

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Eva Gottwaldová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Polymorfismus androgenového receptoru jako  
důsledek progresu nádoru prostaty**

**Bakalářská práce**

**Eva Gottwaldová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Kateřiny Smešný Trtkové, CSc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci .....

.....

Eva Gottwaldová

## Souhrn

Tato bakalářská práce je zaměřena na detekci jednonukleotidového polymorfismu androgenového receptoru pomocí PCR amplifikace a analýzy RFLP u pacientů s rakovinou prostaty.

V teoretické části práce je popsána stavba a funkce prostaty, na kterou navazuje popis struktury a funkce androgenového receptoru. V dalších částech jsou charakterizovány rakovina prostaty z hlediska dostupné terapie, příčiny kastrálně-rezistentního stádia rakoviny prostaty a možnosti jeho léčby. Polymorfismus androgenového receptoru obsahuje část věnující se oblasti s výskytem tandemově se opakujících trinukleotidových sekvencí, poly-glutaminovou  $(CAG)_n$  a poly-glycinovou  $(GGC)_n$ , a jednonukleotidovému polymorfismu. V závěru teoretické části práce jsou popsány mutace jednotlivých domén androgenového receptoru.

V experimentální části bylo testováno 28 archivovaných vzorků biopsií od 11 pacientů s diagnostikovanou rakovinou prostaty, které byly fixovány formalínem a zality do parafínu (FFPE). Pomocí polymerázové řetězové reakce a analýzy RFLP bylo detekováno 11 tkáňových vzorků s polymorfní alelou A a 17 tkáňových vzorků s nepolymorfní alelou G. Detekovaný polymorfismus byl potvrzen přímým sekvenováním u šesti vybraných tkáňových vzorků.

Experimenty nepotvrdily spojitost mezi alelou A a výskytem rakoviny prostaty. U všech tkáňových vzorků konkrétního pacienta nebyla nalezena záměna alel G a A, výsledek analýzy RFLP byl potvrzen metodou přímého sekvenování produktů PCR. Metoda sekvenování také přispěla ke zpřesnění sporného výsledku z analýzy RFLP. Prostatická tkáň pacienta v různém stadiu rakoviny prostaty je nositelem vždy jen jedné ze dvou alel sledovaného jednonukleotidového polymorfismu v 1. exonu androgenového receptoru.

Výsledkem analýzy RFLP a sekvenování bylo také zjištění, že výskyt alely je u jedince vždy shodný bez ohledu na typ nádorové nebo nenádorové prostatické tkáně.

## Summary

This bachelor thesis is focused on detection of the single nucleotide polymorphism of androgen receptor based on PCR amplification and RFLP analysis in patients with prostate cancer.

Theoretical part of this thesis describes the structure and function of the prostate, followed by characterization of the structure and function of the androgen receptor. In other parts, the prostate cancer is characterized from the point of view of the available treatment, causes of castration-resistant prostate cancer and its treatment options. Polymorphism of the androgen receptor includes parts with description of tandem repeating trinucleotide sequences, polyglutamine (CAG) and polyglycine (GGC), and single nucleotide polymorphism. At the end of the theoretical part, the mutation of androgen receptor domains are characterized.

In the experimental part was tested 28 archived samples of biopsy from 11 patients with prostate cancer, formaline-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Polymerase chain reaction and RFLP analysis detected 11 tissue samples with polymorphic allele A and 17 tissue samples with non-polymorphic allele G. Detected polymorphism was confirm by direct sequencing in six selected tissue samples.

Experiments did not confirm the relation between allele A and formation of prostate cancer. At all tissue samples of specific patient were not detected a mismatch between allele G or A, the result of RFLP analysis was confirmed by direct sequencing of PCR products. Sequencing also contributed to the clarification problematic result from RFLP analysis. Prostate tissue contains of the only one of two alleles of the single nucleotide polymorphism in the first exon of androgen receptor.

The result of RFLP analysis and sequencing was also finding that the occurrence of the allele in one persone is always the same regardless of the type of tumor or non-tumor prostatic tissue.

## **Poděkování**

Velké poděkování patří Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc., vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Děkuji také pracovníkům Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP v Olomouci za vstřícnost během vypracovávání experimentální části. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během studia.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Současný stav řešené problematiky .....	3
3.1	Prostata.....	3
3.1.1	Stavba prostatické tkáně .....	3
3.2	Androgenový receptor .....	4
3.2.1	Struktura androgenového receptoru .....	4
3.2.1.1	N-koncová doména (NTD, N-terminal domain) .....	5
3.2.1.2	DNA-vazebná doména (DBD, DNA-binding domain).....	5
3.2.1.3	„Hinge region“ .....	6
3.2.1.4	Ligand-vazebná doména (LBD, ligand-binding domain) .....	6
3.2.2	Ligandy .....	6
3.2.2.1	Agonisté androgenového receptoru.....	7
3.2.2.2	Antagonisté androgenového receptoru.....	7
3.2.3	Funkce androgenového receptoru.....	8
3.3	Rakovina prostaty .....	9
3.3.1	Androgen deprivační terapie (ADT, androgen deprivation therapy) .....	10
3.3.2	Kastračně-rezistentní rakovina prostaty (CRPC, castration-resistant prostate cancer) .....	11
3.3.2.1	Chemoterapie metastatické kastračně-rezistentní rakoviny prostaty .....	12
3.3.3	Benigní hyperplazie prostaty (BPH, benign prostatic hyperplasia) .....	12
3.4	Polymorfismus androgenového receptoru .....	13
3.4.1	Jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single nucleotide polymorphism).....	14
3.5	Mutace androgenového receptoru.....	15
3.5.1	Mutace v N-terminální doméně.....	16
3.5.2	Mutace v DNA-vazebné doméně a „hinge regionu“ .....	16

3.5.3	Mutace v ligand-vazebné doméně .....	16
4	Materiál a metodika .....	18
4.1	Laboratorní pomůcky a přístroje.....	18
4.2	Použité chemikálie a roztoky .....	19
4.3	Biologický materiál.....	20
4.4	Izolace DNA .....	20
4.5	Příprava vzorků pro PCR amplifikaci.....	21
4.6	Příprava 1,5% agarózového gelu LMP a elektroforéza .....	22
4.7	Izolace DNA z amplifikovaných produktů PCR z agarózového gelu .....	22
4.8	Příprava vzorků pro analýzu RFLP.....	23
4.9	Příprava 3% agarózového gelu .....	24
4.10	Analýza produktů PCR a RFLP .....	24
4.11	Potvrzení jednonukleotidového polymorfismu přímým sekvenováním.....	25
5	Výsledky .....	26
6	Diskuze .....	36
7	Závěr .....	38
8	Literatura.....	39



## Seznam symbolů a zkratek

(CAG) <sub>n</sub>	neurčitý počet repetitivní poly-glutaminové sekvence
(GGC) <sub>n</sub>	neurčitý počet repetitivní poly-glycinové sekvence
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -dihydrotestosteron
A	adenin
Accession no.	identifikační číslo
ADT	androgen deprivace terapie (androgen deprivation therapy)
AF1	aktivační doména 1 (activation function 1)
AF2	aktivační doména 2 (activation function 2)
AR	androgenový receptor (androgen receptor)
ARE	androgen responsivní element (androgen response element)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BPH	benigní hyperplazie prostaty (benign prostate hyperplasia)
C	cytosin
CRPC	kastračně-rezistentní rakovina prostaty (castration-resistant prostate cancer)
DBD	DNA-vazebná doména 1. exonu androgenového receptoru (DNA-binding domain)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
FFPE	parafínová tkáň fixovaná formalínem (formalin-fixed paraffin-embedded)
G	guanin
GnRH	gonadotropin uvolňující hormon (gonadotropin-releasing hormone)
GR	glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor)
H	<i>hinge region</i>
hsp	proteiny tepelného šoku (heat shock proteins)
IGF1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)

KGF	keratinocytový růstový faktor (keratinocyte growth factor)
KLK	kallikrein
LBD	ligand-vazebná doména 1. exonu androgenového receptoru (ligand-binding domain)
LH	luteinizační hormon
LMP	low melting point
NES	jaderný exportní signál (nuclear export signal)
NLS	jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal)
NTD	N-koncová doména 1. exonu androgenového receptoru (N-terminal domain)
PCa	rakovina prostaty (prostate cancer)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PSA	prostatický specifický antigen (prostatic specific antigen)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
rpm	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
SHBG	sexuální hormony vázající globulin (sex hormone-binding domain)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
T	thymín

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Stavba prostatické tkáně .....	4
<b>Obrázek č. 2:</b> Gen pro androgenový receptor lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu X, struktura tohoto genu a struktura proteinu androgenového receptoru .....	6
<b>Obrázek č. 3:</b> Redukce testosteronu na 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron pomocí enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy .....	7
<b>Obrázek č. 4:</b> Mechanismus účinku androgenového receptoru .....	9
<b>Obrázek č. 5:</b> Sekvence nukleotidů 1. exonu androgenového receptoru člověka .....	15
<b>Obrázek č. 6:</b> PCR amplifikace vzorků 11–22 separovaných v 3% agarózovém gelu .....	26
<b>Obrázek č. 7:</b> PCR amplifikace vzorků 11–22 separovaných v 3% agarózovém gelu po přečištění kitem s viditelnými PCR produkty o velikosti 100 bp .....	27
<b>Obrázek č. 8:</b> Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza tkáňových vzorků 1–6, 9 a 10 separovaných v 3% agarózovém gelu .....	28
<b>Obrázek č. 9:</b> Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza DNA izolované ze vzorků tkání 7 a 8 separovaných v 3% agarózovém gelu .....	28
<b>Obrázek č. 10:</b> Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza DNA izolované ze vzorků tkání 1a, 1b, 2a, 2b, 3a a 3b separovaných v 3% agarózovém gelu .....	29
<b>Obrázek č. 11:</b> Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza tkáňových vzorků 11–13, 1 a 14–16 separovaných v 3% agarózovém gelu .....	30
<b>Obrázek č. 12:</b> Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza vzorků tkání 17–20, 5, 21–22 a 6 separovaných v 3% agarózovém gelu .....	31
<b>Obrázek č. 13:</b> Detekovaný triplet GAG metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 12 .....	34
<b>Obrázek č. 14:</b> Detekovaný triplet GAA metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 14 .....	34
<b>Obrázek č. 15:</b> Detekovaný triplet GAA metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 15 .....	35
<b>Obrázek č. 16:</b> Detekovaný triplet GAG metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 17 .....	35

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Jednotlivé složky reakční směsi pro PCR.....	21
<b>Tabulka č. 2:</b> Teplotní a časový profil pro PCR amplifikaci pomocí primerů rs6152S .....	22
<b>Tabulka č. 3:</b> Jednotlivé složky reakční směsi pro analýzu RFLP.....	24
<b>Tabulka č. 4:</b> Detekované alely jednonukleotidového polymorfismu po analýze RFLP u tkáňových vzorků jednotlivých pacientů.....	32
<b>Tabulka č. 5:</b> Detekovaný kodon po sekvenování tkáňových vzorků.....	33

# 1 Úvod

Prostata je přídatná pohlavní žláza, která se nachází pod močovým měchýřem v malé pánvi. Obklopuje močovou trubici a vylučuje sekret, který je součástí ejakulátu. Na vývoji a funkci prostaty se významným způsobem podílejí androgeny, jejichž působení na cílové buňky je prostřednictvím androgenového receptoru.

Androgenový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který spolu s estrogeny, progesteronem, glukokortikoidy a dalšími patří do skupiny jaderných receptorů. Androgenový receptor je klíčovým faktorem pro vznik a růst rakoviny prostaty a je indikátorem úspěšnosti hormonální léčby (Taplin *et Balk*, 2004). Androgenový receptor byl detekován v buňkách na androgenech-závislé rakoviny prostaty, v buňkách na androgenech-nezávislé rakoviny prostaty a také v jejich metastázích (Culig *et al.*, 2000).

Rakovina prostaty je vážným a nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním mužské populace. A protože každým rokem mužů s rakovinou prostaty přibývá, přetrvává zájem hledat nové markery, které by pomohly odhalit rakovinu prostaty již v raném stádiu. Tato práce se zabývá jednonukleotidovým polymorfismem v 1. exonu androgenového receptoru, označovaným rs6152, který je rovněž studován jako potenciální marker tohoto onemocnění. Spočívá v záměně nukleotidu guaninu (G) na třetím místě v tripletu GAG za adenin (A) a podle literárních zdrojů je právě tato záměna spojována s pokročilejším stádiem rakoviny prostaty.

## 2 Cíle práce

- 1) Práce s odbornou literaturou a vypracování literární rešerše na zadané téma.
- 2) Izolace DNA vzorků tkáňových biopsií FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded).
- 3) U každého vzorku amplifikovat úsek 100 bp v 1. exonu androgenového receptoru obsahující SNP (single nucleotide polymorphism).
- 4) Detekce SNP pomocí RFLP (restriction fragment length polymorphism) analýzy a potvrzení přítomného polymorfismu přímým sekvenováním.

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Prostata

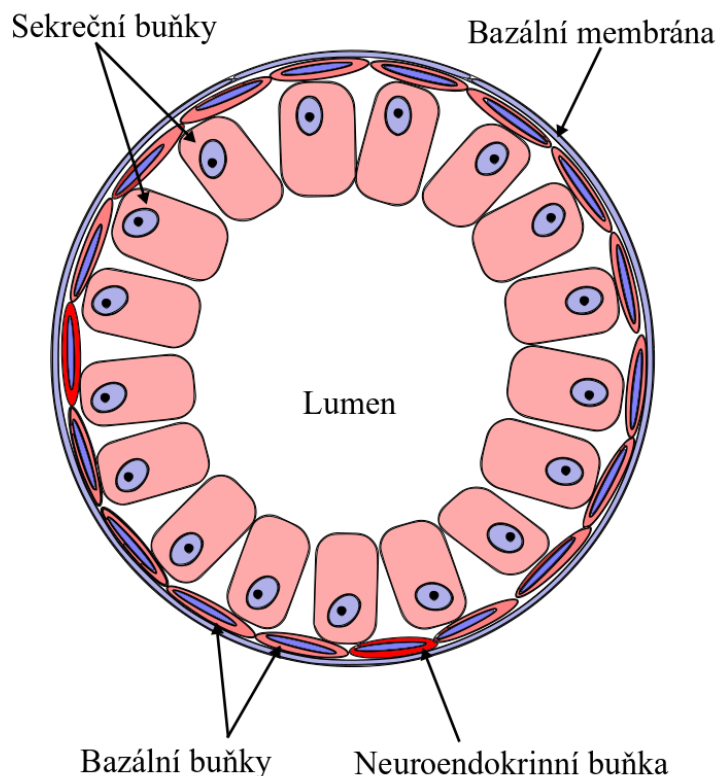
Předstojná žláza, jak je také prostata nazývána, je nepárová přídatná žláza pohlavních cest uložená na bázi močového měchýře v malé pánvi. Močová trubice, procházející prostatou, prostatu rozděluje na přední a zadní část.

