



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

ΣΤΑΜΑΤΙΑ Β. ΒΕΛΑΕΤΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ Βελαέτη Σταματίας: 13-9-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 615^α/16-10-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γούσια Άννα λέκτορας Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πανδής Νικόλαος Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Γενετικής του Πανεπιστημίου LUND της Σουηδίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-10-2007

«Κυτταρογενετική και Μοριακή Κυτταρογενετική μελέτη των νεοπλασιών του προστάτη»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :

Αγνάπη Νίκη	Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα	Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γιαννάκης Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας επί του Επιστημονικού πεδίου της Φυσιολογίας του Ουροποιητικού Συστήματος και της Ενδοσκοπικής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πανδής Νικόλαος	Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Γενετικής Πανεπιστημίου LUND
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **22-3-2013**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής


ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



ΣΤΗ ΜΝΗΜΗ ΤΗΣ ΓΙΑΓΙΑΣ ΜΟΥ, ΑΓΝΗΣ

ΚΑΙ

ΣΤΗ ΜΗΤΕΡΑ ΜΟΥ, ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ

Πρόλογος

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πιο συχνή κακοήθεια στους άνδρες και η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα που αφορούν όλους τους παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου αναμένεται να αυξηθούν περαιτέρω σαν συνέπεια κυρίως των αυξανόμενων τεχνολογικών δυνατοτήτων. Ταυτόχρονα η εφαρμογή τους στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην πρόληψη, θα απαιτήσει, τη διερεύνηση της σχέσης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή φιλοδοξεί να συμβάλλει προς την κατεύθυνση αυτή με τη μελέτη χιμαιρικών γονιδίων σε καλοήθεις υπερπλασίες και στα καρκινώματα του προστάτη.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο τμήμα Γενετικής του Πανεπιστημιακού Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «ο Άγιος Σάββας». Έγινε στα πλαίσια μεταπτυχιακής υποτροφίας που μου χορηγήθηκε από το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης.

Για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής συνέβαλαν, ο καθένας με τον τρόπο του, οι παρακάτω, τους οποίους τους ευχαριστώ θερμά:

Τον επιβλέπων της διατριβής και Πρόεδρο της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κύριο Δημήτριο Στεφάνου, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ανάθεση του θέματος, τις εποικοδομητικές συμβουλές, καθώς και για την κατανόηση και την ευγένειά του και τη διαρκή του στήριξη. Σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής υπήρξε ενθαρρυντικός παράγοντας και με την άποψη συνεργασία μαζί του και την πολύτιμη βοήθειά του, συντέλεσε στην ομαλή διεξαγωγή και ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς επιτροπής κυρία Άννα Γούσια, για τη βοήθεια που μου παρείχε κάθε στιγμή που της ζητήθηκε, καθώς και όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την προθυμία τους να κρίνουν τη διατριβή αυτή.

Τον Νικόλαο Πανδή, Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Lund της Σουηδίας, διευθυντή του τμήματος Γενετικής στο Πανεπιστημιακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Άγιος Σάββας»

και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη βοήθειά του στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή αυτής της εργασίας. Με τις βαθύτατες γνώσεις του στη γενετική του καρκίνου του προστάτη και τον ενθουσιασμό για κάθε νέα ανακάλυψη που αφορά τη γενετική επιστήμη ήταν πρωταρχικός παράγοντας για την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Το συνεχές ενδιαφέρον του σε συνδυασμό με τις γνώσεις και την ειδικότερη παιδεία του επηρέασαν θετικά τη συνολική ερευνητική μου προσπάθεια και συντέλεσαν στη διαμόρφωση του χαρακτήρα μου ως ανθρώπου.

Τη Δρ Κωνσταντίνα Πετράκη και διευθύντρια του Νεφροπαθολογοανατομοκού τμήματος του νοσοκομείου «Ευαγγελισμός», για την προθυμία της να συνεργαστεί και να διαθέσει στοιχεία και το μεγαλύτερο μέρος του βιολογικού υλικού, που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση μέρους αυτής της μελέτης, καθώς και για τις συμβουλές.

Το Δρ Ευθύμιο Δημητριάδη ο οποίος σχεδίασε, οργάνωσε και επέβλεψε τη μελέτη αυτή.

Τη Δρ Ελένη Ρίζου, η οποία με δίδαξε μου τις τεχνικές της κυτταρογενετικής και της μοριακής κυτταρογενετικής και με εμπνέω στην προσπάθειά μου να φέρω εις πέρας τη διδακτορική διατριβή μου.

Το συνάδερφο και φίλο Αναστάσιο Κυριαζόγλου ο οποίος με τις πολύτιμες πληροφορίες και συμβουλές του με ενθάρρυνε στην ολοκλήρωση του στόχου μου.

Το προσωπικό του τμήματος Γενετικής του Νοσοκομείου ΠΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας» και ιδιαίτερα τις τεχνολόγους Αλεξάνδρα Παπακώστα, Βαρβάρα Κλαρνέτα, Αιμιλία Φίλη και Ελένη Τσιαμαντά, οι οποίες μου παρείχαν την όποια βοήθεια είχα ανάγκη. Συνέβαλαν καθοριστικά στη δημιουργία ενός κλίματος άψογης συνεργασίας και με «αγκάλιασαν» από την πρώτη στιγμή.

Το Ουρολογικό τμήμα του Νοσοκομείου ΠΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας» για την προθυμία τους να συνεργαστούν και να διαθέσουν στοιχεία και υλικό, που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση μέρους αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου και στο Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης, το οποίο με ενθάρρυνε και ενίσχυσε, ηθικά και υλικά, την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, μέσα από την χορήγηση και την οργάνωση του προγράμματος υποτροφιών του για τη στήριξη των νέων επιστημόνων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη γιαγιά μου Αγνή που με είχε πάντα στην καρδιά και στο μυαλό της. Οι γονείς μου Φρόσω και Βασίλης και ο αδερφός μου Σπύρος στάθηκαν δίπλα μου όλο αυτή την περίοδο και συνέβαλαν ο καθένας με το δικό του τρόπο, ώστε να φέρω εις πέρας την προσπάθεια αυτή. Τους ευχαριστώ που με στήριξαν και με συγχώρεσαν για την ιδιαίτερη συναισθηματική φόρτιση που είχα σε δύσκολες στιγμές.

Το φίλο μου, Σταύρο Λεχούδη, ο οποίος με στήριξε και μου προσέφερε μεγάλη πρακτική βοήθεια, αφού επιμελήθηκε μέρος της μορφής της διατριβής με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Τη φίλη μου, Κατερίνα Γυφτάκη, για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσέφερε.

Σε όλους τους παραπάνω αναφερόμενους Καθηγητές, συναδέρφους, φίλους και συγγενείς θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου για την ολόψυχη, πολύτιμη, διαρκή και καθοριστική βοήθειά τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
Εισαγωγή	7
1.1 Καρκίνος	7
1.2 Καρκίνος και γενετική	13
I. Ο καρκίνος – Γενετικές βλάβες στα χρωμοσώματα και στα γονίδια	17
II. Τρεις κατηγορίες γονιδίων οι οποίες συμβάλλουν στην καρκινογένεση	19
1.3 Προστάτης	23
I. Ανατομία του προστάτη – Θέση –Λειτουργία	23
II. Νοσήματα – Ταξινόμηση	25
III. Σχέση καλοήθους υπερπλασίας, ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνου	35
IV. Σχέση φλεγμονής και καρκίνου	39
1.4 Βιολογική παθολογία και γενετική στον καρκίνο του προστάτη	41
I. Γενετικός πολυμορφισμός και καρκίνος του προστάτη	43
II. Γενετικές μεταβολές και καρκίνος του προστάτη	47
III. Κλινικές προκλήσεις στον καρκίνο του προστάτη	61
IV. Μέθοδοι διάγνωσης	63
V. Νεοπλασματικοί δείκτες	67
2. Σκοπός	75
3. Ειδικό μέρος : Υλικά και μέθοδοι	77
3.1 Υλικό	77
3.2 Κυτταρογενετική μεθοδολογία	79
3.3 Μεθοδολογία in situ υβριδισμού (FISH)	85
3.4 Μοριακή μεθοδολογία	93

4. Αποτελέσματα	109
5. Συζήτηση	133
6. Συμπεράσματα	153
7. Περίληψη στην Ελληνική	155
8. Περίληψη στην Αγγλική	157
9. Βιβλιογραφία	159

Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα συχνό νόσημα με ξεχωριστή θέση ανάμεσα στα πιο συχνά νοσήματα που προσβάλλουν τον πληθυσμό παγκόσμια. Η ξεχωριστή θέση αφορά :

α) τη συχνότητα - στις αναπτυγμένες χώρες μοιράζεται την πρώτη θέση μαζί με τα καρδιαγγειακά νοσήματα,

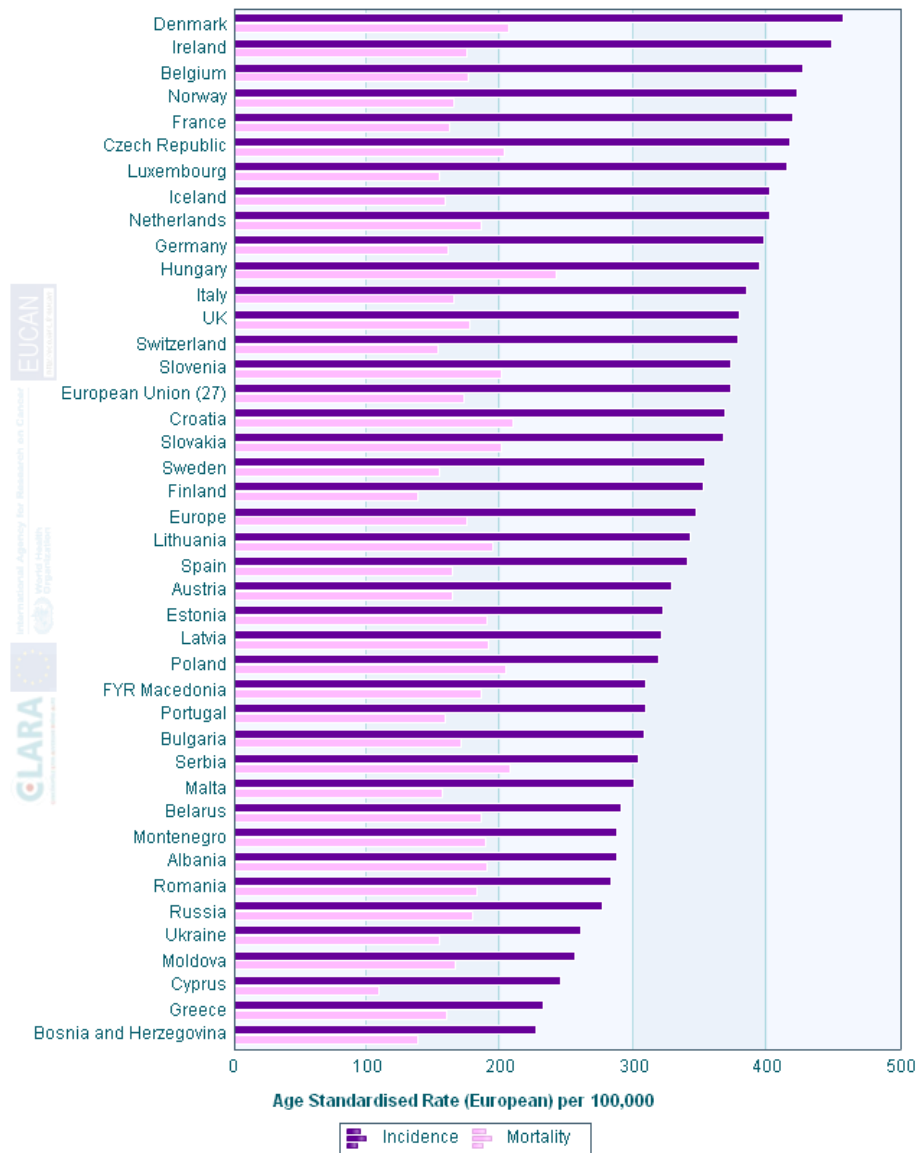
β) τη δυσκολία εισαγωγής αποτελεσματικών θεραπειών για ένα πολύ μεγάλο μέρος των διαφορετικού τύπου κακοηθειών και

γ) τη βαρύτητα, που είναι από τις πλέον μεγάλες, με συνέπεια το υψηλό κόστος αντιμετώπισης.

Το 2007, πάνω από 12 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου διαγνώστηκαν παγκόσμια και περίπου 7.6 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονταν στον καρκίνο. Αυτά τα νούμερα αναμένεται το 2050 να φθάσουν τα 27 εκατομμύρια νέα περιστατικά και τους 17.5 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (Garcia M et al, Global Cancer Facts and Figure 2007 Atlanta., GA: American Cancer Society).

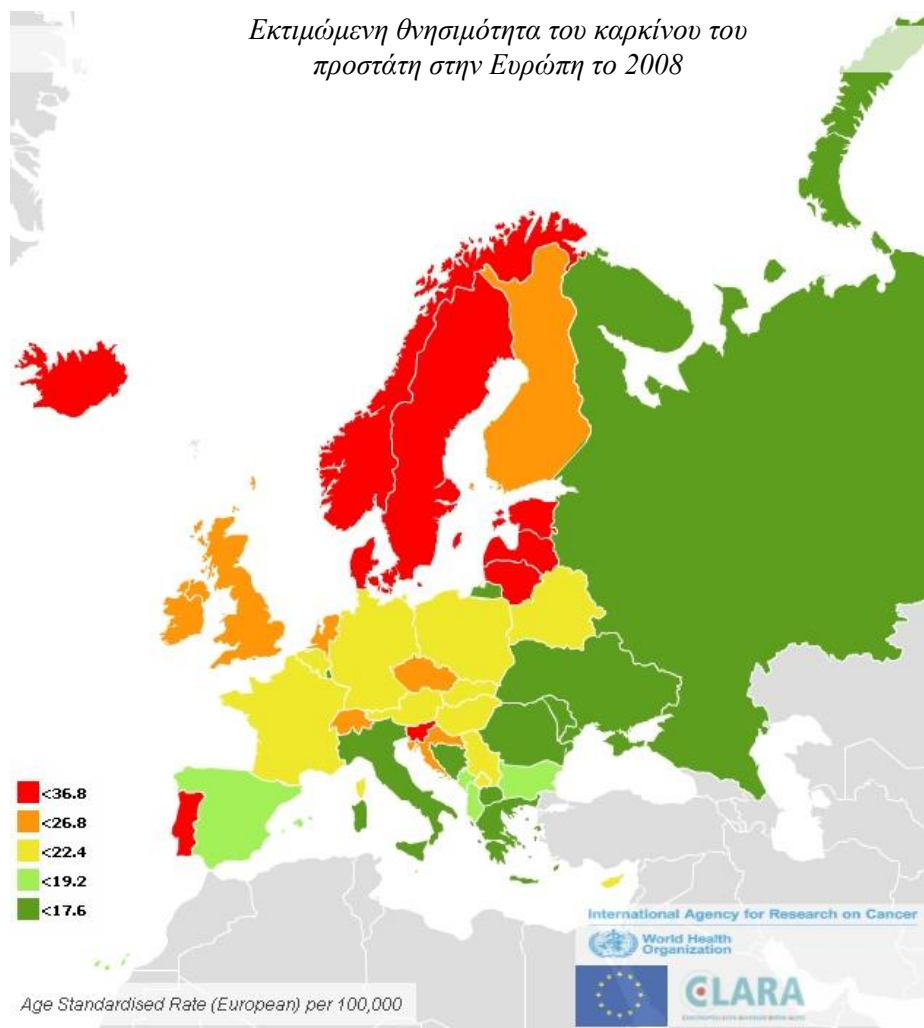
Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία του European Cancer Observatory (ECO) το 2008 καταγράφηκαν 2457610 (374.1/100000) περιστατικά καρκίνου (πλην του βασικοκυτταρικού και ακανθοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος).

Εκτιμώμενη συχνότητα και θνησιμότητα όλων των τύπων καρκίνου εκτός από το μελάνωμα και στα δύο φύλα, το 2008



Εικόνα 1.1 I : Εκτιμώμενη συχνότητα και θνησιμότητα όλων των τύπων καρκίνου εκτός από το μελάνωμα και στα δύο φύλα, το 2008 (European Cancer Observatory).

Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος στους άνδρες είναι ο καρκίνος του προστάτη με 338732 (110.5/100000) περιστατικά (το 2008) ακολουθούμενος από τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του παχέως εντέρου (<http://eco.iarc.fr/>).

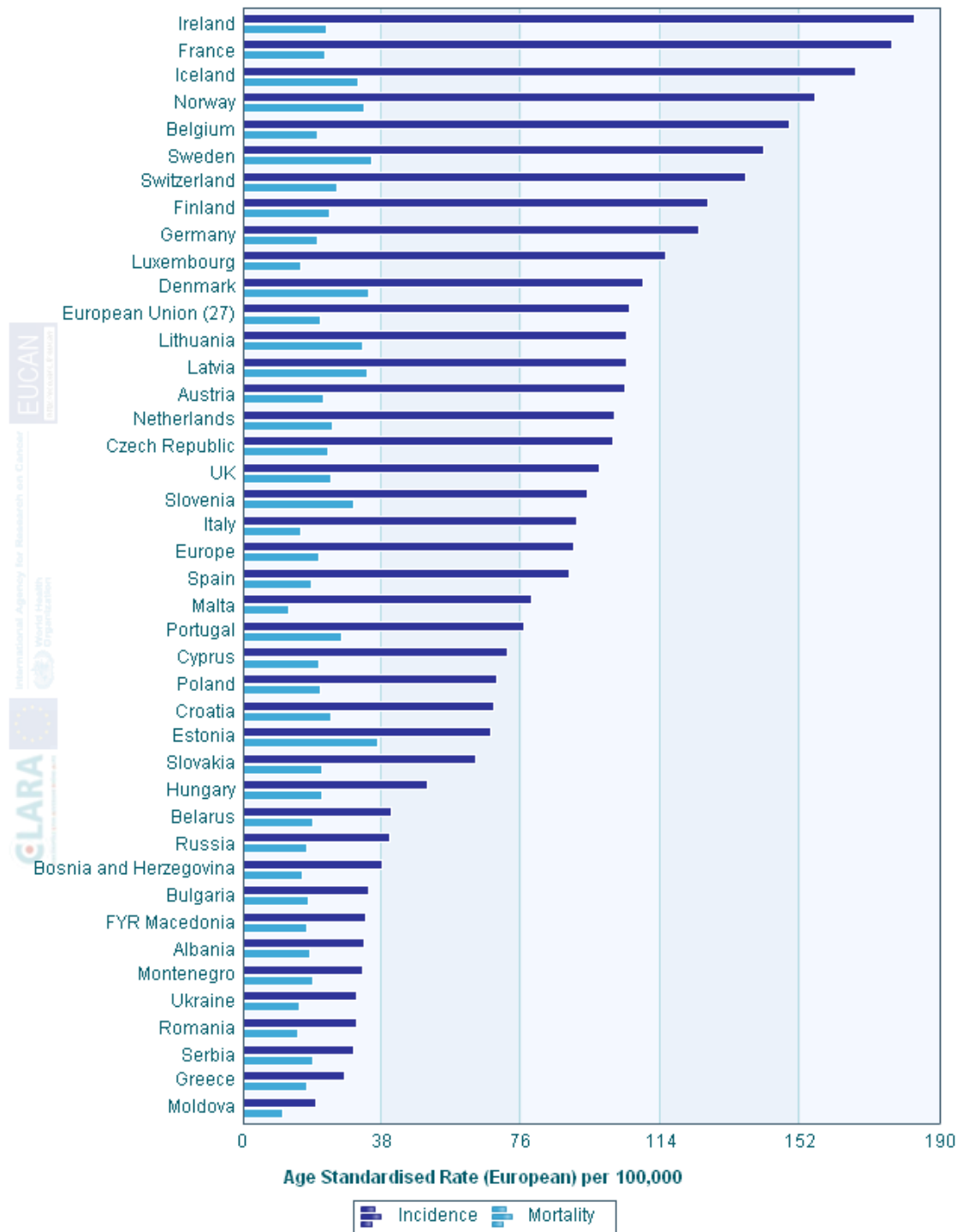


Εικόνα 1.1 II : Εκτιμώμενη θνησιμότητα του καρκίνου του προστάτη στην Ευρώπη το 2008 (European Cancer Observatory).

Στη χώρα μας, σύμφωνα πάντα με το ECO, ο καρκίνος του προστάτη έρχεται δεύτερος σε συχνότητα (13.1%) μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (26.6%), στοιχείο που τοποθετεί την Ελλάδα στην χαμηλότερη θέση όσο αφορά την συχνότητα του καρκίνου του προστάτη ανάμεσα στις 27 χώρες της ευρωπαϊκής ένωσης.

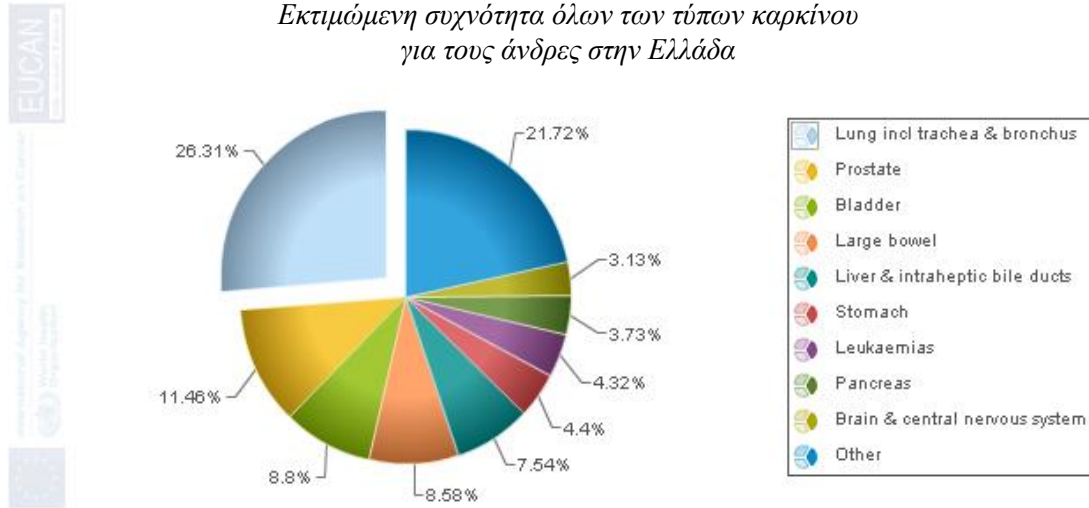
Όσο αφορά τη συχνότητα συνολικά όλων των περιστατικών καρκίνου η Ελλάδα μαζί με την Κύπρο βρίσκονται στις τελευταίες θέσεις με συχνότητα 253.3/100000, όταν ο ευρωπαϊκός μέσος όρος είναι 374.1.

Εκτιμώμενη συχνότητα και θνησιμότητα του καρκίνου του προστάτη
σε ευρωπαϊκές χώρες, το 2008



Εικόνα 1.1 III : Εκτιμώμενη συχνότητα και θνησιμότητα του καρκίνου του προστάτη σε ευρωπαϊκές χώρες, το 2008 (European Cancer Observatory).

Εκτιμώμενη συχνότητα όλων των τύπων καρκίνου
για τους άνδρες στην Ελλάδα



Εικόνα 1.1 IV : Εκτιμώμενη συχνότητα όλων των τύπων καρκίνου για τους άνδρες στην Ελλάδα (European Cancer Observatory).

Η εφαρμογή τις τελευταίες δεκαετίες σε πολλές χώρες (και στη χώρα μας) προγραμμάτων έγκαιρης διάγνωσης μέσω προληπτικού έλεγχου σε όσους καρκίνους αυτό ήταν εφικτό, παρείχε στοιχεία που ενισχύουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα που θα συμβάλει στην αποτελεσματικότερη σχεδίαση, οργάνωση και εκτέλεση τέτοιων προγραμμάτων.

Ταυτόχρονα η εισαγωγή και επιτυχημένη εφαρμογή των νέων θεραπειών στην αντιμετώπιση μιας σειράς κακοηθειών ενισχύει περαιτέρω την ανάγκη για εμβάθυνση των ερευνητικών προσπαθειών που θα καταστήσουν εφικτή την πιο εκτεταμένη εφαρμογή τους.

1.2 Καρκίνος και Γενετική

Μια διαπίστωση, η οποία κατέστη αδιαμφισβήτητο και αφετηριακό στοιχείο για οποιαδήποτε περαιτέρω έρευνα που αφορά τον καρκίνο, είναι η διαπίστωση πως ο «Καρκίνος είναι Γενετική ασθένεια», με την έννοια ότι το πρωταρχικό «πάσχον» υλικό είναι το γενετικό υλικό των κυττάρων.

Οι πρώτες αναφορές για τον ρόλο του γενετικού υλικού στην ανάπτυξη του καρκίνου έγιναν στα τέλη του 19^{ου} αρχές του 20ου αιώνα από τους πρωτοπόρους της κυτταρογενετικής David von Hanseman (1890) και Theodor Boveri (1914). Παρατηρώντας στο οπτικό μικροσκόπιο διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα, διέκριναν και σημείωσαν την παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης ανώμαλων κυτταρικών κλώνων που προκαλούνται από τις ανωμαλίες του γενετικού υλικού. Η ανακάλυψη του DNA (1944) ως το χημικό μόριο της κληρονομικότητας και η αποκάλυψη της δομής του (1953) βοήθησαν στην ενίσχυση αυτής της πρωταρχικής άποψης-διαπίστωσης. Αυτό έγινε αρχικά, κυρίως μέσω των παρατηρήσεων ότι χημικοί και άλλοι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA επάγουν την ανάπτυξη καρκινικής εξαλλαγής.

Χρειάστηκαν περίπου 40 χρόνια από τις πρώτες παρατηρήσεις των Boveri και Hanseman, έως την ανακάλυψη της χρωμοσωμικής μετάθεσης t(9;22) ως χαρακτηριστικού στοιχείου των λευκών αιμοσφαιρίων ασθενών με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία.

Ακολούθησε δυο δεκαετίες αργότερα η παρατήρηση ότι η εισαγωγή γενετικού υλικού (ολικού DNA) καρκινικών κυττάρων σε φαινοτυπικά ομαλά NIH3T3 κύτταρα μπορούσε να τα μετατρέψει σε καρκινικά. Η απομόνωση του τμήματος που ήταν υπεύθυνο για αυτή τη μετατροπή – το τμήμα που περιείχε το μεταλλαγμένο γονίδιο *HRAS* – άνοιξε τον δρόμο (που συνεχίζεται ως σήμερα) της αναζήτησης των αλλαγών στο γενετικό υλικό που σχετίζονται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου.

Οι βασικές μορφές του καρκίνου είναι τρεις : τα καρκινώματα, τα οποία προέρχονται από επιθηλιακό ιστό, τα σαρκώματα, τα οποία είναι νεοπλάσματα μεσεγγυματικής προελεύσεως και οι αιματολογικές κακοήθειες, οι οποίες διακρίνονται στα αιμοποιητικού τύπου νεοπλάσματα (πχ λευχαιμίες) και στις λεμφοειδείς κακοήθειες (πχ λεμφώματα).

Πολλές φορές δεν είναι δυνατό να προσδιορίσουμε την αιτία του καρκίνου. Γνωρίζουμε όμως ότι οι γενετικές μεταλλάξεις που υφίστανται τα κύτταρα είναι αυτές που δημιουργούν τον καρκίνο.

Κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης οι μεταλλάξεις που θα συμβούν στο κύτταρο δεν είναι σίγουρο ότι εξασφαλίζουν την βιωσιμότητα του. Τις περισσότερες φορές μία μετάλλαξη ή δεν εκφράζεται στο φαινότυπο του κυττάρου ή είναι επιβλαβής για τη βιωσιμότητα του. «Επιτυχής» μετάλλαξη θεωρείται αυτή που σαν αποτέλεσμα έχει την επιβίωση και την αύξηση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου το οποίο είναι φορέας της, έτσι ώστε να πετύχει τη δημιουργία κυττάρων-φορέων της μετάλλαξης. Η σταδιακή συσσώρευση τέτοιων μεταλλάξεων προωθεί τη δημιουργία και την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν διαφύγει από τον ομαλό αναπτυξιακό έλεγχο και τελικά μετατρέπει φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Είναι πλέον σαφές πως απαιτούνται πάνω από μια γενετικές βλάβες για την έναρξη και ακόμη περισσότερες για την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Τα καρκινικά λοιπόν κύτταρα αποκτούν κάποιες συγκεκριμένες ιδιότητες όπως απεριόριστο αντιγραφικό δυναμικό, αυτονομία στα αυξητικά σήματα, ελαττωμένη ευαισθησία σε αντι-μιτωτικά σήματα, αποφυγή της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), νεοαγγειογένεση και τέλος ικανότητα επέκτασης στους ιστούς και δημιουργίας μεταστάσεων. Χάρη στις ιδιότητες αυτές μπορούν να εξαπλωθούν εις βάρος των φυσιολογικών κυττάρων.

