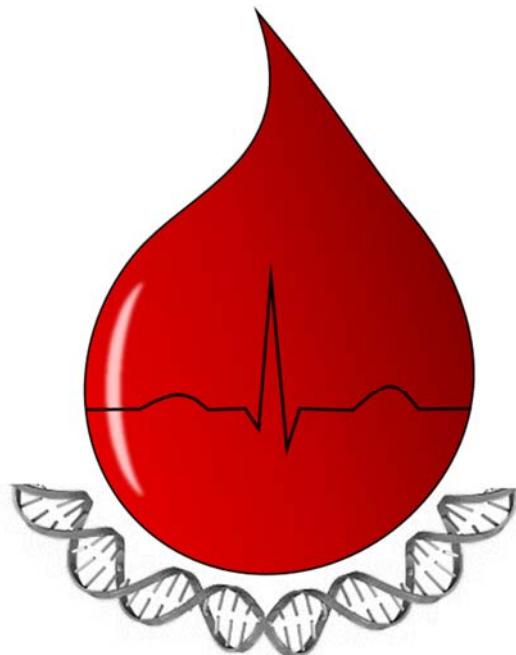




UMEÅ UNIVERSITET



BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Tumörexosomers effekt på prostataorganoider

Felicia Bergström

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2020



UMEÅ UNIVERSITET

Examensarbetets engelska titel

The Effect of Tumor-Derived Exosomes on Prostate Organoids

Handledare

Sofia Halin Bergström, Medicinsk Biovetenskap

Läraropponent: Sofie Degerman
Examinator: Ylva Hedberg Fransson
Datum för godkännande: 2020 06 12

Abstrakt

Prostatacancer är den vanligaste cancerrelaterade dödsorsaken bland män i Sverige. Diagnosteringsmetoderna som används leder ofta till över- samt underdiagnosering av prostatacancer vilket leder till över- samt underbehandling av patienter. Säkrare diagnostik kräver markörer i den normala prostatavävnaden, bredvid tumören, som i tidig tumörutveckling kan urskilja farlig från ofarlig prostatacancer. Syftet var att undersöka om exosomer från prostatatumörer i råtta, Dunning G (G) och MatLyLu (MLL), påverkade viabilitet, genexpression samt cytokinutsöndring i normalt prostataepitel odlade *in vitro* som prostataorganoider. Dessa odlas i definierat medium med G-exosomer, MLL-exosomer eller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), som kontroll, vilket erhåller en representativ modell för att studera hur normalt prostataepitel påverkas av tumörexosomer. Viabiliteten studeras med CellTiter-Glo, genuttrycket med qRT-PCR och cytokinutsöndringen med Cytokine array. Organoider, till skillnad från 2D-kulturer, används för att de bättre efterliknar epitelets körtelstruktur *in vivo*. Försöket skulle kunna utföras *in vivo*, men med odling av organoider *in vitro* reduceras antalet försöksdjur. Därför är prostataorganoider en utmärkt modell för studiens ändamål. Fortsatt forskning behövs för att förstå hur exosomer från tumörer påverkar normalt prostataepitel. Konklusionen var att påverkan på viabilitet, genuttryck samt cytokinutsöndring från prostatatumörers exosomer från råtta, G och MLL, bör gå att studera med celldeling, qRT-PCR samt Cytokine array.

Introduktion

Prostatan

Prostatan är en valnötsstor körtel (1) som är lokaliserad under urinblåsan och omger översta delen av urinrören (2). Den delas in i perifera zonen, centrala zonen samt övergångszonen som alla är histologiskt åtskilda (1). Vid embryogenesen stimuleras bildandet av prostatan genom uttryck av tillväxtfaktorn testosteron. Prostatan fortsätter växa tills den når sin fullvuxna storlek under puberteten (3). Normalt prostataepitel består av de tre epithelcellstyperna luminala, basala samt sällsynta neuroendokrina celler (4). Basalcellerna sitter närmast basalcellsmembranet med de luminala samt neuroendokrina cellerna innanför (3). Epitelet omges av glatt muskulatur samt stroma som bland annat innehåller fibroblaster, blodkärl, nerver, immunceller och lymfkärl. Stromat och epitelet kan även kommunicera med varandra genom parakrin-signaler (3). En viktig funktion prostatan har är att producera prostatavätska som tillsammans med sperma samt vätska från sädesbläsorna bildar mäns ejakulat (5).

Prostatacancer

Prostatacancer är den vanligaste cancerformen i Sverige med en incidens på fler än tiotusen nya fall per år samt en prevalens på ungefär 120 000 fall. Ungefär 20% av alla män diagnosticas någon gång under livet med sjukdomen, där de flesta insjuknar efter 50 års ålder. Bland män är sjukdomen den mest frekventa cancerrelaterade dödsorsaken i Sverige där ungefär 2 400 män avlider per år (6). Vid utvecklad adenokarcinom är basalcellerna helt frånvarande i cancervävnaden (4). Prostatacancer i tidigt stadium ger ofta inga symptom. De symptom som uppkommer vid mer framskriden cancer är exempelvis urineringsbesvär, viktnedgång samt smärta i bäcken eller skelett (6).

Diagnostiseringssmetoder för prostatacancer

Prostatacancer diagnostiseras genom prostataspecifikt antigen (PSA)-prov följt av palpering av prostatan. Vid exempelvis förhöjda PSA-nivåer och/eller misstanke om tumör vid palpering används transrektalt ultraljud (TRUL) för att ta prostatabiopsier. Biopsierna undersöks morfologiskt samt histopatologiskt. PSA produceras normalt i prostata och nivån mäts i blodet. Vid prostatacancer ökar dessa nivåer i blodet till följd av ett ökat läckage. Förhöjda PSA-nivåer ses även vid andra tillstånd som exempelvis godartad prostataförstoring samt inflammation i prostatan vilket kan ge falsk positiv indikation på prostatacancer. De förhöjda värdena ses även vid ofarlig prostatacancer, en cancerform som inte leder till allvarliga symptom men kan leda till en diagnos och att patienten eventuellt blir behandlad i onödan (6).

