

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav klinické a molekulární patologie



DISERTAČNÍ PRÁCE

Stanovení fúzního genu *TMPRSS2-ERG* u nádoru  
prostаты, jeho význam a souvislosti s dalšími  
sledovanými faktory

Olomouc 2018

Mgr. Alena Burdová

# PROHLÁŠENÍ

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

Olomouc 27. června 2018

-----  
Alena Burdová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Zdeňkovi Kolářovi CSc. a doc. Mgr. Honzovi Bouchalovi Ph.D. za vynikající vedení. Z týmu Laboratoře molekulární patologie bych dále ráda poděkovala kolegyni MUDr. Tamaře Jamaspishvili PhD. Z týmu Onkologického centra v Novém Jičíně bych ráda poděkovala MUDr. Mgr. Ivo Kasperčíkovi a kolegům Mgr. Spirovi Tavandzisovi a Pavle Volné. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

## ABSTRAKT

Karcinom prostaty (CaP) je jedním z nejčastějších maligních onemocnění a nejběžnější příčinou úmrtí mužů na rakovinu. Jedná se o heterogenní onemocnění, pro které v současné době neexistují spolehlivé diagnostické a prediktivní markery a velmi často je indikována zbytečně agresivní terapie. Proto jedním z hlavních cílů současného výzkumu CaP je hledání a prověřování nových biomarkerů. Jedním z nich by mohla být fúze genu *TMPRSS2-ERG*.

V této studii jsme určili frekvenci výskytu *TMPRSS2-ERG* genové fúze pomocí FISH (fluorescence in situ hybridizace). Pozitivní výsledek FISH byl prokázán u 60/155 (39 %) případů. Zjistili jsme významnou pozitivní korelaci mezi počtem buněk s přítomnou fúzí a metastázami u CaP. Fúze genu *TMPRSS2-ERG* byla také asociována s nižší expresí PTEN a pozitivně korelovala s expresí ERG proteinu. Pozorovali jsme také korelaci exprese ERG s proteiny AR a TOP2B. Další část naší práce byla zaměřena na hledání korelace mezi zánětem a karcinomem prostaty. Bylo prokázáno, že s nádorem asociované makrofágy (TAM) a nádor infiltrující lymfocyty (TIL) ovlivňují progresi nádoru. Naším cílem bylo zjistit, zda může přítomnost *TMPRSS2-ERG* fúzního genu ovlivnit rozsah infiltrace nádorových struktur buňkami exprimujícími CD204 a CD3 antigeny. Zjistili jsme, že vyšší infiltrace těchto buněk v nádorových strukturách pozitivně koreluje s přítomností fúzního genu. Tato asociace mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a rozdílnou schopností zánětlivých buněk infiltrovat nádorové struktury nebyla dosud publikována.

Naše výsledky potvrzují důležitou roli *TMPRSS2-ERG* genové fúze v patogenezi karcinomu prostaty a také její využitelnost jako diagnostického a prognostického nástroje a v budoucnu potencionálního terapeutického cíle. Její důležitost nespočívá jen v její vysoké prevalenci, kombinovatelnosti s jinými biomarkery, citlivosti a specificitě v časně diagnostice CaP, ale také v souvislosti s androgenovou signalizací a s rolí, kterou sehraává při zánětu.

**Klíčová slova:** *TMPRSS2-ERG* genová fúze, karcinom prostaty, biomarkery, zánět, CD204+ makrofágy, CD3+ T-lymfocyty

## ABSTRACT

Prostate cancer (CaP) is one of the most frequent malignancies and the most common cause of death in men. This is a heterogeneous disease that currently does not have reliable diagnostic and predictive markers and very often there is indicated an inadequately aggressive therapy. The main focus of current research on CaP is therefore finding and testing of new biomarkers. Such a marker could also be a *TMPRSS2-ERG* gene fusion.

In this study we analysed the frequency of *TMPRSS2-ERG* gene fusion by FISH (fluorescence in situ hybridization). The positive FISH results were seen in 60/155 (39 %) cases. We have found a significant positive correlation between the number of fusion positive cells and metastasing in CaP. The *TMPRSS2-ERG* gene fusion was also associated with lower expression of PTEN and positively correlated with expression of ERG protein. We also observed the co-expression of ERG, AR and TOP2B. Another part of our work was focused on a significant association between inflammation and prostate cancer. It has been shown that Tumor-associated macrophages (TAM) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) affect tumor progression. Our goal was to determine whether the presence of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion could affect the level of infiltration of tumor structures by cells expressing CD204 and CD3 antigens. We have found that higher infiltration of these cells in tumor structures positively correlated with the presence of gene fusion. The association between the presence of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion and the different ability of inflammatory cells to infiltrate tumor structures has not yet been published.

Our results confirm the important role of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion in the pathogenesis of prostate cancer, as well as its utility as a diagnostic or prognostic biomarker and in the future a potentially therapeutic target. This fusion is important not only for its high prevalence, possible combination with other biomarkers, sensitivity and specificity in early diagnostics of CaP, but also in connection with the androgenic signalling and with its role in inflammation.

Keywords: *TMPRSS2-ERG* gene fusion, prostate cancer, biomarker, inflammation, CD204+ macrophages, CD3+ T-lymphocytes

# OBSAH

Obsah .....	6
1. TEORETICKÝ ÚVOD .....	8
1.1. Karcinom prostaty.....	8
1.2. Genové fúze a jejich význam.....	9
1.3. <i>TMPRSS2-ERG</i> genová fúze, mechanismus jejího vzniku.....	9
1.4. Význam androgenového receptoru a transkripčního faktoru ERG .....	11
1.5. Molekulární patogeneze karcinomu prostaty ve vztahu k <i>TMPRSS2-ERG</i> fúznímu genu .....	12
1.6. <i>TMPRSS2-ERG</i> a jeho role při zánětu.....	13
1.7. Prognostický význam <i>TMPRSS2-ERG</i> genové fúze .....	15
1.7.1. <i>TMPRSS2-ERG</i> fúzní varianty.....	16
1.7.2. Heterogenita karcinomů prostaty .....	17
1.8. <i>TMPRSS2-ERG</i> jako diagnostický znak.....	18
1.9. <i>TMPRSS2-ERG</i> jako potenciální terapeutický cíl i prediktivní biomarker .....	19
2. CÍLE PRÁCE .....	21
3. METODY.....	22
3.1. Materiál .....	22
3.2. Detekce <i>TMPRSS2-ERG</i> metodou FISH.....	24
3.3. Hodnocení a interpretace výsledků FISH.....	25
3.4. Statistická analýza.....	26
4. VÝSLEDKY .....	27
4.1. Detekce <i>TMPRSS2-ERG</i> genové fúze a přestavby <i>TMPRSS2</i> genu pomocí FISH....	27
4.2. Vztah mezi přítomností <i>TMPRSS2-ERG</i> genové fúze a expresí ERG. ....	28
4.3. ERG exprese koreluje s androgenovým receptorem a TOP2B.....	28
4.4. Vztah mezi přítomností <i>TMPRSS2-ERG</i> genové fúze a metastatickým potenciálem CaP. ....	29

4.5.	Infiltrace tkáňových struktur prostaty CD204+ makrofágy a CD3+ T-lymfocyty ....	30
4.6.	Vztah mezi přítomností <i>TMPRSS2-ERG</i> genové fúze a expresí PTEN. ....	30
4.7.	Význam <i>TMPRSS2-ERG</i> fúzního genu a přestavby <i>TMPRSS2</i> pro progresi karcinomu prostaty. ....	33
4.8.	Vymezení mého podílu práce: .....	35
5.	DISKUZE.....	36
6.	SEZNAM ZKRATEK .....	43
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46
8.	SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ .....	56
9.	PŘÍLOHY .....	58
	PŘÍLOHA č. 1 .....	59
	PŘÍLOHA č. 2 .....	62
	PŘÍLOHA č. 3 .....	64
	PŘÍLOHA č. 4 .....	66

# 1. TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1. Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (CaP) je nejběžnější malignitou a druhou nejčastější příčinou úmrtí spojenou s rakovinou u mužů ve světě, zejména ve vyspělých zemích [1]. Jeho výskyt vykazuje zeměpisné a etnické rozdíly. Asijská populace má ve srovnání s Kavkazskou nižší výskyt tohoto onemocnění. Předpokládá se, že tento rozdíl může být způsoben odlišným genetickým pozadím obou populací a jiným životním stylem.

CaP je heterogenní onemocnění, jež se vyznačuje indolentní a agresivní formou [2]. Jeden z hlavních problémů, co se diagnózy a prognózy týká, je nedostatek vhodných biomarkerů [1]. Stanovení zvýšených hladin sérového PSA (prostatický specifický antigen) a/nebo palpační nález při rektálním vyšetření, jsou hlavními ukazateli, na jejichž podkladě se rozhoduje o provedení biopsie prostaty a následného histopatologického vyšetření vzorku tkáně. Tato vyšetření však nejsou spolehlivými ukazateli diagnózy ani vhodného terapeutického přístupu. Zvýšená hladina PSA může být detekována i u mužů, kteří netrpí nádorovým onemocněním prostaty [3]. Jediný způsob, jak ověřit skutečný stav prostatické tkáně je biopsie. V případě, že je biopsií potvrzena přítomnost nádoru, chybějí v současnosti validní biomarkery, které by pomohly určit, zda se jedná o tzv. indolentní nebo agresivní formu CaP. Agresivní karcinomy získávají hormonální nezávislost a vyvíjí se v tzv. kastroresistentní karcinomy, které metastazují do kostí, plic, mozku a popřípadě dalších orgánů. Z toho vyplývá, že ne všechny nádory je nezbytné léčit radikálním způsobem, který nepřináší benefit z hlediska celkového přežití [4, 5]. Aby bylo možné identifikovat nádory s potenciálem progresu do stadia kastroresistence a navrhnout účinnější terapii, je nutné dobře porozumět molekulárním mechanismům, které stojí za progresí tohoto typu nádoru [2, 3]. Klíčovými faktory, které se podílejí na patogenezi CaP jsou genomické změny jako je vznik fúzních genů včetně *TMPRSS2-ERG*, ztráta tumor-supresorových genů jako jsou *PTEN*, *TP53* nebo *NKX3.1*, chromozomová instabilita, oxidativní stress a zánět [6]. Chronický zánět přispívá ke vzniku a vývoji CaP tím, že modifikuje nádorové mikroprostředí, navozuje buněčný stress a ovlivňuje ostatní děje související s malignizací buňky. Při rozvoji zánětu v prostatické tkáni může hrát významnou roli aktivovaný gen *ERG* [7].



## 1.2. Genové fúze a jejich význam

Již delší dobu je známo, že genové fúze, vznikající na podkladě chromozomových přestaveb, mohou sehrávat důležitou roli v iniciaci kancerogeneze [8]. Ještě nedávno byly chromozomové přestavby vedoucí ke vzniku fúzních genů spojovány především s hematologickými malignitami a velice zřídka popisovány u solidních nádorů [9]. To se změnilo v roce 2005, kdy Tomlins a jeho kolegové poprvé popsali u nádoru prostaty genovou fúzi mezi genem *TMPRSS2* (Transmembrane Protease, Serine 2) a onkogenními členy ETS (E26 Transformation-Specific) rodiny transkripčních faktorů, konkrétně *ERG* genem (ETS Related Gene) a *ETV1* genem (ETS Variant Gene 1) [10]. V dalších letech bylo zjištěno, že gen *TMPRSS2* fúzuje i s dalšími členy ETS rodiny transkripčních faktorů jako jsou geny *ETV4* (ETS Variant Gene 4) nebo *ETV5* (ETS Variant Gene 5) [11, 12].

Rodina ETS patří mezi jednu z největších rodin transkripčních faktorů. Pro všechny členy této rodiny je společná konzervovaná DNA-vazebná doména, tzv. ETS doména, která umožňuje vazbu na sekvenci DNA bohatou na puriny obsahující „5'-GGA/T-3'core motiv“ [13, 14]. ETS transkripční faktory hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech, zahrnujících buněčnou proliferaci, apoptózu, diferenciaci, angiogenezi a invazivitu. Výsledkem fúze 5'UTR (untranslated region) oblasti *TMPRSS2* genu s výše uvedenými geny pro ETS transkripční faktory je ve většině případů nadměrná exprese ETS transkripčního faktoru, která je regulována androgeny prostřednictvím ARE elementu lokalizovaného do oblasti promotoru *TMPRSS2* genu [15]. *TMPRSS2* gen kóduje protein, který náleží do rodiny serinových proteáz a je exprimován v prostatické tkáni pod transkripční kontrolou androgenů.

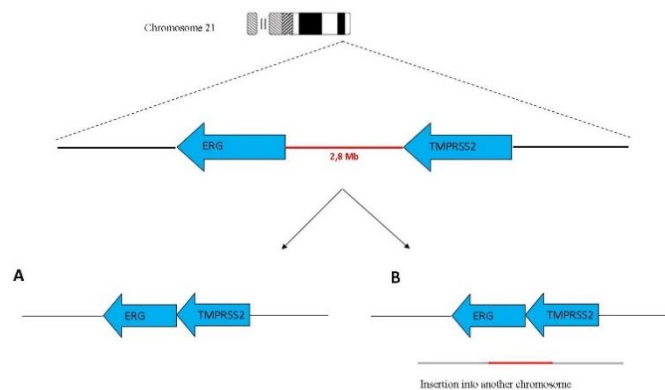
Nejčastěji detekovanou genovou fúzí u karcinomu prostaty je *TMPRSS2-ERG* [16], která bývá přítomna u 40-70 % případů [17, 18], a zahrnuje 80-90 % všech *TMPRSS2-ETS* genových fúzí u CaP [10, 19-21]. Genové fúze *TMPRSS2* genu s dalšími členy ETS rodiny transkripčních faktorů jako jsou *ETV1*, *ETV4* a *ETV5* byly detekovány celkem u 5-10 % případů karcinomů prostaty [22-24].

## 1.3. *TMPRSS2-ERG* genová fúze, mechanismus jejího vzniku

Přestavba s genovou fúzí *TMPRSS2-ERG*, která je detekována přibližně u poloviny případů CaP, je časnou událostí v karcinogenezi prostaty. Nevyskytuje se u benigní prostatické hyperplazie (BPH) a proliferační zánětlivé atrofie (PIA), ale bývá přítomna u přibližně 20 %

prostatické intraepiteliální neoplazie (PIN) a u přibližně 50 % lokalizovaných nádorů prostaty [10, 25-29].

Relativně vysoká frekvence této fúze u karcinomu prostaty je způsobena relativní blízkostí obou genů (*TMPRSS2* a *ERG*) na chromozomu 21q22.2. Fúze obou genů je nejčastěji způsobena intersticiální delecí, při níž dochází ke ztrátě oblasti mezi těmito geny (přibližně 2,8 Mb) nebo v menší míře insercí této oblasti do jiného chromozomu [17, 30-32]. Delece, jako příčina vzniku této genové fúze, je pozorována u 39-60 % *TMPRSS2-ERG* pozitivních případů [19, 33] a má za následek snížení exprese zhruba 13 genů ležících v této oblasti. Vedle onkogenního potenciálu produktu genové fúze *TMPRSS2-ERG*, může být ztráta alespoň dvou z těchto genů, *ETS2* (ETS Proto-Oncogene 2) a *HMGNI* (High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1), spojena s progresí nádoru [19, 20]. Mechanismus vzniku *TMPRSS2-ERG* genové fúze je shrnut na Obr. 1.



**Obr. 1: Mechanismus vzniku *TMPRSS2-ERG* genové fúze.**

A. Fúze v důsledku delece 2,8 Mb dlouhé oblasti (znázorněna červeně). B. Vznik fúze v důsledku inserce této oblasti na jiné místo v genomu. Převzato z [2].

Na základě analýzy genomové vazby byla prokázána asociace mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a vzácnými variantami v genu *POLI* [Polymerase (DNA Direct) Iota (variant F532S)] a *ESCO1* [Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 1 (variant N191S)] u karcinomu prostaty [34]. Oba geny kódují proteiny podílející se na opravě dvouřetězcových DNA zlomů, čímž chrání chromozomální stabilitu a brání translokačním událostem, jako je fúze *TMPRSS2-ERG*.

K fúzi těchto genů přispívá nejen jejich vzájemná blízkost v rámci chromozomu 21, ale také androgenová signalizace [35, 36]. Stimulace dihydrotestosteronem vede ke kolokalizaci

androgenového receptoru (AR) s TOP2B na promotorech androgen regulovaných genů. Enzym TOP2B [Topoisomerase (DNA) II Beta 180kDa] katalyzuje přechodný vznik dvou řetězcových zlomů, aby mohlo dojít k uvolnění pnutí DNA řetězců během transkripce. Většina DNA zlomů je správně opravena, ale ve výjimečných případech může dojít k *de novo* tvorbě *TMPRSS2-ERG* fúzního transkriptu. V několika publikacích byla pozorována signifikantně vyšší koexprese AR a TOP2B i v ložiscích PIN v porovnání s BPH [35, 37]

#### 1.4. Význam androgenového receptoru a transkripčního faktoru ERG

AR je jaderný transkripční faktor, který zprostředkovává působení steroidních hormonů. Reguluje expresi cílových genů v prostatě, například prostatického specifického antigenu (PSA), nebo transmembránové serinové proteázy typu 2 (*TMPRSS2*). Aktivace androgenového receptoru, zprostředkovaná signalizací WNT/ $\beta$ -catenin, vede u buněk s přítomnou fúzí *TMPRSS2-ERG*, k AR řízené transkripci a expresi, následně zvýšené transkripci fúzního genu a tím k vyšším hladinám ERG proteinu [38]. Samotná nadměrná exprese AR nedokáže stimulovat hyperplastickou lézi, ale když je kombinovaná s vysokými hladinami ERG, podporuje vývoj špatně diferencovaného invazivního adenokarcinomu [39]

Onkogen *ERG* je klíčovým regulátorem řady procesů jako jsou buněčná proliferace, diferenciace, angiogeneze, zánět a apoptóza [1]. Za normálních okolností je *ERG* silně exprimován v embryonálním mesodermu a endotelu a sehrává důležitou roli při tvorbě cévního systému, urogenitálního traktu a při vývoji kostí [40-42]. Jeho aberantní exprese má významný dopad na buněčnou invazivitu [43], metastázování [44] a na diferenciaci epitelu prostaty [45]. Wang a jeho kolegové ve své práci prokázali, že specifické umlčení genu *ERG* v buňkách nádoru prostaty způsobuje zablokování buněčného cyklu na přechodu G0/G1 fází a zřetelně inhibuje buněčnou proliferaci. Přestože je *ERG* první identifikovaný konstitutivně aktivovaný onkogen u karcinomu prostaty, nejsou stále plně pochopeny funkční důsledky *TMPRSS2-ERG* genové fúze [1].