Η προσοχή μας, λοιπόν, εστιάζεται στον τρόπο πρόκλησης αυτών των μεταλλάξεων. Κάποιες μεταλλάξεις, οι οποίες ονομάζονται αυτόματες, εμφανίζονται αιφνίδια, προέρχονται από λάθη που γίνονται κατά τον διπλασιασμό του DNA στο κύτταρο. Άλλες προκαλούνται από μεταλλαξιογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι διάφοροι τύποι ακτινοβολιών, (η ιοντίζουσα ακτινοβολία, η κοσμική, η ηλιακή και η υπεριώδης ακτινοβολία) ή οι διάφορες χημικές ουσίες (αμίαντος, φυτοφάρμακα, ορμόνες). Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ο τρόπος διαβίωσης, πχ. το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, που αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου. Επίσης, είναι φανερό ότι όσο προχωράει η ηλικία αυξάνονται οι πιθανότητες συσσώρευσης «λαθών» στο γενετικό υλικό. Τέλος, πολύ σημαντικό είναι το πόσο

βεβαρυμμένο είναι το οικογενειακό ιστορικό του κάθε ανθρώπου για ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

Πιο συγκεκριμένα, όσο αφορά τον κληρονομικό καρκίνο, αυτό που κληρονομείται δεν είναι ο καρκίνος, αλλά η προδιάθεση ή ευαισθησία στον καρκίνο. Αυτό που μεταβιβάζεται από γενιά σε γενιά είναι μια συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, η οποία από μόνη της δεν είναι ικανή να προκαλέσει καρκίνο. Για να εμφανιστεί καρκίνος σε έναν οργανισμό πρέπει να υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις. Έχοντας όμως στο γενετικό του υλικό ήδη μια μετάλλαξη, ο φορέας της μετάλλαξης αυτής εκτεθειμένος σε συγκεκριμένους επιβαρυντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, μπορεί να αναπτύξει πιο σύντομα καρκίνο, συγκριτικά με κάποιον άλλο που δεν φέρει κάποια μετάλλαξη και εκτίθεται στους ίδιους ή παρόμοιους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μία άλλη βασική διαφορά είναι ότι στο σποραδικό καρκίνο όλες οι μεταλλάξεις που έχουν γίνει περιορίζονται στο παρέγχυμα του όγκου, ενώ στον κληρονομικό καρκίνο η αρχική μετάλλαξη για την ογκογένεση υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και μπορεί να μεταφερθεί από γενιά σε γενιά.

Έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση περισσότερων του ενός όγκων στο άτομο ή στην οικογένεια στον κληρονομικό καρκίνο, η οποία οφείλεται ακριβώς στο γεγονός ότι η κληρονομούμενη μετάλλαξη υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και η επιλεκτικότητα της εμφάνισής της ή όχι εξαρτάται αφενός μεν από το σε ποιο ιστό ή όργανο τα γονίδια εκφράζονται, αφετέρου δε από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σήμερα, πλέον μιλάμε για κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα και όχι για κληρονομικό καρκίνο.

1.2 I Ο καρκίνος-Γενετικές βλάβες στα χρωμοσώματα και στα γονίδια

Σήμερα έχει τεκμηριωθεί ότι : βλάβες (ανεξάρτητα από τα αίτια που τις προκαλούν) στο γενετικό υλικό ευθύνονται για την έναρξη και εξέλιξη της καρκινογένεσης. Με τον όρο γενετικές αλλαγές-βλάβες εννοούμε κάθε μικρή ή μεγάλη μεταβολή που έχει σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση της φυσιολογικής λειτουργίας τμήματος ή τμημάτων του γενετικού υλικού. Τέτοιες γενετικές αλλαγές είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες διακρίνονται σε αριθμητικές, δηλαδή ύπαρξη επιπλέον χρωμοσωμάτων ή απώλειά τους και σε δομικές, δηλαδή θραύση ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων σε κάποιο σημείο και τον ανασυνδιασμό, την απώλεια ή και την προσθήκη γενετικού υλικού, οι σημειακές μεταλλάξεις και τέλος, οι επιγενετικές αλλαγές. Παραδείγματα αυτών των γενετικών βλαβών δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.2 I : Γενετικές βλάβες στο γονιδίωμα.

Αριθμητικές Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες	<ul style="list-style-type: none"> ➤ πολυπλοειδίες ➤ ανευπλοειδίες 	Γενικευμένες μεταβολές
Δομικές Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ελλείψεις - Προσθήκες ➤ Μεταθέσεις - Αναστροφές 	Μεταβολές μεγάλου αριθμού γονιδίων-μεγάλης έκτασης περιοχών του γονιδιώματος
Μεταλλάξεις	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Μικροελλείψεις - προσθήκες ➤ Σημειακές μεταλλάξεις 	Μεταβολές συγκεκριμένων γονιδίων-περιοχών
Επιγενετικές αλλαγές	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Υπερ/υπο-μεθυλίωση 	Μεταβολή συγκεκριμένων γονιδίων

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, η απουσία ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων έχει ως τελικό αποτέλεσμα την απώλεια μίας ομάδας γονιδίων που εδράζονται στα αντίστοιχα χρωμοσώματα. Επιπλέον χρωμόσωμα ή χρωμοσώματα έχει ως αποτέλεσμα περισσότερα αντίγραφα του συνόλου των γονιδίων αυτών των χρωμοσωμάτων. Όσον αφορά τις δομικές ανωμαλίες, οι ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις μεταξύ χρωμοσωμάτων, οι εισχωρήσεις (insertions) ενός τμήματος χρωμοσώματος σε κάποιο

άλλο και οι αναστροφές, προκαλούν είτε αλλαγές στη θέση των γονιδίων είτε τη δημιουργία υβριδικών γονιδίων. Στην πρώτη περίπτωση το αποτέλεσμα είναι η μεταφορά ενός γονιδίου σε μια νέα γενετική θέση υπό την ρύθμιση ενός νέου υποκινητή, με τελικό αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου αυτού, δηλαδή παράγεται μια φυσιολογική πρωτεΐνη αλλά σε αφύσικα μεγάλη ποσότητα. Στη δεύτερη περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας νέας χιμαιρικής πρωτεΐνης. Επίσης, υπάρχουν οι μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις κατά τις οποίες γίνονται χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που οδηγούν σε επιπλέον χρωμοσωμικό υλικό ή απώλεια χρωμοσωμικού υλικού ή και τα δύο.

1.2 II Τρεις κατηγορίες γονιδίων οι οποίες συμβάλλουν στην καρκινογένεση

Έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα περισσότερα από 350 γονίδια των οποίων οι γενετικές βλάβες -μεταλλάξεις συμβάλλουν-ενέχονται στην καρκινογένεση.

Τα περισσότερα από τα γονίδια αυτά είναι δυνατό να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- i. Τα Ογκογονίδια
- ii. Τα Ογκοκατασταλτικά γονίδια και
- iii. Τα Γονίδια σταθερότητας (Stability genes)

i. Τα Ογκογονίδια - Απορυθμισμένη ενεργοποίηση

Οι γενετικές βλάβες τα καθιστούν συνεχώς ενεργά ή ενεργά κάτω από συνθήκες που τα φυσιολογικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) είναι ανενεργά.

Η ενεργοποίηση μέσω σωματικής μετάλλαξης του ενός αλληλόμορφου των ογκογονιδίων είναι αρκετή για την επίτευξη της απορρύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου.

Το είδος των γενετικών βλαβών που οδηγούν σε απορυθμισμένη ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μπορεί να είναι χρωμοσωμικές μεταθέσεις, γονιδιακή επέκταση (η οποία κατά κανόνα οδηγεί σε υπερέκφραση ενός κατά τα άλλα φυσιολογικού πρωτεϊνικού προϊόντος) ή σημειακές μεταλλάξεις.

Οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα :

- α) την μεταβολή των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων και επομένως της έκφρασης ενός γονιδίου και
- β) τον σχηματισμό χμαιρικών γονιδίων με εντελώς νέα λειτουργία.

Η γονιδιακή επέκταση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της πολυπλοειδίας αλλά κυρίως είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας πολλαπλών αντιγράφων του ίδιου γονιδίου και έχει σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων.

Οι σημειακές μεταλλάξεις αλλάζουν την δομή και επομένως την δράση κρίσιμων λειτουργικών τμημάτων του γονιδιακού προϊόντος.

ii. Τα Ογκοκατασταλτικά γονίδια-Απενεργοποίηση

Οι γενετικές βλάβες στα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα από ότι στα ογκογονίδια, τα καθιστούν ανενεργά ή μειώνουν-παρεμποδίζουν την φυσιολογική δράση τους.

Στη περίπτωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων απαιτείται η παρουσία της βλάβης και στα δύο αλληλόμορφα γονίδια για να έχουμε μεταβολή της φυσιολογικής τους δράσης. Ωστόσο για μια σειρά ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει διατυπωθεί η άποψη πως η βλάβη και μόνο στο ένα αλληλόμορφο είναι ικανή να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.

Το είδος των γενετικών βλαβών που οδηγούν σε απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι συνήθως :

- α) ελλείψεις ή προσθήκες διαφόρων μεγεθών που έχουν σαν αποτέλεσμα την έλλειψη ολόκληρου ή ενός τμήματος του γονιδίου ή την καταστροφή της δομής του και
- β) σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν είτε σε "αδρανοποίηση" κρίσιμων λειτουργικών τμημάτων των γονιδιακών προϊόντων είτε σε παραγωγή ελαττωματικών προϊόντων.

Σύμφωνα με τους Kinzler και Vogelstein (1), τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (gatekeepers) και σε γονίδια που εξασφαλίζουν την σταθερότητα του γονιδιώματος (caretakers). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει εκείνα τα γονίδια που δρουν απευθείας στην αναστολή του πολλαπλασιασμού ή στην προαγωγή του θανάτου του κυττάρου (πχ. *RB*, *P53* και *APC*), ενώ η δεύτερη αποτελείται από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA και τα οποία συνήθως αντιμετωπίζονται σαν ξεχωριστή κατηγορία (πχ. *MSH2*, *ATM*, *BRCA1* και *BRCA2*). Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια ανήκουν και στις δύο κατηγορίες, όπως για παράδειγμα τα *BRCA1* και *BRCA2*, που λειτουργούν τόσο σαν «caretakers» όσο και σαν «gatekeepers».

iii. Τα Γονίδια σταθερότητας (Stability genes)-Απώλεια λειτουργίας

Η τρίτη αυτή ομάδα γονιδίων που ονομάζονται γονίδια σταθερότητας - γονίδια φρουροί συμβάλλουν στη καρκινογένεση με διαφορετικό τρόπο από ότι οι δύο προηγούμενες ομάδες γονιδίων.

Η απορρύθμιση της λειτουργίας αυτών των γονιδίων οδηγεί στη διατήρηση του ρυθμού συσσώρευσης των γενετικών βλαβών, που επιφέρουν εξωκυτταρικοί ή ενδοκυτταρικοί παράγοντες, σε χαμηλά επίπεδα.

Η απενεργοποίησή τους οδηγεί στην αδυναμία επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν στη διάρκεια της αντιγραφής και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν τη συσσώρευση μεταλλάξεων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αναστολή ή μεταβολή της λειτουργίας τους έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων σε αλλά γονίδια ανάμεσα σε αυτά και σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Για την απώλεια της λειτουργίας τους όπως και για τα ογκοκατασταλτικά γονίδια απαιτείται η απενεργοποίηση και των δυο αλληλόμορφων γονιδίων.

Στην ομάδα αυτή των γονιδίων ανήκουν γονίδια που σκοπό έχουν να διορθώνουν σφάλματα στη διάρκεια διπλασιασμού του γενετικού υλικού, καθώς και να επιδιορθώνουν μικρές βλάβες που επιφέρουν στο γενετικό υλικό μια σειρά μεταλλαξιογόνοι παράγοντες.

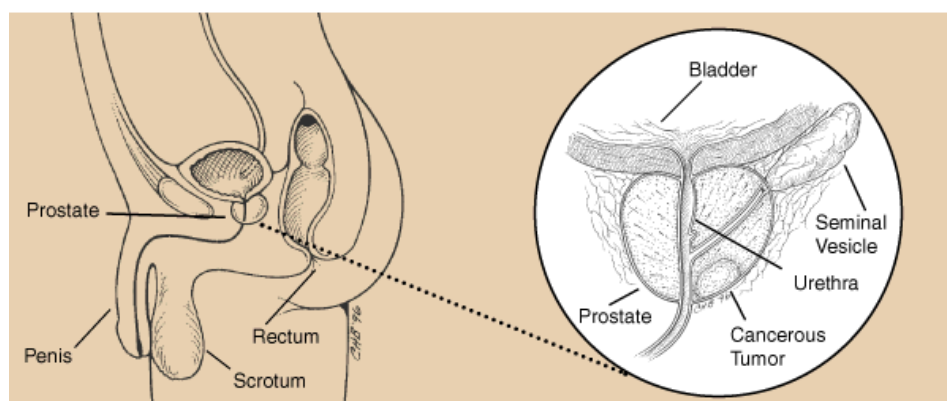
Υπάρχουν 5 μηχανισμοί επιδιόρθωσης που ενδεικτικά αναφέρονται: MMR (mismatch repair), BER (base excision repair), NER (nucleotide excision repair), NHEJ (non homologous end joining), HR (homologous recombination). Σε κάθε ένα από αυτούς τους μηχανισμούς, συμμετέχουν πολλά γονίδια που σχηματίζουν μονοπάτια αντιδράσεων (2-6).

Στην ομάδα αυτή ανήκουν επίσης γονίδια που ελέγχουν τη σωστή εκτέλεση κυτταρικών λειτουργιών, στις οποίες συμμετέχουν μεγάλα τμήματα χρωμοσωμάτων (μιτωτικός ανασυνδυασμός) ή ολόκληρα τα χρωμοσώματα (χρωμοσωμικός διαχωρισμός), (πχ. *BRCA1*, *ATM*).

1.3 Προστάτης

1.3 I Ανατομία του προστάτη - Θέση - Λειτουργία

Ο προστάτης είναι ένας αδένας του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, ο οποίος περιβάλλει την ουρήθρα στην πυελική κοιλότητα. Εντοπίζεται αμέσως κάτω από την ουροδόχο κύστη, πίσω από την ηβική σύμφυση και μπροστά από το ορθό, (Εικόνα 1.3 I). Ο προστάτης του ενήλικα ζυγίζει περίπου 20g. Έχει το σχήμα ενός υποστρόγγυλου κώνου και εμφανίζει μια πλατύτερη βάση, που συνεχεται προς τα πάνω με τον αυχένα της ουροδόχου κύστης και μια στενότερη κορυφή, που στηρίζεται πάνω στο πυελικό έδαφος.



Εικόνα 1.3 I : Ανατομία του προστάτη (www.cancer.org/cancer/prostatecancer/overviewguide/prostate-cancer-overview-what-is-prostate-cancer).

Ο προστάτης αποτελείται από 30-40 ανεξάρτητους σύνθετους αδένες, οι οποίοι αναπτύσσονται από το επιθήλιο της ουρήθρας μέσα στο παρακείμενο τοίχωμα της ουρήθρας. Το σύνολο των αδένων αυτών, διευρύνει το τοίχωμα της ουρήθρας και σχηματίζει αυτό που είναι γνωστό σαν προστάτης. Όλοι οι αδένες διατηρούν τους εκφορητικούς πόρους τους, που εκβάλλουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο στους ουρηθραίους κόλπους, που εντοπίζονται στην οπίσθια επιφάνεια του αυλού της ουρήθρας.

Οι προστατικές εκκρίσεις, από κοινού με τις εκκρίσεις των σπερματοδόχων κύστεων, συμβάλλουν στο σχηματισμό του σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση.

Διακρίνονται τρεις ζώνες: μια κεντρική (πίσω από τον αυχένα της κύστης), μια περιφερική και μια μεταβατική (7). Αυτή η διαίρεση του προστάτη έχει κάποια σχέση με την προέλευση και αιτιολογία των παθήσεων του οργάνου. Συγκεκριμένα, η αδενική υπερπλασία (καλοήθης) προέρχεται από τη μεταβατική ζώνη, μόνο το 15-25% των αδενοκαρκινωμάτων εμφανίζεται στη μεταβατική ζώνη. Η φλεγμονή (προστατίτιδες) και το αδενοκαρκίνωμα συναντούνται στην περιφερική ζώνη. Η κεντρική ζώνη φαίνεται να μη συμμετέχει (8).

1.3 II Νοσήματα-Ταξινόμηση

Στον προστάτη μπορεί να συναντήσουμε:

- i. φλεγμονές,
- ii. αδενωματώδη υπερπλασία και
- iii. νεοπλάσματα.

i. Φλεγμονές

Οι φλεγμονές διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες προστατίτιδες. Η οξεία προστατίτιδα είναι εστιακή ή διάχυτη πυώδης φλεγμονή, με κύριο μικροβιακό αίτιο το κολοβακτηρίδιο.

Στη χρόνια προστατίτιδα μπορεί να παρατηρηθεί συχνά υποτροπή και οι φλεγμονές να επεκταθούν στα λοιπά μέρη του ουροποιογεννητικού συστήματος. Στη χρόνια προστατίτιδα συναντάμε λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Η προστατίτιδα προσβάλλει κυρίως τον αδενικό ιστό του προστάτη, κυρίως στην περιφερική ζώνη (9-13).

ii. Καλοήθεις αλλοιώσεις (PBH-PIN)

Η αδενωματώδης (οζώδης αδενική) υπερπλασία (OAY) είναι καλοήθης εξεργασία. Το βάρος του προστάτη φθάνει τα 60-90g. Συνήθως εμφανίζεται μετά το 50^ο έτος της ηλικίας με το σχηματισμό όζων στην περιουρηθρική περιοχή του προστάτη, προκαλώντας παραμόρφωση και στένωση στην ουρήθρα. Κλινικά εκδηλώνεται με δυσχέρεια στην ούρηση λόγω πιεστικών φαινομένων στην ουρήθρα, κατακράτηση ούρων στην ουροδόχο κύστη, βαθμιαία διάταση και υπερτροφία του κυστικού τοιχώματος με επιμόλυνση των ούρων λόγω της στάσης. Σύμφωνα με νεκροτομικές μελέτες, η OAY συναντάται σε ποσοστό 50-60% σε ηλικίες 40 έως 59

έτη και 95% μετά το 70^ο έτος. Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα ενοχοποιούνται ως αιτιολογικοί παράγοντες.

Ιστολογικά, η υπερπλασία μπορεί να έχει διάφορες μορφές. Αυτό οφείλεται στο ότι τα στοιχεία που συμμετέχουν στην όλη διεργασία είναι οι αδένες (υπερπλασία των κυττάρων ή διάταξη της κοιλότητας) και το ινομυώδες υπόστρωμα. Το αδενικό στοιχείο είναι αυτό που κυριαρχεί κυρίως.

Στην περίπτωση της προστατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (Prostatic Intraepithelial Neoplasia, PIN) υπάρχει δυσπλασία (διαταραχή αρχιτεκτονικής και κυτταρική ατυπία) και πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων στους πόρους και στις κυψέλες του προστάτη.

Υπάρχουν δύο τύποι PIN:

- α) Χαμηλόβαθμη PIN : όπου τα κύτταρα των αδενοκυψελών χαρακτηρίζονται από ήπια κυτταρολογική ατυπία (φαίνονται σχεδόν φυσιολογικά) και
- β) Υψηλόβαθμη PIN : όπου τα κύτταρα των αδενοκυψελών χαρακτηρίζονται από σοβαρή κυτταρολογική ατυπία και διαταραχή της αρχιτεκτονικής (φαίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό μη φυσιολογικά).

PIN αρχίζει να εμφανίζεται στον προστάτη κάποιων ανδρών νωρίς, περίπου από την ηλικία των είκοσι χρόνων. Περίπου το 50% των ανδρών θα εμφανίσουν PIN όταν φθάσουν την ηλικία των 50. Πολλοί άνδρες εμφανίζουν χαμηλόβαθμη PIN σε μικρή ηλικία, χωρίς να σημαίνει ότι θα εμφανίσουν καρκίνο του προστάτη.

Αντιθέτως, στις περιπτώσεις υψηλόβαθμης PIN, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, (20% με 30%), συνύπαρξης καρκίνου του προστάτη σε κάποια άλλη περιοχή του οργάνου.

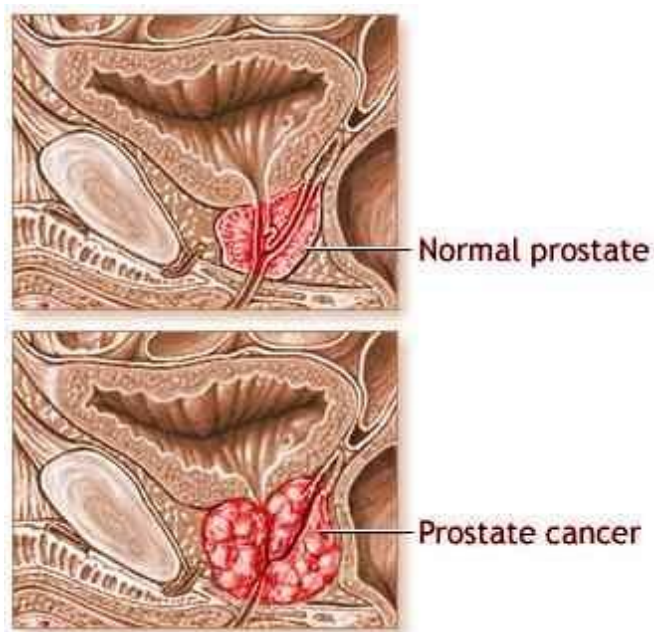
iii. Καρκίνος του προστάτη

Ιστορικά στοιχεία

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πιο συχνή κακοήθεια στους άνδρες και η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες. Υπάρχουν σε ιατρικά κείμενα των αρχαίων λαών (Ασσυρίων, Αιγυπτίων, Ελλήνων) αναφορές που υποδηλώνουν νοσήματα του προστάτη. Ο προστάτης οφείλει το όνομά του

Ερασίστρατο, ο οποίος ήταν μεγάλος ανατόμος της Ελληνιστικής περιόδου στην Αλεξάνδρεια. Μέχρι τις αρχές του 19^{ου} αιώνα κάθε αύξηση στο μέγεθος του προστάτη οριζόταν ως νεόπλασμα. Η υπερτροφία του προστάτη αναγνωριζόταν ως ιδιαίτερη νοσολογική οντότητα με τοπική εντόπιση και διαχωριζόταν από τον καρκίνο που χαρακτηριζόταν από συμπτώματα και σε άλλα συστήματα λόγω μεταστάσεων.

Ο ρόλος του προστάτη στην πρόκληση απόφραξης του αυχένα της κύστης έγινε κατανοητός στο δεύτερο ήμισυ του 19ου αιώνα και η θεραπεία με προστατεκτομή καθιερώθηκε ουσιαστικά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα.



Εικόνα 1.3 II : Φυσιολογικός προστάτης και καρκίνωμα του προστάτη (www.mens-hormonal-health.com/pictures-of-prostate-cancer.html).

Επιδημιολογικά στοιχεία-Αιτιολογία

Στον καρκίνο του προστάτη υπάρχουν τέσσερις σημαντικοί παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη του: η ηλικία, η φυλή, το οικογενειακό ιστορικό και το περιβάλλον.

Με την αύξηση της ηλικίας αυξάνεται και η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Μελέτες που έχουν γίνει στις ΗΠΑ, έχουν δείξει ότι το καρκίνωμα του

προστάτη αναπτύσσεται με μικρή συχνότητα μεταξύ 45-49 έτη, το 40% των ανδρών άνω των πενήντα ετών έχουν καρκίνο του προστάτη και μεγάλη αύξηση υπάρχει μεταξύ 70-75 ετών όπου το ποσοστό φθάνει το 70%. Συγκεκριμένα, οι άνδρες, οι μικρότεροι της ηλικίας των 40 ετών, έχουν μόνο 1/10000 πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη. Το ποσοστό αυξάνει ραγδαία στους άνδρες άνω των 60 ετών όπου η πιθανότητα γίνεται 1/7 (American Cancer Society 2009).

Θεωρείται ότι μία ακόμα αιτία ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, η οποία είναι συνδεδεμένη με την ηλικία είναι το οξειδωτικό στρες και οι συσσωρευτικές επιπτώσεις του στο DNA (14-16). Ο προστάτης φαίνεται να είναι εξαιρετικά ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες, ίσως ως επακόλουθο μιας φλεγμονής, μιας ορμονικής δυσλειτουργίας, μιας δίαιτας και/ή κάποιων επιγενετικών τροποποιήσεων.

Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φυλών και των εθνών. Πιο συγκεκριμένα: οι Αφρο-Αμερικανοί σε σχέση με τους Καυκάσιους, έχουν υψηλότερη επίπτωση και υψηλότερο ποσοστό θανάτου από τον καρκίνο του προστάτη (17). Σύμφωνα με τις μελέτες, υπάρχουν 1/9 πιθανότητες να αναπτύξει καρκίνο του προστάτη ένας Αφρο-Αμερικανός έναντι 1/11 ενός Καυκάσιου (18). Στους ασιάτες είναι εξαιρετικά σπάνιο, με διαφορές μεταξύ Ιαπώνων και Κινέζων. Σε Ιάπωνες που εγκαταστάθηκαν στις ΗΠΑ παρατηρήθηκε αύξηση. Επιπλέον καρκίνο του προστάτη παρουσιάζουν οι άνδρες σε μεγάλο ποσοστό στην Αυστραλία και στις Σκανδιναβικές χώρες, εκτός από τις ΗΠΑ που κυριαρχούν. Στην Ευρώπη τείνει να είναι μεγαλύτερο το ποσοστό στη βόρεια και δυτική Ευρώπη σε σύγκριση με τη νότια και ανατολική. Η θνησιμότητα είναι μικρή χάρη στην πρόωμη διάγνωση με ποσοστό επιβίωσης να φθάνει το 80% στις ΗΠΑ (η χώρα με το μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων) και 40% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα ποσοστά θανάτου είναι υψηλά στην βόρειο Αμερική, στη βορειοδυτική Ευρώπη, στην Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία, σε μέρη της νοτίου Αμερικής (Βραζιλία) και στην Καραϊβική, καθώς και στην κεντρική και νότιο Αφρική. Χαμηλά ποσοστά έχουμε στην Ασία και στη βόρειο Αφρική. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι στις βόρειες περιοχές της Αμερικής και της Ευρώπης υπάρχει αυξημένη συχνότητα του καρκίνου του προστάτη σε σύγκριση με τις νότιες περιοχές. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η ηλιοφάνεια και η βιταμίνη D μπορεί να παίζουν προστατευτικό ρόλο ως προς την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη (19-25).

Επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο έχει η κληρονομικότητα (26-31). Αν ένας άνδρας έχει ένα συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του προστάτη, έχει τις διπλάσιες πιθανότητες να αναπτύξει τη νόσο σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, σύμφωνα με

επιδημιολογικές μελέτες. Ο κίνδυνος πολλαπλασιάζεται όσο περισσότεροι συγγενείς φέρουν τη νόσο. Ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 5-11 φορές όταν ένας άνδρας έχει δύο ή περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού που έχουν καρκίνο του προστάτη.

Εκτός των ανωτέρων υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Υπάρχουν περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (πχ. κάδμιο, χρώμιο, σίδηρο, κοβάλτιο και ψευδάργυρο), τα οποία αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη.

Ο ρόλος των ανδρικών ορμονών (ανδρογόνα, οιστρογόνα, τεστοστερόνη) στην εμφάνιση και ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη είναι σημαντικός. Η τεστοστερόνη διηθείται στον αδένα, όπου μετατρέπεται σε μια πιο μεταβολικά ενεργή μορφή την διυδροτεστοστερόνη (Dihydrotestosterone, DHT). Η DHT και η τεστοστερόνη προσδένονται στον υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR) και το σύμπλεγμα αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα για ενεργοποίηση γονιδίων, τα οποία έχουν στοιχεία που αντιδρούν στα ανδρογόνα.

Οι μέχρι σήμερα έρευνες δίνουν αντικρουόμενα στοιχεία όσο αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων των ανδρογόνων στον ορό με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Τα δεδομένα ωστόσο από ευνοχισμένους άνδρες όπου τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη είναι μηδενικά, καθώς και από μοντέλα σε ζώα, υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή των ανδρογόνων στην εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη. Η εμπλοκή αυτή ενισχύεται περαιτέρω από τη διαπίστωση ότι η δράση των ανδρογόνων μέσω του υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR), επάγει την εμφάνιση χμαιοκρικών γονιδίων με ό,τι αυτό σημαίνει για την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη.

Σημαντικό ρόλο έχουν επίσης και κάποιοι διαιτητικοί παράγοντες. Δίαιτα υψηλή σε θερμίδες σε συνδυασμό με την έλλειψη της φυσικής άσκησης που υπάρχουν στο δυτικό τρόπο ζωής, φαίνεται πως αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη (32, 33). Έχει παρατηρηθεί ότι η υπερκατανάλωση λίπους αποτελεί επικίνδυνο παράγοντα για την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη. Στη μελέτη του Giovannucci (34), όπου μελετήθηκαν 4700 άνδρες ως προς τη σχέση δίαιτας και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, διαγνώστηκε σε 300 από αυτούς καρκίνος του προστάτη. Όλοι αυτοί κατανάλωναν λίπος και μάλιστα κορεσμένο λίπος, όπως επίσης και κόκκινο κρέας (35-38).

Στις Ασιατικές χώρες οι περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του προστάτη είναι μειωμένες, για το λόγο ότι η διαίτά τους περιλαμβάνει πολλά λαχανικά, τα οποία περιέχουν βιταμίνη Α και φυτοοιστρογόνα (39).

Όμως, παρατηρείται αύξηση της παρουσίας του καρκίνου του προστάτη στις χώρες αυτές, όπως η Κίνα και η Ιαπωνία, όπου αλλάζουν οι διατροφικές συνήθειες σύμφωνα με το δυτικό τρόπο διατροφής (40).

Σύμφωνα με μελέτες, έχει παρατηρηθεί μείωση της συχνότητας του καρκίνου του προστάτη κατά 36%, σε αυτούς τους άνδρες που καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες ντομάτας σε σύγκριση με αυτούς που καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες. Η ντομάτα περιέχει σε μεγάλη συγκέντρωση μία καροτινοειδή ουσία, την λυκοπένη, η οποία είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και δρά αρνητικά ως προς την ανάπτυξη του συγκεκριμένου καρκίνου (41).

Ιστολογία του καρκίνου του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την απουσία των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, σε αντίθεση με την PIN όπου έχουμε μείωση του αριθμού τους (42).

Το καρκίνωμα αναπτύσσεται σχεδόν πάντα στην περιφερική ζώνη. Εστίες άτυπης υπερπλασίας, οι οποίες θεωρούνται ως πρόδρομος του καρκίνου, μπορεί να παρατηρηθούν στη συγκεκριμένη ζώνη (43). Σε ορισμένες περιπτώσεις, κυρίως υψηλόβαθμων καρκινωμάτων, υπάρχει διήθηση και διάσπαση της κάψας του οργάνου. Στη διατομή, η επιφάνεια είναι μικροκοκκιώδης, σε αντίθεση με την κυστική εικόνα της αδενωματώδους υπερπλασίας. Ο όγκος είναι δυνατόν να εμφανίζει σκληρά ή μαλθακή σύσταση, ανάλογα με τη συνιστώσα ινώδους υποστρώματος, καθώς και χροιά περισσότερο κιτρινωπή, σε σύγκριση με το υπόλοιπο όργανο.

