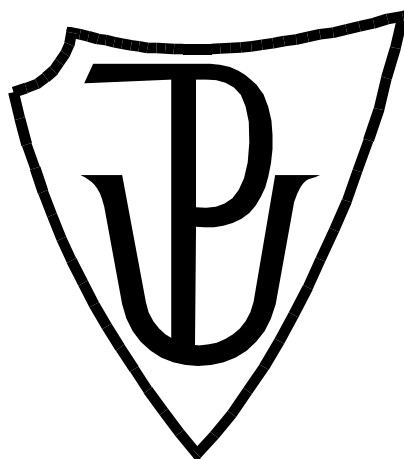


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Polymorfismus HSD3B1 s ohledem na rezistenci k androgen
deprivační terapii karcinomu prostaty**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nikola Mašová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Knillová, Ph. D
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Nikola Mašová
Název práce:	Polymorfismus HSD3B1 s ohledem na rezistenci k androgen deprivaci terapii u karcinomu prostaty
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Knillová, Ph. D
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	<p>Androgen deprivaci terapie představuje základní terapeutický přístup u lokálně pokročilého karcinomu prostaty. U většiny pacientů však časem citlivost k androgenům ubývá a vyvíjí se u nich kastroforně-rezistentní forma onemocnění. Spolu s vývojem nových léčiv a optimalizací terapie, je důležité hledat také vhodné biomarkery, které by pomohly predikovat rezistenci na hormonální léčbu. Bakalářská práce se zabývá detekcí zárodečného polymorfismu genu HSD3B1, zapojeného do intratumorální biosyntézy androgenů. Variantní alela HSD3B1 (1245C) je u pacientů spojena s horší odpovědí na kastroforní terapii a rychlejším vývojem metastáz. V praktické části práce byla optimalizována metoda asymetrické qPCR s nezačnou LNA próbou a analýzou křivek tání pro detekci polymorfismu HSD3B1 a provedena genotypizace u souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.</p>
Klíčová slova:	HSD3B1, karcinom prostaty, androgen deprivaci terapie, analýza křivek tání, asymetrická qPCR.
Počet stran:	58
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's first name and Suriname:	Nikola Mašová
Title of thesis:	Polymorphism of HSD3B1 and resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Clinical and Molecular Pathology
Supervisor:	Mgr. Jana Knillová, Ph.D
The year of presentation:	2018
Abstract:	<p>Androgen deprivation therapy represents a basic therapeutic approach for locally advanced prostate cancer. However, the sensitivity to androgens decreases over time and the majority of patients progress to castration-resistant form of the disease. Along with the development of new drugs and the therapy optimization, it is also important to search for suitable biomarkers to help predict resistance to hormonal therapy. Bachelor thesis deals with detection of germline polymorphism of HSD3B1 gene, involved in intratumoral androgen biosynthesis. The variant HSD3B1 (1245C) allele is associated with worse response to castration therapy and faster metastatic development. In the practical part of the thesis the asymmetric qPCR in the presence of unlabeled LNA probe and melting curve analysis for the detection of HSD3B1 polymorphism was optimized and genotyping in a cohort of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia was performed.</p>
Keywords:	HSD3B1, prostate cancer, androgen deprivation therapy, high resolution melting, asymmetric qPCR
Number of page:	58
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Janě Knillové, Ph.D za odborné vedení bakalářské práce, trpělivost, nespočet rad a věnovaný čas. Poděkování patří také kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP v Olomouci za vstřícné jednání. Dále děkuji rodičům a svým blízkým, kteří mě po celou dobu studia a práce podporovali.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratek	8
1 Úvod.....	10
2 Androgeny.....	11
2.2 Regulace exprese androgenů.....	11
2.3 Steroidogeneze	12
2.3.1 Produkce androgenů ve varlatech a nadledvinách	12
2.3.2 Produkce androgenů v prostatických nádorových buňkách.....	13
2.4 Androgenový receptor.....	15
3. Karcinom prostaty.....	15
3.1 Závislost prostaty na androgenech	15
3.2 Epidemiologie a výskyt.....	16
3.3 Diagnostika	16
3.4 Léčba.....	16
4 Vznik hormonální nezávislosti.....	18
4.1 Mechanismy rezistence	19
4.1.1 Mechanismy rezistence závislé na AR signalizaci.....	19
4.1.2 Mechanismy rezistence nezávislé na AR signalizaci.....	20
4.2 Nové možnosti léčby.....	21
4.3 HSD3B1	22
5 Analýza křivek tání (High Resolution Melting, HRM)	24
6 MATERIÁL A METODY	26
6.1 Přístrojové vybavení a pomůcky.....	26
6.2 Spotřební materiál	26
6.3 Použité chemikálie a roztoky	26
6.4 Použitá média.....	27
6.5 Použité kity	27
6.6 Primery a próby.....	27
6.7 Biologický materiál.....	27
6.8 Metody	28
6.8.1 Kultivace buněčných linií	28
6.8.2 Izolace buněčné DNA	28
6.8.3 Měření koncentrace a čistoty DNA.....	29
6.8.4 Asymetrická Real-Time PCR.....	30

6.8.5	Kontrola produktů PCR reakce pomocí polyakrylamidové elektroforézy	31
6.8.6	High resolution melting (HRM).....	32
7	Výsledky a diskuze	34
7.1	Optimalizace PCR reakce	34
7.2	Optimalizace HRM analýzy.....	36
7.3	Simulace heterozygotní varianty 1245 A/C	39
7.4	3' - fosforylovaná LNA neznačená próba.....	39
7.5	Genotypizace 40 vzorků DNA izolovaných z krve pacientů	44
8	Závěr	46
9	Použitá literatura	48

Seznam zkratk

A	adenin
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADT	androgen deprivační terapie (androgen deprivation therapy)
AKR1C2	aldo-keto reductáza C2
AR	androgenový receptor
ARE	androgen responzibilní elementy (androgen response elements)
AR-Vs	sestříhové varianty androgenového receptoru (androgen receptor splice variants)
bp	pár bazí (base pair)
C	cytosin
CRPC	kastračně-rezistentní karcinom prostaty (castration-resistant prostate cancer)
Ct	cyklus překročení fluorescenčního prahu (cycle of threshold)
CYP	cytochrom
CYP17A1	17- hydroxyláza/17,20-lyáza
DBD	DNA-vazebná doména (DNA binding domain)
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	5- α -dihydrotestosteron
dsDNA	dvouřetězcová DNA (double-stranded DNA)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FSH	folikuly stimulující hormon (follicle-stimulating hormone)
Fw	forward primer
G	guanin
H	variantní heterozygot
HRM	analýza křivek tání (high resolution melting)
LBD	ligand-vazebná doména
LH	luteinizační hormon
LHRH	hormon uvolňující luteinizační hormon
LNA	lock nucleid acid
NTD	N-terminální transaktivační doména
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PC	karcinom prostaty (prostate cancer)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)

qPCR	kvantitativní PCR
Rv	reverse primer
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
SRD5A	steroid-5 α -reduktáza
T	testosteron
TBE	Tris-borát-EDTA pufr
Tm	teplota tání (melting temperature)
V	variantní homozygot
WT	wild-type
3 β HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza
3 β HSD2, HSD3B2	3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2
3 β HSD1, HSD3B1	3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1
17 β HSD	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza
17 β HSD3, HSD17B3	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 3
17 β HSD5, AKR1C3	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 5
5 α -dion	5 α -androstandion

1 Úvod

V současné době představuje karcinom prostaty nejčastěji se vyskytující malignitu u mužů a čtvrtou nejrozšířenější ve světě. Ačkoli je toto onemocnění v raném stádiu poměrně dobře léčitelné, v některých případech progreduje i navzdory léčbě androgen deprivací terapií (ADT) a vyvíjí se v tzv. kastročně-rezistentní karcinom prostaty (CRPC). U pacientů s CRPC je zachovaná signalizace zprostředkovaná androgenovým receptorem a nádorové buňky přežívají i při kastročních hladinách androgenů. Je zřejmé, že nádorové buňky jsou schopné se na nízkou hladinu androgenů adaptovat a využít jejich další zdroje. Mezi ně patří tvorba androgenů v nadledvinách nebo přímo intracelulárně v buňkách karcinomu prostaty a v neposlední řadě i *de novo* syntéza z cholesterolu. Souvislost s produkcí androgenů v nádorových prostatických buňkách má snížená nebo zvýšená exprese enzymů zapojených do biosyntézy androgenů nebo mutace v genech kódujících tyto enzymy. Jedním z enzymů, který se podílí na produkci testosteronu a dihydrotestosteronu z androgenových prekurzorů je 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza-1 (3 β HSD1). V současné době je věnována pozornost studiu zárodečného jednonukleotidového polymorfismu (singlenucleotide polymorphism, SNP) v genu pro tento protein v souvislosti s rezistencí na léčbu ADT.

Bakalářská práce se zabývá detekcí jednonukleotidového polymorfismu 1245A→C v genu HSD3B1. Zmiňovaný polymorfismus vede k záměně aminokyselin (367Asn →Thr) v proteinu 3 β HSD, který tak získává rezistenci vůči degradaci v proteazomu. Dochází k jeho kumulaci a tím zvýšení mimogonadální syntézy DHT, což přispívá k progresi kastročně-rezistentního tumoru. Detekce přítomnosti varianty HSD3B1 (1245C) v zárodečné DNA by mohla u pacientů s CRPC pomoci predikovat horší odpověď k ADT a sloužit tak jako citlivý biomarker.

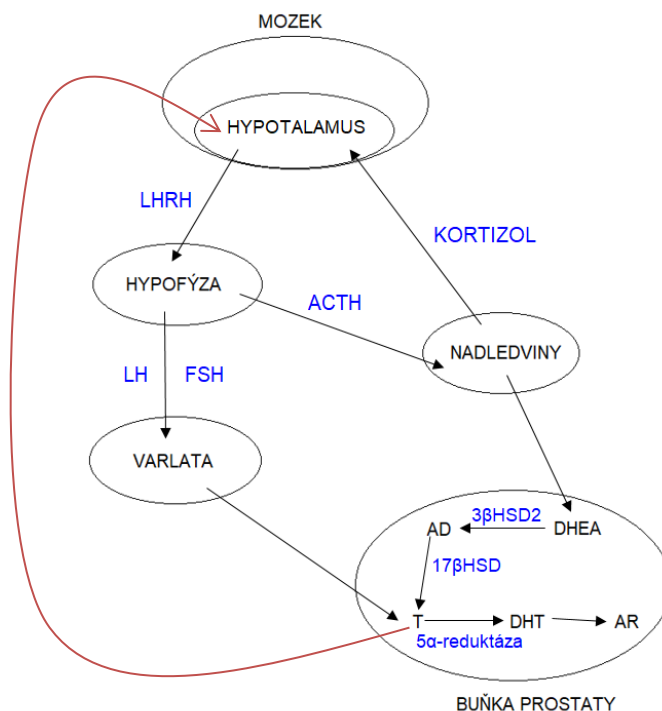
Cílem teoretické části práce bylo shromáždit literární údaje týkající se dané problematiky a na základě získaných informací vypracovat literární rešerši. Praktická část byla věnována především experimentům, jejichž cílem bylo optimalizovat asymetrickou PCR s nezačnou LNA proubou (Lock Nucleic Acid, LNA) a s využitím analýzy křivek tání (High Resolution Melting, HRM) detekovat polymorfismus genu HSD3B1. Touto metodou byl genotypován soubor pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.

2 Androgeny

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony. Jsou důležité pro diferenciaci a zrání mužských pohlavních orgánů, včetně prostaty, a pro vývoj mužských sekundárních pohlavních znaků (Griffin, 1992; Dehm *et Tindall*, 2006). Primárním androgenem je testosteron (T) syntetizovaný ve varlatech. Většina T cirkuluje v krevním řečišti vázaná na specifický globulin (SHBG, sex hormone-binding globulin) nebo albumin, malé procento je nevázané (Dunn *et al.*, 1981; Rosner *et al.*, 1991). Volný T vstupuje z krevního řečiště pasivní difúzí do prostatických buněk, kde je enzymem 5- α -reduktázou typu 1 a 2 (SRD5A1, SRD5A2) metabolizován na 5- α -dihydrotestosteron (DHT) (Zhou *et al.*, 1995). DHT se váže na androgenový receptor (AR) s větší afinitou než T a účinněji aktivuje expresi podřízených genů (Shang *et al.*, 2002).

2.2 Regulace exprese androgenů

Tvorba androgenů ve varlatech je řízena hypotalamo-hypofyzárně-testikulární osou (Obr. 1). První stimul zahajující produkci hormonů vychází z hypotalamu. Sekrecí gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH, hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH), gonadorelin) dochází ke stimulaci hypofýzy a k produkci a uvolnění luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH). Tyto hormony společně spouští ve varlatech produkci testosteronu a jeho následnou konverzi na DHT v periferních tkáních, především v buňkách prostaty (Matoušková, 2006). Hladina testosteronu potom negativní zpětnou vazbou ovlivňuje jejich tvorbu v hypotalamu a hypofýze (Silbernagl *et Despopoulos*, 2004). Pro tvorbu T v nadledvinách je důležitá hormonální regulace adenohipofyzárním adrenokortikotropním hormonem (ACTH). Vlivem ACTH vzniká velké množství inaktivního prekurzoru steroidů dehydroepiandrosteronu (DHEA), který je následně konvertován na androstendion a dále na testosteron. Kortizol, produkovaný v nadledvinách v *zona fasciculata*, může stejně jako testosteron zpětnovazebně působit na hypotalamus. Ve varlatech přesahuje produkce testosteronu 92 %, v kůře nadledvin se tvoří přibližně 5 % a 2 % vznikají v periferních tukových tkáních z estradiolu (Hanuš *et Matoušková*, 2012; Silbernagl *et Despopoulos*, 2004).



Obr. 1 Schéma regulace biosyntézy androgenů hypotalamo-hypofyzárně-testikulární osou. Hormony a enzymy zapojující se do regulace jsou vyznačeny modře. Regulace je naznačena černými šipkami, zpětnou vazbu vyvíjenou testosteronem na dráhu hypothalamus-hypofýza vyznačuje červená šipka.

2.3 Steroidogeneze

Společným prekurzorem pro syntézu všech steroidních hormonů je cholesterol (Miller *et* Auchus, 2011). K přeměně na cílový steroid dochází, pokud je jeho molekula transportována pomocí proteinu StAR (steroidogenic acute regulatory protein) na vnitřní mitochondriální membránu. V mitochondriích je cholesterol odštěpením postranního řetězce konvertován na pregnenolon (Flück *et* Pandey, 2014). Tento první krok steroidogeneze zároveň určuje její rychlost (Miller *et* Auchus, 2011). Tkáňově specifické hydroxylázy P450 a hydroxysteroidní dehydrogenázy dále katalyzují reakce, jimiž se produkují tkáňově specifické steroidní hormony. Mezi primární orgány steroidogeneze patří pohlavní žlázy a nadledviny (Yazawa *et al.*, 2015; Sharifi *et* Auchus, 2012).

2.3.1 Produkce androgenů ve varlatech a nadledvinách

Přes 95 % hlavního mužského pohlavního hormonu testosteronu je tvořeno v Leydigových buňkách varlat (Nakamura *et al.* 2009). Z cholesterolu vzniklý pregnenolon je klasickou dráhou enzymem 17-hydroxyláza/17, 20-lyáza (CYP17A1) konvertován na 17 α -hydroxypregnenolon a na dehydroepiandrosteron (Flück *et* Pandey, 2014). Díky vysoké expresi 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 2 (3 β HSD2) a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 3 (17 β HSD3)

v Leydigových buňkách je DHEA je rychle přeměňován přes androstendion nebo androstendiol na testosteron (Obr. 1) (Simard *et al.*, 2005).

Kromě varlat jsou zdrojem androgenů také nadledviny. Vlivem adrenokortikotropního hormonu produkují nadledviny velká množství DHEA, jeho sulfátu a androstendion. Aktivitou 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 5 (17 β HSD5) je potom i v nadledvinkách produkováno malé množství testosteronu (Turcu *et al.*, 2015). DHEA a androstendion mohou být ve většině periferních tkání, včetně prostaty, konvertovány na T (Labrie *et al.*, 2001).

