

MOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI KLINICKY SIGNIFIKANTNÍHO KARCINOMU PROSTATY

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CLINICALLY SIGNIFICANT PROSTATE CARCINOMA

Marek Schmidt¹, Ladislav Jarolím¹,
Jan Soukup², Jaroslav Mareš³

¹Urologická klinika 2. LF UK a FN Motol,
Praha

²Ústav klinické patologie 2. LF UK a FN
Motol, Praha

³Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK
a FN Motol, Praha

Došlo: 11. 12. 2009

Přijato: 26. 3. 2010

Kontaktní adresa

MUDr. Marek Schmidt
Urologická klinika 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
e-mail: mschmidt@centrum.cz

Práce byla podpořena grantem GA UK 200 090.

Souhrn

Schmidt M, Jarolím L, Soukup J, Mareš J.
Molekulární vlastnosti klinicky signifi-
kantního karcinomu prostaty

V posledních letech došlo k razantnímu zlepšení diagnostiky a léčby lokálně ohraničených forem karcinomů prostaty. Rozvoj nových diagnostických a léčebných metod přináší zvýšený záchyt karcinomu prostaty u pacientů, jejichž věk nebo komorbidity relativizují přínos zavedených léčebných metod. Rozhodování,

zda je konkrétní karcinom klinicky signifikantní, bývá často složité. Standardní prognostické faktory dosud tento problém nevyřešily. Familiární a hereditární výskyt karcinomu prostaty oprávněně vede současný výzkum na poli genetiky a namířil své úsilí k odhalování genetických dispozic jedince k vzniku tohoto onemocnění. Byla identifikována řada kandidátních genů i suspektních oblastí genomu, jejichž změny nebo polymorfismy bývají ve zvýšené míře přítomny u pacientů s karcinomem prostaty, případně v rodinách s jeho častějším výskytem. Detailní studium genetických změn a polymorfismů a vztahy mezi jednotlivými geny budou nepochybně v následujících letech předmětem intenzivního studia.

Klíčová slova:

karcinom prostaty, geny, genová exprese, mutace, polymorfismy, DNA, mRNA.

Summary

Schmidt M, Jarolím L, Soukup J, Mareš J.
Molecular characteristics of clinically sig-
nificant prostate carcinoma

In last years, diagnostics and treatment of localized prostate cancer were improved. Introduction of a new methods caused rising detection of patients, for whom, due to the age or comorbidities, radical therapy is with relative benefit. Decision, whether single cancer is for concrete patient clinically significant or not, is

often complicated. Common prognostic factors are not able to solve this problem. Familial and hereditary prostate cancer definition leads modern scientific research to detection of genetic dispositions of a single patient to develop a disease. There were detected a number of candidate genes and genomic areas, where alterations or polymorphisms are frequently present in patients with prostate cancer or

in prostate cancer families. Detail analysis of genetic alterations and polymorphisms and relationships between single genes will be an object of intensive research in next years.

Key words:

prostate cancer, genes, gene expression, polymorphisms, mutations, DNA, mRNA.

ÚVOD

Karcinom prostaty představuje závažný celosvětový medicínský problém. V Evropě je každoročně diagnostikováno asi 2,6 milionů nových případů. Tvoří asi 11 % všech nádorových onemocnění u mužů a v Evropské unii činí úmrtí na karcinom 9 % všech úmrtí na nádorová onemocnění a je druhou nejčastější onkologickou příčinou úmrtí po karcinomu plic. Přibližně 10 % všech mužů onemocní karcinomem prostaty a 3 % na něj zemrou. Při neustále se prodlužující průměrné délce života a zlepšující se dostupností zdravotní péče současně stoupá počet asymptomatických nemocných se zachyceným karcinomem prostaty, který by se za života pacienta nijak neprojevil. S tím koresponduje i skutečnost, že prevalence onemocnění ve vyspělých státech je trojnásobně vyšší než v rozvojových zemích. Významné rozdíly v incidenci a mortalitě jsou zaznamenány také v závislosti na rase. Nejvyšší incidence i mortalita se vyskytuje u příslušníků negroidní rasy, kteří mají i dvojnásobné riziko úmrtí ve srovnání s kavkazskou rasou. Nejnižší výskyt je naopak zaznamenán u Asiátů. Kromě zvažovaných genetických faktorů, predispozic a exogenních vlivů (např. strava, infekce nebo karcinogeny) se jako vysvětlení nabízejí sociálně-ekonomické a kulturní příčiny. Výskyt karcinomu prostaty u příslušníků armády různých ras ve stejných životních a sociálních podmínkách (stravování, lékařská péče) se prakticky neliší. Přesto jsou mezirasové rozdíly v incidenci natolik výrazné, že je nelze vysvětlit pouhými odlišnostmi chování a zvyklostí. Podle údajů ÚZIS činila incidence karcinomu prostaty v roce 2005 v České republice 97,1 nových případů na 100 000 oby-

vatel a mortalita 27,7/100 000. Data z dalších let nejsou k dispozici.

