

Dovoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne ocitovať.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Biologie
Mikrobiologie, molekulární biologie a virologie



Bc. Viera Semaneková

Screening kandidátních genů u karcinómu prostaty
Candidate genes screening in prostate carcinoma

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.
Praha, 2013

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe 6.5.2013

Podakovanie:

Týmto ďakujem svojmu školiteľovi doc. RNDr. Jaroslavovi Marešovi, CSc. za pomoc, ústretovosť a cenné rady, pri riešení diplomovej práce, ďalej MUDr. Markovi Schmidtovi za poskytnutie vzoriek k analýzam a za odborné rady pri spracovávaní výsledkov a Lubomírovi Štěpánkovi za pomoc so štatistickým spracovaním výsledkov. Moja vďaka patrí aj Ing. et Ing. Jurajovi Vakulovi, Ing. Jurajovi Hutyrovi a Ing. Petrovi Čermákovi za vytvorenie príjemného pracovného prostredia a technickú podporu pri riešení diplomovej práce a Mrg. Jane Uličnej za pomoc a rady pri formálnych úpravách textu.

Abstrakt

Karcinóm prostaty je považovaný za jeden z hlavných medicínskych problémov v mužskej populácii, pretože ide o najčastejšie diagnostikovaný zhubný nádor u mužov. Zároveň je to karcinóm s druhou najvyššou mortalitou spomedzi všetkých diagnostikovaných zhubných ochorení v ČR (ÚZIS). Jediným spoľahlivým diagnostickým biomarkerom je v súčasnosti PSA (prostate specific antigen; prostatický špecifický antigén), ktorého hladina je v prípade karcinómu prostaty zvýšená.

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom zmien v expresii génov v karcinóme prostaty, ktoré sú, podľa najnovšej literatúry, spájané s progresiou nádoru a mohli by mať prognostický význam. Ide o gény: *VCL* (vinculin; vinkulín), *SHB* (Src homology 2 binding protein) a *OCT3* (organic cation transporter 3; transportér 3 katiónov organických zlúčenín).

Práca metodicky zahŕňala spracovanie 82 zozbieraných vzoriek prostatického tkaniva a to formou izolácie mRNA. Následne bola použitá metóda RT-PCR k získaniu cDNA, potom elektroforetické spracovanie cDNA a štatistické vyhodnotenie výsledkov. Bola porovnaná relatívna expresia jednotlivých génov vo vzorkách karcinómu prostaty a vo vzorkách BPH (benign prostatic neoplasia; benígna prostatická hyperplázia).

Pri génoch *SHB* a *OCT3* bola zistená nižšia expresia vo vzorkách karcinómu prostaty, pri *VCL* nebol zistený rozdiel. Ďalšími meraniami bol zistený rozdiel v expresii génu *SHB* v rámci hodnôt Gleasonovho skóre, kde bol zaznamenaný pokles expresie v nádoroch s hodnotami 8 a 9. U génu *OCT3* bola zistená korelácia s vekom pacientov, pričom vo vyššom veku bola expresia *OCT3* nižšia. U žiadneho z analyzovaných génov nebola zistená výrazná korelácia s hodnotou PSA.

Ako možný potenciálny biomarker bol vyhodnotený gén *SHB*. Je však nutné overiť túto teóriu v ďalších klinických štúdiách na širokom súbore pacientov.

Kľúčové slová

karcinóm prostaty, Src homology 2 binding protein, vinkulín, transportér 3 katiónov organických zlúčenín, izolácia RNA, benígna prostatická hyperplázia, semikvantitatívna RT-PCR, diagnostika nádoru

Abstract

Prostate carcinoma is considered to be one of the main medical problem in male population. Prostate carcinoma is the most frequently diagnosed malignancy in men and the death rate has the second position within all diagnosed malignancies in Czech Republic (ÚZIS). There is only one reliable diagnostic tool: PSA (prostate specific antigen). Level of PSA is often elevated in men with prostate carcinoma.

This diploma thesis is focused on study of changes in gene expression in prostate carcinoma. Three candidate genes were analyzed: *VCL* (vinculin), *SHB* (Src homology 2 binding protein) and *OCT3* (organic cation transporter 3). According to recent publications, these genes are related to tumor progression and they could have prognostic significance.

In this thesis the following methodological approaches were used: 82 prostatic specimens were collected from patients and mRNA was isolated from these specimens; then RT-PCR was used to obtain cDNA, fragments were detected by electrophoresis. At the end statistical methods were used for evaluation. Relative expression of the genes in prostate carcinoma tissue was compared to relative expression of the genes in BPH (benign prostatic neoplasia) tissue.

Results showed higher expression of genes *SHB* and *OCT3* in prostate carcinoma tissue in comparison to BPH tissue. No difference was found in *VCL* gene expression. By using next analyses, the difference in *SHB* gene expression was found, when Gleason scores of prostate carcinoma specimens were compared. The decrease of expression was detected in specimens with Gleason score 8 and 9. The correlation between age and *OCT3* gene expression was found, where the expression decreased with increasing age. No correlation with PSA levels was found in any of the analyzed gene expressions.

Gene *SHB* was evaluated to be potential diagnostic biomarker. However, it is necessary to confirm this theory in next clinical studies with a large pool of patients.

Keywords

prostate carcinoma, Src homology 2 binding protein, vinculin, organic cation transporter 3, RNA isolation, benign prostatic hyperplasia, semiquantitative RT-PCR, tumor diagnostics

OBSAH

Zoznam skratiek	3
1 Úvod	6
2 Ciele práce	7
3 Prehľad literatúry	8
3.1 Prostata – základná anatómia a fyziológia	8
3.1.1 Epidemiologické údaje o karcinóme prostaty	9
3.1.2 Rizikové faktory pri vzniku karcinómu prostaty	10
3.1.3 Patológia karcinómu prostaty - PIN	12
3.1.4 Patológia karcinómu prostaty - BPH	12
3.1.5 Patológia karcinómu prostaty - karcinóm (adenokarcinóm) prostaty	13
3.1.6 Diagnóza karcinómu prostaty	16
3.1.7 Terapeutické prístupy pri karcinóme prostaty	17
3.2 Molekulárne – biologické zmeny u karcinómu prostaty	18
3.2.1 Zmeny molekulárnych dráh pri iniciácii kancerogenézy prostaty	19
3.2.2 Modulácia malígnych vlastností nádorových buniek prostaty	21
3.3 Analyzované gény u karcinómu prostaty	22
3.3.1 Gén <i>VCL</i>	22
3.3.2 Gén <i>SHB</i>	26
3.3.3 Gén <i>OCT3</i>	29
4 Materiál a metódy	32
4.1 Odber vzoriek	32
4.2 Izolácia mRNA	35
4.3 RT – PCR	36
4.4 Detekcia fragmentov cDNA	39
4.5 Štatistické metódy vyhodnocovania výsledkov	41
5 Výsledky	44
5.1 Gén <i>VCL</i>	44
5.1.3 Relatívna expresia génu <i>VCL</i> v nádorovom a hyperplázickom tkanive	44
5.1.4 Porovnanie relatívnej expresie <i>VCL</i> v rôznych štádiách karcinómu	46

5.1.5	Korelácia relatívnej expresie génu <i>VCL</i> s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA.....	47
5.2	Gén <i>SHB</i>	49
5.2.3	Relatívna expresia génu <i>SHB</i> v nádorovom a hyperplázickom tkanive.....	49
5.2.4	Porovnanie relatívnej expresie <i>SHB</i> v rôznych štádiách karcinómu.....	50
5.2.5	Korelácia relatívnej expresie génu <i>SHB</i> s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA.....	51
5.3	Gén <i>OCT3</i>	54
5.3.3	Relatívna expresia génu <i>OCT3</i> v nádorovom a hyperplázickom tkanive	54
5.3.4	Porovnanie relatívnej expresie <i>OCT3</i> v rôznych štádiách karcinómu	55
5.3.5	Korelácia relatívnej expresie génu <i>OCT3</i> s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA.....	56
6	Diskusia.....	59
7	Súhrn	63
8	Zoznam použitej literatúry	64

Zoznam skratiek

(zložitejšie preložiteľné názvy boli ponechané v angličtine)

ABC	ATP-binding cassette transporter	ATP viažuci kazetový transportný proteín
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene	
AMPK	5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase	5-adenozínmonofosfátom aktivovaná proteín kináza
Arp 2/3	actin-related protein 2/3	aktín-príbuzný proteín 2/3
BPH	benign prostatic hyperplasia	benígna prostatická hyperplázia
c-Abl	c-Abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	
CD44	cluster of differentiation 44	
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4	CXC chemokínový receptor typu 4
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
doména SH2	Src homology domain 2	Src homológia 2 doména
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálneho rastového faktoru
EPIC	European prospective investigation into cancer and nutrition	
ERG	erythroblast transformation-specific related gene	
ERSPC	European randomized study of screening for prostate cancer	
FAK	focal adhesion kinase	kináza fokálnych adhézií
FGFR-1	fibroblast growth factor receptor	receptor fibroblastového rastového faktoru
GAD	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GLI1	glioma-associated oncogene homolog 1	homológ 1 onkogénu asociovaného s gliómom
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	
GS	Gleason score	Gleasonovo skóre
HA	hyaluronan	hyaluronan
HDAC (1, 2, 3)	histone deacetylase (1, 2, 3)	histónová deacetyláza (1, 2, 3)
HG-PIN	high grade - prostatic intraepithelial neoplasia	prostatická intraepiteliálna neoplázia vysokého stupňa
HIF 1, 2	hypoxia-inducible factor 1, 2	hypoxiou indukovateľný faktor
IGF-1	insulin-like growth factor 1	inzulínu podobný rastový faktor 1
IL-2R	interleukin 2 receptor	receptor interleukínu 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-koncová kináza
LAT	linker for activation of T-cells	

LG-PIN	low grade - prostatic intraepithelial neoplasia	prostatická intraepiteliálna neoplázia nízkeho stupňa
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogénom aktivované proteín kinázy
Mena	Mammalian enabled protein	
MMP	matrix metalloproteinase	matrix metaloproteináza
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium	1-metyl-4-fenylpyridium (neurotoxín)
mTOR	mammalian target of rapamycin	signálna dráha mTOR
Nanog	homeobox protein Nanog	transkripčný faktor Nanog
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	
Nkx3.1	homeobox protein Nkx3.1	
OCT3	organic cation transporter 3	transportér 3 katiónov organických zlúčenín
Oct 3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4	
p27 ^{KIP1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	inhibítor 1B cyklín-dependentnej kinázy
p38 MAPK	p38 MAP Kinase	p38 MAP kináza
p53	tumor supressor protein 53	tumor-supresorový proteín p53
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	receptor rastového faktoru krvných doštičiek
PI3	phosphatidylinositol 3	fosfatidylozitol 3
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia	prostatická intraepiteliálna neoplázia
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Fosfatidylozitol-4,5-bisfosfát
PLAU	urokinase-type plasminogen activator	plazminogénny aktivátor urokinázového typu
PLC	phospholipase C	fosfolipáza C
PLCO	Prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial	
PSA	prostate specific antigen	prostatický špecifický antigén
PTB doména	phosphotyrosin-binding domain	doména viažuca fosfotyrozín
PTEN	phosphatase and tensin homolog	homológ fosfatázy a tenzínu
PTCH1	Patched-1 transmembrane domain protein	Patched-1 transmembránový proteín
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverzná transkripcia polymerázovej reťazovej reakcie
SDF-1	stromal cell-derived factor 1	
SHB	Src homology 2 binding protein	
SHD	Src homology 2 domain containing transforming protein D	
SHH	Sonic hedgehog	
Sox2	(sex determining region Y)-box 2	
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2)	

	viral oncogene homolog	
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2	transmembránová serín-proteáza typu 2
TNM	tumor-nodes-metastasis clasification	klasifikácia klinického štádia karcinómu prostaty
ÚZIS		Ústav zdravotníckých informáci a statistiky ČR
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	
VCL	vinculin	vinkulín
VE-kadherín	vascular endothelial cadherin	
VEGF (A)	vascular endothelial growth factor (A)	vaskulárny endoteliálny rastový faktor (A)
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2	receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru 2
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family	
β -ME	β -mercaptoethanol	β -merkptoetanol

1 Úvod

Nádorové ochorenia patria v súčasnosti spolu so srdcovo-cievnyimi chorobami medzi najrozšírenejšie ochorenia nielen v Českej republike, ale aj vo svete.

Karcinóm prostaty je považovaný za jeden z hlavných medicínskych problémov v mužskej populácii, pretože ide o najčastejšie diagnostikovaný zhubný nádor u mužov. Zároveň je to karcinóm s druhou najvyššou mortalitou spomedzi všetkých diagnostikovaných zhubných ochorení v ČR (ÚZIS). V posledných rokoch však stúpa mortalita len mierne, a to zásluhou včasnej diagnostiky a správne vedenej liečby.

V súčasnosti je jediným spoľahlivým diagnostickým nástrojom biopsia prostaty a stanovenie hladiny PSA (prostate specific antigen; prostatický špecifický antigén). Hladina PSA je často zvýšená u pacientov s karcinómom prostaty, avšak nemusí priamo indikovať toto ochorenie. Môže byť ovplyvnená aj ďalšími faktormi, ktoré nesúvisia s rozvíjajúcim sa ochorením, a preto je nevyhnutné hľadať spôsoby optimálnejšej a presnejšej diagnostiky. Jednou z možností je nájsť gén, ktorého expresia by jednoznačne súvisela so vznikajúcim karcinómom. V súčasnej dobe sa vo vedeckých štúdiách analyzujú viaceré gény, ktoré by túto podmienku spĺňali.

V tejto diplomovej práci sa zameriavam na tri kandidátne gény, ktoré sú, podľa najnovšej literatúry, spájané s progresiou nádoru. Tieto gény by sa v budúcnosti mohli stať efektívnym nástrojom diagnostiky.

2 Ciele práce

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom zmien v expresii génov v karcinóme prostaty, ktoré by mohli mať relevantný prognostický význam. V súčasnej dobe sa v diagnostike používa marker PSA, ktorý je však problematický a často vedie k falošne pozitívnym alebo falošne negatívnym výsledkom. Zároveň pribúdajú vedecké štúdie o iných, potenciálne efektívnejších nástrojoch diagnostiky. Táto diplomová práca by mohla prispieť k hľadaniu nových postupov, keďže jej predmetom je analýza troch kandidátnych génov v karcinóme prostaty.

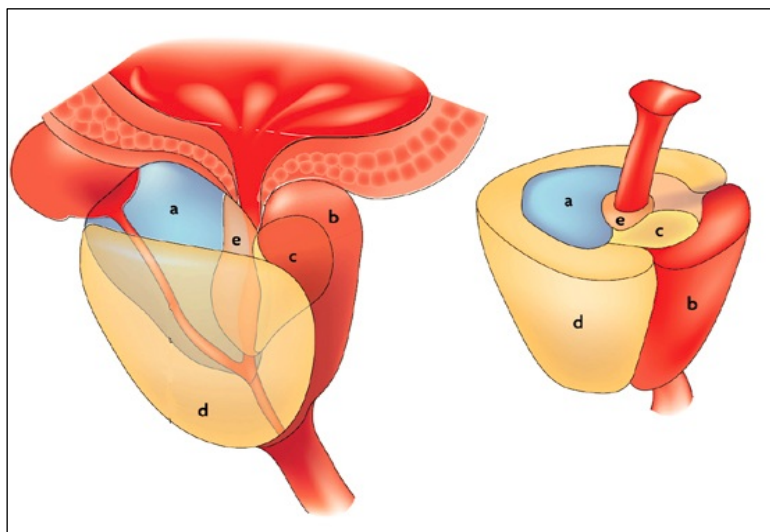
Ciele práce:

1. Zhromaždiť čo najväčší súbor pacientov diagnostikovaných na karcinóm prostaty spolu s klinickými údajmi
2. Izolovať mRNA v dostatočnej čistote zo získaných vzoriek od pacientov s karcinómom prostaty
3. Optimalizovať semikvantitatívnu RT-PCR pre príslušné gény
4. Identifikovať rozdiely v relatívnej expresii u génov: *SHB*, *VCL* a *OCT3*
5. Určiť koreláciu expresie analyzovaných génov s molekulárne-klinickými charakteristikami karcinómu prostaty a s prognózou ochorenia
6. Zhodnotiť prognostický význam týchto korelácií

3 Prehľad literatúry

3.1 Prostata – základná anatómia a fyziológia

Prostata patrí medzi žľazy a je súčasťou mužského pohlavného ústrojenstva. Jej veľkosť zodpovedá rozmerom 3 cm x 4 cm x 2 cm a váži asi 20 g. Nachádza sa pod močovým mechúrom a obklopuje hornú časť močovej trubice. Obklopuje ju väzivové puzdro. Z hľadiska klinickej praxe sa prostata delí na 4 zóny: prednú fibromuskulárnu, centrálnu zónu, periférnu zónu a preprostatickú oblasť. Znázornenie je na obr. č. 1. Vo vonkajšej oblasti sa vyskytujú najmä karcinómy, kým v centrálnej hlavne nodulárne hyperplázie (Hes *et al.*, 2011).



Obr. č. 1: Delenie prostaty z klinického hľadiska: a-centrálna zóna, b-fibromuskulárna zóna, c-prechodná zóna, d-periférna zóna, e-oblasť okolo močovej trubice (De Marzo *et al.* 2007, upravené)

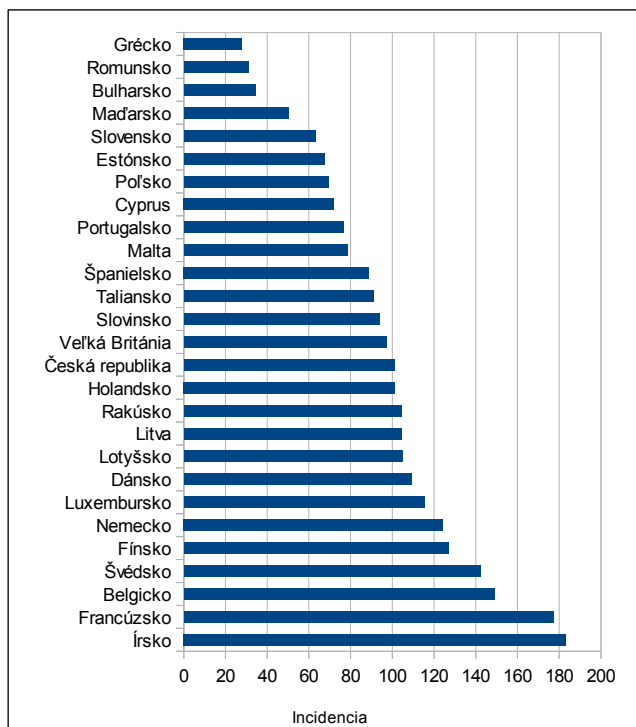
Hlavnou funkciou prostaty je produkcia tzv. prostatického sekrétu, ktorý tvorí asi 30% ejakulátu. Ide o mliečne bielu tekutinu, ktorá obsahuje enzýmy (kyslá fosfatáza, 5- α -reduktáza), kyselinu citrónovú (plní funkciu pufru), prostaglandíny (napomáha sťahom hladkého svalstva maternice), zinok (ovplyvňuje metabolizmus testosterónu), spermín (dôležitý pre pohyblivosť spermií), fibrinolýzín a PSA. Sekrét je mierne kyslý (pH = 6,4). Ako súčasť ejakulátu poskytuje výživu spermiám. Sekrécia je regulovaná hladinou 5 α -dihydroxytestosterónu (Steger a Weidner,

2011). Spodná časť prostaty sa nachádza v blízkosti urinárneho zvierča, ktorý kontroluje vývod moču. Zmeny v anatómii prostaty teda ovplyvňujú aj odvod moču moču (Dvořáček a Šafařík, 2005).

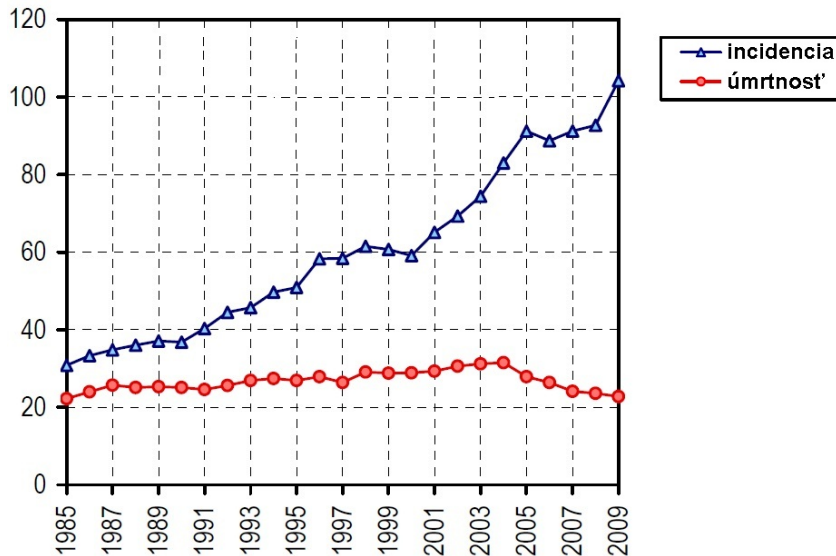
3.1.1 Epidemiologické údaje o karcinóme prostaty

Karcinóm prostaty je najčastejším zhubným nádorom u mužov hneď po kožných zhubných nádoroch. V roku 2009 bolo v ČR hlásených 6154 prípadov, čo je nárast o 13 % oproti predchádzajúcemu roku. V prepočte na obyvateľa išlo o 119,5 prípadu na 100 000 mužov. Rápidny nárast tohto ochorenia je pozorovaný od začiatku 90-tych rokov a po roku 2000 sa ešte zrýchlil. Tento jav je vysvetľovaný jednak starnutím populácie, ale aj zvýšením počtu preventívnych vyšetrení, pri ktorých sa určuje hodnota PSA. Tým pádom sú zistené aj skoršie štádiá karcinómu, ktoré sú klinicky nemé a ktoré by za iných okolností nebolo možné zistiť.

V celosvetovom meradle je karcinóm prostaty rovnako druhým najčastejším zhubným ochorením po nádoroch pľúc. Najvyššia incidencia tohto ochorenia je pozorovaná v Austrálii a na Novom Zélande s incidenciou 104,2 prípadu na 100 000 mužov. V rámci krajín EÚ je na prvom mieste Írsko s incidenciou 183,2 prípadu na 100 000 mužov, Česká republika je na 14. mieste.



Graf č. 1: Incidencia karcinómu prostaty v krajinách EÚ v roku 2008 (<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/>, upravené)



Graf č. 2: Vývoj incidencie a úmrtnosti na karcinóm prostaty v ČR do roku 2009 (ÚZIS, 2012, upravené)

Na rozdiel od incidencie miera úmrtnosti od roku 2004 klesá a v roku 2009 dosiahla hodnotu 22,8 úmrtí na 100 000 mužov v ČR (ÚZIS).

Celosvetovo je karcinóm prostaty na šiestom mieste v príčinách smrti medzi mužmi. Najvyššia miera úmrtnosti je zaznamenaná v Karibskej oblasti, kde je to 26 úmrtí na 100 000 mužov. V rámci štátov Európskej únie je Česká republika na 11. mieste. Najvyššia mortalita je pozorovaná v Estónsku s hodnotou 36,8 úmrtí na 100 000 mužov (<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/>). Rozdiely medzi hodnotami mortality nie sú tak značné ako rozdiely v incidencii, ktorá má stúpajúcu tendenciu, či už celosvetovo alebo v ČR

3.1.2 Rizikové faktory pri vzniku karcinómu prostaty

Príčiny vzniku karcinómu nie sú známe. Sú však známe rizikové faktory, ktoré výrazne ovplyvňujú možnosť vzniku ochorenia. Najznámejší je faktor veku. Incidencia ochorenia sa výrazne zvyšuje u mužov vo veku nad 50 rokov (Dreicer a Garcia, 2012).

Ďalším faktorom je príslušnosť k etnickej skupine. U negroidnej rasy je dvakrát vyššia mortalita než u kaukazskej rasy. Zaujímavé je však zistenie, že nádorovo špecifická mortalita na karcinóm prostaty je do 65 rokov 2 – 3-krát vyššia u černochoch než u belochoch. U starších

mužov sa však situácia obracia a belosi majú horšiu prognózu. Príčiny tejto rozdielnosti nie sú celkom jasné, svoju úlohu zrejme zohrávajú socio-ekonomické faktory (Dvořáček, 2005).

