerů byly

popsány další podtypy CRPC (Labrecque *et al.*, 2021): 1) Amfikirinní PC, který udržuje aktivitu AR a luminální diferenční programy, ale exprimuje některé z klasických NE markerů (chromogranin A, synaptophysin, a/nebo CD56 (AR+/NE+); 2) Fenotyp nízké hladiny AR ukazuje snížený jaderný AR a snížené geny regulované AR, zatímco v mnoha případech zachovává expresi PSA a genů regulovaných AR (AR<sup>low</sup>/NE-) (Labrecque *et al.*, 2019); 3) Dvakrát negativní karcinomy prostaty jsou označeny nedetekovatelnou hladinou exprese proteinu AR a nepřítomností genové exprese AR a NE markerů (AR-/NE-). Tento fenotyp zahrnuje vzácný CRPC s dlaždicovou diferenciací (Parwani *et al.*, 2004, Labrecque *et al.*, 2019, Cackowski *et al.*, 2020); 4) Malobuněčný nebo neuroendokrinní CRPC jsou nádory bez exprese AR a mají buď klasickou malobuněčnou patologii, anebo zvýšenou expresi NE markerů (AR-/NE+) (Tsai *et al.*, 2017, Beltran *et al.*, 2019, Labrecque *et al.*, 2019).

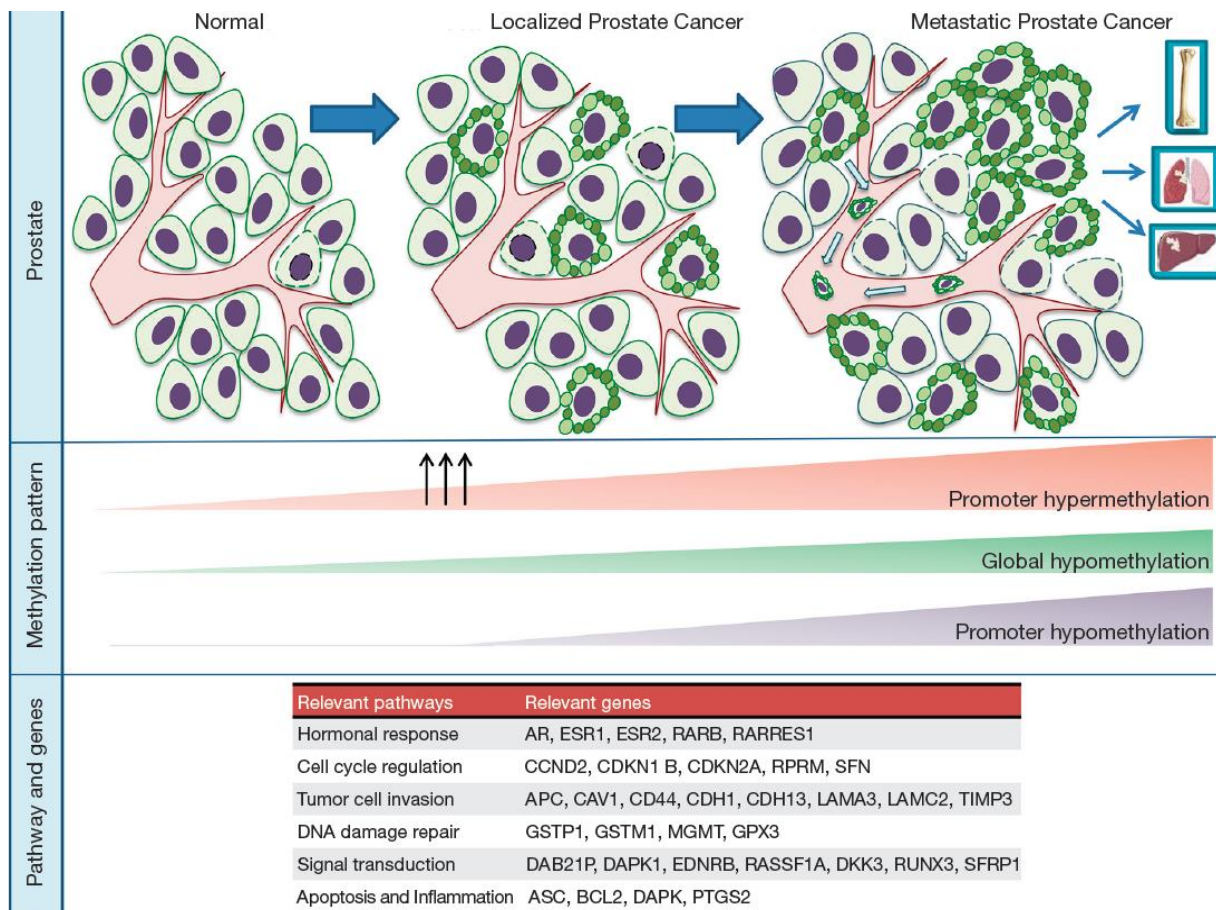
## 1.5 Epigenetika karcinomu prostaty

Vedle genetických změn hrají klíčovou roli v iniciaci, progresi a rezistenci na léčbu karcinomu prostaty také epigenetické modifikace. Tyto se objevují v každém stádiu PC a zahrnují různorodou škálu signálních drah a genů (viz Obr. 2, Conteduca *et al.*, 2021).

### 1.5.1 Metylace DNA u karcinomu prostaty

Hypermetylace promotorů reprezentuje časnou molekulární událost, který přetrvává po celou dobu do progresu onemocnění, zatímco globální hypometylace DNA se objevují nejvýrazněji během nebo po metastatické diseminaci a přispívají k nádorové heterogenitě a genomické nestabilitě (Yegnasubramanian *et al.*, 2008, Conteduca *et al.*, 2021).

Právě metylace promotoru genu *GSTP1* a ztráta exprese byla jedna z prvních objevených epigenetických událostí v souvislosti s karcinomem prostaty (Lee *et al.*, 1994). Hypermetylace promotoru *GSTP1* se vyskytuje v 75 % případů preinvazivní *high grade* prostatické intraepiteliální neoplazie (PIN), více než v 90 % nádorů prostaty a zůstává ve všech stádiích nádorové progresu (Bastian *et al.*, 2004). Celogenomové metylační studie odhalily změny v metylačním profilu DNA během karcinogeneze prostaty (Friedlander *et al.*, 2012, Mahapatra *et al.*, 2012, Kron *et al.*, 2013, Massie *et al.* 2017, Zhao *et al.*, 2020, Ylitalo *et al.*, 2021). Tyto studie potvrdily u vzorků PC hypermetylací *GSTP1* a odhalily další hypermetylované promotory genů, zapojených do svalové kontrakce, různých vývojových a cytoskeletálních procesů, regulace proliferace a buněčné adheze (Yamanaka *et al.*, 2003; Kron *et al.*, 2009, Ylitalo *et al.*, 2021).



**Obrázek 2.** Epigenetické změny během iniciace a progresu PC. Změny v metylačním profilu a další epigenetické změny se objevují během každého stádia PC a zahrnují různé dráhy a geny. Hypometylace promotorů a reaktivace protoonkogenů u PC jsou stále předmětem výzkumu. Převzato od Conteduca *et al.*, 2021.

Změny v metylačním vzorci DNA u větších oblastí, než jsou promotory, jsou také spojovány s karcinogenezí (Kukkonen *et al.*, 2021). Hypometylace LINE-1, která představuje přibližně 15 % lidského genomu, je spojována s úmrtností na karcinom prostaty (Fiano *et al.*, 2017). Kim *et al.* (2011) již dříve ukázal hypometylace DNA v LINE-1 repetitivních elementech u ETS negativních případů, což naznačuje, že epigenetické modifikace mohou souviset se stavem ETS (Kim *et al.*, 2011).

Studie metylací DNA u karcinomů prostaty se nevztahují pouze na modifikaci 5mC. Storebjerg *et al.* (2018) se zaměřili na méně zkoumané modifikace, 5hmC, 5fC a 5caC, vznikající oxidací 5mC při aktivní demethylaci a ukázal, že hladina 5hmC je snižena zvláště u ERG negativních nádorů prostaty v porovnání s nenádorovou tkání (Storebjerg *et al.*, 2018). Stejná práce také ukázala zvýšenou hladinu 5fC u nádorů s fúzním ERG a zvýšenou hladinu

5caC u všech vyšetřovaných vzorků PC (Storebjerg *et al.*, 2018). Snížená exprese demetylačního enzymu TET2 spolu se sníženou hladinou 5hmC je zapojena do vývoje a progresu PC (Takayama *et al.*, 2015; Nickerson *et al.*, 2017).

U karcinomu prostaty mohou různé genetické a epigenetické události vést nezávisle na sobě ke stejnému účinku na genovou expresi u PC (Dhingra *et al.*, 2017). Dhingra *et al.* (2017) častěji pozorovali vyšší počet genů signifikantně ovlivněných hyper- a hypometylací DNA než mutacemi nebo přeskupením genů. Kombinovanou analýzou RNA-Seq, metylace DNA a souboru dat z 333 TCGA nádorových vzorků mělo 88 z nich delecí genu *FAS*, 67 vzorků vykazovalo signifikantní hypermetylace v promotorové oblasti genu *FAS* a 6 vzorků mělo jak delecí genu, tak hypermetylace promotoru (Dhingra *et al.*, 2017). Takto velké množství vzorků karcinomu prostaty pozměněných delecí nebo metylací naznačuje, že genetické a epigenetické události vedou k deregulaci genu *FAS* nezávisle na sobě. Podobné výsledky získali i pro geny *FAM3B* a *TNFSF13*, což naznačuje na jejich roli v tumorigenezi prostaty. Tyto tři geny nesou delecce lokusu napříč celým tělem genu a vykazují hypermetylace v jejich promotorových oblastech (Dhingra *et al.*, 2017).

Metylační vzorec DNA je spojován také se specifickými genomickými změnami u PC. Abeshouse *et al.* (2015) provedli metylační analýzu DNA 333 primárních vzorků PC a ukázali na spojitost metylačního vzorce s fúzí ETS, přičemž metylace DNA se lišily podle fúzního partnera ETS (*ERG*, *ETV1*, *ETV4* a *FLI1*). Jinými slovy, nádory pozitivní na fúzní gen *ERG* mohou mít dvojitý DNA metylační vzorec (buď nízká hladina metylace, nebo různorodé hypermetylace) a toto zjištění odhaluje variabilitu mezi tím, co bylo dříve považováno za geneticky homogenní podtyp PC (Abeshouse *et al.*, 2015). Nádory s fúzním *ERG* představovaly nejrozmanitější metylační změny v porovnání s jinými skupinami (Abeshouse *et al.*, 2015). Ve stejné studii identifikovali 164 epigeneticky umlčených genů u téměř všech primárních nádorů PC (více než 85 % případů) a také zjistili, že nádory prostaty s mutacemi v genech *SPOP*, *FOXA1* a *IDH1* měly odlišný metylační vzorec (Abeshouse *et al.*, 2015). Např. gen *STAT6* byl umlčen přednostně u nádorů s fúzním ETS a ne u nádorů s mutací genu *SPOP* nebo *IDH1* (Abeshouse *et al.*, 2015). Vzorky s nádory prostaty nesoucí mutovaný *IDH1* měly také nejvyšší počet epigeneticky umlčených genů a méně změn v počtu kopií DNA (Abeshouse *et al.*, 2015). Strukturální varianty genů mohou být iniciátory změn, které naruší expresi řady transkripčních faktorů, a DNA metylační změny mohou být propagátory změn genové exprese (Dhingra *et al.*, 2017).

Metylace DNA u PC byla studována také v souvislosti se změnami v přístupnosti chromatinu a modifikacím histonů (Kron *et al.*, 2013; Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020). Tyto práce



zjišťovaly spojitost mezi metylací DNA u PC s různými stádii nemoci podle Gleasonova skóre a statusem ERG a porovnávali nádorový metylační vzorec s represivními a aktivními znaky chromatinu (Kron *et al.*, 2013; Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020). Práce od Kron *et al.* (2013) odhalila, že diferenciálně metylované oblasti (DMR) byly většinou hypermetylovány u nádorů s vysokým Gleasonovým skóre a ve spojitosti s fúzním ERG. Ve stejné práci také zjistili malý překryv mezi DMR spojenými s Gleasonovým skóre a těmi, které jsou spojené s fúzním ERG, což naznačuje na různé změny v metylaci DNA u nádorů s různými stádii nemoci a statusem ERG (Kron *et al.*, 2013).

Recentní integrovaná analýza epigenomu a transkriptomu u lokalizovaných PC identifikovala výraznou hypermetylacii u nádorových vzorků ve srovnání s nezhoubnými tkáněmi (Ylitalo *et al.*, 2021). Ylitalo *et al.* (2021) porovnali diferenciálně metylované oblasti 4360 CpG dinukleotidů (DM-CpG) a u většiny z nich (86 %) korespondovaly hypermetylace CpG s nádorovými vzorky. Tyto diferenciálně metylované CpG dinukleotidy (reprezentující 1759 jedinečných genů) zřetelně odlišovaly nádorové a normální vzorky (Ylitalo *et al.*, 2021). Navíc, zesílená hypermetylace pozorovaná u nádorových vzorků byla signifikantně spojována se sníženou hladinou exprese u 25 % diferenciálně metylovaných genů (Ylitalo *et al.*, 2021). Hypometylace u primárních PC nebyla běžná a není spojována se specifickými funkčními procesy. Většina z identifikovaných DM-CpG pozorovaných mezi primárním PC a nenádorovou tkání byla přítomná také v metastatické tkáni a také vyzorovali jedinečný soubor DM-CpG při přechodu z primárního nádoru do metastatického stádia (Ylitalo *et al.*, 2021). Velká většina těchto DM-CpG byla hypometylovaná a zahrnovala místa v oblasti promotoru *AR* (viz kapitola 1.5.4, Ylitalo *et al.*, 2021).

### **1.5.2 Modifikace histonů u karcinomu prostaty**

Buňky PC vykazují značnou deregulaci chromatinového stavu. Sama androgenová stimulace může v buňkách PC spouštět několik změn v chromatinu (Kukkonen *et al.*, 2021). Například u nádorové linie prostaty LNCaP byla po podání androgenů ukázána akumulace acetylovaného histonu H3 v oblasti promotoru a enhanceru genu *KLK3* (kódující PSA) (Wang *et al.*, 2005). Přítomnost androgenů navíc spouští povolávání AR a jeho koaktivátorů s HAT aktivitou, CBP a p300, k regulační oblasti genu *KLK3* a vede k acetylaci histonů a aktivaci transkripce (Shang *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2005). Naopak, AR navázaný na antagonistu (např. bicalutamid) aktivuje korepresory (NCoR1/2), které jsou spojené s HDAC a potlačují expresi genů (Nagy *et al.*, 1997). Pomerantz *et al.* (2020) propojením epigenomu s genomickými a transkriptomickými daty zjistili, že mCRPC lze odlišit od primárního

nádoru na základě specifické vazby transkripčního faktoru v enhancerech genů (zahrnující *AR*, *FOXA1* a *HOXB13*) a acetylace histonů (H3K27) (Pomerantz *et al.*, 2020).

Také histonové demetylázy jsou v závislosti na androgenové stimulaci povolávány k cílovým genům AR (vedle *KLK3* také např. k *TMPRSS2* a *NKX3-1*), což vede k méně metylovanému H3K9 a aktivnímu chromatinovému stavu (Yamane *et al.*, 2006). Bylo ukázáno, že nízké hladiny H3K9me2 předpovídají slabou prognózu pacientů s PC (Seligson *et al.*, 2009), zatímco vyšší hladiny H3K4me1 jsou spojeny s vyšším rizikem biochemické recidivy (Ellinger *et al.*, 2010). Ke *et al.* (2009) na celogenomovém profilování H3K27me3 a H3K4me3 u normálních a prostatických nádorových buněk ukázal, že zatímco je počet každé modifikace relativně podobný v obou typech buněk, celogenomové profily těchto značek se liší, takže geny označené H3K27me3 nebo oběma značkami (H3K27me3 a H3K4me3) jsou přibližně v 70 % případů odlišné (Ke *et al.*, 2009). Geny označené H3K27me3 v buňkách PC jsou obohacené o vývojové funkce, které nejsou přítomné u normálních epiteliálních buněk (Ke *et al.*, 2009). To ukazuje, že během karcinogeneze PC nastává epigenetické přeprogramování vývojových genů (Kukkonen *et al.*, 2021).

### **1.5.3 Epigenetické mechanismy vývoje do CRPC**

Epigenomické změny, ke kterým dochází s rozvojem PC a během léčby, také významně přispívají k fenotypové heterogenitě mezi pacienty (Yegnasubramanian, 2016). Tyto změny zahrnují remodelace chromatinu, změny transkriptomu modulované nekódující RNA a změny v metylaci DNA (Peter *et al.*, 2021).

#### **1.5.3.1 Význam metylace DNA v CRPC**

Změny v metylaci DNA, ať již globální nebo místně specifické, jsou zřejmě jedny z nejdůležitějších epigenetických zásahů u pokročilých stádií karcinomu prostaty (Conteduca *et al.*, 2021). Yegnasubramanian *et al.* (2008) uvádí, že hypometylace DNA se objevují nejvýrazněji během nebo po metastatické diseminaci a přispívají k nádorové heterogenitě metastatického PC. Metylace DNA jsou spojovány nejen s karcinogenezí, ale také s progresí a rezistencí na léčbu (Kukkonen *et al.*, 2021). Mahapatra *et al.* (2012) identifikovali hypermetylace promotorů genů u nádorových vzorků prostaty od pacientů s rekurentním PC a protože se tyto geny účastní signálních a transkripčních drah, jejich inhibice pomocí metylace promotoru může hrát roli v progresi PC (Mahapatra *et al.*, 2012). Hypermetylace promotorů se týká vedle AR také *ESR1*, genů buněčné adheze (*CD44*, *CDH1*), genů zapojených do buněčného cyklu (*CCND2*, *CDKN1B*) a apoptózy (např. *ASC*, *BCL-2*,

DAPK) (Graça *et al.*, 2016). Ve spojitosti s výrazně delším přežíváním pacientů s CRPC je naopak spojena hypermetylace promotoru genu *SRD5A2*, který kóduje jeden ze tří izozymů 5 $\alpha$ -reduktázy (Wang *et al.*, 2020). Peter *et al.* (2021) provedli celogenomovou metylační analýzu u buněčných linií reprezentující pokročilé PC a ukázali, že vývoj rezistence na ARSI sice vede k hypermetylací DNA, ale modely CRPC a NEPC vykazovali podobný počet hyper- a hypometylovaných míst. To naznačuje, že přestavba diferenciatně metylovaných oblastí nemusí být zapojena do transdiferenciace mezi CRPC a NEPC (Peter *et al.*, 2021).

Zhao *et al.* (2020) využili celogenomové bisulfitové sekvenování a RNA-seq k analýze metylovaných oblastí napříč genomem u 100 klinických vzorků mCRPC a ukázali, že DMR se přednostně vyskytují v intergenních oblastech s regulačními funkcemi. Přibližně 22 % nádorů lze zařadit do stádia mCRPC a charakterizovat hypermetylacemi a somatickými mutacemi v genech *TET2*, *DNMT3B*, *IDH1* a *BRAF* (Zhao *et al.* 2020). Autoři také ukázali, že exprese onkogenů karcinomu prostaty, jako jsou AR, MYC a ERG, byla spojena s metylací DNA v regulačních intergenních oblastech (Zhao *et al.* 2020). Navíc analýza diferenciatně metylovaných oblastí porovnávající BPH, primární nádory a mCRPC identifikovala hypometylace specifických oblastí v mCRPC související s nádorem, které řídí zvýšenou expresi onkogenů (Zhao *et al.* 2020). V této studii zjistili převážně méně metylací u lokalizovaného PC oproti BPH a převážně méně metylací u vzorků mCRPC oproti primárnímu nádoru prostaty, s 55% překryvem DMR mezi lokalizovanými a metastatickými tkáněmi (Zhao *et al.* 2020). Navíc, u mCRPC byly oblasti s nejvíce diferenciatními hypometylacemi charakterizovány vyšší somatickou rychlostí mutace, což naznačuje, že jisté oblasti genomu jsou změněné jak mutacemi, tak metylacemi (Zhao *et al.* 2020). Podle Zhao *et al.* (2020) geny s vyšší expresí měly častěji hypometylací promotoru a hypermetylací v těle genu. Ve vzorcích mCRPC našli hypometylace v promotorech klíčových genů řízených AR v porovnání s BPH (*AR*, *KLK3*, *NKX3-1* aj.), naopak nenašli hypermetylace promotorů tumor supresorových genů (*TP53* nebo *RBI*) a mnoho genů dříve popisovaných jako hypermetylovaných v PC (např. *GSTP1*) bylo v této studii u vzorků mCRPC metylováno rozdílně oproti BPH (Zhao *et al.*, 2020).

Další studie porovnávaly přístupnost chromatinu a metylace DNA u vzorků BPH, primárních PC a CRPC a odhalily, že tyto modifikace jsou ve vzájemné opačné korelaci (Urbanucci *et al.*, 2017, Uusi-Mäkelä 2020). Většina DMR a odlišně přístupných oblastí mezi BPH, primárními PC a CRPC tkáněmi se nepřekrývá, což naznačuje že remodelování přístupného chromatinu a metylace DNA v karcinogenezi prostaty a progresi do CRPC jsou dva odlišné mechanismy (Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020).

Celogenomové porovnání DNA metylačního profilu metastatických biopsií pacientů s NEPC a CRPC ukázalo, že metylační profil DNA může rozlišit vysoce agresivní formy onemocnění NEPC od CRPC (Beltran *et al.*, 2016). Zatímco se stále nalézají molekulární spouštěče diferenciaci z CRPC do NEPC, je zřejmé, že epigenomické změny pravděpodobně hrají významnou roli (Davies *et al.*, 2020). Například proteiny EZH2 a DNMT1 byly silně exprimované a hojnější v NEPC nádorech oproti CRPC (Beltran *et al.*, 2016). To zvyšuje pravděpodobnost, že přechod do NEPC stádia je spojen s epigenetickou deregulací (Beltran *et al.*, 2016). Integrace dat metylace DNA s daty o transkriptomu ukázaly epigenetické modulace signálních drah zapojených do diferenciaci, vývoje, adheze a buněčného cyklu (Beltran *et al.*, 2016). Tyto DNA metylační změny asociované s NEPC jsou detekovatelné pomocí *cell free* DNA (cfDNA), která může mít důležitý dopad pro biomarkery (Yamada *et al.*, 2021). Současná studie celogenomového bisulfitového sekvenování cfDNA dokázala zobrazit shodné metylační profily DNA s profily metastatických nádorů z biopsií NEPC, zahrnující hypermetylace a hypometylace genů specifických pro NEPC (Beltran *et al.*, 2020).

Ylitalo *et al.* (2021) provedli celogenomovou analýzu CpG metylace promotorů 94 vzorků nádorů, zahrnující párové nenádorové a nádorové oblasti primárního nádoru po radikální prostatektomii a vzorky kostních metastáz z několika pacientů (zahrnující hormonálně naivní HSPC, po krátkodobé kastraci nebo s diagnózou CRPC) a identifikovali diferenciaci metylované CpG (Ylitalo *et al.*, 2021). Většina metastatickými vzorků (88 %) odpovídala hypometylaci v porovnání s nádorovými tkáněmi (Ylitalo *et al.*, 2021). Skutečnost, že většina DM-CpG mezi metastatickými a nádorovými vzorky byla také mezi metastatickou a normální tkání naznačuje, že překryv CpG pravděpodobně souvisel s orgánem než s kostními metastázami (Ylitalo *et al.*, 2021).

### 1.5.3.2 Význam chromatinu v CRPC

Změny v chromatinu jsou spojovány i s progresí PC (Nightingale *et al.*, 2006, Kukkonen *et al.*, 2021). Například exprese HAT, CBP a p300 je u mCRPC signifikantně vyšší než u lokalizovaných PC (Wolti *et al.*, 2021) a jsou spojovány s pokročilými stádii a slabou prognózou. p300 navíc také stabilizuje histonovou demetylázu JMJD1A, která je u CRPC zvýšená v porovnání s primárním PC (Xu *et al.*, 2020). Vzdávající JMJD1A je povolána k cílovým genům AR a usnadňuje tak konverzi chromatinu do aktivního stavu (Xu *et al.*, 2020). Nedávná studie od Pomerantz *et al.* (2020) hodnotila epigenom prostaty napříč klinickými stádii (od normální prostaty k lokalizovanému PC a mCRPC) a identifikovala epigeneticky přeprogramovaná místa AR na základě acetylace H3K27, která nevznikla *de*

*novo* (Pomerantz *et al.*, 2020). Během vývoje z lokalizovaného PC do mCRPC byla pozorovaná reaktivace latentních vývojových transkripčních programů, které byly aktivní během fetální organogeneze prostaty (Pomerantz *et al.*, 2020). Také objevili specifické enhancery důležité v progresi nádorů a různé modifikace, např. přítomnost značky H3K27ac spolu se somatickou amplifikací DNA, které identifikovaly regulační místa specifická pro metastázy (Pomerantz *et al.*, 2020).

Ellinger *et al.* (2010) zjišťovali imunohistochemicky (IHC) globální profil modifikace histonů napříč stádii PC a konkrétně u CRPC našli sníženou acetylaci histonů H3 a H4 a di- a trimetylaci histonu H3K9, ale zvýšenou mono-, di- a trimetylaci H3K4. Zde se ukazuje souvislost s transkripčním faktorem FOXA1, jehož vazba k cílovým genům silně závisí na distribuci H3K4me1 a H3K4me2 (Sahu *et al.*, 2011). Histonová demetyláza LSD1, která demetyluje H3K4, může regulovat transkripční aktivitu AR (Cai *et al.*, 2011) a navíc aktivovat transkripční faktor FOXA1, což vede k jeho povolání k enhancerům závislým na AR (Gao *et al.*, 2020). Další histonové demetylázy jsou také zepojeny do progresu PC, např. JMJD5 podporuje buněčnou proliferaci a kontroluje aktivitu AR, HIF-1 $\alpha$  a EZH2 (Wang *et al.*, 2019). Akumulace těchto histonových značek (H3K4, H3K9) byla nalezena v AR-vázajících enhancerech u genů spojených s M-fází buněčného cyklu ve tkáních a buněčných modelech CRPC, v porovnání s nádory a buněčnými liniemi reprezentující AIPC (Wang *et al.*, 2009).