Dnes je většina nádorů prostaty, které nejsou zjistitelné palpačním rektálním vyšetřením detekována biopsií, indikovanou na základě zvýšeného PSA. Většina těchto karcinomů se vyvíjí směrem ke klinické závažnosti. Klinicky nesignifikantních karcinomů je pouze 3,8–16 %. Vyšetření PSA zřejmě není schopné detekovat malé nádory, jejichž sekrece celkovou hladinu markeru nezvyšuje.

Při absenci organizovaného screeningového programu je v době diagnostikování karcinomu klinicky lokalizovaných pouze 55 % tumorů. Asi 30–45 % pacientů s klinicky lokalizovaným onemocněním má při určování patologického stadia extrakapsulární rozšíření karcinomu. Zda se jedná o karcinom prostaty lokalizovaný, nebo lokálně pokročilý má pro pacienta z hlediska kurability zásadní význam. V prognóze dalšího průběhu onemocnění a z něj vyplývajících léčebných postupů mají význam pouze patologicko-anatomické stadium, Gleasonovo skóre nádoru a hladina prostatického specifického antigenu (PSA) v séru, která je v současné době jediným prakticky používaným markerem v diagnostice, volbě optimální terapie a sledování průběhu onemocnění a efektu léčby. Sledované genetické faktory zatím nenabýly praktického významu.

KARCINOM PROSTATY A DĚDIČNOST

Na polygenním původu onemocnění se kromě exogenních faktorů podílí významnou měrou

i genetické dispozice jedince. Odhad relativního rizika vzniku karcinomu prostaty u příbuzných v první linii je 0,64. Příbuzní pacientů mladších než 55 let mají vyšší riziko karcinomu prostaty než ti, u jejichž příbuzných došlo ke vzniku karcinomu prostaty ve vyšším věku. V rodinách s časnějším nástupem onemocnění existuje vyšší počet případů onemocnění. Karcinom prostaty lze rozdělit na tři fenotypy: sporadický, familiární a hereditární. Sporadické karcinomy vznikají u jedinců s negativní rodinnou anamnézou. Familiární karcinom prostaty je definován jako karcinom u muže s více než jedním příbuzným s karcinomem prostaty. Počet postižených členů rodiny a jejich věk v době vzniku karcinomu jsou mezi příbuznými nejdůležitějšími určujícími znaky rizik. Riziko u příbuzných 1. stupně je 2–3× vyšší a stoupá s počtem postižených členů rodiny. Při onemocnění 1, 2 nebo 3 členů rodiny se riziko odhaduje na 2 %, resp. 5 %, resp. 11 %. Relativně rizikovější je postižení bratra než otce (3,0–4,5 vs. 1,9–2,3 %) (1). Hereditární karcinom prostaty je podmnožinou familiární formy a je definován u rodiny s ≥ 3 členy postiženými karcinomem prostaty u tří po sobě jdoucích generací nebo u dvou postižených jedinců, u nichž je karcinom diagnostikován před dovršením 55. roku věku. Zatímco původ karcinomu prostaty je většinou polygenní, existenci skutečně hereditární formy dokazují pozorování, že příbuzní pacientů mladších než 55 let mají vyšší riziko vzniku karcinomu prostaty než ti, u jejichž příbuzných došlo ke vzniku karcinomu prostaty ve vyšším věku. Rozsáhlá skandinávská studie zahrnující 44 788 dvojčat identifikovala, že mezi dvojčaty s karcinomem prostaty je 42 % nádorů hereditárních (2). Sporadické karcinomy tvoří asi 85 % všech karcinomů prostaty a asi 15 % je familiárních a/nebo hereditárních. Hereditární karcinom prostaty tvoří asi 43 % onemocnění vznikajících v nižším věku (55 let nebo méně) ale pouze 9 % všech karcinomů vznikajících do 85. roku.

KANDIDÁTNÍ GENY

Z několika komplexních segregančních analýz byly získány důkazy o hlavních genech vedoucích k náchylnosti ke vzniku a rozvoji karcinomu prostaty. Přitom byla nalezena řada kandidátních genů, jejichž genetické alterace odrážejí predispozice k onemocnění karcinomem prostaty. Většina z nich vykazuje dominantní druh dědičnosti

(3). U starších pacientů jsou za vznik hereditárního karcinomu s vysokou pravděpodobností zodpovědné geny na chromozomu X (4).