Stejně tak nejsou zcela známy všechny cílové geny tohoto transkripčního faktoru. Jedním z nich je, jaderný transkripční faktor MYC, který spouští expresi mnoha genů podílejících se na buněčné proliferaci a je součástí významných buněčných procesů [45]. Obecně bývá často amplifikován u mnoha karcinomů (v rámci amplifikace oblasti 8q24, kde je lokalizován), což vede k jeho konstitutivní expresi [46]. Zatím však není známo, jakou specifickou roli sehrává při rozvoji karcinomu prostaty. Amplifikace *MYC* je však asociovaná s pokročilým onemocněním. Dokládají to publikace, které popisují jeho zvýšenou expresi

v PIN a v invazivních karcinomech [47, 48], a také práce, jež prokázaly korelaci mezi amplifikací 8q24 a vysokým Gleasonovým skóre a metastatickým karcinomem prostaty [47-50]. Zvýšená exprese MYC u primárního karcinomu prostaty bývá běžnou událostí [51]. Dalším cílovým genem je *TWIST 1* (TWIST-related protein 1). Tento gen kóduje transkripční faktor, který sehraává důležitou roli v embryonálním vývoji a epitelovo-mezenchymové tranzici (EMT). Jeho protein také může podporovat invazi nádorových buněk a metastazování [52, 53]. V roce 2011 identifikovali Riberio a jeho kolegové *CRISP3* (Cysteine Rich Secretory Protein 3) jako další cílový gen *ERG* transkripčního faktoru. Hladiny mRNA obou těchto genů spolu silně korelovaly, přičemž exprese *CRISP3* u CaP s detekovanou fúzí byla vyšší v porovnání s CaP, u nichž fúze detekována nebyla. Pomocí chromatinové imunoprecipitace prokázali, že se *ERG* váže přímo na promotor genu *CRISP3* [54]. Tento gen bývá exprimován v mužských i ženských reprodukčních orgánech a uplatňuje se při oplodnění. Již dříve byl uváděn do souvislosti s karcinomem prostaty [55] a také navržen jako možný specifický biomarker pro CaP [56, 57].

### **1.5. Molekulární patogeneze karcinomu prostaty ve vztahu k *TMPRSS2-ERG* fúznímu genu**

Dvě nejčastější změny u karcinomu prostaty jsou výskyt *TMPRSS2-ERG* genové fúze a ztráta tumor-supresorového genu *PTEN* (Phosphatase And Tensin Homolog) [44, 58]. Tento nádorový supresor je součástí signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy/AKT (PI3K/AKT) a působí zde jako negativní regulátor, který defosforyluje fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát (PIP3) na fosfatidylinositol 4,5-difosfát (PIP2) a tím snižuje aktivitu AKT. Ztráta *PTEN* exprese se projeví následnou aktivací AKT (Proteináza B, *PKB*), která inhibuje apoptózu a podporuje buněčnou proliferaci. Aberantní exprese *PTEN* je popsána u mnoha nádorů, včetně metastatického karcinomu prostaty, u něhož bývá často detekována homozygotní delece tohoto genu [59-61]. Většina případů primárních karcinomů prostaty nese heterozygotní ztrátu *PTEN* [62, 63]. Bismar ve své práci předpokládá, že vývoj CaP prvotně určuje hemizygotní delece *PTEN*, což vyvolá vznik PIN léze [64]. Tato monoalelická inaktivace *PTEN* vede ke genomické instabilitě, na základě, které snadněji dochází ke chromozomálním přestavbám, což může vést ke vzniku genové fúze a progresi onemocnění. Následná inaktivace druhé alely *PTEN* genu (může jít o homozygotní deleci, nebo deleci jedné alely a mutaci druhé) charakterizuje zvláště agresivní podskupinu karcinomu prostaty [65].

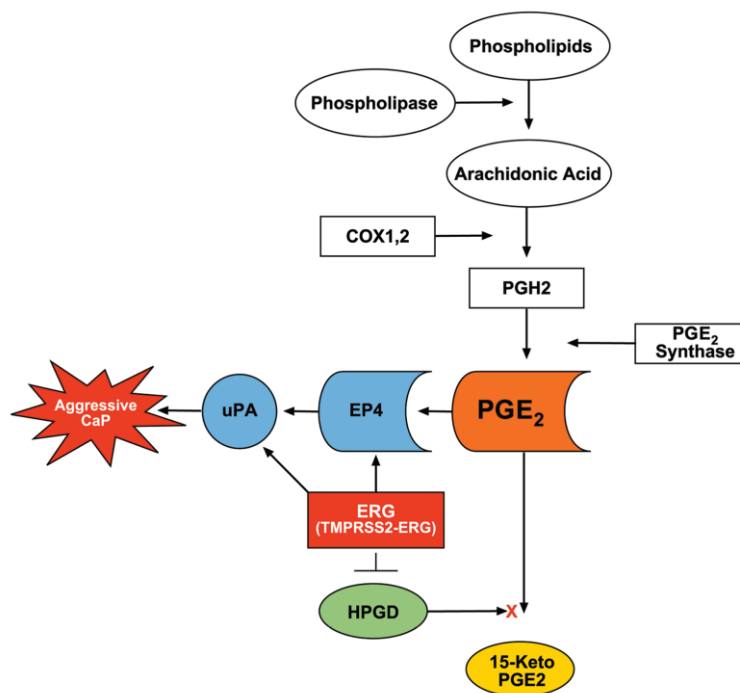
Několik studií prokázalo, že zvýšená exprese ERG v epitelových buňkách prostaty dospělé myši dostačuje k indukci epitelové hyperplazie a fokální prostatické intraepitelové neoplazie, ne však k rozvoji karcinomu [39, 66, 67]. Dokazují tak, že zvýšená exprese ERG se může podílet na transformaci epitelových buněk prostaty, ale sama o sobě neindukuje vznik karcinomu prostaty. Až zvýšená exprese ERG spolu s delecí *PTEN* vede k rozvoji dobře diferencovaného adenokarcinomu [44, 58]. ERG protein je také zapojen do aktivace represivního epigenetického programu prostřednictvím přímé aktivace H3K27 metyltransferázy EZH2 (Enhancer Of Zeste Homolog 2). Zde sehrává *TMPRSS2-ERG* fúze rozhodující roli. Umožňuje progresi nádoru narušením specifické diferenciační linie prostaty a podporuje dediferenciační program, jež je zprostředkovaný právě pomocí *EZH2* [68]. U ERG pozitivních karcinomů prostaty byla rovněž detekována zvýšená exprese efektoru Wnt signální dráhy FZD4, který se může podílet na buněčném fenotypu vedoucím k vývoji EMT [69, 70].

### **1.6. *TMPRSS2-ERG* a jeho role při zánětu**

Chronický zánět je důležitým faktorem při vzniku nádorů u různých typů malignit [71]. Zánět může ovlivnit patogenezi karcinomu prostaty modifikací nádorového mikroprostředí, remodelováním extracelulární matrix a zahájením procesu EMT. Buněčný stres navozený zánětem způsobuje poškození genomu, které vede k buněčné transformaci, zvýšené vaskularizaci a mutacím DNA. Během bakteriální infekce dochází k infiltraci prostatické tkáně neutrofilními granulocyty, makrofágy a lymfocyty. To vede k produkci volných kyslíkových a dusíkových radikálů a různých cytokinů, které mění tkáňové mikroprostředí, způsobují ireverzibilní defekty DNA a tím vedou k maligní transformaci. Produkce enzymů, cytokinů a chemokinů také podporuje růst a šíření nádorových buněk. Na druhé straně se zánětlivé buňky rovněž účastní imunitních dějů a některé typy buněk mohou být významným faktorem potlačujícím nádorový růst a způsobujícím regresi nádorových buněk. Doposud není zcela jasné, které typy buněk podporují nádorový růst, a které naopak působí protinádorově. Zánět koreluje se zvýšeným rizikem vzniku proliferativní zánětlivé atrofie (PIA) a může maskovat prostatickou intraepitelovou neoplazii nebo incipientní karcinom při benigní prostatické hyperplazii, což může znamenat chybnou interpretaci bioptického nálezu [72].

Důležitou součástí nádorového mikroprostředí jsou s nádorem asociované makrofágy (TAM) a nádor infiltruující dendritické buňky (TIDC), které mohou navodit imunosupresi a podporovat progresi nádoru ve spolupráci s infiltruujícími lymfocyty (TIL) [73]. Makrofágy jsou hlavní složkou nádor infiltruujících imunitních buněk, které mohou podpořit

iniciaci nádoru, jeho progresi a vznik metastáz. Bylo prokázáno, že infiltrace TAM koreluje se špatnou prognózou u karcinomu prsu, děložního čípku a močového měchýře. Souvisí však s lepší prognózou u nemalobuněčného karcinomu plic a kolorektálního karcinomu, což naznačuje odlišné mechanismy v různých typech nádorů nebo v různých tkáňových prostředích. Bylo provedeno mnoho studií, které se zabývaly markery asociovanými s makrofágy ve vzorcích karcinomu prostaty s různými velikostmi souborů pacientů a koncovými výstupy. Výsledky však zůstávají kontroverzní [74].



**Obr. 2:** Navrhovaný model propojení *TMPRSS2-ERG* genové fúze se signální dráhou prostaglandinů.

Inhibice HPGD (15-hydroxyl-prostaglandin dehydrogenáza) v důsledku nadměrné exprese *TMPRSS2-ERG* genové fúze zabraňuje katabolismu PGE<sub>2</sub>, takže akumulace PGE<sub>2</sub> má za následek aktivaci uPA a růst buněk, což přispívá k progresi CaP. ERG se přímo váže na promotor uPA. EP4 - receptor 4 prostaglandinu E<sub>2</sub>, COX1, 2 – cyklooxygenáza 1 a 2, PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>, uPA – urokinázový typ plasminogenný aktivátor. Převzato z [70].

ERG protein je schopen indukovat PIN a stimulovat signalizaci zprostředkovanou prostaglandiny v buňkách CaP, kde je exprimován v koncentracích 20 až 100x vyšších než v benigních tkáních [70]. Podle údajů z literatury existuje možná vazba mezi schopností fúzního genu ovlivňovat hladiny prostaglandinů nebo obecně zánět a funkčností dráhy ovlivněné cyklooxygenázou-2 (COX-2), enzymem, který kontroluje syntézu prostaglandinů. Nadměrná

exprese *ERG* je také nepřímo úměrná expresi 15-hydroxyl-prostaglandin dehydrogenázy (HPGD), enzymu podílejícím se na degradaci prostaglandinů. Byla prokázána schopnost prostaglandinů indukovat růst karcinomu prostaty, regulovat expresi „urokinase-type“ plasminogenového aktivátoru a přispívat tak k invazivitě nádorových buněk [69, 70] (Obr. 2).

### 1.7. Prognostický význam *TMPRSS2-ERG* genové fúze

Od roku 2005, kdy Tomlins a jeho kolegové [10] poprvé popsali přítomnost této fúze v CaP, bylo publikováno mnoho studií na toto téma, avšak její prognostický význam zůstává i v současnosti nejasný [1]. Lze říci, že převládají publikace, v nichž přítomnost *TMPRSS2-ERG* genové fúze koreluje s horší prognózou [19, 75-78]. Je však možné najít také práce, kde je přítomnost této fúze v asociaci s dobrou prognózou [79-81] a také publikace, kde autoři nenalezli žádný vztah mezi výskytem fúze a prognózou onemocnění [28, 82-85]. Možným vysvětlením, proč tomu tak je, mohou být rozdílné přístupy jednotlivých vědeckých týmů. V jednotlivých pracích jsou patrné rozdíly ve výběru vzorků, velikosti souboru pacientů, rozdílnostech ve zpracování vzorků a v neposlední řadě také ve výběru metody, kterou je *TMPRSS2-ERG* genová fúze detekovaná [15, 86]. Klíčovým problémem je rozdílné stanovení výsledných korelujících parametrů („end-point“ studie), které představují buď biochemické selhání (zvýšení sérového PSA po prostatektomii) nebo smrt v důsledku CaP [87]. Odlišné výsledky by také mohly být zapříčiněny charakteristikami karcinomů prostaty jako je např. heterogenita nádorové buněčné populace, přítomnost fúzních variant, a geografické nebo etnické rozdíly [15].

Attard a kolegové [75] našli pacienty se dvěma a více kopiemi fúzního genu (k jehož vzniku došlo delecí), kteří měli ve srovnání s pacienty bez této fúze kratší interval přežití. Toto zjištění se shoduje s výše uvedeným zjištěním, že nadměrná exprese *ERG* by měla být zodpovědná za progresi nádoru, a dále s tím, že deletovaný úsek o velikosti 2,8 Mb (nesoucí geny s tumor-supresorovou aktivitou) se může také podílet na onkogenním potenciálu *TMPRSS2-ERG* fúzního produktu [10, 19].

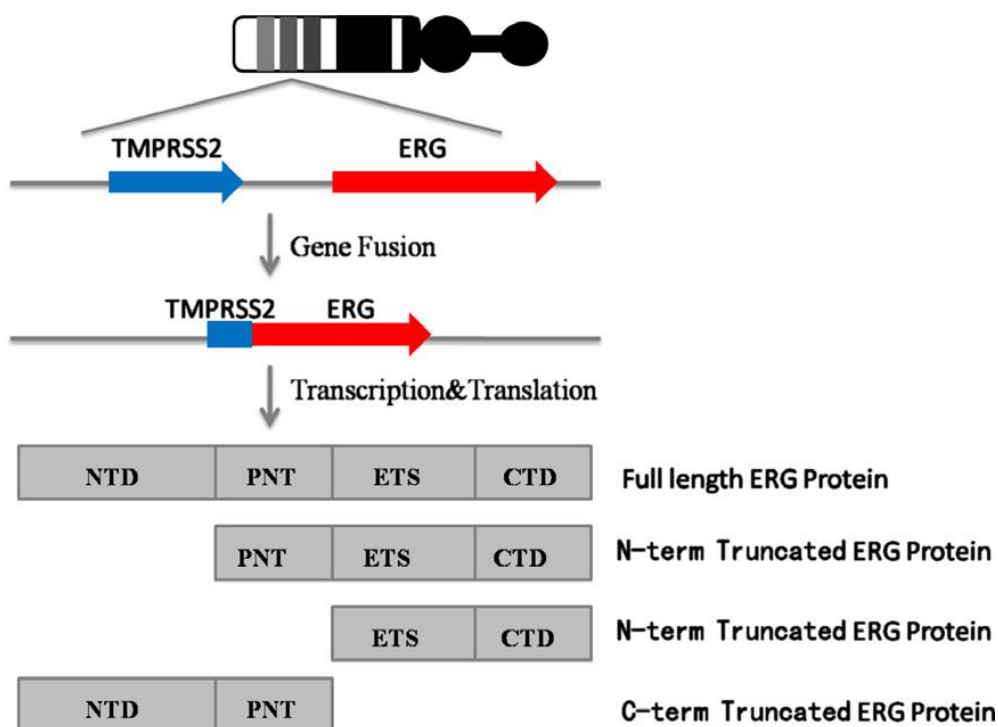
Naproti tomu Gopalan spolu s kolegy [83] zjistili, že *TMPRSS2-ERG* přestavba korelovala s lepší diferenciací nádoru (nižším „gradem“). Nicméně popsali i podskupinu karcinomů, u nichž byl zvýšen počet kopií *TMPRSS2-ERG* a tento nálezný koreloval s více agresivním CaP. Tyto nádory byly převážně aneuploidní/tetraploidní a obsahovaly další chromozomové abnormality. Na základě toho usoudili, že agresivní chování nádoru je dáno

spíše aneuploidií, než jen zvýšením počtu kopií přestavěného *TMPRSS2-ERG* fúzního genu. Podobné závěry publikoval také Toubaji a kol. [85]. Tomuto týmu se nepodařilo prokázat asociaci mezi *TMPRSS2-ERG* genovou fúzí a rekurencí onemocnění. Byl tak zpochybněn prognostický význam *ERG* genové fúze stanovené pomocí FISH. Podařilo se však nalézt asociaci mezi znásobením počtu kopií *ERG* genu a vyšším rizikem rekurence CaP. Podle výsledků této studie je vyšší počet kopií genu *ERG* výsledkem nádorové aneuploidie, která vede k polyzomii chromozomu 21. Vyšší pravděpodobnost nádorové progresi u karcinomu s větším počtem kopií *ERG* (bez genové přestavby) není překvapivá i z pohledu dřívějších prací, které označily aneuploidii za negativní prognostický faktor u CaP [88-90]. K nejednoznačnému prognostickému významu *TMPRSS2-ERG* genové fúze mohou přispívat také fúzní varianty a heterogenita CaP.

