

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Durďáková Magdalena

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Polymorfismus 1. exonu androgenového
receptoru v tkáňových vzorcích pacientů
s nádorem prostaty**

Bakalářská práce

Durd'áková Magdalena

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Polymorfismus 1. exonu androgenového receptoru v tkáňových vzorcích pacientů s nádorem prostaty zpracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc..

V Olomouci dne:

.....

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za věnovaný čas a trpělivost v průběhu psaní bakalářské práce, a také kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP v Olomouci.

SOUHRN

Prostata je žláza mužského reprodukčního systému, jež je regulována androgeny. Buněčná odpověď androgenů je zprostředkovávána prostřednictvím androgenového receptoru. Avšak gen pro androgenový receptor je velmi polymorfní, a právě tyto odlišnosti mohou ovlivnit i buněčnou odpověď na androgeny. Výsledkem může být abnormální růst a vývoj prostaty až vznik adenokarcinomu. Cílem mnoha dnešních výzkumů je najít citlivý a specifický marker, který by umožnil předpovědět budoucí rozvoj karcinomu, a mohla tak být zahájena včasná léčba.

Tato bakalářská práce se zabývá detekcí jednonukleotidového polymorfismu G1733A lokalizovaného do oblasti 1. exonu genu androgenového receptoru, jenž spočívá v záměně třetího nukleotidu guaninu ve 211. tripletu AGG za nukleotid adenin. V některých studiích je právě výskyt této menšinové alely A spojován s vyšším rizikem vzniku rakoviny prostaty. Detekce polymorfismu byla provedena pomocí analýzy délkového polymorfismu restričních fragmentů amplifikovaných úseků DNA izolovaných z tkáňových vzorků pacientů s rakovinou prostaty. Ve vzorcích nenádorové tkáně byla detekována ve 24 % alela A, naproti tomu ve vzorcích tkáně nádorové byla alela A detekována ve 40,7 % případů. Tyto výsledky tedy naznačují možné spojení mezi alelou A a možností výskytu rakoviny prostaty.

SUMMARY

The prostate is a gland of a sexual system of men, which is regulated by androgens. These hormones work through androgen receptor, which mediates an answer of a cell. The gene for the androgen receptor is highly polymorphic and these differences can influence cell answer to the androgens. A result of this polymorphism can be an abnormal growth and development of the prostate, even the formation of prostate cancer. The aim of many present researches is to find a sensitive marker, which could predict a development of adenocarcinoma and an early therapy could be initiated.

This bachelor work is focused on a detection of the single nucleotide polymorphism G1733A which is located in the 1st exon of the androgen receptor. This polymorphism is based on substitution of the third nucleotide guanine in a 211th codon AGG by adenine. In some studies is an occurrence of the allele A connected with higher risk of development of the prostate cancer. For a detection of the polymorphism, the analysis of restriction fragment length polymorphism was used. DNA, which was isolated from tissues samples of patients, was used.

In samples of a tumoral cancer, allele A was detected in a 40,7 % cases, whereas in a nontumoral cancer, allele A was detected in a 24 % cases. These results denote some connection between allele A and a formation of prostate cancer.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍLE PRÁCE.....	10
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1	Prostata.....	11
3.1.1	Stavba prostatické tkáně ve vztahu k androgenovému receptoru	11
3.2	Androgenový receptor	12
3.2.1	Struktura genu pro androgenový receptor	12
3.2.1.1	N-koncová doména (NTD).....	13
3.2.1.2	DNA-vazebná doména (DBD)	13
3.2.1.3	Ligand-vazebná doména (LBD).....	14
3.2.1.4	Oblast hinge region (H).....	14
3.2.2	Ligandy	14
3.2.2.1	Endogenní ligandy.....	14
3.2.2.2	Exogenní ligandy.....	15
3.2.3	Mechanismus účinku	15
3.2.4	Úloha androgenového receptoru v prostatě	17
3.2.5	Polymorfismus AR	17
3.2.5.1	Polymorfismus exonu 1	17
3.2.5.1.1	Repetice CAG	18
3.2.5.1.2	Repetice GGC	20
3.2.5.1.3	Jednonukleotidový polymorfismus	21
3.3	Rakovina prostaty	22
3.3.1	Diagnostika	22
3.3.1.1	Prostatický specifický antigen (PSA).....	23

3.3.1.2	Gleasonovo skóre	23
3.3.2	Stádia rakoviny prostaty	23
4	MATERIÁL A METODY	25
4.1	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	25
4.2	Použité chemikálie a roztoky	25
4.3	Biologický materiál.....	26
4.4	Izolace DNA	26
4.5	Amplifikace PCR (Hot-start)	27
4.6	Analýza RFLP.....	29
4.7	Příprava 3% agarózového gelu a vyhodnocení produktů PCR a analýzy RFLP .	30
5	VÝSLEDKY	32
6	DISKUZE	40
7	ZÁVĚR	42
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52

1 ÚVOD

Prostata nazývaná také jako předstojná žláza je mužský pohlavní orgán. Ve vývoji a funkci prostaty hrají velkou roli androgeny, jejichž účinek je zprostředkováván skrz androgenový receptor. Androgenový receptor je ligandy aktivovaný transkripční faktor, jehož gen je velmi polymorfní. Tento polymorfismus však ovlivňuje transkripční aktivitu androgenového receptoru, a tudíž je jedním z diskutovaných příčin vzniku nádorového bujení.

V posledních letech mužů s rakovinou prostaty přibývá, proto je velmi důležité najít markery, které by sloužily pro prognózu vývoje nádorového onemocnění. V současnosti však neexistuje marker, který by byl zaručeně citlivý a specifický pro včasný nález karcinomu prostaty a léčba rakoviny v pokročilém stádiu již velmi často nevede k úspěšnému vyléčení, ale pouze k oddálení závažnějších stádií nemoci.

Tato bakalářská práce pojednává o detekci jednoho ze tří polymorfismů lokalizovaných v 1. exonu androgenového receptoru. Jednonukleotidový polymorfismus G1733A spočívá v záměně třetího nukleotidu guaninu 211. kodonu AGG za nukleotid adenin. Alela A je v mnoha studiích spojována s vyšším rizikem vzniku rakoviny prostaty s potenciálem možného markeru tohoto onemocnění. Avšak tato hypotéza nebyla ještě dosud jednoznačně potvrzena. Polymorfismus genu androgenového receptoru se liší také v různých lidských populacích a s tím je spjato i rozdílné riziko vzniku karcinomu.

2 CÍLE PRÁCE

- Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma.
- Izolace DNA ze vzorků tkáňových biopsií.
- PCR amplifikace polymorfního úseku genu androgenového receptoru.
- Detekce SNP (*single nucleotide polymorphism*) pomocí analýzy RFLP.

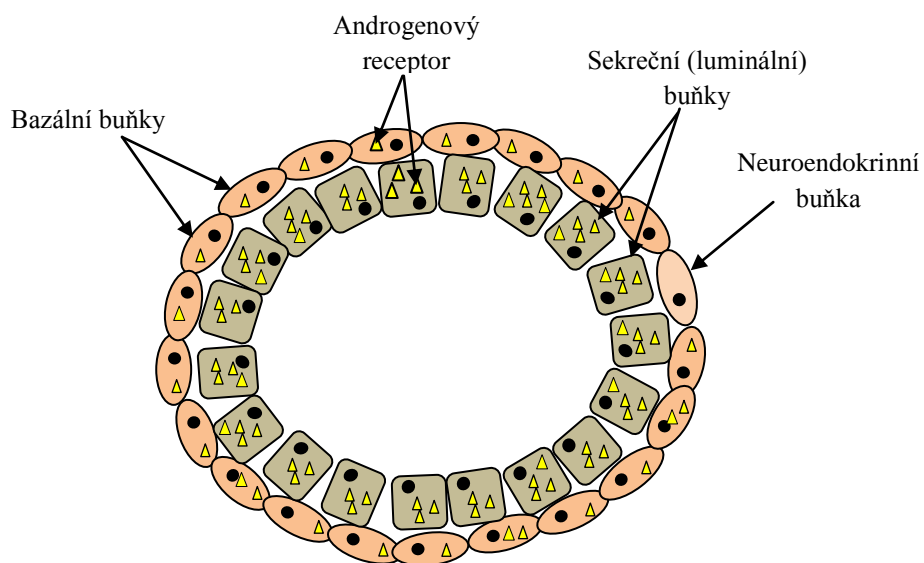
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Prostata

Prostata je orgán v mužském pohlavním systému tvořený souborem žlázek. Nachází se v urogenitální dutině, těsně pod močovým měchýřem. Skrz prostatu prochází močová trubice, a proto často bývá prostata důvodem vzniku problémů s močením. Dochází zde k syntéze nezbytných komponentů ejakulátu, které vyúsťují do močové trubice a mísí se se spermatem.

3.1.1 Stavba prostatické tkáně ve vztahu k androgenovému receptoru

Prostatu tvoří 3 hlavní typy buněk: bazální, sekreční (luminální) a neuroendokrinní buňky (Obr. 1). V bazálních buňkách je nízké množství androgenového receptoru (AR) (Bonkhoff *et* Remberger, 1996), a proto nejsou tyto buňky na androgenech zcela závislé. Naproti tomu v sekrečních buňkách dochází k expresi velkého množství AR a v závislosti na přítomnosti androgenů také k sekreci prostatického specifického antigenu (PSA). Funkce těchto buněk je tedy značně podmíněna androgeny (Collins *et* Maitland, 2006). Naopak v neuroendokrinních buňkách se AR nevyskytuje, avšak prostřednictvím jejich parakrinní signalizace dochází ke stimulaci proliferace sekrečních buněk (Abate-Shen *et* Shen, 2000).



Obr. 1: Stavba prostatické tkáně (upraveno dle Abate-Shen *et* Shen, 2000).

3.2 Androgenový receptor

Androgenový receptor (AR) náleží do skupiny steroidních receptorů. Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor. Je klasifikován jako NR3C4 (Lu *et al.*, 2006). Nachází se ve všech tkáních mimo slezinu, avšak nejvíce je přítomen v mužské předstojné žláze - prostatě, dále pak v nadledvinách a nadvarlatech (Cude *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 1996).

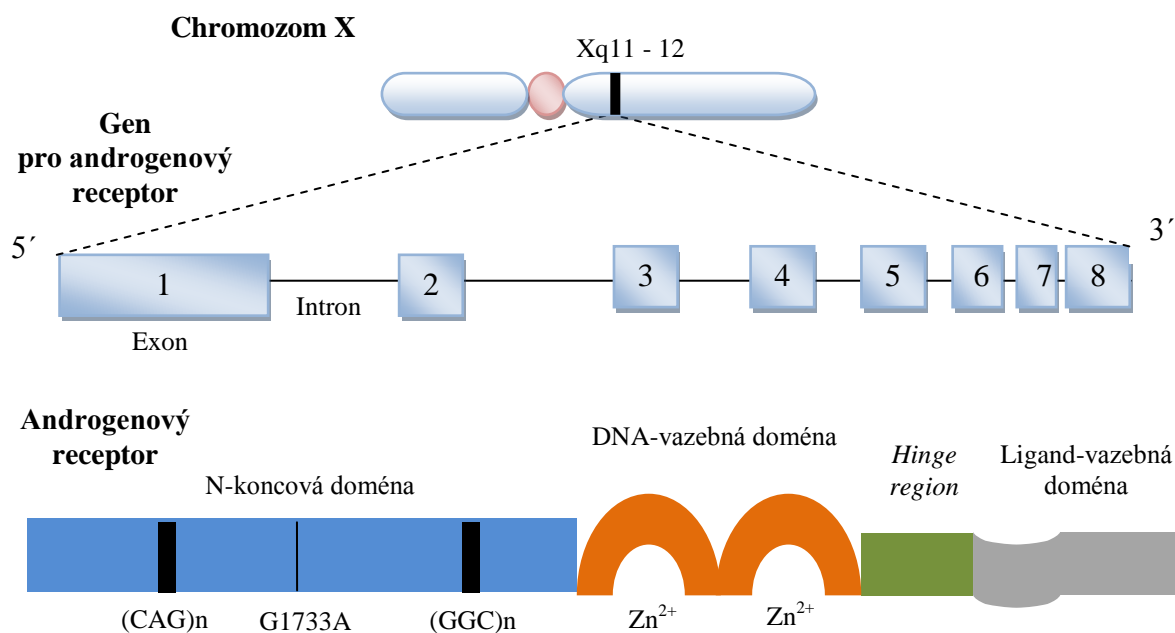
Ligandem androgenového receptoru jsou androgeny, které aktivují geny zodpovědné za vznik mužského pohlaví. Během dospívání a v dospělosti ovlivňuje AR u mužů zejména spermatogenezi, svalovou hmotu a růst prostaty.