Spôsob výživy je ďalším faktorom zasahujúcim do procesu rozvoja karcinómu prostaty. Konzumácia tukov, najmä polynenasýtených, ukazuje na pozitívnu koreláciu s incidenciou a mortalitou u karcinómu prostaty. Ide pravdepodobne o tukom indikované zmeny v hormonálnom profile a zvýšenie miery oxidatívneho stresu. Zvýšený príjem vitamínu A, ktorý pomáha regulovať diferenciaciu a proliferáciu epiteliálnych buniek, je spájaný so zvýšeným rizikom vzniku karcinómu prostaty. Naopak znížený príjem vitamínu D môže byť ďalším rizikovým faktorom v rozvoji ochorenia. Avšak jeho forma, 1-25-dihydroxyvitamín D, má antiproliferatívne a antidiferenciačné účinky na bunky nádoru. Inhibičné účinky na rast nádoru má vitamín E. Ide o antioxidant, ktorý podporuje apoptózu buniek. Denný príjem tohto vitamínu znižuje riziko výskytu ochorenia o 32 %. Podľa doterajších štúdií je doteraz najefektívnejšou látkou, ktorá má ochranný účinok pred rozvojom karcinómu prostaty, lykopén. Vyskytuje sa hlavne v tepelne spracovaných produktoch z rajčín (Botswick *et al.*, 2004).

Niektoré štúdie dávajú do súvislosti s vyšším rizikom rozvoja nádoru zvýšenú konzumáciu mliečnych výrobkov (Tate *et al.*, 2011). Podľa EPIC štúdie (European prospective investigation into cancer and nutrition) je pri dennom príjme 35 g proteínov z mliečnych výrobkov výskyt karcinómu prostaty vyšším o 32 % (Allen *et al.*, 2008).

Ďalším faktorom, ktorý môže prispievať k rozvoju karcinómu prostaty je IGF-1 (insulin-like growth factor-1; inzulínu podobný rastový faktor 1). Tento rastový faktor je súčasťou procesov, ktoré zabezpečujú normálnu proliferáciu buniek a apoptózu. Podľa niektorých štúdií je tento hormón spájaný so zvýšeným rizikom vzniku karcinómu, pričom miera rizika je priamo úmerná dávke hormónu (Renehan *et al.*, 2004; Stattin *et al.*, 2004). Avšak iné štúdie tento účinok nepotvrdili (Allen *et al.*, 2007). IGF-1 môže sprostredkovať účinky množstva iných faktorov prostredia, nakoľko jeho množstvo je regulované faktormi ako hmotnosť, výživa, fyzická aktivita, ktoré prispievajú k vzniku nádorov.

Zaujímavá je súvislosť medzi karcinómom prostaty a ochorením diabetes mellitus typu 2. Miera rozvoja karcinómu bola o 16 % nižšia u pacientov trpiacich týmto ochorením (Bonovas *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2006). Príčina nie je známa, je však diskutovaných množstvo mechanizmov, ktoré popisujú genetickú súvislosť medzi týmito dvoma diagnózami.

3.1.3 Patológia karcinómu prostaty - PIN

Existuje niekoľko abnormálnych proliferčných lézií, ktorých výskyt poukazuje na súvislosť so vznikom karcinómu prostaty. Medzi najčastejšie popisovanú sa zaradzuje PIN (prostatic intraepithelial neoplasia; prostatická intraepiteliálna neoplázia).

PIN je charakterizovaná ako primárna cytologická atypia povrchovej epiteliálnej vrstvy v prostatických duktoch a acinoch. PIN sa delí na dve kategórie. LG-PIN (low grade PIN; PIN s nízkym stupňom diferenciácie) a HG-PIN (high grade PIN; PIN s vysokým stupňom diferenciácie). HG-PIN je typická bunkovými atypiami prostatických duktov s intraepiteliálne umiestnenými neoplastickými zmenami (Dvořáček, 2005).

HG-PIN je preinvazívna forma nádoru, ktorá predstavuje zvýšené riziko vzniku karcinómu prostaty. Cytologická charakteristika HG-PIN je podobná charakteristike samotného karcinómu a vyskytuje sa vo viac než 85% prípadov karcinómu prostaty, avšak na rozdiel od karcinómu, jej lokalizácia je v bazálnej oblasti. Niekoľko epidemiologických štúdií potvrdilo súvislosť medzi HG-PIN a následným rizikom výskytu nádorov prostaty (Botswick *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2011).

3.1.4 Patológia karcinómu prostaty - BPH

Ďalším nálezom, ktorý sa radí medzi abnormálne proliferčné lézie je BPH (benign prostatic neoplasia; benígna prostatická hyperplázia) BPH. BPH je patologicky charakterizovaná ako proliferácia buniek prostaty hlavne v oblasti okolo močovej trubice. Tieto histologické zmeny začínajú už vo veku okolo 30 rokov a klinicky sú deketovateľné vo štvrtej dekáde života. Sú spôsobené zvýšenou hladinou 5 α -dihydrotestosterónu, látkou tvorenou z testosterónu v prostate. I keď produkcia testosterónu klesá, produkcia 5 α -dihydrotestosterónu pokračuje aj vo vyššom veku a dochádza k postupnej akumulácii tejto látky v tkanive prostaty. To vedie k zvýšenej proliferácii buniek. U mužov, ktorí neprodujú 5 α -dihydrotestosterón vôbec, nebola detekovaná ani BPH (Wei *et al.*, 2004).

Prvými príznakmi BPH sú obštrukcie uretry. Svalové vlákna sa nadmerne napínajú a to má za následok zvýšenú frekvenciu močenia, poruchy pri močení, nedostatočný tok moču. Často sa môžu pridružiť patofyziologické zmeny v stene močového mechúra (Wei *et al.*, 2004). Súvislosť medzi BPH a karcinómom prostaty zostáva nejasná. Odlíšiť vzájomnú podmienenosť týchto dvoch, ochorení je zložité. Oboje sa vyskytuje vo vyššom veku, často sa vyskytuje súčasne, a u oboch je zaznamenaná zvýšená hladina PSA. Jedinou spoľahlivou metódou ako rozlíšiť BPH a karcinóm je biopsia prostaty.

3.1.5 Patológia karcinómu prostaty - karcinóm (adenokarcinóm) prostaty

Rovnako ako v prípade BPH, aj u karcinómu prostaty je nutná stimulácia testosterónom a dihydroxytestosterónom. Pod vplyvom týchto hormónov vznikajú bunky adenokarcinómu (Hes *et al.*, 2011). Karcinóm prostaty má veľa spoločných znakov nielen s BPH alej aj s HG-PIN. U všetkých troch stúpa prevalencia s vekom, je vyžadovaná prítomnosť androgénov pre rast a rozvoj ochorenia, a všetky reagujú na liečbu založenú na deprivácii androgénov. Spoločne vykazujú vlastnosti ako abnormality v markeroch určujúcich diferenciáciu, cytologické zmeny v jadre a jadierku buniek, zvýšená bunková proliferácia, zvýšená genetická nestabilita (Bostwick *et al.*, 2004).

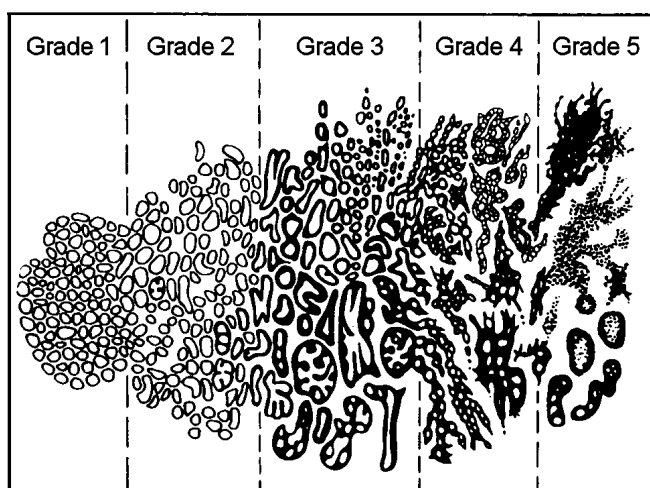
Nádor vzniká väčšinou multifokálne, v 70 % prípadov sa nachádza v periférnej zóne prostaty. Vytvára drobné ložiská nažltlej farby a tuhšej konzistencie, ktoré majú, v porovnaní s normálnou štruktúrou prostaty, kompaktnejší vzhľad (Povýšil, 2005).

Všeobecne platí, že karcinóm prostaty je tvorený malými nazhlukovanými žliazkami, ktoré sú relatívne uniformné. Niekedy vytvárajú glomeruloidné štruktúry. Tieto žliazky sú často infiltrované medzi žliazky benígneho tkaniva. Ďalej sa vyskytujú glandulárne štruktúry tvoriace pruhy, splývajúce do väčších celkov, alebo naopak len jednotlivé bunky medzi normálnym prostatickým tkanivom. Bunky sa často vyznačujú polymorfiou jadier, nápadnými jadierkami a mitózami. Cytoplazma buniek sa môže výrazne líšiť od cytoplazmy v okolitých benígnych žliazkach. V lumene žliazok karcinómu sa nachádza modravý hlien, a dajú sa identifikovať kryštaloidné eozinofilné útvary. Ide o produkty pozostávajúce z abnormálnych hlienových proteínov a minerálov (Hes *et al.*, 2011). U dobre diferencovaných karcinómov chýba vrstva

bazálnych buniek. Spôľahlivým znakom malignity nádoru je nález infiltratívneho rastu nádorových buniek, pri ktorom je úplne narušené pôvodné tkanivo prostaty a nádor sa tak šíri do extraprostatických tkanív, predovšetkým do tkaniva tukovo väzivového. Intravaskulárna invázia je rovnako dôležitým indikátorom malignity (Povýšil, 2005).

3.1.5.1 Grading

Grading je určovanie stupňa histologickej diferenciácie karcinómu. Grading karcinómu prostaty má zásadný význam z prognostického hľadiska, pretože dobre diferencované karcinómy progredujú pomalšie, zatiaľčo málo diferencované karcinómy progredujú rýchlejšie a zakladajú metastázy. Najčastejšie používaným systémom je Gleasonovo skóre, ktoré popisuje nádor číslami v rozmedzí 2 – 10, kde 2 je najmenej agresívne a 10 je najagresívnejšie ochorenie. Hodnotí sa architektonické usporiadanie nádorových ložísk a stupeň ich diferenciácie sa vyjadruje 5 stupňami od obrazu dobre diferencovaného acinárneho karcinómu až po disociovaný karcinóm. Znáozornenie gradingu je na obr. č. 2. Súčasne sa rozlišuje primárna a sekundárna histologická štruktúra, nakoľko asi 50 % karcinómov obsahuje minimálne dva komponenty rôzneho stupňa diferenciácie. Histologické skóre je súčtom oboch, teda najmenej častého a najčastejšieho stupňa diferenciácie. Na základe gradingu je možné stanoviť prognózu ochorenia z hľadiska schopnosti invázie nádoru a jeho metastatického potenciálu. S gradingom úzko súvisí aj doba prežitia. Nádory s vyšším gradingom majú všeobecne horšiu prognózu, sú agresívnejšie a vyvíjajú sa najmä v periférnej zóne prostaty (Povýšil, 2005).



Obr. č. 2: Schéma gradingu podľa Gleasona: Od dobre diferencovaného nádoru (grade 1) až po zle diferencovaný nádor s ťažko rozpoznateľnými žliazkami (grade 5) (O'Dowd *et al.*, 2001, upravené)

3.1.5.2 Staging

Staging definuje rozsah ochorenia, určuje či primárny nádor presiahol hranice tkaniva prostaty a rozšíril sa do okolitých tkanív. Existuje niekoľko klasifikácií, avšak v prípade karcinómu sa najčastejšie používa klasifikácia TNM (tumor-nodes-metastasis classification; klasifikácia klinického štádia karcinómu prostaty). Je použiteľná aj pre iné solídne nádory. Určenie stagingu je nevyhnutné pre určenie prognózy, pre plánovanie vhodnej liečby a pri porovnávaní v rámci klinických štúdií.

T - Primárny nádor	
TX	primárny nádor sa nedá hodnotiť
T0	bez známk primárneho nádoru
T1	nádor nepreukázateľný ani klinicky ani palpačne
T1a	nádor zistený náhodne histologicky v menej ako 5% resekovaného tkaniva
T1b	nádor zistený náhodne histologicky vo viac ako 5% resekovaného tkaniva
T1c	nádor zistený pri biopsii
T2	nádor obmedzený na prostatu
T2a	nádor postihuje polovicu laloku alebo menej
T2b	nádor postihuje viac než polovicu laloku, ale nie oba laloky
T2c	nádor postihuje oba laloky
T3	nádor sa šíri cez puzdro prostaty
T3a	extrakapsulárne šírenie jednostranné alebo obojstranné
T3b	nádor infiltruje semenné vačky
T4	nádor sa šíri do okolitých štruktúr iných ako semenné vačky
N - Regionálne lymfatické uzliny	
NX	regionálne lymfatické uzliny sa nedajú hodnotiť
N0	v regionálnych lymfatických uzlinách sa nevyskytujú metastázy
N1	v regionálnych lymfatických uzlinách sa vyskytujú metastázy
M - Vzdialené metastázy	
M0	chýbajú vzdialené metastázy
M1	vzdialené metastázy
M1a	lymfatické uzliny (okrem regionálnych lymfatických uzlín)
M1b	kosti
M1c	iné lokalizácie

Tabuľka č. 1: Klasifikácia TNM (Cheng *et al.*, 2012, upravené)

3.1.6 Diagnóza karcinómu prostaty

Základom diagnózy je anamnéza a fyzikálne vyšetrenie. Popri bežnom celkovom fyzikálnom vyšetrení sa diagnostika ochorenia opiera o palpačné vyšetrenie prostaty cez konečník. Malé nádory však ľahko uniknú diagnostike, prípadne môžu byť diagnostikované nálezy, ktoré svojím tvarom a štruktúrou imitujú karcinóm. Palpačným vyšetrením sa odhalí len 0,8 – 1,7 % nádorov. Rektálnym vyšetrením je odhalených asi 55 % nádorov a na základe transurektálnej ultrasonografie 82 %. Najčastejšie je však karcinóm diagnostikovaný na základe zvýšenej hladiny PSA, ktorý má v súčasnosti kľúčovú úlohu v diagnostike. Rozhodujúcim preukázaním prítomnosti karcinómu je histologický nález získaný biopsiou prostaty diagnostikovaný ako karcinóm (Dvořáček a Šafařík, 2005).

3.1.6.1 PSA

PSA je prostatický špecifický antigén, ktorý patrí do skupiny kalikreínov, konkrétne ide o kalikreínu podobnú peptidázu 3. Lokus génu pre PSA je na chromozóme 19q13.41. Ide o látku, ktorá je tvorená výlučne epitelálnymi bunkami prostaty (Yousef *et al.*, 2000). Sérová hladina PSA je určená krvným vyšetrením. Čím je hodnota PSA vyššia, tým je vyššie riziko existencie karcinómu. Neexistuje však prahová hodnota, na základe ktorej by bolo možné jednoznačne určiť prítomnosť nádoru. Väčšina štúdií sa prikláňa k hodnote 3 – 4 ng/ml. Za zvýšenou hladinou PSA môžu byť aj benígne nálezy ako zápal prostaty a BPH, ďalej to môže byť dôsledok samotnej biopsie prostaty, nedávnej ejakulácie alebo častej jazdy na bicykli (Aus *et al.*, 2006).

PSA (ng/ml)	predpokladané riziko karcinómu prostaty (%)
0 – 1	2,8 – 5
1 – 2,5	10,5 – 14
2,5 – 4	22 – 30
4 - 10	41
> 10	69

Tabuľka č. 2: Hladina PSA a riziko karcinómu prostaty (Aus *et al.*, 2006, upravené)

Testovanie PSA teda má určité obmedzenia. Ochorenie môže byť detekované pri screeningu vo veľmi skorom štádiu, kedy nádor ešte nespôsobuje žiadne symptómy. Nájdenie malého nádoru však neznižuje riziko neskoršieho rozvoja ochorenia. Niektoré nádory rastú len veľmi pomaly a priamo neohrozujú pacienta, no často je nasadená liečba, ktorá môže spôsobiť komplikácie a má nežiaduce vedľajšie účinky. Na druhej strane včasné diagnostikovanie ochorenia nemusí byť efektívne u pacientov s agresívnym typom nádoru, ktorý môže začať metastázovať ešte pred samotnou detekciou. Navyše, testy PSA môžu dávať falošne pozitívne alebo falošne negatívne výsledky. Hladina PSA môže byť zvýšená, pričom nemusí ísť o adenokarcinóm prostaty, a naopak, hladina PSA môže byť nízka aj v prípade už existujúceho adenokarcinómu (Barry, 2001).

3.1.6.2 Screening karcinómu prostaty

Za účelom zníženia úmrtnosti v prípade adenokarcinómu bolo prevedených niekoľko masových screeningov. Ide o vyšetrenie asymptomatických mužov s rizikom rozvoja ochorenia. Prebehli dve veľké populačné štúdie: PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovary) a ERSPC (European Randomized Screening for Prostate Cancer) (Aus *et al.*, 2006). Štúdia PLCO udáva, že testovanie PSA znížilo riziko úmrtia na karcinóm prostaty. Zistilo sa, že u mužov, ktorí podstúpili pravidelný screening, bola zvýšená incidencia karcinómov prostaty v porovnaní s kontrolnou skupinou, ale miera úmrtnosti zostala rovnaká (Andriole *et al.*, 2012). Závery štúdie ERSPC taktiež potvrdili znížené riziko úmrtia na karcinóm prostaty u pacientov, ktorí podstúpili screening, avšak na rozdiel od PLCO, bola miera úmrtnosti u týchto pacientov nižšia (Schroder *et al.*, 2012).

3.1.7 Terapeutické prístupy pri karcinóme prostaty

V prípade karcinómu prostaty existuje viacero terapeutických prístupov. Výber liečby závisí od určenia štádia ochorenia a ďalšej prognózy. Niektoré z prístupov sú štandardne používané, iné sú vo fáze klinických testov. Zo štandardne používaných sú to:

- pozorné vyčkávanie a aktívny monitoring (neprevádza sa žiadna liečba, pokiaľ nedôjde k symptomatickej progresii)
- chirurgický zákrok (odstránenie lymfatických uzlín, radikálna prostakrektómia, transuretrálna resekcia prostaty)
- rádioterapia (možné riziko vzniku nádorov močového mechúra, či konečníka)
- hormonálna terapia (zablokovanie činnosti hormónov pomocou liekov alebo iných hormónov, alebo chirurgickým odstránením semenníkov)
- chemoterapia
- biologická liečba (imunoterapia, využíva bunky pacientovho imunitného systému zamierené proti nádorovým bunkám)

Metódy klinicky testované:

- kryochirurgia prostaty (zmrazenie a následné zničenie nádorových buniek)
- použitie ultrazvuku s vysokou intenzitou (použitie endorektálnej sondy, ktorá vysiela ultrazvukové vlny k nádorovým bunkám)
- radiačná protónová terapia (použitie toku protónov zacielených na nádor)

(Aus *et al.*, 2006; <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/prostate/>)

3.2 Molekulárne – biologické zmeny u karcinómu prostaty

Posledné analýzy génových expresií a funkčných analýz proteínov v karcinóme prostaty naznačujú špecifické zmeny génových produktov a molekulárnych dráh. Tieto zmeny často postihujú kmeňové alebo progenitorové bunky a ich dcérske bunky.

3.2.1 Zmeny molekulárnych dráh pri iniciácii kancerogenézy prostaty

Pôvod karcinómu prostaty nie je úplne jasný. Existuje množstvo štúdií, ktoré predpokladajú akumuláciu určitých genetických príp. epigenetických zmien v prostatických kmeňových alebo progenitorových bunkách, čo súvisí so starnutím buniek, fyzickými poraneniami tkaniva alebo vplyvom rizikových faktorov z prostredia. Všetky tieto javy môžu vyústiť do malígnej transformácie normálnych diferencovaných buniek alebo kmeňových buniek (Mimeault a Batra, 2006). Často ide o downreguláciu nádorových supresorov a up reguláciu rôznych onkogénnych produktov v prostatických kmeňových bunkách vedúcich k iniciácii vzniku nádoru a v neskoršom štádiu k progresii ochorenia (Giannoni *et al.*, 2010; Giannoni *et al.*, 2011; Patrawala *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Mimeault a Batra 2011).

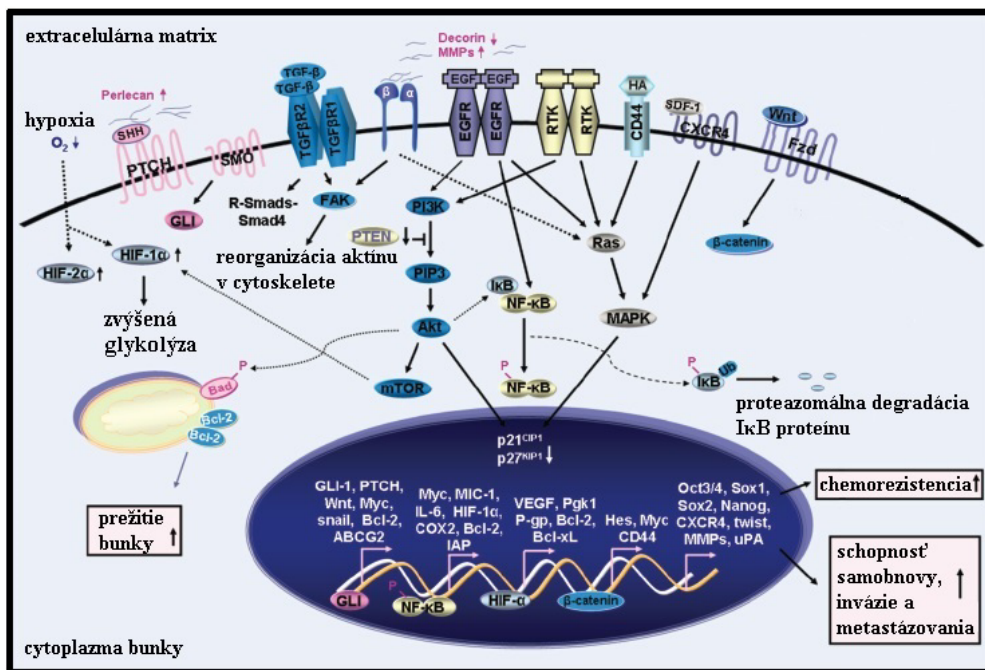
Medzi nádorové supresory sa radia proteíny PTEN (phosphatase and tensin homolog; homológ fosfatázy a tenzínu), p53 (tumor suppressor protein 53; tumor-supresorový proteín p53), Nkx3.1 (homeobox protein Nkx3.1), p27^{KIP1} (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; inhibítor 1B cyklín-dependentnej kinázy). Strata jedného alebo oboch kópií *PTEN* vedie k expanzii nádorových buniek a iniciácii nádoru (Wang *et al.*, 2006). Onkogénom so zvýšenou expresiou je *TMPRSS2-ERG* fúzny gén v prostatických bunkách, ktorý bol pozorovaný v 50 – 60 % prípadov karcinómu prostaty (Clark *et al.*, 2008; Mosquera *et al.*, 2008). Zvýšená expresia *TMPRSS2-ERG* (transmembrane protease serine 2 gene; gén pre transmembránová serín-proteáza typu 2-erythroblast transformation-specific related gene) spolu s downregulovaným génom *PTEN* vedú k zvýšenej aktivite PI3-kinázy (phosphatidylinositol 3 kinase; fosfatidylinozitol 3 kináza) a následnej stimulácii génu *AKT* (v-akt murine thymoma viral oncogene) v ranných a neskorších štádiách karcinómu prostaty. Strata kópie *PTEN* v kombinácii so zvýšenou expresiou *ERG* indukovanou p53 môže v neskorom štádiu karcinómu zvýšiť expresiu *CXCR4* (CXC chemokine receptor type 4; CXC chemokínový receptor typu 4) a viesť k invazívnej forme karcinómu (King *et al.*, 2009; Leong *et al.*, 2009).

