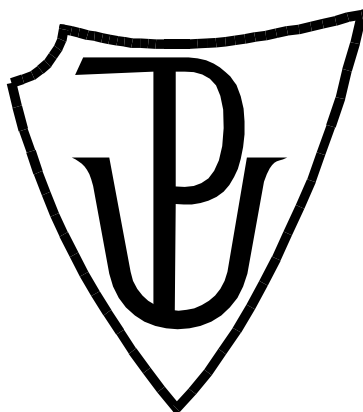


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Analýza genomické DNA z krve pro výběr terapie
u nádorů prostaty**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Nikola Mašová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Knillová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Nikola Mašová
Název práce:	Analýza genomické DNA z krve pro výběr terapie u nádorů prostaty
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Knillová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>Hlavním problémem léčby karcinomu prostaty je progresse onemocnění do kastročně-rezistentní formy (CRPC) i navzdory androgen deprivací terapii. Intrakrinní biosyntéza androgenů, stejně tak jako působení složek nádorového mikroprostředí, patří k mechanismům, které mohou přispívat k progresi a selhání terapie. Díky tomu by detekce SNP v genu HSD3B1 a délky D-repetice asporinu mohla sloužit k predikci odpovědi na léčbu a agresivity onemocnění. Metody použité v práci zahrnovaly asymetrickou qPCR s nezačnou LNA próbou s následnou analýzou křivek tání pro detekci SNP u HSD3B1 a fragmentační analýzu pro určení délky D-repetice asporinu. Z naměřených dat byl u souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty pozorován trend k asociaci HSD3B1 1245C/C genotypu s rychlejším rozvojem CRPC a s přítomností metastáz v době diagnózy. Ve stejném souboru byla zjištěna signifikantní asociace delších D-repetice asporinu s vyšším Gleasonovým skóre a také asociace alely D14 s nižším věkem pacienta v době diagnózy. Obě sledované genové varianty tak ukazují potenciální klinický význam pro volbu vhodné terapie u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.</p>
Klíčová slova:	HSD3B1, karcinom prostaty, androgen deprivací terapie, asporin, kyselina asparagová
Počet stran:	65
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's first name and Surname: Bc. Nikola Mašová

Title of thesis: Analysis of blood genomic DNA for treatment selection in prostate cancer

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Clinical and Molecular Pathology

Supervisor: Mgr. Jana Knillová, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: The main problem in the treatment of prostate cancer is disease progression to a castration-resistant form (CRPC) despite androgen deprivation therapy. Intracrine biosynthesis of androgens, as well as the action of components of the tumor microenvironment, are among the mechanisms that may contribute to the progression and therapy failure. Detection of SNPs in the HSD3B1 gene and the length of D-repeats of asporin could predict the treatment response and disease progression. The methods used in this study included asymmetric qPCR with an unlabeled LNA probe followed by melting curve analysis to detect SNPs in HSD3B1 and fragmentation analysis of the length of asporin D-repeats. From the measured data, a trend towards the association of HSD3B1 1245C/C genotype with faster development of CRPC and the presence of metastases at the time of diagnosis was observed in a group of patients with advanced prostate cancer. In the same group, a significant association of longer D-repeats of asporin with the higher Gleason score, as well as D14 allele with the lower age of the patient at the time of diagnosis, were found. Thus, both observed gene variants show the potential clinical importance for therapy selection in patients with advanced prostate cancer.

Keywords: HSD3B1, prostate cancer, androgen deprivation therapy, asporin, aspartic acid

Number of page: 65

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Jany Knillové, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Mé poděkování patří Mgr. Janě Knillové, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, laskavý přístup, pomoc i čas, který mi věnovala. Ráda bych také poděkovala MUDr. Denise Vitáskové za poskytnutí patientských vzorků včetně klinických dat a doc. Janu Bouchalovi, Ph.D. za cenné rady a statistické zpracování výsledků. V neposlední řadě děkuji i rodině a svým blízkým za podporu během celého studia.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Prostatické buňky a jejich závislost na androgenech	12
2.1.1 Regulace tvorby androgenů	12
2.1.2 Biosyntéza androgenů	13
2.1.3 Mechanismy vzniku CRPC	13
2.2 Karcinom prostaty	15
2.2.1 Léčba	15
2.2.1.1 Lokalizovaný karcinom	15
2.2.1.2 Pokročilý a metastatický karcinom	16
2.2.1.3 Kastrálně - rezistentní karcinom	17
2.3 Vliv genetických variant na progresi karcinomu prostaty	19
2.3.1 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy	19
2.3.2 Genové varianty ostatních steroidogenních enzymů	20
2.4 Vliv mikroprostředí na vývoj karcinomu a odpověď na terapii	21
2.4.1 Malé proteoglykany bohaté na leucin (SLRPs)	22
2.4.2 Asporin	23
2.4.2.1 Role asporinu v regulačních dráhách u různých typů malignit	23
2.4.2.2 Polymorfismus v počtu D-repetic asporinu a jejich vliv na patogenezi	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky	26
3.1.2 Spotřební materiál	26
3.1.3 Použité chemikálie a roztoky	26
3.1.4 Použité kity	27
3.1.5 Primery a próby	28
3.1.6 Biologický materiál	28
3.2 Metody	31
3.2.1 Izolace DNA	31
3.2.2 Obecná pravidla pro přípravu PCR	31
3.2.3 Asymetrická real-time PCR	31
3.2.4 Kontrola produktů PCR reakce pomocí gelové elektroforézy	32
3.2.5 High resolution melting (HRM)	33

3.2.6	Sangerovo sekvenování.....	35
3.2.6.1	Přečištění produktů	35
3.2.6.2	Sekvenační PCR.....	36
3.2.6.3	Přečištění produktů sekvenační PCR reakce.....	37
3.2.6.4	Sekvenování.....	37
3.2.7	Fragmentační analýza	37
3.2.8	Reverzní transkripce	39
3.2.9	Statistická analýza.....	40
3.3.	Výsledky	41
3.3.1	Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím HRM analýzy pro soubor pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.....	41
3.3.2	Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím HRM analýzy pro soubor pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.....	42
3.3.3	Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím Sangerova sekvenování.....	43
3.3.4	Vliv variantní alely 1245C v genu HSD3B1 na délku androgen deprivace terapie.....	44
3.3.5	Vyšetření počtu D-repetic asporinu u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.....	45
3.3.6	Vliv polymorfismu v počtu D-repetic asporinu na progresi karcinomu prostaty	47
3.3.7	Význam klinických parametrů	48
3.4	Diskuze	49
4	Závěr	53
5	Použitá literatura	54

Seznam zkratek

A	adenin
ADT	androgen deprivační terapie (androgen deprivation therapy)
AKR1C3	aldo-keto reduktáza C3
AR	androgenový receptor
ASPIN	asporin
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BMP2	bone-morphogenic protein 2
Bp	pár bazí (base pair)
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA
CRPC	kastračně-rezistentní karcinom prostaty (castration-resistant prostate cancer)
CYP	cytochrom P450, enzymy cytochromu P450
D, D-repetice	repetice kyseliny asparagové
DHEA, DHEAS	dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron sulfát
DHT	5- α -dihydrotestosteron
dsDNA	dvouvláknová DNA
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
Fw	forward primer
G	guanin
GnRH, LHRH	hormon uvolňující luteinizační hormon (gonadotropin hormone releasing hormone; luteinizing hormone-releasing hormone)
GS	Gleasonovo skóre (Gleason score)
HRM	analýza křivek tání (high resolution melting)
HSP	proteiny tepelného šoku (heat-shock proteins)
KP	karcinom prostaty
LH	luteinizační hormon, lutropin
mRNA	mediátorová RNA
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)
qPCR	kvantitativní PCR

Rv	reverse primer
SLCO	solute carrier proteins
SLRP	small-leucin-rich proteoglykan
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
SRD5A	steroid-5 α -reduktáza
T	thymin
TAE	tris-acetát-EDTA pufr
TBE	tris-borát-EDTA-pufr
TGF β , TGF β R	transformin growing factor- β , transformin growing factor- β receptor
Tm	teplota tání (melting temperature)
TME	nádorové mikroprostředí (tumor microenvironment)
TTP	čas/doba do progrese (time to progression)
3 β HSD, HSD3B	enzymy rodiny 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáz
17 β HSD, HSD17B	enzymy rodiny 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáz

1 Úvod a cíle práce

Podle aktuálních celosvětových dat je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů karcinom prostaty. Závislost prostatických buněk na androgenech využívá androgen deprivace terapie založená na potlačení jejich tvorby nebo jejich účinku. Po nějaké době léčby se však citlivost prostatických buněk na kastraci hladinu androgenů snižuje a hormonálně-senzitivní karcinom u většiny pacientů přechází v karcinom kastrace-rezistentní, který je v současné době jen obtížně léčitelný. Predikce vzniku kastrace rezistence a progresu do terminálního stádia by lékařům mohla pomoci při výběru terapie a případném použití moderních léčiv. Z tohoto důvodu jsou vyhledávány markery, které by usnadnily předpověď průběhu léčby a účinnosti androgen deprivace. Pozornost se zaměřuje zejména na genové varianty enzymů zapojených do produkce a metabolismu mužských pohlavních hormonů. Jednou ze studovaných variant je jednonukleotidový polymorfismus v genu HSD3B1. Enzym kódovaný tímto genem je zodpovědný za přeměnu dehydroepiandrosteronu na androstendion. Substitucí 1245 A → C dochází k nesynonymní záměně aminokyseliny Arg za Thr v pozici 367 vznikajícího proteinu. Přítomnost variantní alely je spojena s horší odpovědí pacientů na androgen deprivace terapii a slouží jako biomarker pro výběr terapie karcinomu prostaty.

V současnosti je již objasněno, že maligní transformace buněk a progresu nádorového onemocnění jsou nejen výsledkem genetických změn v protoonkogenech a tumor-supresorových genech, ale také výsledkem interakcí složek nádorového mikroprostředí. Významnou součástí systému je extracelulární matrix a proteiny, které obsahuje. Mezi tyto proteiny patří asporin, který díky svému působení v drahách regulujících proliferaci a invazivitu buněk, hraje podstatnou roli při rozvoji nádoru. Ve struktuře genu byla nalezena unikátní oblast kódující repetice kyseliny asparagové a polymorfismus v jejich délce je spojován s progresí některých nádorových onemocnění, včetně karcinomu prostaty.

Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na popis závislosti nádorových buněk prostaty na androgenech a věnuje se také interakcím, které zprostředkovávají. Shrnuje typy léčby karcinomu prostaty, které jsou dostupné pro jednotlivá stádia onemocnění, a v neposlední řadě se zabývá i přehledem studovaných variant genů zapojených do tvorby i metabolismu androgenů a jejich významem pro predikci odpovědi na androgen deprivace terapii. Je také popsán vliv nádorového mikroprostředí, včetně proteinu asporinu, na progresi nádoru.

Cílem experimentální části práce bylo detekovat polymorfismus 1245A → C v genu HSD3B1 pomocí metody asymetrické qPCR a analýzy křivek tání, určit frekvenci výskytu variantní alely u souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty a zjistit, zda získané výsledky korelují s odpovědí pacientů na androgen deprivace terapii. Další část práce byla zaměřena na stanovení počtu repetice kyseliny asparagové v molekule asporinu metodou

fragmentační analýzy a na korelaci zjištěných dat s progresí onemocnění u souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Prostatické buňky a jejich závislost na androgenech

Prostata (předstojná žláza) je mužský přídatný pohlavní orgán sestávající z 30-50 rozvětvených tuboalveolárních žlázek. Z histologického hlediska ji tvoří stroma a víceřadý epitel, jenž obsahuje bazální, neuroendokrinní a lumenální buňky. Lumenální buňky mají jako jediné sekreční funkci a tvoří prostatický sekret o slabě kyselém pH obsahující kromě jiných látek prostatický specifický antigen (PSA) a kyselou prostatickou fosfatázu (PAP, prostatic acid phosphatase) (Lüllmann-Rauch, 2012). Pro vývoj, správnou funkci prostaty a proliferaci prostatických buněk jsou důležité androgeny, které přímo působí na lumenální buňky epitelu. Jejich nepřímý účinek se odráží v sekreci růstových faktorů buňkami stromatu a jimi indukované proliferaci a diferenciaci bazálních buněk (Wikstrom *et al.*, 1999).

Účinek androgenů v buňkách zprostředkovává androgenový receptor (AR). Strukturou a funkcí jde o transkripční faktor, který je v cytoplazmě prostatických buněk asociovaný s proteiny tepelného šoku (HSP, heat-shock proteins) (Grossmann *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 1999). Vazbou ligandu dochází ke konformační změně a uvolnění z vazby s HSP. Následnou aktivací jaderného lokalizačního signálu je umožněn import androgenového receptoru do jádra (Koochekpour, 2010; Kaku *et al.*, 2008). Zde ve formě dimeru svou vazbou na specifické úseky DNA (ARE, androgen responzibilní elementy) indukuje nebo inhibuje expresi cílových genů (Dai *et al.*, 2017). Vysokou expresi AR vykazují zejména lumenální buňky prostatického epitelu. Bazální a neuroendokrinní buňky jsou naopak považovány za androgen necitlivé, protože AR téměř neexprimují. Schopnost androgenové signalizace těchto buněk pravděpodobně ovlivňuje budoucí vývoj karcinomu prostaty (Zhou *et al.*, 2015). Mezi geny regulované přímo androgeny se řadí především PSA (prostatický specifický antigen) a TMPRSS2 (transmembránová serinová proteáza typu 2) (Tan *et al.*, 2015).

2.1.1 Regulace tvorby androgenů

Jak již bylo zmíněno, růst, vývoj i diferenciaci prostatických buněk jsou závislé na androgenech. Jsou to mužské pohlavní hormony nepostradatelné pro zrání a funkci mužských pohlavních orgánů a vývoj sekundárních pohlavních znaků (Griffin, 1992). Většina androgenů se tvoří ve varlatech (přibližně 95 %), malé množství jsou schopny produkovat i nadledviny (asi 5 %) (Silbernagl *et Despopoulos*, 2004).

Produkce androgenů je řízena z hypotalamu, tzv. hypotalamo-hypofyzárně testikulární osou. Hypotalamus produkuje hormon uvolňující gonadotropin (GnRH, LHRH) a hormon uvolňující kortikotropin (kortikoliberin). Tyto signální látky podněcují tvorbu příslušných hormonů v adenohipofýze. GnRH stimuluje produkci lutropinu (LH) a folikuly-stimulujícího

hormonu. Oba hormony indukují produkci testosteronu ve varlatech. Hladina testosteronu potom negativní zpětnou vazbou působí na jejich produkci v hypothalamu a v hypofýze. V nadledvinách je produkce androgenů regulována adrenokortikotropním hormonem, jehož tvorba v hypofýze je stimulována kortikoliberinem (Dai *et al.*, 2017; Auchus *et al.*, 2012). Testosteron je v krevním řečišti přenášen ve vazbě na specifický globulin (SHBG, sex hormone-binding globulin), případně na albumin, a malé procento je nevázané (Dai *et al.*, 2017; Dunn *et al.*, 1981). Pro spermatogenezi je využíván testosteron vázaný na protein ABP (androgen-binding protein) (Silbernagl *et al.*, 2004).

2.1.2 Biosyntéza androgenů

Prekurzorem pro všechny steroidní hormony je cholesterol. Samotná biosyntéza je iniciována transportem cholesterolu z vnější na vnitřní membránu mitochondrie pomocí proteinu StAR (steroidogenic acute regulatory protein). Zde dochází ke štěpení postranního řetězce cholesterolu enzymem CYP11A1 za účasti ferredoxin-reduktázy. Produktem reakce je pregnenolon, který je konvertován na 17-OH-pregnenolon a následně na dehydroepiandrosteron (DHEA). Obě reakce jsou katalyzovány enzymem CYP17A1 (17-hydroxyláza/17,20-lyáza, P450c17). Tyto časně reakce steroidogeneze probíhají shodně v kůře nadledvin i varlatech (Scharifi *et al.*, 2012).

V nadledvinách je většina DHEA sulfonována sulfotransferázou SULT2A1 a secernována do krve, případně přeměněna na androstendion. Aktivitou 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 5 (17 β HSD5) je potom i nadledvinami tvořeno malé množství testosteronu (Turcu *et al.*, 2015). Leydigovy buňky varlat neexprimují SULT2A1, a proto DHEA aktivně přeměňují na androstendion a následně na testosteron, který vstupuje do krevního řečiště. Ke vzniku androstendionu a testosteronu je potřebná aktivita enzymů 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy) a 17 β -HSD (17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy) (Dai *et al.*, 2017; Sharifi *et al.*, 2012). V cílové tkáni vstupuje volný testosteron pasivní difúzí do prostatických buněk, kde přímo aktivuje androgenový receptor nebo je ireverzibilně konvertován enzymem 5- α reduktázou typu 1 a 2 (SRD5A1, SRD5A2) na 5- α -dihydrotestosteron (DHT) (Russel *et al.*, 1994). Ten má oproti testoteronu až desetkrát větší schopnost stimulace AR (Deslypere *et al.*, 1992).

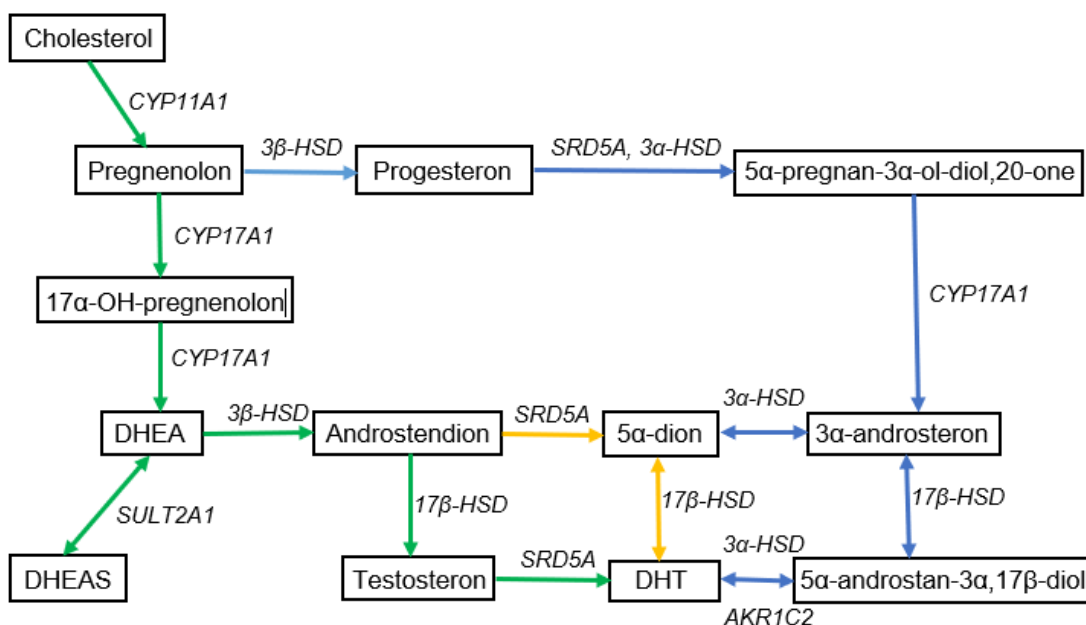
2.1.3 Mechanismy vzniku CRPC

Jedním z hlavních problémů při léčbě karcinomu prostaty je vznik kastrační rezistence v průběhu androgen deprivace terapie (ADT). Počáteční stav, kdy jsou buňky karcinomu citlivé na sníženou hladinu androgenů, v průběhu léčby progreduje a může postoupit až do stádia, kdy buňky rostou a proliferují i za těchto podmínek - vyvíjí se tzv. kastračně-rezistentní karcinom prostaty (CRPC, castration-resistant prostate cancer). Ukazuje se, že u většiny těchto nádorů je exprimován AR

a progresu do CRPC je výsledkem obnovení signalizace, kterou zprostředkovává (Sharifi *et al.*, 2005).