3.2.1 Struktura genu pro androgenový receptor

Gen pro AR je lokalizován na dlouhém raménku 21. chromozomu X nedaleko centromery v oblasti Xq11 - 12 (Brown *et al.*, 1989). Gen o délce cca 90 kb kóduje produkt o velikosti přibližně 99 kDa. Vzniklý protein obsahuje asi 920 aminokyselin.

Gen pro AR je tvořen 8 exony, které kódují odlišné funkční motivy následně vzniklého proteinu. Exon 1 kóduje N-koncovou doménu (NTD, *N-terminal domain*), exon 2 a 3 kódují DNA-vazebnou doménu (DBD, *DNA-binding domain*), část exonu 4 kóduje oblast *hinge region* (H) a zbývají část exonu 4 spolu s exonem 5, 6, 7 a 8 kódují signální molekulu (tzv. ligand) vazebnou doménu (LBD, *ligand-binding domain*) (Obr. 2) (Gelman, 2002).

AR vlastní 2 aktivační domény. Aktivační doména 1 (AF-1, *activation function 1*) se nachází v NTD a jedná se o nejdelší a nejvíce variabilní část genu pro AR. Délka a pořadí aminokyselin v NTD se u AR liší dle místa lokalizace v organismu (Jenster *et al.*, 1995). Aktivační doména 2 (AF-2, *activation function 2*) se nachází v LBD. Zde se váží ligandy na základě hydrofóbních interakcí. Pokud není přítomna LBD, je AF1 konstitutivně aktivní a dokáže tento chybějící úsek plně nahradit (Evans, 1988; Gao *et al.*, 2005; MacLean *et al.*, 1997;).



Obr. 2: Lokalizace genu pro androgenový receptor na chromozomu X, struktura genu pro androgenový receptor a struktura proteinu androgenového receptoru (upraveno dle Gelmann, 2002).

3.2.1.1 N-koncová doména (NTD)

Hlavní funkcí N-koncové domény je regulace transkripce cílového genu prostřednictvím interakce s transkripčními faktory. Téměř celý úsek NTD je nezbytný pro plnou aktivitu receptoru.

V této doméně se nachází velké množství CAG a GGC repetit. Počet těchto repetit je velmi polymorfní (Brinkmann *et al.*, 1989). Blíže 5' konci exonu 1 se nachází oblast repetit CAG. Naopak blíže 3' konci exonu 1 je lokalizována oblast repetit GGC. Mezi těmito repeticemi se nachází jednonukleotidový polymorfismus G1733A.

Do NTD se mohou dále vázat koaktivátory, které zesilují transkripční signál (Bevan *et al.*, 1999).

3.2.1.2 DNA-vazebná doména (DBD)

DNA-vazebná doména obsahuje 70 aminokyselin a 8 cysteinových zbytků, jež formují 2 komplexy. Každý z komplexů je složen ze 4 cysteinů vázajících se na jeden Zn²⁺ iont. Vzniká struktura tzv. zinečnatých prstů. První komplex se váže

do oblasti na androgen-odpovídající element (ARE, *androgen response element*) cílového genu, zatímco druhý je zodpovědný za stabilitu vázajícího se komplexu (Hard *et al.*, 1990). DBD tedy určuje specifické sekvence cílových genů, do kterých se AR bude vázat.

Dále je tato doména důležitá pro transkripční aktivitu receptoru, jaderný transport (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989) a dimerizaci androgenového receptoru (Kumar *et al.*, 1988).

3.2.1.3 Ligand-vazebná doména (LBD)

Ligand-vazebná doména se skládá do 12 šroubovic formujících místo pro vazbu ligandu. Dojde-li k vazbě AR s ligandem, těchto 12 šroubovic signální molekulu uzavře (Jenster *et al.*, 1991).

3.2.1.4 Oblast hinge region (H)

Oblast *hinge region* ovlivňuje přenos proteinu z cytoplazmy do jádra (Simental *et al.*, 1991).

3.2.2 Ligandy

Funkce androgenového receptoru je závislá na vazbě ligandů, jež iniciují konformační změny androgenového receptoru. Dochází k celé kaskádě dějů vedoucích až k interakci AR s cílovou DNA.

Ligandy androgenového receptoru jsou endogenního (vznikají v těle přirozeně) ale i exogenního (uměle nasyntetizované) charakteru.

3.2.2.1 Endogenní ligandy

Mezi hlavní endogenní ligandy AR patří androgen testosteron a jeho aktivovaný metabolit 5 α -dihydrotestosteron (5 α -DHT). Na rozdíl od 5 α -DHT se testosteron váže, třebaže s nízkou afinitou, i na ostatní steroidní receptory jako například estrogenový nebo progesteronový receptor. 5 α -DHT se ve srovnání s testosteronem vyznačuje mnohem větší afinitou k AR (Lindzey *et al.*, 1994). Zhruba 25 % 5 α -DHT vzniká ve varlatech, ale většina je působením 5 α -reduktázy II přeměněna z testosteronu.

5 α -DHT rovněž znásobuje androgenovou aktivitu testosteronu (Thigpen *et al.*, 1993) a ovlivňuje například růst vlasů, vousů, ochlupení, akné, zvětšení prostaty, aj. (Singh *et al.*, 2000).

Androgeny dále ovlivňují buněčnou proliferaci, modulují programovanou buněčnou smrt - apoptózu (Geck *et al.*, 1997) anebo kontrolují produkci sekrečního proteinu PSA (prostatický specifický antigen) (Nelson *et al.*, 2002).

3.2.2.2 *Exogenní ligandy*

Exogenní ligandy jsou nejvíce využívány v klinické praxi. Nejprve byly syntetizovány steroidní struktury podobné endogenním androgenovým ligandům, avšak dnes již existují i ligandy nesteroidní povahy. Velkou výhodou nesteroidních ligandů je jejich vysoká specifita k AR. Naproti tomu u steroidních syntetických ligandů dochází k vedlejším anabolickým efektům ovlivňujících například svalstvo, kosti, atd.

Mezi nejvýznamnější zástupce exogenních syntetických ligandů patří 17 α -metyltesteron, propionát, nandrolon, aj. (Gao *et al.*, 2005).

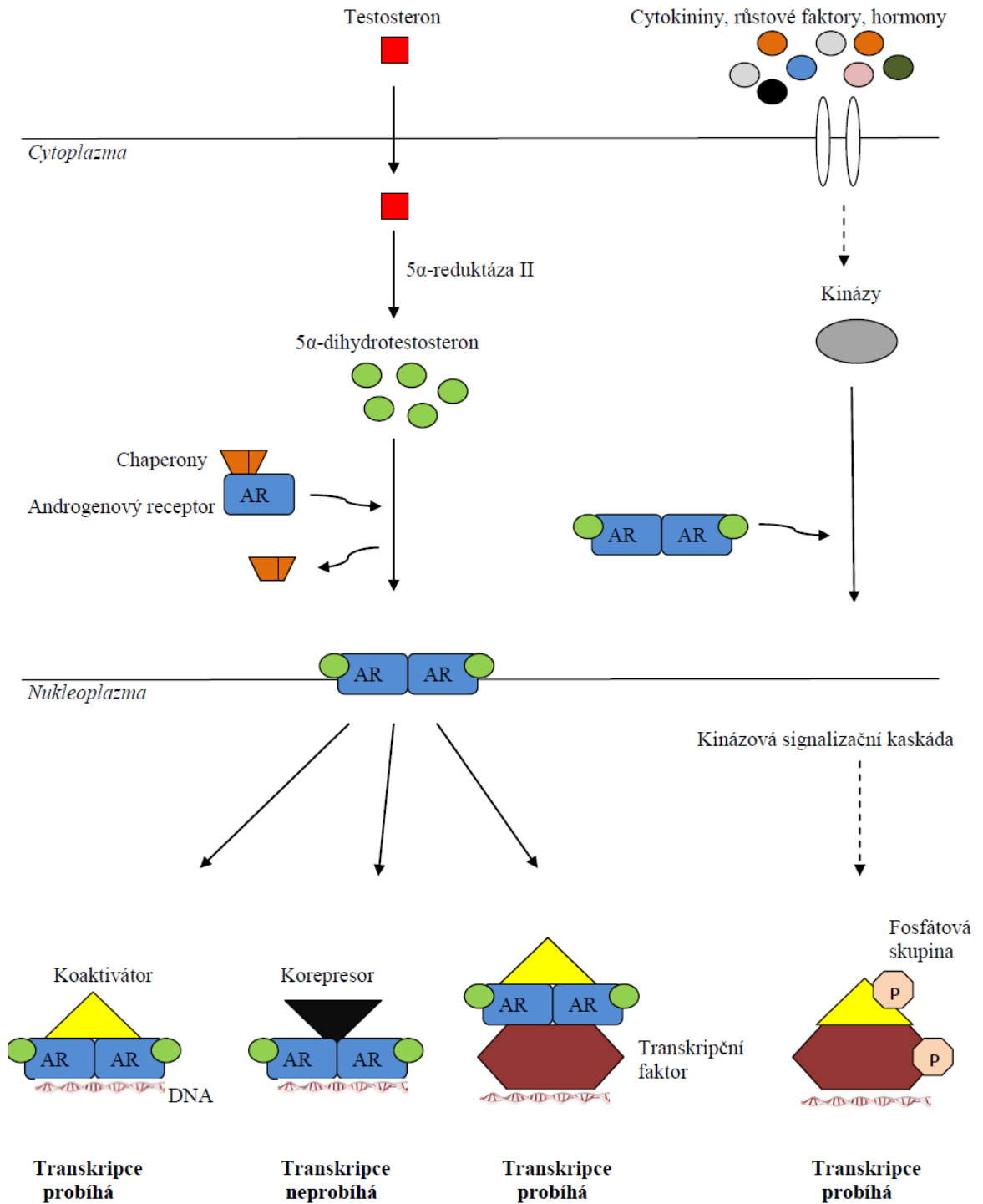
3.2.3 **Mechanismus účinku**

Androgenový receptor se v inaktivním stavu nachází v cytoplazmě, kde je ve vazbě s chaperonovými proteiny. Transkripční aktivita AR je regulována koaktivátory a korepresory, které ovlivňují schopnost AR vázat se na cílovou DNA (Gregory *et al.*, 2001).