Kromě popsaných kandidátních genů byly prokázány další oblasti s predispozičními faktory k onemocnění karcinomem prostaty na chromozomech 1q42.2–43, 1p36. Geny vázané na tyto lokality dosud nebyly izolovány, ani blíže popsány.

Další genomové studie větších skupin rodin s hereditárním karcinomem prostaty identifikovaly další oblasti chromozomů spojené s karcinomem prostaty:

HPC1

Gen *RNASEL* lokalizovaný v lokusu *HPC1* (1q24–25) byl prokázán pomocí studií genomu rodin s hereditárním karcinomem a potvrzen vazebnými studiemi (5, 6). Tento gen zřejmě kóduje antivirový a proapoptický enzym RNázu L, která je složkou degradační dráhy RNA a hraje významnou roli při zprostředkování biologického účinku interferonů, zejména při odpovědi na virovou infekci. Ztráta enzymatické aktivity RNázy L způsobuje větší náchylnost k virovým infekcím (7). U rodin s hereditárním karcinomem prostaty byla identifikována řada missense mutací genu *RNASEL* (8). Na jejich základě bylo prokázáno, že nukleotidový polymorfismus (SNP), 1385G $\rightarrow$ A způsobující substituci argininu za glutamin (R462Q) souvisí se zvýšeným rizikem karcinomu prostaty v USA, nikoliv však u německé a švédské populace (9–11). Mutovaná alela genu *RNASEL* s delecí kodonu 157 byla detekována u 6,9 % pacientů s CaP, zatímco u zdravých pacientů byla detekována pouze 2,9 % (12). Další práce popisují alelu genu s terminačním kodonem na pozici 265. aminokyseliny u 4,3 % pacientů s familiárním karcinomem, ale pouze u 1,8 % v kontrolní skupině (13). Epidemiologické údaje ukazují, že mutovaný gen *HPC1* je vzácný autozomálně dominantní gen s vysokou penetrancí, což znamená, že i když není u velkého množství karcinomů prostaty přítomen, individuální nositel bude s vysokou pravděpodobností postižen karcinomem prostaty. Karcinomy vázané na *HPC1* mají vyšší grade a pokročilejší stadium, přestože u sporadických karcinomů nejsou zaznamenány žádné histologické odlišnosti (14).

HPC2, HPC20, HPCX

Funkce genu *ELAC2/HPC2* (17p11) není dosud známa. Polymorfismus tohoto genu byl

suspektní ze zvýšeného rizika karcinomu prostaty u japonské populace. Další vazebné studie a genotypizace u různých populací však toto podezření nepotvrdily (15).

Gen *HPCX* (Xq27-28) byl nalezen na krátkém raménku chromozomu X u rodin s výskytem karcinomu prostaty. Toto bylo potvrzeno dalšími vazebnými studiemi. Bližší detaily o tomto genu zatím nejsou k dispozici (16).

Gen *HPC20* (20q13) je další suspektní gen identifikovaný v rodinách s hereditárním karcinomem prostaty. Vazebné studie však jeho vztah k riziku karcinomu prostaty zatím neprokázaly (19).

Geny regulující imunitní reakci

Gen *SR-A/MSR1* (8p22-23) patří mezi regulátory zánětu. Tento gen moduluje interakci hostitelských makrofágů, adhezi makrofágů, fagocytózu apoptotických buněk a mikrobů a detoxikaci mikrobiálních produktů. Absence genu *SR-A/MSR1* znamená větší náchylnost k bakteriálním infekcím. Mutace genu jsou asociované s vyšším rizikem karcinomu prostaty. Vyskytují se asi u 3 % pacientů se sporadickým karcinomem, zatímco u zdravých mužů pouze v 0,4 % (17). Bylo také prokázáno, že gen *SR-A/MSR1* se podílí na zprostředkování zánětu vedoucího k ateroskleróze (18).

Gen *MIC-1* (19p13) patří mezi transformující růstové faktory beta (TGF- β) a reguluje aktivitu makrofágů.

Gen *TLR4* (9q32-33) patří do skupiny genů nazvaných *TLRs* (toll-like receptors), podobných genu octomilky (*Drosophila*) Toll. Geny *TLRs* zprostředkovávají vrozenou imunitní reakci na mikrobiální infekci stimulací systému prozánětlivých cytokinů, které simultánně pomáhají potlačit počáteční infekci a stimulovat vývoj adaptivní imunitní reakce (20). Mutace genů *TLRs* mohou vést k nedostatečnosti mechanismu čištění patogenů a způsobit chronickou zánětlivou reakci na přetrvávající infekci (21).