För att finna en eventuell tumör tas 10–12 systematiska nälbiopsier som ska ge en representativ bild utav prostatan (6). Tyvärr finns det en risk att en tumör eller en mer aggressiv sektion av cancervävnad missas då det är ett så litet provmaterial som avlägsnas (7). Biopsierna studeras morfologiskt samt immunohistokemiskt (IHC) för att skilja cancervävnad från normalt prostataepitel. Vanliga IHC-färgningar är antikroppar mot basalcellsmarkörer som är positiva i benign prostata och negativa i cancer. Exempel på basalcellsmarkörer är högmolekylärt keratin, cytokeratin 5 samt p63 som därefter alltid korreleras mot vanlig morfologi i hematoxylin-eosin-färgade snitt (6).

Globalt används Gleasonsystemet för bedömning av tumör i biopsi. Biopsierna graderas enligt en 5-gradig skala utefter cellernas differentieringsgrad. Låg grad betyder att cellerna mer liknar normal vävnad medan hög Gleasongrad påvisar lågt differentierade cancerceller. Graderingarna av den mest frekventa Gleasongraden samt den högsta återstående Gleasongraden i biopsierna adderas ihop och bildar Gleasonsumma. För att underlätta i patientkontakten har International Society of Urological Pathology (ISUP)-graderingen utformats. Gleasonsummorna delas in i prognostiskt relevanta grupper där varje grupp omvandlats till en ISUP-grad. ISUP-grad 1 anger bäst prognos och ISUP-grad 5 anger sämst prognos med Gleasonsumma ≤ 6 respektive 9–10 (6).

Tumor, Node, Metastasis (TNM)-systemet beskriver cancersjukdomars utbredning i kroppen där varje cancer typ har en specifik gradering. T motsvarar tumörens lokala utbredning och bedöms för prostata-cancer genom palpering, TRUL samt bedömning av biopsier. N avser spridning till lokala lymfknotor och utreds med exempelvis magnetresonanstomografi (MRT). M avser fjärrmetastasering till andra organ genom blod- eller lymfsystemet, där vanligaste organet är skelettet. Metastaserna är sklerotiska vilket orsakar bennybildning som utreds med skelettskintografi alternativt MRT (6).

Bedömning av prostatacancer och behandling

Gleasonsumma, PSA-nivå samt TNM-gradering används tillsammans för att prediktera patientens prognos samt val av eventuell behandling. Patienter utan påvisad metastasering delas in i riskgrupper beroende på den uppskattade risken för metastasering. De fyra riskgrupperna är mycket låg risk, övrig lågrisk, mellanrisk samt högrisk. Vid lågriskcancer behandlas oftast inte patienterna utan kontrolleras för att se om canceren hålls i schack eller börjar utvecklas, vid vilket behandling sätts in. Vid högre cancer-risk kan exempelvis strålbehandling, radikal prostatektomi samt hormonbehandling användas (6). Några vanliga biverkningar av dessa metoder är urinläckage, tömningsbesvär, erektionsbesvär, ändtarmsläckage samt eventuell smärta som grundar sig i prostatans lokalisering samt höga innervation (2, 6). Tyvärr är dessa ovanstående metoder idag otillräckliga verktyg för att förutsäga om tumören kommer växa snabbt och kräva behandling eller om den är så långsamväxande att den kan lämnas utan åtgärd (6).

Neoplastisk vävnad modifierar omgivande normal vävnad

Flera studier visar att normalt prostataepitel samt stroma förändras mikroskopiskt samt molekylärt till följd av en cancer-tumör som är lokaliserad i en annan del av prostatan (7-11). Denna icke-maligna vävnad kallas Tumor Instructed/Indicating Normal Tissue (TINT) eftersom vävnaden morfologiskt ser normal ut, men kan påvisas ha små förändringar utan att vara i direkt kontakt med cancervävnaden (8). Förändringarna i TINT har varit mer uttalad och/eller annorlunda om tumören är aggressiv jämfört med en mer ofarlig form (12).

Om TINT-förändringar bättre kan karakteriseras kan de användas inom diagnostisering och prognostisering av prostatacancer. Då normal prostatavävnad finns med i biopsier skulle förändringar i den normala vävnaden kunna användas för att indikera en närliggande tumör och även kunna bistå med information om tumörens aggressivitet.

Studier har visat att de inducerade förändringarna i TINT sker på gennivå och verkar gynna tillväxt samt spridning av tumören genom bland annat ökad proliferation, cellöverlevnad, inflammation samt angiogenes. Det har även visats att genexpressionsprofilerna i TINT skiljer sig åt beroende på om tumören är mer aggressiv och metastaserande jämfört med om tumören är icke-metastaserande. Även regionala lymfkörtlar har påvisats bli omprogrammerade innan metastasering sker (9).

Hur kan tumören inducera förändringar i TINT?

Det är inte känt på vilket sätt tumören inducerar förändringarna i den normala prostatavävnaden, men det är troligt att det sker via utsöndring av signalmolekyler (7). Celler utsöndrar vesiklar till den extracellulära miljön och de kan ta sig till blodet. På så sätt sprids vesiklarna till andra delar av kroppen vilket tyder på att de används vid bland annat cell-cell-kommunikation (13). Exempel på vesiklar är exosomer som är endosomala membranomslutna vesiklar (14) på närmare 30–150 nm i storlek (15). Exosomer innehåller information i form av proteiner, lipider samt nukleinsyra som kan reglera genuttryck i målcellen vilket kan ändra cellens beteende (15).

Tumörer har påvisats utsöndra exosomer innehållande bland annat immunosuppressiva molekyler, tumörassocierade antigen samt major histocompatibility complex (MHC) vilket leder till en anti-tumörrespons hos immunceller (15). Studier har visat att injektion av exosomer från aggressiva metastaserande MatLyLu-tumörer i prostatan på råttor förändrar den normala prostatavävnaden. Denna förändring gjorde att en långsamtväxande och icke-metastaserande Dunning G-tumör växte betydligt snabbare. Det sågs även att de injicerade exosomerna gav en ökad infiltrering utav makrofager i prostatan samt att det normala epitelet fick ökad proliferation. Tumörexosomerna inducerade även förändringar i genuttryck i monocyter samt fibroblaster *in vitro* som båda kan kopplas till en mer tumörstimulerande fenotyp (12).

