

Gymnázium a Střední odborná škola, Nový Jičín,  
příspěvková organizace, Palackého 50/52

## 6. Zdravotnictví

Název práce:

# **Vliv polymorfních CAG repetit v genu androgenního receptoru a polymorfismu rs10993994 v MSMB genu na vznik karcinomu prostaty**

Autoři:

Radka Meisslová

Jakub Novosad

4. ročník

Zadavatel práce:

Ing. Arpád Bóday

Nový Jičín

2010

Moravskoslezský kraj

Prohlašujeme, že jsme svou práci vypracovali samostatně, použili jsme pouze podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů v platném znění.

V Novém Jičíně dne 29.3.2010

Radka Meisslová

Jakub Novosad

**Poděkování:**

Zde bychom rádi poděkovali všem, kteří nám pomohli s vypracováním této práce, zajistili potřebné prostředky, povolení, odborný dohled a školení nutné k její realizaci. V první řadě děkujeme Ing. Arpádu Bóday, který nám poskytoval cenné rady v průběhu zpracování práce, pomáhal nám jak s teoretickou, tak praktickou částí a poskytoval konzultace během hodnocení výsledků. Dále děkujeme Ing. Přemyslu Kramolišovi, který nám dal podnět k napsání této práce, zajistil nám spolupráci s Ing. Bódayem, pomohl s formální stránkou práce a za vše další, co pro nás udělal. Upřímné poděkování patří také Mgr. Andrei Ocáskové za všechny odborné konzultace a pomoc při zpracování výsledků a formální stránky práce. Také děkujeme za pomoc našim kamarádům, jmenovitě J. Bobek, T. Fusková, J. Petružela a V. Rašková. A v neposlední řadě bychom rádi poděkovali všem pracovníkům laboratoře molekulární biologie P&R LAB a.s. za trpělivost s námi.

## Abstrakt

Karcinom prostaty patří mezi nejčastější nádorová onemocnění mužů, v rozvinutých zemích je předstihován jen nádory kůže. Je charakterizován abnormálním nekoordinovaným růstem epiteliálních prostatických buněk se ztrátou jejich původní funkce. Velký vliv na něj mají androgeny, jejichž signály jsou do buněk přenášeny androgenním receptorem (AR). Androgenní receptor obsahuje vysoce polymorfní úsek CAG repetice, které svou délkou ovlivňují aktivitu AR. Průměrná hodnota CAG repetice v populaci je 15 repetice. Soudí se, že čím je počet CAG repetice nižší, tím je vyšší riziko vzniku karcinomu prostaty. Tato domněnka však zatím nebyla věrohodně potvrzena. Příliš krátké CAG repetice mohou způsobit infertilitu, příliš dlouhé zase SBMA (neboli Kennedyho chorobu). Dalším rizikovým faktorem je zřejmě SNP polymorfismus MSMB genu rs10993994, kde výskyt mutované alely znamená snížení aktivity promotoru na 13% oproti wild-type alele. Bílkovina kódovaná tímto genem zřejmě působí jako tumor supresor. Tato práce má za cíl zjistit možné souvislosti mezi délkou CAG repetice v AR genu, polymorfismem MSMB genu rs10993994 a vznikem karcinomu prostaty.

## Abstract (En)

Prostate cancer is the most common nonskin malignancy. It is characterized by abnormal noncoordinated growth of epithelial prostatic cells with the loss of their origin function. Prostate cancer is highly influenced by androgens, which signals are mediated through androgen receptor(AR). An androgen receptor contains highly polymorphic section with CAG repeats. Length of CAG repeats affects the activity of AR. The average length of CAG repeats in population is 15. We have focused on the CAG repeat length because recent research suggests that men with shorter AR CAG lengths are at a greater risk of developing prostate cancer than are those with longer variants. Too short CAG repeats can cause infertility, and vice versa, too long CAG repeats(>40) can cause SBMA (Kennedy's disease). Another risk factor of developing prostate cancer is SNP polymorphism in MSMB gene rs10993994 where occurrence of thymine(T) allele, causes lower activity of promoter area of this gene. The protein encoded by this gene obviously functions as tumor suppressor. This is the main topic of the article.

# Obsah

1. Úvod .....	7
2. Teoretický základ práce .....	8
2.1 Prostata .....	8
2.1.1 Zonální dělení prostaty .....	8
2.1.2 Histologie prostaty .....	9
2.1.3 Funkce prostaty .....	10
2.1.4 Prostatický specifický antigen .....	10
2.2 Rakovina .....	10
2.2.1 Onkogenetika .....	12
2.2.2 Mutagenní faktory .....	14
2.2.3 Polymorfismy .....	14
2.2.4 Imunitní systém a nádorová onemocnění .....	15
2.3 Karcinom prostaty .....	15
2.3.1 Epidemiologie .....	16
2.3.2 Geny zapříčiňující vznik karcinomu prostaty .....	17
2.3.3 Prorůstání karcinomu .....	18
2.3.4 Stádia rakoviny prostaty .....	18
2.3.5 Léčba rakoviny prostaty .....	18
2.4 Androgenní receptor (AR) .....	19
2.4.1 CAG polymorfismy genu AR .....	21
2.5 MSMB gen .....	21
3. Metodika a materiál .....	22
4. Výsledky .....	28
4.1 CAG repetice - populace .....	28
4.2 CAG repetice - pacienti pozitivní AAP .....	29
4.3 CAG repetice - pacienti negativní AAP .....	29

4.4 CAG repetice - porovnání pacientů pozitivních AAP s populací.....	30
4.5 CAG repetice - srovnání pacientů negativních AAP s populací .....	31
4.6 CAG repetice - srovnání pacientů pozitivních AAP s pacienty negativními AAP .....	32
4.7 Polymorfismus MSMB genu rs10993994 .....	33
5. Diskuze.....	34
6. Závěr.....	36
7. Seznam použité literatury .....	37

# 1.Úvod

Karcinom prostaty se stal problémem, který nelze přehlížet. V posledních letech jeho incidence stoupá. Především v důsledku zlepšení diagnostických metod a prodloužení průměrné délky života. Od roku 2005 je toto onemocnění nejčastější malignitou mužské populace v ČR. (Študent et al.,2008) Problémem však je, že bývá odhalen až v pozdějších stádiích, jelikož zpočátku se jedná o onemocnění asymptomatické. Dalším důvodem je podcenění prevence.

Jedná se o multifaktoriální geneticky podmíněné onemocnění, které vzniká kumulací rizikových mutací v genomu. Odhalení rizikových mutací vede ke zlepšení diagnostických metod, což je nezbytné k zachycení karcinomu v raném stádiu.

A právě vlivu některých mutací na vznik karcinomu prostaty je věnována tato práce. Vznikala po dobu tří let pod odborným dohledem Ing. Bódaye v laboratoři molekulární biologie P&R LAB a.s. v Novém Jičíně.

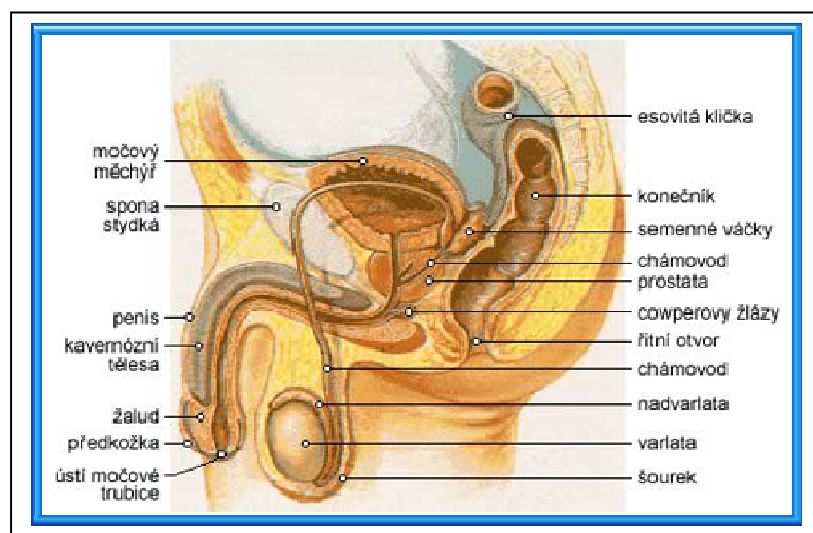
## 2. Teoretický základ práce

### 2.1 Prostata

Prostata je mužská přídatná pohlavní žláza. Nachází se v oblasti tzv. malé pánve, těsně pod močovým měchýřem. Prostatou prochází ejakulatoční vývod a močová trubice, jejíž začátek je prostatou obklopen.

Prostata tvoří a skladuje prostatický sekret, který je při ejakulaci vypuzován do prostatické části močové trubice a tvoří až 30% objemu ejakulátu.

Obr. č. 1: Umístění prostaty



#### 2.1.1 Zonální dělení prostaty

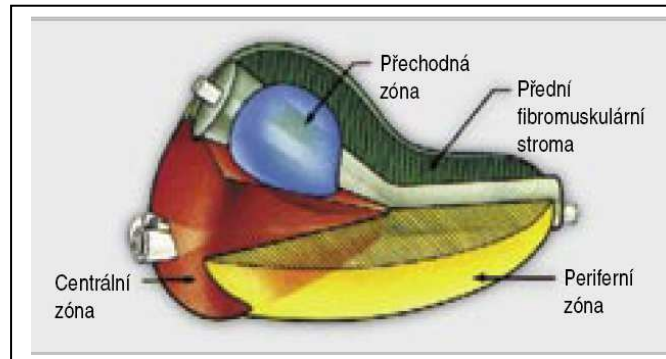
Prostatu lze rozdělit podle dvou základních systémů do několika oblastí. Prvním systémem je rozdělení na tzv. **laloky**. Toto rozdělení se používá častěji v anatomii. Pro charakteristiku karcinomu prostaty je důležitější tzv. **zonální dělení prostaty** (koncept formulovaný McNealem), který se využívá zejména v patologii a popisuje pravděpodobnost vzniku karcinomu v jednotlivých zónách prostaty. Podle tohoto konceptu prostatu dělíme do čtyř základních oblastí.

Největší část prostaty zaujímá **periferní zóna (PZ)**. Tato část prostaty produkuje největší část sekretu ejakulátu. Vyskytuje se zde až 68 % karcinomů. **Centrální zóna (CZ)** obklopuje močovou trubici, začíná v ní asi 8 % karcinomů prostaty. **V přechodné zóně (TZ)** začíná asi 24 % karcinomů prostaty. Benigní hyperplazie prostaty (BHP) vzniká pouze v této oblasti.



**Fibromuskulární stroma**, jako další část prostaty, je pravděpodobně nefunkční a zatím není přesně známa její role při onemocnění prostaty.

**Obr. č. 2: Zonální dělení prostaty**



### 2.1.2 Histologie prostaty

Prostata je tvořena 30 až 50 tuboalveolárními žlázkami, které ústí do prostatické části mužské uretry. Mezi produkty těchto žlázek patří látky, které nějakým způsobem umožňují nebo zvyšují šanci na oplodnění.

Epitel těchto žlázek je androgen-dependentní. Mezi žlázkami je uloženo fibromuskulární stroma prostaty. Stromální buňky jsou schopny pomocí 5 $\alpha$ -reduktázy vytvářet dihydrotestosteron, který stimuluje produkci mitogenního růstového faktoru jak stromálních, tak epiteliálních buněk. Proto se inhibitory 5 $\alpha$ -reduktázy uplatňují při terapii benigní hyperplazie prostaty.