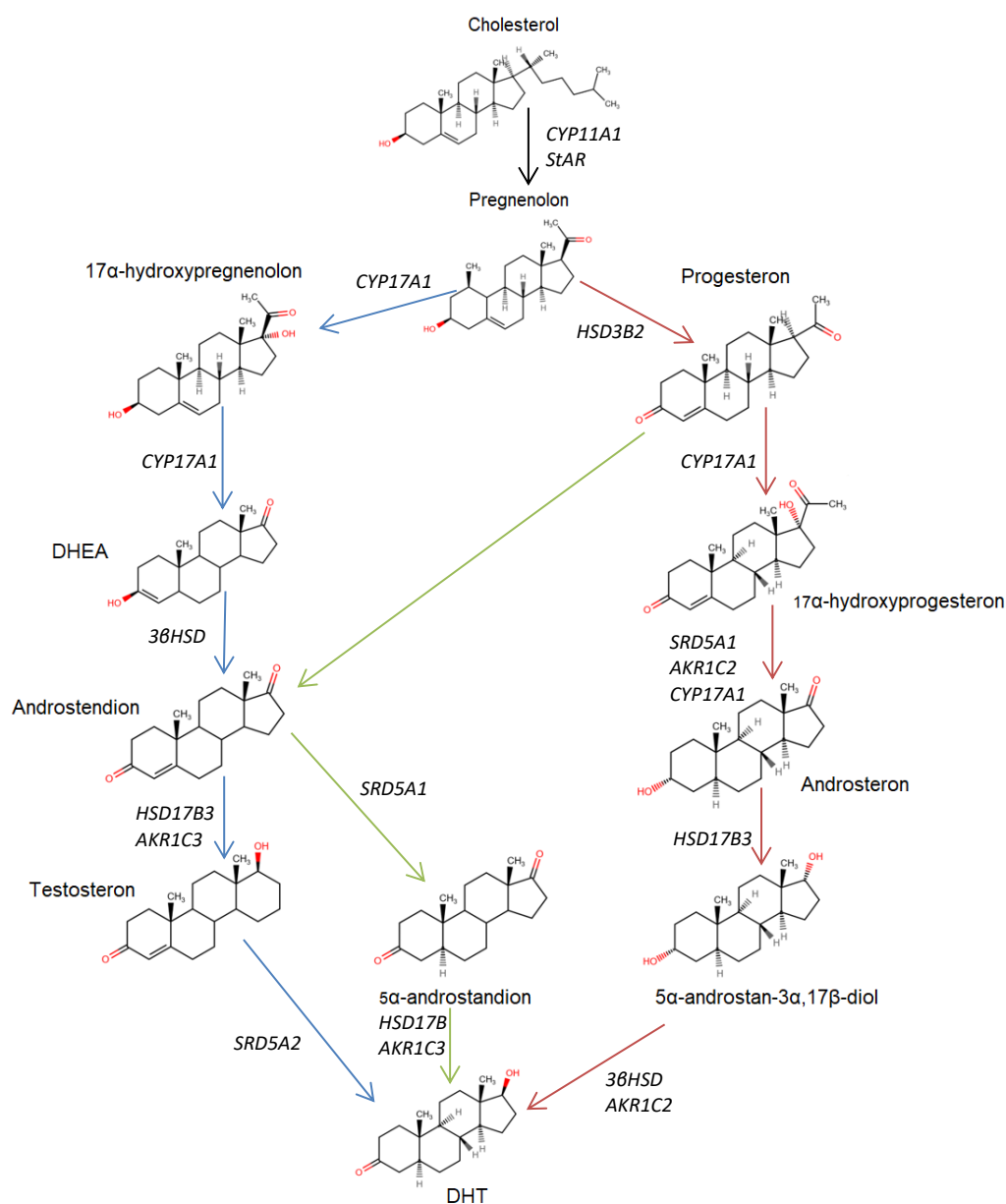
2.3.2 Produkce androgenů v prostatických nádorových buňkách

U primárních a metastatických karcinomů prostaty jsou androgeny důležité pro proliferaci nádorových buněk, a tedy pro nádorový růst (Imamoto *et al.*, 2008). Přítomnost DHT však byla prokázána také v rekurentních nádorech léčených androgen deprivací terapií (ADT) (Montromery *et al.*, 2008). Nádorové buňky musí mít mechanismy, kterými jsou schopny androgeny získávat. Produkce androgenů u nich může probíhat minimálně dvěma způsoby: konverzí prekurzorů z nadledvin a v neposlední řadě i (*de novo*) syntézou z cholesterolu přímo v nádorových buňkách. Množství cholesterolu tak může ovlivnit vývoj rakoviny prostaty (Sharifi, 2013; Mostaghel *et al.*, 2012). Pro *de novo* steroidogenezi z cholesterolu je nutná přítomnost enzymů 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1 (3 β HSD1), CYP11A a CYP17A (Armandari *et al.*, 2014).

Adrenální androgeny, zahrnující DHEA a jeho sulfát, jsou hojně dostupné v tělním oběhu. Aby z těchto prekurzorů mohlo v cílovém orgánu docházet ke vzniku DHT, je nejprve dehydroepiandrosteron oxidací 3 β -hydroxyl skupiny na 3-keto skupinu a izomerací Δ^5 na Δ^4 převeden na androstendion. To se děje pomocí enzymů 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (3 β HSD). Následný vznik DHT z androstendionu je podmíněn přítomností enzymů 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáz (17 β HSD) (17 β HSD3 a AKR1C3) a steroid-5 α -reduktáz 1 a 2 (SRD5A1 a 2). K převedení adrenálních androgenů na aktivní androgeny, T a DHT, může docházet jak tzv. klasickou dráhou, tak také dráhou alternativní (Obr. 2) (Chang *et al.*, 2014).

Klasická cesta představuje mechanismus syntézy DHT z androstendionu přes testosteron. Pomocí 17 β HSD dochází nejprve k redukci androstendionu na T, poté následuje redukce steroid-5 α -reduktázou na DHT. Protože androstendion, stejně jako testosteron, obsahuje 3-keto Δ^4 strukturu, může být i on substrátem pro steroid-5 α -reduktázy. Tímto alternativním mechanismem, popisovaným jako 5- α -dion dráha, je androstendion konvertován na 5 α -androstandion (5 α -dion), který je prekurzorem pro tvorbu DHT (Chang *et al.*, 2014). Tato dráha tak obchází testosteron jako meziproduct a podle Chang *et al.* (2011) je častěji využívanou dráhou syntézy DHT v kastročně-rezistentních karcinomech prostaty.

Další možnost syntézy DHT je uváděna jako “backdoor“ mechanismus. V této dráze je 17-hydroxyprogesteron redukován působením CYP17A1 na androsteron a následně 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (androstrandiol), který je oxidován na DHT (Obr. 2). Tato cesta obchází jak DHEA a androstendion, tak testosteron. Mezi zapojené enzymy patří SRD5A, AKR1C2 a 17 β HSD (Fukami *et al.*, 2013). Aktivní intratumorální steroidogeneze alternativní cestou byla prokázána vysokou mírou konverze androstendionu na DHT v CRPC buněčných liniích a tkáních pacientů s CRPC (Chang *et al.*, 2011).



Obr. 2 Produkce androgenů v prostatických nádorových buňkách. Modrá šipka představuje klasickou dráhu androgenové produkce. Alternativní mechanismus, tzv. 5- α -dion dráha syntézy androgenů, je vyznačen zelenými šipkami. Produkce DHT “backdoor“ mechanismem je znázorněna šipkami červenými.

2.4 Androgenový receptor

Androgenový receptor (AR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Patří mezi jaderné steroidní receptory a je exprimovaný především v lumenálních buňkách prostaty, buňkách karcinomu prostaty a jeho metastázách (Quigley *et al.*, 1995).

Gen pro AR leží na chromozomu Xq11-12 a kóduje 110 kDa protein (Lubahn *et al.*, 1998; Gelman, 2002). Stejně jako ostatní jaderné receptory je AR rozdělen na čtyři strukturální a funkční domény: N-terminální transaktivační doménu (NTD), DNA-vazebnou doménu (DBD), dimerizační (hinge) doménu a ligand-vazebnou doménu (LBD) (Quigley *et al.*, 1995). U všech jaderných steroidních receptorů obsahuje DBD dva zinkové prsty, které rozpoznávají specifické sekvence DNA (ARE, androgen-response elements) v regulačních oblastech cílových genů. (Umesono *et Evans* 1989; Shaffer *et al.*, 2004). AR se nachází v cytoplazmě prostatických buněk asociovaný s proteiny tepelného šoku (HSP, heat-shock proteins) a dalšími chaperony (Smith *et Toft*, 2008). Vazbou ligandu dochází ke konformační změně, která uvolňuje AR z proteinového komplexu, a jeho translokaci do jádra buňky. Translokaci do jádra buňky umožňuje oblast receptoru označovaná jako NLS (nuclear localization signal). V jádře dochází k hyperfosforylaci a dimerizaci AR. Ve formě homodimeru potom receptor reguluje expresi cílových genů (Eder *et al.*, 2001).

Mezi geny přímo regulované androgeny patří PSA (prostatický specifický antigen), gen hGK-1 (lidský glandulární kalikrein-1) a TMPRSS2 (transmembránová serinová proteáza typu II) (Tan *et al.*, 2015). Androgeny prostřednictvím aktivovaného AR ovlivňují buněčnou proliferaci, apoptózu, diferenciaci a také geny zapojené v angiogenezi a metastazování (Culig *et Santer*, 2014).

3. Karcinom prostaty

3.1 Závislost prostaty na androgenech

Vývoj prostaty, její funkce a růst prostatických buněk jsou úzce spjaty s androgeny (Litvinov *et al.*, 2003; Marker *et al.*, 2003). V diferencované prostatě jsou dva typy tkání, epitel a stroma. Stroma se skládá z fibroblastů a z vřetenovitých buněk hladké svaloviny (Hayward *et al.*, 1996). Epitel tvoří tři základní typy buněk: lumenální (sekreční), bazální a neuroendokrinní (Bonkhoff *et Remberger*, 1996). Lumenální buňky mají sekreční funkci a tvoří hlavní typ buněk prostatického epitelu. Vylučují PSA a kyselou prostatickou fosfatázu. Exprimují velké množství androgenového receptoru a jsou závislé na androgenech (Sar *et al.*, 1990; Kyprianou *et Isaacs*, 1988). Bazální buňky postrádají sekreční funkci. Nachází se v bazální membráně, exprimují velmi malé množství AR a jsou považovány za nezávislé na androgenech (Bonkhoff *et Remberger*, 1993; Kyprianou *et Isaacs*, 1988). Neuroendokrinní buňky

se nachází ve žláznatém epitelu. Tyto buňky neexprimují AR, neprodukují PSA a jsou necitlivé na androgeny (Bonkoff *et al.*, 1995).

Postnatální vývoj a zrání prostaty závisí na vzájemné interakci jednotlivých typů buněk (Hayward *et al.* 1998). V důsledku androgenní signalizace vyučují stromální buňky růstové faktory (andromediny), které se váží na receptory bazálních buněk. To podporuje jejich proliferaci a diferenciaci na luminální buňky epitelu, generuje vnitrobuněčné signály potlačující apoptózu a umožňuje vznik homeostázy (Lu *et al.*, 1999, Planz *et al.*, 1999).

3.2 Epidemiologie a výskyt

Karcinom prostaty je nejčastějším solidním nádorovým onemocněním u mužů a čtvrtým nejčastěji diagnostikovaným maligním onemocněním ve světě (Global Burden of Disease Cancer Collaboration, 2016; Bashir, 2015). I když počet diagnostikovaných případů také díky skríninku PSA narůstá, díky včasnému zachytu a moderní léčbě úmrtnost klesá (ÚZIS ČR).

Výskyt nádorů prostaty stoupá se zvyšujícím se věkem. Onemocnění postihuje muže starší 50 let, téměř u 85 % pacientů je nemoc diagnostikována po 65 roce. Důležitým faktorem je rasový původ. Nízký je výskyt onemocnění u mužů v Asii, především v Číně, naopak v Severní Americe a Skandinávii, zejména u afroameričanů v USA, je výskyt nejvyšší. Na vznik rakoviny prostaty má vliv životní prostředí i životní styl a k rizikovým faktorům se řadí také výskyt karcinomu prostaty v rodině (Grönberg, 2003; Bashir, 2015).

3.3 Diagnostika

Vývoj a průběh nemoci je u každého pacienta individuální. Základem pro stanovení přesné diagnózy je digitální rektální vyšetření, stanovení hladiny PSA a pro lepší informovanost i transrektální biopsie prostaty. Prahová hodnota PSA je 2,5- 3,0 ng/ml (Balík *et Brod'ák*, 2011; Heidenreich *et al.*, 2008; Roobol *et al.*, 2010), stupeň malignity je hodnocen pomocí Gleasonova skóre (Gleason *et al.*, 1974).

Převážná většina diagnostikovaných nádorů prostaty jsou adenokarcinomy. Z hlediska stádia onemocnění je můžeme rozdělit na lokalizované (objemově malé nezasahující mimo prostatu), lokálně pokročilé (přesahují pouzdro prostaty) a metastatické. Oproti většině solidních nádorů roste karcinom prostaty pomalu (Abate-Shen *et Ahen*, 2000).

3.4 Léčba

Typ léčby u karcinomu prostaty závisí na pokročilosti onemocnění a na faktorech určujících jeho progresi.

U nízkorizikových karcinomů prostaty se uplatňuje tzv. odložená terapie. Aktivní sledování se využívá většinou u mladších pacientů s karcinomem v předpokládaném latentním stavu, pozorné vyčkávání (watchful waiting) u starších pacientů. V obou případech je kladen důraz na pravidelné kontroly a informovanost pacienta (Heidenreich *et al.*, 2008; Epstein *et al.*, 2014).

U lokalizovaných nádorů představuje operativní odstranění prostatické žlázy včetně pouzdra prostaty a semenných váčků, tzv. radikální prostatektomie, způsob léčby, jejímž cílem je úplné vyléčení pacienta (Balík *et Brodák*, 2011; Heidenreich *et al.*, 2008). Další používanou metodou je radioterapie. Využívá se primárně u pacientů, kteří nemohou podstoupit prostatektomii, nebo kteří ji odmítají, a také jako doplňková pooperační léčba (Balík *et Brodák*, 2011). V kombinaci s hormonální terapií je slibným léčebným prostředkem u lokálně pokročilých karcinomů (Warde *et al.*, 2010).

U neoperabilních lokálně pokročilých nebo metastatických karcinomů prostaty se obvykle využívá hormonální terapie. Cílem hormonální terapie je blokování účinku androgenů nebo potlačení jejich tvorby. V prostředí s nízkou hladinou androgenů dochází k navození apoptózy u androgen-dependentních buněk. Hormonální léčba je proto označována také jako androgen deprivace terapie. Používaná hormonální terapie představuje kastraci chirurgickou (orchiektomie) nebo chemickou (analogy LHRH a antagonisté LHRH), nebo podávání antiandrogenů (steroidních a nesteroidních sloučenin) (Obr. 3) (Matoušková, 2006).

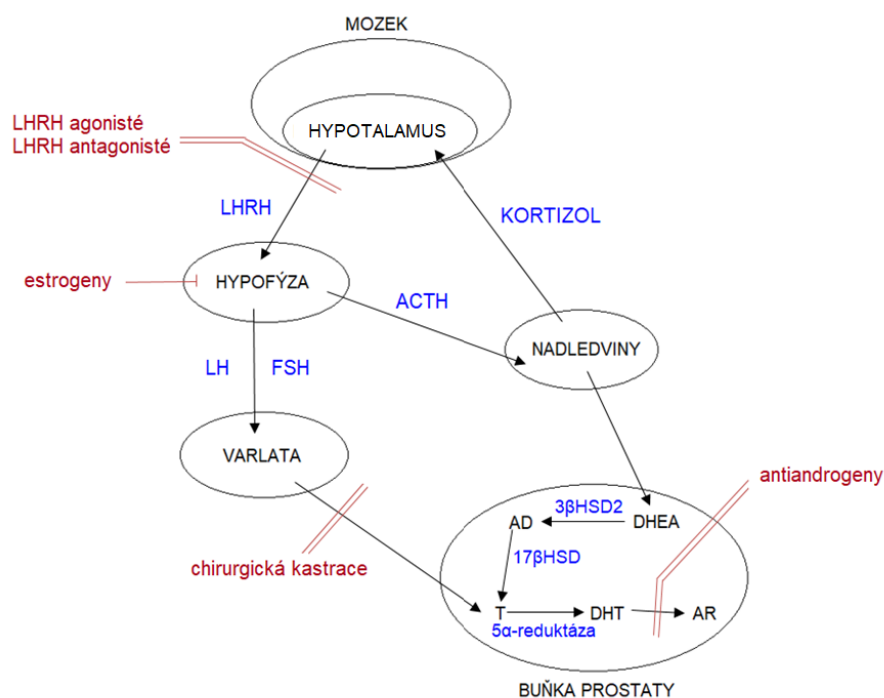
Výhodou orchiektomie (oboustranné odstranění varlat) je rychlý nástup účinku léčby, ke snížení cirkulujícího testosteronu dochází během několika hodin (Maatman *et al.*, 1985). Analogy LHRH jsou syntetické látky, strukturně podobné přirozenému LHRH, který je zapojený do regulace exprese androgenů prostřednictvím hypotalamo-hypofyzární osy. Analogy LHRH (goserelin, leuprolid a triptorelin) tak suprimují sekreci testikulárních androgenů a dochází k navození jejich kastrace hladiny stejně jako u orchiektomie (Matoušková, 2006; Schally, 1999). Antagonisté LHRH (např. degarelix) se přímo váží na LHRH receptor v hypofýze a umožňují okamžité zablokování sekrece LH a FSH. Obsah testosteronu v séru je potlačen velmi rychle a nedochází k prvotnímu nárůstu hladiny T jako při aplikaci analogů LHRH (Ricci *et al.*, 2014; Klotz *et al.*, 2008).