Genexpression i TINT

Studier av den globala genexpressionen visar att flera hundra gener skiljer sig signifikant mellan TINT och kontrollvävnad (7). Exempel på gener som har ett minskat uttryck i epitelceller i TINT är Microseminoprotein-beta (*Msmb*) (7, 10) och *Nkx3.1* (9). Några gener som har ett ökat uttryck är Cystein-rich angiogenic inducer 61 (*Cyr61*) (7), CCAAT enhancer binding protein β (*Cebpb*) (7, 11) och 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (*Hmgcs1*) (16).

Luminala epitelceller i prostatan producerar MSMB (10) som tillsammans med PSA samt prostatic acid phosphatase är ett av prostatans mest utsöndrade protein. Studier visar att uttrycket av MSMB är lägre i cancervävnad jämfört med normal prostatavävnad samt att uttrycket i tumören minskar ytterligare i mer avancerad prostatacancer (17). MSMB-nivåerna minskar även i blod samt urin hos patienter med prostatacancer (10, 17). Nedgången har även konstaterats i TINT där minskningen är mest uttalad närmast tumören (10).

Den prostataspecifika transkriptionsfaktorn NKX3.1 (18) reglerar prostataepitelets differentiering (9). Proteinet har ett minskat uttryck i prostatacancerceller på grund av exempelvis deletion av genen. Den låga nivån korrelerar till tumörprogression samt metastasering (18), dessutom har NKX3.1 visats ha ett minskat uttryck även i TINT (9).

Proteinet CYR61 utsöndras till extracellulär matrix (ECM) och är involverat i bland annat celladhesion, kemotaxis av fibroblaster samt angiogenes (19). I prostata uttrycks *CYR61*-genen framförallt av epitelcellerna som utsöndrar CYR61 till ECM, men proteinet kan även påvisas i stromat (20). Studier har visat att uttrycket av CYR61 uppgreras i prostatacancervävnad samt TINT jämfört med normal prostatavävnad där det ökade uttrycket kan korreleras till en mer aggressiv tumör (7, 21).

I prostatatumörer är ett högt uttryck av transkriptionsfaktorn C/EBP β associerat med både hög Gleasonsumma och proliferation samt en dålig prognos (11, 22). Däremot är ett högt uttryck av proteinet i TINT associerat med en bättre prognos. Varför C/EBP β verkar ha olika funktioner i tumörer jämfört med i TINT är inte känt, men skulle kunna vara kopplad till olika inflammationssvar. Det ökade uttrycket av C/EBP β i TINT har kunnat relateras till prostatatumörens storlek, aggressivitet samt avståndet till själva tumören (11).

Enzymet HMGCS1 ingår i kolesterol-syntesen samt lipidmetabolismen. En konstaterad association finns mellan prostatacancer och lipidmetabolismen. *HMGCS1* har visats vara uppgraderad i stroma vid samskultur med prostatacancerceller vilket främjar tumörtillväxten genom parakrin-kommunikation (16). Vid injektion av exosomer i prostata hos råttor ökade uttrycket av *HMGCS1* vilket tyder på att tumör-exosomer kan inducera uttrycket av *HMGCS1* i normal prostatavävnad (personlig kommunikation).

Det nukleära proteinet Ki-67 uttrycks i cellcykeln och används som en proliferationsmarkör (23) vid exempelvis utvärdering utav malign tumörvävnad i förhållande till normal vävnad (24). Studier har visat att ett högt uttryck utav Ki-67 i prostatatumörer tyder på en mer aggressiv cancer samt sämre prognos (25, 26). Studier visar även att det förekommer en ökad proliferation i TINT (12).

Inflammation i TINT

Flera studier visar en ökad inflammation i TINT med infiltration av makrofager, mastceller samt neutrofila granulocyter (7–9). Makrofager och mastceller i TINT har även visats stimulera tumörtillväxt (27, 28). Cytokiner används som medlare i immun- samt inflammationssvar genom exempelvis kemotaxis. Molekylerna syntetiseras huvudsakligen av lymfocyter samt andra immunceller, men även av icke-hematopoetiska celler som exempelvis fibroblaster och endotelceller. Några cytokingrupper är interleukiner, tumör-nekros-faktorer, interferoner samt tillväxtfaktorer i bland annat hematopoesen. Cytokiner regleras mycket noggrant av exempelvis inhibitorer eftersom en för stor mängd kan ge svåra konsekvenser som kan ses vid septisk chock där regleringen av dessa molekyler misslyckats. Vissa cytokiner har även setts stimulera tillväxt av vissa cancertyper (29).

Prostataorganoider som modellsystem för TINT

En organoid är en vävnadsstruktur i 3D som i sammansättningen samt funktion liknar originalorganet. Detta sker genom att vuxna stamceller ifrån vävnad växer under specifika definierade förhållanden. Tarmepitelorganoider utvecklades 2009 genom tillväxt av stamceller från tarm i basalcellsmembran-substitutet Matrigel med serum-fritt medium som liknade cellens omgivning *in vivo*. De odlade organoiderna utvecklade polariserade strukturer av epitel med både kryptor samt villi vilket liknar normalt tarmepitel. Olika protokoll för att odla kulturer av organoider har utformats, däribland från normalt prostataepitel från både mus samt mänskliga men även från prostatacancermetastaser.

Kulturerna har dessutom visats vara fenotypiskt stabila även efter odling under lång tid samt efter genetiska modifieringar (30). Eftersom prostataorganoider odlas av epitelceller finns ingen stroma som kommunicerar med epitelet vilket gör att faktorer som ökar stamcellernas överlevnad, proliferation samt differentiering måste tillsättas mediet (4). Odling utav organoider öppnar upp för bättre fysiologiska cancermodeller vilket gör det lättare att genomföra forskning samt utforma behandlingsformer för olika cancerformer (30). Prostataorganoider gör det möjligt att studera de effekter som prostatatumören har på normalt epitel.

Dagens diagnostiska metoder för prostatacancer är bristfälliga då de ofta leder till både över- samt underdiagnosering av sjukdomen vilket i sin tur leder till lidande för patienten samt högre kostnad för samhället. Därför vore det bra om markörer kan hittas i normal vävnad som i ett tidigt skede kan urskilja farlig från ofarlig prostatacancer. Det kommer även underlätta valet av fortsatt behandling. Syftet med studien var att undersöka om exosomer från två olika prostatatumörer i råtta, Dunning G och MatLyLu, påverkade viabilitet, genexpression samt cytokinutsöndring i prostataorganoider *in vitro*.