U karcinómu prostaty bola pozorovaná zvýšená aktivita telomerázy a zvýšená expresia jednotlivých rastových faktorov a následná zmena ich signálnych dráh. Medzi komponenty týchto signálnych dráh patria: EGFR (epidermal growth factor receptor; receptor epidermálneho rastového faktoru), SHH (Sonic hedgehog), Wnt/ β -katenín, integríny, interleukín 6, *CXCR4* s ligandom SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) a komponenty extracelulárnej matrix. Pri

aktivácii SHH dráhy dochádza k aktivácii jedného z jej elementov, receptoru PTCH1 (Patched-1 transmembrane domain protein; Patched-1 transmembránový proteín), a následne GLI1 (glioma-associated oncogene homolog 1; homológ 1 onkogénu asociovaného s gliómom). Prítomnosť týchto elementov je často detekovaná v hyperplázických a nádorových bunkách prostaty (Chen *et al.*, 2007). Integrácia týchto dráh vedie k udržiavaniu rastu nádorových buniek a získaniu schopnosti migrácie v procese epiteliálno-mezenchymálneho zvratu (Giannoni *et al.*, 2010; Giannoni *et al.*, 2011; Patrawala *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2010; Dubrovská *et al.*, 2009).

Často je detekovaná zvýšená expresia transkripčných faktorov asociovaných s vlastnosťami embryonálnych kmeňových buniek ako: Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), Nanog (homeobox protein Nanog), Sox2 (sex determining region Y-box 2). Bunky vykazujúce prítomnosť týchto faktorov majú schopnosť samobnovy, vysokú schopnosť migrácie a teda aj zakladania metastáz (Duhagon *et al.*, 2010; Bae *et al.*, 2010).

Schématické znázornenie jednotlivých signálnych dráh je na obr. č.3.



Obr. č.3: Znázornenie molekulárnych dráh v prostatickej bunke (Mimeault a Batra, 2011, upravené)

3.2.2 Modulácia malígnych vlastností nádorových buniek prostaty

Progresia karcinómu prostaty je typicky spájaná s degradáciou bazálnej membrány, stratou vrstvy epiteliálnych buniek a bunkovej adhézie. Prebiehajú intenzívne remodelačné procesy a to najmä v stromatických bunkách nádoru (Mimeault *et al.*, 2006; Ao *et al.* 2007) a v extracelulárnej matrix. Dochádza k upregulácii ligandov integrínových receptorov, peptidoglykánov (hlavne perlekánu), k sekrécii proteolytických enzýmov: hepsínu, MMPs (matrix metalloproteinases; matrix metaloproteinázy), PLAU (urokinase-type plasminogen activator; plazminogénny aktivátor urokinázového typu). Súčasne klesá expresia dekorínu a zvyšuje sa expresia membránových prekursorov EGFR ligandov, ktorá je indukovaná MMP. Dochádza k aktivácii EGFR. (Mimeault *et al.*, 2006; Datta *et al.*, 2006; Ao *et al.*, 2007; Mimeault *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009). Akumulácia perlekánu v extracelulárnej matrix a jeho interakcia s molekulami ligandov SHH zabezpečuje schopnosť udržať kaskádu SHH v prostatických nádorových bunkách aktívnu (Ao *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009).

Prostatické nádorové bunky majú schopnosť adaptácie na oxidatívny stres, hypoxiu a zápalové procesy, čo sú podmienky vyskytujúce sa v mieste nádoru. Schopnosť adaptácie spočíva v získaní malígneho fenotypu prostredníctvom aktivácie NF- κ B a HIFs (hypoxia-inducible factors; hypoxiou indukovateľné faktory) (Birnie *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2011). NF- κ B, HIF-1 α a HIF-2 α môžu indukovať expresiu rôznych génových produktov akými sú: glykolytické enzýmy, interleukín 6, cyklooxygenáza 2, VEGF (vascular endothelial growth factor; vaskulárny endoteliálny rastový faktor), P-glykoproteín, v prostatických nádorových bunkách v podmienach normoxie alebo hypoxie (Birnie *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2009). Tieto génové produkty majú kritickú úlohu v progresii karcinómu prostaty, pretože dochádza k upregulácii glykolýzy, angiogénnemu prepnutiu a chemorezistencii nádorových buniek (Higgins *et al.*, 2009; LaTulipe *et al.*, 2002).

3.3 Analyzované gény u karcinómu prostaty

3.3.1 Gén *VCL*

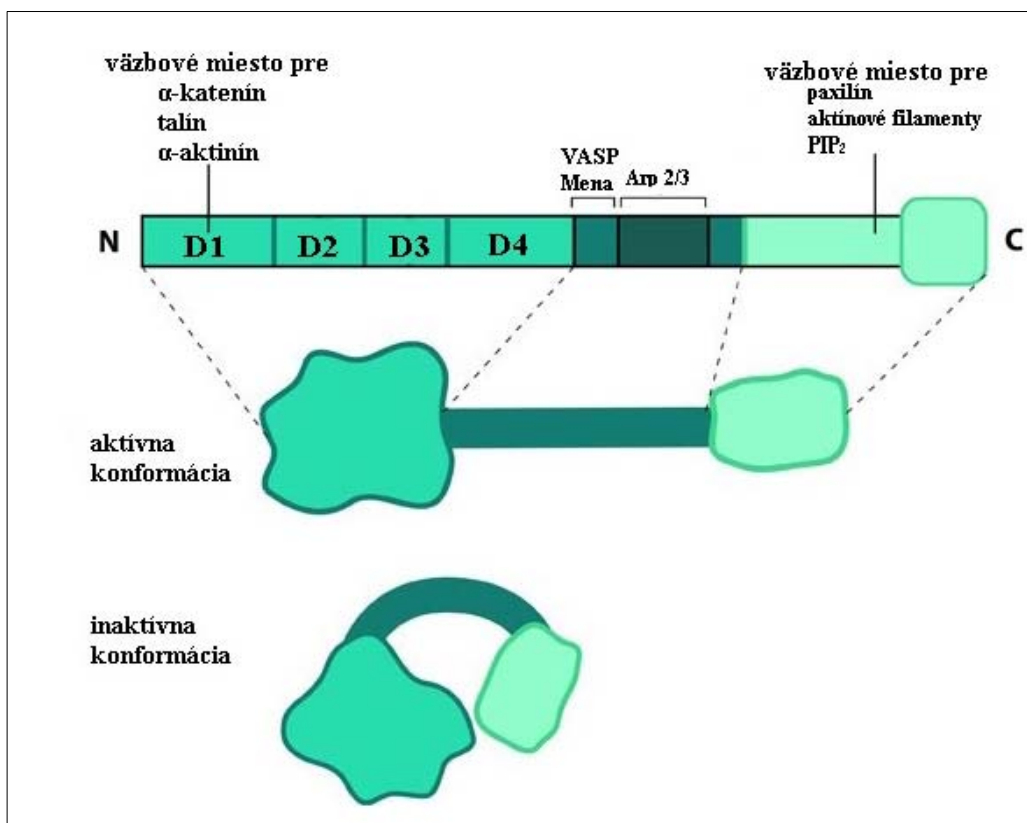
Gén *VCL* (vinculin; vinkulín) a jeho proteínový produkt vinkulín, ktorý patrí medzi proteíny cytoskeletu, je dôležitou súčasťou komplexu fokálnych bunkových adhézii. Jeho zvýšená expresia je spájaná so zvýšenou migráciou ako normálnych, tak aj nádorových buniek, ktoré sú následne schopné zakladať metastázy (Bhavik *et al.*, 2008).

3.3.1.1 Štruktúra a funkcie *VCL*

Lokus génu *VCL* sa nachádza na chromozóme 10q22.2, je dlhý 122 kb a má 22 exónov. U človeka sú známe dve izoformy: vinkulín a metavinkulín. *Meta-VCL* má na 3' kódujúcom konci na rozdiel od *VCL* jeden exón navyše. *VCL* je exprimovaný takmer vo všetkých ľudských tkanivách, v najvyššej miere v monocytoch, dendritických bunkách, NK (natural killer) bunkách, v bunkách hladkých svalov, adipocytoch, bunkách placenty, prostatických bunkách a bunkách semenníkov (<http://pax-db.org/>).

Proteínový produkt kódovaný génom *VCL* pozostáva z 1134 aminokyselín, má dĺžku 123 700 Da. Prostredníctvom N-koncovej domény viaže talín, α -katenín a α -aktinín. Touto väzbou je umožnené spojenie integrínov s aktín-myozínovým komplexom. K C-koncovej doméne sa pripája paxilín, aktínové filameny a PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát). Spojenie N- a C-koncových domén je flexibilné a obsahuje väzbové miesta pre komponenty aktín-polymerizačného komplexu: Arp2/3 (actin-related protein 2/3; aktín-príbuzný proteín 2/3), Mena (Mammalian enabled protein) / VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (DeMali *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 1990).

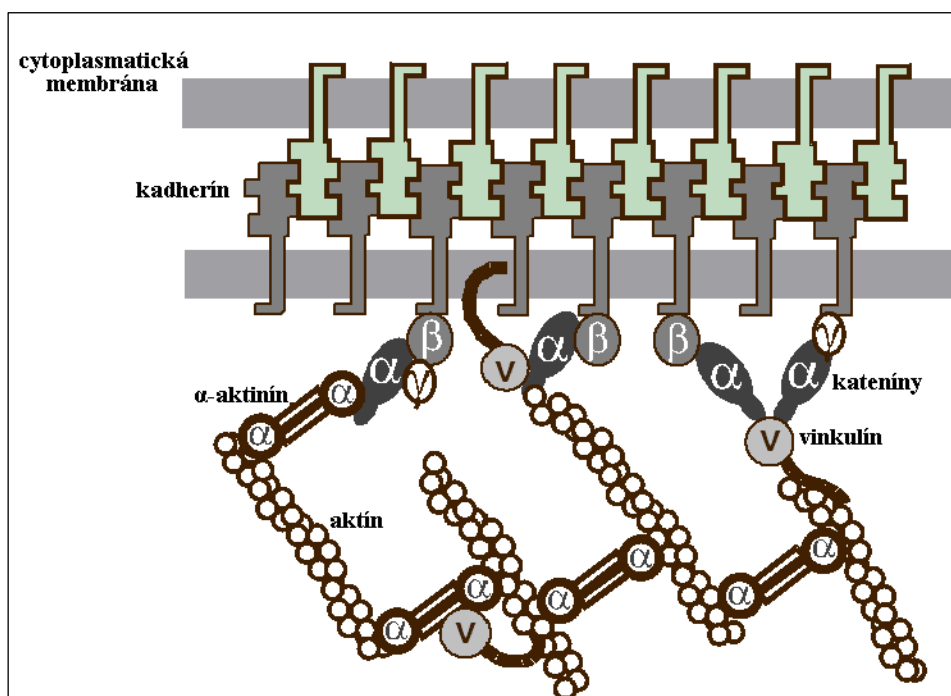
Vinkulín sa nachádza buď v aktívnej-otvorenej konformácii alebo inaktívnej-uzatvorenej konformácii. N-koncová doména pozostáva zo 4 subdomén (D1-D4). Znázornenie štruktúry vinkulínu je na obr. č. 4.



Obr. č. 4: Znázornenie štruktúry vinkulínu a jeho konformácií. Písmenami D sú označené jednotlivé subdomény (<http://www.mechanobio.info/Home/glossary-of-terms/proteins/vinculin>, upravené)

C- koncová doména viaže F-aktín a aktínové filamenty do zväzkov. Intramolekulárna interakcia medzi N a C-koncovou doménou maskuje väzbovú doménu pre F-aktín lokalizovanú na C-konci. Ak sa na subdoménu D1 naviaže talín a α -aktinín, dôjde ku konverzii tejto subdomény, čo vedie k rozštiepeniu intramolekulárnej interakcie a kryptické miesto pre naviazanie F-aktínu ostáva voľné (Le Clainche *et al.*, 2010). Rovnaká situácia nastane ak sa na špecifické miesto v oblasti C-koncovej domény naviaže PIP_2 . N- a C-koniec potom disociujú a proteín zaujme aktívnu konformáciu. Znázornenie oboch konformácií je na obr. č. 4. V tomto stave sú jeho väzbové miesta prístupné pre ďalšie proteíny zúčastňujúce sa na zmenách cytoskeletálnych komplexov. Vinkulín plní funkciu štruktúrneho spojenia medzi aktínovými filamentami a receptormi zúčastnenými na fokálnej adhézii v bunkovej membráne. Fokálne bunkové adhérie sú komplexy spájajúce bunky s extracelulárnou matrix, a sú tvorené viac než 50 typmi proteínov. Tieto proteíny sú pevne spojené s aktínovými filamentami. Vinkulín je

jedným z proteínov viažucich aktínové filameny (Mierke *et al.*, 2009). Plní funkciu dynamickej regulačnej zložky počas bunkovej adhézie a počas bunkovej migrácie pomáha prostredníctvom vytvárania membránových výbežkov navádzať aktínové filameny na nové miesta, kde sa už nachádzajú integríny (DeMali *et al.*, Buridge *et al.*, 2003). Vinkulín je taktiež súčasťou medzibunkových spojení. Môže sa viazať na E-kadherín na N-konci a na aktínové filameny na C-konci. Tým zvyšuje mechanickú pevnosť celého komplexu (le Duc *et al.*, 2010). Znázornenie interakcií jednotlivých proteínov je na obr. č. 5.



Obr. č. 5: Znázornenie základných interakcií proteínov pri bunkových spojeniach (<http://herkules.oulu.fi/isbn9514269306/html/x477.html>, upravené)

3.3.1.2 Gén *VCL* v súvislosti s nádormi a metastázovaním

Schopnosť migrácie cez extracelulárnu matrix je nevyhnutná pre nádorové bunky, ktoré sú tak schopné dosiahnuť miesta vzdialené od primárneho nádoru a založiť metastázy. S inváziou nádorových buniek súvisí ich schopnosť tvoriť špecifické výbežky cytoplazmy: invadopodia a podozomy. Tvorba podozomov bola zistená nielen u nádorových buniek ale aj u makrofágov, chondrocytov, buniek endotelu, transformovaných fibroblastov a osteoklastov (Linder *et al.*, 2003). Podozomy sú štruktúry bohaté na F-aktín. Počas procesu migrácie podozomu formujú klastre a rozety, ktoré obsahujú rovnaké proteíny ako komplexy fokálnej adhézie, čiže aj proteín vinkulín (Marchisio *et al.*, 1987). Invadopodia a podozomy zdieľajú spoločné štruktúrne vlastnosti a niektoré molekulárne zložky. Invadopodia obsahujú proteázy, signálne proteíny, aktín a aktín-viažuce proteíny, a majú dôležitú úlohu pri degradácii extracelulárnej matrix a následnej migrácii a metastázovaní (Baldassare *et al.*, 2003).

Adhezívne štruktúry podobné invadopodiám boli nájdené vo vnútri a na povrchu prostatických nádorových buniek línie PC3. V týchto adhezívnych štruktúrach bola zistená kolokalizácia vinkulínu spolu s F-aktínom. Distribúcia F-aktínu a vinkulínu tvorila bodky v centrálnej a periférnej časti štruktúr. Formácia týchto štruktúr korelovala s lokalizáciou matrix-metallo-proteinázy 9 a degradáciou matrix v priebehu invazívnych procesov (Desai *et al.*, 2008). Ďalej bola zistená zvýšená expresia transkripčných korepresorov ako: HDAC1 (histone deacetylase 1; histónová deacetyláza 1), HDAC2, HDAC3 a proteínov skupiny Polycomb, vedie k supresii génu *VCL*, a to má za následok zvýšenú schopnosť migrácie buniek v prostatických nádorových bunkových línách LNCaP a VCaP (Rei Chng *et al.*, 2012). V ďalšej štúdií bola zistená zvýšená expresia vinkulínu v prípade buniek s amplifikovaným regiónom chromozómu 10q22. Vinkulín bol lokalizovaný v cytoplazme aj v membráne buniek. Ako kontroly poslúžili vzorky s BPH, kde sekrečné epiteliálne bunky nevykazovali expresiu vinkulínu, zatiaľčo okolité bazálne bunky a bunky fibromuskulárnej stromy boli pozitívne na prítomnosť vinkulínu. Taktiež bola zistená zvýšená proliferácia buniek vo vzorkách, kde bola zvýšená expresia vinkulínu, čo podporuje hypotézu, že vinkulín podporuje proces bunkovej proliferácie. Ďalej bolo zistené, že pokročilé štádium karcinómu bolo asociované s vyššou expresiou génu *VCL* (Ruiz *et al.*, 2011).

Bunky embryonálneho karcinómu, v ktorých bol inaktivovaný gén *VCL* vykazujú nižšiu schopnosť adhézie a zvýšenú motilitu (Goldman *et al.*, 1995).

3.3.2 Gén *SHB*

Gén *SHB* kóduje tzv. „Src homology 2-domain adapter protein B“, ktorý je súčasťou vnútrobunkových signálnych dráh pri rôznych procesoch v bunke akými sú: proliferácia, diferenciácia, bunková motilita alebo apoptóza (Anneren *et al.*, 2003).

3.3.2.1 Štruktúra a funkcie *SHB*

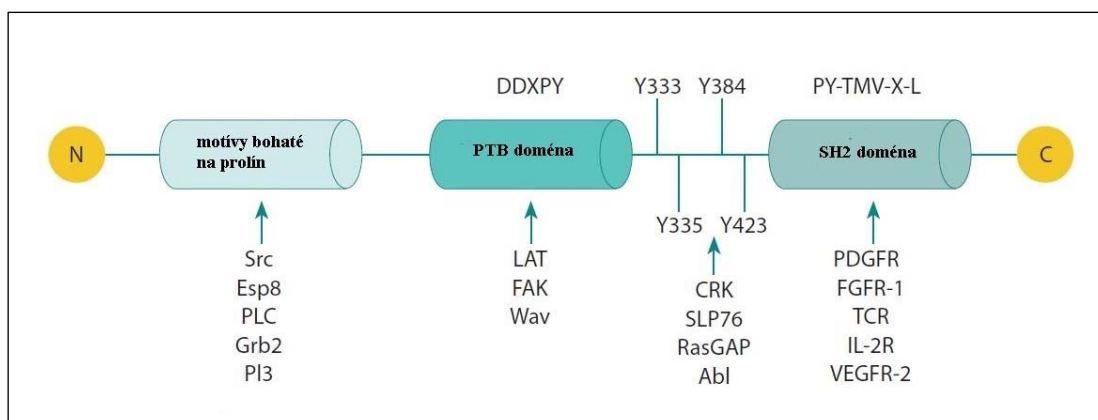
SHB bol objavený pri identifikácii génov indukovaných sérom v inzulínovej bunkovej línii β TC-1 u myši (Welsh *et al.*, 1994). Názov vznikol skratkou označenia proteínu SH2 β -buniek. Gén *SHB* sa nachádza na chromozóme 9p13.2, má dĺžku 153 kb a obsahuje 6 exónov. *SHB* je exprimovaný takmer vo všetkých tkanivách ľudského tela, pričom úroveň expície v rámci normálnych zdravých tkanív je približne rovnaká (Welsh *et al.*, 1998). Ním kódovaný proteín pozostáva z 509 aminokyselín. Boli identifikované 3 izoformy proteínu v dĺžke 55, 66 a 77 kDa. (Karlsson a Welsh, 1996). Je pravdepodobné, že existujú ďalšie izoformy, ktoré sú špecifické pre jednotlivé typy buniek.

Proteín SHB má na svojom N-konci motívy bohaté na prolín a na C-konci sa nachádza doména s homológiou k SH2 proteínom. Medzi nimi je lokalizovaná PTB doména (phosphotyrosin-binding domain; doména viažuca fosfotyrozín viazajúca fosfotyrozín) (Lindholm, 2000). Štruktúra proteínu SHB spolu s PTB-doménou je znázornená na obr. č. 6. Src (v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog), PLC (phospholipase C; fosfolipáza C), Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), PI3-kinázy interagujú s motívmi bohatými na prolín (Hagerkvist *et al.*, 2007), zatiaľčo FAK a LAT (linker for activation of T-cells) s PTB doménou. Doména SH2 doména viaže aktivované tyrozínkinázové receptory ako: PDGFR (platelet-derived growth factor receptor; receptor rastového faktoru krvných doštičiek), FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor; receptor fibroblastového rastového faktoru), receptor T-buniek, receptor interleukínu 2 a VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2; receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru 2) (Holmqvist *et al.*, 2004).

SHB je súčasťou signálnych dráh regulujúcich proliferáciu, migráciu a diferenciáciu endoteliálnych buniek, čím sa podieľa na procese angiogenézy. Interaguje s receptormi FGFR-1 a VEGFR-2 a tým aktivuje rastové faktory (Holmqvist *et al.*, 2004). VEGFR-2 je receptorom VEGF-A. VEGFR-2 sa viaže na komplex VE-kadherínu (vascular endothelial cadherin) a β -

katenínu a takto sa podieľa na regulácii formovania adhezenčných spojení v endoteliálnych bunkách (Dejana *et al.*, 2009). VEGFR-2 a VE-kadherín spolu asociujú. Aktivácia VEGFR-2 spúšťa na Src závislú fosforyláciu VE-kadherínu, čo má za následok rozpad bunkových spojení (Weis *et al.*, 2004). Aktivácia VEGFR-2 taktiež stimuluje PI3-kinázovú aktivitu, čo má za následok interakciu Src a FAK. Dochádza k formácii fokálnych adhézii a migrácii buniek. Stimulácia VEGFR-2 ďalej spôsobuje proliferáciu a migráciu endoteliálnych buniek a uvoľnenie proteáz, ktoré môžu spustiť invazívny proces (Holmquist *et al.*, 2004). SHB sprostredkováva signály vedúce k proliferácii buniek aktiváciou MAPK (mitogen-activated protein kinase; mitogénom aktivované proteín kinázy). V spojení s kinázou Src a FAK navodzuje zmeny v cytoskelete bunky. (Cross *et al.*, 2002; Holmquist *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2002). Pri chýbajúcom SHB bola zaznamenaná znížená aktivácia FAK ako odpoveď na VEGF. FAK je súčasťou signálnej dráhy, ktorá vedie k poruchám štruktúry cytoskeletu (Holmquist *et al.*, 2004). Zvýšená aktivita p38 MAPK (p38 MAP Kinase; p38 MAP kináza) bola taktiež spájaná s poruchami štruktúry cytoskeletu, nakoľko p38 MAPK je spojená s reguláciou cytoskeletu endoteliálnych buniek a s formáciou nových ciev (Matsumoto *et al.*, 2002).

Je pravdepodobné, že SHB má funkciu aj v procese apoptózy. SHB interaguje s tyrozínkinázou c-Abl (c-Abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase), reguluje jej kinázovú aktivitu, čo následne vedie k regulácii signálnej dráhy pre apoptózu (Hagerkvist *et al.*, 2007). Kináza c-Abl je silne aktivovaná v prípade poškodenia bunky, čo môže vyústiť do zastavenia bunkového cyklu alebo apoptózy. Biologický význam interakcie c-Abl/SHB bol testovaný pri knockoute SHB, kedy bola pozorovaná znížená miera angiogenézy, znížená hustota ciev a rôzne defekty ciev (Christoffersson *et al.*, 2012).



Obr. č. 6: Schéma proteínu SHB (Davoodpour *et al.*, 2005, upravené)

3.3.2.2 *SHB* v súvislosti s nádorovými ochoreniami

Keďže *SHB* je zahrnutý v procesoch migrácie a proliferácie buniek a v procese angiogenézy, zmena v jeho expresii bola pozorovaná pri niekoľkých typoch nádorových ochorení.

Pokusy na myšiach, u ktorých bol uskutočnený knockout génu *SHB* poukázali na zníženú hustotu ciev a potlačený rast implantovaných nádorových buniek inzulínómu. Analýza génovej expresie nádorových buniek u týchto myší ukázala zníženú expresiu VEGF-A. U *Shb* mutantov bola znížená frekvencia výskytu nádorov kvôli chronicky potlačenej angiogenéze, v prípade, že šlo o angiogenézu závislú na VEGF-A. V prípade angiogenézy nezávislej na VEGF-A bola zaznamenaná zvýšená frekvencia nádorov u *Shb* mutantov, čo poukazuje na heterogénny mechanizmus vzniku nádorov. Avšak nebol pozorovaný rozdiel v miere proliferácie a apoptózy pri porovnaní *Shb* mutantov a kontrol. Rovnako nebol zistený rozdiel v invazivite nádoru. (Akerblom *et al.*, 2012).

Knockdown *SHB* v bunkách angiosarkómu viedol k zvýšeniu citlivosti voči angiogénemu inhibítoru honokiolu a následne k potlačeniu rastu nádoru (Funa *et al.*, 2008). Ďalej boli testované bunky pľúcneho karcinómu a fibrosarkómu. V oboch prípadoch bola pozorovaná výrazne nižšia miera rastu nádorov u myší s knockoutom génu *SHB*, pričom nádory vykazovali abnormálne štruktúry buniek endotelu. Už strata jednej alely génu *SHB* viedla k zníženej vaskularizácii nádoru a potlačeniu jeho rastu (Funa *et al.*, 2009). Vo vzorkách karcinómu prostaty bola zistená nižšia expresia *SHB* v porovnaní s BPH vzorkami, pričom pri rozdelení karcinómu na lokalizované a lokálne pokročilé štádium bol pozorovaný trend smerom k nižšej expresii u nálezov s lokálne pokročilým štádiom. Tento trend však nebol štatisticky významný (Schmidt *et al.*, 2012). To je v súlade so štúdiou, ktorá skúmala zvýšenú expresiu v prostatických nádorových bunkách línie PC3, kde bola popísaná spojitosť so zvýšenou mierou apoptózy a potlačeným rastom nádorových buniek (Davoodpour *et al.*, 2007).