Použití estrogenů není rozšířené. V současnosti je jediným užívaným estrogenem semisyntetický diethylstilbestrol, který blokuje signální dráhy mezi hypotalamem a hypofýzou (Ricci *et al.*, 2014; Lam *et al.*, 2006).

Antiandrogeny jsou sloučeniny schopné kompetice s DHT při vazbě na AR (Helsen *et al.*, 2012). Nesteroidní látky, flutamid, nilutamid a bicalutamid, cílí přímo na ligand vazebnou doménu androgenového receptoru, a tím zabraňují transkripci androgen responzivních elementů (Gioeli, 2010). Působení bicalutamidu stimuluje tvorbu AR korepresorů, které přispívají k inhibici transkripční aktivity AR (Masiello *et al.*, 2002). Cyproteron acetát je

naopak látka steroidního charakteru, blokuje interakci androgen-receptor a snižuje hladinu testosteronu v séru díky slabému antigonadotropnímu účinku (de Voogt, 1992).

K blokování škodlivých efektů androgenů produkovaných nadledvinami se používá kombinace obou přístupů, tj. kastrace nebo podání LHRH agonistů společně s aplikací antiandrogenů. Tím je dosaženo maximální androgenní blokády (Labrie *et al.*, 1993; Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group, 2000).



Obr. 3 Schéma regulace biosyntézy androgenů hypotalamo-hypofyzárně-testikulární osou. Červeně jsou zaznačeny cíle léčiv, která jsou standardně podávána při léčbě karcinomu prostaty. Hormony a enzymy zapojující se do regulace jsou vyznačeny modře.

4 Vznik hormonální nezávislosti

Většina diagnostikovaných karcinomů prostaty je zpočátku vnímavá na androgeny. Androgen deprivace je proto u velké části pacientů i s metastatickým onemocněním velmi efektivní a je považována za terapeutický standard (Crawford *et al.*, 1989). V průběhu léčby však citlivost k androgenům ubývá. Onemocnění lokálně progreduje, případně metastazuje a vyvíjí se v tzv. kastračně-rezistentní karcinom prostaty (Attard *et al.*, 2009). Za kastračně-rezistentní je karcinom považován, pokud dochází ke zvýšení sérové hladiny PSA při kastračních hladinách T (biochemická progresa). Mezi další kritéria se řadí vznik nových ložisek metastáz (radiologická progresa) a vývoj symptomů (klinická progresa). Dříve byl tento typ nádorů označován jako hormonálně-refraktorní nebo androgen-nezávislý. V současné době se dává přednost termínu kastračně-rezistentní karcinom prostaty, který lépe vystihuje rezistenci

k ADT (Hotte *et Saad*, 2010). Kastrálně-rezistentní karcinom prostaty v současné době představuje terapeuticky nevládnutelné stádium onemocnění s nepříznivou prognózou. Přežití pacienta CRPC od selhání hormonální léčby většinou nepřesahuje 14-20 měsíců (Sharifi *et al.*, 2005).

4.1 Mechanismy rezistence

Objasnění mechanismů podílejících se na vzniku hormonální rezistence je věnována velká pozornost. Jejich pochopení je klíčové nejen pro vývoj nových léčiv, ale také pro optimalizaci aktuálně používaných terapeutických přístupů (Hoang *et al.*, 2017). Důležitou roli hrají mechanismy, kterými je aktivována signalizace zprostředkovaná přes AR, ale také dráhy na AR nezávislé.

4.1.1 Mechanismy rezistence závislé na AR signalizaci

Amplifikace genu pro androgenový receptor

Amplifikace genu pro AR je jedním z mechanismů, který umožňuje přetrvání androgenní odpovědi i v prostředí s nízkou hladinou testosteronu po ADT (Devlin *et Mudryj*, 2009; Javidan *et al.*, 2005). Podle studií má gen pro AR amplifikováno až 30 % androgen-independentních karcinomů prostaty, které vznikají po hormonální terapii (Koivisto *et al.*, 1997).

Mutace androgenového receptoru

U některých pacientů s karcinomem prostaty se mohou jako odezva na ADT objevit mutace AR (Hoang *et al.*, 2017). Mutace byly popsány u všech 8 exonů a nejčastěji se objevují jako bodové mutace v ligand-vazebné doméně (Attar *et al.*, 2009; Devlin *et Mudryj*, 2009). Přítomnost mutací v AR vede buď ke zvýšení jeho citlivosti a tím k aktivaci i v prostředí chudém na androgeny, nebo ke změně ligandové specifity a k aktivaci nejen androgeny, ale také neandrogeními steroidy a antiandrogeny (Culig *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1997). V raných stádiích tumorigeneze se mutace objevují vzácně, naopak je tomu u pokročilých nádorů (Devlin *et Mudryj*, 2009; Taplin *et al.*, 1995).

Sestřihové varianty androgenového receptoru

Sestřihové varianty androgenového receptoru (AR-Vs) podporují růst a dělení prostatických nádorových buněk aktivací AR cílových genů nezávislou na androgenech. (Dehm *et Tindall*, 2011). Ligand-independentní aktivita AR-Vs ovlivňuje léčbu CRPC. Například exprese AR-V7 je spojena s rezistencí na enzalutamid a abirateron. (Efstathiou *et al.*, 2015).

Intratumorální biosyntéza androgenů

U pacientů s CRPC je většinou zachovaná signalizace zprostředkovaná AR a nádorové buňky přežívají i při kastročních hladinách androgenů. Bylo prokázáno, že intratumorální hladiny testosteronu jsou u pacientů s CRPC srovnatelné s hladinami testosteronu u pacientů, kteří kastraci nepodstoupili (Montgomery *et al.*, 2008).

Je zřejmé, že nádorové buňky jsou schopné se na nízkou hladinu androgenů adaptovat a využít jejich další zdroje. Mezi ně patří tvorba androgenů v nadledvinách nebo přímo v buňkách karcinomu prostaty (viz kapitola 2.3.2) (Titus *et al.*, 2005). Souvislost s produkcí T a DHT v nádorových prostatických buňkách má snížená nebo zvýšená exprese enzymů zapojených do biosyntézy androgenů (HSD3B1, HSD3B2, AKR1C3 a HSD17B3) a mutace v genech kódujících tyto enzymy (Chang *et al.*, 2014; Stanbrough *et al.*, 2006). Příkladem je zvýšená exprese enzymu CYP17A1, která u pacientů s CRPC může vysvětlovat rezistenci na abirateron (Mostaghel *et al.*, 2011).

Nekanonická transaktivace androgenového receptoru

K nekanonické aktivaci AR nebo jeho koaktivátorů v prostředí s nízkou hladinou androgenů nebo v jejich nepřítomnosti může docházet také alternativními molekulami. Mezi ně patří růstové faktory (epidermální růstový faktor), insulinu podobný růstový faktor (insulin like grow factor-1, IGF-1), cytokiny (interleukin-6) a hormony (Zhu *et Kyprianou*, 2008; Wang *et al.*, 1999) Transkripční aktivitu AR zvyšuje overexprese Her2/neu nebo Src kinázy (Hoang *et al.*, 2017) a také alternativní aktivace dráhy PI3/Akt kinázy (Raudenská *et al.*, 2014). AR signalizace v PC může být podpořena také ztrátou negativních regulačních signálů. V klinických vzorcích PC byla popsána například zvýšená exprese izoformy b cyklinu D1 nebo inaktivace nádorového supresorového genu pro retinoblastom (retinoblastoma tumor suppressor gene). (Augello *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2010).

4.1.2 Mechanismy rezistence nezávislé na AR signalizaci

Dráhy obcházející signalizaci zprostředkovanou AR

U kastročně-rezistentních karcinomů prostaty mohou být aktivní alternativní signální dráhy, které umožňují proliferaci a přežití CRPC buněk v prostředí chudém na androgeny nezávisle na AR. Tyto cesty obcházejí signalizaci zprostředkovanou AR a k aktivaci cílových genů dochází i v případě, že AR není exprimován (Saraon *et al.*, 2011).

Během androgenní deprivace dochází k spouštění buněčných apoptotických drah a aktivace antiapoptotických faktorů může apoptózu blokovat. Mezi geny, které mohou

podporovat růst CRPC buněk nezávisle na AR, tak patří například antiapoptotický gen Bcl-2. (Colombel *et al.*, 1993).

Dalším příkladem alternativní signalizační dráhy obcházející AR je signalizace zprostředkovaná glukokortikoidovým receptorem, který umožňuje expresi podobných cílových genů jako AR. Za určitých okolností je schopen nahradit AR ve vazbě na androgen-responzivní elementy a zajistit přežití rakovinových buněk prostaty (Sahu *et al.*, 2013; Isikbay *et al.*, 2014).

Prostatické nádorové buňky kmenového charakteru

Podle teorie kmenových nádorových buněk může tvorbu nádoru iniciovat málo čtená populace buněk, které mají vlastnosti buněk kmenových, zejména schopnost neomezeného dělení a multilineární diferenciaci (Reya *et al.*, 2001). Tyto buňky jsou také obecněji označovány jako buňky iniciující nádor (tumor-initiating cells) (Chen *et al.*, 2013). Předpokládá se, že jsou rezistentní k většině protinádorových terapií a přispívají k rekurenci rezistentních nádorů se zvýšeným metastatickým potenciálem (Dean *et al.*, 2005; Chaffer *et al.*, 2011). Také u karcinomů prostaty jsou v literatuře popsány populace nádorových buněk kmenového charakteru (PC stem-like cells) (Reya *et al.*, 2001). Nádorové buňky kmenového charakteru jsou AR negativní nebo exprimují jen nízké hladiny AR a nedávné práce ukazují spojení mezi expanzí populace těchto buněk a kastroční rezistencí (Zhang *et al.*, 2016).

Neuroendokrinní buňky karcinomu prostaty

Neuroendokrinní buňky (viz kapitola 3.1) vylučují řadu neuropeptidů, o kterých je známo, že podporují proliferaci a přežití buněk adenokarcinomu prostaty (Sun *et al.*, 2009). Přibližně 5-10% primárních adenokarcinomů prostaty obsahuje neuroendokrinní buňky, jejich nejvyšší výskyt je popisován u high-grade karcinomů (Sun *et al.*, 2009; Abrahamsson, 1999). Neuroendokrinní karcinomy prostaty představují vysoce heterogenní skupinu nádorů, z nichž většina se objevuje u pacientů s rekurentním nádorem po androgen deprivaci terapii (Epstein *et al.*, 2014).

4.2 Nové možnosti léčby

Kastročně-rezistentní karcinom prostaty představuje fázi onemocnění, kterou ještě nedávno nebylo možné významněji léčebně ovlivnit. V poslední době se možnosti léčby kastročně-rezistentních nádorů rozšířily. Nové přístupy přinášejí prodloužení přežití a zvýšení kvality života nemocných, bohužel zatím stále zůstávají převážně nástrojem paliativní léčby.

V současné době je standardem chemoterapeutické léčby a jediným schváleným terapeutikem metastatického CRPC docetaxel. Slibným novým cytostatikem pro druhou linii chemoterapie je cabazitaxel, taxan vázající se na tubulin. Je jediným cytostatikem, které má vliv

na přežití pacienta (Paller *et Antonarakis*, 2011). Do skupiny cytostatik jsou řazeny i epothilony, které interferují s tubulinem a narušují buněčnou mitózu (Goodin *et al.*, 2004).

Mezi významná cílená léčiva zasahující do androgenové signalizace patří abirateron acetát a enzalutamid. Abirateron acetát efektivně ireverzibilně inhibuje enzym CYP17, který je nezbytný pro syntézu androgenů. Účinně tak ovlivňuje steroidogenezi nejen ve varlatech, ale také v nadledvinách a v nádorových buňkách prostaty. Ve spojení s chemoterapií (docetaxel), má velký význam pro celkové přežití pacientů (Clark *et Armstrong*, 2013; de Bono *et al.*, 2011).

Enzalutamid je antagonist AR. Oproti jiným antiandrogenům se k AR váže až s osmkrát větší afinitou. Kromě toho, že zabraňuje vazbě dihydrotestosteronu na AR, blokuje také translokaci komplexu AR-androgen do jádra a dále jeho vazbu na ARE (Hanuš *et Matoušková*, 2012). Využívá se pro dlouhodobou léčbu CRPC (Scher *et al.*, 2012).

V posledních letech se do středu zájmu léčby nádorů prostaty dostává také imunoterapie. Jejím cílem je vyvolat protinádorovou imunitní odpověď pomocí ex vivo prezentace antigenu. Prodlužuje přežití pacientů s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým CRPC. Prvním z přípravků, který získal schválení pro léčbu je autologní dendritická buněčná vakcína Sipuleucel-T, mezi další patří GVAX a PROSTAVAC-VF. (Kantoff *et al.*, 2010).

Nové možnosti cílené léčby kostních metastáz představují radiofarmaka. Tyto alfa-zářiče emitují vysoké kvantum energie na krátkou vzdálenost, které způsobuje poškození DNA a smrt buňky. Jsou schopny imitovat vápník, a tak se inkorporovat do buňky, kde působí. Do této skupiny pro léčbu schválených farmak patří radium-223 (alfaradin) (Parket *et al.*, 2013). Mezi další látky používané při léčbě kostních metastáz patří bisfosfonáty (kyselina zeledronová) nebo nově monoklonální protilátka denosumab. V kombinaci s kalcielem a vitamínem D zvyšují mechanickou odolnost kosti, vykazují analgetické a angiogenní účinky a inhibují buněčnou proliferaci (Matoušková, 2006, Fizazi *et al.*, 2011).

4.3 HSD3B1

Epidemiologické studie ukazují na důležitou roli genetiky při rozvoji karcinomu prostaty. Pozornost se zaměřuje na roli SNP (single-nucleotide polymorphism) nejen v jeho vzniku a progresi, ale také v diagnostice a predikci rizika (Broeck *et al.*, 2014). Mutace v genech kódujících enzymy zapojené do biosyntézy a metabolismu androgenů mohou přispívat ke vzniku kastracní rezistence (viz kapitola 4.1). U těchto genů je popsáno více než 100 zárodečných jednonukleotidových polymorfismů a předpokládá se, že některé z nich jsou spojeny s rychlejší progresí k CRPC (Hoang *et al.*, 2017). Jedním z potenciálních mechanismů rezistence k ADT je zárodečný polymorfismus (1245A→C) v genu HSD3B1.

Genová rodina HSD3B je lokalizovaná na chromozomu 1p13. Kóduje dva izoenzymy, 3 β HSD1 a 3 β HSD2, zodpovědné za konverzi adrenálních androgenových prekurzorů na DHT (Miller *et al.*, 2011). Enzymy umožňují oxidaci 3 β -hydroxyl skupiny DHEA a následnou izomeraci z Δ^5 na Δ^4 formu androstendionu. 3 β HSD1 dominuje v periferních tkáních, převážně v prostatě, zatímco izoenzym 3 β HSD2 je exprimován v nadledvinách a gonádách (Simard *et al.*, 2005).