K deregulaci AR signalizace může docházet jak na úrovni post-receptorové (amplifikace genu pro androgenový receptor, mutace AR, sestřihové varianty AR, nekankonická transaktivace androgenového receptoru), tak na úrovni pre-receptorové (intrakrinní biosyntéza androgenů) (Hoang *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2017). Kromě těchto mechanismů, ve kterých je zapojen AR, mohou mít na vzniku CRPC podíl i dráhy, které jeho signalizaci obcházejí, nebo vlastnosti prostatických nádorových buněk kmenového charakteru a neuroendokrinních buněk karcinomu prostaty (Hoang *et al.*, 2017; Chandrasekar *et al.*, 2015).

Intrakrinní syntéza androgenů představuje jak *de novo* syntézu z cholesterolu přes progesteron pomocí CYP17A1, tak alternativní mechanismy, které zahrnují systémy pro tvorbu DHT obcházející testosteron jako meziprodukt (Obr. 1) (Chang *et al.*, 2012). První z alternativních přístupů tvorby androgenů může být tzv. „backdoor mechanismus“. Vychází z přeměny pregnenolonu na progesteron a zahrnuje několik dalších meziproduktů (17-hydroxyprogesteron, 3 α -androsteron). Závěrečnou redukcí na 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol a následnou konverzí vzniká DHT. V reakcích jsou zapojeny zejména enzymy rodiny CYP17A1 a 3 α -HSD (Obr.1) (Dai, *et al.*, 2017; Fiandalo *et al.*, 2014). Cesta, kterou je preferenčně tvořen DHT v kastročně-rezistentním karcinomu prostaty, je 5 α -dion dráha (5 α -androstandion). Androstendion podstoupí 5 α -redukcí na 5 α -dion s následnou redukcí 17-keto skupiny na DHT (Chang *et al.*, 2011). Na dihydrotestosteron mohou být přeměněny i androgenové prekurzory cirkulující v krvi (DHEA, DHEAS) (Dai *et al.*, 2017; Mostaghel, 2013).



Obr.1 Schéma biosyntetických drah androgenů v prostatě a karcinomu prostaty. Schéma zobrazuje klasickou dráhu tvorby androgenů (zeleně), backdoor dráhu (modře) a 5 α -dion dráhu (žlutě).

2.2 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a současně pátou nejčastější příčinou úmrtí ve světě (Rawla, 2019; Bray *et al.*, 2018). Díky aktivnímu vyhledávání je diagnostikován ve většině případů v poměrně dobře léčitelném časném stádiu, a tak i přes narůstající incidenci nedochází ke zvyšování mortality. Informace z projektu Eurocare 5 udávají pětileté přežití s karcinomem až u 83 % případů (Trama *et al.*, 2015). Významný je také přínos zlepšujících se terapeutických postupů a hledání biomarkerů, které by u pacientů predikovaly odpověď na terapii nebo progresi onemocnění (SVOD, 2017).

Onemocnění karcinomem prostaty postihuje především muže starší 50 let a závisí na rasovém původu, životním stylu nebo výskytu onemocnění v rodině (Bostwick *et al.*, 2004). Samotný nádor roste většinou velmi pomalu a projevuje se minimálně. V pokročilejším stádiu se již pacient setkává s příznaky, mezi které patří obtížné močení, retence moči nebo hematurie (Balík *et Brodřák*, 2011). Mezi základní vyšetření pro stanovení diagnózy patří digitální rektální vyšetření, stanovení hladiny sérového PSA a transrektální biopsie prostaty (Heidenreich *et al.*, 2014). Histologický stupeň diferenciacie nádoru je určován pomocí Gleasonova skóre (Gleason *et al.*, 1974), klinické stádium je hodnoceno mezinárodní TNM klasifikací (<https://www.uicc.org/resources/tnm>).

2.2.1 Léčba

Většina diagnostikovaných karcinomů prostaty jsou adenokarcinomy a podle klinického stádia se dají rozdělit na nádory lokalizované, lokálně pokročilé a metastatické. Z hlediska hormonální senzitivity potom na hormonálně-senzitivní (HSPC; hormone-sensitive prostate cancer) a kastročně-rezistentní karcinom prostaty (CRPC; castration-resistant prostate cancer). Pokročilost onemocnění a faktory určující jeho progresi ovlivňují volbu způsobu léčby (Obr. 3).

2.2.1.1 Lokalizovaný karcinom

Lokalizovaný karcinom prostaty je většinou indikován v časném stádiu maligního onemocnění. Nádor nepronurůstá do okolních tkání a je omezený pouze na prostatu. Terapie lokalizovaného karcinomu zahrnuje několik přístupů v závislosti na závažnosti onemocnění.

U pacientů s nízkorizikovým karcinomem se často uplatňuje tzv. odložená terapie, reprezentující neinvazivní možnost léčby. Patří sem aktivní sledování, které se využívá zejména u mladších pacientů s karcinomem v přepokládaném latentním stavu a zahrnuje pravidelné testování markerů progresse onemocnění a rebiopsie prostaty (Matulewicz *et al.*, 2015). Ve vyšším věku u nemocných s nízkým Gleasonovým skóre je preferován přístup pozorného vyčkávání (watchful waiting) (Matoušková, 2006).

Invazivní terapii lokalizovaného karcinomu představuje především radikální prostatektomie (operativní odstranění prostaty včetně semenných váčků) a radioterapie. Je indikována u nemocných se známkami progresu nádoru (Heidenreich *et al.*, 2014; Herden *et al.*, 2018). Radioterapie v kombinaci s hormonální léčbou tvoří slibnou terapii i u lokálně pokročilých karcinomů (Warde *et al.*, 2011). K eliminaci reziduálních hladin androgenů lze adjuvantně využít i hormonální terapii (Messing *et al.*, 1999).

2.2.1.2 Pokročilý a metastatický karcinom

Lokálně pokročilý karcinom je zhoubný útvar, který proniká pouzdrem prostaty do okolních tkání a případně zakládá metastatická ložiska v jiných orgánech. Standardní léčbou je androgen deprivace (ADT), jejímž cílem je blokování účinku androgenů nebo potlačení jejich tvorby (Matoušková, 2006). V prostředí s nízkou hladinou androgenů dochází potom u buněk, které jsou na nich závislé, k navození apoptózy (Matoušková, 2006; Pollack *et al.*, 2001).

Androgenní deprivace se dosahuje chirurgickým oboustranným odstraněním varlat (orchiektomie) nebo chemickou kastrací. Chemická kastrace je léčbou první volby u pacientů s metastatickým karcinomem a zahrnuje analoga nebo antagonisty LHRH. Potlačení účinku androgenů je dosaženo steroidními nebo nesteroidními antiandrogeny (Saad *et al.*, 2015).

Analoga LHRH (leuprolid, goserelin, buserelin) představují strukturně podobné látky hormonu uvolňující gonadotropin (GnRH, LHRH), které nepřetržitě aktivují jeho receptory v adenohipofýze. Nejprve prudce narůstá hladina LH, a tím i hladina testosteronu. Brzy je lutropin vyčerpán a následuje prudký útlum produkce testosteronu. Kastrální hladina testosteronu se dostaví po 2-3 týdnech terapie (Saad *et al.*, 2015; 2015; Harris *et al.*, 2009; Labrie *et al.*, 2005). Podobně působí i antagonisté (degarelix), které svou vazbou na LHRH receptor v hypofýze brání přímé tvorbě LH, a tím i tvorbě testosteronu (Boccon-Gibod *et al.*, 2011).

I přes snížení gonadální produkce androgenů může přetrvávat steroidogeneze z adrenálních prekurzorů nebo v samotných buňkách nádoru. K potlačení účinku androgenů se používají steroidní (mifepriston, cyproteron acetát, spironolacton) i nesteroidní (bicalutamid, flutamid, nilutamid, enzalutamid) antiandrogeny. Jsou to látky kompetující s DHT o vazbu na androgenový receptor, čímž zabraňují transkripci cílových genů (Gamat *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009).

Nesteroidní farmaka inhibují androgenní signalizaci vazbou na ligand-vazebnou doménu AR. Bicalutamid svou vazbou k AR stimuluje tvorbu AR korepresorů, které snižují AR transkripční aktivitu (Masiello *et al.*, 2002). Antiandrogenem nové generace je enzalutamid. Na rozdíl od ostatních inhibitorů AR vykazuje pouze antagonistický účinek a na AR se váže se signifikantně vyšší afinitou. Svým působením brání vazbě DHT na AR, blokuje translokaci komplexu AR-DHT do jádra a inhibuje jeho vazbu na androgen responzivní elementy

(Študentová, 2013; Tran *et al.*, 2009). Vzhledem ke svým vlastnostem má signifikantní vliv na celkové přežití a u pacientů s metastatickým CRPC, kteří již podstoupili chemoterapii, je schváleným prostředkem terapie (Stein *et Jang*, 2016). Využívá se pro dlouhodobou léčbu kastračně-rezistentního karcinomu prostaty (Scher *et al.*, 2012).

Steroidní antiandrogeny ovlivňují uvolňování gonadotropinů v hypofýze, a tím snižují hladinu testosteronu v plazmě. Vzhledem k jejich hepatotoxicitě a kardiotoxicitě je užívání značně omezeno (Ricci *et al.*, 2014; Gillatt, 2006).

Kombinací obou přístupů, tj. kastrace (chirurgické nebo chemické) společně s antiandrogeny, je docíleno tzv. maximální androgenní blokády a je blokován účinek androgenů produkovaných nadledvinami (Ricci *et al.*, 2014).

2.2.1.3 Kastrace - rezistentní karcinom

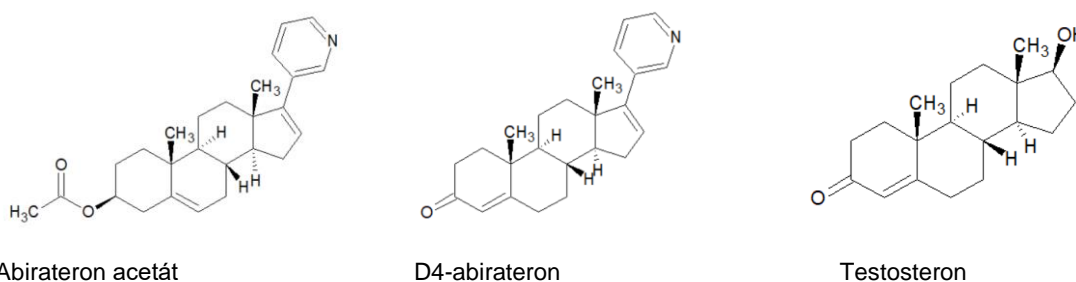
Androgen deprivace je základním pilířem léčby pokročilého nebo metastatického karcinomu prostaty. Z počátku jsou téměř všichni pacienti na androgenní deprivaci citliví, avšak po čase její účinnost selhává a postupně dochází k adaptaci nádorových buněk na prostředí s kastrační hladinou androgenů. Tento stav je převážně způsobený reaktivací signalizace zprostředkované androgenovým receptorem (Shafi *et al.*, 2013). Onemocnění nadále progreduje v kastračně-rezistentní karcinom (CRPC, castration-resistant prostate cancer), který je definován biochemickou progresí (zvýšení hladiny sérového PSA při kastračních hladinách testosteronu), radiologickou progresí (vznik nových ložisek metastáz) a klinickou progresí (vývoj symptomů) (Hotte *et Saad*, 2010).

V případě progresse onemocnění je kastrační léčba kombinována i s jinými léčebnými postupy. Nejčastěji se uplatňují již zmiňované antiandrogeny. K terapii metastatického CRPC (mCRPC) může být použita kombinace ADT s chemoterapií, imunoterapií nebo radiofarmaky. Cytostatikem první volby u CRPC je docetaxel, lék ze skupiny taxanů, který vazbou na tubulin ovlivňuje funkci dělicího vřetenka a současně indukuje apoptózu nádorových buněk. Pro druhou linii léčby je aplikováno i novější chemoterapeutikum cabazitaxel. Jeho vliv na celkové přežití pacienta je srovnatelný s účinky docetaxelu (Nader *et al.*, 2018; de Bono *et al.*, 2010; Sartor *et al.*, 2016).

Pro léčbu pacientů s metastatickým CRPC je používána i imunoterapie. V současnosti je jediným registrovaným imunoterapeutikem buněčná imunovakcína Sipuleucel-T. Obsahuje autologní monojaderné buňky získané leukoferézou a následně aktivované *ex vivo* rekombinantním fúzním proteinem kyselou prostatickou fosfatázu (PA2024) (Kantoff *et al.*, 2010). Léčivo cílí na kyselou prostatickou fosfatázu. Její zvýšenou hladinu lze registrovat u pacientů s kostními metastázami a obecně je spojena se špatnou prognózou (Janiczek *et al.*, 2017; Gutman *et al.*, 1936). V klinických studiích se však testuje řada nových potenciálních léčiv s různým

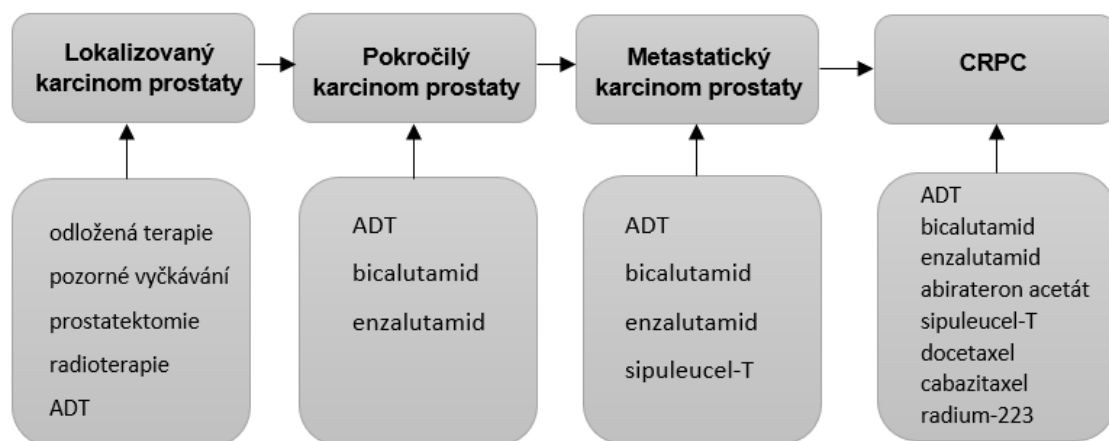
mechanismem účinku, která jsou indikována nejen pro pacienty s CRPC, ale i s lokalizovaným karcinomem. Příkladem je virová vakcína Prostavac-VF, tvořená virovým vektorem obsahujícím geny pro PSA a kostimulační molekuly T-lymfocytů. Vakcína aktivuje T-buněčnou imunitní odpověď pacienta s následnou destrukcí nádorových buněk (Reimers *et al.*, 2019; Kantoff *et al.*, 2010). Autologní vakcína DCVAC/PCa obsahující aktivované dendritické buňky je dalším testovaným léčivem. V kombinaci s docetaxelem vykazuje zlepšení celkového přežití pacienta (Podrazil *et al.*, 2015). Mezi imunoterapeutika patří i DNA vakcíny s částmi kódujícími sekvence cíleného antigenu. Současně se studie také zaměřují na inhibitory kontrolních bodů buněčného cyklu. Do této skupiny patří Ipilimumab, protilátky anti-PD-1 (Pembrolizumab, Pidilizumab) a cytokiny (Reimers *et al.*, 2019; Janiczek *et al.*, 2017; Cole *et al.*, 2015). Imunoterapie je indikována především pro pacienty s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým mCRPC a také v případě paliativní péče (Saad *et Fizazi* 2015; Janiczek *et al.*, 2017).

Vzhledem k náročnosti a omezeným možnostem terapie CRPC, se lékaři přiklánějí i k aktivnějšímu využívání novějších léčiv. Do této kategorie patří již zmíněný enzalutamid, potom také abirateron acetát nebo léčiva paliativní péče. Abirateron acetát je selektivní inhibitor enzymu 17α -hydroxylázy (CYP17A) a svým působením zasahuje do syntetické dráhy testosteronu nejen v gonádách, ale i v nadledvinách a nádorových buňkách prostaty. Působením izoenzymů 3β HSD vzniká aktivnější metabolit Δ^4 -abirateron (D4A), který inhibuje zejména CYP17A, 3β HSD a SRD5A. Svou strukturou podobnou testosteronu působí také jako antagonist androgenového receptoru a potlačuje účinek androgenů (Obr. 2) (Li *et al.*, 2015). Na základě studie z roku 2011 je abirateron schváleným léčivem u pacientů s mCRPC, kteří byli léčeni docetaxelem a současně se léčí ADT (de Bono *et al.*, 2011).



Obr. 2 Chemická struktura abirateron acetátu, jeho metabolitu D4-abirateronu (D4A) a testosteronu.

Kyselina zoledronová nebo monoklonální protilátka denosumab se podávají pacientům trpícím bolestmi, jejichž příčinou jsou zejména kostní metastázy (Študentová, 2013). Nové možnosti cílené léčby kostních metastáz představují také radiofarmaka. Alfa zářič Radium-223 emituje α částice o vysoké energii. Vysokoenergetické částice indukují tvorbu dvouvláknových zlomů v DNA, které mohou vést k apoptóze nádorových buněk. V současnosti se studuje vztah mezi využitím Radia-223 a ostatních terapií u CRPC (Morris *et al.*, 2019).



Obr. 3 Zjednodušené schéma terapie pro jednotlivá stádia onemocnění.

2.3 Vliv genetických variant na progresi karcinomu prostaty

Progrese karcinomu prostaty z hormonálně-senzitivního na kastračně-rezistentní je z velké části přisuzována reaktivaci androgenového receptoru (Scher *et al.*, 2005).

Intrakrinní biosyntéza androgenů je jedním z mechanismů, způsobující hormonální rezistenci prostatických buněk, ke které dochází v průběhu léčby ADT (viz. kapitola 2.1.3). S produkcí androgenů v nádorových prostatických buňkách souvisí zvýšená nebo snížená exprese enzymů biosyntetické dráhy androgenů nebo mutace v genech kódujících tyto enzymy (Hoang *et al.*, 2017).

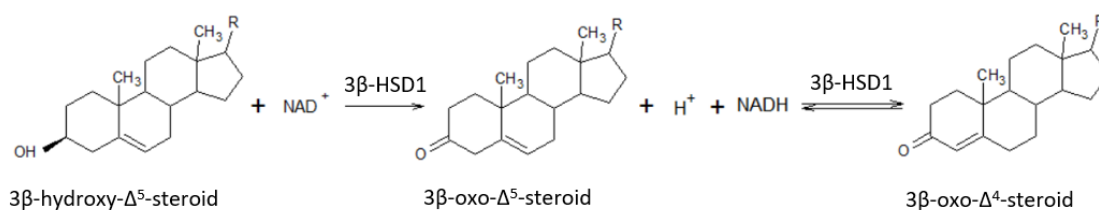
2.3.1 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy

Enzymy 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy/ Δ^5 - Δ^4 izomerázy (3 β -HSD) se podílí na tvorbě meziproductů všech steroidních hormonů. Lidskými buňkami jsou produkovány dvě izoformy: 3 β -HSD1 a 3 β -HSD2, kódované příslušnými geny (HSD3B1, HSD3B2). V periferních tkáních (prostata, kůže nebo placenta) je exprimována zejména 3 β -HSD1. V nadledvinách a varlatech se preferenčně tvoří 3 β -HSD2 (Simard *et al.*, 2005).