### **1.7.1. *TMPRSS2-ERG* fúzní varianty**

Bylo popsáno více než 20 transkripčních variant této fúze, které vznikají buď v důsledku alternativního sestřihu nebo v důsledku rekombinace (např. intersticiální delecí, insercí, translokacemi) [15]. Nejčastější varianta *TMPRSS2-ERG* genové fúze vzniká spojením exonu 1 *TMPRSS2* genu a exonu 4 *ERG* genu [17]. Wang a kol. ukázali, že jak přítomnost určitých isoform *TMPRSS2-ERG* genové fúze, tak jejich expresní hladina ovlivňují progresi CaP [76]. Například isoforma sestávající se z exonu 1-2 *TMPRSS2* genu a exonu 4 *ERG* genu je asociovaná s agresivním typem CaP. Také exprese kompletního proteinu ERG podporuje transkripční aktivitu onkogenů a usnadňuje nádorovou progresi. Naopak některé N-terminálně zkrácené varianty proteinu ERG, vzniklé v důsledku *TMPRSS2-ERG* fúzního genu (ztracená NTD nebo PNT doména) mohou inhibovat transkripční aktivitu, a to tím, že se kompetitivně váží na ETS domény vazebných míst u CaP. Karcinomy prostaty, které exprimují tento typ zkráceného ERG proteinu se mohou projevat méně agresivně [91] (Obr. 3).





**Obr. 3: Schéma jednotlivých strukturních variant ERG proteinu.**

NTD, N-terminální transkripční aktivační doména; PNT, protein-protein interakční doména; ETS doména, DNA vazebná doména; CTD, C-terminální transkripční aktivační doména. Převzato z [91].

### 1.7.2. Heterogenita karcinomů prostaty

Většina karcinomů prostaty vzniká multifokálně [92]. CaP totiž patří do skupiny nádorových onemocnění, které vznikají z několika nezávislých buněčných klonů. To potvrzují rozdílné nálezy delecí odlišných alel v rámci různých nádorových ohnisek [93, 94]. Přibližně 75 % vzorků pocházejících z radikální prostatektomie má několik nádorových ohnisek. Existují studie, které zkoumaly ETS fúze v kontextu multifokálního nádoru. Tyto studie prokázaly u 41 % až 67 % případů, že se jednotlivá nádorová ohniska od sebe lišila buď v přítomnosti či nepřítomnosti těchto fúzí, nebo v mechanismu vzniku genových fúzí (v důsledku delece nebo inserce) [17, 28, 95-98]. Tato pozorovaná fokální heterogenita podporuje hypotézu, že karcinogeneze prostaty je multicentrický proces, na kterém se podílí nejméně dvě nezávislé signální dráhy, což vede ke vzniku paralelně se vyvíjejících nádorových populací buněk, z nichž některé vznikají s přispěním signální dráhy zprostředkované ETS [27]. Byla také popsána heterogenita uvnitř jednotlivých nádorových ložisek [29, 99, 100]. Svensson se spolupracovníky popsali případ heterogenity, kde v jednom fokusu našli buněčná jádra,

kteřá byla pro tuto fúzi pozitivní i negativní a případy, kde tato fúze vznikala, jak v důsledku delece, tak inserce. Tato heterogenita může být důsledkem nádorové progresie a může vést k rozdílným klinickým projevům [99, 101].

Několik studií prokázalo přítomnost *TMPRSS2-ERG* genové fúze ve většině případů metastatického CaP [33, 102, 103]. U případů nádoru prostaty s jedním nádorovým ohniskem, byl status *ERG* přestavby shodný pro primární CaP i pro metastázy. U případů multifokálního CaP, navzdory popsané významné heterogenitě, byl status *ERG* přestavby shodný v dominantním nádorovém ohnisku a v metastázách. Tato shoda naznačuje, že metastázy pravděpodobně vznikají u multifokálního CaP z dominantního nádorového ložiska. Avšak nemůžeme vyloučit, že metastázy také vznikají ze sekundárního ohniska, zvláště u pacientů, jejichž dominantní a sekundární ohnisko vykazuje podobný typ *TMPRSS2-ERG* genové fúze [104]. V souladu s tímto Mehra a kolegové [96] publikoval, že u 83 % případů může být *TMPRSS2-ERG* fúze spojena s dominantním nádorem. Avšak u 17 % byla fúze pozorována jen u sekundárních nádorů. Tyto výsledky také naznačují, že malá část případů sekundárních nádorů nese významnou aberaci. Navíc, Perner spolu s kolegy [102] zjistil, že multifokální CaP může vykazovat jak *ERG* pozitivní, tak *ERG* negativní ložiska, přičemž *ERG* pozitivní měla větší předpoklad založit metastázu. Tento nález má jasný klinický dopad na progresi onemocnění a navržení vhodné léčby. Na druhou stranu Guo se spolupracovníky publikovali, že metastatické buňky mohou pocházet také z ložisek s *ERG*-negativní přestavbou [104].

## 1.8. *TMPRSS2-ERG* jako diagnostický znak

Jak již bylo uvedeno dříve, obecně používaný diagnostický marker PSA není dostatečně specifický. Jeho hlavním limitem, je nízká specifita (25-40 %), která vede k vysokému počtu negativních biopsií. Přesto je důležité diagnostikovat nádor včas, tak aby byla co nejdříve nasazená vhodná terapie [105]. V současné době je proto zaměřená pozornost na *TMPRSS2-ERG* genovou fúzi, která může sehrávat důležitou úlohu při diagnostice CaP a to jednak jako samostatný biomarker nebo v kombinaci s ostatními znaky.

Použití více biomarkerů u heterogenního onemocnění, jako je CaP vede ke zvýšení diagnostické senzitivity i specifity [106, 107]. V poslední době, je v tomto směru zaměřena pozornost také na *PCA3* (Prostate Cancer Antigen 3). *PCA3* je gen, který exprimuje nekódující RNA (ncRNA). Vysoká exprese *PCA3* probíhá v nádorových buňkách prostaty a může být detekována v moči pacientů [108], stejně jako produkt fúzního genu *TMPRSS2-ERG*. Nedávné

studie ukázaly, že právě kombinace těchto dvou biomarkerů by mohla zlepšit záchyt CaP, což by mohlo vést ke snížení počtu indikovaných biopsií. Testování těchto dvou RNA v moči pacientů by představovalo neinvazivní způsob diagnostiky CaP [105, 109].

*TMPRSS2-ERG* genová fúze může mít význam i jako samostatný biomarker [110]. Byly publikovány případy, kdy průkaz této genové fúze potvrdil „prostatický“ původ. Adra a spolupracovníci například popsali případ muže s diseminovaným onemocněním, u něhož se dle dostupných technik nedařilo prokázat původ metastáz. Teprve potvrzením přítomnosti *TMPRSS2-ERG* genové fúze mohli u tohoto pacienta diagnostikovat kastročně-rezistentní karcinom prostaty [111]. Jiným případem může být využití fúzního genu v diagnostice malobuněčného karcinomu prostaty, který je oproti klasickému adenokarcinomu poměrně vzácný, ale vyznačuje se agresivnějším chováním a metastazováním. Nejznámější malobuněčný karcinom je malobuněčný karcinom plic. V některých případech je těžké od sebe odlišit jednotlivé druhy malobuněčných karcinomů zvláště u malých vzorků biopsií. Bylo prokázáno, že zastoupení *TMPRSS2-ERG* fúze u malobuněčných karcinomů prostaty je stejné jako u adenokarcinomů [112-115]. Přestože se tato přestavba nachází přibližně u 50 % případů, je její prediktivní hodnota vyšší než např. hodnota PSA nebo prostateinu, které jsou přítomny pouze u 28 % případů malobuněčných karcinomů prostaty [116]. Detekce *TMPRSS2-ERG* genové fúze pomocí IHC, FISH nebo DNA sekvenováním může potvrdit prostatický původ karcinomu [87, 110, 111]

### **1.9. *TMPRSS2-ERG* jako potenciální terapeutický cíl i prediktivní biomarker**

V současné době dominuje léčbě pokročilých karcinomů prostaty využití inhibitorů androgenových receptorů, které v průběhu posledních dvou desetiletí přispěly k poklesu úmrtnosti na toto onemocnění o 30-40 %. Přes neustálé zdokonalování vlastností těchto léků, se však u většiny pacientů nakonec vyvine rezistence [117]. Jak již bylo uvedeno dříve, nejčastější abnormalitou u karcinomu prostaty je genová fúze *TMPRSS2-ERG*, které se vyskytuje u přibližně 50 % všech karcinomů prostaty [10]. Přestavba *TMPRSS2-ERG* je při vývoji nádoru prostaty považována za časnou událost a je asociována s agresivnější formou onemocnění [42]. Exprese *ERG* navíc v průběhu progresu onemocnění přetrvává [118]. Z tohoto důvodu může být fúzní gen *TMPRSS2-ERG* využit jako potenciální terapeutický cíl nebo prediktivní biomarker.

ERG může být terapeutický cíl inhibičních peptidů, které se přímo váží na DNA vazebnou doménu *ERG* a narušují tak její interakce s DNA [119]. Další přístup využívá zvýšenou exprese FGF (Fibroblast growth factor) ligandů a receptorů u karcinomů prostaty s nadměrnou expresí ERG v kombinaci se ztrátou *PTEN*. Výsledky publikované v práci Shao a spolupracovníků naznačují, že by FGF receptor mohl být u těchto nádorů terapeutickým cílem specifických monoklonálních protilátek [120]. Pro snížení ERG signalizace je možné využít RNA interference pomocí malých molekul shRNA (short harpin RNA). Pro transport do buňky jsou využívány například lentivirové vektory [121]. Sreenivasa R. Chinni s kolegy využil u pacientů s CRPC lentivirového vektoru a RNA interference k vyřazení genu *ERG* z funkce a prokázali vyšší účinnost enzalutamidu u *TMPRSS2-ERG* pozitivních CaP [122].

V současné době se reálnému použití u kastročtě rezistentních nádorů prostaty nejvíce přibližuje využití PARP inhibitorů. Brenner a kolektiv zkoumali mechanismus, jakým *TMPRSS2-ERG* fúze zprostředkovává svůj účinek, a zjistili, že produkt ETS genové fúze fyzicky interaguje s enzymem poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) a s katalytickou podjednotkou DNA-protein kinázy (DNA-PKcs). Oba tyto faktory jsou zodpovědné za *ERG*-zprostředkovanou transkripci a buněčnou invazi, což ukazuje na fakt, že jsou oba tyto kofaktory nezbytné pro nádorovou progresi zprostředkovanou *ERG* [123]. PARP1 enzym se také podílí na excizní opravě a byl zkoumán v řadě preklinických a klinických studií jako terapeutický cíl u nádorů s defektem v opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Například u nádorů prsu s prokázanou mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*, tedy s defektem v opravě pomocí homologní rekombinace (HR). Při inhibici PARP dochází k akumulaci jednořetězcových zlomů, ze kterých mohou během replikace vzniknout zlomy dvouřetězcové. Pokud nejsou tyto zlomy opraveny homologní rekombinací, dochází k nouzové opravě pomocí NHEJ („non-homologous end joining“) a vysoké genomové nestabilitě, která je letální i pro většinu nádorových buněk [124, 125]. Na základě výše uvedených dat a preklinických výsledků se předpokládá, že ETS-pozitivní nádory by mohly odpovídat lépe na inhibici PARP1 než ETS-negativní nádory, což činí z ETS statusu potencionální důležitý prediktivní biomarker [123]. První PARP inhibitor nazývaný Lynparza (dříve Olaparib) byl schválený pro léčbu *BRCA1/2* mutovaných nádorů vaječníků a velmi slibné výsledky byly také získány v klinické studii fáze II u skupiny kastročtě rezistentního nádoru prostaty [126].

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Zmapovat prevalenci *TMPRSS2-ERG* genové fúze v našem souboru pacientů.
2. Získané výsledky zhodnotit ve vztahu ke klinicko-patologickým parametrům karcinomu prostaty
3. Analyzovat vztah *TMPRSS2-ERG* přestavby k vybraným proteinům (TOP2B, ERG a PTEN).
4. Ověřit, zda přítomnost genové přestavby *TMPRSS2-ERG* může souviset se zánětlivou infiltrací patologických lézí v prostatě.

### 3. METODY

#### 3.1. Materiál

Analyzované vzorky byly získány z tkáňové banky Ústavu Klinické a Molekulární Patologie, Palackého Univerzity a Univerzitní nemocnice v Olomouci, část vzorků pocházela z Komplexního Onkologického centra v Novém Jičíně. Jednalo se o vzorky tkáně pacientů s adenokarcinomem prostaty, fixovaných formalínem a uchovaných v podobě parafinových bloků, ve stádiích T1-T4, N0-N1, M0, kteří podstoupili radikální prostatektomii (RP) v letech 2004-2011. Před radikální prostatektomií nebyli pacienti léčeni hormonální terapií, ani nepodstoupili radioterapii. U většiny pacientů byla k dispozici následující data: věk v době diagnózy, hladina PSA – před RP, pTNM stádium, Gleason skóre, kategorie nádoru (lokalizovaný CaP – byl definován jako T1-T2, N0, M0; lokálně pokročilý CaP – byl definován jako T3-T4, N0-N1, M0), kategorie rizika (nízké riziko: T1-T2a, Gleason skóre  $\leq 6$ , PSA  $\leq 10$  ng ml<sup>-1</sup>, střední riziko: splnění nejméně jedné této podmínky: T2b-c, Gleason skóre 7 nebo PSA vyšší než 10 a nižší než 20 ng ml<sup>-1</sup>, vysoké riziko: splnění nejméně jedné této podmínky: T3-T4, Gleason skóre  $>7$  nebo PSA  $>20$  ng ml<sup>-1</sup>) (Tab. 1).

V této metodické části se zaměřuji pouze na popis přípravy a hodnocení vzorků metodou FISH. Provedení metod IHC analýzy, kvantitativní RT-PCR, které byly použity k detekci následně porovnávaných faktorů (AR, TOP2B, ERG, CD 204+, CD 3+ a PTEN) je možné dohledat v těchto pracích [3, 7, 127].

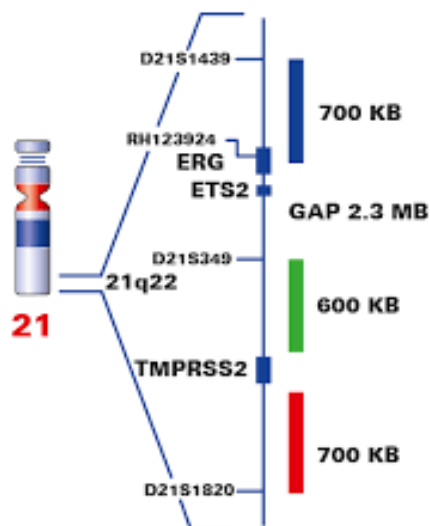
Klinicko- patologické parametry	Celkový počet (n=155)	Negativní - FISH (n=95)		Pozitivní - FISH (n=60)			
				Přestavba <i>TMPRSS2</i>		Delece - potvrzená fúze	
		2n (n=89)	4n (n=6)	2n (n=23)	4n (n=4)	2n (n=23)	4n (n=10)
PSA kategorie							
0 (< 2,5)	2	2	0	0	0	0	0
1 (2,5-4)	20	11	0	3	0	3	3
2 (4-10)	85	52	2	12	2	12	5
3 (>10)	45	23	4	7	1	8	2
neznámo	3	1	0	1	1	0	0
Gleason 1-2							
1 (≤6)	40	30	0	6	0	4	0
2 (≥7)	112	57	5	17	4	19	10
neznámo	3	2	1	0	0	0	0
Gleason abc							
a (<6)	40	30	0	6	0	4	0
b (7)	77	39	3	15	1	15	4
c (>8)	38	20	3	2	3	4	6
neznámo	0	0	0	0	0	0	0
CaP kategorie							
lokální	105	61	1	17	1	19	6
pokročilý	48	27	5	5	3	4	4
neznámo	2	1	0	1	0	0	0
PTG risk							
nízké	54	29	1	10	1	11	2
střední	35	22	0	5	0	6	2
vysoké	64	37	5	7	3	6	6
neznámo	2	1	0	1	0	0	0
Metastázování							
N0	90	52	4	14	2	14	4
N1	12	5	2	1	1	1	2
neznámo	53	32	0	8	1	8	4
Metastázování							
M0	33	20	1	3	0	5	4
M1	4	0	0	2	1	0	1
neznámo	118	69	5	18	3	18	5

**Tab. 1: Souhrn klinicko-patologických parametrů.**

Celkem popsáno 155 případů, u nichž byla úspěšně provedena FISH.

### 3.2. Detekce *TMPRSS2-ERG* metodou FISH

K detekci přestavby *TMPRSS2* a *ERG* genů jsme použili metodu FISH. Tato analýza byla provedena sondou Poseidon *TMPRSS2-ERG* (21q22) Del, Break, TC Probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Nizozemí). Jedná se o tříbarevnou sondu optimalizovanou k detekci intersticiální delecce mezi geny *TMPRSS2* a *ERG*, ke které dochází důsledkem fúze těchto genů. Oba geny se nacházejí na chromozomu 21 v oblasti q22. Tato sonda také detekuje přestavby v oblasti 21q22, například může zachytit translokaci genu *TMPRSS2* s dalšími ETS transkripčními faktory jako jsou *ETV1* t(7;21) nebo *ETV4* t(17;21) (Obr. 4).



**Obr. 4:** Schéma znázorňující konstrukci sondy, určené k detekci *TMPRSS2-ERG* genové fúze.

Distální oblast genu *TMPRSS2* je značena červeným fluorochromem, proximální oblast tohoto genu je značena zeleným fluorochromem (jeho delecí, dochází k fúzi těchto genů). Oblast pro *ERG* gen je značena modrým fluorochromem.