Jednonukleotidová záměna A za C v pozici 1245 genu HSD3B1 představuje zděděný zárodečný polymorfismus (SNP, rs1047303) s alelickou frekvencí zhruba 22 % v normální populaci (Chang *et al.*, 2014). Hearn *et al.* (2016) uvádí na základě NCBI dbSNP databáze alelickou frekvenci 15-35 % v závislosti na etnickém původu studované populace. Přeměna DHEA na DHT je v normální tkáni regulována rychlým odbouráváním proteinu 3 β HSD1. Polymorfismus (1245A \rightarrow C) vede k záměně aminokyselin (367Asn \rightarrow Thr) a k rezistenci 3 β HSD1 vůči proteazomové degradaci. Tím dochází ke kumulaci proteinu a zvýšení mimogonadální syntézy DHT. 3 β HSD1 (367T) pravděpodobně také reguluje jakoukoli *de novo* syntézu z cholesterolu a z ostatních adrenálních prekurzorů (Obr. 2) (Chang *et al.*, 2014). Podle Chang *et al.* (2014) má 3 β HSD1 (367T) význam i při intratumorální syntéze DHT. Uplatnit se může autokrinní sekrece DHT, kterou si nádorové buňky mohou zajišťovat růst samy díky vlastní produkci DHT.

Masivní konverze DHEA na androstendion je popsána u prostatických buněčných linií LNCaP a VCaP. Tyto linie jsou homozygotní pro variantní alelu (1245C/C), naopak linie LAPC4 má "wild-type" alely (1245A/A). U těchto buněk dochází k přeměně DHEA pomalu a syntéza dalších metabolitů je omezená. Citovaná práce také ukazuje aktivnější metabolismus DHEA na DHT vlivem přítomnosti variantní alely 1245C/C v *in vivo* studii na myších xenograftech (Chang *et al.*, 2013). Také u pacientů s karcinomem prostaty přítomnost jedné nebo více variantních alel v zárodečné DNA vede k zvýšené DHT syntéze z extragonadálních prekurzorů, predikuje rychlejší progresi k CRPC a rezistenci k ADT. U pacientů s heterozygotní formou genu (1245A/C) lze očekávat příznivější odpověď na léčbu než u pacientů nesoucích homozygotní variantu (1245C/C). V přítomnosti homozygotní varianty typu wild-type (1245A/A) by měly být výsledky léčby nejlepší (Hearn *et al.*, 2016).

Nejnovější práce uvádí, že na základě dědičnosti HSD3B1 (1245C) variantní alely, lze také predikovat citlivost k extragonadální androgenové ablaci nesteroidním CYP17A1 inhibitorem (Almassi *et al.*, 2017). Hearn *et al.* (2017) ve své studii ukazuje spojitost této variantní alely s rychlejším vývojem metastáz u mužů léčených ADT kvůli biochemické rekurenci po primární radiční terapii karcinomu prostaty.

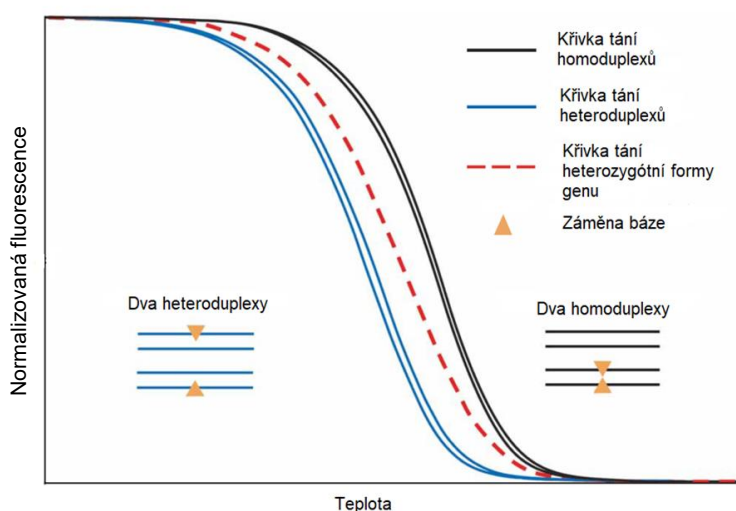
Detekce přítomnosti varianty HSD3B1 (1245C) v zárodečné DNA by tak mohla u pacientů s CRPC sloužit jako prognostický indikátor horší odpovědi na ADT a mohla by pomoci vybrat ty pacienty, kteří by profitovali z časnější razantnější léčby jako např. gonadální

suprese kombinované s docetaxelem nebo s novými léky (enzalutamid a abirateron acetát) (Hearn *et al.*, 2016).

5 Analýza křivek tání (High Resolution Melting, HRM)

Analýza křivek tání (High Resolution Melting, HRM) je velmi citlivá a specifická metoda umožňující detekci SNPs (single-nucleotide polymorphisms) a malých inzercí a delecí. Vlastní analýzu, v případě použití pro skenování mutací nebo genotypování, předchází asymetrická PCR v přítomnosti saturační fluorescenční barvy a neznačené oligonukleotidové proby. Analyzovány jsou fluorescenční křivky tání jak duplexů PCR ampliconů, tak duplexů amplicon-proba (Montgomery *et al.*, 2007).

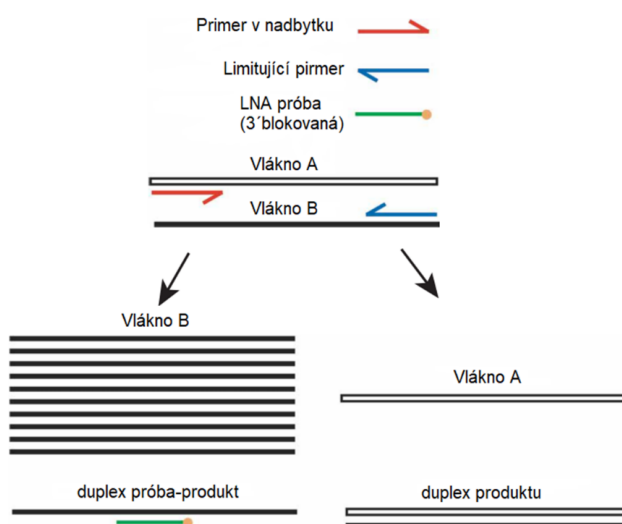
Teplou stabilitu produktů PCR reakce určuje sekvence bází, délka vlákna a obsah CG párů. (Ririe *et al.*, 1997). Pokud dojde ke změně v této sekvenci například mutací, dochází k nekomplementárnímu párování bází, mění se stabilita duplexu a tím i jeho teplotní chování (Palais *et al.*, 2005). Pokud je změna homozygotní, dochází obvykle pouze k posunu teploty tání (T_m). Při heterozygotní změně vznikají po denuraci a následné reasociaci vláken čtyři duplexy: dva heteroduplexy a dva homoduplexy (Obr. 4). Výsledná křivka tání je kombinací křivky tání homoduplexů i heteroduplexů, což se projeví nejen snížením teploty tání (T_m), ale i změnou tvaru křivky (Montgomery *et al.*, 2007).



Obr. 4 Schéma křivek tání homoduplexů a heteroduplexů získané HRM analýzou (převzato a upraveno dle Montgomery *et al.*, 2007). Při PCR reakci se v případě heterozygotní záměny vytváří kromě dvou homoduplexů (černě) i dva heteroduplexy (modře) a výsledná křivka tání je kombinací křivek tání těchto duplexů (červeně).

Použitím neznačených oligonukleotidových prób lze specificky detekovat krátké sekvence, u nichž je záměna bází známá. Próby jsou navrženy tak, že vazbou na wild-type nebo mutantní sekvence identifikují určitý genotyp. Teplota tání duplexů amplicon-proba je oproti teplotě tání

duplexů PCR amplikonů nižší. Ve většině případů probíhá tato reakce v uzavřeném systému, kdy je próba přidána do reakční směsi před zahájením PCR reakce. Proba v tomto případě obsahuje 3' blokátor a ke zvýšení množství vlákna, ke kterému proba hybridizuje, se využívá asymetrické PCR (Zhou *et al.*, 2004; Montgomery *et al.*, 2007) (Obr. 5). Další zvýšení senzitivity a specificity umožňuje použití neznačených LNA prób (Locked Nucleic Acid, LNA). Tyto oligonukleotidy mají ve své struktuře ribózový kruh "uzamčený" metylénovým můstkem, který ovlivňuje konformaci próby. Hybridizace próby ke komplementární sekvenci DNA je potom specifitější a umožňuje rozlišení i vysoce příbuzných sekvencí a detekci SNPs. Vlastní genotypování probíhá jednoduchou analýzou profilu křivek tání pomocí softwaru, úspěšné rozlišení mezi homozygoty a citlivá detekce heterozygotů záleží také na rozlišení samotného přístroje, použité fluorescenční barvě a čistotě PCR produktu.



Obr. 5 Schéma asymetrické PCR s LNA neznačenou próbou (převzato a upraveno z Montgomery *et al.*, 2007). V přítomnosti obou primerů v průběhu PCR reakce se množství DNA zvyšuje exponenciálně. Po vyčerpání limitujícího primeru (označen modře) se tvoří vlákno DNA pouze z primeru v nadbytku (označen červeně) a tím je upřednostněna tvorba vlákna, ke kterému se hybridizuje próba pro genotypizaci SNP.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Automatické pipety (Eppendorf)
- Elektroforetický systém Mini PROTEAN® TetraCell (BioRad)
- Elektroforetický zdroj MP – 300 V (Majorscience)
- Flow-box MSC – ADVANTAGE (Thermo Scientific)
- Chladicí stojan (Brand GmbH + CO)
- Inkubátor CO₂ HERA cell (Thermo Scientific)
- Kývačka MiniRocker MR-1 (Biosan)
- LightCycler® 480 (Roche)
- Magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph Instruments)
- Minicentrifuga EPP Minispin (plus) (Eppendorf)
- Minicentrifugas nádstavcem pro PCR stripy (Labnet)
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Světelný mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
- Termoblok TS-100C (Biosan)
- UV transiluminator G:Box (Syngene)
- Vortex (IKA)

6.2 Spotřební materiál

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

6.3 Použité chemikálie a roztoky

- 10% peroxidisíran amonný (PERS) (Serva)
- 30% Akrylamid/Bis Solution, 29 : 1 (Serva)
- 99,5% ethanol (FAGRON)
- 5x TBE pufr (445 mM Tris base (NH₂C(CH₂OH)₃), 445 mM kyselina boritá (H₃BO₃), 10 mM EDTA, pH 8,2-8,4)
- Deionizovaná H₂O
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x (Biotium)
- Nanášecí pufr pro DNA (40 % sacharóza; 0,1M EDTA 0,25% bromfenolová modř)

- N, N, N', N' tetramethylethylendiamin (TEMED)
- PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4-7,5)
- Standard molekulové hmotnosti-HyperLadder 25 bp (Bioline)

6.4 Použitá média

- RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma)
- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Sigma)
- DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (PAA Laboratories)
- SFM (Serum-free Medium) (GIBCO)

6.5 Použité kity

- LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Master (Roche) (kit obsahuje 2× koncentrovaný Master Mix; MgCl₂, 25 mM; vodu pro PCR)
- 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)

6.6 Primery a próby

Tab. 1 Přehled používaných primerů a prób (EXIQON).

Primer/Próba	Sekvence
Primer forward	5'-GTCAAATAGCGTATTCACCTTCTCTTAT-3'
Primer reverse	5'-GAGGGTGGAGCTTGATGACATCT-3'
Próba	5'-GGAGA <u>A</u> CCTGAAGTCCAAGACTCAGTGATTTAAGG-3'
Próba 3P	5'-GGAGA <u>A</u> CCTGAAGTCCAAGACTCAGTGATTTAAGG-P-3'

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

6.7 Biologický materiál

V prováděných experimentech byly používány buněčné linie LNCaP, LAPC-4, VCaP a RWPE odvozené od karcinomu prostaty. Nádorové buněčné linie LNCaP a RWPE byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC), linie LAPC4 byly získány od Mgr. Karla Součka, Ph.D (Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno). K detekci polymorfismu byl použit soubor 40 vzorků izolované DNA, která byla získána pomocí izolačního kitu *QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)* podle návodu výrobce. Vstupním materiálem pro izolaci byla plná krev od pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty, kteří podepsali informovaný souhlas.

6.8 Metody

6.8.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty byly kultivovány ve standardních médiích pro konkrétní buněčnou linii (Tab. 2) v atmosféře 5% CO₂ při 37 °C. Buňky byly pasážovány 1- 2x týdně pomocí 0,25% trypsinu-EDTA (Sigma). Pro izolaci DNA byl po pasáži odebrán objem buněčné suspenze obsahující 300 000 buněk. Suspenze byla stočena (5 minut, 800 x g), bylo odsáto médium a peleta rozsuspendována v 1 ml PBS. Následovala centrifugace (3 min, 800 x g) a odsátí supernatantu. Postup byl dvakrát zopakován. Takto připravená buněčná peleta byla použita pro izolaci DNA.

Tab. 2 Média a jejich složení pro kultivaci buněčných linií.

Buněčná linie	Médium	Obohacení
LNCaP	RPMI-1640 (Sigma)	10% FBS (fetální bovinní sérum) (PAA) L-glutamin 200 mM (GIBCO) pyruvát sodný 1mM (Sigma) penicilin 1 U/ml (GIBCO) streptomycin 1 U/ml (GIBCO)
LAPC-4	IMDM (Sigma)	10% FBS (PAA) L-glutamin 200 mM (GIBCO) penicilin 1 U/ml (GIBCO) streptomycin 1 U/ml (GIBCO) faktor R1881 1nM
VCaP	DMEM F12 (PAA Laboratories)	10% FBS (PAA) L-glutamin 200 mM (GIBCO) penicilin 1 U/ml (GIBCO) streptomycin 1 U/ml (GIBCO)
RWPE	SFM (GIBCO)	1% Amphotericin B (Amresco) 1% Gentamicin 20 mg/ml penicilin 1 U/ml (GIBCO) streptomycin 1 U/ml (GIBCO)

6.8.2 Izolace buněčné DNA

Izolace buněčné DNA byla prováděna pomocí izolačního kitu *QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)* (QIAGEN) podle izolačního protokolu výrobce. Prvním krokem je lýza buněk a zahřátí. K vlastní izolaci se využívá kolonka, na jejíž membráně se zachytí DNA vysrážená ethanolem. Následným promytím a uvolněním elučním puřrem se získá čistá DNA.

Pracovní postup izolace DNA

- K buněčné peletě (obsahující 300 000 buněk) bylo přidáno 200 µl PBS a rozsuspendováno pomocí pipety.
- Následovalo přidání 20 µl proteinázy K a 200 µl lyzačního AL pufru a vzorek byl důkladně promíchán po dobu 15 sekund (vortex).
- Poté byl vzorek inkubován po dobu 10 minut v termobloku při 56 °C a následně krátce stočen pro odstranění kapek z povrchu víčka mikrozkušavky.
- Bylo přidáno 200 µl ethanolu (99,5%) a vzorek opět promíchán po dobu 15 sekund (vortex), následovala krátká centrifugace.
- Lyzát byl přenesen na QIAamp Mini kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce tak, aby nedošlo k namočení okrajů kolonky.
- Kolonka byla uzavřena a následovala centrifugace podobu 60 sekund při 6000 x g (v případě, že celý lyzát neprošel membránou kolonky, centrifugace se byla opakována při vyšších otáčkách, případně byla prodloužena doba stáčení).
- Po centrifugaci byla kolonka přemístěna do čisté sběrné zkumavky, bylo přidáno 500 µl promývacího AW1 pufru a následovala centrifugace po dobu 60 sekund při 6000 x g.
- Kolonka byla opět přemístěna do čisté sběrné zkumavky, pro další promytí bylo přidáno 500 µl promývacího AW2 pufru a vzorek byl centrifugován po dobu 3 minut při 20 000 x g.
- Po centrifugaci byla kolonka znovu přemístěna do čisté sběrné zkumavky a pro důkladné odstranění AW2 pufru následovala znovu centrifugace po dobu 3 minut při 20 000 x g.
- Kolonka byla poté umístěna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a přímo na střed membrány bylo napipetováno 50 µl elučního AE pufru.
- Pro zvýšení výtěžku izolované DNA byla kolonka inkubována 5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována po dobu 1 minuty při 6000 x g.
- Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla změřena na Nanodropu.
- DNA byla uchována při -20 °C.

6.8.3 Měření koncentrace a čistoty DNA

K měření koncentrace a čistoty DNA byl používán spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Pracovní postup pro měření koncentrace a čistoty DNA

- Ramena spektrofotometru byla očištěna buničinou navlhčenou deionizovanou vodou a přístroj byl připraven k měření.
- V prvním kroku bylo nanášeno 2 μ l elučního pufru (AE) a změřena hodnotaslepého vzorku („blank“).
- Po opětovném očištění byly nanášeny 2 μ l vzorku DNA a byla změřena jeho koncentrace (ng/ μ l) a čistota (poměr absorbancí 260/280).
- Mezi jednotlivými měřeními byla ramena spektrofotometru vždy důkladně otřena.
- Naměřené hodnoty byly uloženy.