V normálním žlázkatém prostatickém epitelu je přítomno pět buněčných typů: kmenové buňky, přechodně se dělící prekurzorové buňky (TA buňky, transit-amplifying cells), neuroendokrinní buňky, bazální epiteliální buňky a sekreční lumenální buňky (Lam a Reiter, 2006). Nejvíce zastoupené jsou zde sekreční lumenální buňky, které jsou terminálně diferencované, nesou androgenní receptor, produkují PSA (prostatický specifický antigen) a jsou závislé na androgenech (Liu et al., 1997; Schalken a Van Leenders, 2003). Bazální buňky exprimují androgenní receptor na úrovni mediátorové RNA (mRNA) a v malém množství na úrovni proteinu, ale neprodukují PSA (Lam a Reiter, 2006). Neuroendokrinní buňky jsou terminálně diferencované, neexprimují androgenní receptor a neprodukují PSA (Huang et al., 2006). Populace TA buněk slouží jako prostředník mezi nediferencovanými kmenovými buňkami bazální vrstvy a vysoce diferencovanými exokrinními a neuroendokrinními buňkami lumenu (Isaacs a Coffey, 1989). Tyto TA pocházejí z kmenových buněk a jsou citlivé na přítomnost androgenů, nejsou však na nich závislé. Jednotlivé buněčné typy nesou charakteristické znaky (markery), na jejichž základě mohou být rozlišeny a také může být sledován jejich původ (Rizzo et al., 2005).

Na základě popisných imunohistochemických studií bylo postulováno, že rakovinné buňky prostaty pochází zejména z transformovaných sekrečních luminálních buněk.

### 2.1.3 Funkce prostaty

Hlavní funkcí prostaty je **tvorba sekretu** - tekutiny pro ejakulát. **Ejakulát** vzniká smíšením spermií se sekrety prostaty, semenných váčků, Cowperových a Littreových žlázek.

**Spermie** jsou produkovány ve varlatech a pak uloženy těsně za prostatou v semenných váčcích. V průběhu orgasmu jsou vypuzeny ze semenných váčků do uretry, kde se mísí se sekretem produkováným prostatou. Tento prostatou produkováný **sekret** tvoří 15-30 % objemu ejakulátu. Výměšek je tekutý, bezbarvý, kyselé reakce (pH 6,4), obsahuje zinek, kyselinu citrónovou, prostaglandiny, polyaminy - spermin a spermidin, imunoglobuliny, kyselou fosfatázu a proteázy. Každá z těchto složek nějakým způsobem umožňuje nebo zvyšuje šanci na oplodnění.

**Zinek** ovlivňuje metabolismus testosteronu v prostatě, mimo to se v komplexu příkládá na buněčnou membránu spermií. **Kyselina citrónová** ve formě citrátů má funkci pufru, **prostaglandiny** stimulují svalovinu dělohy a přispívají tím k transportu spermií, **spermin** ovlivňuje pohyblivost spermií a jejich schopnost oplodnit vajíčko, **proteázy** (mezi které patří prostatický specifický antigen) způsobují řídnutí ejakulátu.

### 2.1.4 Prostatický specifický antigen

**Prostatický specifický antigen (PSA)** je proteolytický enzym produkováný normálními i rakovinovými buňkami prostaty.

Hodnota PSA se stala důležitým **markerem** v předpovědi rizika karcinomu prostaty. Pro časnou diagnostiku karcinomu prostaty je doporučováno vyšetřovat hladinu **PSA krevním testem** u mužů od 45. roku života. Narůstající hladiny PSA jsou obecně spojeny se zvyšujícím se rizikem výskytu karcinomu prostaty.

Hodnota PSA koreluje s rasou, věkem pacienta a objemem prostaty. Zvýšení PSA v séru mohou také vyvolat všechna tři nejčastější onemocnění prostaty - **karcinom**, **benigní hyperplazie** a **zánět**, dále pak **operační výkony na prostatě**, **akutní zástava močení**, **masáž** nebo **biopsie prostaty**, méně častěji i **ejakulace**.

## 2.2 Rakovina

Nádorová onemocnění jsou spolu s nemocemi kardiovaskulárního systému nejběžnějšími chorobami v naší populaci a nejčastější příčinou úmrtí. Nádorové onemocnění znamená vznik tkáně, ve které se růst buněk vymkl kontrolním mechanismům buněčné proliferace. Proces vzniku a vývoje nádoru se označuje jako **kancerogeneze**.

Pojem **nádor** (novotvar, neoplasie, blastom) je chápán jako obecné označení nově vzniklých tkáňových útvarů či buněčných populací v organismu, které nevznikají jako fyziologická odezva na vnější i vnitřní podněty, jeví známky abnormality a více nebo méně unikají z regulačního vlivu okolních buněk a organismu. Tato do jisté míry autoregulační schopnost každého nádoru se projevuje zejména v oblasti regulace buněčné proliferace (multiplikace) a buněčné smrti, kterými se zajišťuje tzv. tkáňová homeostáza. Tkáňová rovnováha je narušena i za fyziologických podmínek, např. tehdy, když jsou nastartovány procesy hojení (reparace), náhrady ztracených tkání (regenerace), nebo obrany proti cizorodým agens (zánět, imunitní reakce). V těchto případech je však zdravý organismus vybaven mechanismy, které dokáží po skončení příčiny a úpravě stavu tento nerovnovážený stav omezit a nadbytečnou proliferaci zastavit (tzv. regulace negativní zpětnou vazbou).

Při defektech těchto autoregulačních mechanismů, pravděpodobně vzniklých nejčastěji na podkladě genetické chyby, nastává situace, ze které se nádor může (ale nemusí) vyvinout. Některé z těchto stavů se označují jako **prekancerózy** nebo **dysplasie**.

**Proliferace** (množení) nádorových buněk probíhá téměř autonomně. Morfologický obraz nádorové tkáně může být stručně charakterizován takto: nádory jsou tvořeny proliferujícími nádorovými buňkami (parenchym), pojivovou nenádorovou tkání (stroma) a cévním systémem, jehož vznik nádory samy stimulují (angiogeneze). Vypracování techniky kultivace buněk in vitro (tkáňové kultury) umožnilo definovat rozdíly mezi normálními a maligně transformovanými buňkami na cytologické úrovni.

**Normální buňky** zachovávají specifický buněčný tvar a typické antigenní determinanty odpovídající antigenním determinantám tkáně, ze které byla buněčná kultura odvozena. Zachovávají kontrolu množení kontaktní inhibicí. Zastaví růst po vzájemném kontaktu. Růst buněk je omezený, každá buňka se množí po omezenou dobu, má omezený počet generací. Po určitém počtu generací buňka zaniká v důsledku stárnutí buněk. Normální buňky reagují na neopravitelné poškození programovou smrtí - apoptózou. Nádorové buňky jsou k mechanismům apoptózy jen omezeně vnímavé. Normální buňky mají také vysoké požadavky na přítomnost růstových faktorů v kultivačním mediu (potřebují pro svůj růst stimulaci).

**Nádorové buňky** mají většinou v in vitro podmínkách neomezenou proliferační aktivitu, tzn. že vzniká neomezený počet generací, dochází ke ztrátě kontaktní inhibice, transformované buňky rostou v několika vrstvách, buňky bývají přes sebe neorganizovaně nakupené. Buněčná kultura je nesmrtelná a při vhodných kultivačních podmínkách je možná její stálá (časově neomezená) kultivace. Nádorové buňky vykazují různé změny v povrchových antigenech jako je např. ztráta antigenů, exprese nových, pro daný nádor specifických antigenů (např. PSA u rakoviny prostaty) a nebo exprese fetálních antigenů. Mají nižší požadavek na množství proteinových růstových faktorů v kultivačním mediu.

Normální somatické buňky mají diploidní počet chromosomů. U nádorových buněk bývá změněný jak počet chromosomů, tak i jejich struktura (numerické a strukturní aberace).

U maligních buněk bývá heteroploidní chromosomální výbava (aneuploidie, polyploidie).

Vzhledem k aktivitě proliferace rozlišujeme dva základní typy nádorů – **nádory benigní** (nezhoubné) a **maligní** (zhoubné). Benigní i maligní nádory jsou geneticky podmíněným onemocněním - vznikají díky změnám genetické informace.

Nádor, který jeví autonomní růst, avšak jeho buňky neprorůstají (neinvazivní růst) okolní struktury a jen je odtlačují (expanzní růst) ani nepronikají přes bazální membrány epitelů či kapilár a nezakládají sekundární ložiska (metastázy) se označuje jako nádor **benigní**. Zachovává charakter tkáně, ze které vznikl. Po chirurgickém zákroku je ve většině případů pacient vyléčen.

Růst **maligního** nádoru je invazivní, tzn. že prorůstá z výchozího ložiska do okolí a poškozuje strukturu a funkci orgánu. Uvolněné nádorové buňky jsou přenášeny krevními a lymfatickými cévami do jiných orgánů, kde pokračují ve své proliferaci jako sekundární ložiska – **metastázy**.

### 2.2.1 Onkogenetika

Maligní transformace může postihnout buňky téměř všech tkání, ale nejčastěji vzniká v těch tkáních, kde se nejvíce množí buňky (dýchací soustava, trávicí soustava) a nebo, kde jsou buňky stimulovány hormony (prostata, vaječníky, prsy).

Maligní nádory se mohou vyskytnout v rodině **sporadicky** (náhodný výskyt u člena rodiny) nebo existuje v rodině opakovaný výskyt téhož typu nádoru u mnoha členů rodiny, hovoříme o **familiárním nebo hereditárním výskytu**. Jelikož je nádorové onemocnění způsobeno kumulací mutací v různých genech, jedná se v obou případech o onemocnění geneticky podmíněné.

Přeměna normální buňky v buňku nádorovou je většinou **vícetupňový proces**, při kterém dochází v buňce ke kumulaci mutací v určitých genech. Odhaduje se, že k rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace minimálně 4 různých genetických změn v buňce. To znamená, že v DNA dojde postupně k několika různým mutacím v různých genech, které ve svém výsledku způsobí maligní zvrát buňky. K vlastnímu malignímu zvrátu dojde tedy až po premaligním stadiu.

### Protoonkogeny a nádorové supresory

Mutace, které souvisejí s kancerogenezí, nastávají především ve dvou typech genů. V tzv. protoonkogenech a nádorových supresech. Funkce těchto genů jsou protichůdné.

**Protoonkogeny** kódují proteiny, které jsou zapojeny do regulačních buněčných okruhů takovým způsobem, že urychlují buněčný cyklus a tak podporují růst nebo zvětšování tkání v důsledku aktivního dělení buněk – tzv. **proliferaci**. Společným rysem protoonkogenů je, že jejich

přílišná funkce je nebezpečná, protože vede k nadměrné buněčné proliferaci i za nepřítomnosti fyziologické hladiny prorůstového signálu.

**Nádorové supresory** (antionkogeny) kódují proteiny, jejichž úloha spočívá ve zpomalování rychlosti proliferace buněk. Z hlediska vzniku rakoviny jsou nebezpečné takové mutace nádorových supresorových genů, které vedou k inaktivaci jejich proteinových produktů.