Mechanizmus, akým *SHB* reguluje apoptózu, je stále nejasný. Na základe interakcií homológneho proteínu SHD (Src homology 2 domain containing transforming protein D) sa predpokladá, že *SHB* viaže c-Abl. Nereceptorová tyrozínkináza c-Abl patrí do skupiny kináz, ktoré sú zodpovedné za kontrolu apoptózy (Kharbanda *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2000). c-Abl sa viaže k SH2 doméne proteínu *SHB* a táto interakcia má za následok konformačnú zmenu, ktorá

aktivuje kinázu c-Abl kinázu (Hantschel *et al.*, 2004). Aktivácia je spojená s fosforyláciou tyrozínových zvyškov (Brasher *et al.*, 2000) a bola zaznamenaná za určitých stresových podmienok, kedy sa bunkový cyklus zastavil a spustila sa apoptóza (Kharbanda *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2000). Aktivovaná c-Abl ďalej aktivuje MAP-kinázy: JNK (c-Jun N-terminal kinase; c-Jun N-koncová kináza) a p38, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu a diferenciácie buniek a k apoptóze. (Barilla *et al.*, 2000).

3.3.3 Gén *OCT3*

Gén *OCT3* (organic cation transporter 3; transportér 3 katiónov organických zlúčenín) tiež známy ako *SLC22A3* (solute carrier family 22 member 3) kóduje extraneuronálny proteínový transportér monoamínu. Patrí do skupiny polyšpecifických organických katiónových transportérov, ktoré sú zodpovedné za prenos rôznych typov malých organických katiónov (Gruendemann *et al.*, 1998).

3.3.3.1 Štruktúra a funkcie *OCT3*

Lokus génu *OCT3* sa nachádza na chromozóme 6q25.3. Má dĺžku 106 kb a obsahuje 11 exónov (Wieland *et al.*, 2000). Prvýkrát bol detekovaný v placentárnom tkanive potkanov a jeho expresia bola následne zistená u ďalších tkanív (Kekuda *et al.*, 1998). Proteín kódovaný týmto génom patrí medzi membránové transportné proteíny. Je jedným z troch transportných proteínov (*OCT1*, *OCT2*, *OCT3*) kódovaných génmi na chromozóme 6, ktoré tvoria klaster. Gény majú rovnakú exón-intrónovú štruktúru a veľkosť exónov. Ich exprimácia v jednotlivých tkanivách sa však líši. *OCT3* je zložený z 12 transmembránových domén, pričom jedna extracelulárna slučka sa nachádza medzi 1. a 2. doménou, a jedna intracelulárna slučka je medzi 6. a 7. doménou. N-koniec aj C-koniec sú lokalizované intracelulárne. Proteín má 556 aminokyselín. Je exprimovaný hlavne v tkanive placenty, kostrových svalov, prostaty, pečene, obličiek, slinných žliaz, a v mozgu (Gruendemann *et al.*, 1998, Verhaagh *et al.*, 1999).

Hlavnou funkciou *OCT3*, a rovnako aj *OCT1* a *OCT2*, je príjem a transport katiónov organických zlúčenín alebo katiónov liečiv. Ide najmä o endogénne a exogénne zlúčeniny

amínov a xenobiotiká ako: neurotoxín 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), tetraetylamónium, agmantín, cimetidín, prazosin, metformín, dopamín, a norepinefrín (Nies *et al.*, 2011). OCT3 je exprimovaný v gliálnych bunkách mozgového tkaniva, kde je zodpovedný za príjem katecholamínov a katiónov z neurotoxických organických zlúčenín. Katecholamíny sú prijímané z extracelulárneho priestoru OCT3 štruktúrami v plazmatickej membráne buniek, ktoré patria do sympatického nervového systému akými sú bunky hladkého svalstva, srdcového svalstva a žľazové bunky. Pri prijímaní katecholamínov prostredníctvom OCT3 nie je nutná tvorba sodíkového gradientu. U myši, ktorým chýbal OCT3, boli zaznamenané zmeny v neurotransmisii a zvýšená citlivosť na psychostimulačné látky (Vialou *et al.*, 2008). OCT3 sa takisto podieľa na prijímaní katecholamínov a iných katiónov bunkami pečene a obličiek (Graefe *et al.*, 1998).

Celá skupina transportérov katiónov organických zlúčenín je schopná katióny len prijímať. Pri výdaji je nutná „spolupráca“ s inými transportérmi, ktorých funkciou je výdaj látok. Väčšinou ide o ABC proteíny. V placentárnom tkanive, v trofoblastoch, je OCT3 zodpovedný za príjem látok z krvného obehu plodu. Presný mechanizmus nie je známy (Ahmadimoghaddam *et al.*, 2012).

Dôležitou funkciou OCT3 je príjem katiónov farmakologických zlúčenín. Ide najmä o chemoterapeutické liečivá, akým je napr. cisplatina alebo oxaliplatina (Zhang *et al.*, 2006).

3.3.3.2 OCT3 v spojení s nádorovými ochoreniami

Expresiou génu *OCT3* v nádorových tkanivách sa zaoberá pomerne málo štúdií, presný mechanizmus pôsobenia *OCT3* v nádorových bunkách zostáva nejasný. Keďže gén *OCT3* reguluje príjem farmakologických zlúčenín do bunky, jeho zvýšená expresia je spájaná s vyššou efektivitou liečby u pacientov s nádorovým ochorením. Zvýšená expresia bola zaznamenaná u vzoriek kolorektálneho karcinómu, kde v porovnaní so zdravým tkanivom bola hodnota expresie 9-krát vyššia, pričom akumulácia oxaliplatiny bola tiež vyššia. Miera expresie *OCT3* tak môže určovať mieru citlivosti voči liečbe oxaliplatinou (Yokoo *et al.*, 2008). Vyššia expresia tohto génu bola detekovaná aj vo vzorkách nádorov hlavy a krku. Pri porovnaní so zdravým tkanivom bola u nádorových buniek, ktoré boli dobre diferencované, zistená vyššia expresia. Naopak u nádorov málo diferencovaných bola expresia *OCT3* nižšia. Pri analýzach bunkových línií nádorov krku a hlavy bola miera expresie rozdielna. Zatiaľčo u línií HN13, Hep2 a HN12

bola hodnota expresie vyššia u línii HN4 a HN6 zostala nezmenená. Kontrolnou vzorkou bola bunková línia normálnych keratinocytov (Patel *et al.*, 2013).

V ďalšej štúdií bola analyzovaná expresia génu *OCT3* u vzoriek hepatokarcinómov a u bunkových línii hepatokarcinómu. U bunkových línii bola zistená nulová alebo len nepatrná expresia *OCT3*. U vzoriek hepatokarcinómu v porovnaní so zdravým tkanivom bola zistená nižšia expresia. Nebola zistená žiadna súvislosť so štádiom ochorenia a prognózou (Heise *et al.*, 2012).

U bunkových línii karcinómu prostaty boli uskutočnené funkčné analýzy. Knockdown *OCT3* v línii LNCaP a supresia v líniiach LHSAR a RWPE1 spôsobili zníženie alebo úplné potlačenie proliferácie a zníženú životaschopnosť nádorových buniek (Grisanzio *et al.*, 2012). Taktiež bola zistená súvislosť medzi expresiou *OCT3* a hodnotou Gleason skóre, kde nižšia expresia génu bola asociovaná so vzrokami s vyššou hodnotou Gleasonovho skóre. Expresia u BPH bola vyššia než vo vzorkách karcinómu a klesala smerom k pokročilejším štádiám (Tomlins *et al.*, 2007).

Jednou zo zlúčenín, ktoré prijíma *OCT3* do bunky je metformin. Ide o liek užívaný pri liečbe diabetu typu II, avšak podľa posledných štúdií má funkciu pri prevencii vzniku nádorov. Metformin sa akumuluje v matrix mitochondrií, kde narúša transpot elektrónov, čo vedie k redukcii syntézy ATP (El-Mir *et al.*, 2000). Následne sa aktivuje AMPK (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase; 5-adenozínmonofosfátom aktivovaná proteín kináza), ktorá je spojená s redukcii signálnej dráhy mTOR. Signálna dráha mTOR reguluje rast buniek, proliferáciu a metabolizmus. Zároveň má schopnosť regulovať niektoré z molekulárnych dráh, ktoré sú v prípade nádorového ochorenia často deregulované (Inoki *et al.*, 2002). Aktiváciou AMPK sprostredkovanou metmorfinom je možné inhibovať mTOR dráhu a tým pádom potlačiť proteínovú syntézu a bunkovú proliferáciu v prípade nádorového tkaniva (Riedmaier *et al.*, 2013). Užívaním metmorfinu bolo možné znížiť incidenciu karcinómu prostaty o 31 % u pacientov s diabetom (Decensi *et al.*, 2010).

4 Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 82 pacientov vo veku od 44 do 80 rokov, priemerný vek bol 64,4 roka. Vzorky boli odoberané na Urologickej klinike 2. FN Motol. Materiál bol získaný zo vzoriek pacientov, ktorí podstúpili biopsiu prostaty, kontrolovanú transrektálnou sonografiou alebo zo vzoriek radikálnej prostatektómie. Prítomnosť karcinómu a jeho biologická špecifikácia bola posúdená histologickým vyšetrením vzorky. Pri potvrdení nálezu karcinómu bol stanovený grading (Gleason skóre) a staging (TNM).

Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas o poskytnutí vzoriek pre potreby štúdie.

4.1 Odber vzoriek

Transrektálne kontrolovaná biopsia prostaty bola prevedená pomocou transrektálnej ultrazvukovej sondy. Keďže karcinóm má často nešpecifickú štruktúru, je okrem cielenej biopsie uskutočnený aj segmentárny odber 6 až 12 vzoriek podľa naliehavosti a klinického stavu pacienta. Získané vzorky boli rozdelené na tri časti: dve periférne a jednu strednú. Periférne boli vyšetrené na Ústave klinickej patológie FN Motol a 2. LF UK. Stredný segment bol ihneď po odbere prenesený do roztoku RNAlater a takto uchovávaný pri teplote - 20°C až do izolácie mRNA.

Radikálna prostatektómia je kuratívny výkon, pri ktorom dochádza ku kompletnému odstráneniu prostaty. Po tomto zákroku bola zo suspektného tkaniva odobraná vzorka a prenesená do roztoku RNAlater. Vzorka bola zhodnotená histologicky a ďalej spracovávaná v prípade nálezu karcinómu alebo BPH.

Ako kontrolné vzorky slúžili odbery z benígnych hyperplázií prostaty. Tie boli získané transuretrálnou resekciou, transvezikálnou prostatektómiou alebo transrektálnou biopsiou. Boli taktiež hodnotené histologicky a ďalej uchovávané v roztoku RNAlater.

Súbor vzoriek spolu s klinickými údajmi je v tabuľke č. 3 a č. 4.

Kód pacienta	vek	TNM	GS	hladina PSA	diagnóza	terapia
P1	63			8.17	BPH	
P2	65			2.65	BPH	
P3	45	2a	3+3	2.70	CaP	
P4	67			0.79	BPH	
P5	75	3a	3+4	14.30	CaP	
P6	53	2c	3+3	8.22	CaP	
P7	63			3.52	BPH	
P8	63			49.90	BPH	
P9	64	3a	3+3	9.20	CaP	
P10	54	2a	3+3	7.20	CaP	
P11	74	3a	3+3	4.54	CaP	
P12	58	2c	4+3	6.30	CaP	
P13	71	2b	5+4	32.00	CaP	
P14	59	2c	3+4	5.20	CaP	
P15	60	3b	3+4	34.00	CaP	
P16	61	2c	3+3	8.49	CaP	
P17	71				BPH	
P18	62	2c	3+3	7.29	CaP	
P19	64	3a	4+3	11.00	CaP	
P20	64	3a	4+3	11.00	CaP	
P21	58	3b	4+5	13.15	CaP	
P22	58	3b	4+5	13.15	CaP	
P23	69	2a	3+3	4.64	CaP	
P24	69	2a	3+3	4.64	CaP	
P25	71	2b	3+4	18.60	CaP	
P26	71	2b	3+4	18.60	CaP	
P27	70	2a	3+4	1.82	CaP	
P28	70	2a	3+4	1.82	CaP	
P29	76	2a	3+3	6.30	CaP	
P30	48	3a	3+4	5.50	CaP	
P31	54	2c	3+3	4.17	CaP	
P32	71	3a	5+4	4.95	CaP	
P33	74			6.05	BPH	
P34	80	2a	3+3	2.85	CaP	
P35	80	3b	3+4	1.00	CaP	
P36	80	2a	3+3	2.85	CaP	
P37	74			6.05	BPH	
P38	69			5.00	BPH	
P39	69			5.00	BPH	
P40	62			12.35	BPH	
P41	62			12.35	BPH	

Tabuľka č. 3: Klinické údaje k vzorkám P1 – P41

Kód pacienta	vek	TNM	GS	hladina PSA	diagnóza	terapia
P42	80	3b	3+4	1.00	CaP	
P43	71	3a	5+4	8.38	CaP	
P44	63	3a	3+3	6.97	CaP	RRP
P45	61			2.39	BPH	
P46	61			2.39	BPH	
P47	60			3.38	BPH	
P48	62			4.14	BPH	
P49	52			3.80	BPH	TURP
P50	52			2.90	BPH	TURP
P51	60			3.38	BPH	TURP
P52	63	3a	3+3	19.00	CaP	RRP
P53	59	3a	3+3	5.88	CaP	RRP
P54	62			4.14	BPH	TURP
P55	63	2c	3+3	23.40	CaP	RRP
P56	44	3a	3+3	5.60	CaP	RRP
P57	62	2c	3+3	3.84	CaP	RRP
P58	68	3a	3+4	9.56	CaP	RRP
P59	72	2a	3+3	2.68	CaP	RRP
P60	76	2c	3+4	23.78	CaP	RRP
P61	59	2c	3+4	2.40	CaP	RRP
P62	57	2c	3+4	5.70	CaP	RRP
P63	61	3b	4+4	4.12	CaP	RRP
P64	63	3a	4+3	30.74	CaP	RRP
P65	72	1b	3+3	11.40	CaP	RRP
P66	72	1b	3+3	11.40	CaP	RRP
P67	65	2a	3+3	4.71	CaP	RRP
P68	59	2a	3+3	6.78	CaP	RRP
P69	58	2c	4+3	5.36	CaP	RRP
P70	56	2c	3+3	6.06	CaP	RRP
P71	64	2c	3+3	6.90	CaP	RRP
P72	64	2c	3+3	6.90	CaP	RRP
P73	68			7.85	BPH	TURP
P74	68			7.85	BPH	TURP
P75	77	3b	4+4	2.94	CaP	RRP
P76	77	3b	4+4	2.94	CaP	RRP
P77	59	3b	5+4	0.99	CaP	RRP
P78	59	3b	5+4	0.99	CaP	RRP
P79	62	2c	3+3	5.31	CaP	RRP
P80	62	2c	3+3	5.31	CaP	RRP
P81	62	3a	3+3	13.30	CaP	RRP
P82	56	3a	3+4	2.47	CaP	RRP

Tabuľka č. 4: Klinické údaje k vzorkám P42 – P82

BPH	benígna hyperplázia prostaty
CaP	karcinóm prostaty
GS	Gleasonovo skóre
RRP	radikálna prostatektómia
TNM	stupeň karcinómu prostaty
TURP	transuretrálna prostatektómia

4.2 Izolácia mRNA

Na izoláciu mRNA boli použité tkanivá získané biopsiou prostaty. Množstvo tkaniva použitého z jednej vzorky bolo v rozmedzí 50 – 100 mg tkaniva. Toto množstvo bolo oddelené skalpelom a zvyšok bol zamrazený a uložený k ďalším izoláciám. K samotnej izolácii bola použitá súprava Oligotex Direct mRNA Midi/Maxi od firmy Qiagen.

Zároveň bola pripravená zmes lyzačného pufru OL1 a β -ME v pomere 1 ml OL1 : 30 μ β -ME.

- b) K odobranému množstvu tkaniva bolo pridaných 600 μ l zmesi OL1 a β -ME. Takto pripravená vzorka bola homogenizovaná 40 sekúnd pomocou rotorstatorového homogenizátoru.
- c) Vzniknutá zmes bola prepipetovaná do 2 ml centrifugačných skúmaviek a následne k nej bolo pridaných 1,2 ml ODB pufru. Nasledovala centrifugácia po dobu 4 min pri rýchlosti 13 000 rpm.
- d) Supernatant bol opatrne prepipetovaný do novej centrifugačnej skúmavky a bolo pridaných 110 μ l Oligotex suspenzie. Táto suspenzia bola predtým nahriata na 37°C. Zmes bola premiešaná a ponechaná 10 min pri izbovej teplote. V tomto kroku sa poly-A konce mRNA naviazali na oligodT-reťazce Oligotexu.
- e) Nasledovala 6 min centrifugácia pri rýchlosti 13 000 rpm. Potom bol z centrifugačnej skúmavky odstránený supernatant a k peletu bolo pridaných 100 μ l zmesi OL1 s β -ME. Následne bolo pridaných 400 μ l pufru ODB.
- f) Vzniknutá zmes bola zahrievaná 3 min pri 70°C a potom 10 min ponechaná pri izbovej teplote.
- g) V ďalšom kroku nasledovala 6 min centrifugácia pri rýchlosti 13 000 rpm. Supernatant bol odstránený a k peletu bolo pridaných 350 μ l pufru OW1. Zmes bola premiešaná na vortexe.
- h) Následne bola zmes prepipetovaná do koloniek s Oligotexom, ktoré sú súčasťou súpravy. Kolonky sa nachádzajú v centrifugačných skúmavkách. Ďalším krokom bola 1 min centrifugácia pri rýchlosti 13 000 rpm.

- i) Filtrát bol odstránený a na kolonky so sedimentom bolo napipetovaných 350 μ l OW2. Pipetou bol sediment s OW2 pufrom jemne premiešaný tak, aby nedošlo k poškodeniu membrány.
- j) Prebehla 1 min centrifugácia pri rýchlosti 13 000 rpm, filtrát bol odstránený a krok s OW2 pufrom sa zopakoval.
- k) Nakoniec sa na kolonku nanieslo 60 μ l pufru OEB nahriateho na 70°C a nasledovala centrifugácia po dobu 1 min pri rýchlosti 13 000 rpm. V tomto kroku došlo k vymytiu mRNA z Oligotexu.
- l) Krok s pufrom OEB sa zopakoval, kvôli zaisteniu vyššieho výťažku.
- m) Zo vzniknutého supernatantu bolo do mikroskúmavky odobraných, ako alikvot, 50 μ l. Takto izolovaná mRNA bola zamrazená pri teplote -70°C.

4.3 RT – PCR

RT-PCR, teda reverzná PCR je modifikáciou klasickej PCR. Izolovaná mRNA je prevedená na cDNA pomocou reverznej transkriptázy. Potom je zahájená klasická PCR s dvomi špecifickými primermi. Výsledný počet kópií je $2^n - 1$, kde n označuje počet cyklov. Výhodou tejto techniky je citlivá detekcia veľmi nízkych množstiev DNA, pričom sa používa izolovaná mRNA. Pri RT-PCR reakcii bol použitý kit Qiagen *OneStep RT-PCR* od firmy Qiagen. Komponenty kitu sú uvedené v tabuľke č. 5.

Komponenty kitu:
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix (zmes obsahovala reverznú transkriptázu a HotStar Taq polymerázu)
Qiagen OneStep RT-PCR pufo, 5x
Mix dNTP
Voda Rnase-free
Q-solution

Tabuľka č. 5: Komponenty kitu, používaného pri namiešaní mastermix zmesi.

Z uvedených komponentov bol namiešaný mastermix pre jednotlivé kandidátne gény. Pri pipetovaní boli používané pipety CAPP AUTOCLAVABLE, objem 0,5-10 µl a 10-100 µl; firma CAPP. Pomery jednotlivých zložiek sú uvedené v tabuľkách č. 6, 7, 8, 9:

GAD

Komponenta	Objem (pre 10 reakcií)
Templát mRNA	10 µl
Mix dNTP	4 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	4 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Pufor, 5x	20 µl
Voda Rnase free	60 µl

Tabuľka č. 6: Zložky mastermix zmesi pre *GAD*

SHB

Komponenta	Objem (pre 10 reakcií)
Templát mRNA	10 µl
Mix dNTP	4 µl
Primer 1	0,6 µl
Primer 2	0,6 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	4 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Pufor, 5x	20 µl
Voda Rnase free	60 µl

Tabuľka č. 7: Zložky mastermix zmesi pre *SHB*

VCL

Komponenta	Objem (pre 10 reakcií)
Templát mRNA	10 µl
Mix dNTP	4 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	4 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Pufor, 5x	20 µl
Voda Rnase free	60 µl

Tabuľka č. 8: Zložky mastermix zmesi pre *VCL*

OCT3

Komponenta	Objem (pre 10 reakcií)
Templát mRNA	10 µl
Mix dNTP	4 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	4 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Pufor, 5x	20 µl
Voda Rnase free	60 µl

Tabuľka č. 9: Zložky mastermix zmesi pre *OCT3*

Ako templát mRNA bol použitá izolovaná mRNA získaná zo vzoriek biopsií pacientov. Primery pre amplifikáciu jednotlivých génov boli prevzaté z literárnych zdrojov. Sekvencie primerov sú uvedené v tabuľke č. 10.

Lokus	Kód primeru	Sekvencie primeru
GAD	GAPD2-R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
	GAPD2-L	CGAGATCCCTCCAAAATCAA
SHB	shb200-R	GGTAGCTTTCTGGTGGTGTGA
	shb200-L	GACTCTGCAAGGAGTGTAGC
VCL	VCL2R	GAATAAGTGCCCGCTTGGTA
	VCL2F	CTTCCCCTCTGACATGGAA
OCT3	OCT32r	GGAAGATCACAAACACAGGGAAGT
	OCT32f	CAGCAGACAGGTATGGCAGG

Tabuľka č. 10: Sekvencie primerov analyzovaných génov

Na prevedenie reakcií RT-PCR bol použitý termocykler TGradient od firmy BIOMETRA. Prebehlo 35 cyklov reakcie, annealingová teplota bola určená na základe dostupných literárnych zdrojov a gradientovej RT-PCR a je uvedená v tabuľke č. 12. Popis jednotlivých krokov je uvedený v tabuľke č. 11. Jednotlivé kroky RT-PCR boli rovnaké pre všetky analyzované gény, líšila sa len annealingová teplota. Kroky 3. – 5. sa cyklicky opakovali.

poradie kroku	popis kroku	teplota (°C)	čas (min)
1.	reverzná transkripcia	50	30
	- za prítomnosti reverznej transkriptázy dochádza k prepisu mRNA na cDNA		
2.	aktivácia <i>HotStarTaq DNA polymerázy</i>	95	15
	- zahájenie štandardnej PCR, inaktivácia reverznej transkriptázy		
3.	denaturácia	90	1
	- rozpletenie DNA reťazca na samostatné reťazce		
4.	annealing	podľa analýzov aného génu	1
	- pripojenie primerov, annealingová teplota je určená na základe teploty topenia primerov		
5.	elongácia	72	1
	- k 3' - konci primeru naviazaná polymeráza syntetizuje pomocou voľných dNTP nový komplementárny reťazec		
6.	konečná elongácia	72	10
	- dokončenie polymerizácie		

Tabuľka č. 11: Popis krokov RT-PCR

kód génu	annealingová teplota (°C)
<i>GAPDH</i>	65
<i>SHB</i>	55
<i>VCL</i>	61
<i>OCT3</i>	61

Tabuľka č. 12: Annealingové teploty analyzovaných génov

4.4 Detekcia fragmentov cDNA

Fragmenty cDNA po RT-PCR boli detekované gélovou elektroforézou. Metóda využíva schopnosť nabitých častíc pohybovať sa v elektrickom poli. Rýchlosť pohybu častíc je závislá na veľkosti náboja a veľkosti molekuly. Molekuly DNA sa pohybujú v smere od záporne nabitej elektróde ku kladne nabitej elektróde.