FISH byla provedena na parafinových řezech o tloušťce 4  $\mu\text{m}$ , po předchozí fixaci ve formalínu. Deparafinizovaná tkáň byla ošetřena 0,2 M HCl po dobu 20 minut, NaSCN po dobu 30 minut při 80 °C a natrávena pepsinem (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 70 minut. Kodenaturace tkáně a FISH sondy trvala 5 minut při teplotě 80 °C, následovaná hybridizací při 37 °C ve vlhké komůrce přes noc (StatSpin ThermoBrite, IRIS, MA). K odmytí nenávané sondy byly použity odmyvací roztoky 2xSSC NP-40 (2 minuty při 73°C) a následně 2xSSC NP-40 (1 minuta při pokojové teplotě). Po oschnutí skel následovalo podbarvení pomocí 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI II, Vysis, Downers Grove, IL). Vzorky byly analyzované pod

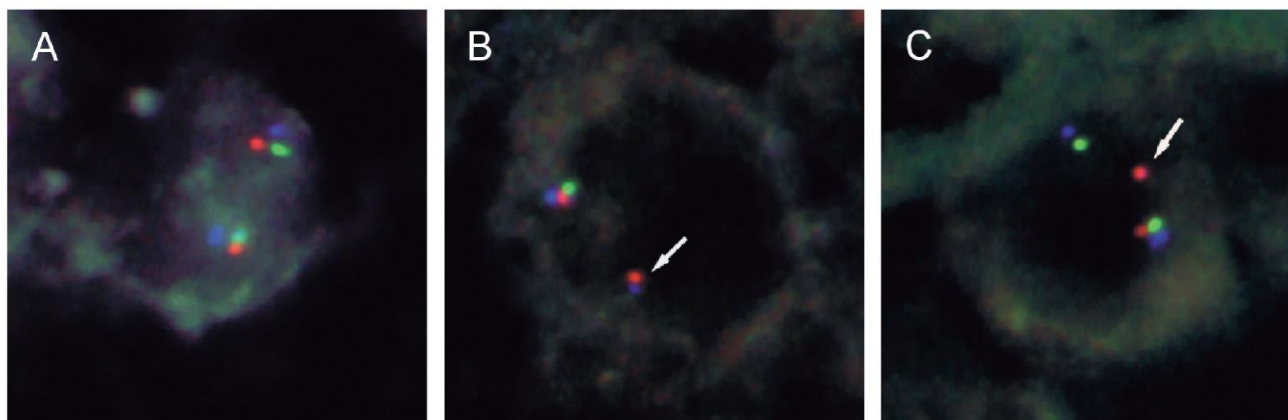


zvětšením 100x pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX-51(Olympus, Center Valley, PA), který byl doplněn o sadu fluorescenčních filtrů a CCD (charge-coupled device) kameru. Fluorescence byla zachycena pomocí softwaru ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Německo).

### 3.3. Hodnocení a interpretace výsledků FISH

Podarilo se nám úspěšně zhodnotit celkem 155 vzorků metodou FISH. Vzorky, které opakovaně nehybridizovaly (se slabými signály nebo bez signálů) byly vyloučeny z analýzy. Pro hodnocení byly u všech případů vybrány reprezentativní parafínové bloky s nádorovou tkání. Dále byly k dispozici preparáty barvené hematoxylinem-eosinem (H&E) ze stejného řezu, které byly již zhodnocené patologem, a umožnily lepší orientaci v rámci preparátu a identifikaci nádorových buněk. Celkem bylo u každého vzorku hodnoceno 100 buněčných jader, v případě nejasností byl hodnocený počet buněk navýšen a konzultován s dalším kvalifikovaným pracovníkem. Ke stanovení hodnoty cut off (dělicí hranice, podle které jsou výsledky FISH klasifikovány jako pozitivní nebo negativní) bylo použito 50 negativních vzorků (zdravá tkáň a BPH). Hodnota cut off byla stanovena na 15 %.

Sestavy signálů mapující uvedené lokusy (Č-červený fluorochrom, Z-zelený fluorochrom, M-modrý fluorochrom) byly hodnoceny dle manuálu, který je součástí balení sondy (Obr. 5). Buněčné jádro s normální sestavou signálů bez detekované chromozomové aberace v lokusu 21q22 reprezentují dva fúzní signály - 2Z2Č2M. Genová fúze *TMPRSS2-ERG*, která vzniká v důsledku intersticiální delecce mezi těmito geny se projeví ztrátou zeleného signálu, výsledná sestava signálů vypadá takto 1Z1Č1M a 1Č1M. V případě přestavby genu *TMPRSS2* dochází k rozdělení fúzního signálu, výsledná sestava signálů představuje 1 fúzní signál 1Z1Č1M a jeden izolovaný červený signál 1Č a jeden fúzní signál složený ze zeleného a modrého signálu 1Z1M (představuje derivovaný chromozom 21).



**Obr. 5: Trojbarevná sonda, určená k detekci *TMPRSS2-ERG* genové fúze.**

Znázornění výsledné sestavy signálů v buněčném jádře, (distální oblast genu *TMPRSS2* je značena červeným fluorochromem, proximální oblast tohoto genu je značena zeleným fluorochromem, oblast pro *ERG* gen je značena modrým fluorochromem). A. Buněčné jádro s normální sestavou signálů, v rámci lokusu 21q22 nebyla prokázána chromozomální aberace, pozorujeme dva fúzní signály pro všechny tři fluorochromy. B. Buněčné jádro s prokázanou *TMPRSS2-ERG* genovou fúzí, která vznikla v důsledku delece v intersticiální oblasti mezi těmito geny, projeví se jako ztráta zeleného signálu (bílá šipka). C. Buněčné jádro s detekovanou přestavbou genu *TMPRSS2*, projeví se rozpadem fúzního signálu – pozorujeme jeden fúzní signál pro zelený a modrý fluorochrom a jeden izolovaný červený signál (bílá šipka).

### 3.4. Statistická analýza

Data v kapitolách 4.6, 4.7 byla analyzována v programu Statistica 12.0 (StatSoft, USA) pomocí testů Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ANOVA a Pearsonův chí-kvadrát. Výsledky v kapitolách 4.2, 4.3, 4.4 a 4.5 byly hodnoceny v programu SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). V případě, že Shapiro-Wilkův test normality odhalil nenormální distribuci dat, byl použit neparametrický Kruskal-Wallis test s Bonferroniho korekcí. Korelace byly vyhodnoceny Spearmanovým korelačním testem a kategoriální údaje byly testovány pomocí Pearsonova chí-kvadrátu. Výsledky analýz byly považovány za statisticky významné na hladině nižší než 0.05.

## 4. VÝSLEDKY

Celkem jsme metodou FISH vyhodnotili 155 vzorků nádoru prostaty. U části těchto vzorků (n=100) byla provedena imunohistochemická analýza, pomocí níž jsme stanovili expresi AR, ERG a TOP2B, míru infiltrace struktur BPH, PIN a CaP CD204+ makrofágy a CD3+ T-lymfocyty. Hledali jsme asociaci mezi přítomností genové fúze a klinicko-patologickými charakteristikami pacientů s CaP. U malého souboru pacientů (N=28) byl také sledován vztah *TMPRSS2-ERG* fúze k expresi nádorového supresoru PTEN a dalším proteinům.

### 4.1. Detekce *TMPRSS2-ERG* genové fúze a přestavby *TMPRSS2* genu pomocí FISH.

Podarilo se nám pomocí FISH zhodnotit 155 vzorků z celkového počtu 184. Úspěšnost vyšetření tedy byla 84 %. Vzorky se slabými signály nebo bez nich byly vyloučeny z analýzy.

Z celkového počtu 155 úspěšně zhodnocených vzorků bylo 61 % negativních a 39 % FISH pozitivních (Tab. 1). U 33 případů (55 % pozitivních případů) byla detekovaná delece oblasti lokalizované mezi geny *TMPRSS2* a *ERG*, což potvrzuje přítomnost fúzního genu *TMPRSS2-ERG*. U 27 případů (45 %) byla nalezena přestavba genu *TMPRSS2*. V rámci této skupiny pozitivních případů je možné, že došlo k fúzi *TMPRSS2* genu s ostatními ETS fúzními partnery jako je: *ETV1*, *ETV4* a *ETV5*. Dále byly detekovány početní změny v daném lokusu, a to u 14 (23 %) ze 33 pozitivních případů a u 6 (4 %) případů v rámci negativního výsledku. Záchyt početních změn v daném lokusu ukazuje na zmnožení genetického materiálu, není však zřejmé, zda došlo ke zmnožení jen vyšetřovaného lokusu, nebo se jedná o zmnožení v rámci celého genomu, tedy o ploidii (Tab. 2). Všechny vyšetřované vzorky BPH byly negativní.

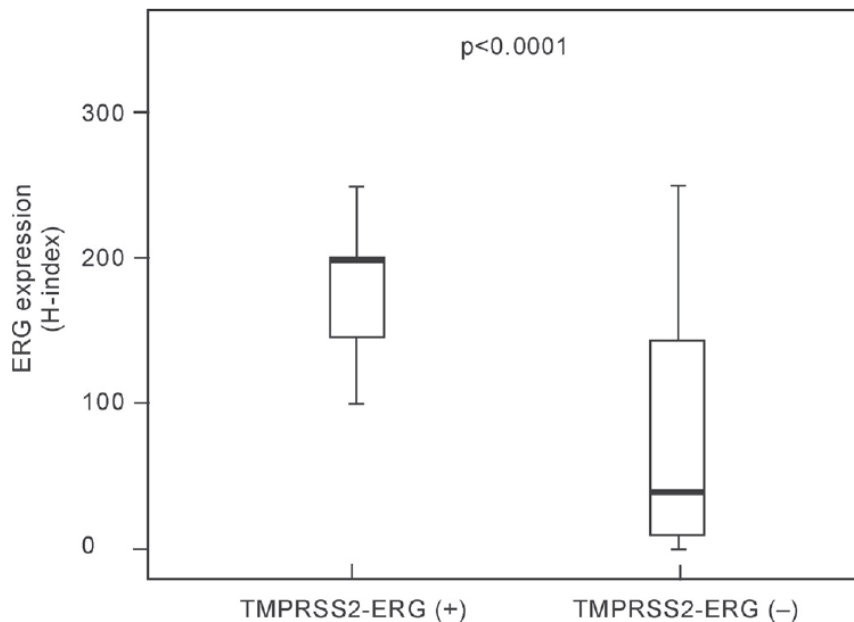
Tab. 2: Výsledky vyšetření genové fúze *TMPRSS2-ERG* pomocí FISH.

Celkový počet vzorků - 155			
Negativní FISH - 95 (61%)		Pozitivní FISH - 60 (39%)	
4n - 6 (6%)	2n - 89 (94%)	4n - 14 (23%) delece - 10 (71%) přestavba - 4 (29%)	2n - 46 (77%) delece- 23 (50%) přestavba - 23 (50%)

2n - diploidní buňky; 4n - tetraploidní buňky.

#### 4.2. Vztah mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a expresí ERG.

Expresie ERG pozitivně korelovala s výskytem *TMPRSS2-ERG* fúzního genu ( $p < 0.0001$ ). U všech případů s potvrzenou genovou fúzí bylo histoskóre ERG vyšší než 100 a hodnota mediánu byla 200. U případů, kde nebyla zjištěna přestavba *TMPRSS2* genu byla hodnota mediánu pro histoskóre ERG 40. Nádory s přestavbou *TMPRSS2* genu (s nejasným fúzním partnerem) měly expresi ERG (medián histoskóre 100) signifikantně nižší než nádory s fúzním genem *TMPRSS2-ERG* ( $p = 0.005$ ) a zároveň signifikantně vyšší než nádory bez přestavby *TMPRSS2* lokusu ( $p = 0.01$ ). U případů CaP bez průkazu genové přestavby byla výjimečně zaznamenána vysoká exprese ERG proteinu (Obr. 6).



Obr. 6: Pozitivní vztah mezi expresí ERG (H-index, histoskóre) a mezi *TMPRSS2-ERG* genovou fúzí u nádoru prostaty.

Box-ploty představují medián, 25-75 percentil a rozmezí hodnot.

#### 4.3. ERG exprese koreluje s androgenovým receptorem a TOP2B.

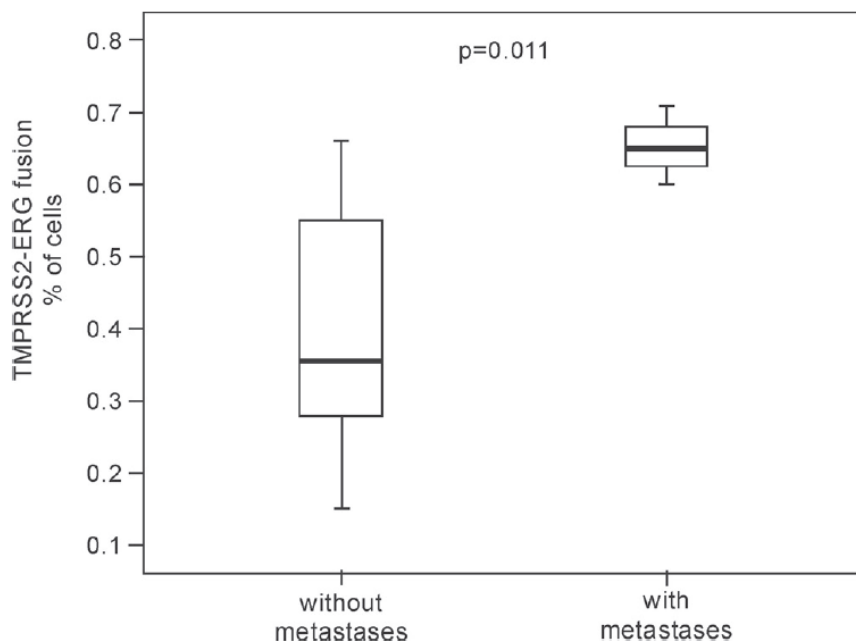
ERG pozitivita byla nalezena u 66 % případů CaP (histoskóre  $> 50$ ) a u 3 % PIN a BPH. Pozitivita AR i TOP2B byla nalezena u všech vzorků CaP. Nejvýznamnější korelace ERG v nádorové tkáni byla s AR (Spearmanův koeficient  $R_s$  0.337). Slabší korelace byla také pozorována pro TOP2B a ERG ( $R_s$  0.228) i AR ( $R_s$  0.283). Navzdory skutečnosti, že ERG, AR a TOP2B byly exprimovány i v okolních oblastech PIN/BPH, nebyl zde pozorován

významný vztah mezi těmito molekulami. Expresce ERG, AR ani TOP2B neměla vztah k diferenciaci CaP a nebyl nalezen významný rozdíl v expresi těchto proteinů u rozdílných kategorií Gleasonova skóre.

Nebyl pozorován významný rozdíl mezi expresí TOP2B ani AR ve vztahu k přítomnosti fúzního genu či přestavby *TMPRSS2* ve vzorcích CaP. Expresce AR byla signifikantně vyšší u více rizikových CaP ( $p=0.01$ ; kategorizace rizikových skupin podle hodnot pT, PSA, Gleasonova skóre – viz Metody).

#### 4.4. Vztah mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a metastatickým potenciálem CaP.

Tabulka 1 shrnuje klinické údaje pacientů, kteří byli zahrnuti do FISH analýzy. Statisticky jsme hodnotili rozdíly mezi pozitivními a negativními případy pro genovou fúzi nebo přestavbu ve vztahu k následujícím parametrům: věk, PSA, Gleasonovo skóre, pT stadium a metastazování do lymfatických uzlin. Jedinou statisticky významnou korelaci jsme našli v souvislosti s přítomností *TMPRSS2-ERG* fúzního genu a metastazováním ( $p=0.011$ , Obr. 7). Výskyt metastáz v lymfatických uzlinách byl rovněž vyšší u případů s detekovanou 4n ploidií ve srovnání s diploidními nádory ( $p=0.049$ ).



**Obr. 7: Vztah mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a metastazováním.**

Pozitivní korelace mezi přítomností fúzního genu u nádoru prostaty a mezi metastazováním ( $p=0.011$ ). Box-ploty představují medián, 25-75 percentil a rozmezí hodnot.

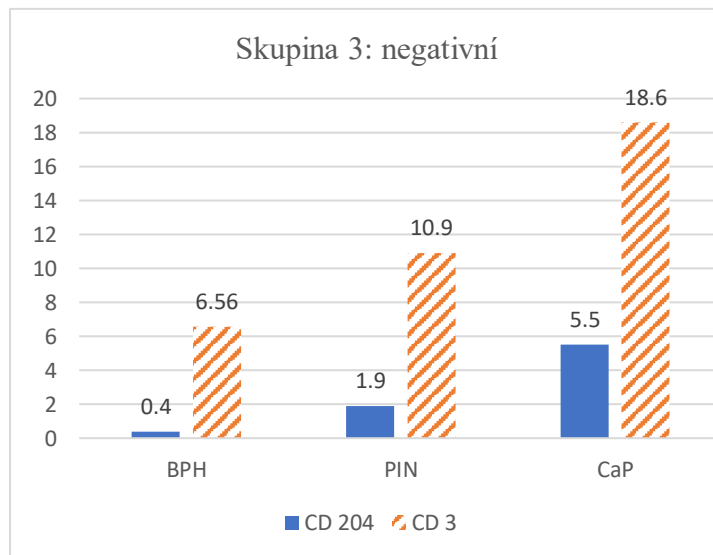
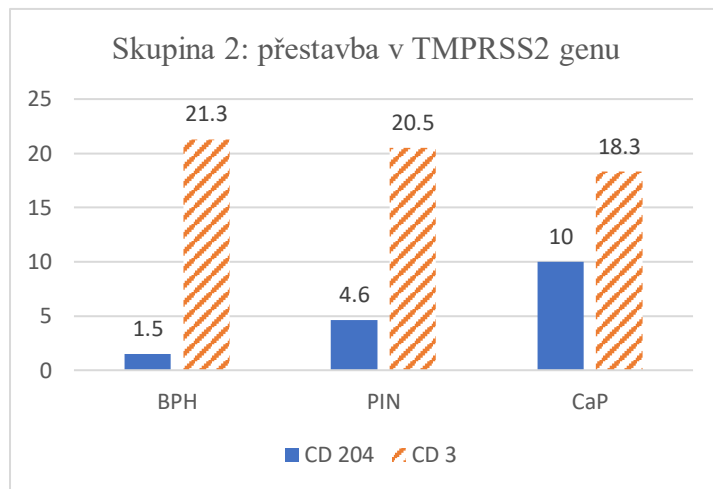
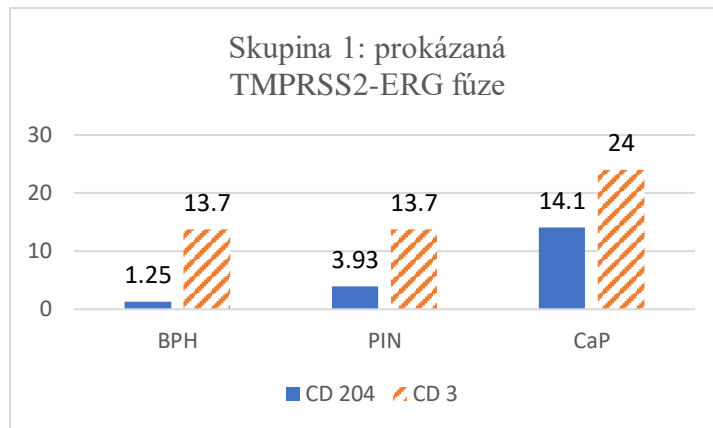
#### **4.5. Infiltrace tkáňových struktur prostaty CD204+ makrofágy a CD3+ T-lymfocyty**

Infiltrace tkáňových struktur prostaty CD204+ makrofágy se kontinuálně zvyšovala ve směru od BPH přes PIN k CaP, bez ohledu na status genové fúze v nádorových strukturách (Obr. 8: skupina 1: prokázaná *TMPRSS2-ERG* fúze, skupina 2: přestavba v *TMPRSS2* genu a skupina 3: negativní). Počet zánětlivých buněk CD204+ v nádorové tkáni byl nejvyšší ve skupině 1 a poklesl ve skupině 2 a nejnižší byl ve skupině 3 (Obr. 9). Pokles infiltrace je také patrný u lézí PIN s negativním FISH nálezem. U BPH nebyly pozorovány změny v infiltraci CD204+ makrofágy.