IHC analýzu globální hladiny H3K27me3 provedl také Pellakuru *et al.* (2012), který ukázal, že hladiny H3K27me3 klesají s tím, jak se zvyšují markery agresivního onemocnění (Pellakuru *et al.*, 2012). Tento pokles v hladině H3K27me3 je častěji pozorován u více diferencovaných normálních lumenálních epiteliálních buněk v porovnání s více se podobajícím kmenovým bazálním buňkám (Pellakuru *et al.*, 2012). Tyto poznatky naznačují, že se během progresu PC zvyšuje celkový aktivní chromatinový stav a že se epigenom přeprogramovává, aby se přiblížil podobě kmenových buněk (Kukkonen *et al.*, 2021). Tuto teorii podporuje zjištění, že geny, které jsou potlačované a označené H3K27me3 v normální prostatické tkáni a pak nepotlačované během progresu PC, jsou regulátory vývojových drah a homeobox proteinů, a že takové epigenetické přeprogramování může částečně pocházet z aberantní funkce EZH2 (Yu *et al.*, 2007a, Yu *et al.*, 2007b). EZH2 je katalytická podjednotka Polycomb represivního komplexu 2 (PRC2), která v CRPC potlačuje transkripci androgenového receptoru pomocí trimetylaci histonu H3 (H3K27me3) (Xu *et al.*, 2012). Ukázalo se, že EZH2 má zvýšenou expresi v PC, ale ještě vyšší v CRPC (Varambally *et al.*,

2002, Dundr *et al.*, 2020). Kromě této funkce působí EZH2 také jako koaktivátor důležitých transkripčních faktorů, včetně AR (Xu *et al.*, 2012).

Přístupnost chromatinu je usnadněna chromatin remodelačními komplexy; buď vypuzením histonů nebo celého nukleozomu, anebo klouzáním nukleozomů do různých míst DNA (Hargreaves, 2021). Chromatin remodelační komplex SWI/SNF byl prokazatelně spojen s karcinogenezí a progresí PC (Kukkonen *et al.*, 2021). Jedna z podjednotek SWI/SNF komplexu, BRG1, je nutná pro přístupnost chromatinu (Hargreaves, 2021), má zvýšenou expresi v primárních PC, s nádorovou progresí se zvyšovala a nejvyšších hodnot dosahovala ve stádiu NEPC (Ding *et al.*, 2019, Muthuswami *et al.*, 2019, Cyrta *et al.*, 2020). Také další podjednotky SWI/SNF komplexu hrají roli v progresi PC, například exprese BAF57 pozitivně koreluje s Gleasonovým skóre (Link *et al.*, 2008). Tato zjištění naznačují, že pro progresi nádorových buněk do CRPC a NEPC je nutná odlišná remodelace chromatinu (Kukkonen *et al.*, 2021). Abnormální aktivace chromatinových proteinů (čtecích proteinů, remodelačních komplexů a jejich podjednotek) v CRPC naznačuje celkové zvýšení přístupnosti chromatinu v oblastech genové regulace, což je doloženo pozitivní korelací relaxovaného chromatinu s nádorovou progresí PC (Urbanucci *et al.*, 2017, Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020, Kukkonen *et al.*, 2021). Příkladem abnormální aktivace čtecích proteinů, vedoucí k udržení přístupného chromatinu u PC, jsou BET proteiny BRD2 a BRD4, které rozpoznávají acetylované histony, spouštějí remodelaci chromatinu, iniciují transkripci a mají zvýšenou expresi v CRPC (Urbanucci *et al.*, 2017, Urbanucci *et al.*, 2018). Konkrétně BRD4 působí jako kritický koregulátor AR, jeho exprese se při progresi do CRPC zvyšuje a je spojována se špatnou prognózou (Urbanucci *et al.*, 2018). Také samotný SWI/SNF komplex je důležitým transkripčním kofaktorem pro aktivitu AR (Link *et al.*, 2008), jelikož se ukázalo, že aktivita komplexu je kritická pro zahájení transkripce genů KLK3 a TMPRSS2 zprostředkované AR (Marshall *et al.*, 2003).

Uusi-Mäkelä *et al.* (2020) zjistili, že se během progresi CRPC může chromatin posunovat směrem k přístupnějšímu stavu. Autoři studovali přístupnost chromatinu mezi BPH, primárním PC a nmCRPC a odhalili, že promotory exprimovaných genů většinou ukazují přístupný chromatin napříč všemi typy vzorků, zatímco enhancery vykazují pro přístupnost chromatinu specifické vzorce spojené se stádiem nemoci, ale také zobrazují vysokou heterogenitu mezi jednotlivými nádory (Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020). Sledování transkripčních faktorů přístupných oblastí DNA naznačilo, že vazebná místa pro FOXA1, AR a HOXB13 mají ve vzorcích karcinomu prostaty vyšší přístupnost chromatinu a ta je dále přeprogramována během progresi do CRPC (Uusi-Mäkelä *et al.*, 2020).

Smyčky a topologicky asociované domény (TAD) mají v chromatinu strukturní i funkční role (Dixon *et al.*, 2016). Smyčky usnadňují fyzickou interakci mezi enhancery a promotory, zatímco TAD asistují jejich interakcím přisunem blíže jedna k druhé ve 3D prostoru (Dixon *et al.*, 2016, Misteli *et Finn*, 2021). Mnohé studie ukázaly, že 3D organizace genomu PC je v porovnání s normálními buňkami přeprogramovaná tak, že se TAD v nádorových buňkách rozdělí na menší nádorově specifické TAD (Achinger-Kawecka *et al.*, 2016, Taberlay *et al.*, 2016, Rhie *et al.*, 2019). Hranice nově vytvořených menších TAD se hojně vyskytují v oblastech, které vykazují změny v počtu kopií a studie ukazují, že rozdělení TAD na menší domény je nádorově specifický a nenáhodný proces během vývoje PC (Achinger-Kawecka *et al.*, 2016, Taberlay *et al.*, 2016). Rhie *et al.* (2019) navíc ukázali, že v rámci TAD, která udržuje stejné hranice, ale vykazuje změny v chromatinovém stavu, byla v nádorových buňkách exprese 1185 genů zesílená a 713 genů snižena, což naznačuje na zvýšenou chromatinovou přístupnost během vývoje a progresu PC (Rhie *et al.*, 2019, Kukkonen *et al.*, 2021).

Do epigenetických mechanismů progresu do CRPC jsou zapojeny také nekódující RNA (ncRNA) (Shih *et al.*, 2015, Kojima *et al.*, 2017, Ding *et al.*, 2021). ncRNA se účastní různých epigenetických, posttranskripčních a posttranslačních procesů a přenosu signálu. Mohou být klasifikovány do několika podskupin: mikroRNA (miRNA), malé interferující RNA (siRNA nebo RNAi), malé jaderná RNA (snoRNA), PIWI-interaktivní RNA (piRNA) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA) (shrnutí v Hu *et al.*, 2022). miRNA a lncRNA jsou dvě nejčastěji se objevující RNA při výzkumu CRPC a jsou zapojeny do mnoha patofyziologických drah (Shih *et al.*, 2015, Ding *et al.*, 2021). Regulační role miRNA ve vývoji CRPC zahrnují buněčnou proliferaci související s AR, přežívání nádorových buněk, apoptózu nebo EMT (Kojima *et al.*, 2017) a je známá jejich účast ve vývoji do kastrace rezistence, zahrnující modulaci amplifikace AR, zasahování do transkripční aktivity AR a signalizační kaskády nezávisle na AR, regulaci koaktivátorů a korepresorů AR a miRNA cílené přímo na AR (Shih *et al.*, 2015). lncRNA se mohou poskládat do struktur a interagovat s transkripty nebo proteiny, remodelovat chromatin, metylovat histony, působit na miRNA aj. (Ramnarine *et al.*, 2019). lncRNA mají sklon působit jako konkurenční endogenní RNA (ceRNA), kompetitivně se vázat k miRNAs a tvořit lncRNA–miRNA–mRNA síť, která se ve velké míře vyskytuje ve vzorcích a buněčných liniích CRPC (shrnutí v Hu *et al.*, 2022). lncRNA je také klíčový regulátor v PC progresu ze statusu androgenové závislosti do CRPC (Ramnarine *et al.*, 2019). Například lncRNA 1 (ARLNC1) může být

upregulovaná proteinem AR a stabilizovat transkript AR prostřednictvím interakce RNA-RNA (Zhang *et al.*, 2018).

#### 1.5.4 Metylace AR v CRPC

AR stále hraje podstatnou roli u pokročilých stádií PC (Scher *et Sawyers*, 2005). Zatímco některé CRPC exprimují AR v autokrinních dráhách, jiné nádorové buňky ukazují sníženou expresi AR, která je přisuzována umlčování metylací DNA, ztrátou X chromozomu nebo zhoršené stabilitě proteinu AR (Felgueiras *et al.*, 2014).

Jedna z prvních prací vůbec, zabývající se metylací genu *AR* a s tím související progresí do CRPC stádia, byla studie na prostatických nádorových buňkách od Jarrard *et al.* (1998). Dalšími důkazy přispěli Kinoshita *et al.* (2000), kteří našli ve 2 ze 4 vzorků prostaty, vyznačujících se signifikantní ztrátou exprese AR, přítomné metylace v promotoru genu *AR*. Hypermetylace v této oblasti genu se vyskytovala také u pokročilých mCRPC, ale ne v primárních a lokalizovaných nádorech prostaty nebo v normálních tkáních (Kinoshita *et al.* 2000). Naopak Nakayama *et al.* (2000) detekovali hypermetylace genu *AR* také u 20 % pacientů s primárním PC a u 28 % pacientů ve stádiu CRPC (Nakayama *et al.*, 2000). Souvislost mezi metylací genu *AR* a progresí karcinomu prostaty popisují také Tian *et al.* (2012), kteří zjistili, že metylace v promotorové oblasti genu *AR* je pravděpodobně spojená s kmenovostí prostatických nádorových/progenitorových buněk a diferenciací. Dále ukázali, že nízké exprese genu *AR* přítomné v prostatických nádorových kmenových buňkách a kmenových/progenitorových buňkách linie LNCaP byly v důsledku vysoké hladiny DNMT1/3 a vysoké vazbě MBD2 k promotoru *AR* (Tian *et al.*, 2012).

Novější práce zabývající se globální metylací DNA u stádií CRPC a individuálně u genu *AR* souhrnně uvádí častěji spíše hypometylovaný gen či promotor *AR*. Ylitalo *et al.* (2021) objevili soubor unikátně diferenciaciálně metylovaných CpG při přechodu z primárního PC do metastatického PC, z nichž velká většina byly hypometylace a zahrnovaly i místa v oblasti promotoru *AR*. Detailnější studie v metastatických vzorcích ukázala demetylační trend v několika CpG místech v promotoru *AR*, zahrnující dvě alternativní TSS, která dobře korelovala s indukovanou hladinou exprese obou transkriptů *AR* (Ylitalo *et al.*, 2021). Naopak metylace *AR* je stále považována za hůře či méně popsanou a studie zaměřené na tento typ regulace exprese AR nevykazují konzistentní výsledky (Jarrard *et al.*, 1998, Kinoshita *et al.*, 2000, Nakayama *et al.*, 2000, Friedlander *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2020). Podobně jako Ylitalo *et al.* (2021), také Zhao *et al.*, (2020) detekovali hypometylace promotoru *AR* v CRPC, ale zároveň také ukázali hypometylace u neléčených metastatických vzorků. To



nahrává hypotéze, že demetylace *AR* v metastázách může být dřívější příčinou indukce *AR* než amplifikace *AR*, jelikož amplifikace *AR* obvykle není před ADT pozorovaná (Zhao *et al.*, 2020, Ylitalo *et al.*, 2021). Ylitalo *et al.* doplňují, že ani velký rozptyl v úrovni metylace promotoru *AR* mezi metastatickými vzorky, ani stav amplifikace *AR*, neukázaly žádný jasný vztah k aktivitě *AR* v nádoru.

Ylitalo *et al.* (2021) identifikovali mCpG dinukleotidy související s aktivitou *AR* v kostních metastázách PC a tím také jejich potenciální závislost na *AR*. Vytvořili metylační klasifikátor aktivity *AR* (MCA) z 2970 jedinečných CpG, separovaný do dvou klastrů podle exprese a metylace genu *AR*; majoritní klastr metastáz MCA pozitivní (MCA+) vykazoval hypometylace a zvýšené exprese genů spojených s rekurentními fúzí genů v PC, aktivací *AR* a signalizací ukazující na závislost na *AR*; klastr metastáz MCA negativní (MCA-) vykazoval hypermetylace a nízké exprese mnoha genů spojených s aktivitou *AR*, ale hypometylace a vysoké exprese genů spojovaných s EMT, cytoskeletální remodelací a imunitní odpovědí (Ylitalo *et al.*, 2021). Klastr MCA- vykazoval také značně sníženou aktivitu *AR* a tendenci k vyšší proliferaci než MCA+, navíc MCA- pacienti vykazovali značně nižší sérovou hladinu PSA a horší prognózu po ADT (medián přežití 30 měsíců) než MCA+ pacienti (medián přežití 60 měsíců) (Ylitalo *et al.*, 2021). Ylitalo *et al.* (2021) podle tohoto metylačního profilu MCA vyvodili dva typy CRPC. MCA+ typ CRPC s nízkou hladinou metylace promotorů určitých genů regulovaných *AR* (např. *TMPRSS2*) může přispět k nádorovému fenotypu řízenému *AR*, jaký byl pozorován u většiny pacientů s mCRPC, zatímco MCA- typ CRPC s hypermetylací promotorů stejných genů může přispět k vývoji stádia NEPC, které je méně závislé na *AR* (Beltran *et al.*, 2016). Podle této klasifikace by pak pacienti s profilem MCA- mohli být nasměrováni k podpůrné terapii pomocí demetylujících činidel (DNMTi) s cílem zvýšit citlivost na následnou ADT (Ylitalo *et al.* (2021).

Hypotéza, že by epigeneticky indukovaná exprese *AR* u pacientů s CRPC a metylovaným genem *AR* mohla zvrátit některé škodlivé signální dráhy a v určité míře zmírnit agresivitu nádorových buněk, byla podpořena již dříve několika studiemi (McCabe *et al.*, 2006, Zorn *et al.*, 2007, Gravina *et al.*, 2008, Gravina *et al.*, 2010). McCabe *et al.* (2006) zjistili, že Aza-dC inhibovala aberantní *de novo* metylaci DNA u myšího modelu TRAMP a během podávání této látky se podařilo vyvarovat vývoji karcinomu prostaty. Zorn *et al.* (2007) ukázali, že zpožděný nástup PC nezávislého na androgenech u kastrováných myší TRAMP byl důsledkem podávání Aza-dC. Kombinovaná léčba kastrací spolu s ovlivněním Aza-dC navíc vedla ke statisticky signifikantně vyššímu přežívání v porovnání se samotným

ovlivněním Aza-dC. V preklinické studii Gravina *et al.* (2010) použili 5-azacytidin pro reaktivaci exprese genu androgenového receptoru umlčeného metylací DNA u linie PC3, což vedlo ke znásobení odpovědi na bicalutamid následované apoptózou. Ovlivnění 5-azacytidinem zvýšilo účinek terapie bicalutamidem u nádorů prostaty exprimujících i neexprimujících AR, jak *in vitro*, tak *in vivo* (Gravina *et al.*, 2010). Kombinované ovlivnění oběma látkami vedlo k synergickému/aditivnímu účinku u athymické samčí myši xenotransplantovanou buňkami 22rv1 (buněčná linie exprimující AR) nebo u buněk PC3, což mělo za následek značnou redukci nádorové masy a zpoždění progresu (Gravina *et al.*, 2010). U obou buněčných linií (22rv1 a PC3) byla pozorována zvýšená exprese proteinů buněčného cyklu a apoptózy (Gravina *et al.*, 2010). Také Tian *et al.* (2012) ukázali, že ovlivnění buněk karcinomu prostaty 5  $\mu$ M Aza-dC mělo za následek inhibici sebeobnovy a růstu prostatických kmenových/progenitorových buněk *in vitro* a sníženou tumorigenicitu *in vivo*. Indukce exprese genu a funkčního proteinu AR byla závislá na čase a maximálního účinku bylo dosaženo po 6 dnech inkubace (Tian *et al.*, 2012).

## 1.6 Možnosti epigenetické terapie

Vzhledem k dobře známé roli epigenetické deregulace při vzniku a progresi nádorových onemocnění bylo vynaloženo značné úsilí do vývoje epigenetických léčiv. Díky reverzibilní povaze metylace DNA a posttranslačních modifikací histonů mohou být epigenetické proteiny novým terapeutickým cílem.

V současné době je již schválena řada léků ve třech třídách epigenetických inhibitorů (DNMT, HDAC a inhibitory EZH2) americkou FDA pro léčbu různých malignit a další léky na epigenetické bázi prochází klinickými studiemi (Nepali *et Liou*, 2021). Mezi již schválené patří 5-azacytidin a 5'-Aza-2'-deoxycytidin (inhibitory DNMT schválené pro léčbu AML a MDS), FK-228 a SAHA (HDAC inhibitory schválené pro léčbu refrakterního CTCL), PXD101 (HDAC inhibitor schválen pro léčbu refrakterní PTCL), LBH589 (HDAC inhibitor pro léčbu mnohočetného myelomu) a tazemetostat (inhibitor EZH2 schválený pro léčbu metastatického nebo lokálně pokročilého epitelooidního sarkomu). Kromě výše zmíněných byl také schválen FDA anilidový inhibitor HDAC, chidamid, k léčbě pacientů s R/R PTCL (shrnutu v Nepali *et Liou*, 2021). Pro léčbu lymfomů a melanomů jsou schválené FDA 4 inhibitory histonových deacetyláz: vorinostat, belinostat, panobinostat a romidepsin. Tato skupina inhibitorů je také testována u PC (Kaushik *et al.*, 2015). Ferrari *et al.* (2019) ve II. fázi pokusů s podáváním panobinostatu a bicalutamidu hlásili prodloužené přežití bez

rentgenové progresi u pacientů s mCRPC v porovnání s podáváním samotným bicalutamidem.

### 1.6.1 Pokroky v epigeneticky cílené terapii karcinomu prostaty

Epigenetické enzymy, jakými jsou histon lyzin demethylázy a histonové deacetylázy, fungují jako důležité koaktivátory AR a mohou být považovány za terapeutické cíle pro ovlivnění stability a funkce AR. Rozsáhlé výzkumy na různých inhibitech tříd DNMT, HDAC, DOT1L, LSD, EZH2 a inhibitech třídy BET proteinů ukazují, že epigenetické proteiny jsou potenciálními terapeutickými cíli. Otevírají se tak další příležitosti pro epigenetickou léčbu s cílem překonat mechanismy hormonální rezistence a zacílit na AR bez hormonální terapie (Gao *et al.*, 2010).

Yee *et al.* (2010) poukázali na důvodné použití demethylujících činidel u CRPC. Jejich studie *in vitro* ukázala obnovení genu WIF1 (inhibitor WNT) aplikací Aza-dC, které vedlo k mezenchymo-epitelové tranzici (MET, zvrát EMT) se zesílenou regulací E-kadherinu a CK8/18 a sníženou regulací mnoha mezenchymálních markerů, společně se sníženou aktivitou matrixových metaloproteináz 2 a 9 (Yee *et al.*, 2010).

Dlouho známé inhibitory DNA metyltransferáz, azacytidin a 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabin), jsou dlouhodobě studovány pro léčbu MDS a jiných nádorů (Fenaux *et al.*, 2009). Změny v metylaci DNA se objevují u PC brzy a aberantní exprese DNA metyltransferáz se vyskytuje během progresi (Fenaux *et al.*, 2009). V preklinické studii inhibitor DNMTs disulfiram potlačoval růst nádorových buněk DU145, PC3, C4-2B a CWR22R1 *in vitro* a *in vivo* (xenograft nádory buněk C4-2B) (Lin *et al.*, 2011). Kombinovaná léčba s použitím azacytidinu, docetaxelu (inhibitor signální dráhy AR) a prednisonu (kortikoid) u pacientů s mCRPC mělo za výsledek pokles PSA u více než 50 % pacientů (Singal *et al.*, 2015).

Proteiny skupiny Polycomb, EZH2 a EED, jsou dalším terapeutickým cílem epigenetických inhibitorů. Tazemetostat (také jako EPZ-6438) je inhibitor EZH2 nedávno schválený pro léčbu epitelioidního sarkomu a folikulárního lymfomu, u kterých převažuje mutace EZH2 se ziskem funkce (Park *et al.*, 2021). Tento inhibitor je také zkoušen v klinickém testování u pacientů s mCRPC v kombinaci s androgenovou blokádou (Ge *et al.*, 2020). Inhibitor proteinu EED, MAK-683, blokuje vazbu EED na H3K27 a následně zabraňuje aktivaci EZH2. MAK-683 je testovaný v I/II fázi klinických pokusů u pokračujících nádorů, zahrnujících i relapsující PC, u kterých není dostupná efektivní standardní léčba (studie NCT02900651).

EZH2 má histonovou a nehistonovou metylační aktivitu, stejně jako funkce nezávislé na metylaci, které podporují karcinogenezi a proliferaci (Park *et al.*, 2021). Zatímco inhibice EZH2 bude utlumovat jeho metylační aktivitu (tj. H3K27me3), nekanonické a na metylaci nezávislé vlastnosti EZH2 zůstanou enzymatickými inhibitory neovlivněné. Proteinová degradace EZH2 tak může být slibný postup inhibice jeho nekanonické a na metylaci nezávislé funkce. Za tímto účelem byl nedávno oznámen první cílený degradátor EZH2, MS1943 (Ma *et al.*, 2020). Tato látka indukuje EZH2 degradaci v různých nádorových buněčných liniích, včetně buněčné linie nezahoubného karcinomu prostaty PNT2 (Ma *et al.*, 2020). Vzhledem k nedostatku enzymatických inhibitorů EZH2 u PC budou velmi zajímavé pro další výzkum právě sloučeniny degradující EZH2 (Park *et al.*, 2021). Liu *et al.* (2019) nově objevili EZH2 inhibitor astemizol a ve své studii ukázali, že úspěšně degraduje EZH2 a snižuje progresi nádoru, což naznačuje na novou terapeutickou strategii pro pokročilé CRPC (Liu *et al.*, 2019).

Dalším cílem klinické použitelnosti je rodina bromodomén a extra-terminálních bromodomén (BET). Aggarwal *et al.* (2020) testovali inhibitor ZEN-3694 v kombinaci s enzalutamidem u pacientů s mCRPC, kteří progredovali po předchozí léčbě AA a/nebo enzalutamidem. Fáze studie Ib/IIa odhalila medián 9 měsíců prodlouženého přežití bez rentgenové progresy, dlouhodobé léčebné účinky bez progresy více než 12 měsíců u 17 % pacientů a více než 24 měsíců u 5 % pacientů (Aggarwal *et al.*, 2020). Příznivého výsledku přežití bez rentgenové progresy bylo dosaženo i u pacientů s agresivní variantou PC (Aggarwal *et al.*, 2020).

Wolti *et al.* (2021) poprvé testovali CCS1477, orálně biologicky dostupný, silný a selektivní inhibitor bromodomény p300/CBP pro léčbu CRPC. Ve své práci ukázali, že inhibitor komplexu p300/CBP blokuje AR a AR-SV signalizaci, potlačuje expresi MYC v buněčných liniích a xenoimplantátech získaných od pacienta a inhibuje růst a aktivitu AR v modelech CRPC (Wolti *et al.* 2021).

Dalším potenciálním terapeutickým cílem je LSD1. Jeho inhibitor SP2509 utlumoval růst nádoru u CRPC xenograftových modelů (Sehrawat *et al.*, 2018). V jiné studii (Gao *et al.*, 2020) inhibice LSD1 stejným inhibitorem narušila chromatinovou vazbu transkripčního faktoru FOXA1 (Gao *et al.*, 2020). Inhibice LSD1 zásahem do vazebnosti AR a genové exprese potlačuje růst nádoru a také vykazuje synergický účinek s enzalutamidem u modelů CRPC (Sehrawat *et al.*, 2018).

Probíhající klinické studie hodnotí nově vznikající epigenetické terapie jako slibné a potenciální léčebné strategie pro pacienty s pokročilými nádory prostaty (Conteduca *et al.*,

2021). Dosavadní klinické studie však byly zejména pro neselektované populace biomarkerů. Pochopení nádorové specifčnosti a následných účinků takové epigenetické terapie může být důležité pro zlepšení výběru pacientů a kombinace vhodných přístupů léčby v budoucnu (Conteduca *et al.*, 2021). Ty by mohly zahrnovat kombinace epigenetických inhibitorů a rovněž kombinace epigenetických inhibitorů s cytotoxickou chemoterapií, hormonální terapií a inhibitory imunitních kontrolních bodů (Jin *et al.*, 2021).

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Otestovat kombinace a koncentrace epigenetických inhibitorů na demetylaci a re-expresi inaktivovaného genu *AR* u buněk nádorových prostatických linií bez exprese *AR* (DU145 a PC3).
2. Analyzovat vliv vybraných kombinací a koncentrací epigenetických inhibitorů na úroveň acetylace histonů H3 a H4 v promotoru genu *AR* u normálních (RWPE-1) a nádorových buněk prostaty (DU145).
3. Porovnat účinky epigenetických inhibitorů na viabilitu a buněčný cyklus u normálních (RWPE-1) a nádorových buněk prostaty (DU145).

### **3 METODIKA**

#### **3.1 Prostatické nádorové linie**

Pro experimentální část této práce byly použity buněčné linie PC3 a DU145 odvozené z karcinomu prostaty, obě necitlivé na androgeny a představující model CRPC. První z nich, epitelová adherentní linie PC3 (ATCC, Cat. No. CRL – 1435<sup>TM</sup>) je původem odvozena z kostní metastázy, druhá linie DU145 (ATCC, HTB-81<sup>TM</sup>) je taktéž epitelová a adherentní, odvozena z metastázy v mozku. Obě linie jsou tumorigenní, polyploidní, neexprimují AR ani PSA. Linie RWPE-1 byla poskytnuta s laskavým svolením Mgr. Karla Součka z Ústavu experimentální biologie (Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity). Jedná se o epitelovou adherentní buněčnou linii, odvozenou z periferní zóny histologicky normální dospělé prostaty a transfekovanou jednou kopií lidského papilomaviru 18 (HPV-18). Linie není tumorigenní, exprimuje AR a po aplikaci androgenů do média exprimuje také PSA.