V tejto práci bol ako médium použitý 2 % agarózový gél. Agarózové gély sú dostatočne pevné, ľahko sa s nimi manipuluje a sú vhodné pre separáciu molekúl DNA do veľkosti 20 kbp. Gél bol pripravený z 2,4 g agarózy a 120 ml pufru 1x TBE. Pufor 1x TBE vznikol desaťnásobným zriedením pufru 10x TBE. Do ešte horúceho gélu bolo pridaných 12,5 µl farbiva GelRed od firmy Biotinum. Následne bol naliaty do formy. Po stuhnutí boli na gél napipetované jednotlivé vzorky cDNA v objeme 10 µl. Ku každej vzorke bolo pridaných 2,5 µl nanášacieho pufru 5 x TD. Fragменты putovali gélom 30 min pri napätí 130 V. Zloženie pufrom 10x TBE a 5x TD je uvedené v tabuľkách č. 13 a 14.

Zloženie pufru 10xTBE	
TRIS-báza	108 g
Kyselina boritá	55 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	40 ml

Tabuľka č. 13: Zloženie pufru 10x TBE

Zloženie pufru 5x TD	
20% Ficoll 400	
25 mM EDTA (pH 8.0)	
0,05% bromfenolová modrá	

Tabuľka č. 14: Zloženie pufru 5x TD

Výsledky boli spracované pomocou vizualizačného prístroja MiniBIS PRO od firmy Bio-Imaging Systems. Optická hustota bola meraná na denzitometri Kodak Digital Science ID od firmy Kodak Rochester.

Ako referenčný gén pre výpočet relatívnej expresie jednotlivých génov bol vybraný gén *GAD* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza). Ide o prevádzkový gén, ktorého produkt je dôležitým enzýmom v metabolizme uhl'ohydrátov. Relatívna expresia jednotlivých génov v jednotlivých vzorkách bola vyjadrená vzťahom:

$$\frac{\text{optická hustota prúžku daného génu u vzorky } P}{\text{optická hustota prúžku } GAD \text{ u vzorky } P}$$

P označuje analyzované vzorky P1 – P82, pričom pre každú vzorku boli jednotlivo vypočítané hodnoty relatívnej expresie pre *SHB*, *VCL* a *OCT3*.

4.5 Štatistické metódy vyhodnocovania výsledkov

K štatistickému vyhodnoteniu meraní bol použitý program STATISTICA (verzia 8.0, StatSoft, Inc., Oklahoma).

1. V každom skúmanom výbere (hodnoty relatívnej expresie jednotlivých génov, hodnoty PSA) boli vylúčené tzv. extrémne hodnoty, teda hodnoty vzdialené od priemeru, ktoré mohli vzniknúť náhodnou chybou.
2. U takto vybraného súboru dát bolo overené normálne rozloženie a to výpočtom šikmosti a špicatosti. Bolo vypočítané, ktoré dáta ležia v medziach blízkyh nule a sú dostatočne malé, aby mohli byť považované za nulovo šikmé a nulovo špicaté. Teda také, aby boli v rámci rozloženia Gausovej krivky.
3. V prípade, že dáta boli v normálnom rozložení bol použitý nepárový t-test. Hladina významnosti bola určená ako $\alpha = 0,05 = 5\%$ a bola vypočítaná hodnota pravdepodobnosti p, ktorá určuje medznú hladinu významnosti, teda udáva najnižšiu možnú hladinu významnosti, pri ktorej ešte môžeme zamietnuť nulovú hypotézu. Hodnota p bola porovnaná s hladinou významnosti α , pričom platí:
Ak $p \leq \alpha \rightarrow$ nulová hypotéza bola zamietnutá
Ak $p > \alpha \rightarrow$ nulová hypotéza bola prijatá
4. Následne boli hodnoty rozdelené na kontrolné vzorky, kde patrili vzorky diagnostikované ako BPH, a na vzorky karcinómu prostaty. Pre jednotlivé gény boli vypočítané priemery hodnôt relatívnej expresie pre vzorky karcinómu a pre vzorky BPH. Pre zistenie, či sa hodnoty relatívnej expresie vo vzorkách karcinómu a v kontrolných vzorkách BPH líšia, bola formulovaná nulová hypotéza H_0 a alternatívna hypotéza H_1 :
 H_0 : Medzi relatívnou expresiou génu u pacientov s karcinómom a u pacientov s BPH nie je štatisticky významný rozdiel
 H_1 : Medzi relatívnou expresiou génu u pacientov s karcinómom a u pacientov s BPH je štatisticky významný rozdiel

5. Boli porovnané hodnoty relatívnej expresie jednotlivých génov v rôznych klinických štádiách karcinómu podľa klasifikácie TNM. Pre každý gén bola použitá jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA. Vzorky boli rozdelené do súborov podľa klinického štádia a relatívne expresie génov porovnané medzi sebou. Boli formulované hypotézy:

H_0 : Priemerná relatívna expresia daného génu sa medzi jednotlivými štádiami T štatisticky významne nelíši

H_1 : Priemerná relatívna expresia daného génu sa medzi jednotlivými štádiami T štatisticky významne líši

Levenovým testom bola zisťovaná zhodnosť rozptylov. V prípade, že nebol medzi hodnotami jednotlivých štádií rovnaký rozptyl, bola ANOVA nahradená neparametrickou metódou – Kruskal-Wallisovým testom. Tento test sa využíva v prípade, že máme viac než 2 testované výbery dát, ktoré nie sú na sebe závislé.

Hladina významnosti bola určená ako $\alpha = 0,05 = 5\%$ a bola vypočítaná hodnota p a porovnaná s hladinou významnosti.

6. Nasledovalo porovnanie hodnôt relatívnych expresií u daných génov s jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre. Pri tomto porovnaní bola použitá ANOVA. Boli formulované hypotézy:

H_0 : Priemerná relatívna expresia daného génu sa medzi jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre štatisticky významne nelíši.

H_1 : Priemerná relatívna expresia daného génu sa medzi jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre štatisticky významne líši.

V prípade, že bola zamietnutá nulová hypotéza, bol použitý LSD test. Tento test určil, medzi ktorými konkrétnymi hodnotami Gleasonovho skóre sa hodnoty relatívnej expresie štatisticky významne líšia.

Hladina významnosti bola určená ako $\alpha = 0,05 = 5\%$ a bola vypočítaná hodnota p a porovnaná s hladinou významnosti.

7. Poslednou analýzou bolo určenie lineárneho vzťahu medzi relatívnou expresiou daného génu a sérovou hladinou PSA a ďalej medzi relatívnou expresiou daného génu a veku pacienta. Metódou bolo určenie Pearsonovho korelačného koeficientu (r) a významnosti lineárnej korelácie podľa hladiny významnosti $\alpha = 0,05 = 5\%$. Pearsonov korelačný koeficient meria silu štatistickej závislosti medzi dvoma kvantitatívnymi premennými. Kladná hodnota znamená, že obe premenné zároveň rastú alebo klesajú. Záporná hodnota znamená, že jedna premenná klesá a druhá stúpa, alebo opačne. Absolútna hodnota je interpretovaná nasledovne:

0,1 – 0,3 korelácia slabá

0,4 – 0,6 korelácia stredná

0,7 – 0,8 korelácia silná

nad 0,9 korelácia veľmi silná

5 Výsledky

V rámci súborov skúmaných dát: relatívna expresia jednotlivých génov a sérova hladina PSA, nebola nájdená žiadna odľahlá hodnota. Následne sa výpočtom šikmosti a špicatosti potvrdilo normálne rozloženie dát. Dáta boli následne podrobené ďalším analýzám.

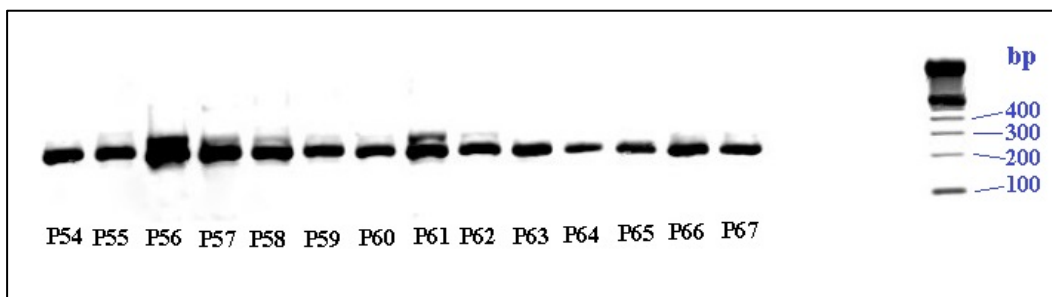
5.1 Gén *VCL*

5.1.3 Relatívna expresia génu *VCL* v nádorovom a hyperplázickom tkanive

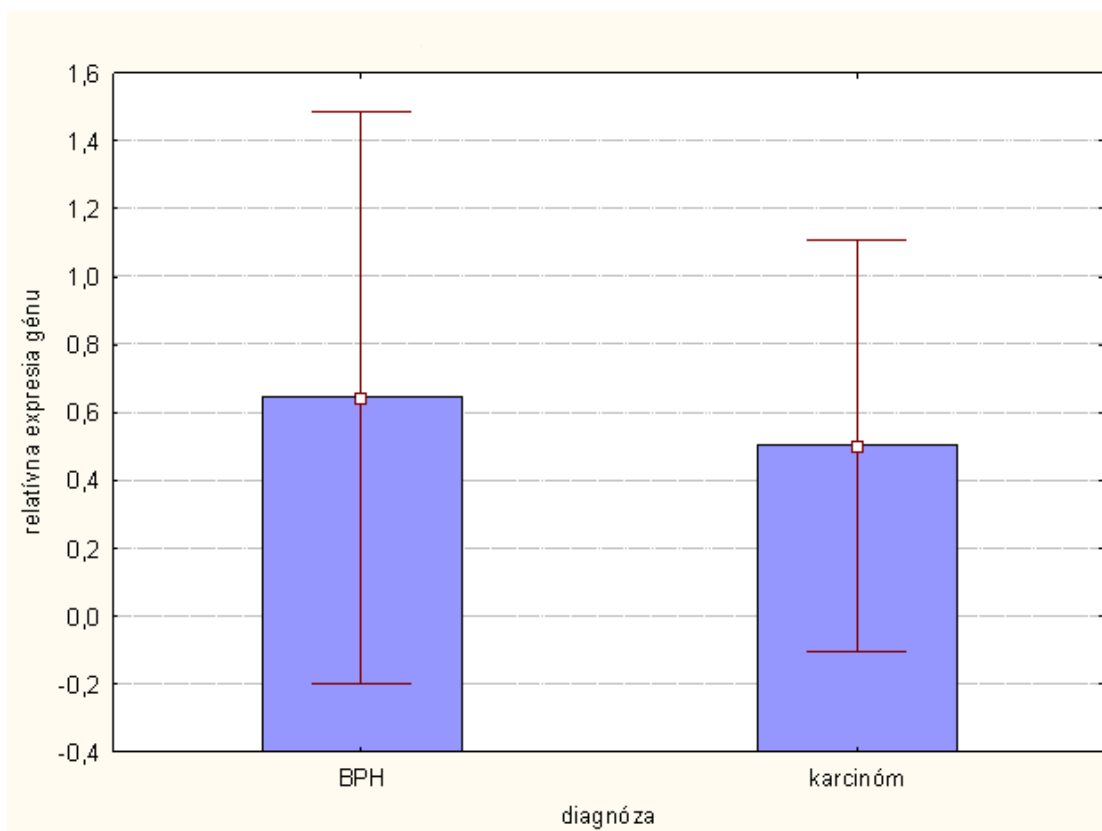
Expresia bola stanovená pomocou RT-PCR. Jej hodnota bola priemerom troch meraní a bola následne porovnávaná s mierou relatívnej expresie génu *GAD*. Po vylúčení extrémnych hodnôt bolo do výpočtov zaradených 21 vzoriek BPH a 60 vzoriek karcinómu prostaty. Priemerná hodnota relatívnej expresie u karcinómu prostaty bola $\bar{x} = 0,503 \pm 0,303$, u kontrolných vzoriek $\bar{x} = 0,643 \pm 0,422$. Keďže hodnota $p = 0,105$ bola vyššia ako hladina významnosti α , bola vylúčená alternatívna hypotéza v prospech nulovej hypotézy, teda hodnota relatívnej expresie *VCL* u karcinómu prostaty nebola významne odlišná od kontrolných vzoriek. Hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 15 a znázornenie v grafe č. 3. Vizualizácia expresie génu je na obr. č. 7.

	priemerná hodnota u BPH	priemerná hodnota u karcinómu	štandardná odchýlka u BPH	štandardná odchýlka u karcinómu	počet vzoriek BPH	počet vzoriek karcinómu	hladina p
relatívna expresia génu <i>VCL</i>	0,643	0,503	0,422	0,303	21	60	0,105

Tabuľka č. 15: Hodnoty relatívnej expresie u *VCL*



Obr. č. 7: Vizualizácia expresie génu *VCL* v 2% agarózovom géle (pod jednotlivými prúžkami je kód analyzovanej vzorky)



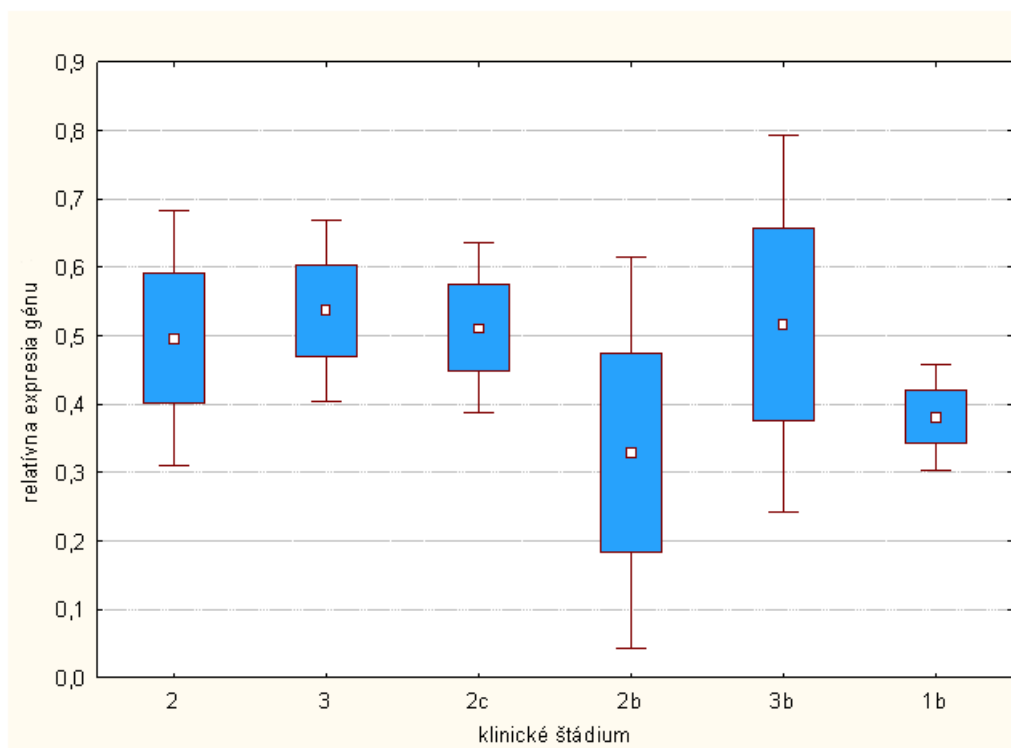
Graf č. 3: Porovnanie relatívnej expresie génu *VCL* u karcinómu a BPH

5.1.4 Porovnanie relatívnej expresie *VCL* v rôznych štádiách karcinómu

Boli porovnané hodnoty relatívnej expresie *VCL* v rámci jednotlivých štádií karcinómu podľa klasifikácie TNM. 60 vzoriek karcinómu bolo rozdelených do príslušných klinických štádií a vzájomne porovnaných. Hodnota $p = 0,916$, čiže vyššia než $0,05$. U génu *VCL* teda nebol zistený významný rozdiel medzi jednotlivými klinickými štádiami karcinómu prostaty. Bola teda opäť zamietnutá alternatívna hypotéza v prospech nulovej hypotézy. Hodnoty relatívnej expresie sú uvedené v tabuľke č. 16. a znázornené v grafe č. 4.

štádium T	relatívna expresia génu <i>VCL</i>	počet vzoriek daného štádia	štandardná odchýlka u <i>VCL</i>
2	0,497	12	0,328
3	0,537	16	0,270
2c	0,512	17	0,262
2b	0,329	3	0,253
3b	0,517	10	0,444
1b	0,382	2	0,056

Tabuľka č. 16: Hodnoty relatívnej expresie v rôznych štádiách karcinómu



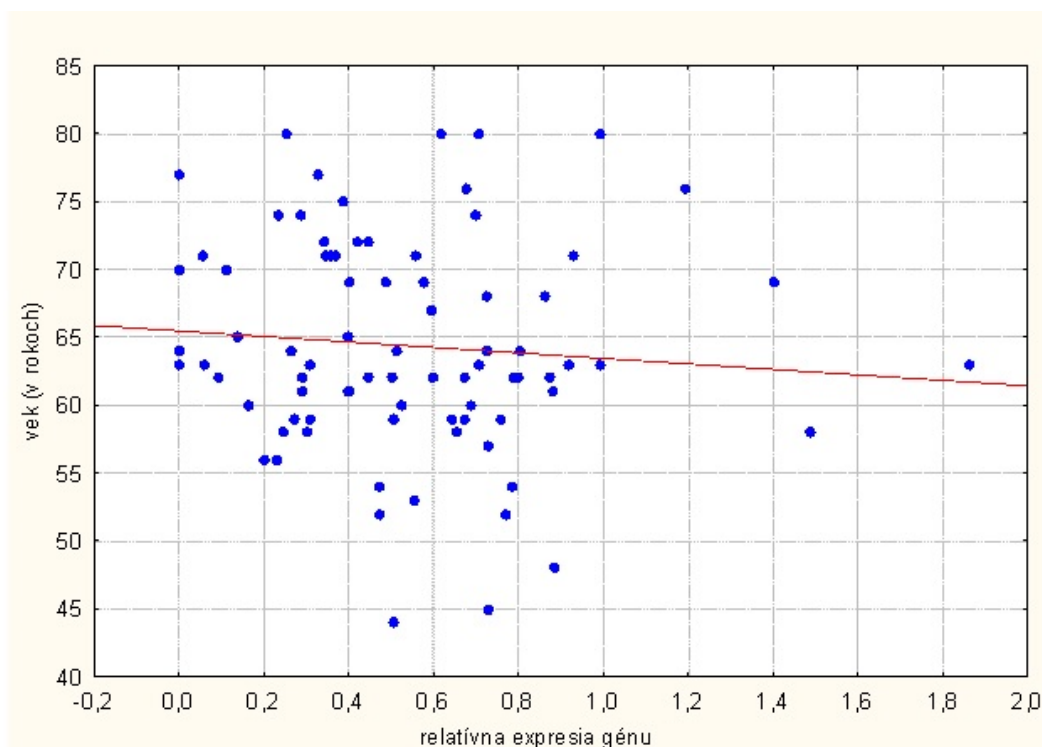
Graf č. 4: Porovnanie relatívnej expresie génu *VCL* v rámci klinických štádií

5.1.5 Korelácia relatívnej expresie génu *VCL* s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA

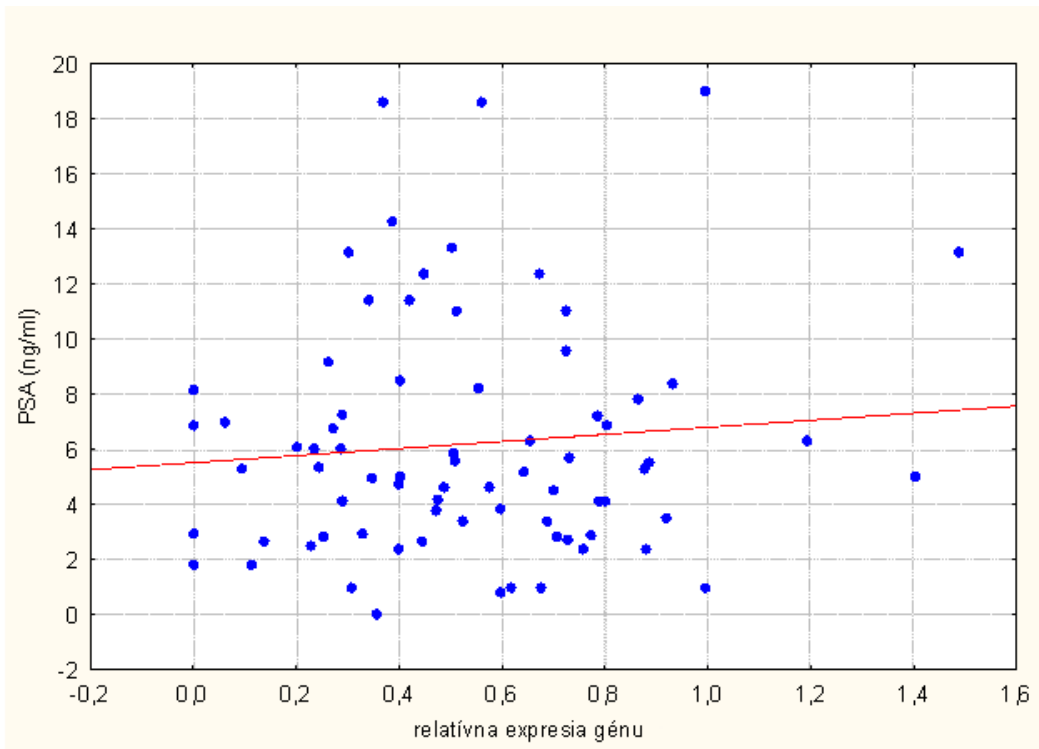
Relatívna expresia bola porovnaná s údajmi o veku, kde nebola zistená významná korelácia ($p = 0,438 > 0,05$). Graf č. 5 znázorňuje koreláciu medzi relatívnou expresiou *VCL* a vekom. Rovnako v prípade korelácie s hladinou PSA nebola zistená štatisticky významná spojitosť ($p = 0,426 > 0,05$). Korelácia je znázornená v grafe č. 6. Pri porovnaní hodnôt relatívnej expresie s Gleasonovým skóre nebol zistený štatisticky významný rozdiel, nakoľko hodnota $p = 0,335$ bola vyššia než 0,05. Porovnanie je znázornené v grafe č. 7, hodnoty sú v tabuľke č. 17.