Material och metoder

Framställning av organoider samt exosomer

I denna studie användes prostatavävnad från en 12 veckor gammal tumörfri Copenhagen-råtta (Charles River, Sulzfeld, Tyskland) för att framställa organoider. Prostatavävnaden odlades i 24-brunnsplatta i sju dagar enligt protokoll för odling av prostaorganoider från mus (31). Exosomer isolerades från långsamväxande icke-metastaserande G-tumör (G) samt snabbväxande metastaserande MatLyLu-tumör (MLL) varefter den totala proteinkoncentrationen mättes enligt tidigare beskrivning (12).

Metodprincip för organoidodling

Kroppen har den perfekta miljön att kultivera alla typer av celler och det gör det därför svårt att odla celler i kultur. Kroppen tillför bland annat näring, O₂, hormoner och signalmolekyler samt avlägsnar även exempelvis CO₂ samt slaggprodukter medan celler i en kultur odlas i en behållare med ett medium som endast förnyas ibland. Celler som klarar att odlas *in vitro* behöver specifika förutsättningar i form av faktorer i mediet för att må bra. Faktorer som ingår i mediet är bland annat näringssämnen, kolhydrater, aminosyror, vitaminer, joner, tillväxtfaktorer samt hormoner. De specifika faktorer som behövs för att cellen ska må bra samt proliferera i kroppen ersätts helt med det sammansatta mediet (32). För att odla prostaorganoider *in vitro* används Matrigel som substitut för basalconcellsmembranet samt ECM i kroppen (30). Matrigel utvinns från ett mus-sarkom och stödjer organoidernas 3D-tillväxt (30, 33). Mediet som används för odling av prostaorganoider från prostatavävnad är ett definierat komplett organoidmedium utan serum. Mediet innehåller bland annat epidermal tillväxtfaktor, benmorfogenesprotein-inhibitorn noggin samt R-spondin 1 som alla bidrar till en korrekt tillväxtmiljö för prostatan (30). För att prostatan ska utvecklas behövs även testosteron (3) samt ROCK kinasinhibitorn Y-27632 som ökar cellernas celldelning samt ökar singelcellsers överlevnad (34).

Odling av prostaorganoider

Mediet hos prostaorganoiderna som odlats i 24-brunnsplatta i sju dagar sugs bort. Organoiderna trypsineras med TrypLE av Thermo Fisher Scientific Inc (Invitrogen, Carlsbad, USA) och förs över till ett falconrör som inkuberas vid 37°C i 5–10 min. En liten volym sätts av och cellerna räknas med lika delar trypanblått i Countess™ automated cell counter av Thermo Fisher Scientific Inc (Invitrogen, Carlsbad, USA). Trypsineringen avbryts med 20 mL AdDMEM/F12+/+ (97% Advanced DMEM/F-12, 1x penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 1x GlutaMax) innehållande 5% Fetal Bovine Serum varefter cellerna centrifugeras vid 200 g i 5 min. Supernatanten kasseras och cellerna löses i Matrigel till 2 500 celler/µL. I en 24-håls platta appliceras 100 000 celler/brunn i 18 brunns och matrigelen låts stelna vid 37°C i 15 min. Därefter tillsätts 500 µL komplett organoidmedium (88% AdDMEM/F12+/+, 2% B27, 10% R-spondinkonditionerat medium, 50 ng/mL EGF, 200 nM A83-01, 100 ng/mL Noggin, 1 nM Dihydrotestosterone, 10 µM Y-27632 dihydrochloride) innehållande 10 µg/mL G-exosomer, 10 µg/mL MLL-exosomer eller fosfatbuffrad saltlösning (PBS), som kontroll, till sex brunns vardera. Plattan inkuberas vid 37°C med 5% CO₂. Dag 3 byts medium och dag 6 används organoiderna för att isolera RNA samt för uppsamling av medium till Cytokine array.

Metodprincip för att mäta levande celler

Antalet levande celler kan mäts med CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) genom luminiscent kvantifiering utav mängden ATP som finns vid den specifika tidpunkten mätningen utförs. Cellerna blandas med en buffert som först gör att cellerna lyseras så ATP frigörs från de levande cellerna. ATP kommer därefter reagera med O₂ samt Luciferin tillsammans med ett enzym och Mg²⁺. Produkten blir ljus som analyseras för att ge korrelation mellan ATP och levande celler.

Cellviabilitet av prostataorganoider

Cellviabiliteten mäts dag 0, 3 och 6 genom att tillsätta 7 500 celler/brunn av samma cell-Matrigel-mix som ovan, detta utförs i 24 brunnar i vardera 3 96-håls plattor. När matrigelen stelnat tillsätts 100 µL komplett organoidmedium innehållande 10 µg/mL G-exosomer, 10 µg/mL MLL-exosomer eller PBS, som kontroll, till åtta brunnar/platta vardera. Plattorna inkuberas på samma sätt som ovan. Cellmedium byts dag 3 och antalet levande celler i organoidkulturen mäts med CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) enligt tillverkarens anvisningar. Till varje brunn tillsätts 100 µL reagens varefter suspensionen mixas i 5 min och inkuberas i 25 min innan avläsning av luminiscens sker på SpectraMax.

Metodprincip för qRT-PCR

Förändring i genuttryck kan bestämmas med qRT-PCR som består av tre steg, först utvinns RNA ur proven, sedan omvandlas RNA till cDNA och därefter används cDNA för att utföra qRT-PCR. Ett sätt att isolera RNA från cell-material är att använda RNeasy Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Tyskland) enligt tillverkarens instruktioner. Provet homogeniseras och cellerna lyseras med en buffert som inhiberar RNaser vilket gör att RNAt hålls intakt. Etanol tillsätts för att ge RNA bindningsmöjlighet till ett kiselmembran. Provmaterial passeras genom kiselmembranet som binder RNA som är längre än 200 baser. Därefter renas RNAt samt elueras med buffertsystem innehållande olika salthalter.