Konkrétních genů, které mohou být u nádorů mutovány a přispívají tak k procesu kancerogeneze, bylo nalezeno velké množství (řádově desítky až stovky). Dokonce i nádory stejného nebo velmi podobného histologického typu mohou být podmíněny mutacemi různých genů. Můžeme tedy říci, že proces kancerogeneze může být velmi **individuální**. Přesto lze pro mutace související s kancerogenezí najít společného jmenovatele.

### 1. Poškození buněčného cyklu

Pro udržování tkáňové homeostáze, tj. správného počtu životaschopných buněk dané tkáně, je nezbytným předpokladem kontrola rychlosti, s jakou buňky proliferují (tj. kontrola buněčného cyklu), a kontrola rychlosti, s jakou buňky odumírají programovanou buněčnou smrtí.

### 2. Poškození programované buněčné smrti - apoptózy

### 3. Získání neomezeného replikačního potenciálu

### 4. Indukce angiogeneze

Pro nádor je důležitá jeho schopnost zajistit si přístup ke krevnímu systému. Tato schopnost umožňuje nádorovým buňkám v dostatečné míře získávat základní živiny a kyslík a zbavovat se odpadů svého metabolismu. Nejvýznamnějším stimulatorem nádorové angiogeneze je patrně nedostatek kyslíku, tzv. **hypoxie**.

### 5. Tvorba metastáz

Maligní buňky se mohou uvolňovat z primárního nádoru, vstoupit do krevního nebo lymfatického systému a vytvořit v jiných částech těla sekundární nádory, **metastázy**. Čím více se nádor šíří, tím složitější je jeho úplné odstranění. Metastázy jsou nejzhoršivějším projevem nádorového onemocnění a jsou příčinou asi 90% úmrtí pacientů s rakovinou. Během svého vývoje většina nádorů dříve nebo později metastázy vytvoří.

### 6. Genetická nestabilita

Genetická nestabilita nádorových buněk způsobuje významné zvýšení mutační rychlosti, která potom zvyšuje pravděpodobnost akumulace všech mutací souvisejících s kancerogenezí. Genetická nestabilita je výsledkem vzniku mutací, které snižují přesnost replikace genomu, a tak zvyšují frekvenci objevení nových mutací, snižují účinnost mechanismů opravujících DNA nebo zvyšují výskyt chromozomálních zlomů a přestaveb, což navozuje nestabilitu tzv. karyotypu, tj. souboru chromozomů buňky, jedince nebo druhu. Jiným zdrojem navýšení genetické nestability může být u

některých buněk kritické zkrácení telomer (koncové části chromozomů, které hlídají opotřebenou buňku replikací).

Právě genetická nestabilita nádorů může navíc způsobit značnou heterogenitu buněčných klonů v rámci jediného nádoru. Nejzávažnějším důsledkem této heterogenity jsou komplikace pro terapii, protože heterogenní buněčná populace nádoru nemůže na danou terapii odpovídat uniformně (totožně).

### 2.2.2 Mutagenní faktory

Z praktického hlediska jsou nejdůležitějšími mutagenními faktory (mutageny) fyzikální, chemické nebo biologické agens (původce, činitel), které signifikantně (příznačně, důležitě) působí na vznik mutací - jsou **genotoxické** (= toxické pro genetický materiál).

**Fyzikální mutageny** jsou reprezentovány různými zdroji **záření**, především ionizující a ultrafialové záření.

**Chemické mutageny** jsou reprezentovány širokou škálou látek, které jsou předmětem výzkumu a testování. Mezi chemické mutageny patří **léky** (některá cytostatika a antibiotika), **látky získané potravou** (např. umělá sladidla, některé konzervační látky), **látky používané v zemědělství** (pesticidy, insekticidy, fungicidy, herbicidy, fumiganty, chemosterilanty, atd.) a **ostatní chemické látky** (např. lepidla, rozpouštědla, atd.).

**Biologické mutageny** jsou reprezentovány především **viry**. Již sama schopnost viru inkorporovat se do molekuly DNA hostitele naplňuje podstatu mutace jako takové.

### 2.2.3 Polymorfismy

Dnes již můžeme bez nadsázky říci, že každý jedinec vyskytující se na Zemi je svou genetickou výbavou jedinečný. Podstatou vzájemné genetické odlišnosti jsou polymorfické úseky DNA. Příčinou jejich existence jsou pak mutace, tedy změny probíhající v genomu. Zde si musíme uvědomit fakt, že v genomu změny probíhají neustále.

Změny, které se v něm objevují, můžeme klasifikovat jako ty vzácné - **mutace** a ty, které najdeme u většího počtu jedinců, označujeme jako **polymorfismy**. Jde o stejný jev, rozdíl je pouze v četnosti výskytu. K odlišení používáme dohodnutou míru, a tou je **99% pro alelu**, která je v populaci nejčastější. Při překročení této hodnoty přestáváme hovořit o polymorfismu a všechny ostatní alely v populaci považujeme za izolované mutace odvozené od standardní alely.

Rozlišujeme **jednonukleotidové polymorfismy** (SNP-single nukleotid polymorphism), kdy dochází k odlišnosti jen u jednoho nukleotidu. Dalším typem polymorfismu je **variabilní počet tandemových opakování** (VNTR-variable number of tandem repeat), jehož existence je založena na

výskytu repetitivních sekvencí, které se navzájem mohou lišit v počtu opakování. Repetitivních sekvencí je v lidském genomu velké množství - od nejjednodušších, jakými je **monotónní opakování** jedné báze (CCCCC...), přes **opakování dvojice bází** (CACACACACA...), **trojice bází** (CAGCAGCAGCAG...) atd. Pro opakování do šesti nukleotidů byl použit název **mikrosatelitní repetitivní DNA**. Opakování delších repetit nazýváme **minisatelitní DNA**. Stavba repetitivních sekvencí může být velice složitá - dovedeme si představit, že se původně identické jednotky mohou časem změnit, že může dojít k opakování celého bloku repetit, a tím ke vzniku jakéhosi vyššího řádu. Krátké repetice tvoří většinou jakési řady nebo sledy, někdy oddělené nerepetitivním úsekem. Jsou roztroušeny po celém genomu, a to nejen v nekódujících úsecích, ale i v nich.

U polymorfismů sledujeme také jejich proměnlivost - mutabilitu. Porovnáme-li jednotlivé typy polymorfismů, zjistíme, že nejméně stabilní jsou sekvence mikrosatelitní a při porovnání hodnot mezi dvěma generacemi (rodiče-dítě), zjistíme, že u některých se odchylky vyskytují i v několika procentech. Tato instabilita, typická pro určité konkrétní polymorfismy, může být u některých stavů paušálně zvýšena a signalizuje zvýšené riziko vzniku nádorů. V některých případech je instabilita vlastností alel - známe ji u tzv. trinukleotidových expanzí, kdy některé alely, označované jako **permutace**, inklinují více ke zmnožení repetit, než alely jiné.

Zvláštní medicínský význam studia polymorfismů tkví v jejich možném spojení s patologickými procesy, které může být prokázáno statisticky, aniž bychom plně chápali podstatu takového vztahu. Empiricky můžeme stanovit, že u osob, které disponují daným genotypem, dochází častěji k rozvoji choroby. (Brdečka, 2001)

#### **2.2.4 Imunitní systém a nádorová onemocnění**

U nádorových onemocnění obecně platí, že imunitní reakce má důležitou úlohu při vzniku a progresi maligního procesu. Imunitní systém jedince může v počátečním stádiu nádorové onemocnění rozpoznat a eliminovat transformované buňky v důsledku nově vzniklých antigenních determinant, které nádorové buňky odlišují od normálních buněk. Některé antigenní determinanty nádorových buněk jsou typické pro určitý typ nádoru. Jsou to tzv. **nádorové markery** a lze je využít při diagnostice nádorového onemocnění. Je však nutné mít na zřeteli, že nálezy nádorových markerů nejsou specifickou diagnostickou metodou.

#### **2.3 Karcinom prostaty**

Nejčastějším onemocněním prostaty je její zbytnění (**benigní hyperplasie**), kterým po padesátém roce života trpí téměř polovina mužů. Zvětšující se prostata může tlačit ze stran na močovou trubici a způsobit problémy při močení.

Karcinom prostaty nesouvisí s benigní hyperplasií, může se však vyskytovat současně. Nádor v časných stádiích nevyvolává obtíže, ale pokud se vyvíjí současně s hyperplasií, je možné ho odhalit lékařským preventivním vyšetřením - vyšetřením per rectum, při kterém lze pohmatem zjistit možné zvětšení prostaty. Podobně jako u kteréhokoliv druhu rakoviny, tak i u karcinomu prostaty včasné rozpoznání nádoru výrazně zvyšuje šanci na úplné vyléčení.

Karcinom prostaty se obvykle vyvíjí pomalu a nezpůsobuje nemocnému větší potíže, proto také bývá ve většině případů zjištěn až v pokročilejších stádiích.

### 2.3.1 Epidemiologie

Za posledních 38 let počet případů karcinomu prostaty stoupl šestkrát a úmrtnost se zdvojnásobila. Zneklidňujícím faktem je i to, že věk nástupu onemocnění klesá. Zřejmě důsledkem větší koncentrace xenobiotik (látek, které se běžně v přírodě nevyskytují) v prostředí a také proměnou životního stylu lidí.

Za významné rizikové faktory se považují: **věk, afroamerická rasa, cirkulující androgeny a pozitivní rodinná anamnéza.**

Incidence karcinomu prostaty vzrůstá s **věkem**, před čtyřicátým rokem života se jedná o vzácné, ojedinělé případy, mezi 40 - 50 lety je výskyt nízký, s postupnou akcelerací po "padesátce". V čase diagnózy rakoviny prostaty má 80% mužů více než 65 let.

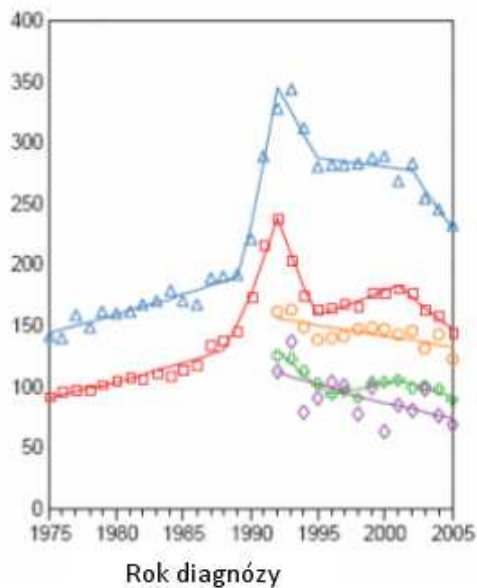
Obecně lze říci, že u obyvatel jihovýchodní Asie je výskyt tohoto onemocnění daleko nižší než u Evropanů. Největší výskyt je zaznamenán u **afroameričanů**. Obyvatelé Asie vděčí za nízký výskyt karcinomu prostaty pravděpodobně vysoké konzumaci rostlinné stravy bohaté na fytoosteroly. Pozitivní vliv se ukázal i při konzumaci sóji, bohaté na isoflavony. Ochranný vliv se předpokládá u řady látek, jako je selen, vitamín E a D, dále látky, jež dokáží zredukovat množství mužských pohlavních hormonů.