Vzestup počtu infiltrujících CD3+ T-buněk od BPH přes PIN k CaP je možné sledovat u skupiny 3 (negativní FISH nález) a méně zřetelně i u skupiny 1 (prokázána *TMPRSS2-ERG* genová fúze). Kruskal-Wallisovým testem bylo prokázáno, že skupiny 1 až 3 se signifikantně liší v počtu infiltrovaných CD3+ buněk v BPH ( $p < 0,0001$ ). Skupina 1 měla signifikantně vyšší výskyt CD3 pozitivních T-lymfocytů ve strukturách BPH než skupina 3 ( $p \leq 0,0004$ ) a skupina 2 měla signifikantně vyšší výskyt CD3 pozitivních T-lymfocytů ve strukturách BPH než skupina 3 ( $p \leq 0,0002$ ).

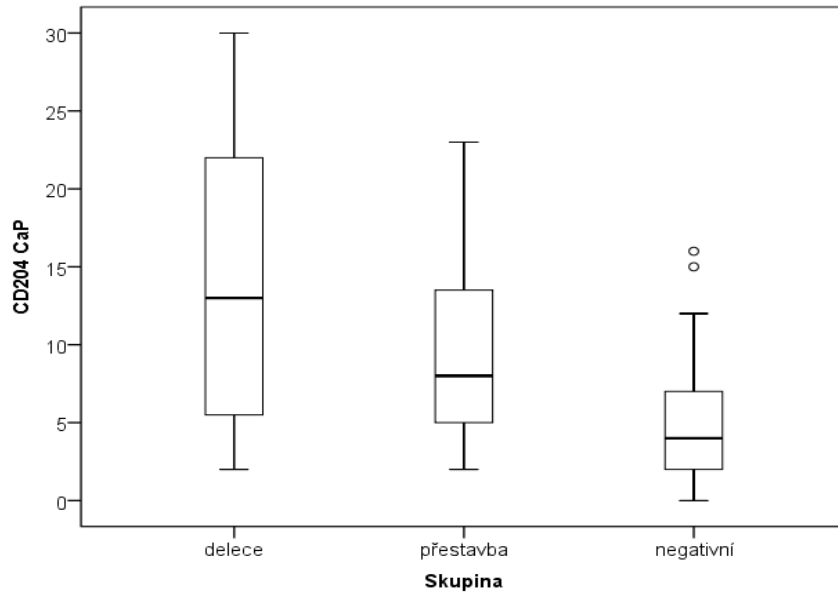
#### **4.6. Vztah mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a expresí PTEN.**

Výše uvedené výsledky byly získány na hlavním souboru pacientů s nádory prostaty (N=100) [7, 127]. Část těchto vzorků (N=12) byla zahrnuta i do paralelní studie, která sledovala řadu proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu, oxidativního stresu a DNA oprav [3]. Přítomnost *TMPRSS2-ERG* genové fúze byla úspěšně stanovena také pomocí kvantitativní RT-PCR na RNA izolované z dalších vzorků (N=16, viz Metody). V rámci tohoto malého souboru (N=28) jsme pozorovali signifikantně nižší expresi nádorového supresoru PTEN ve skupině s prokázaným fúzním genem ve srovnání s negativními nádory (Obr. 10).



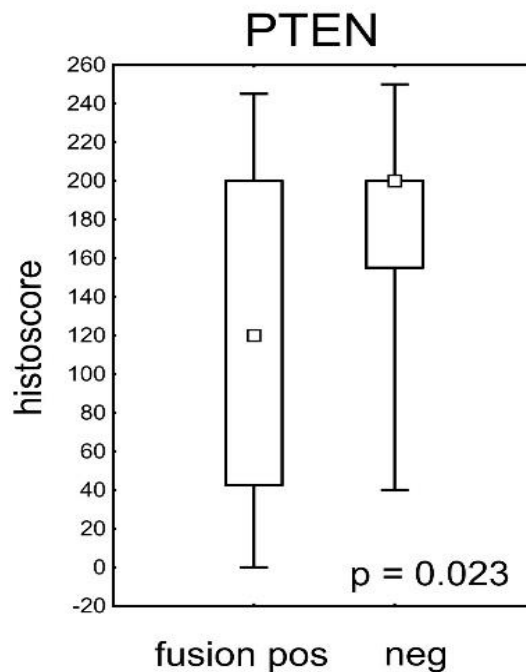
**Obr. 8: Infiltrace struktur BPH, PIN, CaP CD204+ a CD3+ buňkami.**

Skupiny 1 a 3 se signifikantně liší v počtu infiltrovaných buněk CD204+ v PIN ( $p = 0,005$ ) a v CaP ( $p = 0,0002$ ). Skupina 2 měla ve strukturách PIN výrazně vyšší infiltraci buněk CD204+ než skupina 3 ( $p \leq 0,003$ ). Skupina 1 a skupina 2 měla v CaP signifikantně vyšší infiltraci makrofágů CD204+ než skupina 3 s následujícími hodnotami P: skupina 1  $p < 0,001$  a skupina 2  $p \leq 0,015$ . Histogramy zobrazují průměrné počty infiltrujících buněk.



**Obr. 9: Infiltrace nádorových struktur prostaty dle fúzního statusu.**

Skupiny 1 (prokázaný *TMPRSS2-ERG* fúzní gen) a 2 (přestavba *TMPRSS2* genu) mají signifikantně vyšší ( $p \leq 0.001$  a  $p = 0.015$ ) výskyt CD204 pozitivních buněk ve strukturách CaP než skupina 3 (negativní FISH nález). Box-ploty představují medián, 25-75 percentil, rozmezí hodnot a odlišené odlehlé hodnoty.



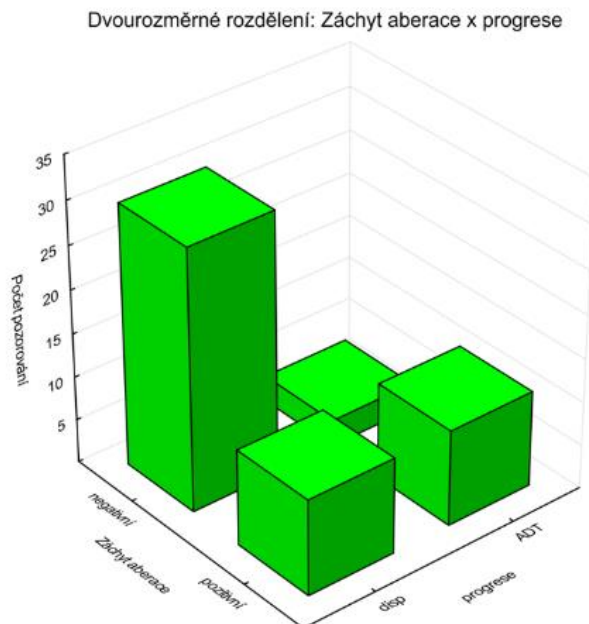
**Obr. 10: Vztah mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* genové fúze a expresí PTEN.**

U případů s prokázanou *TMPRSS2-ERG* fúzí byla pozorovaná signifikantně nižší exprese PTEN. Box-ploty představují medián, 25-75 percentil a rozmezí hodnot.



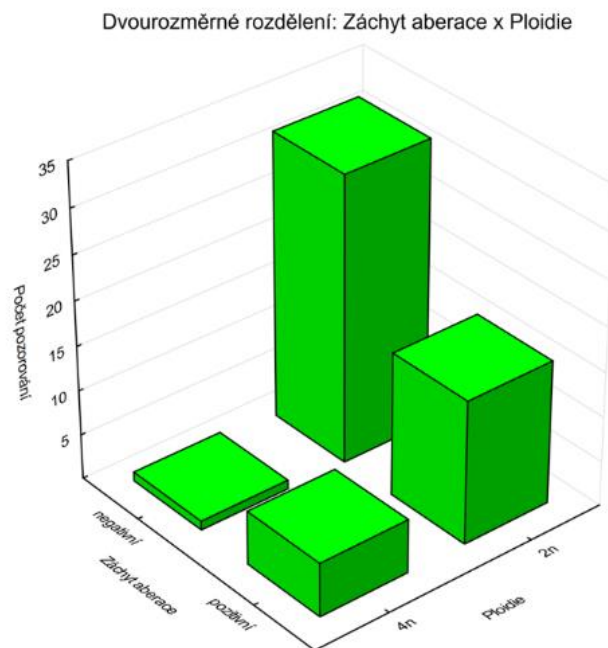
#### 4.7. Význam *TMPRSS2-ERG* fúzního genu a přestavby *TMPRSS2* pro progresi karcinomu prostaty.

Vedle již publikovaných studií na souboru pacientů z Fakultní nemocnice Olomouc [3, 7, 127] jsme metodou FISH vyšetřili status *TMPRSS2* a *ERG* genů také u dalších 55 pacientů z Nemocnice Nový Jičín (v Tabulce 1 a 2 jsou souhrnně uvedeni všichni pacienti vyšetření pomocí FISH). U souboru pacientů z Nového Jičína se podařilo získat cenné údaje o klinickém vývoji onemocnění s celkovou dobou sledování alespoň 7 let (biochemický relaps a informace o přežití). U 14 pacientů z 55 došlo k biochemickému relapsu, přičemž většina (11 ze 14) měla pozitivní nález pomocí FISH metody (Obr. 11). Celkem zemřeli 4 pacienti, z nichž tři podleli metastatickému nádoru prostaty a všichni měli pozitivní FISH nález. Čtvrtý pacient zemřel v důsledku srdečního selhání a u něj bylo vyšetření FISH negativní. Podobně jako u celého souboru (N=155, Tabulka 1) jsme u pacientů z Nového Jičína pozorovali vztah mezi vyšším zastoupením tetraploidních buněk a přítomností fúzního genu nebo přestavbou *TMPRSS2* (Obr. 12). Pozorovali jsme také trend k signifikantnímu vztahu mezi vyšším Gleasonovým skóre a přítomností genetické aberace, zejména fúzního genu (Obr. 13).

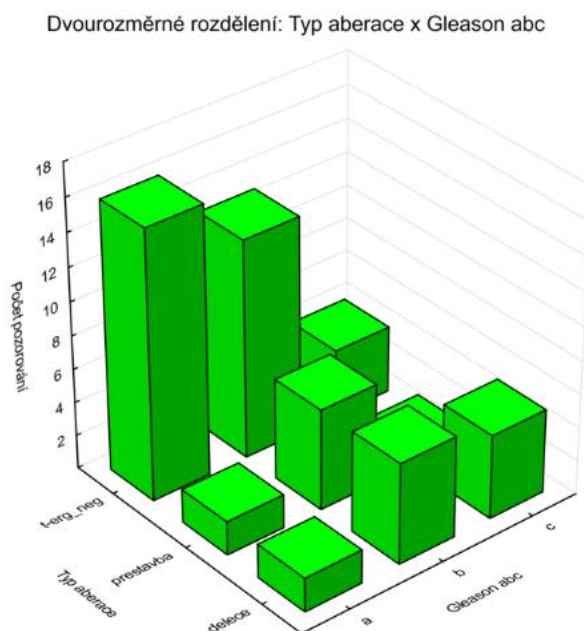


**Obr. 11: Vztah mezi průkazem aberace (delece nebo přestavba) a biochemickým relapsem.**

Pearsonův chí-kvadrát  $p < 0.001$ . Disp – pacienti pouze dispenzarizováni; ADT – pacienti s biochemickým relapsem a androgen-deprivační terapií.



**Obr. 12: Vztah mezi průkazem aberace (delece nebo přestavba) a ploidii.**  
 Pearsonův chí-kvadrát  $p=0.008$ .  $2n$  - diploidní buňky;  $4n$  - tetraploidní buňky.



**Obr. 13: Rozložení vzorků s ohledem na Gleasonovo skóre a výsledek FISH vyšetření.**  
 Pearsonův chí-kvadrát  $p=0.077$ . Gleasonovo skóre: a = 6 a nižší, b = 7, c = 8 a vyšší.

#### **4.8. Vymezení mého podílu práce:**

Aktivně jsem se podílela na výběru vzorků a koordinaci spolupráce obou zmíněných pracovišť. Prováděla jsem optimalizaci a zpracování vzorků, která zahrnovala ošetření FFPE tkáně (tkáně fixované ve formalínu a uchované v parafínu) a následnou denaturaci a hybridizaci se značenou sondou. Hodnocení vzorků nádoru prostaty metodou FISH.

Výsledky získané v rámci optimalizace vhodně zvolené fixace materiálu, který má být použit k analýze FISH, byly prezentovány formou posteru na 23rd European Congress of Pathology, v Budapešti. Stejně tak byly tyto zkušenosti prezentovány na Workshopu firmy Intimex, který proběhl na Masarykově onkologickém ústavu v Brně.

## 5. DISKUZE

Karcinom prostaty je heterogenní onemocnění, u něhož je důležitá správná diagnostika a predikce vhodného způsobu terapie. Rozdělení pacientů do různých rizikových skupin umožňuje výběr správného léčebného režimu a odhad rizika možného relapsu daného onemocnění. V poslední době bylo studováno mnoho markerů, které by mohly vést ke zpřesnění diagnózy a stanovení rizika vzniku metastáz nebo možného biochemického návratu onemocnění. Jedním z těchto slibných znaků s prediktivním potenciálem je *TMPRSS2-ERG* genová fúze. Podstatnými argumenty pro její využití jsou především její vysoká prevalence, možnost kombinování s jinými biomarkery, senzitivita a specificita v diagnostice časných stádií. Z prognostického hlediska je často uváděná asociace s agresivním průběhem onemocnění a metastazováním [19, 75, 77, 128].

V rámci této práce bylo vyhodnoceno celkem 155 vzorků nádorů prostaty z toho u 39 % případů byla metodou FISH zachycena přestavba *ERG*, což odpovídá výsledkům předešlých studií, kde se frekvence výskytu této přestavby pohybovala v rozsahu 26-50 % případů [10, 75, 82, 83, 129, 130]. Výsledná frekvence záchytů genové fúze v naší skupině je podobná s výsledkem uvedeným v práci FitzGerald a kolektivu (2008), kde byla detekována u 35,5 % případů [82]. Frekvence záchytu *TMPRSS2-ERG* genové fúze může být ovlivněna několika faktory. Prvním z nich je rozdílná prevalence této fúze v rámci různých etnických skupin. Na základě meta-analýzy dat bylo například zjištěno, že frekvence jejího výskytu u pacientů s CaP v rámci asijské populace tvoří 23 %, zatímco u evropské a severo americké populace je frekvence dvakrát vyšší, zhruba 50 % (54 % a 48 %) [131]. Také odlišná kritéria výběru pacientů pro stanovení této fúze v rámci různých studií mohou způsobit rozdíly ve výsledných počtech záchytů. Příkladem může být nízká detekční frekvence v souboru pacientů, kteří byli sledováni v režimu „watch and wait“. Fúze byla v tomto případě zjištěna pouze u 15 % pacientů (17/111) [77]. Také velikost souboru nebo použití různých diagnostických metod může ovlivnit výsledné procento pozitivitu. Vyšší záchyt *TMPRSS2-ERG* fúze byl pozorován u studií, které použily k detekci této přestavby metodu RT-PCR (52 %) nebo IHC (52 %), zatímco při použití metody FISH byla frekvence záchytu 42 % [131]. Výhodou metodiky FISH je, že dokáže kategorizovat typ aberace a umožnit tak vymezení CaP podtypů (např. přestavba *TMPRSS2* genu napoví, že mohlo dojít k fúzi s dalšími *ETS* partnery), které mohou mít prognostický význam [130]. Pomocí FISH lze také odhalit přítomnost většího počtu kopií fúzního genu. Aneuploidie jsou obecně považovány za negativní prognostický faktor u CaP [88-90], viz. níže.