Gen *PONI* (7q21.3) kóduje paraoxanáz, která se váže na lipoprotein o vysoké denzitě v séru a přispívá k detoxikaci organofosfatových sloučenin a karcinogenních, v tucích rozpustných volných radikálů z lipidové peroxidace (22). Stejně jako *SR-A/MSR1* i *PONI* hraje roli při zprostředkování zánětu vedoucího k ateroskleróze (23).

Reparační geny

Geny *CHEK2* (22q12.1), *BRCA2* (13q12.3) a *OGG1* (3p26.2) jsou významné při opravě DNA.

Gen *CHEK2* brání replikaci poškozené DNA koordinací opravy DNA, progresí buněčného cyklu a apoptózy (24).

Gen *BRCA2* podporuje opravu poškozené dsDNA pomocí homologní rekombinace.

Gen *OGG1* je DNA-glykosyláza/AP-lyáza, jež opravuje oxidační poškození DNA (25).

Tumor supresorové geny

Chromozomy 8p a 13q jsou velmi často poškozené u pacientů s karcinomem prostaty, ale také u pacientů s prostatickou intraepiteliální neoplazií (PIN). Na chromozomu 8 jsou to především oblasti 8p12-p21 a 8p22. V této oblasti se nalézá řada kandidátních genů, které by mohly patřit mezi tumor supresorové (např. geny *MSR1*, *NKX3.1* a *N33*) (tab. 1).

Na chromozomu 13 se vyskytuje retinoblastomový supresorový gen (*RBI*), jehož delece se běžně vyskytují při časně prostatické karcinogenezi (26).

Gen *NKX3.1* (8p21) je specificky exprimován v prostatě. Jeho produktem je prostatický specifický homeoprotein, regulující epiteliální růst a diferenciaci. Oblast 8p21, kde se vyskytuje, vykazuje ztrátu heterozygosity u 85 % karcinomů prostaty. Kompletní ztráta jeho exprese je častá u progresu karcinomu prostaty (27). V časném stadiu onemocnění se běžně vyskytují promotorové metylace a snížená exprese genu korelující se ztrátou alely.

Gen *PTEN* (10q23) – homolog fosfatázy a tensinu – je tumor supresorový gen, který je velmi často deletován a jehož exprese je snížena u karcinomu prostaty. Jeho produktem je lipidová fosfatáza potlačující účinek fosfoinositol-3-kináz defosforylací fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (lipidové části AKT-kinázy). U nemocných s karcinomem prostaty jsou časté hypermetylace, delece i hypometylace. Ztráta exprese *PTEN* je přítomna u lokálně pokročilých nádorů a karcinomů prostaty s vysokým gradíngem malignity (28). Pouze nižší procento pacientů s časnými a lokalizovanými karcinomy prostaty mají detekovanou deleci či mutaci genu *PTEN*, ale více než 50 % metastatických lézí má alteraci genu *PTEN* (29). Současná ztráta exprese *NKX3.1* a *PTEN* u myši se vyskytuje u agresivnějších forem karcinomu prostaty.

Tab. 1. Přehled hlavních kandidátních genů pro karcinom prostaty
Table 1. Main candidate genes for prostate cancer

Gen	Lokus	Funkce
<i>RNASEL/HPC1</i>	1q24-25	protizánětlivý, proapoptotický
<i>ELAC2/HPC2</i>	1q24-25	?
<i>HPCX</i>	Xq27-28	?
<i>SR-A/MSR1</i>	8p22-23	regulátor zánětu, proapoptotický
<i>MIC-1</i>	19p13	transformující růstové faktory, regulátor zánětu
<i>TLR4</i>	9q32-33	regulátor zánětu, stimulace cytokinů,
<i>PON1</i>	7q21.3	regulátor zánětu, detoxikace
<i>CHEK2</i>	22q12.1	reparace DNA, proapoptotický
<i>BRCA2</i>	13q12.3	reparace DNA
<i>OGG1</i>	3p26.2	reparace DNA
<i>N33</i>	8p22	tumor supresorový
<i>NKX3.1</i>	8p21	tumor supresorový
<i>RB1</i>	13q14.2	tumor supresorový
<i>PTEN</i>	10q23	tumor supresorový
<i>CDKN1B</i>	12p11-13	tumor supresorový, regulátor buněčného cyklu
<i>KLF6</i>	10p15	tumor supresorový, regulátor buněčného cyklu
<i>ATFB1</i>	16q22	tumor supresorový, regulátor buněčného cyklu
<i>ERG</i>	21q22.3	tumor supresorový, regulátor buněčného cyklu
<i>AR</i>	Xq11.2-12	regulace androgenní aktivity
<i>CYP17</i>	9q33	regulace androgenní aktivity
<i>SRD5A2</i>	2p23	regulace androgenní aktivity
<i>GSTP1</i>	11q13	detoxikace