Hlavní funkcí enzymů 3 β -HSD je oxidace a následná izomerace Δ^5 -3 β -hydroxysteroidních prekurzorů na Δ^4 -ketosteroidy v přítomnosti NAD⁺ (Obr. 4). Ve steroidogenezi se podílejí na konverzi: pregnenolon \rightarrow progesteron, 17-OH-pregnenolon \rightarrow 17-OH-progesteron, androstenediol \rightarrow testosteron a na přeměně DHEA \rightarrow androstendion (Sharifi *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2017). Kromě účasti na tvorbě meziproductů je jejich funkce spjatá i s degradací DHT a DHEA (Mason *et al.*, 1997).

Jednou z genových variant přispívajících k progresi karcinomu prostaty, je zárodečný jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single-nucleotide polymorphism) v genu pro 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázu 1 (3 β -HSD1). Gen HSD3B1 se nachází na chromozomu

1p13.1 a skládá se ze 4 exonů (Berube *et al.*, 1989; Lachance *et al.*, 1991). Enzym katalyzuje přeměnu DHEA na AD. V pozici 1245 genu HSD3B1 byl detekován zárodečný SNP, jenž vede k jednonukleotidové záměně A za C (rs1047303). Následkem substituce dochází v samotné struktuře proteinu k nesynonymní záměně aminokyselin argininu za threonin v pozici 367 (Chang *et al.*, 2002). Protein získává odolnost vůči proteazomové degradaci a v buňkách dochází k jeho akumulaci (Hearn *et al.*, 2016). Buňky jsou díky tomu schopné produkovat více DHT z adrenálního DHEA 5- α -dion mechanismem a zajistit si tak přítomnost ligandu pro androgenní signalizaci navzdory androgenní deprivaci. Ačkoliv přítomnost variantní alely 1245C je ve většině případů podmíněna dědičným polymorfismem, záměnu bází v genu HSD3B1 mohou způsobit i mutace (Chang *et al.*, 2013). U bělochů je tento polymorfismus s přítomností další varianty rs1819698 v 3'- nepřekládané oblasti genu HSD3B2 navíc zmiňován v souvislosti se zvýšeným rizikem karcinomu prostaty (Chang *et al.*, 2002). Dalším z SNP objeveným v genu HSD3B1 je rs1856888, kdy dochází k záměně A \rightarrow G. Ve vztahu k progresi onemocnění během léčby androgen deprivací se pozitivně jeví homozygotní konstituce GG, kde průměrné přežití pacienta činí přibližně 39 měsíců (Ross *et al.*, 2008).



Obr. 4 Oxidace 3β-hydroxy- Δ^5 -steroidu na 3-oxo- Δ^5 -steroid a následná izomerizace na Δ^4 -ketosteroid katalytickou aktivitou 3β-HSD1.

2.3.2 Genové varianty ostatních steroidogenních enzymů

Genetické faktory hrají při vývoji karcinomu prostaty důležitou roli (Schaid, 2004). Zejména mutace, SNP a ostatní genové varianty jsou pro vznik nádoru klíčové, a jsou proto studovány z hlediska predikce a prognózy onemocnění. Spojitost mezi polymorfními variantami genů zapojených do syntézy a metabolismu androgenů a úspěšnosti ADT však není zcela objasněná a mnoho výsledků je zatím nereprodukovatelných (Schleutker, 2011). Kromě zárodečného polymorfismu v genu HSD3B1 se studie zaměřují i na ostatní enzymy steroidogeneze.

Z genů zapojených do syntézy testosteronu je popsán vliv některých genových variant na zvýšené riziko vzniku karcinomu prostaty např. u LH β (varianta LH β -V), u CYP11A1 (polymorfismus (tttta)_n), CYP19A1 (T201M, rs700519) nebo u CYP17A1, kde jsou polymorfismy v tomto genu (rs6163, rs743572, rs1088378, rs1004467, rs17115144) u afroameričanů asociovány s vyšším rizikem karcinomu. U většiny z těchto genů nebyl pozorován žádný vliv na účinnost ADT. Nicméně u některých je popsána spojitost s progresí onemocnění během terapie nebo naopak pozitivní vliv na dobu přežití (Schleutker, 2011).

Příkladem jsou transportní peptidy rodiny SLCO (solute carrier proteins), které umožňují endogenním sloučeninám, zahrnujícím i androgeny a meziprodukty steroidogeneze, vstup do buněk. Jejich role v progresi karcinomu spočívá pravděpodobně v rozdílných schopnostech transportu androgenů do prostatických nádorových buněk. Některé nalezené genové varianty (rs12422149, rs1789693, rs1077858) enzymu SLCO2B1 měly vliv na progresi onemocnění během ADT (Yang *et al.*, 2011; Alsinnawi *et al.*, 2019).

Jedním z dalších enzymů je HSD17B4, který se podílí na konverzi 5-androstendiolu na DHEA zejména v prostatě a prsu (Peltoketo *et al.*, 1999). V genu pro enzym se nachází polymorfismus rs7737181, kdy dochází k záměně G za C. I když se polymorfismus nachází uvnitř intronu, ve své studii Ross a kol. uvádí, že přítomnost dvou variantních alel pozitivně ovlivňuje tzv. dobu do progresu (TTP, time-to-progression) během léčby ADT (Ross *et al.*, 2008). Ve stejné práci je zmiňován i význam genových variant dalšího z enzymů steroidogenní kaskády. CYP19A1 je u mužů klíčový pro tvorbu estrogenu a estradiolu z androgenů. Nejčastěji je zmiňovaný SNP rs1870050. Příznivým genotypem pro TTP se jeví variantní homozygot AA pro rs1870050 (Ross *et al.*, 2008). V práci Lévesque a kol. je však jako příznivý genotyp uváděn CC pro rs1870050, což může poukazovat na vliv etnického původu pacientů a jejich rozdílnou odpověď na terapii (Lévesque *et al.*, 2013, Shiota *et al.*, 2019).

Podobně jako u genů zapojených do biosyntézy androgenů jsou popisovány polymorfismy v genech kódujících enzymy zapojené do jejich metabolismu. Polymorfismy u enzymů cytochromu P450, jako jsou například rs2740574 u CYP3A4, izoforma CYP3A5*1 nebo CYP3A43*3, se ukazují jako určité rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty. Podobně byla studována řada genových variant u alfa-keto-reduktáz, zejména AKR1C3 (rs41306308, rs7741, rs12529), ale stejně jako u enzymů cytochromu P450 nebyla prozatím nalezena spojitost s ADT (Schleutker, 2011).

2.4 Vliv mikroprostředí na vývoj karcinomu a odpověď na terapii

V současné době je již zřejmé, že maligní transformace a progresu tumoru nejsou výlučně regulovány změnami v onkogenech a tumor-supresorových genech neoplastických buněk. Na změnách, které mohou vést k tumorogenezi, se podílejí i jiné faktory. Příkladem mohou být modifikované interakce mezi stromální a epitelovou složkou ovlivňující tkáňovou homeostázu, dále signální molekuly nebo molekuly extracelulární matrix (Krušlin *et al.*, 2015).

Nádorové mikroprostředí (TME, tumor microenvironment) je komplexní a dynamický systém, který ovlivňuje nejen růst nádoru, ale i jeho odpověď na terapii (Wu *et al.*, 2017; Hirata *et al.*, 2017). Progresu a růst tumoru je výsledkem remodelace tkáně, která je zapříčiněna interakcí invazivních buněk nádoru se složkami mikroprostředí. TME je tvořeno především krevními a lymfatickými cévami, imunitními buňkami, endotelovými nádorovými buňkami

(TECs – tumor-associated endothelial cells), nádorově asociovanými fibroblasty (CAF, cancer-associated fibroblast) a extracelulární matrix (ECM) (Wu *et al.*, 2017).

ECM obsahuje řadu molekul s rozdílnou stavbou a funkcí (Zhan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2012). Skládá se z proteinů (zejména kolagenu) a z glykosaminoglykanů (zejména proteoglykanů) a glykoproteinů (laminin, fibronektin). Hlavní nekolagenní složku tvoří skupina malých proteoglykanů bohatých na leucin (SLRPs-small leucine rich proteoglykans) (Iozzo, 1997).

2.4.1 Malé proteoglykany bohaté na leucin (SLRPs)

Proteiny SLRPs jsou charakteristické přítomností konzervovaného proteinového jádra obsahujícího repetice leucinu (LRR; leucine-rich repeat), které interagují s kolagenovými vlákny (Hedbom *et al.*, 1993; Iozzo, 1999). Svými interakcemi s extracelulárními receptory nebo ligandy (fibronektin, kolagen, TGFβ1) regulují funkci ECM (Zhan *et al.*, 2019).

Podle aminokyselinové sekvence, struktury genu a rozmístění cysteinových reziduí na N-konci molekuly můžeme tyto proteiny dělit do 5 skupin, které v současnosti čítají 18 členů (Schaefer *et al.*, 2012). Nejčastěji studovanými zástupci jsou proteoglykany první skupiny decorin, biglykan a asporin. Všechny tyto proteiny se významně podílejí na správné funkci ECM a jsou mimo jiné důležité pro vývoj chrupavky a periodontálních ligament. Na druhé straně mohou svými interakcemi přivodit i patologické stavy a podílet se tak především na vzniku osteoartrity a některých typů nádorových onemocnění (Šimková *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2015; Satoyoshi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Rochette *et al.*, 2017).

Decorin je přirozeným inhibítozem pro receptory tyrosin-kináz, jako jsou EGFR (epidermal growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor), c-met, IGF-1R (insulin like growth factor receptor) a TLR (toll like receptor). Přispívá i k inhibici TGFβ (transforming growth factor-β) (Goldoni *et al.*, 2008). Vazbou na EGFR aktivuje MAP kinázy (mitogenně asociované protein kinázy) a následnou indukci p21 se podílí na blokaci buněčného cyklu, růstu a migraci buněk (Iozzo *et al.*, 1999). Svými funkcemi působí jako supresor angiogeneze, metastazování a proliferace (Wu *et al.*, 2017; Appunni *et al.*, 2019).

Biglykan sdílí strukturu podobnou decorinu, funkcemi se však liší. Interaguje s TLR2 a TLR4 imunitních buněk a přispívá k tvorbě zánětu zprostředkovanou NF-κB dráhou. Ačkoli mechanismy působení biglykanu nejsou příliš známé, zmíněnou NF-κB dráhou pozitivně ovlivňuje migraci rakovinných buněk. Zvýšená genová exprese biglykanu koreluje s buněčnou proliferací, migrací, metastazováním a angiogenezí (Zhan *et al.*, 2019; Appunni *et al.*, 2019).

Asporin je velmi často studován v souvislosti s osteoartritidou, chondrogenézou nebo inhibicí osifikace při cytodiferenciaci. V současnosti se objevují také práce zabývající se vztahem asporinu k různým typům nádorů, včetně karcinomu prostaty (kapitola 2.4.2.1).

2.4.2 Asporin

Jedná se o extracelulární protein objevený v roce 2001 třemi výzkumnými skupinami (Henry *et al.*, 2001; Lorenzo *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Gen pro asporin leží na chromozomu 9q22.31 a obsahuje 8 exonů (Lorenzo *et al.*, 2001). Jak již bylo zmíněno, patří do I. skupiny proteoglykanů. Svou strukturou však není typickým proteoglykanem. Na rozdíl od decorinu nebo biglykanu postrádá řetězce chondroitinu a více glykosylačních oblastí. Ve struktuře asporinu se také na rozdíl od jiných proteoglykanů nachází specifické oblasti s repeticemi kyseliny asparagové (D-repetice) na N-konci molekuly. Standardně se v molekule asporinu nachází 13 D-repetic, ale jejich počet může být variabilní, od 11 do 17 D-repetic (Lorenzo *et al.*, 2001; Kizawa *et al.*, 2005). Polymorfismus v počtu repetic kyseliny asparagové je spojován s vývojem osteoartrity (Nakajima *et al.*, 2007), hypochondrogenézí a také s karcinomem prsu (Šimková *et al.*, 2016; Maris *et al.*, 2015) nebo prostaty (Rochette *et al.*, 2017; Hurley *et al.*, 2015). Zvýšená exprese asporinu je popisována v souvislosti s karcinomem žaludku (Satoyoshi *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2015), kolorekta (Li *et al.*, 2019) a slinivky (Wang *et al.*, 2017).

2.4.2.1 Role asporinu v regulačních dráhách u různých typů malignit

Jedním z hlavních znaků nádorových onemocnění je deregulace signálních drah. Asporin působí ve třech významných řídicích systémech, které jsou spojené s proliferací, invazí a metastazováním nádorových buněk (Zhan *et al.*, 2019).

TGFβ/Smad2/3 dráha

Signální dráha TGFβ/Smad2/3 významně ovlivňuje chování nádorových buněk a může jak podporovat, tak inhibovat jejich invazi a nádorovou progresi. Asporin působí na tuto dráhu na jedné straně inhibičně, kdy svou vazbou na receptor TGFβR potlačuje signalizaci zprostředkovanou TGFβ, na druhé straně má schopnost aktivovat kinázovou dráhu přímou interakcí s proteinem Smad2/3. Oběma mechanismy se tak rozdílně podílí na regulaci invazivity nádorových buněk (Zhan *et al.*, 2019).

Maris *et al.* popisuje ve své práci dvojí roli asporinu u karcinomu prsu. Aktivační schopnost asporinu je zde uplatněna zvýšenou genovou expresí v mikroprostředí nádorových lézí. Naopak jako inhibitor růstu a metastazování asporin působí u triple-negativního karcinomu prsu *in vivo*, kde potlačením TGFβ1/Smad2 signalizace dochází k supresi epitelovo-mezenchymální tranzice a kmenovosti nádorových buněk (Maris *et al.*, 2015). Dvojí role asporinu byla popsána také u nádorů prsu různého stádia. Ve studii Šimková *et al.* byla zvýšená exprese asporinu asociována s horší prognózou u pacientů s málo diferencovaným nádorem (grade 3) bez ohledu na přítomnost estrogenového receptoru, naopak jako dobrý prognostický faktor se projevila u nádorů diferencovaných (grade 1 a 2) (Šimková *et al.*, 2016). Význam asporinu v TGFβ1

signální dráze byl popsán i u karcinomu kolorekta, kde je jeho zvýšená exprese asociována se špatnou prognózou (Li *et al.*, 2019).

EGFR dráha

Epidermální růstový faktor a jeho receptor mají důležitou roli ve správném růstu, diferenciaci a proliferaci buněk (Barnard *et al.*, 1995). Obecně je pozměněná aktivace nebo zvýšená exprese receptoru úzce spojena s tumorogenezí (Nicholson *et al.*, 2001; Yarden *et Pines*, 2012). Vazbou epidermálního růstového faktoru na receptor je spuštěna signalizační kaskáda, do které jsou zapojeny PI3K, Src a Ras dráhy regulující buněčnou proliferaci. Role asporinu spočívá zejména v pozitivní regulaci jednotlivých aktivačních molekul těchto drah (Zhan *et al.*, 2019).

Význam asporinu a jeho vlivu na EGFR dráhu je popisován u karcinomu žaludku. Zde regulací EGFR signální dráhy přispívá k růstu a metastazování (Ding *et al.*, 2015). Svoji promotorovou funkci uplatňuje degradací tumor-supresorových faktorů (PTEN, DUSP7). Potlačení jejich hladiny je umožněna aktivace intracelulárních drah MAP/ERK, PI3K/AKT a p38/MAPK, které indukují buněčnou proliferaci (Zhan *et al.*, 2019). U karcinomu kolorekta asporin indukuje angiogenezi zvýšenou expresí VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor) a kromě toho usnadňuje buněčnou migraci aktivací EGFR/Src/Cortactin dráhy (Zhan *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2016).

CD44 dráha

CD44 je transmembránový glykoprotein, mezi jehož ligandy patří kyselina hyaluronová, osteopontin, kolagen nebo metaloproteinázy (Senbanjo *et Chellaiah*, 2017; Ponta *et al.*, 2003). Vazba ligandu vyvolává intracelulární konformační změny, které následně vedou k aktivaci dalších signálních drah (MAPK, AKT, STAT3, β -catenin, TGF β). CD44 je jejich prostřednictvím zapojen do regulace nádorové progresy, metastazování a angiogeneze a je spojován s nádory slinivky, kolorekta, prostaty nebo gastrointestinálního traktu (Chen *et al.*, 2018; Zhan *et al.*, 2019).

Asporin působí zejména jako ligand samotného CD44 nebo podporuje zapojené intracelulární dráhy (Ras, PI3K), které aktivují epitelovo-mezenchymální tranzici a následnou migraci buněk (Zhan *et al.*, 2019). Vysoká exprese asporinu byla nalezena v CAF karcinomu žaludku (Satoyoshi *et al.*, 2015) a také v aktivovaných PSC (pancreatic stellate cell) (Wang *et al.*, 2017).

2.4.2.2 Polymorfismus v počtu D-repetic asporinu a jejich vliv na patogenezi

Polymorfismus v počtu D-repetic asporinu je spojován se vznikem osteoartritidy, kdy nastává nerovnováha mezi degradací a tvorbou ECM v chrupavce (Grimaud *et al.*, 2002). Přítomnost alely D14 u asporinu způsobuje po vazbě blokaci TGF β receptoru a následnou inhibici TGF β /Smad

signalizace. Dochází ke snížení exprese kolagenu II a agrekanu zajišťujících správný vývoj chrupavek (Kizawa *et al.*, 2005). Nakajima *et al.* ve své práci z roku 2007 uvádí, že TGFβ1 nepřímo indukuje expresi asporinu prostřednictvím Smad signalizace a vytváří tak zpětnovazebnou smyčku udržující rovnováhu v kloubní chrupavce (Nakajima *et al.*, 2007).

Exprese asporinu souvisí s procesy cytodiferenciace a mineralizace buněk periodontálních ligament, jejichž regulace je zajišťována přímou interakcí asporinu s proteinem BMP2 (bone morphogenic protein 2) (Yamada *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2007). Kajikawa ve své práci také potvrzuje rozdílný účinek v inhibici cytodiferenciace vyvolané BMP2 v závislosti na počtu D-repetic v molekule asporinu. V buňkách exprimujících D14 alelu byla cytodiferenciace inhibována výrazněji oproti buňkám se standardní D13 alelou (Kajikawa *et al.*, 2014). Funkční rozdíly mezi molekulami s rozdílným počtem D-repetic však nejsou zatím zcela objasněny. Lze předpokládat, že tento polymorfismus může ovlivnit konformační změny proteinu, a tím i procesy spojené s BMP2, TGFβ1 a mineralizací kolagenu (Zhan *et al.*, 2019).

Funkce asporinu a jeho vliv na prognózu u karcinomů prsu byl již popsán výše. Duální role asporinu u těchto nádorů může souviset, podobně jako u karcinomu prostaty, s počtem repetitiv kyseliny asparagové. Přítomnost alespoň jedné alely D14 je asociována se špatným vývojem onemocnění (Šimková *et al.*, 2016).