Metoden RT-PCR använder en omvänt transkriptionsreaktion följd av vanlig PCR för att framställa cDNA från mRNA. Det isolerade RNAt denatureras vilket gör att primrarnas bindningsställen frigörs så de kan binda in. Enzymet reverse transcriptase binder till RNA vid primarna och syntetiseras ensträngat cDNA. Därefter amplificeras det genererade cDNAt tillsammans med DNA-polymeras och reverse samt forward primrar i realtids-PCR (35). Vid kvantitativ realtids PCR kan en TaqMan-probe användas. Proben har en fluorescent reporter som binder vid 5'-änden och en quencher vid 3'-änden. När proben är intakt sitter reporter samt quencher nära varandra vilket får till följd att quenchern absorberar emissionen från reportern. När proben bundit till målsekvensen på templatet klyvs den utav DNA-polymeraset vid förlängningen av DNAt i PCR. Klyvningen gör att reporter och quencher kommer ifrån varandra och reportern kan avge sin fluorescens (36).

Med qRT-PCR kan amplifieringen av PCR-produkten följas på en skärm för varje cykel genom probens fluorescens. Detta kan sedan användas bland annat för att beräkna hur mycket templat det fanns vid start. Kurvorna som bildas är exponentiella där det finns ett visst tröskelvärde som visar på om det finns templat som amplificeras eller ej. Om kurvan går över tröskelvärdet finns templat. Ct-värdet är det cykelnummer där kurvan passerar tröskelvärdet. När kurvan brutit tröskelvärdet är den exponentiell innan

den når en platå-fas. Det är endast i den exponentiella fasen som mängden templat vid start korrekt kan beräknas (36).

För att minimera felkällor samt korrigera prov-variation amplifieras samtidigt en housekeeping-gen för ett cellulärt protein från vilka alla värden kan normaliseras. β -aktin är en housekeeping-gen som ingår i cytoskelettet och finns i hög mängd i de flesta celler vilket gör att den passar bra att använda vid analysering av prostatavävnad (37). Vid undersökning av relativa skillnader i genuttrycket mellan prover används ofta $\Delta\Delta Ct$ -metoden. Metoden jämför det experimentella genuttrycket med både en kalibrator, exempelvis ett obehandlat prov, samt en housekeeping-gen för att undersöka om genuttrycket ökat, minskat eller är oförändrat. Ekvationen som används är; $2^{-\Delta\Delta Ct}$, där $\Delta Ct = Ct(\text{housekeeping-gen}) - Ct(\text{målgen})$ och $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{prov}) - \Delta Ct(\text{kalibrator})$ (36).

RNA-isolering och realtids-kvantitativ-PCR

Isolering av RNA från prostataorganoider stimulerade med exosomer utförs med RNeasy Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Tyskland) enligt tillverkarens instruktioner samt protokoll (31). Mediet elimineras och 350 μL RLT-buffert med β -merkaptoetanol tillsätts varje brunn varefter proverna passeras genom filter och slutligen elueras i 30 μL RNase-fritt H₂O. Efter eluering sätts proverna på is och RNA-koncentrationen mäts med DS-11 FX+ (DeNovix Inc, Wilmington, USA) innan de antingen fryses vid -80°C alternativt används direkt till cDNA-syntes. Syntetisering av cDNA med en provmängd på 1,4 μg total-RNA/prov utförs med SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit av Thermo Fisher Scientific Inc (Invitrogen, Carlsbad, USA) enligt tillverkarens anvisningar.

Uttrycket av generna *Mki67*, *Cebpb*, *Cyr61*, *Hmgcs1*, *Msmb* och *Nkx3.1* undersöks med qRT-PCR, där *Actb* används som housekeeping-gen. Enligt tillverkarens anvisning blandas en 20 μL -reaktion motsvarande 35 ng cDNA med TaqMan™ Gene Expression Master Mix samt TaqMan Assays från Thermo Fisher Scientific Inc (Applied Biosystems™, Carlsbad, USA) innehållande specifika primer/probe-set för generna *Mki67*: Rno1451446_m1, *Cebpb*: Rno0824635_s1, *Cyr61*: Rno0580055_m1, *Hmgcs1*: Rno1493959_m1, *Msmb*: Rno0569882_m1, *Nkx3.1*: Rno1466010_m1, *Actb*: Rno0667869_m1. qRT-PCR utförs på QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System från Thermo Fisher Scientific Inc (Applied Biosystems™, Carlsbad, USA) och det relativa mRNA-uttrycket bestäms med $\Delta\Delta Ct$ -metoden.

Metodprincip för Cytokine Array

Utsöndring av cytokiner vid celldeling kan undersökas med Cytokine array. Nitrocellulosamembran belagd med duplikat av negativ kontroll, referens samt 79 olika primärantikroppar på utmärkta områden används vid Proteome Profiler Rat XL Cytokine Array (R&D Systems, Minneapolis, USA). Exempelvis supernatant från cellkultur eller serum inkuberas tillsammans med membranet så eventuella cytokiner kan binda till de olika primärantikropparna. Därefter tvättas membranet för att avlägsna icke-bundet material. Biotinylerade detektionsantikroppar inkuberas sedan tillsammans med membranet och binder in där respektive cytokin eventuellt bundit. Streptavidin-HRP tillsammans med en kemiluminiscent detektionsreagens tillsätts för att producera en signal där de eventuellt inbundna cytokinerna finns.

Cytokine Array

Efter organoiderna stimulerats i sex dagar samlas konditionerat medium. Mediet centrifugeras vid 2 000 g i 5 min så eventuella celler avlägsnas innan mediet alikvoteras och frysas vid -80°C inför Cytokine Array. Detektion av 79 cytokiner utförs med Proteome Profiler Rat XL Cytokine Array (R&D Systems, Minneapolis, USA) enligt tillverkarens anvisningar. Membranen blockas med buffert innan konditionerat medium med G-exosomer, MLL-exosomer eller PBS tillsätts till varsitt membran som därefter inkuberas på skak över natt. Därefter inkuberas membranen först med detektionsantikroppar, sedan med Streptavidin-HRP och därefter med kemiluminiscent detektionsreagens. Membranen blottas med röntgenstrålning och analyseras genom dataanalys av pixeldensiteten. Pixeldensiteten används därefter för att beräkna relativa skillnader i cytokinuttryck mellan de tre grupperna.