Gen *CDKN1B* (12p11-13) kóduje inhibitor cyklin-dependentní kinázy p27, který patří do skupiny inhibitorů buněčného cyklu. Ztráta heterozygosity regionu 12p11-13 se vyskytuje u 50 % karcinomů prostaty (30). Snížená či chybějící exprese p27 koreluje s vyšším gradínem nádoru a kratším beznádorovým intervalem. Změny genu *PTEN* a p27 se spolu často vyskytují v rodinách s familiárním karcinomem prostaty.

Gen *KLF6* (10p15) – Kruppel-like zinc finger transkripční faktor 6 vykazuje ztrátu heterozygosity asi u pětiny karcinomů prostaty. Mutace nebo snížená proteinová exprese byla detekována u malého množství karcinomů vysokého gradingu malignity (31).

Gen *ATFB1* (16q22) – regulátor buněčného cyklu – je transkripční faktor reagující s onkoproteinem MYB a regulující expresi α -fetoproteinu. Jeho lokus je charakteristický častou ztrátou heterozygosity a 36 % nádorů prostaty obsahuje missense mutace, které zřejmě působí ztrátu proteinové funkce genu (32).

Geny *ERG* (21q22.3) a *ETV1* (7p21.2) patří do skupiny transkripčního faktoru ETS a ve

tkání karcinomu prostaty byla prokázána jejich zvýšená exprese, a to jak u lokalizovaného karcinomu, tak u metastatického s přibližně stejnou frekvencí. Nebyla prokázána u PIN.

Zvláštním typem regulátoru apoptózy je adaptační protein Shb. Při jeho zvýšené expresi je prokázána redukce růstu prostatických nádorových buněk PC3. Děje se tak prostřednictvím inhibitorů c-Abl, které navozují apoptózu nádorových buněk (33).

Geny regulující androgenní aktivitu

Významný vliv na riziko vzniku karcinomu prostaty mají i geny kódující androgenní aktivitu. Do této skupiny patří gen androgenního receptoru (*AR*), gen cytochromu P-450c17 α (*CYP17*) gen steroidní 5 α -reduktázy 2. typu (*SRD5A2*).

Gen androgenního receptoru *AR* (Xq11-12) je nezbytný pro růst a vývoj prostatických epiteliálních buněk. Obsahuje opakující se polymorfní triplety glutaminu (CAG), jejichž zkrácení vyvolává vyšší transkripční a transak-

tivační aktivitu androgenního receptoru. Kratší úseky CAG jsou rizikovým faktorem karcinomu prostaty a lokálně pokročilého onemocnění. U Afroameričanů s vysokou incidencí karcinomu prostaty byly prokázány zkrácené úseky polyglutaminů na rozdíl od Asiatů, kde jsou tyto úseky delší (34, 35). Velmi krátké úseky CAG jsou rizikovým faktorem a predisponují k časnějšímu nástupu a recidivě onemocnění. Podobná souvislost byla identifikována i v případech opakujících se úseků polyglycinu (GGC) (35). AR hraje roli dominantního onkogenu u pacientů s pokročilým karcinomem po androgenní deprivaci. Při kastročních hodnotách testosteronu se aktivita AR zvyšuje genovou amplifikací asi u 30 % nádorů (36). Gen AR může být hyperaktivován missense mutacemi a u hormonálně independentních karcinomů jsou časté amplifikace opakujících se sekvencí CAG způsobující hyperaktivace receptoru (37). Aktivace AR u hormonálně independentních nádorů může být uskutečněna i jinými mechanismy, jako je vliv koaktivátorů (p160, beta-katenin) nebo účinky kinázy MAP nebo kináz skupiny HER atd.

Gen *CYP17* kóduje cytochrom P-450c17 α . Tento enzym katalyzuje syntézu pohlavních hormonů. U některých variant genu je pravděpodobná souvislost se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty (38).

SRD5A2 kóduje predominantní isoenzym 5 α -reduktázy 2. typu. Byly detekovány polymorfní alely, které kódují tento enzym se zvýšenou aktivitou a jsou asociovány se zvýšeným rizikem a horší prognózou karcinomu prostaty (39).