V buňkách dochází k přeměně testosteronu na 5 α -DHT, který se váže na AR, a tak iniciuje konformační změny androgenového receptoru a disociaci chaperonů. Dochází k homodimerizaci (Khorasanizadeh *et Rastinejad*, 2001) a mnohdy i k fosforylaci AR. Poté komplex tvořený androgenovým receptorem s navázaným 5 α -DHT přechází do jádra a reguluje transkripci několika možnými způsoby (Obr. 3).

Prvním způsobem je navázání komplexu na cílovou DNA do oblasti na androgen odpovídajících elementů ARE a napojení různých koaktivátorů, které přestaví chromatin tak, aby mohla být zahájena transkripce. Dalším způsobem je navázání korepresorů, které inhibují přepis daného genu. AR také reguluje transkripci spojením s jinými transkripční faktory za účasti koaktivátorů. Poslední možností je interakce

komplexu hormon-receptor s kinázami. Výsledkem této reakce je aktivace kinázové kaskády, jež aktivuje další transkripční faktory (Shafi *et al.*, 2013).



Obr. 3: Mechanismus účinku androgenového receptoru
(upraveno dle Shafi *et al.*, 2013).

3.2.4 Úloha androgenového receptoru v prostatě

Androgenový receptor reguluje expresi genů, které jsou nezbytné pro zdravý vývoj a funkci prostaty. Ovlivňuje proliferaci, životnost a diferenciaci buněk, avšak může mít i inhibiční funkci (Niu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009). Vrozené dysfunkce AR u mužů způsobují poruchy ve vývoji prostaty, jelikož AR může regulovat geny, jejichž produkty ovlivňují buněčný cyklus, jako například CDK2, CDK4 a p16 (Lu *et al.*, 1997). Androgeny tedy prostřednictvím AR hrají velkou roli v normálním, ale i v maligním vývoji prostatických buněk (Coetzee *et al.*, 1994).

3.2.5 Polymorfismus AR

Genetickým polymorfismem se rozumí existence dvou nebo více variant genotypů, přesahující svým výskytem 1 % výskytu v téže populaci. Příčinou však nejsou opakovaně probíhající mutace (Cammack *et al.*, 2006).

Polymorfismus AR může přispívat ke zvýšené expresi tohoto proteinu, a tím ovlivnit proliferaci buněk a jejich možnou transformaci v buňky nádorové.

3.2.5.1 Polymorfismus exonu 1

Aktivita AR spočívá v N-koncové doméně. Tato doména obsahuje dvě trinukleotidové repetice CAG a GGC (Brinkmann *et al.*, 1989), jejichž polymorfismus spočívá v jejich délce, a jeden jednonukleotidový polymorfismus AGG (Obr. 4) (Lu *et al.*, 1996). Délka genu pro AR se tedy může lišit z důvodu různého počtu repetitivních CAG a GGC (Edwards *et al.*, 1992).

Polymorfismus exonu 1 je studován pro možné spojení se vznikem rakoviny prostaty. Avšak zatímco některé studie potvrdily zvýšené riziko vzniku rakoviny u krátkých repetitivních CAG nebo GGC, (Akinloye *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2003), jiné studie toto spojení popřely (Lange *et al.*, 2008; Lindström *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010).

5' ATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCCTCGGCCGCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTTCC
AGAATCTGTTCCAGAGCGTGC CGGAAGTGATCCAGAACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGC
ACCTCCC GGCGCCAGTTTGCTGCTGCTG CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
CAGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGTGAGGATGGTTCTCCCAAGCCC
ATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCTGGATGAGGAACAGCAACCTTCACAGCCGCAGTGGGCCCCGGA
GTGCCACCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTGGAGCCGCGTGGCCGCCAGCAAGGGGCTGCCGCAGCAG
CTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCCTGCTGGGCCCCACTTTCCCCG
GCTTAAGCAGCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCTGAGCGAGGCCAGCACCATGCAACTCCTTCAGCAACA
GCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCAGCAGCAGCGGGAGAGCGAGGAGCAGCGCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCC
AAGGACAATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTTCTGACAACGCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAGTGTGCGGTGT
CCATGGGCGTGGTGTGGAGGCGTGGAGCATCTGAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGC
CCCACTTTTGAGGTTCCACCCGCTGTGCGTCCCACCTTGTGCCCCATTGGCCGAATGCAAAGGTTCTCTG
CTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGCTGAGTATTCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAG
GGCTAGAAGGCGAGAGCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGA ACTGCCGTC
TACCCTGTCTCTTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGCTGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACA ACTTT
CCACTGGCTCTGGCCGACCGCCGCCCCCTCCGCGCCTCCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAGAACC
CGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGC CGCAGTGCCGCTATGGGGACCTGGCGAGCCTGCATGG
CGCGGGTGCAGCGGGACCCGTTCTGGGTACCCTCAGCCGCGCTTCCCTCATCTGGCACACTCTCTTCACA
GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGGTTGGTGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGG
CGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGCGGGGAGGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCCCTCAGGG
GCTGGCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCCTGGCGGCATGGTGAGCAGAGTGCC
TATCCAGTCCCCTTGTGTCAAAGCGAAATGGGCCCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACA
TGCG 3'

Obr. 4: Sekvence nukleotidů 1. exonu lidského genu pro androgenový receptor s vyznačenými polymorfismy: CAG - žlutě, AGG – červeně a GGC – modře (GenBank, *Accession*: M35844).

3.2.5.1.1 Repetice CAG

Triplet CAG kódující aminokyselinu glutamin se v N-kódující oblasti AR nejčastěji vyskytuje v 9 až 29 repeticích (Irvine *et al.*, 1995). U pacientů s rakovinou prostaty je nejfrekventovanější délka 17 repetice CAG (Ding *et al.*, 2004). Jiné studie ale spojení mezi délkou, přesněji počtem repetice CAG, a rizikem vzniku rakoviny prostaty nepotvrdily (Lange *et al.*, 2008; Lindström *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010).

Délka repetice CAG může ovlivňovat transkripční aktivitu AR (Beilin *et al.*, 2000; Chamberlain *et al.*, 1994). Počet repetice CAG souvisí rovněž s výskytem neurodegenerativních onemocnění, jako například svalová atrofie a Huntingtonova

choroba (Choong *et al.*, 1998), ale také s mnoha dalšími nemocemi (Richards *et al.*, 1992).

Menší počet repetitivních CAG

Menší počet repetitivních CAG, tedy kratší úsek polyglutaminu, je spojován s vyšší transkripční aktivitou AR, a tím i s větším rizikem vzniku rakoviny prostaty (Akinloye *et al.*, 2011; Balic *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003). Muži s 19 a méně repetitivními CAG mají také větší riziko vzniku benigní hyperplazie prostaty (BPH) než muži s 25 a více repetitivními (Giovannucci *et al.*, 1999).

Větší počet repetitivních CAG

Bylo zjištěno, že muži s více jak 28 repetitivními CAG mají sklony k poruchám spermatogeneze a mohou se tedy potýkat s neplodností (Tut *et al.*, 1997). Některé studie potvrdily i zvýšenou hladinu testosteronu u mužů s větším počtem repetitivních (Crabbe *et al.*, 2007; Lindström *et al.*, 2010). Souvislost mezi výskytem dlouhých repetitivních a vnímavostí ke vzniku rakoviny prostaty se liší u různých populací, například u mužů žijících v USA bylo zjištěno o 11 % nižší riziko vzniku rakoviny a u mužů žijících v Evropě dokonce nižší o 53 % (Gu *et al.*, 2012). Dále bylo pozorováno spojení mezi dlouhými repetitivními a výskytem rakoviny prostaty u východo-asijské populace (Das *et al.*, 2008).

Rozdíly v počtu repetitivních CAG mezi lidskými rasami

Mnohé studie odhalily mezirasovou různorodost v průměrné délce repetitivních CAG (Tab. I). Například hispánská populace mužů se řadí k populacím s nejvyšším průměrným počtem repetitivních (O'Brien *et al.*, 2004). Čínská populace jako příklad mongoloidní lidské rasy má v průměru větší počet repetitivních než bělošská, tedy europoidní lidská rasa (Hsing *et al.*, 2000). U černošské populace, tedy negroidní lidské rasy, byl naopak zjištěn nejmenší počet, a to v průměru 19 až 20 repetitivních (Irvine *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 2004; Sartor *et al.*, 1999). Právě u černochů dochází k výraznější expresi AR v případě BPH i rakoviny prostaty v porovnání s bělochy, avšak ve zdravé tkáni se úroveň exprese u obou skupin neliší (Gaston *et al.*, 2003; Olapade-Olaopa *et al.*, 2004).

Tab. I: Průměrný počet CAG repetic v N-koncové doméně 1. exonu genu androgenového receptoru u vybraných populací nebo u mužů žijících na určitém území s rakovinou prostaty.

Populace / území	Průměrný počet repetic CAG	Zdroj
Afričani	20,0 ± 3,8	O'Brien <i>et al.</i> , 2004
Afro-Američani	19,8 ± 3,2	O'Brien <i>et al.</i> , 2004
Američtí běloši	22,0 ± 3,2	O'Brien <i>et al.</i> , 2004
Běloši	21,73 ± 3,5	Stanford <i>et al.</i> , 1997
Brazílie	21,8 ± 2,6	Santos <i>et al.</i> , 2003
Černoši	19	Sartor <i>et al.</i> , 1999
Číňané	23	Hsing <i>et al.</i> , 2000
Evropani	21,6 ± 2,9	O'Brien <i>et al.</i> , 2004
Řecko	21,33	Esteban <i>et al.</i> , 2006
Severní Amerika	21,9	Lange <i>et al.</i> , 2000
Spojené království Velké Británie	21	Edwards <i>et al.</i> , 1999
Švédsko	21,7	Bratt <i>et al.</i> , 1999
Turecko	22,59	Esteban <i>et al.</i> , 2006

3.2.5.1.2 Repetice GGC

Mikrosatelitové repetice GGC, nacházející se v úseku 1. exonu androgenového receptoru a kódující aminokyselinu glycin, se obvykle vyskytují v počtu 8 až 30 repetic GGC (Edwards *et al.*, 1992), nejčastěji však v počtu 16 repetic (Irvine *et al.*, 1995). Velmi často se objevuje motiv: (GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n. V porovnání s repeticemi CAG jsou však méně polymorfni.

Podobně jako u repetic CAG, i v případě repetic GGC některé studie potvrdily vztah mezi jejich délkou, transkripční aktivitou a vnímavostí k rakovině prostaty (Hsing *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Stanford *et al.*, 1997). Například buňky s 13 repeticemi GGC produkovaly 2,7x více proteinu AR než buňky se 17 repeticemi (Ding *et al.*, 2005). Avšak mnoho studií spojení mezi počtem repetic GGC a vnímavostí k rakovině prostaty neprokázalo (Akinloye *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2008).

Délka repetic GGC nesouvisí s délkou repetic CAG (Lumbroso *et al.*, 1997). Nicméně v jiných studiích bylo riziko vzniku rakoviny pozorováno u bělochů

s krátkými repeticemi CAG a GGC (CAG < 22, GGC < nebo rovno 16) (Stanford *et al.*, 1997).

Počet repetic GGC se nezdá být spolehlivým ukazatelem vzniku rakoviny prostaty, avšak taktéž není vyloučen vliv délky repetic na progresi nebo léčbu rakoviny prostaty (Eisermann *et al.*, 2013).