Tento orgán je složen z 30–50 tuboalveolárních žláz, které ústí do močové trubice a jsou chráněny vazivem a hladkou svalovinou. Prostatické žlázy produkují alkalický sekret, který je součástí ejakulátu. Sekret obsahuje spermin, kyselou fosfatázu, prostaglandiny, imunoglobuliny, proteázy a další látky, které ovlivňují životaschopnost a pohyblivost spermií a podílí se na neutralizaci kyselé reakce poševní sliznice. Na povrchu je prostata chráněna vazivovým pouzdem.

Se zvyšujícím se věkem dochází k častému zvětšování prostaty a tím i k zužování močové trubice a bolestivému močení. Toto zvětšování je způsobeno zvýšenou přítomností testosteronu, který prostata není schopná odbourávat (Dylevský, 2000).

##### 3.1.1 Stavba prostatické tkáně

Prostatický epitel je složený ze tří odlišných typů buněk – sekrečních, bazálních a neuroendokrinních. Ty lze odlišit na základě morfologie, funkčního významu nebo významu v průběhu karcinogeneze (Abate-Shen *et* Shen, 2000). Sekreční buňky jsou převládající, vysoce diferencované, na androgenu závislé (Bonkhoff *et* Remberger, 1996). Tyto buňky exprimují androgenový receptor (AR, androgen receptor) a specifický prostatický antigen (PSA, prostatic specific antigen). Mezi vrstvou sekrečních buněk a bazální membránou se nachází kontinuální vrstva bazálních buněk. Ty jsou nezávislé na androgenech. Androgenový receptor produkují v malém množství a PSA neprodukují vůbec (Abate-Shen *et* Shen, 2000). Neuroendokrinní buňky se v normální prostatě vyskytují vzácně (Marker *et al.*, 2003). Jsou na androgenu nezávislé, tudíž AR neprodukují (Abate-Shen *et* Shen, 2000).



**Obrázek č. 1:** Stavba prostatické tkáně složené ze sekrečních, bazálních a neuroendokrinních buněk (upraveno dle Abate-Shen *et Shen*, 2000)

## 3.2 Androgenový receptor

Androgenový receptor je člen skupiny steroidních hormonů jaderných receptorů, který funguje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor kontrolující expresi specifických genů (Tsai *et O'Malley*, 1994). Nejvíce AR je exprimováno v cílových tkáních pro androgeny, jako jsou prostata, nadvarlata, nadledviny, kosterní svaly a játra (Gao *et al.*, 2005).

### 3.2.1 Struktura androgenového receptoru

Gen pro AR je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X (Xq11-12). Velikost tohoto genu je přibližně 90 kb a kóduje protein o velikosti 110 kDa složený z 919 aminokyselin (Gelmann, 2002).

Gen se skládá z 8 exonů, přičemž 1. exon kóduje tzv. N-koncovou doménu (NTD, N-terminal domain), 2. a 3. exon kódují DNA-vazebnou doménu (DBD, DNA-binding domain) a 4.–8. exon kódují ligand-vazebnou doménu (LBD, ligand-binding domain).



Část 4. exonu zároveň kóduje tzv. *hinge region* (H), tedy oblast mezi DNA-vazebnou doménou a ligand-vazebnou doménou (Gao *et al.*, 2005).

AR dále obsahuje dvě transkripční domény – aktivační doménu 1 a aktivační doménu 2. Na ligandu nezávislá aktivační doména 1 (AF1, activation function 1) v oblasti NTD je konstitutivně aktivní, nezbytná pro maximální aktivitu AR (Gao *et al.*, 2005; Davey *et Grossmann*, 2016). Na ligandu závislá aktivační doména 2 (AF2, activation function 2), lokalizovaná v LBD, je důležitá pro vazbu ligandů na základě hydrofobních interakcí (He *et al.*, 1999).

### **3.2.1.1 N-koncová doména (NTD, N-terminal domain)**

Oblast N-koncové domény je nejvíce proměnlivá z domén AR (Davey *et Grossmann*, 2016). Její velikost představuje více než polovinu délky AR (Tan *et al.*, 2015). Díky její velké proměnlivosti je androgenovému receptoru umožněno různě vázat koregulátory, které vyvolají jeho specifickou transaktivaci (Simental *et al.*, 1991). Prvních 30 aminokyselin v NTD je podstatných pro interakci amino-terminálního konce s karboxylovým koncem (N/C interakce), která je nezbytná pro správnou aktivaci AR (Callewaert *et al.*, 2003).

Tento úsek je v lidské populaci charakteristický vysokou variabilitou v počtu opakování sekvence CAG (poly-glutamin) nebo sekvence GGC (poly-glycin). Obecně je vyšší počet tzv. repetice popisován sníženou transkripční aktivitou AR a naopak nižší počet repetice jeho zvýšenou transkripční aktivitou (Choong *et al.*, 1996). Počet CAG repetice může také souviset s rizikem vzniku rakoviny prostaty (PCa, prostate cancer) (Choong *et al.*, 1996) a změny v těchto repeticích zřejmě ovlivňují N/C interakce (Irvine *et al.*, 2000).

### **3.2.1.2 DNA-vazebná doména (DBD, DNA-binding domain)**

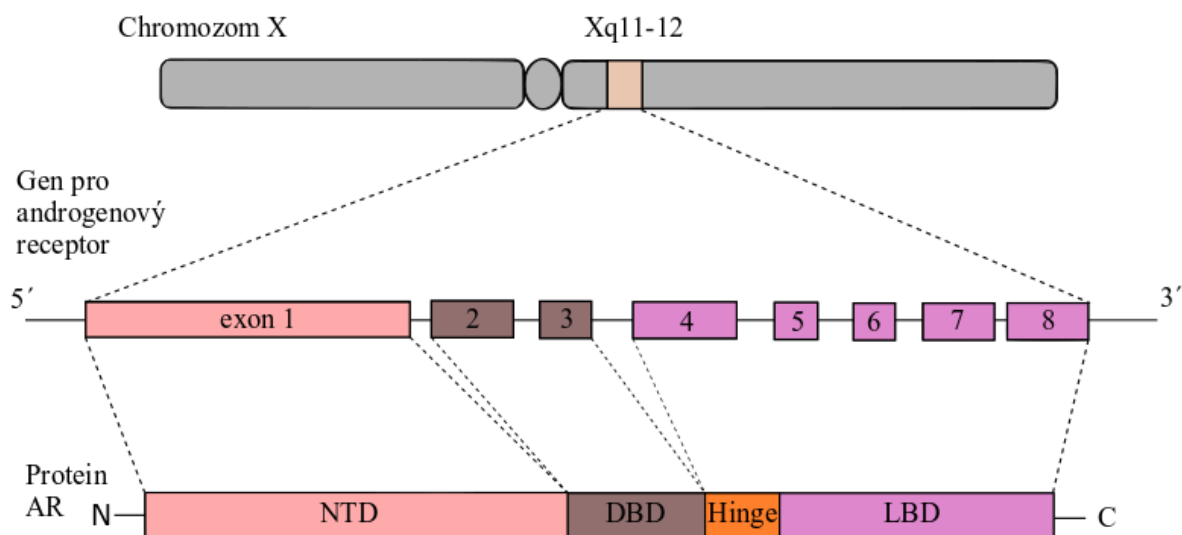
Oblast DNA-vazebné domény je vysoce konzervovaná, bohatá na cystein. Obsahuje 8 cysteinových zbytků, které spolu s aminokyselinami tvoří dva komplexy, tzv. zinkové prsty. Každý zinkový prst sestává ze čtyř cysteinových zbytků, které váží zinečnatý iont (Tan *et al.*, 2015). Tato oblast je důležitá pro vazbu androgenového receptoru na androgen responzivní elementy (AREs, androgen responsive elements) (Shaffer *et al.*, 2004). Druhý zinkový prst také usnadňuje dimerizaci AR a stabilizuje jeho vazbu s DNA (Eisermann *et al.*, 2013).

### 3.2.1.3 „Hinge region“

Mezi DBD a LBD je *hinge region* (H), kde je uložený tzv. jaderný lokalizační signál (NLS, nuclear localization signal), který je zodpovědný za přesun AR receptoru do jádra, a jaderný exportní signál (NES, nuclear export signal) odpovědný za přesun androgenového receptoru zpět do cytoplasmy po předchozí disociaci ligandu (Tan *et al.*, 2015).

### 3.2.1.4 Ligand-vazebná doména (LBD, ligand-binding domain)

LBD je doména zprostředkávající interakci mezi AR a proteiny teplotního šoku (hsp, heat shock proteins) (Heinlein *et al.*, 2002). Je složená z 11  $\alpha$ -závitů a dvou krátkých  $\beta$ -otáček, které jsou uspořádány do tří vrstev a tvoří tzv. antiparalelní  $\alpha$ -helikální sendvič (Gao *et al.*, 2005). Po vazbě ligandu na AR dojde k uzavření této signální molekuly pomocí  $\alpha$ -závitů (Jenster *et al.*, 1991).



**Obrázek č. 2:** Gen pro androgenový receptor lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu X, struktura tohoto genu a struktura proteinu androgenového receptoru (upraveno dle Tan *et al.*, 2015)

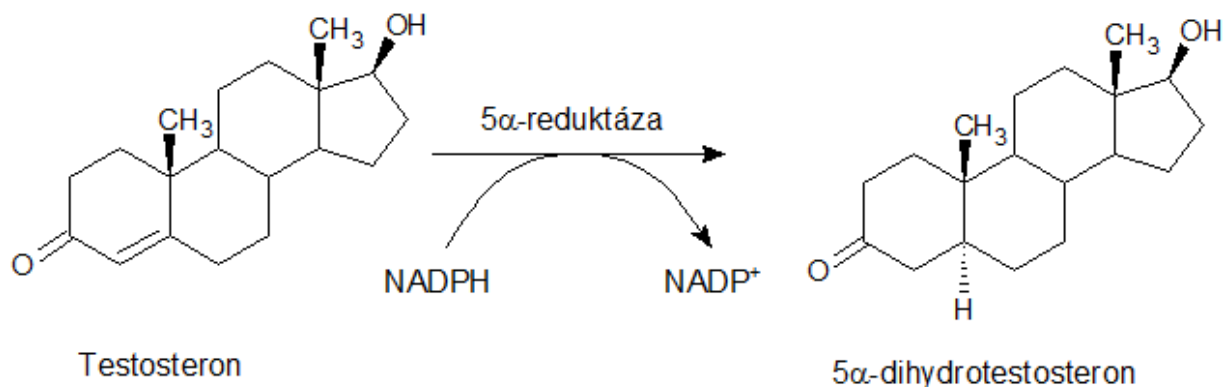
### 3.2.2 Ligandy

Funkcí androgenového receptoru je ligandem indukovaná exprese cílových genů. Na základě schopnosti aktivovat či inhibovat transkripci cílových genů AR lze ligandy rozdělit na agonisty a antagonisty (Tan *et al.*, 2015).

### 3.2.2.1 Agonisté androgenového receptoru

Mezi agonistické ligandy AR řadíme androgeny, konkrétně testosteron a jeho aktivní metabolit 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (5 $\alpha$ -DHT), což jsou pohlavní hormony zodpovědné za vývoj mužského reprodukčního systému. Testosteron je primárně produkován Leydigovými buňkami ve varlatech a jeho syntéza je pod regulací luteinizačního hormonu (LH), který je vylučován adenohypofýzou. Testosteron je také produkován v menší míře kůrou nadledvin, játry a ženskými vaječníky. Z varlat uvolněný testosteron se dočasně váže na plazmatické proteiny. S vysokou afinitou se váže na sexuální hormony vázající globulin (SHBG, sex hormone-binding globulin) a s nízkou afinitou na globuliny. Pouze asi 2 % testosteronu se vyskytují volně (Gao *et al.*, 2005).

V buňce je testosteron převáděn na 5 $\alpha$ -DHT, který je více biologicky aktivní a váže se na AR s vyšší afinitou než testosteron (Grino *et al.*, 1990). Během této přeměny dojde u testosteronu k redukci jedné dvojnásobné vazby v kruhu A, což má za následek dvojnásobné zvýšení afinity k AR a pětinašobné snížení rychlosti disociace z AR (Grino *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 2015). Tato přeměna se děje pomocí enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy a za přítomnosti NADPH a je ireverzibilní (Gao *et al.*, 2005).