Statistik

Den statistiska skillnaden i viabilitet, genuttryck och cytokinuttryck mellan de tre grupperna organoider stimulerade med G-exosomer, MLL-exosomer eller PBS analyseras med Kruskal-Wallis test och vid påvisad skillnad utreds denna med Mann-Whitney U-test. Analyserna sker med SPSS version 25 alternativt med GraphPad Prism 8.

Kruskal-Wallis test är ett icke-parametriskt test som används vid icke-normalfördelat material och baseras på rankning av materialet. Distributionen av olika grupper jämförs mellan varandra där H_0 =finns ingen skillnad i distributionen mellan någon av grupperna, och H_1 =minst en grupp har en signifikant skillnad i distributionen ifrån de andra. Om testet visar en signifikansnivå på $p < 0,05$ kan H_0 förkastas (38).

Mann-Whitney U-test är ett icke-parametriskt test som används vid icke-normalfördelat material. Distributionen av två olika grupper undersöks där H_0 =finns ingen skillnad i distributionen mellan grupperna, och H_1 =det är en signifikant skillnad i distributionen mellan grupperna. Signifikansnivån ligger på $p < 0,05$ (39). Om någon av parametrarna ovan visar på signifikans på Kruskal-Wallis test undersöks de tre grupperna två och två mot varandra med Mann-Whitney U-testet för att undersöka mellan vilka grupper skillnaden föreligger.

Etiska överväganden

Alla djurförsök är godkända av Umeå regionala djurförsöksetiska nämnd 2015-04-29 med diarie-nummer A 42-15. För att kunna undersöka tumörer samt hur processer påverkas behövs försök på mäniskor eller djur utföras. De djur som används i denna studie vårdas av kunniga djurvårdare, bor i en bur med spän samt andra råttor och har alltid tillgång till både vatten samt mat. De droger samt behandlingar djuren utsätts för har endast minimala effekter på djurens allmäntillstånd, och vid avlivning sövs djuren. Antalet djur begränsas till minsta möjliga antal som ger statistiskt säkerställda resultat.

Diskussion

Prostataorganoider som modellsystem

I denna studie var det tänkt att odla prostataepitel *in vitro* som prostataorganoider för att undersöka tumörexosomers effekt på prostataepitel. Prostataorganoider efterliknar prostatans normala epitelstruktur och organoider är fenotypiskt stabila, vilket är fördelaktigt (30). Denna *in vitro*-metod ger därför en representativ bild över hur prostataepitelet skulle kunna bete sig samt förändras av tumörexosomer *in vivo*. En annan vanlig typ av modell som används är 2D vävnadsmodellen där celler växer i ett encells-lager. 2D-modeller är billiga och de flesta protokoll är designade för denna typ av modell. Däremot etableras inte vävnadslika cell-cell-interaktioner vid 2D-modellen som det gör vid 3D-modellen då den ger en bättre cellulär organisering att studera (40).

Försöken skulle även ha kunnat utföras *in vivo*. För att kunna studera vilka effekter tumörexosomerna skulle haft på det normala prostataepitelet *in vivo* skulle exosomerna behöva injiceras i levande råttors prostat. Detta skulle ge mycket bra förutsättning för experimentet då prostatan behåller en oförändrad omgivande miljö medan det i en *in vitro*-modell endast finns en tillgjord miljö i form av definierat medium. Studier visar att olika delar av prostatan behöver kommunicera med varandra under prostatans normala utveckling (3). För organoidmodellen skulle detta kunna betyda att viktiga interaktioner för prostataepitelet missas. En fördel med organoidmodellen är att endast exosomernas direkta effekter på epithelcellerna som ses. En *in vivo*-modell skulle däremot kräva många råttor då varje brunn i denna studie skulle behöva ersättas med en levande råtta. Detta gör det mer etiskt försvarbart att studera organoider som utvinns av endast en råtta istället för att många råttor behöver nyttjas.

Cellviabilitet Assay

Cellproliferation kan mätas på många olika sätt, i detta experiment mättes cellviabiliteten med CellTiter-Glo. En alternativ modell är att använda cell-spårningsfärg. Antingen tas färgen upp av cellen och binder till cellulära protein i cellen eller så är färgen lipofil och inkorporeras i cellens plasmamembran. Mängden av färgen späds ut vid multipla celldelningar och kan relateras till cellproliferationen genom analys med flödescytometri (41). Denna metod ger ett värde på cellernas proliferation men inte specifikt antalet levande celler, som undersöktes i denna studie.

Cytokine Array

I denna undersökning utfördes en screening för 79 olika cytokiner för att få en överblick över vilka typer av cytokiner som utsöndrades då prostataepitel influerades av tumörexosomer. Cytokiner används som medlare vid bland annat inflammationssvar (29) och studier har visat att det finns en ökad infiltration av inflammatoriska celler i prostatan vid förekomst av en tumör (7–9, 27, 28). Vilka cytokiner som är involverade i det inflammatoriska svaret i den normala vävnaden runt en prostatatumör är inte känt och inte heller vilka celler som utsöndrar cytokinerna. Om detta var bättre klarlagt skulle profilen utav cytokiner eventuellt kunna användas för prognos samt behandling av prostatacancer.

Studier av genuttryck

Studier har visat att genuttrycket för TINT skiljer sig från kontrollvävnad (7). Här analyserades sex olika gener med qRT-PCR som tidigare visat sig ha ett förändrat uttryck i TINT (7, 9–12, 16). Det undersöktes om tumörexosomer kunde påverka uttrycket utav faktorer i prostataepitel som redan visat sig vara förändrade i andra *in vivo*-studier av TINT. Om syftet däremot hade varit att undersöka alla faktorer som förändras i prostataorganoider stimulerade med tumörexosomer skulle metoder som analyserar det totala genuttrycket använts, som exempelvis microarray.

Vid microarray är ett objektglas uppmärkt med ett stort antal kluster som var och en består av flera kopior utav ssDNA. Alla kopior av ssDNA är komplementära till ett visst cDNA där de olika klustren av ssDNA brukar representera var sin gen. mRNA extraheras från vävnaden alternativt cellerna som ska analyseras för sitt genuttryck. Detta omvandlas sedan till cDNA, märks med fluorescens och läts hybridisera med sitt komplementära kluster av ssDNA på plattan. Beroende på hur många kopior av ett cDNA det finns kommer fluorescensen bli olika stark i olika kluster vilket korrelerar till hur stort genuttrycket är för de olika generna som klustren representerar. Genuttrycket analyseras genom kvantifiering utav styrkan av klustrens fluorescens (42).