Rozdíly v počtu repetic GGC mezi lidskými rasami

Podobně jako u repetic CAG, i zde je nižší počet repetic GGC (GGC < 15) spojován s černošskou populací negroidní rasy na rozdíl od bělochů europoidní rasy nebo asiátů mongoloidní lidské rasy (Esteban *et al.*, 2006; Kittles *et al.*, 2001). Jedna studie dokonce demonstrovala vyšší riziko vzniku rakoviny u Američanů s počtem 23 repetic GGC (Platz *et al.*, 1998) (Tab. II).

Tab. II: Průměrný počet repetic GGC v N-koncové doméně 1. exonu genu androgenového receptoru u vybraných populací nebo u mužů žijících na určitém území s rakovinou prostaty.

Populace / území	Průměrný počet repetic GGC	Zdroj
Běloši	15,62 ± 1,86	Stanford <i>et al.</i> , 1997
Brazílie	22,38	Ribeiro <i>et al.</i> , 2002
Číňané	23	Hsing <i>et al.</i> , 2000
Jižní Brazílie	18,17 ± 2,07	Biolchi <i>et al.</i> , 2013
Řecko	16,23	Esteban <i>et al.</i> , 2006
Sardinie	16,1	Esteban <i>et al.</i> , 2006
Severní Amerika	23	Platz <i>et al.</i> , 1998
Španělsko	15,9	Esteban <i>et al.</i> , 2006
Turecko	15,92	Esteban <i>et al.</i> , 2006

3.2.5.1.3 Jednonukleotidový polymorfismus

Jednonukleotidový polymorfismus AGG se vyskytuje ve 211. kodonu exonu 1 mezi repeticemi CAG a GGC (Obr. 4). Označuje se jako G1733A a spočívá v záměně třetího nukleotidu guaninu (G) za nukleotid adenin (A) (Lu *et Danielsen*, 1996).

Oba tripletky AGG i AGA však kódují stejnou aminokyselinu - arginin. Někdy se tento polymorfismus objevuje pod názvem E211 (Hayes *et al.*, 2005).

Přítomnost menšinové alely A je studována pro možné spojení se zvýšeným rizikem pro vznik rakoviny prostaty. Bylo rovněž zjištěno i spojení mezi alelou A a nižším rizikem vzniku metastáz v případě karcinomu prostaty (Hayes *et al.*, 2005).

Rozdíly G1733A polymorfismu mezi lidskými rasami

Vysoká frekvence výskytu alely A byla detekována například u afroamerické populace. V této populaci je alela A spojována se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prostaty u mužů, jejichž věk nepřesahuje 65 let (Medeiros *et al.*, 2003). Jiná studie se však zabývala výskytem alely A u adenokarcinomů prostaty v australské populaci, ale spojení se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prostaty nepotvrdila.

3.3 Rakovina prostaty

Vznik nádoru je iniciován zejména změnou protoonkogenů na onkogeny, inaktivací tumor-supresorových genů a reparačních mechanismů nebo zvýšenou aktivitou růstových faktorů. Tyto změny vznikají zejména na základě mutací. Některé mutace jsou předávány z generace na generaci, a tím dochází k vyššímu riziku vzniku rakoviny u potomků.

Mezi hlavní faktory ovlivňující vznik karcinomu prostaty patří věk, etnická rasa, dědičnost, hladina androgenů, fyzická aktivita, sexuální aktivita a obezita (Hsing *et Chokkalingam*, 2006).

3.3.1 Diagnostika

Diagnostika rakoviny prostaty je založena na vyšetření per rectum, spermatu anebo analýzou histologických a cytologických vzorků žlázy, jejichž odběr se provádí jehlovou biopsií.

3.3.1.1 *Prostatický specifický antigen (PSA)*

PSA je v současné době nejčastěji využívaný biologický marker rakoviny prostaty. Jedná se o protein o velikosti 33 kD, který je identifikován jako serinová proteáza. PSA je produkován buňkami prostaty a lze jej detekovat ve velkém množství ve spermatu.

Běžná hladina PSA je okolo 4 ng/ml (Schroder *et al.*, 2005). Mírně zvýšená hladina PSA 4 - 10 ng/ml detekuje onemocnění v 75 % případů. Koncentrace vyšší než 40 ng/ml bývá většinou spojována s výskytem metastáz. Avšak v některých případech byla rakovina potvrzena i při detekci hladiny PSA nižší než 4 ng/ml (Thompson *et al.*, 2004). Nicméně nejedná se o protein specifický pro vznik rakoviny prostaty, hladina PSA se může zvýšit i v případě nemaligního onemocnění nebo po určitém fyzickém výkonu, proto se tato podezření na rakovinu dále ověřují pomocí biopsie.

3.3.1.2 *Gleasonovo skóre*

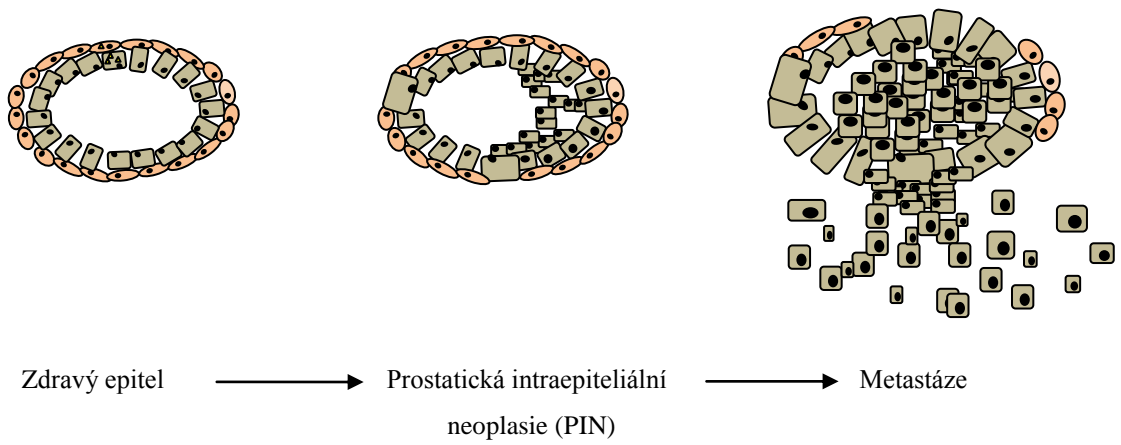
Gleasonovo skóre je nejčastěji používaný systém pro klasifikaci vývojových stádií rakoviny prostaty. Hodnocena je tkáň, jež byla odebrána biopsií. Gleasonovo skóre představuje součet dvou nejčastěji stanovených stupňů 1 - 5 vyskytujících se v daném vzorku. Gleasonovo skóre vykazuje tedy rozpětí 2 - 10, přičemž hodnota 2 - 4 určuje dobře diferencované stádium a naopak hodnota 8 - 10 minimálně diferencované stádium. Se zvyšujícím se Gleasonovým skóre stoupá agresivita nádoru (Gleason *et al.*, 1974).

3.3.2 *Stádia rakoviny prostaty*

Prekurzorem rakoviny je tzv. intraepiteliální neoplazie prostaty (PIN, *prostatic intraepithelial neoplasia*) (McNeal *et Bostwick*, 1986). Jedná se o stádium, kdy dochází k poškození bazální vrstvy, avšak buňky nezasahují do stromatu (Bostwick *et al.*, 1993).

V dalším stádiu dochází k invazivnímu karcinomu a následně k metastázám, jež se šíří do celého těla, především do lymfatických uzlin a kostí. Tato fáze již není závislá ani ovlivnitelná androgeny (Obr. 5).

U prostaty se může vyskytovat tzv. benigní hyperplazie prostaty (BPH, *benign prostatic hyperplasia*), kdy dochází k expanzi bazální vrstvy a zbytnění žlázek prostaty (McNeal, 1978). BPH ale není prekurzorem vzniku rakoviny prostaty (Bostwick *et Chang*, 1999).



Obr. 5: Rozvoj karcinomu prostaty (upraveno dle Shen *et* Abate-Shen, 2010).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Digitální váha 440-33 (Kern)
- Elektroforetická komora Easycast B1A (Thermo Scientific)
- Flow-box (Merci, Biofan)
- Chladicí stojan
- Li-Cor Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences)
- Mikrovlnná trouba (Ignis)
- Mikrozkušavky 1,5ml (Eppendorf)
- Minicentrifuga (Labnet)
- Nanodrop ND-1000 (Spectrophotometer)
- Parafilm (Pechinery Plastic Packaging)
- PCR mikrozkušavky 0,6 ml (Eppendorf)
- Plovací stojan
- Softwarový program ND-1000
- Termoblok (P-Lab)
- Termocyklér C1000™ (BIO-RAD)
- Vodní lázeň Memmert WNB (Maneko)
- Vortex mixer (P-Lab)
- Výrobník deionizované H₂O GenePure System (TKA)
- Zdroj elektrického proudu MP-300N (Biotech)

4.2 Použité chemikálie a roztoky

- 1x TAE elektroforetický pufr (5 ml 50x TAE pufru - doplněno do 250 ml sterilní deionizovanou vodou)
- 6x Orange Loading Dye solution (Fermentas)
- 10x NEBuffer (BioLabs)
- 10x Optimized DyNAzyme™ EXT Buffer (Finnzymes)
- 50x TAE pufr: - 121 g Tris - base
 - 50 ml roztoku EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

- 28,6 ml ledové kyseliny octové
- doplněno do 500 ml sterilní deionizovanou H₂O
- 90% etanol (Tamda)
- Agaróza Wide Range / Standard 3 : 1 (Sigma-Aldrich)
- Deionizovaná H₂O (vlastní výroba)
- DMSO 100% roztok (Finnzymes)
- DyNAzyme™ Taq polymerase EXT 1 U/μl (Finnzymes)
- FitAmp™ Paraffin Tissue Section DNA Isolation Kit (Epigentek)
- GelRed™ Nucleid Acid Stain, 10 000x ředěný (Biotium)
- Primery rs6152 - Forward/Reverse (Sigma-Aldrich)
- Restrikční enzym *StuI* R0187L: 10 000 U/ml (BioLabs)
- Roztok dNTPs Mix 10 mmol/l (Promega)
- Standard molekulové hmotnosti – Step Ladder 50 - 3000 pb 1 mg/ml (BioLabs)

4.3 Biologický materiál

Pro detekci jednonukleotidového polymorfismu bylo použito 52 archivovaných tkáňových vzorků biopsií od pacientů s rakovinou prostaty, které byly fixovány formalínem a zalaty do parafínu (FFPE, *formalin fixed paraffin embedded tissue*). Vzorky tkáně se nacházely v různých stádiích onemocnění: 6 vzorků tkáňových úseků vykazujících znaky normální tkáně (N), 19 vzorků benigní hyperplazie prostaty (BPH), 4 vzorky prostatické intraepiteliální neoplazie prostaty (PIN) a 23 vzorků karcinomu prostaty (KP).

4.4 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu *FitAmp™ Paraffin Tissue Section DNA Isolation Kit* a postupovalo se podle protokolu od výrobce - *Epigentek*.