#### **3.2 Použité inhibitory**

Pro ovlivnění buněk byl použit čerstvě připravený roztok inhibitoru DNA metyltransferáz 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza-dC, Sigma-Aldrich) v médiu o koncentraci 0,5 mmol/l z výchozí koncentrace 50 mmol/l ve 100% DMSO. Čerstvě připravená výchozí pracovní koncentrace inhibitoru histonových deacetyláz butyrátu sodného (NaB, Sigma-Aldrich) byla 0,5 mol/l v 10% DMSO.

#### **3.3 Kultivace buněčných linií**

Linie PC3 a DU145 byly kultivovány v médiu DMEM (Gibco) doplněné 10% fetálním bovinním sérem, 0,01 % penicilinen a streptomycinem a 2 mM L-glutaminem. Linie RWPE-1 byla kultivována v bezsérovém médiu Keratinocyt-SFM (Kit) s L-glutaminem, lidským rekombinantním a epidermálním růstovým faktorem a extraktem z bovinní hypofýzy (Gibco), doplněné na konečnou 0,01% koncentraci dvěma antibiotiky (penicilin, streptomycin), 0,01% koncentraci amfomycinu a 0,005% koncentraci gentamycinu. Všechny buněčné linie byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **3.4 MTT test buněčné viability**

Životaschopnost buněk byla stanovena podle citlivosti buněk k 3-(4,5-dimethylthiozol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Určení koncentrace IC<sub>50</sub> studovaných inhibitorů bylo provedeno podle Malikova *et al.* (2008). Buňky byly nasazeny do 96-

jamkových destiček v počtu 4 500 buněk/jamka pro linii DU145, 5 000 buněk/jamka pro linii PC3 a 6 000 buněk/jamka pro linii RWPE-1. Ovlivněny by po dosažení konfluence 40 – 50 % po dobu 2 a 6 dnů, s výměnou média po 2 dnech. Měření absorbance bylo provedeno na přístroji Labsystem Multiscan RC ELISA reader. Procento životaschopných buněk bylo vypočítáno podle následujícího vzorce: (průměrná absorbance ovlivněných buněk/průměrná absorbance kontrolních buněk) x 100. Test viability buněk byl proveden v triplicátech a ve třech na sobě nezávislých experimentech.

### 3.5 Bisulfitové sekvenování

Nádorové buňky DU145 a PC3 byly ovlivněny buď jednotlivými inhibitory nebo jejich kombinacemi 5  $\mu$ M Aza-dC, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB a 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB po dobu 2 dnů. Genomická DNA byla izolovaná pomocí kitu Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) pro bisulfitovou modifikaci DNA byl použit EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany). Bisulfitová modifikace DNA se používá pro detekci metylovaných CpG dinukleotidů a je založena na chemické přeměně nemetylovaného cytosinu na uracil za přítomnosti bisulfitu sodného, který při vysoké teplotě a nízkém pH deaminuje cytosinová rezidua za vzniku uracilu. Metylovaný cytosin konverzi nepodléhá a uchová si sekvenci DNA i během PCR. Na základě těchto rozdílů jsou specificky navrhovány primery na metylovanou a/nebo nemetylovanou DNA.

PCR amplifikace genu *AR* byla provedena s použitím primerů nasedajících na promotorový úsek genu o délce 385 bp: F, 5' - TGG TTT AGG AAA TTA GGA GTT ATT TAG G - 3' a R, 5' - TCC CTT CGA CTC CTA TAC AAC ACT A - 3' a primerů nasedajících na úsek 1. exonu o délce 236 bp: F, 5' - AGT TTG TAG AGA GGT AAT TTT TTT TGG T - 3' a R, 5' - CCT AAC TAC CTT TTC ATC TTT TAA TCT - 3'. Oba páry primerů byly navrženy na PCR amplifikaci metylované DNA po bisulfitové modifikaci. Teplotní podmínky PCR amplifikací byly následující: počáteční denaturace při 94 °C/4 min, následuje 35 cyklů denaturace při 94 °C/1 min, nasedání primerů při 52 °C/50 s (pro primery na promotor *AR*), 50 °C/50 s (pro primery na 1. exon), prodloužení primerů při 72 °C/1 min a konečná extenze při 72 °C/15 min po posledním cyklu. DNA modifikovaná bisulfitem sodným byla použita do 25  $\mu$ l PCR reakční směsi s polymerázou DyNAzyme<sup>™</sup> EXT DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). Výsledné PCR produkty byly vizualizovány na 1,0 % TAE agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem. Amplifikované úseky DNA byly purifikovány QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Německo) nebo QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle manuálu výrobce. GenomeLab<sup>™</sup>



DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Brea, USA) a Beckman Coulter sekvenátor byly použity pro sekvenační analýzu. Výsledné sekvence byly porovnávány s *wt* sekvencí AR (NC\_000023.10).

### 3.6 Expresní profil androgenového receptoru

Prostatické nádorové buňky DU145 a nenádorové RWPE-1 byly ovlivněny po dobu 2 a 6 dnů buď jednotlivými inhibitory nebo jejich kombinacemi: 5  $\mu$ M Aza-dC, 5 mM NaB, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB a 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB. RNA byla izolovaná pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Diagnostics, Basel, Switzerland) a konvertovaná na komplementární DNA použitím Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche, Diagnostics, Basel, Switzerland) podle manuálu výrobce. Primery CAG byly navrženy pro amplifikaci 476 bp polymorfni CAG oblasti genu AR ke zjištění exprese AR. PCR s primery CAG/F: 5'- CCT GTT GAA CTC TTC TGA G - 3' a CAG/R: 5'- TCT GGG ACG CAA CCT CTC - 3' byla zahájena denaturací při 94 °C na 4 min, následována 40 cykly denaturace po 40 sec, nasedání primerů při 58 °C a 40 sec, elongaci při 72 °C na 1 min a koncové extenzi 72 °C a 10 min po posledním cyklu. Primery byly navrženy na amplifikaci *wt* lidské DNA bez bisulfitové modifikace. Pro vnitřní kontrolu PCR amplifikace byl použit gen *TBP* o velikosti 89 bp. Pozitivní kontrolou exprese genu AR byla DNA izolovaná ze zdravého muže. Výsledky byly potvrzeny druhou nezávislou PCR amplifikací.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Próba (5'-3')	Produkt
<b>AR</b>	ATCCCAGTCCCCTTGT GTC	GGTCTTCTGGGGTGG AAGT	AAGCGAAATGGGCCC TGGA	137 bp
<b>PSA</b>	CGGAGAGCTGTGTCACC AT	CACAATCCGAGACAGG ATGA	CGTGGATTGGTGCTGC ACC C	95 bp
<b>GAPDH</b>	GAAGATGGTGGGGATT TC	GAAGGTGAAGGTCCGA GT	CAAGCTTCCCGTTCTC AGCC	226 bp
<b>AR (ChIP)</b>	CAGGAGCTATTCAGGA AGCAG	GGCTTTGGAGAAACAA GTGC	CTCCTGCC	93 bp

**Tabulka č. 1.** Sekvence primerů a prób použitých pro expresní analýzu genu AR a pro ChIP-qPCR.

### 3.7 Chromatinová imunoprecipitace a kvantitativní PCR (ChIP-qPCR)

Metoda chromatinové imunoprecipitace umožňuje studium interakcí mezi proteiny a DNA. Oproti dříve používaným postupům imunoprecipitace chromatinu jsou dnešní protokoly časově méně náročné, snížil se počet kroků při zpracování vzorku, což vedlo ke snížení rizika kontaminace nebo ztrát vzorku (Nelson *et al.*, 2006). Postup byl převzat od Jia *et al.* (2003) a upraven.

#### 3.7.1 Ovlivnění buněk DU145 a RWPE-1

Buňky prostatické nádorové linie DU145 byly nasazeny na 150mm misky v počtu 1 900 000/miska a nenádorové linie RWPE-1 na 100mm Petriho misky v počtu 100 000 buněk/miska. Buňky byly ovlivněny po dobu 2 a 6 dnů buď jednotlivými inhibitory, nebo jejich kombinacemi stejně jako pro analýzu exprese *AR*.

#### 3.7.2 Fixace, promývání a lýze buněk

Promývání a lýze buněk následuje po kultivaci v termostatu při 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>, kdy by pokrytí Petriho misky buňkami mělo být optimálně v rozmezí 85 – 95 %. Postup promývání a lýze buněk byl převzat od Kang *et al.* (2005) a upraven.

Do každé Petriho misky byl přidán 1 ml čerstvě připraveného ledového roztoku 11x Formaldehyde Stock, proběhla inkubace při 4 °C po dobu 30 min a *cross-linking* byl zastaven přidáním glycinu o finální koncentraci 125 mM. Získaná buněčná suspenze byla promyta PBS nebo D-PBS (pro buňky RWPE-1). Buněčný pelet získaný centrifugací byl lyzován přidáním 400 µl Chro-IP lyzačního pufru (50 mM Hepes-KOH, pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 10 % glycerol, 0,5 % NP-40, 0,25 % Triton X-100) s obsahem inhibitorů proteáz (cOmplete Protease Inhibitor Coctail, Roche, Diagnostics, Basel, Switzerland). Zkumavky s buněčnými lyzáty byly přeneseny na talířový rotátor a při 4 °C byly dále lyzovány po dobu 10 min. Po centrifugaci při 600 g po dobu 5 min při 4 °C byl lyzáát promyt a další centrifugací získané peletky resuspendovány v 1 x RIPA pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 1 % Triton, 0,1 % Na-deoxycholate, 0,1 % SDS). Následnou sonikací chromatinových lyzáátů jsou získávány fragmenty chromatinu o velikosti 300 až 1000 bp. V případě nedostatečně našťípané DNA lze sonikaci opakovat. Koncentrace proteinů v chromatinových lyzátech byly stanoveny metodou Bradfordové.

### 3.7.3 Chromatinová imunoprecipitace

Sonikovaný vzorek chromatinového lyzátu s proteiny o koncentraci 700 µg/ml, obsahující PEX pufr s inhibitory proteáz, byl použit pro precipitaci s protilátkami: anti-acetyl histon H3 králičí polyklonální protilátkou (kat. č. 06-599, Millipore), anti-acetyl histon H4 králičí polyklonální protilátkou (kat. č. 06-866, Millipore) a normální myší IgG polyklonální protilátkou (kat. č. 12-371, Millipore). Vzorky s inputy (bez přidané protilátky) byly zpracovány stejným postupem dle protokolu pro ChIP jako vzorky inkubované s protilátkou a sloužily jako vnitřní kontrola pro stanovení vlivu pozadí během imunoprecipitace.

Vzorky umístěné na talířovém rotátoru (5 ot./min) byly inkubovány při 4 °C přes noc. K precipitovaným vzorkům bylo přidáno 40 µl Salmon sperm DNA/Protein A Agarose (Upstate Biotechnology, Temecula, CA) a po umístění na rotátor (7 ot./min) při 4 °C byly inkubovány po dobu 1 h. Po centrifugaci ve vychlazené centrifuze při 2500 rpm, 4 °C po dobu 3 min byly vzorky umístěny na led a po odebrání supernatantu byl k sedimentu přidán 1 ml RIPA pufru. Vzorky byly třepány při cca 100 ot./min. po dobu 5 min a 4 °C. Po centrifugaci při 2500 rpm, 4 °C po dobu 3 min. byl odebrán supernatant a sediment byl resuspendován v 1 ml RIPA pufru se Salmon sperm DNA. Po následné centrifugaci byl získaný sediment promýván 1 ml Low salt pufrům (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl), 1 ml High salt promývacím pufrům (0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 500 mM NaCl) a 1 ml RIPA pufrům obsahující 100 µg/ml Salmon sperm DNA. Po poslední centrifugaci a odebrání supernatantu byly vzorky se sedimentem ponechány při pokojové teplotě. Sediment byl resuspendován přidáním 100 µl elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) a inkubován při 65 °C, po dobu 20 min, přičemž každé 2 min byl vzorek jemně zvortexován. Následně byly vzorky umístěny na rotátor po dobu 10 min, při 15 ot./min (Bio rotator RS-Multi Boeco). Po centrifugaci při 13 400 rpm po dobu 2 min byl odebrán supernatant do nově připravených eppendorfek a inkubován po dobu 6 h při 65 °C. Po inkubaci byl přidán k supernatantu obsahující DNA 1 µl proteinázy K (200 mg/ml) a inkubován přes noc při 55 °C v inkubátoru se třepačkou. Pro přípravu inputu byl použit sonikovaný chromatinový lyzát, který byl po přidání 1 µl proteinázy K (200 mg/ml) inkubován při 55 °C v inkubátoru se třepačkou po dobu minimálně 3 hodin.

### 3.7.4 Izolace DNA a kvantitativní PCR

Pro izolaci DNA byl použit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Německo). Koncentrace DNA ze získaného precipitátu byla měřena na přístroji Nanodrop

a precipitovaná DNA byla skladována při 4 °C. Precipitovaná DNA byla amplifikovaná kvantitativní PCR (LightCycler 480, Roche) se sondou a primery specifickými pro úsek genu *AR* (Universal Probe Library cat. no. 04688481001, Tab. 1) s použitím softwaru ProbeFinder. RT-PCR bylo provedeno v triplikátech a ve třech na sobě nezávislých experimentech.

### **3.8 Analýza buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie (FACS)**

Buňky byly nasazeny do 6-jamkových destiček (2 200 buněk/jamka u linie RWPE-1 a 1 500 buněk/jamka linie DU145) a ovlivněny výše uvedenými inhibitory a jejich kombinacemi po dobu 2 a 6 dnů. Ovlivněné buňky včetně plovoucích byly fixovány mraženým 70 % etanolem a po ošetření RNAsa A (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo) byly buňky obarveny propidium jodidem (PI) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Obsah buněčné DNA byl analyzován pomocí průtokového cytometru (BD FACSverse, BD, USA) a získaná data zpracována BD FACSuite (BD). Pro analýzu bylo vždy použito nejméně 10 000 buněk.

### **3.9 Statistické analýzy**

Multifaktoriální analýza variance (ANOVA) *s post hoc* oboustranný Dunnettův test a *post hoc* Bonferroniho test mnohočetného porovnávání byl použitý pro komparaci životaschopnosti buněk mezi ovlivněními a kontrolami a pro kvantitativní analýzy, přičemž hodnoceny byly časy ovlivnění a jednotlivé buněčné linie. Analýzy byly provedeny pomocí SPSS, verze software 15 (SPSS, Inc. Chicago, USA) a statistická významnost byla nastavena  $p < 0,05$  (oboustranná).

### **3.10 Vymezení mého podílu práce**

Aktivně jsem se podílela na experimentech zahrnujících kultivaci a různá ovlivnění buněčných linií, izolaci a přípravu DNA, RNA a proteinových lyzátů, reverzní transkripci, PCR, chromatinovou imunoprecipitaci a vyhodnocování dat.

Sekvenování proběhlo na pracovišti LEM pod vedením Doc. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. a bylo provedené Mgr. Sylvií Jančík, PhD. Vzorky určené k sekvenování jsem připravovala sama (ovlivnění a sklizení buněk, příprava DNA, PCR).

Metoda qPCR pro analýzu exprese genu *AR* a CHIP byla provedena s pomocí Mgr. Jany Fialové Kučerové, Ph.D. na Ústavu biologie LF UP a veškeré kroky před samotnou kvantifikací jsem prováděla sama (ovlivnění a sklizení buněk, příprava RNA a DNA).

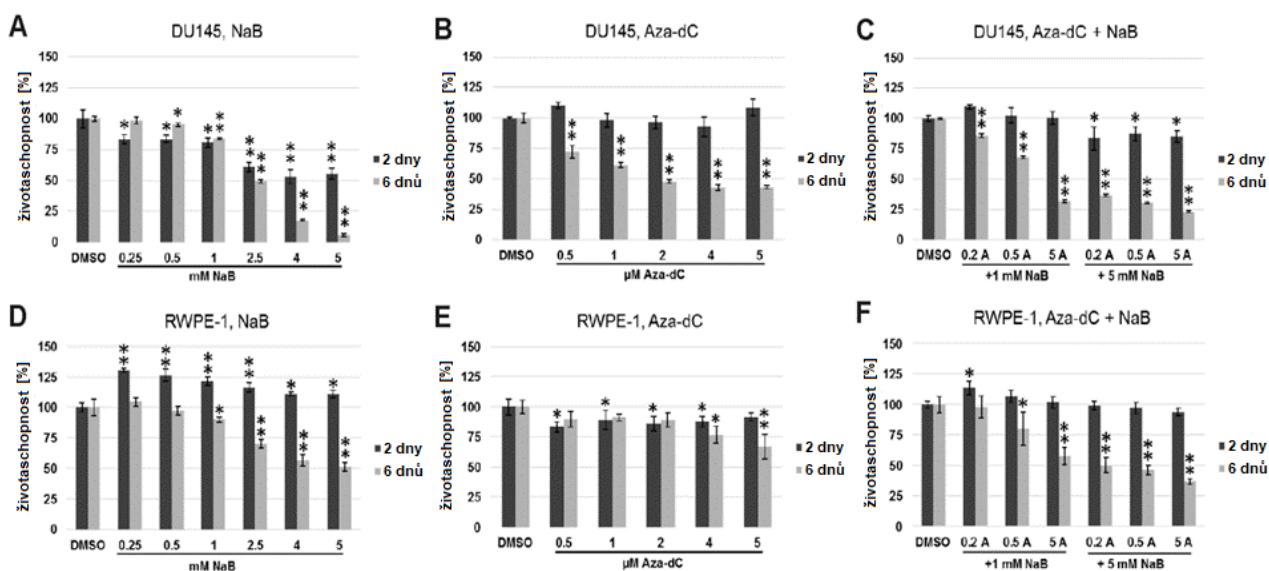
V části věnované analýze buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie jsem se aktivně podílela na teoretické přípravě experimentu, zahrnující ovlivnění, sklizení a barvení buněk. Prakticky tento experiment provedla Mgr. Petra Lužná, Ph.D. a měření na cytometru provedl a výsledky vyhodnotil Mgr. Ján Gurský, Ph.D. na pracovišti Biomedregu.

Obdržená data byla publikována (viz Kapitola 9 – Seznam publikací a konferenčních příspěvků, Fialová *et al.*, 2013 a 2016 - příloha č. 1 a 2, Pašková *et al.*, 2013 – příloha č. 3) a prezentována na domácích i zahraničních konferencích a seminářích.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Viabilita buněk linie DU 145 a RWPE-1 po ovlivnění Aza-dC a NaB

Byl otestován vliv epigenetických inhibitorů Aza-dC a NaB na životaschopnost nádorové linie DU145 a normální linie RWPE-1, vždy po 2 a 6 dnech ovlivnění (s výměnou média po 2 dnech) v tomto schématu: ovlivnění samotným NaB (Obr. 3 A a D), ovlivnění samotnou Aza-dC (Obr. 3 B a E) a jejich kombinace (Obr. 3 C a F). V závislosti na koncentraci použitých činidel byl pozorován cytotoxický účinek na nádorové i normální buňky po 6 dnech ovlivnění, přičemž větší cytotoxický efekt byl zaznamenán u nádorových buněk linie DU145. 5 mM koncentrace NaB způsobila snížení viability asi o 50 % po 2denním ovlivnění buněk DU145 a po jejich 6denním ovlivnění byla tato koncentrace NaB pro buňky toxická (Obr. 3 A), zatímco u linie RWPE-1 zůstalo po 6denní aplikaci NaB životaschopných 50 % buněk (Obr. 3 D). Po 2denním ovlivnění postupně se zvyšující koncentrace Aza-dC nemá vliv na viabilitu nádorových buněk DU14 (Obr. 3 B) a všechny použité koncentrace NaB a kombinace Aza-dC + NaB neměly cytotoxický vliv na buněčnou viabilitu buněk RWPE-1 (Obr. 3 D a 3 F).

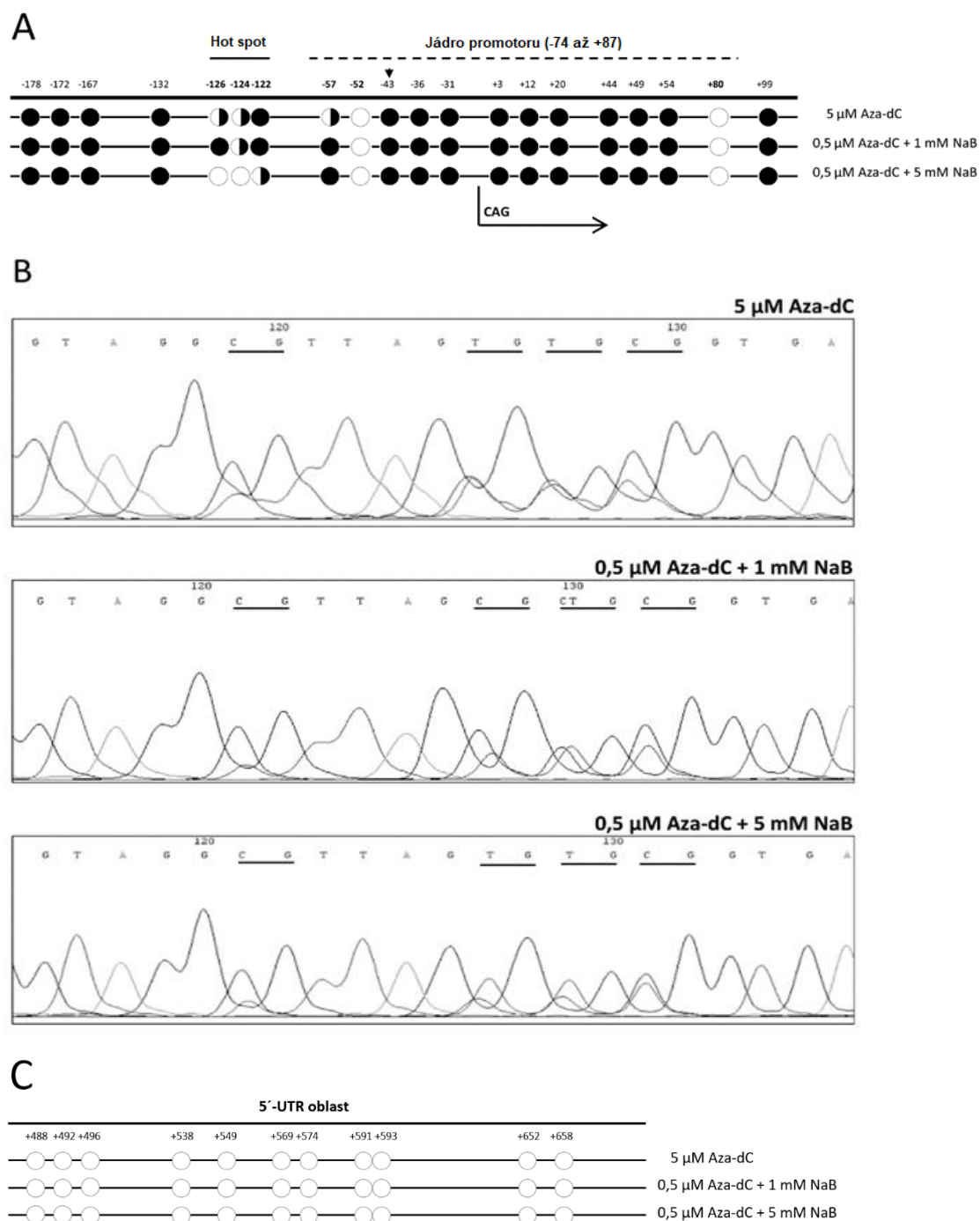


**Obrázek 3.** Viabilita buněk DU145 (A-C) a RWPE-1 (D-F) po 2 a 6 dnech ovlivnění NaB, Aza-dC a jejich kombinacemi. Sloupec pro každé ovlivnění reprezentuje průměr ze tří naměřených hodnot. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly mezi ovlivněním a kontrolou (DMSO), \*p<0.05, \*\*p<0.0001. Upraveno, Fialova *et al.*, 2016.

## 4.2 Demetylační účinek Aza-dC a NaB v oblastech promotoru a 5'-UTR genu AR

U prostatických nádorových buněk PC3 a DU145 (bez exprese AR), které byly ovlivněny 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M koncentracemi Aza-dC a kombinacemi 0,5  $\mu$ M Aza-dC a NaB (1 mM a 5 mM) po dobu 2 a 6 dnů, byly amplifikovány PCR produkty v 5'-UTR oblasti genu AR u linie PC3 (Fialova *et al.*, 2013, Fig. 3 B) a PCR produkty v promotorové oblasti genu AR u linie DU145 (Fialova *et al.*, 2013, Fig. 3 C). Výsledky této PCR metylační analýzy naznačují přítomnost metylačních změn v genu AR a na jejich základě byla následně provedena bisulfitová sekvenační analýza. Výše uvedené výsledky jsou součástí Diplomové práce (Fialová, 2009) a publikovány (Fialova *et al.*, 2013).

Bisulfitová sekvenační analýza promotorového úseku genu AR u buněk linie DU145 ovlivněných po dobu 2 dnů 5  $\mu$ M Aza-dC, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB a 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB ukázala částečnou demetylaci v místě tzv. *hot spotu* (v pozicích -126 až -122) a k úplné demetylaci v pozicích -52 a +80 sledovaného promotorového úseku AR (Obr. 4 A a B). U buněk DU145 ovlivněných kombinací 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB byla detekována úplná demetylace CpG míst v pozicích -126, -124 a částečná demetylace v místě -122 (Obr. 4 B). Sekvenační analýza buněk PC3 ovlivněných Aza-dC a její kombinací s NaB ukázala demetylovanou, respektive nemetylovanou DNA na všech CpG pozicích v 5'-UTR oblasti genu AR (Obr. 4 C).



**Obrázek 4.** Metylační stav jednotlivých CpG míst v promotoru a 5'-UTR oblasti genu *AR* u ovlivněných buněk linií DU145 a PC3. **(A)** Metylační stav každého jednotlivého CpG dinukleotidu byl hodnocen na základě sekvenačního profilu porovnáním výšky píků cytosinu (C) vs tyminu (T), proto byla metylační úroveň hodnocena jako <50 %, 50:50 nebo >50 % metylované DNA. Promotorový úsek je označen jako čárkovaná linie, *hot spot* jako tlustá čára. Vazebné místo pro Sp1 je označeno šipkou. **(B)** Sekvence DNA získané z ovlivněných buněk linie DU145 s částečně nebo kompletně demetylovanými úseky CpG v promotorové oblasti genu, zahrnující pozice -132 CpG a *hot spot* v pozici -126, -124 a -122 (podtržené). **(C)** Sekvence DNA získané z buněk linie PC3 ukazuje nemetylovanou oblast 5'-UTR. Upraveno a doplněno, Fialova *et al.*, 2013.