Το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη είναι συχνά καλά διαφοροποιημένο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα διαφορικής διάγνωσης του από άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία. Αντίθετα στα αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης, η κακοήθεια είναι προφανής.

Υπάρχει μια μορφή καρκινώματος, το λανθάνον καρκίνωμα, το οποίο δεν μπορεί να διαγνωστεί εύκολα και συνήθως ανακαλύπτεται τυχαία είτε σε εγχείρηση για άλλους λόγους είτε σε νεκροτομή. Το καρκίνωμα αυτό είναι μια μικροσκοπική εστία καρκινώματος και διαφεύγει εύκολα, ιδίως όταν οι τομές είναι ολιγάριθμες.

Ο καρκίνος του προστάτη είναι όγκος επιθηλιακής προέλευσης, αλλά διαφέρει από άλλους επιθηλιακούς όγκους, όπως πχ. ο καρκίνος του μαστού, στην έλλειψη ιστοπαθολογικά ευδιάκριτων υποτύπων που διαφέρουν στην πρόγνωσή τους ή στην ανταπόκρισή τους στη θεραπεία.

Η πλειοψηφία των καρκίνων του προστάτη αντιστοιχεί στο αδενοκαρκίνωμα των αδενουκυελών, που εκφράζει υποδοχείς ανδρογόνων (Androgen Receptors, AR).

Υπάρχει μια άλλη κατηγορία αλλά πιο σπάνια, προστατικού καρκινώματος που εμφανίζεται στους μεγάλους αδένες που βρίσκονται στην περιουριθρική περιοχή. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι παρακάτω τύποι :

Το αδενοκαρκίνωμα από τους μεγάλους προστατικούς πόρους, το οποίο παρουσιάζει κακοήθειες σε μεγάλους διατεταμένους πόρους και συχνά εμφανίζει θηλώδεις εστίες.

Το πρωτοπαθές καρκίνωμα από μεταβατικό επιθήλιο, όπου εμφανίζονται όγκοι στο μεταβατικό επιθήλιο των περιουρηθρικών προστατικών αδένων, οι οποίοι καταλήγουν μέσα στην ουρήθρα.

Ο τρίτος τύπος είναι το μικτό αδενοκαρκίνωμα και καρκίνωμα από μεταβατικό επιθήλιο. Σε αυτόν τον τύπο καρκινώματος υπάρχει η συνύπαρξη των δύο προηγούμενων τύπων.

Άλλοι μικροσκοπικοί τύποι καρκίνων του προστάτη που είναι πολύ πιο σπάνιοι είναι : το καρκίνωμα με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά/διαφοροποίηση (44), το οποίο συναντάται σε λιγότερο από το 2% των περιπτώσεων του καρκίνου του προστάτη. Καθώς, επίσης, και οι παρακάτω που απλά αναφέρονται: το βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα, το καρκίνωμα από κύτταρα «δίκην σφραγιστήρος» (signet ring), το πλακώδες καρκίνωμα, το αδενοπλάκώδες καρκίνωμα και τύπου αδενικού-κυστικού (adenoid-cystic-like) (45).

Σύστημα ιστολογικής βαθμολόγησης κατά Gleason

Το σύστημα Gleason είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα. Καθορίζει δε πέντε ιστολογικές διαβαθμίσεις βάσει των μορφολογικών ανωμαλιών, στην αρχιτεκτονική του αδένου, στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων και στον αφορισμό των ορίων του όγκου. Βαθμολογείται η κύρια και δευτερεύουσα μορφολογική εικόνα. Η βαθμολογία κυμαίνεται από το 1 μέχρι το 5. Το Gleason score είναι το άθροισμα των δύο βαθμολογιών, το οποίο είναι από το 2 μέχρι το 10. Ο καρκίνος του προστάτη χαρακτηρίζεται από μορφολογική ετερογένεια και συνήθως περισσότερες από μία ιστολογικές διαβαθμίσεις είναι παρούσες. Η αύξηση του βαθμού κακοήθειας, σχετίζεται συνήθως με πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου και με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών.

Στον πίνακα 1.3 II παρουσιάζεται η σχέση της επιβίωσης των ασθενών με τη βαθμολόγηση Gleason.

Πίνακας 1.3 II : Σχέση επιβίωσης των ασθενών και βαθμολόγηση Gleason.

Ειδική ως προς τη νόσο επιβίωση των ασθενών χωρίς θεραπεία (ανάλογη προς Gleason score)			
Διαφοροποίηση κατά βαθμό	5ετής επιβίωση	10ετής επιβίωση	15ετής επιβίωση
Καλά διαφοροποιημένο (2-4)	98%	94%	83%
Μέτρια διαφοροποιημένο (5-6)	93%	84%	75%
Μη διαφοροποιημένο (7-10)	68%	32%	25%

Κλινική σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση πραγματοποιείται με βιοψία του όγκου. Δύο είναι τα πιο χρησιμοποιούμενα συστήματα: το Whitmore-Jewett System (παλιό) και το TNM System (primary Tumor, regional lymph Nodes, distant Metastasis) (νεότερο). Το TNM σύστημα είναι πιο δημοφιλές και λαμβάνει υπόψη του και τις ψηλαφητές και τις μη ψηλαφητές περιπτώσεις καρκίνου. Περιλαμβάνει εκτίμηση του όγκου με δακτυλική εξέταση και ιστοπαθολογική εκτίμηση των βιοψιών με βελόνα με κατευθυνόμενο υπερηχογράφημα. Το στάδιο T καθορίζεται από το μέγεθος του όγκου, την έκταση κατάληψης των λοβών από τον όγκο ή από το κατά πόσο υπάρχει επέκταση στις σπερματοδόχους κύστες, καθήλωση στα οστά της πυέλου και επέκταση στον αυχένα της κύστης. Το στάδιο N καθορίζεται από την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες και το στάδιο M από οποιαδήποτε πιθανή μετάσταση (46).

Η σταδιοποίηση έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί παρατηρείται σημαντική συσχέτιση αυτής με τα ιστολογικά και κλινικά κριτήρια.

Να σημειωθεί ότι η σταδιοποίηση αφορά μόνο τα αδενοκαρκινώματα. Τα καρκινώματα του προστάτη από μεταβατικό επιθήλιο ταξινομούνται ως ουρηθρικοί όγκοι.

1.3 III Σχέση καλοήθους υπερπλασίας, ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνου

Ένα από τα ερωτήματα που αφορά όλες τις καλοήθεις νόσους του προστάτη είναι το κατά πόσο η παρουσία τους αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Η PIN υψηλού βαθμού (High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia, HGPIN) θεωρείται δυσμενές προγνωστικό στοιχείο για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη.

Ορισμένα από τα κοινά μορφολογικά σημεία μεταξύ της HGPIN και του καρκινώματος του προστάτη είναι τα παρακάτω:

- α) η εμφάνιση και η ανάπτυξη και των δύο αυξάνεται με την ηλικία,
- β) υπάρχει μία αυξημένη συχνότητα και ανάπτυξη της HGPIN στον προστάτη με καρκίνο
- γ) και οι δύο είναι πολυεστιακές (47) και κυρίως βρίσκονται στην περιφερική ζώνη.

Αυτά τα στοιχεία, καθώς και το ότι εμφανίζουν σε σημαντικό ποσοστό γενετικές αλλαγές (48), ενισχύουν την άποψη πώς το HGPIN μπορεί να αξιολογηθεί για ένα ελάχιστο ποσοστό ως πρώιμο στάδιο καρκινώματος του προστάτη (49, 50).

Η καλοήθης υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη είναι συνήθεις ουρολογικές νόσοι στους ηλικιωμένους και υπάρχουν αρκετά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη πώς ως ένα βαθμό υπάρχει αιτιακή συσχέτιση μεταξύ της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη και του καρκίνου του προστάτη (51-53).

Οι αρχικές υποθέσεις για μια τέτοια συσχέτιση βασίζονταν στην παρατήρηση πώς σε υλικό βιοψιών το ποσοστό κοινής εμφάνισης καλοήθους υπερπλασίας και καρκίνου του προστάτη ήταν υψηλό, περίπου 20%. Όλες οι σχετικές μελέτες σε υλικό βιοψιών δείχνουν πώς η καλοήθης υπερπλασία και ο καρκίνος του προστάτη συνυπάρχουν αρκετά συχνά. Έτσι πάνω από το 20% των ανδρών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του προστάτη έχουν επίσης και καλοήθη υπερπλασία του προστάτη. Επίσης, ο καρκίνος του προστάτη ανιχνεύεται σαν τυχαίο εύρημα σε ασθενείς που χειρουργούνται για καλοήθης υπερπλασία σε ποσοστά από 10 μέχρι 20% (54-57).

Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν, επίσης, μία συσχέτιση ανάμεσα στα καρκινώματα και τις καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη, με τη μεγαλύτερη από

αυτές, να δείχνει πως υπάρχει μόνο μία μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκινωμάτων σε ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (58, 59).

Επίσης, τα ευρήματα έχουν αρκετά κοινά στοιχεία, όπως αναφέρεται και παρακάτω:

- α) η συχνότητα και των δύο αυξάνει με την ηλικία (54).
- β) η εξέλιξή τους εξαρτάται από τα ανδρογόνα (54, 60) και ανταποκρίνονται στις σχετικές θεραπείες ανδρογονικού αποκλεισμού (61, 62).
- γ) μοιράζονται επίσης κοινές γενετικές αλλαγές (63) και τέλος
- δ) στην εμφάνιση και των δύο, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο η παρουσία φλεγμονής (10, 64).

Ωστόσο παρά τις ομοιότητες υπάρχουν αρκετά ισχυρά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη ότι η καλοήγη υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη δεν σχετίζονται αιτιακά και ότι η παρουσία της υπερπλασίας του προστάτη δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον αδένα (43).

Η καλοήγη υπερπλασία χαρακτηρίζεται από την υπερπλασία κυρίως του στρωματικού στοιχείου και σε μικρότερο βαθμό του επιθηλιακού, ενώ στο καρκίνωμα του προστάτη εμφανίζεται σύνθετη παθολογία όπου επικρατεί το επιθηλιακό στοιχείο (65, 66).

Το σύνολο σχεδόν των περιστατικών καλοηθών υπερπλασιών του προστάτη εντοπίζονται στη μεταβατική ζώνη ενώ μόνο το 24% των περιστατικών καρκινωμάτων του προστάτη έχει εντοπιστεί σε αυτή τη ζώνη, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους να εντοπίζεται στην περιφερική ζώνη (67).

Από επιδημιολογική άποψη το πιο σημαντικό πρόβλημα στην προσπάθεια αξιολόγησης της συσχέτισης της καλοήθους υπερπλασίας και του καρκίνου του προστάτη βρίσκεται στις αλλαγές στη διαγνωστική προσέγγιση. Έχει εκτιμηθεί πως ένα ποσοστό 15% κλινικά σημαντικού καρκίνου του προστάτη μένει αδιάγνωστο. Επομένως, κάθε σύμπτωμα-νόσος που αυξάνει τη συχνότητα και το εύρος του ουρολογικού ελέγχου είναι πιθανό να οδηγεί και σε διάγνωση περιστατικών καρκίνου που διαφορετικά θα έμεναν αδιάγνωστα. Ταυτόχρονα ένα ποσοστό μη κλινικά σημαντικού καρκίνου του προστάτη ανιχνεύεται σαν τυχαίο εύρημα σε βιοψίες ασθενών με καλοήγη υπερπλασία.

Έτσι παρότι οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε ασθενείς με καλοήγη

υπερπλασία, μελέτες που επιχειρούν να αποφύγουν τους προαναφερόμενους παράγοντες, δεν βρίσκουν καμία συσχέτιση (68).

1.3 IV Σχέση φλεγμονής και καρκίνου

Η σχέση φλεγμονής και ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη είναι ένα στοιχείο το οποίο διερευνάται ολοένα και περισσότερο. Υπάρχουν σήμερα αρκετά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη πώς η παρουσία χρόνιων φλεγμονών είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη.

Θεωρείται ότι οι χρόνιες φλεγμονές συνδέονται με την καρκινογένεση του προστάτη, σύμφωνα με κάποιες επιδημιολογικές, παθολογικές και μοριακές ενδείξεις (12, 69, 70). Ένα παράδειγμα είναι ότι η έκφραση ορισμένων χημειοκινών είναι ένας βιοχημικός προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του προστάτη (71).

Περιοχές εστιασμένου επιθηλίου του προστάτη μπορεί συχνά να εμφανιστούν σε ηλικιωμένους άνδρες σαν ακολουθία μίας φλεγμονής. Τέτοιες περιοχές συνήθως εμφανίζουν αυξημένο επιθηλιακό πολλαπλασιασμό και έχουν τον όρο PIA (Proliferative Inflammatory Atrophy). Περιοχές με PIA συχνά συναντάμε σε PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) και σε αδενοκαρκινώματα και έτσι PIA θα μπορούσε να θεωρηθεί πρόδρομη βλάβη που οδηγεί στον καρκίνο του προστάτη (43, 50).

Στις φλεγμονές του προστάτη μπορεί να παρατηρήσουμε ορμονικές διαταραχές, όπως επίσης αλλοιωμένα επίπεδα ανδρογόνων και οιστρογόνων. Μπορεί η αιτία να είναι μία μόλυνση από βακτηριακούς ή ιογενείς παράγοντες, φυσικό τραύμα ή διαιτητικούς παράγοντες (10). Μία γνωστή αιτία είναι η μόλυνση του προστατικού αδένου από χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα και επομένως, συμπεραίνεται ο σημαντικός ρόλος που έχει η βακτηριακή μόλυνση στην καρκινογένεση του προστάτη, η οποία φαίνεται από την ταυτοποίηση πολλαπλών ειδών βακτηρίων σε δείγματα προστατεκτομής (72).

Επίσης, σημαντική είναι η «συνεισφορά» των ιογενών μολύνσεων στη δημιουργία χρόνιων φλεγμονών του προστάτη, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινώματα του προστάτη. Αυτό ταυτοποιείται από την παρουσία γονιδιακών περιοχών ιών, οι οποίες συνδέονται με την αύξηση του κινδύνου του κληρονομικού καρκίνου (HPC, Hereditary Prostate Cancer) (13, 27, 73, 74).

1.4 Βιολογική παθολογία και γενετική στον καρκίνο του προστάτη

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα της έρευνας πάνω στην Μοριακή Βιολογία και Γενετική του καρκίνου του προστάτη έχουν συμβάλει στην τεκμηρίωση και ενίσχυση μιας σειράς διαπιστώσεων καθώς και στη διατύπωση ορισμένων πιθανών «μοντέλων» για την έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη.

Ορισμένα από τα βασικά σημεία - διαπιστώσεις που αφορούν την γενετική και βιολογία του καρκίνου του προστάτη είναι τα παρακάτω:

- α) ο καρκίνος του προστάτη είναι μια πολυπαραγοντική νόσος στην ανάπτυξη της οποίας οι γενετικοί παράγοντες έχουν καθοριστική συμβολή και
- β) ο καρκίνος του προστάτη είναι μια ετερογενής και πολυσταδιακή νόσος εξελισσόμενη στο χρόνο.

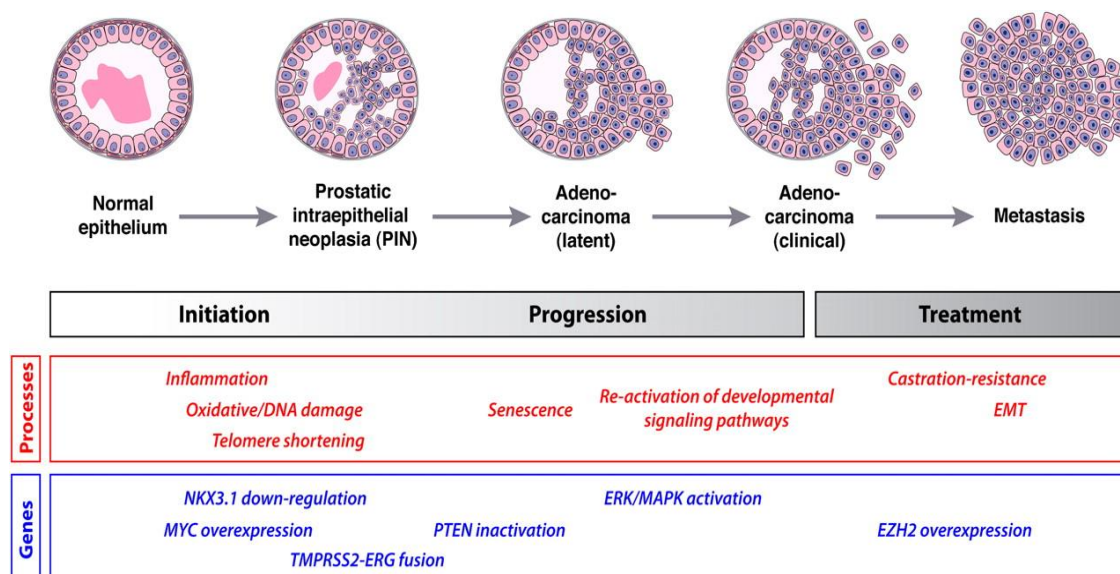
Οι διαπιστώσεις αυτές ενισχύονται σήμερα κυρίως μέσα από την εφαρμογή των τεχνολογιών που επιτρέπουν μαζικού τύπου αναλύσεις. Τα ευρήματα αυτών των αναλύσεων συσσωρεύουν δεδομένα τόσο γύρω από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου, όσο και για το είδος των βλαβών-μεταλλάξεων που αυτές προκαλούν στο γενετικό υλικό των κυττάρων του προστάτη.

Οι πλέον χαρακτηριστικές κλινικές παρατηρήσεις που υπογραμμίζουν το στοιχείο της ετερογένειας και εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη είναι :

- α) οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στον αδρανή-μη σημαντικό κλινικά-καρκίνο και στον επιθετικό-μεταστατικό καρκίνο του προστάτη και
- β) η παρατηρούμενη εξέλιξη-σχεδόν καθολική-από τον αρχικά ορμονοεξαρτώμενο στον ορμονοανθεκτικό καρκίνο του προστάτη.

Η βάση-αιτία αυτών των διαφορών δεν είναι ακόμα διευκρινισμένη, όμως οι πρόσφατες μελέτες που διερευνούν το σύνολο των γενετικών μεταβολών που παρατηρούνται στον καρκίνο του προστάτη, ανοίγουν το δρόμο για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της νόσου. Αυτό που διαφαίνεται σαν δυνατότητα από αυτή την προσπάθεια είναι να φθάσουμε από μια ετερογενή και ελλιπώς χαρακτηρισμένη ενιαία νόσο σε μια σειρά από σχετικά ομοιογενείς και καλά χαρακτηρισμένους υπότυπους της νόσου.

Στην εικόνα 1.4 φαίνεται σχηματικά η εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, καθώς και κάποιες από τις διεργασίες και τα γονίδια που συμμετέχουν.



Εικόνα 1.4 : Η εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Παρουσίαση των σταδίων ανάπτυξης, μαζί με τις μοριακές διαδικασίες και τα γονίδια που είναι σημαντικά στο αρχικό στάδιο. Ο καρκίνος του προστάτη είναι μια ετερογενής και πολυσταδιακή νόσος εξελισσόμενη στο χρόνο (Abate-Shen και Shen, 2000)(42).

1.4 I Γενετικός πολυμορφισμός και καρκίνος του προστάτη

Μια σειρά μελετών, με πιο χαρακτηριστική αυτή που έγινε σε δίδυμους (26), δείχνουν πως η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, περισσότερο ίσως από κάθε άλλο τύπο καρκίνου, επηρεάζεται από κληρονομούμενους παράγοντες.

Το ποσοστό συμβολής των κληρονομούμενων παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, υπολογίζεται περίπου 40%.

Η διαπίστωση αυτή κατεύθυνε και κατευθύνει μια σειρά νέων μελετών που αναζητούν στο επίπεδο του γενετικού υλικού τα στοιχεία εκείνα (τμήματα, αλληλουχίες DNA, πολυμορφισμός), που εμπλέκονται στη γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη.

Οι μελέτες που έγιναν είναι κυρίως δύο ειδών: οι λεγόμενες linkage analysis (σύνδεσης) και οι genome wide association studies και είχαν σαν αποτέλεσμα τον εντοπισμό μιας σειράς πολυμορφισμών –SNPs, Single-Nucleotide Polymorphism ή CNVs, Copy-Number Variations- που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Μια από τις πρώτες περιοχές του γονιδιώματος που βρέθηκε να φέρει πολυμορφισμούς που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, είναι η περιοχή 8q24, στην οποία οι Amundadottir (75) και Freedman (76) εντόπισαν κατ' αρχήν SNPs που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Οι μελέτες που ακολούθησαν, πρόσθεσαν μία σειρά από άλλες περιοχές που φέρουν SNPs αυξάνοντας τον αριθμό τους σε περίπου 50, όπως περιγράφονται κάποιες από αυτές, στον πίνακα 1.4 I (77-79).

Πίνακας 1.4 I : Κοινές θέσεις ευαισθησίας για τον καρκίνο του προστάτη που προσδιορίζονται μέσω GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), (C. L. Goh et al., 2012) (77).

Locus	SNP	RAF	Per allele OR	Γειτονικά γονίδια	Αναφορές
2p11	rs10187424	0.41	0.92(.89-0.94)	<i>GGCX/VAMP8</i>	(80)
2p15	rs721048	0.19	1.15(1.10-1.21)	Intronic in <i>EHBPI</i>	(81)
2p21	rs1465618	0.23	1.08(1.03-1.12)	Intronic in <i>THADA</i>	(82)
2p24	rs13385191	0.44	1.15(1.10-1.21)	Intronic in <i>C2orf43</i>	(83)
2q31	rs12621278	0.06	0.75(0.70-0.80)	Intronic in <i>ITGA6</i>	(82)
3q26	rs10936632	0.48	0.90(0.88-0.93)	<i>CLDN1 1/SKIL</i>	(80)
8p21	rs1512268	0.45	1.18(1.14-1.22)	<i>NKX3.1</i>	(82)
9q33	rs1571801	0.25	1.27(1.10-1.48)	Intronic in <i>DAB2IP</i>	(84)
10q11	rs10933994	0.40	1.25(1.17-1.34)	Promoter of <i>MSMB</i>	(85, 86)
19q13	rs2735839	0.15	0.83(0.75-0.91)	<i>KLK3/KLK3</i>	(85)
Xq12	rs5919432	0.19	0.94(0.89-0.98)	<i>AR</i>	(80)

RAF (Risk allele frequency)

OR (odds ratio)

Οι κλινικές εφαρμογές από την αξιοποίηση αυτών των ευρημάτων πρέπει να αντιμετωπίσουν κυρίως δύο προβλήματα: πρώτον, η προβλεπόμενη επίδραση-επιβάρυνση των επιμέρους πολυμορφισμών είναι μικρή, με αποτέλεσμα η χρήση τους ως διαγνωστικών δεικτών να καθίσταται προβληματική. Δεύτερον, αποδείχτηκε ιδιαίτερα δύσκολο να μελετηθούν οι λειτουργικές και βιολογικές συνέπειες των επιμέρους επιβαρυντικών SNPs, με δεδομένο ότι η πλειοψηφία τους βρίσκεται σε μη κωδικές περιοχές.

Η πρόσφατη δημοσιοποίηση των αποτελεσμάτων του προγράμματος ENCODE, που αφορούν τη λειτουργική και βιολογική σημασία των μη κωδικών περιοχών, αναμένεται να βοηθήσει σε αυτή την κατεύθυνση.

Ένα μέρος των ερευνών γύρω από τους κληρονομούμενους παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη, στράφηκε στη διερεύνηση της συσχέτισης κληρονομούμενων παραγόντων με την εμφάνιση επιθετικών καρκίνων του προστάτη. Οι έρευνες αυτές πρότειναν μια σειρά SNPs, ορισμένα από τα οποία βρίσκονται στην περιοχή των γονιδίων όπως τα *ARVCF* (Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome), *LEPR* (Leptin receptor), *CRX1* (cone-rod homeobox containing gene), *RNASEL* (2',5'-oligoadenylate-synthetase

dependent) και *IL4* (interleukin 4) που σχετίζονται με επιθετικό καρκίνο του προστάτη ή/και θνησιμότητα λόγω του καρκίνου αυτού. (87)

Μία άλλη μορφή γενετικού πολυμορφισμού, εκτός των SNPs, που διερευνήθηκαν για τη σχέση τους με την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, είναι οι πολυμορφισμοί που αφορούν την παρουσία επιπλέον αντιγράφων ή την απουσία τμημάτων του γενετικού υλικού, από μερικές εκατοντάδες βάσεις έως Mbases, τα λεγόμενα CNVs. (88, 89)

Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη που να διερευνά τη συσχέτιση των CNVs με την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη. Στοχευμένες μελέτες έχουν δώσει στοιχεία για τη συσχέτιση συγκεκριμένων CNVs με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, όπως αυτό που περιλαμβάνει το γονίδιο *UGT2B17* (UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17), γονίδιο της οικογένειας των UGT τρανσφερασών, που συμμετέχει στο μεταβολισμό της τεστοστερόνης. Το *UGT2B17* εδράζεται σε μια ιδιαίτερα πολυμορφική θέση στην περιοχή του 4q13.2.

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα αναμένεται να αυξηθούν περαιτέρω και η εφαρμογή τους στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην πρόληψη, θα απαιτήσει, όπως αναγνωρίζεται ήδη από τη διεξαγωγή δύο μεγάλων προγραμμάτων, τη διερεύνηση της σχέσης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

1.4 II Γενετικές μεταβολές και καρκίνος του προστάτη

Για τον καρκίνο του προστάτη ισχύει ότι ισχύει γενικά για το σύνολο των καρκινωμάτων: επάγεται από γενετικές μεταβολές που είτε ενεργοποιούν ογκογονίδια είτε απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα τα γονίδια των οποίων η λειτουργία μεταβάλλεται στον καρκίνο του προστάτη, ανήκουν σε μια σειρά διαφορετικές –με βάση τη λειτουργία τους –ομάδες γονιδίων με πιο σημαντικές τις παρακάτω:

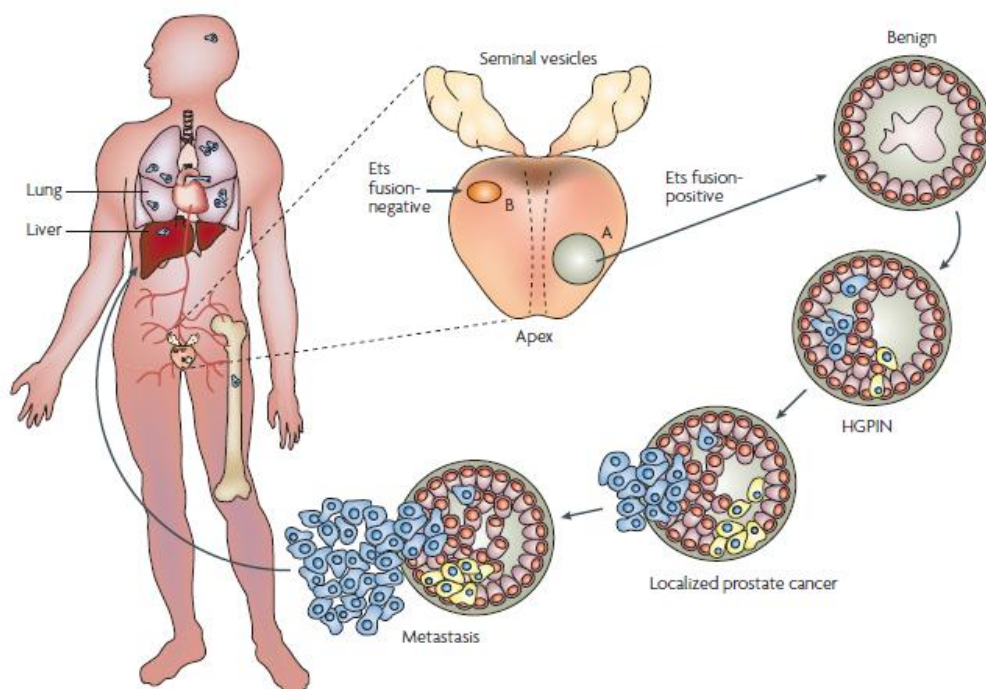
1. τους παράγοντες μεταγραφής ETS factors (Erythroblast Transformation Specific ή E-twenty six, ETS)
2. φωσφατάσες, όπως *NKX3.1* (NK homeobox family 3, A, NK3 transcription factor related, locus 1), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog)
3. υποδοχείς, όπως *AR* (androgen receptor)
4. υποδοχείς με λειτουργία τυροσινικής κινάσης, όπως *EGFR* (epidermal growth factor receptor)
5. ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στους επιγενετικούς μηχανισμούς (πχ. μεθυλίωση) όπως *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2).

Όσον αφορά το είδος των μεταβολών που υφίστανται τα γονίδια, ο καρκίνος του προστάτη χαρακτηρίζεται από:

- α) δομικές χρωμοσωμικές μεταβολές-μεταθέσεις που οδηγούν στο σχηματισμό χμιαϊκών γονιδίων (fusion genes), όπως *TMPRSS2-ERG*
- β) ελλείψεις, που απενεργοποιούν γονίδια, πχ. *NKX3.1*, *PTEN*, *AR*
- γ) επεκτάσεις που επάγουν γονίδια, πχ. *CMYC*
- δ) σημειακές μεταλλάξεις, αν και ο καρκίνος του προστάτη χαρακτηρίζεται από μικρότερο αριθμό σημειακών μεταλλάξεων που μεταβάλλουν τη δομή των πρωτεϊνών σε σχέση με άλλα καρκινώματα
- ε) επιγενετικές μεταβολές, όπως μεθυλίωση και τέλος
- στ) μεταβολές που επηρεάζουν τα microRNAs.