Pracovní postup pro izolaci DNA:

- 0,5 ml PS1 (*DNA digestion solution*) bylo přidáno do PS2 (*DNA digestion powder*) a promícháno (Vortex), dokud roztok nebyl čirý (nespotřebovaný roztok PS1/PS2 byl uchováván při teplotě -20 °C)

- bioptická tkáň byla umístěna do mikrozkušavek a k ní bylo přidáno 100 µl PS3 (*DNA isolation buffer*)
- inkubace po dobu 10 minut v termobloku při teplotě 95 °C
- intenzivní třepání 10 sekund (Vortex)
- temperování vzorku při pokojové teplotě po dobu 1 minuty
- 10 µl roztoku PS1/PS2 bylo přidáno k 100 µl tkáňové suspenze
- inkubace 75 minut v termobloku při teplotě 65 °C
- v průběhu inkubace byl vzorek každých 30 minut promícháván po dobu 5 - 10 sekund (Vortex)
- po inkubaci byla tkáňová suspenze intenzivně promíchána po dobu 5 sekund (Vortex)
- k tkáňové suspenzi bylo přidáno 200 µl roztoku PS4 (*DNA binding buffer*) a centrifugováno po dobu 1 minuty při 12 000 rpm
- kolona byla umístěna do mikrozkušavky o objemu 2 ml (*collection tube*)
- čistý roztok v dolní části mikrozkušavky byl skrz parafinovou vrstvu přepipetován na kolonu a centrifugován po dobu 30 sekund při 12 000 rpm
- po odstranění nečisté frakce bylo přidáno 200 µl 70% etanolu a centrifugováno po dobu 20 sekund při 12 000 rpm
- po promytí bylo přidáno 200 µl 90% etanolu a centrifugováno po dobu 20 sekund při 12 000 rpm
- opět po promytí bylo přidáno 200 µl 90% etanolu a centrifugováno 40 sekund při 12 000 rpm
- kolona byla přemístěna do čisté mikrozkušavky a přidáno 14 µl PS5 (*DNA elution solution*) na filtr kolony
- centrifugace po dobu 20 sekund při 12 000 rpm
- změřena koncentrace a čistota vyizolované DNA

4.5 Amplifikace PCR (Hot-start)

Prvním krokem programu PCR (polymerázová řetězová reakce) byla denaturace dvouřetězcové DNA při 94 °C, pro nasedání primerů byla zvolena teplota 56 °C, syntéza nových řetězců DNA probíhala pomocí DNA polymerázy při obvyklých 72 °C. PCR amplifikace probíhala 35 cyklů. Amplifikace PCR prostřednictvím Hot-start snižuje možnost tvorby primerových dimerů a spočívá v uložení vzorků do přístroje

pro amplifikaci PCR v době, kdy je přístroj již přehřátý na požadovanou denaturační teplotu.

Pracovní postup pro přípravu reakce PCR

- sterilní box byl vyzářen UV světlem po dobu 15 minut
- po celou dobu se pracovalo v latexových rukavicích, které byly průběžně desinfikovány 70% etanolem
- komponenty pro reakci PCR byly vyjmuty z mrazicího boxu (-20 °C), promíchány (Vortex), stočeny na minicentrifuze a opět promíchány (Vortex)
- DNA polymeráza a primery byly uchovávány v chladícím stojanu
- práce probíhala ve sterilním boxu, pro pipetování deionizované H₂O a enzymu DNA polymerázy byly použity špičky s filtry, jednotlivé komponenty do reakce PCR byly pipetovány do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml v pořadí podle Tab. III
- před pipetováním primerů (rs6152S/F 5'-AAC AGC AGC AGG AAG CAG TAT C-3'; rs6152S/R 5'-GTC CCC CCT AAG TAA TTG TCC T-3') byla směs umístěna do chladícího stojánku
- vzorek DNA a ostatní komponenty byly pipetovány v odlišných sterilních boxech
- pro ověření správnosti reakce sloužila negativní kontrola
- reakční směs byla před umístěním do termocykléru, kde byl nastaven požadovaný program (Tab. IV), protřepána (Vortex)

Tab. III: Složky reakční směsi pro PCR.

Složky reakční směsi	Objem pro 1 reakci [μ l]	Negativní kontrola - objem pro 1 reakci [μ l]
Deionizovaná H ₂ O	17,75	18,75
10x Optimized DyNAzyme EXT Buffer	2,50	2,50
DMSO 100% roztok	1,25	1,25
dNTPs [10 mmol/l]	0,5	0,5
Primer rs6152S/F [25 μ mol/l]	0,5	0,5
Primer rs6152S/R [25 μ mol/l]	0,5	0,5
DyNAzyme™ EXT DNA polymerase [1 U/ μ l]	1	1
DNA [50 ng]	1	-
Celkový objem	25	25

Tab. IV: Podmínky PCR pro amplifikaci daného úseku DNA pomocí primerů rs6152S.

Fáze	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Predeaturace	94	4 min	1
Denaturace	94	45 s	35
Annealing	56	45 s	
Elongace	72	1 min	
Extenze	72	10 min	1

4.6 Analýza RFLP

Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů neboli RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) je metoda využívající enzymy - tzv. restrikční endonukleázy izolované z bakterií, které jsou schopné rozpoznat specifické sekvence DNA a tato místa rozštěpit.

Pro detekci jednonukleotidového G1733A polymorfismu byl použit restrikční enzym *StuI*, který rozpoznává hexanukleotidovou palindromickou sekvenci:

5'-AGGCCT-3' (Shimotsu *et al.*, 1980). Dojde-li v restriční místo k záměně některého z nukleotidů, enzym sekvenci nerozpozná a DNA nerozštěpí. Vyskytuje-li se tedy v tomto restriční místo namísto třetího nukleotidu guaninu (G) v kodonu AGG adenin (A), amplifikovaný fragment DNA zůstane nerozštěpen.

Pracovní postup pro přípravu analýzy RFLP:

- připravené reagenty byly nejprve promíchány (Vortex), krátce stočeny na minicentrifuze a opět promíchány
- jednotlivé reagenty byly pipetovány do mikrozkušavky podle Tab. V
- mikrozkušavka se vzorkem produktu PCR a směsí s restriční endonukleázou byla utěsněna pomocí parafilmu, upevněna do plovacího stojanu a umístěna po dobu 1,5 hodiny do termobloku s teplotou 37 °C

Tab. V: Jednotlivé reagenty a jejich objemy pro analýzu RFLP.

Reagenty	Objem pro jednu reakci [μl]
Deionizovaná H ₂ O	2,5
10x NEbuffer 4	1
Restriční enzym <i>StuI</i>	1,5
Produkt PCR	5
Celkový objem	10

4.7 Příprava 3% agaróзовého gelu a vyhodnocení produktů PCR a analýzy RFLP

Gelová elektroforéza slouží k rozdělení fragmentů DNA podle jejich molekulové hmotnosti pomocí stejnosměrného elektrického proudu. Molekuly DNA mají záporný náboj a v elektrickém poli putují od katody k anodě. Koncentrace gelu určuje velikost pórů a je přizpůsobována velikosti DNA fragmentů. Větší fragmenty DNA jsou zadržovány a prostupují gelem pomaleji, zatímco malé fragmenty DNA putují gelem rychleji.

Pracovní postup pro přípravu 3% agaróзовého gelu

- byla připravena elektroforetická komora a vsazeny hřebínky
- 2,4 g agarózy bylo rozpuštěno v 80 ml deionizované H₂O

- směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě na teplotu varu
- do vroucí směsi bylo přidáno 1,6 ml 50x TAE pufru a 6 µl roztoku pro vizualizaci DNA (10 000x GelRed™ Nucleid Acid Stain, Biotium)
- gel byl vylit do elektroforetické komory
- po 30 minutách byl gel zalit 500 ml 1x TAE pufrém a připraven k použití

Pracovní postup pro vyhodnocení produktů PCR a analýzy RFLP:

- 5 µl standardu molekulové hmotnosti (Step Ladder 50 - 3000 pb, Sigma) bylo napipetováno na gel
- k 15 µl produktu PCR, taktéž i negativní kontrole, byly přidány 4 µl deionizované H₂O a 1 µl barvicího roztoku (6x Orange Loading Dye solution, Fermentas) a naneseno na gel
- 10 µl produktu analýzy RFLP bylo se 1,1 µl barvicího roztoku rovněž naneseno na gel
- byl zapojen elektrický obvod a elektroforetická separace probíhala při 55 V
- po uběhnutí dráhy zhruba 3 cm byl gel vyhodnocen pomocí přístroje Li-Cor

5 VÝSLEDKY

Pracovala jsem se vzorky 11 pacientů, které obsahovaly: 6 vzorků tkáňových úseků vykazujících znaky normální tkáně (N), 19 vzorků benigní hyperplazie prostaty (BPH), 4 vzorky prostatické intraepiteliární neoplazie (PIN) a 23 vzorků vykazujících znaky karcinomu prostaty (KP). Cílem bylo v těchto vzorcích detekovat jednonukleotidový polymorfismus G1733A pomocí metody analýzy RFLP.

V Tab. VI jsou uvedeny alely jednonukleotidového polymorfismu G1733A, které byly detekovány u sledovaných typů tkáňových vzorků jednotlivých pacientů.

Tab. VI: Výskyt alel jednonukleotidového polymorfismu G1733A 1. exonu AR u sledovaných typů tkáňových vzorků jednotlivých pacientů.

Pořadí	Číslo pacienta	Vzorek tkáně číslo	Diagnóza	Alela
1.	14 981/05	01	BPH	G, A
		02	BPH	G, A
		03	BPH	G, A
2.	9 557/04	04	KP	A
		05	KP	A
		06	KP	A
3.	23 260/05	07	BPH	G
		08	BPH	G
		09	BPH	G
		10	KP	G
		11	KP	G
		12	KP	G
4.	22 485/09	13	N	G
		14	N	G
		15	BPH	G
		16	BPH	G
		17	KP	G
		18	KP	G

Pořadí	Číslo pacienta	Vzorek tkáně číslo	Diagnóza	Alela
5.	10 894/04	19	BPH	G
		20	BPH	G
		21	KP	G
		22	KP	G
		23	N	G
		24	N	G
6.	11 033/09	25	BPH	A
		26	BPH	A
		27	PIN	A
		28	PIN	A
		29	KP	A
		30	KP	A
		31	N	A
		32	BPH	A
7.	12 022/09	33	KP	A
		34	KP	A
		35	KP	A
		36	KP	A
		37	BPH	A
		38	BPH	G, A
8.	25 072/09	39	BPH	G
		40	BPH	G
		41	KP	G
		42	N	A
9.	23 013/04	43	KP	G
		44	KP	G, A
10.	24 445/05	45	KP	G
		46	KP	G
11.	6 085/09	47	PIN	G
		48	PIN	G
		49	BPH	G
		50	BPH	G
		51	KP	G
		52	KP	G

Vysvětlivky: N - normální tkáň

BPH - benigní hyperplazie prostaty

PIN - prostatická intraepiteliální neoplazie

KP - karcinom prostaty

V Tab. VII a VIII jsou uvedeny četnosti alel ve sledovaných typech tkání. Bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení jednotlivých alel pro nádorovou a nenádorovou tkáň. V nenádorové tkáni, tj. normální tkáň (N), a prostatické tkáni s charakterem benigní hyperplazie (BPH) byla detekována v 60 % případů alela G a ve 24 % případů alela A. Přítomnost obou alel byla zjištěna v 16 % případů. U nádorové tkáně, tj. u vzorků tkáně se znaky prostatické intraepiteliální neoplazie (PIN) a vzorků tkáně s karcinomem prostaty (KP), byla alela G detekována v 55,6 % případů a alela A ve 40,7 % případů. Obě alely byly přítomny ve 3,7 % případů.

Tab. VII: Četnost alel G, G/A, A jednonukleotidového polymorfismu G1733A v nenádorových tkáních pacientů.