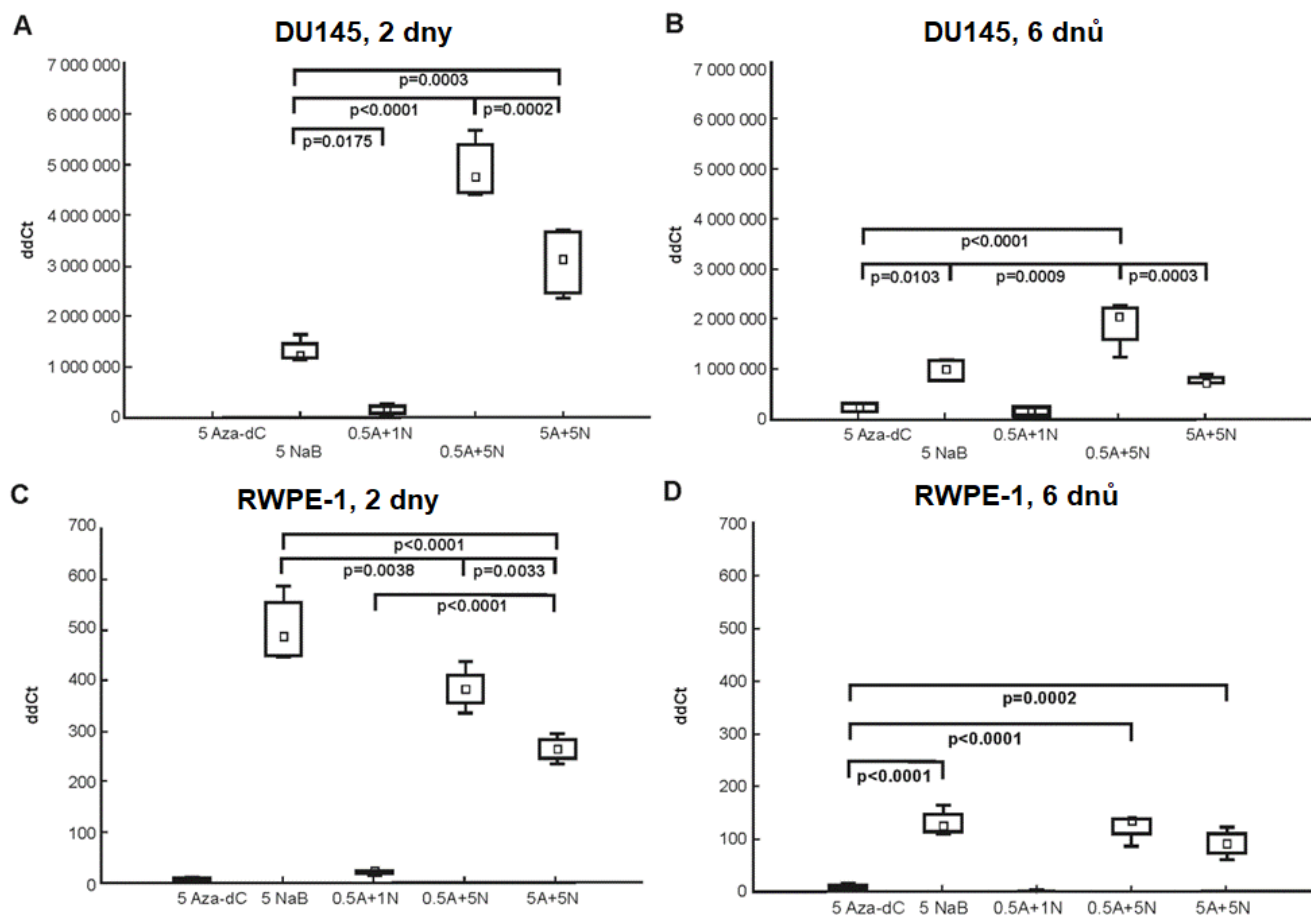
### 4.3 Expresní profil AR u buněk ovlivněných Aza-dC a NaB

Na základě výsledků MTT testů buněčné viability (Obr. 3) a výsledků bisulfitového sekvenování (Obr. 4) byla provedena analýza exprese genu androgenového receptoru s těmito ovlivněními: 5  $\mu$ M Aza-dC, 5  $\mu$ M NaB a kombinacemi 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB a 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB. U ovlivněných buněk linie DU145 po dobu 2 a 6 dnů bylo zjištěno signifikantní zvýšení ( $p = 0,0001$  pro oba časové intervaly) normalizované exprese AR (Obr. 5 A, B). U buněk ovlivněných 5  $\mu$ M Aza-dC po dobu 2 dnů nebyla detekována exprese AR (Ct hodnota byla nedetekovatelná) (Obr. 5 A), ale buňky ovlivněné po dobu 6 dnů vykazovaly nízkou normalizovanou expresi AR (Obr. 5 B).

U buněk nádorové linie DU145 způsobila kombinace 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB statisticky významné zvýšení normalizované hodnoty exprese genu AR po 2 a 6 dnech ovlivnění. Naproti tomu ovlivnění buněk 5  $\mu$ M Aza-dC nemělo u buněk DU145 vliv na obnovení exprese AR. Nicméně, po 6denním působení 5  $\mu$ M Aza-dC byla detekována nízká hodnota normalizované exprese androgenového receptoru (Obr. 5 A, B). Signifikantní zvýšení normalizované hodnoty exprese AR bylo detekováno také u buněk DU145 ovlivněných 5 mM NaB a kombinací 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB.

U buněk nenádorové linie RWPE-1 byla pozorována zvýšená exprese genu AR u všech použitých typů ovlivnění, přičemž nejvyšší hodnota normalizované exprese byla zjištěna po 2denním a 6denním ovlivnění buněk 5 mM NaB (Obr. 5 C, D). Nicméně, pouze 2denní experiment ukázal statisticky významné rozdíly mezi normalizovanými hodnotami exprese AR u buněk ovlivněných 5 mM NaB a kombinací 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB ( $p = 0,0038$ ) a mezi 5 mM NaB a kombinací 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB ( $p = 0,0001$ ).

Porovnáním normalizovaných hodnot exprese AR mezi 2 a 6 dny aplikace zvolených typů ovlivnění byla pozorován u obou buněčných linií (DU145 a RWPE-1) snížená hodnota normalizované exprese AR u buněk ovlivněných po dobu 6 dnů, porovnáním s hodnotami exprese AR u ovlivnění po dobu 2 dnů. U prostatických nádorových buněk DU145, 5 mM NaB a kombinace 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB měla minimální vliv na změnu normalizované hodnoty exprese AR. Kromě toho, u žádné z testovaných buněčných linií nebyla detekována exprese PSA (genu *KLK3*) po 2 a 6 dnech ovlivnění (Ct hodnoty byly nedetekovatelné). Test ANOVA ukázal statisticky významné rozdíly v expresi mezi buněčnými liniemi pro oba režimy ovlivnění (2 dny a 6 dnů;  $p < 0,0001$ , Obr. 5).



**Obrázek 5.** Expresí genu *AR* v prostatických buněčných liniích DU145 (A, B) a RWPE-1 (C, D). Pro zjištění relativní exprese *AR* byla použita metoda výpočtu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  normalizovaná ke GAPDH. Statistická významnost byla nastavena na  $p < 0.05$  (oboustranný test). Zkratky pro ovlivnění: 5 Aza-dC (5  $\mu\text{M}$  Aza-dC), 5 NaB (5 mM NaB), 0,5A+1N (0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 1 mM NaB), 0,5A+5N (0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB) 5A+5N (5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB). Upraveno, Fialova *et al.*, 2016.

#### 4.4 Ovlivnění NaB zvyšuje acetylaci histonu H4, ale ne histonu H3

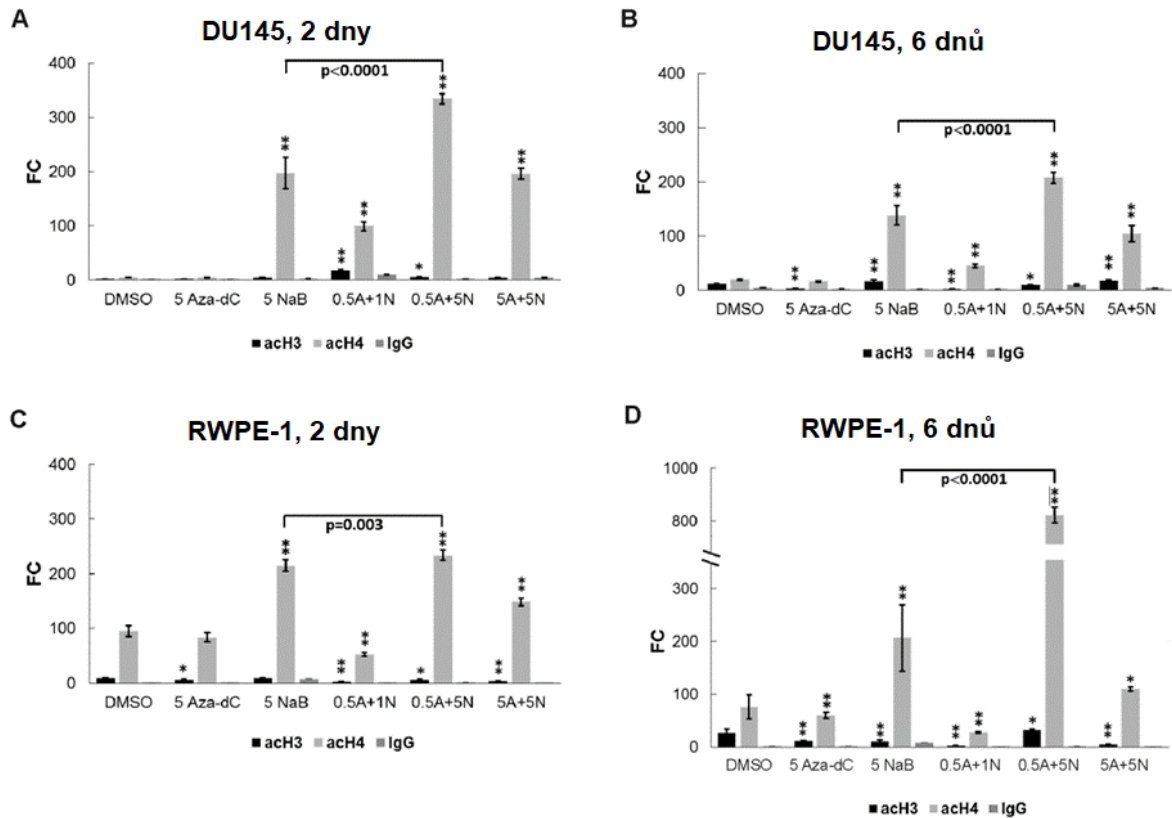
Deacetylační stav histonů souvisí s kondenzovaným stavem chromatinu a je obvykle spojován se sníženou transkripční aktivitou genů. Metoda chromatinové imunoprecipitace byla zvolena s cílem zjistit, zda-li NaB jako inhibitor histonových deacetyláz, nebo jeho kombinace s demetylačním agens, Aza-dC, mohou ovlivňovat expresi androgenového receptoru. Prostatické nádorové buňky DU145 a buňky nenádorové linie RWPE-1 byly po dobu 2 a 6 dnů ovlivňovány 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC, 5  $\mu\text{M}$  NaB a kombinacemi 0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 1 mM NaB, 0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB a 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB. Sonikované vzorky chromatinového lyzátu byly precipitovány s protilátkou proti acetylovanému histonu H3

a lyzinu 4, 9, 14, 18 (H3K4, H3K9, H3K14, H3K18) a protilátkou proti acetylovanému histonu H4 a lyzinu 5, 8, 12, 16 (H4K5, H4K8, H4K12, H4K16).

Navržené schéma ChIP experimentu ukázalo u normálních a nádorových buněk prostaty zvýšenou expresi androgenového receptoru, doprovázenou acetylovanými úseky histonu H4 po ovlivnění 5 mM NaB a jeho kombinacemi s 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M Aza-dC.

Porovnáním s daty z kontrolního ovlivnění (DMSO) vykazují vzorky precipitátů nádorových buněk DU145 po 2denním ovlivnění kombinacemi 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB a 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB zvýšenou acetylaci histonu H3 v oblasti promotorového úseku genu *AR* (Obr. 6 A), zatímco zvýšení acetylace histonu H4 bylo pozorováno u všech ovlivnění, kromě ovlivnění 5  $\mu$ M Aza-dC (Obr. 6 A). V pokračujícím 6denním experimentu byla acetylace histonu H3 zvýšena po ovlivnění buněk samotným 5 mM NaB a kombinací 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB při porovnání s kontrolními buňkami (Obr. 6 B). Kromě ovlivnění 5  $\mu$ M Aza-dC byl podobný trend zvýšených hodnot acetylace histonu H4 detekován i po 6 dnech u všech použitých ovlivnění (Obr. 6 B). Tyto výsledky dále naznačují, že sledovaný efekt NaB se u prostatických nádorových buněk DU145 v závislosti na čase snižuje (Obr. 6 A a B).

Po 2denním ovlivnění buněk linie RWPE-1 byla zjištěna významně snížená acetylace histonu H3 v oblasti promotoru genu *AR* u všech typů ovlivnění v porovnání s kontrolou (DMSO), kromě 5 mM NaB (Obr. 6 C). Signifikantní zvýšení acetylace histonu H4 bylo pozorováno u buněk ovlivněných 5 mM NaB, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB a 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB (Obr. 6 C). Snížená acetylace histonu H4 byla zjištěna po ovlivnění 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB a bez významné změny byla pozorovaná acetylace po ovlivnění 5  $\mu$ M Aza-dC (Obr. 6 C). Po 6 dnech ovlivnění byla u linie RWPE-1 zjištěna významně nižší normalizovaná hodnota promotorového úseku *AR* v komplexu s acetylovaným úsekem histonu H3 u všech typů ovlivnění, kromě kombinace 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB (Obr. 6 D). Tato kombinace naopak způsobila zvýšení normalizované hodnoty promotorového úseku *AR* v precipitátu s acetylovanými úseky histonu H3. Podobný trend zvýšených hodnot acetylace histonu H4 (pozorovaný po 2denní aplikaci) byl detekován také po 6 dnech ovlivnění s 5 mM NaB, 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB a 5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB. Snížená acetylace histonu H4 byla zjištěna po ovlivnění 5  $\mu$ M Aza-dC a 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB (Obr. 6 D).



**Obrázek 6. ChIP - qPCR.** Neovlivněné kontrolní buňky (DMSO) a buňky ovlivněné  $\mu\text{M}$  Aza-dC (5 Aza-dC), 5 mM NaB (5 NaB) a jejich kombinacemi 0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 1 mM NaB (0,5A+1N), 0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB (0,5A+5N) a 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB (5A+5N) po dobu 2 dnů (A a B) a 6 dnů (C a D) byly precipitovány s protilátkami acetyl histon H3 (acH3), acetyl histon H4 (acH4) a IgG. Pro každé ovlivnění byly zpracovány inputy, se kterými byla provedena qPCR a výsledné hodnoty použity pro výpočet (násobek oproti inputu, *fold change*, FC). qPCR byla provedena s *wt* primery specifickými pro oblast promotoru *AR* (o velikosti 93 bp DNA). Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíly mezi ovlivněními v porovnání s kontrolou (DMSO). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ . Upraveno, Fialová *et al.*, 2016.

#### 4.5 Analýza buněčného cyklu a pro-apoptotický účinek NaB

Analýza buněčného cyklu byla provedena s cílem porovnat fáze buněčného cyklu v normálních a nádorových buňkách prostaty po jejich ovlivnění Aza-dC, NaB a jejich kombinacemi v experimentálním schématu zvoleném pro RT-PCR a ChIP. Pro stanovení vlivu Aza-dC a NaB na buněčný cyklus ovlivněných buněk byly exponenciálně rostoucí buňky RWPE-1 a DU145 obarveny propidium jodidem a obsah DNA byl hodnocen průtokovou cytometrií (Obr. 7).

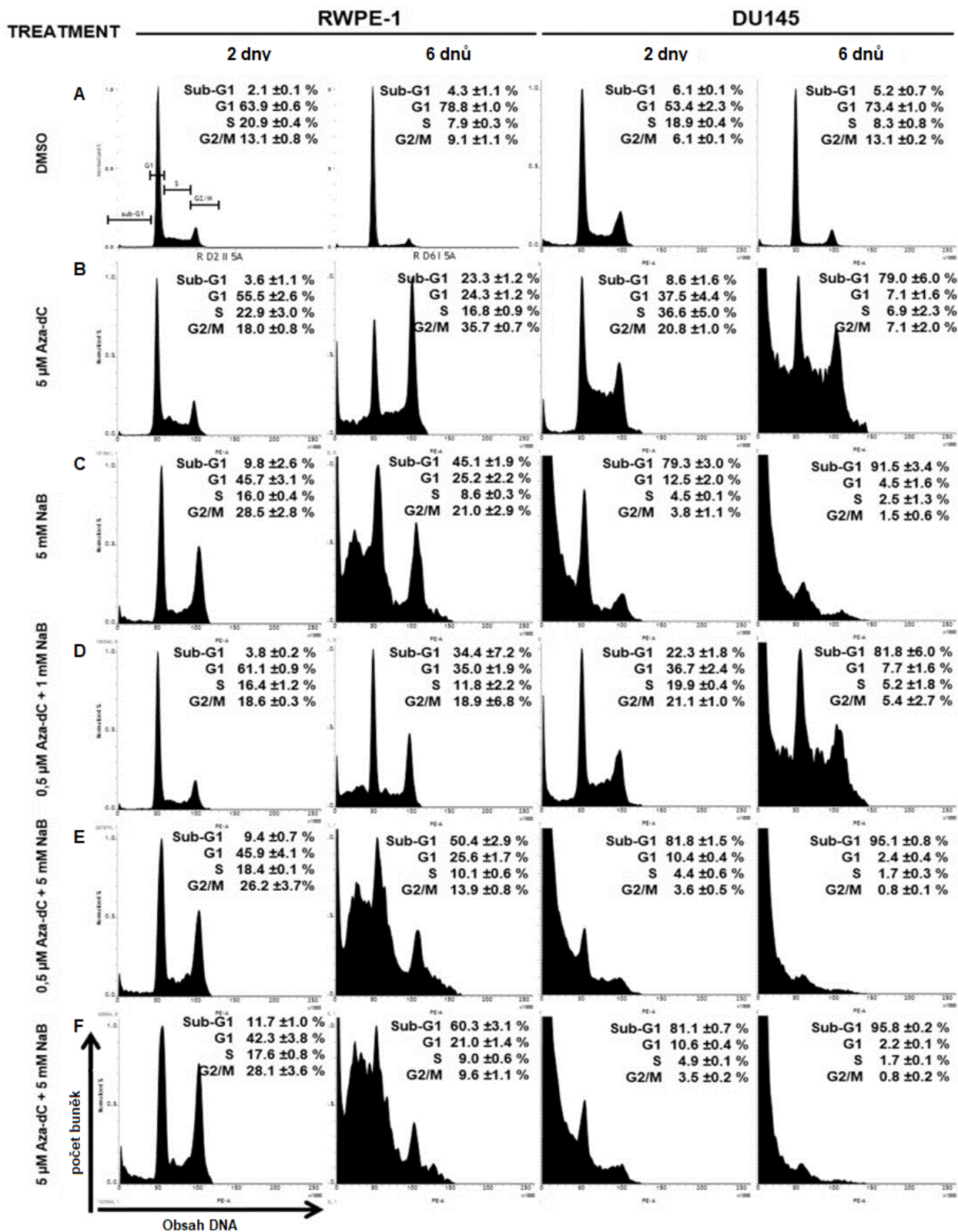
Porovnáním distribuce fází buněčného cyklu u nenádorových buněk RWPE-1 a nádorových buněk DU145 po 2denním ovlivnění 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC byla akumulace buněk v G2/M fázi u linie RWPE-1 (18,0 %) srovnatelná s kontrolními buňkami s DMSO (13,1 %),

zatímco u linie DU145 byla v G2/M fázi zvýšená (20,8 %) oproti kontrolním buňkám s DMSO (6,1 %, Obr. 7 A a B). Následné 6denní ovlivnění 5  $\mu$ M Aza-dC ukázalo významnější rozdíly v účinnosti zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a v úbytku životaschopných buněk v sub-G1 fázi mezi porovnávanými buněčnými liniemi. Zatímco u buněk RWPE-1 byla pozorována významná a specifická akumulace v G2/M (35,7 %) a mírný úbytek životaschopných buněk v sub-G1 (23,3 %), u ovlivněných buněk DU145 byla populace v G2/M tvořena 7,1 % buněk a byl sledován významný úbytek životaschopných buněk v sub-G1 populaci (79,0 %, Obr. 7 A a B).

Ovlivnění 5 mM NaB způsobilo výraznější rozdíly v procentech mrtvých buněk mezi RWPE-1 a DU145. Buňky linie RWPE-1 tvořily po 2denním ovlivnění 28,5 % buněk v populaci G2/M a 9,8 % mrtvých buněk v sub-G1 fázi, u DU145 bylo posunuto do G2/M fáze 3,8 % buněk a do sub-G1 fáze 79,3 % buněk, indikující pro-apoptotický účinek NaB (Obr. 7 C). Po 6denním ovlivnění 5 mM NaB bylo zastoupeno 21,0 % buněk RWPE-1 v G2/M fázi a 45,1 % v sub-G1 fázi buněčného cyklu, zatímco buněk DU145 bylo v G2/M fázi 1,5 % a v sub-G1 fázi 91,5 % mrtvých buněk (Obr. 7 C).

Porovnáním distribuce fází buněčného cyklu u buněk RWPE-1 a DU145 po 2denním ovlivnění kombinací 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB se ukázala srovnatelná akumulace buněk v G2/M fázi (18,6 % u RWPE-1 a 21,1 % u DU145) a zvýšená akumulace v sub-G1 fázi u linie DU145 (22,3 %) oproti buňkám RWPE-1 (3,8 %, Obr. 7 D). Následné 6denní ovlivnění 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 1 mM NaB ukázalo výrazné rozdíly v distribuci buněk mezi porovnávanými liniemi RWPE-1 a DU145. Zatímco u RWPE-1 bylo pozorováno 34,4 % mrtvých buněk v sub-G1 fázi a 18,9 % v G2/M fázi, u buněk DU145 tvořilo populaci mrtvých buněk 81,1 % v sub-G1 fázi a 5,4 % buněk bylo posunuto do G2/M fáze (Obr. 7 D).

Podobný trend, kdy je detekován vysoký podíl pro-apoptotických buněk DU145 v sub-G1 fázi, byl zjištěn u kombinací 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM (81,8 % po 2 dnech, 95,1 % po 6 dnech, Obr. 7 E) a 5  $\mu$ M AzadC + 5 mM (81,1 % po 2 dnech, 95,8 % po 6 dnech, Obr. 7 F). Naproti tomu u buněk nenádorové linie RWPE-1 nebyl podobný efekt použitých kombinací detekován.



**Obrázek 7.** Účinky Aza-dC, NaB a jejich kombinace na distribuci buněčného cyklu v prostatických nádorových buňkách linie DU145 a normální RWPE-1. Histogram zobrazuje výsledky analýzy průtokové cytometrie obsahu DNA v různých fázích buněčného cyklu. Čísla uvádí procento buněk ve fázi G0/G1 a G2/M a každá hodnota je průměrem tří nezávislých měření. Upraveno, Fialová *et al.*, 2016.

## 5 DISKUZE

Prostatické nádorové buněčné linie nezávislé na AR jsou spojené s hypermetylací a ztrátou exprese genu *AR* (Jarrard *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000; McCabe *et al.*, 2006). Epigeneticky indukovaná obnovená exprese *AR* by mohla v určité míře snížit agresivitu nádorových buněk a prodloužit přežití pacientů s mCRPC (McCabe *et al.*, 2006, Zorn *et al.*, 2007, Gravina *et al.*, 2010, Zhao *et al.* 2020).

### 5.1 Metylace, demethylace a exprese genu *AR*

V této práci jsme se zabývali možnostmi epigenetického ovlivnění exprese genu *AR* u buněk prostatických nádorových linií DU145 a PC-3, které jsou bez exprese androgenového receptoru a mohou tak sloužit jako model kastračně rezistentního stádia karcinomu prostaty (CRPC). Pro ovlivnění buněk byly použity dva typy činidel - inhibitor DNA metyltransferáz (Aza-dC) jako demetylační činidlo a inhibitor histonových deacetyláz (NaB) jako acetylační činidlo, u kterých jsme analyzovali epigenetický potenciál jejich aplikace.

Normální prostatické epitelové buňky nevykazují metylační změny v promotoru genu *AR*, naproti tomu u buněk prostatických nádorových linií necitlivých na androgeny byly popsány hypermetylace v oblasti počátku transkripce (TSS) promotoru genu *AR* (Jarrard *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000; McCabe *et al.*, 2006). Hypermetylace genu *AR* byla detekována u 20 % pacientů s primárním karcinomem prostaty a u 28 % pacientů ve stádiu CRPC (Nakayama *et al.*, 2000). Korelace mezi metylačními změnami v blízkosti TSS a expresí androgenového receptoru je popisována v recentních studiích (Zhao *et al.*, 2020, Ylitalo *et al.*, 2021). V naší studii způsobilo ovlivnění prostatických nádorových buněk bez exprese *AR* demetylačním činidlem Aza-dC a jeho kombinací s NaB demetylaci CpG míst v promotoru genu *AR* v pozicích od -126 do -122, které jsou důležité pro zahájení transkripce a jsou označovány jako tzv. *hot spot* (Mizokami *et Cheng*, 1994). Na rozdíl od Aza-dC byl vyšší demetylační účinek detekován po aplikaci kombinace Aza-dC a NaB (0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB) indikující synergický epigenetický efekt zvolených činidel. Tato zjištění jsou v souladu se studií Nakayama *et al.*, (2000), kdy aplikace 2  $\mu$ M Aza-dC měla nižší demetylační účinek než aplikace Trichostatinu A (HDACi) nebo jejich kombinací. Synergický efekt HDACi a DNMTi dokládá také Walton *et al.* (2008), kteří kombinací Aza-dC a Trichostatinu A dosáhli u testovaných nádorových prostatických linií re-exprese genu *ESR2*.

Sekvenční metylační analýza nebyla provedena u neovlivněných buněk linie DU145, proto můžeme pouze předpokládat účinný demetylační efekt použité kombinace Aza-dC a NaB.