Gleasonovo skóre	relatívna expresia génu <i>VCL</i>	počet vzoriek daného štádia	štandardná odchýlka u <i>VCL</i>
6	0,505	30	0,275
7	0,515	20	0,273
8	0,206	3	0,180
9	0,587	7	0,489

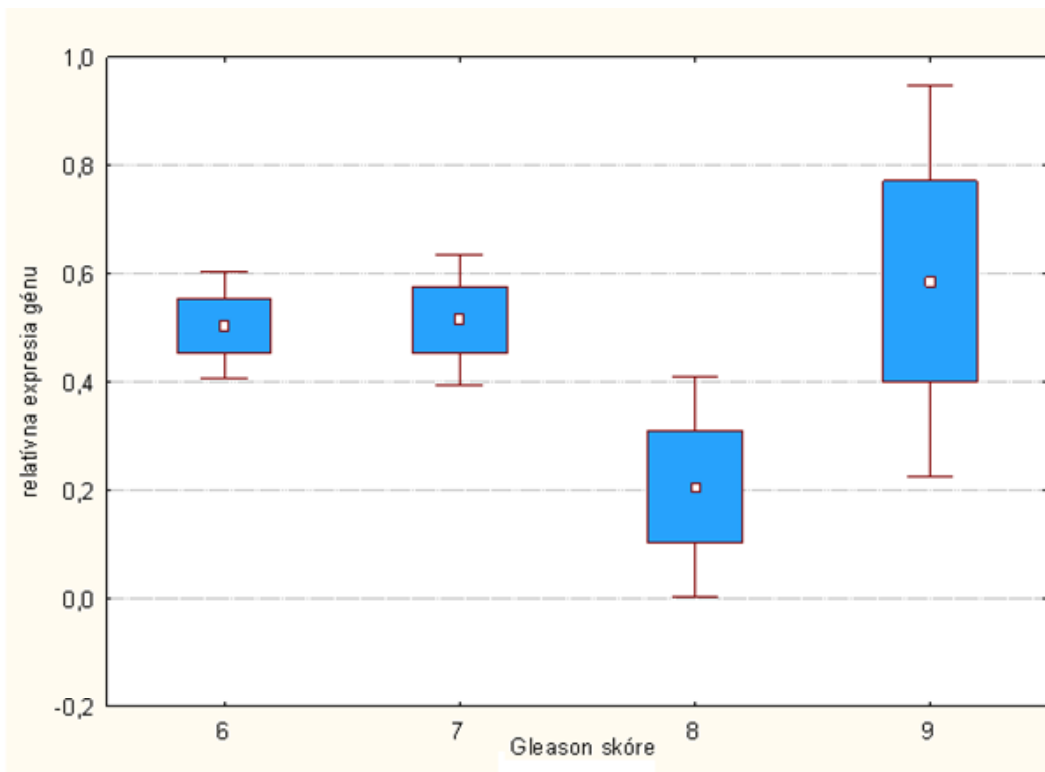
Tabuľka č. 17: Hodnoty relatívnej expresie voči Gleason skóre



Graf č. 5: Korelácia medzi vekom pacientov a relatívnou expresiou génu *VCL* ($r = -0,087$)



Graf č. 6: Korelácia medzi hladinou PSA a relatívnou expresiou génu *VCL* ($r = 0,093$)



Graf č. 7: Porovnanie relatívnej expresie génu *VCL* medzi jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre

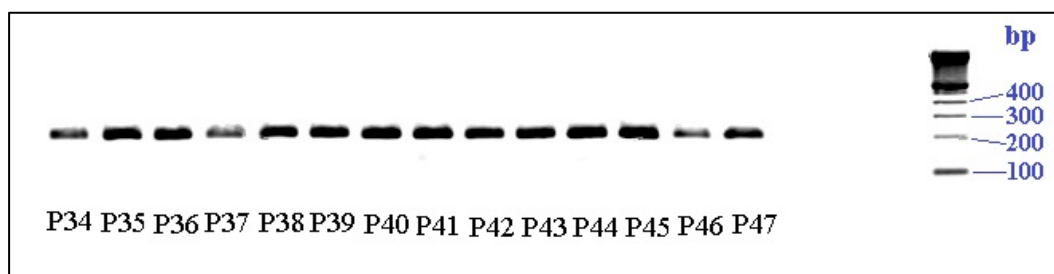
5.2 Gén *SHB*

5.2.3 Relatívna expresia génu *SHB* v nádorovom a hyperplázickom tkanive

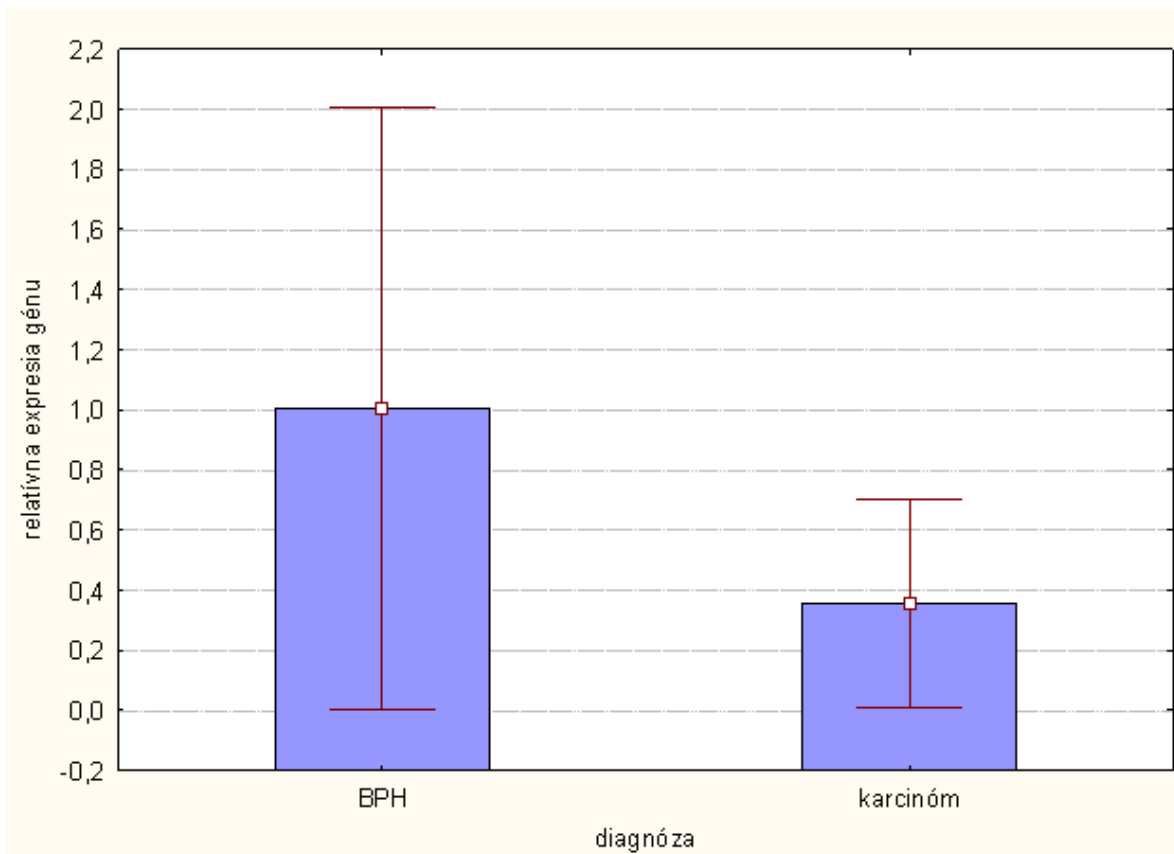
Expresia bola stanovená ako priemer troch meraní a porovnaná s hodnotami *GAD*. Do výpočtov bolo zaradených 59 vzoriek karcinómu a 22 kontrolných vzoriek. V prípade génu *SHB* bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi expresiou u karcinómov a expresiou u BPH, kedy relatívna expresia bola výrazne nižšia u karcinómu prostaty. Hodnota $p = 0,0 < 0,05$, nulová hypotéza bola zamietnutá. Priemerná hodnota relatívnej expresie u BPH bola $\bar{x} = 1,004$ zatiaľčo u karcinómu $\bar{x} = 0,355$. Hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 18, grafické znázornenie je v grafe č. 8. Vizualizácia expresie génu je na obr. č. 8.

	priemerná hodnota u BPH	priemerná hodnota u karcinómu	štandardná odchýlka u BPH	štandardná odchýlka u karcinómu	počet vzoriek BPH	počet vzoriek karcinómu	hladina p
relatívna expresia génu <i>SHB</i>	1,004	0,355	0,500	0,173	22	59	0,000

Tabuľka č. 18: Porovnanie relatívnej expresie u karcinómu a BPH



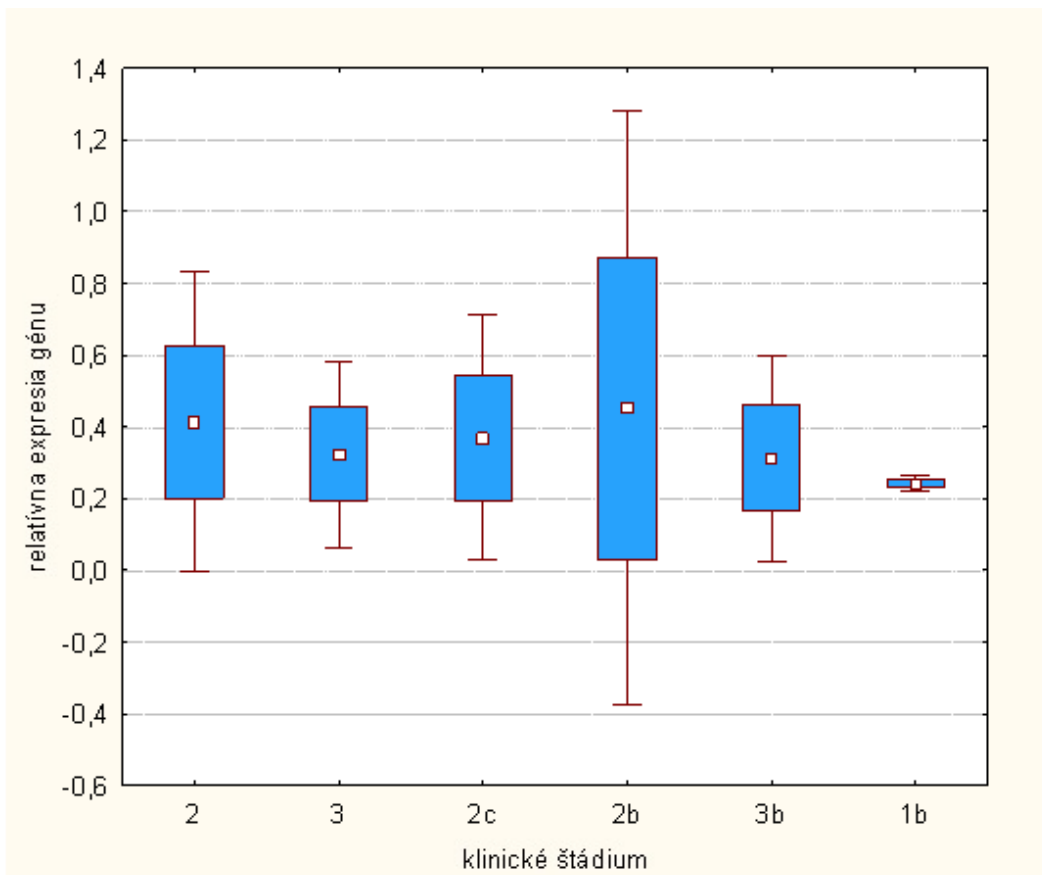
Obr. č. 8: Vizualizácia expresie génu *SHB* v agarózovom géle (pod jednotlivými prúžkami je kód analyzovanej vzorky)



Graf č. 8: Porovnanie relatívnej expresie génu *SHB* u karcinómu a BPH

5.2.4 Porovnanie relatívnej expresie *SHB* v rôznych štádiách karcinómu

59 vzoriek karcinómu bolo rozdelených podľa klinického štádia TNM klasifikácie a vzájomne porovnaných. Nulová hypotéza nebola zamietnutá, nenašiel sa štatisticky významný rozdiel v hodnote relatívnej expresie v rámci jednotlivých klinických štádií. Hodnota $p = 0,581 > 0,05$, teda bola potvrdená nulová hypotéza. V týchto výpočtoch bol aplikovaný Kruskal-Wallisov test, nakoľko rozptyly medzi jednotlivými štádiami neboli rovnaké. Výsledky znázorňuje graf č. 9.



Graf č. 9: Porovnanie relatívnej expresie génu *SHB* v rámci klinických štádií

5.2.5 Korelácia relatívnej expresie génu *SHB* s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA

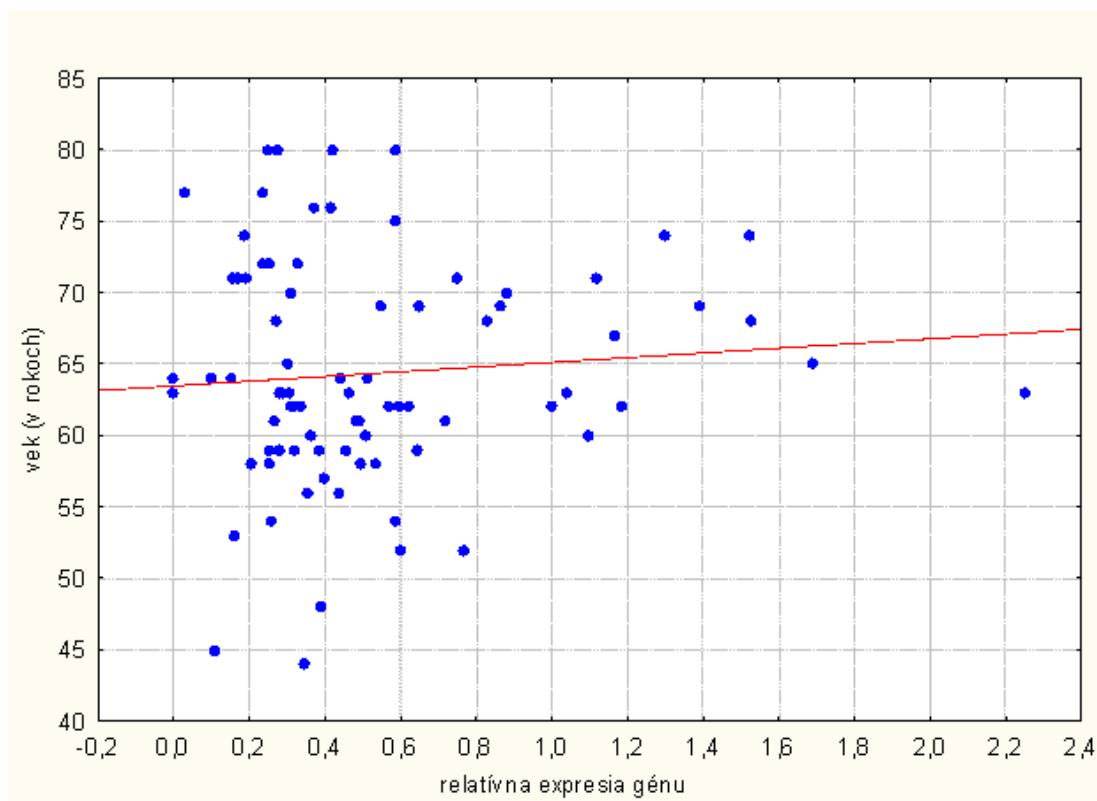
Pri zisťovaní lineárneho vzťahu medzi relatívnou expresiou génu a vekom, nebola nájdená významná korelácia ($p = 0,447 > 0,05$). Rovnako nebola zistená významná korelácia medzi relatívnou expresiou a hladinou PSA ($p = 0,093 > 0,05$). Korelácie sú znázornené v grafoch č. 10 a č. 11.

Pri porovnaní relatívnej expresie génu *SHB* s Gleasonovým skóre, bol zistený významný rozdiel, teda bola zamietnutá nulová hypotéza v prospech alternatívnej. Hodnota $p = 0,007 < 0,05$. Následne bol použitý LSD test, ktorý určil, medzi ktorými hodnotami Gleasonovho skóre je

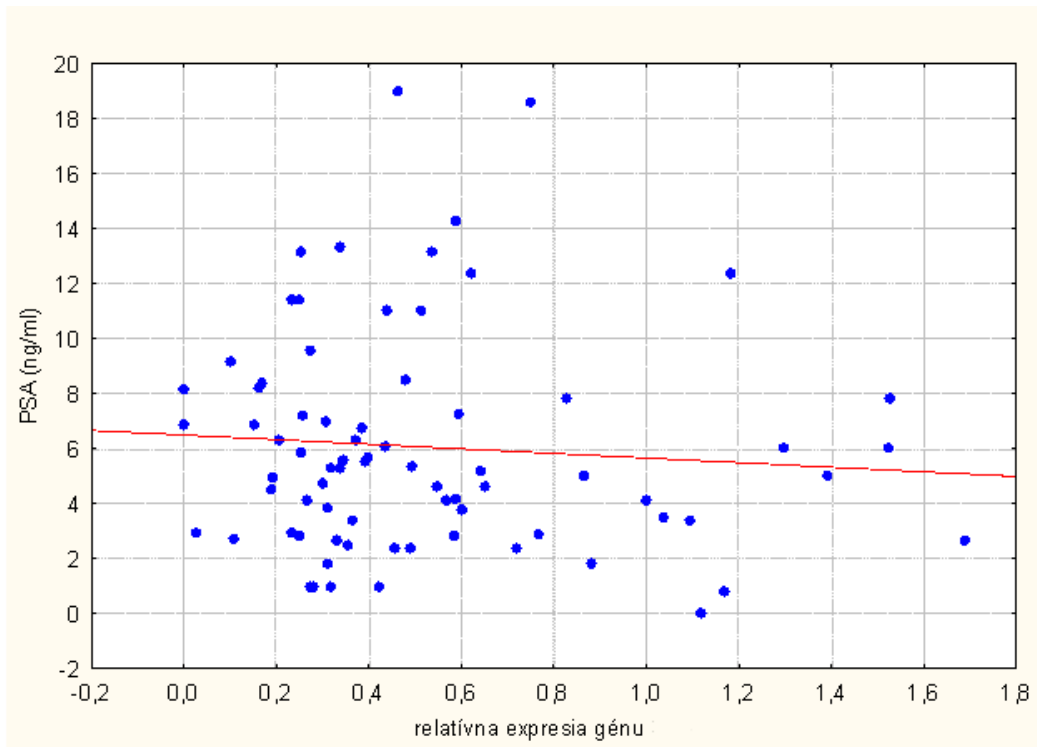
významný rozdiel. To bolo zistené medzi hodnotami skóre 6 a 7, 7 a 8 a medzi skóre 7 a 9. Hodnoty sú znázornené v tabuľke č. 19 a v grafe č. 12.

Gleasonovo skóre	relatívna expresia génu <i>SHB</i>	počet vzoriek daného štádia	štandardná odchýlka u <i>SHB</i>
6	0,330	30	0,159
7	0,452	19	0,172
8	0,175	3	0,129
9	0,272	7	0,131

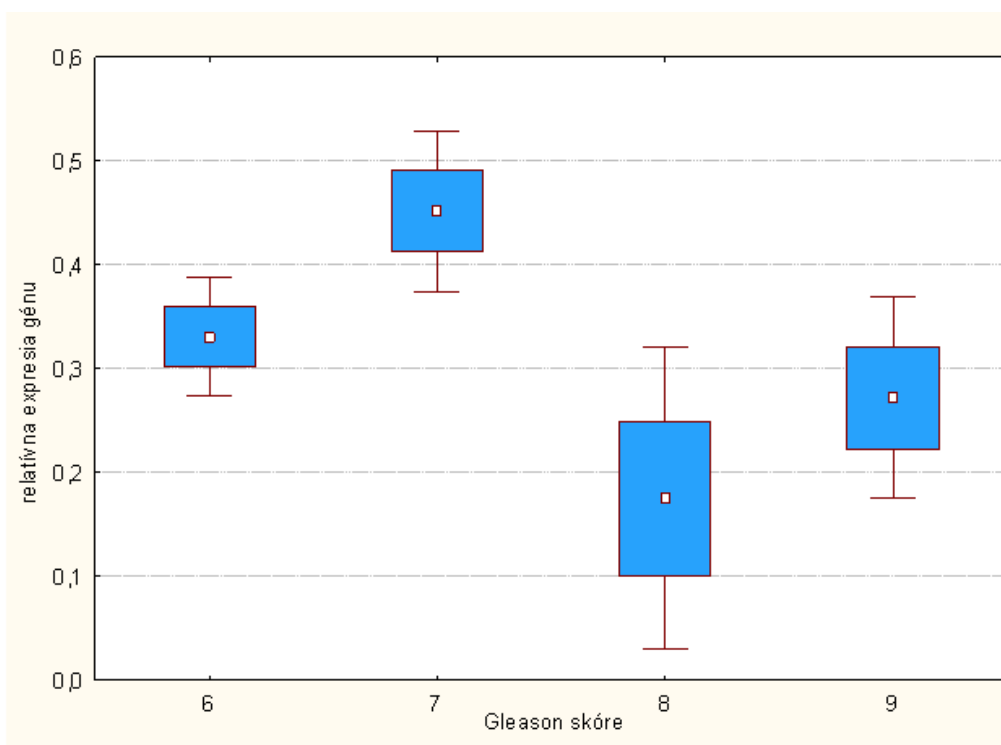
Tabuľka č. 19: Hodnoty relatívnej expresie *SHB* voči Gleasonovmu skóre



Graf č. 10: Korelácia medzi vekom pacientov a relatívnou expresiou génu *SHB* ($r = 0,087$)



Graf č. 11: Korelácia medzi hladinou PSA a relatívnou expresiou génu *SHB* ($r = 0,093$)



Graf č. 12: Porovnanie relatívnej expresie génu *SHB* medzi jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre

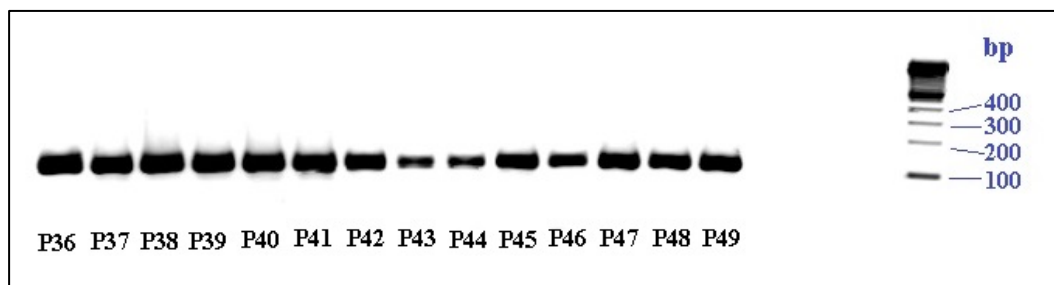
5.3 Gén *OCT3*

5.3.3 Relatívna expresia génu *OCT3* v nádorovom a hyperplázickom tkanive

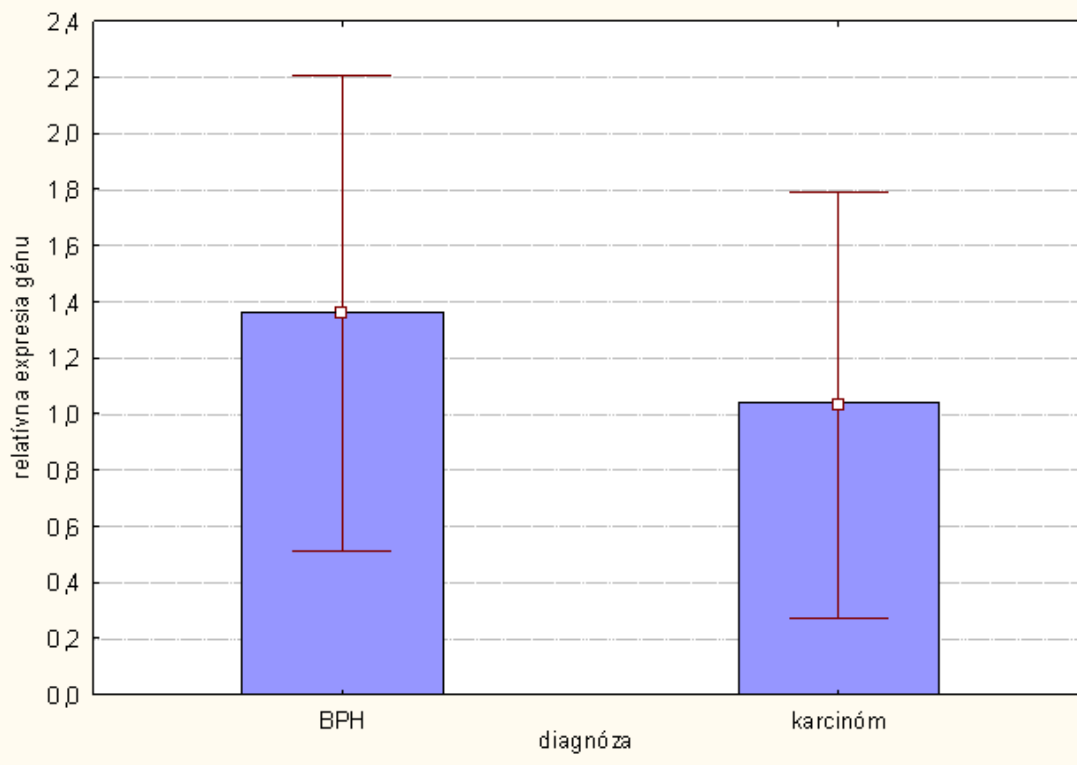
Do porovnania relatívnej expresie génu *OCT3* bolo zahrnutých 58 vzoriek karcinómu a 18 kontrolných vzoriek BPH. Bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi týmito dvoma skupinami, pričom u karcinómu bola detekovaná nižšia miera expresie. Hodnota relatívnej expresie u vzoriek karcinómu bola $\bar{x} = 1,032$ zatiaľčo u BPH $\bar{x} = 1,359$. Hodnota $p = 0,002 < 0,05$, nulová hypotéza bola zamietnutá. Výsledné hodnoty sú v tabuľke č.20, grafické znázornenie je v grafe č. 13. Vizualizácia expresie génu je na obr. č. 9.

	priemerná hodnota u BPH	priemerná hodnota u karcinómu	štandardná odchýlka u BPH	štandardná odchýlka u karcinómu	počet vzoriek BPH	počet vzoriek karcinómu	hladina p
relatívna expresia génu <i>OCT3</i>	1,359	1,032	0,424	0,380	18	58	0,002

Tabuľka č. 20: Porovnanie relatívnej expresie u karcinómu a *OCT3*



Obr. č. 9: Vizualizácia expresie génu *OCT3* v agarózovom géle (pod jednotlivými prúžkami je kód analyzovanej vzorky)



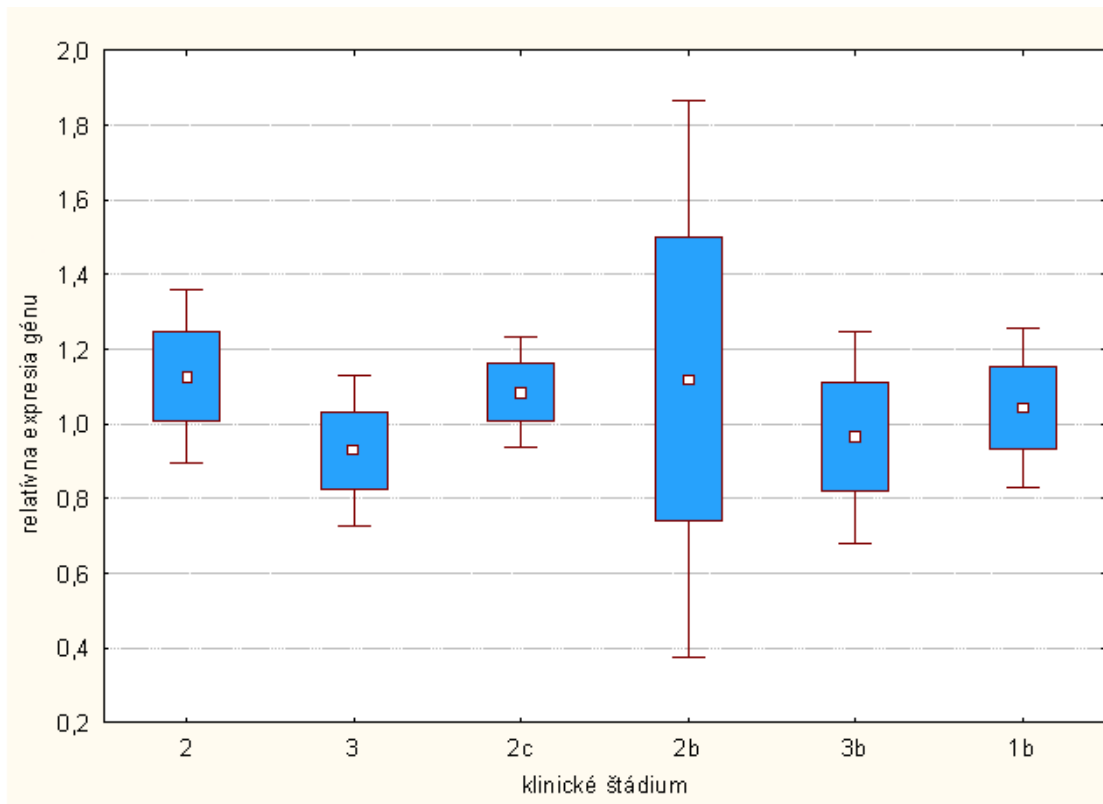
Graf č. 13: Porovnanie relatívnej expresie génu *OCT3* u karcinómu a BPH

5.3.4 Porovnanie relatívnej expresie *OCT3* v rôznych štádiách karcinómu

Do tejto analýzy boli zahrnuté hodnoty 58 vzoriek karcinómu. Pri porovnávaní hodnôt relatívnej expresie v rámci jednotlivých klinických štádií nebol zistený štatisticky významný rozdiel. Bola prijatá nulová hypotéza, hodnota $p = 0,730 > 0,05$. Hodnoty sú v tabuľke č. 21. a grafické znázornenie v grafe č. 14.