Role asporinu u urologických malignit byla zkoumána především u karcinomu prostaty. Je exprimován zejména v tzv. prostatických nádorově-asociovaných fibroblastech (PCAF; prostate cancer-associated fibroblasts), které se podílejí na regulaci tumorogeneze (Orr *et al.*, 2012). Zvýšené množství v krvi bylo zjištěno u mužů s pokročilým karcinomem prostaty (Klee *et al.*, 2012). Zvýšená exprese korelovala s biochemickou progresí a vyšším Gleasonovým skóre (Rochette *et al.*, 2017). Ve studii Hurley a kol. (2015) byl zkoumán vliv zárodečného polymorfismu v počtu D-repetic v molekule asporinu na progresi karcinomu prostaty. Ačkoliv se počet repetitiv a kombinace variantních alel u jedinců liší, přítomnost jedné nebo více D14 alel je spojována s progresí karcinomu prostaty a vývojem metastáz. U homozygotního genotypu pro alelu D13 (ASPN D13/13) je riziko vývoje metastáz významně sníženo (Hurely *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Automatické pipety (Eppendorf)
- Elektroforetický systém Mini PROTEAN® TetraCell (BioRad)
- Elektroforetický systém Owl™ EasyCast™ B1A Mini (ThermoFisher Scientific)
- Elektroforetický zdroj MP – 300 V (Majorscience)
- Chemické sklo
- Laboratorní váhy Kern 440.33 (KERN & SON GmbH)
- LightCycler® 480 (Roche)
- Magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph Instruments)
- Mikrovlnná trouba (Gorenje)
- Minicentrifuga EPP Minispín (plus) (Eppendorf)
- Minicentrifuga s nástavcem pro PCR stripy (Labnet)
- sekvenátor ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Termoblok TS-100C (Biosan)
- Termocycler Mastercycler® Gradient (Eppendorf)
- Termocycler Mastercycler® pro S thermal cycler (Eppendorf)
- UV transiluminator G:Box (Syngene)
- Vortex (IKA)

3.1.2 Spotřební materiál

- Mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf)
- PCR Mikrozkušavky 0,2 ml (Eppendorf)
- Parafilm (Pechinery Plastic Packaging)
- PCR 8 zkušavkové stripy (BIO plastics)
- Špičky s filtrem (Eppendorf)

3.1.3 Použité chemikálie a roztoky

- 30% Akrylamid/Bisakrylamid, 29:1 (Serva)
- 10% peroxodisíran amonný (PERS) (Serva)
- 99,5% ethanol (FAGRON)

- 10× Genetic Analyzer Buffer (Applied Biosystems)
- 50× TAE pufr (2M Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 1M ledová kyselina octová (CH_3COOH), 50mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 8,5)
- 5× TBE pufr (445 mM Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 445 mM kyselina boritá (H_3BO_3), 10 mM EDTA, pH 8,2-8,4)
- Agaróza (Serva)
- Barvicí roztok (45 ml ddH₂O, 5 ml 1M NaCl₂, 15 µl GelRed [10 000× zásobní roztok])
- Deionizovaná H₂O
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000× (Biotium)
- Gene Scan™ 500 LIZ® hmotnostní standard (Applied Biosystems)
- Hi-Di formamid (Applied Biosystems)
- Matrix standard dye set G5 (Applied Biosystems)
- N, N, N', N' tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Náhodné hexamery N6, 10 µM (Generi Biotech)
- Nanášecí pufr pro DNA (40% sacharóza; 0,1M EDTA, 0,25% bromfenolová modř)
- POP-4 polymer (Applied Biosystems)
- Protector RNase inhibitor (Roche)
- Směs deoxyribonukleotidů (dNTP, Top-Bio)
- Standard molekulové hmotnosti 50 bp DNA Ladder (NORGEN Biotek corporation)
- Standard molekulové hmotnosti HyperLadder 25 bp (Bioline)

3.1.4 Použité kity

- ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems™) (kit obsahuje sekvenační master mix, sekvenační pufr)
- BigDye XTerminator purification kit (Applied Biosystems™) (kit obsahuje roztok BigDye XTerminator™, SAM™ roztok)
- DNase I Amp Grade (Invitrogen) (kit obsahuje enzym DNase I Amp Grade, 10× DNase reakční pufr, 25mM EDTA pH 8.0)
- Exgene Clinic SV mini Kit (GeneAll) (kit obsahuje kolonky typu G, sběrné zkumavky, lyzační pufr CL a BL, promývací pufr BW a TW, eluční pufr AE, proteinázu K, pufr pro přípravu proteinázy)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN) (kit obsahuje 2× koncentrovaný HotStarTaq Master Mix, 10× primer mix, PCR vodu)
- LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche) (kit obsahuje 2× koncentrovaný Master Mix, 25mM MgCl₂, PCR vodu)

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) (kit obsahuje QIAamp Mini spin kolonky, proteinázu K, lyzační AL pufr, promývací AW1 a AW2 pufr, eluční AE pufr, sběrné zkumavky)
- QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) (kit obsahuje QIAquick kolonky, pufr PB, promývací pufr PE, eluční pufr EB)
- SuperScript™ III Reverse Transkriptase (Invitrogen) (kit obsahuje enzym SuperScript™ III [200 U/μl], 5× first strand pufr [250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂], 0,1M DTT)

3.1.5 Primery a próby

Pro detekci polymorfismu v genu HSD3B1 byly použity primery a próba od firmy EXIQON. Primery pro asporin byly dodány firmou Generi Biotech.

Tab. 1 Přehled používaných primerů a prób.

Primer/Próba	Sekvence
Primer forward HSD3B1_Fw	5'-GTCAAATAGCGTATTCACCTTCTCTTAT-3'
Primer reverse HSD3B1_Rv	5'-GAGGGTGGAGCTTGATGACATCT-3'
Próba 3P HSD3B1_3P_LNA	5'-GGAGA <u>A</u> CCTGAAGTCCAAGACTCAGTGATTTAAGG-P-3'
Primer forward ASPN_5FAM_Fw	5'-ATTCTGGCTTTGTGCTCTG-3'
Primer reverse ASPN_Rv	5'-TGGCTTCTTGGCTCTCTTGT-3'

Podtržená a zvýrazněná báze značí místo záměny nukleotidu A→C.

3.1.6 Biologický materiál

Buněčná linie LNCaP odvozená od karcinomu prostaty používaná v experimentech byla zakoupena z American Type Culture Collection (ATCC), linie LAPC4 byla získána od Mgr. Karla Součka, Ph.D (Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno).

Soubor 424 vzorků vyizolované DNA, u kterého byl sledován polymorfismus v genu HSD3B1, byl získán pomocí izolačního kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) postupem uvedeným výrobcem. Izolace byla prováděna paní Mgr. Holinkovou z plné krve pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty, kteří podepsali informovaný souhlas. Z tohoto souboru bylo pro analýzu použito 422 vzorků a úspěšně genotypováno 418.

Soubor 98 vzorků vyizolované DNA, u kterého byl stanovován počet D-repetic asporinu (Tab. 2), byl získán pomocí izolačního kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) a Exgene

Clinic SV mini Kit (GeneAll) podle návodu výrobce. Vstupním materiálem pro izolaci byla plná krev pacientů s pokročilým karcinomem prostaty léčených na onkologické klinice v FN Olomouc v období od září roku 2002 do konce roku 2019, kteří podepsali informovaný souhlas. Izolace byla provedena paní Mgr. Janou Knillovou, Ph.D. Pozitivní kontrola BCA4 pro stanovení D-repetic asporinu byla získána reverzní transkripcí podle postupu uvedeném v kapitole 3.2.8. Vstupním materiálem byla mRNA z fibroblastů prsu, která byla poskytnuta Mgr. Danou Šimkovou, Ph.D.

Tab. 2 Klinicko-patologické charakteristiky souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.

Charakteristika	Hodnota	Počet pacientů	[%]
Věk v čase diagnózy [roky]		n = 98	
Průměr	66		
Rozmezí	50-83		
PSA v době diagnózy [ng/ml]		n = 98	
Průměr	352,7		
Rozmezí	4,7-5229		
Gleasonovo skóre		n = 94	
≤ 6		12	12,8
7 (4+3)		12	12,8
7 (3+4)		19	20,2
8		17	18,1
9-10		34	36,2
Metastázy v době diagnózy		n = 98	
Ne		54	55,1
Ano		44	44,9
Doba od diagnózy do ADT [roky]		n = 98	
Průměr	1,35		
Rozmezí	0,00-10,59		
Doba od kastrace do rozvoje CRPC [dny]		n = 98	
Průměr	1111,2		
Rozmezí	10-6048		
Terapie cílená na androgenový receptor		n = 85	
Enzalutamid		40	47,1
Abirateron acetát		45	52,9
Typ ADT		n = 98	
LHRH analoga		49	48,1
Orchiektomie		24	23,5
LHRH analoga + orchiektomie		25	24,5
Genotyp HSD3B1 (rs1047303)		n = 98	
1245A/A		42	42,9
1245A/C		49	50,0
1245C/C		7	7,1
Alelová frekvence 1245C		63	32,1
Alelová frekvence 1245A		133	67,9

3.2 Metody

3.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna s použitím izolačních kitů QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) a Exgene Clinic SV mini Kit (GeneAll). Byl dodržován postup předepsaný výrobcem těchto kitů.

3.2.2 Obecná pravidla pro přípravu PCR

Polymerázové řetězové reakce (PCR) byly připravovány v čistém prostředí PCR laboratoře (dekontaminace prostředí germicidním UV zářičem, dekontaminace ploch (ethanol, SAVO)) a při práci byly používány ochranné latexové rukavice. Při práci se všemi reagensy a produkty PCR byly používány špičky s filtrem. Zmrazené reagensy byly před použitím rozmrazeny, promíchány (vortex) a stočeny. V případě, že směsi obsahovaly fluorochromy, bylo omezeno přímé osvětlení.

3.2.3 Asymetrická real-time PCR

Asymetrická PCR je modifikací běžné PCR a umožňuje preferenční syntézu jednoho vlákna z duplexu DNA díky zvýšené koncentraci jednoho z použitých primerů. Reakce byly připravovány kitem LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche).

Pracovní postup pro přípravu PCR

- Podle Tab. 3 byl nejprve připraven pre-mix, jehož objem odpovídal počtu zpracovávaných vzorků.
- Do jednotlivých jamek PCR stripů bylo napipetováno 15 µl připraveného pre-mixu.
- DNA byla naředěna elučním pufrem na koncentraci 20 ng/µl.
- Do jednotlivých jamek s pre-mixem bylo přidáno 5 µl naředěné DNA.
- Pro negativní kontrolu bylo pipetováno 5 µl PCR vody místo naředěné DNA.
- Jako pozitivní kontroly byly použity DNA buněčných linií (LNCaP, LAPC-4 a jejich směs 1:1).
- Stripy byly uzavřeny a zcentrifugovány.
- S pomocí adaptéru byly stripy umístěny do LightCycler® 480 a spuštěn příslušný program dle Tab. 4.
- Po skončení programu byla provedena analýza dat a výsledky vyexportovány v textové a grafické podobě.

Tab. 3 Složky qPCR reakční směsi.

Složky PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
Master mix 2x konc.	10,0
Primer HSD3B1_Fw [10 μM]	0,1
Primer HSD3B1_Rv [10 μM]	1,0
próba HSD3B1_LNA_probe [10 μM]	1,0
MgCl ₂ [25 mM]	2,4
DNA	5,0
PCR voda	0,5
Celkový objem	20,0

Tab. 4 Podmínky pro qPCR a analýzu křivek tání.

Program	Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	Preinkubace	95	10 min	1
	Denaturace	95	30 s	
	Annealing	66	30 s	55
	Extenze	72	30 s	
2		95	60 s	1
	Křivka tání	40	60 s	1
		60-95	1 s	1
	Chlazení	40	-	1

3.2.4 Kontrola produktů PCR reakce pomocí gelové elektroforézy

Elektroforetická separace PCR produktů byla použita k ověření specificity amplifikace a odhalení případné kontaminace.

Pracovní postup polyakrylamidové elektroforézy

- Nejprve byla sestavena elektroforetická aparatura s využitím skel pro tloušťku gelu 1,5 mm, počet jamek byl zvolen s ohledem na počet zpracovávaných vzorků.
- Byl připraven 6% polyakrylamidový gel smícháním jednotlivých reagensů v uvedeném pořadí: 22,96 ml deionizované H₂O, 7 ml 30% směsi Arylamid/Bisakrylamid, 3,5 ml 5x TBE pufru, 400 μl 10% PERS a 22,5 μl TEMED.
- Směs byla důkladně promíchána s využitím elektromagnetické míchačky, napipetována mezi sestavená skla a byl vložen hřebínek.
- Po ztuhnutí gelu (45 minut) byly vytaženy hřebínky, skla byla umístěna do elektroforetické komory a zalita 700 ml 0,5x TBE pufru.
- Smícháním 10 μl PCR produktu a 1 μl nanášecího pufru byly vzorky připraveny pro nanesení na gel a napipetovány do jednotlivých jamek (10 μl směsi/jamka).

- Pro určení molekulové hmotnosti produktů byl na gel nanesen standard molekulové hmotnosti HyperLadder 25 bp (3 µl/jamka).
- Elektroforetická separace probíhala při 100 V 60 minut.
- Po ukončení separace byl gel vložen na 45 minut do barvicího roztoku GelRed s následným oplachem v deionizované H₂O.
- Vizualizace separovaných PCR produktů byla provedena pomocí UV transilluminátoru G:Box.

Pracovní postup agarózové elektroforézy

- Nejprve byla sestavena elektroforetická aparatura pro agarózovou elektroforézu, velikost gelu a počet jamek byl zvolen s ohledem na počet analyzovaných vzorků.
- Pro přípravu 40 ml 2% agarózového gelu bylo do Erlenmayerovy baňky naváženo 0,8 g agarózy a přidáno 40 ml deionizované vody.
- Agaróza byla rozpuštěna povařením v mikrovlnné troubě (600 W, přibližně 1,5 minuty) a průběžně promíchávána.
- Po ochlazení bylo k rozpuštěné agaróze přidáno 800 µl 50x TAE pufru a 2 µl barviva GelRed™. Gel byl promíchán a nalit do elektroforetické vaničky.
- Po ztuhnutí gelu (přibližně 45 minut) byla vanička s gelem zasazena do elektroforetické komory a zalita 500 ml 1×TAE pufru.
- Vzorky pro separaci byly připraveny smícháním 10 µl PCR produktu s 1 µl nanášecího pufru a do jamky bylo nanášeno 10 µl takto připraveného vzorku.
- Pro určení molekulové hmotnosti byl na gel nanesen standard molekulové hmotnosti HyperLadder 25 bp (3 µl/jamka) a DNA Ladder 50 bp (10 µl/jamka).
- Elektroforetická separace probíhala 90 minut při 90 V a vizualizace separovaných PCR produktů byla provedena pomocí UV transilluminátoru G:Box.

3.2.5 High resolution melting (HRM)

Samotné HRM analýze studovaného SNP předcházela asymetrická qPCR v přítomnosti saturační fluorescenční barvy s použitím neznačené LNA oligonukleotidové próby blokována na 3' konci fosforylací. Analyzovány byly fluorescenční křivky tání duplexů amplikon-próba pomocí software přístroje LightCycler® 480 (Roche) analýzami T_m Calling a Gene Scanning.

Postup analýzy T_m calling:

- Nejprve byl vybrán druh analýzy Analysis – T_m Calling.
- Při otevření okna Create new analysis byl zvolen příslušný analyzovaný soubor.
- Dále byl nastaven počet hodnocených teplotních píků – Max Peaks (6 or less) a z nabídky vybrán SYBR green format.

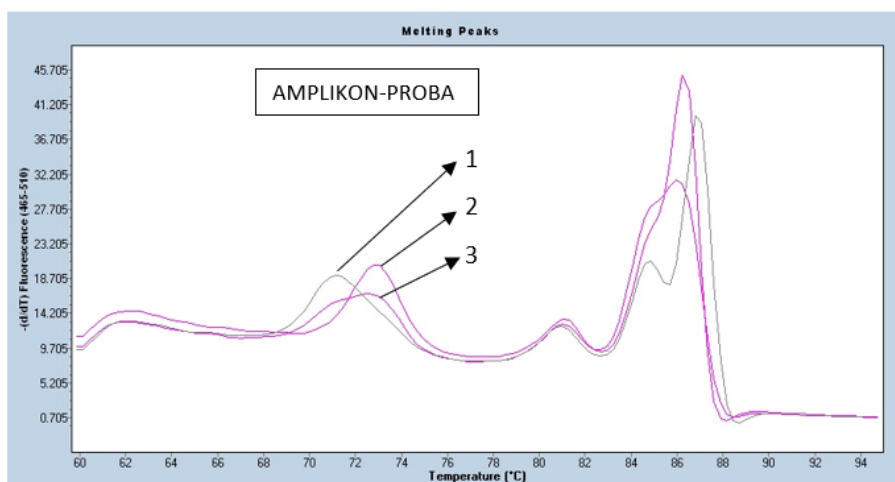
- Analýza byla spuštěna příkazem Calculate.

Postup analýzy Gene Scanning:

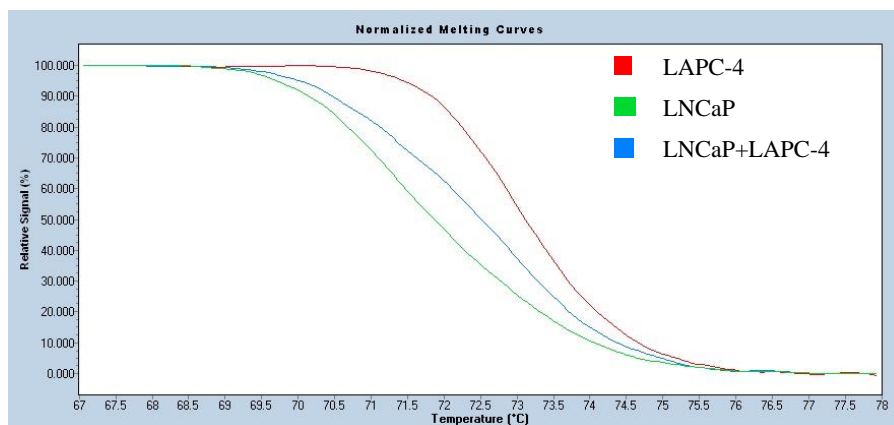
- Nejprve byl vybrán druh analýzy Analysis – Gene Scanning.
- Při otevření okna Create new analysis byl zvolen příslušný analyzovaný soubor.
- Pomocí funkce New Call – Positive byly vybrány analyzované pozitivní vzorky.
- Analýza byla spuštěna příkazem Calculate.
- V záložce Normalization bylo nastaveno teplotní rozmezí Pre-melt slider setting 66-68 °C a Post-melt slider setting 76-78 °C.
- Funkcí Calculate byl spuštěn výpočet.

Vyhodnocení Tm Calling a Gene Scanning analýzy pro HSD3B1

- Nejprve byly porovnány teploty tání a tvar křivky tání analyzovaného vzorku s kontrolními vzorky (Tm calling analýza) (Obr. 5). Teplota tání duplexu amplikon-próba pro wild-type homozygotní genotyp 1245A/A (linie LAPC-4) je ~ 73 °C, pro variantní homozygotní genotyp 1245C/C (linie LNCaP) ~ 71,5 °C. Kontrolní vzorek pro heterozygotní genotyp 1245A/C byl připraven kombinací DNA buněčných linií LNCaP a LAPC-4 v poměru 1:1. Křivka tání představuje dvojitý široký pík s teplotními maximy v rozmezí 71,5°C - 73°C.
- Výsledek Tm Calling analýzy byl porovnán s výsledky Gene Scanning analýzy (Obr. 6).