V naší studii nebyla metylace zjištěna u dvou nukleotidů CpG v pozicích -52 a +80, u kterých byla v práci Nakayama *et al.* (2000) popsána metylace z 60 % (CpG v pozici -52) a 80 % (CpG v pozici +80). V promotoru genu *AR* v pozici -43 se nachází vazebné místo pro transkripční faktor Sp1 (Mancini *et al.*, 1999). Přesto, že u ovlivněných buněk DU145 byla CpG pozice -52 nemetylována (s předpokladem demetylačního účinku použitých činidel), metylační status v pozici -43 zůstal nezměněn. Jak uvádí Archer *et al.* (2011), Sp1 transkripční faktor patří do skupiny jaderných faktorů, které jsou necitlivé na metylační změny a zřejmě tak nemá vliv na transkripci genu *AR*. Jako regulační mechanismy exprese androgenového receptoru byly popsány také somatické mutace DNA (Zhao *et al.*, 2020), modulace na úrovni jednotlivých histonů, místně specifické uspořádání koregulatorů a korepresorů a kondenzace chromatinu (Conteduca *et al.*, 2021, Kukkonen *et al.*, 2021).

U všech sekvencí DNA buněk DU145 zůstaly přibližně dvě třetiny CpG dinukleotidů bez demetylačních změn. Příčinou může být i účinnost bisulfitové modifikace izolované DNA. Porovnáním účinnosti všech v té době dostupných kitů se zabývala studie Holmes *et al.* (2014). Účinnost kitu EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) použitého v této práci byla sice velmi vysoká, ale nižší (98,7 %) než u ostatních kitů ( $\geq 99\%$ ), což je stále hodnoceno jako dostatečně vysoká konverze pro všechny biologické a klinické aplikace (Holmes *et al.*, 2014). Holmes *et al.* ve své práci také testovali účinnosti nesprávné konverze, tj. konverze metylovaných cytosinů na tyminy, která byla v případě kitu používaného v této studii 1,4 % detekovaných inkorporovaných tyminů (ostatní kity byly v rozmezí od 0,9 % do 2,5 %). Vzorky DNA po modifikaci bisulfitem sodným vykazují fragmentaci způsobenou depurinací a depyrimidinací, jež vedou k abazickým místům a následným zlomům ve vláknech DNA (Raizis *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2007). Podle výsledků testů však nedochází k významné inhibici reakce PCR u žádného z testovaných kitů (Holmes *et al.*, 2014). Vzhledem k procentu chyb a počtu námi detekovaných demetylovaných oblastí se jeví málo pravděpodobné, že by nízkou úroveň demetylace způsobila chybná metodika. Specificky demetylovaná místa v promotoru genu *AR* detekovaná shodně u všech tří analyzovaných sekvencí navíc nasvědčují tomu, že nejde o náhodnou demetylaci.

Demetylační účinek použitých činidel Aza-dC a jeho kombinací s NaB nevedl ke kompletní demetylaci analyzovaných úseků promotoru androgenového receptoru u nádorových prostatických buněk linie DU145. Jak uvádí Mishra *et al.* (2010), většina CpG



dinukleotidů může zůstat metylovaná, třebaže účinnost demetylace způsobená Aza-dC je velmi vysoká. V některých případech byla dokonce pozorována re-metylace DNA po vysazení látek s demetylačním účinkem (Mishra *et al.* 2010). Kromě toho, některé úseky DNA mohou mít sníženou schopnost bisulfitové konverze, přičemž distribuce nemodifikovaných oblastí nemusí být náhodná (Warnecke *et al.*, 2002). Například cytosiny ležící v blízkosti dinukleotidů CpG jsou obvykle nedostatečně modifikovány bisulfitovou konverzí. Příčinou bývá tvorba teplotně stabilnějších sekundárních struktur kolem dinukleotidů CpG s vytvořením lokalizované oblasti bránící přístupu bisulfitu sodného (Harrison *et al.*, 1998; Warnecke *et al.*, 2002). Sekundární strukturu popisují ve své práci Mizokami *et Chang* (1994). Sekvence DNA od pozice +20 do pozice +148 zahrnuje v sekundární struktuře 5'-UTR oblasti genu *AR* vlásenku v oblasti od +109 do +129 (Mizokami *et Chang*, 1994). V souladu s touto studií jsme v tomto úseku DNA detekovali metylované nukleotidy CpG v pozici +20 až +99 (kromě pozice +80). Je tedy možné, že přítomnost vlásenky může být příčinou zhoršené bisulfitové konverze v důsledku její inhibice.

Buňky prostatické nádorové linie PC3 vykazují nízkou, ale detekovatelnou hladinu exprese androgenového receptoru (Jarrard *et al.*, 1998, Nakayama *et al.*, 2000), přičemž předpokládaná zvýšená úroveň metylace ve sledovaných úsecích promotoru ani 1. exonu genu *AR* nebyla potvrzena (Jarrard *et al.*, 1998). V naší studii jsme u buněk linie PC3 zjistili kompletně nemetylovaný úsek sekvence v 5'-UTR oblasti. Naproti tomu v jiných studiích byla detekována sice nízká, ale lokálně specifická metylace v promotoru a 5'-UTR oblasti genu *AR* (Nakayama *et al.*, 2000, Kinoshita *et al.*, 2000). Buňky linie PC3 nevykazovaly změny v expresi genu *AR* po jejich ovlivnění Aza-dC nebo v kombinaci s Trichostatinem A (Nakayama *et al.*, 2000). Podle jiných prací buňky linie PC3 neexprimují funkční AR (Wu *et al.*, 1994; Tilley *et al.*, 1995), navzdory nejednoznačně detekovaným metylacím v genu *AR* (Jarrard *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2000, Kinoshita *et al.*, 2000). Významnější roli v regulaci exprese mohou hrát změny v signální dráze AR zahrnující jeho amplifikace, mutační změny, posttranslační modifikace ovlivňující funkci regulační proteinů – koaktivátorů a korepresorů, nebo zesílená regulace drah vedoucí k aktivaci AR v nepřítomnosti androgenů (Scher *et Sawyers*, 2005; Gao *et Alumkal*, 2010). K tomuto vysvětlení by mohla přispět i teorie ne-CpG metylace, která je považována za další kritický faktor v kontrole genové exprese (Ramasamy *et al.*, 2021). Ne-CpG metylace je spojována se změnami v genech zapojených jak do nádorové suprese, tak onkogeneze (shrnutí v Ramasamy *et al.*, 2021). Ne-CpG metylace a její spojitost s nádorovou progresí byly popsány v souvislosti s hypermetylací ne-CpG míst v promotoru genu *AR*

prostatických nádorových buněčných linií (Kinoshita *et al.*, 2000). Výskyt ne-CpG metylace ve studovaných CGI u buněk karcinomu prostaty popsal např. i Truong *et al.* (2013), kteří detekovali hypermetylace v ne-CpG oblastech u dvou lokusů, EVX1 a FILIP1L. Hypermetylace v ne-CpG místech tak může přispívat k selektivním mutacím genu androgenového receptoru (Ramasamy *et al.*, 2021).

### 5.1.1 Expresse a re-expresse AR u prostatických nádorových buněk

Metylace ostrůvků CpG v promotorové oblasti genů ovlivňuje transkripci a je základním mechanismem regulace genové exprese. V naší studii jsme zjistili, že buňky prostatické nádorové linie DU145 vykazují metylační změny v analyzovaném úseku promotoru genu AR, které mohou být příčinou nízké nebo obtížně detekovatelné úrovně exprese androgenového receptoru. Protože jsme u kontrolních neovlivněných buněk DU145 kultivovaných po dobu 2 a 6 dní nebyli schopni stanovit expresní profil AR, pro výpočet normalizovaných hodnot exprese genu AR byla Ct hodnota stanovena arbitrárně jako Ct 50 pro oba časové intervaly. Reálné hodnoty námi zjištěné re-expresse genu AR tak mohou být ještě vyšší než ty, které jsme vypočítali pro buňky kontrolní. Jarrard *et al.* (1998) uvádějí, že ovlivnění Aza-dC indukovalo obnovení exprese genu AR u některých metastatických prostatických nádorových linií, přičemž došlo i k expresi androgen responsivních genů, nicméně exprese genu AR u buněk linie DU145 nebyla detekována ani po dvouměsíčním demetylačním ovlivnění (Jarrard *et al.* 1998). Příčinou mohly být nízké koncentrace Aza-dC - 0,15  $\mu\text{M}$  a 0,3  $\mu\text{M}$ , které mohly vést k demetylačním změnám, ale nikoliv k obnovení exprese AR (Jarrard *et al.* 1998).

Ve studii Nakayama *et al.* (2000) byly buňky linie DU145 ovlivněny Aza-dC nebo v kombinaci s Trichostatinem A, přičemž kombinace demetylačního činidla a inhibitoru HDAC byly účinnější pro re-expresi AR než aplikace jednotlivých činidel samostatně. Podobný efekt re-expresse AR jsme zjistili v naší studii po aplikaci kombinace 0,5  $\mu\text{M}$  Aza-dC + 5 mM NaB, porovnáním s normálními prostatickými buňkami linie RWPE-1. Normální prostatické buňky ovlivněné touto kombinací vykazovaly zvýšenou expresi AR, ale úroveň normalizované exprese AR byla řádově mnohonásobně nižší oproti hodnotám u ovlivněných nádorových buněk DU145 (Obr. 5).

Porovnáním expresního profilu AR u buněk ovlivněných Aza-dC nebo NaB se 5 mM NaB, jako inhibitor HDAC, jeví účinnější v procesu re-expresse AR. Je tak pravděpodobné, že námi detekované metylační změny v oblasti promotoru genu AR u prostatických nádorových buněk bez exprese AR mají pouze částečnou a spíše minoritní roli. Nicméně, na rozdíl od

aplikace 5 mM NaB, kombinace 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB vykazuje významnější epigenetický efekt zvolených činidel pro re-expresi AR.

Hypotéza, že epigeneticky indukovaná exprese AR u CRPC s metylovaným genem AR může zvrátit některé signální dráhy doprovázející nádorovou proliferaci a snížit agresivitu nádorových buněk, byla podpořena několika studii (McCabe *et al.*, 2006, Zorn *et al.*, 2007, Gravina *et al.*, 2010). Zorn *et al.* (2007) pozorovali zpoždění nástupu na androgenech nezávislého stádia u kastrovaných TRAMP myších modelů po podání Aza-dC. Kombinovaný léčebný přístup (kastrace a aplikace Aza-dC) vedl ke statisticky významně delší době přežívání pacientů, než zvolení jen jednoho z těchto přístupů. V preklinické studii Gravina *et al.* (2010) byl použit Aza-dC pro obnovení exprese genu AR umlčeného metylací DNA u buněk linie PC3. Důsledkem byla zvýšená citlivost na bicalutamid doprovázená apoptózou nádorových buněk. Ve studii Tian *et al.*, (2012) bylo v experimentech *in vitro* a *in vivo* zjištěno, že re-exprese AR spojovaná s metylačním zvratem vedla k potlačení sebeobnovovacích schopností prostatických nádorových kmenových buněk a k navození jejich diferenciaci. Z výsledků práce Tian *et al.* (2012) vyplývá, že využití Aza-dC v terapii PC má své opodstatnění z několika důvodů; a) obnovení exprese AR účinně potlačuje sebeobnovovací schopnosti nádorových kmenových buněk PC (bez vlivu na proliferaci zprostředkovanou AR v prostatických nádorových ne-kmenových buňkách) a umožňuje buněčně specifickou cílenou terapii; b) méně vedlejších účinků v porovnání s cytotoxicitou jiných postupů cílících na kmenové buňky (např. pomocí imunoterapie) (Deonarain *et al.*, 2009); c) kombinace aplikace Aza-dC s klasickou ADT (Dubrovská *et al.*, 2010) může současně potlačovat kmenové a ne-kmenové buňky a ovlivňovat nástup stádií před a po kastrační rezistenci (Tian *et al.*, 2012).

Je všeobecně známo, že nukleosidové analogy 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza-dC) a 5-azacytidin (Aza) jsou inkorporovány do DNA během replikace a inhibují DNA metyltransferázovou aktivitu enzymů tvorbou aduktů. Metylace cytosinů v promotorech genů a v jejich blízkosti může mít za následek snížení nebo umlčení genové exprese. Metylace DNA mění strukturu chromatinu, definuje úseky pro regulaci transkripce (Cameron *et al.*, 1999) a spolu s hypoacetylací histonů jsou proto považovány za vzájemně interagující mechanismy, které ovlivňují genovou expresi (Cameron *et al.*, 1999; Dobosy *et al.*, 2001; Ahmed, 2010).

## 5.2 Acetylace histonů H3 a H4 a exprese androgenového receptoru

Přítomnost acetylovaných histonů v blízkosti promotorů je známkou transkripčně aktivních genů. Aplikované schéma CHIP experimentů v této studii ukázalo, že u normálních a nádorových buněk prostaty je exprese androgenového receptoru doprovázena přítomností acetylovaných úseků histonu H4 po ovlivnění 5 mM NaB a také jeho kombinacemi s 0,5  $\mu$ M Aza-dC nebo 5  $\mu$ M Aza-dC. Detekovaná exprese androgenového receptoru u nádorových buněk prostaty byla tak zřejmě ovlivněna zvýšenou acetylací lyzinových zbytků histonu H4.

Podle Urbanucci *et al.* (2012) se naopak histon H3 v prostatických buňkách s nadměrnou expresí androgenového receptoru jeví jako více acetylovaný. Acetylace histonu H3 a histonu H4 byly signifikantně sniženy u vzorků mCRPC v porovnání se vzorky tkání s BPH a zdravé tkáně prostaty, dosahující téměř 90% specificity a 80% senzitivity pro acetylované úseky histonu H3 (Ellinger *et al.*, 2010). Zvýšená úroveň acetylace H3K18 byla zjištěna u primárních PC a metastáz v porovnání s BPH a přítomnost acetylovaného H3K18 byla prokázána u pacientů s vyšším rizikem lokálně pokročilého karcinomu prostaty (Damodaran *et al.*, 2017). Zvýšenou acetylaci H3K18 během prostatické nádorové progresy uvádí také Hałasa *et al.* (2019). Ve studii Jia *et al.* (2006) bylo popsáno, že zvýšená acetylace histonů H3K9 a H3K14 je spojena s vývojem směrem k androgenové nezávislosti *in vivo* (Jia *et al.*, 2006). I když je známo, že promotory genů se signifikantně acetylovaným H3K9 mohou mít vysokou hladinu exprese, acetylace H3K9 není nezbytná pro transkripční aktivitu (Nishida *et al.*, 2006). A podle našich nepublikovaných výsledků western blot analýzy vedlo ovlivnění 0,5 Aza-dC + 5 mM NaB u buněk linie DU145 (po 2denní aplikaci) k deacetylaci na histonech H3K4 a H3K9, zatímco v CHIP analýze tato kombinace zvýšila celkovou acetylaci H3 v promotoru genu *AR*.

Ovlivnění 5 mM NaB a jeho kombinace s Aza-dC měly stejný efekt na obě buněčné linie a vedly ke zvýšené acetylaci histonu H4. Naproti tomu, 5  $\mu$ M Aza-dC nemělo žádný vliv na změny v acetylaci histonu H4, ale 6denní ovlivnění normálních prostatických buněk způsobilo deacetylaci histonu H4, což naznačuje spíše na antagonistický účinek Aza-dC na remodelaci chromatinu. Nízká mikromolární koncentrace Aza-dC (0,5  $\mu$ M) v kombinaci s NaB může mít aditivní nebo synergický účinek na acetylaci histonů H4, zatímco vyšší koncentrace 5  $\mu$ M Aza-dC v kombinaci s NaB má antagonistický efekt.

V několika studiích bylo popsáno, že re-exprese genu *AR* použitím epigenetické terapie vede ke snížené proliferaci buněk a delšímu přežívání pacientů s PC (McCabe *et al.*, 2006, Zorn *et al.*, 2007, Gravina *et al.*, 2010). V některých případech se ukázalo, že funkční signální dráha AR nezhoršuje vývoj nemoci. Může působit jako fyziologický regulátor na expresi na

androgenech závislých genů a zvyšovat citlivost nádorových buněk pro další fáze terapie. V naší studii jsme u nádorových prostatických buněk bez exprese AR dosáhli jeho obnovené exprese doprovázené signifikantní re-acetylací histonu H4 v úseku promotoru *AR*. U těchto buněk ovlivněných kombinacemi 5 mM NaB a Aza-dC je pravděpodobné, že obnovená exprese *AR* není spojena s regulační funkcí AR, jelikož hladina PSA nebyla detekovaná.

### **5.3 Životaschopnost a buněčný cyklus normálních a nádorových buněk prostaty po ovlivnění Aza-dC a NaB**

Butyrát sodný inhibuje viabilitu a proliferaci prostatických nádorových buněk DU145 a některých dalších prostatických nádorových linií v závislosti na čase a dávce (Kim *et al.*, 2007, Pajak *et al.*, 2007, Qiu *et al.*, 2011, Mu *et al.*, 2013). V naší studii způsobilo ovlivnění 5 mM NaB u buněk nádorové linie DU145 a jeho kombinací s Aza-dC nástup apoptózy na rozdíl od ovlivněných buněk normální prostatické linie RWPE-1. Navození proapoptotické aktivity je možné také dosáhnout vysokými koncentracemi Aza-dC (až ~5  $\mu$ M) (Patra *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2021). U námi ovlivněných buněk DU145 vedla aplikace Aza-dC k navození buněčné smrti s 79% zastoupením buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu, přičemž kombinované ovlivnění s NaB nemělo vliv na změny v zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (Obr. 7). Ovlivnění buněk buď samotným Aza-dC nebo NaB sice způsobilo významný nárůst buněk v sub-G1 fázi, nicméně jejich kombinace nemusí mít kumulativní dopad na iniciaci apoptózy u nádorových buněk prostaty. Vysoké zastoupení buněk v sub-G1 fázi může být také důsledkem fragmentace DNA mrtvých buněk, stejně tak může být důsledkem potenciální proapoptotické aktivity NaB (Qiu *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2013) i Aza-dC (Cheng *et al.*, 2021).

Značný rozdíl v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu mezi normálními a nádorovými prostatickými buňkami by mohl být způsoben genetickými rozdílnostmi obou linií. Normální prostatické buňky linie RWPE-1 exprimují gen *TP53*, zatímco nádorové buňky linie DU145 obsahují mutovaný gen *TP53*. Ovlivnění normálních prostatických buněk námi zvolenými činidly může vést k p53-dependentní aktivaci a zástavě buněčného cyklu ve fázi G2/M a lepšímu přežívání buněk RWPE-1 oproti DU145 (Obr. 7). V podobné studii Cheng *et al.* (2021) sledovali vliv Aza-dC na prostatické buňky linií RWPE-1 a DU145 po 4denním ovlivnění 2  $\mu$ M Aza-dC a zjistili, že do antiproliferativních a cytotoxických účinků Aza-dC jsou zřejmě zapojeny mechanismy zahrnující indukci zastavení buněčného cyklu, indukci apoptózy a poškození DNA. U buněk DU145

ovlivněných 2  $\mu\text{M}$  Aza-dC dochází k rychlejšímu nástupu apoptózy, než u buněk linie RWPE-1 (Cheng *et al.*, 2021). Předpokládané antiproliferativní účinky Aza-dC mohou být u nádorových buněk DU145 příčinou zastavení buněčného cyklu v jeho S fázi. Je zřejmé, že životaschopnost prostatických nádorových buněk nesouvisí s úrovní jejich demetylace nebo obnovenou expresí genu *AR*. Podle Cheng *et al.* (2021) indukuje demetylační účinek Aza-dC zvýšenou expresi p21 u buněk s *wt* p53, ale ne u buněk linie DU145, která má mutantní p53 (Chappell *et al.*, 2018). Protože buňky RWPE-1 nemají metylovaný promotor genu *CDKN1A*, zvýšená exprese p21 je tak pravděpodobně důsledkem poškození DNA vlivem Aza-dC a následnou aktivací p53/p21. Aza-dC ovlivňuje proces buněčného cyklu u nádorových buněk odlišně od normálních buněk a svou roli mohou hrát genetické varianty prostatických nádorových buněk a tkání (Cheng *et al.*, 2021).

Ovlivnění Aza-dC nebo NaB a jejich kombinacemi způsobilo významný cytotoxický účinek u všech námi testovaných buněčných linií. U buněk DU145 byl po 6denní aplikaci 5 mM NaB zjištěn minimální procentický podíl životaschopných buněk odpovídající výrazné toxicitě této koncentrace NaB. Kombinace Aza-dC a NaB však může snížit nestabilitu butyrátu sodného (Emanuele *et al.*, 2008) a efektivněji ovlivnit studovaný epigenetický účinek na re-expresi *AR* z důvodu jejich synergického účinku. Kromě toho, Marks *et Xu* (2009) odůvodňují kombinování inhibitorů DNMT a HDAC skutečností, že hypermetylované oblasti vedou ke kompaktnějším nukleozomům, které jsou pak schopné odolávat jejich re-acetylaci. A právě kombinace DNMT a HDAC mohou lépe tuto odolnost překonávat (Marks *et Xu*, 2009). Butyrát sodný vykazuje inhibiční účinky na histonové deacetylázy, ale kvůli potřebě milimolárních koncentrací pro dosažení požadované účinnosti a nízké specifitě pro vyvolání genové exprese, je jeho aplikace diskutabilní (Zhu *et Otterson*, 2003, Marks *et Xu*, 2009).

Na rozdíl od 5 mM NaB, 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC nevykazovala u buněk DU145 cytotoxický účinek. Pozorovali jsme pokles buněčné viability v závislosti na použité dávce, výrazněji u buněk linie DU145 při porovnání s normálními prostatickými buňkami linie RWPE-1. Jednou z příčin zjištěné 40 - 50% viability buněk po 6denní aplikaci 5  $\mu\text{M}$  Aza-dC, na rozdíl od 5 mM NaB (Obr. 3), by mohlo být i obnovení exprese pro-apoptotických genů a genů ovlivňujících proliferaci buněk (VanOosten *et al.*, 2007, Walton *et al.*, 2008, Gravina *et al.*, 2010, Qiu *et al.*, 2011). Další faktor, který způsobuje nescifickou cytotoxicitu u normálních i nádorových prostatických buněk, je inkorporace samotného Aza-dC vedoucí ke dvouvláknovým zlomům DNA (Jüttermann *et Jaenisch*, 1994; Pali *et al.*, 2008). Pro dosažení požadovaného demetylačního účinku Aza-dC je potřeba replikující se buňka. Jedině tak je nukleosidový analog schopný inkorporovat se do nově vznikajícího vlákna místo

cytosinového rezidua a kovalentní vazbou následně vázat DNA metyltransferázy. Aza-dC tak soutěží o navázání do replikujícího se řetězce DNA s cytosinovou bází. Co rozhoduje o preferenční inkorporaci Aza-dC do replikujícího se řetězce DNA a proč zůstává značné procento dinukleotidů CpG metylovaných (resp. odolává demetylacii), je předmětem dalších studií.

Deaminace Aza-dC působením jaterní cytidin deaminázy snižuje hladinu Aza-dC v plazmě a vede k jeho nízké biologické dostupnosti, na což bylo často poukazováno jako na jeden z nedostatků aplikace Aza-dC (Momparler, 2005). Účinky Aza-dC mohou být různé v závislosti na použité koncentraci (Nakayama *et al.*, 2000, Gravina *et al.*, 2010, Tian *et al.*, 2012, Chappell *et al.*, 2018, Cheng *et al.*, 2021). Při nízkých dávkách dochází k obnovování exprese metylovaných genů, pravděpodobně spojených se sníženou proliferací buněk, jejich diferenciací, apoptózou a senescencí, zatímco odpovědi na poškozenou DNA, které spouštějí apoptotickou dráhu, jsou převážně důsledkem vysokých dávek Aza-dC (Ferguson *et al.*, 1997, Patra *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2021). Aza-dC se vyznačuje rychlým poločasem rozpadu ve vodných roztocích v délce cca 15 - 25 min (Momparler, 2005, Rudek *et al.*, 2005) a u pacientů léčených Aza-dC (Decitabin) vysokým výskytem neutropenie. Popsané nežádoucí vlastnosti Aza-dC by mohla odstranit metoda DDS (*drug delivery system*), umožňující cíleně a bezpečně s ohledem na okolní zdravé buňky doručit účinnou léčivou látku do nádorové tkáně nebo buňky (Naldi *et al.*, 2014). Příkladem může být EMHV, což je DDS cílený na erytrocyty nesoucí superparamagnetické nanočástice a fúzní glykoprotein hemaglutinin, který je vložený do cytoplazmatické membrány erytrocytu (Cinti *et al.*, 2011). Erytrocyty jsou bezpečné a biokompatibilní přenašeči hlavně pro látky, které mají nízkou tkáňovou penetraci nebo jsou rychle inaktivovány (Roberti *et al.*, 2019). Preklinická studie (Naldi *et al.*, 2014) představila novou metodu řízeného uvolňování léčiv z lékových forem pomocí EMHV systému, která maximalizuje protinádorovou účinnost Aza-dC a zlepšuje jeho biologickou dostupnost, farmakokinetiku a farmakodynamiku (Naldi *et al.*, 2014). Testy na buněčných liniích DU145 a LNCAP a jejich xenograftových myších modelech ukázaly vysoký antiproliferativní účinek EMHV systému na nádorové buňky karcinomu prostaty již po 24 hodinách, doprovázený distribucí buněk do G1 fáze a zastavení buněčného cyklu (Naldi *et al.*, 2014). U modelů *in vivo* docházelo k inhibici metyltransferázy DNMT3b, což vedlo k apoptóze cílových nádorových buněk (Naldi *et al.*, 2014).

## 6 ZÁVĚR

Patogeneze kastročně rezistentního karcinomu prostaty, který se vyvíjí po androgenové deprivaci, je ovlivňována genetickými i epigenetickými faktory, z nichž významné místo zaujímají metylace DNA a posttranslační modifikace histonů. Pro progresi onemocnění je důležitý status a funkce androgenového receptoru, přičemž u CRPC dochází k omezeným možnostem jeho regulace v důsledku na androgenech nezávislé proliferace nádorových buněk. Minoritní skupina pacientů s mCRPC vykazuje hypermetylace mnoha genů spojených s aktivitou AR, se značně sníženou expresí AR, s tendencí k vyšší proliferaci a horší prognózou. Činidla s potenciálem epigenetického účinku mohou vést k obnovení exprese inaktivovaného androgenového receptoru u pacientů s CRPC a případně zmírnit proliferativní aktivitu nádorových buněk.