Obrázek č. 3: Redukce testosteronu na 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron pomocí enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy

### 3.2.2.2 Antagonisté androgenového receptoru

Antiandrogeny jsou ligandy AR, které soutěží o vazebné místo AR s testosteronem a 5 $\alpha$ -DHT. Mohou být steroidní i nesteroidní povahy a mají terapeutické využití u rakoviny prostaty (Gao *et al.*, 2005). Mezi steroidní antiandrogeny patří cyproteron acetát, spironolakton a oxendolon, které ale často mají nežádoucí vedlejší účinky, a proto je jejich klinická aplikace omezená. V důsledku toho byly vyvinuty nesteroidní antiandrogeny, jako

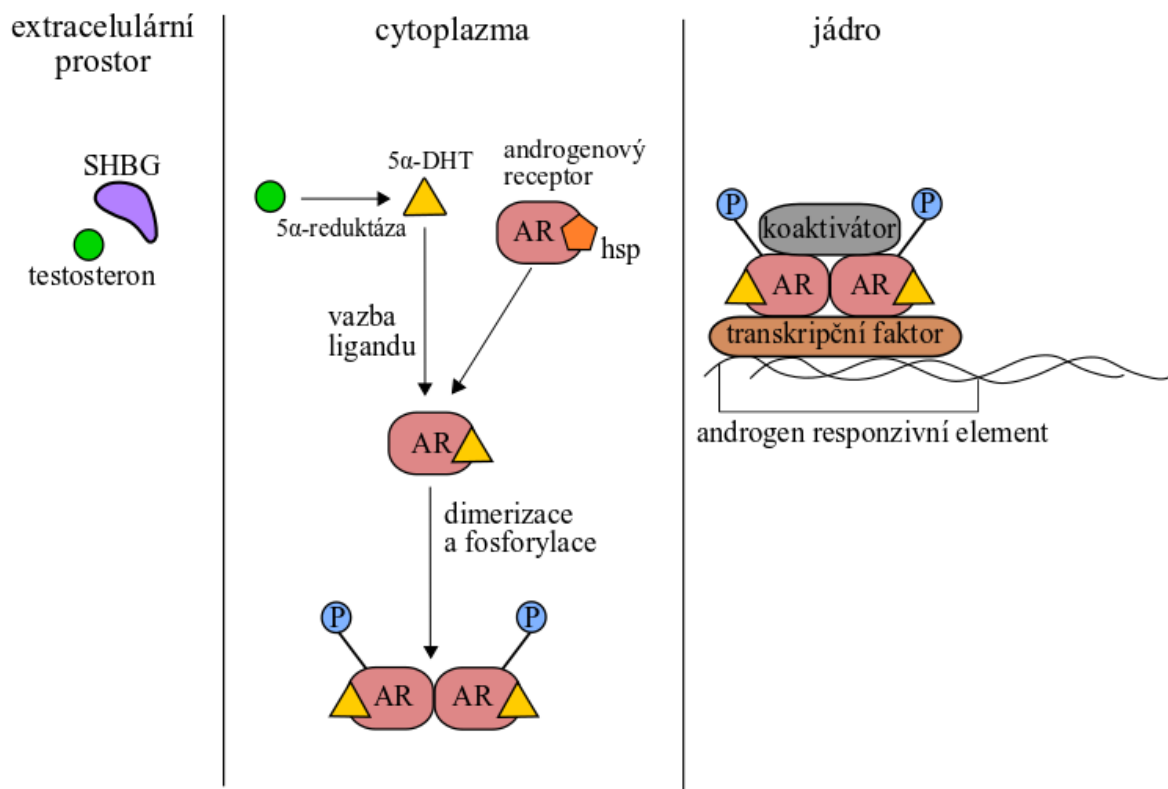
například deriváty toluidinu. Mezi deriváty toluidinu patří flutamid, bicalutamid a nilutamid, což jsou čisté antiandrogeny, které postrádají androgenní vlastnosti (Singh *et al.*, 2000). Tato absence androgenních vlastností je činí vhodnými pro použití k léčbě nejen benigní hyperplazie prostaty (BPH, benign prostatic hyperplasia), ale i rakoviny prostaty (Gao *et al.*, 2005).

### 3.2.3 Funkce androgenového receptoru

Pokud není AR ve vazbě se svým ligandem, je lokalizován v cytosolu stabilizován pomocí proteinů teplotního šoku, hsp90, hsp70 a hsp56 (MacLean *et al.*, 1997), které brání jeho degradaci proteolytickými enzymy (Lukeš *et al.*, 2002). Tyto proteiny jsou nezbytné pro efektivní vazbu ligandu a pro udržení AR v optimální konformaci se schopností reagovat na aktivační signál (Bohen *et Kralli*, 1995).

Po navázání ligandu dochází ke konformačním změnám AR. Nejprve disociuje hsp56 spolu s hsp90 a poté až hsp70, který je vázaný v LBD, a zabraňuje tak interakci AR s DNA (MacLean *et al.*, 1997). Poté dochází k dimerizaci androgenového receptoru, jeho fosforylaci a následnému přemístění z cytosolu do jádra. Uvnitř jádra se receptor váže jako dimer na androgen responsivní elementy, které obsahují šesti-nukleotidovou shodnou sekvenci 5'-TGTTCT-3', v oblasti promotoru nebo zesilovacích (enhancer) oblastech cílových genů (Gao *et al.*, 2005).

Nejznámějším cílovým genem AR je prostatický specifický antigen. PSA, kódovaný genem KLK3, je glykoprotein produkovaný epiteliálními buňkami prostaty, vyskytující se převážně ve spermatu (Lukeš *et al.*, 2002). Patří do rodiny lidských tkáňových kallikreinů, která je složená z 15 genů tandemově uspořádaných na dlouhém raménku chromozomu 19 (19q13.3-13.4) (Yousef *et Diamandis*, 2003). Jeho exprese je regulována pomocí androgenů a je specifická pro prostatickou tkáň (Lukeš *et al.*, 2002).



**Obrázek č. 4:** Mechanismus účinku androgenového receptoru (upraveno dle Feldman *et al.*, 2001)

### 3.3 Rakovina prostaty

Rakovina prostaty dnes patří k významným onkologickým onemocněním s druhou nejvyšší mortalitou v nádorových onemocněních na světě (Jemal *et al.*, 2008). Je známo, že většina onkologických onemocnění je způsobena mnohočetnými mutacemi genů, které obvykle vznikají během stárnutí buněk. Pokud nedojde k aktivaci reparačních procesů, vzniklé nádorové buňky se nekontrolovatelně dělí, což je doprovázeno potlačením apoptózy (Král *et al.*, 2010).

V 80. letech 20. století se začal v klinické medicíně používat PSA jako významný marker časně diagnostiky rakoviny prostaty (Kolombo *et al.*, 2008). Jeho normální sérová hladina se pohybuje v rozmezí 0–4 ng·ml<sup>-1</sup>. Zvýšená hladina PSA v séru může být způsobena právě změnami doprovázejícími vznik rakoviny prostaty, ale také benigní hyperplazií prostaty nebo zánětem prostaty. Přibližně 20 % pacientů s rakovinou prostaty má ale hladinu PSA nižší než hraniční 4 ng·ml<sup>-1</sup>. Dalším problémem při detekci rakoviny prostaty pomocí PSA je jeho nízká specifita k nádorovým změnám v prostatě při hodnotách 4–10 ng·ml<sup>-1</sup> (Lukeš *et al.*, 2002).

Rakovinu prostaty nelze jednoznačně identifikovat pouze na základě sérových hodnot PSA, vždy je nutné na základě těchto hodnot provést další vyšetření, jako je nejčastěji biopsie prostaty (Kolombo *et al.*, 2008).

### 3.3.1 Androgen deprivace (ADT, androgen deprivation therapy)

Podobně jako normální prostatické buňky, i nádorové buňky prostaty vyžadují pro svůj růst a vývoj androgeny a androgenový receptor. Zablokováním androgenů lze docílit poklesu hladiny PSA a následně i zmenšení nádoru, čehož se využívá při léčbě proliferujících stádií rakoviny prostaty (Katolická, 2014). Bylo prokázáno, že odstraněním varlat pomocí orchiektomie dojde k omezení androgenů a s tím souvisejícímu útlumu rakoviny prostaty (Huggins, 1967). Tento léčebný postup je nazýván androgen deprivace (ADT, androgen deprivation therapy). Odstranění varlat je ovšem nevratný proces a vede k impotenci, a proto se nejčastěji provádí u pacientů s rozsáhlými kostními metastázami a rizikem tlaku nádoru na míchu (Debruyne, 2002). Jelikož je rakovina prostaty detekována u čím dál mladších pacientů, kteří jsou fyzicky a sexuálně aktivní, jsou využívány i jiné možnosti androgen deprivace (Kolvenbag *et al.*, 2001).

Jako další možnost ADT je používáno chemické potlačení androgenů pomocí analogů gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH, gonadotropin-releasing hormone) (Palmbos *et Hussain*, 2013). Agonisté GnRH snižují citlivost hypofyzárních receptorů GnRH, čímž dochází ke snížení tvorby LH, což má za následek omezení tvorby testosteronu. Nejprve ale dojde k dočasnému zvýšení hladiny LH, respektive testosteronu (Poppel *et Klotz*, 2012). Dlouhodobá androgen deprivace pomocí agonistů GnRH vede k narušení tvorby testosteronu ve varlatech a sérová koncentrace testosteronu i PSA je nízká dlouhou dobu po ukončení léčby (Pedraza *et Kwart*, 2003).

Na rozdíl od agonistů, antagonisté GnRH přímo potlačují receptor GnRH bez počáteční stimulace GnRH. Nedochozí k přechodnému zvýšení hladiny luteinizačního hormonu ani testosteronu (d'Ancona *et Debruyne*, 2005). V současné době se k androgenní deprivaci používají dva antagonisté, degarelix a abirateron.

Principalle *et al.* (2007) ve své studii srovnávali účinky antagonisty degarelixu s agonistou triptorelinem u potkanů s rakovinou prostaty. U potkanů, kterým byl podáván triptorelin došlo nejprve ke zvýšení hladiny testosteronu, po kterém následovalo jeho snížení až na kastrovační hladinu. Tato kastrovační hladina byla udržována až do ukončení studie.

U potkanů, kterým byl podáván degarelix byly kastroční hladiny testosteronu pozorovány bez předchozího nárůstu jejich hodnot. U takto léčených potkanů byla na konci studie také snížena hmotnost nádoru ve srovnání s potkany léčenými triptorelinem.

### **3.3.2 Kastročně-rezistentní rakovina prostaty (CRPC, castration-resistant prostate cancer)**

Pacienti s pokročilou rakovinou prostaty, kteří jsou léčeni pomocí ADT, mají nižší hladiny jak cirkulujícího testosteronu, tak i PSA a omezený růst rakoviny prostaty. I přes dlouhodobý účinek této léčby, u většiny pacientů nakonec dojde k rezistenci na tuto léčbu a k další progresi rakoviny. Toto stádium se nazývá kastročně-rezistentní rakovina prostaty (CRPC, castration-resistant prostate cancer). CRPC má nízké kastroční hladiny testosteronu, ale zároveň je zvýšená hladina PSA (Cornford *et al.*, 2017). Vznikají nádory lokální i metastazující v kostech, měkkých tkáních a parenchymových orgánech (Matoušková *et Hanuš*, 2014).

Byly popsány čtyři různé mechanismy vedoucí k vývoji CRPC. Jako první možný mechanismus je zvýšená citlivost androgenového receptoru k agonistům (Tan *et al.*, 2015). I přes snížené hladiny androgenů po androgen deprivační terapii je u mnoha pacientů zjištěna zvýšená exprese androgenového receptoru v důsledku amplifikace AR (Koivisto *et al.*, 1997).

Pokud po mutaci AR v LBD došlo ke změně aminokyseliny, je snížena specifita a selektivita AR pro ligandy. Tento androgenový receptor potom váže i jiné steroidní hormony, jako progesteron, estrogény nebo glukokortikoidy, které indukují aktivaci transkripční aktivity AR, což vede k další progresi rakoviny prostaty (Buchanan *et al.*, 2001).

Jako třetí mechanismus vedoucí k rozvoji CRPC může být aktivace androgenového receptoru prostřednictvím mechanismů nezávislých na ligandu (Jenster, 2000). Ligandy, jako například inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF1, insulin-like growth factor 1), keratinocytový růstový faktor (KGF, keratinocyte growth factor) či epidermální růstový faktor (EGF, epidermal growth factor), aktivují kinázové receptory tyrosinu. AR je následně fosforylován například proteinkinázou B nebo mitogenem aktivovanou proteinkinázou, čímž dojde k jeho aktivaci (d'Ancona *et Debruyne*, 2005).

Poslední mechanismus vedoucí k CRPC zcela obchází signální dráhy androgenového receptoru. Růst a přežívání nádorových buněk je řízeno zvýšenou aktivitou anti-apoptického proteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Bcl-2 je proonkogen potlačující apoptózu a u rakoviny

prostaty chrání rakovinné buňky před apoptózou, která vzniká jako důsledek kastrace (Tan *et al.*, 2015). Arora *et al.* (2013) uvádí, že při rozvoji CRPC je zvýšená exprese glukokortikoidního receptoru (GR, glucocorticoid receptor), jako náhrada za androgenový receptor, který aktivuje podobné cílové geny AR, jež jsou nezbytné pro přežití rakovinných buněk.

### **3.3.2.1 Chemoterapie metastatické kastročně-rezistentní rakoviny prostaty**

U pacientů s metastatickým CRPC chemoterapie snižuje sérové hladiny PSA, zmírňuje bolest a zlepšuje kvalitu života. Jedním z používaných chemoterapeutik je mitoxantron užívaný spolu s prednisonem. Medián přežití pacientů užívajících mitoxantron s prednisonem je 16,5 měsíců (Tannock *et al.*, 2004).

Od roku 2004 je pacientům s metastatickým CRPC podáván docetaxel (Berthold *et al.*, 2008). Docetaxel je taxanové cytostatikum, které brání depolymerizaci tubulinu, což má za následek pomalejší přechod z G2 fáze do M fáze buněčného cyklu (Rušarová *et Študentová*, 2017). Standardní dávka docetaxelu je  $75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  každé tři týdny spolu s prednisonem. K nežádoucím účinkům při léčbě docetaxelem patří neutropenie 3. a 4. stupně, průjemy, nevolnost, zvracení či kožní toxicita (Berthold *et al.*, 2008). Medián přežití takto léčených pacientů je 18,9 měsíců (Tannock *et al.*, 2004).

Šest až osm měsíců po ukončení chemoterapie docetaxelem dochází velmi často k nové progresi rakoviny prostaty (Rušarová *et Študentová*, 2017). Jednou z možností další léčby je opětovné použití docetaxelu, což se zdá být úspěšné u pacientů předléčených docetaxelem. Medián prodloužení doby přežití je 13 měsíců (Di Lorenzo *et al.*, 2011). Pacienti, u kterých onemocnění progreduje během léčby docetaxelem nebo bezprostředně po ní mohou být dále léčeni kabazitaxelem s prednisonem nebo mitoxantronem s prednisonem. De Bono *et al.* (2010) srovnávali dobu přežití u pacientů léčených kabazitaxelem a mitoxantronem po předléčení docetaxelem. Podávání kabazitaxelu s prednisonem prodloužilo dobu přežití pacientů o 15 měsíců a užívání mitoxantronu s prednisonem prodloužilo dobu přežití pouze o 12,7 měsíců.

### **3.3.3 Benigní hyperplazie prostaty (BPH, benign prostatic hyperplasia)**

Benigní hyperplazie prostaty je nezhoubné onemocnění prostaty vyskytující se u starších mužů. 50 % mužů nad 60 let a téměř 90 % mužů nad 80 let trpí touto nemocí (Roehrborn *et al.*, 1997). Jedná se o zvětšení prostaty způsobené zvýšeným růstem epiteliálních buněk



(Luo *et al.*, 2001). Takto zvětšená prostata tlačí na močový měchýř, čímž vznikají u mužů poruchy shromažďovací a vyprazdňovací funkce dolních močových cest. Mezi poruchy shromažďovací funkce se řadí časté močení nebo urgentní inkontinence. Poruchy vyprazdňování se projevují slabým proudem moči, přerušovaným močením či pocitem neúplného vyprázdnění (Brodáček *et al.*, 2006).