Obr. 5 Vyhodnocení křivek tání kontrolních buněčných linií při genotypizaci HSD3B1- Tm Calling analýza. 1 -LNCaP (1245C/C); 2 – LAPC-4 (1245A/A); 3 – LNCaP+LAPC4 (1245A/C).



Obr. 6 Vyhodnocení křivek tání kontrolních buněčných linií při genotypizaci HSD3B1 - Gene Scanning analýza. Červená křivka zobrazuje homozygotní wild-type variantu 1245A/A (LAPC-4), zelená křivka znázorňuje variantní homozygotní genotyp 1245C/C (LNCaP) a modrá křivka představuje heterozygotní genotyp 1245A/C (LNCaP+LAPC-4).

3.2.6 Sangerovo sekvenování

Pracovní postup pro sekvenování

Prvním krokem je amplifikace úseku vymezeného primery pomocí PCR. V případě sekvenování pro potvrzení genotypu HSD3B1 byla použita asymetrická PCR (viz kapitola 3.2.3). V reakční směsi byla v tomto případě vynechána próba a její objem byl nahrazen PCR vodou (viz Tab. 2). Amplifikace probíhala podle programu 1 uvedeného v Tab. 3. Specifita amplifikace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy (viz kapitola 3.2.4). Následující postup (přečištění produktů PCR, sekvenační PCR, přečištění produktů sekvenační PCR, samotné sekvenování) je dále popsán.

3.2.6.1 Přečištění produktů

K přečištění produktů asymetrické PCR a odstranění nezreagovaných složek reakční směsi byl použit QIAquick PCR Purification kit.

Pracovní postup přečištění

- Ke 20 μ l PCR produktu v mikrozkuhavce bylo přidáno 100 μ l PB pufru, směs byla řádně propipetována a následně byl celý objem přenesen na QIAquick kolonku umístěnou ve sběrné zkuhavce.
- Následovala centrifugace (13 000 rpm, 1 min).
- Supernatant byl odstraněn a kolonka se zachyceným produktem byla vložena do sběrné zkuhavky.
- Po promytí navázané DNA bylo na kolonku naneseno 750 μ l PE pufru a následovala centrifugace (13 000 rpm, 1 minuta).

- Supernatant byl odstraněn a kolonka byla opět vložena do sběrné zkumavky.
- Pro úplné odstranění zbytků etanolu z PE pufru byla opět provedena centrifugace (13 000 rpm, 1 min) a poté byla kolonka umístěna do čisté mikrozukavky.
- Na střed membrány kolonky bylo dále napipetováno 40 µl elučního pufru (EB pufr).
- Po inkubaci (1 min) následovala centrifugace (13 000 rpm, 1 minuta) a přečištěné produkty byly uchovány při - 20°C.

3.2.6.2 Sekvenační PCR

Pro sekvenační PCR (amplifikace jednotlivých řetězců s použitím jednoho specifického primeru) byl využit ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit. Sekvenování probíhalo v obou směrech (Fw, Rv), proto byly pro každý vzorek připraveny dvě sekvenační PCR.

Pracovní postup sekvenační PCR

- Podle Tab. 5 byl připraven pre-mix pro jednotlivé řetězce.
- Do označených mikrozukavek bylo rozpipetováno 8,8 µl pre-mixu, do každé mikrozukavky byl přidán 1 µl příslušného primeru a následně 0,2 µl přečištěného PCR produktu.
- Mikrozukavky byly uzavřeny, stočeny a vloženy do termocycleru.
- Sekvenační PCR probíhala za podmínek uvedených v Tab. 6.

Tab. 5 Složky sekvenační PCR pro forward/reverse řetězec.

Složky reakční směsi	Objem složky pro 1 reakci [µl]
Sekvenační pufr	1,0
Sekvenační master mix	2,0
PCR voda	5,8
Primer HSD3B1_Fw [10 µM] (nebo HSD3B1_Rv [10 µM] pro druhý řetězec)	1,0
PCR produkt	0,2
Celkem	10,0

Tab. 6 Reakční podmínky sekvenační PCR reakce.

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 s	
Annealing	53	15 s	28
Extenze	60	4 min	
Chlazení	4	-	1

3.2.6.3 Přečištění produktů sekvenační PCR reakce

Pro přečištění produktů sekvenační PCR byl použit BigDye XTerminator™ Purification Kit.

Pracovní postup purifikace

- K 10 µl produktu sekvenační PCR reakce bylo přidáno 45 µl SAM roztoku.
- Špičkou s širším otvorem bylo přidáno 10 µl BigDye XTerminator roztoku (roztok byl před každým pipetováním řádně promíchán na vortexu).
- Mikrozkušavky byly pečlivě uzavřeny, umístěny do nástavce vortexu a přikryty alobalem.
- Následovalo intenzivní promíchávání po dobu 50 minut.
- Přečištěné produkty byly důkladně stočeny.
- Dle připraveného rozpisu bylo do sekvenačního platička napipetováno 20 µl supernatantu a platičko bylo uzavřeno silikonovou zátkou.

3.2.6.4 Sekvenování

- Připravené produkty byly sekvenovány na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc.
- Data z analýzy byly získány ve formátu .abl a vyhodnoceny softwarem Sequencing Analysis v5.4.

3.2.7 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza umožňuje stanovit délku fluorescenčně značených DNA fragmentů. Stanovení probíhá na kapilární elektroforéze za denaturačních podmínek. Velikost fragmentů lze určit pomocí fluorescenčně značeného hmotnostního standardu separovaného současně s analyzovanými vzorky. Samotné analýze předcházela PCR, pro kterou byl použit HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN). Fragmentační analýza probíhala na sekvenátoru ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems na Hematoonkologické klinice (HOK) Fakultní nemocnice v Olomouci.

Pracovní postup přípravy PCR pro fragmentační analýzu

- Nejprve byl připraven pre-mix dle Tab. 7, jehož množství odpovídalo počtu zpracovávaných vzorků.
- Pre-mix byl rozpipetován po 19 µl do jednotlivých jamek PCR stripu.
- Do každé jamky byl napipetován 1 µl DNA o koncentraci 60 ng/µl a strip byl řádně uzavřen.
- Výsledná směs byla důkladně promíchána, stočena a vložena do termocycleru.

- Byl spuštěn příslušný program dle Tab. 8.

Pracovní postup fragmentační analýzy

- Byla připravena směs 1000 μl HiDi formamidu a 9 μl LIZ hmotnostního standardu a rozpipetována po 14,75 μl do jamek sekvenačního platíčka.
- Produkty PCR byly naředěny PCR vodou v poměru 1:7.
- Do jednotlivých jamek bylo ke směsi HiDi formamidu s LIZ přidáno 0,75 μl naředěných PCR produktů.
- Platíčko bylo přikryto silikonovou zátkou a centrifugováno (1 min, 800 rpm).
- Následovala denaturace PCR produktů (3 min, 95 °C) umístěním platíčka do termocycleru.
- Po denuraci bylo platíčko rychle zchlazeno na ledu (3 min).
- Připravené denaturované produkty byly analyzovány fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
- Data z analýzy byly získány ve formátu .fsa a vyhodnoceny online softwarem MSA Thermo Fisher Scientific.

Tab. 7 Složky PCR pro fragmentační analýzu.

Složky PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
HotStarTaq Master Mix Kit 2x konc.	10,0
Primer ASPN_Rv [10 μM]	0,25
Primer ASPN_5FAM_Fw [10 μM]	0,25
DNA [60 ng/ μl]	1,0
PCR voda	8,5
Celkový objem	20,0

Tab. 8 Reakční podmínky PCR pro fragmentační analýzu.

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	15 min	1
Denaturace	95	30 s	
Annealing	60	30 s	34
Extenze	72	1 min	
Konečná elongace	72	10 min	1

3.2.8 Reverzní transkripce

Pro přípravu cDNA reverzní transkripcí byl použit DNase I Amp Grade kit (Invitrogen) a SuperScript III kit (Invitrogen). Nejprve byla provedena degradace reziduální DNA a následně samotná reverzní transkripce.

Pracovní postup pro degradaci reziduální DNA

- Podle Tab. 9 byla připravena reakční směs se vzorkem RNA a byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě.
- Následovala inaktivace enzymu DNase I, Amp Grade přidavkem 1 μ l 25mM EDTA, mikrozkušavka byla uzavřena a stočena.
- Směs v mikrozkušavce byla zahřívána v termocycleru 10 minut při 65 °C.

Tab. 9 Složky reakční směsi pro degradaci reziduální DNA.

Složky reakce	Objem složky pro 1 reakci [μ l]
PCR voda	6,5
10X DNase I reakční pufr	1,0
DNase I, Amp Grade [1 U/ μ l]	1,0
RNA (100 ng)	1,5
Celkový objem	10,0

Pracovní postup pro reverzní transkripci

- Ke směsi byl přidán 1 μ l náhodných primerů [10 μ M] a 1 μ L deoxyribonukleotidů [10 μ M].
- Následovalo zahřátí na 65 °C po dobu 5 minut v termocycleru a po zahřátí byl vzorek rychle ochlazen na ledu po dobu minimálně 1 minuty.
- V další mikrozkušavce byla připravena směs podle Tab. 10 a 7 μ l této směsi bylo přidáno do mikrozkušavky se vzorkem.
- Po uzavření a stočení mikrozkušavky následovala samotná reverzní transkripce v termocycleru při podmínkách uvedených v Tab. 11.
- Připravená cDNA byla uchována při -20 °C.

Tab. 10 Složky reakční směsi pro reverzní transkripci.

Složky reakce	Objem složky pro 1 reakci [μl]
5x first strand buffer	4,0
DTT [0,1 M]	1,0
Protector Rnase inhibitor [40 U/ μ l]	1,0
SuperScript III Reverse transcriptase [200 U/ μ l]	1,0
Celkový objem	7,0

Tab.11 Reakční podmínky pro reverzní transkripci.

Fáze	Teplota [$^{\circ}$C]	Čas [min]
Inkubace	25	5
	50	60
Inaktivace	70	15

3.2.9 Statistická analýza

Získaná data byla statisticky analyzována v programu Statistica 13.5 (StatSoft) Byl použit neparametrický Mann-Whitney U test, Pearsonův chí-kvadrát test a Kaplan-Meierův odhad funkce přežití. Testy byly vyhodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (p-hodnota). Trend k asociaci představovala p-hodnota 0,05 - 0,10, slabý trend potom p-hodnota 0,10 – 0,15.

3.3. Výsledky

3.3.1 Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím HRM analýzy pro soubor pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty

V první fázi bylo analyzováno 422 vzorků DNA izolovaných z krve pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty. Tento soubor byl retrospektivně analyzován s ohledem na polymorfismy jiných genů studovaných v předchozích pracích Kučerová *et al.* (2015) a Kurfurstová *et al.* (2016). Cílem bylo určit zastoupení jednotlivých variant genu HSD3B1 (1245A/A, 1245A/C, 1245C/C). Genotyp byl spolehlivě určen u 418 vzorků DNA a zastoupení jednotlivých variant činilo 46,17 % (1245A/A, wild-type homozygot), 43,06 % (1245A/C, heterozygot) a 10,77 % (1245C/C, variantní homozygot) (Tab. 12). Čtyři vzorky ze studovaného souboru nebylo možné vyšetřit z důvodu špatné kvality DNA. Celková frekvence variantní alely 1245C v daném souboru činila 32,3 %.

Tab. 12 Zastoupení jednotlivých genotypů HSD3B1 v souboru 418 analyzovaných vzorků.

Genotyp	1245A/A (wild-type homozygot)	1245A/C (heterozygot)	1245C/C (variantní homozygot)
Počet vzorků	193	180	45
Zastoupení	46,17 %	43,06 %	10,77 %

Z informací o vstupní diagnóze a genotypu HSD3B1 u pacientů studovaného souboru bylo určeno i zastoupení jednotlivých genotypů ve skupině nemocných s benigní hyperplazií prostaty (BHP) a s karcinomem prostaty (KP).

Informace o diagnóze byla dostupná u 373 pacientů. Z tohoto počtu mělo 205 pacientů BHP a genotyp byl stanoven u 204 z nich. Zastoupení jednotlivých genotypů činilo 48,53 % (1245A/A, wild-type homozygot), 42,16 % (1245A/C, heterozygot) a 9,31 % (1245C/C, variantní homozygot) (Tab. 13). Variantní alela 1245C byla v této skupině zastoupena 30,4 %.

Z celkového počtu 168 nemocných s karcinomem prostaty byl určen genotyp u 166 pacientů. Zastoupení wild-type homozygotů (1245A/A) bylo v této skupině pacientů 45,78 %, pro heterozygota (1245A/C) činilo 40,36 % a variantních homozygotů (1245C/C) bylo 13,86 % (Tab. 13). Variantní alela 1245C byla zastoupena 34,04 %.

Tab. 13 Zastoupení jednotlivých genotypů ve skupině pacientů s benigní hyperplazií (BHP) a ve skupině pacientů s karcinomem prostaty (KP).

Genotyp	Dg	1245A/A	1245A/C	1245C/C
		(wild-type homozygot)	(heterozygot)	(variantní homozygot)
Počet vzorků	BHP	99	86	19
Zastoupení		48,53 %	42,16 %	9,31 %
Počet vzorků	KP	76	67	23
Zastoupení		45,78 %	40,36 %	13,86 %

3.3.2 Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím HRM analýzy pro soubor pacientů s pokročilým karcinomem prostaty

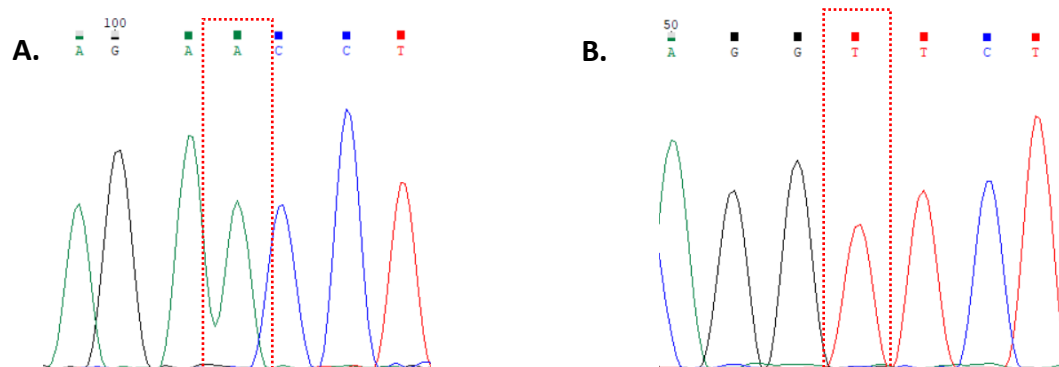
U prospektivního souboru 98 pacientů s pokročilým karcinomem prostaty byla z poskytnutých klinických dat určena frekvence variantní alely 1245C a zastoupení jednotlivých genotypů (Tab. 2). Zastoupení jednotlivých variant činilo 42,9 % pro wild-type homozygoty (1245A/A), 50 % pro heterozygoty (1245A/C) a 7,1 % pro variantní homozygoty (1245C/C) (Tab.14). Celková frekvence variantní alely 1245C v tomto souboru byla 32,1 %.

Tab. 14 Zastoupení jednotlivých genotypů HSD3B1 v prospektivním souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.

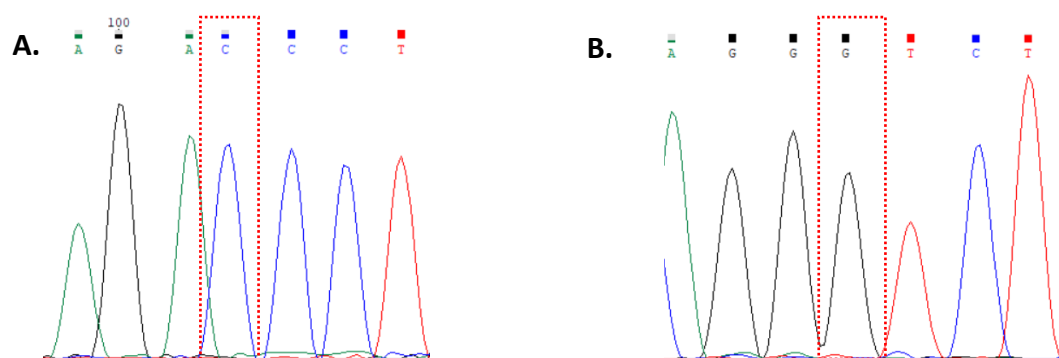
Genotyp	1245A/A	1245A/C	1245C/C
	(wild-type homozygot)	(heterozygot)	(variantní homozygot)
Počet vzorků	42	49	7
Zastoupení	42,9 %	50,0 %	7,1 %

3.3.3 Vyšetření genotypu HSD3B1 s využitím Sangerova sekvenování

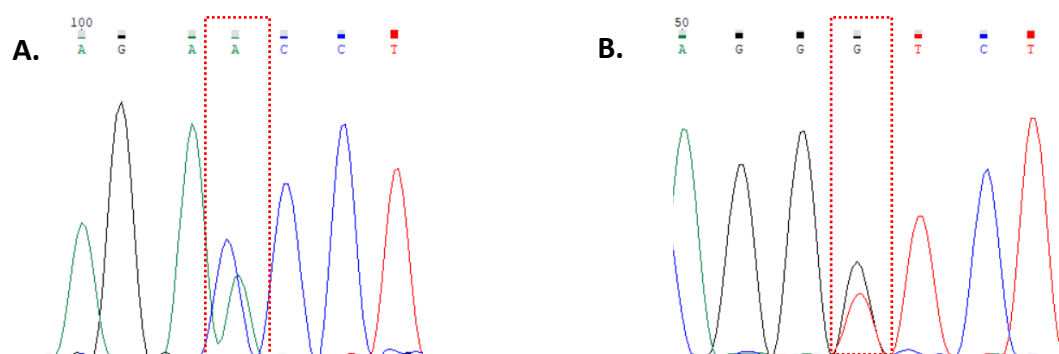
K ověření genotypu určeného pomocí HRM analýzy byla použita i metoda Sangerova sekvenování. Genotyp byl stanoven pro tři vzorky zastupujících jednotlivé varianty genu HSD3B1: 1245A/A (Obr. 7), 1245C/C (Obr. 8), 1245A/C (Obr. 9).



Obr. 7 Analýza vzorku BF 387 zastupujícího wild-type homozygotní genotyp 1245A/A. **A.** Obě alely genu HSD3B1 obsahují v pozici 1254 adenin (forward řetězec). **B.** Komplementární báze thymin ve sledované pozici (reverse řetězec).



Obr. 8 Analýza vzorku BF 358 zastupující variantní homozygotní genotyp 1245C/C. **A.** Záměna A → C v pozici 1245 v obou alelách genu HSD3B1 (forward řetězec). **B.** Komplementární báze guanin ve sledované pozici (reverse řetězec).