U karcinomu prostaty hraje důležitou úlohu také **dědičnost**. Onemocnění otce či bratra zdvojnásobuje riziko, pokud jsou v rodině dva a více nemocných, stoupá riziko pěti až jedenáctinásobně.



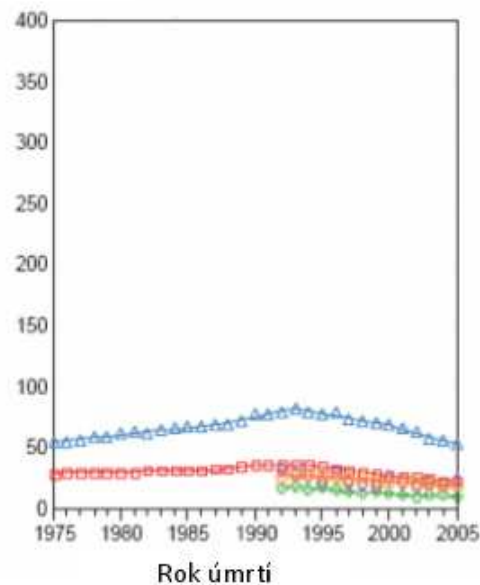
přepočítáno na  
100 000 obyvatel

## INCIDENCE



přepočítáno na  
100 000 obyvatel

## ÚMRTNOST



Obr. č. 3: VÝSKYT PODLE RASY, Analýza výskytu a úmrtnosti rok 1975-2005

([http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/results\\_merged/sect\\_23\\_prostate.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/results_merged/sect_23_prostate.pdf))

- Europoidní rasa
- △ Negroidní rasa
- ⊕ API – Asian/Pacific Islanders
- ◇ AI/AN – Američtí Indiáni/ původní obyvatelé Aljašky
- Hispánci

### 2.3.2 Geny zapříčiňující vznik karcinomu prostaty

Přímá souvislost s rakovinou prostaty byla zjištěna u několika genů. Za všechny jmenujme geny **BRCA 1** (lokus 17q21), **BRCA 2** (13q12), **HPC 1** (1q24), **HPC 2** (Xq27), **OGG1**(3p26.2), **CHEK2**(22q12.1), **MSR1**(8p22-23), **PON1**(7q21.3), **MIC-1**(19p13), **TLR4**(9q32-33). Geny **BRCA1** a **BRCA2** řídí opravy DNA. Gen **HPC1** dává impulsy k apoptóze a ovlivňuje náchylnost k infekcím. **OGG1** zajišťuje obnovu DNA po oxidačním poškození. **CHEK2** informuje o poškození DNA a hlídá buněčný cyklus. **MSR1** ovlivňuje vznik zánětu a infekce. **PON1** je znám jako likvidátor volných radikálů, **MIC-1** moduluje zánět a **TLR4** ovlivňuje náchylnost k infekci. (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)

### 2.3.3 Prorůstání karcinomu

Prorůstání karcinomu záleží na jeho lokalizaci. Každá anatomická zóna má svá slabá místa, kterými nádor snadno penetruje. Největší procento karcinomů se vyskytuje **v periferní zóně** - až 68% karcinomů začíná právě zde.

Nejčastěji karcinom prorůstá **do semenných váčků a do močového měchýře**, odkud se pak může díky metastázám rozšířit dále do celého těla.

### 2.3.4 Stádia rakoviny prostaty

V rámci odborného urologického vyšetření při podezření na karcinom prostaty je prostata vyšetřena ultrazvukem přes konečník a je z ní proveden odběr vzorků tenkou jehlou k histopatologickému vyšetření. Při něm pak může být stanovena diagnóza karcinomu prostaty. Kromě zjištění samotného nádoru ve vzorcích z prostaty určuje patolog jeho typ a biologickou agresivitu stanovením buněčné diferenciaci nádorových buněk a tzv. **Gleasonova skóre**. Dalším kritériem k posouzení nádoru je klasifikace podle **systému TNM**. Stanovení stádia nemoci má rozhodující vliv v další léčbě. Je proto velmi důležité pokročilost choroby přesně určit. Klíčové především je, zda se nádor dostal "za hranici" prostaty, tedy zda ložisko opustily metastázy, které se nejčastěji šíří do kostí. Stanovení pokročilosti karcinomu prostaty se nazývá staging.

**Gleasonův systém** je založen na posouzení architektiky nádorových žlázek, rozděluje nádory do **5 stupňů**: od G1 (nejvíce diferencovaný - nejméně zhoubný) do G5 (nejméně diferencovaný - nejvíce zhoubný, agresivní). **Gleasonovo skóre** je dáno součtem dvou nejvýznamnějších stupňů diferenciaci nádoru. Gleasonovo skóre větší než 7 je považováno za velmi rizikové a je spojeno s výrazně horší prognózou pacienta.

### 2.3.5 Léčba rakoviny prostaty

#### Léčba nádoru omezeného na prostatu

**Prostatektomie**: proběhne-li operace bez komplikací a prostatu se podaří odstranit s celým nádorem a metastázy v uzlinách nebyly nalezeny, je vysoká pravděpodobnost úplného uzdravení.

**Aktinoterapie** (radioterapie): nádorové buňky jsou na ozáření citlivější než zdravé buňky. Toho se využívá při léčbě zářením.

**Brachyterapie** (ozařování z krátké vzdálenosti) je charakterizována vysokými dávkami záření přímo v oblasti nádoru a rychlým poklesem dávky do okolí. Do oblasti nádoru se nejprve zavede aplikátor, po rentgenové kontrole jeho správné pozice se připojí k přístroji, ze kterého vyjíždí radioaktivní iridiové zrno.

### **Léčba pokročilého karcinomu prostaty**

Vývoj buněk prostaty, a to jak zdravých tak nádorových, je závislý na mužském pohlavním hormonu **testosteronu**. Ten ovlivňuje jak nádorové buňky, rostoucí přímo v prostatě, tak nádorové buňky v metastázách, v druhotných ložiscích mimo prostatu (mízních uzlinách, plicích, kostech). Snížení hladiny testosteronu v krvi nebo blokáce jeho účinku může zastavit nebo zpomalit růst nádoru. Na tomto faktu jsou založeny léčebné postupy u pokročilé rakoviny prostaty.

**Odstranění varlat (orchiektomie):** operací se docílí téměř naprosté zastavení produkce testosteronu, neboť většina testosteronu se tvoří právě ve varlatech.

**Hormonální léčba:** mezi prověřené úspěšné léčebné postupy při pokročilém karcinomu prostaty patří hormonální léčba pomocí ženských pohlavních hormonů – estrogenů nebo látek blokujících působení testosteronu, tzv. antiandrogenů.

**Léčba depozitními analogy gonadotropin releasing hormonu (GnRH):** tyto látky inhibují tvorbu testosteronu ve varlatech.

### **2.4 Androgenní receptor (AR)**

Signály androgenů jsou přenášeny do buňky přes AR. Androgeny vázající AR funguje jako transkripční faktor k regulaci genů zapojených do fyziologických pochodů těla, hlavně diferenciaci pohlaví, pohlavním dozrávání a počátku spermatogeneze.

Androgenní receptor patří do početné rodiny jaderných receptorů, která zahrnuje receptory pro estrogeny, glukokortikoidy, progesteron, mineralokortikoidy, vitamín D, tyreoidální receptor a receptor pro kyselinu retinoidovou. AR je kromě sleziny přítomen ve všech tkáních lidského těla.

Je uložen na dlouhém raménku chromosomu X (v pozici Xq11-12) a obsahuje osm exonů. Primární struktura lidského AR byla určena klonováním a charakterizací cDNA(komplementární DNA). AR protein je složen z 910 až 919 aminokyselin. Molekulovou hmotnost má přibližně 110 kDa. Jeho velikost je díky polymorfismům v 1. exonu (různý počet opakování trinukleotidových sekvencí (CAG)<sub>n</sub> a (GGC)<sub>n</sub>) značně variabilní.

AR má tři hlavní domény: transaktivační doménu, centrální doménu, kterou se receptor váže na DNA, a C-terminální doménu, která váže ligand. Transaktivační doména (TAD), lokalizovaná při N-

konci proteinu (N-terminální), je kódována prvním, největším exonem. Uvnitř TAD jsou dva úseky tvořené repetitivy aminokyselin glutaminu (kódovaného CAG) a glycinu (kódovaného GGN). (Obr. č.1v příloze)

Repetice jsou polymorfní tím, že se jejich velikost u jednotlivců v normální populaci liší. Úlohou domény je přenos signálu na iniciační místo transkripce. V důsledku variability tuto doménu nejlépe rozpoznávají protilátky při imunitní reakci. DNA vázající doména (DBD) je kódována exony 2, 3 a částečně 4. Patří mezi nejkonzervovanější struktury v rodině steroidních a tyreoidálních receptorů; např. mezi androgenními a glukokortikoidními receptory existuje 80% homologie. Typické pro tuto část receptorové bílkoviny jsou tzv. zinkové prsty, tvořené dvěma peptidovými smyčkami, jež jsou fixovány čtyřmi cysteinovými zbytky, koordinovanými s centrálním atomem zinku. Prostřednictvím těchto struktur se komplex hormon-receptor váže na DNA v místech tzv. androgeny regulovaných elementů (ARE) v promotorové oblasti kontrolovaného genu. Je známo, že při steroidní regulaci transkripce spolupracují vždy dvě molekuly receptoru, které se vážou na dva ARE. K dimerizaci AR dochází prostřednictvím DNA vázající domény.

Androgen (ligand) vázající doména (LBD) při karboxylovém konci proteinu (C-terminální), kódovaná exony 4 až 8, obsahuje specifické vazebné místo pro androgen. Vazbou ligandu dojde ke konformačním změnám celého receptoru, který zaujme formu schopnou interakce s DNA.

Receptor může být funkční, tj. nejen se vázat na ARE, ale může zprostředkovat i transaktivaci vedoucí k transkripci příslušného genu, a to i bez LBD. Doména zřejmě slouží jako represor funkce celého receptoru, jenž se stane funkčním teprve navázáním androgenu s následnými konformačními změnami.

V klidovém stavu se totiž na tuto část vážou proteiny teplotního šoku (heat-shock proteins, hsp), zejména hsp90, které účinkují jako vlastní specifické represory funkce receptoru a po vazbě hormonu dojde k jejich disociaci. AR je lokalizován v cytoplazmě, kde se váže na proteiny tepelného šoku (zvláště hsp 90, 70, 54, 56), které jej chrání před degradací proteolytickými enzymy.

AR může být aktivován testosteronem (T) nebo dihydrotestosteronem (DHT). DHT má však mnohonásobně vyšší afinitu k AR. Po aktivaci mužskými pohlavními steroidy působí AR v jádře a zprostředkovává biologické působení těchto hormonů na cílové buňky tím, že aktivuje transkripci androgen-dependentních genů.

Jakmile se naváže ligand (T nebo DHT), dochází ke konformační změně receptoru, a tím k uvolnění proteinů tepelného šoku. Následuje fosforylace receptoru, která přispívá ke stabilizaci AR a hraje roli v transkripční aktivitě a v interakci AR s koaktivátory. Komplex receptoru s navázaným ligandem se přesunuje do jádra buňky.

AR zde dimerizuje a jako homodimer nasedá na specifické sekvence DNA v blízkosti promotorů cílových genů, které nazýváme androgeny regulované elementy. K aktivaci transkripce je

potřeba ještě řady dalších koaktivátorů - jaderných proteinů, jež napomáhají vazbě AR na promotorovou oblast a zpřístupňují DNA k přepisu.