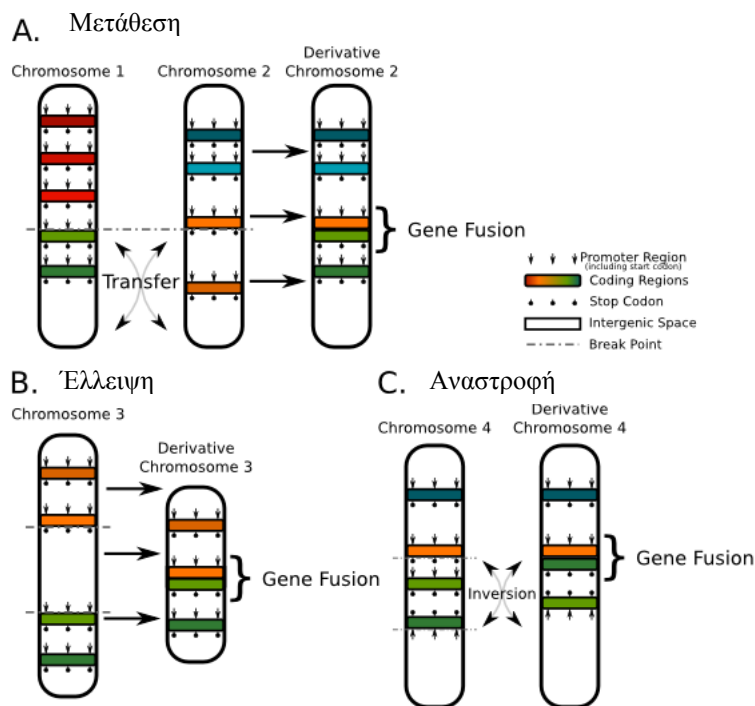
α) δομικές χρωμοσωμικές μεταβολές- χιμαιρικά γονίδια

Μια από τις πλέον συχνές γενετικές βλάβες που παρατηρούνται στον καρκίνο του προστάτη, σε ποσοστό έως 50%, είναι αυτές που οδηγούν στο σχηματισμό χιμαιρικών γονιδίων (Εικόνα 1.4 II i). Οι μαζικού τύπου αναλύσεις γονιδιωμάτων από ένα σημαντικό αριθμό περιστατικών του καρκίνου του προστάτη δίνουν ένα μέσο αριθμό περίπου 90 πιθανών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων ανά γονιδίωμα (90, 91). Ένα μεγάλο μέρος τους είναι μοναδικές, παρατηρούνται μόνο σε ένα περιστατικό και η σημασία τους είναι αδιευκρίνιστη. Ένα ποσοστό ωστόσο, που κυμαίνεται, είναι επαναλαμβανόμενες.



Εικόνα 1.4 II i : Γένεση και ανάπτυξη των χιμαιρικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη (Kumar-Sinha et al., 2008)(92).

Τα χμαιρικά γονίδια προέρχονται από γενετικές ανακατατάξεις, οι οποίες τις περισσότερες φορές κυτταρογενετικά περιλαμβάνουν ισοζυγισμένες μεταθέσεις (balanced translocations) (93, 94). Το πιο γνωστό χμαιρικό γονίδιο του καρκίνου του προστάτη είναι το *TMPRSS2-ERG*, το οποίο δημιουργείται μέσω χρωμοσωμικών μεταθέσεων ή εσωτερικών ελλείψεων. Τα χμαιρικά ή υβριδικά γονίδια σχηματίζονται από το 5' άκρο του ενός και το 3' άκρο του δεύτερου γονιδίου που συμμετέχουν σε αυτή την αναδιάταξη. Στην εικόνα 1.4 II ii παρουσιάζεται ο μηχανισμός δημιουργίας τους.



Εικόνα 1.4 II ii : Μηχανισμοί δημιουργίας χμαιρικών γονιδίων. A. χρωμοσωμική μετάθεση, B. έλλειψη και C. χρωμοσωμική αναστροφή.

Τις περισσότερες φορές, η παραγόμενη χμαιρική πρωτεΐνη είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εκφράζεται περισσότερο από την φυσιολογική πρωτεΐνη. Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι το ένα από τα δύο γονίδια είναι μεταγραφικός παράγοντας (94). Η ύπαρξη των χμαιρικών πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων στο κύτταρο, οπότε

δημιουργείται «πρόβλημα» στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση και στη διαφοροποίηση.

Πιο συγκεκριμένα, στον καρκίνο του προστάτη δημιουργούνται κοινά χμιαρικά γονίδια σε ένα μεγάλο ποσοστό, τα οποία αποτελούνται από γονίδια που ρυθμίζονται από τα ανδρογόνα, όπως τα *TMPRSS2* (transmembrane protease, serine 2), *SLC45A3* (solute carrier family 45, member 3) και *NDRG1* (N-myc downstream regulated 1), στην περιοχή 5' και από μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας ETS, όπως *ERG* (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog), *ETV1* (ets variant 1) στην περιοχή 3' (92, 95). Η παρουσία αυτών των χμιαρικών γονιδίων φαίνεται ότι έχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Τα πιθανά αυτά χμιαρικά γονίδια ταξινομούνται σε αυτά που διαβάζονται κατευθείαν, αφού ενώνουν γειτονικά γονίδια τα οποία βρίσκονται στον ίδιο κλώνο, σε *cis*, τα οποία γεφυρώνουν γονίδια τα οποία βρίσκονται στο ίδιο μεν χρωμόσωμα αλλά σε διαφορετικούς κλώνους, σε αυτά που δημιουργούνται από ανασυνδιασμούς μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων ή από ανασυνδιασμούς τμημάτων του ίδιου χρωμοσώματος (96).

Συχνά χμιαρικά γονίδια είναι τα *TMPRSS2-ERG* και *SLC45A3-ERG*, ενώ σε όγκους αρνητικούς για το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* μπορεί να βρεθούν πιο σπάνια χμιαρικά γονίδια όπως τα *KLK2-ETV1* (kallikrein-related peptidase 2 και ets variant 1) και *FKBP5-ERG* (FK506 binding protein 5, v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog) (94). Και τα δύο γονίδια που βρίσκονται στην 5' περιοχή είναι γνωστά γονίδια που ρυθμίζονται από τα ανδρογόνα (97).

Τα πιο γνωστά επαναλαμβανόμενα χμιαρικά γονίδια κυρίως είναι αυτά που περιλαμβάνουν το *ERG* και λιγότερο το *ETV1* και *ETV4* (ets variant 4), (Εικόνα 1.4 II iii) (92, 95, 98-103).

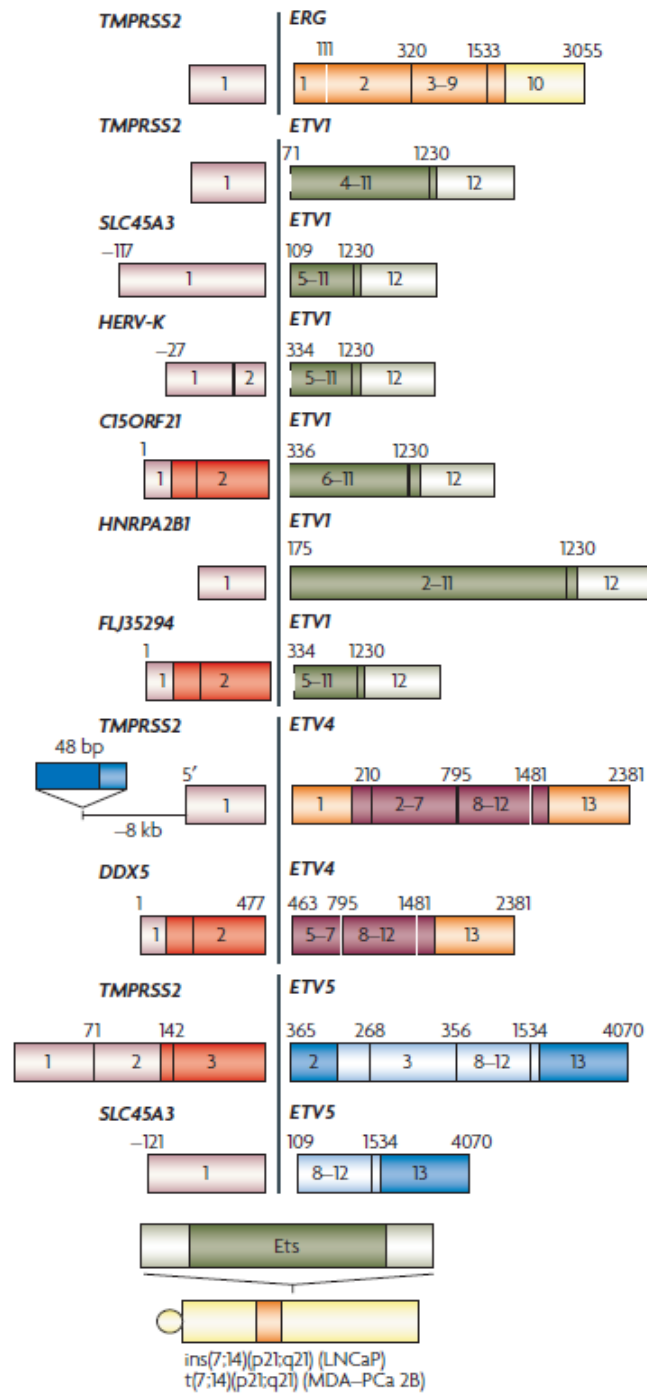
Όλα τα καρκινικά γονιδιώματα του προστάτη φέρουν κάποια αναδιάταξη. Αποκαλύπτονται εντυπωσιακά επαναλαμβανόμενα μοτίβα τα οποία εμφανίζονται και σε αναδιατάξεις που έγιναν μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων και στο εσωτερικό ενός χρωμοσώματος. Μπορούν να γίνουν αμοιβαίες ισοζυγισμένες μετατοπίσεις ανάμεσα σε διαφορετικά χρωμοσώματα δημιουργώντας χμιαρικά γονίδια, χωρίς να χαθεί γενετικό υλικό, όπως πχ. στην περίπτωση του *TMPRSS2-ERG*. Το σημείο θραύσης, λοιπόν, βρίσκεται κοντά σε γνωστά γονίδια, που παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου. Οι μηχανισμοί «σπασίματος» των χρωμοσωμάτων και η δημιουργία των χμιαρικών γονιδίων δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστοί, όμως η

αμοιβαία αυτή μετατόπιση απορυθμίζει πολλά γονίδια παράλληλα προάγοντας με αυτό τον τρόπο την καρκινογένεση στον προστάτη.

Οι γενωμικές αναδιατάξεις φαίνεται ότι δεν είναι τυχαίες, αλλά πολύ συγκεκριμένες και εξαρτώνται, κατά ένα μέρος, από την εγγύτητα των χρωμοσωμικών περιοχών στον πυρήνα του κυττάρου. Οι παράγοντες μεταγραφής είναι συνδεδεμένοι με «σπασίματα» στο δίκλωνο μόριο του DNA. Τα γονίδια *AR* και *TOP2B* (topoisomerase (DNA) II beta 180kDa) συνεκφράζονται σε πρόδρομες βλάβες στον καρκίνο του προστάτη όπου παράλληλα υπάρχει και το *TMPRSS2-ERG*. Από αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι το *TOP2B* παίζει κάποιο ρόλο στις αναδιατάξεις της οικογένειας των ETS γονιδίων.

Επίσης, από μελέτες σε κυτταρικές σειρές φαίνεται ότι οι αναστολείς των επιδιορθωτικών ενζύμων, όπως *PARP1* (poly (ADP-ribose) polymerase 1) και *DNA-PK* (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide), μειώνουν τη συχνότητα αναδιατάξεων των γονιδίων. Από την ίδια μελέτη (94) φαίνεται ότι ίσως οι *TOP2B* αναστολείς διευκολύνουν τις αναδιατάξεις και τις συντήξεις γονιδίων ενισχύοντας τα «σπασίματα» του δίκλωνου μορίου του DNA.

Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *MAGI2* (membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά και σταθεροποιεί το *PTEN* γονίδιο, φέρει επίσης αναδιατάξεις που το απενεργοποιούν, σε όγκους του προστάτη (104, 105).



Εικόνα 1.4 II iii : Χιμαρικά γονίδια στον καρκίνο του προστάτη (Kumar-Sinha et al., 2008) (92).

TMPRSS2-ERG

Το γονίδιο Transmembrane protease, serine 2, (*TMPRSS2*) κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης. Η λειτουργία του ρυθμίζεται από τα ανδρογόνα. Μελέτες έδειξαν ότι εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα του προστάτη, ενώ η υπερέκφρασή του είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά θεωρείτο ότι το *TMPRSS2* έπαιξε κάποιο ρόλο στη μετάσταση μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα-2, ο οποίος χρειάζεται την πρωτεάση για να ενεργοποιηθεί.

Η πιο κοινή από τις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις στον καρκίνο του προστάτη, δημιουργεί το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*, από το οποίο προκύπτει η έκφραση μιας *ERG* πρωτεΐνης (υπάρχει πιθανότητα η πρωτεΐνη αυτή να είναι κομμένη» στο αμινοτελικό άκρο της), η έκφραση της οποίας είναι κάτω από τον έλεγχο του προωθητή του *TMPRSS2*, ο οποίος ανταποκρίνεται στα ανδρογόνα (95, 98, 106-108).

Τα *TMPRSS2* και *ERG* είναι τοποθετημένα στη χρωμοσωμική περιοχή του 21q και χωρίζονται από μια απόσταση μόλις 3Mb.

Η αναδιάταξή τους προκύπτει είτε από μια ενδιάμεση έλλειψη, η οποία είναι πολύ συχνή, είτε από μη αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ χρωμοσωμάτων (98, 106). Η συχνότητα αυτών των ενώσεων και της δημιουργίας του χμιαρικού γονιδίου είναι 15% σε βλάβες HGPIN και 50% σε εντοπισμένους καρκίνους του προστάτη (109-111). Από αυτό το υψηλό ποσοστό της συχνότητας που συναντώνται, θεωρείται ότι αυτές οι αναδιατάξεις είτε συμβαίνουν μετά την έναρξη του καρκίνου είτε εναλλακτικά αντιστοιχούν σε μία πρόιμη εκδήλωση που προδιαθέτει για την κλινική εξέλιξη της νόσου.

β) ελλείψεις

NKX3.1

NKX3.1 (*NK3 homeobox 1*) είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ειδική για τον προστάτη. Το γονίδιο το υπεύθυνο για την πρωτεΐνη βρίσκεται στην περιοχή 8p21. Η έλλειψη που παρατηρείται στην περιοχή αυτή, στην περίπτωση του

καρκίνου, προκαλεί απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH), της τάξεως του 60% με 80% των όγκων του προστάτη (112-120).

Η έλλειψη στο γονίδιο *NKX3.1* φθάνει περίπου το 63% των δειγμάτων. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *NKX3.1* συναντάται σαν ένα συχνό και κρίσιμο γεγονός στα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη, καθώς εμπλέκεται σε πολλούς μηχανισμούς (42, 121, 122).

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου στα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη (123). Επιπλέον η ικανότητα του *NKX3.1* να ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του προστάτη φέρει σαν υπόθεση ότι η έλλειψη του γονιδίου *NKX3.1* με την παράλληλη συνεργασία της ελλείψεως των *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) και *p27* ενισχύει την καρκινογένεση στον προστάτη. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι μεταλλάξεις στην έκφραση του *NKX3.1* επηρεάζουν την καρκινογένεση στον προστάτη (123).

PTEN

Το *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) ήταν αρχικά αναγνωρισμένο σαν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, στο οποίο παρατηρούνται συχνά μεταλλάξεις ή έλλειψεις, σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως και στον καρκίνο του προστάτη (124).

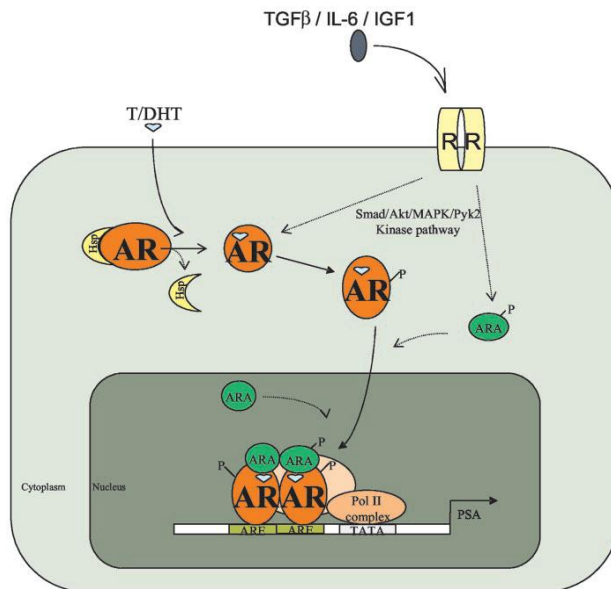
Το *PTEN* εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 10q23 και συχνά υφίσταται έλλειψη του ενός αλληλόμορφου στον καρκίνο του προστάτη με συνέπεια τη μείωση της έκφρασής του (125-129).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το *PTEN* υφίσταται απώλεια του αριθμού των αντιγράφων σαν ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του προστάτη και σχετίζεται με την εξέλιξη της επιθετικής, ανθεκτικής στον ανδρογονικό αποκλεισμό ασθένειας.

Επιπλέον, αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα της δραστηριότητας του *PTEN*, ίσως διατηρούνται στον καρκίνο του προστάτη.

AR

Η φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση του προστάτη εξαρτάται από τη δράση των ανδρογόνων μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR) (77, 130). Τα ανδρογόνα δεσμεύονται στον διαμεμβρανικό υποδοχέα. Το σύμπλοκο που δημιουργείται μεταφέρεται στον πυρήνα. Εκεί δεσμεύεται σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA, ενεργοποιώντας την έκφραση ανδρογονορρυθμιζόμενων γονιδίων, (Εικόνα 1.4 II iv), (131).



Εικόνα 1.4 II iv : Η δράση του συμπλόκου ανδρογόνων-AR στον προστάτη (Heinlein et al., 2004 (131)).

Ο υποδοχέας των ανδρογόνων παραμένει σημαντικός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη. Απουσία ανδρογόνων στον καρκίνο του προστάτη δημιουργείται ένας ορμονο-άντοχος κλώνος καρκινικών κυττάρων. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η πλειοψηφία των «ανεξάρτητων από τα ανδρογόνα» καρκίνων του προστάτη εκφράζουν το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες δείχνουν ότι η εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη συμβαίνει μέσω της αλλοίωσης του φυσιολογικού άξονα δράσης των ανδρογόνων με τη δυσλειτουργία της δραστηριότητας των υποδοχέων των ανδρογόνων (AR) μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τροποποίησης της έκφρασης των AR συμπαράγοντων και μεταλλάξεων του AR (131). Σαν αποτέλεσμα αυτών είναι να γίνει ο υποδοχέας ανδρογόνων, μεταγραφικά ενεργός και σε άλλες ουσίες εκτός από την τεστοστερόνη και τη 5-διυδροτεστοστερόνη (5-dihydrotestosterone, DHT), με τις οποίες φυσιολογικά ενεργοποιείται.

Το γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνων βρίσκεται στο Xq11-12 χρωμόσωμα. Ελλείψεις του X χρωμοσώματος, συμπεριλαμβανομένου έλλειψη του γονιδίου του AR, είναι πολύ σπάνια στον καρκίνο του προστάτη. Επιγενετική «σιωπή» της έκφρασης του AR εξαιτίας της μεθυλίωσης έχει παρατηρηθεί στο 8% των πρωτογενών καρκίνων του προστάτη. Μια άλλη δυνατότητα απώλειας της έκφρασης του AR γίνεται μειώνοντας τη σταθερότητα της πρωτεΐνης AR.

γ) επεκτάσεις

MYC

Στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24 βρίσκεται το ογκογονίδιο *MYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), το οποίο πολλαπλασιάζεται σε προχωρημένους καρκίνους του προστάτη (130, 132, 133).

Πρόσφατες έρευνες υποδηλώνουν ένα ρόλο της υπερέκφρασης του *MYC* σε αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη (όπως υπερέκφραση του *MYC* σε πολλές βλάβες PIN).

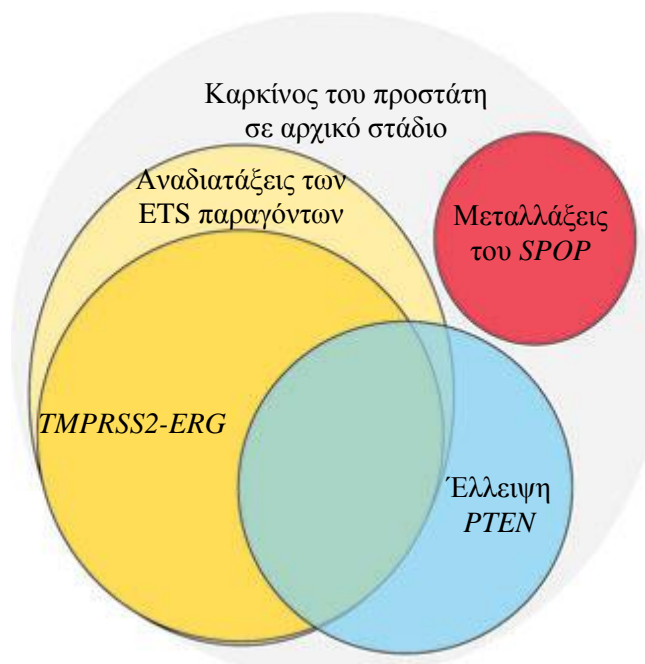
Επίσης, πολλά SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) που συνδέονται με αλληλόμορφα γονίδια, συνδέονται με αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη, είναι συγκεντρωμένα στην χρωμοσωμική περιοχή κοντά στο *MYC* (75, 134).

δ) σημειακές μεταλλάξεις

SPOP

Μία συχνά επαναλαμβανόμενη μη σιωπηλή μετάλλαξη, εμπλεκόμενη στον καρκίνο του προστάτη, περιλαμβάνει το γονίδιο *SPOP* (Speckle-type POZ). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το στοιχείο αναγνώρισης του υποστρώματος της Cullin 3-based E3-ubiquitin λιγάσης. Έχει ταυτοποιηθεί η παρουσία επαναλαμβανόμενων μεταλλάξεων στο *SPOP* στο 6-13% του καρκίνου του προστάτη (135). Οι πιο συνηθισμένες μεταλλάξεις είναι αυτές που έχουν σαν αποτέλεσμα αλλαγές στη δομή του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης *SPOP*. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του γονιδίου *SPOP*, διαταράσσοντας την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *SPOP* με το ειδικό υπόστρωμα. Επομένως, με την απώλεια της λειτουργίας του *SPOP* υπάρχει αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση. Σημαντικό είναι ότι η παρουσία των μεταλλάξεων του *SPOP* βρίσκονται σε όγκους οι οποίοι δεν φέρουν αναδιατάξεις του *ERG*.

Η πλειοψηφία των καρκίνων του προστάτη γίνονται με αναδιατάξεις στην οικογένεια γονιδίων *ETS*, με πιο κοινή την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Το ποσοστό της έλλειψης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN* φθάνει το 20-40% στον καρκίνο του προστάτη, με σημαντικές επικαλύψεις με τις αναδιατάξεις των *ETS*. Οι μεταλλάξεις του *SPOP*, συμβαίνουν στο 10% των καρκίνων του προστάτη και αλληλοαναιρούνται με τις αναδιατάξεις της *ETS* οικογένειας (Εικόνα 1.4 II ν).



Εικόνα 1.4 II ν : Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του προστάτη.

δ) Μεθυλίωση

EZH2

Το *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2) ανήκει σε μια ομάδα polycomb γονιδίων. Κωδικοποιεί μια ιστόνη, τη λυσίνη μεθυλτρανσφεράση, η οποία βρίσκεται συχνά ενεργοποιημένη σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου του προστάτη, σε μερικές περιπτώσεις μέσω του πολλαπλασιασμού του γονιδίου (136, 137).

GSTP1

Το γονίδιο γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση της τάξεως Pi (Pi-class glutathione-S-transferase, *GSTP1*), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q13. Το *GSTP1* διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από κυτταροτοξικά και καρκινογόνους παράγοντες και εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς σε διάφορα

επίπεδα σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Μεταβολές στη δραστηριότητα και στην έκφραση του *GSTP1* έχουν αναφερθεί σε πολλούς όγκους και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό από την υπερμεθυλίωση του DNA του γονιδίου *GSTP1*, στις νησίδες CpG του 5' προαγωγέα του γονιδίου (138-141).

NKX3.1

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου *NKX3.1* είναι η μεθυλίωση που έχει ανιχνευτεί σε λίγες περιοχές «upstream» από την κωδικοποιημένη περιοχή της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα του μηχανισμού αυτού είναι η μείωση της έκφρασης του γονιδίου στα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη (123).

ε) miRNAs

Τα miRNAs ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διαδικασίες της ανάπτυξης, όπως και κάποιων παθολογικών διαδικασιών, οι οποίες συνδέονται με τον καρκίνο (142, 143).

Θεωρείται ότι τα μοτίβα έκφρασης των miRNAs ίσως διαχωρίζουν τους αδρανείς από τους επιθετικούς τύπους καρκίνων (144-149).

Επίσης, κάποια ειδικά miRNAs εμπλέκονται σε ανθεκτικούς στον ανδρογονικό αποκλεισμό καρκίνους του προστάτη (150-152).

Τα miRNAs παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση κάποιων κρίσιμων γονιδίων, όπως το *PTEN*. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ένα ψευδογονίδιο *PTENP1* (phosphatase and tensin homolog pseudogene 1) μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του *PTEN* στον καρκίνο του προστάτη μέσω του ανταγωνισμού για πρόσδεση στο miRNA (153).

1.4 III Κλινικές προκλήσεις στον καρκίνο του προστάτη

Ο στόχος της επαρκούς αποκάλυψης των μηχανισμών της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη μένει ανεκπλήρωτος σε σημαντικό βαθμό, γεγονός που αποτυπώνεται στη μέχρι σήμερα αδυναμία απάντησης βασικών ερωτημάτων που απασχολούν όλους όσους εμπλέκονται στην έρευνα και κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.

Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι :

1. Ποια είναι τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τον αδρανή-λανθάνοντα καρκίνο του προστάτη από τον επιθετικό που χρειάζεται εντατική θεραπευτική αντιμετώπιση.
2. Ποιος είναι ο μηχανισμός ανάπτυξης του ορμονο-ανεξάρτητου καρκίνου του προστάτη.
3. Ποιοι είναι οι ιδιαίτεροι μηχανισμοί που διέπουν την «αποκλειστική» σχεδόν μετάσταση του καρκίνου του προστάτη στα οστά.

1) Διαχωρισμός μεταξύ αδρανούς και επιθετικής ασθένειας

Έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με βαθμό Gleason 3 ή λιγότερο, σχεδόν ποτέ, δεν υποτροπιάζουν μετά από τοπική θεραπεία. Όμως, ένα μικρό μέρος από αυτούς τους καρκίνους θα προχωρήσει γρηγορότερα και έχει ανάγκη από άμεση θεραπεία (154-156). Για αυτό το λόγο είναι σημαντικό να διαχωρίσουν τις αδρανείς από τις επιθετικές μορφές καρκίνων στους ασθενείς, οι οποίοι μετά τη βιοψία διαγνώστηκαν με καρκίνους με χαμηλό βαθμό Gleason (157). Εξαιτίας έλλειψης αυτών των προγνωστικών πληροφοριών κάποιοι ασθενείς κάνουν επιπλέον θεραπείες ενώ απαιτείται μόνο μία συντηρητική θεραπεία.

Θα ήταν χρήσιμο μέσω κάποιων μοριακών βιολογικών δεικτών να ξεχωρίσουν οι αδρανείς από τις επιθετικές μορφές καρκίνων του προστάτη. Μέχρι τώρα η χρησιμότητα των μοριακών αυτών βιολογικών δεικτών δεν έχει μεγαλύτερη προγνωστική σημασία σε σχέση με τον καθορισμένο μέσω της κλίμακας του Gleason (158).

2) Καρκίνος του προστάτη με ανθεκτικότητα στην περίπτωση του ανδρογονικού αποκλεισμού

Όπως γνωρίζουμε είναι απαραίτητα τα ανδρογόνα για να υπάρχει φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς ανδρογόνων (AR, Androgen Receptors). Παρόλο που την δεκαετία του '40 φάνηκε ότι η αφαίρεση των ανδρογόνων μέσω χειρουργικής αφαίρεσης των όρχεων ή χημικό ευνουχισμό, οδηγεί σε οπισθοχώρηση του καρκίνου του προστάτη, αυτό δεν ισχύει πάντα. Τελικά είναι πολύ συνηθισμένη η «αφαίμαξη» των ανδρογόνων να ακολουθείται από μια υποτροπή της εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη, η οποία φαίνεται ελέγχοντας τα αυξημένα επίπεδα του PSA. Αυτή η υποτροπή της ασθένειας είναι συνήθως ανθεκτική στον ανδρογονικό αποκλεισμό. Φαίνεται λοιπόν, ότι προχωρημένες μορφές καρκίνου του προστάτη παραμένουν εξαρτημένες από τη λειτουργία των ανδρογόνων (AR function).

3) Μετάσταση του καρκίνου του προστάτη στα οστά

Υπάρχουν κάποιοι επιθηλιακοί τύποι καρκίνων οι οποίοι περιστασιακά κάνουν μετάσταση στα οστά. Ο καρκίνος του προστάτη κάνει μετάσταση σχεδόν πάντα στα οστά. Επιπλέον, εκτός από τις οστεολυτικές λύσεις δημιουργεί και χαρακτηριστικούς οστεοβλάστες (159). Μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς της μετάστασης.