Typ tkáně	Počet vzorků	Četnost alely:		
		G	G/A	A
N	6	4	0	2
BPH	19	11	4	4
Celkem v nenádorové tkáni	25	15	4	6
Celkem v nenádorové tkáni v %	100	60	16	24

Vysvětlivky: N - normální tkáň

BPH - benigní hyperplazie prostaty

Tab. VIII: Četnost alel G, G/A, A jednonukleotidového polymorfismu G1733A v nádorových tkáních pacientů.

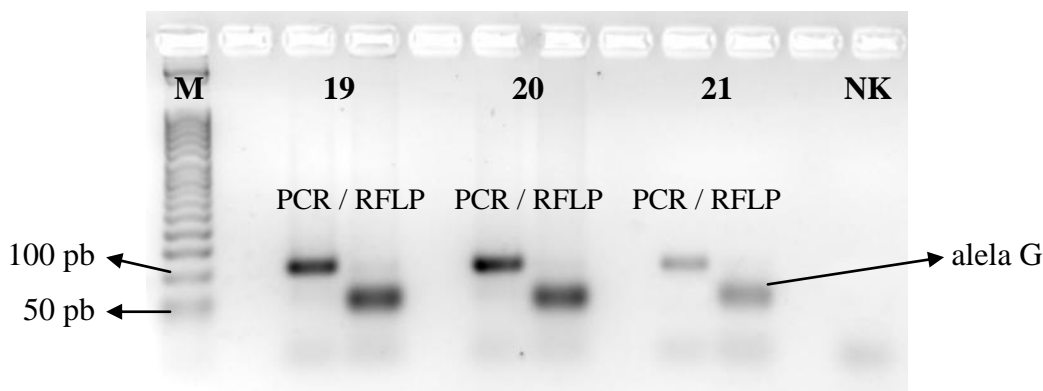
Typ tkáně	Počet vzorků	Četnost alely:		
		G	G/A	A
PIN	4	2	0	2
KP	23	13	1	9
Celkem v nádorové tkáni	27	15	1	11
Celkem nádorové tkáni v %	100	55,6	3,7	40,7

Vysvětlivky: PIN - prostatická intraepiteliální neoplazie

KP - karcinom prostaty

Na Obr. 6 a 7 jsou elektroforetogramy produktů PCR a analýzy RFLP. Od každého vzorku byl vždy vedle sebe nanesen produkt PCR a produkt analýzy RFLP. Velikost amplifikovaného úseku byla 100 pb. Pokud byl produkt analýzy RFLP naštěpen, v elektroforetogramu byly detekovány produkty o velikosti 50 pb. Jestliže se tedy v amplifikovaném úseku 1. exonu nacházel kodon AGG, došlo k rozštěpení enzymem *StuI* a na elektroforetogramu byl partný produkt, který odpovídal přítomnosti dvou rozštěpených úseků DNA o velikosti 50 pb (Obr. 6, pacient č. 10 894/04). Avšak pokud se zde nacházel kodon AGA, enzym *StuI* toto místo nerozštěpil a na elektroforetogramu byl partný produkt shodný s produktem PCR o velikosti 100 pb (Obr. 7, pacient č. 9 557/04). V případě výskytu obou alel byly na elektroforetogramu pozorovány 2 produkty analýzy RFLP, jeden o velikosti 100 pb a druhý o velikosti 50 pb (Obr. 8, pacient č. 14 981/05).

Obr. 6: Elektroforetogram produktů PCR a analýzy RFLP ze vzorků tkáně č. 19 - 21 pacienta č. 10 894/04.



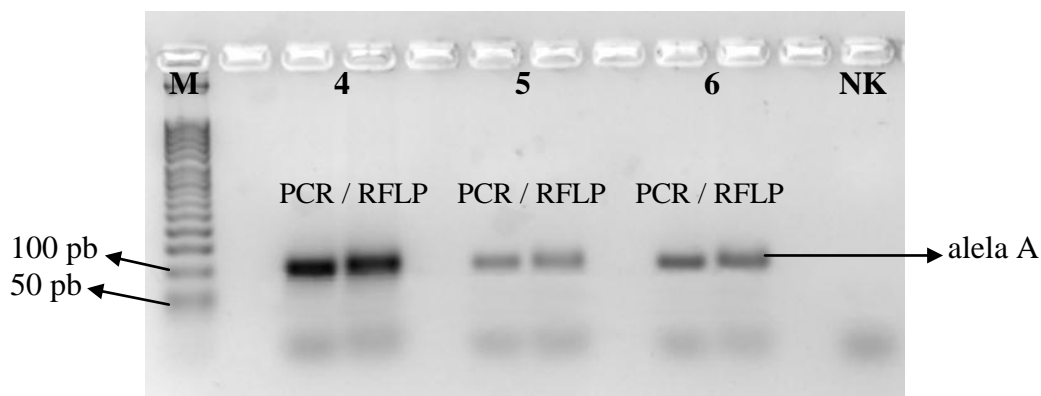
Vysvětlivky: *M* - standard molekulové hmotnosti (*Step Ladder* 50 - 3000 pb)

19,20,21 - vzorky tkáně č. 19,20,21

NK - negativní kontrola

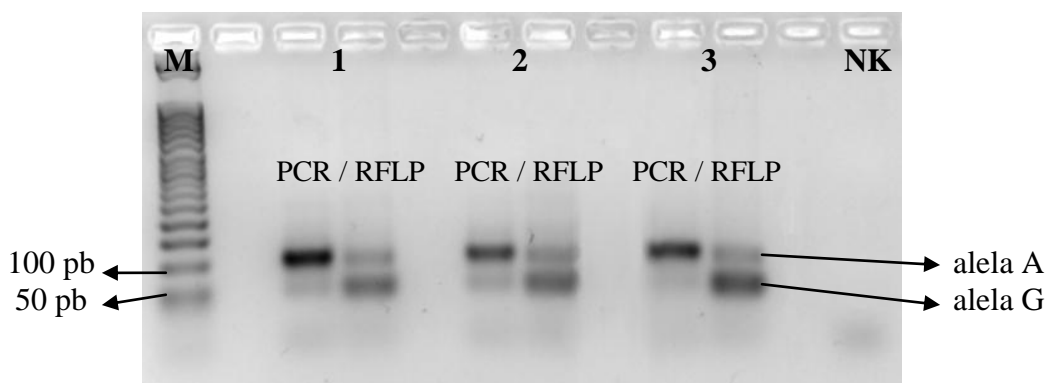
100 pb, 50 pb - molekulová hmotnost bandů standardu molekulové hmotnosti

Obr. 7: Elektroforetogram produktů PCR a analýzy RFLP ze vzorků tkáně č. 4 - 6 pacienta č. 9 557/04.



Vysvětlivky: *M* - standard molekulové hmotnosti (Step Ladder 50 - 3000 pb)
4,5,6 - vzorky tkáně č. 4,5,6
NK - negativní kontrola
100 pb, 50 pb - molekulová hmotnost bandů standardu molekulové hmotnosti

Obr. 8: Elektroforetogram produktů PCR a analýzy RFLP ze vzorků tkáně č. 1 - 3 pacienta č. 14 981/05.



Vysvětlivky: *M* - standard molekulové hmotnosti (Step Ladder 50 - 3000 pb)
1,2,3 - vzorky tkáně č. 1,2,3
NK - negativní kontrola
100 pb, 50 pb - molekulová hmotnost bandů standardu molekulové hmotnosti

Statistické vyhodnocení výsledků výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu

Bylo provedeno statistické vyhodnocení získaných výsledků dle Pearsonova korelačního koeficientu. Tento výpočet se používá k vyhodnocení závislosti mezi dvěma variabilními „x“ a „y“. Výsledná hodnota „r“ se nachází v rozmezí -1 až 1

včetně, přičemž hodnota 1 se vyznačuje maximální pozitivní korelací, zatímco hodnota -1 vyjadřuje, že proměnné „x“ a „y“ vykazují negativní korelaci. Hodnota 0 znamená žádnou korelaci.

Statistické vyhodnocení dle Pearsona bylo provedeno zvlášť pro alelu G a zvlášť pro alelu A. U obou alel byla sledována závislost mezi tkání nádorovou a nenádorovou. Výpočet byl proveden pomocí internetové aplikace *Social science statistics - Pearson Correlation Coefficient Calculator* (www.socscistatistics.com).

Statistické vyhodnocení alely G

V Tab. IX jsou uvedeny četnosti alely G v nenádorových (N + BPH) a nádorových (PIN + KP) tkáňových vzorcích jednotlivých pacientů, přičemž hodnota „x“ představuje četnost alely G v nenádorových tkáních a hodnota „y“ představuje četnost v nádorových tkáních.

Tab. IX: Četnost alely G v nenádorových a nádorových vzorků tkání jednotlivých pacientů.

Číslo pacienta	Hodnota „x“	Hodnota „y“
	Četnost N + BPH	Četnost PIN + KP
14 981/05	3	0
23 260/05	3	3
22 485/09	4	2
10 894/04	4	2
12 022/09	1	0
25 072/09	2	1
23 013/04	0	2
24 445/05	0	2
6 085/09	2	4

Vysvětlivky: N - normální tkáň

BPH - benigní hyperplazie prostaty

PIN - prostatická intraepiteliální neoplazie

KP - karcinom prostaty

Vzorec pro výpočet Pearsonova korelačního koeficientu:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2} \sqrt{\sum(y - \bar{y})^2}}$$

Do vzorce pro Pearsonův korelační koeficient byly dosazeny hodnoty „x“ a „y“ podle Tab. IX a následně vypočítána hodnota „r“.

Výsledná hodnota „r“ se rovná přibližně 0,08 pro alelu G. I přestože se jedná o pozitivní korelaci mezi tkání benigní a maligní, vztah mezi proměnnými je slabý, jelikož hodnota se velmi blíží hodnotě 0, tedy žádné korelaci. P-hodnota pro určení mezní hladiny je 0,8451. Výsledek by byl neprůkazný při hladině významnosti, kdy p-hodnota je menší než 0,05.

Statistické vyhodnocení alely A

V Tab. X jsou uvedeny četnosti alely A v nenádorových (N + BPH) a nádorových (PIN + KP) tkáňových vzorcích jednotlivých pacientů, přičemž hodnota „x“ představuje četnost alely A u nenádorových tkání a hodnota „y“ představuje četnost u nádorových tkání.

Tab. X: Četnost alely A u nenádorových a nádorových vzorků tkání jednotlivých pacientů.

Číslo pacienta	Hodnota „x“	Hodnota „y“
	Četnost N + BPH	Četnost PIN + KP
14 981/05	3	0
9 557/04	0	3
11 033/09	3	4
10 894/04	2	4
12 022/09	4	2
25 072/09	1	0
23 013/04	0	1

Vysvětlivky: N - normální tkáň

BPH - benigní hyperplazie prostaty

PIN - prostatická intraepiteliální neoplazie

KP - karcinom prostaty

Do vzorce pro Pearsonův korelační koeficient byly dosazeny hodnoty „x“ a „y“ podle Tab. X a následně byla vypočítána hodnota „r“.

Výsledná hodnota „r“ pro alelu A se rovná 0,12. Stejně jako u alely G, tak i u alely A bylo zjištěno, že třebaže se jedná o pozitivní korelaci, vztah mezi proměnnými je slabý, jelikož hodnota se spíše blíží hodnotě 0 než hodnotě 1. P-hodnota pro určení mezní hladiny je 0,7939. Výsledek by byl neprůkazný při hladině významnosti, kdy p-hodnota je menší než 0,05.