Koregulátor bývá většinou definován jako protein reagující s jadernými receptory k zvýšení transaktivace(koaktivátor) nebo snížení transaktivace(kopressor) cílových genů, ale zásadně neovlivňuje základní transkripční rychlost

#### **2.4.1 CAG polymorfismy genu AR**

Exon 1 genu AR obsahuje oblast, kde se vyskytují trinukleotidové repetitivní sekvence bází CAG. Tato konkrétní oblast ovlivňuje délku vznikajících polyglutaminových řetězců v AR. Bylo zjištěno, že počtu CAG repetice je nepřímo úměrná exprese AR v buňce. (Gellman, 2002)

CAG repetice jsou vysoce polymorfické. U zdravé populace se obvykle objevují repetice obsahující 9-31 CAG. Nejčastější jsou repetice obsahující 18-21 CAG.(Sulek et al., 2005) Vychýlení počtu repetice může způsobit různé zdravotní potíže. Repetice kratší než 7 mohou způsobit u mužské populace infertilitu. Naopak, jsou-li delší než 40 (40-62), může se objevit onemocnění známé jako SBMA (Kennedyho choroba).

Předpokládá se také, že délka CAG repetice může ovlivňovat riziko vzniku karcinomu prostaty. (Giovannucci, 2002) Tento vztah však zatím nebyl přesvědčivě dokázán. A výsledky výzkumů, zabývajících se touto problematikou, se značně odlišují.

#### **2.5 MSMB gen**

MSMB gen se nachází na lokusu 10q11.2. Tento gen kóduje  $\beta$ -microseminoprotein (prostatic secretory protein 94, PSP94). Předpokládá se, že tento protein funguje jako tumor supresor. Tento předpoklad byl vysloven na základě studií, které sledovaly hladiny  $\beta$ -microseminoproteinu během progresu karcinomu. S postupem karcinomu exprese  $\beta$ -microseminoproteinu klesá, až úplně vymizí. Tento fakt byl také v minulosti využíván jako marker, který signalizoval návrat karcinomu po úspěšné léčbě.

Expresi  $\beta$ -microseminoproteinu ovlivňuje SNP rs10993994. Nachází se na genu MSMB a vyskytuje se ve třech podobách. Tyto podoby se liší v přítomných bázích. Tzv. wild-type (přirozená forma), kde jsou na alelách přítomny báze cytosin-cytosin (C/C) a mutované typy- cytosin-thymin (C/T), thymin-thymin (T/T). Riziková alela MSMB-T vykazovala jen 13% aktivity promotoru oproti alele MSMB-C. Menší hladina  $\beta$ -microseminoproteinu u mutované alely může pomoci vzniku karcinomu prostaty. V mnoha případech byla při zjištění mutované formy alely zjištěna i zvýšená hladina PSA. Ovšem tento fakt může být způsoben častějším projevením karcinomu u mužů s tímto typem alely.

### 3. Metodika a materiál

Do této práce jsou zahrnuty vzorky získané od pacientů a také vzorky získané od běžné populace.

Vzorky od pacientů byly převzaty z urologického oddělení NsP NJ, radioterapie a.s. a komplexního onkologického centra. Jednalo se o pacienty s potížemi s prostatou. Rozčlenili jsme je do dvou skupin:

1. Pacienti pozitivní AAP- diagnostikováni acinární adenokarcinom prostaty.
2. Pacienti negativní AAP- diagnostikováni: adenofibromyomatózní hyperplasie, adenomyomatózní hyperplasie, benigní hyperplasie, hypertrofie; bez známek nádorových změn v prostatě.

Celkově se jednalo o soubor 79 pacientů.

Populační vzorek pocházel z DNA banky a původně sloužil jiným výzkumům. Vzorky byly anonymní, bylo známo pouze pohlaví a rok narození. Soubor obsahoval 205 vzorků, z toho 111 žen a 94 mužů.

Použité metody:

DNA byla získána z periferní nesrážlivé krve odebrané do EDTA odběrovou soupravou na krevní obraz. Poté následovala izolace dna z 600μl krve, vysolovací metoda (protokol č.1 ). Cílová sekvence DNA byla amplifikována PCR reakcí (protokol č.2). PCR produkt byl hodnocen dvěma způsoby. Buď byl sledován počet CAG repetice na PAGE (protokol č.3) nebo kombinováním metody fragmentační analýzy s paralelním sekvenováním.

MSMB polymorfismus rs10993994 byl sledován SNP analýzou DNA v přístroji Lightcycler 480 II – ROCHE.(Obr. č.2 v příloze)

Další použité přístroje:

-PCR- termocycler- Biometra(Obr. č.3 v příloze)

-paralelní sekvenování-sekvenátor,3130 Genetic analyzer- AB(Obr. č.4 v příloze)

-fragmentační analýza- Avant genetic analyzer(Obr. č.5 v příloze)

-elektroforéza- vertikální elektroforéza(Obr. č.6 v příloze)

## Protokol č. 1 - Izolace lidské DNA

(Metoda vysolovací - kit Puregene, Gentra)

1. **600 µl krve** přelít do 1.5 ml sterilní mikrozkušavky
2. přidat **900 µl RBC Lysis solution** a dobře promíchat
3. inkubovat při pokojové teplotě 1 - 5 min., během inkubace 3x promíchat
4. centrifugovat 14 000rpm/1min
5. odsát supernatant tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek
6. přidat **600 µl RBC Lysis solution** a promíchat
7. centrifugovat 14 000rpm/1min
8. odsát supernatant
9. zhomogenizovat pelet na vortexu
10. přidat **600 µl Cell lysis solution** a **6 µl proteinázy K** (1mg/ml), jemně vortexovat
11. inkubovat v termostatu při 37 °C do rozpuštění (cca 30 - 60 min)
12. ochladit na pokojovou teplotu
13. přidat **150 µl Protein precipitation solution**
14. vortexovat při maximální rychlosti 20 - 30 sec.
15. centrifugovat 14 000rpm/1min
16. přenést supernatant do čisté 15 ml zkumavky (POPSAT!), obsahující **600 µl 96% Isopropanolu**
17. promíchat převrácením, pozorovat vysrážení DNA,
18. centrifugovat 14 000rpm/1min
19. opatrně odsát supernatant a přidat 600 µl **70% etanolu** - oplach DNA
20. centrifugovat 14 000rpm/1min
21. opatrně odsát ethanol
22. DNA nechat vyschnout při +37°C v termobloku (asi 10 - 30 min)
23. přidat **100 µl DNA Hydration Solution** a rozpustit DNA při 37°C/1 h v termobloku
24. změřit koncentraci DNA na spektrofotometru
25. během analýz DNA uchovávat v lednici při +4°C a potom skladovat při -20 až -80°C

## Protokol č. 2 - Polymerázová řetězová reakce (PCR)

### Chemikálie:

- Primery

#### Fragmentační analýza:

**CAGF:** 5'- FAM- ACA CTC TCT TCA CAG CCG A- 3'

**CAGR:** 5'- ACT GGG ATA GGG CAC TCT GCT - 3'

#### Gelová analýza:

**AR-CAGF** 5'-ACC CAG CAG CTT TCC AGA A - 3'

**AR-CAGR** 5'-TTG CTG TTC CTC ATC CAG GA - 3'

- Injekční voda
- dNTPs
- 1x TBE pufr
- BioTaq DNA polymerase (Bioline)
- DNA
- MgC<sub>2</sub>

### Pracovní postup

- Příprava Master Mixu

Amplifikace probíhá v PCR zkumavkách (0,2 nebo 0,5 ml). Master Mix se připravuje do označených sterilních mikrozkušavek pro potřebný počet vzorků, včetně kontrol a blanku.

**Tab.č.1: Složení Master Mixu pro 1 reakci**

Master Mix	1 reakce (μl)
H <sub>2</sub> O	36,3
10x PCR pufr	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
dNTPs (2mM)	5
BILI90-92 F/R (20pM)	1
BioTaq polymeráza	0,2
DNA	1
<b>celkem</b>	<b>50</b>



Poté vložit mikrozkušavky do termocycleru a spustit program č.93. Po skončení programu mikrozkušavky vytáhnout.

### Protokol č. 3 - Vertikální elektroforéza

1. Sestavit aparaturu na elektroforézu.

2. Připravit PAGE

#### Příprava zásobního roztoku PAGE:

zásobní roztok-40% acrylamid

-380g acrylamid

-20g NN-bis-acrylamid

-600g H<sub>2</sub>O

#### Příprava pracovního roztoku PAGE ze zásobního roztoku:

Pracovní roztok- 8% acrylamid

-20ml 40% acrylamid

-70ml H<sub>2</sub>O

-10ml TBE(trisborátedita)

-150μl 25% amoniumpersulfát

-150μTEMED

3. Připravený pracovní roztok PAGE vlít mezi skla aparatury a vložit hřeben.

4. Vložit aparaturu do pufrem.

5. Po 15 minutách vyjmout hřeben.

6. Vypláchnout vzniklé jamky pufrem. Injekční stříkačku naplnit pufrem, vložit do jamky a vypláchnout.

7. Nanést obarvenou DNA do jamek.

8. Přiklopit víko a spustit elektroforézu.

### **Protokol vertikální elektroforézy s denaturačním roztokem acrylamidu:**

1. Sestavit aparaturu na elektroforézu.
2. Připravit denaturační roztok acrylamidu

#### Příprava zásobního roztoku denaturačního acrylamidu:

zásobní roztok-40% acrylamid

-200ml 40% acrylamid

-100ml TBE(10x)

-420g Urea (nejdříve rozpustíme v H<sub>2</sub>O)

-280ml H<sub>2</sub>O

Než se urea rozpustí, tak zahřívát. Roztok skladujeme při 4°C.

#### Příprava pracovního roztoku denaturačního acrylamidu ze zásobního roztoku:

Pracovní roztok

-100ml zásobního denaturačního roztoku

-150μl APS

-150μTEMED

3. Připravený roztok vlit mezi skla a vložit hřeben.
4. Po 15 minutách vyjmout hřeben.
5. Jamky vypláchnout pufrém. Do injekční stříkačky nasát pufr, jehlu vložit do jamky a jemným proudem vytlačeného pufru propláchnout.
6. Aplikovat do jamek obarvenou DNA.
7. Přiklopit víko a spustit elektroforetický proces.

#### **Po asi 1-2h.**

1. Ukončit elektroforézu, rozebrat aparaturu a uvolnit ze skel opatrně gel.
2. Opláchnout gel proudem destilované vody.
3. Opláchnout gel v destilované vodě. V misce.
4. Připravit fixační roztok.