6.8.4 Asymetrická Real-Time PCR

Při PCR (polymerázové řetězové reakci) dochází k namnožení úseku DNA daného zvolenými primery. Asymetrická PCR je modifikací běžné PCR, která umožňuje preferenční syntézu jednoho vlákna z duplexu DNA díky zvýšení koncentrace jednoho z použitých primerů. V průběhu PCR vzniká nejprve obvyklým způsobem dvouvláknová DNA, jejíž množství se zvyšuje exponenciálně. Po vyčerpání limitujícího primeru se v následujících cyklech tvoří jen jedno vlákno, kterého přibývá lineárně. Kvantitativní real-time PCR (qPCR) umožňuje sledování průběhu PCR přímo během reakce („v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Pro přípravu reakcí byl použit kit *LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Master (Roche)*.

Pracovní postup pro přípravu PCR reakce

- PCR reakce byly připravovány v čistém prostředí PCR laboratoře (dekontaminace prostředí germicidním UV zářičem, dekontaminace ploch (ethanol, SAVO)) a při práci byly používány ochranné latexové rukavice.
- Pro pipetování všech reagensů a při práci s produkty PCR byly používány špičky s filtrem.
- Zmrazené reagensie byly rozmrazeny a promíchány (vortex).
- Podle Tab. 4 byly nejprve připraveny reakční směsi v objemu odpovídajícímu počtu zpracovávaných vzorků.
- Do jednotlivých jamek PCR stripů dle předem připravených rozpisů bylo napipetováno 15 μ l připravené reakční směsi.
- DNA byla naředěna elučním pufrem na požadovanou koncentraci (koncentrace uvádět/neuvádět).
- Do jednotlivých jamek s reakční směsí bylo přidáno 5 μ l naředěné DNA dle rozpisu.

- Pro negativní kontrolu bylo místo DNA pipetováno 5 μ l vody.
- Stripy byly uzavřeny víčkem a zcentrifugovány.
- Pomocí adapteru byly stripy umístěny do light cycleru LC480 Roche a spuštěn příslušný program dle Tab. 3.
- Po skončení programu byla provedena analýza dat a výsledky vyexportovány v textové a grafické podobě.

Tab. 3: Podmínky pro amplifikaci úseku DNA primery a analýzu křivek tání pomocí LNA oligonukleotidové próby.

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	Křivka tání	95	60 s	1
		40	60 s	1
		60-95	1 s	1
	Chlazení	40	-	1

Tab. 4: Složky reakční směsi PCR reakce.

Složky PCR reakce	Objem složky pro 1 reakci [μ l]
Master mix 2x konc.	10,0
Primer HSD3B1_FW [10 μ M]	0,1
Primer HSD3B1_RV [10 μ M]	1,0
próba HSD3B1_LNA_probe [10 μ M]	1,0
MgCl ₂ [25 mM]	2,4
DNA	5,0
H ₂ O, PCR grade	0,5
Celkový objem	20,0

6.8.5 Kontrola produktů PCR reakce pomocí polyakrylamidové elektroforézy

Gelová elektroforéza (agarozová nebo polyakrylamidová) se používá pro separaci nabitých molekul v elektrickém poli. Záporně nabité molekuly DNA se pohybují směrem od katody k anodě a jsou separovány na základě rozdílné pohyblivosti, která odpovídá velikosti fragmentů. Použitím vhodného standardu molekulové hmotnosti lze ověřit délku fragmentů.

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

Pracovní postup

- Byla sestavena elektroforetická aparatura, použita byla skla pro tloušťku gelu 1,5 mm, velikost hřebínku (počet jamek) byla zvolena s ohledem na počet zpracovávaných vzorků.
- Byla připravena směs na 6% polyakrylamidový gel, reagenty byly přidávány v uvedeném pořadí: 22,96 ml deionizované H₂O, 7 ml 30% směsi polyakrylamid + bisakrylamid, 3,5 ml 5x TBE pufru, 400 µl 10% PERS (amonium persulfát) a 22,5 µl TEMED (N, N, N', N' tetramethylethylendiamin)
- K promíchání byla použita elektromagnetická míchačka a směs byla napipetována mezi sestavená skla a vložen hřebínek.
- Po ztuhnutí gelu (45 minut) byly vytaženy hřebínky, skla byla umístěna do elektroforetické komory a zalita 700 ml 0,5x TBE pufru.
- Vzorky pro nanesení na gel byly připraveny smícháním 10 µl PCR produktu a 1 µl nanášecího pufru a napipetovány do jednotlivých jamek (10 µl směsi/jamka).
- Pro kontrolu molekulové hmotnosti byl na gel nanesen hmotnostní standard HyperLadder 25 bp (3 µl/jamka).
- Elektroforetická separace probíhala při 100 V 60 minut.
- Po ukončení elektroforézy byl gel vložen na 45 minut do barvicího roztoku GelRed a následně do deionizované H₂O.
- Vizualizace separovaných PCR produktů byla provedena pomocí UV transiluminátoru G:Box.

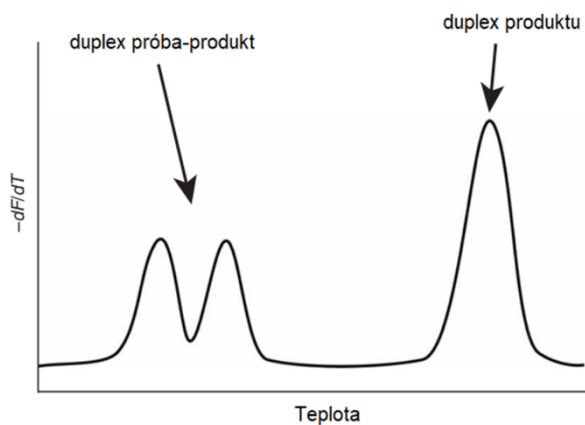
6.8.6 High resolution melting (HRM)

Křivky tání byly vyhodnocovány pomocí software přístroje LightCycler® 480 (Roche). Používány byly analýzy T_m Calling a Gene Scanning.

T_m Calling analýza vyhodnocuje profil křivek tání (závislost fluoescence na teplotě) a slouží ke stanovení charakteristické teploty tání cílové DNA a identifikaci nebo genotypizaci produktů PCR reakce. Software při této analýze počítá pro každý vzorek teplotu tání (T_m) (definovanou jako teplotu, při které je polovina dvouřetězcové DNA denaturována na jednořetězcovou DNA), teplotní pík, jeho šířku a plochu pod píkem (Obr. 6). V případě genotypizace HSD3B1 pomocí nezačené LNA próby by teplota tání duplexů amplikon-próba měla být v rozmezí 71,5°C-74°C, teplotní rozmezí pro duplexy amplikonů odpovídá 86°C-88°C.

Také analýza Gene Scanning identifikuje změny ve tvaru křivek tání, které ukazují na přítomnost sekvenčních variant mezi PCR produkty. Základní kroky, které software při vyhodnocení provádí, spočívají nejprve ve vyřazení vzorků s nízkým fluorescenčním signálem

a následné normalizaci křivek. Při normalizaci dochází k převedení počátečních a konečných hodnot fluorescence u analyzovaných vzorků na relativní hodnoty. Dalším krokem je posun teplotní osy normalizovaných křivek do bodu, kdy je všechna dsDNA denaturovaná. Posledním krokem pro rozlišení daného genotypu je výpočet diferenční křivky, která umožňuje zvýraznění rozdílů mezi vzorky a jejich zařazení do skupin podle podobnosti křivek tání.



Obr. 6 Grafické znázornění profilu křivek tání pomocí píků. Graf je získán derivací fluorescenční křivky, teplota tání je zobrazena jako pik pro snadnější rozlišení charakteristického profilu křivky a zvýraznění rozdílů mezi vzorky.

7 Výsledky a diskuze

Experimentální část práce vycházela z publikace Hearn a spolupracovníků uveřejněné v *Lancet Oncology* v roce 2016, kde retrospektivně stanovovali HSD3B1 genotyp u mužů s karcinomem prostaty v souvislosti s rezistencí k ADT (Hearn *et al.*, 2016).

7.1 Optimalizace PCR reakce

Vzhledem k odlišnému přístrojovému vybavení pracoviště, byla prvním krokem pro mapování zárodečného polymorfismu 1245A→C v genu HSD3B1 optimalizace PCR reakce. Reakční podmínky uvedené v publikaci byly upraveny podle doporučení výrobce k použitému reakčnímu mixu LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche) a cycleru LightCycler® 480 (Roche).

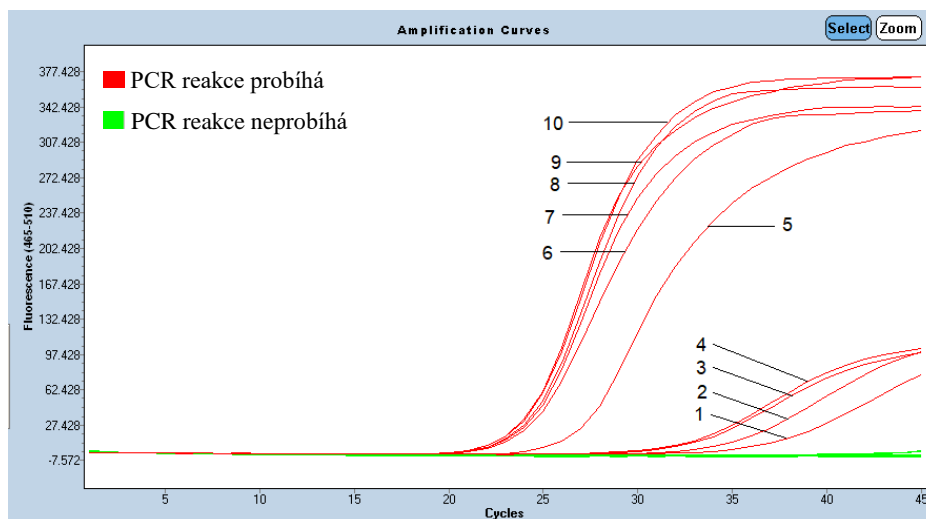
Teplotní a časové nastavení jednotlivých kroků pro vlastní amplifikaci DNA i získání křivek tání je uvedeno v Tab. 3, složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4.

Použitý reakční mix vyžadoval nejprve stanovení optimální koncentrace hořečnatých iontů (MgCl_2) v reakční směsi pro daný pár primerů. Byla připravena koncentrační řada chloridu hořečnatého o výsledné koncentraci 1,0 až 3,5 mM v reakci (Tab. 5).

V tomto kroku bylo do reakcí použito 30 ng DNA ze souboru patientských vzorků, počet amplifikačních cyklů byl zvýšen oproti Tab. 3 na 60. Zároveň pro ověření správného průběhu PCR reakce, vzhledem k použití neblokované próby, byly reakce rozděleny. Jedna část probíhala v tzv. uzavřeném systému, kdy byla próba přidána do reakční směsi hned na začátku dle Tab. 4. Paralelně běžely pro vzorky reakce bez próby (v reakční směsi dle Tab. 4 bylo úměrně navýšeno množství vody) v tzv. otevřeném systému. Při těchto reakcích byla próba přidávána ke vzorku až po dokončení amplifikace. Výsledné fluorescenční křivky jsou na Obr. 7.

Tab. 5 Množství 25 mM MgCl_2 odpovídající výsledné koncentraci MgCl_2 v reakci.

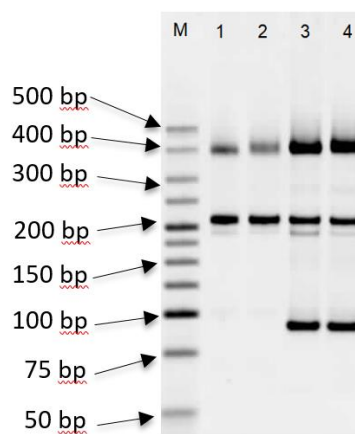
Výsledná koncentrace MgCl_2 v reakci [mM]	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Množství 25 mM MgCl_2 v 1 reakci [μl]	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8



Obr. 7 Fluorescenční křivky DNA při stanovení vhodné koncentrace hořečnatých iontů v reakční směsi. Amplifikace probíhala 60 cyklů za podmínek uvedených v Tab. 3 a výchozí množství DNA činilo 30 ng. Zelené křivky představují reakce, u nichž koncentrace hořečnatých iontů nebyla dostačující (reakční směs vzorku BF 171 bez próby s koncentrací hořečnatých iontů 1,0-2,5 mM; reakční směs vzorku BF 171 s próbou s koncentrací hořečnatých iontů 1,0, 1,5 a 2,5 mM; reakční směs vzorku BF 156 bez próby s koncentrací hořečnatých iontů 1,0-2,5 mM; reakční směs vzorku BF 156 s próbou s koncentrací hořečnatých iontů 1,0-2,0 mM). Červené křivky představují reakce s dostatečnou koncentrací chloridu hořečnatého pro průběh reakce. Amplifikační křivky 1-4 odpovídají reakcím s pacientskými vzorky DNA bez próby s koncentrací hořečnatých iontů ($MgCl_2$) 3,0 a 3,5 mM (1 BF 171, 3,0 mM; 2 BF 156, 3,5 mM; 3 BF 156, 3,0 mM; 4 BF 171, 3,5 mM). Amplifikační křivky 5-10 představují reakce s próbou v uzavřeném systému (5 BF 171, 2,0 mM; 6 BF 156, 3,5 mM; 7 BF 171, 3,5 mM; 8 BF 156, 2,5 mM; 9 BF 171, 3,0 mM; 10 BF 156, 3,0 mM).

Výsledky experimentu ukázaly, že vhodná koncentrace chloridu hořečnatého pro optimální průběh PCR reakce je 3,0 mM. Z amplifikačních křivek bylo zřejmé, že reakce v tzv. uzavřeném systému probíhají efektivněji než reakce bez próby. Bylo u nich dosaženo jak nižších Ct hodnot, tak vyšších výtěžků. To vedlo k domněnce, že neblokovaná próba může nahrazovat forward (Fw) primer, který je v asymetrickém uspořádání PCR v menší koncentraci.

Elektroforetická separace produktů ukázala, že v uzavřeném systému vznikají primárně produkty o velikosti přibližně 90 bp. To by odpovídalo velikosti produktu vniklého amplifikační úseku DNA ohraničeného próbou a Rv primerem (reverse primer, Rv) (90 bp). Syntéza DNA z próby byla potvrzena pozitivní PCR reakcí, při které byl vynechán Fw primer (forward primer, Fw). Velikost produktu, který vzniká z obou primerů, je 219 bp. Tento očekávaný band byl vidět u vzorků, u kterých PCR reakce probíhala bez próby (jamky 1 a 2 na Obr. 8). U těchto vzorků byl pozorován také band o velikosti 400 bp, který patrně odpovídá dimerům produktů. Teprve po přidavku próby k amplifikačním produktům a následné elektroforetické separaci byl detekován band v rozmezí velikostí 50-100 bp, který odpovídá duplexům próba-amplikon (jamky 3 a 4 na Obr. 8).



Obr. 8 Elektroforetogram produktů PCR reakce patientských vzorků BF 154 a BF 155 v otevřeném a uzavřeném systému. Podmínky experimentu odpovídají programu 1 a 2 z Tab. 3. Bylo nastaveno 60 cyklů amplifikace a vstupní množství DNA činilo 50 ng. Označení M odpovídá standardu molekulové hmotnosti (HyperLadder 25 bp). V jamce 1 a 2 probíhala separace produktů PCR reakce bez próby (1 BF154, 2 BF 155), v jamkách 3 a 4 byly separovány produkty po přidavku próby (3 BF 154, 4 BF 155).

Na základě těchto výsledků byly další experimenty prováděny v otevřeném systému.