1.4 IV Μέθοδοι διάγνωσης

Οι πιο κοινές μέθοδοι διάγνωσης που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι η δακτυλική εξέταση (digital rectal examination, DRE), το ειδικό αντιγόνο του προστάτη PSA και το διορθικό υπερηχογράφημα (transrectal ultrasound, TRUS). Στην περίπτωση κάποιου θετικού αποτελέσματος που προκύπτει από τις παραπάνω μεθόδους διάγνωσης, συνήθως ακολουθεί βιοψία και ιστολογική εξέταση για επιβεβαίωση. Διάφορες άλλες μέθοδοι που υπάρχουν είναι οι ακτίνες X, η μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging, MRI), το CT scan (computerized tomography) και το scan στα οστά, με τη βοήθεια των οποίων καθορίζεται το στάδιο της νόσου και η ανίχνευση καρκινωμάτων σε άλλο σημείο του σώματος εκτός του προστάτη, στην περίπτωση μεταστάσεων. Είναι απαραίτητη, λοιπόν, η συνεκτίμηση του αποτελέσματος των εξετάσεων με διάφορες μεθόδους για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη.

Δακτυλική εξέταση (DRE)

Η δακτυλική εξέταση, (digital rectal examination, DRE), θεωρείται μία βασική μέθοδος για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη, με ποσοστό ακρίβειας στο 59% (160). Ευρήματα όπως η ασυμμετρία, η σκληρία, ένα οζίδιο και μία περιοχή με διήθηση, καθιστούν ύποπτη τη δακτυλική εξέταση.

Παρόλο που δεν εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, είναι μία μέθοδο ρουτίνας για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη. Αυτό συμβαίνει γιατί συχνά ανιχνεύει καρκινώματα, τα οποία δεν ανιχνεύτηκαν με άλλες μεθόδους (161). Έχει παρατηρηθεί ότι το 1/3 των ασθενών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του προστάτη έχουν φυσιολογικές τιμές στο PSA αλλά ψηλαφητές ανωμαλίες στη δακτυλική εξέταση.

Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ότι οι περισσότεροι ψηλαφητοί καρκίνοι δεν είναι στο αρχικό στάδιο της ασθένειας, καθώς και ότι κλινικά

σημαντικοί καρκίνοι είναι τοποθετημένοι σε περιοχές του αδένου που είναι μακρινοί και έτσι δεν είναι δυνατή η ψηλάφησή τους.

Όξινη προστατική φωσφατάση

Η όξινη προστατική φωσφατάση (Prostatic acid phosphatase, PAP) έχει αναφερθεί για πρώτη φορά το 1936 και αποτελεί τον πρώτο δείκτη στον καρκίνο του προστάτη, χρησιμοποιώντας σαν υλικό το πλάσμα. Η όξινη φωσφατάση του ορού δεν έχει την ανάλογη ευαισθησία για να παγιωθεί σαν καρκινικός δείκτης, για αυτό και σύντομα εγκαταλείφθηκε και τη θέση της πήρε το ειδικό προστατικό αντιγόνο.

Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)

Το ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA (Prostate Specific Antigen), που ανακαλύφθηκε το 1971, είναι ο πιο σημαντικός μέχρι σήμερα δείκτης διάγνωσης του καρκίνου του προστάτη (162-168). Το PSA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, (συγκεκριμένα kallikrein-related serine protease), που παράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα κατά μήκος των προστατικών αγωγών και εκκρίνεται στο προστατικό υγρό. Ανιχνεύεται στο αίμα σαν αποτέλεσμα της φυσιολογικής ανατομικής δομής του προστάτη (169).

Στο πλάσμα του αίματος το PSA συνδέεται πρωτίστως με την α 1-antichymotrypsin (ACT), η οποία είναι ένας ενδογενής αναστολέας πρωτεάσης, και επίσης, με έναν άλλο παρόμοιο αναστολέα, την α 2-μικροσφαιρίνη (A2M). Το γονίδιο για το PSA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19. Η μεταγραφή του καθορίζεται από τα ανδρογόνα και καταλήγει στην βιοσύνθεση του πρόδρομου PSA που αποτελείται από 261 αμινοξέα. Η μετατροπή του μη ενεργού πρόδρομου του PSA σε ενεργό PSA απαιτεί τη συμμετοχή κάποιων εξωγενών προστατικών πρωτεάσεων, όπως hK2, hK15, hK4 ή της τρυψίνης. Το PSA είναι τοποθετημένο στο κυτταρόπλασμα των μη νεοπλασματικών προστατικών κυττάρων σε όλες τις προστατικές ζώνες. Εκφράζεται όμως και στα ρινικά κύτταρα, στα κύτταρα της σπερματοδόχου κύστης και στα αδενικά κύτταρα του αγωγού εκσπερμάτωσης.

Το PSA κυκλοφορεί στο αίμα σε δύο μορφές και σε ελεύθερη μορφή και σε συνδεδεμένη με αντιχυμοτροψίνη (πρωτεΐνη του πλάσματος). Συνήθως γίνεται μέτρηση στο ολικό PSA, το οποίο είναι και η ελεύθερη και η συνδεδεμένη μορφή. Το δεσμευμένο PSA είναι περισσότερο στους ασθενείς με καρκίνο σε σύγκριση με αυτούς με καλοήγη υπερπλασία (170-172). Παρατηρήθηκε ότι ο λόγος free/total PSA είχε μέση τιμή χαμηλότερη στους ασθενείς με καρκίνο (0.18) συγκριτικά με τους ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία που η τιμή του ήταν 0.28. Με τη χρησιμοποίηση του πηλίκου free/total PSA και θέτοντας σαν όριο <0.20 ως ένδειξη καρκίνου, θα ήταν δυνατό να αποφευχθεί το 44% των βιοψιών, ενώ δεν θα ανιχνευόταν το 19% των καρκίνων.

Η πρόωμη ανίχνευση (εκλεκτική χρήση του PSA) σε ειδικές ηλικιακές ομάδες και σε άτομα με σημαντικούς παράγοντες κινδύνου, αντί για καθολικό προσυμπτωματικό έλεγχο, έχει οδηγήσει στη διάγνωση του καρκίνου σε χαμηλότερα στάδια.

Λογικό είναι ότι μια αύξηση στην έγκαιρη διάγνωση του θεραπεύσιμου και κλινικά σημαντικού καρκίνου του προστάτη, καθώς και πιο αποτελεσματική θεραπεία, θα οδηγήσουν σε μείωση της θνησιμότητας από τη νόσο. Οι άνδρες με υψηλά επίπεδα PSA, πάνω από 10 ng/ml, θέτουν ισχυρή υποψία για καρκίνο του προστάτη (173). Όμως, το PSA παρόλη τη μεγάλη ευαισθησία του, δεν μπορεί να διακρίνει την καλοήγη από την κακοήγη νόσο του προστάτη, αφού είναι ειδικός δείκτης ως προς το όργανο και όχι ως προς την ύπαρξη του καρκίνου. Αυτό είναι και το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσκληση για επαναξιολόγηση της προσέγγισης για τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και για την έρευνα για νέους βιολογικούς δείκτες στον καρκίνο του προστάτη.

Διορθικό υπερηχογράφημα και καθοδηγούμενη παρακέντηση του προστάτη

Το Διορθικό Υπερηχογράφημα του προστάτη (transrectal ultrasound, TRUS) αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο απεικόνισης του προστάτη, είναι αρκετά διαδεδομένο και σχετικά απλό στη χρήση του, με πολύ καλή απεικόνιση των ανατομικών στοιχείων του προστάτη. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου

είναι η μεγάλη της ευαισθησία και έτσι παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη σε αρχικά στάδια.

Η χρήση του συνήθως συνοδεύεται και από την λήψη βιοψιών με παρακέντηση.

Η υπερηχογραφικά καθοδηγούμενη βιοψία του προστάτη αποτελεί την καθοριστική διαγνωστική προσέγγιση για τη διερεύνηση της παρουσίας κακοήθειας. Το διορθικό υπερηχογράφημα επιτυγχάνει πολύ καλή διακριτική ικανότητα στη ζώνη αυτή και η βιοψία διά βελόνης βοηθάει στην ιστολογική διάγνωση και στην έγκυρη ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη (174). Η βιοψία είναι αυτή που κατοχυρώνει την ιστολογική απόδειξη του καρκίνου.

1.4 V Νεοπλασματικοί δείκτες

Το PSA και άλλοι καθιερωμένοι δείκτες δεν είναι από μόνοι τους ιδανικοί, εφόσον δεν έχουν την απαιτούμενη διαγνωστική ειδικότητα και προγνωστική αξία, καθώς και στο ότι φέρουν ένα υψηλό ποσοστό ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Κατά συνέπεια, η έλλειψη ειδικών και ευαίσθητων βιολογικών δεικτών για ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη σε αρχικά στάδια, αποτελεί μία πρόκληση για τη διερεύνηση νέων και υφιστάμενων δεικτών, καθώς και για την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων, για την αναγνώριση και την επικύρωση με περισσότερη ακρίβεια, διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών για τον καρκίνο του προστάτη.

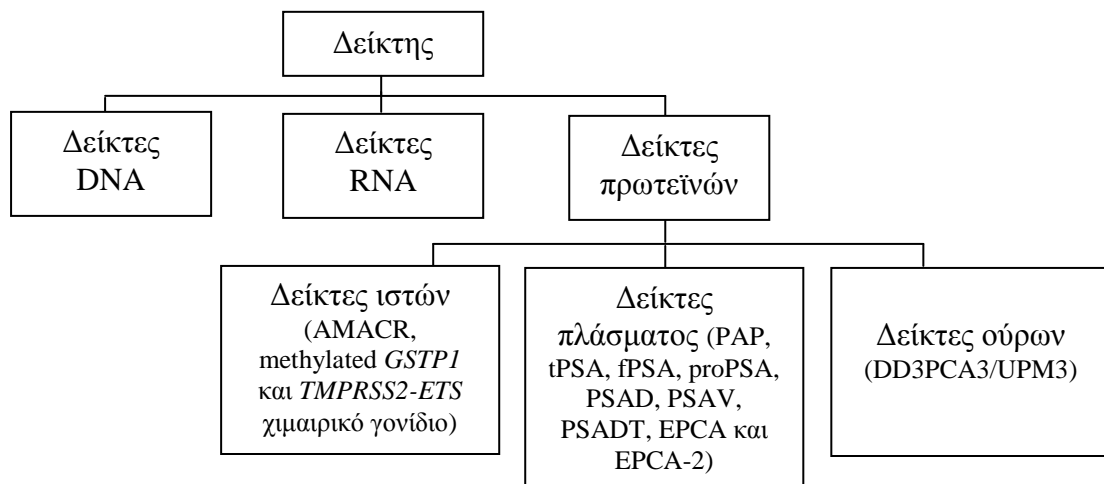
Σύμφωνα με το εθνικό ίδρυμα για τον καρκίνο των ΗΠΑ, ορίζεται σαν βιολογικός δείκτης, «ένα μόριο το οποίο υπάρχει στο αίμα, σε άλλα υγρά του σώματος ή σε ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελεί ένα σημάδι μίας φυσιολογικής ή ανώμαλης διαδικασίας ή μίας κατάστασης ή μίας ασθένειας». Ένας βιολογικός δείκτης μπορεί αντικειμενικά να μετρηθεί και να αξιολογηθεί σαν μία ένδειξη φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθογόνων διαδικασιών ή σαν μία φαρμακολογική απάντηση σε μία συγκεκριμένη θεραπεία. Οι κλινικοί δείκτες χρησιμοποιούνται ως ένα εργαλείο που μπορεί να αξιολογήσει βιολογικές παραμέτρους για μία γρήγορη και περιεκτική θεραπευτική ανάλυση. Με τη χρήση των δεικτών επιτυγχάνεται η ανίχνευση της ασθένειας σε πρώιμα στάδια, η εξέλιξή της, καθώς και ο τύπος του καρκίνου.

Ο ιδανικός δείκτης θα πρέπει να δίνει ένα γρήγορο, επαναλήψιμο, ποσοτικό αποτέλεσμα με χαμηλό κόστος, σε ένα προσιτό βιολογικό υγρό όπως και πλάσμα, ούρα ή προστατικό υγρό, το οποίο αποτέλεσμα να είναι εύκολα ερμηνεύσιμο από τους κλινικούς.

Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιλογή ενός υποψήφιου πιθανού βιολογικού δείκτη είναι η αξία των κλινικών και επιστημονικών αποτελεσμάτων του. Πιο συγκεκριμένα, πρέπει να υπάρχει συσχέτιση της λειτουργίας του γονιδίου ή της πρωτεΐνης με τη «βιολογία» της ασθένειας, τα αποτελέσματα να βεβαιώνουν την παρουσία της συγκεκριμένης ασθένειας, να υπάρχει διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σε κάθε στάδιο της εξελισσόμενης νόσου, να υπάρχει αντίδραση στη θεραπεία, έτσι ώστε να βοηθάει στην αύξηση των πιθανοτήτων για επιβίωση του ασθενούς. Όσο αφορά τον καρκίνο του προστάτη οι πιθανοί δείκτες πρέπει να

μπορούν χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του σε αρχικά στάδια, καθώς και για την παρακολούθησή του σε όλη την πορεία της ασθένειας. Για το λόγο αυτό πρέπει να είναι ειδικοί για τον προστάτη και να μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του όγκου που υπάρχει κάθε φορά, δηλαδή αν θα υπάρχει καλοήθης υπερπλασία (Benign prostatic hyperplasia, BPH), προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (prostatic intraepithelial neoplasia, PIN) ή καρκίνωμα του προστάτη (Cancer, CaP).

Χάρη στην ανάπτυξη της τεχνολογίας και βιοτεχνολογίας βρέθηκαν και μελετήθηκαν πολλοί δείκτες. Οι βιολογικοί δείκτες για διάγνωση και πρόληψη του καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνουν αυτούς με βάση το DNA, αυτούς με βάση το RNA, καθώς και τους πρωτεϊνικούς δείκτες, οι οποίοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιούν π.χ. ιστό, πλάσμα, ούρα (Εικόνα 1.4 V). Παρακάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά κάποιοι από αυτούς.



Εικόνα 1.4 V : Μία γενική ταξινόμηση των βιολογικών δεικτών με βάση την περιγραφή τους.

α-Methylacyl Coenzyme A Racemase (AMACR)

Το AMACR είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα υπεροξειδισώματα και συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Στον καρκίνο προστάτη λειτουργεί σαν ένας αυξητικός, ανεξάρτητος από τα ανδρογόνα, παράγοντας (175, 176). Το γονίδιο του *AMACR* φαίνεται ότι υπερεκφράζεται στα καρκινώματα του προστάτη. Αυτό το κάνει να θεωρείται ένας εξαιρετικά ειδικός δείκτης στον καρκίνο του προστάτη και να χρησιμοποιείται σήμερα με σκοπό να βοηθήσει σε παθολογικές διαγνώσεις (177-179).

Μελέτες έδειξαν ότι είναι πιθανό να αναλυθούν τα επίπεδα του AMACR και σε δείγματα ούρων για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη (180). Μία άλλη πιθανή χρήση του AMACR περιλαμβάνει την ανάλυση και την ερμηνεία των δειγμάτων από τη διά βελόνης βιοψία (178). Επίσης, ανοσοανιχνεύσιμα αυτοαντισώματα στο πλάσμα, τα οποία παράγονται ως απάντηση του αντιγόνου AMACR που συνδέεται με τον καρκίνο, μπορούν να φανούν χρήσιμα στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του PSA.

Όμως, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί ως προς την ικανότητα του συγκεκριμένου δείκτη. Υπάρχει η πιθανότητα παραγωγής ενδογενών αντισωμάτων AMACR και από ορισμένους άλλους τύπους καρκίνου, σε ανθρώπους που υποφέρουν από αυτοάνοσα νοσήματα (181). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων του AMACR σε ασθενείς με άλλες ουρολογικές διαταραχές, όπως παρουσία υπερπλασίας του προστάτη.

Glutathione S-transferase P I (*GSTPI*)

Η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (*GSTPI*) είναι ένας δείκτης που έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του προστάτη, αρχικά ως δείκτης σε ιστούς και στη συνέχεια σαν καρκινικός δείκτης. Τα GSTs είναι μία οικογένεια πολυλειτουργικών ενζύμων, τα οποία συζευγνύουν υποστρώματα με αναγωγίμη γλουταθειόνη (GSH) και εμπλέκονται στην αποτοξίνωση (182, 183).

Το γονίδιο *GSTPI* έχει παρατηρηθεί ότι είναι απομεθυλιωμένο σε όλους τους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς και σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη,

αλλά υπερμεθυλιωμένο σε δείγματα ιστών από καρκινώματα του προστάτη (141, 183). Η υπερμεθυλίωση του «προωθητή» του γονιδίου είναι μία κοινή αλλαγή που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης στον προστάτη. Επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης, ο οποίος είναι ικανός να διαχωρίσει τον καρκίνο του προστάτη από την παρουσία καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (138-140, 183-185). Σημαντικό είναι επίσης, το γεγονός ότι το μεθυλιωμένο γονίδιο *GSTPI* μπορεί να ανιχνευτεί και σε ούρα ασθενών που έχουν υποστεί βιοψία.

Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)

Το ειδικό αντιγόνο της μεμβράνης στον προστάτη είναι μία μεμβράνη στην κυτταρική επιφάνεια, που ανακαλύφθηκε το 1987, και χαρακτηρίζεται σαν ένας διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης. Το PSMA είναι μία τύπου 2 ολοκληρωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης, η οποία παρουσιάζει πολυάριθμες ενζυματικές δραστηριότητες (186).

Το PSMA έχει ανιχνευτεί σε προστατικούς ιστούς, σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και στο πλάσμα. Τα επίπεδά του είναι υψηλότερα στα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη, καθώς και σε περίπτωση μεταστάσεων. Σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, τα επίπεδα του PSMA είναι υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά που έχουν υγιείς άνδρες ή άνδρες με υπερπλασία του προστάτη (187).

Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)

Το αντιγόνο των βλαστικών κυττάρων του προστάτη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης, η οποία εκφράζεται κυρίως στον προστάτη. Παρόλο που η έκφραση του PSCA απορυθμίζεται στην πλειοψηφία των καρκινωμάτων του προστάτη, ο βιολογικός του ρόλος στην καρκινογένεση του προστάτη είναι ακόμα αβέβαιος (188).

Μελέτες έδειξαν ότι το PSCA εμπλέκεται σε κάποιες λειτουργίες του βλαστικού κύτταρου όπως στην εξέλιξη του μη εξαρτώμενου από τα ανδρογόνα καρκίνου, στη μετάσταση ή στη μετάδοση του σήματος σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (189-192). Έχει παρατηρηθεί ακόμα ότι το PSCA πολλαπλασιάζεται από κοινού με το *C-MYC*, το οποίο είναι ένα ογκογονίδιο, σε καρκινώματα σε προχωρημένο στάδιο (188, 193).

Σαν δείκτης το PSCA φαίνεται ότι δεν έχει μεγάλη ευαισθησία σε σύγκριση με κάποιους άλλους δείκτες, όπως το PSA και το PSMA, και επιπλέον δεν είναι ικανό να διαχωρίσει την υπερπλασία από το καρκίνωμα του προστάτη.

Early Prostate Cancer Antigen (EPCA)

Το αντιγόνο του πρώιμου καρκίνου του προστάτη, που ανακαλύφθηκε το 1991, είναι μία πρωτεΐνη του πυρήνα του κυττάρου (194).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ικανότητα των αντισωμάτων του EPCA να αναγνωρίζουν καρκινικά κύτταρα του προστάτη, επιβεβαιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη διαγνωστική αξία του EPCA στο πλάσμα (195).

B7-H3

Το B7-H3 είναι το πρώτο ανοσοποιητικό μόριο που πιθανά συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη και στην πρόβλεψη της εξέλιξής του. Το B7-H3 προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 2001 και αποτελεί μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών B7. Αυτές είναι μία ομάδα από πρωτεΐνες, οι οποίες είναι σημαντικές λόγω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με γνωστούς και άγνωστους υποδοχείς, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων.

Μελέτες έδειξαν ότι αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν έναν ανοσοδιεγερτικό και έναν ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε αρκετούς φυσιολογικούς ιστούς αλλά και στον καρκίνο του προστάτη. Μάλιστα σε αντίθεση με το PSA, το B7-H3 παραμένει συνδεδεμένο στην επιφάνεια φυσιολογικών κυττάρων του προστάτη, όπως και στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Αυτό το κάνει να φαίνεται σαν ένας ελκυστικός στόχος για να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, αλλά και σαν δείκτης της ασθένειας αυτής.

Ίσως, λοιπόν, το μόριο B7-H3 να έχει τη δυνατότητα να «προβλέψει» την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη και να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σαν ένας διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης στο να αξιολογεί την κατάσταση της νόσου στους ασθενείς και την ανοσοθεραπευτική απάντησή τους (196-198).

Σαρκοσίνη

Η σαρκοσίνη, που είναι γνωστή σαν N-μεθυλογλυκίνη, είναι ένα φυσιολογικό αμινοξύ που συναντάται στους μύες και σε άλλους ιστούς του σώματος. Σύμφωνα με μελέτες, η σαρκοσίνη διεγείρει την ανάπτυξη κακοήθειας στην περίπτωση που υπάρχει υπερπλασία στον προστάτη (199). Οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας δείκτης της κακοήθειας στα κύτταρα του προστάτη. Ανιχνεύεται όχι μόνο στο αίμα και στους ιστούς αλλά και στα ούρα του ασθενή.

Υπάρχει διαφοροποίηση των επιπέδων της σαρκοσίνης, και συγκεκριμένα αύξηση των επιπέδων της, στην περίπτωση μετάστασης σε σχέση με την παρουσία υπερπλασίας του προστάτη (199).

Caveolin-I

Η Caveolin-I (Cav-1) είναι μία πρωτεΐνη της μεμβράνης, που εκφράζεται σε δύο ισόμορφες (caveolin-1α και caveolin-1β). Θεωρείται ότι η Cav-1 ίσως να παίζει ρόλο σε κάποια βήματα στην καρκινογένεση διάφορων τύπων καρκίνου.

Μελέτες σε ιστό του προστάτη σε άνδρες με καρκίνωμα του προστάτη, έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων της Cav-1. Επίσης, βρέθηκε ότι η Cav-1 είναι απύσα σε ιστούς ανδρών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη και ότι τα μειωμένα επίπεδα της Cav-1 συνδέονται με υψηλό βαθμό Gleason (200).

PCA3/DD3

Το γονίδιο του προστατικού καρκινικού αντιγόνου 3 (Prostate Cancer Antigen 3, *PCA3* ή *DD3*) εδράζεται στο χρωμόσωμα 9q21-22, αποτελείται από τέσσερα εξόνια και η ανάλυσή του έδειξε ότι δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Ανήκει στην ομάδα των γονιδίων που εκφράζονται μόνο στο επίπεδο του RNA (non coding RNAs) και όπως και πολλά από τα non coding RNAs δεν είναι ακόμα σαφής ο ρόλος του στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Το *PCA3* έχει προταθεί ότι μπορεί να έχει συμμετοχή στη γονιδιακή ρύθμιση ή στο splicing.

Η χρήση τους ως δείκτες, ένας από τους λόγους που έχουν εγκριθεί για διαγνωστική χρήση, στηρίζεται στο γεγονός ότι α. υπερεκφράζεται στους προστατικούς καρκινικούς ιστούς (201, 202), β. δεν εκφράζεται σε άλλους ιστούς, γ. σχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου, δ. μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα των αντιγράφων του mRNA του *PCA3* με μη επεμβατικό τρόπο, σε δείγματα ούρων (203) και ε. τα επίπεδά του δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το μέγεθος του προστάτη.

Εξωσώματα

Τα εξωσώματα είναι κυστίδια, πολύ μικρών διαστάσεων (nm), τα οποία εκκρίνονται από ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και νεοπλασματικών τύπων κυττάρων (204).

Επειδή συχνά φέρουν γενετικό υλικό που προέρχονται κατευθείαν από κακοήθη κύτταρα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν μη επεμβατικοί δείκτες σε ασθένειες των νεφρών, συμπεριλαμβανομένου και τον καρκίνο του προστάτη.

Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει την παρουσία του *PCA3* και του χμιαϊκού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, τα οποία αποτελούν δύο καρκινικούς δείκτες του προστάτη, σε εξωσώματα σε δείγματα ούρων από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (205, 206).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι:

A) να διερευνηθεί η παρουσία και η συχνότητα ενός αριθμού χμαιορικών γονιδίων σε καρκινώματα προστάτη.

B) να διερευνηθεί η παρουσία ή μη των αντίστοιχων χμαιορικών γονιδίων σε καλοήθεις υπερπλασίες και η πιθανή βιολογική σημασία τους.

Γ) να διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης των χμαιορικών γονιδίων ως διαγνωστικών δεικτών στον καρκίνο του προστάτη.

Ειδικό μέρος

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή προέρχεται από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση για αφαίρεση καλοήθους ή κακοήθους όγκου του προστάτη. Ήταν δείγματα από επεμβάσεις α. ριζικής προστατεκτομής στην περίπτωση κακοηθειών και β. διουρηθρικής προστατεκτομής στην περίπτωση των καλοηθειών. Οι ασθενείς νοσηλεύθηκαν στο νοσοκομείο «Ευαγγελισμός» και στο νοσοκομείο «ο Άγιος Σάββας». Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν από το χειρουργό ή τον παθολογοανατόμο σε RNA Later. Συνολικά συλλέχθηκαν 116 δείγματα από καλοήθεις όγκους και 72 από κακοήθεις. Επίσης, συλλέχθηκαν ούρα από 66 άνδρες μετά από δαχτυλική εξέταση (Digital Rectal Examination, DRE), οι οποίοι είχαν εισαχθεί για βιοψία του προστάτη στο Ουρολογικό Τμήμα στο νοσοκομείο «ο Άγιος Σάββας», με βάση τα επίπεδα του PSA και / ή μη φυσιολογική DRE.

Η μελέτη για την ύπαρξη του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* έγινε σε 12 δείγματα από καρκινώματα του προστάτη (Prostate Cancer, CaP) και 38 δείγματα από καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH), με τη χρήση της φθορίζουσας in situ υβριδοποίησης (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH), σε υλικό μονιμοποιημένο. Η λήψη των τομών έγινε από το καταλληλότερο block παραφίνης του κάθε περιστατικού. Η επιλογή των blocks έγινε μετά από μικροσκοπική παρατήρηση τομών από κάθε block χρωσμένου με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, από τον παθολογοανατόμο. Η επιλογή αυτών των δειγμάτων για την υβριδοποίηση έγινε σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα και την καταλληλότητα του υλικού από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου. Συγκεντρώθηκαν, επίσης, τα απαραίτητα κλινικοπαθολογικά δεδομένα.

Έκτος από τις τομές των δειγμάτων, εξετάστηκαν με αυτή τη μέθοδο (FISH) και περιστατικά περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας υλικό από την καλλιέργεια των δειγμάτων, σαν αρνητικοί μάρτυρες (Controls), καθώς και από την καρκινική σειρά κυττάρων VCAP που χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες.

Επίσης, με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) έγινε μελέτη για την ύπαρξη κάποιων χημικών γονιδίων, καθώς και για την έκφραση κάποιων γονιδίων, σε 66 δείγματα από καρκινώματα του προστάτη (CaP) και 116 δείγματα από καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη (BPH).

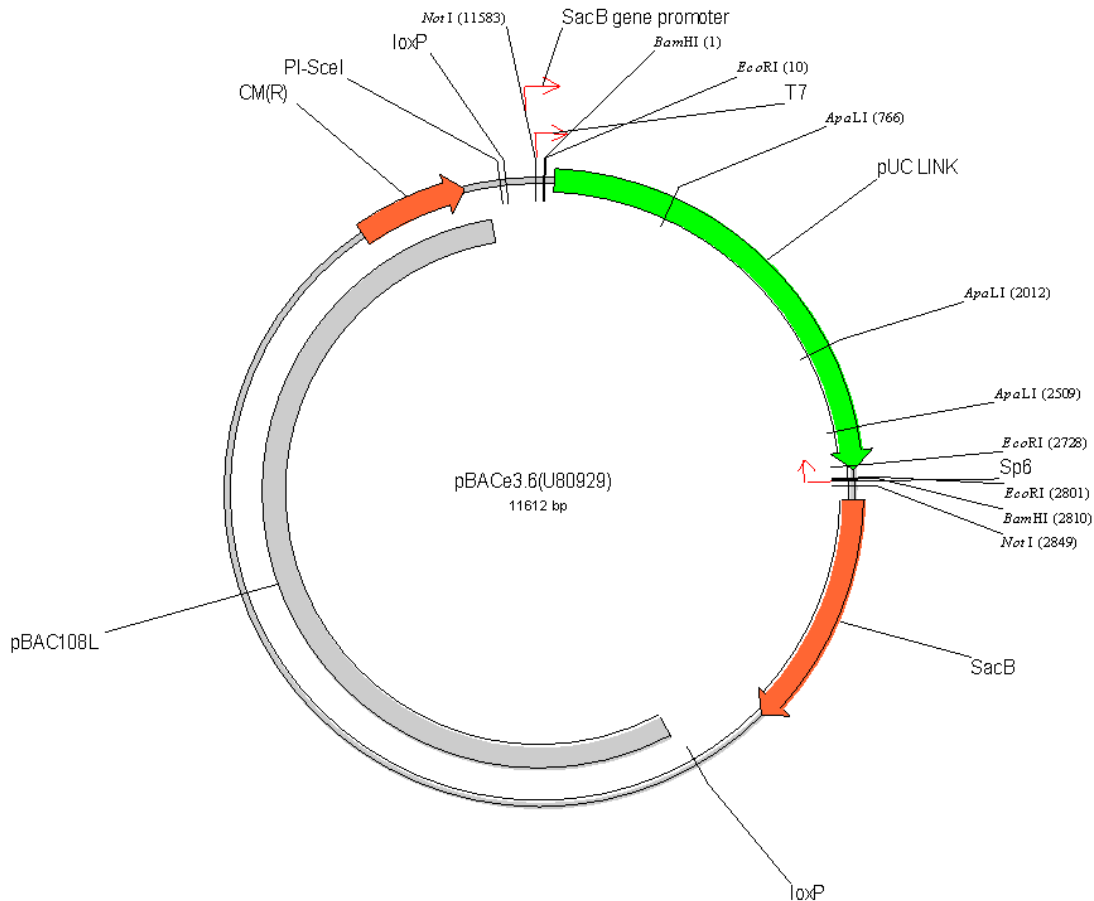
3.2 Κυτταρογενετική μεθοδολογία

I. Κλώνοι BACs

Η βιβλιοθήκη BAC RPCI-11 είναι κατασκευασμένη από ανθρώπινο γενετικό υλικό, συγκεκριμένα περιφερικό αίμα από άνδρα (207). Η βιβλιοθήκη BAC RPCI-11 είναι κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας βελτιωμένες τεχνικές κλωνοποίησης που αναπτύχθηκαν από τον Kazutoyo Osoewaga (208). Η όλη κατασκευή χρηματοδοτήθηκε από μια επιχορήγηση από το Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών του Ανθρώπινου Γονιδιώματος, (National Human Genome Research Institute, NHGRI, NHI). Η βιβλιοθήκη δημιουργήθηκε σύμφωνα με τις νέες NHGRI/DOE οδηγίες για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA μεγάλης κλίμακας για τον άνθρωπο (Guidance on Human Subjects in Large-scale DNA Sequencing).