štádium T	relatívna expresia génu <i>OCT3</i>	počet vzoriek daného štádia	štandardná odchýlka u <i>OCT3</i>
2	1,127	12	0,413
3	0,929	15	0,398
2c	1,085	17	0,313
2b	1,120	2	0,537
3b	0,964	10	0,458
1b	1,044	2	0,153

Tabuľka č. 21: Hodnoty relatívnej expresie u rôznych štádií karcinómu



Graf č. 14: Porovnanie relatívnej expresie génu *OCT3* v rámci klinických štádií

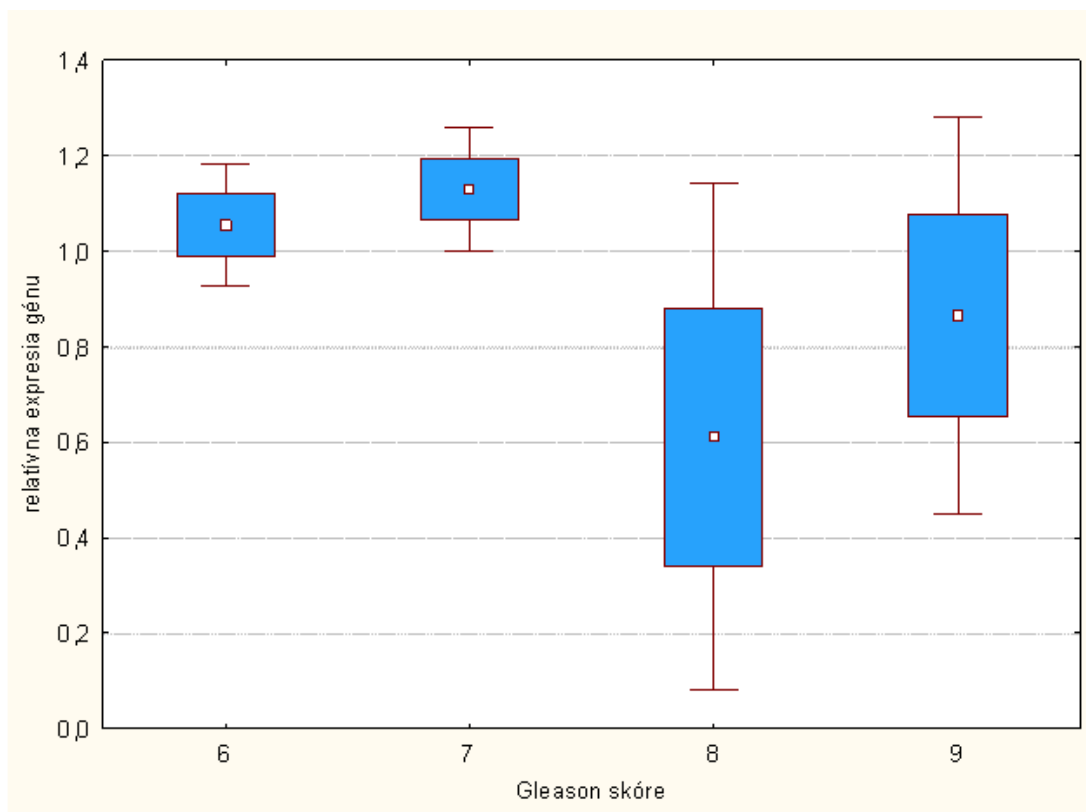
5.3.5 Korelácia relatívnej expresie génu *OCT3* s vekom, Gleasonovým skóre a hladinou PSA

Pri posudzovaní hodnôt relatívnej expresie voči Gleasonovmu skóre nebol zistený štatisticky významný rozdiel. Bola zamietnutá alternatívna hypotéza v prospech nulovej. Hodnota $p = 0,093 > 0,05$. Jednotlivé hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 22 a znázornené v grafe č. 15.

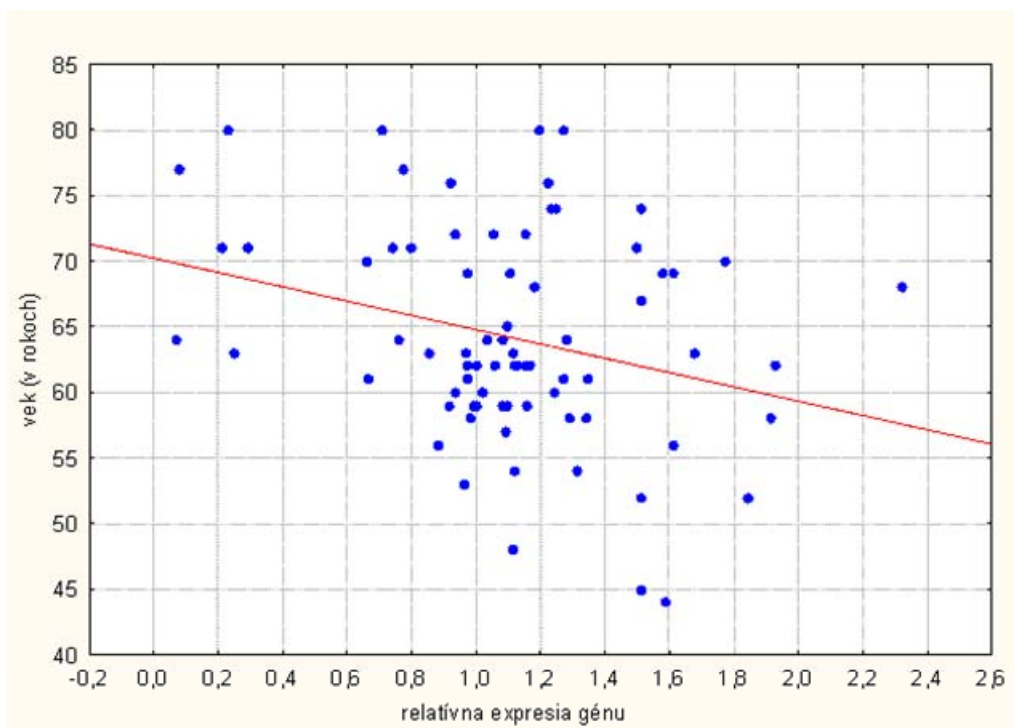
Pri tomto géne bola zistená štatisticky významná lineárna korelácia s vekom, kedy so stúpajúcim vekom klesala hodnota relatívnej expresie *OCT3*. Hodnota $p = 0,014 < 0,05$. Hodnota $r = -0,280$, išlo teda o slabú koreláciu. Lineárna korelácia je znázornená v grafe č. 16. Naopak, štatisticky významná korelácia nebola zistená medzi relatívnou expresiou génu *OCT3* a hladinou PSA, kde hodnota $p = 0,524 > 0,05$. Znázornenie je v grafe č. 17.

Gleasonovo skóre	relatívna expresia génu <i>OCT 3/4</i>	počet vzoriek daného štádia	štandardná odchýlka u <i>OCT 3/4</i>
6	1,055	30	0,356
7	1,130	18	0,278
8	0,612	3	0,469
9	0,865	7	0,563

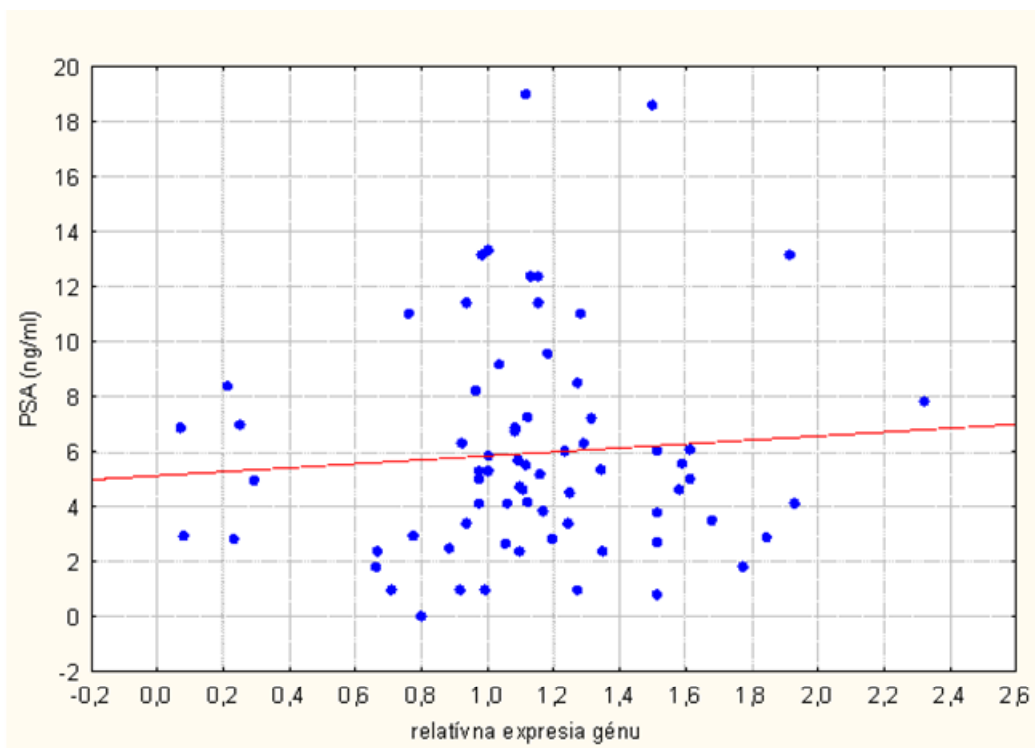
Tabuľka č. 22: Hodnoty relatívnej expresie *OCT3* voči Gleasonovmu skóre



Graf č. 15: Korelácia relatívnej expresie génu *OCT3* medzi jednotlivými hodnotami Gleasonovho skóre



Graf č. 16: Závislosť medzi vekom pacientov a relatívnou expresiou génu *OCT3* ($r = -0,281$)



Graf č. 17: Závislosť medzi hladinou PSA a relatívnou expresiou génu *OCT3* ($r = 0,077$)

6 Diskusia

Príčiny vzniku karcinómu prostaty sú stále nejasné a tak nie je možné zvoliť dostatočnú a správnu prevenciu tohto ochorenia. Jedinou možnosťou je skoré zachytenie vznikajúceho ochorenia, kedy je úspešnosť liečby vysoká. V súčasnosti je veľká pozornosť venovaná štúdiám nádorových markerov. Ide predovšetkým o analýzy expresie génov, ktoré sú zapojené do procesov vzniku a rozvoja karcinómu prostaty. Práve zmeny regulácie expresie génov a ich molekulárnych dráh sú podstatou vzniku a proliferácie nádorových buniek.

Analyzovanými génmi v tejto diplomovej práci boli vybrané tri gény: *VCL*, *SHB*, *OCT3*. Výběr génov bol inšpirovaný výzkumnými projektami Urologickej kliniky 2. LF UK. Ide o gény, ktoré sa navzájom líšia funkciou a ich zmenenú expresiu je možné detekovať u rôznych typov nádorových tkanív. Z 82 vzoriek prostatického tkaniva bola izolovaná mRNA, ktorá bola následne prevedená do cDNA prostredníctvom RT-PCR. Na analýzy bola použitá relatívne dobre purifikovaná mRNA, nie celková RNA (viď. kapitola Metódy, s. X). Stanovená relatívna expresia génov u každej vzorky bola relativizovaná na expresiu referenčného génu *GAD*.

Vinkulín je proteín cytoskeletu. Je dôležitou súčasťou bunkových spojení a to konkrétne fokálnych bunkových adhézií a medzibunkových spojení (Mierke *et al.*, 2009). Zvýšená expresia tohto génu bola detekovaná v prostatických nádorových bunkách línie PC3, v ktorých bola zistená zvýšená schopnosť migrácie (Desai *et al.*, 2008). Zvýšená expresia *VCL* bola zistená vo vzorkách tkaniva karcinómu prostaty, pričom v porovnaní so vzorkami BPH bola expresia vyššia vo vzorkách karcinómu. Ďalej bola zistené, že pokročilé štádium karcinómu bolo asociované s vyššou expresiou vinkulínu (Ruiz *et al.*, 2011). Expresia *VCL* bola detekovaná aj v prípade bunkových nádorových línií karcinómu prostaty: PC3, LNCaP, P4E6. Tieto bunky mali zvýšenú schopnosť migrácie oproti bunkám zdravého prostatického tkaniva (Lang *et al.*, 2002). Naopak supresia *VCL* bola detekovaná aj u nádorových línií karcinómu prostaty: LNCaP a VCaP. Ide o línie s vysokou schopnosťou zakladania metastáz.

V našej štúdií nebol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel v expresii *VCL* medzi vzorkami BPH a karcinómu prostaty. Expresia *VCL* bola nepatrne zvýšená u vzoriek BPH. Rovnako nebol zaznamenaný významný rozdiel v rámci jednotlivých klinických štádií. Ani v prípade korelácií s vekom a hodnotou PSA nebola nájdená štatisticky významná závislosť. Možným vysvetlením je použitie mRNA, ktorá bola izolovaná z tkaniva intaktných solídnych nádorov

prostaty nie z bunkových línií. V bunkových líniách je totiž vyššia pravdepodobnosť prítomnosti nádorových buniek. Tkanivo solídnych nádorov nie je tvorené len nádorovými líniami.

Štúdií, ktoré priamo analyzujú expresiu *VCL* u karcinómu prostaty je málo a ich výsledky nie sú jednoznačné. Jeho zvýšená expresia môže súvisieť s tvorbou podozomov a invadopódií, ktoré sú nevyhnutné pre migráciu, a teda aj metastázovanie nádorových buniek (Desai *et al.*, 2008). Jeho znížená expresia môže súvisieť s epiteliálno-mezenchymálnou transformáciou. Ide o proces, kedy epiteliálne bunky strácajú schopnosť bunkovej adhézie. Bunkové a medzibunkové spoje zanikajú a bunky získavajú schopnosť pohybu, stávajú sa z nich mezenchymálne bunky. Dochádza teda k zníženiu expresie proteínov cytoskeletu, vrátane vinkulínu (Rei Chng *et al.*, 2012).

Funkcia *VCL* ako možného diagnostického markera je nejasná. Budú potrebné ďalšie analýzy pre lepšie pochopenie funkcie *VCL* pri vzniku a progresii karcinómu prostaty.

Gén *SHB* je súčasťou vnútrobunkových signálnych dráh pri rôznorodých procesov v bunke akými sú: proliferácia, diferenciácia, bunková motilita a apoptóza (Welsh *et al.*, 1998, Anneren *et al.*, 2003). Zmena v jeho expresii bola zaznamenaná u niekoľkých typov nádorových ochorení vrátane karcinómu prostaty. Knockout génu *SHB* v bunkách pľúcneho karcinómu a fibrosarkómu viedol k potlačeniu rastu nádorov. Taktiež boli pozorované abnormálne štruktúry buniek endotelu (Funa *et al.*, 2009). V prípade karcinómu prostaty, bola expresia *SHB* analyzovaná v bunkovej nádorovej línii PC3, kde zvýšená miera expresie súvisela so zníženou mierou rastu nádorových buniek (Davoodpour *et al.*, 2007). Analýza expresie *SHB* u vzoriek prostatického tkaniva popisuje štúdia, kde u karcinómu prostaty bola zistená nižšia expresia *SHB* v porovnaní so vzorkami BPH. Zároveň bola zaznamenaná nižšia expresia *SHB* u pokročilejších foriem karcinómu, ktorá nebola štatisticky významná (Schmidt *et al.*, 2012). V našej štúdií bola potvrdená štatisticky významne nižšia expresia *SHB* u karcinómu v porovnaní s BPH. Pri porovnaní jednotlivých klinických štádií však nebol nájdený významný rozdiel v expresii *SHB*. Detekovali sme súvislosť s relatívnou expresiou génu a hodnotou Gleasonovho skóre. Spomedzi vzoriek ohodnotených Gleasonovým skóre 6 – 9 bola vyššia expresia *SHB* u vzoriek s hodnotou 7 a nižšia hodnota 8 a 9. Rozdiel bol štatisticky významný. Vysvetlenie pozorovaného poklesu expresie v nádoroch s hodnotami Gleasonovho skóre 8 a 9 je obtiažne a pravdepodobne odráža zvýšenú agresivitu menej diferencovaných buniek, ktoré majú hodnotu Gleasonovho skóre vyššiu. Objasnenie by mohli priniesť naväzujúce cytologické a histologické vyšetrenia. Naopak, nebola nájdená žiadna štatisticky významná korelácia s vekom a s hladinou PSA.

Gén *SHB* je jedným z regulátorov apoptózy a jeho znížená expresia je spojená s potlačením aktivácie proapoptotických dráh v bunkách, čo vedie k rastu nádorových buniek (Anneren *et al.*, 2003, Hagerkvist *et al.*, 2007). *SHB* sa ďalej podieľa na regulácii angiogenézy. Doména SH2 interaguje s receptormi FGFR-1 a VEGFR-2 a tým aktivuje príslušné rastové faktory (Holmquist, 2004). VEGFR-2 je receptorom VEGF-A, ktorý sa podieľa na regulácii angiogenézy. Pri úplnej inaktivácii *SHB* dochádza prostredníctvom angiogénnych inhibítorov k potlačeniu angiogenézy (Funa *et al.*, 2008). Tento fakt bol pozorovaný len v prípade knockoutu génu *SHB* u myši a nebolo možné ho v našej štúdií overiť.

Na základe dostupnej literatúry a uskutočnených analýz, je pravdepodobné, že znížená expresia *SHB* môže mať súvislosť s rozvojom karcinómu prostaty. Sú však nutné ďalšie štúdie na veľkých súboroch pacientov, ktoré by túto teóriu potvrdili.

OCT3 je gén, ktorý kóduje transportný proteín zodpovedný za príjem katiónov organických zlúčenín do bunky. Jeho expresia môže nepriamo ovplyvňovať molekulárne dráhy, ako napr. mTOR, ktoré sú často deregulované v prípade nádorových ochorení (Riedmaier *et al.*, 2013). Expresiou *OCT3* u karcinómu prostaty sa zaoberalo niekoľko štúdií. Analýza, ktorá sa zaoberala expresiou *OCT3* v nádorovej línii, zistila v prípade inaktivácie génu zníženú proliferáciu nádorových buniek (Grisanzio *et al.*, 2012). Naopak, analýzy u vzoriek karcinómov poukázali na zníženú expresiu *OCT3* v súvislosti s pokročilým štádiom ochorenia a vyššími hodnotami Gleason skóre (Tomlins *et al.*, 2007). V ďalšej štúdií bola zistená vyššia úroveň metylácie *OCT3* v 62 % nádorov prostaty v porovnaní so zdravým tkanivom. V agresívnych nádorov bola jeho expresia znížená (Chen *et al.*, 2012). V našej štúdií bola detekovaná nižšia expresia *OCT3* u karcinómu prostaty v porovnaní s vzorkami BPH, čo potvrdzuje závery štúdie Tomlinsa *et al.* V rámci jednotlivých klinických štádií nebol zistený štatisticky významný rozdiel v expresii *OCT3* a rovnako tomu tak nebolo ani v prípade porovnania vzoriek s rôznymi hodnotami Gleasonovho skóre. U hodnôt Gleasonovho skóre 6 a 7 bol detekovaný len štatisticky nevýznamný nárast expresie v porovnaní s hodnotou 8. To mohlo byť spôsobené malým počtom vzoriek v analýzach. Súvislosť s hladinou PSA nebola štatisticky významná. Bola však zistená korelácia s vekom pacientov, kedy vo vyššom veku bola expresia *OCT3* nižšia. V dostupnej literatúre zatiaľ nebola potvrdená štatisticky významná korelácia expresie *OCT3* s vekom (Nies *et al.*, 2009). Pozitívna korelácia s vekom bola zistená u *OCT1* (Tzvetkov *et al.*, 2009), ktorý patrí spolu s *OCT3* do rovnakej skupiny transportných proteínov.

Štúdií, ktoré sa zaoberali karcinómom prostaty v súvislosti s expresiou *OCT3* je len málo a je ťažké posúdiť vhodnosť *OCT3* ako biomarkera. Sú potrebné ďalšie analýzy s dostatočne veľkým súborom dát, aby bol výsledok štatisticky významný. Keďže *OCT3* je transportným proteínom, zmena jeho expresie môže byť nápomocná pri určení vhodného liečebného postupu a určovaní citlivosti na farmakologické substancie.

Získané výsledky budú v spolupráci s MUDr. Markem Schmidtom z Urologickej kliniky 2. LF UK publikované v časopisoch *Urology* a *Neoplasma*.

7 Súhrn

Predkladaná práca sa zaoberá štúdiom zmien v relatívnej expresii troch vybraných génov u karcinómu prostaty. Tieto zmeny by mohli mať relevantný prognostický význam a zefektívniť tak liečbu karcinómu prostaty.