-1:1

-5% kyselina octová):15% methanol

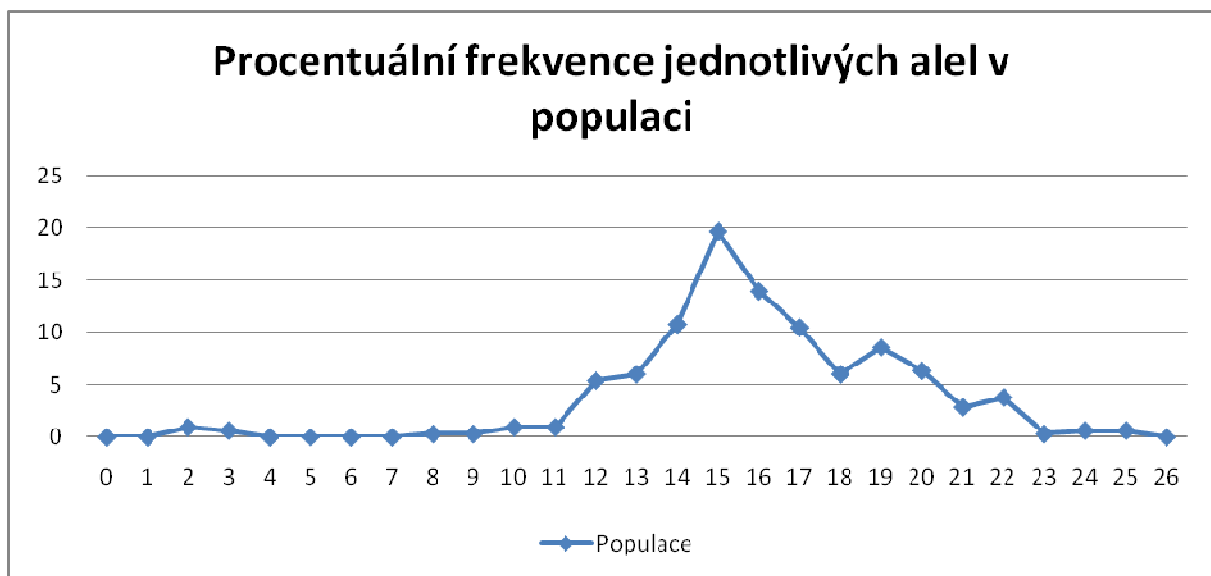
5. Odlít vodu a nalít fixační roztok. Vložit na 5 minut na třepačku.
6. Odlít fixační roztok a nalít nový. Vložit na 5 minut na třepačku.
7. Opláchnout destilovanou vodou. 10-30s
8. Vlít roztok  $\text{AgNO}_3$ .
9. Připravit vývojku:
  - 1:1:1
  - 300ml 1,5% NaOH
  - 300ml  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (0,24g/300ml)
  - 300ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 1800 $\mu\text{l}$  formaldehyd
10. Odlít  $\text{AgNO}_3$  a dvakrát 10s oplachovat gel tekoucí destilovanou vodou.
11. Opláchnout gel 1,5% NaOH. Maximálně 10s.
12. Nalít vývojku a pozorovat vývoj.
13. Když je vývoj ukončen, odbarvení gelu vypadá hodnotitelně(Obr. č7 v příloze), vývojku odlít a nalít 5% kyselinu octovou.

## 4. Výsledky

### 4.1 CAG repetice - populace

Délka CAG repetic v populaci je velmi variabilní (Graf č. 1). V námi pozorovaném populačním vzorku se vyskytovaly repetice od 2 do 25 CAG repetic. Až do 11 repetic se jednotlivé alely vyskytují s frekvencí menší než 1%, od 11 repetic se výskyt jednotlivých alel zvyšuje, průměrně o 3,5% na alelu až po 15 repetic, což je nejfrekventovanější alela v námi sledované populaci. Od tohoto počtu repetic frekvence jednotlivých alel postupně klesá, průměrně o 3,5% na alelu, až po alelu s 18 repeticemi. Zde jsme zaznamenali opětovný nárůst o 2,5% u alely s 19 repeticemi. Poté následuje sestup průměrně o 2,5% až k alele s 21 repeticemi, u alely s 22 repeticemi jsme zaznamenali nárůst o 1%. Další alely se vyskytují s četností menší než 1%. Přesnou frekvenci pro jednotlivé alely ukazuje tabulka č. 1 v příloze.

Graf č. 1

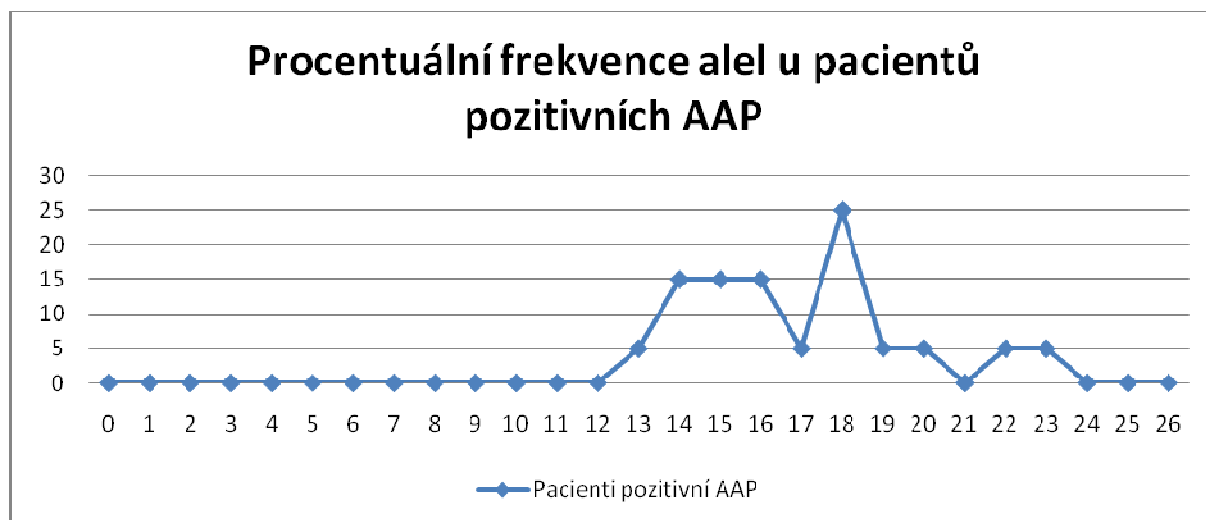


Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetic

#### 4.2 CAG repetice - pacienti pozitivní AAP

U pacientů pozitivních AAP jsme pozorovali také velkou variabilitu (Graf č.2). Zaznamenali jsme výskyt alel s 13 až 23 repeticemi. Výraznou převahu má alela s 18 repeticemi. Další významně zastoupené alely jsou alely s 14, 15, 16 repeticemi. Ostatní alely jsou zastoupeny v menší míře. Přesnou frekvenci pro jednotlivé alely ukazuje tabulka č. 1 v příloze.

Graf č.2

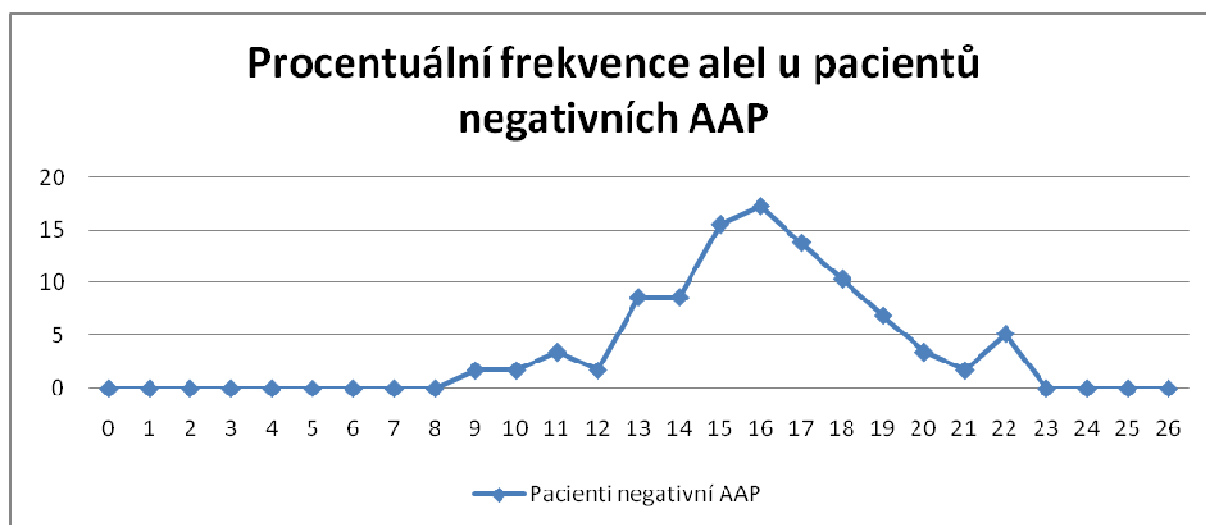


Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetice

#### 4.3 CAG repetice - pacienti negativní AAP

Délka CAG repetice u pacientů negativních AAP vykazuje také velkou proměnlivost.(Graf č.3) Zjistili jsme hodnoty od 9 do 22 repetic. Významné zastoupení v porovnání s ostatními vykazaly repetice 13 až 19 a 22. Nejfrekventovanější alela je alela s 16 repeticemi. Podobně jsou zastoupeny i alely s 15 a 17 repeticemi. Přesnou frekvenci pro jednotlivé alely ukazuje tabulka č. 1 v příloze.

Graf č.3

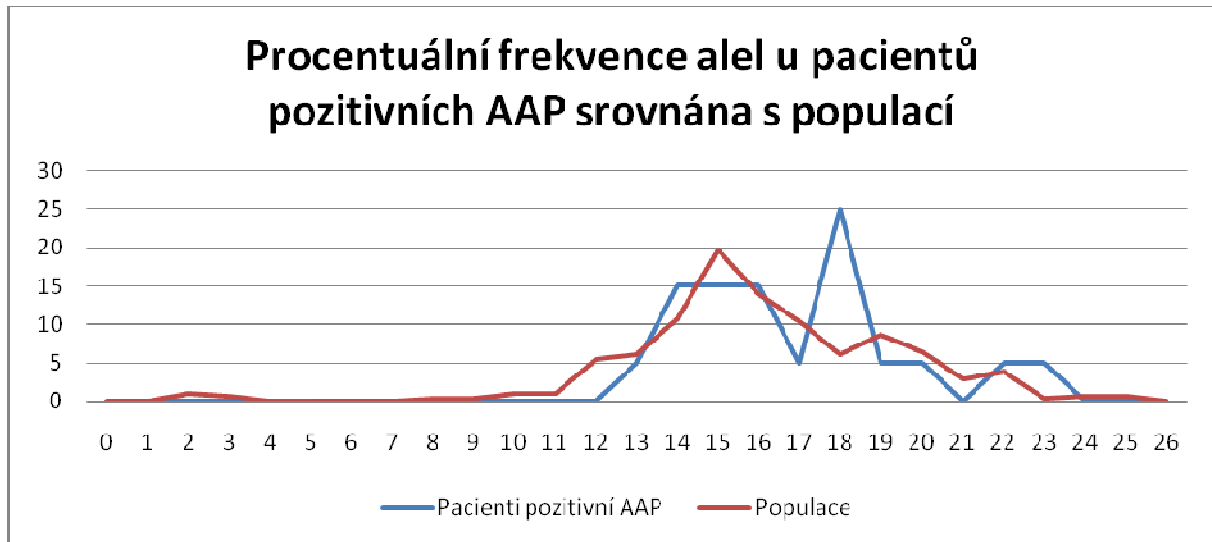


Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetice

#### 4.4 CAG repetice - porovnání pacientů pozitivních AAP s populací

Průběh křivky, která vyjadřuje procentuální zastoupení alel pacientů pozitivních AAP se odlišuje od průběhu křivky vyjadřující procentuální zastoupení alel populace.(Graf č.4) Velmi výraznou odchylku je možné pozorovat u varianty s 18 CAG repeticemi. Pacienti pozitivní AAP zde vykazali o 19% vyšší výskyt této alely než populace.