Το περιφερικό αίμα απομονώθηκε από τουλάχιστον δέκα δωρητές μετά από τυχαία επιλογή. Στο υλικό αυτό, μετά από μερική πέψη με ένα συνδυασμό των δύο ενζύμων EcoRI και EcoRI Methylase, κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBACe3.6 (209). Οι κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο pBACe3.6 είναι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό χλωραφαινικόλη. Οι κλώνοι αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό υλικό που περιέχει 12.5 μl/ml αντιβιοτικού. Το πλασμίδιο είναι προϊόν του ερευνητικού κέντρου BACPAC στην Oakland (BACPAC Resource Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, CHORI), California, USA.

Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν είναι οι εξής: pBAC RPCI-11 35C4, RPCI-11 137J13, RPCI-11 24A11 και RPCI-11 476D17 (102, 103, 106, 210-214).



Εικόνα 3 I : Το πλασμίδιο pBACe3.6 (Frengen, E. et al., 1999)(209).

II. Καλλιέργεια- Επιλογή αποικιών

II i. Στερεή καλλιέργεια των BACs

Για να δημιουργηθούν αποικίες του κλώνου που επιλέχθηκε γίνεται στερεή καλλιέργεια του συγκεκριμένου κλώνου. Συγκεκριμένα, αραιώνονται 32 g του LB Agar καλλιερητικού σε 1 lt νερού. Αποστειρώνεται το καλλιερητικό στους 121°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να χαμηλώσει η θερμοκρασία του αποστειρωμένου πλέον καλλιερητικού. Όταν η θερμοκρασία είναι η κατάλληλη προστίθεται το αντιβιοτικό χλωραφαινικόλη. Ακολουθεί η έκχυση του καλλιερητικού σε τρυβλία που αφήνονται να στερεοποιηθούν. Τέλος, γίνεται η επίστρωση μικρής ποσότητας (περίπου 10 μl) pBAC σε κάθε τρυβλίο. Για την επώαση, τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο στους 37°C για πάνω από 12 ώρες (Over Night, ON).

II ii. Υγρή καλλιέργεια των BACs

Για να την αύξηση της ποσότητας του DNA των BACs ακολουθεί υγρή καλλιέργεια αποικιών του επιλεγμένου κλώνου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται 20 ml υγρού καλλιεργητικού για κάθε αποικία. Η παρασκευή της υγρής καλλιέργειας γίνεται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω η παρασκευή στερεής καλλιέργειας με μόνες διαφορές τις εξής: αραιώνονται 20 g του LB Broth Base καλλιεργητικού σε 1 lt νερού και στο τελικό στάδιο το αποστειρωμένο καλλιεργητικό εκχύνεται σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Η επιλεγμένη αποικία της στερεής καλλιέργειας συλλέγεται με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ρύγχους, το οποίο αφήνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 2 ml υγρό καλλιεργητικό υλικό. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για περίπου 8 ώρες με συνεχή κίνηση.

Στη συνέχεια 0.5 ml από αυτό το καλλιεργητικό με τους πολλαπλασιασμένους κλώνους μεταφέρεται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν 250 ml υγρού καλλιεργητικού υλικού και επωάζεται για 12-16 ώρες (Over Night, ON).

Πίνακας 3 I : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στις στερεές και υγρές καλλιέργειες των BACs.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
pBAC πλασμίδια	CHORI
LB Agar	32 g/lt / INVITROGEN
LB Broth Base	20 g/lt / INVITROGEN
Χλωραφαινικόλη	12.5 mg/lt / SIGMA

III. Απομόνωση του DNA των πλασμιδίων pBAC

Η διαδικασία της απομόνωσης του DNA των πλασμιδίων βασίζεται στο πρωτόκολλο της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Σε μία LB υγρή καλλιέργεια γίνεται φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά στις 6000xg, ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα των

βακτηρίων, το οποίο στη συνέχεια αραιώνεται με 24 ml buffer S1 και RNase A. Στο εναιώρημα προστίθενται 24 ml buffer S2 τα οποία αναμειγνύονται καλά αναστρέφοντας το σωληνάριο και το μείγμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη στο εναιώρημα 24 ml ψυγμένου buffer S3 τα οποία αναμειγνύονται καλά αναστρέφοντας το σωληνάριο και το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά. Παράλληλα εξισορροπείται μία στήλη NucleoBond BAC 100 με 6 ml buffer N2. Ακολουθεί έκχυση του εναιωρήματος σε εμποτισμένο φίλτρο με buffer N2. Στη συνέχεια φορτώνεται το καθαρό πλέον διάλυμα, στο οποίο είχε γίνει λύση των κυττάρων, σε μία στήλη NucleoBond. Γίνεται έκπλυση δύο διαδοχικές φορές με 18 ml buffer N3. Για την έκλυση του DNA του πλασμιδίου χρησιμοποιείται προθερμασμένο στους 50°C buffer N5. Ακολουθεί καθίζηση του DNA του πλασμιδίου με 11 ml ισοπροπανόλη σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 15000xg ώστε να καθιζάνει το ίζημα του DNA. Εν συνεχεία, ακολουθεί έκπλυση με 5 ml 70% αιθανόλης στις 15000xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά, το ίζημα του DNA αποξηραίνεται στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και επανυδατώνεται με 200 μl αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό.

Πίνακας 3 II : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση DNA πλασμιδίου pBAC.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Buffer S1(+RNase A)	MACHEREY-NAGEL
Buffer S2	MACHEREY-NAGEL
Buffer S3	MACHEREY-NAGEL
Buffer N2	MACHEREY-NAGEL
Buffer N3	MACHEREY-NAGEL
Buffer N5	MACHEREY-NAGEL
Ισοπροπανόλη	100% Ισοπροπανόλη/ RIEDEL-DEHAEN
Αιθανόλη	70% Αιθανόλη/ PROLABS
NucleoBond BAC 100 Column	MACHEREY-NAGEL

IV. Κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων καρκινικής σειράς Vcap (Vcap cell line)

Τα κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο στους -196°C και προστατευμένα σε με γλυκερόλη σε cryovials. Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται με την απότομη μεταφορά τους από το υγρό άζωτο (-196°C) στους 37°C για δύο-τρία λεπτά και κατευθείαν 10 μl από το υδροποιημένο πλέον μίγμα μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας των 25 cm^2 . Η φλάσκα καλλιέργειας περιέχει 5 ml από το κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (DMEM medium, 10% fetal bovine serum, 1% αντιβιοτικό Penicillin και Streptomycin και 1% γλουταμίνη). Η κυτταροκαλλιέργεια τοποθετείται σε κλίβανο με συνθήκες 37°C , 5% CO_2 και υγρασία 90%. Η πορεία της κυτταροκαλλιέργειας παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο ανεστραμμένου φωτός.

V. Απομόνωση χρωμοσωμάτων

Ανάλογα με το είδος των κυττάρων και από το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνταν για τρεις περίπου ημέρες, ώσπου να παρατηρηθεί το άριστο σημείο ανάπτυξης και μιτωτικής δραστηριότητας. Όταν η καλλιέργεια φθάσει σε αυτό το σημείο ανάπτυξης μπορεί να ακολουθήσει η απομόνωση των χρωμοσωμάτων. Στη φιάλη προστίθεται colcemid, σε συγκέντρωση 20 ng/ml καλλιεργητικού υλικού για 2,5-3 ώρες. Με την προσθήκη της ουσίας αυτής, πετυχαίνεται η διακοπή της συνέχειας του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων, στο στάδιο της μετάφασης. Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος του colcemid είναι να σταματάει τη μετακίνηση των χρωμοσωμάτων προς τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Ακολουθεί, μεταφορά του καλλιεργητικού μέσου από τη φιάλη σε σωλήνα φυγοκέντρου και στη φιάλη προστίθεται 1 ml διάλυμα θρυψίνης (Trypsin/EDTA) για την αποκόλληση των κυττάρων. Η φιάλη επανατοποθετείται στον κλίβανο για 2 με 5 λεπτά και στη συνέχεια το μείγμα του ενζύμου και των αποκολλημένων κυττάρων, μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου.

Ο σωλήνας φυγοκέντρου φυγοκεντρείται στις 1500 στροφές για 7 λεπτά. Κατόπιν το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα γίνεται υποτονική μεταχείριση των κυττάρων με προσθήκη περίπου 2-3 ml KCl 0.05M, ήπια ανάδευση με γυάλινη πιπέτα και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσεκτική ήπια μονιμοποίηση με διάλυμα μεθανόλης: οξικού οξέως 3:1. Συγκεκριμένα, το σωληνάριο με

το υποτονικό φυγοκεντρείται 3 φορές στις 1500 στροφές για 7 λεπτά την κάθε φορά. Σε κάθε φυγοκέντρηση αφαιρείται σταδιακά το υποτονικό και προστίθεται στο ίζημα που προκύπτει, με ήπια ανάδευση όλο και περισσότερο μονιμοποιητικό διάλυμα, με χρόνους παραμονής στο μονιμοποιητικό προοδευτικά αυξανόμενους (1 λεπτό, 10 λεπτά, 30 λεπτά). Τελικά, μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρησης τα κύτταρα να βρίσκονται μέσα σε καθαρό μονιμοποιητικό διάλυμα και να είναι έτοιμα προς επίστρωση. Τα κύτταρα με μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού (περίπου 0.4 ml) επιστρώνονται σε καθαρές αντικειμενοφόρους που φυλάγονταν σε απεσταγμένο νερό στο ψυγείο. Όταν τα πλακίδια είναι απολύτως στεγνά (συνήθως μετά από 24 ώρες) ξεκινά η διαδικασία της υβριδοποίησης.

Πίνακας 3 III : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στις κυτταροκαλλιέργειες και στην απομόνωση χρωμοσωμάτων.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
DMEM medium + GlutaMAX	1X / GIBCO
fetal bovine serum	10% / GIBCO
Penicillin	50 U/ml medium / GIBCO
Streptomycin	50 µg/ml medium / GIBCO
γλουταμίνη	1% / GIBCO
κολχικίνη (colcemid)	20 ng/ml/GIBCO
Διάλυμα θρυψίνης /EDTA	1X Trypsin/EDTA / GIBCO
KCl	0.05 M / SIGMA
Μεθανόλη	SHARLAU
Οξικό οξύ	SIGMA

3.3 Μεθοδολογία in situ υβριδισμού (FISH - Fluorescent In Situ Hybridization)

Η μεθοδολογία του FISH είναι βασισμένη στο πρωτόκολλο της εταιρείας METASYSTEMS και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν έχουν προμηθευτεί από αυτή.

I. Fluorescent In Situ Hybridization FISH

Με την τεχνική του FISH πάνω στα 24 ανθρώπινα χρωμοσώματα μπορούν να χρωματιστούν με διαφορετικό χρώμα δύο τμήματα κάποιων συγκεκριμένων γονιδίων που ο κάθε ερευνητής θέλει να μελετήσει, χρησιμοποιώντας δύο φθοριοχρώματα και τα κατάλληλα φίλτρα ενός μικροσκοπίου φθορισμού. Αναλυτικά τα βήματα της διαδικασίας αυτής είναι τα παρακάτω:

i. Δημιουργία ανιχνευτών

Για την εφαρμογή της τεχνικής του FISH είναι απαραίτητη η δημιουργία νέων ανιχνευτών οι οποίοι δεν είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του Nick Translation kit της Vysis. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα παρακάτω.

i 1. Nick translation

Ετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης στον πάγο. Σε τελικό λοιπόν όγκο 50 μl, αναμιγνύονται 10 μl μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 2.5 μl φθορίζοντων νουκλεοτιδίων (SpectrumGreen dUTPs για τον κλώνο pBAC 137J13, SpectrumRed dUTPs για το BAC 24A11), 5 μl νουκλεοτιδίο dTTP, 5 μl nick translation buffer, 10 μl nick translation enzyme (DNA πολυμεράση I) και νερό με όγκο 17.5-x μl, όπου x είναι ο όγκος από το DNA που θα χρησιμοποιηθεί. Η τελική ποσότητα του DNA στην αντίδραση ιδανικά είναι τα 1 μg. Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετείται στους 15°C για μία ώρα και πενήντα πέντε λεπτά και ύστερα στους 70°C για δέκα λεπτά ώστε να

σταματήσει η δράση του ενζύμου. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορεύεται σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης. Το nick translated DNA πρέπει να έχει μέγεθος 50bp-600bp, ώστε να είναι κατάλληλο για υβριδοποίηση.

i 2. Κατακρήμνιση των ανιχνευτών

Με βάση την ένταση του προς ανάλυση αλλά και του φυσιολογικού DNA, επιλέγονται και οι όγκοι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την υβριδοποίηση. Έτσι, αναμιγνύονται 10 µl από κάθε nick translated DNA, 6 µl Cot1 DNA, 8 µl απιονισμένο νερό, 2.4 µl οξικό νάτριο 3M και 60 µl αιθανόλη 100%. Η αντίδραση τοποθετείται στους -80°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 45 λεπτά στους 4°C.

Τέλος, γίνεται αποξήρανση του ιζήματος στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 3.5 µl Hybridization Buffer LSI και 1.5 µl απιονισμένο νερό.

Πίνακας 3 IV : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στη δημιουργία φοροισμένων ανιχνευτών.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Μείγμα νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP)	0.1 mM / VYSIS
dTTP	0.1 mM/ VYSIS
SpectrumGreen, SpectrumRed dUTPs	0.2 mM / VYSIS
Nick Translation Buffer	10X / VYSIS
Nick Translation Enzyme	VYSIS
Human Cot-1 DNA	1 µg/µl / INVITROGEN
Οξικό νάτριο	3 M /SIGMA
Αιθανόλη	100% Αιθανόλη/ PROLABS
LSI/WCP Hybridization Buffer	VYSIS

ii. Προετοιμασία δείγματος : δημιουργία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων και δημιουργία τομών παραφίνης

Αρχικά γίνεται η επίστρωση μεταφασικών χρωμοσωμάτων πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας υλικό από το ίζημα με το μονιμοποιητικό διάλυμα (fixative) όπως περιγράφηκε παραπάνω στην παράγραφο V. Είναι σημαντικό τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα να είναι πρόσφατα (24 ωρών).

Για τη δημιουργία του block παραφίνης, το υλικό των τομών έχει μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και έχει εγκλειστεί στην παραφίνη. Με τη χρήση του μικροτόμου επιτυγχάνεται η τομή του υλικού, σε τομές μεγέθους 4 μm , οι οποίες εκτείνονται στο υδατόλουτρο με αποσταγμένο νερό θερμοκρασίας 40°C και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες, θετικά φορτισμένες και αφήνονται να στεγνώνουν στον αέρα. Τέλος, επωάζονται σε ξηρό κλίβανο θερμοκρασίας 56°C για 4-12 ώρες. Είναι σημαντικό τα ιστολογικά παρασκευάσματα να είναι σχετικά πρόσφατα (το πολύ 3 εβδομάδων).

iii. Αποπαραφίνωση

Η διαδικασία της αποπαραφίνωσης πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια και σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα αρχικά απαιτείται παραμονή των πλακιδίων σε ξηρό κλίβανο θερμοκρασίας 56°C για 12-16 ώρες. Στην συνέχεια γίνεται εμβαπτισμός των πλακιδίων σε προθερμασμένη ξυλόλη (η προθέρμανση έγινε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C) σε τέσσερα δοχεία (δοχεία τύπου complin jar) με παραμονή 10 λεπτών στο κάθε δοχείο και ακολουθεί αφυδάτωση με αιθανόλη 100% σε δύο δοχεία (μία φορά στο κάθε δοχείο από 10 λεπτά) και αιθανόλη 96%, 80%, 50% διαδοχικά (μία φορά για 10 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

iv. Προεπεξεργασία τομών- Πρωτεόλυση

Η διαδικασία έγινε χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του Paraffin Pretreatment Kit, της Vysis (Abbott Molecular Inc. USA), καθώς και τις οδηγίες της εταιρείας.

Η διαδικασία ξεκινάει με εμβαπτισμό των πλακιδίων σε διάλυμα 0.2N HCL για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί ξέπλυμα σε αποσταγμένο νερό για 3 λεπτά και εμβαπτισμός στο Wash Buffer για 3 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται

εμβαπτισμός στο προθερμασμένο Pretreatment Solution για 30 λεπτά (η προθέρμανση είχε ξεκινήσει τουλάχιστον μια ώρα πριν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80°C) και ξέπλυμα σε αποσταγμένο νερό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Εμβαπτίζονται τα πλακίδια σε δύο διαφορετικά δοχεία (δοχεία τύπου complin jar) με το Wash Buffer για 5 λεπτά στο κάθε δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί εμβαπτισμός στο προθερμασμένο Protease Solution (η προθέρμανση είχε ξεκινήσει τουλάχιστον μια ώρα πριν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C) για 40 λεπτά μέχρι 1 ώρα και 55 λεπτά (η διάρκεια της παραμονής των πλακιδίων στην πρωτεάση εξαρτάται από την τομή του κάθε ιστολογικού υλικού). Εκ νέου γίνεται εμβαπτισμός στα δύο προαναφερόμενα δοχεία (complin jar) με το Wash Buffer για 5 λεπτά στο κάθε δοχείο, και τέλος, γίνεται αφυδάτωση του υλικού σε διαλύματα 70%, 85%, 100% αιθανόλης για 2 λεπτά στο καθένα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος, τα πλακίδια στέγνωσαν στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και ήταν έτοιμα για την αποδιάταξη του DNA και την υβριδοποίησή του με κατάλληλο μοριακό ανιχνευτή (ιχνηθέτη).

Το Wash Buffer και το Pretreatment Solution ήταν έτοιμα προς χρήση διαλύματα. Έπρεπε μόνο να ελεγχθεί το pH του Wash Buffer το οποίο έπρεπε να είναι 7.0. Το Protease Solution προετοιμαζόταν την ίδια μέρα που θα χρησιμοποιείτο προσθέτοντας σε 50 ml Protease Solution με pH 2.0 (ελεγμένο) ένα φιαλίδιο (vial) ενζύμου (protease) των 25 mg.

v. Υβριδοποίηση-FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

Η διαδικασία ξεκινάει με την αποδιάταξη των μεταφασικών χρωμοσωμάτων σε αντικειμενοφόρες πλάκες με την επίδραση δύο παραγόντων: τόσο της θερμοκρασίας, αλλά και χημικών μέσων όπως το φορμαμίδιο.

v 1. Αποδιάταξη του DNA

Αρχικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται σε προθερμασμένο διάλυμα φορμαμιδίου 70% (η προθέρμανση είχε ξεκινήσει τουλάχιστον μια ώρα πριν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $73\pm 3^{\circ}\text{C}$) για 5 λεπτά. Εμβαπτίζονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε διαλύματα 70%, 85%, 100% αιθανόλης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία

δοματίου, για να αφυδατωθεί το DNA, και στην συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται στον αέρα για αποξήρανση. Για να γίνει η αποδιάταξη του DNA χρειάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας και η χρήση συγκεκριμένων χημικών ουσιών.

v 2. Αποδιάταξη του ιχνηθέτη (probe)

Η αποδιάταξη του ιχνηθέτη (probe), ο οποίος παρασκευάζεται από το εργαστήριο μας, γίνεται μόνο με την επίδραση της θερμοκρασίας. Έτσι, ο κατάλληλος όγκος ιχνηθέτη (όπως αυτός ορίζεται ανάλογα με την έκταση της αντικειμενοφόρου πλάκας που θα υβριδοποιηθεί) τοποθετείται στους $73\pm 3^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά.

v 3. Υβριδοποίηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων και ιχνηθέτη

Τα αποδιαταγμένα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα και ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης είναι έτοιμα για υβριδοποίηση. Ο απαιτούμενος όγκος του ιχνηθέτη απλώνεται πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες και καλύπτεται με καλυπτρίδα (10 μl για μια καλυπτρίδα $22\times 22\text{mm}^2$). Στη συνέχεια η καλυπτρίδα στεγανοποιείται με τη χρήση κόλλας. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε θήκη με υγρασία και αφήνονται να υβριδοποιηθούν μέσα σε κλίβανο 37°C για 12-16 ώρες.

v 4. Έκπλυση μετά την υβριδοποίηση

Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη ώστε να αποφευχθεί μη ειδική σήμανση. Έτσι, αφαιρείται η κόλλα και οι καλυπτρίδες με πολλή προσοχή για να μην τραυματιστούν τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται σε τρία διαφορετικά δοχεία (δοχεία τύπου complin jar) με προθερμασμένα διαλύματα φορμαμιδίου 50% στους $43\pm 3^{\circ}\text{C}$ για 12 λεπτά στο κάθε δοχείο. Ακολουθεί εμβαπτισμός σε δοχείο με προθερμασμένο διάλυμα 2X SSC στους $43\pm 3^{\circ}\text{C}$ για 12 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί ένα ακόμη βήμα με προθερμασμένο διάλυμα 2X SSC/0.1% NP40 στους $43\pm 3^{\circ}\text{C}$ για 7 λεπτά. Όλα τα διαλύματα ήταν προθερμασμένα σε υδατόλουτρο. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονταν να

στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος (αφού οι ιχνηθέτες είναι φωτοευαίσθητοι). Τέλος, σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται διάλυμα 10 μl DAPI II (antifade solution, Vysis) στην περιοχή που μας ενδιαφέρει και καλύπτεται με καλυπτρίδα 22x22mm². Τα δείγματα είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.

Πίνακας 3 V : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στο FISH.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΞΥΛΟΛΗ	SCHARLAU
ΑΙΘΑΝΟΛΗ	70%, 85%, 100%/ Αιθανόλη PROLABS
ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΟ HCl	0.2N/SIGMA
WASH BUFFER	VYSIS
PRETREATMENT SOLUTION	VYSIS
PROTEASE SOLUTION	VYSIS
ΦΟΡΜΑΜΙΔΙΟ	1 μέρος 2X SSC/ 1 μέρος φορμαμίδιο /φορμαμίδιο 70%, 50% / APPLICHEM
20xSSC BUFFER ULTRA PURE	2X SSC / GIBCO
NP40	0.1% NP40 / VYSIS
Ιχνηθέτης probe	Προϊόν του εργαστηρίου γενετικής Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας»
Ιχνηθέτης probe	Προϊόν του εργαστηρίου γενετικής Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας»
Διάλυμα DAPI II	Προϊόν Vysis

v 5. Μικροσκοπική παρατήρηση

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Axionplan, Zeiss) εφοδιασμένο με λάμπα φθορισμού 100 watt πηγής υδραργύρου και κατάλληλα φίλτρα για την απεικόνιση των σημάτων υβριδισμού. Η απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Isis) της εταιρείας Metasystems.

Η καταγραφή και αξιολόγηση των σημάτων υβριδοποίησης έγινε ακολουθώντας τα διεθνώς παραδεκτά κριτήρια (215). Για να θεωρηθεί επιτυχής μια υβριδοποίηση πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

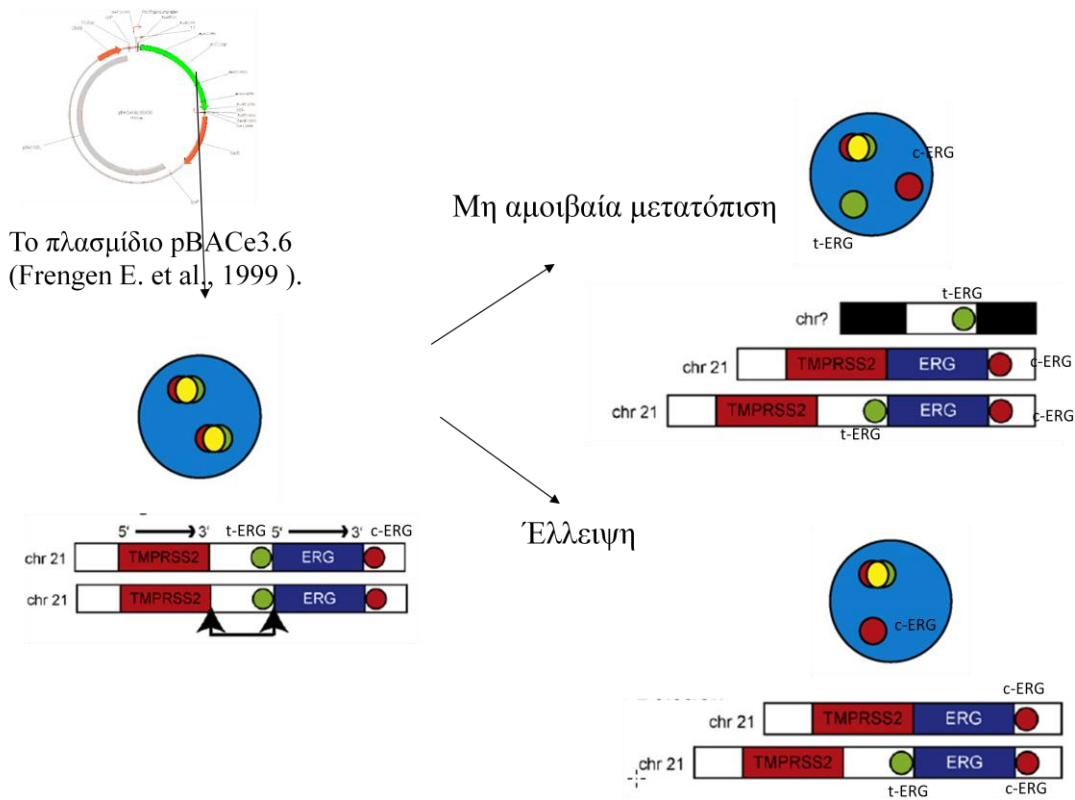
- i) να είναι ομοιόμορφη σε όλη την τομή. Δηλαδή τα σήματα κόκκινο και πράσινο για τα δύο γονίδια αντίστοιχα, να έχουν την ίδια φωτεινότητα, μέγεθος και σχήμα (σφαιρικό ή οβάλ).
- ii) να μην υπάρχει απώλεια γενετικού υλικού, δηλαδή οι κυτταρικοί πυρήνες να είναι ολόκληροι, να διακρίνονται εύκολα και να είναι βαμμένοι ομοιόμορφα μπλέ με τη χρώση DAPI II
- iii) το φόντο (background) του παρασκευάσματος να είναι σκούρο μπλέ ή μαύρο και με όσο το δυνατό λιγότερο «θόρυβο» (όχι σωματίδια υβριδισμού, θαμπάδα κ.α).

Συνολικά έγινε μέτρηση των σημάτων υβριδοποίησης σε 100 πυρήνες και αν αυτό δεν ήταν εφικτό, τουλάχιστον σε 50. Οι πυρήνες δεν έπρεπε να έχουν αλληλοκαλυπτόμενες περιοχές ή τουλάχιστον τα σήματά τους να μην βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές. Η μέτρηση των σημάτων γινόταν με τη χρησιμοποίηση καταδυτικού φακού 10X100 και σαρωνόταν όλη η τομή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, παρουσιάζεται η παρουσία κοινών εξωνικών ελλείψεων στο χρωμόσωμα 21q22.2-3 ως αιτία της δημιουργίας του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, το οποίο είναι συσχετισμένο με την πρόοδο της ασθένειας.

Συγκεκριμένα, με τη χρήση ενός break-apart probe system επετεύχθη η έμμεση ανίχνευση του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Πιο αναλυτικά: για την παρασκευή του πρώτου ιχνηθέτη χρησιμοποιήθηκε ο pBAC κλώνος RP11-137J13, ο οποίος παράγει πράσινο σήμα και είναι υβριδοποιημένος στην τελομερική περιοχή του γονιδίου *ERG* στην 21q22.3. Ομοίως, για την παρασκευή του δεύτερου ιχνηθέτη χρησιμοποιήθηκε ο pBAC κλώνος RP11-24A11, ο οποίος παράγει κόκκινο σήμα και είναι υβριδοποιημένος στην κεντρομεριδιακή περιοχή του *ERG* locus στην 21q22.3. Επομένως, αυτό το ζευγάρι ιχνηθετών εμφανίζεται κίτρινο όταν υπάρχει επικάλυψη του κόκκινου κεντρομεριδιακού ιχνηθέτη (cERG) με τον πράσινο τελομερικό ιχνηθέτη (tERG), όπως στην περίπτωση που δεν υπάρχει κάποια μετατόπιση στο αλληλόμορφο γονίδιο. Στην περίπτωση που υπάρξει κάποιο «σπάσιμο» μεταξύ των δύο ιχνηθετών, στο ένα ζευγάρι των ιχνηθετών εμφανίζεται κάθε χρώμα ξεχωριστά, ανιχνεύοντας με έμμεσο τρόπο την ύπαρξη του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Παρατηρείται, δηλαδή, ένα σήμα κίτρινο (από το χρωμόσωμα, στο οποίο δεν έγινε κάποια μετάθεση), ένα σήμα κόκκινο (από την κεντρομεριδιακή περιοχή του γονιδίου *ERG* στην 21q22.3) και ένα σήμα πράσινο (από τον τελομερικό ιχνηθέτη, ο οποίος έχει μεταφερθεί σε άλλη περιοχή κάποιου χρωμοσώματος). Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα να έχουμε έλλειψη του ενός πράσινου τελομερικού ιχνηθέτη, η οποία επιβεβαιώνει ξανά την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* (Εικόνα 3 II) (106).