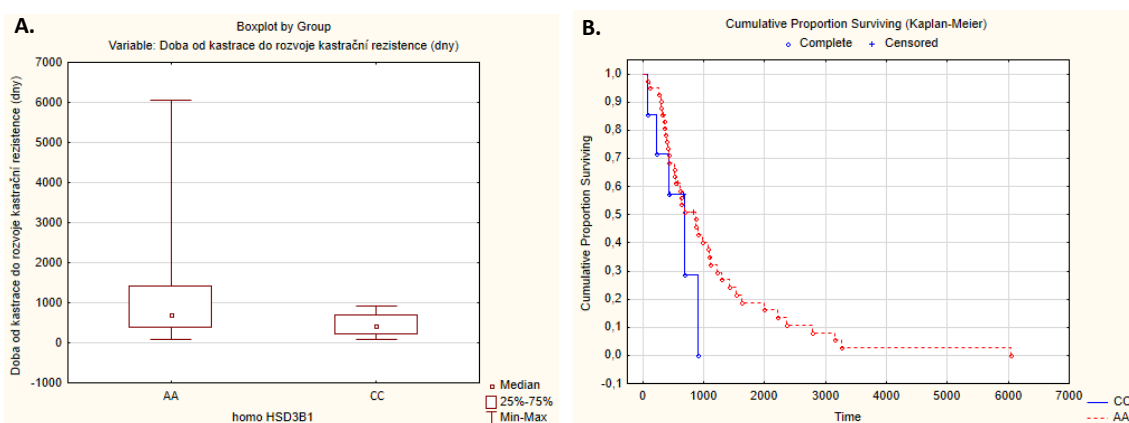
Obr. 9 Analýza vzorku BF 383 zastupující heterozygotní variantu 1245A/C. **A.** V pozici 1245 jedné alely genu HSD3B1 se nachází adenin, u druhé alely ve stejné pozici cytosin (záměna A → C) (forward řetězec). **B.** Komplementární báze thymin a guanin ve sledované pozici (reverse řetězec).

3.3.4 Vliv variantní alely 1245C v genu HSD3B1 na délku androgen deprivace terapie.

U souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (Tab. 2) byl vyšetřen zárodečný polymorfismus v genu HSD3B1 (1245 A → C) a získaná data byla korelována s odpovědí na androgen deprivace terapii. Odpověď na léčbu ADT byla hodnocena jako doba od kastrace do rozvoje CRPC. Kastrace rezistence byla u studovaného souboru definována jako nárůst hladiny PSA po kastraci.

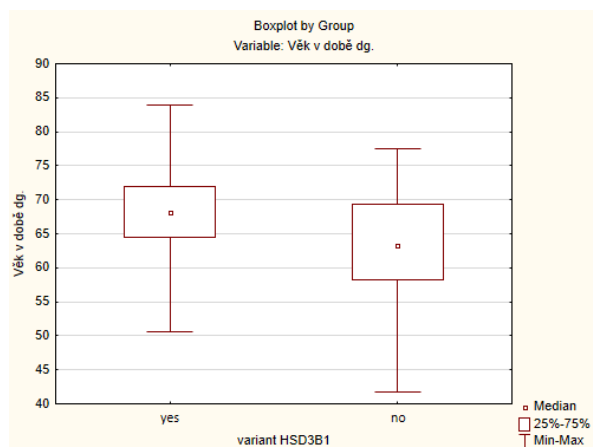
Pro zhodnocení asociace mezi přítomností variantní alely a doby do rozvoje kastrace rezistence byly použity Mann-Whitney U test a Kaplan-Meierova analýza přežití. Do testu bylo zahrnuto 39 pacientů s wild-type homozygotním (1245A/A) a 5 pacientů variantním homozygotním (1245C/C) genotypem.

Výsledky byly znázorněny pomocí krabicového grafu (Obr. 10A) a poukazují na slabý trend k asociaci alely v homozygotním stavu (1245C/C) s kratší dobou do rozvoje CRPC ($p = 0,123$). Kaplan-Meierova analýza stejných dat vykazuje pouze nesignifikantní náznak (Obr. 10B; $p = 0,366$).



Obr. 10 A. Krabicový graf znázorňující dobu od kastrace do rozvoje CRPC [dny] u skupiny pacientů s homozygotním wild-type (1245A/A) a homozygotním variantním (1245C/C) genotypem. Výsledky vykazují slabý trend ($p = 0,123$). B. Kaplan-Meierova křivka zobrazující rozdíl v době od kastrace do rozvoje CRPC [dny] u skupiny pacientů s homozygotním wild-type (1245A/A, červeně) a homozygotním variantním (1245C/C, modře) genotypem. Variantní homozygoti vykazují pouze nesignifikantní náznak ($p = 0,366$).

Ve sledovaném souboru byla pozorována také souvislost vyššího věku pacienta v době diagnózy s přítomností variantní alely 1245C. U pacientů s alespoň jednou variantní alelou byl věk vyšší (zahrnuto 56 pacientů) než u pacientů, kteří nositeli variantní alely nebyli (zahrnuto 35 pacientů). Korelace spočítaná Mann-Whitney U Testem vykazuje statistickou významnost ($p = 0,00623$) (Obr. 11).



Obr. 11 Krabicový graf zobrazující rozložení věku [roky] v době diagnózy v závislosti na přítomnosti variantní alely 1245C genu HSD3B1. Výsledky jsou statisticky signifikantní ($p = 0,00623$).

Ve studovaném souboru pacientů byl pozorován také trend k asociaci variantní alely HSD3B1 s přítomností metastáz v době diagnózy. Analýza byla provedena Pearson chí-kvadrát testem, do kterého bylo zahrnuto celkem 91 pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (Tab. 15). Výsledky vykazují trend k asociaci alely 1245C s přítomností metastáz ($p=0,082$).

Tab. 15 Přehled počtu pacientů s přítomností metastáz v době diagnózy a variantní alely 1245C v genu HSD3B1 (Pearsonův chí-kvadrát test, $p=0,082$).

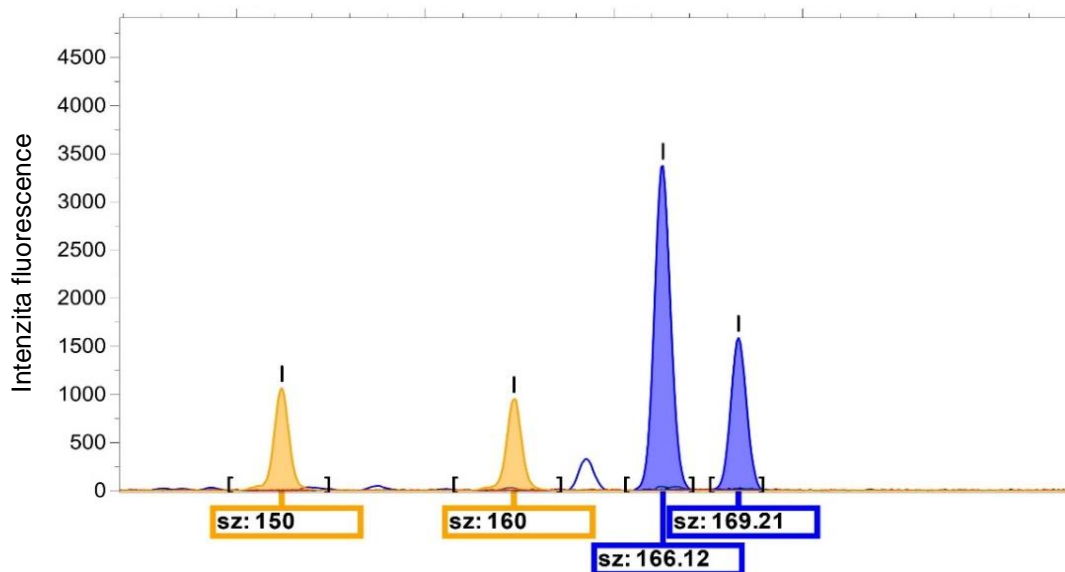
Variant HSD3B1	Meta v době dg (0/1)		Row Totals
	0	1	
no	24	11	35
yes	28	28	56
Celkem	52	39	91

3.3.5 Vyšetření počtu D-repetic asporinu u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty

Fragmentační analýzou bylo vyšetřeno 97 pacientů s pokročilým karcinomem prostaty pro zjištění počtu D-repetic asporinu. Jako pozitivní kontrola byl analyzován vzorek BCA4 (fibroblasty izolované z nádoru karcinomu prsu), jehož genotyp (D13/D14) byl již dříve ověřen jak fragmentační analýzou, tak Sangerovým sekvenováním (Šimková *et al.*, 2016). U kontroly byly detekovány PCR fragmenty s délkou 166 a 169 párů bazí odpovídající alelám D13 a D14 (Obr. 12). Z výsledků tohoto měření vycházelo potom určení počtu repetice kyseliny asparagové u ostatních vzorků.

U jednotlivých mužů ve studovaném souboru byl počet D-repetic variabilní a pohyboval se od 12 do 18. Variantní alela D14 byla detekována u 40 pacientů a její celková frekvence v souboru činila 23,2 %. V Tab. 16 je uveden přehled variantních genotypů detekovaných ve

sledovaném souboru. Nejpočetněji byly zastoupeny délkové varianty D13/D13, D13/D14, D13/D15, D14/D15 a D14/D14.



Obr. 12 Vyhodnocení fragmentační analýzy pro kontrolní vzorek BCA4 s heterozygotním genotypem D13/D14 (odpovídající velikosti PCR produktů 166 bp a 169 bp). Žluté píky představují hmotnostní standard s fragmenty o definovaných velikostech (150 bp a 160 bp).

Tab. 16 Přehled zjištěných alelických variant D-repetic asporinu u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty.

Počet pacientů	Variantní genotyp	Zastoupení [%]	Počet pacientů	Variantní genotyp	Zastoupení [%]
1	D12/D12	1,03	5	D14/D14	5,16
3	D12/D13	3,09	8	D14/D15	8,25
1	D12/D14	1,03	3	D14/D16	3,09
1	D12/D15	1,03	1	D14/D17	1,03
20	D13/D13	20,62	2	D15/D15	2,06
22	D13/D14	22,68	2	D15/D16	2,06
17	D13/D15	17,53	1	D15/D17	1,03
5	D13/D16	5,16	1	D15/D18	1,03
1	D13/D17	1,03	1	D16/D16	1,03
2	D13/D18	2,06			

3.3.6 Vliv polymorfismu v počtu D-repetic asporinu na progresi karcinomu prostaty

Ke zjištění, zda délka D-repetic asporinu souvisí s agresivitou karcinomu prostaty, byla tato data vztažena ke Gleasonovu skóre (GS). Pacienti byli rozděleni do tří skupin podle uvedeného gradingu (Tab. 17).

Metodou Pearsonova chí-kvadrát testu byl analyzován vztah mezi GS < 7, GS 7 a GS > 7 a delšími D-repeticemi, tzn. s přítomností alespoň jedné alely s D14 až D18. V souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty byla pozorována signifikantní asociace delších D-repetic s vyšším Gleasonovým skóre (>7) ($p = 0,00043$).

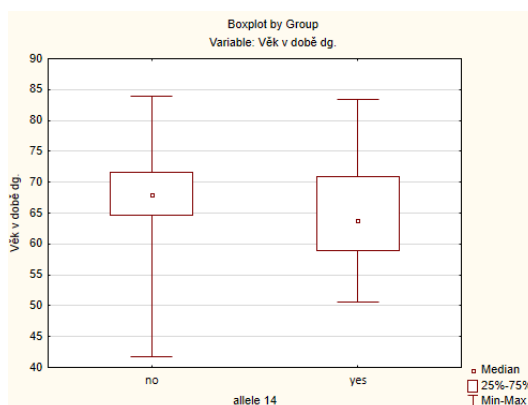
Tab. 17 Přehled četnosti pacientů s přítomností delších D-repetic asporinu (alela D14 – D18) v jednotlivých skupinách sestavených na základě Gleasonova skóre (Pearsonův chí-kvadrát test, $p=0,00043$).

Alela 14-18	GS < 7	GS 7	GS > 7	Celkem
no ¹	8	4	12	24
yes ²	3	27	39	69
Celkem	11	31	51	93

¹ Proměnná „no“ reprezentuje pacienty s genotypy bez alely D14 (tzn. s alelami kratšími nebo delšími)

² Proměnná „yes“ reprezentuje pacienty s genotypy s alelou D14 (v homozygotním i heterozygotním stavu).

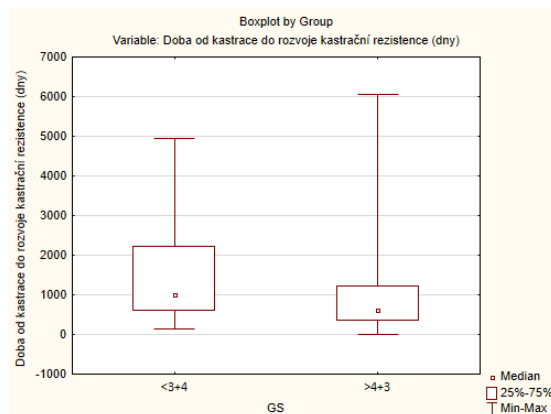
Ke zjištění, zda přítomnost variantní D14 alely souvisí s nižším věkem pacienta při diagnóze karcinomu, byla provedena statistická analýza Mann-Whitney U testem. Zahrnuto bylo celkem 97 pacientů (57 s genotypem bez alely D14, 40 s genotypem obsahujícím alelu D14). U pacientů s variantní alelou D14 byl pozorován trend k signifikanci pro diagnózu karcinomu v mladším věku ($p = 0,097$) ve srovnání s pacienty s přítomností ostatních alelických variant (Obr. 13).



Obr. 13 Krabicový graf závislosti věku v době diagnózy na přítomnosti nebo absenci alely D14 u souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty. V proměnné „no“ jsou obsaženi pacienti s genotypy bez alely D14 (tzn. s alelami kratšími nebo delšími). Proměnná „yes“ obsahuje pacienty s genotypy s alelou D14 (v homozygotním i heterozygotním stavu).

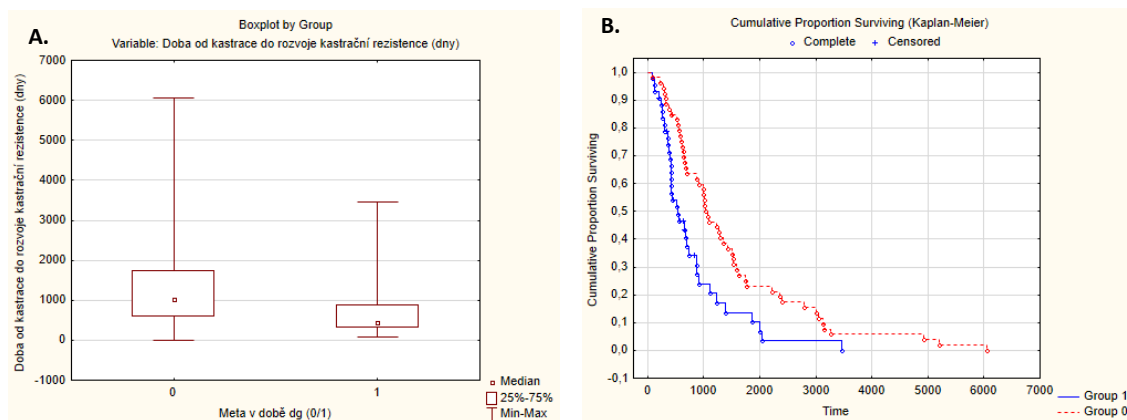
3.3.7 Význam klinických parametrů

Pro potvrzení spojitosti vyššího histopatologického stupně s vyšší agresivitou nádoru bylo Mann-Whitney U testem provedeno statistické porovnání doby od kastrace do rozvoje kastroční rezistence u skupin s GS 3+4 a nižší (počet pacientů 55) a GS 4+3 a vyšší (počet pacientů 30). Vztah mezi kratší dobou od kastrace do rozvoje CRPC a vyšším GS byl dle očekávání shledán statisticky významný ($p = 0,026$) (Obr. 14.).



Obr. 14 Krabicový graf znázorňuje porovnání doby od kastrace do rozvoje kastroční rezistence u pacientů s rozdílným Gleasonovým skóre. Proměnná „<3+4“ značí GS < 7, proměnná „>4+3“ značí GS 4+3 a vyšší.

Dále byla testována souvislost mezi výskytem metastáz v čase diagnózy a dobou od kastrace do rozvoje kastroční rezistence. Provedením Mann-Whitney U testu byla zjištěna jednoznačně signifikantní spojitost mezi přítomností metastáz a rychlejší progresí nádoru ($p = 0,0004$) (Obr. 15A.). Pro srovnání byla použita také Kaplan-Meierova analýza (Obr. 15B.). Rozdíl mezi oběma skupinami byl shledán statisticky významným ($p = 0,006$).



Obr. 15 **A.** Graf zobrazuje rozdíl v době od kastrace do rozvoje CRPC v závislosti na přítomnosti nebo absenci metastáz při diagnóze. Proměnná 0 značí nepřítomnost metastáz a zahrnuje 53 pacientů, proměnná 1 zahrnuje 36 pacientů s metastázami. **B.** Kaplan-Meierova křivka zobrazující rozdíl v době od kastrace do rozvoje kastroční rezistence [dny] v závislosti na přítomnosti metastáz v čase diagnózy. Group 1, modrá křivka - pacienti s přítomností metastáz v době diagnózy; Group 0, červená křivka – pacienti s bez metastáz v době diagnózy.

3.4 Diskuze

Výsledky této práce ukazují význam genetických variant při predikci odpovědi na androgen deprivaci terapii a v progresi karcinomu prostaty. Ačkoliv spojitost mezi polymorfními variantami genů zapojených do syntézy a metabolismu androgenů a úspěšnosti ADT není zcela objasněná (Schleutker, 2011), v budoucnu může studium této problematiky přinést důležité poznatky pro výběr vhodné terapie. Také v otázce vlivu nádorového mikroprostředí na progresi karcinomu prostaty mohou hrát genové varianty jeho složek významnou roli.

Během studie bylo vyšetřeno celkem 418 pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty na přítomnost variantní alely HSD3B1 1245C. Detekce zárodečného polymorfismu vycházela ze studie Hearn *et al.* (2016) a z bakalářské práce, ve které byla optimalizována vlastní metodika stanovení (Mašová, 2018). Zjištěná celková frekvence variantní alely v tomto souboru činila 32,3 %, přičemž zastoupení jednotlivých genotypů odpovídalo 46,17 % pro 1245A/A, 43,06 % pro 1245A/C a 10,77 % pro 1245C/C. Námi zjištěné četnosti korespondují s daty uváděnými i v ostatních studiích (Tab. 18). Za povšimnutí stojí nízké zastoupení variantní alely u Japonců v práci Shiota *et al.* (2019), kde ve skupině mužů s karcinomem prostaty, kteří podstoupili léčbu ADT, byla frekvence variantní alely, ve srovnání s ostatními soubory, přibližně třetinová (Tab. 18). Genetický základ může být jedním z důvodů, proč je výskyt karcinomu prostaty u Asiatů ve srovnání s populací bělochů nebo afroameričanů podstatně nižší.

Tab. 18 Zastoupení variantní alely a jednotlivých genotypů.