Cílem této studie bylo zjistit účinky epigenetických inhibitorů DNA metyltransferáz (Aza-dC) a histonových deacetyláz (NaB) na expresi epigeneticky umlčeného androgenového receptoru a na životaschopnost a buněčný cyklus prostatické nádorové buněčné linie reprezentující CRPC stádium.

Bisulfitové sekvenování odhalilo vyšší demetylační efekt po aplikaci kombinace Aza-dC a NaB (0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB) indikující účinnější epigenetický efekt zvolených činidel. Porovnáním expresního profilu *AR* u nádorových buněk ovlivněných Aza-dC nebo NaB se 5 mM NaB jevílo účinnější v procesu re-exprese genu *AR*. Nicméně, na rozdíl od aplikace 5 mM NaB, kombinace 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB vykazovala významnější epigenetický efekt zvolených činidel pro re-expresi *AR*. Aplikované schéma CHIP experimentů v této studii ukázalo, že u normálních a nádorových buněk prostaty byla exprese androgenového receptoru doprovázena přítomností acetylovaných úseků histonů H4 po ovlivnění 5 mM NaB a také jeho kombinacemi s 0,5  $\mu$ M Aza-dC nebo 5  $\mu$ M Aza-dC. Detekovaná exprese androgenového receptoru u nádorových buněk prostaty byla tak zřejmě ovlivněna zvýšenou acetylací lyzinových zbytků histonu H4. V naší studii způsobilo ovlivnění 5 mM NaB a jeho kombinací s Aza-dC u nádorové linie DU145 sníženou viabilitu buněk a masivní nástup apoptózy, na rozdíl od ovlivněných buněk normální prostatické linie RWPE-1.

Shrnutí výsledků této práce naznačují, že kombinace Aza-dC a NaB (zejména 0,5  $\mu$ M Aza-dC + 5 mM NaB) dosahovala účinnějšího epigenetického efektu zvolených



činidel pro demetylaci promotoru *AR*, re-expresi genu *AR*, zvýšenou acetylaci histonů H4 a navození apoptózy u nádorových buněk prostaty. Výsledky práce přispívají k lepšímu pochopení účinků epigenetických inhibitorů na androgenový receptor a nádorové buněčné linie představující model CRPC. Pochopení nádorové specifčnosti a účinků epigenetické terapie může mít v budoucnu význam pro lepší výběr pacientů se specifickým metylačním profilem a kombinaci vhodných přístupů léčby, například podpůrné terapie pomocí demetylujících činidel s cílem zvýšit citlivost na následnou ADT.

## 7 ZKRATKY

5'-UTR	5' - Untranslated region
5caC	5-carboxycytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin
AA	Abiraterone acetat
ADP	Adenosine Diphosphate
ADT	Androgen deprivation therapy
AIPC	Androgen independent prostate cancer
AML	Acute myeloid leukemia
ANOVA	Analysis of variance
AR	Androgen receptor
ARE	Androgen response element
ARSI	Androgen receptor signaling inhibitors
AR-SV	Androgen receptor splice variant
AR-V7	Androgen receptor splice variant 7
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidin
BAF57	BRG1-associated factor 57
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BET	Bromodomain and extra-terminal domain
BPH	Benign prostatic hyperplasia
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BRCA2	Breast cancer 2
BRD2/4	Bromodomain-containing protein 2/4
BRG1	Brahma-related gene-1
CBP	Creb binding protein
CCND1	Cyclin D1
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CD56	Neural cell adhesion molecule
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin
CDK	Cyklin dependent kinase
CDKN1A/1B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A/1B

cfDNA	Cell free DNA
CGIs	CpG islands
CpG	Cytosine phosphate guanine
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
CSC	Cancer stem cells
CTCL	Cutaneous T cell lymphoma
DAPK	Death-Associated Protein Kinase
DBD	DNA binding domain
DDR	DNA damage response
DDS	Drug delivery system
DHEA	Dihydroepiandrosterone
DHT	Dihydrotestosterone
DM-CpG	Differentially methylated CpG
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMR	Differentially methylated regions
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNMT 3A/3B	DNA Methyltransferase 3 Alpha/3 Beta
DNMT3L	DNA Methyltransferase 3 Like
DNMT	DNA methyltransferase
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
DNMTi	Inhibitor of DNA methyltransferase
DNPC	Double negative prostate cancer
DOT1L	DOT1 Like Histone Lysine Methyltransferase
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EED	Embryonic ectoderm development
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EMHV <sub>s</sub>	Erythro-magneto-hemagglutinin virosomes
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
EP300	E1A binding protein p300
ERG	ETS-related gene
ESC	Embryonic stem cells
ESR1/2	Estrogen receptor 1 (alpha)/2 (beta)
ETS	ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor
ETV4/5	ETS Variant Transcription Factor 4/5
EVX1	Even-Skipped homeobox 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2

FACS	Fluorescently activated cell sorter
FAM3B	FAM3 Metabolism Regulating Signaling Molecule B
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
FBS	Foetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FILIP1L	Filamin A- interacting protein 1-Like
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FOLH1	Folate Hydrolase 1
FOXA1	Forkhead box A1
GNAT	GCN5-related N-acetyltransferases family
GSTP1	Glutathione S-transferase Pi
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HDACi	Inhibitor of histone deacetylase
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HOXB13	Homeobox B13
HSPC	Hormone sensitive prostate cancer
ChIP	Chromatine immunoprecipitation
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunohistochemistry
IP	Immunoprecipitation
JMJC	Jumonji C
JMJD1A	Jumonji-C (JmjC) domain containing 1A (Lysine Demethylase 3A)
JMJD5	Jumonji-C (JmjC) domain-containing protein 5 (Lysine Demethylase 8)
KDAC	Lysine deacetylases
KDM	Lysine Demethylase
KLK3	Kallikrein Related Peptidase 3
KMT	Lysine methyltransferase
KMT2C/2D	Lysine Methyltransferase 2C/ 2D
LBD	Ligand binding domain
LINE-1	Long interspersed nuclear element-1
lncRNA	Long non-coding RNA
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1 (Lysine Demethylase 1A)
MBD	Methyl-CpG-Binding Domain
MCA	Methylation Classifier for Androgen receptor activity
mCpH	Non-CpG methylation, H – adenine, thymine, cytosine

mCRPC	Metastatic castration-resistant prostate cancer
MDS	Myelodysplastic syndrome
MET	Mesenchymal epithelial transition
mHSPC	Metastatic hormone sensitive prostate cancer
miRNA	MicroRNA
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
MYST	The MYST family of HATs (MOZ/Ybf2/Sas3-Sas2/Tip60)
NaB	Sodium butyrate
NCoR1/2	Nuclear receptor co-repressor 1/ 2
NDRG1	N-Myc Downstream Regulated 1
NE	Neuroendocrine
NEPC	Neuroendocrine prostate cancer
NKX3-1	NK3 Homeobox 1
nmCRPC	Non-metastatic castration-resistant prostate cancer
NTD	N terminal domain
NURD	Nucleosome Remodeling Deacetylase
p300	E1A binding protein p300
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase protein
PC	Prostate cancer
PEX	Potassium ethyl xanthogenate buffer
PI	Propidium iodid
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B
PIN	Prostatic intraepithelial neoplasia
piRNA	Piwi-interacting RNA
PRC	Polycomb repressive complex
PRMT	Protein arginine methyltransferase
PSA	Prostatic specific antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
R/R PTCL	Relapsed and refractory peripheral T cell lymphoma
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
RB1	RB Transcriptional Corepressor 1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RT-PCR	Real-time PCR
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid

SAM	S-adenosyl methionin
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SET	SET-domain protein methyltransferase superfamily ( <b>Su(var)3-9, E(z), Trx</b> )
SFM	Serum-free media
siRNA/RNAi	Small interferin RNA/RNA interference
SLC45A3	Solute Carrier Family 45 Member 3
snoRNA	Small nucleolar RNA
Sp1	Specificity protein
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal-type 1
SPOP	Speckle type btb/poz protein
SRA	Set and Ring Finger-associated
SRC	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
SRD5A2	Steroid 5 Alpha-Reductase 2
STAT3/6	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3/6
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
T	Testosteron
TAD	Topologically associating domain
TAU	Transcriptional activation unit
TBP	TATA-Box Binding Protein
TET1/2/3	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1/2/3
TME	Tissue microenvironment
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 1
TNFSF13	TNF Superfamily Member 13
TP53	Tumor protein p53
TRAMP	Transgenic adenocarcinoma mouse prostate
TSS	Transcription start site
UHRF1	Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1
WIF1	WNT Inhibitory Factor 1
WNT	Wingless/Int-1

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

ABESHOUSE, Adam, Jaeil AHN, Rehan AKBANI, *et al.* The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cell*. 2015, **163**(4), 1011-1025. ISSN 00928674.doi:10.1016/j.cell.2015.10.025

AGGARWAL, Rahul R., Michael T. SCHWEIZER, David M. NANUS, *et al.* A Phase Ib/IIa Study of the Pan-BET Inhibitor ZEN-3694 in Combination with Enzalutamide in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* . 2020, **26**(20), 5338-5347 . ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1707

AHMED, Hafiz. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomarkers in Cancer* . 2010, **2**. ISSN 1179-299X. doi:10.4137/BIC.S3187

AHSAN, Sama, Eric H RAABE, Michael C HAFFNER, *et al.* Increased 5-hydroxymethylcytosine and decreased 5-methylcytosine are indicators of global epigenetic dysregulation in diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathologica Communications* . 2014, **2**(1). ISSN 2051-5960.doi:10.1186/2051-5960-2-59

ACHINGER-KAWECKA, Joanna, Phillippa C. TABERLAY a Susan J. CLARK. Alterations in Three-Dimensional Organization of the Cancer Genome and Epigenome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* . 2017, **81**, 41-51. ISSN 0091-7451. doi:10.1101/sqb.2016.81.031013

AKHTAR, Asifa a Peter B BECKER. Activation of Transcription through Histone H4 Acetylation by MOF, an Acetyltransferase Essential for Dosage Compensation in *Drosophila*. *Molecular Cell* . 2000, **5**(2), 367-375. ISSN 10972765.doi:10.1016/S1097-2765(00)80431-1

ALY, Markus, Amy LEVAL, Frida SCHAIN, *et al.* Survival in patients diagnosed with castration-resistant prostate cancer: a population-based observational study in Sweden. *Scandinavian Journal of Urology*. 2020, **54**(2), 115-121. ISSN 2168-1805.doi:10.1080/21681805.2020.1739139

ANTONARAKIS, Emmanuel S., Changxue LU, Hao WANG, *et al.* AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* . 2014, **371**(11), 1028-1038. ISSN 0028-4793.doi:10.1056/NEJMoal315815

ARCHER, M. C., William S. CHEN, Haolong LI, *et al.* Role of Sp Transcription Factors in the Regulation of Cancer Cell Metabolism: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Nature Genetics*. 2011, **2**(7), 712-719. ISSN 1947-6019.doi:10.1177/1947601911423029

ARORA, Kaveri, Christopher E. BARBIERI, Haolong LI, *et al.* Molecular Subtypes of Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Current Oncology Reports*. 2018, **20**(8), 712-719. ISSN 1523-3790.doi:10.1007/s11912-018-0707-9

ARYEE, Martin J., Wennuan LIU, Julia C. ENGELMANN, *et al.* DNA Methylation Alterations Exhibit Intraindividual Stability and Interindividual Heterogeneity in Prostate Cancer Metastases. *Science Translational Medicine* . 2013, **5**(169). ISSN 1946-6234.doi:10.1126/scitranslmed.3005211

BACA, Sylvan C., Davide PRANDI, Michael S. LAWRENCE, *et al.* Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. *Cell* . 2013, **153**(3), 666-677. ISSN 00928674.doi:10.1016/j.cell.2013.03.021

BANNISTER, Andrew J a Tony KOUZARIDES. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* . 2011, **21**(3), 381-395. ISSN 1001-0602.doi:10.1038/cr.2011.22

BARBIERI, Christopher E, Francesca DEMICHELIS a Mark A RUBIN. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology* . 2012, **60**(1), 187-198. ISSN 03090167.doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04041.x

BASTIAN, Patrick J., Srinivasan YEGNASUBRAMANIAN, Ganesh S. PALAPATTU, Craig G. ROGERS, Xiaohui LIN, Angelo M. DE MARZO a William G. NELSON. Molecular Biomarker in Prostate Cancer: The Role of CpG Island Hypermethylation. *European Urology* . 2004, **46**(6), 698-708. ISSN 03022838.doi:10.1016/j.eururo.2004.07.022

BELTRAN, Himisha, Andrew HRUSZKEWYCZ, Howard I. SCHER, et al. The role of lineage plasticity in prostate cancer therapy resistance. *Clinical Cancer Research* . 2019. 1078-0432.CCR-19-1423. ISSN 1078-0432.doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1423

BELTRAN, Himisha, Davide PRANDI, Juan Miguel MOSQUERA, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nature Medicine* . 2016, **22**(3), 298-305. ISSN 1078-8956.doi:10.1038/nm.4045

BELTRAN, Himisha, Alessandro ROMANEL, Vincenza CONTEDEUCA, et al. Circulating tumor DNA profile recognizes transformation to castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation* . 2020, **130**(4), 1653-1668 . ISSN 0021-9738.doi:10.1172/JCI131041

BERNSTEIN, Bradley E., Tarjei S. MIKKELSEN, Xiaohui XIE, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* . 2006, **125**(2), 315-326. ISSN 00928674.doi:10.1016/j.cell.2006.02.041

BIRD, Adrian P a Alan P WOLFFE. Methylation-Induced Repression - Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* . 1999, **99**(5), 451-454. ISSN 00928674.doi:10.1016/S0092-8674(00)81532-9

BOULEFTOUR, Wafa, Karima BOUSSOUALIM, Sandrine SOTTON, Cecile VASSAL, Thierry THOMAS, Nicolas MAGNE a Aline GUILLOT. Second-generation hormone therapy in prostate cancer and bone microenvironment. *Endocrine-Related Cancer* . 2021, **28**(8), T39-T49. ISSN 1351-0088.doi:10.1530/ERC-21-0118

CAKOWSKI, Frank C., Chandan KUMAR-SINHA, Rohit MEHRA, Yi-Mi WU, Dan R. ROBINSON, Joshi J. ALUMKAL a Arul M. CHINNAIYAN. Double-Negative Prostate Cancer Masquerading as a Squamous Cancer of Unknown Primary: A Clinicopathologic and Genomic Sequencing-Based Case Study. *JCO Precision Oncology* . 2020, (4), 1386-1392. ISSN 2473-4284.doi:10.1200/PO.20.00309

CAI, Fangzhen, Yanmei ZHANG, Jianwei LI, et al. Isorhamnetin inhibited the proliferation and metastasis of androgen-independent prostate cancer cells by targeting the mitochondrion-dependent intrinsic apoptotic and PI3K/Akt/mTOR pathway: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Bioscience Reports*. 2020, **40**(3), 712-719. ISSN 0144-8463.doi:10.1042/BSR20192826

CAI, Changmeng, Housheng Hansen HE, Sen CHEN, et al. Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell* . 2011, **20**(4), 457-471. ISSN 15356108.doi:10.1016/j.ccr.2011.09.001

CAMERON, Elizabeth E., Kurtis E. BACHMAN, Sanna MYÖHÄNEN, James G. HERMAN a Stephen B. BAYLIN. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics* . 1999, **21**(1), 103-107. ISSN 1061-4036.doi:10.1038/5047

CINTI, Caterina, Monia TARANTA, Ilaria NALDI, Settimio GRIMALDI a Steven ELLIS. Newly Engineered Magnetic Erythrocytes for Sustained and Targeted Delivery of Anti-Cancer Therapeutic Compounds. *PLoS ONE* . 2011, **6**(2). ISSN 1932-6203.doi:10.1371/journal.pone.0017132

CLAESSENS, Frank, Sarah DENAYER, Nora VAN TILBORGH, Stefanie KERKHOFS, Christine HELSEN a Annemie HAELENS. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Receptor Signaling* . 2008, **6**(1). ISSN 1550-7629.doi:10.1621/nrs.06008

CLEGG, Nicola J., John WONGVIPAT, James D. JOSEPH, et al. ARN-509: A Novel Antiandrogen for Prostate Cancer Treatment. *Cancer Research* . 2012, **72**(6), 1494-1503 . ISSN 0008-5472.doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3948



CLEMENTS, Adrienne, Arienne N POUX, Wan-Sheng LO, Lorraine PILLUS, Shelley L BERGER a Ronen MARMORSTEIN. Structural Basis for Histone and Phosphohistone Binding by the GCN5 Histone Acetyltransferase. *Molecular Cell* . 2003, **12**(2), 461-473. ISSN 10972765.doi:10.1016/S1097-2765(03)00288-0

CONTEDEUCA, Vincenza, Judy HESS, Yasutaka YAMADA, Sheng-Yu KU et Himisha BELTRAN. Epigenetics in prostate cancer: clinical implications. *Translational Andrology and Urology*. 2021, **10**(7), 3104-3116. ISSN 22234683.doi:10.21037/tau-20-1339

CYRTA, Joanna, Anke AUGSPACH, Maria Rosaria DE FILIPPO, *et al.* Role of specialized composition of SWI/SNF complexes in prostate cancer lineage plasticity: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Nature Communications*. 2020, **11**(1), 4551-4558. ISSN 2041-1723.doi:10.1038/s41467-020-19328-1

DAI, Ziwei, Vijyendra RAMESH a Jason W. LOCASALE. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics* . 2020, **21**(12), 737-753. ISSN 1471-0056.doi:10.1038/s41576-020-0270-8

DAMODARAN, Shivashankar, Nathan DAMASCHKE, Joseph GAWDZIK, et al. Dysregulation of Sirtuin 2 (SIRT2) and histone H3K18 acetylation pathways associates with adverse prostate cancer outcomes. *BMC Cancer* . 2017, **17**(1). ISSN 1471-2407.doi:10.1186/s12885-017-3853-9

DAVID F. Jarrard, Hidefumi Kinoshita, Yan Shi, Carol Sandefur, Douglas Hoff et al. Methylation of the Androgen Receptor Promoter CpG Island Is Associated with Loss of Androgen Receptor Expression in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. 1 December 1998; **58** (23): 5310–5314.

DAVIES, Alastair, Vincenza CONTEDEUCA, Amina ZOUBEIDI, et al. Biological Evolution of Castration-resistant Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *European Urology Focus*. 2019, **5**(2), 147-154. ISSN 24054569.doi:10.1016/j.euf.2019.01.016

DAWSON, Mark A., Andrew J. BANNISTER, Berthold GÖTTGENS, Samuel D. FOSTER, Till BARTKE, Anthony R. GREEN a Tony KOUZARIDES. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 $\alpha$  from chromatin. *Nature* . 2009, **461**(7265), 819-822. ISSN 0028-0836.doi:10.1038/nature08448

DE MOL, Eva, R. Bryn FENWICK, Christopher T. W. PHANG, et al. EPI-001, A Compound Active against Castration-Resistant Prostate Cancer, Targets Transactivation Unit 5 of the Androgen Receptor: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *ACS Chemical Biology*. 2016, **11**(9), 2499-2505. ISSN 1554-8929.doi:10.1021/acschembio.6b00182

DEONARAIN, Mahendra P., Christina A. KOUSPAROU a Agamemnon A. EPENETOS. Antibodies targeting cancer stem cells: A new paradigm in immunotherapy?. *MAbs* . 2009, **1**(1), 12-25 . ISSN 1942-0862. doi:10.4161/mabs.1.1.7347

DESAI, Milap H., Meghana PARSI, Rashmika R. POTDAR, et al. Triple-arm androgen blockade for advanced prostate cancer: a review. *Medical Oncology*. 2021, **38**(7), 2499-2505. ISSN 1357-0560.doi:10.1007/s12032-021-01520-y

DHINGRA, Priyanka, Alexander MARTINEZ-FUNDICHELY, Adeline BERGER, et al. Identification of novel prostate cancer drivers using RegNetDriver: a framework for integration of genetic and epigenetic alterations with tissue-specific regulatory network. *Genome Biology* . 2017, **18**(1). ISSN 1474-760X.doi:10.1186/s13059-017-1266-3

DING, Yufeng, Ni LI, Baijun DONG, et al. Chromatin remodeling ATPase BRG1 and PTEN are synthetic lethal in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation* . 2019, **129**(2), 759-773 . ISSN 0021-9738.doi:10.1172/JCI123557

DING, Lifeng, Ruyue WANG, Danyang SHEN, et al. Role of noncoding RNA in drug resistance of prostate cancer. *Cell Death & Disease* . 2021, **12**(6) . ISSN 2041-4889.doi:10.1038/s41419-021-03854-x

DIXON, Jesse R., David U. GORKIN a Bing REN. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Molecular Cell* . 2016, **62**(5), 668-680 . ISSN 10972765. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.018

DI ZAZZO, Erika, Giovanni GALASSO, Pia GIOVANNELLI, et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. *Oncotarget* . 2016, **7**(1), 193-208. ISSN 1949-2553. doi:10.18632/oncotarget.6220

DÍAZ-MEJÍA, Nely, David GARCÍA-ILLESCAS, Rafael MORALES-BARRERA, Cristina SUAREZ, Jacques PLANAS, Xavier MALDONADO, Joan CARLES a Joaquin MATEO. PARP inhibitors in advanced prostate cancer: when to use them? *Endocrine-Related Cancer* . 2021, **28**(8), T79-T93. ISSN 1351-0088. doi:10.1530/ERC-21-0133

DOBOSY, J.R. a E.U. SELKER. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* . 2001, **58**(5), 721-727. ISSN 1420-682X. doi:10.1007/PL00000895

DUBROVSKA, Anna, Jimmy ELLIOTT, Richard J. SALAMONE, et al. Combination Therapy Targeting Both Tumor-Initiating and Differentiated Cell Populations in Prostate Carcinoma. *Clinical Cancer Research* . 2010, **16**(23), 5692-5702 . ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1601

DUNDR, Pavel, Michaela BÁRTŮ, Jan HOJNÝ, et al. HNF1B, EZH2 and ECI2 in prostate carcinoma. Molecular, immunohistochemical and clinico-pathological study: a population-based observational study in Sweden. *Scientific Reports*. 2020, **10**(1), 115-121. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-71427-7

ELLINGER, Jarg, Philip KAHL, Johannes VON DER GATHEN, et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence: a population-based observational study in Sweden. *The Prostate*. 2010, **70**(1), 61-69. ISSN 02704137. doi:10.1002/pros.21038

EMANUELE S, LAURICELLA M a TESORIERE G. Histone deacetylase inhibitors: Apoptotic effects and clinical implications (Review). *International Journal of Oncology* . 2008, **33**(4). ISSN 10196439. doi:10.3892/ijo\_00000049

EPSTEIN, Jonathan I., Mahul B. AMIN, Himisha BELTRAN, et al. Triple-arm androgen blockade for advanced prostate cancer: a review. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014, **38**(6), 756-767. ISSN 0147-5185. doi:10.1097/PAS.0000000000000208

FELGUEIRAS, Juliana, Joana Vieira SILVA a Margarida FARDILHA. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* . 2014, **15**(1), 16-42. ISSN 1673-1581. doi:10.1631/jzus.B1300106

FENAUX, Pierre, Ghulam J MUFTI, Eva HELLSTROM-LINDBERG, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* . 2009, **10**(3), 223-232 . ISSN 14702045. doi:10.1016/S1470-2045(09)70003-8

FERGUSON, Anne T., Paula M. VERTINO, Jeffrey R. SPITZNER, Stephen B. BAYLIN, Mark T. MULLER a Nancy E. DAVIDSON. Role of Estrogen Receptor Gene Demethylation and DNA Methyltransferase·DNA Adduct Formation in 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced Cytotoxicity In Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* . 1997, **272**(51), 32260-32266. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.272.51.32260

FERRARI, Anna C., Joshi J. ALUMKAL, Mark N. STEIN, et al. Epigenetic Therapy with Panobinostat Combined with Bicalutamide Rechallenge in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* . 2019, **25**(1), 52-63 . ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1589

FIALOVA, Barbora, Katerina SMESNY TRTKOVA, Lenka PASKOVA, Katerina LANGOVA et al. Effect of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors on the expression of the androgen receptor gene in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Oncology Reports* . 2013, **29**(5), 2039-2045. ISSN 1021-335X. doi:10.3892/or.2013.2344

FIALOVA, Barbora, Petra LUZNA, Jan GURSKY, Katerina LANGOVA, Zdenek KOLAR et al. Epigenetic modulation of AR gene expression in prostate cancer DU145 cells with the combination of sodium butyrate and

5'-Aza-2'-deoxycytidine. *Oncology Reports* . 2016, **36**(4), 2365-2374. ISSN 1021-335X. doi:10.3892/or.2016.5000

FIANO, Valentina, Daniela ZUGNA, Chiara GRASSO, et al. LINE-1 methylation status in prostate cancer and non-neoplastic tissue adjacent to tumor in association with mortality. *Epigenetics* . 2017, **12**(1), 11-18. ISSN 1559-2294. doi:10.1080/15592294.2016.1261786

FILION, Guillaume J. P., Svetlana ZHENILO, Sergey SALOZHIN, Daisuke YAMADA, Egor PROKHORTCHOUK a Pierre-Antoine DEFOSSEZ. A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Molecular and Cellular Biology* . 2006, **26**(1), 169-181. ISSN 0270-7306. doi:10.1128/MCB.26.1.169-181.2006

FILIPPAKOPOULOS, Panagis, Jun QI, Sarah PICAUD, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* . 2010, **468**(7327), 1067-1073. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature09504

FRIEDLANDER, Terence W., Ritu ROY, Scott A. TOMLINS, et al. Common Structural and Epigenetic Changes in the Genome of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Research* . 2012, **72**(3), 616-625. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2079

GAO, Shuai, Sujun CHEN, Dong HAN, et al. Chromatin binding of FOXA1 is promoted by LSD1-mediated demethylation in prostate cancer. *Nature Genetics* . 2020, **52**(10), 1011-1017. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-020-0681-7

GAO, Lina a Joshi ALUMKAL. Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Epigenetics* . 2014, **5**(2), 100-104. ISSN 1559-2294. doi:10.4161/epi.5.2.10778

GE, R., Z. WANG, R. MONTIRONI, et al. Epigenetic modulations and lineage plasticity in advanced prostate cancer. *Annals of Oncology* . 2020, **31**(4), 470-479. ISSN 09237534. doi:10.1016/j.annonc.2020.02.002

GENG, Chuandong, Kimal RAJAPAKSHE, Shrijal S. SHAH, et al. Androgen Receptor Is the Key Transcriptional Mediator of the Tumor Suppressor SPOP in Prostate Cancer. *Cancer Research* . 2014, **74**(19), 5631-5643. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0476