Graf č.4

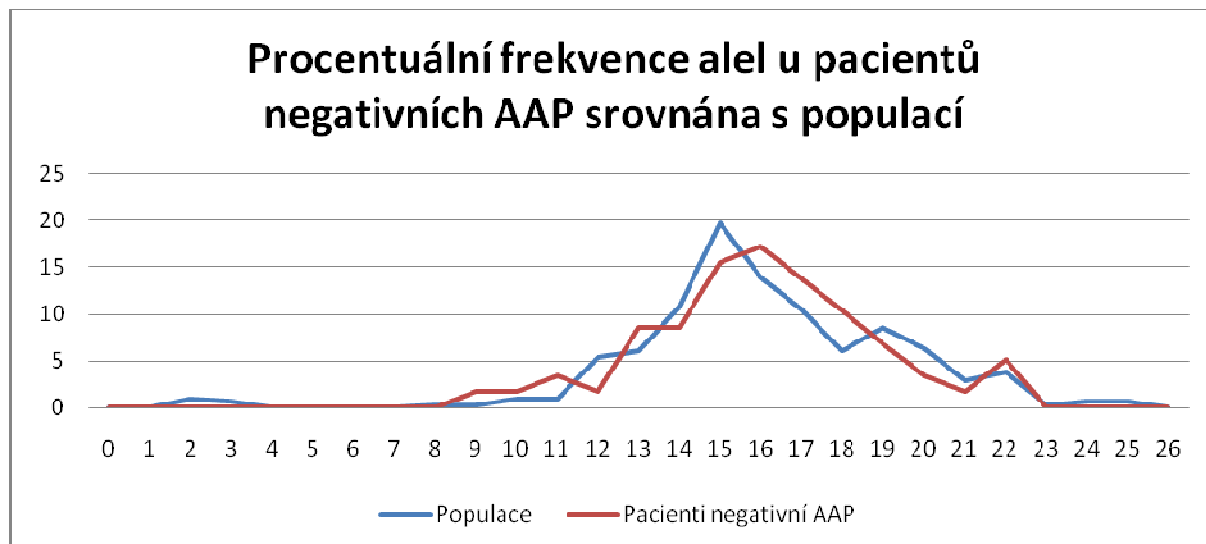


Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetic

#### 4.5 CAG repetice - srovnání pacientů negativních AAP s populací

Srovnání procentuální frekvence alel pacientů negativních AAP s procentuální frekvencí alel populace neukázalo tak významnou odchylku, jako srovnání pacientů pozitivních AAP s populací. I zde se však malé odchylky dají nalézt. U pacientů negativních AAP je nejfrekventovanější alelou varianta s 16 repeticemi, zatímco nejfrekventovanější alelou u populace je varianta s 15 repeticemi.

Graf č.5

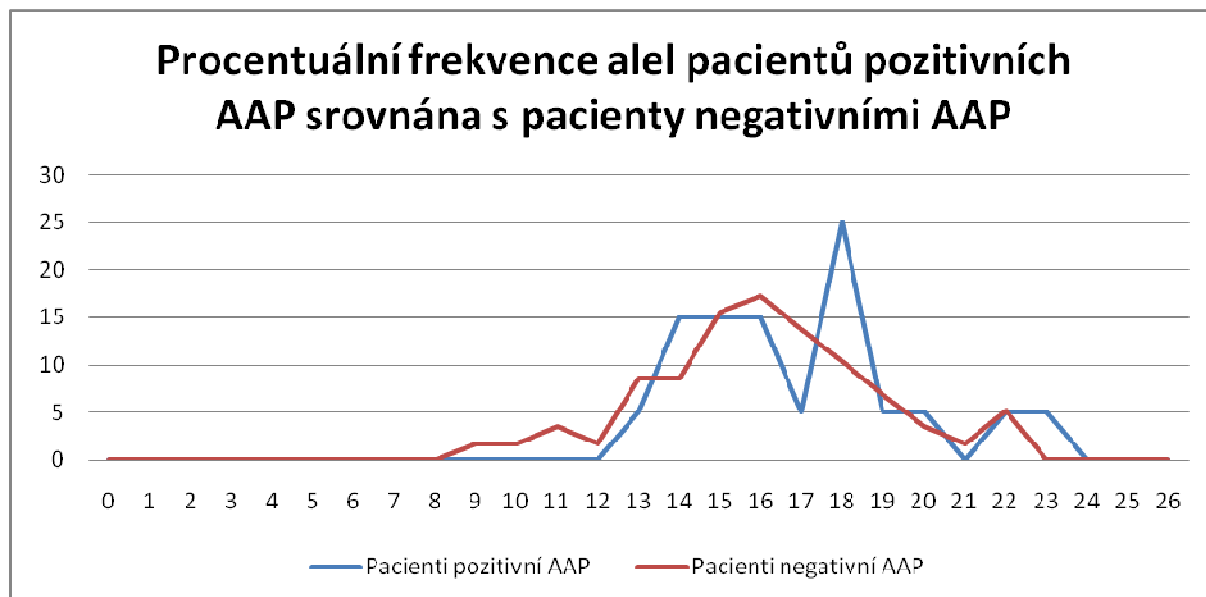


Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetic

#### 4.6 CAG repetic - srovnání pacientů pozitivních AAP s pacienty negativními AAP

Srovnání těchto dvou skupin vypadá podobně jako srovnání populace s pacienty pozitivními AAP.

Graf č.6



Svislá osa-stupnice ukazuje procenta, vodorovná osa- počet CAG repetic

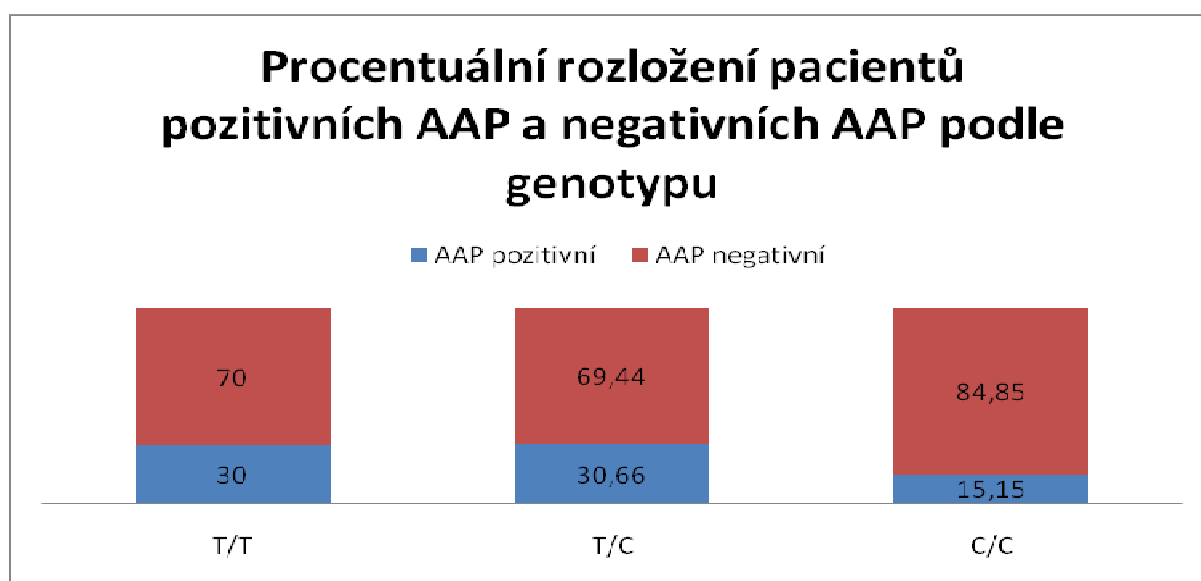


#### 4.7 Polymorfismus MSMB genu rs10993994

Provedli jsme skenování na tento polymorfismus u 79 pacientů. U 10 z nich jsme zjistili genotyp T/T, u 36 z nich genotyp T/C a u 33 z nich genotyp C/C. Procentuálně vyjádřeno - 12,66% genotyp T/T, 45,57% genotyp T/C, 41,77% genotyp C/C. (Graf č.1 v příloze) Abychom potvrdili průkaznost našeho vzorku, provedli jsme výpočet Hardy-Weinbergovy rovnice. Pozorovaná alelická frekvence se shodovala s vypočítanou, jedná se tedy o průkazný vzorek. (Tab. č.2 v příloze)

U 30% pacientů nesoucích genotyp T/T byl potvrzen AAP, stejně tak u 30,66% pacientů nesoucích genotyp T/C byl zaznamenán AAP. Oproti tomu pouze u 15,15% pacientů nesoucích genotyp C/C byl diagnostikován AAP.

Graf č. 7



První sloupec zleva vyjadřuje kolik pacientů nesoucích genotyp T/T bylo pozitivní AAP, prostřední sloupec ukazuje kolik pacientů nesoucích genotyp T/C bylo pozitivních AAP a poslední sloupec ukazuje kolik pacientů nesoucích genotyp C/C bylo postiženo AAP.

## 5. Diskuze

Androgeny jsou hlavním stimulem pro proliferaci buněk, růst a správný vývoj prostaty. Zvýšená sekrece androgenů a polymorfismus v genu androgenního receptoru mohou mít souvislost s rozvojem a vznikem karcinomu prostaty.

Naše práce je mimo jiné zaměřena na polymorfismus v genu androgenního receptoru, konkrétně na polymorfni úsek CAG repetice, který se nachází na prvním exonu tohoto genu. V této práci jsme se snažili prokázat možnou souvislost mezi délkou CAG repetice a rozvojem karcinomu prostaty.

Objasnění této problematiky již bylo cílem mnoha výzkumů; jejich výsledky se však značně odlišují. Tato odlišnost může být způsobena jak nedostatečným počtem vzorků, tak různou interpretací výsledků.

Giovannucci et al. ve svém výzkumu z roku 2002 zjistil, že pacienti nesoucí počet CAG repetice menší než 22 jsou více náchylnější k rozvoji karcinomu prostaty, a že je tento projev výraznější u mladších mužů. U starších mužů zřejmě není vliv délky CAG repetice tak signifikantní. Standfort et al. předpokládá snížení rizika vzniku karcinomu prostaty o 3% s každou přidanou CAG repeticí. Oproti tomu Platz et al. neprokázal žádnou spojitost mezi délkou CAG repetice a rozvojem karcinomu prostaty. Stejně tak Ethan et al. neprokázal vliv CAG repetice na vznik karcinomu prostaty.