7.2 Optimalizace HRM analýzy

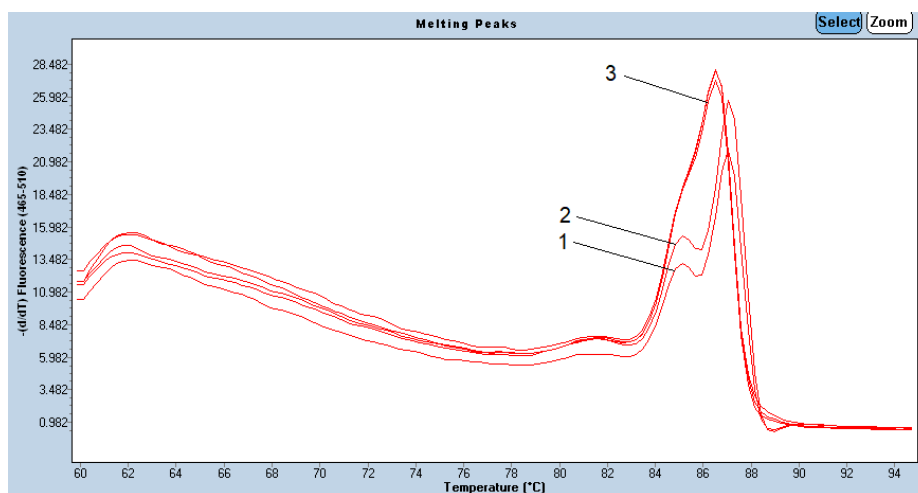
V dalším kroku bylo nutné zoptimalizovat HRM analýzu tak, aby byl jednoznačně odlišitelný polymorfni fenotyp HSD3B1 1245A/A (wild-type homozygot, WT), 1245 C/C (variantní homozygot, V) a 1245 A/C (variantní heterozygot, H). Na základě literatury byly vybrány kontrolní buněčné linie LNCaP a VCaP (s variantou 1245 C/C) a linie RWPE a LAPC-4 (s variantou 1245 A/A) (Chang *et al.*, 2014). Z linií byla vyizolována DNA, která byla použita při optimalizaci HRM a v následných experimentech.

Na základě předchozích experimentů byl počet cyklů amplifikace snížen na 55, dostatečný pro dosažení fáze plató. Kvůli zajištění optimálních Ct hodnot bylo naopak zvýšeno vstupní množství DNA na 50 ng. Reakce probíhaly v otevřeném systému, próba byla přidávána až po amplifikaci.

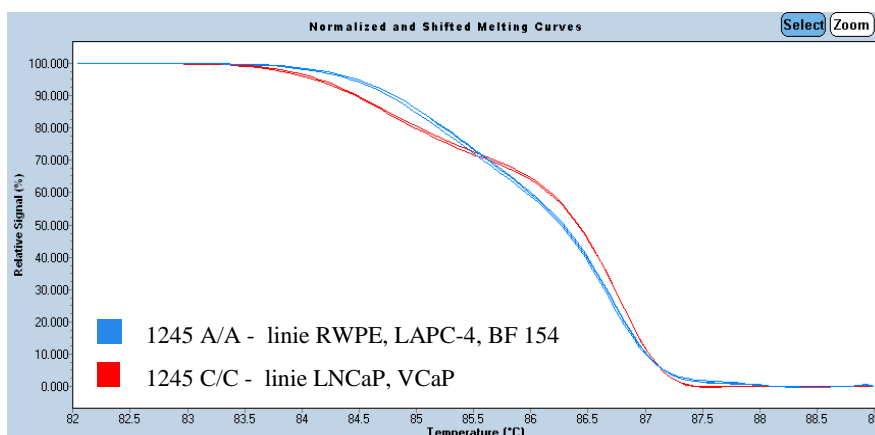
Výsledkem vyhodnocení křivek tání analýzou Tm Calling (Obr. 9) bylo odlišení buněčných linií LNCaP a VCaP od buněčných linií LAPC-4, RWPE a patientského vzorku BF154 počtem píků. Viditelné byly dva píky pro variantní homozygoty (LNCaP, VCaP) s maximy při teplotě 85,1°C a 87°C, na rozdíl od wild-type homozygotů (LAPC-4, RWPE, BF154), které reprezentoval pouze jeden pík s maximem při 85,9 °C.

Detailní hodnocení křivek pomocí Gene Scanning analýzy toto zařazení potvrdilo (Obr. 10). Vzorek DNA izolovaný z krve BF 154 byl zařazen do skupiny WT.

Zařazení buněčných linií do odpovídajících skupin bylo úspěšné i bez přidavku próby. Záměna jedné báze v nukleotidové sekvenci měla dostatečný vliv na teplotní chování duplexů a tím i odlišení homozygotních variant.



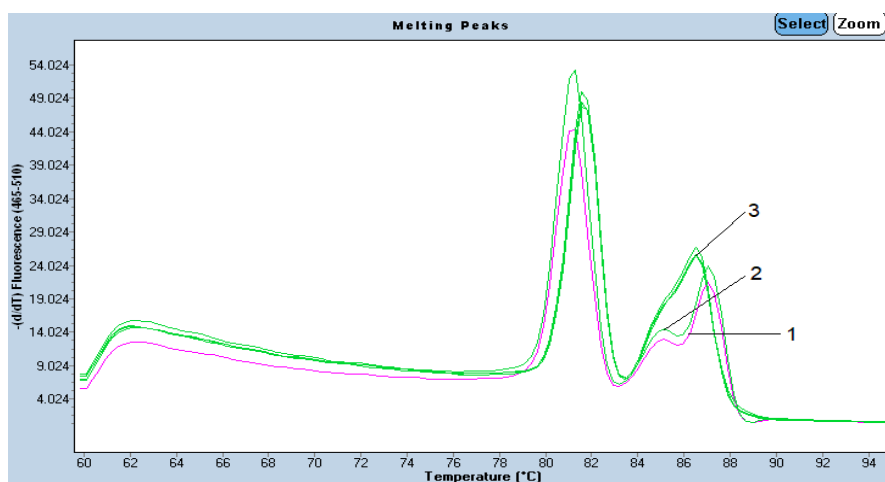
Obr. 9 Vyhodnocení křivek tání – Tm Calling analýza (PCR reakce bez próby, 55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 50 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2). Derivované fluorescenční křivky označené 1 a 2 vyobrazují polymorfni fenotyp 1245 C/C (1 VCaP, 2 LNCaP), jejichž maxima se nachází při 85,1 °C a 87 °C. Wild-type homozygotní fenotyp 1245 A/A zastupují buněčné linie RWPE, LAPC-4 a patientský vzorek BF 154, které představují píky označené 3 (maximum při 85,9 °C).



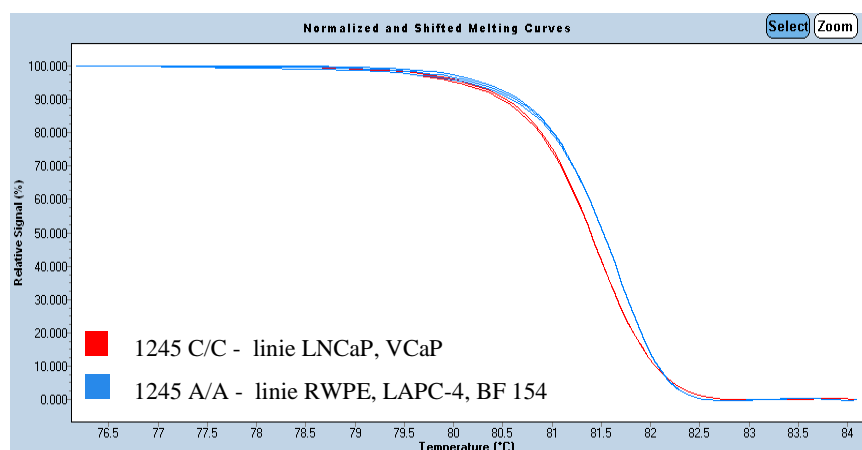
Obr. 10 Vyhodnocení křivek tání - Gene Scanning analýza (PCR reakce bez próby, 55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 50 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2). Červeně označené křivky znázorňují variantu 1245 C/C (linie LNCaP, VCaP), modře označené křivky znázorňují variantu 1245 A/A (linie RWPE, LAPC-4, BF 154).

V dalším kroku byla k amplifikačním produktům přidána próba a znovu byla provedena analýza křivek tání. Po přidavku próby se objevil v oblasti 81°C-82°C u všech vzorků další pík odpovídající pravděpodobně duplexu proba-amplikon. Teplotní posun mezi jednotlivými vzorky u tohoto píku nebyl dostatečný a nepřispěl tak k jednoznačnějšímu rozlišení variantních

genotypů (Obr. 11). Gene scanning analýza potvrdila rozdělení linií do stejných skupin jako analýza píků náležících amplifikačním produktům bez próby (Obr. 12).



Obr. 11 Vyhodnocení křivek tání - Tm Calling analýza (přidavek próby k amplifikačním produktům, 55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 50 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2; otevřený systém). Derivované fluorescenční křivky označené 1 a 2 vyobrazují polymorfní fenotyp 1245 C/C (1 VCaP, 2 LNCaP), Wild-type homozygotní fenotyp 1245 A/A zastupují buněčné linie RWPE, LAPC-4 a patientský vzorek BF 154, které představují píky označené 3. Pík v oblasti 81°C-82°C u všech vzorků odpovídá pravděpodobně duplexu proba-amplikon.



Obr. 12 Vyhodnocení křivek tání - Gene Scanning analýza (přidavek próby k amplifikačním produktům, 55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 50 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2; otevřený systém). Červeně označené křivky znázorňují variantu 1245 C/C (linie LNCaP, VCaP), modře označené křivky znázorňují variantu 1245 A/A (linie RWPE, LAPC-4, BF 154).

Profil křivek tání získaný analýzou Gene Scanning odpovídal teoretickému předpokladu, že variantní homozygotní vzorky a wild-type homozygotní vzorky se liší pouze hodnotou Tm, ne však tvarem křivky. I když přidavkem próby nevznikaly píky odpovídající duplexu proba-amplikon v teplotním rozmezí 71,5 °C-74 °C tak, jak uvádí Hearn *et al.* 2016,

bylo rozlišení homozygotů dostatečné a uvedené uspořádání reakce bylo používáno pro další experimenty.

7.3 Simulace heterozygotní varianty 1245 A/C

Mezi používanými buněčnými liniemi nebyla linie s heterozygotním genotypem. Tento genotyp je možné uměle vytvořit společným smícháním DNA jednotlivých homozygotních variant v poměru 1:1 v jedné reakci a heterozygotní variantu tak nasimulovat.

Pro tento experiment byly použity kontrolní buněčné linie LNCaP, RWPE a patientský vzorek BF 154. Pro amplifikaci bylo nastaveno 55 cyklů a vstupní množství DNA činilo 50 ng. V tomto kroku byla próba přidána k produktům PCR reakce.

Tab. 6 Vyhodnocení simulace heterozygotní varianty 1245 A/C analýzou Tma Calling a analýzou Gene Scanning.

Linie	Očekávaný genotyp	Určený genotyp Tm Calling	Určený genotyp Gene Scanning
LNCaP	V	V	V
LNCaP+RWPE	H	V	V
LNCaP+BF154	H	WT	H
RWPE	WT	WT	WT

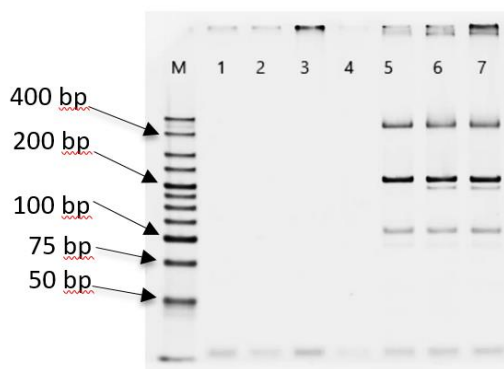
Výsledky analýz uvedené v Tab. 6 ukazují, že v tomto uspořádání experimentu nebylo možné heterozygotní variantu 1245 A/C spolehlivě rozlišit.

7.4 3'- fosforylovaná LNA neznačená próba

S doposud používanou neblokovanou prábou nebylo možné PCR reakce s následnou analýzou křivek tání provádět v uzavřeném systému a především nebylo dosaženo jednoznačného odlišení heterozygotní varianty. Také v použité literatuře popisovaný teplotní posun pík odpovídajících duplexu próba-amplikon (teplotní rozmezí 71,5-74 °C) nebyl v našem případě pozorován.

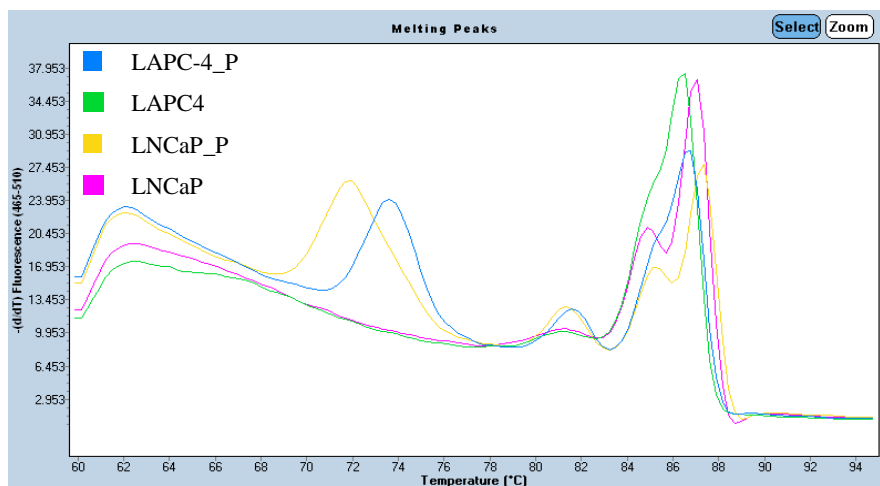
Domněnka, že může jít o rozdíl způsobený typem použité próby, se potvrdila. Přestože v práci, na základě které byly experimenty prováděny, nebylo uvedeno, že jde o prábou blokovanou na 3'- konci, z metodických článků to vyplývalo (Montgomery *et al.*, 2007). Na přímý dotaz autorům bylo potvrzeno, že v práci použitá próba byla na 3'konci blokována fosforylací. Další experimenty již byly prováděny s fosforylovanou prábou. Uspořádání experimentů odpovídalo Tab. 3. Celkové množství DNA v reakci bylo zvýšeno na 100 ng a bylo nastaveno 55 cyklů pro amplifikaci.

Nejprve bylo opět ověřeno, že próba nemá vliv na průběh PCR reakce a nenahrazuje při amplifikaci Fw primer. Při experimentu s 3'-blokovanou próbou v uzavřeném systému, kdy byl v reakční směsi vynechán Fw primer, bylo již z fluorescenčních křivek patrné, že reakce neprobíhá. Následnou elektroforetickou separací bylo potvrzeno, že v tomto případě nevznikají žádné produkty, na rozdíl od reakce ve standardním uspořádání dle Tab. 4 (Obr. 13).



Obr. 13 Elektroforetogram produktů PCR reakce s použitím 3'-blokované próby v uzavřeném systému bez Fw primeru a s Fw primerem. Podmínky experimentu odpovídají programu 1 a 2 z Tab. 3. Bylo nastaveno 55 cyklů amplifikace a vstupní množství DNA činilo 100 ng. Označení M odpovídá standardu molekulové hmotnosti (HyperLadder 25 bp). V jamce 1-4 probíhala separace produktů PCR reakce bez Fw primeru (1 LNCaP, 2 LAPC-4, 3 BF 154, 4 negativní kontrola), v jamkách 5-8 byly separovány produkty PCR ve standardním uspořádání (5 LNCaP, 6 LAPC-4, 7 BF 154).

V dalším kroku bylo provedeno srovnání výsledků genotypizace při použití próby a bez jejího použití u buněčných linií zastupujících V (LNCaP) a WT (LAPC-4) varianty. V uzavřeném systému, tj. při přidávku blokované próby před zahájením PCR reakce, byly při T_m calling analýze na derivovaných křivkách tání výrazné píky duplexů próba-amplikon v rozmezí teplot 71,5 °C-74 °C, které bez použití próby nevznikaly (Obr. 14). Kromě tohoto výrazného posunu v teplotách tání oproti teplotám tání duplexů produktů došlo při použití LNA próby navíc k posunu T_m mezi jednotlivými píky próba-amplikon odpovídajícím V a WT přibližně o 2 °C. To umožnilo specificky rozlišit křivku tání těchto variant (Obr. 14).