STUDIUM GENETICKÝCH ZMĚN

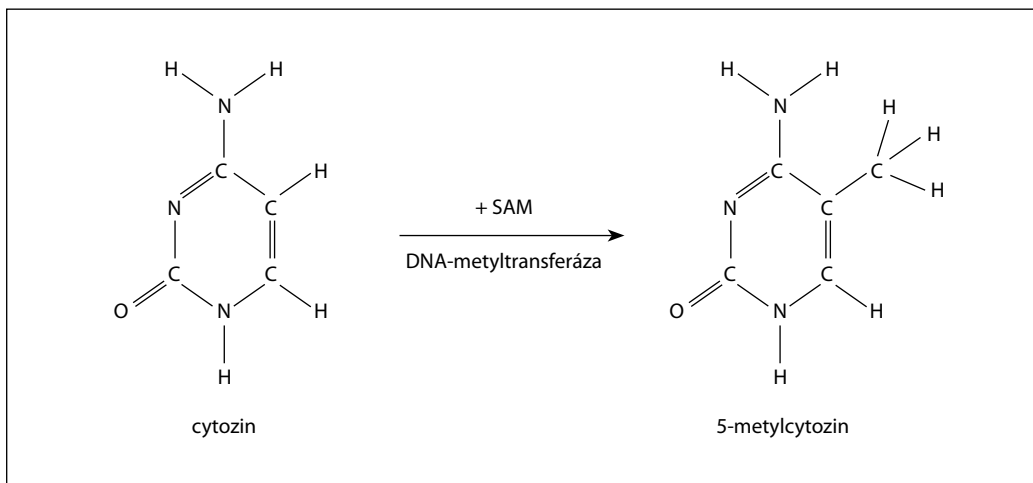
Bližší zkoumání molekulárních vlastností karcinomu prostaty předpokládá analýzu genových produktů – tzv. genovou expresi nebo přímou identifikaci strukturálních změn genů – mutací nebo chromozomálních aberací. Detekce změny genové exprese ve smyslu zvýšené, snížené či chybějící exprese je podmíněna izolací mRNA z nádorové tkáně a identifikace expresních změn většinou prostřednictvím RT-PCR (reverse transcriptase time polymerase chain reaction). Podobně lze sledovat i proteinové produkty genové exprese. Změny exprese bývají často sdruženy s výskytem určitých nádorů. Detekce hledaných znaků nádorových

epiteliálních buněk probíhají na úrovni sekvence RNA (informační RNA – mRNA). Pomocí reverzní transkriptázy (RT) je izolovaná RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) a ta se pak použije jako templát pro reakci PCR. Real-time RT-PCR umožňuje přesnou kvantifikaci hledané sekvence cDNA ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství amplikonů. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv (např. Sybr Green), která se interkalují mezi báze DNA (proces, při němž je molekula nebo iont umísťován do hostitelské mřížky). Narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku. V současnosti je nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčové je zde použití oligonukleotidu – sondy (např. TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhaševacím fluorochromem. Při syntéze komplementárních vláken dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase. Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství hledané sekvence cDNA (markeru) ve vzorku.

Detailnější studium je možné identifikací změn v genetickém materiálu pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH), expresních mikrosouborů, SNP-chipů nebo určením metylačních profilů.

Při mutacích a chromozomálních aberacích bývají poškozeny geny ovlivňující buněčné dělení, diferenciaci buněk, apoptózu, replikaci a reparaci DNA. K nim náleží zejména onkogeny, tumor supresorové geny a mutátorové geny. U některých nádorů je známá korelace mezi druhem či rozsahem chromozomálních změn a výskytem nebo prognózou onemocnění. V těchto případech lze cytogenetické vyšetření využít jako důležité diagnostické a prognostické kritérium. K zobrazení chromozomů se používá řada různých metod v závislosti na rozsahu zkoumaných strukturálních aberací. Nejčastějším postupem je tzv. G-pruhování (G-banding) spočívající ve vystavení chromozomů krátkodobému působení trypsinu a obarvení roztokem Giemsa-Romanowski. Jednotlivé pruhy chromozomů, kde se vyskytují určité geny, jsou poté hodnoceny mikroskopicky.

Z hlediska možného vysvětlení genetického původu nebo náchylnosti k určitým onemoc-

**Obr. 1.**

Lokální metylace CpG

Fig. 1.

CpG methylation

něním jsou zajímavé především jednonukleotidové polymorfismy (SNP) – jednoduché záměny nukleotidů určitého úseku DNA. Nacházejí se v kódujících i nekódujících částech genů a vyskytují se průměrně každých 250–300 bází. Ve srovnání s bodovými mutacemi, jejichž efektem je většinou změna funkce proteinu, je důsledek těchto polymorfismů neidentifikovatelný. Vzhledem k jejich časté lokalizaci v regulačních regionech často způsobují změny genové exprese. SNP představují nejčastější formu genových variací. Analýza SNP je nejčastěji prováděna pomocí čipových technologií, jejichž podstatou je hybridizace studovaného vzorku k sondě na základě komplementarity.