Přestože již uplynulo 13 let od objevení *TMPRSS2-ERG* genové fúze u CaP, není zatím zcela znám její prognostický či prediktivní dopad. Existuje celá řada studií zabývajících se korelací mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* fúze a klinicko-patologickými charakteristikami jako jsou PSA, věk v době diagnózy, Gleasonovo skóre, pT stadium, metastázování, relaps onemocnění či úmrtí v důsledku CaP, avšak s rozdílnými výsledky [130-132]. Některé z nich uvádějí, že *TMPRSS2-ERG* fúze není validní prediktor návratu onemocnění ani úmrtí v důsledku CaP [131], zatímco jiné publikovaly asociaci mezi jejím výskytem a zvýšeným rizikem úmrtí v důsledku CaP [75, 77, 133]. Většina publikací uvádí, že přítomnost genové fúze v nádoru prostaty je asociována se špatnou prognózou [75-77, 82, 134]. Existují však i práce, které naopak spojují její přítomnost s dobrou prognózou [80, 81, 135, 136]. Někteří autoři pak nenalezli žádný vztah mezi výskytem fúze a prognózou onemocnění [83]. V rámci posouzení validnosti jednotlivých výsledků je nutné přihlídnout k tomu, podle jakých kritérií byla posuzována prognóza onemocnění (relaps onemocnění, metastazování, úmrtí v důsledku CaP). Ukazuje se, že jen malý počet prací srovnávalo výskyt genové fúze s úmrtím v důsledku CaP. Důležité je zmínit, že například biochemická rekurence onemocnění je nepřesný ukazatel rizika úmrtí v důsledku CaP [131]. Bylo zjištěno, že pouze 8,3 % pacientů, u nichž došlo k biochemickému relapsu, zemřelo v důsledku CaP. Můžeme konstatovat, že biochemický návrat onemocnění může být asociován s úmrtím v důsledku CaP, ale většina těchto mužů zemře v důsledku jiné příčiny. Z tohoto důvodu je více spolehlivé porovnání fúzního statusu a úmrtí v důsledku CaP [77, 137].

Jediný statisticky významný vztah v rámci klinicko-patologických charakteristik jsme v olomoucké skupině pacientů našli mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* fúzního genu a metastazováním ( $p=0.011$ ). Tuto korelaci také prezentovali ve své práci Demichelis a Perner [19, 77].

U souboru pacientů z Nového Jičína se podařilo získat cenné údaje o klinickém vývoji onemocnění s celkovou dobou sledování alespoň 7 let (biochemický relaps a informace o přežití). U 14 pacientů z 55 došlo k biochemickému relapsu přičemž většina (11 ze 14) měla pozitivní nález pomocí FISH metody. Existuje několik prací, kde popsaly asociaci mezi výskytem *TMPRSS2-ERG* fúze a biochemickým relapsem onemocnění [138-140]. Nam se spolupracovníky popsali rozdílný výskyt relapsu onemocnění u skupiny s pozitivní a negativní fúzí (58,4 % vs. 8,1 % případů) [141]. V jiné práci měli pacienti s pozitivní fúzí relaps onemocnění do 5 let v 79,5 % případů ve srovnání s 37,5 % případů u pacientů negativních pro fúzi [140]. Barwick se spolupracovníky také popsaly asociaci mezi přítomností genové fúze a

relapsem onemocnění [138]. V již zmiňované studii Demichelisové a spolupracovníků byla popsána signifikantní asociace mezi výskytem genové fúze a mezi úmrtím v důsledku CaP [77]. V našem souboru pacientů, z Nového Jičína, zemřeli 4 pacienti, z nichž tři podleli metastatickému nádoru prostaty a všichni měli pozitivní FISH nález. Čtvrtý pacient zemřel v důsledku srdečního selhání a u něj bylo vyšetření FISH negativní. Podobně jako u celého souboru (N=155, Tabulka 1) jsme u pacientů z Nového Jičína pozorovali vztah mezi vyšším zastoupením tetraploidních buněk a přítomností fúzního genu nebo přestavbou *TMPRSS2*. Podskupinu agresivních nádorů, u nichž byl zvýšen počet kopií *TMPRSS2-ERG* fúzního genu, popsal již Gopalan a spolupracovníci [83]. Tyto nádory byly převážně aneuploidní/tetraploidní a obsahovaly další chromozomální abnormality. Na základě toho usoudili, že agresivní chování je dáno pravděpodobně také pozorovanou aneuploidií. Podobné výsledky publikoval i Toubaji se spolupracovníky [85]. Zůstává nejasné, zda hlavní příčinou metastázování v našem souboru pacientů je výskyt genové fúze a zvýšený počet kopií daného lokusu nebo masivní změny v ploidii.

V naší skupině jsme také pozorovali trend k signifikantnímu vztahu mezi vyšším Gleasonovým skóre a přítomností genetické aberace, zejména fúzního genu. Asociace mezi přítomností genové fúze a vyšším Gleason skóre bývá popisována zřídka. V roce 2009 německá skupina pozorovala v rámci své studie (N=86) významnou asociaci mezi *TMPRSS2-ERG* fúzí (stanovenou metodou FISH) a vyšším Gleasonovým skóre (7 a 8-10 vs. 4-6,  $p = 0,027$ ) [142]. Stejně tak Rostad a kolegové analyzovali přítomnost *TMPRSS2-ERG* isoform pomocí kvantitativní PCR u vzorků moči ve skupině 55 mužů a našli pozitivní vztah mezi výskytem fúze a vyšším Gleasonovým skóre [128]. Naproti tomu v kanadské studii (N=163) byl nalezen signifikantně vyšší výskyt *TMPRSS2-ERG* fúze ( $p = 0,014$ ) v nádorové tkáni s Gleasonovým gradem 3 vs. Gleasonovu gradu 4 (42 % vs. 27 %) [143].

Expresí ERG proteinu dále pozitivně korelovala s přítomností fúzního genu a s počtem kopií fúzního genu. Vysoká exprese ERG (histoskóre  $\geq 100$ ) byla detekována u všech (100 %) případů s prokázaným fúzním genem, ale pouze u 26 % případů, u nichž fúzní gen prokázán nebyl. Shodujeme se tak s výsledky již publikovaných prací [84, 144].

Haffner se spolupracovníky publikovali signifikantně vyšší expresi AR a TOP2B v lézích PIN oproti normálnímu epitelu prostaty [35]. Naše analýza odhalila zvýšenou expresi AR a TOP2B u CaP v porovnání s PIN/BPH. Jak již bylo uvedeno dříve, vznik fúzního genu vede k aktivaci ERG, která je řízena androgeny. Pozorovaná společná exprese AR a TOP2B tomu odpovídá. Je však nutné poznamenat, že i přes tuto pozorovanou asociaci mezi ERG a

AR, existují i AR-negativní CaP s expresí ERG. Minner a jeho kolegové, potvrdili 95 % shodu mezi detekcí exprese ERG stanovenou pomocí IHC a mezi potvrzením přítomnosti *TMPRSS2-ERG* fúzního genu pomocí FISH [84]. Nenalezli žádnou asociaci mezi *ERG* expresí a mezi klinickým obrazem ani nádorovým fenotypem, ale potvrdili významně vyšší expresi AR u ERG pozitivních CaP. Naše výsledky se s tímto shodují a ukazují na to, že odlišnosti v expresi AR u ERG pozitivních a ERG negativních CaP by mohly vysvětlit rozdílnou odpověď pacientů na hormonální terapii.

Epidemiologické studie ukazují na jasnou souvislost mezi zánětem a výskytem karcinomu v prostatě. Buněčný stres navozený zánětem způsobuje poškození genomu, které vede k buněčné transformaci, zvýšené vaskularizaci a mutacím DNA [72]. Zánětlivé buňky vylučují řadu cytokinů, které aktivují jiné stromální buňky a podporují růst nádorů a tvorbu metastáz. Některé práce z poslední doby studovaly význam makrofágů produkujících chemotaktický protein-1 (MCP-1, monocyte chemotactic protein-1) a zjistily, že infiltrace tumoru těmito makrofágy koreluje se špatnou prognózou některých typů nádorů (karcinomy plic a pankreatu, gliomy). Tyto makrofágy exprimují antigen označovaný jako CD204 [71]. Stejní autoři také vyhodnocovali význam zánětlivého infiltrátu obsahujícího buňky exprimující antigeny CD3, CD4, CD8, CD20, CD79alfa, CD68, CD204 nebo CD163 a zahrnující tak široké spektrum T lymfocytů, B lymfocytů i makrofágů. Zjistili, že počet zánětlivých buněk v infiltrátu je obecně nejvyšší v BPH a výrazně se snižuje v PIN a CaP. Jejich zjištění podporují i jiné práce [145]. Theyer se spolupracovníky popisují, že v infiltrátu prostaty převažují T lymfocyty (70 %) následované B lymfocyty (15 %) a makrofágy (15 %) [146]. Fujii se svými spolupracovníky však našli výrazně vyšší zastoupení B lymfocytů (59 %) v benigních strukturách prostaty, které se významně snižovalo v PIN a CaP (29-31 %). Signifikantní snižování zaznamenali rovněž u populace CD68+ makrofágů. Nejistili změny v zastoupení buněk exprimujících CD3, CD4 a CD8 (T lymfocyty) mezi BPH, PIN a CaP [71]. V tomto směru naše výsledky týkající se CD3+ T lymfocytů neodporují těmto výsledkům, protože námi zjištěné rozdíly v celém souboru nejsou signifikantní. Určitý trend ke zvyšování počtu CD3+ T lymfocytů v maligních strukturách byl pozorován jen u skupiny s neprokázanou přestavbou.

Wang se spolupracovníky popisují zvyšování počtu makrofágů exprimujících CD204 v premaligních a zejména maligních okrcích analyzovaných tkáňových vzorků oproti BPH. Na základě toho dedukují, že tyto makrofágy mají důležitý význam v karcinogenezi prostaty. Kriticky však poznamenávají, že jejich výskyt je sice indikátorem nádorové progresi, ale nelze

tvrdit, že se účastní mechanismu nádorové progresu ať již ve smyslu podpory nebo inhibice. V nádorech mají makrofágy dvojí funkci, nádory potlačující (nádorově supresorovou – označují se jak M1) nebo nádory podporující (nádorově promotorickou – označují se jako M2). M2 makrofágy se vyznačují vysokou schopností produkovat IL-4 a IL-10 a naopak nízkou produkcí IL-12. Hrají důležitou roli nejen v karcinogenezi, ale také v angiogenezi, remodelaci mezibuněčné matrix a metastazování. M2 makrofágy se vyznačují expresí „macrophage scavenger receptor A“ (CD204) nebo proteinu náležejícího do rodiny „scavenger receptor cysteine-rich domain“ (CD163). Vzhledem k tomu, že znak CD68 je považovaný za běžný znak makrofágů je zajímavé pozorování, že makrofágy infiltrující tumory mohou být CD68 negativní [73, 147]. Námi zjištěný nárůst počtu CD204+ makrofágů v maligních strukturách je v souladu s těmito zjištěními.

Naše výsledky poukazují také na významnou úlohu funkčního stavu genu *ERG* a potvrzují jeho úlohu při iniciaci zánětu v prostatě. Je známo, že onkoprotein ERG v buňkách CaP ovlivňuje pozitivně signalizaci zprostředkovanou prostaglandiny, které se vyznačují tím, že indukují růst CaP, regulují expresi „urokinase-type“ plasminogen aktivátoru (uPA) a přispívají tak k invazivitě nádorových buněk [69, 70]. Zdá se, že existence fúzního genu, popřípadě jiné přestavby může zvyšovat schopnost infiltrace nádoru CD204 pozitivními makrofágy. V případě CD3 pozitivních T lymfocytů byly signifikantní rozdíly v infiltraci zjištěny jen u skupiny s neprokázanou přestavbou (skupina 3). Není jasné, do jaké míry mohou být tyto výsledky ovlivněny „chybou malých čísel“, nebo zda znamenají, že schopnost CD3+ T lymfocytů infiltrovat maligně transformované léze se děje mechanismem nezávislým na existenci fúzního genu. Skutečností zůstává, že znak CD3 určuje velmi širokou skupinu T lymfocytů zahrnující různé lymfocytární subtypy s různou funkcí. Z našich výsledků tedy nelze určit, jaké kvalitativní změny ve složení T lymfocytárních subpopulací se v nádoru odehrávají a zda tyto změny mají promoční nebo inhibiční vliv na nádor.

Pokud je nám známo, naše poznatky o rozdílné nádorové infiltraci CD204+ makrofágů s ohledem na rozdílný funkční stav genů *TMPRSS2* a *ERG* dosud nebyly nikým publikovány. Silnější infiltrace daných maligních struktur však patrně neznámá lepší prognózu či výraz protinádorově zaměřeného imunitního procesu, ale právě naopak může vyjadřovat inhibiční imunitních mechanismů nebo navození stavu tolerance.

Přestože je FISH široce využívaná k detekci genové fúze, ještě nebyla stanovena optimální technika pro běžný screening a klinické testování. Kvantitativní RT-PCR je oproti FISH technice rychlejší a citlivější metodou, ale umožňuje sledovat jen přesně definované fúze



(primery jsou navrženy na určité exony, případně jejich přechody). Jde o poměrně rychlou a dobře standardizovanou metodu, která vyžaduje pouze malé množství nádorové tkáně. Obě metody, jak FISH tak RT-PCR, jsou využitelné pro vyšetření přítomnosti fúzního genu ve vzorcích tkání, a vykazují shodné výsledky. FISH je však využitelná pouze při analýze tkání a nedá ve využití při analýze tělních tekutin, například při detekci přítomnosti fúzního genu ve vzorcích moči [9]. Míra diagnostického významu této fúze je stále diskutabilní a nejedná se o metodu první linie skriningového testu. Díky své specificitě však může detekce *TMPRSS2-ERG* fúze sloužit jako rychlá a neinvazivní metoda pro potvrzení diagnózy CaP [9]. Stanovení fúzního genu může mít kromě diagnostického a prognostického také prediktivní význam. Jeho přítomnost byla například spojena s horší odpovědí na taxanovou chemoterapii a celkové přežití pacientů s metastatickým kastročně rezistentním nádorem prostaty [148]. Podle některých studií mohou být nádory s fúzním genem citlivé k terapii pomocí PARP inhibitorů [123, 126]. Další genetickou změnou, která může predikovat dobrou odpověď na tuto terapii, je ztráta nádorového supresoru PTEN. V naší práci jsme pozorovali signifikantně nižší expresi PTEN v nádorech s *TMPRSS2-ERG* fúzí, což je v souladu se studií, ve které byl popsán společný výskyt *TMPRSS2-ERG*, *SLC45A3-ERG* genových přestaveb a ztráta exprese PTEN. Souběžná přítomnost všech tří změn byla asociovaná s vyšším Gleasonovým skóre a stádiem T3 a T4 [149]. Williams se spolupracovníky prezentovali výsledky meta-analýzy somatických změn počtu kopií (copy number alterations - CNAs) ve skupině pacientů s primárním i pokročilým karcinomem prostaty. Porovnání těchto dvou skupin mimo jiné zjistili, že delece *PTEN* a výskyt *TMPRSS2-ERG* genové fúze je výrazně více přítomen u pokročilého CaP. Uvádějí, že delece *PTEN* je asociovaná s genomickou instabilitou a dalšími změnami, jako je vznik *TMPRSS2-ERG* genové fúze a delece tumorsupresorových genů *RBI* a *TP53* [150].

Závěrem lze konstatovat, že se nám podařilo, v našem souboru pacientů, stanovit frekvenci záchytu *TMPRSS2-ERG* genové fúze, jež odpovídala údajům dostupných v literatuře. Prokázali jsme asociaci mezi přítomností *TMPRSS2-ERG* fúzního genu a metastazováním. Dále jsme prokázali, zvýšenou expresi ERG proteinu u případů s potvrzenou genovou fúzí. Stejně tak byla pozorovaná ko-exprese ERG s AR a TOP2B. Jak již bylo uvedeno dříve, vznik fúzního genu *TMPRSS2-ERG* vede k aktivaci *ERG*, která je řízená androgeny. V neposlední řadě jsme ověřili, že přítomnost přestavby *TMPRSS2-ERG* může souviset se zánětlivou infiltrací patologických lézí v prostatě. Detekovali jsme vyšší míru infiltrace nádorových struktur CD204+ a CD3+ buňkami, která pozitivně korelovala s výskytem fúzního genu, tato asociace nebyla dosud nikým popsána.

Naše výsledky potvrzují, že *TMPRSS2-ERG* genová fúze zaujímá významnou roli v patogenezi karcinomu prostaty. Budoucí studie, které budou korelovat vztah fúzního statusu s klinickými dopady by již mohly mít k dispozici dostatečná follow-up data pacientů, která by sloužila k posouzení vhodnosti využití této fúze jako prognostického markeru. Využití *TMPRSS2-ERG* genové fúze jako markeru pro predikci odpovědi na léčbu, stejně tak i její využití jako potenciálního terapeutického cíle, jsou dnes již zřejmé.