Možnost léčby BPH je pomocí chirurgického zákroku, který je ale častěji nahrazován medikamentózní terapií, jejímž cílem je zlepšení funkce dolních močových cest a kvality života pacienta (Lukeš *et al.*, 2006). Benigní hyperplazie prostaty není považována za prekursor rakoviny prostaty (Aaron *et al.*, 2016).

### 3.4 Polymorfismus androgenového receptoru

Polymorfismus je charakterizován jako existence dvou a více variant genotypů, přičemž nejméně dvě z těchto variant se vyskytují s četností vyšší než 1 %.

Lidský androgenový receptor obsahuje v 1. exonu dvě oblasti tandemově se opakujících trinukleotidových sekvencí, poly-glutaminovou (CAG)<sub>n</sub> a poly-glycinovou (GGC)<sub>n</sub>. Délka těchto sekvencí zřejmě ovlivňuje transkripční aktivitu AR (Eisermann *et al.*, 2013). Obvyklý počet CAG repetit je 9–29 (Irvine *et al.*, 1995). U vyššího počtu repetit, mezi 38 a 75, byla popsána spojitost s výskytem bulbospinální svalové atrofie, tzv. Kennedyho nemoci (Spada *et al.*, 1991). Počet repetit vyšších jak 28 je spojen s poruchami spermatogeneze a neplodností (Tut *et al.*, 1997). Jiné studie uvádějí souvislost kratšího úseku tandemových CAG s rakovinou prostaty, benigní hyperplazií prostaty a se zvýšeným obsahem minerálů v kostech (Giovannucci *et al.*, 1999; Rajender *et al.*, 2007; Tirabassi *et al.*, 2013).

Abnormální délka úseku s tripletem CAG je také ve vztahu s etnickou příslušností. U Afričanů se počet repetit CAG pohybuje mezi 18–20 (Platz *et al.*, 2000; Zitzmann *et al.*, 2003), u kavkazské populace je průměrný počet repetit 21–22 (Platz *et al.*, 2000; Ferlin *et al.*, 2004) a u Asiatů je to 22–23 repetit (Platz *et al.*, 2000). Jak uvádí Coetzee *et al.* (1994) u Afričanů se zdá být díky nižšímu počtu repetit vyšší riziko vzniku rakoviny prostaty.

Počet tandemově se opakujících tripletů GGC se obvykle pohybuje v rozmezí 10–35 repetit, nejčastější počet je 23 opakování u zdravých mužů (Delli *et al.*, 2014). Podle Ding *et al.* (2005) může být nižší počet repetit příčinou zvýšené transkripční aktivity AR.

Počet repetice GGC ve vztahu k etnické příslušnosti uvádí Kittles *et al.* (2001) rozmezí 4–24 repetice u Afričanů, 4–20 repetice u Afroameričanů, 2–20 repetice u Evropských Američanů a 10–16 repetice u Asiatů.

### **3.4.1 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single nucleotide polymorphism)**

Jednonukleotidový polymorfismus znamená záměnu jednoho nukleotidu v sekvenci DNA. Tyto změny lze detekovat průměrně každých 200–300 bází a nachází se jak v exonech, tak i v intronech genů. SNP se často vyskytuje v regulačních oblastech, což má za následek změny v genové expresi (Benešová *et al.*, 2007).

Mezi poly-glutaminovou a poly-glycinovou sekvencí v 1. exonu androgenového receptoru se nachází jednonukleotidový polymorfismus rs6152, označovaný také jako G1733A nebo E211 G>A. Tento SNP spočívá v záměně nukleotidu guaninu (G) za adenin (A) na třetím místě tripletu GAG bez změny kódované aminokyseliny (Hayes *et al.*, 2005). Tento SNP se často spojuje s dědičnou ztrátou vlasů u mužů, tzv. androgenní alopecií (Hillmer *et al.*, 2005). Kromě toho byla zjištěna možná souvislost mezi přítomností alely A a sníženým rizikem výskytu metastáz u rakoviny prostaty (Hayes *et al.*, 2005).



I když se mutace v raných stádiích rakoviny prostaty vyskytují vzácně, u pacientů s CRPC jsou detekovány v 10–30 % případech (Wallén *et al.*, 1999; Taplin *et al.*, 2003). Většina mutací v prostatických nádorových buňkách jsou jednonukleotidové substituce, které způsobují buď ztrátu funkce AR, nebo jeho zvýšenou aktivitu. I přes to, že 1. exon kóduje více než polovinu proteinů AR, 45 % mutací je detekováno v LBD a pouze 30 % v NTD (Gottlieb *et al.*, 2012).

### 3.5.1 Mutace v N-terminální doméně

Mutace v této oblasti představují třetinu všech mutací v AR. Do roku 2012 bylo zaznamenáno 42 jednonukleotidových mutací u PCa (Gottlieb *et al.*, 2012). Dvě mutace v aminokyselinách byly zjištěny u pacientů s CRPC (Chen *et al.*, 2005). Jedna z nich byla objevena u aminokyseliny 142, kdy došlo k záměně glycinu za valin, a druhá u aminokyseliny 221, u které byl substituován aspartát za histidin. Dále bylo u těchto dvou mutací zjištěno méně CAG repetice, což je spojováno s vyšším rizikem rozvoje rakoviny prostaty (Chen *et al.*, 2005).

### 3.5.2 Mutace v DNA-vazebné doméně a „hinge regionu“

V této oblasti je zaznamenáno nejméně mutací u pacientů s rakovinou prostaty. Do roku 2012 bylo popsáno pouze 10 jednonukleotidových substitucí – 7 v oblasti DBD a 3 v *hinge regionu* (Gottlieb *et al.*, 2012). Tyto mutace narušují vazbu AR na DNA, vazby koregulačních proteinů a také jaderný export, což může ovlivnit jeho transkripční aktivitu (Black *et Paschal*, 2004).

Jedna z těchto sedmi mutací, pozorovaná u pacientů trpících CRPC, spočívá v záměně aminokyseliny treoninu na pozici 575 za alanin, což má za následek slabší transkripční aktivitu AR. Ve stejném mutantním transkriptu byla také nalezena stejná záměna treoninu za alanin na pozici 877 v LBD, která umožňuje aktivaci AR abnormálními ligandy, jako jsou kortizol či 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron (Monge *et al.*, 2006).

### 3.5.3 Mutace v ligand-vazebné doméně

V ligand-vazebné doméně AR se vyskytuje nejvíce mutací v rámci androgenového receptoru. Jsou popsány čtyři oblasti citlivé na mutace. Oblast aminokyselin 670–678, která se nachází na rozhraní *hinge regionu* a LBD, a oblasti mezi aminokyselinami 701–730, 741–763 a 872–910 (Bergerat *et Ceraline*, 2009).

Somatické mutace v ligand-vazebné doméně vedou ke snížení specifity AR k jiným hormonům, jako jsou progesteron, estrogeny či adrenální steroidy, a ovlivňují afinitu ligandu i vazbu koregulatorů (Feldman *et* Feldman, 2001).

Kvůli rozdílné lokalizaci a charakteru substitucí, mutace v ligand-vazebné doméně pozmění ligandem indukovanou změnu konformace androgenového receptoru, což má za následek změny v N/C interakci, ligand-vazebné afinitě a interakci s koaktivátory (Bergerat *et* Ceraline, 2009).

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Laboratorní pomůcky a přístroje**

0,2ml a 1,5ml mikrokumavky (Eppendorf)

Analytické váhy R200D (Sartorius)

Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)

Digitální váha 440-33N (Kern)

DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan)

Elektroforetická komora Easycast B1A (Thermo Scientific)

Chladicí stojan

Inkubátor Dry Bath MD-02N (Major Science)

Inkubovaná třepačka s chlazením TS-100C (Biosan)

Laboratorní digestoř M/900 M2 (Merci)

Li-Cor Odyssey<sup>®</sup> Fc Imaging Systém (LI-COR)

Mikrocentrifuga Multi-spin PCV-3000 (Grant-Bio)

Mikropipety (Eppendorf, Gilson)

Mikrovlnná trouba MO 17 MW (Gorenje)

NanoDrop<sup>™</sup> 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)

Plovací stojan

Spectrafuge<sup>™</sup> Mini C1301-B (Labnet)

Thermal Cycler C1000<sup>™</sup> (Bio-Rad)

UV transiluminátor EB-20 (Ultra-Lum)

Vodní lázeň WNB (Mettler)

Vortex mixer PV-1 (Grant-Bio)

Zdroj elektrického proudu MP-300N (Major Science)

## 4.2 Použité chemikálie a roztoky

1x TAE elektroforetický pufr (10 ml 50x TAE pufr, doplněno do 500 ml sterilní deionizovanou vodou)

50x TAE elektroforetický pufr (121 g Tris base; 28,6 ml ledové kyseliny octové; 50 ml roztoku EDTA 0,5 mol·l<sup>-1</sup>, pH 8,0; doplněno do 500 ml sterilní deionizovanou vodou)

6x Orange Loading Dye Solution, R0631 (Fermentas)

96% ethanol

Agaróza Low melting point, A9414 (Sigma-Aldrich)

Agaróza Wide range/Standard 3:1, A7431 (Sigma-Aldrich)

Deionizovaná voda

Ethidium bromid 100 mg (Amresco)

FitAmp Paraffin Tissue Section DNA Isolation Kit, P-1009-1 (Epigentek)

Isopropanol

Primery rs6152S/F a rs6152S/R (Sigma-Aldrich)

QIAquick Gel Extraction Kit, 28706 (QIAgen)

Restrikční enzym *StuI* 10 000 U·ml<sup>-1</sup>, R0187S (BioLabs)

Standard molekulové hmotnosti 100 bp DNA Ladder 500 µg·ml<sup>-1</sup>, N3231L (BioLabs)

TP 2x Master Mix (150 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C); 40 mmol·l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,4 mol·l<sup>-1</sup> trehalóza; 2 mol·l<sup>-1</sup> 1,2-propandiol; 5 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 400 µmol·l<sup>-1</sup> dATP; 400 µmol·l<sup>-1</sup> dCTP; 400 µmol·l<sup>-1</sup> dGTP; 400 µmol·l<sup>-1</sup> dTTP; Tween 20; Taq DNA polymeráza (50 U·ml<sup>-1</sup>); stabilizátory a aditiva), T602 (Top-Bio)

### 4.3 Biologický materiál

Pro experimentální část bylo použito 28 archivovaných vzorků tkáňové biopsie pacientů s nádorovým onemocněním prostaty. Tkáňové vzorky byly fixované formalínem a zalité do parafinu. Z 28 analyzovaných vzorků bylo 17 vzorků bez bližší specifikace tkáně benigní nebo nádorové, v tabulce č. 4 označeno jako smíšené (PCa/BPH), u 4 vzorků byla patologem určena a mikrodisekcí získána tkáň typu BPH a u 7 vzorků byl stejným postupem izolován úsek tkáně nádorové (PCa).

### 4.4 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byl použit kit FitAmp Paraffin Tissue Section DNA Isolation Kit. Postup byl proveden podle protokolu od výrobce Epigentek.

K roztoku PS2 (Dna Digestion Powder) bylo přidáno 0,5 ml roztoku PS1 (DNA Digestion Solution). Směs byla promíchána na Vortexu, dokud nebyla čirá. Řezy bioptické tkáně o velikosti  $15 \mu\text{m}^2$  byly umístěny do 1,5ml mikrozkušavek a do každé bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku PS3 (DNA Isolation Buffer). Tkáňové řezy byly inkubovány při teplotě  $95^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Po krátkém promíchání na Vortexu a minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo do mikrozkušavek přidáno 10  $\mu\text{l}$  směsi inhibitorů proteáz PS1/PS2. Následovala inkubace za současného třepání po minimální dobu 90 minut při teplotě  $65^\circ\text{C}$ . Po inkubaci byla tkáňová suspenze krátce promíchána na Vortexu a bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku PS4 (DNA-Binding Buffer). Směs byla centrifugována při otáčkách 12 000 rpm po dobu 1 minuty. Vzniklý čirý roztok s DNA ve spodní části zkumavky byl přepipetován do kolony umístěné v 2ml mikrozkušavce a centrifugován při otáčkách 12 000 rpm po dobu 30 sekund. Po odstranění nečisté frakce a zachycení DNA ve filtru kolony bylo za účelem získání čisté DNA přidáno 200  $\mu\text{l}$  70% ethanolu a mikrozkušavky byly centrifugovány při otáčkách 12 000 rpm po dobu 30 sekund. Následně bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  90% ethanolu a opět centrifugováno při otáčkách 12 000 rpm po dobu 30 sekund. Po odstranění nečisté frakce bylo znovu přidáno 200  $\mu\text{l}$  90% ethanolu a centrifugováno při otáčkách 12 000 rpm po dobu 45 sekund. Kolona byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky a přímo na filtr kolony bylo napipetováno 15  $\mu\text{l}$  roztoku PS5 (DNA Elution Solution). Po centrifugaci při otáčkách 12 000 rpm po dobu 20 sekund byla změřena koncentrace a čistota získané DNA. DNA byla uchována v zamraženém stavu při teplotě  $-20^\circ\text{C}$ .



## 4.5 Příprava vzorků pro PCR amplifikaci

Pro PCR amplifikaci úseku o velikosti 100 bp byly použity primery 6152S/F (5'-AAC AGC AGC AGG AAG CAG TAT C-3') a 6152S/R (5'-GTG CCC CCT AAG TAA TTG TCC T-3').

Po celou dobu přípravy reakce PCR se pracovalo v ochranných latexových rukavicích. PCR box pro přípravu PCR byl před zahájením práce vyzářen UV světlem po dobu 10 minut. Chemikálie pro PCR reakci byly po uskladnění v -20 °C temperovány při pokojové teplotě, promíchány pomocí Vortexu, krátce stočeny na minicentrifuze a vloženy do chladicího stojanu. Do 0,2ml mikrozkušavek umístěných v chladicím stojanu byly napipetovány jednotlivé chemikálie v pořadí jak je uvedeno v tabulce č. 1. Vzorek DNA byl do reakční směsi pipetován na odlišném místě, než kde se pracovalo s ostatními komponenty pro přípravu PCR reakce. Po smíchání všech komponentů byla směs promíchána na Vortexu, krátce stočena na minicentrifuze a vložena do termocykleru.