6 DISKUZE

Na chromozomu X, v oblasti N-koncové domény 1. exonu genu pro androgenový receptor se vyskytují tři polymorfní úseky. Tyto polymorfismy $(CAG)_n$, $(GGC)_n$ a G1733A jsou studovány pro možné spojení s rizikem vzniku rakoviny prostaty. Avšak výsledky jsou dosud rozporuplné a nepřesvědčivé. Tyto rozdíly a pochybnosti jsou navíc umocňovány odlišností polymorfismů u jednotlivých lidských ras.

Jednonukleotidový polymorfismus G1733A je svojí simultánní záměnou alely G za alelu A spojován se zvýšeným rizikem rozvoje karcinomu. V této bakalářské práci byly v nádorové tkáni detekovány alely G a A, dokonce v některých případech byly detekovány obě alely G i A zároveň. Četnost alely A byla větší v nádorové tkáni než ve tkáni nenádorové, což nasvědčuje pravděpodobné spojitosti mezi alelou A a možným markerem vzniku rakoviny prostaty. Oproti jiné studii, při zkoumání většího počtu vzorků DNA z krve pacientů, nebyla statisticky prokázána žádná spojitost mezi alelou A a vyšším rizikem vzniku rakoviny prostaty (Reptova *et al.*, 2014). Alela A byla v této bakalářské práci detekována v případě intraepiteliální neoplazie prostaty (PIN) ve dvou vzorcích, avšak v případě karcinomu (KP) v devíti vzorcích. Nicméně v jiné studii je alela A spojována spíše s méně pokročilým onemocněním prostaty, a tedy s menším rizikem vzniku metastáz (Hayes *et al.*, 2005).

Statistické výsledky ukázaly slabou korelaci v případě alely G mezi tkáni nádorovou a nenádorovou, a to pouze 0,08, zatímco v případě alely A byl výsledek 0,12, přičemž hodnota 0 znamená žádnou korelaci. Příčinou nízkých hodnot však může být nízký počet sledovaných tkání.

V této práci byly v některých vzorcích prostatické tkáně detekovány obě varianty genu. Karyotyp mužů je 46, XY a gen pro androgenový receptor je umístěn na chromozomu X. Z toho vyplývá, že by měla být detekována pouze alela G nebo A, ale nikoli obě varianty genu. Možným vysvětlením je, že DNA byla izolovaná ze směsi tkáňových buněk, přičemž některé z nich mohly obsahovat alelu G a jiné alelu A. Mutací mohl vzniknout klon buněk, který se od původní buněčné populace vyznačoval změnou v polymorfismu G1733A.

V této bakalářské práci byl polymorfismus detekován z tkáňových vzorků, čímž se odlišuje od většiny studií podobného zaměření, jelikož většina výzkumů se zabývá detekcí polymorfismu z krve. Četnost detekovaných alel v tkáňových vzorcích

a vzorcích krve by měla být přibližně stejná. Avšak porovnáním našich výsledků se studií, kde byla sledována frekvence obou alel u krevních vzorků, byl zjištěn nesoulad mezi výsledky z této studie (Reptova *et al.*, 2014) a námi stanovenou frekvencí obou alel v prostatické tkáni.

V této bakalářské práci nebyl polymorfismus G1733A zkoumán s ohledem na věk pacienta nebo Gleasonovo skóre, které mohou mít také vliv na sledovanou frekvenci obou alel (Reptova *et al.*, 2014). Rovněž bližší informace o stavu a případně vývoji nádorového onemocnění prostaty u jednotlivých pacientů by mohly objasnit tuto dlouhodobě řešenou souvislost výskytu alely A a G s progresí nebo regresí nádoru prostaty.

Jelikož alela G byla v nádorové tkáni detekována ve větším procentuálním zastoupení než alela A, nemůže být jednoznačně konstatováno, že alela A je spolehlivý a přesný marker pro vznik rakoviny prostaty.

7 ZÁVĚR

V rámci mé bakalářské práce jsem se zabývala problematikou polymorfismu 1. exonu androgenového receptoru u pacientů s rakovinou prostaty. Zpracovala jsem literární rešerši, kde jsem se zaměřila nejprve na molekulárně - biologickou charakteristiku androgenového receptoru a polymorfismus 1. exonu AR. V další části jsem se pak snažila přiblížit diagnostiku a jednotlivá stádia karcinomu prostaty.

V praktické části jsem se věnovala detekci jednonukleotidového polymorfismu G1733A, u kterého je alela A zkoumána pro možné spojení s vyšším rizikem vzniku karcinomu. Ze vzorků tkáně, která byla diagnostikována jako normální, BPH, PIN nebo karcinom, jsem vyizolovala DNA a pomocí PCR amplifikovala požadovanou část 1. exonu androgenového receptoru. Následovala analýza délkového polymorfismu restričních fragmentů (RFLP) a pomocí gelové elektroforézy jsem detekovala jednotlivé alely. Ve vzorcích nenádorové tkáně byla detekována v 60 % alela G, ve 24 % alela A a v 16 % obě alely G i A. Ve vzorcích nádorové tkáně byla v 55,6 % detekována alela G, ve 40,7 % alela A a v 3,7 % byly detekovány obě alely.

Výskyt alely G u nenádorových (N + BPH) a nádorových (PIN + KP) tkáňových vzorků jednotlivých pacientů byl vyhodnocen statisticky výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu. Vypočtená hodnota $r = 0,08$ charakterizuje vztah mezi proměnnými jako slabý, s minimální korelací mezi proměnnými. U alely A, při statistickém vyhodnocení stejných proměnných, byla získána hodnota $r = 0,12$. I v tomto případě se jedná pouze o slabě pozitivní korelaci. Porovnání hodnot obou korelačních koeficientů vede k závěru, že výskyt alely A může být více pravděpodobný v nádorovém typu tkáně než ve tkáni s výskytem alely G.

Výsledky ukazují, že tento polymorfismus sice není přesným a spolehlivým biomarkerem rakoviny prostaty, nicméně jisté spojení alely A s rakovinou prostaty není zcela vyloučeno. Avšak v této bakalářské práci byla studie provedena na počtu vzorků, který se nám v dané chvíli jeví jako nedostatečný. Tudíž pro spolehlivější výsledek by bylo potřeba další a co do počtu vzorků rozsáhlejší analýzy.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abate-Shen, C., Shen, M. M. (2000): Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development*, 14: 2410 - 2434.
- Akinloye, O., Gromoll, J., Simoni, M. (2011): Variation in CAG and GGN repeat lengths and CAG/GGN haplotype in androgen receptor gene polymorphism and prostate carcinoma in Nigerians. *British journal of biomedical science*, 68: 138 - 142.
- Balic, I., Graham, S. T., Troyer, D. A., Higgins, B. A., Pollock, B. H., Johnson-Pais, T. L., Thompson, I. M., Leach, R. J. (2002): Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in Hispanic men. *The Journal of urology*, 168: 2245 - 2248.
- Beilin, J., Ball, E. M., Favaloro, J. M., Zajac, J. D. (2000): Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *Journal of molecular endocrinology*, 25: 85 - 96.
- Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery, D. M., Parker, M. G. (1999): The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Molecular and cellular biology*, 19: 8383 - 8392.
- Biolchi, V., Neto, B. S., Pianta, D. B., Koff, W. J., Berger, M., Brum, I. S. (2013): Androgen receptor GGC polymorphism and testosterone levels associated with high risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Molecular biology reports*, 40: 2749 - 2756.
- Bonkhoff, H., Remberger, K. D. (1996): Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostate growth: a stem cell model. *The Prostate* 28, 98 - 106.
- Bostwick, D. G., Amin, M. B., Dundore, P., Marsh, W., Schultz, D. S. (1993): Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Human pathology*, 24: 298 - 310.
- Bostwick, D. G., Chang, L. (1999): Overdiagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Seminars in urologic oncology*, 17: 199 - 205.
- Bratt, O., Borg, A., Kristoffersson, U., Lundgren, R., Zhang, Q. X., Olsson, H. (1999): CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age

at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *British journal of cancer*, 81: 672 - 676.

- Brinkmann, A. O., Faber, P. W., vanRooij, H. C., Kuiper, G. G., Ris, C., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Voorhorst, M. M., van Laar, J. H., Mulder, E. (1989): The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *Journal of steroid biochemistry*, 34: 307 - 310.
- Brown, C. J., Goss, S. J., Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Wilson, E. M., French, F. S., Willard, H. F. (1989): Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American journal of human genetics*, 44: 264 - 269.
- Cammack, R., Attwood, T. K., Campbell, P. N., Parish, J. H., Smith, A. D., Stirling, J. L., Vella, F., (eds.) (2006): *The Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Second Edition, Oxford University Press Inc., New York.
- Coetzee, G. A., Ross, R. K. (1994): Prostate cancer and the androgen receptor. *Journal of National Cancer Institution*, 86: 872 - 873.
- Collins, A. T., Maitland, N. J. (2006). Prostate cancer stem cells. *European journal of cancer*, 42, 1213 - 1218.
- Crabbe, P., Bogaert, V., De Bacquer, D., Goemaere, S., Zmierzak, H., Kaufman, J. M. (2007): Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92: 3604 - 3610.
- Cude, K. J., Dixon, S. C., Guo, Y., Lisella J., Fiqq, W. D. (1999): The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *Journal of molecular medicine*, 77: 419 - 426.
- Das, K., Cheah, P. Y., Lim, P. L., Zain, Y. B., Stephanie, F. C., Zhao, Y., Cheng, C., Lau, W. (2008): Shorter CAG repeat in androgen receptor and non-GG genotypes in prostate-specific antigen loci are associated with decreased risk of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer letters*, 268: 340 - 347.
- Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G. P., Barrack, E. R. (2004): Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *The prostate*, 58: 23 - 32.

- Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G.P., Barrack, E. R. (2005): Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate* 62: 133 - 139.
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., Chakraborty, R. (1992): Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12: 241 - 253.
- Edwards, S. M., Badzioch, M. D., Minter, R., Hamoudi, R., Collins, N., Ardern-Jones, A., Dowe, A., Osborne, S., Kelly, J., Shearer, R., Easton, D. F., Saunders, G. F., Dearnaley, D. P., Eeles, R. A. (1999): Androgen receptor polymorphisms: Association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *International journal of cancer*, 84: 458 - 465.
- Eisermann, K., Wang, D., Jing, Y., Pascal., L. E., Wang, Z. (2013): Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Translational andrology and urology*, 2: 137 - 147.
- Esteban, E., Rodon, N., Via, M., Gonzalez-Perez, E., Santamaria, J., Dugoujon, J. M., Chennawi, F. E., Melhaoui, M., Cherkaoui, M., Vona, G., Harich, N., Moral, P. (2006): Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *Journal of human genetics*, 51: 129 - 136.
- Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240: 889 - 895.
- Gao, W., Bohl E. C., Dalton T. J. (2005): Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical reviews*, 105: 3352 - 3370.
- Gaston, K. E., Kim, D., Singh, S., Ford, O. H. 3rd, Mohler, J. L. (2003): Racial differences in androgen receptor protein expression in men with clinically localized prostate cancer. *The Journal of urology*, 170: 990 - 993.
- Geck, P., Szelei, J., Jimenez, J., Lin, T. M., Sonnenschein, C., Soto, A. M. (1997): Expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shut off in prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 63: 211 - 218.
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of clinical oncology*, 20: 3001 - 3015.