GODINI, Rasoul, Haider Yabr LAFTA a Hossein FALLAHI. Epigenetic modifications in the embryonic and induced pluripotent stem cells. *Gene Expression Patterns* . 2018, **29**, 1-9. ISSN 1567133X. doi:10.1016/j.gep.2018.04.001

GRAÇA, Inês, Eva PEREIRA-SILVA, Rui HENRIQUE, Graham PACKHAM, Simon J. CRABB a Carmen JERÓNIMO. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. *Clinical Epigenetics* . 2016, **8**(1). ISSN 1868-7075. doi:10.1186/s13148-016-0264-8

GRASSO, Catherine S., Yi-Mi WU, Dan R. ROBINSON, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* . 2012, **487**(7406), 239-243. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature11125

GRAVINA, Giovanni Luca, Claudio FESTUCCIA, Danilo MILLIMAGGI, Vincenza DOLO, Vincenzo TOMBOLINI, et al. 2008. Chronic azacitidine treatment results in differentiating effects, sensitizes against bicalutamide in androgen-independent prostate cancer cells. *The Prostate*. 68(7), 793-801. ISSN 02704137. *CANCER RESEARCH* 58. 5.11U-5.M4. doi:10.1002/pros.20748

GRAVINA, Giovanni Luca, Francesco MARAMPON, Mario DI STASO, et al. 5-azacitidine restores and amplifies the bicalutamide response on preclinical models of androgen receptor expressing or deficient prostate tumors. *The Prostate* . 2010, **70**(11), 1166-1178. ISSN 02704137. doi:10.1002/pros.21151

HABERLAND, Michael, Rusty L. MONTGOMERY a Eric N. OLSON. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics* . 2009, **10**(1), 32-42. ISSN 1471-0056. doi:10.1038/nrg2485

HAFFNER, Michael C., Alcides CHAUX, Alan K. MEEKER, et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* . 2011, **2**(8), 627-637. ISSN 1949-2553. doi:10.18632/oncotarget.316

HAŁASA, Marta, Anna WAWRUSZAK, Alicja PRZYBYSZEWSKA, Anna JARUGA, Małgorzata GUZ, Joanna KAŁAFUT, Andrzej STEPULAK a Marek CYBULSKI. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells* . 2019, **8**(5). ISSN 2073-4409. doi:10.3390/cells8050485

HARDWICK, Jack S., Andrew N. LANE a Tom BROWN. Epigenetic Modifications of Cytosine: Biophysical Properties, Regulation, and Function in Mammalian DNA. *BioEssays* . 2018, **40**(3). ISSN 02659247. doi:10.1002/bies.201700199

HARGREAVES, Diana C. Chromatin openness requires continuous SWI/SNF activity. *Nature Genetics* . 2021, **53**(3), 263-264 . ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-021-00781-7

HARRISON, Janet, Clare STIRZAKER a Susan J. CLARK. Cytosines Adjacent to Methylated CpG Sites Can Be Partially Resistant to Conversion in Genomic Bisulfite Sequencing Leading to Methylation Artifacts. *Analytical Biochemistry* . 1998, **264**(1), 129-132. ISSN 00032697. doi:10.1006/abio.1998.2833

HASHIMOTO, Hideharu, John R. HORTON, Xing ZHANG, Magnolia BOSTICK, Steven E. JACOBSEN a Xiaodong CHENG. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* . 2008, **455**(7214), 826-829. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature07280

HEEMERS, Hannelore V. a Donald J. TINDALL. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocrine Reviews* . 2007, **28**(7), 778-808. ISSN 0163-769X. doi:10.1210/er.2007-0019

HEINLEIN, Cynthia A. a Chawnshang CHANG. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews* . 2004, **25**(2), 276-308. ISSN 0163-769X. doi:10.1210/er.2002-0032

HOLMES, Emily Eva, Maria JUNG, Sebastian MELLER, et al. Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine. *PLoS ONE* . 2014, **9**(4). ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0093933

HORIE-INOUE, Kuniko, Hidemasa BONO, Yasushi OKAZAKI a Satoshi INOUE. Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 2004, **325**(4), 1312-1317. ISSN 0006291X. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.174

HU, Che-Yuan, Kuan-Yu WU, Tsung-Yen LIN a Chien-Chin CHEN. The Crosstalk of Long Non-Coding RNA and MicroRNA in Castration-Resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer: Their Interaction and Clinical Importance. *International Journal of Molecular Sciences* . 2022, **23**(1). ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms23010392

CHAPPELL, William H., Saverio CANDIDO, Stephen L. ABRAMS, et al. Roles of p53, NF-κB and the androgen receptor in controlling NGAL expression in prostate cancer cell lines: a review. *Advances in Biological Regulation*. 2018, **69**(6), 43-62. ISSN 22124926. doi:10.1016/j.jbior.2018.05.002

CHEN, Shaoyong, Youyuan XU, Xin YUAN, Glenn J. BUBLEY a Steven P. BALK. Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 2006, **103**(43), 15969-15974. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0604193103

CHENG, Huiying, Sijie TANG, Xueqi LIAN, Hong MENG, Xiang GU, Jiajia JIANG a Xiaohua LI. The Differential Antitumor Activity of 5-Aza-2'-deoxycytidine in Prostate Cancer DU145, 22RV1, and LNCaP Cells. *Journal of Cancer* . 2021, **12**(18), 5593-5604. ISSN 1837-9664. doi:10.7150/jca.56709

IACOVELLI, Roberto, Chiara CICCARESE, Giovanni SCHINZARI, et al. Going towards a precise definition of the therapeutic management of de-novo metastatic castration sensitive prostate cancer patients: How prognostic classification impact treatment decisions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019, **139**(6), 83-86. ISSN 10408428. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.05.005

IRIZARRY, Rafael A., Hao WU a Andrew P. FEINBERG. A species-generalized probabilistic model-based definition of CpG islands. *Mammalian Genome* . 2009, **20**(9-10). ISSN 0938-8990. doi:10.1007/s00335-009-9222-5

JARRARD DF, KINOSHITA H, SHI Y, SANDEFUR C, HOFF D, et al. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:5310–4.

JENUWEIN, Thomas a C. David ALLIS. Translating the Histone Code. *Science* . 2001, **293**(5532), 1074-1080. ISSN 0036-8075.doi:10.1126/science.1063127

JIA L, KIM J, SHEN H, CLARK PE, TILLEY WD, COETZEE GA. Androgen receptor activity at the prostate specific antigen locus: steroidal and non-steroidal mechanisms. *Mol Cancer Res.* 2003;1(5):385-392.

JIA, Li, Howard C. SHEN, Marcus WANTROBA, et al. Locus-Wide Chromatin Remodeling and Enhanced Androgen Receptor-Mediated Transcription in Recurrent Prostate Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology* . 2006, **26**(19), 7331-7341. ISSN 0270-7306.doi:10.1128/MCB.00581-06

JIN, Hong-Jian, Jonathan C. ZHAO, Irene OGDEN, Raymond C. BERGAN a Jindan YU. Androgen Receptor-Independent Function of FoxA1 in Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Research* . 2013, **73**(12), 3725-3736. ISSN 0008-5472.doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3468

JIN, Ning, Tiffany L. GEORGE, Gregory A. OTTERSON, et al. Advances in epigenetic therapeutics with focus on solid tumors. *Clinical Epigenetics* . 2021, **13**(1). ISSN 1868-7075.doi:10.1186/s13148-021-01069-7

JONES, Peter A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics* . 2012, **13**(7), 484-492. ISSN 1471-0056.doi:10.1038/nrg3230

JÜTTERMANN, R., E. LI a R. JAENISCH. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 1994, **91**(25), 11797-11801. ISSN 0027-8424.doi:10.1073/pnas.91.25.11797

KANG, Jee Hyun, Yoon Young LEE, Byung Yeon YU, Beom -Seok YANG, Kyung -Hwan CHO, Do Kyoung YOON a Yong Kyun ROH. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Archives of Pharmacal Research* . 2005, **28**(11), 1263-1269. ISSN 0253-6269. doi:10.1007/BF02978210

KE, Xi-Song, Yi QU, Kari ROSTAD, et al. Genome-Wide Profiling of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Trimethylation Reveals an Epigenetic Signature in Prostate Carcinogenesis. *PLoS ONE* . 2009, **4**(3) . ISSN 1932-6203.doi:10.1371/journal.pone.0004687

KEBEDE, Adam F., Robert SCHNEIDER a Sylvain DAUJAT. Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. *FEBS Journal* . 2015, **282**(9), 1658-1674 . ISSN 1742464X.doi:10.1111/febs.13047

KIM, J, Park H, Im JY, Choi WS, Kim HS. Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 2007;27(5A):3285-3292.

KIM, Jung H., Saravana M. DHANASEKARAN, John R. PRENSNER, et al. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. *Genome Research* . 2011, **21**(7), 1028-1041 . ISSN 1088-9051.doi:10.1101/gr.119347.110

KAUSHIK, Dharam, Vishal VASHISTHA, Sudhir ISHARWAL, Soud A. SEDIQE a Ming-Fong LIN. Histone deacetylase inhibitors in castration-resistant prostate cancer: molecular mechanism of action and recent clinical trials. *Therapeutic Advances in Urology* . 2015, **7**(6), 388-395. ISSN 1756-2872. doi:10.1177/1756287215597637

KINOSHITA H, SHI Y, SANDEFUR C, MEISNER LF et al. Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:3623–30.

KLOSE, Robert J. a Adrian P. BIRD. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* . 2006, **31**(2), 89-97 . ISSN 09680004.doi:10.1016/j.tibs.2005.12.008

KNUDSEN, Beatrice S. a Valera VASIOUKHIN. *Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression*. Elsevier, 2010, 2010, s. 1-50. *Advances in Cancer Research*. ISBN 9780123808905. doi:10.1016/B978-0-12-380890-5.00001-6

KOJIMA, Satoko, Yusuke GOTO, Yukio NAYA, et al. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Journal of Human Genetics*. 2017, **62**(1), 25-31. ISSN 1434-5161. doi:10.1038/jhg.2016.69

KRIAUCIONIS, Skirmantas a Nathaniel HEINTZ. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science*. 2009, **324**(5929), 929-930. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1169786

KRON, Ken, Dominique TRUDEL, Vaijayanti PETHE, et al. Altered DNA Methylation Landscapes of Polycomb-Repressed Loci Are Associated with Prostate Cancer Progression and ERG Oncogene Expression in Prostate Cancer: a population-based observational study in Sweden. *Clinical Cancer Research*. 2013, **19**(13), 3450-3461. ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3139

KRON, Ken, Vaijayanti PETHE, Laurent BRIOLLAIS, et al. Discovery of Novel Hypermethylated Genes in Prostate Cancer Using Genomic CpG Island Microarrays: a population-based observational study in Sweden. *PLoS ONE*. 2009, **4**(3), 61-69. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0004830

KUKKONEN, Konsta, Sinja TAAVITSAINEN, Laura HUHTALA, et al. Chromatin and Epigenetic Dysregulation of Prostate Cancer Development, Progression, and Therapeutic Response: a population-based observational study in Sweden. *Cancers*. 2021, **13**(13), 3450-3461. ISSN 2072-6694. doi:10.3390/cancers13133325

KURDISTANI, Siavash K, Saeed TAVAZOIE a Michael GRUNSTEIN. Mapping Global Histone Acetylation Patterns to Gene Expression. *Cell*. 2004, **117**(6), 721-733. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2004.05.023

LABRECQUE, Mark P, Joshi J ALUMKAL, Ilsa M COLEMAN, Peter S NELSON a Colm MORRISSEY. The heterogeneity of prostate cancers lacking AR activity will require diverse treatment approaches. *Endocrine-Related Cancer*. 2021, **28**(8), T51-T66. ISSN 1351-0088. doi:10.1530/ERC-21-0002

LABRECQUE, Mark P., Ilsa M. COLEMAN, Lisha G. BROWN, et al. Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2019, **129**(10), 4492-4505. ISSN 0021-9738. doi:10.1172/JCI128212

LEE, Geun Taek, Naoya NAGAYA, Jenny DESANTIS, et al. Effects of MTX-23, a Novel PROTAC of Androgen Receptor Splice Variant-7 and Androgen Receptor, on CRPC Resistant to Second-Line Antiandrogen Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2021, **20**(3), 490-499. ISSN 1535-7163. doi:10.1158/1535-7163.MCT-20-0417

LEE, W H, R A MORTON, J I EPSTEIN, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, **91**(24), 11733-11737. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.91.24.11733

LIN, Jianqing, Michael C. HAFFNER, Yonggang ZHANG, et al. Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *The Prostate*. 2011, **71**(4), 333-343. ISSN 02704137. doi:10.1002/pros.21247

LINK, Kevin A., Sucharitha BALASUBRAMANIAM, Ankur SHARMA, et al. Targeting the BAF57 SWI/SNF Subunit in Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cancer Research*. 2008, **68**(12), 4551-4558. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6392

LISTER, Ryan, Mattia PELIZZOLA, Robert H. DOWEN, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009, **462**(7271), 315-322. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature08514

LIU, Qipeng, Guangyu WANG, Qiaqia LI, et al. Polycomb group proteins EZH2 and EED directly regulate androgen receptor in advanced prostate cancer. *International Journal of Cancer* . 2019, **145**(2), 415-426 . ISSN 0020-7136. doi:10.1002/ijc.32118

LU, Xu, Matthew D SIMON, Jayanth V CHODAPARAMBIL, Jeffrey C HANSEN, Kevan M SHOKAT a Karolin LUGER. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. *Nature Structural & Molecular Biology* . 2008, **15**(10), 1122-1124. ISSN 1545-9993. doi:10.1038/nsmb.1489

LUGER, Karolin, Armin W. MÄDER, Robin K. RICHMOND, David F. SARGENT a Timothy J. RICHMOND. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* . 1997, **389**(6648), 251-260. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/38444

MA, Anqi, Elias STRATIKOPOULOS, Kwang-Su PARK, et al. Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader. *Nature Chemical Biology* . 2020, **16**(2), 214-222 . ISSN 1552-4450. doi:10.1038/s41589-019-0421-4

MAHAPATRA, Saswati, Eric W. KLEE, Charles Y.F. YOUNG, Zhifu SUN, Rafael E. JIMENEZ, George G. KLEE, Donald J. TINDALL a Krishna Vanaja DONKENA. Global Methylation Profiling for Risk Prediction of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* . 2012, **18**(10), 2882-2895. ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2090

MAKAREVIĆ, Jasmina, Nassim TAWANAIE, Eva JUENGEL, et al. Cross-communication between histone H3 and H4 acetylation and Akt-m TOR signalling in prostate cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* . 2014, **18**(7), 1460-1466. ISSN 1582-1838. doi:10.1111/jcmm.12299

MALÍKOVÁ, Jana, Jana SWACZYNOVÁ, Zdeněk KOLÁŘ a Miroslav STRNAD. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* . 2008, **69**(2), 418-426 . ISSN 00319422. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.028

MANCINI, Debora N, Shiva M SINGH, Trevor K ARCHER a David I RODENHISER. Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene* . 1999, **18**(28), 4108-4119. ISSN 0950-9232. doi:10.1038/sj.onc.1202764

MARGUERON, Raphael, Patrick TROJER a Danny REINBERG. The key to development: interpreting the histone code?. *Current Opinion in Genetics & Development* . 2005, **15**(2), 163-176. ISSN 0959437X. doi:10.1016/j.gde.2005.01.005

MARKS, P.A. a W.-S. XU. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* . 2009, **107**(4), 600-608. ISSN 07302312. doi:10.1002/jcb.22185

MARSHALL, Thomas W., Kevin A. LINK, Christin E. PETRE-DRAVIAM a Karen E. KNUDSEN. Differential Requirement of SWI/SNF for Androgen Receptor Activity. *Journal of Biological Chemistry* . 2003, **278**(33), 30605-30613. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M304582200

MASSIE, Charles E., Ian G. MILLS a Andy G. LYNCH. The importance of DNA methylation in prostate cancer development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* . 2017, **166**, 1-15. ISSN 09600760. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.04.009

MAUGHAN, Benjamin L a Emmanuel S ANTONARAKIS. Androgen pathway resistance in prostate cancer and therapeutic implications. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* . 2015, **16**(10), 1521-1537. ISSN 1465-6566. doi:10.1517/14656566.2015.1055249

MCCABE, Michael T., Jonathan A. LOW, Stephanie DAIGNAULT, Michael J. IMPERIALE, Kirk J. WOJNO a Mark L. DAY. Inhibition of DNA Methyltransferase Activity Prevents Tumorigenesis in a Mouse Model of Prostate Cancer. *Cancer Research* . 2006, **66**(1), 385-392. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2020

MISHRA, Dhruva Kumar, Zujian CHEN, Yanyuan WU, Marianna SARKISSYAN, H. Phillip KOEFFLER a Jaydutt V. VADGAMA. Global Methylation Pattern of Genes in Androgen-Sensitive and Androgen-

Independent Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* . 2010, **9**(1), 33-45. ISSN 1535-7163. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0486

MISTELLI, Tom a Elizabeth H. FINN. Chromatin architecture is a flexible foundation for gene expression. *Nature Genetics* . 2021, **53**(4), 426-427 . ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-021-00813-2

MISZTAK, Paulina, Patrycja PAŃCZYSZYN-TRZEWIK a Magdalena SOWA-KUĆMA. Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. *Pharmacological Reports* . 2018, **70**(2), 398-408. ISSN 17341140. doi:10.1016/j.pharep.2017.08.001

MITSIADES, Nicholas a Salma KAOCHAR. Androgen receptor signaling inhibitors: post-chemotherapy, pre-chemotherapy and now in castration-sensitive prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* . 2021, **28**(8), T19-T38. ISSN 1351-0088. doi:10.1530/ERC-21-0098

MIZOKAMI, A a C CHANG. Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA. *Journal of Biological Chemistry* . 1994, **269**(41), 25655-25659. ISSN 00219258. doi:10.1016/S0021-9258(18)47299-7

MOHLER, Michael L., Arunima SIKDAR, Suriyan PONNUSAMY, Dong-Jin HWANG, Yali HE, Duane D. MILLER a Ramesh NARAYANAN. An Overview of Next-Generation Androgen Receptor-Targeted Therapeutics in Development for the Treatment of Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* . 2021, **22**(4). ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms22042124

MOILANEN, Anu-Maarit, Reetta RIIKONEN, Riikka OKSALA, et al. Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Scientific Reports* . 2015, **5**(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep12007

MOMPARLER, Richard L. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in Hematology* . 2005, **42**, S9-S16. ISSN 00371963. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.002

MOUL, JuddW. Hormone naïve prostate cancer: predicting and maximizing response intervals. *Asian Journal of Andrology* . 2015, **17**(6). ISSN 1008-682X. doi:10.4103/1008-682X.152821

MU, Dawei, Zhuo GAO, Heqing GUO, Gaobiao ZHOU, Bin SUN a Dhyana CHANDRA. Sodium Butyrate Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human Prostate Cancer DU145 Cells by Up-Regulation of the Expression of Annexin A1. *PLoS ONE* . 2013, **8**(9).. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0074922

MUTHUSWAMI, Rohini, LeeAnn BAILEY, Radhakrishnan RAKESH, Anthony N. IMBALZANO, Jeffrey A. NICKERSON a Joel W. HOCKENSMITH. BRG1 is a prognostic indicator and a potential therapeutic target for prostate cancer. *Journal of Cellular Physiology* . 2019, **234**(9), 15194-15205 . ISSN 0021-9541. doi:10.1002/jcp.28161

MYUNG, Jae-Kyung, Carmen A. BANUELOS, Javier Garcia FERNANDEZ, et al. An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation* . 2013, **123**(7), 2948-2960 . ISSN 0021-9738. doi:10.1172/JCI66398

NAGY, Laszlo, Hung-Ying KAO, Debabrata CHAKRAVARTI, Richard J LIN, Christian A HASSIG, Donald E AYER, Stuart L SCHREIBER a Ronald M EVANS. Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, mSin3A, and Histone Deacetylase. *Cell* . 1997, **89**(3), 373-380. ISSN 00928674. doi:10.1016/S0092-8674(00)80218-4

NAKAYAMA T, WATANABE M, SUZUKI H, TOYOTA M, Sekita N, et al. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest*. 2000;**80**:1789–96.

NALDI, Ilaria, Monia TARANTA, Lisa GHERARDINI, et al. Novel Epigenetic Target Therapy for Prostate Cancer: A Preclinical Study. *PLoS ONE* . 2014, **9**(5). ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0098101

NAZOR, Kristopher L., Gulsah ALTUN, Candace LYNCH, et al. Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Derivatives. *Cell Stem Cell* . 2012, **10**(5), 620-634. ISSN 19345909. doi:10.1016/j.stem.2012.02.013



NELSON, Joel D, Oleg DENISENKO a Karol BOMSZTYK. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Protocols* . 2006, **1**(1), 179-185. ISSN 1754-2189. doi:10.1038/nprot.2006.27

NEPALI, Kunal a Jing-Ping LIOU. Recent developments in epigenetic cancer therapeutics: clinical advancement and emerging trends. *Journal of Biomedical Science* . 2021, **28**(1) . ISSN 1423-0127. doi:10.1186/s12929-021-00721-x

NICKERSON, M L, S DAS, K M IM, et al. TET2 binds the androgen receptor and loss is associated with prostate cancer. *Oncogene* . 2017, **36**(15), 2172-2183. ISSN 0950-9232. doi:10.1038/onc.2016.376

NIGHTINGALE, Karl P, Laura P O'NEILL a Bryan M TURNER. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Current Opinion in Genetics & Development* . 2006, **16**(2), 125-136 . ISSN 0959437X. doi:10.1016/j.gde.2006.02.015

NISHIDA, Hiromi, Takahiro SUZUKI, Shinji KONDO, Hisashi MIURA, Yu-ichi FUJIMURA a Yoshihide HAYASHIZAKI. Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Research* . 2006, **14**(2), 203-211. ISSN 0967-3849. doi:10.1007/s10577-006-1036-7

OKANO, Masaki, Daphne W BELL, Daniel A HABER a En LI. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* . 1999, **99**(3), 247-257. ISSN 00928674. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6

OUARD, Stéphane. Progress in emerging therapies for advanced prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews* . 2013, **39**(3), 275-289. ISSN 03057372. doi:10.1016/j.ctrv.2012.09.005

PAJAK B, ORZECZOWSKI A, GAJKOWSKA B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci*. 2007;52:83-88.

PALII, Stela S., Beth O. VAN EMBURGH, Umesh T. SANKPAL, Kevin D. BROWN a Keith D. ROBERTSON. DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B. *Molecular and Cellular Biology* . 2008, **28**(2), 752-771. ISSN 0270-7306. doi:10.1128/MCB.01799-07

PARK, Su H., Ka-Wing FONG, Ezinne MONG, M. Cynthia MARTIN, Gary E. SCHILTZ a Jindan YU. Going beyond Polycomb: EZH2 functions in prostate cancer. *Oncogene* . 2021, **40**(39), 5788-5798 . ISSN 0950-9232. doi:10.1038/s41388-021-01982-4

PARWANI, Anil V, J D KRONZ, E M GENEGA, P GAUDIN, S CHANG a J I EPSTEIN. Prostate Carcinoma With Squamous Differentiation. *The American Journal of Surgical Pathology* . 2004, **28**(5), 651-657. ISSN 0147-5185. doi:10.1097/00000478-200405000-00014

PATRA, Aditi, Moonmoon DEB, Rajvir DAHIYA et Samir Kumar PATRA. 5-Aza-2'-deoxycytidine stress response and apoptosis in prostate cancer. *Clinical Epigenetics* . 2011, **2**(2), 339-348. ISSN 1868-7075. doi:10.1007/s13148-010-0019-x

PELLAKURU, Laxmi G., Tsuyoshi IWATA, Bora GUREL, Denise SCHULTZ, Jessica HICKS, Carlise BETHEL, Srinivasan YEGNASUBRAMANIAN a Angelo M. DE MARZO. Global Levels of H3K27me3 Track with Differentiation in Vivo and Are Deregulated by MYC in Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology* . 2012, **181**(2), 560-569 . ISSN 00029440. doi:10.1016/j.ajpath.2012.04.021

PETER, Madonna R., Misha BILENKY, Alastair DAVIES, et al. Distinct DNA methylation patterns associated with treatment resistance in metastatic castration resistant prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Scientific Reports*. 2021, **11**(1), 25-31. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-021-85812-3

POMERANTZ, Mark M., Xintao QIU, Yanyun ZHU, et al. Distinct DNA methylation patterns associated with treatment resistance in metastatic castration resistant prostate cancer: A Novel Platform to Control

Androgen Receptor Activity. *Nature Genetics*. 2020, **52**(8), 25-31. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-020-0664-8

PRADHAN, Sriharsa, Albino BACOLLA, Robert D. WELLS a Richard J. ROBERTS. Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* . 1999, **274**(46), 33002-33010. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.274.46.33002

QIU, Jun. Growth of human prostate cancer cells is significantly suppressed in vitro with sodium butyrate through apoptosis. *Oncology Reports* . 2011. ISSN 1021-335X. doi:10.3892/or.2011.1470

QUIGLEY, David A., Ha X. DANG, Shuang G. ZHAO, et al. Genomic Hallmarks and Structural Variation in Metastatic Prostate Cancer. *Cell* . 2018, **174**(3), 758-769.e9. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2018.06.039

RAIZIS, A.M., F. SCHMITT a J.P. JOST. A Bisulfite Method of 5-Methylcytosine Mapping That Minimizes Template Degradation. *Analytical Biochemistry* . 1995, **226**(1), 161-166. ISSN 00032697. doi:10.1006/abio.1995.1204

RAMASAMY, Deepa, Arunagiri Kuha DEVA MAGENDHRA RAO, Thangarajan RAJKUMAR a Samson MANI. Non-CpG methylation - a key epigenetic modification in cancer. *Briefings in Functional Genomics* . 2021, **20**(5), 304-311. ISSN 2041-2649. doi:10.1093/bfpg/elab035

RAMNARINE, Varune Rohan, Maxim KOBELLEV, Ewan A. GIBB, et al. The evolution of long noncoding RNA acceptance in prostate cancer initiation, progression, and its clinical utility in disease management: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *European Urology*. 2019, **76**(5), 546-559. ISSN 03022838. doi:10.1016/j.eururo.2019.07.040