**Tabulka č. 1:** Jednotlivé složky reakční směsi pro PCR

Složky reakční směsi	Množství pro 1 reakci [ $\mu$ l]	Negativní kontrola množství pro 1 reakci [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	9,5	10,5
TP 2x Master Mix	12,5	12,5
Primer rs6152S/F [ $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	1	1
Primer rs6152S/R [ $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	1	1
DNA [10 ng]	1	-
Celkový objem	25	25

PCR amplifikace s primery rs6152S probíhala podle programu TP57 s Hot-startem (tabulka č. 2). Hot-start zabraňuje tvorbě primerových dimerů a spočívá ve vložení vzorků do termocykleru až po předehřátí na 94 °C. Prvním krokem byla počáteční denaturace dvouvláknové DNA při 94 °C po dobu 10 minut. Tento cyklus probíhal pouze jednou. Následovala denaturace při 94 °C po dobu 10 vteřin, nasedání primerů při teplotě 57 °C po dobu 10 vteřin a syntéza DNA při 72 °C po dobu 20 vteřin. Tyto tři kroky probíhaly v 38 cyklech.

**Tabulka č. 2:** Teplotní a časový profil pro PCR amplifikaci pomocí primerů rs6152S

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	10:00	1
Denaturace	94	00:10	38
Nasedání primerů	57	00:10	
Syntéza DNA	72	00:20	

#### 4.6 Příprava 1,5% agarózového gelu LMP a elektroforéza

Elektroforetická komůrka byla oblepena páskou a byly do ní vsazeny hřebínky. K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 1,2 g agarózy LMP (low melting point). Tato směs byla zahřata v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Po zchladnutí gelové suspenze na přibližně 60 °C bylo přidáno 1,6 ml 50x TAE pufru a 8 µl ethidium bromidu. Takto připravená gelová suspenze byla vylita do elektroforetické komůrky a ponechána 30 minut ke ztuhnutí. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vaničky obsahující 1x TAE pufr.

Do krajní jamky v gelu byly napipetovány 3 µl standardu molekulové hmotnosti 100 bp DNA ladderu. K 50 µl PCR produktu bylo přidáno 8 µl barvicího roztoku 6x Orange Loading Dye Solution a tato suspenze byla nanášena do jamek gelu.

Komůrka byla uzavřena víkem a byl zapojen zdroj elektrického napětí s nastavením 55 V. Po hodině byla elektroforéza vypnuta a vyhodnocena pomocí UV transiluminátoru.

#### 4.7 Izolace DNA z amplifikovaných produktů PCR z agarózového gelu LMP

DNA izolovaná ze vzorků 11–22 (tabulka č. 4) byla použita pro amplifikaci úseku 100 bp s výše uvedenými primery v objemu 50 µl reakční směsi PCR, což byl dvojnásobný objem reakce PCR oproti obvyklým 25 µl (tabulka č. 1). Po elektroforetické separaci produktů PCR v agarózovém gelu LMP byly skalpelem vyřezány fragmenty odpovídající velikostně 100 bp.

Pro izolaci DNA z gelových fragmentů byl použit kit QIAquick Gel Extraction Kit. Postup byl proveden podle protokolu od výrobce QIAGEN.

Gelové fragmenty s DNA o velikosti 100 bp byly vloženy do předem zvážených 1,5ml mikrozkupek. Mikrozkupek byly opět zváženy. Do mikrozkupek bylo přidáno objemové množství pufru QG odpovídající trojnásobné hmotnosti vyřezaného gelového fragmentu s DNA. Mikrozkupek s gelovými fragmenty byly inkubovány při teplotě 50 °C

po dobu 10 minut za občasného promíchání na Vortexu. Následně bylo přidáno stejné objemové množství isopropanolu, jako byla hmotnost vyřezaného gelového fragmentu s DNA. Tato suspenze byla přenesena do kolony umístěné v 2ml mikrokumavce a centrifugována po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm. DNA byla zachycena ve filtru kolony a po přidání 0,5 ml pufru QG proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm. K přečištění DNA bylo přidáno 0,75 ml pufru PE s následnou centrifugací po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm. Po odstranění proteklé kapaliny byla opět provedena centrifugace po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm. Následně byla kolona vložena do čisté 1,5ml mikrokumavky a na filtr kolony bylo přidáno 25 µl pufru EB. Po centrifugaci po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm byla změřena koncentrace a čistota získané DNA. DNA byla zamrazena a uchovávána při teplotě -20 °C.

Získaná DNA byla použita pro opakovanou reakci PCR s primery rs6152S a následnou amplifikaci PCR produktu o velikosti 100 bp. Objem reakční směsi pro PCR byl 25 µl (tabulka č. 1).

#### **4.8 Příprava vzorků pro analýzu RFLP**

K restrikčnímu štěpení byla použita restrikční endonukleáza *StuI*, která rozpoznává hexanukleotidovou palindromatickou sekvenci 5'-AGGCCT-3'. Pokud je guanin na třetí pozici kodonu GAG zaměněn za adenin, restrikční endonukleáza toto místo nerozpozná a nerozštěpí.

Chemikálie pro analýzu RFLP byly promíchány pomocí Vortexu a následně krátce stočeny na minicentrifuze. Jednotlivé komponenty pro RFLP byly pipetovány do 1,5ml mikrokumavek v pořadí podle tabulky č. 3. Mikrokumavky s reagenty byly uzavřeny pomocí parafilmu a vloženy do předem vyhřátého termobloku s teplotou 37 °C na dobu 1,5 hodiny.

**Tabulka č. 3:** Jednotlivé složky reakční směsi pro analýzu RFLP

Složky reakční směsi	Množství pro 1 reakci [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	5
10x NEBuffer	1
Restrikční enzym <i>StuI</i>	1
PCR produkt	3
Celkový objem	10

#### 4.9 Příprava 3% agarózového gelu

Elektroforetická komůrka byla oblepena páskou a byly do ní vsazeny hřebínky. K 30 ml deionizované vody bylo přidáno 0,9 g agarózy Wide range/Standard 3:1. Tato směs byla zahřata v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Po zchladnutí gelové suspenze bylo přidáno 0,6 ml 50x TAE pufru a 3  $\mu$ l ethidium bromidu. Gelová suspenze byla vylita do elektroforetické komůrky a ponechána 30 minut ke ztuhnutí. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vaničky obsahující 1x TAE pufr.

#### 4.10 Analýza produktů PCR a RFLP

Do krajní jamky v gelu byly napipetovány 3  $\mu$ l standardu molekulové hmotnosti 100 bp DNA ladderu. K 5  $\mu$ l PCR produktu byl přidán 1  $\mu$ l barvicího roztoku 6x Orange Loading Dye Solution a tato suspenze byla nanášena na gel.

K 10  $\mu$ l produktu analýzy RFLP byly přidány 2  $\mu$ l barvicího roztoku. Po promíchání a následném stočení na minicentrifuze bylo z této směsi odebráno 5  $\mu$ l a nanášeno na gel.

Komůrka byla uzavřena víkem a byl zapojen zdroj elektrického napětí s nastavením 55 V. Po hodině byla elektroforéza vypnuta a vyhodnocení bylo provedeno pomocí přístroje Li-Cor.

#### **4.11 Potvrzení jednonukleotidového polymorfismu přímým sekvenováním**

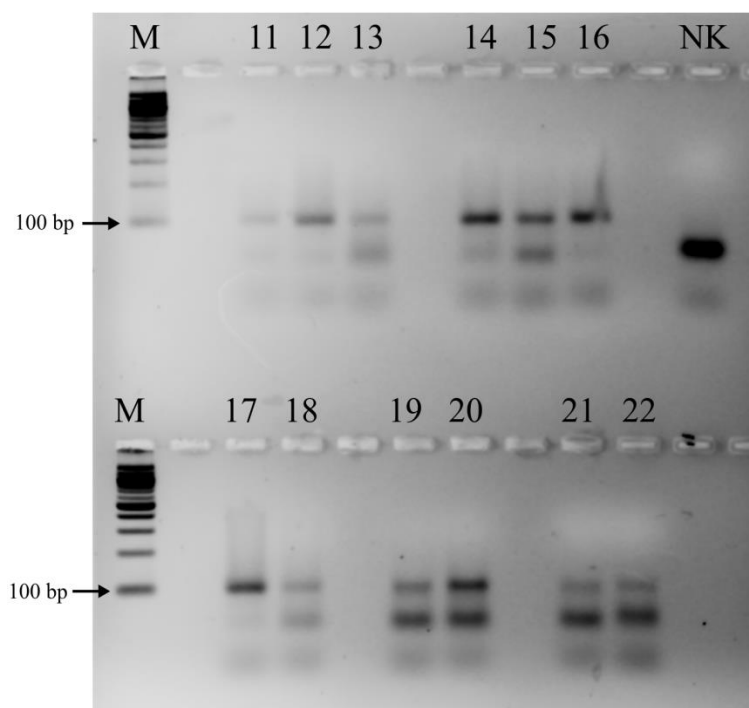
DNA izolovaná z tkáňových vzorků 11, 12, 14, 15, 17 a 18 byla poslána Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v. v. i., v Praze, kde bylo provedeno sekvenování těchto vzorků. Výsledky sekvenační analýzy byly zpracovány v programu Chromas.

## 5 Výsledky

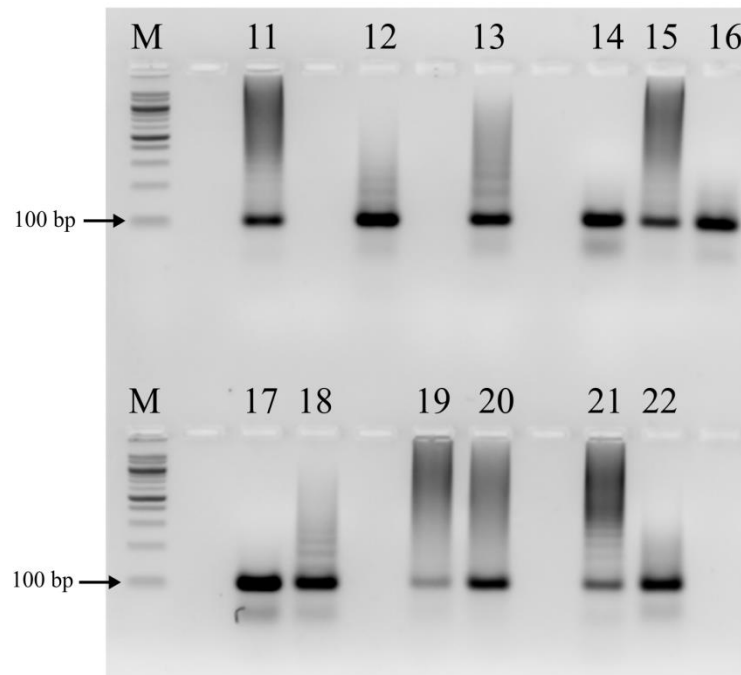
Cílem experimentální části bakalářské práce bylo detekovat jednonukleotidový polymorfismus androgenového receptoru pomocí analýzy RFLP a jeho potvrzení přímým sekvenováním.

Pro experiment bylo použito 28 archivovaných vzorků tkáňové biopsie od 11 pacientů s nádorovým onemocněním prostaty. Z těchto vzorků FFPE bylo 17 vzorků označeno jako smíšené (PCa/BPH), 4 vzorky jako benigní hyperplazie prostaty (BPH) a 7 vzorků jako rakovina prostaty (PCa).

U vzorků 11–22 byly skalpelem vyřezány gelové fragmenty s amplifikovanou DNA o velikosti 100 bp (obrázek č. 6). DNA izolovaná z vyřezaných gelových fragmentů byla znovu použita pro druhou PCR amplifikaci úseků dlouhých 100 bp (obrázek č. 7). U těchto vzorků byly po první PCR amplifikaci a následné elektroforetické separaci v 3% agarózovém gelu viditelné PCR artefakty (obrázek č. 6).



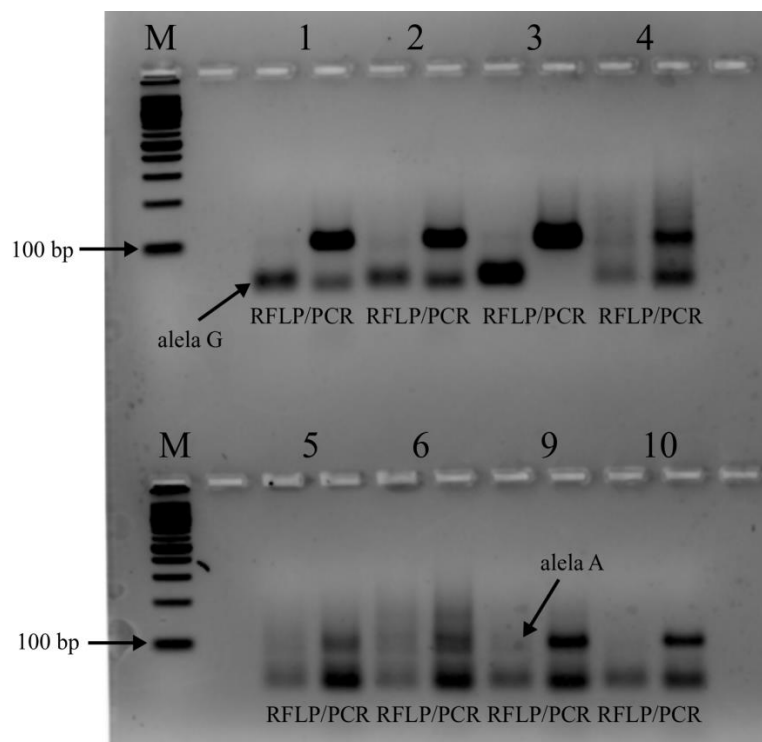
**Obrázek č. 6:** PCR amplifikace vzorků 11–22 separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 11–22 vzorky amplifikované DNA; NK – negativní kontrola



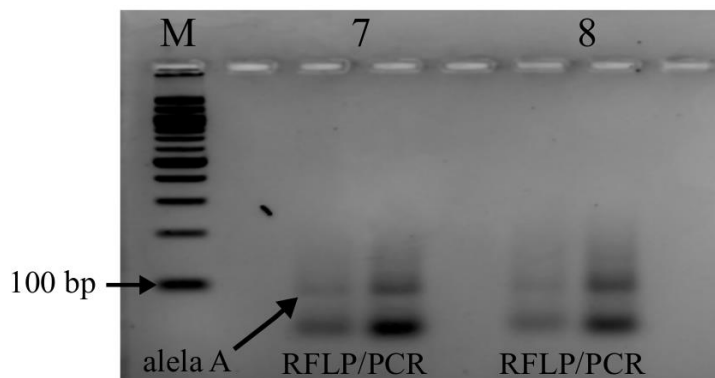
**Obrázek č. 7:** PCR amplifikace vzorků 11–22 separovaných v 3% agarózovém gelu po přečištění kitem s viditelnými PCR produkty o velikosti 100 bp. M – marker molekulové hmotnosti; 11–22 vzorky amplifikované DNA

S amplifikovanou DNA byla dále provedena analýza RFLP pomocí restričního enzymu *StuI*. Štěpené (RFLP) i neštěpené (PCR) produkty byly separované v 3% agarózovém gelu a vizualizovány pomocí přístroje Li-Cor. Od každého vzorku byl vedle sebe nanesen vždy produkt po RFLP a (neštěpený) PCR produkt. Pokud byl produkt po RFLP rozštěpen restričním enzymem *StuI*, byly detekovány dva fragmenty dlouhé 50 bp. Amplifikovaný 100bp úsek DNA tedy obsahoval ve štěpném místě enzymu *StuI* 5'-AGGCCT-3' nepolymorfni GAG kodon. Štěpené produkty PCR byly detekovány u vzorků DNA pacientů 9207/05, 14968/08, 22341/08, 14504/09, 22708/04, 2013/05 a 3225/09.