Για τον προσδιορισμό των ορίων αξιολογήθηκαν οι μετρήσεις δειγμάτων φυσιολογικού αίματος και ο μέσος όρος των λόγων φυσιολογικοί πυρήνες/ μη φυσιολογικούς (14,62) συν 2SD (6,07) χρησιμοποιήθηκε σαν τιμή ορίου (26,76) (cut off value).



Εικόνα 3 II : Σχηματική παρουσίαση του FISH break-apart assay για έμμεση ανίχνευση του χιμαιρικού γονιδίου TMPRSS2-ERG.

3.4 Μοριακή μεθοδολογία

I. Απομόνωση γενωμικού DNA από τομές παραφίνης

Η απομόνωση του γενωμικού DNA γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας PROMEGA. Αρχικά απομακρύνουμε την τομή παραφίνης από την αντικειμενοφόρο πλάκα μηχανικά με ψαλίδι ή νυστέρι και τη μεταφέρουμε σε ένα eppendorf. Προστίθενται 600 μl Lysis EDTA, καθώς και 50 μl πρωτεϊνάσης K, ώστε να γίνει ενζυμική αποδιάταξη. Αναδεύονται και επωάζονται στους 55°C για 12-16 ώρες ή και περισσότερο μέχρι ο ιστός να ομογενοποιηθεί και αποδιαταχθεί πλήρως. Ακολουθεί καθίζηση των πρωτεϊνών με 200 μl Protein Precipitation solution και επώαση στους -20°C για 5 λεπτά. Φυγοκεντρώντας για 4 λεπτά στις 13000 στροφές το ίζημα των πρωτεϊνών καθιζάνει. Προσεκτικά, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου, το οποίο περιέχει 600 μl ισοπροπανόλης και 2 μl γλυκερόλης και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου. Αναστρέφοντας το σωληνάριο σχηματίζεται ίζημα, το οποίο περιέχει το DNA και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά. Εν συνεχεία, ακολουθεί έκπλυση με 600 μl 70% αιθανόλης στις 13000 στροφές για 1 λεπτό. Τελικά, το ίζημα του DNA αποξηραίνεται στον αέρα, επανυδατώνεται με 20 μl DNA Rehydration solution και αφήνεται στους 65°C για 1 ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως το ίζημα του DNA, πριν την αποθήκευσή του.

Πίνακας 3 VI: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση γενωμικού DNA.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Nuclei Lysis solution	PROMEGA
Protein precipitation solution	PROMEGA
Isopropanol	100% Isopropanol / RIEDEL-DEHAEN
Ethanol	70% Ethanol / PROLAB
DNA Rehydration solution	PROMEGA

II. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Κατεψυγμένος ιστός 30 mg κατατέμνεται και ομογενοποιείται μηχανικά με νυστέρι και χημικά με διάλυμα 10 μl β-μερκαπτοαιθανόλης και 990 μl RA1. Το διάλυμα μεταφέρεται και φιλτράρεται από το φίλτρο Nucleospin Filter Columns και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000xg. Το φιλτραρισμένο διάλυμα αναμιγνύεται με 350 μl 70% αιθανόλης. Το νέο διάλυμα φιλτράρεται στη Nucleospin RNA II Column και φυγοκεντρείται στις 11000xg για 30 δευτερόλεπτα. Η μεμβράνη της Nucleospin RNA II Column ξεπλένεται με 350 μl Membrane Desalting Buffer (MDB) και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000xg. Ακολουθεί πέψη του DNA με 95 μl DNase reaction mixture για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η προσθήκη 200 μl διαλύματος RA2 στη Nucleospin RNA II Column απενεργοποιούν το ένζυμο της rDNase. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 11000xg. Στη συνέχεια, ακολουθούν 2 διαδοχικές εκπλύσεις με 600 ml και 250 ml διαλύματος RA3 αντιστοίχως, καθώς και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των 30 δευτερολέπτων και των 2 λεπτών αντιστοίχως, στις 11000xg. Τέλος, με 40 μl νερού επαναδιαλύεται το RNA μετά από φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000xg.

Πίνακας 3 VII: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της MACHEREY-NAGEL.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
RA1 buffer	MACHEREY-NAGEL
RA2 buffer	MACHEREY-NAGEL
RA3 buffer	MACHEREY-NAGEL
MDB buffer	MACHEREY-NAGEL
DNase reaction mixture	MACHEREY-NAGEL 10 μl rDNase + 90 μl DNase reaction buffer
Nucleospin Filter Columns	MACHEREY-NAGEL
Nucleospin RNA II Column	MACHEREY-NAGEL
Αιθανόλη	70% Αιθανόλη/ PROLABS
β-μερκαπτοαιθανόλη	MERCK

Ένα εναλλακτικό πρωτόκολλο για την απομόνωση του RNA είναι αυτό που βασίζεται στο πρωτόκολλο της εταιρείας INVITROGEN. Κατεψυγμένος ιστός 30mg κατατέμνεται και ομογενοποιείται μηχανικά με νυστέρι αρχικά και με τη χρήση του ομογενοποιητή για 2-3 λεπτά στη συνέχεια χρησιμοποιώντας 1 ml διαλύματος Trizol Reagent (χημική ομογενοποίηση). Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000xg στους 4°C. Στο διάλυμα που μένει μετά την απομάκρυνση των μη ομογενοποιημένων κομματιών του ιστού, προστίθεται 0.2 ml χλωροφόρμιο. Μετά την καλή ανακίνηση των διαλυμάτων, το διάλυμα που προκύπτει παραμένει σε RT για 2-3 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 12000xg στους 4°C. Διακρίνονται δύο φάσεις. Η διαυγή φάση μεταφέρεται και αναμιγνύεται με 0.5 ml ισοπροπανόλη. Το ομογενοποιημένο διάλυμα αφήνεται σε RT για 10 λεπτά. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος. Στο ίζημα που προκύπτει γίνεται έκπλυση με 75% αιθανόλης και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 7500xg στους 4°C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου. Τέλος, επαναδιαλύεται το RNA με 50 μl νερού (RNase-free water).

Πίνακας 3 VIII : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της INVITROGEN.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Trizol Reagent	INVITROGEN
Χλωροφόρμιο	SIGMA
Ισοπροπανόλη	IEDEL-DEHAEN
Αιθανόλη	75% Αιθανόλη/ PROLABS
RNase-free water	INVITROGEN

III. Απομόνωση γενωμικού DNA και RNA από ούρα

Τα ούρα συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα κύπελλα συλλογής ούρων που περιείχε 5 ml 0.5 M EDTA. Ένας όγκος ούρων, τουλάχιστον 30 ml, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C και το προκύπτον κυτταρικό ίζημα υπέστη επεξεργασία για απομόνωση DNA και RNA. Το ολικό RNA και DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας ένα RNA, DNA extraction kit (NucleoSpin RNAXS, NucleoSpin RNA/DNA buffer set, Macherey-Nagel, Duren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

IV. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) έγινε με τη χρήση του ενζύμου Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στο πρώτο στάδιο προστίθενται 10 μl RNA (1 ng-5 ng), 1 μl εκκινητών (random primers, 50-250 ng) και 1 μl μίγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs 10 mM), τα οποία επωάζονται για 5 λεπτά στους 65°C. Στη συνέχεια, η αντίδραση διακόπτεται για 5 λεπτά στους 4°C. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης προστίθενται στο μίγμα 4 μl 5X First-Strand reaction buffer, 2 μl DTT, 1 μl ένζυμο RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor και 1 μl ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II. Η αντίδραση επωάζεται στους 25°C για 13 λεπτά, στους 42°C για 50 λεπτά και η αντίδραση τερματίζει στους 70°C για 15 λεπτά.

Πίνακας 3 IX : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην κατασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA).

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Random primers	50-250 ng/ INVITROGEN
dNTPs	10 mM/ INVITROGEN
DTT	0.1 M/ INVITROGEN
RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40 units/μl/ INVITROGEN
Superscript II RNase H Reverse Transcriptase	200 units/ INVITROGEN
First strand reaction buffer	5X / INVITROGEN

V. Real time PCR

Η τεχνική του real time PCR δίνει τη δυνατότητα μελέτης της παρουσίας ή όχι ενός χμιαρικού γονιδίου, καθώς και της έκφρασης ενός γονιδίου προσδιορίζοντας την ποσότητα του RNA αυτού του γονιδίου. Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής έγινε με τη χρήση α. της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green και β. των ανιχνευτών TaqMan. Το πρωτόκολλο καθώς και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι της εταιρείας INVITROGEN.

Για τη χρήση της SYBR Green, το μίγμα που ετοιμάζεται, χρησιμοποιώντας σαν φθορίζουσα ουσία τη SYBR Green mix, περιέχει 10 μl SYBR Green, 0.5 μl BSA 20X, 0.2 μl από έκαστο εκκινητή (primer, 50 pmol/μl), 0.1 μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 7 μl νερό και 2 μl cDNA. Το μίγμα τοποθετείται σε ειδικά τριχοειδή σωληνάρια (LightCycler capillaries 20 μl) και προστίθονται 2 μl cDNA του υπό εξέταση δείγματος. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε συσκευή Real time PCR Light Cycler ROCHE. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως φθορίζουσα ουσία η SYBR Green, η αντίδραση περιλαμβάνει 1 κύκλο αποδιάταξης με πρώτο βήμα στους 50°C για 120 δευτερόλεπτα και με το δεύτερο βήμα στους 95°C για 120 δευτερόλεπτα. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος ολοκληρώνεται σε τρία βήματα: με ένα βήμα στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα, ένα βήμα στους 60°C για 10 δευτερόλεπτα και ένα βήμα στους 72°C για 15

δευτερόλεπτα. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος γίνεται για 45 διαδοχικούς κύκλους. Ακολουθεί η τήξη του προϊόντος με ένα βήμα στους 55°C για 15 δευτερόλεπτα. Το πρωτόκολλο τελειώνει με ψύξη στους 40°C για 30 δευτερόλεπτα.

Το μίγμα κατά τη χρήση των ανιχνευτών TaqMan, περιέχει 10 μl UDGmix, 1 μl BSA 20X, 1.2 μl από έκαστο εκκινητή (primer, 5pmol/μl), 0.18 μl MgCl₂ (50mM), 0.12 μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 1 μl TaqMan Probe (5 pmol/μl) και 3.3 μl νερό. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές TaqMan, η αντίδραση περιλαμβάνει 1 κύκλο αποδιάταξης με πρώτο βήμα στους 50°C για 120 δευτερόλεπτα και με το δεύτερο βήμα στους 95°C για 120 δευτερόλεπτα. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος ολοκληρώνεται σε δύο βήματα: με ένα βήμα στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα και ένα βήμα στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος γίνεται για 40 διαδοχικούς κύκλους. Το πρωτόκολλο τελειώνει με ψύξη στους 40°C για 30 δευτερόλεπτα.

Για την αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση της σχετικής ποσοτικοποίησης, κατά την οποία τα επίπεδα του mRNA των υπό μελέτη γονιδίων εκφράζονται ως λόγος προς τα επίπεδα ενός γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος προκύπτει από τον υπολογισμό της διαφοράς των crossing point (ΔC_p) του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς με τη χρήση του τύπου $\text{Λόγος} = 2^{-\Delta C_t}$.

Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν : το γονίδιο Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, (*GAPDH*), το γονίδιο της β_2 μικροσφαιρίνης (β_2m) και το ειδικό προστατικό αντιγόνο (prostate specific antigen, *PSA*). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα RelQuant (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα ήταν ποσοτικά, οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν, υπολογίστηκαν με τον εξής τρόπο: $\text{ratio } 2^{-\Delta C_t} \times 1000$, όπου ΔC_t είναι το κλάσμα του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς, (target/μέσο όρο των δύο γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και β_2m ή target/*PSA*).

Πίνακας 3 X : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στο Real time PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
SYBR Green mix	2X / INVITROGEN
BSA	20X/ INVITROGEN
Primers (εκκινητές)	5 pmol/μl/ INVITROGEN
Platinum Taq	5 units/μl / INVITROGEN
MgCl₂	50 mM / INVITROGEN
UDGmix	2X / INVITROGEN
TaqMan Probe	5 pmol/μl / INVITROGEN

Πίνακας 3 XI : Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (*primers*) για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε με *Real time PCR*.

Γονίδιο	Forward primer	Reverse primer
<i>ERG</i>	ERG 5-6 F: 5'-CGCAGAGTTATCGTGCCAGCAGAT -3'	ERG 5-6 R: 5' - CCATATTCTTTACCCGCCCACTCC-3'
<i>CMYC</i>	CMYC 291F: 5' - TCAAGAGGCGAACACACAAC-3'	CMYC 291R: 5' - GGCCTTTTCATTGTTTTCCA-3'
<i>PCA3</i>	PCA3 F: 5' - CATGGTGGGAAGGACCTGATGATAC-3'	PCA3 R: 5' - GATGTGTGGCCTCAGATGGTAAAGTC-3'
<i>EZH2</i>	EZH2 F: 5' - -3'CTGATTTTACACGCTTCCGC	EZH2 R: 5' - -3'GGAACAACGCGAGTCCG
<i>SNAIL</i>	SNAIL F: 5'-GCTGCAGGACTCTAATCCAGA -3'	SNAIL R: 5' - ATCTCCGGAGGTGGGATG-3'
<i>PIM1</i>	PIM1 F: 5' - CGGGAAGCTGGAGACAGAAG-3'	PIM1 R: 5'-CCCAGCAAATAGCAGCCTTT -3'
<i>AR</i>	AR F: 5' - CCTGGCTTCCGCAACTTACAC-3'	AR R: 5' - GGAAGTGTGCATGCGGTAATC-3'
<i>FZD4</i>	FZD4 F: 5'-CTTCGTCACCTGGTCCTTCC -3'	FZD4 R: 5' - CACCCAGAACGACCACAAC-3'
<i>PTEN</i>	PTEN F: 5'-CCGAAAGGTTTTGCTACCATTCT -3'	PTEN R: 5' - AAAATTATTTCTTTCTGAGCATTCC-3'
<i>NKX3.1</i>	NKX3.1 F: 5'-CAGTCCCTACTGAGTACTCTTTCTCTC -	NKX3.1 R: 5' - CACAGTGAAATGTGTAATCCTTGC-3'
<i>ADRB2</i>	ADRB2 F: 5'-CATGCGCCGGACCACGAC -3'	ADRB2 R: 5'-CATGCCACCACCCACACCT -3'
<i>CDH1</i>	CDH1 F: 5' - TGGAGAGACACTGCCAACTG-3'	CDH1 R: 5' - AGGCTGTGCCTTCTTACAGA-3'
<i>SNCA</i>	SNCA F: 5'-TGTGCCAGTCATGACATTT -3'	SNCA R: 5' - CCACAAAATCCACAGCACAC-3'
<i>ERG</i> (<i>TaqMan</i>)	ERG 2F: 5'-CGCGGCAAGAAGCCTTA -3'	ERG 2R: 5' - TCCGTAGGCACACTCAAACAAC-3'
	ERG TaqMan: 5' - CAGTTGTGAGTGAGGACC-3'	

Γον. Αναφοράς	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i> (SG)	GAPDH F: 5'- AACAGCCTCAAGATCATCAGC-3'	GAPDH R: 5'- GGATGATGTTCTGGAGAGCC-3'
<i>PSA</i> (SG)	PSA nF: 5'- GCATCAGGAACAAAAGCGTGA-3'	PSA nR: 5'-CCTGAGGAATCGATTCTTCAG -3'
<i>PSA</i> (TaqMan)	PSA F: 5'- GTCTGCGGCGGTGTTCTG-3'	PSA R: 5'- TGCCGACCCAGCAAGATC-3'
	PSA TaqMan: 5'- CACAGCTGCCCACTGCATCAGGA-3'	
<i>β2m</i> (SG)	β2m F: 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG -3'	β2m R: 5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA -3'

VI. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR και Nested PCR)

α. Με τη μοριακή μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) έγινε έλεγχος των pBAC κλώνων που χρησιμοποιήθηκαν για την *in situ* υβριδοποίηση. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl PCR buffer 10X, 5 μl μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (2 mM dNTPs), 2.5 μl MgCl₂ (50 mM), 1 μl από έκαστο εκκινητή (primer, 50 pmol/μl), 0.3 μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 34.2 μl απιονισμένο νερό και 1 μl DNA από τον κλώνο pBAC 35C4. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μηχανήμα PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές 35C4.F/35C4.R στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 40 δευτερόλεπτα. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Πίνακας 3 XII : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην PCR ελέγχου του pBAC.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
PCR Buffer	10X / INVITROGEN
Μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs	2 mM / INVITROGEN
MgCl ₂	50 mM / INVITROGEN
Εκκινητές (primers)	50 pmol/μl /ITE
Platinum Taq ένζυμο πολυμεράσης	5 units/μl / INVITROGEN

Πίνακας 3 XIII : Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (primers) για τον έλεγχο του pBAC.

Κλώνος pBAC	Forward primer	Reverse primer
35C4	35C4.F : 5'-GGCTTAAAATGCAGGAGGTG-3'	35C.R : 5'-TTGAAACCAGGGTTTGGTTC-3'

β. Η ανίχνευση των υβριδικών γονιδίων *TMPRSS2-ERG* και *TMPRSS2-ETV1* έγινε με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ειδικότερα της μεθόδου nested PCR. Με την χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής εξασφαλίζεται μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία. Στην nested PCR χρησιμοποιούνται δυο ζεύγη εκκινητών. Το δεύτερο ζεύγος βρίσκεται εσωτερικά του πρώτου ζεύγους εκκινητών. Έτσι, το προϊόν της πρώτης PCR ξαναπολλαπλασιάζεται με το δεύτερο ζεύγος των εσωτερικότερων εκκινητών. Για την εφαρμογή της τεχνικής είναι απαραίτητη η κατασκευή συμπληρωματικού μορίου DNA (cDNA) από το RNA του προς εξέταση ιστού.

Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl PCR buffer 10X, 5 μl μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (2 mM dNTPs), 1.3 μl MgCl₂ (50 mM), 0.5 μl από έκαστο εκκινητή (primer, 50 pmol/μl), 0.3 μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 34.4 μl

απιονισμένο νερό και 3 μ l cDNA του υπό εξέταση δείγματος. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μηχανήμα PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 2 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές TMPRSS2 1F/ ERG 541R ή TMPRSS2 1F/ ETV 580R στους 94°C για 1 λεπτό, στους 60°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν αυτής της πρώτης αντίδρασης ξαναπολλαπλασιάζεται με τη χρήση των εσωτερικότερων εκκινητών TMPRSS2 20F/ ERG 450R ή TMPRSS2 20F/ ETV 502R. Η αντίδραση περιέχει τα ίδια υλικά με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται 3 μ l από το προϊόν της πρώτης PCR αντί για cDNA. Εκτός από τα μελετούμενα γονίδια, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το γονίδιο EWS με εκκινητές EWS 501/EWS 225R και το γονίδιο της β_2 μικροσφαιρίνης (β_2 microglobulin, β_2m) με εκκινητές β_2mV/β_2mD . Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αгарόζης 2%.

Τα ίδια υλικά και οι ίδιες ποσότητες χρησιμοποιούνται και για τη μελέτη και του χμιαρικού γονιδίου, του *SLC45A3-ELK4*. Στην περίπτωση της μελέτης του χμιαρικού γονιδίου *SLC45A3-ERG* οι εξωτερικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι SLC45A3F/ ERGex5-6 R και για το δεύτερο κύκλο του PCR οι εσωτερικοί εκκινητές ήταν οι SLC45A3F/ERGex10 R. Το πρόγραμμα της PCR ήταν 2 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολούθησαν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα και 68°C για 2 λεπτά. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος έγινε στους 68°C για 10 λεπτά.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης του χμιαρικού γονιδίου *NDRG1-ERG* οι εξωτερικοί εκκινητές ήταν οι NDRG1ex1F/ERGex5-6 R και για το δεύτερο κύκλο του PCR οι εσωτερικοί εκκινητές ήταν οι NDRG1ex1F/ERGex10 R ή NDRG1ex1F / ERGex13 R. Το πρόγραμμα της PCR ήταν 2 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολούθησαν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα και 68°C για 2 λεπτά. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος έγινε στους 68°C για 10 λεπτά.

Παράλληλα έγινε και ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου αναφοράς, το οποίο είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της ύπαρξης γενετικού υλικού σε κάθε δείγμα, με τη χρήση των εξωτερικών εκκινητών EWS 501/ EWS 22.5R στον πρώτο κύκλο του PCR και EWS 22.3 / EWS 22.5R στο δεύτερο κύκλο του PCR ή των εκκινητών β_2mV και β_2mD του γονιδίου αναφοράς της μικροσφαιρίνης β_2 . Η αντίδραση περιείχε τα ίδια υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων στόχων. Το πρόγραμμα της

PCR ήταν και αυτό το ίδιο και το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε καθαρισμό με τη χρήση του Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλουχοποίηση των προϊόντων έγινε από την εταιρεία VBC. Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Πίνακας 3 XIV: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην nested PCR

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ/ΕΤΑΙΡΕΙΑ
PCR Buffer	10X / INVITROGEN
Μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs	2 Mm / INVITROGEN
MgCl₂	50 mM / INVITROGEN
Εκκινητές (primers)	50 pmol/μl / ITE
Platinum Taq ένζυμο πολυμεράσης	5 units/μl / INVITROGEN

Πίνακας 3 XV : Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (*primers*) για την ανίχνευση των υβριδικών γονιδίων *TMPRSS2-ERG*, *TMPRSS2-ETV1*, *SLC45A3-ELK4*, *SLC45A3-ERG*, και *NDRG1-ERG* σε καλοήγη υπερπλασία του προστάτη καθώς και σε καρκίνωμα του προστάτη.

Χιμ/κό γονίδιο	Forward primer	Reverse primer
<i>TMPRSS2-ERG</i> 1^η PCR	TMPRSS2 1F : 5'-CGCGAGCTAAGCAGGAGGCG-3'	ERG 541R : 5'-TCATGTTTGGGGGTGGCATGTG-3'
<i>TMPRSS2-ERG</i> 2^η PCR	TMPRSS2 20F: 5'-GGAGGCGGAGGCGGAGGG-3'	ERG 450R : 5'-TTGGCCACACTGCATTCATCAGGA-3'
<i>TMPRSS2-ETV1</i> 1^η PCR	TMPRSS2 1F : 5'-CGCGAGCTAAGCAGGAGGCG-3'	ETV 580R: 5'-GATGGAGGGAGGTGAGCTGGGAA-3'
<i>TMPRSS2-ETV1</i> 2^η PCR	TMPRSS2 20F: 5'-GGAGGCGGAGGCGGAGGG-3'	ETV 502R: 5'-GACACTGGCTGTCTGGATGGTGT-3'
<i>SLC45A3-ELK4</i> 1^η PCR	SLC45A3.1F : 5'-CCGCGGAGTAACCTGGAGATTT-3'	ELK4.R : 5'-TGCCCATCATTAGAGGTCCAACAG -3'
<i>SLC45A3-ELK4</i> 2^η PCR	SLC45A3.1inF : 5'-CTGGAGATTTAAAAGCCGCC -3'	ELK4.1inR : 5'- GCTGAAGAAGGAAGTCCAC-3'
<i>SLC45A3-ERG</i> 1^η PCR	SLC45A3.1F : 5'-CCGCGGAGTAACCTGGAGATTT-3'	ERGex5-6R : 5'-CCATATTCTTTCACCGCCCACTCC-3'
<i>SLC45A3-ERG</i> 2^η PCR	SLC45A3.1inF : 5'-CTGGAGATTTAAAAGCCGCC-3'	ERGex10R : 5'-CGACTGGGGCGTGGGGTG-3'
<i>NDRG-ERG</i> 1^η PCR	<i>NDRG1.ex1F:</i> 5'-CTGAAGCTCGTCAGTTCACCATCC	ERGex5-6R : 5'-CCATATTCTTTCACCGCCCACTCC-3'
<i>NDRG-ERG</i> 2^η PCR	<i>NDRG1.ex1F:</i> 5'-CTGAAGCTCGTCAGTTCACCATCC	ERGex10R : 5'-CGACTGGGGCGTGGGGTG-3'
<i>NDRG-ERG</i> 2^η PCR	<i>NDRG1.ex1F:</i> 5'-CTGAAGCTCGTCAGTTCACCATCC	ERGex13R: 5'- TAGTAGTAAGTGCCAGATGAGAAGG-3'

Γον. Αναφοράς	Forward primer	Reverse primer
<i>Ews</i> 1 ^η PCR	EWS 501: 5'-CCAGCCCAGCCTAGGATATGGACA-3'	EWS 22.5R: 5'- TGGGCTTTCCTGTTTCCTTGTCC-3'
<i>Ews</i> 2 ^η PCR	EWS 22.3F: 5'- ATCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC-3'	EWS 22.5R: 5'- TGGGCTTTCCTGTTTCCTTGTCC-3'
<i>β2m</i>	β2mV: 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG -3'	β2m D: 5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA -3'

VII. Καθαρισμός προϊόντος από πήκτωμα αγαρόζης ή άμεσα του προϊόντος της PCR

Για τον καθαρισμό προϊόντος PCR χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο της εταιρείας MACHEREY-NAGEL από την οποία παρέχονται και τα αντιδραστήρια. Υπάρχουν δύο περιπτώσεις: είτε από πήκτωμα αγαρόζης είτε άμεσα από την αντίδραση της PCR.

VII 1. Προϊόν από πήκτωμα αγαρόζης

Η ζώνη από το πήκτωμα αγαρόζης κόβεται πολύ προσεκτικά με αποστειρωμένο νυστέρι, προσπαθώντας να υπάρχει στο κομμάτι που αφαιρείται όσο δυνατόν λιγότερο πήκτωμα. Το κομμάτι αυτό, περίπου 100 mg, μεταφέρεται σε μικροσωληνάριο φυγοκέντρου, το οποίο περιέχει 400 µl διαλύματος Buffer NT και επωάζεται στους 50°C για 10-15 λεπτά, ώσπου το διάλυμα να είναι πλήρως ομογενοποιημένο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11000xg για 1 λεπτό και φιλτράρεται μέσα από κολώνα Nucleospin Extract II. Η μεμβράνη της προαναφερθείσας στήλης ξεπλένεται με 700 µl διαλύματος Buffer NT3 και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000xg. Στη συνέχεια, η Nucleospin Extract II column φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 11000xg ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα διαλύματος Buffer NT3. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 2-5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος Buffer NT3. Τέλος, το

προϊόν εκλούεται με 25 μl διαλύματος Elution buffer NE σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου με φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 11000xg.

VII 2. Προϊόν PCR

Το προϊόν της αντίδρασης άμεσα μεταφέρεται για καθαρισμό. Ποσότητα ενός όγκου από το προϊόν αναμιγνύεται με διπλάσιο όγκο διαλύματος NT. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 11000xg για 1 λεπτό και φιλτράρεται μέσα από κολώνα Nucleospin Extract II. Η μεμβράνη της προαναφερθείσας στήλης ξεπλένεται με 700μl διαλύματος Buffer NT3 και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000xg. Στη συνέχεια, η Nucleospin Extract II column φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 11000xg ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα διαλύματος Buffer NT3. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 2-5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος Buffer NT3. Τέλος, το προϊόν εκλούεται με 25 μl διαλύματος Elution buffer NE σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου με φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 11000xg.

Πίνακας 3 XVI : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στον καθαρισμό προϊόντος είτε άμεσα από την αντίδραση PCR είτε από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Buffer NT	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin Extract II II column	MACHEREY-NAGEL
Wash Buffer NT3	MACHEREY-NAGEL
Elution Buffer NE	MACHEREY-NAGEL

4. Αποτελέσματα

4.1. Παρουσία του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα και καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη

Στον πίνακα 4.1 I παρουσιάζονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την παρουσία του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, σε συνολικά 72 δείγματα καρκίνου του προστάτη. Από αυτά, 21 δείγματα βρέθηκαν να φέρουν το χμιαϊρικό γονίδιο (ποσοστό 29.17%) και τα υπόλοιπα 51 δείγματα να είναι αρνητικά για αυτό (ποσοστό 70.83%).

Εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές: η μοριακή κυτταρογενετική μέθοδος FISH και η Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Συγκεκριμένα, με τη μοριακή κυτταρογενετική μέθοδο FISH (Εικόνα 4.1 II) μελετήθηκαν 12 δείγματα καρκίνου του προστάτη, όπου 6 από αυτά βρέθηκαν θετικά για το χμιαϊρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*, (ποσοστό 50.00%).

Με τη μοριακή μέθοδο RT-PCR που χρησιμοποιήθηκε, ελέγχθησαν συνολικά 66 δείγματα, από τα οποία 17 βρέθηκαν να φέρουν το χμιαϊρικό γονίδιο (ποσοστό 25.76%).