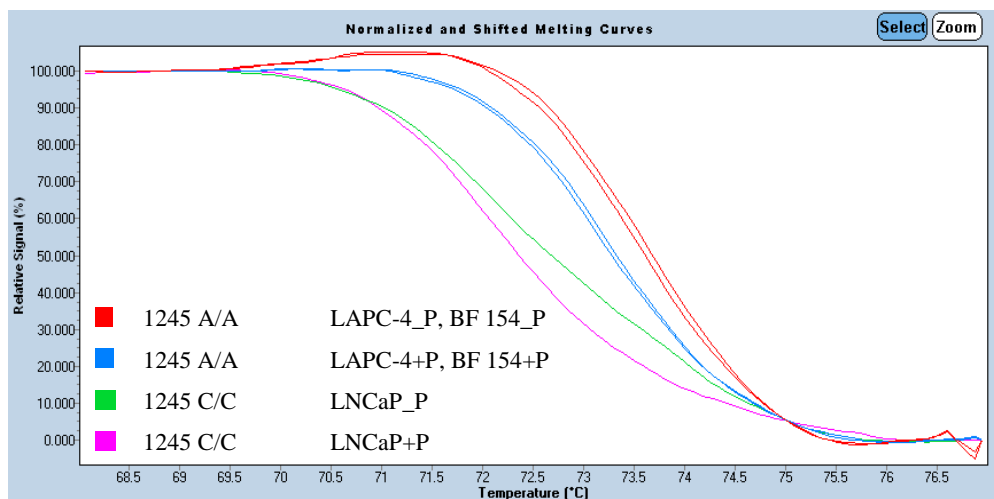


Obr. 14 Vyhodnocení křivek tání - Tm Calling analýza (55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 100 ng). Porovnání analýzy při přidavku próby před zahájením amplifikace a analýzy bez přidavku próby do reakční směsi. Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2). Žlutá křivka představuje křivku tání DNA buněčné linie LNCaP (V) s píkem patřícím duplexu próba-amplikon (71,9°C) a dalšími dvěma píky v oblasti 85°C-87,6°C odpovídajícími duplexu produktů. Modrá křivka odpovídá křivce tání DNA buněčné linie LAPC-4 (WT). Pík duplexu próba-produkt má maximum při 71,7°C, pík duplexu produktů se objevuje při 86,7°C. Amplifikačním produktům PCR reakce bez próby odpovídají zelená a růžová křivka tání, kdy pík duplexu próba-produkt nevzniká a píky odpovídající duplexu produktů leží v teplotním rozmezí 85 °C-87 °C.

Dále následovalo srovnání použití blokování próby v uspořádání v otevřeném a uzavřeném systému. Analýzou Tm calling i Gene Scanning (Obr. 15) byly kontrolní linie a analyzovaný patientský vzorek BF 154 zařazeny do dvou shodných skupin podle určeného genotypu. Křivky tání potvrdily, že Tm duplexů próba-amplikon u variantních homozygotů jsou nižší než Tm WT homozygotů přibližně o 2 °C (Tab. 7).

Tab. 7 Teploty tání duplexů próba-produkt a duplexů produktů v uspořádání otevřeném a uzavřeném zjištěné analýzou Tm Calling.

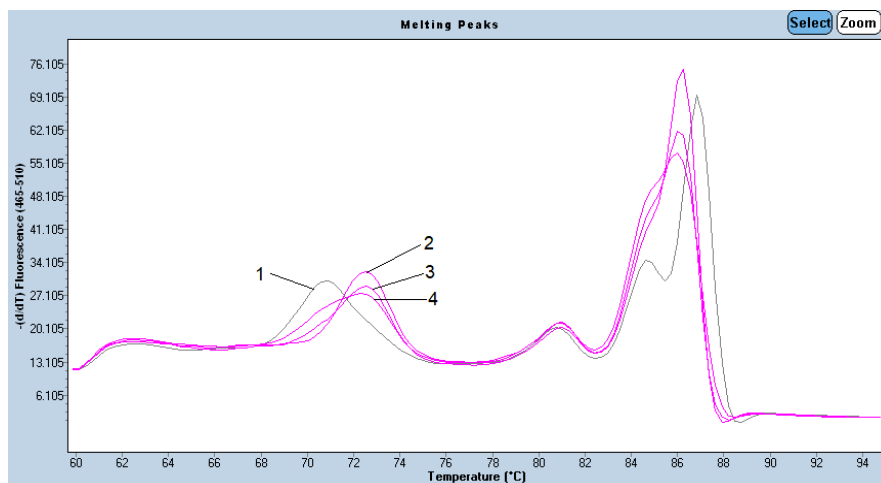
Vzorek	Genotyp	Teploty tání duplexů [°C]	
		Próba-produkt	Produktů
LNCaP_P	V	71,87	87,19
LNCaP+P	V	71,38	86,85
LAPC-4_P	WT	73,50	86,60
LAPC-4+P	WT	73,26	85,65
_P	uzavřený systém (próba přidána do reakční směsi před amplifikací)		
+P	otevřený systém (próba přidána do reakční směsi po amplifikaci)		



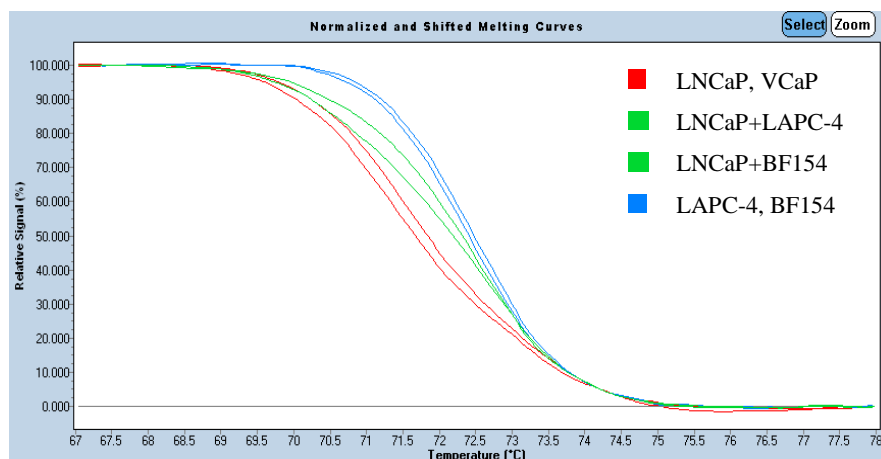
Obr. 15 Vyhodnocení křivek tání - Gene Scanning analýza (55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 100 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2; otevřený i uzavřený systém). Červeně označené křivky znázorňují variantu 1245 A/A v uzavřeném systému (_P) (LAPC-4, BF 154). Modře označené křivky znázorňují variantu 1245 A/A v otevřeném systému (+P) (LAPC-4, BF 154). Zelená a růžová křivka odpovídají homozygotní variantě 1245 C/C (LNCaP) při reakci v uzavřeném a otevřeném systému.

Použití otevřeného nebo uzavřeného systému s blokovanou próbou, v případě odlišení homozygotních variant, nemělo vliv na určení a zařazení jednotlivých genotypů do odpovídajících skupin. Na základě tohoto zjištění byly další experimenty prováděny pouze v uzavřeném systému.

Pro záchyt heterozygotní varianty byly vybrány buněčné linie zastupující V (LNCaP) a WT (LAPC-4) genotyp a patientský vzorek BF 154. Heterozygotní genotyp byl uměle simulován smícháním DNA vybraných vzorků v poměru 1:1. Uspořádání reakce odpovídalo Tab. 3 (program 1+2) a celkové množství DNA činilo 100 ng. Kombinace variantního homozygota se vzorkem BF 154 se ukázala jako nevhodná, genotyp nebylo možné rozlišit. Naopak pro kombinaci homozygotních linií V a WT, byl na derivovaných fluorescenčních křivkách odlišitelný dvojitý široký pík s teplotními maximy v rozmezí 69°C-74°C (Obr. 16).



Obr. 16 Vyhodnocení křivek tání při pozitivním zachycení heterozygotní varianty - Tm Calling analýza (55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 100 ng, uzavřený systém). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2). Graf zobrazuje derivované fluorescenční křivky. Křivka 1 a 2 představují pozitivní kontroly buněčných linií zastupující variantní a wild-type homozygotní variantu (1-LNCaP, 1245 C/C; 2-LAPC-4, 1245 A/A). Neúspěšnou heterozygotní simulaci kombinací LNCaP a BF 154 představuje křivka 3. Dvojitý pík heterozygotní varianty 1245 A/C vzniklé kombinací buněčných linií LNCaP a LAPC-4 znázorňuje křivka 4.



Obr. 17 Vyhodnocení křivek tání - Gene Scanning analýza (55 amplifikačních cyklů, vstupní množství DNA činilo 100 ng). Reakční podmínky byly nastaveny dle Tab. 3 (program 1 + 2; uzavřený systém _P). Červeně označené křivky znázorňují variantu znázorňují variantu 1245 C/C (LNCaP, VCaP). Modře označené křivky znázorňují variantu 1245 A/A (LAPC-4, BF 154). Zelené křivky odpovídají heterozygotní variantě 1245 A/C (LNCaP+LAPC-4, LNCaP+BF 154).

Z analýzy variantních homozygotních (LNCaP, VCaP), wild-type homozygotních (LAPC-4, BF 154) a heterozygotních (LNCaP+LAPC-4) genotypů pomocí Gene Scanning analýzy bylo zřejmé, že profil HRM křivek souhlasí s teorií křivek tání (Obr. 17). Křivky představující V genotyp (červené) a WT genotyp (modré) byly dobře odlišené a byl viditelný pokles teploty tání u variantních homozygotů. Dobře odlišitelný byl i profil křivky tání DNA heterozygotní varianty. V souladu s tím, že křivka vzniklá kombinací křivek tání homoduplexů

a heteroduplexů, se lišila jak teplotou tání, tak tvarem, a ležela mezi křivkami pro homozygotní varianty (Obr. 17).

Na základě těchto výsledků bylo pro genotypizaci souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty dále používáno uvedené nastavení, jako pozitivní kontroly byly zvoleny DNA izolované z buněčných linií LNCaP pro homozygotní variantu (1245 C/C), LAPC-4 zastupující wild-type genotyp (1245 A/A) a LNCaP+LAPC-4 představující heterozygotní variantu (1245 A/C).

7.5 Genotypizace 40 vzorků DNA izolovaných z krve pacientů

Posledním z cílů bakalářské práce byla genotypizace HSD3B1 u souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty. Bylo sledováno zastoupení variantní alely a jednotlivých genotypů.

Hearn et al. (2016) uvádí podle NCBI dbSNP alelickou frekvenci HSD3B1 (1245C) v závislosti na etnickém původu mezi 15-35%. Ve vlastní práci, kdy ve třech souborech hodnotili 443 pacientů po prostatektomii, byla alelická frekvence 29 %. V této sledované populaci nemělo 49 % mužů žádnou variantní alelu, u 43 % byla zjištěna jedna a u 7 % dvě variantní alely. Ve studii Hearn *et al.* (2017) je u souboru pacientů léčených ADT kvůli biochemické rekurenci po primární radiační terapii karcinomu prostaty popsáno, že 46 % mužů ze studovaného souboru nezdědilo variantní alelu (1245A/A), 45 % pacientů zdědilo 1 variantní alelu (1245 A/C) a 9 % má 2 alely (1245 C/C). Alelická frekvence variantní alely v této populaci činila 32 %. Také ve studii Agarwal *et al.* (2017) v souboru pacientů léčených ADT, kterým bylo diagnostikováno metastatické onemocnění, je uvedeno podobné zastoupení jednotlivých genotypů (48 % WT, 44 % H, 10 % V).

Tab. 8 Celkové zastoupení jednotlivých genotypů HSD3B1 v analyzovaném souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.

Celkem	1245 A/A		1245 C/C		1245 A/C	
	Počet	Zastoupení [%]	Počet	Zastoupení [%]	Počet	Zastoupení [%]
40	20	50,00	4	10,00	16	40,00

Tab. 9 Zastoupení jednotlivých genotypů HSD3B1 u pacientů s karcinomem prostaty (KP) a benigní hyperplazií prostaty (BHP).

Diagnóza	Celkem	1245 A/A		1245 C/C		1245 A/C	
		Počet	Zastoupení [%]	Počet	Zastoupení [%]	Počet	Zastoupení [%]
BHP	17	11	64,71	1	5,88	5	29,41
KP	23	9	39,13	3	13,04	11	47,83

Tab. 10 Alelická frekvence HSD3B1 (1245C) v analyzovaném souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.

Varianta	Počet vzorků	Celkem vzorků	Celkový počet alel	Alelická frekvence 1245C [%]
1245 A/A	20			
1245 C/C	4	40	80	30
1245 A/C	16			

V našem analyzovaném souboru 40 vzorků DNA izolovaných z krve pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty bylo 50% zastoupení homozygotního wild-type genotypu (1245 A/A), 10 % zastoupení homozygotního variantního genotypu (1245 C/C) a 40 % heterozygotního genotypu (1245 A/C) (Tab. 8). Ze 40 genotypizovaných pacientů byl u 23 z nich diagnostikován karcinom prostaty a u 17 benigní hyperplazie prostaty. Zastoupení jednotlivých genotypů v rámci těchto onemocnění je uvedeno v Tab. 9. Alelická frekvence HSD3B1 (1245C) u analyzovaného souboru pacientů činila dle získaných údajů 30 % (Tab. 10). Získané hodnoty velmi dobře korespondují s údaji z výše uvedených studií.

8 Závěr

Bakalářská práce se zabývala detekcí zárodečného polymorfismu (1245A→C) genu HSD3B1. Cílem práce byla optimalizace metody detekce zmíněného polymorfismu s využitím HRM analýzy a následná genotypizace souboru pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.

Teoretická část práce byla zaměřena na problematiku karcinomu prostaty v souvislosti s významem androgenů a regulací steroidogeneze. Další část byla věnována molekulární podstatě hormonální nezávislosti a rezistence na androgen deprivační terapii. Pozornost byla zaměřena na zděděný zárodečný polymorfismus (1245A→C) genu HSD3B1. Variantní alela HSD3B1 (1245C) je u pacientů spojena s horší odpovědí na kastrovační terapii a rychlejším vývojem metastáz a její detekce může pomoci predikovat horší odpověď na ADT.

V experimentální části práce byla nejprve optimalizována metoda asymetrické qPCR s nezačnou LNA próbou a následnou analýzou křivek tání. qPCR a HRM analýza byla prováděna na LightCycler® 480 s kitem LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche). Pro zvolený reakční mix byla optimalizována koncentrace hořčičných iontů (3 mM), množství DNA (100 ng/reakce) a počet amplifikačních cyklů (55). Jako kontrolní vzorky byly použity buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty se známou variantou HSD3B1: LNCaP (1245 C/C), LAPC-4 (1245 A/A) a jejich kombinace pro simulaci heterozygotní varianty (1245 A/C).

V prvních experimentech neumožnila neblokovaná LNA próba provádět PCR reakci a následnou analýzou křivek tání v uzavřeném systému. Především však nebylo dosaženo jednoznačného odlišení heterozygotní varianty. Použití LNA próby blokováno na 3'- konci fosforylací zjednodušilo postup analýzy a vedlo k specifickému odlišení křivek tání jednotlivých variant. Při T_m calling analýze byly na derivovaných křivkách tání výrazné píky duplexů próba-amplikon v rozmezí teplot 71,5°C-74°C. Píky odpovídající homozygotní variantní a homozygotní wild-type variantě byly vzájemně posunuty přibližně o 2 °C, heterozygotní variantu představoval odlišitelný dvojité široký pík v uvedeném teplotním rozmezí. Gene Scanning analýza křivek tání potvrdila rozlišení jednotlivých genotypů.

Posledním z cílů bakalářské práce byla genotypizace HSD3B1 u souboru 40 pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty. Bylo sledováno zastoupení variantní alely a jednotlivých genotypů. Alelická frekvence HSD3B1 (1245C) u analyzovaného souboru pacientů byla 30 %. Zastoupení jednotlivých genotypů bylo následující: 50 % pacientů mělo homozygotní wild-type genotyp (1245 A/A), 10 % homozygotní variantní genotyp (1245 C/C) a 40 % heterozygotní genotyp (1245 A/C). Získané výsledky odpovídaly hodnotám uvedeným v ostatních publikovaných studiích.

Detekce polymorfismu HSD3B1 může sloužit jako citlivý biomarker v predikci odpovědi pacientů s karcinomem prostaty na androgen deprivaci terapii. V bakalářské práci optimalizovaná metoda by mohla být používána v praxi jako doplňkové vyšetření pro pacienty s tímto onemocněním a pomoci při výběru těch, kteří by mohli profitovat z časnější razantnější léčby.

9 Použitá literatura

Abate-Shen C., Shen M. M. (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* **14**, 2410-2434.

Abrahamsson P. A. (1999) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* **39**, 135-148.

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., Russell C., Perry J., Ryan C. J., Friedlander T., Sharifi N. (2017) HSD3B1 and Response to a Nonsteroidal CYP17A1 Inhibitor in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology* [online] [cit. 2018-04-08] Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2657130?redirect=true>

Armandari I., Hamid A. R., Verhaegh G., Schalken J. (2014) Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate International* **2**, 105-113.

Attar R. M., Takimoto C. H., Gottardis M. M. (2009) Castration-Resistant Prostate Cancer: Locking up the Molecular Escape Routes. *Clinical Cancer Research* **15**, 3251–3255.