Pokud amplifikovaný úsek DNA obsahoval ve štěpném místě 5'-AGGCCT-3' kodon GAA, restriční enzym *StuI* toto místo nerozštěpil a na elektroforetogramu byly viditelné produkty analýzy RFLP i neštěpené PCR produkty o jednotné velikosti 100 bp. Neštěpené produkty analýzy RFLP byly detekovány u vzorků DNA pacientů 23016/04, 548/05, 5742/05 a 12022/09.

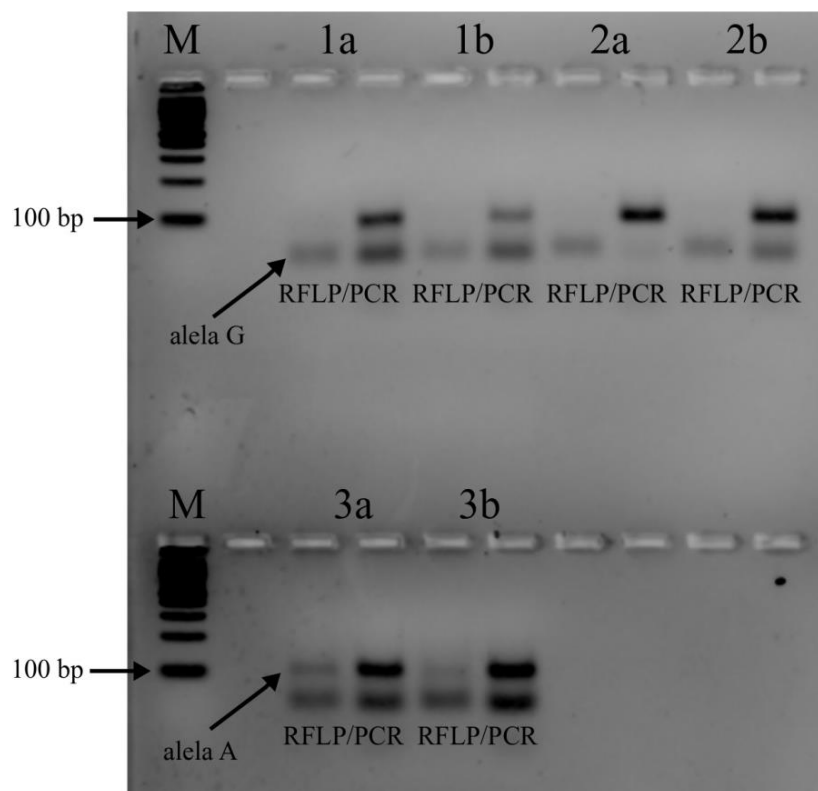


**Obrázek č. 8:** Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza tkáňových vzorků 1–6, 9 a 10 (PCa/BPH) separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 1 a 2 – tkáňové vzorky pacienta 9207/05; 3 – vzorek tkáně pacienta 14968/08; 4 – vzorek tkáně pacienta 22341/08; 5 – vzorek tkáně pacienta 14504/09; 6 – vzorek tkáně pacienta 23016/04; 9 – vzorek tkáně pacienta 12022/09; 10 – vzorek tkáně pacienta 3225/09

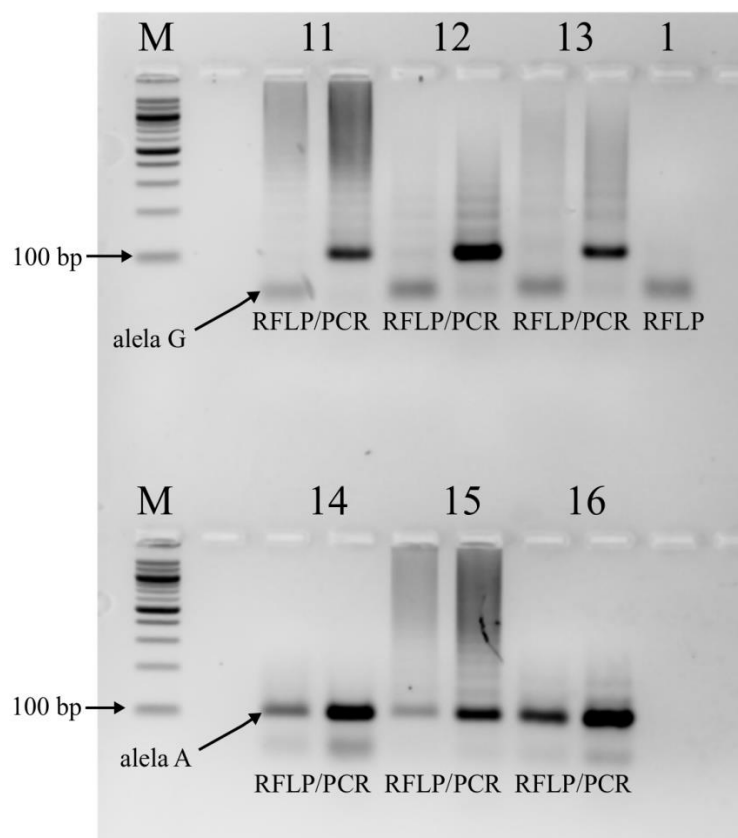


**Obrázek č. 9:** Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza DNA izolované ze vzorků tkání 7 a 8 (PCa/BPH) separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 7 – vzorek tkáně pacienta 548/05; 8 – vzorek tkáně pacienta 5742/05

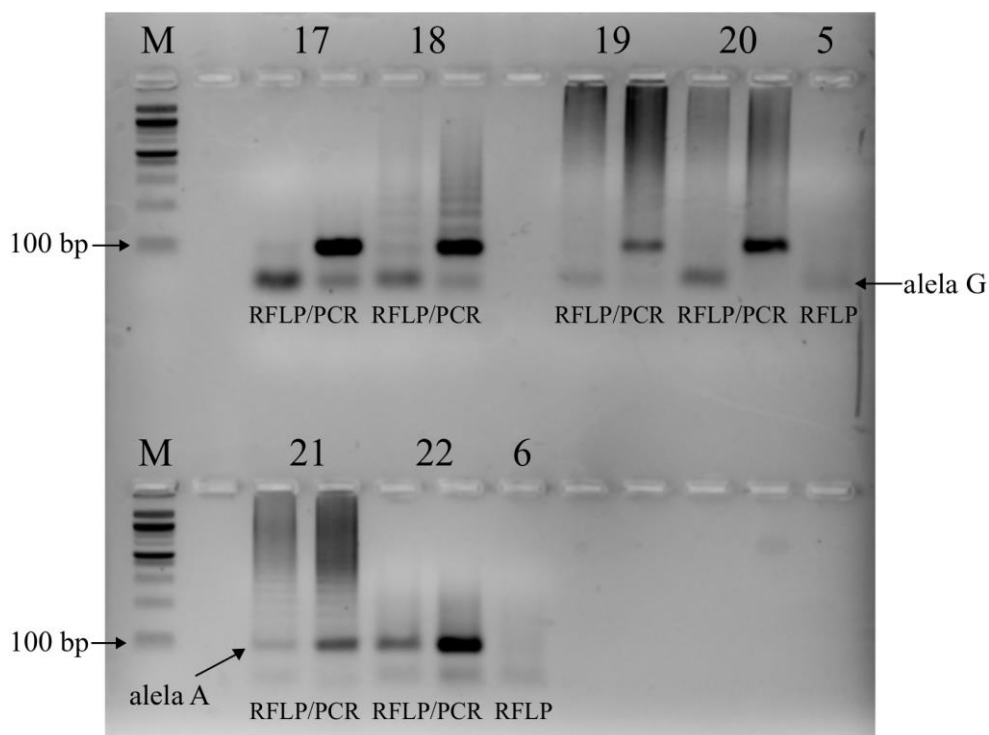




**Obrázek č. 10:** Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza DNA izolované ze vzorků tkání 1a, 1b, 2a, 2b, 3a a 3b (PCa/BPH) separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 1a a 1b – tkáňové vzorky pacienta 22708/04; 2a a 2b – tkáňové vzorky pacienta 2013/05; 3a a 3b – tkáňové vzorky pacienta 23016/04



**Obrázek č. 11:** Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza tkáňových vzorků 11–13, 1 a 14–16 separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 11 (BPH), 12 (PCa), 13 (PCa), 1 (PCa/BPH) – tkáňové vzorky pacienta 9207/05; 14 (PCa/BPH), 15 (PCa), 16 (PCa) – tkáňové vzorky pacienta 12022/09



**Obrázek č. 12:** Produkty PCR amplifikace a RFLP analýza vzorků tkání 17–20, 5, 21–22 a 6 separovaných v 3% agarózovém gelu. M – marker molekulové hmotnosti; 17 (BPH) a 18 (PCa) – tkáňové vzorky pacienta 22341/08; 19 (BPH), 20 (PCa), 5 (PCa/BPH) – tkáňové vzorky pacienta 14504/09; 21 (PBH), 22 (PCa), 6 (PCa/PBH) – tkáňové vzorky pacienta 23016/04

Ze 17 smíšených vzorků (PCa/BPH) byla u 9 vzorků detekována alela G a u 7 vzorků detekována alela A. Celkově byla u 6 pacientů detekována alela G a u 4 pacientů alela A, jelikož bylo od několika pacientů zařazeno více smíšených tkáňových vzorků. U vzorků PCa byla detekována alela G ve třech případech, stejně tak tomu bylo u alely A. Z celkového počtu byla alela G detekována u dvou pacientů s PCa. Alela A byla detekována také u dvou pacientů s PCa. U pacientů s BPH byla ve dvou případech detekována alela G a pouze v jednom případě alela A. U pacienta 22341/08 nebylo možné na základě analýzy RFLP přesně určit, zda se u něj vyskytuje alela G nebo alela A, a to ve všech třech typech tkáňových vzorků.

V tabulce č. 4 jsou uvedeny údaje o pacientech včetně detekovaných alel jednonukleotidového polymorfismu na základě analýzy RFLP u jednotlivých tkáňových vzorků.

**Tabulka č. 4:** Detekované alely jednonukleotidového polymorfismu po analýze RFLP u tkáňových vzorků jednotlivých pacientů

Číslo pacienta	Diagnóza	Tkáňový vzorek	Detekovaná alela
9207/05	PCa/BPH	1	G
	PCa/BPH	2	G
	BPH	11	G
	PCa	12	G
	PCa	13	G
14968/08	PCa/BPH	3	G
22341/08	PCa/BPH	4	G/A
	BPH	17	G/A
	PCa	18	G/A
14504/09	PCa/BPH	5	G
	BPH	19	G
	PCa	20	G
23016/04	PCa/BPH	6	A
	PCa/BPH	3a	A
	PCa/BPH	3b	A
	BPH	21	A
	PCa	22	A
22708/04	PCa/BPH	1a	G
	PCa/BPH	1b	G
2013/05	PCa/BPH	2a	G
	PCa/BPH	2b	G
548/05	PCa/BPH	7	A
5742/05	PCa/BPH	8	A
12022/09	PCa/BPH	9	A
	PCa/BPH	14	A
	PCa	15	A
	PCa	16	A
3225/09	PCa/BPH	10	G

Vysvětlivky: PCa – rakovina prostaty, BPH – benigní hyperplazie prostaty, G – guanin, A - adenin

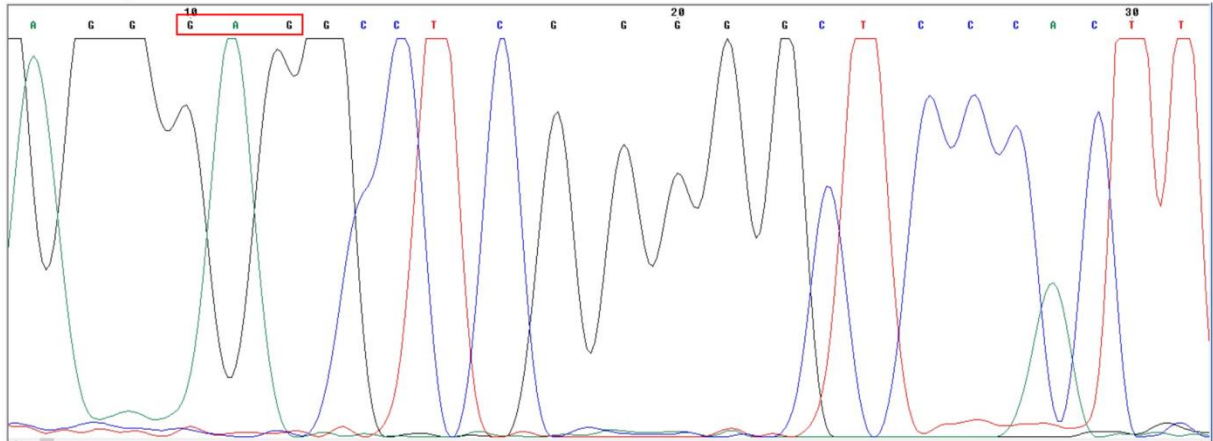
Izolovaná DNA z tkáňových vzorků 11, 12, 14, 15, 17 a 18 byla sekvenována ve Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v. v. i., v Praze. U sekvenovaných vzorků 11 a 12 (obrázek č. 13) byla potvrzena přítomnost nepolymorfního kodonu GAG ve štěpném místě enzymu *StuI* 5'-AGGCCT-3'. U sekvenovaných vzorků 14 (obrázek č. 14) a 15 (obrázek č. 15) byla zjištěna přítomnost kodonu GAA. U těchto vzorků byla pomocí analýzy RFLP detekována alela A, která tak byla potvrzena sekvenováním. U sekvenovaných vzorků 17 (obrázek č. 16) a 18 byl detekován nepolymorfní kodon AGG, i když z analýzy RFLP (obrázek č. 12) nebylo zcela jasné, o jakou alelu (G/A) se jedná. Výsledky sekvenování jsou shrnuty v tabulce č. 5.