Frekvence 1245C [%]	Frekvence 1245A/A [%]	Frekvence 1245A/C [%]	Frekvence 1245C/C [%]	Počet pacientů	Publikace
32,3	46,17	43,06	10,77	n = 418	Retrospektivní soubor pacientů
32,1	42,9	50	7,1	n = 98	Prospektivní soubor pacientů
29	49	43	7	n = 443	Hearn <i>et al.</i> , 2016
31	-	-	10	n = 102	Agarwal <i>et al.</i> , 2017
32	46	45	9	n = 213	Hearn <i>et al.</i> , 2018
8,7	91,3	6,7	1,9	n = 104	Shiota <i>et al.</i> , 2019
25,7	55,3	38,2	6,6	n = 76	Hahn <i>et al.</i> , 2018
32	49	34	13	n = 90	Almassi <i>et al.</i> , 2018
17,5	82,5	-	-	n = 103	Wu <i>et al.</i> , 2015

Variantní alela HSD3B1 1245C je spojována s horší odpovědí pacienta na ADT a rychlejším rozvojem kastracní rezistence (Hearn *et al.*, 2016). V předložené diplomové práci byla

hodnoceným parametrem určujícím horší odpověď pacienta na ADT doba od kastrace po nárůst hladiny PSA po kastraci indikující rozvoj kastrační rezistence.

Předpoklad spojitosti variantního genotypu s rychlejším vývojem kastrační rezistence při léčbě ADT byl testován u souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty. Z výsledků byl patrný pouze slabý trend variantních homozygotů 1245C/C k asociaci s rychlejším vznikem kastrační rezistence při ADT, což jen částečně potvrdilo předpokládaný vztah. Podobně byly prezentovány i výsledky studie Wu *et al.* (2015), jenž sice jevíly signifikanci ve vyšší incidenci CRPC u pacientů s variantní alelou, ale signifikantní rozdíl v době do rozvoje kastrační rezistence mezi heterozygoty 1245A/C a wild-type homozygoty 1245A/A nebyl pozorován. Výstup studie byl pravděpodobně ovlivněn nevyváženým počtem pacientů s metastázami a bez nich mezi jednotlivými genotypy (Shiota *et al.*, 2019). Také v souboru sledovaném v diplomové práci nebylo zastoupení pacientů s metastázami mezi jednotlivými genotypy rovnoměrné. Tento fakt, společně s malým počtem pacientů s variantním homozygotním genotypem, může být jedním z vysvětlení nedosaženého signifikantního výsledku.

Ve studii Shiota *et al.* (2019) pozorovali vyšší frekvenci variantní alely u skupiny Japonských pacientů s CRPC ve srovnání se skupinou pacientů s metastatickým hormonálně-senzitivním karcinomem. To podporuje hypotézu, že zděděním variantní alely se zvyšuje tendence k rezistenci k ADT. Ve stejné práci bylo navíc u mužů s variantní alelou při léčbě CRPC abirateronem pozorováno nižší riziko selhání této nové terapie. Zvýšená produkce 3 β -HSD1 polymorfismem v genu HSD3B1 teoreticky umožňuje rychlejší metabolizaci abirateronu na aktivnější Δ^4 -abirateron a tím zvyšuje jeho terapeutickou účinnost navzdory zvýšené extragonadální syntéze androgenů podporující progresi nádoru (Shiota *et al.*, 2019). V dřívější práci byl diskutován spíše agonistický vliv dalších metabolitů abirateronu na AR v souvislosti se sníženým přínosem léčiva u pacientů s homozygotním variantním genotypem (Alyamani *et al.*, 2018). Tato myšlenka byla podpořena i ve studii Hahn *et al.* (2018), kde u mužů léčených abirateronem je asociována přítomnost variantní alely s horší prognózou. Metabolity abirateronu produkované enzymatickou aktivitou 3 β -HSD1 tak svým jak agonistickým, tak antagonistickým působením na AR mohou ovlivňovat účinek léčiva a progresi onemocnění.

Recentní práce také uvádí spojitost variantní alely HSD3B1 s pozdější progresí u pacientů s metastatickým CRPC léčených nesteroidním inhibitorem enzymu CYP17A1 ketokonazolem (Almassi *et al.*, 2018). Svoje závěry odůvodňují tvrzením, že přítomnost variantní alely zvyšuje závislost prostatických nádorových buněk na extragonadálních androgenech a to zvyšuje náchylnost nádoru k inhibici CYP17A1 podáním ketokonazolu (Almassi *et al.*, 2018). V tomto smyslu vede přítomnost alespoň jedné variantní alely HSD3B1 ke zvýšené produkci DHT z extragonadálních prekurzorů, predikuje rychlejší progresi k CRPC a rezistenci k ADT, což platí pro biochemicky rekurentní nádory prostaty po prostatektomii a u metastatických nádorů (Hearn *et al.*, 2018). Výstupy těchto prací mnohé objasňují, ale předkládají i další možné oblasti studia

vlivu polymorfismu 1245C v genu HSD3B1 týkající se odpovědi na různá farmaka při léčbě karcinomu prostaty.

Přítomnost metastáz v době diagnózy značí pokročilé a invazivní stádium karcinomu prostaty. U těchto pacientů lze očekávat kratší dobu do progresu onemocnění a s tím spojenou i horší prognózu. Bylo tedy zajímavé ověřit, zda je s přítomností metastáz v době diagnózy asociovaná i přítomnost variantní alely HSD3B1. Vypočítaná korelace vykazovala trend k této vazbě a korektnost výsledků byla podpořena i Kaplan-Meierovou analýzou zobrazující rozdíl v době do vzniku CRPC v závislosti na přítomnosti metastáz. Předpoklad asociace variantní alely 1245C (1245A/C a 1245C/C) s poklesem doby do progresu, doby do vzniku metastáz i celkového přežití byl komentován v publikaci Hearn *et al.* (2016). Další studie Hearn *et al.* (2018) předkládá spojitost variantní alely s rychlejším vývojem metastáz u mužů léčených ADT kvůli biochemické rekurenci po primární radioterapii karcinomu prostaty.

Vyšší věk je jedním z rizikových faktorů vzniku karcinomu prostaty. Podle American Cancer Society (2015) je průměrný věk pacienta v době diagnózy 66 let, což odpovídá zjištěnému průměrnému věku pacientů studovaného souboru v této práci. Neočekávané bylo zjištění signifikantního vztahu mezi přítomností variantní alely a vyšším věkem pacienta v době diagnózy. Pozorovaná signifikance by naznačovala možnost protektivního vlivu variantní alely ke vzniku karcinomu prostaty. Tento výsledek není zatím podložen žádnou publikací a může být ovlivněn (stejně jako pouze slabý trend variantních homozygotů 1245C/C k asociaci s rychlejším vznikem kastrační rezistence při ADT) velikostí testovaného souboru a zvláště potom nízkým zastoupením pacientů s variantním homozygotním genotypem. Jeho případné potvrzení bude vyžadovat důkladnější analýzu.

Vliv nádorového mikroprostředí a jeho složek na progresi karcinomu prostaty byl studován v souvislosti s detekcí délky D-repetic v asporinu s využitím metody uvedené v Hurley *et al.* (2015). Předpoklad vlivu délky repetice asporinu na progresi karcinomu prostaty vycházel z publikací, které uváděly význam polymorfismu délky D-repetic v regulačních drahách u onemocnění jako je osteoartritida nebo procesy cytodiferenciace a mineralizace kolagenu (Zhan *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2007). Tyto regulační dráhy se podílejí i na procesech spojených s proliferací, invazí a metastazováním nádorových buněk (Zhan *et al.*, 2019). Ve studii Hurley *et al.* (2015) byla zjištěn vztah mezi polymorfismem D-repetic asporinu a progresí karcinomu prostaty do metastatického stavu u mužů po radikální prostatektomii. Uvádí, že heterozygotní genotyp D13/D14 je významně asociovan s metastatickou progresí a také, že u mužů s alespoň jednou alelou D14 lze očekávat vyšší pravděpodobnost k rozvoji do tohoto stádia. Homozygotní genotyp D13/D13 je naopak považován za protektivní a muži vykazují snížené riziko progresu.

Pro zjištění vlivu délky D-repetic asporinu na progresi karcinomu prostaty byla provedena korelace s Gleasonovým skóre, které je významným prognostickým markerem

agresivity nádoru. Pozorován byl zcela nový vztah mezi vyšší hodnotou GS a delšími D-repeticemi. Přítomnost alespoň jedné alely D14 až D18 byla signifikantně asociována s vyšším Gleasonovým skóre.

Doposud byly publikovány pouze souvislosti vyššího Gleasonova skóre s hladinou exprese asporinu (Hurley *et al.*, 2015), kdy byla pozorována nejvyšší exprese u nádorů s celkovým GS 8 až 9, nebo korelace GS s ASPN mRNA (Rochette *et al.*, 2017). Signifikantní vliv genotypu D13/D14 asporinu na biochemickou rekurenci však práce Hurley *et al.* (2015) nepotvrdila. Z našich výsledků vyplývá, že určení délky D-repetic asporinu by mohlo být parametrem pomáhajícím předpovídat agresivnější typ karcinomu prostaty.

Další zjištěná data také potvrzují, že vyšší Gleasonovo skóre (4+3 a vyšší) je spojeno s horší prognózou. Vývoj kastrační rezistence u těchto pacientů, ve srovnání s pacienty s nižším stupněm histopatologické diferenciaci, nastává po kastraci dříve. Tento výsledek byl očekávaný a potvrzuje obecně platný význam určování GS skóre.

Ve studovaném souboru pacientů s pokročilým karcinomem prostaty byl analyzován také vztah věku v době diagnózy s přítomností variantní alely D14. Přestože nebyla pozorována asociace délky D-repetic s incidencí karcinomu prostaty (Hurley *et al.*, 2015), naše výsledky ukazují na možnou spojitost alely D14 s vyšší pravděpodobností výskytu karcinomu prostaty již v mladším věku. Vzhledem k tomu, že přítomnost alely D14 je spojena s vyšší agresivitou nádoru a progresí do metastatického stavu, mohli by muži s tímto genotypem být aktivněji sledováni již v mladším věku, případně být léčeni razantněji již v časnějším stádiu onemocnění.

4 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na význam detekce genových variant, které by pomohly lépe vybrat terapii u karcinomu prostaty, a predikovat odpověď pacienta na léčbu nebo progresi onemocnění do pokročilého stádia. Z mnoha popsanych variant genů byla pozornost věnována zárodečnému jednonukleotidovému polymorfismu v genu HSD3B1 a polymorfismu v délce D-repetic proteinu asporinu.

Práce shrnula dosavadní poznatky o závislosti vývoje karcinomu prostaty na androgenech, jejich biosyntetické dráhy a účinek na buňky prostaty. Byla zmíněna stádia karcinomu prostaty, léčba a stručně i mechanismy vzniku kastroční rezistence. Důraz byl kladen na genové varianty enzymů zapojených do steroidogeneze, především na 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenázu 1. V genu HSD3B1 byl studován SNP 1245 A→C, odpovědný za zvýšenou produkci DHT z extragonadálních prekurzorů, a spojitost variantní alely s predikcí odpovědi na androgenní deprivaci a prognózou onemocnění. Další část práce byla věnována vlivu složek nádorového mikroprostředí na schopnost progresu tumoru. Pozornost byla soustředěna především na protein asporin a jeho působení v regulačních drahách nádorových buněk. Polymorfismus v počtu repetice kyseliny asparagové a zejména přítomnost variantní alely se čtrnácti repeticemi je spojována s rychlejší progresí do metastatického stádia.

Experimentální část práce byla zaměřena na detekci uvedených genových variant a následné statistické ověření vzájemných vztahů. Analýzou křivek tání, které předcházela asymetrická qPCR s neznačenou LNA próbou, byl zhodnocen polymorfismus v genu HSD3B1. Frekvence variantní alely 1245C korelovala s informacemi uváděnými v literatuře, ale signifikantní spojitost genotypu 1245C/C s rychlejším vývojem kastroční rezistence v daném souboru zjištěna nebyla. Naopak byl nalezen neočekávaný vztah mezi přítomností variantní alely a vyšším věkem pacienta v době diagnózy, který však vyžaduje, vzhledem k velikosti souboru, další validaci. Pozorována byla také asociace variantní alely s přítomností metastáz v době diagnózy. Polymorfismus v délce D-repetic v asporinu byl určován metodou fragmentační analýzy. Počet D-repetic byl ve studovaném souboru variabilní a pohyboval se od 12 do 18. Byla zachycena signifikantní spojitost přítomnosti alespoň jedné alely D14 až D18 s vyšším Gleasonovým skóre.

Z výsledků práce je zřejmý význam analýzy genomické DNA pro výběr vhodné a časně terapie u pacientů s karcinomem prostaty. Jednonukleotidový polymorfismus v genu HSD3B1 a délka D-repetic asporinu představují potenciálně klinicky vhodné biomarkery pro predikci odpovědi na léčbu a progresi onemocnění.

5 Použitá literatura

Agarwal N., Hahn A. W., Gill D. M., Farnham J. M., Poole A. I., Cannon-Albright L. (2017) Independent Validation of Effect of *HSD3B1* Genotype on Response to Androgen-Deprivation Therapy in Prostate Cancer. *JAMA Oncology* **3**, 856–857.

Almassi N., Reichard C., Li J., Russel C., Perry J., Ryan C. J., Friedlander T., Sharifi N. (2018) HSD3B1 and Response to a Nonsteroidal CYP17A1 Inhibitor in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology* **4**, 554–557.

Alsinnawi M., Zhang A., Bianchi-Frias D., Burns J., Cho E., Zhang X., Sowalsky A., Ye H., Slee A. E., True L., Porter C., Taplin M. E., Balk S., Nelson P. S., Montgomery R. B., Mostaghel E. A. (2019) Association of prostate cancer *SLCO* gene expression with Gleason grade and alterations following androgen deprivation therapy. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **22**, 560-568.

Alyamani M., Enamekhoo H., Park S., Taylor J., Almassi N., Upadhyay S., Tyler A., Berk M. P., Hu B., Hwang T. H., Figg W. D., Peer C. J., Chien C., Koshkin V. S., Mendiratta P., Grivas P., Rini B., Garcia J., Auchus R. J., Sharifi N. (2018) HSD3B1(1245A>C) variant regulates dueling abiraterone metabolite effects in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigations* **128**, 3333-3340.

American Cancer Society (2015) Facts & Figures 2015. *American Cancer Society*, 1-52.
Dostupné z: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2015.html>

Appunni S., Anand V., Khandelwal M., Gupta N., Rubens M., Sharma A. (2019) Small leucine rich proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. *Clinica Chimica Acta* **491**, 1–7.

Auchus M. L., Auchus R. J. (2012) Human steroid biosynthesis for the oncologist. *Journal of Investigative Medicine* **60**, 495–503.

Balík M., Broďák M. (2011) Lokalizovaný karcinom prostaty-diagnostika a léčba. *Urologie pro praxi* **12**, 105-110.

Barnard J. A., Beauchamp R. D., Russell W. E., Dubois R. N., Coffey R. J. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* **108**, 564–580.

Berube D., Luu The V., Lachance Y., Gagne R., Labrie F. (1989) Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (*HSDB3*) to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenetics and Cell Genetics* **52**, 199–200.

Boccon-Gibod L., van der Meulen E., Persson B. E. (2011) An update on the use of gonadotropin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Therapeutic Advances in Urology* **3**, 127-140.

Bostwick D. G., Burke H. B., Djakiew D., Euling S., Ho S. M., Landolph J., Morrison H., Sonawane B., Shifflett, Waters D. J., Timms B. (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**, 2371-2490.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal of Clinicians* **68**, 394-424.

Cole G., McCaffrey J., Ali A. A., McCarthy H. O. (2015) DNA vaccination for prostate cancer: key concepts and considerations. *Cancer Nanotechnology* **6**, 1-23.

Dai Ch., Heemers H., Sharifi N. (2017) Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **7**, 399-415.

de Bono J. S., Oudard S., Ozguroglu M., Hansen S., Machiels J. P., Kocak I., Gravis G., Bodrogi I., Mackenzie M. J., Shen L., Roessner M., Gupta S., Sartor A. O., TROPIC Investigators. (2010) Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* **376**, 1147–1154.

de Bono J. S., Logothetis C. J., Molina A., Fizazi K., North S., Chu L., Chi K. N., Jones R. J., Goodman Jr. O. B., Saad F., Staffurth J. N., Mainwaring P., Harland S., Flaig T. W., Hutson T. E., Cheng T., Patterson H., Hainsworth J. D., Ryan Ch. J., Sternberg C. N., Ellard S. L., Fléchon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Haqq Ch. M., Scher H. I., COU-AA-301 Investigators (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *New England Journal of Medicine* **364**, 1995-2005.

Deslypere J. P., Young M., Wilson J. D., McPhaul M. J. (1992) Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* **88**, 15-22.

Ding Q., Zhang M., Liu C. (2015) Asporin participates in gastric cancer cell growth and migration by influencing EGF receptor signaling. *Oncology Reports* **33**, 1783–1790.

Dunn J. F., Nisula B. C., Rodbard D. (1981) Transport of steroid hormones: Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **53**, 58–68.

Eggerer S. E., Scardino P. T., Walsh P. C., Han M., Partin A. W., Trock B. J., Feng Z., Wood D. P., Eastham J. A., Yossepowith O., Rabah D. M., Kattan M. W., Yu C., Klein E. A.,

Stephenson A. J. (2011) Predicting 15-year Prostate Cancer Specific Mortality After Radical Prostatectomy. *Journal of Urology* **185**, 869–875.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D., Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **136**, E359-E386.

Fiandalo M. V., Wilton J., Mohler J. L. (2014) Roles for the backdoor pathway of androgen metabolism in prostate cancer response to castration and drug treatment. *International Journal of Biological Sciences* **10**, 596–601.

Gamat M., McNeel D. G. (2017) Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* **24**, 297-310.

Gillatt D. (2006) Antiandrogen treatments in locally advanced prostate cancer: are they all the same? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **132**, 17-26.

Gleason, D. F., Mellinger, G. T., Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. *The Journal of Urology* **111**, 58-64.

Goldoni S., Iozzo R.V. (2008) Tumor microenvironment: modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs. *International Journal of Cancer* **123**, 2473-2479.

Griffin J. E. (1992) Androgen resistance-The clinical and molecular spectrum. *New England Journal of Medicine* **326**, 611–618.

Grimaud E., Heymann D., Rédini F. (2002) Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF- β in cartilage disorders. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **13**, 241-257.

Grossmann M. E., Huang H., Tindall D. J. (2001) Androgen receptor signaling in androgen refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **93**,1687–1697.

Gutman E. B., Sproul E. E., Gutman A. B. (1936) Significance of Increased Phosphatase Activity of Bone at the Site of Osteoplastic Metastases Secondary to Carcinoma of the Prostate Gland. *American Association for Cancer Research* **28**, 485-495.

Hahn A. W., Gill D. M., Nussenzveig R. H., Poole A., Farnham J., Cannon-Albright L., Agarwal N. (2018) Germline Variant in HSD3B1 (1245A>C) and Response to Abiraterone Acetate Plus Prednisone in Men With New-Onset Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer* **16**, 288-292.

Harris W. P., Mostaghel E. A., Nelson P. S., Montgomery B. (2009) Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature Clinical Practice. Urology* **6**, 76-85.

Hearn J., AbuAli G., Reichard C., Reddy C. A., Magi-Galluzzi C., Chang K. H., Carlson R., Rangel L., Reagan K., Davis B. J., Karnes R. J., Kohli M., Tindall D., Klein E. A., Sharifi N. (2016) HSD3B1 and resistance to androgen-deprivation therapy in prostate cancer: a retrospective, multicohort study. *The Lancet Oncology* **17**, 1435-1444.