V našem výzkumu založeném na sledování jednotlivých alel, jsme zjistili, že u pacientů pozitivních AAP se nejčastěji vyskytuje varianta 18 CAG repetice, která však v populaci není příliš častá. Rozdíl mezi populací a pacienty pozitivními AAP u této alely tvořil 19%. Oproti tomu srovnání pacientů negativních AAP s populací nevykázalo žádné tak významné odchylky. Je známo, že exprese genu AR je nepřímo úměrná délce CAG repetice, tedy čím kratší CAG repetice, tím častější je aktivace AR a tedy i exprese androgen dependentních genů. Dále se spekuluje o tom, že kratší polyglutaminové řetězce více reagují s koaktivátory např. p160 a další. (Germann, 2002) A to může také přispívat ke zvýšené aktivitě AR a tím pádem i expresi AR dependentních genů. Možná má alela nesoucí 18 repetice onu ideální délku a tím pádem jsou buňky více vystaveny působení an

drogenů. Je však jisté, že nejen délka CAG repetice rozhoduje o tom, jak bude androgenní receptor reagovat s androgeny. Jedná se o gen dlouhý 90 kbp skládající se z 8 exonů, je tedy jasné, že faktorů, které tyto děje ovlivňují, bude více. Také je silně ovlivněn koaktivátory a aberace v genech kódujících koaktivátory mohou také přispívat k rozvoji onemocnění.

Dalším významným faktorem je hladina androgenů kolujících v těle. Ukazuje se, že při kastraci a snížení hladiny androgenů se zvýší počet AR až o 20% a AR začne reagovat i s látkami,

s kterými předtím nereagoval.(Gelmann, 2002) Proto někteří pacienti nereagují na léčbu odebráním androgenů.

Protein, který kóduje MSMB gen, je považován za tumor supresor. Proto pokles jeho hladiny může zvýšit riziko vzniku karcinomu prostaty. Je dokázáno, že u některých rozvinutých karcinomů prostaty je hladina  $\beta$ -microseminoproteinu prakticky nulová. Na expresi má významný vliv polymorfismus rs10993994; konkrétně přítomnost thyminu. Přítomnost této báze má za následek snížení aktivity promotoru na 13% původní aktivity. (Lou et al., 2009) Výsledkem může být vznik karcinomu prostaty. Přesná funkce  $\beta$ -microseminoproteinu ještě není známa. Je však součástí ejakulátu.

V námi sledovaném vzorku pacientů jsme zjistili, že ve skupině pacientů nesoucích mutované alely T/T a T/C je výskyt AAP o 15% větší než u wild-type alely C/C. Z toho vyplývá, že  $\beta$ -microseminoprotein zřejmě opravdu funguje jako tumor supresor a je jedním z faktorů ovlivňujících vznik karcinomu prostaty.

Dalším zajímavým zjištěním je, že i přes vyšší náchylnost ke karcinomu prostaty, bylo zastoupení genotypů s mutovanou alelou T větší než wild type alely. Nejspíše to bylo způsobeno tím, že jsme polymorfismus rs10993994 pozorovali pouze u pacientů, a tak nemáme srovnání s průměrnou populací. Přesto odhalení tohoto faktu může pomoci lékařům vylepšit diagnostické metody a také přispět preventivním genetickým screeningům, díky kterým snad budeme schopni lépe monitorovat muže nesoucí rizikové geny.

Také vyplývá na povrch otázka, zdali přítomnost 18 CAG repetice a polymorfismu rs10993994 má za následek vyšší riziko karcinomu prostaty. Toto se nám nepovedlo potvrdit, ale ani to nemůžeme vyvrátit. Přítomnost mutované alely T jsme zaznamenali v 3/4 případů. Nevyplývá z toho však to, že přítomnost těchto dvou polymorfismů zároveň u jedince znamená jistou rakovinu. Může to však tomu nasvědčovat.

## 6. Závěr

Každý den je diagnostikováno mnoho nových případů rakoviny. Rakovina prostaty v těchto statistikách hraje nemalou roli.

Abychom rakovinu mohli včas odhalit, správně diagnostikovat a co možná nejefektivněji vyléčit, je nezbytně nutné správně pochopit a popsat všechny možné faktory přispívající k jejímu vzniku. Proces vzniku rakoviny, je proces dlouhodobý, na kterém se podílí mnoho různých faktorů, od vlivu prostředí, přes dědičnost až po nahodilé mutace v lidském genomu. Mnohdy není jasná přesná příčina vzniku tohoto onemocnění. Pro správné pochopení rozvoje rakoviny a následnou nejvhodnější léčbu, je nezbytné zaměřit se na genetickou podstatu tohoto onemocnění, na jednotlivé odchylky v lidské genetické informaci, které mohou být s tímto onemocněním velmi úzce spjaty nebo dokonce mohou mít přímou souvislost.

Možnou souvislost s rozvojem rakoviny prostaty mohou mít odlišné délky CAG repetice v genu AR, karcinom prostaty také může ovlivnit polymorfismus MSMB genu. Cílem naší práce bylo prokázat možnou souvislost těchto polymorfismů a kancerogeneze v prostatě.

Počet CAG repetice nemá souvislost pouze s rakovinou prostaty, ale při výrazně menším počtu repetice dochází v mužské populaci k infertilitě. Při výrazně vyšším počtu CAG repetice se u mužů projevuje Kennedyho choroba neboli SBMA.

Stejně tak přítomnost polymorfismu MSMB genu rs10993994 automaticky neznamená, že se u člověka projeví karcinom prostaty. Pouze je zde zvýšené riziko.

Z našich výsledků vyplývá, že 18 CAG repetice zřejmě patří k rizikovým faktorům zapříčiňujícím vznik karcinomu prostaty. Dále přítomnost mutované alely polymorfismu rs10993994 zvyšuje výskyt karcinomu prostaty o 15% oproti genotypu C/C.

Naše výsledky mohou být použity k rozvoji diagnostických metod a také mohou sloužit k lepšímu pochopení vzniku tohoto onemocnění.

## 7. Seznam použité literatury

### Literatura:

- 1) Lam, J.S. and Reiter, R.E. 2006. Stem cells in prostate cancer development. *Urol. Oncol.-Semin. Orig. Investig.* **24**:131 – 140.
- 2) Liu, A.Y., True, L.D., LaTray, L., Nelson, P.S., Ellis, W.J., Vessella, R.L., Lange, P.H., Hood, L. and Van Den Engh, G. 1997. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10705-10710.
- 3) Schalken, J.A. and Van Leenders, G. 2003. Cellular and molecular biology of the prostate: Stem cell biology. *Urology* **62**: 11-20.
- 4) Huang, J., Yao, J.L., Di Sant'Agnes, P.A., Yang, Q., Bourne, P.A. and Na, Y. 2006. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate* **66**: 1399-1406.
- 5) Isaacs, J.T. and Coffey, D.S. 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.* **2**:33-50.
- 5) Rizzo, S., Attard, G. and Hudson, D.L. 2005. Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* **38**: 363-374.
- 6) Brdička, R., *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*, 2001, Grada Publishing, spol. s.r.o, ISBN 80-247-0188-9
- 7) Gelmann E.P., 2002, **Molecular Biology of the Androgen Receptor**, *American Society of Clinical Oncology.*, 0732-183X/02/2013-3001
- 8) Anna Sulek, Dorota Hoffman-Zacharska, Wioletta Krysa, Walentyna Szirkowiec, Elżbieta Fidziańska, Jacek Zaremba, 2005, *CAG repeat polymorphism in the androgen receptor (AR) gene of SBMA patients and a control group*, Department of Genetics, Institute of Psychiatry and Neurology
- 9) Edward Giovannucci, 2002, *Is the Androgen Receptor CAG Repeat Length Significant for Prostate Cancer?* Channing Laboratory, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Departments of Nutrition and Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts 02115
- 10) Hong Loua, Meredith Yeagerb, Hongchuan Lia, Jesus Gonzalez Bosquetc, Richard B. Hayesc, Nick Orrc, Kai Yuc, Amy Hutchinsonb, Kevin B. Jacobsd, Peter Krafte, Sholom Wacholderc, Nilanjan Chatterjeec, Heather Spencer Feigelsonf, Michael J. Thunf, W. Ryan Diverf, Demetrius Albanesc, Jarmo Virtamog, Stephanie Weinsteinc, Jing Mah, J. Michael Gaziano, Meir Stampferh, Fredrick R. Schumachere, Edward Giovannucci, Geraldine Cancel-Tassinck, Olivier Cussenotk, Antoine Valerik, Gerald L. Andriolel, E. David Crawfordm, Stephen K. Andersona, Margaret Tuckerc, Robert N. Hooverc, Joseph F. Fraumeni, Jr., Gilles Thomasd, David J. Huntere, Michael Deana, Stephen J. Chanock: *Fine mapping and functional analysis of a common variant in MSMB on chromosome 10q11.2 associated with prostate cancer susceptibility*; [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902104106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902104106), 2009
- 11) Ethan M. Lange, Hong Chen, Kristin Brierley, Heather Livermore, Kirk J. Wojno, Carl D. Langefeld, Kenneth Lange, and Kathleen A. Cooney: *The Polymorphic Exon 1 Androgen Receptor CAG Repeat in Men with a Potential Inherited Predisposition to Prostate Cancer*, 2000
- 12) Elizabeth A. Platz, Michael F. Leitzmann, Nader Rifai, Philip W. Kantoff, Yen-Ching Chen, Meir J. Stampfer, Walter C. Willett, Edward Giovannucci: *Sex Steroid Hormones and the Androgen Receptor Gene CAG Repeat and Subsequent Risk of Prostate Cancer in the Prostate-Specific Antigen Era*; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(5). May 2005

### **Internetové zdroje:**

**13) Študent, V.; Grepl, M.; Král, M; Hartmann, I.; Vidlář, A.; Hrabec, M.:** *Včasná detekce karcinomu prostaty*, 2008, Zdravotnické noviny - Příloha: Lékařské listy LL 14/2008

ISSN 1214-7664 (online verze; převzato z <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/vcasna-detekce-karcinomu-prostaty-377416> )

**14)** [http://is.muni.cz/th/36196/lf\\_d/Copy\\_of\\_LAST\\_disertacni\\_prace\\_m.txt](http://is.muni.cz/th/36196/lf_d/Copy_of_LAST_disertacni_prace_m.txt)

**15) Čermák, A.; Pacík, D.:** *Diagnostika karcinomu prostaty – současné možnosti a limitace transrektální ultrazvukem vedené biopsie prostaty*, 2002, Urologie pro praxi 4/2002 ISSN 1803-5299 (online verze; převzato z <http://www.solen.cz/pdfs/uro/2002/04/03.pdf>)

**16)** Dušek, P.: *Zhoubné nádory prostaty*, 2006; online verze; převzato z [http://www.linkos.cz/pacienti/prostata\\_clanek.php?t1=1&t2=1&t3=1&t=1](http://www.linkos.cz/pacienti/prostata_clanek.php?t1=1&t2=1&t3=1&t=1)

**17) Myslivcová N.:** Rakovina prostaty je nejčastější nádor českých mužů a přibývá jí převzato z <http://www.pramenyzdravi.cz/5108498/Rakovina-prostaty-je-nejcastejsi-nador-ceskych-muzu-a-pribyva-ji.php>

**18)** <http://ncbi.nlm.nih.gov>

**19 )**[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/results\\_merged/sect\\_23\\_prostate.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/results_merged/sect_23_prostate.pdf)

**20 )**MUDr. Jiří Heráček , doc. MUDr. Michael Urban MUDr. Miroslav Záleský MUDr. Vladimír Sobotka RNDr. Marcela Kosařová, Ph. D. MVDr. Dagmar Zudová, Ph. D. MVDr. Štěpánka Halouzková Ing. Tereza Brachtlová prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc.; *Gen pro androgenní receptor a mužská neplodnost*  
Převzato z :<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/gen-pro-androgenni-receptor-a-muzska-neplodnost-169655>