**Tabulka č. 5:** Detekovaný kodon po sekvenování tkáňových vzorků

Číslo pacienta	Diagnóza	Sekvenovaný tkáňový vzorek	Detekovaný triplet	Detekovaná alela po RFLP
9207/05	BPH	11	GAG	G
	PCa	12	GAG	G
12022/09	PCa/BPH	14	GAA	A
	PCa	15	GAA	A
22341/08	BPH	17	GAG	G/A
	PCa	18	GAG	G/A

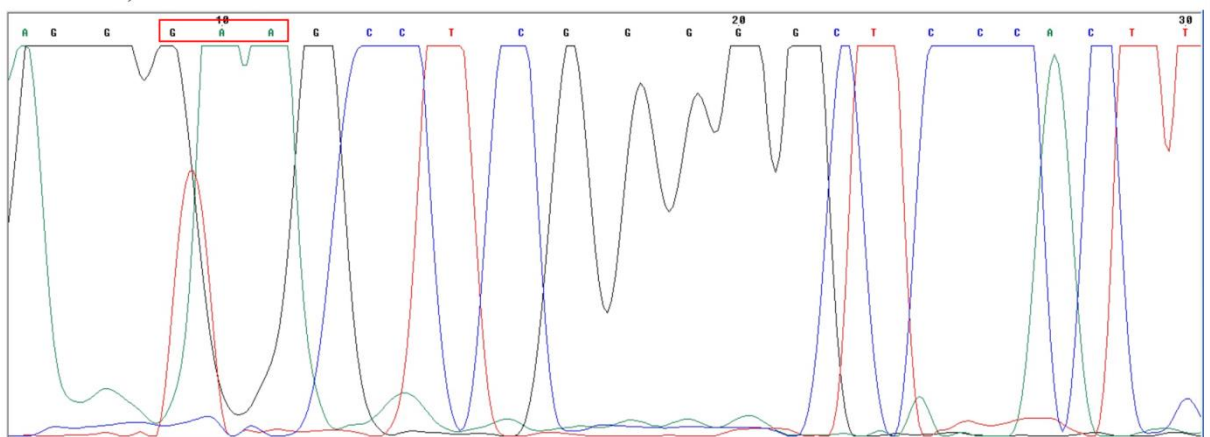
Vysvětlivky: PCa – rakovina prostaty, BPH – benigní hyperplazie prostaty, G – guanin, A - adenin

vzorek 12, směr sekvenování 5'→3'



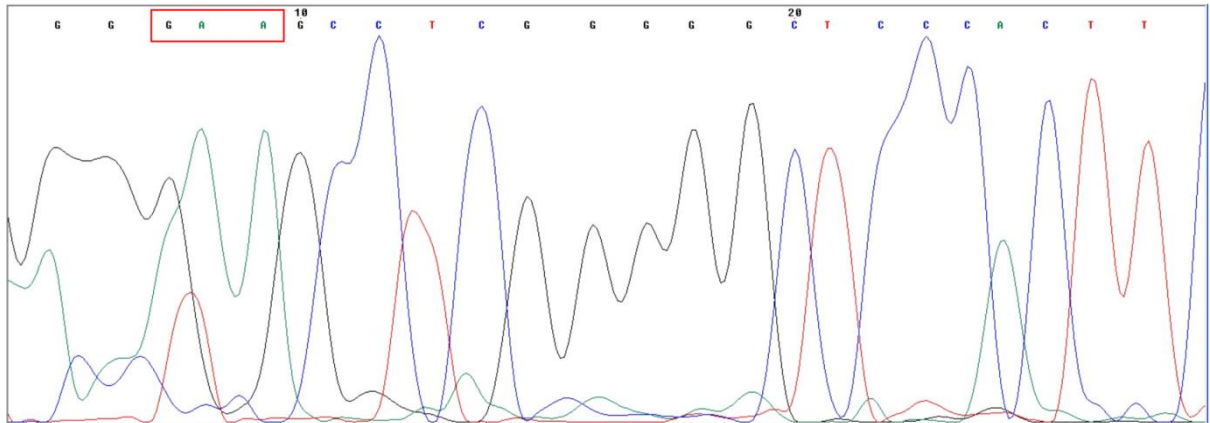
**Obrázek č. 13:** Detekovaný triplet GAG metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 12. A – adenin; G – guanin; C – cytosin; T – thymin; červeně je vyznačený detekovaný triplet GAG

vzorek 14, směr sekvenování 5'→3'



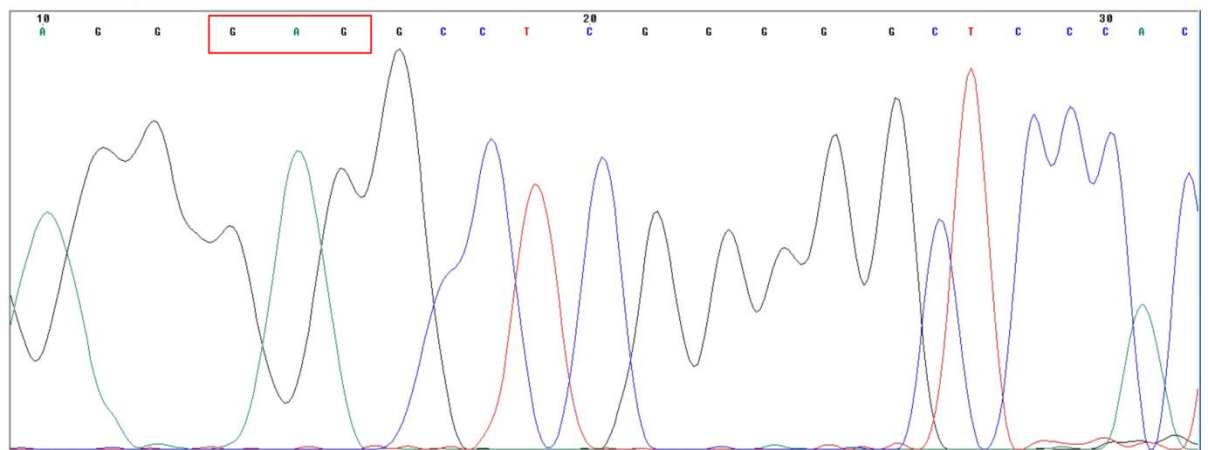
**Obrázek č. 14:** Detekovaný triplet GAA metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 14. A – adenin; G – guanin; C – cytosin; T – thymin; červeně je vyznačený detekovaný triplet GAA

vzorek 15, směr sekvenování 5'→3'



**Obrázek č. 15:** Detekovaný triplet GAA metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 15. A – adenin; G – guanin; C – cytosin; T – thymin; červeně je vyznačený detekovaný triplet GAA

vzorek 17, směr sekvenování 5'→3'



**Obrázek č. 16:** Detekovaný triplet GAG metodou přímého sekvenování ve směru 5'→3' u tkáňového vzorku 17. A – adenin; G – guanin; C – cytosin; T – thymin; červeně je vyznačený detekovaný triplet GAG

## 6 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo detekovat jednonukleotidový polymorfismus rs6152 v 1. exonu androgenového receptoru, který je studován pro možné spojení s rizikem vzniku rakoviny prostaty.

Pro experiment bylo vybráno 11 pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním prostaty. U těchto pacientů bylo použito celkem 28 vzorků tkáňových biopsií (FFPE), z nichž u sedmi vzorků byla patologem určena oblast nádorové tkáně a u čtyř vzorků byla lokalizována tkáň typu benigní hyperplazie prostaty. Ze zbývajících 17 vzorků, bez předcházející lokalizace typu tkáně, byly získány tkáňové řezy, které byly označeny jako smíšené tkáňové vzorky rakoviny prostaty a benigní hyperplazie prostaty.

Jelikož je gen pro androgenový receptor uložen na chromozomu X, u mužů neexistuje druhá kopie a vždy by měla být detekována pouze jedna alela. U tkáňových vzorků deseti testovaných pacientů byla detekovaná jedna stejná alela. Pouze u pacienta 22341/08 nebylo možné po analýze RFLP přesně určit, o kterou alelu se jedná. Po sekvenační analýze těchto vzorků metodou přímého sekvenování produktů PCR byla potvrzena přítomnost pouze alely G (tabulka č. 5). Stejný problém sporné interpretace výsledků RFLP byl popsán v práci Durdáková (2014), která za příčinu problému považovala izolaci DNA ze vzorků FFPE bez ohledu na typ prostatické tkáně. Z tohoto důvodu v této bakalářské práci následovala po analýze RFLP metoda přímého sekvenování produktů PCR.

V této práci byl u tkáňových vzorků 14 (PCa/BPH) a 15 (PCa) pacienta 12022/09 (tabulka č. 4 a č. 5) po sekvenační analýze detekován polymorfni kodon GAA potvrzující přítomnost alely A. U polymorfismu rs6152 se ovšem záměnou alely G za alelu A na třetím místě kodonu nemění kódovaná aminokyselina. U pacienta 9207/05 byla pomocí sekvenační analýzy potvrzena detekce nepolymorfniho kodonu GAG (alela G) u obou testovaných vzorků PCa a BPH (tabulka č. 4 a č. 5). Potenciální přítomnost obou alel v testovaných vzorcích PCa, BPH a PCa/BPH u pacienta 22341/08 po analýze RFLP (tabulka č. 4) tak byla vyvrácena použitím přesnější metody přímého sekvenování produktů PCR (tabulka č. 5). Z těchto výsledků vyplývá, že prostatická tkáň pacienta v různém stadiu rakoviny prostaty je nositelem vždy jen jedné ze dvou alel polymorfismu rs6152.

Durdáková (2014) a Robles-Fernandez (2017) neprokázali, že tento SNP 1. exonu AR, který spočívá v záměně alely G za alelu A, souvisí se zvýšeným rizikem rakoviny prostaty.



V bakalářské práci Durdáková (2014) byla sledována četnost výskytu obou alel u 52 vzorků FFPE, u nichž byl specifikován typ odebrané tkáně – nádorová tkáň prostaty a nenádorová tkáň (normální tkáň, benigní hyperplazie prostaty a prostatická intraepiteliální neoplazie). Četnost alely A byl vyšší u nádorové prostatické tkáně než u tkáně nenádorové. Statistické vyhodnocení dle Pearsona ukázalo slabou korelaci 0,08 v případě alely G mezi tkání nádorovou a nenádorovou, zatímco v případě alely A byl výsledek 0,12, přičemž hodnota 0 znamená žádnou korelaci. Výsledek tak naznačoval vyšší, i když neprůkaznou souvislost mezi výskytem alely A a typem prostatické tkáně.

Hayes *et al.* (2005) popsal významnou spojitost mezi přítomností alely A a sníženým rizikem vzniku metastazujících stádií rakoviny prostaty. Studie uvádí výrazně nižší četnost alely A u rakoviny prostaty ve stádiu metastáz, než u méně pokročilých stádií tohoto onemocnění. V této bakalářské práci byl u 11 pacientů detekován přibližně stejný počet jedinců s alelou G a alelou A. Na rozdíl od předcházejících studií byl v této práci zvolen jiný přístup k analýze tkáňových vzorků. Detekce polymorfních alel nebyla prováděna u souboru tkáně nádorové a nenádorové od maximálního počtu pacientů, ale byly použity vzorky FFPE od 11 testovaných pacientů (tabulka č. 4), u nichž byl patologem určen typ nádorové a nenádorové (benigní hyperplazie prostaty) tkáně.

Výsledkem analýzy RFLP a sekvenování bylo zjištění, že výskyt alely je u jedince vždy shodný bez ohledu na typ nádorové nebo nenádorové prostatické tkáně. Jelikož byla detekována vždy stejná alela u sledovaných typů nádorové a nenádorové tkáně konkrétního pacienta, nelze potvrdit souvislost výskytu alely A s rakovinou prostaty.

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo detekovat jednonukleotidový polymorfismus v 1. exonu androgenového receptoru, označovaný rs6152, G1733A nebo také E211 G>A, u DNA izolované z tkáňových vzorků biopsií od pacientů s diagnostikovanou rakovinou prostaty, které byly fixovány formalínem a zality do parafinu.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na stavbu a funkci androgenového receptoru, rakovinu prostaty a popis polymorfismu v 1. exonu androgenového receptoru.

V experimentální části byl jednonukleotidový polymorfismus rs6152 detekován pomocí polymerázové řetězové reakce a analýzy RFLP z 28 tkáňových vzorků FFPE od 11 pacientů s rakovinou prostaty. U vzorků FFPE byl diagnostikován úsek nebo oblast prostatické tkáně odpovídající typu benigní hyperplazie prostaty, rakovině prostaty a kromě toho byly použity vzorky FFPE bez bližší specifikace tkáně benigní či nádorové. Polymorfní alela A byla detekována u 11 tkáňových vzorků, alela G byla přítomna v 17 tkáňových vzorcích. Z celkového počtu 11 pacientů byla polymorfní alela A detekována u čtyř pacientů.

Potenciální přítomnost obou alel v testovaných vzorcích PCa a BPH po analýze RFLP byla vyvrácena použitím přesnější metody přímého sekvenování produktů PCR, a to detekcí nepolymorfní alely G. U dvou vzorků s detekovanou alelou A po analýze RFLP byl po sekvenování nalezen kodon GAA, potvrzující tak přítomnost alely A. Sekvenováním a detekcí kodonu GAG byla u vzorků PCa a BPH od jednoho pacienta potvrzena nepolymorfní alela G. Výsledkem experimentální části této bakalářské práce je zjištění, že prostatická tkáň pacienta v různém stadiu rakoviny prostaty je nositelem vždy jen jedné ze dvou alel sledovaného jednonukleotidového polymorfismu v 1. exonu androgenového receptoru.

Na rozdíl od předcházejících studií byl v této práci zvolen jiný přístup k analýze tkáňových vzorků. Detekce polymorfních alel nebyla prováděna u souboru tkáně nádorové a nenádorové od nekonkrétního počtu pacientů, ale byly použity vzorky FFPE od 11 testovaných pacientů, u nichž byl specifikován typ prostatické tkáně. Výsledkem analýzy RFLP a sekvenování bylo zjištění, že výskyt alely je u jedince vždy shodný bez ohledu na typ nádorové nebo nenádorové prostatické tkáně.