## 6. SEZNAM ZKRATEK

ADT	Androgen deprivation therapy
AKT	AKT serine/threonine kinase 1
AR	androgen receptor
BPH	benign prostatic hyperplasia
<i>BRCA1</i>	breast cancer 1
<i>BRCA2</i>	breast cancer 2
CaP	karzinom prostaty
CD	classification determinant
CD163	hemoglobin scavenger receptor
CD20	B-lymphocyte surface antigen B1
CD204	macrophage scavenger receptor 1
CD3	T-cell surface glycoprotein CD3
CD4	T-cell surface glycoprotein CD4
CD68	macrophage antigen CD68
CD8	T-cell surface glycoprotein CD4
CNAs	copy number alterations
COX1	cyclooxygenase-1
COX2	cyclooxygenase-2
CRISP3	cysteine rich secretory protein 3
CRPC	castration-resistant prostate cancer
CTD	C-terminal domain
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EP4	prostaglandin E2 receptor 4

ERG	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
<i>ESCO1</i>	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1
ETS	E26 transformation-specific
<i>ETS2</i>	ETS proto-oncogene 2
ETV1	ETS variant gene 1
ETV4	ETS variant gene 4
ETV5	ETS variant gene 5
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FZD4	frizzled class receptor 4
H3K27	histone deacetylase 3
<i>HMGNI</i>	high mobility group nucleosome binding domain 1
HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase
HR	homologous recombination
IHC	immunohistochemistry
Iota	protein kinase C iota
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
ncRNA	non-coding RNA
NHEJ	non-homologous end joining
NKX3.1	NK3 homeobox 1
NTD	N-terminal domain
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCA3	prostate cancer antigen 3
PGE2	prostaglandin E2

PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIA	proliferative inflammatory atrophy
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia
PIP	fosfatidylinositol 4,5-difosfát
PIP3	fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát
PNT	protein-protein interaction domain (pointed domain)
<i>POLI</i>	DNA polymerase iota
PSA	prostatic specific antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
<i>RB1</i>	retinoblastoma 1
RT-PCR	real-time PCR
shRNA	short hairpin RNA
TAMs	tumor-associated macrophages
TIDC	tumor-infiltrating dendritic cells
TILs	tumor infiltrating lymphocytes
TMPRSS2	transmembrane serine protease 2
<i>TMPRSS2-ERG</i>	fúzní gen
TOP2B	DNA topoisomerase II beta
<i>TP53</i>	tumor protein p53
TWIST	twist family bhlh transcription factor 1
uPA	plasminogen activator, urokinase
UTR	untranslated region
WNT	wnt family member

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Wang, Z., et al., *Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer*. Mol Med Rep, 2017. **16**(4): p. 5450-5458.
2. Burdova, A., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2014. **158**(4): p. 502-10.
3. Kurfurstova, D., et al., *DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer*. Mol Oncol, 2016. **10**(6): p. 879-94.
4. Andriole, G.L., et al., *Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(2): p. 125-32.
5. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up*. Lancet, 2014. **384**(9959): p. 2027-35.
6. Felgueiras, J., J.V. Silva, and M. Fardilha, *Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets*. J Zhejiang Univ Sci B, 2014. **15**(1): p. 16-42.
7. Burdova, A., et al., *Infiltration of prostate cancer by CD204+ and CD3+ cells correlates with ERG expression and TMPRSS2-ERG gene fusion*. Klinická Onkologie, 2018. **31**(4): in press.
8. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *The impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 233-45.
9. Yao, Y., et al., *Evaluation of the TMPRSS2:ERG fusion for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(3): p. 2157-66.
10. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. Science, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
11. Tomlins, S.A., et al., *TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3396-400.
12. Helgeson, B.E., et al., *Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(1): p. 73-80.
13. Findlay, V.J., et al., *Understanding the role of ETS-mediated gene regulation in complex biological processes*. Adv Cancer Res, 2013. **119**: p. 1-61.
14. Williams, J., et al., *TMPRSS2: ETS gene fusions in prostate cancer*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2011.

15. Hessels, D. and J.A. Schalken, *Recurrent gene fusions in prostate cancer: their clinical implications and uses*. *Curr Urol Rep*, 2013. **14**(3): p. 214-22.
16. Shah, R.B. and A.M. Chinnaiyan, *The discovery of common recurrent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS) gene fusions in prostate cancer: significance and clinical implications*. *Adv Anat Pathol*, 2009. **16**(3): p. 145-53.
17. Tomlins, S.A., et al., *ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice*. *Eur Urol*, 2009. **56**(2): p. 275-86.
18. Rubio-Briones, J., et al., *Clinical implications of TMPRSS2-ERG gene fusion expression in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy*. *J Urol*, 2010. **183**(5): p. 2054-61.
19. Perner, S., et al., *TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8337-41.
20. Yoshimoto, M., et al., *Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement*. *Neoplasia*, 2006. **8**(6): p. 465-9.
21. Soller, M.J., et al., *Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. **45**(7): p. 717-9.
22. Han, B., et al., *A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(18): p. 7629-37.
23. Attard, G., et al., *Heterogeneity and clinical significance of ETV1 translocations in human prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(2): p. 314-20.
24. Mehra, R., et al., *Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(5): p. 538-44.
25. Albadine, R., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(11): p. 1415-22.
26. Mosquera, J.M., et al., *Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(11): p. 3380-5.
27. Cerveira, N., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions*. *Neoplasia*, 2006. **8**(10): p. 826-32.
28. Furusato, B., et al., *Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer*. *Mod Pathol*, 2008. **21**(2): p. 67-75.
29. Perner, S., et al., *TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion*. *Am J Surg Pathol*, 2007. **31**(6): p. 882-8.

30. Hermans, K.G., et al., *TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(22): p. 10658-63.
31. Iljin, K., et al., *TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming*. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10242-6.
32. Teixeira, M.R., *Chromosome mechanisms giving rise to the TMPRSS2-ERG fusion oncogene in prostate cancer and HGPIN lesions*. *Am J Surg Pathol*, 2008. **32**(4): p. 642-4; author reply 644.
33. Mehra, R., et al., *Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3584-90.
34. Luedeke, M., et al., *Predisposition for TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer by variants in DNA repair genes*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(11): p. 3030-5.
35. Haffner, M.C., et al., *Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements*. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 668-75.
36. Bastus, N.C., et al., *Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(23): p. 9544-8.
37. Bartek, J., P. Hamerlik, and J. Lukas, *On the origin of prostate fusion oncogenes*. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 647-8.
38. Schweizer, L., et al., *The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens*. *BMC Cell Biol*, 2008. **9**: p. 4.
39. Zong, Y., et al., *ETS family transcription factors collaborate with alternative signaling pathways to induce carcinoma from adult murine prostate cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(30): p. 12465-70.
40. Birdsey, G.M., et al., *Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3498-506.
41. Vijayaraj, P., et al., *Erg is a crucial regulator of endocardial-mesenchymal transformation during cardiac valve morphogenesis*. *Development*, 2012. **139**(21): p. 3973-85.
42. Adamo, P. and M.R. Ladomery, *The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer*. *Oncogene*, 2016. **35**(4): p. 403-14.
43. Gupta, S., et al., *FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(17): p. 6735-45.
44. Carver, B.S., et al., *Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate*. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 619-24.



45. Sun, C., et al., *TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation*. *Oncogene*, 2008. **27**(40): p. 5348-53.
46. Dang, C.V., et al., *The c-Myc target gene network*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(4): p. 253-64.
47. Qian, J., R.B. Jenkins, and D.G. Bostwick, *Detection of chromosomal anomalies and c-myc gene amplification in the cribriform pattern of prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma by fluorescence in situ hybridization*. *Mod Pathol*, 1997. **10**(11): p. 1113-9.
48. Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik, *MYC oncogenes and human neoplastic disease*. *Oncogene*, 1999. **18**(19): p. 3004-16.
49. Jenkins, R.B., et al., *Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization*. *Cancer Res*, 1997. **57**(3): p. 524-31.
50. Sato, K., et al., *Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(18): p. 1574-80.
51. Koh, C.M., et al., *MYC and Prostate Cancer*. *Genes Cancer*, 2010. **1**(6): p. 617-28.
52. Dubovenko, A., et al., *Reconstitution of the ERG Gene Expression Network Reveals New Biomarkers and Therapeutic Targets in ERG Positive Prostate Tumors*. *J Cancer*, 2015. **6**(6): p. 490-501.
53. Ezponda, T., et al., *The histone methyltransferase MMSET/WHSC1 activates TWIST1 to promote an epithelial-mesenchymal transition and invasive properties of prostate cancer*. *Oncogene*, 2013. **32**(23): p. 2882-90.
54. Ribeiro, F.R., et al., *Cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly up-regulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22317.
55. Asmann, Y.W., et al., *Identification of differentially expressed genes in normal and malignant prostate by electronic profiling of expressed sequence tags*. *Cancer Res*, 2002. **62**(11): p. 3308-14.
56. Bjartell, A., et al., *Immunohistochemical detection of cysteine-rich secretory protein 3 in tissue and in serum from men with cancer or benign enlargement of the prostate gland*. *Prostate*, 2006. **66**(6): p. 591-603.
57. Udby, L., et al., *beta-Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(2): p. 555-61.
58. King, J.C., et al., *Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis*. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 524-6.
59. Karayi, M.K. and A.F. Markham, *Molecular biology of prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2004. **7**(1): p. 6-20.
60. Dong, J.T., *Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. **20**(3-4): p. 173-93.

61. Wang, S.I., R. Parsons, and M. Ittmann, *Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(3): p. 811-5.
62. Feilotter, H.E., et al., *Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas*. Oncogene, 1998. **16**(13): p. 1743-8.
63. Hermans, K.G., et al., *Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **39**(3): p. 171-84.
64. Bismar, T.A., et al., *PTEN genomic deletion is an early event associated with ERG gene rearrangements in prostate cancer*. BJU Int, 2011. **107**(3): p. 477-85.
65. Krohn, A., et al., *Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer*. Am J Pathol, 2012. **181**(2): p. 401-12.
66. Klezovitch, O., et al., *A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2105-10.
67. Tomlins, S.A., et al., *Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer*. Neoplasia, 2008. **10**(2): p. 177-88.
68. Yu, J., et al., *An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 443-54.
69. Martin, S.K. and N. Kyprianou, *Gene fusions find an ERG-way to tumor inflammation*. Cancer Biol Ther, 2011. **11**(4): p. 418-20.
70. Mohamed, A.A., et al., *ERG oncogene modulates prostaglandin signaling in prostate cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2011. **11**(4): p. 410-7.
71. Fujii, T., et al., *Immunohistochemical analysis of inflammatory cells in benign and precancerous lesions and carcinoma of the prostate*. Pathobiology, 2013. **80**(3): p. 119-26.
72. Nakai, Y. and N. Nonomura, *Inflammation and prostate carcinogenesis*. Int J Urol, 2013. **20**(2): p. 150-60.
73. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
74. Cao, J., et al., *Prognostic role of tumour-associated macrophages and macrophage scavenger receptor 1 in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2017. **8**(47): p. 83261-83269.
75. Attard, G., et al., *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer*. Oncogene, 2008. **27**(3): p. 253-63.
76. Wang, J., et al., *Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8347-51.

77. Demichelis, F., et al., *TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort*. *Oncogene*, 2007. **26**(31): p. 4596-9.
78. Yoshimoto, M., et al., *Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome*. *Mod Pathol*, 2008. **21**(12): p. 1451-60.
79. Boormans, J.L., et al., *Confirmation of the association of TMPRSS2(exon 0):ERG expression and a favorable prognosis of primary prostate cancer*. *Eur Urol*, 2011. **60**(1): p. 183-4.
80. Saramaki, O.R., et al., *TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(11): p. 3395-400.
81. Hermans, K.G., et al., *Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(20): p. 6398-403.
82. FitzGerald, L.M., et al., *Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 230.
83. Gopalan, A., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy*. *Cancer Res*, 2009. **69**(4): p. 1400-6.
84. Minner, S., et al., *ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(18): p. 5878-88.
85. Toubaji, A., et al., *Increased gene copy number of ERG on chromosome 21 but not TMPRSS2-ERG fusion predicts outcome in prostatic adenocarcinomas*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(11): p. 1511-20.
86. Fernandez-Serra, A., et al., *[Prostate cancer: the revolution of the fusion genes]*. *Actas Urol Esp*, 2011. **35**(7): p. 420-8.
87. Kristiansen, G., *Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer*. *Histopathology*, 2012. **60**(1): p. 125-41.
88. Epstein, J.I., et al., *Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens*. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2005(216): p. 34-63.
89. Brown, J.A., et al., *Fluorescence in situ hybridization aneuploidy as a predictor of clinical disease recurrence and prostate-specific antigen level 3 years after radical prostatectomy*. *Mayo Clin Proc*, 1999. **74**(12): p. 1214-20.
90. Lau, W.K., et al., *Prognostic factors for survival of patients with pathological Gleason score 7 prostate cancer: differences in outcome between primary Gleason grades 3 and 4*. *J Urol*, 2001. **166**(5): p. 1692-7.
91. Wu, F., S. Ding, and J. Lu, *Truncated ERG proteins affect the aggressiveness of prostate cancer*. *Med Hypotheses*, 2013. **80**(4): p. 490-3.

92. Chen, M.E., et al., *Detailed mapping of prostate carcinoma foci: biopsy strategy implications*. Cancer, 2000. **89**(8): p. 1800-9.
93. Kumar-Sinha, C., S.A. Tomlins, and A.M. Chinnaiyan, *Recurrent gene fusions in prostate cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 497-511.
94. Cheng, L., et al., *Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(3): p. 233-7.
95. Meiers, I., D.J. Waters, and D.G. Bostwick, *Preoperative prediction of multifocal prostate cancer and application of focal therapy: review 2007*. Urology, 2007. **70**(6 Suppl): p. 3-8.
96. Mehra, R., et al., *Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 7991-5.
97. Barry, M., et al., *TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications*. Urology, 2007. **70**(4): p. 630-3.
98. Clark, J., et al., *Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate*. Oncogene, 2008. **27**(14): p. 1993-2003.
99. Svensson, M.A., et al., *Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer*. Lab Invest, 2011. **91**(3): p. 404-12.
100. Minner, S., et al., *Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers*. Mod Pathol, 2013. **26**(1): p. 106-16.
101. Boyd, L.K., X. Mao, and Y.J. Lu, *The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity*. Nat Rev Urol, 2012. **9**(11): p. 652-64.
102. Perner, S., et al., *ERG rearrangement metastasis patterns in locally advanced prostate cancer*. Urology, 2010. **75**(4): p. 762-7.
103. Attard, G., et al., *Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2912-8.
104. Guo, C.C., et al., *The relationship of TMPRSS2-ERG gene fusion between primary and metastatic prostate cancers*. Hum Pathol, 2012. **43**(5): p. 644-9.
105. Yang, Z., L. Yu, and Z. Wang, *PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer*. Chin J Cancer Res, 2016. **28**(1): p. 65-71.
106. Hessels, D., et al., *Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2004. **4**(4): p. 513-26.
107. Jamaspishvili, T., et al., *Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2011. **14**(4): p. 354-60.
108. Bussemakers, M.J., et al., *DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(23): p. 5975-9.

109. Sanda, M.G., et al., *Association Between Combined TMPRSS2:ERG and PCA3 RNA Urinary Testing and Detection of Aggressive Prostate Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(8): p. 1085-1093.
110. Scheble, V.J., et al., *ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor*. Mod Pathol, 2010. **23**(8): p. 1061-7.
111. Adra, N., et al., *TMPRSS2-ERG Fusion in an Uncommon Presentation of Prostate Cancer*. Clin Genitourin Cancer, 2017. **15**(3): p. e489-e491.
112. Scheble, V.J., et al., *ERG rearrangement in small cell prostatic and lung cancer*. Histopathology, 2010. **56**(7): p. 937-43.
113. Guo, C.C., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion in small cell carcinoma of the prostate*. Hum Pathol, 2011. **42**(1): p. 11-7.
114. Williamson, S.R., et al., *ERG-TMPRSS2 rearrangement is shared by concurrent prostatic adenocarcinoma and prostatic small cell carcinoma and absent in small cell carcinoma of the urinary bladder: evidence supporting monoclonal origin*. Mod Pathol, 2011. **24**(8): p. 1120-7.
115. Lotan, T.L., et al., *ERG gene rearrangements are common in prostatic small cell carcinomas*. Mod Pathol, 2011. **24**(6): p. 820-8.
116. Wang, W. and J.I. Epstein, *Small cell carcinoma of the prostate. A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(1): p. 65-71.
117. Chang, A.J., et al., *High-risk prostate cancer-classification and therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(6): p. 308-23.
118. Galletti, G., et al., *ERG induces taxane resistance in castration-resistant prostate cancer*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5548.
119. Butler, M.S., et al., *Discovery and characterization of small molecules targeting the DNA-binding ETS domain of ERG in prostate cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 42438-42454.
120. Shao, L., et al., *Fibroblast growth factor receptor signaling plays a key role in transformation induced by the TMPRSS2/ERG fusion gene and decreased PTEN*. Oncotarget, 2018. **9**(18): p. 14456-14471.
121. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev, 2002. **16**(8): p. 948-58.
122. Chinni, S.R., L. Semaan, and M. Cher, *TMPRSS2-ERG fusions confers efficacy of enzalutamide in an in vivo bone tumor growth model*. Cancer Res, 2018 **78** (13 Supplement): p. 5422-54222018.
123. Brenner, J.C., et al., *Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer*. Cancer Cell, 2011. **19**(5): p. 664-78.
124. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-7.

125. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
126. Mateo, J., et al., *DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(18): p. 1697-708.
127. Kolar, Z., et al., *Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2beta expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer*. Neoplasma, 2014. **61**(1): p. 9-16.
128. Rostad, K., et al., *TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis*. Apmis, 2009. **117**(8): p. 575-82.
129. Esgueva, R., et al., *Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort*. Mod Pathol, 2010. **23**(4): p. 539-46.
130. Bhanushali, A., et al., *Status of TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer patients from India: correlation with clinico-pathological details and TMPRSS2 Met160Val polymorphism*. Prostate International, 2018. in press.
131. Pettersson, A., et al., *The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(9): p. 1497-509.
132. Fernandez-Serra, A., et al., *Molecular characterization and clinical impact of TMPRSS2-ERG rearrangement on prostate cancer: comparison between FISH and RT-PCR*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 465179.
133. St John, J., et al., *TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression*. J Cancer Sci Ther, 2012. **4**(4): p. 94-101.
134. Rajput, A.B., et al., *Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers*. J Clin Pathol, 2007. **60**(11): p. 1238-43.
135. Winnes, M., et al., *Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer*. Oncol Rep, 2007. **17**(5): p. 1033-6.
136. Petrovics, G., et al., *Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome*. Oncogene, 2005. **24**(23): p. 3847-52.
137. Ward, J.F., et al., *The long-term clinical impact of biochemical recurrence of prostate cancer 5 or more years after radical prostatectomy*. J Urol, 2003. **170**(5): p. 1872-6.
138. Barwick, B.G., et al., *Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts*. Br J Cancer, 2010. **102**(3): p. 570-6.
139. Nam, R.K., et al., *Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(12): p. 1690-5.