Attard G., Cooper C. S., de Bono J. S. (2009) Steroid hormone receptors in prostate cancer: a hard habit to break? *Cancer Cell* **16**, 458–462.

Augello M. A., Burd C. J., Birbe R., McNair C., Ertel A., Magee M. S., Frigo D. E., Wilder-Romans K., Shilkrot M., Han S., Jernigan D. L., Dean J. L., Fatatis A., McDonnell D. P., Visakorpi T., Feng F. Y., Knudsen K. E. (2013) Convergence of oncogenic and hormone receptor pathways promotes metastatic phenotypes. *The Journal of Clinical Investigation* **123**, 493-508.

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

Bashir M. N. (2015) Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **16**, 5137-5141.

Bonkoff H., Remberger K. (1993) Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy and Histopathology* **422**, 35–38.

Bonkhoff H., Remberger K. D. (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostate growth: a stem cell model. *The Prostate* **28**, 98-106.

Bonkoff H., Stein U., Remberger K. (1995) Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Human Pathology* **26**, 167–170.

Broeck T. V., Joniau S., Clinckemalie, Helsen C., Prekovic S., Spans L., Tosco L., Van Poppel H., Claessens F. (2014) The Role of Single Nucleotide Polymorphisms in Predicting Prostate Cancer Risk and Therapeutic Decision Making. *BioMed Research International* **2014**, 1-16.

Clarke J. M., Armstrong A. J. (2013) Novel Therapies for the Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Current Treatment Options in Oncology* **14**, 109-126.

Colombel M., Symmans F., Gil S., O'Toole K. M., Chopin D., Benson M., Olsson C. A., Korsmeyer S., Buttyan R. (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *The American Journal of Pathology* **143**, 390-400.

Crawford E. D., Eisenberger M. A., McLeod D. G., Spaulding J. T., Benson R., Dorr F. A., Blumenstein B. A., Davis M. A., Goodman P. J. (1989) A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *The New England Journal of Medicine* **321**, 419–424.

Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Cato A. C., Hittmair A., Radmayr C., Eberle J., Bartsch G., Klocker H. (1993) Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Molecular Endocrinology* **7**, 1541-1550.

Culig Z., Santer F. R. (2014) Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **33**, 413-427.

de Bono J. S., Logothetis C. J., Molina A., Fizazi K., North S., Chu L., Chi K. N., Jones R. J., Goodman 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 C. J., Sternberg C. N., Ellard S. L., Fléchon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Kheoh T., Haqq C. M., Scher H. I. (2011) Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* **364**, 1995–2005.

de Voogt H. J. (1992) The position of cyproterone acetate (CPA), a steroidal anti-androgen, in the treatment of prostate cancer. *The Prostate* **4**, 91-95.

Dean M., Fojo T., Bates S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* **5**, 275-284.

Dehm S. M., Tindall D. J. (2006) Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**, 333–344.

Dehm S. M., Tindall D. J. (2011) Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer* **18**, 183-196.

Devlin H., Mudryj M. (2009) Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Letters* **274**, 177-186.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **53**, 58-68.

Eder I. E., Culig Z., Putz T., Nessler-Menardi C., Bartsch G., Klocker H. (2001) Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. *European Urology* **40**, 241-51.

Efstathiou E., Titus M., Wen S., Hoang A., Karlou M., Ashe R., Tu S. M., Aparicio A., Troncoso P., Mohler J., Logothetis Ch. J. (2015) Molecular characterization of enzalutamide-treated bone metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Urology* **67**, 53-60.

Epstein J. I., Amin M. B., Beltran H., Lotan T. L., Mosquera J. M., Reuter V. E., Robinson B. D., Troncoso P., Rubin M. A. (2014) Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *The American Journal of Surgical Pathology* **38**, 756-767.

Fizazi K., Carducci M., Smith M., Damião R., Brown J., Karsh L., Milecki P., Shore N., Rader M., Wang H., Jiang Q., Tadros S., Dansey R., Goessl C. (2011) Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *The Lancet* **377**, 813-822.

Flück C. E., Pandey A. V. (2014) Steroidogenesis of the testis-new genes and pathways. *Annales d'Endocrinologie* **75**, 32-39.

Fukami M., Homma K., Hasegawa T., Ogata T. (2013) Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Developmental Dynamics* **242**, 320-329.

Gelmann E. P. (2002) Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology* **20**, 3001-3015.

Gioeli D. G. (2010) The promise of novel androgen receptor antagonists. *Cell Cycle* **9**, 440-441.

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.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration (2017) Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology* **3**, 524-548.

Grönberg H. (2003) Prostate cancer epidemiology. *The Lancet* **361**, 859-864.

Goodin S., Kane M. P., Rubin E. H. (2004) Epothilones: Mechanism of Action and Biologic Activity. *Journal of Clinical Oncology* **22**, 2015–2025.

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

Hanuš M., Matoušková M. (2012) Nové možnosti léčby kastročně rezistentního karcinomu prostaty. [online] [cit. 2018-03-22] Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Nove-moznosti-lecby-kastracne-rezistentniho-karcinomu-prostaty/6-L-1kg.magarticle.aspx>

Hayward S. W., Baskin L. S., Haughney P. C., Cunha A. R., Foster B. A., Dahiya R., Prins G. S., Cunha G. R. (1996) Stromal Development in the Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle of the Rat. *Cells Tissues Organs* **155**, 94-103.

Hayward S. W., Haughney P. C., Rosen M. A., Greulich K. M., Weier H. U., Dahiya R., Cunha G. R. (1998) Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. *Differentiation* **63**, 131–140.

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., Wanling X., Nakabayashi M., Almassi N., Reichard C. A., Pomerantz M., Kantoff P. W., Sharifi N. (2017) Association of HSD3B1 Genotype With Response to Androgen-Deprivation Therapy for Biochemical Recurrence After Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *JAMA Oncology* [online] [cit. 2018-04-08] Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2657131?redirect=true>

Heidenreich A., Aus G., Bolla M., Joniau S., Matveev V. B., Schmid H. P., Zattoni F. (2008) EAU guidelines on prostate cancer. *European Urology* **53**, 68–80.

Helsen C., Kerkhofs S., Clinckemalie L., Spans L., Laurent M., Boonen S., Vanderschueren D., Claessens F. (2012) Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Molecular and Cellular Endocrinology* **348**, 411-417.

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.

Chaffer C. L., Weinberg R. A. (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**, 1559-1564.

Chang K-H., Ercole C. E., Sharifi N. (2014) Androgen metabolism in prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical consequences. *British Journal of Cancer* **111**, 1249–1254.

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.

Chen X., Rycaj K., Liu X., Tang D. G. (2013) New insights into prostate cancer stem cells. *Cell Cycle* **12**, 579-586.

Isikbay M., Otto K., Kregel S., Kach J., Cai Y., Vander Griend D. J., Conzen S. D., Szmulewitz R. Z. (2014) Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones and Cancer* **5**, 72-89.

Imamoto T., Suzuki H., Yano M., Kawamura K., Kamiya N., Araki K., Komiya A., Nihei N., Naya Y., Ichikawa T. (2008) The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer. *International Journal of Urology* **15**, 472-480.

Javidan J., Deitch A. D., Shi X-B., deVere White R. W. (2005) The Androgen Receptor and Mechanisms for Androgen Independence in Prostate Cancer. *Cancer Investigation* **23**, 520-528.

Kantoff P. W., Higano C. S., Shore N. D., Berger E. R., Small E. J., Penson D. F., Redfern C. H., Ferrari A. C., Dreicer R., Sims R. B., Xu Y., Frohlich M. W., Schellhammer P. F. (2010) Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* **363**, 411-422.

Klotz L., Boccon-Gibod L., Shore N. D., Andreou C., Persson B-E., Cantor P., Jensen J-K., Olesen T. K., Schröder F. H. (2008) The efficacy and safety of degarelix: a 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU International* **102**, 1531–1538.

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.

Kyprianou N., Isaacs J. T. (1998) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* **122**, 552–562.

Labrie F., Bélanger A., Dupont A., Luu-The V., Simard J., Labrie C. (1993) Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clinical and Investigative Medicine* **16**, 475–492.

Labrie F., Luu-The V., Labrie C., Simard J. (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Frontiers in Neuroendocrinology* **22**, 185–212.

Lam J. S., Leppert J. T., Vemulapalli S. N., Shvarts O., Beldegrun A. S. (2006) Secondary hormonal therapy for advanced prostate cancer. *The Journal of Urology* **175**, 27-34.

Litvinov I. V., De Marzo A. M., Isaacs J. T. (2003) Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 2972–2982.

Lu W., Luo Y., Kan M., McKeehan W. L. (1999) Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 12827–12834.

Lubahn D. B., Joseph D. R., Sullivan P. M., Willard H. F., French F. S., Wilson E. M. (1998) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**, 327–330.

Maatman T. J., Gupta M. K., Montie J. E. (1985) Effectiveness of castration versus intravenous estrogen therapy in producing rapid endocrine control of metastatic cancer of the prostate. *The Journal of Urology* **133**, 620-621.

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.

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. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26321-26326.

Matoušková M. (2006) Farmakoterapie karcinomu prostaty. [online] [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Farmakoterapie-karcinomu-prostaty/6-L-ek.magarticle.aspx>

Miller W. L., Auchus R. J. (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* **32**, 81–151.

Montgomery R. B., Mostaghel E. A., Vessella R., Hess D. L., Kalthorn T. F., Higano C. S., True L. D., Nelson P. S. (2008) Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Research* **68**, 4447–4454.

Montgomery J., Wittwer C. T., Palais R., Zhou L. (2007) Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols* **2**, 59-66.

Mostaghel E. A., Marck B. T., Plymate S. R., Vessella R. L., Balk S., Matsumoto A. M., Nelson P. S., Montgomery R. B. (2011) Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clinical Cancer Research* **17**, 5913–5925.

Mostaghel E. A., Solomon K. R., Pelton K., Freeman M. R., Montgomery R. B. (2012) Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. *PLOS ONE* **7**, e30062. doi:10.1371/journal.pone.0030062

Nakamura Y., Hornsby P. J., Casson P., Morimoto R., Satoh F., Xing Y., Kennedy M. R., Sasano H., Rainey W. E. (2009) Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in the adrenal reticularis. *The Journal of Clinical Endocrinol & Metabolism* **94**, 2192–2198.

NCBI dbSNP database. dbSNP short genetic variations. [online] [cit. 2018-04-08] Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1047303

Palais, R., Liew, M. & Wittwer, C. (2005) Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical Biochemistry* **346**, 167–175.

Paller C. J., Antonarakis E. S. (2011) Cabazitaxel: a novel second- line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Design, Development and Therapy* **5**, 117–124.

Parker C., Nilsson S., Heinrich D., Helle S. I., O'Sullivan J. M., FOssa S. D., Chodacki A., Wiechno P., Logue J., Seke M., Widmark A., Johannessen D. C., Hoskin P., Bottomley D., James N. D., Solberg A., Syndikus I., Kliment J., Wedel S., Boehmer S., Dall'Oglio M., Franzén L., Coleman R., Vogelzang N. J., O'Bryan-Tear C. G., Staudacher K., Garcia-Vargas

J., Shan M., Bruland Ø. S., Sartor O. (2013) Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* **369**, 213-223.

Planz B., Aretz H. T., Wang Q., Tabatabaei S., Kirley S. D., Lin Ch-W., McDougal W. S. (1999) Immunolocalization of the keratinocyte growth factor in benign and neoplastic human prostate and its relation to androgen receptor. *The Prostate* **41**, 233–242.

Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group (2000) Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **355**, 1491–1498.

Quigley C. A., Bellis A. D., Marschke K. B., El-Awady M. K., Wilson E. M., French F. S. (1995). Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* **16**, 271-321.

Raudenská M., Balvan J., Gumulec J., Sztalmachová M., Polanská H., Adam V., Stíborová M., Eckschlager T., Kizek R., Masařík M. (2014) Molekulární mechanismy rezistence u nádorového onemocnění prostaty. *Praktický lékař* **94**, 87-92.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.

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

Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154–160.

Roobol M. J., Steyerberg E. W., Kranse R., Wolters T., van den Bergh R. C., Bangma C. H., Schröder F. H. (2010) A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer. *European Urology* **57**, 79–85.

Rosner W., Hryb D. J., Khan M. S., Nakhla A. M., Romas N. A. (1991) Sex hormone-binding globulin: Anatomy and physiology of a new regulatory system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 813–820.

Sahu B., Laakso M., Pihlajamaa P., Ovaska K., Sinielnikov I., Hautaniemi S., Janne O. A. (2013) FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Research* **73**, 1570-1580.

Sar M., Lubahn D. B., French F. S., Wilson E. M. (1990) Immunohistochemical localisation of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* **127**, 3180–3186.

Saraon P., Jarvi K., Diamandis E. P. (2011) Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence. *Clinical Chemistry* **57**, 1366-1375.

Schally, A. V. (1999) Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: Their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* **20**, 1247–1262.

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. (2012) Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* **267**, 1187-1197.

Shaffer P. L., Jivan A., Dollins D. E., Claessens F., Gewirth D. T. (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.

Shang Y., Myers M., Brown M. (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell* **9**, 601–610.

Sharifi N (2013) Minireview: androgen metabolism in castration-resistant prostate cancer. *Molecular Endocrinology* **27**, 708–714.

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

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

Sharma A., Yeow W. S., Ertel A., Coleman I., Clegg N., Thangavel C., Morrissey C., Zhang X., Comstock C. E., Witkiewicz A. K., Gomella L., Knudsen E. S., Nelson P. S., Knudsen K. E. (2010) The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 4478-4492.

Silbernagl S., Despopoulos A. (2004) *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. pp. 296-306, Praha: Grada

Simard J., Ricketts M. L., Gingras S., Soucy P., Feltus F. A., Melner M. H. (2005) Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews* **26**, 525–582.

Smith D. F., Toft D. O. (2008) Minireview: The intersection of steroid receptors with molecular chaperones: Observations and questions. *Molecular Endocrinology* **22**, 2229–2240.

Stanbrough M., Bubley G. J., Ross K., Golub T. R., Rubin M. A., Penning T. M., Febbo P. G., Balk S. P. (2006) Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* **66**, 2815–2825.

Sun Y., Niu J., Huang J. (2009) Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am. J. Transl. Res.* **1**, 148-162.

Tan J., Sharief Y., Hamil K. G., Gregory C. W., Zang D. Y., Sar M., Gumerlock P. H., deVere White R. W., Pretlow T. G., Harris S. E., Wilson E. M., Mohler J. L., French F. S. (1997) Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Molecular Endocrinology* **11**, 450–459.

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.

Taplin M. E., Bubley G. J., Shuster T. D., Frantz M. E., Spooner A. E., Ogata G. K., Keer H. N., Balk S. P. (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* **332**, 1393–1398.

Titus M. A., Schell M. J., Lih F. B., Tomer K. B., Mohler J. L. (2005) Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clinical Cancer Research* **11**, 4653–4657.

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

Umesono K., Evans R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139–1146.

Wang L. G., Liu X. M., Kreis W., Budman D. R. (1999) Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**, 21-28.

Warde P. R., Mason M. D., Sydes M. R., Gospodarowicz M. K., Swanson G. P., Kirkbride P., Kostashuk E., Hetherington J., Ding K., Parulekar W., NCIC CTG PR.3/MRC PRO7/SWOG JPR3 Investigators (2010) Intergroup randomized phase III study of androgen deprivation therapy (ADT) plus radiation therapy (RT) in locally advanced prostate cancer (CaP) (NCIC-CTG, SWOG, MRC-UK, and INT: T94–0110; NCT00002633). [online] [cit. 25.3.2018] *Journal of Clinical Oncology* **78**, Dostupné z: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.cra4504

Yazawa T., Imamichi Y., Miyamoto K., Khan Md. R. I., Uwada J., Umezawa A., Taniguchi T. (2015) Regulation of Steroidogenesis, Development, and Cell Differentiation by Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1. *Zoological Science* **32**, 323-330.

Zhang D., Park D., Zhong Y., Lu Y., Rycaj K., Gong S., Chen X., Liu X., Chao H. P., Whitney P., Calhoun-Davis T., Takata Y., Shen J., Iyer V. R., Tang D. G. (2016) Stem cell and

neurogenic gene-expression profiles link prostate basal cells to aggressive prostate cancer. *Nature Communications* **7**.

Zhou L., Myers A. N., Vandersteen J. G., Wang L., Wittwer C. T. (2004) Closed- tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical Chemistry* **50**, 1328–1335.

Zhou Z. X., Lane M. V., Kempainen J. A., French F. S., Wilson E. M. (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Molecular Endocrinology* **9**, 208–218.

Zhu M. L., Kyprianou N. (2008) Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* **15**, 841-8.