Novou oblastí genetického výzkumu je studium mikroRNA. Jedná se o metodiku zkoumání skupiny RNA, která není zodpovědná za kodování proteinů, ale jejíž funkce spočívají ve vývoji, buněčné diferenciaci, metabolismu a dalších chorobných procesech včetně kancerogeneze (40).

DNA hypermetylace je jedna z nejčastějších a nejlépe popsanych epigenetických abnormalit u CaP. Metylace je charakterizována připojením metylové skupiny k cytosinovému reziduu CpG ostrovů vyskytujících se u více než poloviny všech genů (obr. 1). Je zprostředkována jednou ze tří DNA metyltransferáz a stupeň metylace hraje kritickou roli v genové expresi. Změny v metylaci mohou vést k transkripční inaktivaci nebo aktivaci genů.

V případě karcinomu prostaty je hypermetylace popsána u více než 30 genů. Mezi nimi jsou geny tumor-supresorů, geny kontrolující buněčný cyklus, geny kontrolující hormonální regulaci, geny řídící opravy poškozené DNA, invazivitu a morfologii nádorových buněk aj. Hypermetylace je pro většinu genů promotorem v poškození jejich funkce s následnou aktivací tumorigeneze. Příkladem může být hypermetylace ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD), která je asociována s agresivnějším karcinomem prostaty a vyšším rizikem biochemické recidivy nebo GSTP1 (gen pro glutathion-S-transferázu $\pi 1$), která chrání DNA před elektrofilními metabolity karcinogenů a reaktivními oxidanty tím, že je konjuguje na glutathion (41, 42).

LEGISLATIVNÍ PROBLEMATIKA

Většina genetických vyšetření přepokládá odběr nádorové tkáně z kterých je izolována DNA nebo mRNA. Odběr tkáně z lidského těla je upraven zákonem č. 20 z roku 1996, § 26, odstavec (4). Tento zákon podmiňuje odběr tkáně pro potřeby lékařské vědy, výzkumu nebo k výukovým účelům prokazatelným informovaným souhlasem pacienta na základě dobrovolnosti a svobodné vůle. Součástí souhlasu musí být vymezení účelu použití částí

těla pacienta. Tento souhlas je součástí zdravotnické dokumentace pacienta. Použití částí těla pacienta nemůže být zdrojem finančního prospěchu nebo jiných výhod pro pacienta nebo fyzických nebo právnických osob po jeho úmrtí; rovněž nemůže být zdrojem finančního prospěchu nebo jiných výhod pro zdravotnické zařízení.

ZÁVĚR

Díky intenzivnímu zkoumání lidského genomu, genetických odlišností, polymorfismů, genové exprese a současnému porovnání výsledků s klinickými projevy onkologických onemocnění se objevila řada kandidátních genů, které mohou hrát určitou roli ve vzniku a rozvoji karcinomu prostaty. Přestože statistické metody a detailní sledování nemocných s určitou formou genetické změny potvrzují, především u familiárních a hereditárních karcinomů, pravděpodobnou spojitost genetické

změny a nemoci samé, přesná etiopatogeneze a role jednotlivých genů zůstávají zatím nejasné. Proto tyto geny nemůžeme nazývat „nádorovými“ ale pouze „geny náchylnosti“. Vzhledem k vysokému počtu kandidátních genů a oblastí chromozomů, kde dosud ještě nebyly zjištěny konkrétní geny, budou zapotřebí rozsáhlé studie dokumentující korelaci genetických odchylek s určitými typy karcinomu, popřípadě s konkrétními klinickými průběhy. Stejně tak bude nutné odlišit geny zodpovědné za vznik jednotlivých nádorů a geny způsobující obecnou genetickou nestabilitu a dále i vztahy mezi geny náchylnosti navzájem, jak o tom svědčí dostupné údaje o trojici genů NKX3.1, PTEN a CDKN1B. Dalším krokem bude zřejmě posouzení genetických dispozic nemocných ve vztahu k exogenním potenciálním faktorům, jako jsou infekce, výživa, stres a vnější prostředí. Bližší poznání role jednotlivých genů v procesu vzniku a průběhu onemocnění může přinést tolik potřebné prognostické informace a usnadnit i rozhodování, který karcinom je signifikantní a musí být léčen.