Prostatacancermarkörer

I dessa försök undersöktes om tumörexosomer kunde påverka viabilitet, genuttryck samt cytokinutsöndring av prostataorganoider *in vitro*. Det skulle ge en ökad förståelse över hur TINT-förändringar uppstår. Eventuella skillnader i genuttryck eller cytokinutsöndring skulle kunna utredas vidare som nya diagnostiska eller prognostiska markörer samt även om de skulle kunna fungera som nya målinriktade behandlingar.

Att försöka finna nya biomarkörer för prostatacancer forskas det om inte bara i TINT utan även i bland annat urin samt blod. PSA har hög sensitivitet, men låg specificitet vilket är en ledande faktor till varför många män överdiagnosiseras samt överbehandlas gällande prostatacancer. Denna låga specificitet kommer bland annat av att PSA ökar vid prostatacancer, men även normalt vid exempelvis förstorad prostata eller inflammation. En biomarkör som inte tar hänsyn till ålder, prostatavolym, inflammation eller trauma är prostate cancer antigen 3 (PCA3). Det är ett prostataspecifikt icke-kodande mRNA som uttrycks i högre grad i prostatacancerceller än i normal vävnad. Markören mäts i urinen och testet har en hög specificitet samt prediktivt värde men låg sensitivitet (43). Desto fler markörer som hittas desto lättare kommer det vara att skilja en aggressiv från en ofarlig prostatacancer samt att skilja dessa från normal prostata utan cancer.

Nyttan av projektet

I denna studie utredes TINT-markörer *in vitro* då studier visat att det finns ett förändrat uttryck i TINT som verkar bero på tumören (7–11). Det bästa vore att så många specifika markörer som möjligt kunde upptäckas i TINT samt blod- eller urinprov eftersom en markör-panel för prostatacancer då skulle kunna utformas. Panelen bör ge hög specificitet samt sensitivitet och samtidigt kunna förutsäga tumörens aggressivitet samt metastatiska förmåga. Om diagnostik samt prognos av prostatacancer skulle förbättras så skulle över- och underdiagnoseringen samt över- och underbehandlingen av prostatacancer minska vilket skulle vara bättre för både patienten och samhället.

Det är viktigt att identifiera markörer i TINT från prostatabiopsier som kan påvisa en tumör även om biopsierna råkat missa tumören. En undersökning av den normala vävnaden i prostatabiopsierna skulle kunna ge en fingervisning om att det finns en tumör som har missats eller att vävnaden är tumörfri, utfallet avgör om fler biopsier behöver tas. Undersökningen skulle även kunna ge en fingervisning om tumörens aggressivitet. Det skulle innebära en indikation om patienten behöver behandlas samt även vilken typ av behandling som skulle kunna bota. Då sjukdomen är så utbredd i västvärlden, har hög dödlighet samt att behandlingarna ger mycket biverkningar (6) är det av största vikt att alternativa diagnostiska metoder hittas så inga tumörer vare sig missas eller överbehandlas.

Etiska aspekter

Det är av största vikt att patienter får den vård dem behöver, men även att de inte utsättas för onödig vård som kan förhindras genom nya förbättrade diagnostiska metoder. En behandling samt dess eftervård kan få en patient att behöva utstå lidande. Exempelvis radikal prostatektomi och strålning kan ge många biverkningar som bland annat urinerings-, erekitions-, tarmbesvär samt smärta som patienten kan behöva stå ut med under resten av sitt liv. Dessa biverkningar kan utgöra ett stort lidande för patienten som i vissa fall kan undvikas om ofarlig cancer diagnostiseras på rätt sätt. Om en aggressiv prostatacancer ändå missas vid en biopsundersökning kan en nödvändig behandling utgå vilket även det leder till lidande för patienten då det finns risk att patienten erhåller metastaser och senare avlider i sin sjukdom. Om markörer i TINT skulle kunna kartläggas skulle dessa scenarion kunna undvikas och de som behöver behandling för sin tumör hittas tidigare samt får rätt behandling.

Modellen som användes i denna studie baserades på råttor och en enda rått-prostata ger mycket material till organoidodling. Detta gör att färre råttor behöver sätta livet till jämfört med *in vivo*-studier, och att forskningen av prostatacancer kan fortgå i samma takt. Detta ger en mer hållbar forskning samt minskar lidandet för djuren.

Samhälleliga aspekter

Hos män är prostatacancer den mest frekventa cancerrelaterade dödsorsaken i Sverige och trots att prostatacancer endast drabbar män utgör sjukdomen den vanligaste cancerformen. Idag finns en hög överdiagnosering av prostatacancer vilket leder till överbehandling som är mycket kostsam för samhället. Behandlingen kan bli än mer kostsam om patienten behöver medicin för exempelvis sexuell dysfunktion som följd av den första behandlingen (6). Om nya diagnostiska metoder upptäcks kan dessa bidra till minskad överbehandling av ofarlig prostatacancer, vilket leder till minskad belastning på

sjukvården och lägre kostnad då färre behandlingar samt mindre eftervård behövs. Detta kommer även leda till att färre patienter behöver utstå onödiga biverkningar till följd av överbehandling.

Det är av största vikt att nya diagnostiska metoder utvecklas för prostatacancer då nuvarande metoder är bristfälliga. Fler markörer för diagnostisering av farlig samt ofarlig prostatacancer behövs i syfte att kunna välja rätt behandling till varje patient, det både minskar kostnaderna för samhället samt lidandet för patienten. Fortsatt forskning behövs för att förstå hur exosomer från tumörer påverkar normalt prostataepitel. Konklusionen var att påverkan på viabilitet, genuttryck samt cytokinutsöndring från prostatatumörers exosomer från råtta, G och MLL, bör gå att studera med celldeling, qRT-PCR samt Cytokine array.