## 8 Literatura

- Aaron L. T., Franco O. E., Hayward S. W. (2016): Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North America* 43: 279–288.
- Abate-Shen C., Shen M. M. (2000): Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* 14: 2410–2434.
- Arora V. K., Schenkein E., Murali R., Subudhi S. K., Wongvipat J., Balbas M. D., Shah N., Cai L., Efstathiou E., Logothetis Ch., Zheng D., Sawyers Ch. L. (2013): Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* 155: 1309–1322.
- Benešová L., Fantová L., Heráček J., Urban M., Sachová J., Minárik M. (2007): Frekvence výskytu vrozených DNA polymorfizmů genů syntetické dráhy testosteronu v české populaci pacientů s karcinomem prostaty. *Česká urologie* 11: 80–84.
- Bergerat J. P., Ceraline J. (2009): Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Human Mutation* 30: 145–157.
- Berthold D. R., Pond G. R., Soban F., De Wit R., Eisenberger M., Tannock I. F. (2008): Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: update survival in the TAC 327 study. *Journal of Clinical Oncology* 26: 242–245.
- Black B. E., Paschal B. M. (2004): Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends in Endocrinology* 15: 411–417.
- Bohen S. P., Kralli A. (1995): Hold 'em and fold 'em: Chaperones and signal transduction. *Science* 268: 1303–1304.
- Bonkhoff H., Remberger K. (1996): Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: A stem cell model. *Prostate* 28: 98–106.
- Brinkmann A. O. (2001): Molecular basis of androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179: 105–109.
- Brod'ák M. M., Holub M. L. (2006): Farmakoterapie benigní hyperplazie prostaty – prevence, účinné preparáty, nežádoucí účinky. *Urologie pro praxi* 7: 210–213.

- Buchanan G., Greenberg N. M., Scher H. I., Harris J. M., Marshall V. R., Tilley W. D. (2001): Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clinical cancer research* 7: 1273–1281.
- Callewaert L., Christiaens V., Haelens A., Verrijdt G., Verhoeven G., Claessens F. (2003): Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 46–52.
- Coetzee G. A., Ross R. K. (1994): Prostate cancer and the androgen receptor. *Journal of National Cancer Institution* 86: 872–873.
- Cornford P., Bellmunt J., Bolla M., De Santis M., Gross T., Henry A. M., Joniau S., Lam T. B., Mason M. D., van der Poel H. G., van der Kwast T. H., Rouviere O., Wiegel T., Mottet N. (2017): EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of relapsing, metastatic and castration-resistant prostate cancer. *European Urology* 71: 630–642.
- Culig Z., Hobisch A., Bartsch G., Klocker H. (2000): Androgen receptor – an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urological Research* 28: 211–219.
- d’Ancona F. H., Debruyne F. J. (2005): Endocrine approaches in the therapy of prostate carcinoma. *Human Reproduction Update* 11: 309–317.
- Davey R.A., Grossmann M. (2016): Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *Clinical Biochemist Reviews* 37: 3–15.
- De Bono J. S., Oudard S., Ozguroglu M., Hansen S., Jean-Pascal M., Kocak I., Gravis G., Bodrogi I., Mackenzie M. J., Shen L., Roessner M., Gupta S., Sartor A. O. (2010): Fast track – Article: Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantron efor metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment. *The Lancet* 376: 1147–1154.
- Debruyne F. (2002): Hormonal therapy of prostate cancer. *Seminars in Urologic Oncology* 20: 4–9.
- Delli Muti N., Agarwal A., Buldreghini E., Gioia A., Lenzi A., Boscaro M., Balercia G. (2014): Have androgen receptor gene CAG and GGC repeat polymorphisms an effect on sperm motility in infertile men?. *Andrologia* 46: 564–569.

- Di Lorenzo G., Buonerba C., Faiella A., Roscigno P., Rizzo M., Autorino R., Pedrona S., Riccardi N., Scaglorini S., Scognamiglio F., Masala D., Ferro M., Palmieri G., Aieta M., Marinelli A., Altieri V., De Placido S., Carteni G. (2011): Phase II study of docetaxel retreatment in docetaxel-pretreated castration-resistant prostate cancer. *BJU International* 107: 234–239.
- Ding D., Xu L., Menon M., Reddy G. P. V., Barrack E. R. (2005): Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 62: 133–139.
- Durd'áková M. (2014): Polymorfismus 1. exonu androgenového receptoru v tkáňových vzorcích pacientů s nádorem prostaty. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Dylevský I., Mrázková O., Druga R. (2000): Orgány mužského pohlavního ústrojí – organa genitalia masculina. In: *Funkční anatomie člověka*, pp. 390–391, Grada Publishing, Praha (ISBN 8071696811).
- Eisermann K., Wang D., Jing Y., Pascal L. E., Wang Z. (2013): Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Translational Andrology and Urology* 2: 137–147.
- Feldman B. J., Feldman D. (2001): The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 1: 34–45.
- Ferlin A., Bartoloni L., Rizzo G., Roverato A., Garolla A., Foresta C. (2004): Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Molecular Human Reproduction* 10: 417–421.
- Gao W., Bohl C. E., Dalton J. T. (2005): Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Division of Pharmaceutics. Chemical reviews* 105: 3352–3370.
- Gelmann E. P. (2002): Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology* 20: 3001–3015.
- Giovannucci E., Platz E. A., Stampfer M. J., Chan A., Krithivas K., Kawachi I., Willett W. C., Kantoff P. W. (1999): The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 53: 121–125.
- Gottlieb B., Beitel L. K., Nadarajah A., Paliouras M., Trifiro M. (2012): The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation* 33: 887–894.

- Grino P. B., Griffin J. E., Wilson J. D. (1990): Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126: 1165–1172.
- Hayes V. M., Eggleton S. A., Padilla E. J. D., Sutherland R. L., Severi G., Giles G. G., Southey M. C., Hopper J. L. (2005): The E211 GA androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenic alopecia. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 14: 993–996.
- He B., Wilson E. M., Kempainen J. A., Voegel J. J., Gronemeyer H. (1999): Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH<sub>2</sub>-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry* 274: 37219–37225.
- Heinlein C. A., Chang C. (2002): Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews* 23: 175–200.
- Hillmer A. M., Hanneken S., Ritzmann S., Becker T., Freudenberg J., Brockschmidt F. F., Flaquer A., Freudenberg-Hua Y., Jamra R. A., Metzen Ch., Heyn U., Schweiger N., Betz R. C., Blaumeiser B., Hampe J., Schreiber S., Schulze T. G., Hennies H. CH., Schumacher J., Propping P., Ruzicka T., Cichon S., Wienker T. F., Kruse R., Nöthen M. M. (2005): Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenic alopecia. *The American Journal of Human Genetics* 77: 140–148.
- Huggins Ch. (1967): Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Research* 27: 1925–1930.
- Chen G., Wang X., Lu Y., Zhang J., Li Z., Lu J., Zhang S., Sun Y. (2005): Androgen receptor mutants detected in recurrent prostate cancer exhibit diverse functional characteristics. *Prostate* 63: 395–406.
- Choong C. S., Kempainen J. A., Zhou Z. X., Wilson E. M. (1996): Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Molecular Endocrinology* 10: 1527–1535.
- Irvine R. A., Coetzee G. A., Ma H., Stallcup M. R., Yu M. C., Ross R. K. (2000): Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Human Molecular Genetics* 9: 267–274.

- Irvine R. A., Coetzee G. A., Yu M. C., Ross R. K. (1995): The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer research* 55: 1937–1940.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M. J. (2008): Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 58: 71–96.
- Jenster G (2000): Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *The Journal of Pathology* 191: 227–228.
- Jenster G., van der Korput H. A., van Vroonhoven C., van der Kwast T. H., Trapman J., Brinkmann A. O. (1991): Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Molecular Endocrinology* 5: 1396–1404.
- Katolická J. (2014): Hormonální léčba karcinomu prostaty. *Onkologie* 8: 228–230.
- Kittles R. A., Young D., Weinrich S., Hudson J., Argyropoulos G., Ukoli F., Adams-Campbell L., Dunston G. M. (2001): Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Human Genetics* 109: 253–261.
- Koivisto P., Kononen J., Palmberg C., Tammela T., Hyytinen E., Isola J., Trapman J., Cleutjens K., Noordzij A., Visakorpi T., Kallioniemi O. P. (1997): Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer research* 57: 314–319.
- Kolombo I., Poršová M., Zemanová I., Horecký M., Antonová P., Vlášek T., Porš J., Poněšický J., Bartůněk M. (2008): Prostatický specifický antigen (PSA) – situace v roce 2007. *Onkologie* 2: 39–43.
- Kolvenbag G. J. C. M., Iversen P., Newling D. W. W. (2001): Antiandrogen monotherapy: a new form of treatment for patients with prostate cancer. *Urology* 58: 16–22.
- Král M., Vyhnánková V., Študent V., Bouchal J. (2010): Genetické riziko karcinomu prostaty. *Česká urologie* 14: 139–147.
- Lukeš M. M., Záleský M. M., Urban D. M. M. (2006): Nové trendy v konzervativní léčbě benigní hyperplazie prostaty. *Urologie pro praxi* 7: 12–14.

- Lukeš M., Záleský M., Heráček J., Kuncová J., Urban M., Zachoval R., Mandys V., Polreich D., Žďárský E. (2002): Molekulární genetika karcinomu prostaty. Galén, Praha.
- Luo J., Duggan D. J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C. M., Bittner M. L., Trent J. M., Isaacs W. B. (2001): Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Research* 61: 4683–4688.
- MacLean H. E., Warne G. L., Zajac J. D. (1997): Localization of functional domains in the androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62: 233–242.
- Marker P. C., Donjacour A. A., Dahiya R., Cunha G. R. (2003): Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* 253: 165–174.
- Matoušková M., Hanuš M. (2014): Hormonální léčba kastročně refrakterního karcinomu prostaty (CRPC), existují linie léčby?. *Onkologie* 8: 75–79.
- Medeiros R., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Morais A., Oliveira J., Lopes C. (2003): Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 141: 91–96.
- Monge A., Jagla M., Lapouge G., Sasorith S., Cruchant M., Wurtz J. M., Jacquemin D., Bergerat J. P., Céraline J. (2006): Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer. *Cellular And Molecular Life Sciences* 63: 487–497.
- Palmbos P., Hussain M. (2013): Non-castrate metastatic prostate cancer: Have the treatment options changed?. *Seminars in Oncology* 40: 337–346.
- Pedraza R., Kwart A. M. (2003): Hormonal therapy for patients with advanced adenocarcinoma of the prostate: is there a role for discontinuing treatment after prolonged androgen suppression?. *Urology* 61: 770–773.
- Platz E. A., Rimm E. B., Willett W. C., Giovannucci E., Kantoff P. W. (2000): Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 2009–2017.
- Poppel van H., Klotz L. (2012): Gonadotropin-releasing hormone: an update review of the antagonists versus agonists. *International Journal of Urology* 19: 594–601.



- Princivalle M., Broqua P., Meyer J., Mayer G., Elliott L., Haigh R., Yea C., White R., Bjarnason K. (2007): Rapid suppression of plasma testosterone levels and tumor growth in the dunning rat model treated with degarelix, a new gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320: 1113–1118.
- Rajender S., Singh L., Thangaraj K. (2007): Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian Journal Of Andrology* 9: 147–179.
- Reptova S., Smesny Trtkova K., Kolar Z. (2014): Direct detection of the AR-E211 G>A gene polymorphism from blood and tissue samples without DNA isolation. *Pathology oncology research* 20: 223–227.
- Robles-Fernandez I., Martinez-Gonzalez L. J., Pascual-Geler M., Cozar J. M., Puche-Sanz I., Serrano M. J., Lorente J. A., Alvarez-Cubero M. J. (2017): Association between polymorphisms in sex hormones synthesis and metabolism and prostate cancer aggressiveness. *PLoS One* 12: e0185447, doi:10.1371/journal.pone.0185447.eCollection 2017
- Roehrborn C. G., Girman C. J., Rhodes T., Hanson K. A., Collins G. N., Sech S. M., Jacobsen S. J., Garraway W. M., Lieber M. M. (1997): Correlation between prostate size estimated by digital rectal examination and measured by transrectal ultrasound. *Urology* 49: 548–557.
- Rušarová N., Študentová H. (2017): Současné možnosti léčby metastatického kastročně rezistentního karcinomu prostaty. *Onkologie* 11: 200–204.
- Shaffer P. L., Jivan A., Dollins D. E., Gewirth D. T., Claessens F. (2004): Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4758–4763.
- Simental J. A., Lane M. V., French F. S., Wilson E. M., Sar M. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266: 510–518.
- Sinhg S. M., Gauthier S., Labrie F. (2000): Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry* 7: 211–247.
- Spada A. R. L., Fischbeck K. H., Wilson E. M., Lubahn D. B., Harding A. E. (1991): Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbular muscular atrophy. *Nature* 352: 77–79.

- Tan M. H. E., Li J., Xu H. E., Melcher K., Yong E. (2015): Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 36: 3–23.
- Tannock I. F., De Wit R., Berry W. R., Horti J., Pluzanska A., Chi K. N., Oudard S., Théodore Ch., James N. D., Turesson I., Rosenthal M. A., Eisenberger M. A. (2004): Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 351: 1502–1512.
- Taplin M. E., Balk S. P. (2004): Androgen receptor: A key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *Journal of Cellular Biochemistry* 91: 483–490.
- Taplin M. E., Rajeshkumar B., Halabi S., Werner C. P., Woda B. A., Picus J., Stadler W., Hayes D. F., Kantoff P. W., Vogelzang N. J., Small E. J. (2003): Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *Journal of Clinical Oncology* 21: 2673–2678.
- Tirabassi G., Delli Muti N., Balercia G., Corona G., Maggi M. (2013): Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism regulates the metabolic effects of testosterone replacement therapy in male postsurgical hypogonadotropic hypogonadism. *International Journal of Endocrinology* 2013: 1–7
- Tsai M. J., O'Malley B. W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* 63: 451–486.
- Tut T. G., Ghadessy F. J., Yong E. L., Trifiro M. A., Pinsky L. (1997): Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 3777–3782.
- Wallén M. J., Linja M., Kaartinen K., Schleutker J., Visakorpi T. (1999): Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *Journal of Pathology* 189: 559–563.
- Yousef G. M., Diamandis E. P. (2003): An overview of the kallikrein gene families in humans and others species: emerging candidate tumor markers. *Clinical Biochemistry* 36: 443–452.
- Zitzmann M., Nieschlag E. (2003): The CAG repeat polymorphism within the androgen receptor gene and maleness. *International Journal of Andrology* 26: 76–83.