- Giovannucci, E., Platz, E. A., Stampfer, M. J., Chan, A., Krithivas, K., Kawachi, I., Willett, W. C., Kantoff, P. W. (1999): The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 53: 121 - 125.
- Gleason, D. F., Mellinger, G. T., Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (1974): Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. *The Journal of urology*, 111: 58 - 64.
- Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S., Wilson, E. M. (2001): A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer research*, 61: 4315 - 4319.
- Gu, M., Dong, X., Zhang, X., Niu, W. (2012): The CAG repeat polymorphism of androgen receptor gene and prostate cancer: a meta-analysis. *Molecular biology reports*, 39: 2615 - 2624.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E. (1989): Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell*, 57: 1147 - 1154.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J. A., Kaptein, R. (1990): Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science*, 249: 157 - 160.
- Hayes, V. M., Severi, G., Eggleton, S. A., Padilla, E. J., Southey, M. C., Sutherland, R. L., Hopper, J. L., Giles, G. G. (2005): The E211 G/A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 14: 993 - 995.
- Hsing, A. W., Gao, Y. T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Chen, Y. L., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., Benichou, J., Chang, C. (2000): Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer research*, 60: 5111 - 5116.
- Hsing, A. W., Chokkalingam, A. P. (2006) Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in bioscience*, 11: 1388 - 1413.
- Chamberlain, N. L., Driver, E. D., Miesfeld, R. L. (1994): The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Research*, 22: 3181 - 3186.

- Chang, B., Zheng, S. L., Hawkins, G. A., Isaacs, S. D., Wiley, K. E., Turner, A., Carpten, J. D., Bleecker, E. R., Walsh, P. C., Trent, J. M., Meyers, D. A., Isaacs, W. B., Xu, J. (2002): Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Human genetics*, 110: 122 - 129.
- Choong, C. S., Wilson, E. M. (1998): Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *Journal of molecular endocrinology*, 21: 235 - 257.
- Irvine, R. A., Yu, M. C., Ross, R. K., Coetzee, G. A. (1995): The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer research*, 55: 1937 - 1940.
- Jenster, G., van der Korput, H. A., Trapman, J., Brinkmann, A. O. (1995): Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *The Journal of biological chemistry*, 270: 7341 - 7346.
- Jenster, G., van der Korput, H. A., van Vroonhoven, C., van der Kwast, T. H., Trapman, J., Brinkmann, A. O. (1991): Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Molecular endocrinology*, 5: 1396 - 1404.
- Keller, E. T., Ershler, W. B., Chang, C. (1996): The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Frontiers in bioscience*, 1: 59 - 71.
- Khorasanizadeh, S., Rastinejad, F. (2001): Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in biochemical sciences*, 26: 384 - 390.
- Kittles, R. A., Young, D., Weinrich, S., Hudson, J., Argyropoulos, G., Ukoli, F., Adams-Campbell, L., Dunston, G. M. (2001): Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Human Genetics*, 109: 253 - 261.
- Kumar, V., Chambon, P. (1988): The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 55: 145 - 156.
- Lange, E. M., Chen, H., Brierley, K., Livermore, H., Wojno, K. J., Langefeld, C. D., Lange, K., Cooney, K. A. (2000): The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer. *Cancer Epidemiology, biomarkers & prevention*, 9: 439 - 442.

- Lange, E. M., Sarma, A. V., Ray, A., Wang, Y., Ho, L. A., Anderson, S. A., Cunningham, J. M., Cooney, K. A. (2008): The androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and prostate cancer susceptibility in African-American men: results from the Flint Men's Health Study. *Journal of human genetics*, 53: 220 - 226.
- Lindström, S., Ma, J., Altshuler, D., Giovannucci, E., Riboli, E., Albanes, D., Allen, N. E., Berndt, S. I., Boeing, H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Chanock, S. J., Dunning, A. M., Feigelson, H. S., Gaziano, J. M., Haiman, C. A., Hayes, R. B., Henderson, B. E., Hunter, D. J., Kaaks, R., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., Martínez, C., Overvad, K., Siddiq, A., Stampfer, M., Stattin, P., Stram, D. O., Thun, M. J., Trichopoulos, D., Tumino, R., Virtamo, J., Weinstein, S. J., Yeager, M., Kraft, P., Freedman, M. L. (2010): A large study of androgen receptor germline variants and their relation to sex hormone levels and prostate cancer risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *The Journal of Clinical endocrinology and metabolism*, 95: 121 - 127.
- Lindzey, J., Kumar, M. V., Grossmann, M., Young, C., Tindall, D. J. (1994): Molecular mechanisms of androgen action. *Vitamins and Hormones*, 49: 383 - 432.
- Lu, J., Danielsen, M. (1996): A Stu I polymorphism in the human androgen receptor gene (AR). *Clinical Genetics*, 49: 323 - 324.
- Lu, N. Z., Wardell, S. E., Burnstein, K. L., DeFranco, D., Fuller, P. J., Giguere, V., Hochberg, R. B., McKay, L., Renoir, J. M., Weigel, N. L., Wilson, E. M., McDonnell, D. P., Cidlowski, J. A. (2006). *International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. Pharmacological Reviews*, 58: 782 - 797.
- Lu, S., Tsai, S. Y., Tsao, M. J. (1997): Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Research*, **57**: 4511 - 4516.
- Lumbroso, R., Beitel, L. K., Vasiliou, D. M., Trifiro, M. A., Pinsky, L. (1997): Codon-usage variants in the polymorphic (GGN)_n trinucleotide repeat of the human androgen receptor gene. *Human Genetics*, 101: 43 - 46.
- MacLean, H. E., Warne, G. L., Zajac, J. D. (1997): Localization of functional domains in the androgen receptor. *The Journal of steroid Biochemistry and molecular biology*, 62: 233 - 242.

- McNeal, J. E. (1978): Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Investigative Urology*, 15: 340 - 345.
- McNeal, J. E., Bostwick, D. G. (1986): Intraductal dysplasia: A premalignant lesion of the prostate. *Human pathology*, 17: 64 - 71.
- Medeiros, R., Vasconcelos, A., Costa, S., Pinto, D., Morais, A., Oliveira, J., Lopes, C. (2003): Steroid hormone genotypes AR *StuI* and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*, 141: 91 - 96.
- Nelson, P. S., Clegg, N., Arnold, H., Ferguson, C., Bonham, M., White, J., Hood, L., Lin, B. (2002): The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 99: 11890 - 11895.
- Niu, Y., Altuwaijri, S., Yeh, S., Lai, K. P., Yu, S., Chuang, K. H., Huang, S. P., Lardy, H., Chang, C. (2008). Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 105: 12188 - 12193.
- O'Brien, T. G., Guo, Y., Visvanathan, K., Sciulli, J., McLaine, M., Helzlsouer, K. J., Watkins-Bruner, D. (2004): Differences in ornithine decarboxylase and androgen receptor allele frequencies among ohnic groups. *Molecular carcinogenesis*, 41: 120 - 123.
- Olapade-Olaopa, E. O., Muronda, C. A., MacKay, E. H., Danso, A. P., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Habib, F. K. (2004): Androgen receptor protein expression in prostatic tissues in Black and Caucasian men. *The Prostate*, 59: 460 - 8.
- Platz, E. A., Giovannucci, E., Dahl, D. M., Krithivas, K., Hennekens, C. H., Brown, M., Stampfer, M. J., Kantoff, P. W. (1998) The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 7: 379 - 384
- Price, D. K., Chau, C. H., Till, C., Goodman, P. J., Baum, C. E., Ockers, S. B., English, B. C., Minasian, L., Parnes, H. L., Hsing, A. W., Reichardt, J. K., Hoque, A., Tangen, C. M., Kristal, A. R., Thompson, I. M., Figg, W. D. (2010): Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *The Journal of urology*, 184: 2297 - 302.

- Reptova, S., Smesny Trtkova, K., Kolar, Z. (2014): Direct detection of the AR-E211 G>A gene polymorphism from blood and tissue samples without DNA isolation. *Panatology oncology research*, 20: 223-227.
- Ribeiro, M. L., Santos, A., Carvalho-Calles, A. B., Hackel, C. (2002): Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Brazilian journal of medical and biological research*, 35: 205 - 213.
- Richards, R. I., Sutherland, G. R. (1992): Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell*, 70: 709 - 712.
- Santos, M. L., Sarkis, A. S., Nishimoto, I. N., Nagai, M. A. (2003): Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer detection and prevention*, 27: 321 - 326.
- Sartor, O., Zheng, Q., Eastham, J. A. (1999): Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology*, 53: 378 - 380.
- Shafi, A. A., Yen, A. E., Weigel, N. L. (2013): Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer, *Pharmacology & Therapeutics*, 140: 223 - 38.
- Shen, M. M., Abate-Shen, C. (2010): Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges, *Genes & development*, 24: 1967 - 2000.
- Shimotsu, H., Takahashi, H., Saito, H. (1980): A new site-specific endonuclease *StuI* from *Streptomyces tubercidicus*. *Gene*, 11: 219 - 225.
- Schroder, F. H., Raaijmakers, R., Postma, R., van der Kwast, T. H., Roobol, M. J. (2005): 4-year prostate specific antigen progression and diagnosis of prostate cancer in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. *The Journal of urology*, 174: 489 - 94.
- Simental, J. A., Sar, M., Lane, M. V., French, F. S., Wilson, E. M. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *The Journal of biological Chemistry*, 266: 510 - 518.
- Singh, S. M., Gauthier, S., Labrie, F. (2000): Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, 7: 211 - 247.
- Stanford, J. L., Just, J. J., Gibbs, M., Wicklund, K. G., Neal, C. L., Blumenstein, B. A., Ostrande, E. A. (1997): Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: Molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*, 57: 1194 - 1198.

- Stangroom, J. Social Science Statistics. Statistical Test Calculators. Pearson Correlation Coefficient Calculator [online]. ©2014 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://www.socscistatistics.com/tests/pearson/Default.aspx>.
- Thigpen, A. E., Davis, D. L., Milatovich, A., Mendonca, B. B., Imperato-McGinley, J., Griffin, J. E., Francke, U., Wilson, J. D., Russell, D. W. (1993): Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 90: 799 - 809.
- Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Scott Lucia, M., Parnes, L. H., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., Coltman, Ch. A., (2004): Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per millilitre. *National English journal of medicine*, 350: 2239 - 46.
- Tut, T. G., Ghadessy, F. J., Trifiro, M. A., Pinsky, L., Yong, E. L. (1997): Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82: 3777 - 3782.
- Yu, S. Q., Lai, K. P., Xia, S. J., Chang, H. C., Chang, C., Yeh, S. (2009). The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 11: 39 - 48.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(CAG) _n	neurčitý počet repetice CAG
(GGC) _n	neurčitý počet repetice GGC
5 α -DHT	5 α -dihydrotestosteron
A	adenin
<i>Accession</i>	identifikační číslo
AF	aktivační doména (<i>activation function</i>)
AR	androgenový receptor
ARE	na nadrogen odpovídající element (<i>androgen response element</i>)
BPH	benigní prostatická hyperplazie
C	cytosin
CKD	cyklin dependentní kináza
DBD	DNA-vazebná doména (<i>DNA binding domain</i>)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleozidtrifosfáty
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FFPE	parafinová tkáň fixovaná formalínem (<i>formalin-fixed paraffin embedded</i>)
G	guanin
H	<i>hinge region</i>
KP	karcinom prostaty
LBD	ligand-vazebná doména (<i>ligand binding domain</i>)
N	tkáň, vykazující znaky normální tkáně
NTD	N-koncová doména (<i>N-terminal domain</i>)
p16	protein p16
pb	pár bází
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIN	prostatická intraepiteliální neoplazie (<i>prostatic intraepithelial neoplasia</i>)
PSA	prostatický specifický antigen

RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
rpm	počet otáček za minutu (<i>revolutions per minute</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	tymin
TAE pufr	Tris- acetát- EDTA pufr