Referenser

1. Alves EF, de Freitas Ribiero BLM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Histological and quantitative analyzes of the stromal and acinar components of normal human prostate zones. *Prostate*. 2018;78(4):289-293.
2. Dalpiaz O, Anderhuber F. The fascial suspension of the prostate: A cadaveric study. *Neurourol Urodyn*. 2017;36(4):1131-1135.
3. Toivanen R, Shen MM. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*. 2017;144(8):1382-1398.
4. Chua CW, Shibata M, Lei M et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):951-961.
5. Homonnai ZT, Matzkin H, Fainman N, Paz G, Kraicer PF. The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertil Steril*. 1978;29(5):539-542.
6. Regionala cancercentrum i samverkan. Prostatacancer Nationellt vårdprogram. <https://kunskapsbanken.cancercentrum.se/globalassets/cancerdiagnoser/prostatacancer/vardprogram/nationellt-vardprogram-prostatacancer.pdf> (2020-04-09)
7. Adamo HH, Halin Bergström S, Bergh A. Characterization of a gene expression signature in normal rat prostate tissue induced by the presence of a tumor elsewhere in the organ. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130076.
8. Adamo HH, Strömvall K, Nilsson M, Halin Bergström S, Bergh A. Adaptive (TINT) changes in the tumor bearing organ are related to prostate tumor size and aggressiveness. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141601.
9. Strömvall K, Thysell E, Halin Bergström S, Bergh A. Aggressive rat prostate tumors reprogram the benign parts of the prostate and regional lymph nodes prior to metastasis. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176679.
10. Bergström SH, Järemo H, Nilsson M, Adamo HH, Bergh A. Prostate tumors downregulate microseminoprotein-beta (MSMB) in the surrounding benign prostate epithelium and this response is associated with tumor aggressiveness. *Prostate*. 2018;78(4):257-265.
11. Adamo H, Hammarsten P, Hägglöf C et al. Prostate cancer induces C/EBP β expression in surrounding epithelial cells which relates to tumor aggressiveness and patient outcome. *Prostate*. 2019;79(5):435-445.
12. Halin Bergström S, Hägglöf C, Thysell E, Bergh A, Wikström P, Lundholm M. Extracellular vesicles from metastatic rat prostate tumors prime the normal prostate tissue to facilitate tumor growth. *Sci Rep*. 2016;6:31805.
13. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879-887.
14. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412-9420.
15. Whiteside TL. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Adv Clin Chem*. 2016;74:103-141.

16. Ashida S, Kawada C, Inoue K. Stromal regulation of prostate cancer cell growth by mevalonate pathway enzymes HMGCS1 and HMGCR. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6533-6542.
17. Sjöblom L, Saramäki O, Annala M et al. Microseminoprotein-beta expression in different stages of prostate cancer. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150241.
18. Asatiani E, Huang WX, Wang A, Rodriguez Ortner E, Cavalli LR, Haddad BR, Gelmann EP. Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* 2005;65(4):1164-1173.
19. Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF. The angiogenetic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology.* 2002;143(4):1441-1450.
20. Pilarsky CP, Schmidt U, Eissrich C et al. Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer. *Prostate.* 1998;36(2):85-91.
21. D'Antonio KB, Toubaji A, Albadine R, Mondul AM, Platz EA, Netto GJ, Getzenberg RH. Extracellular matrix associated protein CYR61 is linked to prostate cancer development. *J Urol.* 2010;183(4):1604-1610.
22. Li D, Liu J, Huang S et al. CCAAT enhancer binding protein β promotes tumor growth and inhibits apoptosis in prostate cancer by methylating estrogen receptor β. *Neo.* 2018;65(1):34-41.
23. Oikonomou P, Giatromanolaki A, Tsaroucha AK et al. Expression of autophagy-related proteins Beclin-1 and proliferation marker Ki-67 in calculous av acalculous human gallbladder epithelium. *Hippo.* 2019;23(2):64-69.
24. Lee LH, Yang H, Bigras G. Current breast cancer proliferative markers correlate variably based on decoupled duration of cell cycle phases. *Sci Rep.* 2014;4:5122.
25. Azizan N, Hayati F, Tizen NMS, Farouk WI, Masir N. Role of co-expression of estrogen receptor beta and Ki67 in prostate adenocarcinoma. *Investig Clin Urol.* 2018;59(4):232-237.
26. Hammarsten P, Josefsson A, Thysell E et al. Immunoreactivity for prostate specific antigen and Ki67 differentiates subgroups of prostate cancer related to outcome. *Mod Pathol.* 2019;32(9):1310-1319.
27. Halin S, Rudolfsson SH, Van Rooijen N, Bergh A. Extratumoral macrophages promote tumor and vascular growth in an orthotopic rat prostate tumor model. *Neoplasia.* 2009;11(2):177-186.
28. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am J Pathol.* 2010;177(2):1031-1041.
29. Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften.* 1995;82(4):178-187.
30. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(7):407-418.
31. Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc.* 2016;11(2):347-358.
32. Cook DJ, Warren PJ. (2015). Cellular pathology; An introduction to techniques and applications. 3rd ed. Scion Publishing Limited, ISBN: 9781907904356, 292-297.

33. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;79-80:3-18.
34. Zhang L, Valdez J, Zhang B, Wei L, Chang J, Xin L. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. *PLoS One.* 2011;6(3):e18271.
35. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530:67-74.
36. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209-219.
37. Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate.* 2008;68(14):1555-1560.
38. Fan C, Zhang D. A note on power and sample size calculations for the Kruskal-Wallis test for ordered categorical data. *J Biopharm Stat.* 2012;22(6):1162-1173.
39. Bürkner PC, Doeblер P, Holling H. Optimal design of the Wilcoxon-Mann-Whitney-test. *Biom J.* 2017;59(1):25-40.
40. Mosaad E, Chambers K, Futrega K, Clements J, Doran MR. Using high throughput microtissue culture to study the difference in prostate cancer cell behavior and drug response in 2D and 3D co-cultures. *BMC Cancer.* 2018;18(1):592.
41. Chung S, Kim SH, Seo Y, Kim SK, Lee JY. Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: application to cell lines and cocultures. *Cytometry A.* 2017;91(7):704-712.
42. Altman NS, Hua J. Extending the loop design for two-channel microarray experiments. *Genet Res.* 2006;88(3):153-163.
43. Hendriks RJ, van Oort IM, Schalken JA. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(1):12-19.