140. Bonaccorsi, L., et al., *Persistence of expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene after pre-surgery androgen ablation may be associated with early prostate specific antigen relapse of prostate cancer: preliminary results.* J Endocrinol Invest, 2009. **32**(7): p. 590-6.
141. Nam, R.K., et al., *Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression.* Cancer Biol Ther, 2007. **6**(1): p. 40-5.
142. Hofer, M.D., et al., *Genome-wide linkage analysis of TMPRSS2-ERG fusion in familial prostate cancer.* Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 640-6.
143. Darnel, A.D., et al., *TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in Gleason pattern 3 prostate cancer in a Canadian cohort.* Cancer Biol Ther, 2009. **8**(2): p. 125-30.
144. Chaux, A., et al., *Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas.* Am J Surg Pathol, 2011. **35**(7): p. 1014-20.
145. Engelhardt, P.F., et al., *Chronic asymptomatic inflammation of the prostate type IV and carcinoma of the prostate: is there a correlation?* Scand J Urol, 2013. **47**(3): p. 230-5.
146. Theyer, G., et al., *Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia.* Lab Invest, 1992. **66**(1): p. 96-107.
147. Wang, X.Y., et al., *Scavenger receptor-A negatively regulates antitumor immunity.* Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4996-5002.
148. Reig, O., et al., *Corrigendum re: "TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer" [Eur Urol 2016;70:709-13].* Eur Urol, 2017. **72**(2): p. e49.
149. Hernandez, S., et al., *Concurrent TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG rearrangements plus PTEN loss are not found in low grade prostate cancer and define an aggressive tumor subset.* Prostate, 2016. **76**(9): p. 854-65.
150. Williams, J.L., P.A. Greer, and J.A. Squire, *Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data.* Cancer Genet, 2014. **207**(10-12): p. 474-88.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

### Původní vědecké publikace:

**Burdová A**, Bouchal J, Rulíšek P, Král M, Študent V, Kolář Z. Infiltration of prostate cancer by CD204+ and CD3+ cells correlates with ERG expression and *TMPRSS2-ERG* gene fusion. *Klinická Onkologie*. 2018;31(5): přijato k tisku 25.6. 2018 IF není

Kolar Z, **Burdova A**, Jamaspishvili T, Bouchal J, Kucerova R, Bienova M, Kral M, Student V. Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2 $\beta$  expression to *TMPRSS2-ERG* fusion status in prostate cancer. *Neoplasma*. 2014;61(1): 9-16. IF: 1,961

Kurfurstova D, Bartkova J, Vrtel R, Mickova A, **Burdova A**, Majera D, Mistrik M, Kral M, Santer F R, Bouchal J, Bartek J. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Molecular Oncology*. 2016;10: 879-894. IF: 5,367

Kucerova R, Bienova M, Bouchal J, Trtkova KS, **Burdova A**, Student V, Kolar Z. Androgenetic alopecia and polymorphism of the androgen receptor gene (SNP rs 6152) in patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.2015;29(1):91-6. IF: 3,029

### Přehledné vědecké práce v daném oboru:

**Burdová A**, Bouchal J, Tavandzis S, Kolář Z. *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer. *Biomedical Papers*. 2014;158(4):502-510. IF: 0,924

### Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech:

**Tovaryšová et al.**: Detekce fúzního genu *TMPRSS2-ERG* metodou FISH na parafinových řezech nádoru prostaty. 43. Výroční cytogenetická konference, Ostravice 2010, přednáška.

**Tovaryšová et al.**: Detekce fúzního genu *TMPRSS2-ERG* metodou FISH na parafinových řezech nádoru prostaty. Workshop fy Intimex, Kreatech sondy, Brno 2010, přednáška.



R. Andělová et al.: **Our experiences with Sakura's Tissue-Tek Xpress x120 Continuous Rapid Tissue Processor.** 23rd European Congress of Patology, Budapešť 2011, poster.

## 9. PŘÍLOHY

## **PŘÍLOHA č. 1**

**Burdová A**, Bouchal J, Rulišek P, Král M, Študent V, Kolář Z. Infiltration of prostate cancer by CD204+ and CD3+ cells correlates with ERG expression and *TMPRSS2-ERG* gene fusion. *Klinická Onkologie*, přijato k publikaci 25.6. 2018

## **Infiltration of prostate cancer by CD204+ and CD3+ cells correlates with ERG expression and *TMPRSS2-ERG* gene fusion**

Alena Burdová<sup>1, 2</sup>, Patrik Rulišek<sup>1</sup>, Jan Bouchal<sup>1</sup>, Milan Král<sup>1</sup>, Vladimír Študent<sup>1</sup>, Zdeněk Kolář<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Molecular Pathology and Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Medicine, Palacký University and University Hospital, Olomouc, CZ-77515, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics, AGEL Laboratories, Nový Jičín, Czech Republic

Klinická Onkologie. 2018;31(5): přijato k tisku 25.6. 2018

### **ABSTRACT**

The transmembrane protease serine 2: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (*TMPRSS2-ERG*) gene fusion, which results in the increased expression of oncoprotein ERG is common in prostate cancer (CaP), while its functional role is not fully understood. Epidemiological studies of prostate carcinoma show significant associations between inflammation and cancer. Tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have been shown to influence tumor progression. The aim of the study was the detection of CD204 + and CD3 + cells in the infiltrate of benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostatic carcinoma (PCa) in prostate specimens after radical prostatectomy, and correlation of the intensity of this infiltration with ERG oncoprotein expression as well as with presence of ERG activating *TMPRSS2-ERG* gene fusion. To confirm the presence of *TMPRSS2-ERG* gene fusion we used fluorescence in situ hybridization (FISH). Immunohistochemistry (IHC) was used to evaluate presence of ERG oncoprotein and for assesment of the number of CD204+ and CD3+ infiltrating cells. Biometric analysis confirmed that the number of CD204+ macrophages in the malignant structure was significantly higher than in the BPH regardless of the fusion pattern determined by FISH. Increased infiltration by CD3+ cells was detected in malignant structures of prostate in group with normal signal pattern and in group with *TMPRSS2-ERG* gene fusion, but was not observed in group with the break in *TMPRSS2* gene. Expression of ERG positively correlated with CD204+ macrophages and CD3+ lymphocytes infiltration of malignant structures only in cases where the *TMPRSS2-ERG* gene fusion was present. In the group with the break in *TMPRSS2* gene the positive correlation was only observed between ERG expression and CD204+ macrophage infiltration. In case with normal signal pattern no correlation was observed. We have determined the ability to infiltrate malignant structures according the differences in infiltration benign and malignant structures of the prostate (higher infiltration of malignant structures than benign structures - good ability to infiltrate, lower / equal infiltration - weak ability to infiltrate malignant structures). We observed in group with *TMPRSS2-ERG* gene fusion significantly more cases with the good ability of CD204+ cells to infiltrate malignant structures, unlike the group with normal signal pattern, where was more cases with the weak ability of CD204 + cells to infiltrate the malignant structures. The same was observed for CD3 + cells. In the group with *TMPRSS2-ERG* gene fusion was detected good ability of CD3+ cells

to infiltrate malignant structures, and in the group with normal signal pattern was significantly weak ability of CD3+ cells infiltrate malignant structures. CD204+ macrophages and CD3+ T-lymphocytes in the group with *TMPRSS2-ERG* gene fusion, infiltrated the malignant prostate structures more intensely, but their effect on malignant transformation might be different. The association between the presence of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion and the different ability of inflammatory cells to infiltrate malignant structures have not been reported so far. The results confirm the important role of the activated *ERG* gene, due to *TMPRSS2-ERG* gene fusion, in the development of inflammation in the prostate as well as the effect of inflammatory cells on the neoplastic process development. This leads to consideration about introduction of immunomodulatory modalities into the prostate cancer therapeutic protocols.

## PŘÍLOHA č. 2

Kolar Z, **Burdova A**, Jamaspishvili T, Bouchal J, Kucerova R, Bienova M, Kral M, Student V. Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2 $\beta$  expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer. *Neoplasma*. 2014;61(1): 9-16.

## Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2 $\beta$ expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer

Z. KOLAR<sup>1,\*</sup>, A. BURDOVA<sup>1,4</sup>, T. JAMASPISHVILI<sup>1</sup>, J. BOUCHAL<sup>1</sup>, R. KUCEROVA<sup>2</sup>, M. BIENOVA<sup>2</sup>, M. KRAL<sup>3</sup>, V. STUDENT<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; <sup>2</sup>Department of Dermatovenereology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; <sup>3</sup>Department of Urology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; <sup>4</sup>Laboratore AGEL a.s., Laboratory of Medical Genetics, Novy Jicin, Czech Republic, EU

\*Correspondence: kolarz@tunw.upol.cz

Received February 17, 2013 / Accepted April 10, 2013

Fusion of TMPRSS2 with ERG in prostate cells is determined by double-strand DNA breaks induced by androgen signaling and transcription stress. The enzyme topoisomerase 2 $\beta$  (TOP2B) mediating DNA processing, plays an important role in DNA cleavage. The aim of this study was to analyse expression of AR, TOP2B and ERG in relation to TMPRSS2-ERG gene rearrangement and relevant clinicopathological characteristics in prostate cancer (CaP). Immunohistochemical staining and FISH were used for investigation. ERG expression in prostate cell lesions positively correlated with levels of TMPRSS2-ERG fusion gene ( $p < 0.0001$ ). The most significant co-expression of ERG was found with AR in CaP ( $p = 0.001$ ). Significantly more frequent co-expression of ERG was also revealed with TOP2B ( $p = 0.028$ ). ERG protein expression did not correlate with CaP differentiation status as we found no significant differences in ERG expression for different Gleason categories. We demonstrated a statistically significant positive correlation between the percentage of cells with fusion gene TMPRSS2-ERG in CaP and metastatic potential of tumors ( $p = 0.011$ ). Besides these positive correlations of AR with ERG ( $p = 0.001$ ) and TOP2B with ERG ( $p = 0.028$ ), we also demonstrated a significant co-expression of AR with TOP2B ( $p = 0.007$ ) in CaP. There was a statistically significant increase in the TOP2B H-index in locally advanced CaP in comparison with localized tumors ( $p = 0.046$ ). ERG expression correlates with occurrence of TMPRSS2-ERG fusion and with AR-driven malignant transformation. The results indicate that detection of the TMPRSS2-ERG fusion gene and parallel immunohistochemical examination of AR, TOP2B and ERG has diagnostic significance and may be useful in assessing the biological character of the prostate cancer as well as selecting the best treatment.

*Key words: androgen receptor, ERG, topoisomerase 2 $\beta$ , TMPRSS2-ERG fusion, prostate cancer*

The androgen receptor (AR) is a DNA-binding nuclear transcription factor that regulates gene expression. It is essential for prostate differentiation and maintenance of its differentiation status as well as for the regulation of prostate specific gene expressions such as prostate specific antigen (PSA) and type II transmembrane serine protease (TMPRSS2). In the majority of prostate cancers (CaP) there are fusion genes with oncogenic potential involving 5'-end elements composed of androgen regulated genes and the gene ETS transcription factor family [1,2]. This fusion causes aberrant transcription which is andro-

gen-driven. Although the mechanisms underlying these gene rearrangements are still unclear, recently it has been shown that fusion of TMPRSS2 with ERG (the Estrogen-Regulated Gene, a member of the ETS transcription factor family) in prostate cells is determined by double-strand DNA breaks induced by androgen signaling in response to transcription stress [1,3]. The fusion of both genes is possible owing to near configuration of uncovered DNA areas during androgen receptor-driven chromatin looping [4]. The enzyme topoisomerase 2 $\beta$  (TOP2B) mediating DNA processing, plays a major role in

### **PŘÍLOHA č. 3**

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



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/molonc](http://www.elsevier.com/locate/molonc)

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



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

<sup>a</sup>Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup>Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

<sup>c</sup>Science for Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

<sup>d</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>e</sup>Laboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>f</sup>Department of Urology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>g</sup>Division of Experimental Urology, Department of Urology, Medical University of Innsbruck, Austria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 January 2016

Received in revised form

23 February 2016

Accepted 24 February 2016

Available online 3 March 2016

#### Keywords:

Prostate tumorigenesis

DNA damage response barrier

p53 and NKX3.1 tumour suppressors

NQO1 and oxidative stress

TMPRSS2-ERG

PARP inhibitor biomarkers

### ABSTRACT

The DNA damage checkpoints provide an anti-cancer barrier in diverse tumour types, however this concept has remained unexplored in prostate cancer (CaP). Furthermore, targeting DNA repair defects by PARP1 inhibitors (PARPi) as a cancer treatment strategy is emerging yet requires suitable predictive biomarkers. To address these issues, we performed immunohistochemical analysis of multiple markers of DNA damage signalling, oxidative stress, DNA repair and cell cycle control pathways during progression of human prostate disease from benign hyperplasia, through intraepithelial neoplasia to CaP, complemented by genetic analyses of TMPRSS2-ERG rearrangement and NQO1, an anti-oxidant factor and p53 protector. The DNA damage checkpoint barrier ( $\gamma$ H2AX, pATM, p53) mechanism was activated during CaP tumorigenesis, albeit less and with delayed culmination compared to other cancers, possibly reflecting lower replication stress (slow proliferation despite cases of Rb loss and cyclin D1 overexpression) and progressive loss of ATM activator NKX3.1. Oxidative stress (8-oxoguanine lesions) and NQO1 increased during disease progression. NQO1 genotypes of 390 men did not indicate predisposition to CaP, yet loss of NQO1 in CaP suggested potential progression-opposing tumour suppressor role. TMPRSS2-ERG rearrangement and PTEN loss, events sensitizing to PARPi, occurred

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

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

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

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

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

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

## **PŘÍLOHA č. 4**

**Burdová A**, Bouchal J, Tavandzis S, Kolář Z. TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. Biomedical Papers. 2014;158(4):502-510.

## *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer

Alena Burdova<sup>a,b</sup>, Jan Bouchal<sup>a</sup>, Spiros Tavandzis<sup>b</sup>, Zdenek Kolar<sup>a</sup>

**Background.** The *TMPRSS2-ERG* gene fusion is one of the most widely spread chromosomal rearrangements in carcinomas. Since its discovery, a number of studies have examined its diagnostic, prognostic and therapeutic implications for prostate cancer where suitable biomarkers are still lacking. The publication data are inconsistent. The aim of this review was to critically evaluate the current clinical impact of this gene fusion.

**Methods.** The PubMed online database was used to search relevant reviews and original articles.

**Results.** Although the *TMPRSS2-ERG* gene fusion appears to be a suitable diagnostic biomarker, the prognostic implications of this gene fusion are still unclear. Several new strategies for therapeutically targeting ETS fusions and their modulators have been identified and are currently being investigated.

**Conclusion.** Due to the heterogeneity of prostate cancer, the combination of several biomarkers is necessary to accurately assess the presence of prostate cancer, predict its potential clinical outcome and decide on appropriate therapy (e.g. PARP inhibitors).

**Key words:** *TMPRSS2-ERG*, gene fusion, diagnosis, prognosis, predictive marker, prostate cancer

Received: September 18, 2014; Accepted with revision: November 25, 2014; Available online: December 5, 2014  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.065>

<sup>a</sup>Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup>Laboratory of Medical Genetics, AGEL Laboratories, AGEL Research and Training Institute, Novy Jicin  
Corresponding author: Zdenek Kolar, e-mail: [kolarz@tunw.upol.cz](mailto:kolarz@tunw.upol.cz)

### INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the third most common cancer diagnosed in Europe today, and the most frequent cancer in European men<sup>1</sup>. It is a heterogenous disease displaying either an indolent or an aggressive course<sup>2</sup>. One of the major problems with its diagnosis and prognosis, is the lack of valid biomarkers. Elevated levels of serum prostate-specific antigen (PSA) and/or abnormal digital rectal examination (DRE) which form the rationale for histopathological examination by needle biopsy, are insufficient and can lead to overdiagnosis and overtreatment. It is also impossible to distinguish between indolent and aggressive forms of PCa (ref.<sup>3</sup>). The main focus of current PCa research is hence on identifying and validating new biomarkers<sup>4</sup>. This review covers recent knowledge on the importance of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion in PCa.

### GENES FUSIONS AND THEIR SIGNIFICANCE

Gene fusions resulting from chromosomal rearrangements are known to play an important role in the initial steps of tumorigenesis<sup>5</sup>. Tomlins et al.<sup>6</sup> first described a gene fusion between *TMPRSS2* (Transmembrane Protease Serine 2) gene and *ETS* (Erythroblastosis Virus E26 Transformation-Specific) family genes in PCa, involving the 5' - untranslated region of *TMPRSS2* (21q22) and the encoding region of some transcription factors such as the *ETS*-related gene (*ERG*, 21q22) or *ETS* variant 1 gene (*ETV1* 7p21). Bioinformatic analysis of DNA microar-

ray data, subsequent fluorescence in situ hybridization (FISH) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, have identified *TPRSS2-ERG* fusion and *TMPRSS2-ETV1* fusion in 16/29 (55%) and in 7/29 (27%) cases of PCa, respectively<sup>7</sup>. Until this time, carcinomas were believed to harbor only rare disease-specific gene rearrangements, unlike leukemias, lymphomas and sarcomas<sup>8</sup>.

*TMPRSS2* is a prostate-specific, androgen regulated gene, constitutively expressed under the transcriptional control of androgens through androgen responsive elements (ARE) in its 5' UTR. The ETS family of transcription factors is one of the largest families of transcription regulators. All 27 members share a conserved DNA binding domain - the ETS-domain which permits binding to purine rich DNA sequences containing a 5' -GGAA/T-3' core sequence<sup>9</sup>. ETS transcription factors play an important role in diverse biological processes, including cell proliferation, apoptosis, differentiation, angiogenesis and invasiveness. *TMPRSS2-ETS* gene fusions lead to increased expression of the ETS members in response to the androgen induced *TMPRSS2* promoter<sup>10</sup>.

Further experiments revealed that the *TMPRSS2* gene could also be fused to other members of the ETS transcription factor family, such as *ETV4* and *ETV5* genes<sup>11,12</sup>. *ETV1*, *ETV4* and *ETV5* fusions together account for approximately 5-10% of PSA-screened PCa (ref.<sup>13-15</sup>). Likewise, other genes, for example, *SLC45A3* (Solute Carrier Family 45, Member 3), *NDRG1* (N-Myc Downstream Regulated 1), *HERPUD1* (Homocysteine-Inducible, Endoplasmatic Reticulum Stress-Inducible,