Hearn J. W. D, Xie W., Nakabayashi M., Almassi N., Reichard C. A., Pomerantz M., Kantoff P. W., Sharifi N. (2018) Association of HSD3B1 Genotype With Response to Androgen-Deprivation Therapy for Biochemical Recurrence After Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *JAMA Oncology* **4**, 558–562.

Hedbom E., Heinegård D. (1993) Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27307–27312.

Heidenreich A., Bastian P. J., Bellmunt J., Bolla M., Joniau S., van der Kwast T., Mason M., Matveev V., Wiegel T., Zattoni F., Mottet N., European Association of Urology. (2014) EAU guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology* **65**, 467-479.

Henry S. P., Takanosu M., Boyd T. C., Mayne P. M., Eberspaecher H., Zhou W., de Crombrugge B., Hook M., Mayne R. (2001) Expression pattern and gene characterization of asporin. A newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12212–12221.

Herden J., Weissbach L. (2018) Utilization of Active Surveillance and Watchful Waiting for localized prostate cancer in the daily practice. *World Journal of Urology* **36**, 383-391.

Hirata E., Sahai E. (2017) Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **7**, 1-14.

Hoang D. T., Iczkowski K. A., Kilari D., See W., Nevalainen M. T. (2017) Androgen receptor-dependent and-independent mechanisms driving prostate cancer progression: Opportunities for therapeutic targeting from multiple angles. *Oncotarget* **8**, 3724-3745.

Hotte S. J., Saad F. (2010) Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Current Oncology* **17**, 72–79.

Huo W. U., Jing X., Cheng X., He Y., Hu L., Wu H., Ye F., Zhao R. (2016) Aspirin enhances colorectal cancer metastasis through activating the EGFR/src/cortactin signaling pathway. *Oncotarget* **7**, 73402-73413.

Hurley P. J., Sundi D., Shinder B. Simons B. W., Hughes R. M., Miller R. M., Benzon B., Faraj S. F., Netto G. J., Vergara I. A., Erho N., Davicioni E., Karnes D. M., Rider J. R., Jordahl K. M., Mucci L. A., Huang J., An S. S., Park B. H., Isaacs Q. B., Marchionni L., Ross A. E., Schaeffer E. M. (2015) Germline Variants in Asporin Vary by Race, Modulate the Tumor Microenvironment, and Are Differentially Associated with Metastatic Prostate Cancer. *Clinical Cancer research* **22**, 448-458.

Chandrasekar T., Yang J. C., Gao A. C., Evans Ch. P. (2015) Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology* **4**, 365-380.

Chang B., Zheng S. L., Hawkins G. A., Isaacs S. D., Wiley K. E., Turner A., Carpten J. D., Bleecker E. R., Walsh P. C., Trent J. M., Meyers D. A., Isaacs Q. B., Xu J. (2002) Joint Effect of HSD3B1 and HSD3B2 Genes Is Associated with Hereditary and Sporadic Prostate Cancer Susceptibility. *Molecular Biology and Genetics* **62**, 1784–1789.

Chang K-H., Li R., Papari-Zareei M., Watumull L., Zhao Y. D., Auchus R. J., Sharifi N. (2011) Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13728-13733.

Chang K. H., Sharifi N. (2012) Prostate cancer-from steroid transformations to clinical translation. *Nature Reviews Urology* **9**, 721–724.

Chang K., Li R., Kuri B., Lotan Y., Roehrborn C. G., Liu J., Vessella R., Nelson P., Kapur P., Guo X., Mirzaei H., Auchus R. J., Sharifi N. (2013) A gain of function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell* **154**, 1074-1084.

Charles D., Heermers H., Sharifi N. (2017) Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **7**, 399-415.

Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J. W. (2018) The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology and Oncology* **11**, 1-23.

Chen Y., Clegg N. J., Scher H. I. (2009) Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncology* **10**, 981-991.

Iozzo R.V. (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans:key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 141-174.

Iozzo R. V., Moscatello D. K., McQuillan D. J., Eichstetter I. (1999) Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 4489-4492.

Janiczek M., Szyberg L., Kasperska A., Kowalewski A., Parol M., Antosik P., Radecka B., Marszalek A. (2017) Immunotherapy as a Promising Treatment for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Journal of Immunology Research* **2017**, 1-6.

Kajikawa T., Yamada S., Tauchi T., Awata T., Yamaba S., Fujihara C., Murakami S. (2014) Inhibitory effects of PLAP-1/aspurin on periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research* **93**, 400–405.

Kaku N., Matsuda K., Tsujimura A., Kawata M. (2008) Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin α/β and Ran-Guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology* **149**, 3960–3969.

Kantoff P. W., Schuetz T. J., Blumenstein B. A., Glode L. M., Bilhartz D. L., Wyand M., Manson K., Panicali D. L. (2010) Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 1099-1105.

Kizawa H., Kou I., Iida A., Sudo A., Miyamoto Y., Fukuda A., Mabuchi A., Kotani A., Kawakami A., Yamamoto S., Uchida A., Nakamura K., Notoya K., Nakamura Y., Ikegawa S (2005) An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics* **37**, 138–144.

Klee E. W., Bondar O. P., Goodmanson M. K., Dyer R. B., Erdogan S., Bergstrahl E. J., Bergen H. R. 3rd, Sebo T. J., Klee G. G. (2012) Candidate serum biomarkers for prostate adenocarcinoma identified by mRNA differences in prostate tissue and verified with protein measurements in tissue and blood. *Clinical Chemistry* **58**, 599–609.

Koochekpour S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian journal of andrology* **12**, 639–657.

Krušlin B., Ulamec M., Tomas D. (2015) Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosnian Journal of Basis Medical Sciences* **15**, 21-28.

Kucerova R., Bienova M., Kral M., Bouchal J., Trtkova K. S., Burdova A., Student V., Kolar Z. (2015) Androgenetic alopecia and polymorphism of the androgen receptor gene (SNP rs6152) in patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *European Academy of Dermatology and Venereology* **29**, 91-96.

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

Labrie F., Belanger A., Luu-The V., Labrie C., Simard J., Cusan L., Gomez J., Candas B. (2005) Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocrine Review* **26**, 361-379.

Lachance Y., Luu-The V., Verreault H., Dumont M., Rheaume E., Leblanc G., Labrie F. (1991) Structure of the human type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3β -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA and Cell Biology* **10**, 701–711.

Lévesque É., Huang S-P., Audet-Walsh É., Lacombe L., Bao B-Y., Fradet Y., Laverdière I., Rouleau M., Huang C-Y., Yu Ch., Caron P., Guillemette Ch. (2013) Molecular markers in key steroidogenic pathways, circulating steroid levels, and prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research* **19**, 699–709.

Li H., Zhang Z., Chen L., Sun X., Zhao Y., Guo Q., Zhu S., Li P., Min L., Zhang S. (2019) Cytoplasmic Asporin promotes cell migration by regulating TGF- β /Smad2/3 pathway and indicates a poor prognosis in colorectal cancer. *Cell Death and Disease* **10**, 1-14.

Li Z., Bishop A. C., Alyamani M., Garcia J. A., Dreicer R., Bunch D., Liu J., Upadhyay S. U., Auchus R. J., Sharifi N. (2015) Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumor activity in prostate cancer. *Nature* **523**, 347-351.

Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Aazeed M., Upadhyay S. K., Balk S. P., Taplin M-E., Auchus R. J., Sharifi N. (2016) Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy. *Nature* **533**, 547-551.

Lorenzo P., Aspberg A., Onnerfjord P., Bayliss M. T., Neame P. J., Heinegard D. (2001) Identification and characterization of asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12201–12211.

Lu P., Weaver V.M., Werb Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* **196**, 395–406.

Lüllmann-rauch R. (2012) *Histologie*. Vydání 3. české - pp 415, Praha: Grada, ISBN 978-80-247-3729-4.

Maris P., Blomme A., Palacios A. P., Costanza B., Bellahcène A., Bianchi E., Gofflot S., Drion P., Trombino G. E., Di Valentin E., Cusumano P. G., Maerja S., Jerusalem G., Delvenne P., Lifrange E., Castronovo V., Turtoi A. (2015) Asporin is a Fibroblast-Derived TGF- β 1 Inhibitor and a Tumor Suppressor Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *PLoS Medicine* **12**, 1-29.

Masiello D., Cheng S., Bubley G. J., Lu M. L., Balk S. P. (2002) Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 26321-26326.

Matoušková M. (2006) Farmakoterapie karcinomu prostaty. [online] [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2006/1-2006/Farmakoterapie-karcinomu-prostaty/e-9o-9P-ek.magarticle.aspx>

Mason J. I., Keeney D. S., Bird I. M., Rainey W. E., Morohashi K., Leers- Sucheta S., Melner M. H. (1997) The regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression. *Steroids* **62**, 164–168.

Matulewicz R. S., Weiner A. B., Schaeffer E. M. (2017) Active Surveillance for Prostate Cancer. *JAMA* **318**, 2152.

Messing E. M., Manola J., Sarosdy M., Wilding G., Crawford E. D., Trump D. (1999) Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *New England Journal of Medicine* **341**, 1781–1788.

Morris M. J., Corey E., Guise T. A., Gulley J. L., Kelly W. K., Quinn D. I., Scholz A., Sgouros G. (2019) Radium-223 mechanism of action: Implications for use in treatment combinations. *Nature Reviews Urology* **16**, 745-756.

Mostaghel E. A. (2013) Steroid hormone synthetic pathways in prostate cancer. *Translational Andrology and Urology* **2**, 212–227.

Nader R., Amm J. E., Aragon-Ching J. B. (2018) Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology* **20**, 221-229.

Nakajima M., Kizawa H., Saitoh M., Kou I., Miyazono K., Ikegawa S. (2007) Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 32185-32192.

Nicholson R. I., Gee J. M. W., Harper M. E. (2001) EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* **37**, 9-15.

Orr B., Riddick A. C., Stewart G. D., Anderson R. A., Franco O. E., Hayward S. W., Thomson A. A. (2012) Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene* **31**, 1130–1142.

Peltoketo H., Luu-The V., Simard J., Adamski J. (1999) 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase(HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family: nomenclature and main characteristic of the 17HSD/KSR enzymes. *Journal of Molecular Endocrinology* **23**, 1-11.

Podrazil M., Horvath R., Becht E., Rozkova D., Bilkova P., Sochorova K., Hromadkova H., Kayserova J., Vavrova K., Lastovicka J., Vrabцова P., Kubackova K., Gasova Z., Jarolim L., Bajbuk M., Spisek R., Bartunkova J., Fucikova J. (2015) Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer, *Oncotarget* **6**, 18192–18205.

Pollack A., Salem N., Ashoori F., Hachem P., Sangha M., von Eschenbach A. C., Meistrich M. L. (2001) Lack of prostate cancer radiosensitization by androgen deprivation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **51**, 1002–1007.

Ponta H., Sherman L., Herrlich P. A. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **4**, 33-45.

Rawla P. (2019) Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology* **10**; 63–89.

Reimers M. A., Slane K. E., Pachynski R. K. (2019) Immunotherapy i Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Past and Future Strategies for Oprimization. *Current Urology Reports* **20**, 1-10.

Ricci F., Buzzatti G., Rubagotti A., Boccardo F. (2014) Safety of antiandrogen therapy for treating prostate cancer. *Expert opinion on drug safety* **13**, 1483-1499.

Rochette A., Boufaied N., Scarlata E., Hamel L., Brimo F., Whitaker H. C., Ramos-Montoya A., Neal D. E., Dragomir A., Aprikan A., Chevalier S., Thomson A. A. (2017) Asporin is a stromally expressed marker associated with prostate cancer progression. *British Journal of Cancer* **116**, 775-784.

Ross R. W., Oh W. K., Xie W., Pomerantz M., Nakabayashi M., Sartor O., Taplin M-E., Regan M. M., Kantoff P. W., Freedman M. (2008) Inherited Variation in the Androgen Pathway Is Associated With the Efficacy of Androgen-Deprivation Therapy in Men With Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 842-847.

Roy, A. K., Lavrovsky, Y., Song, C. S., Chen, S., Jung, M. H., Velu, N. K., Bi B. Y., Chatterjee B. (1999) Regulation of androgen action. *Vitamins and Hormones* **55**, 309–352.

Russell D. W., Wilson J. D. (1994) Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 25–61.

Saad F., Fizazi K. (2015) Androgen Deprivation Therapy and Secondary Hormone Therapy in the Management of Hormone-sensitive and Castration-resistant Prostate Cancer. *Urology* **86**; 852-861.

Sartor A. O., Oudard S., Sengelov L., Daugaard G., Saad F., Hansen S., Hjelm-Eriksson M., Jassem J., Thiery-Vuillemin A., Caffo O., Castellano D. E., Mainwaring P. N., Bernard J. P.,

Shen L., Chadjaa M., Fizazi K. (2016) Cabazitaxel vs. docetaxel in chemotherapy-naive (CN) patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): a three-arm phase III study (FIRSTANA). *Journal of Clinical Oncology* **34**, 5006-5006.

Satoyoshi R., Kuriyama S., Aiba N., Yashiro M., Tanaka M. (2015) Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* **34**, 650–660.

Senbanjo L. T., Chellaiah M. A. (2017) CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in Cell Developmental Biology* **5**, 1-6.

Shafi A., Yen A. E., Weigel N. L. (2013) Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics* **130**, 223-238.

Sharifi N., Gulley J. L., Dahut W. L. (2005) Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA* **294**, 238–244.

Sharifi N., Auchus R. J. (2012) Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids* **77**, 719–726.

Shiota M., Fujimoto N., Tsukahara S., Ushijima M., Takeuchi A., Kashiwagi E., Inokuchi J., Tatsugami K., Uchiumi T., Eto M. (2019) The impact of genetic polymorphism on CYP19A1 in androgen-deprivation therapy among Japanese men. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **83**, 933-938.

Schaefer L., Iozzo R. V. (2012) Small leucine-rich proteoglycans, at the cross-road of cancer growth and inflammation. *Current Opinion in Genetics & Development* **22**, 56-7.

Schaid, D., 2004. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Molecular Genetics* **13**, 103–121.

Scher H. I., Sawyers C. L. (2005) Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: Directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 8253–8261.

Scher H. I., Fizazi K., Saad F., Taplin M-E., Sternberg C. N., Miller K., de Wit R., Mulders P., Chi K. N., Shore N. D., Armstrong A. J., Flaig T. W., Fléchon A., Mainwaring P., Fleming M., Hainsworth J. D., Hirmand M., Selby B., Seely L., de Bono J. S., AFFIRM Investigators (2012) Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* **267**, 1187-1197.

Schleutker J. (2011) Polymorphisms in androgen signaling pathway predisposing to prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* **360**, 25-37.

Silbernagl S., Despopoulos A. (2004) *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. pp. 306, Praha: Grada, ISBN 978-80-247-0630-6

Simard J., Ricketts M. L., Gingras S., Soucy P., Feltus F. A., Melner M. H. (2005) Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews* **26**, 525-582.

Simkova D., Kharraishvili G., Korinkova G., Ozdian T., Suchánková-Kleplová T., Soukup T., Krupka M., Galandakova A., Dzubak P., Janikova M., Navratil J., Kahounova Z., Soucek K., Bouchal J. (2016) The dual role of asporin in breast cancer progression. *Oncotarget* **7**, 52045–52060.

Stein M. N., Jang T. L. (2016) Striving Toward a Cure for Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 2075-2078.

Študentová H., Študent V., Študent V., Melichar B. (2013) Pokročilý karcinom prostaty a nové léky z pohledu onkologa. *Urologie pro praxi* **14**, 152-156.

Tan M. H., Li J., Xu H. E., Melcher K., Yong E. L. (2015) Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* **36**, 3-23.

Trama A., Foschi R., Larranaga N., Sant M., Fuentes-Raspall R., Serraino D., Tavilla A., Van Eycken L., Nicolai N., EUROCORE-5 Working Group. (2015) Survival of male genital cancers (prostate, testis and penis) in Europe 1999-2007: Results from the EUROCORE-5 study. *European Journal of Cancer* **51**, 2206-2216.

Tran C., Ouk S., Clegg N. J., Chen Y., Watson P. A., Arora V., Wongvipat J., Smith-Jones P. M., Yoo D., Kwon A., Wasielewska T., Welsbie D., Chen C. D., Higano C. S., Beer T. M., Hung D. T., Scher H. I., Jung M. E., Sawyers C. L. (2009) Development of a second-generation anti- androgen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* **324**, 787-790.

Turcu A. F., Auchus R. J. (2015) Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* **44**, 275-296.

Wang L., Wu H., Wang L., Zhang H., Lu J., Liang Z., Liu T. (2017) Asporin promotes pancreatic cancer cell invasion and migration by regulating the epithelial- to-mesenchymal transition (EMT) through both autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Letters* **398**, 24–36.

Warde P., Mason M., Ding K., Kirkbride P., Brundage M., Cowan R., Gospodarowicz M., Sanders K., Kostashuk E., Swanson G., Barber J., Hiltz A., Parmar M. K., Sathya J., Anderson J., Hayter C., Hetherington J., Sydes M. R., Parulekar W., NCIC CTG PR.3/MRC UK PR07 investigators. (2011) Combined androgen deprivation therapy and radiation therapy for locally advanced prostate cancer: a randomised, phase 3 trial. *Lancet* **378**, 2104-2111.

Wikström P., Westin P., Stattin P., Damber J. E., Bergh A. (1999) Early castration-induced upregulation of transforming growth factor b1 and its receptors is associated with tumor cell apoptosis and a major decline in serum prostate-specific antigen in prostate cancer patients. *Prostate* **38**, 268–277.

Wu G., Huang S., Nastiuk K. L., Li J., Gu J., Wu M., Zhang Q., Lin H., Wu D. (2015) Variant allele of HSD3B1 increases progression to castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. **75**, 777–782.

Wu T., Dai Y. (2017) Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters* **387**, 61-68.

Yamada S., Murakami S., Matoba R., Ozawa Y., Yokokoji T., Nakahira Y., Ikezawa K., Takayama S., Matsubara K., Okada H. (2001) Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* **275**, 279–286.

Yamada, S., Ozawa, Y., Tomoeda, M., Matoba, R., Matsubara, K., Murakami, S. (2006) Regulation of PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells. *Journal of Dental Research* **85**, 447–45.

Yamada S., Tomoeda M., Ozawa Y., Yoneda S., Terashima Y., Ikezawa K., Ikegawa S., Saito M., Toyosawa S., Murakami S. (2007) PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *Journal of biological chemistry* **282**, 23070–23080.

Yang M., Xie W., Mostaghel E., Nakabayashi M., Werner L., Sun T., Pomerantz M., Freedman M., Ross R., Regan M., Sharifi N., Figg W. D., Balk S., Brown M., Taplin M-E., Oh W. K., Lee G-S. M., Kantoff P. W. (2011) SLCO2B1 and SLCO1B3 May Determine Time to Progression for Patients Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 2565-2573.

Yarden Y., Pines G. (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews. Cancer* **12**, 553–563.

Zhan S., Li J., Ge W. (2019) Multifaceted Roles of Asporin in Cancer: Current Understanding. *Frontiers in Oncology* **9**, 1-10.

Zhang Z., Li H., Zhao Y., Guo Q., Yu Y., Zhu S., Zhang S., Min L., Li P. (2019) Asporin promotes cell proliferation via interacting with PSMD2 in gastric cancer. *Frontiers in Bioscience* **24**, 1178–1189.

Zhou Y., Bolton E. C., Jones J. O. (2015) Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *Journal of Molecular Endocrinology* **54**, 15-29.