LITERATURA

1. Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S, et al. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 1041–1047.
2. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twin from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78–85.
3. Gillanders EM, Xu J, Chang BL, et al. Combined genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1240–1247.
4. Cui J, Staples MP, Hopper JL, et al. Segregation analyses of 1,476 population-based Australian families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1207–1218.
5. Smith JR, Freije D, Carpten JD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996; 274: 1371–1374.
6. Eeles RA, Durocher F, Carpten JD, et al. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 653–658.
7. Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 2003; 42: 805–1812.
8. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, et al. Effects of RNaseL mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. *Cancer Res* 2003; 63: 6795–6801.
9. Rennert H, Zeigler-Johnson CM, Addya K, et al. Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 949–957.
10. Maier C, Haeusler J, Herkommer K, et al. Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene. *Br J Cancer* 2005; 92: 1159–1164.

11. **Wiklund F, Jonsson BA, Brookes AJ, et al.** Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7150–7156.
12. **Rennert H, Berkovich D, Hubert A, et al.** A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 981–984.
13. **Rokman A, Ikonen T, Seppala EH, et al.** Germline alterations of RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1299–1304.
14. **Goode EL, Stanford JL, Peters MA, et al.** Clinical characteristics of prostate cancer in an analysis of linkage to four putative susceptibility loci. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2739–2749.
15. **Fujiwara H, Emi M, Nagai H, et al.** Association of common missense changes in ELAC2 (HPC2) with prostate cancer in a Japanese cas-control series. *J Hum Genet* 2002; 47: 641–648.
16. **Baffoe-Bonnie AB, Smith JR, Stephan DA, et al.** A genetic epidemiological study of hereditary prostate cancer (HPC) in Finland: localization by linkage disequilibrium of a haplotype in the HPCX region. *J Hum Genet* 2005; 117: 307–316.
17. **Xu J, Zheng SL, Komiya A, et al.** Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002; 32: 321–325.
18. **De Winther MP, Gijbels MJ, Van Dijk KW, et al.** Transgenic mouse models to study the role of the macrophage scavenger receptor class A in atherosclerosis. *Int J Tissue React* 2000; 22: 85–91.
19. **Bock CH, Cunningham JM, McDonnell SK, et al.** Analysis of the prostate cancer-susceptibility locus HPC20 in 172 families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 795–801.
20. **O'Neil LA, Fitzgerald KA, Bowie AG.** The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003; 24: 286–290.
21. **Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, et al.** Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the Cancer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* 2004; 64: 2918–2922.
22. **Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen TP, et al.** New paraoxonase 1 polymorphism 1102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J Nail Cancer Inst* 2003; 95: 812–818.
23. **Shih DM, Gu I, Xia YR, et al.** Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284–287.
24. **Dong X, Wang L, Taniguchi K, et al.** Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 270–280.
25. **Coussens LM, Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867.
26. **Phillips SM, Barton CM, Lee SJ, et al.** Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 70: 1252–1257.
27. **Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, et al.** Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 2000; 60: 6111–6115.
28. **McMenamin ME, Soung P, Perera S, et al.** Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999; 59: 4291–4296.
29. **Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, et al.** Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res* 1998; 58: 204–209.
30. **Kibel AS, Freije D, Isaacs WB, Bova GS, et al.** Deletion mapping at 12p12-13 in metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 270–276.
31. **Chen C, Hyytinen ER, Sun X, et al.** Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003; 162: 1349–1354.
32. **Sun X, Frierson HF, Chen C, et al.** Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* 2005; 37: 407–412.
33. **Davoodpour P, Landstrom M, Welsh M.** Reduced tumor growth in vivo and increased c-Abl activity in PC3 prostate cancer cells overexpressing the Shb adapter protein. *BMC Cancer* 2007; 7: 161; <http://www.biomedcentral.com/1471-2401/7/161>.

34. **Irvine RA, Ma H, Yu MC, et al.** Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 267–274.
35. **Hsing AW, Gao YT, Wu G, et al.** Polymorphic CAG and GGM repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk. A population-based case-control study in China. *Cancer Res*, 2000, 60: 5111–5116.
36. **Ford OH III, Gregory CW, Kim D, et al.** Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol* 2003; 170: 1817–1821.
37. **Buchanan G, Yang M, Cheong A, et al.** Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1677–1692.
38. **Chang B, Zheng SL, Isaacs SD, et al.** Linkage and association of CYP17 gene in hereditary and sporadic prostate cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 354–359.
39. **Nam RK, Toi A, Vesprini D, et al.** V89L polymorphism of type-2,5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* 2001; 57: 199–204.
40. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosomes, indicates thousand of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15–20.
41. **Collard RL, Harya NS, Monzon FA, Maier CE, O'Keefe DS.** Methylation of the ASC Gene Promoter is Associated With Agressive Prostate Cancer. *The Prostate* 2006; 66: 687–695.
42. **Henrique R, Jeronimo C.** Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur Urol* 2004; 46: 660–669.