RHIE, Suhn Kyong, Andrew A. PEREZ, Fides D. LAY, Shannon SCHREINER, Jiani SHI, Jenevieve POLIN a Peggy J. FARNHAM. A high-resolution 3D epigenomic map reveals insights into the creation of the prostate cancer transcriptome. *Nature Communications* . 2019, **10**(1) . ISSN 2041-1723. doi:10.1038/s41467-019-12079-8

RICE, Meghan A., Sanjay V. MALHOTRA a Tanya STOYANOVA. Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology* . 2019, **9** . ISSN 2234-943X. doi:10.3389/fonc.2019.00801

ROBERTI, Annalisa, Adolfo F. VALDES, Ramón TORRECILLAS, Mario F. FRAGA a Agustin F. FERNANDEZ. Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. *Clinical Epigenetics* . 2019, **11**(1). ISSN 1868-7075. doi:10.1186/s13148-019-0675-4

ROBINSON, Dan, Eliezer M. VAN ALLEN, Yi-Mi WU, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* . 2015, **161**(5), 1215-1228. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2015.05.001

RONDELET, Grégoire, Thomas DAL MASO, Luc WILLEMS a Johan WOUTERS. Structural basis for recognition of histone H3K36me3 nucleosome by human de novo DNA methyltransferases 3A and 3B. *Journal of Structural Biology* . 2016, **194**(3), 357-367. ISSN 10478477. doi:10.1016/j.jsb.2016.03.013

ROTTACH, Andrea, Carina FRAUER, Garwin PICHLER, Ian Marc BONAPACE, Fabio SPADA a Heinrich LEONHARDT. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Research* . 2010, **38**(6), 1796-1804. ISSN 0305-1048. doi:10.1093/nar/gkp1152

RUDEK, Michelle A., Ming ZHAO, Ping HE, Carol HARTKE, Jill GILBERT, Steven D. GORE, Michael A. CARDUCCI a Sharyn D. BAKER. Pharmacokinetics of 5-Azacitidine Administered With Phenylbutyrate in Patients With Refractory Solid Tumors or Hematologic Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* . 2005, **23**(17), 3906-3911. ISSN 0732-183X. doi:10.1200/JCO.2005.07.450

SAHU, Biswajyoti, Marko LAAKSO, Kristian OVASKA, et al. Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *The EMBO Journal*. 2011, **30**(19), 3962-3976. ISSN 02614189. doi:10.1038/emboj.2011.328

SEHRAWAT, Archana, Lina GAO, Yuliang WANG, et al. LSD1 activates a lethal prostate cancer gene network independently of its demethylase function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 2018, **115**(18) . ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1719168115

SELIGSON, David B., Steve HORVATH, Matthew A. MCBRIAN, et al. Global Levels of Histone Modifications Predict Prognosis in Different Cancers. *The American Journal of Pathology* . 2009, **174**(5), 1619-1628. ISSN 00029440. doi:10.2353/ajpath.2009.080874

SHANG, Yongfeng, Molly MYERS a Myles BROWN. Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Molecular Cell* . 2002, **9**(3), 601-610. ISSN 10972765. doi:10.1016/S1097-2765(02)00471-9

SHANKAR, Eswar, Mitali PANDEY, Shiv VERMA, et al. Role of class I histone deacetylases in the regulation of maspin expression in prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis* . 2020, **59**(8), 955-966. ISSN 0899-1987. doi:10.1002/mc.23214

SHI, Qing, Yasheng ZHU, Jian MA, et al. Prostate Cancer-associated SPOP mutations enhance cancer cell survival and docetaxel resistance by upregulating Caprin1-dependent stress granule assembly. *Molecular Cancer* . 2019, **18**(1). ISSN 1476-4598. doi:10.1186/s12943-019-1096-x

SHIH, Jing-Wen, Ling-Yu WANG, Chiu-Lien HUNG, Hsing-Jien KUNG a Chia-Ling HSIEH. Non-Coding RNAs in Castration-Resistant Prostate Cancer: Regulation of Androgen Receptor Signaling and Cancer Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* . 2015, **16**(12), 28943-28978 . ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms161226138

SHOGREN-KNAAK, Michael, Haruhiko ISHII, Jian-Min SUN, Michael J. PAZIN, James R. DAVIE a Craig L. PETERSON. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* . 2006, **311**(5762), 844-847. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1124000

SCHER, Howard I. a Charles L. SAWYERS. Biology of Progressive, Castration-Resistant Prostate Cancer: Directed Therapies Targeting the Androgen-Receptor Signaling Axis. *Journal of Clinical Oncology* . 2005, **23**(32), 8253-826. ISSN 0732-183X. doi:10.1200/JCO.2005.03.4777

SCHRECENGOST, Randy a Karen E. KNUDSEN. Molecular Pathogenesis and Progression of Prostate Cancer. *Seminars in Oncology* . 2013, **40**(3), 244-258. ISSN 00937754. doi:10.1053/j.seminoncol.2013.04.001

SCHÜBELER, Dirk. Function and information content of DNA methylation. *Nature* . 2015, **517**(7534), 321-326. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature14192

SINGAL, Rakesh, Kavitha RAMACHANDRAN, Edna GORDIAN, Carlos QUINTERO et al. Phase I/II Study of Azacitidine, Docetaxel, and Prednisone in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Previously Treated With Docetaxel-Based Therapy. *Clinical Genitourinary Cancer* . 2015, **13**(1), 22-31 . ISSN 15587673. doi:10.1016/j.clgc.2014.07.008

SMITH, David F. a David O. TOFT. Minireview: The Intersection of Steroid Receptors with Molecular Chaperones. *Molecular Endocrinology* . 2008, **22**(10), 2229-2240. ISSN 0888-8809. doi:10.1210/me.2008-0089

STOREBJERG, Tine Maj, Siri H. STRAND, Søren HØYER, et al. Dysregulation and prognostic potential of 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC), and 5-carboxylcytosine (5caC) levels in prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Clinical Epigenetics*. 2018, **10**(1), 3962-3976. ISSN 1868-7075. doi:10.1186/s13148-018-0540-x

SUGIURA, Masahiro, Hiroaki SATO, Manato KANESAKA, et al. Epigenetic modifications in prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *International Journal of Urology*. 2021, **28**(2), 140-149. ISSN 0919-8172. doi:10.1111/iju.14406

TABERLAY, Phillippa C., Joanna ACHINGER-KAWECKA, Aaron T.L. LUN, et al. Three-dimensional disorganization of the cancer genome occurs coincident with long-range genetic and epigenetic alterations. *Genome Research* . 2016, **26**(6), 719-731 . ISSN 1088-9051. doi:10.1101/gr.201517.115

TAHILIANI, Mamta, Kian Peng KOH, Yinghua SHEN, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* . 2009, **324**(5929), 930-935. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1170116

TAKAYAMA, Ken-ichi, Aya MISAWA, Takashi SUZUKI, et al. TET2 repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. *Nature Communications* . 2015, **6**(1). ISSN 2041-1723. doi:10.1038/ncomms9219

TAKEDA, David Y., Sándor SPISÁK, Ji-Heui SEO, et al. A Somatic Acquired Enhancer of the Androgen Receptor Is a Noncoding Driver in Advanced Prostate Cancer. *Cell* . 2018, **174**(2), 422-432.e13. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2018.05.037

TAMBARO, Francesco Paolo, Carmela DELL'AVERSANA, Vincenzo CARAFA, Angela NEBBIOSO, Branka RADIC, Felicetto FERRARA a Lucia ALTUCCI. Histone deacetylase inhibitors: clinical implications for hematological malignancies. *Clinical Epigenetics* . 2010, **1**(1-2), 25-44. ISSN 1868-7075. doi:10.1007/s13148-010-0006-2

TAN, Song a Curt A DAVEY. Nucleosome structural studies. *Current Opinion in Structural Biology* . 2011, **21**(1), 128-136. ISSN 0959440X. doi:10.1016/j.sbi.2010.11.006

TANAKA, Kazuo a Akimitsu OKAMOTO. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . 2007, **17**(7), 1912-1915. ISSN 0960894X. doi:10.1016/j.bmcl.2007.01.040

TIAN, Jing, Soo Ok LEE, Liang LIANG, Jie LUO, Chiung-Kuei HUANG, Lei LI et al. Targeting the Unique Methylation Pattern of Androgen Receptor (AR) Promoter in Prostate Stem/Progenitor Cells with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) Leads to Suppressed Prostate Tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry* . 2012, **287**(47), 39954-39966. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M112.395574

TILLEY, Wayne D., Jacqueline M. BENTEL, James O. ASPINALL, Rosemary E. HALL a David J. HORSFALL. Evidence for a novel mechanism of androgen resistance in the human prostate cancer cell line, PC-3. *Steroids* . 1995, **60**(1), 180-186. ISSN 0039128X. doi:10.1016/0039-128X(94)00031-7

TINDALL, Donald J a Peter E LONERGAN. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis* . 2011, **10**(1). ISSN 1477-3163. doi:10.4103/1477-3163.83937

TOMLINS, Scott A., Bharathi LAXMAN, Saravana M. DHANASEKARAN, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* . 2007, **448**(7153), 595-599. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature06024

TONG, Dali. Unravelling the molecular mechanisms of prostate cancer evolution from genotype to phenotype. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* . 2021, **163**. ISSN 10408428. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103370

TRUONG, Matthew, Bing YANG, Jennifer WAGNER, et al. Analysis of promoter non-CG methylation in prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Epigenomics*. 2013, **5**(1), 65-71. ISSN 1750-1911. doi:10.2217/epi.12.67

TSAI, Harrison K., Jonathan LEHRER, Mohammed ALSHALALFA, Nicholas ERHO, Elai DAVICIONI a Tamara L. LOTAN. Gene expression signatures of neuroendocrine prostate cancer and primary small cell prostatic carcinoma. *BMC Cancer* . 2017, **17**(1). ISSN 1471-2407. doi:10.1186/s12885-017-3729-z

UNOKI, M, J D KELLY, D E NEAL, B A J PONDER, Y NAKAMURA a R HAMAMOTO. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *British Journal of Cancer* . 2009, **101**(1), 98-105. ISSN 0007-0920. doi:10.1038/sj.bjc.6605123

URBANUCCI, Alfonso, Ian G. MILLS, Jennifer WAGNER, et al. Bromodomain-containing proteins in prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018, **462**(1), 31-40. ISSN 03037207. doi:10.1016/j.mce.2017.06.007

URBANUCCI, Alfonso, Saara MARTTILA, Olli A. JÄNNE, et al. Androgen receptor overexpression alters binding dynamics of the receptor to chromatin and chromatin structure: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *The Prostate*. 2012, **72**(11), 1223-1232. ISSN 02704137. doi:10.1002/pros.22473

URBANUCCI, Alfonso, Stefan J. BARFELD, Ville KYTÖLÄ, et al. Androgen receptor overexpression alters binding dynamics of the receptor to chromatin and chromatin structure: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cell Reports*. 2017, **19**(10), 1223-1232. ISSN 22111247. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.049

UUSI-MÄKELÄ, J., AFYOUNIAN, E., TABARO, F., HÄKKINEN, T et al (2020). Chromatin accessibility analysis uncovers regulatory element landscape in prostate cancer progression. doi.:10.1101/2020.09.08.287268

VANDIVER, Amy R., Adrian IDRIZI, Lindsay RIZZARDI, Andrew P. FEINBERG a Kasper D. HANSEN. DNA methylation is stable during replication and cell cycle arrest. *Scientific Reports* . 2016, **5**(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep17911

VANOOSTEN, Rebecca L., James K. EAREL a Thomas S. GRIFFITH. Histone deacetylase inhibitors enhance Ad5-TRAIL killing of TRAIL-resistant prostate tumor cells through increased caspase-2 activity. *Apoptosis* . 2007, **12**(3), 561-571. ISSN 1360-8185. doi:10.1007/s10495-006-0009-9

VARAMBALLY, Sooryanarayana, Saravana M. DHANASEKARAN, Ming ZHOU, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Nature*. 2002, **419**(6907), 624-629. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature01075

VISAKORPI T, E HYYTINEN, KOIVISTO P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995;9:401–6.

WADE, Cameron a Natasha KYPRIANOU. Profiling Prostate Cancer Therapeutic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* . 2018, **19**(3). ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms19030904

WADOSKY, Kristine M. a Shahriar KOOCHEKPOUR. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget* . 2017, **8**(11), 18550-18576. ISSN 1949-2553. doi:10.18632/oncotarget.14537

WALTON, T.J., G. LI, R. SETH, S.E. MCARDLE, M.C. BISHOP a R.C. REES. DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *The Prostate* . 2008, **68**(2), 210-222. ISSN 02704137. doi:10.1002/pros.20673

WANG, Hung-Jung, Mamata POCHAMPALLI, Ling-Yu WANG, et al. KDM8/JMJD5 as a dual coactivator of AR and PKM2 integrates AR/EZH2 network and tumor metabolism in CRPC: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Oncogene*. 2019, **38**(1), 17-32. ISSN 0950-9232. doi:10.1038/s41388-018-0414-x

WANG, Qianben, Jason S. CARROLL a Myles BROWN. Spatial and Temporal Recruitment of Androgen Receptor and Its Coactivators Involves Chromosomal Looping and Polymerase Tracking. *Molecular Cell* . 2005, **19**(5), 631-642. ISSN 10972765. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.018

WANG, Qianben, Wei LI, Yong ZHANG, et al. Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cell*. 2009, **138**(2), 245-256. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2009.04.056

WANG, Zhibin, Chongzhi ZANG, Jeffrey A ROSENFELD, et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics* . 2008, **40**(7), 897-903. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/ng.154

WANG, Zongwei, Tuo DENG, Xingbo LONG, et al. Methylation of SRD5A2 promoter predicts a better outcome for castration-resistant prostate cancer patients undergoing androgen deprivation therapy: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *PLOS ONE*. 2020, **15**(3), 17-32. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0229754

WARNECKE, Peter M, Clare STIRZAKER, Jenny SONG, Christoph GRUNAU, John R MELKI a Susan J CLARK. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* . 2002, **27**(2), 101-107. ISSN 10462023. doi:10.1016/S1046-2023(02)00060-9

WEINBERG, Daniel N., Simon PAPILLON-CAVANAGH, Haifen CHEN, et al. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature* . 2019, **573**(7773), 281-286. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/s41586-019-1534-3

WELTI, Jonathan, Adam SHARP, Nigel BROOKS, et al. Methylation of SRD5A2 promoter predicts a better outcome for castration-resistant prostate cancer patients undergoing androgen deprivation therapy: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cancer Discovery*. 2021, **11**(5), 17-32. ISSN 2159-8274. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0751

WU, Hsi-Chin, Jer-Tsong HSIEH, Martin E. GLEAVE, Nicholas M. BROWN, Sen PATHAK a Leland W. K. CHUNG. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: Role of bone stromal cells. *International Journal of Cancer* . 1994, **57**(3), 406-412 . ISSN 00207136. doi:10.1002/ijc.2910570319

WYSOCKA, Joanna. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Bioscience* . 2006, **11**(1). ISSN 10939946. doi:10.2741/1802

XI, Yang, Zhuang JING, Wu WEI, Zhang CHUN, Qi QUAN, Zhou QING, Xu JIAMIN a Han SHUWEN. Inhibitory effect of sodium butyrate on colorectal cancer cells and construction of the related molecular network. *BMC Cancer* . 2021, **21**(1). ISSN 1471-2407. doi:10.1186/s12885-021-07845-1

XU, Jin a Yun QIU. Role of androgen receptor splice variants in prostate cancer metastasis. *Asian Journal of Urology* . 2016, **3**(4), 177-184 . ISSN 22143882. doi:10.1016/j.ajur.2016.08.003

XU, Kexin, Zhenhua Jeremy WU, Anna C. GRONER, et al. Targeting the p300/CBP Axis in Lethal Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Science*. 2012, **338**(6113), 1118-1137. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1227604

XU, Lingfan, Junyi CHEN, Weipeng LIU, Chaozhao LIANG, Hailiang HU a Jiaoti HUANG. Targeting androgen receptor-independent pathways in therapy-resistant prostate cancer. *Asian Journal of Urology* . 2019, **6**(1), 91-98. ISSN 22143882. doi:10.1016/j.ajur.2018.11.002

XU, Songhui, Lingling FAN, Hee-Young JEON, et al. P300-Mediated Acetylation of Histone Demethylase JMJD1A Prevents Its Degradation by Ubiquitin Ligase STUB1 and Enhances Its Activity in Prostate Cancer. *Cancer Research* . 2020, **80**(15), 3074-3087 . ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-0233

YAMADA, Yasutaka, Himisha BELTRAN, Anna C. GRONER, et al. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Current Oncology Reports*. 2021, **23**(2), 1465-1469. ISSN 1523-3790. doi:10.1007/s11912-020-01003-9

YAMADA, Yasutaka a Himisha BELTRAN. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Current Oncology Reports* . 2021, **23**(2) . ISSN 1523-3790. doi:10.1007/s11912-020-01003-9

YAMANAKA, Mikio, Masatoshi WATANABE, Yasushi YAMADA, et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *International Journal of Cancer*. 2003, **106**(3), 382-387. ISSN 0020-7136. doi:10.1002/ijc.11227

YAMANE, Kenichi, Charalambos TOUMAZOU, Yu-ichi TSUKADA, Hediye ERDJUMENT-BROMAGE, Paul TEMPST, Jiemin WONG a Yi ZHANG. JHDM2A, a JmJc-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor. *Cell* . 2006, **125**(3), 483-495. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2006.03.027

YEE, David S., Yaxiong TANG, Xuesen LI, et al. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Molecular Cancer* . 2010, **9**(1) . ISSN 1476-4598. doi:10.1186/1476-4598-9-162

YEGNASUBRAMANIAN, Srinivasan, Masatoshi WATANABE, Yasushi YAMADA, et al. Prostate cancer epigenetics and its clinical implications: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Asian Journal of Andrology*. 2016, **18**(4), 382-387. ISSN 1008-682X. doi:10.4103/1008-682X.179859

YEGNASUBRAMANIAN, Srinivasan, Michael C. HAFFNER, Yonggang ZHANG, et al. DNA Hypomethylation Arises Later in Prostate Cancer Progression than CpG Island Hypermethylation and Contributes to Metastatic Tumor Heterogeneity. *Cancer Research*. 2008, **68**(21), 8954-8967. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6088

YLITALO, Erik Bovinder, Elin THYSELL, Mattias LANDFORS, et al. A novel DNA methylation signature is associated with androgen receptor activity and patient prognosis in bone metastatic prostate cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Clinical Epigenetics*. 2021, **13**(1), 382-387. ISSN 1868-7075. doi:10.1186/s13148-021-01119-0

YU, Jindan, Jianjun YU, Daniel R. RHODES, et al. A Polycomb Repression Signature in Metastatic Prostate Cancer Predicts Cancer Outcome: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cancer Research*. 2007a, **67**(22), 10657-10663. ISSN 0008-5472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2498

YU, Jindan, Qi CAO, Rohit MEHRA, et al. Integrative Genomics Analysis Reveals Silencing of  $\beta$ -Adrenergic Signaling by Polycomb in Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Cancer Cell*. 2007b, **12**(5), 419-431. ISSN 15356108. doi:10.1016/j.ccr.2007.10.016

ZHANG, Jing a Qing ZHONG. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014, **71**(20), 3885-3901. ISSN 1420-682X. doi:10.1007/s00018-014-1656-6

ZHANG, Yajia, Sethuramasundaram PITCHIAYA, Marcin CIEŚLIK, et al. Integrative Genomics Analysis Reveals Silencing of  $\beta$ -Adrenergic Signaling by Polycomb in Prostate Cancer: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Nature Genetics*. 2018, **50**(6), 419-431. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-018-0120-1

ZHAO, Shuai, C. David ALLIS a Gang Greg WANG. The language of chromatin modification in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2021, **21**(7), 413-430. ISSN 1474-175X. doi:10.1038/s41568-021-00357-x

ZHAO, Shuang G., William S. CHEN, Haolong LI, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression: A Novel Platform to Control Androgen Receptor Activity. *Nature Genetics*. 2020, **52**(8), 814-824. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/s41588-020-0648-8

ZHU, Wei-Guo a Gregory OTTERSON. The Interaction of Histone Deacetylase Inhibitors and DNA Methyltransferase Inhibitors in the Treatment of Human Cancer Cells. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2003, **3**(3), 187-199. ISSN 15680118. doi:10.2174/1568011033482440

ZIPPO, Alessio, Riccardo SERAFINI, Marina ROCCHIGIANI, Susanna PENNACCHINI, Anna KREPELOVA a Salvatore OLIVIERO. Histone Crosstalk between H3S10ph and H4K16ac Generates a Histone Code that Mediates Transcription Elongation. *Cell*. 2009, **138**(6), 1122-1136. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2009.07.031

ZORN, Christoph S., Kirk J. WOJNO, Michael T. MCCABE, Rainer KUEFER, Juergen E. GSCHWEND a Mark L. DAY. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Delays Androgen-Independent Disease and Improves Survival in the Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mouse Model of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007, **13**(7), 2136-2143. ISSN 1078-0432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2381

## Internetové zdroje:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02900651>

## 9 SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

### Původní vědecké publikace

FIALOVA, Barbora, Katerina SMESNY TRTKOVA, Lenka PASKOVA, Katerina LANGOVA and Zdenek KOLAR. **Effect of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors on the expression of the androgen receptor gene in androgen-independent prostate cancer cell lines.** *Oncology Reports*. 2013, **29**(5), 2039-2045. IF: 2,555

FIALOVA, Barbora, Petra LUZNA, Jan GURSKY, Katerina LANGOVA, Zdenek KOLAR and Katerina SMESNY TRTKOVA. **Epigenetic modulation of AR gene expression in prostate cancer DU145 cells with the combination of sodium butyrate and 5'-Aza-2'-deoxycytidine.** *Oncology Reports*. 2016, **36**(4), 2365-2374. IF: 2,892

PASKOVA, Lenka, Katerina SMESNY TRTKOVA, Barbora FIALOVA, Andrea BENEDIKOVA, Katerina LANGOVA and Zdenek KOLAR. **Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells.** *Toxicology in Vitro* . 2013, **27**(5), 1489-1495. IF: 3,444

### Seznam posterů a přednášek

**Poster:** *DNA Methylation Analysis of AR Gene in Androgen Independent Prostate Cancer Cell Lines.* **B. Fialova**, L. Paskova, Z. Kolar, K. Trtkova, 6<sup>th</sup> Biennial World Congress on Men's Health, 9. – 11. 9. 2009, Vídeň, Rakousko

**Přednáška:** *Metylace potenciálního tumor-supresorového genu ZNF185 a genu AR u benigní a nádorové tkáně prostaty (pilotní studie).* **B. Fialová**, K. Trtková a Z. Kolář, XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, 22. - 24. 4. 2010, Brno

**Poster:** *Methylation of androgen receptor promoter gene in prostate cancer cells.* **B. Fialova**, L. Paskova, Z. Kolar, K. Smesny Trtkova, XXVIII<sup>th</sup> International Congress of the



International Academy of Pathology, 10. – 15. 10. 2010, Sao Paulo, Brazílie (účast v zastoupení školitelkou Ing. K. S. Trtkovou, CSc.)

**Přednáška:** *Metylace DNA genu androgenového receptoru v prostatických nádorových buňkách DU145 a PC3 po ovlivnění 5-Aza-2'-deoxycytidinem a butyrátem sodným.* **B. Fialová**, K. Trtková, T. Jamaspishvili, Z. Kolář, Konference vědeckých prací studentů DSP, 2011, Olomouc

**Přednáška:** *Detekce aberantní metylace genů AR a ZNF185 z tkání (FFPE) v různých vývojových stádiích karcinomu prostaty metodou Nested Methylation-Specific PCR (N-MSP).* **B. Fialová**, K. Sikorová, K. Trtková, 19. – 21. 4. 2012, XXXVI. Brněnské onkologické dny a XXVI. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, Brno

**Přednáška:** *Metylace DNA genu androgenového receptoru v prostatických nádorových buňkách DU145 a PC3 po ovlivnění 5-Aza-2'-deoxycytidinem a butyrátem sodným.* **B. Fialová**, K. Smešný Trtková, L. Pašková, Z. Kolar, Konference vědeckých prací studentů DSP, 30. 11. 2012, Drnovice

**Poster:** *The effect of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors on expression of androgen receptor gene in androgen-independent prostate cancer cell lines.* **B. Fialova**, L. Paskova, Z. Kolar, K. Smesny Trtkova, 12<sup>th</sup> Annual Congress of the Belgian Association of Urology, 7. a 8. 12. 2012, Brusel, Belgie

**Poster:** *Epigenetic modulation of the androgen receptor gene expression.* **B. Fialova**, L. Paskova, Z. Kolar, K. Smesny Trtkova, 25<sup>th</sup> European Congress of Pathology, 31. 8 - 4. 9. 2013, Lisabon, Portugalsko

**Přednáška:** *Expres androgenového receptoru u normálních a nádorových buněk prostaty ovlivněných látkami indukující epigenetické změny.* **B. Fialová**, Z. Kolar, K. Langova, K. Smesny Trtkova, 11. sympóziu molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelekárskych pracovníkov v patológii, 4. a 5. 6. 2015, Martin, Slovensko

**Poster:** *AR gene expression changes after epigenetic inhibitors treatment in normal and prostate cancer cell lines.* **B. Fialova**, L. Paskova, Z. Kolar, K. Smesny Trtkova, 27<sup>th</sup> European Congress of Pathology, 5. - 9. 9. 2015, Bělehrad, Srbsko

## 10 PŘÍLOHY

### Příloha č. 1

FIALOVA, Barbora, Katerina SMESNY TRTKOVA, Lenka PASKOVA, Katerina LANGOVA and Zdenek KOLAR. **Effect of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors on the expression of the androgen receptor gene in androgen-independent prostate cancer cell lines.** *Oncology Reports*. 2013, **29**(5), 2039-2045. IF: 2,555

Příloha č. 2

FIALOVA, Barbora, Petra LUZNA, Jan GURSKY, Katerina LANGOVA, Zdenek KOLAR and Katerina SMESNY TRTKOVA. **Epigenetic modulation of AR gene expression in prostate cancer DU145 cells with the combination of sodium butyrate and 5'-Aza-2'-deoxycytidine.** *Oncology Reports.* 2016, **36**(4), 2365-2374. IF: 2,892

Příloha č. 3

PASKOVA, Lenka, Katerina SMESNY TRTKOVA, Barbora FIALOVA, Andrea BENEDIKOVA, Katerina LANGOVA and Zdenek KOLAR. **Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells.** *Toxicology in Vitro* . 2013, **27**(5), 1489-1495. IF: 3,444