1. Bol zhromaždený súbor 82 vzoriek od pacientov s karcinómom prostaty alebo s benígnou prostatickou hyperpláziou spolu s klinickými údajmi.
2. V tohmtó súbore bola izolovaná mRNA.
3. Po optimalizácii jednotlivých krokov RT-PCR bola stanovená expresia génov: *VCL*, *SHB* a *OCT3* v každej vzorke.
4. Ich relatívna expresia bola porovnávaná s klinickými charakteristikami karcinómu prostaty za účelom nájdenia korelácií.
5. Po nájdení korelácií bol gén *SHB* vyhodnotený ako potenciálny marker pre diagnostiku ochorenia.

8 Zoznam použitej literatúry

1. Ahmadimoghaddam, D., Hofman, J., Zemankova, L., Nachtigal, P., Dolezelova, E., Cervený, L., Ceckova, M., Micuda, S., Staud, F. (2012): Synchronized activity of organic cation transporter 3 (Oct3/Slc22a3) and Multidrug and Toxin Extrusion 1 Mate1/Slc47a1 transporter in transplacental passage of MPP⁺ in rat. *Toxicological Sciences* 128: 471-481.
2. Akerblom, B., Zanga, G., Zhuang, Z. W., Calounova, G., Simons, M., Welsh, M. (2012): Heterogeneity among RIP-Tag2 insulinomas allows vascular endothelial growth factor-A independent tumor expansion as revealed by studies in Shb mutant mice: Implications for tumor angiogenesis. *Molecular Oncology* 6: 333-346.
3. Allen, N. E., Key, T. J., Appleby, P. N., Travis, R. C., Roddam, A. W., Tjønneland, A., Johnsen, N. A., Overvad, K., Linseisen, J., Rohrmann, S., Boeing, H., Pischon, T., Bueno-de-Mesquita, H. B., Kiemeny, L., Tagliabue, G., Palli, D., Vineis, P., Tumino, R., Trichopoulou, A., Kassapa, C., Trichopoulos, D., Ardanaz, E., Larranaga, N., Tormo, M. J., González, C. A., Quiros, J. R., Sánchez, M. J., Bingham, S., Khaw, K. T., Manjer, J., Berglund, G., Stattin, P., Hallmans, G., Slimani, N., Ferrari, P., Rinaldi, S., Riboli, E. (2008): Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British Journal of Cancer* 98:1574-1581.
4. Allen, N. E., Key, T. J., Appleby, P. N., Travis, R. C., Roddam, A. W., Rinaldi, S., Egevad, L., Rohrmann, S., Linseisen, J., Pischon, T., Boeing, H., Johnsen, N. F., Tjønneland, A., Gronbaek, H., Overvad, K., Kiemeny, L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Bingham, S., Khaw, K. T., Tumino, R., Berrino, F., Mattiello, A., Sacerdote, C., Palli, D., Quiros, J. R., Ardanaz, E., Navarro, C., Larranaga, N., Gonzalez, C., Sanchez, M. J., Trichopoulou, A., Travezea, C., Trichopoulos, D., Jenab, M., Ferrari, P., Riboli, E., Kaaks, R. (2007): Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 concentrations and prostate cancer risk: Results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16: 1121-1127.
5. Anderson, K. M., Guinan, P., Rubenstein, M. (2011): The effect of normoxia and hypoxia on a prostate (PC-3) CD44/CD41 cell side fraction. *Anticancer Research* 31: 487-494.
6. Andriole, G. L., Crawford, E. D., Grubb, R. L., Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., Fouad, M. N., Isaacs, C., Kvale, P. A., Reding, D. J., Weissfeld, J. L., Yokochi, L. A., O'Brien, B., Ragard, L. R., Clapp, J. D., Rathmell, J. M., Riley, T. L., Hsing, A. W., Izmirlian, G., Pinsky, P. F., Kramer, B. S., Miller, A. B., Gohagan, J. K., Prorok, P. C. (2012): Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: mortality results after 13 years of follow-up. *Journal of the National Cancer Institute* 104: 125-132.

7. Anneren, C., Lindholm, C.K., Kriz, V., Welsh, M., (2003): The FRK/RAK-SHB signaling cascade: a versatile signal-transduction pathway that regulates cell survival, differentiation and proliferation. *Current Molecular Medicine* 3: 313-324.
8. Ao, M., Franco, O. E., Park, D., Raman, D., Williams, K., Hayward, S. W. (2007): Cross-talk between paracrine acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Research* 67: 4244-4253.
9. Aus, G., Abbou, C. C., Bolla, M., Heidenreich, A., Van Poppel, H., Schmid, H. P., Wolff, J. M., Zattoni, F. (2006): Guidelines EAU pro karcinom prostaty. *Urologické listy* 4: 94, 95.
10. Bae, K. M., Su, Z., Frye, C., McClellan, S., Allan, R. W., Andrejewski, J. T., Kelley, V., Jorgensen, M., Steindler, D. A., Vieweg, J., Siemann, D. W. (2010): Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *Journal of Urology* 183: 2045–2053.
11. Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M. A., Luini, A., Buccione, R. (2003): Dynamins participate in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular Biology of the Cell* 14: 1074-1084.
12. Barilla, D., Mangano, R., Gonfloni, S., Kretzschmar, J., Moro, M., Bohmann, D., Superti-Furga, G. (2000): A nuclear tyrosine phosphorylation circuit: c-Jun as an activator and substrate of c-Abl and JNK. *EMBO Journal* 19: 273-281.
13. Barry, M. J. (2001): Prostate-Specific–Antigen Testing for Early Diagnosis of Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 344: 1373-1377.
14. Birnie, R., Bryce, S. D., Roome, C., Dussupt, V., Droop, A., Lang, S. H., Berry, P. A., Hyde, C. F., Lewis, J. L., Stower, M. J., Maitland, N. J., Collins, A. T. (2008): Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a proinflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biology* 9: R83.
15. Bonovas, S., Filioussi, K., Tsantes, A. (2004): Diabetes mellitus and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 47: 1071-1078.
16. Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., Timms, B. (2004): Human prostate cancer risk factors. *Cancer Supplement* 101: 2371-2490.
17. Botswick, G. D. (2000): Prostatic intraepithelial neoplasia. *Current Urology Reports* 2000 1: 65-70.
18. Brasher, B. B., Van Etten, R. A. (2000): c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *Journal of Biological Chemistry* 275: 35631-35637.

19. Clark, J., Attard, G., Jhavar, S., Flohr, P., Reid, A., De-Bono, J., Eeles, R., Scardino, P., Cuzick, J., Fisher, G., Parker, M. D., Foster, C. S., Berney, D., Kovacs, G., Cooper, C. S. (2008): Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 27: 1993-2003.
20. Cross, M. J., Lu, L., Magnusson, P., Nyqvist, D., Holmqvist, K., Welsh, M., Claesson-Welsh, L., (2002): The Shb adaptor protein binds to tyrosine 766 in the FGFR-1 and regulates the Ras/MEK/MAPK pathway via FRS2 phosphorylation in endothelial cells. *Molecular Biology of Cell* 13: 2881-2893.
21. Datta, M. W., Hernandez, A. M., Schlicht, M. J., Kahler, A. J., DeGueme, A. M, Dhir, R., Shah, R. B., Farach-Carson, C., Barrett, A., Datt, S. (2006): Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth *via* the Sonic Hedgehog pathway. *Molecular Cancer* 5: 9.
22. Davoodpour, P., Landstrom, M. (2005): 2-Methoxyestradiol-induced apoptosis in prostate cancer cells requires Smad7. *Journal of Biological Chemistry* 280: 14773-14779.
23. Davoodpour, P., Landström, M., Welsh, M. (2007): Reduced tumor growth in vivo and increased c-Abl activity in PC3 prostate cancer cells overexpressing the Shb adapter protein. *BMC Cancer* 7: 161.
24. De Marzo, A., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, Ch. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., Nelson, W. G. (2007): Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7: 256-269.
25. Decensi, A., Puntoni, M., Goodwin, P., Cazzaniga, M., Gennari, A., Bonanni, B., Gandini, S. (2010): Metmorfin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prevention Research* 3: 1451-1461.
26. Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., Weinstein, B. M. (2009): The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell* 16: 209-221.
27. DeMali, K. A., Barlow, C. A., Burrridge, K. (2002): Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *The Journal of Cell Biology* 159: 881-891.
28. DeMali, K. A., Burrridge, K., (2003): Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *Journal of Cell Science* 116: 2389-2397.
29. Desai, B., Ma, T., Chellaiah, M. A. (2008): Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 13856-13866.

30. Dreicer, R., Garcia, J. 2012. Prostate Cancer. [online] [cit. 1.12. 2012]. Dostupné na: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/prostate-cancer/>
31. Dubrovska, A., Kimb, S., Salamoneb, R.J., Walkerb, J. R., Maira, S. M., Garcia-Echeverria, C., Schultz, P. G., Reddy, V. A. (2009): The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 268–273.
32. Duhagon, M. A., Hurt, E. M., Sotelo-Silveira, J. R., Zhang, X., Farrar, W. L. (2010): Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres. *BMC Genomics* 11:324.
33. Dvořáček, J. (2005): Epidemiologie. *In: Klenek, P., Houdek, L. (eds.): Onkourologie. Galén, Praha, 227.*
34. Dvořáček, J., Šafařík, L. (2005): Symptomatologie a diagnóza. *In: Klenek, P., Houdek, L. (eds.): Onkourologie. Galén, Praha, 274.*
35. El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., Leverve, X. (2000): Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry* 275: 223-228.
36. Funa, N. S., Kriz, V., Zang, G., Calounova, G., Akerblom, B., Mares, J., Larsson, E., Sun, Y., Betsholtz, C., Welsh, M. (2009): Gene inactivation causes impaired tumor growth dysfunctional microvasculature as a consequence of *Shb*. *Cancer Research* 69: 5.
37. Funa, N. S., Reddy, K., Bhandarkar, S., Kurenova, E. V., Yang, L., Cance, W. G., Welsh, M., Arbisser, J. L. (2008): Shb gene knockdown increases the susceptibility of SVR endothelial tumor cells to apoptotic stimuli in vitro and in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 128: 710-716.
38. Giannoni, E., Bianchini, F., Calorini, L., Chiarugi, P. (2011): Cancer associated fibroblasts exploit reactive oxygen species through a pro-inflammatory signature leading to EMT and stemness. *Antioxidants and Redox Signaling* 14: 2361–2371.
39. Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., Chiarugi, P. (2010): Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Research* 70:6945–6956.
40. Godoy, G., Huang, G. J., Patel, T., Taneja, S. S. (2011): Long-term follow-up of men with isolated high-grade prostatic intra-epithelial neoplasia followed by serial delayed interval biopsy. *Oncology* 77: 669-676.
41. Goldmann, W. H., Schindl, M., Cardozo, T. J., Ezzell, R. M. (1995): Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy. *Experimental Cell Research* 221: 311-319.

42. Graefe, K. H., Friedgen, B., Wölfel, R., Schömig, E. (1998): Removal of circulating catecholamines by extraneuronal amine transport systems. *Advanced Pharmacology* 42: 360-363.
43. Grisanzio, C., Werner, L., Takeda, D., Awoyemi, B. C., Pomerantz, M. M., Yamada, H., Sooriakumaran, P., Robinson, B. D., Leung, D., Schinzel, A. C., Millsh, I., Ross-Adams, H., Nealk, D. E., Kidoe, M., Yamamoto, T., Petrozziello, G., Stacka, E. C., Lisa, R., Kantoff, P. W., Loda, M., Sartorn, O., Egawa, S., Tewarif, A. K., Hahna, W. C., Freedman, M. L. (2012): Genetic and functional analyses implicate the *NUDT11*, *HNF1B*, and *SLC22A3* genes in prostate cancer pathogenesis. *PNAS* 109: 11252-11257.
44. Gruendemann, D., Schechinger, B., Rappold, G. A., Schoemig, E. (1998): Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature Neuroscience* 1: 349-351.
45. Hagerkvist, R., Mokhtari, D., Lindholm, C., Farnebo, F., Mostoslavsky, G., Mulligan, R. C., Welsh, N., Welsh, M., (2007): Consequences of Shb and c-Abl interactions for cell death in response to various stress stimuli. *Experimental Cell Research* 313: 284-291.
46. Hantschel, O., Superti-Furga, G. (2004): Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 33-44.
47. Heise, M., Lautem, A., Knapstein, J., Schattenberg, J. M., Hoppe-Lotichius, M., Foltys, D., Weiler, N., Zimmermann, A., Schad, A., Gründemann, D., Otto, G., Galle, P. R., Schuchmann, M., Zimmermann, T. (2012): Downregulation of organic cation transporters OCT1 (*SLC22A1*) and OCT3 (*SLC22A3*) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer* 12: 109-119.
48. Hes, O., Michal, M., Mukenšnábl, P., Hora, M., Smitková, V., Zámečník, M. 2011. Základní anatomické údaje. [online] [cit. 9.4. 2013]. Dostupné na: <http://www.prostata.nadory.cz/zakladni.html>
49. Hes, O., Michal, M., Mukenšnábl, P., Hora, M., Smitková, V., Zámečník, M. 2011. Adenokarcinom prostaty. Základní klinickopatologické údaje [online] [cit. 9.4. 2013]. Dostupné na: <http://www.prostata.nadory.cz/d21.html>
50. Higgins, L. H., Withers, H. G., Garbens, A., Love, H. D., Magnoni, L., Hayward, S. W., Moyes, C. D. (2009): Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1787: 1433-1443.
51. Holmqvist, K., Cross, M., Riley, D., Welsh, M. (2003): The Shb adaptor protein causes Src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cellular Signaling* 15: 171-179.
52. Holmqvist, K., Cross, M.J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., Welsh, M., (2004): The adaptor protein Shb binds to tyrosine 1175 in vascular

- endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *Journal of Biological Chemistry* 279: 22267-22275.
53. Hu, Y., Haiguo, Sun., Owens, R. T., Wu, J., Chen, Y. Q., Berquin, I. M., Perry, D., O'Flaherty, J. T., Edwards, I. J. (2009): Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia* 11: 1042-1053.
 54. Chen, B. Y., Liu, J. Y., Chang, H. H., Chang, C. P., Lo, W. Y., Kuo, W. H., Yang, C. R., Lin, D. P. C. (2007): Hedgehog is involved in prostate basal cell hyperplasia formation and its progressing towards tumorigenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357:1084–1089.
 55. Chen, L., Hong, C., Chen, E. C., Yee, S. W., Xu, L., Almof, E. U, Wen, C., Fuji, K., Johns, S. J., Stryke, D., Ferrin, T. E., Simko, J., Chen, X., Costello, J. F., Giacomini, K. M. (2012): Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics Journal* 13: 110-120.
 56. Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A., Berney, D. M. (2012): Staging of prostate cancer. *Histopathology* 60: 87-117.
 57. Chng, K. R., Chang, C. W., Tan, S. K., Yang, C., Hong, S. Z., Sng, N. I. W., Cheung, E. (2012): A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. *The EMBO Journal* 00: 1–14.
 58. Christoffersson, G., Zang, G., Zhuang, Z. W., Vagesjo, E., Simons, M., Phillipson, M., Welsh, M. (2012): Vascular adaptation to a dysfunctional endothelium as a consequence of Shb deficiency. *Angiogenesis* 15: 469-480.
 59. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T. Q., Wu, J., Guan, K. L. (2002): TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* 4: 648-657.
 60. Karlsson, T., Welsh, M. (1996): Apoptosis of NIH3T3 cells overexpressing the Src homology 2 domain protein Shb. *Oncogene* 3: 955-961.
 61. Kasper, J. S., Giovannucci, E. (2006): A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention* 15: 2056-2062.
 62. Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Ganapathy, V. (1998): Cloning and functional characterization of a potential sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *Journal of Biological Chemistry* 273: 15971–15979.
 63. Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T. D., Feller, S. M., Weichselbaum, R. R., Kufe, D. W (1995): Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 376: 785-788.

64. King, J. C., Xu, J., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, B. S., Leung, D. H., Taylor, B. S., Sander, C., Cardiff, R. D., Couto, S. S., Gerald, W. L., Sawyers, C. L. (2009): Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nature Genetics* 41: 524–526.
65. Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Li, Y., Wang, Z., Sethi, S., Sarkar, F. H. (2010): Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One* 5: e12445.
66. Lang, S. H., Hyde, C., Reid, I. N., Hitchcock, I. S., Hart, C. A., Gordon Bryden, A. A., Vилlete, J. M., Stower, M. J., Maitland, N. J. (2002): Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 52: 253-263.
67. LaTulippe, E., Satagopan, J., Smith, A., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V., Gerald, W. L. (2002): Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Research* 62: 4499-4506.
68. Le Clainche, C., Dwivedi, S. P., Didry, D., Carlier, M. F. (2010): Vinculin is a dually regulated actin filament barbed end-capping and side-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 23420-23432.
69. Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., de Rooij, J. (2010): Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* 189: 1107-1115.
70. Leong, M., Shi, W., Tian, J., Cho, E., Raza, A., Siddiqi, S. A., Selim, A., Chen, H., Zhang, D. (2009): Overexpression of truncated ERG from TMPRSS2-ERG fusion and prostate cancer development. *Pathology and Laboratory Medicine International* 1: 13–21.
71. Linder, S., Aepfelbacher, M. (2003): Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in Cell Biology* 13: 376-385.
72. Lindholm, C.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E. and Welsh, M. (2000): Shf, a Shb-like adapter protein, is involved in PDGF-alpha-receptor regulation of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278: 537–543.
73. Lu, L., Holmqvist, K., Cross, M., Welsh, M. (2002): Role of the Src homology 2 domain-containing protein Shb in murine brain endothelial cell proliferation and differentiation. *Cell Growth and Differentiation* 13: 141-148.
74. Marchisio, P. C., Cirillo, D., Teti, A., Zamboni-Zallone, A., Tarone, G. (1987): Rous-sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-

- like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament membrane interactions. *Experimental Cell Research* 169: 202-214.
75. Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P., Claesson-Welsh, L. (2002): p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Biology* 156:149-160.
 76. Mierke, C. T. (2009): The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53: 115-126.
 77. Mimeault, M., Batra, K. S. (2011): Frequent gene products and molecular pathways altered in prostate cancer- and metastasis- initiating cells and their progenies and novel promising multitargeted therapies. *Molecular Medicine* 17: 949 – 964.
 78. Mimeault, M., Batra, S. K. (2006): Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis* 27:1–22.
 79. Mimeault, M., Batra, S. K. (2007): Interplay of distinct growth factors during epithelial-mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Annals of Oncology* 18: 1605-1619.
 80. Mimeault, M., Batra, S.K., (2011): Animal models of prostate carcinogenesis underlining the critical implication of prostatic stem progenitor cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1816: 25–37.
 81. Mosquera, J. M., Perner, S., Genega, E. M., Sanda, M., Hofer, M. D., Mertz, K. D., Paris, P. L., Simko, J., Bismar, T. A., Ayala, G., Shah, R. B., Loda, M., Rubin, M. A. (2008): Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clinical Cancer Research* 14: 3380-3385.
 82. Nies, A. T., Koepsell, H., Damme, K., and Schwab, M. (2011): Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* 201: 105–167.
 83. Nies, A. T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., Zanger, U. M., Keppler, D., Schwab, M., Schaeffeler, E. (2009): Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50: 1227-1240.
 84. O’Dowd, G. J., Veltri, R. W., Miller, M. C., Strum, S. B. (2001). The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy. [online] [cit. 1.12. 2012]. Dostupné na: <<http://prostate-cancer.org/the-gleason-score-a-significant-biologic-manifestation-of-prostate-cancer-aggressiveness-on-biopsy/>>
 85. Patel, H., Younis, R. H., Ord, R. A., Basile, J. R., Schneider, A. (2013): Differential expression of organic cation transporter OCT-3 in oral premalignant and malignant lesions:

- potential implications in the antineoplastic effects of metformin. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 42: 250-256.
86. Patrawala, L., Calhoun-Davis, T., Schneider-Broussard, R., Tang, D. G. (2007): Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+ α 2 β 1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Research* 67: 6796–6805.
87. Povýšil, C. (2005): Patologie. . *In*: Klenek, P., Houdek, L. (eds.): *Onkourologie*. Galén, Praha, 244-246.
88. Renehan, A. G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S. T., Shalet, S. M., Egger, M. (2004): Insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363: 1346-1353.
89. Riedmaier, A. E., Fisel, P., Nies, A. T., Schaeffeler, E., Schwab, M. (2013): Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* 34: 126-135.
90. Ruiz, C., Holz, D. R., Oeggerli, M., Schneider, S., Gonzales, I. M., Kiefer, J. M., Zellweger, T., Bachmann, A., Koivisto, P. A., Helin, H. J., Mousses, S., Barrett, M. T., Azorsa, D. A., Bubendorf, L. (2011): Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. *Journal of Pathology* 223: 543-552.
91. Schmidt, M., Mareš, J., Jarolím, L., Černý, M., Veselý, Š., Babjuk, M. (2012): Stanovení exprese *SHB* v tkáni karcinomu prostaty: Využití v diagnostice a prognostice. *Česká Urologia* 16: 58-66.
92. Schroder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L. J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L. J., Recker, F., Paez, A., Maattanen, L., Bangma, C. H., Aus, G., Carlsson, S., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Kujala, P. M., Blijenberg, B. G., Stenman, U. H., Huber, A., Taari, K., Hakama, M., Moss, S. M., de Koning, H. J., Auvinen, A. (2012): Prostate-cancer mortality at 11 years follow-up. *New England Journal of Medicine* 366: 981-990.
93. Stattin, P., Rinaldi, S., Biessy, C., Stenman, U. H., Hallmans, G., Kaaks, R. (2004): High levels of circulating insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort. *Journal of Clinical Oncology* 22: 3104-3112.
94. Steger, K., Weidner, W. (2011): Anatomy of the male reproductive system. *In*: Chapper, C. L., Steers, W. D. (eds): *Practical Urology: Essential Principles and Practice*. Springer, London, 65.

95. Sun, X., Wu, F., Datta, R., Kharbanda, S., Kufe, D. (2000): Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7470-7473.
96. Tang, D. G., Patrawala, L., Calhoun, T., Bhatia, B., Choy, G., Schneider-Broussard, R., Jeter, C. (2007): Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Molecular Carcinogenesis* 46: 1–14.
97. Tate, P. L., Bibb, R., Larcom, L. L. (2011): Milk stimulates growth of prostate cancer cells in culture. *Nutrition and Cancer* 63: 1361-1366.
98. Tomlins, S. A., Mehra, R., Rhodes, D. R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S. M., Kalyanasundaram, S., Wei, J. T., Rubin, M. A., Pienta, K. J., Shah, R. B., Chinnaiyan, A. M. (2007): Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature Genetics* 39: 41-51
99. Turner, C. E., Glenney, J. R. Jr., Burridge, K. (1990): Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of Cell Biology* 111: 1059-1068.
100. Tzvetkov, M. V., Vormfelde, S. V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehart, D., Sabolic, I., Koepsell, H., Brockmüller, J. (2009): The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 86: 299-306.
101. ÚZIS. Novotvary 2009 ČR. [online] [cit. 9.4. 2013]. Dostupné na: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>
102. Verhaagh, S., Schweifer, N., Barlow, D. P., Zwart, R. (1999): Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 55: 209-218.
103. Vialou, V., Balasse, L., Callebert, J., Launay, J. M., Giros, B., Gautron, S. (2008): Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *Journal of Neurochemistry* 106: 1471-1482.
104. Wang, S.Y., Garcia, A. J., Wu, M., Lawson, D. A., Witte, O. N., Wu, H. (2006): Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 1480-1485.
105. Wei, J. T., Calhoun, E. A., Jacobsen, S. J. (2004): Urologic diseases in America. Interim Compendium. Washington DC.
106. Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N., Burstein, D., Doukas, J., Soll, R., Losordo, D., Cheresch, D. (2004): Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation* 113: 885-894.

107. Welsh, M., Mares, J., Karlsson, T., Lavergne, C., Bréant, B., Claesson-Welsh, L. (1994): Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. *Oncogene* 9:19-27.
108. Wieland, A., Hayer-Zilgen, M., Bonisch, H., Bruss, M. (2000): Analysis of the gene structure of the human (SLC22A3) and murine (Slc22a3) extraneuronal monoamine transporter. *Journal of Neural Transmission* 107: 1149-1157.
109. Yokoo, S., Masuda, S., Yonezawa, A., Terada, T., Katsura, T., Inui, K. I. (2008): Significance of OCT3/SLC22A3, organic cation transporter 3, expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. *Drug Metabolism and Disposition* 36: 2299-2306.
110. Yousef, G. M., Chang, A., Scorilas, A., Diamandis, E. P. (2000): Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 125-133.
111. Zhang, S., Lovejoy, K. S., Shima, J. E., Lagpacan, L. L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J. W., Chen, X., Lippard, S. J., Giacomini, K. M. (2006): Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Research* 66: 8847-8857.
112. Zhao, H., Peehl, D. M. (2009): Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate* 69: 991-1000.