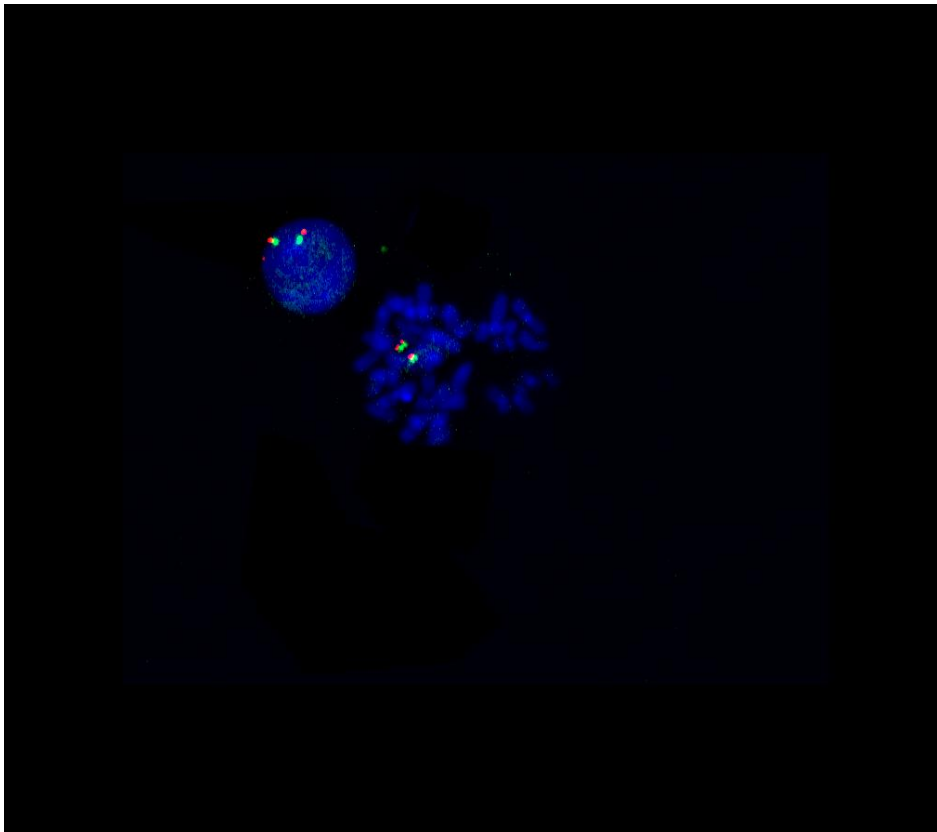
Ο συνολικός αριθμός των θετικών για το χμιαϊρικό γονίδιο, δειγμάτων, που ελέγχθηκαν και με τις δύο τεχνικές είναι 3. Από αυτά, 2 δείγματα είναι θετικά και με τις δύο τεχνικές ενώ 1 δείγμα ήταν αρνητικό με την RT-PCR και θετικό με το FISH.

Ο συνολικός αριθμός των αρνητικών για το χμιαϊρικό γονίδιο, δειγμάτων, που ελέγχθηκαν και με τις δύο τεχνικές είναι 3 τα οποία βρέθηκαν αρνητικά και με τις δύο τεχνικές, το ποσοστό ταύτισης, σε αυτήν την περίπτωση, φθάνει το 100%.

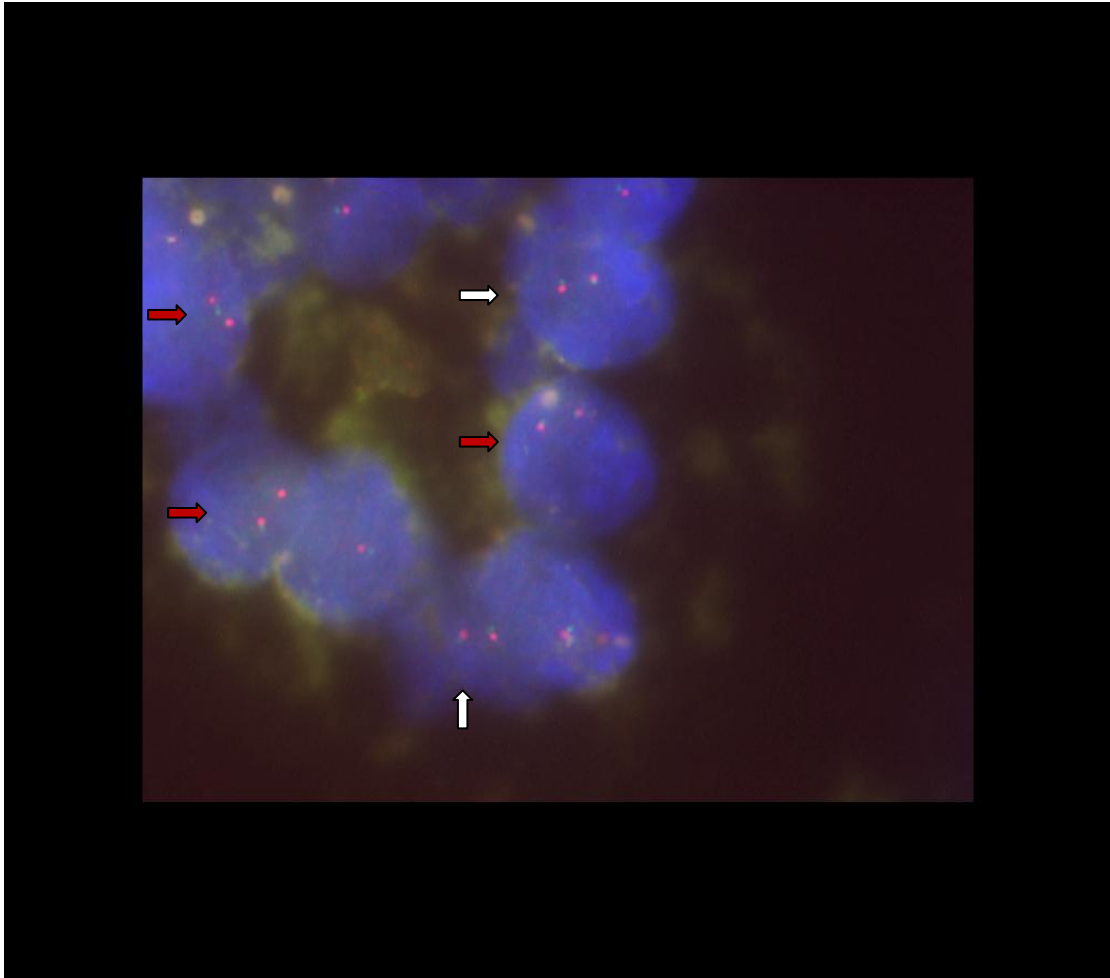
Στον πίνακα 4.1 I δίνονται επίσης, τα στοιχεία που αφορούν τη συσχέτιση του βαθμού ιστολογικής κακοήθειας (grade) της μεθόδου Gleason, με την παρουσία ή μη του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Παρατηρείται ότι από τα δείγματα που είναι θετικά για το χμιαϊρικό γονίδιο, η πλειοψηφία των δειγμάτων ανήκει σε υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (≥ 7), (ποσοστό 84.61%), χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικό.

Πίνακας 4.1 I: Παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα του προστάτη.

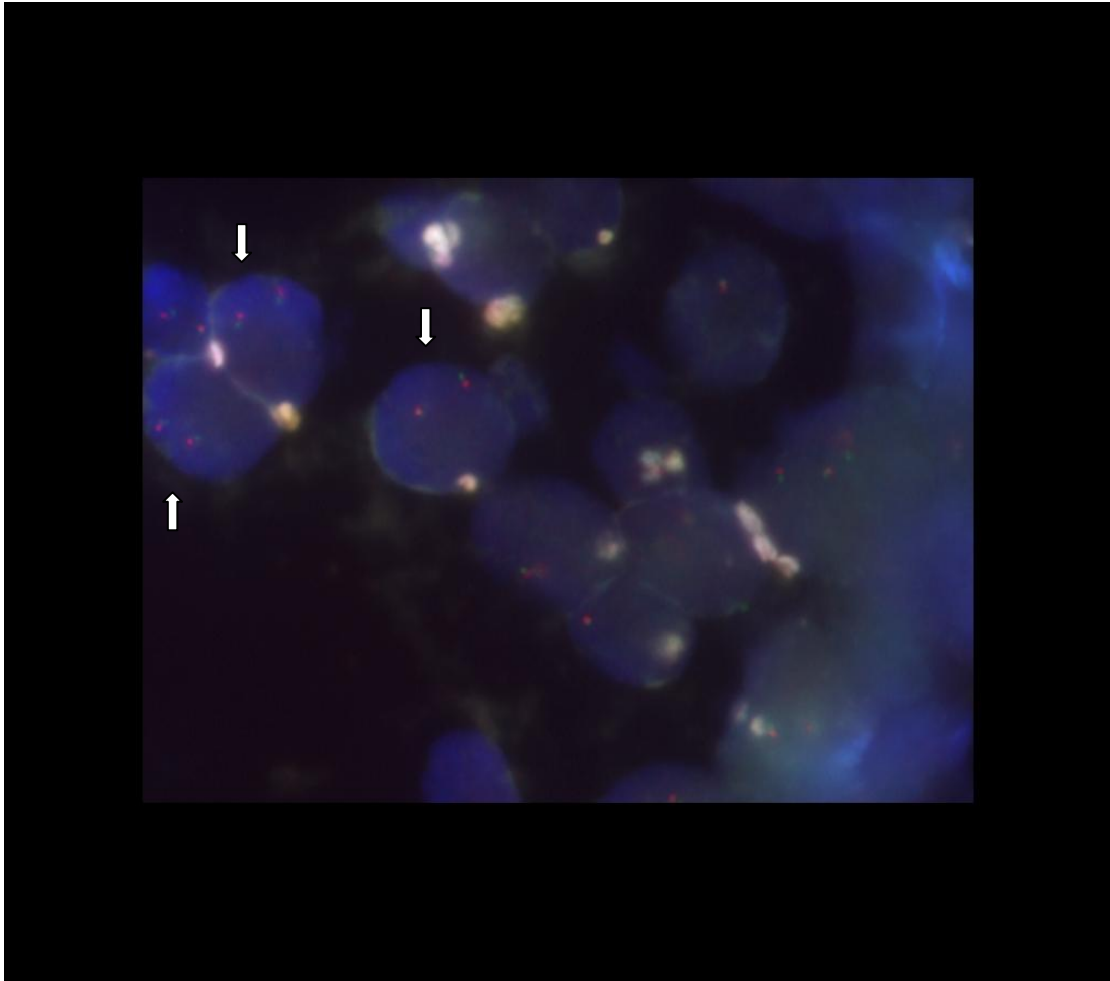
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΡΟΣΤΑΤΗ					
	FISH	RT-PCR	GLEASON		ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
			<7	>=7	
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	12	66	20 (35.71%)	36 (64.29%)	72
ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	6 (50.00%)	17 (25.76%)	2 (15.39%)	11 (84.61%)	21 (29.17%)
ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	6 (50.00%)	49 (74.24%)	18 (41.86%)	25 (58.14%)	51



Εικόνα 4.1 I : Αποτελέσματα ανάλυσης FISH με τους ανιχνευτές *c-ERG* (RP11-24A11) και *t-ERG* (RP11-137J13) στον πυρήνα και στα μεταφασικά χρωμοσώματα κυττάρων από περιφερικό αίμα.



Εικόνα 4.1 II : Αποτελέσματα ανάλυσης FISH με τους ανιχνευτές c-ERG (RP11-24A11) και t-ERG (RP11-137J13) σε τομή παραφίνης καρκινώματος του προστάτη. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν πυρήνες που φέρουν το χιμαιρικό γονίδιο TMPRSS2-ERG και τα λευκά βέλη δείχνουν φυσιολογικούς πυρήνες.



Εικόνα 4.1 III : Αποτελέσματα ανάλυσης FISH με τους ανιχνευτές c-ERG (RP11-24A11) και t-ERG (RP11-137J13) σε τομή παραφίνης καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη. Τα βέλη δείχνουν φυσιολογικούς πυρήνες.

Στον πίνακα 4.1 II δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την παρουσία του χμιαϊκού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, σε συνολικά 116 δείγματα με καλοήγη υπερπλασία του προστάτη. Από αυτά τα 8 δείγματα στο σύνολο είναι θετικά για το χμιαϊκό γονίδιο (ποσοστό 6.90%), ενώ τα υπόλοιπα 108 βρέθηκαν αρνητικά (ποσοστό 93.10%).

Εφαρμόστηκαν και σε αυτή τη μελέτη οι δύο τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, λόγω του είδους του υλικού που υπήρχε για κάθε δείγμα. Πιο αναλυτικά, με τη μοριακή κυτταρογενετική μέθοδο FISH (Εικόνα 4.1 II) υποβλήθηκαν σε μελέτη συνολικά 38 δείγματα με καλοήγη υπερπλασία του προστάτη, από τα οποία τα 7 βρέθηκαν θετικά για το χμιαϊκό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*, (ποσοστό 18.42%.) Τα υπόλοιπα 31 δείγματα είναι αρνητικά, (ποσοστό 81.58%).

Με τη μοριακή μέθοδο RT-PCR, ελέγχθηκαν συνολικά 116 δείγματα, από τα οποία 4 βρέθηκαν να φέρουν το χμιαϊκό γονίδιο (ποσοστό 3.28%).

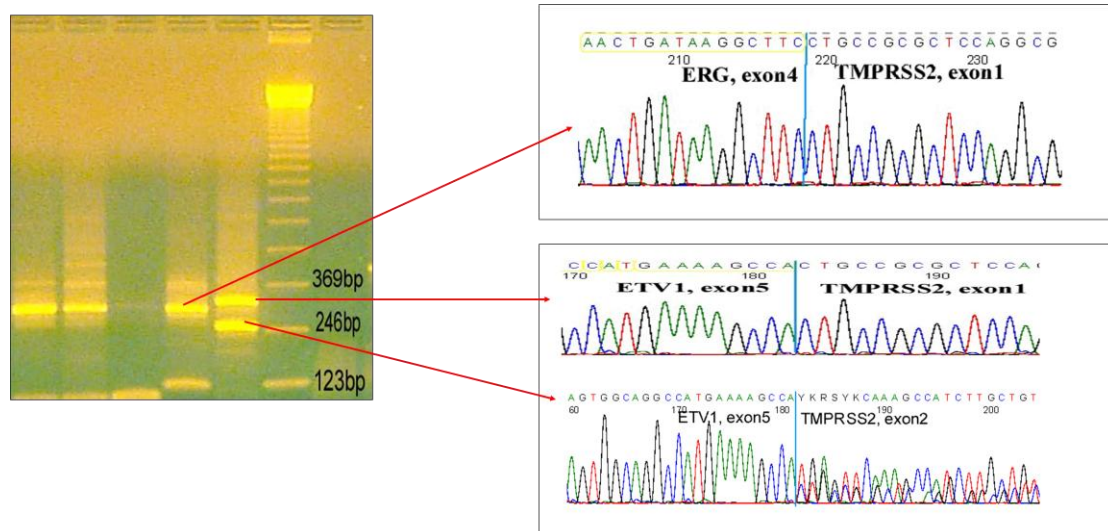
Και τα 38 δείγματα που μελετήθηκαν με FISH, μελετήθηκαν επίσης και με την τεχνική RT-PCR.

Ο συνολικός αριθμός των θετικών για το χμιαϊκό γονίδιο, δειγμάτων, που ελέγχθηκαν και με τις δύο τεχνικές είναι 7. Από αυτά, 3 δείγματα είναι θετικά και με τις δύο τεχνικές ενώ 4 δείγματα ήταν αρνητικά με την RT-PCR και θετικά με το FISH. Ένα δείγμα ελέγχθηκε μόνο με την RT-PCR, λόγω έλλειψης υλικού για το FISH και βρέθηκε να φέρει το χμιαϊκό γονίδιο.

Ο συνολικός αριθμός των αρνητικών για το χμιαϊκό γονίδιο, δειγμάτων, που ελέγχθηκαν και με τις δύο τεχνικές είναι 31, τα οποία βρέθηκαν αρνητικά και με τις δύο τεχνικές, το ποσοστό ταύτισης, σε αυτήν την περίπτωση, φθάνει το 100%.

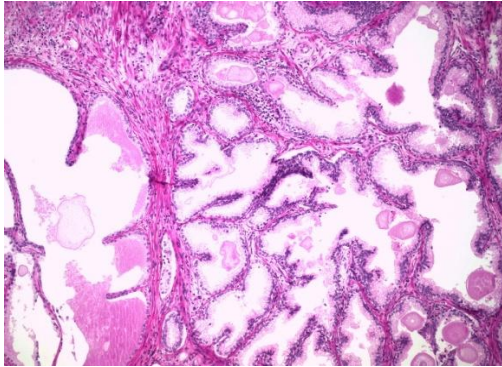
Πίνακας 4.1 II: Παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη.

ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ			
	FISH	RT-PCR	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	38	116	116
ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	7 (18.42%)	4 (3.45%)	8 (6.90%)
ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	31 (81.58%)	112 (96.55%)	108

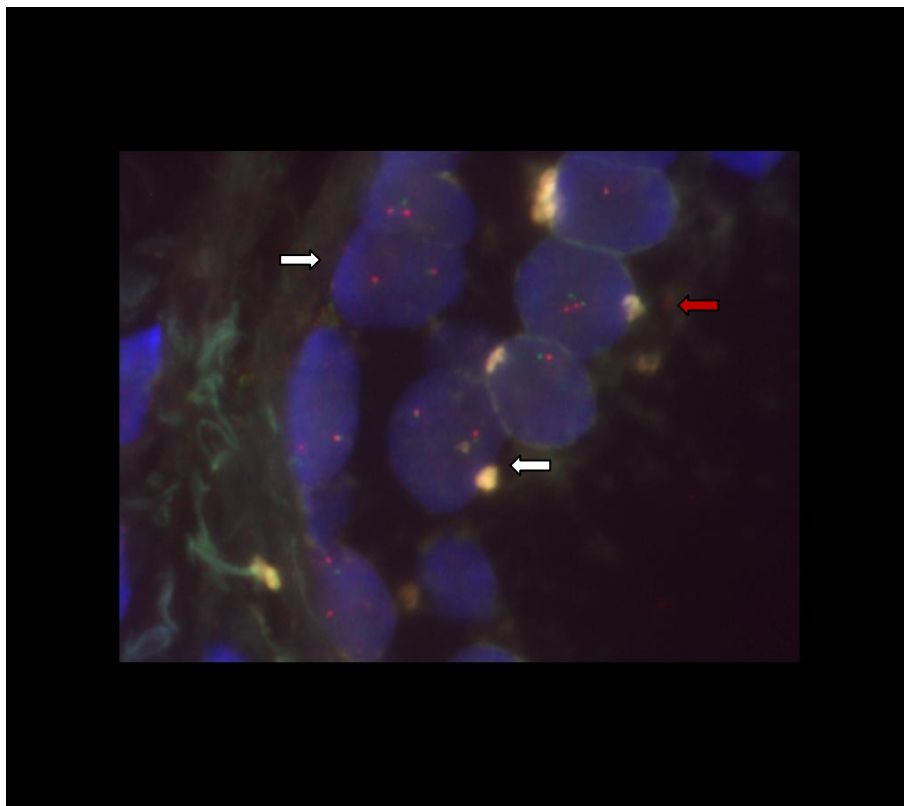


Εικόνα 4.1 IV : Αποτελέσματα PCR της παρούσης μελέτης για τα χιμαιρικά γονίδια *TMPRSS2-ERG* και *TMPRSS2-ETV1*.

A.



B.



Εικόνας 4.1 V : A. Ιστολογική εικόνα καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη. B. Αποτελέσματα FISH από το συγκεκριμένο ιστολογικό παρασκεύασμα. Το κόκκινο βέλος δείχνει πυρήνα που φέρει το χιμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* και τα λευκά βέλη δείχνουν φυσιολογικούς πυρήνες.

4.2. Παρουσία άλλων χμαιοικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη

Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την παρουσία τεσσάρων χμαιοικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη. Επιπλέον, δίνονται τα στοιχεία όσον αφορά τον τύπο του όγκου, το σύνολο των δειγμάτων ανά περίπτωση, καθώς και τα τελικά ποσοστά επί τις εκατό των δειγμάτων που φέρουν το κάθε χμαιοικό γονίδιο.

Τα τέσσερα χμαιοικά γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα εξής: *SLC45A3-ELK4*, *TMPRSS2-ETV1*, *SLC45A3-ERG* και *NDRG1-ERG*. Η μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας τη μοριακή τεχνική RT-PCR.

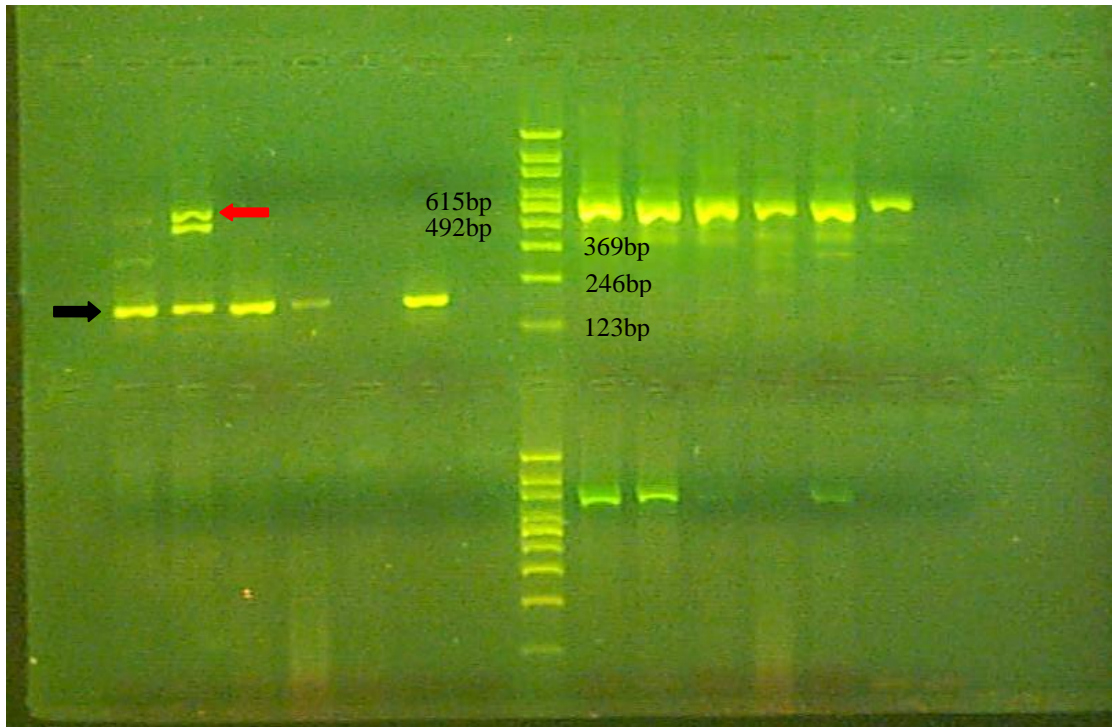
Παρατηρείται, στην περίπτωση της μελέτης του *SLC45A3-ELK4*, η παρουσία αυτού του χμαιοικού mRNA σε μεγάλα ποσοστά σε όλους τους τύπους του όγκου του προστάτη.

Στη μελέτη του *TMPRSS2-ETV1*, η παρουσία αυτού του χμαιοικού γονιδίου υπάρχει σε ένα από τα δέκα συνολικά δείγματα καρκινωμάτων του προστάτη.

Για τα υπόλοιπα δύο χμαιοικά γονίδια, που μελετήθηκαν, τα αποτελέσματα είναι αρνητικά.

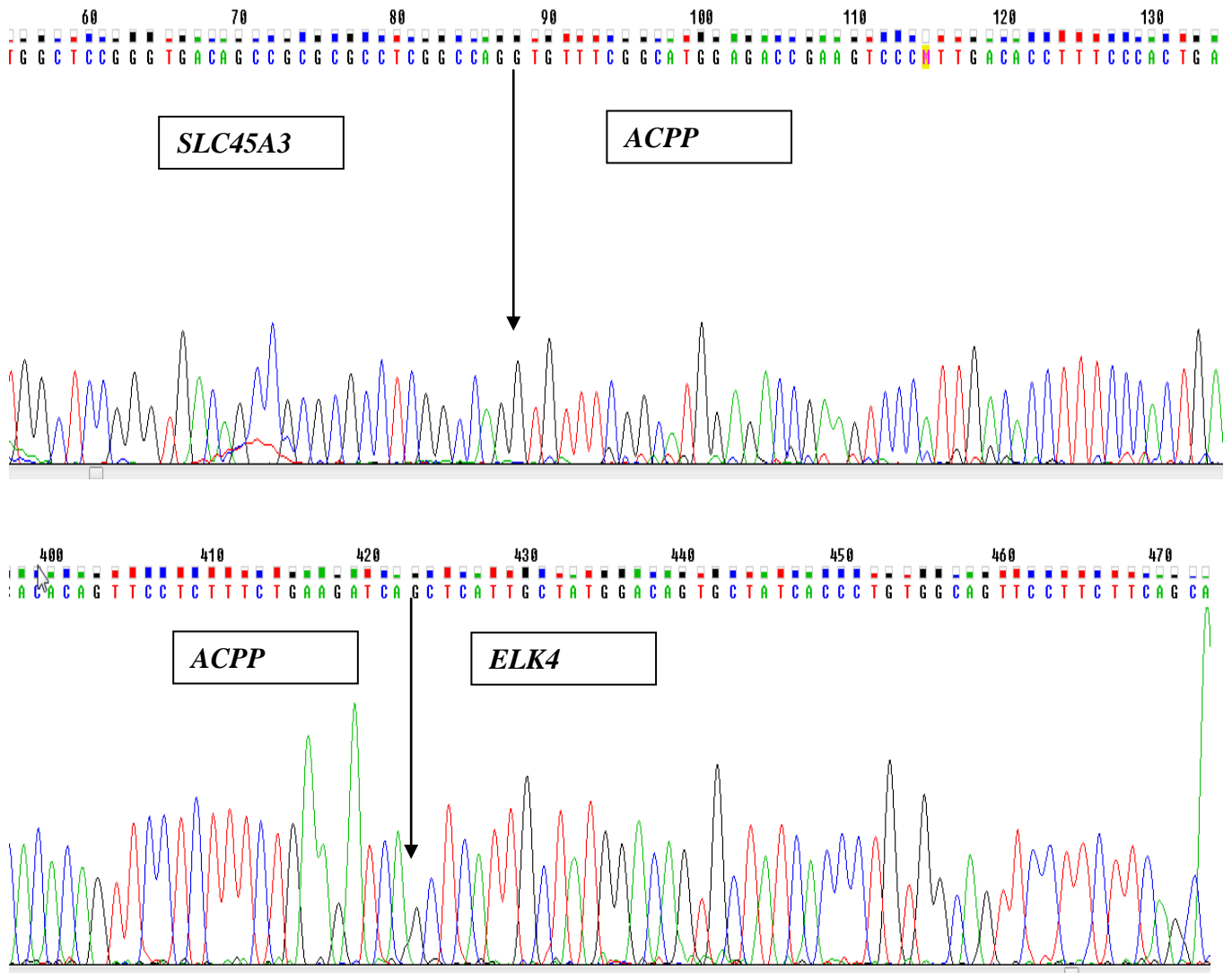
Πίνακας 4.2 : Παρουσία τεσσάρων χμαιοικών γονιδίων σε όγκους του προστάτη.

	CaP	PIN	BPH
<i>SLC45A3-ELK4</i> ΣΥΝΟΛΟ/ΘΕΤΙΚΑ/ΠΟΣΟΣΤΟ%	65/55/ 84.62%	9/8/ 88.89%	101/65/ 64.36%
<i>TMPRSS2-ETV1</i> ΣΥΝΟΛΟ/ΘΕΤΙΚΑ/ΠΟΣΟΣΤΟ%	41/1/ 2.44%	-	33/0/-
<i>SLC45A3-ERG</i> ΣΥΝΟΛΟ/ΘΕΤΙΚΑ/ΠΟΣΟΣΤΟ%	57/0/-	1/0/-	64/0/-
<i>NDRG1-ERG</i> ΣΥΝΟΛΟ/ΘΕΤΙΚΑ/ΠΟΣΟΣΤΟ%	60/0/-	-	-



Εικόνα 4.2 I : Αποτελέσματα PCR της παρούσης μελέτης για το χμαιοικό mRNA *SLC45A3-ELK4*. Το μαύρο βέλος δείχνει το αναμενόμενο προϊόν της PCR για το χμαιοικό γονίδιο. Το κόκκινο βέλος δείχνει το προϊόν της PCR για το *SLC45A3-ACPP-ELK4*.

Στην περίπτωση της μελέτης της παρουσίας του χμαιοικού mRNA *SLC45A3-ELK4* σε ένα δείγμα αδενοκαρκινώματος του προστάτη, παρατηρήθηκε η παρουσία μετάθεσης τμήματος του γονιδίου της όξινης προστατικής φωσφατάσης (Prostatic Acid Phosphatase, *ACPP*) στο σημείο ένωσης των δύο γονιδίων, που μελετούνται, για τη δημιουργία του χμαιοικού γονιδίου. Αποτέλεσμα αυτής της αναδιάταξης ήταν η παρουσία ενός διαφορετικού από το αναμενόμενο χμαιοικού γονιδίου, το οποίο αποτελείται από τμήματα τριών γονιδίων με τη σειρά που αναφέρονται: *SLC45A3*, *ACPP* και *ELK4*. Η ακολουθία του γονιδίου αυτού παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.2 II.



Εικόνα 4.2 II : Η ακολουθία του γονιδίου της όξινης προστατικής φωσφατάσης σε αδενοκαρκίνωμα του προστάτη.

4.3. Έκφραση του *ERG* και του *CMYC* σε σχέση με άλλες παραμέτρους σε καρκινώματα του προστάτη

Στους πίνακες 4.3 I και 4.3 II παρουσιάζονται συνοπτικά τα δεδομένα που αφορούν την έκφραση των γονιδίων *ERG* και *CMYC* σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα του προστάτη.

Συγκεκριμένα στον πίνακα 4.3 I δίνονται τα αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση των μέσων τιμών της έκφρασης του *ERG* σε σχέση με το χιμαιρικό γονίδιο, σε 40 καρκινώματα του προστάτη. Στους θετικούς, για την παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου, όγκους, η μέση τιμή του *ERG* ήταν υψηλότερη από ότι στους αρνητικούς (0.710 και 0.119 αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική, ($p=0.03$.)

Πίνακας 4.3 I : Έκφραση του ERG σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου σε καρκινώματα του προστάτη.

ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ERG*	P
ADCA	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	12	0.710	0.03
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	28	0.119	

*ERG λόγος ERG/PSAx1000 (όπου *ERG* είναι το γονίδιο μελέτης και *PSA* είναι το γονίδιο αναφοράς)

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μέσων τιμών έκφρασης του *CMYC* συγκριτικά με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου σε καρκινώματα του προστάτη. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στους πίνακες 4.3 II.

Πίνακας 4.3 II : Έκφραση του *CMYC* σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου σε καρκινώματα του προστάτη.

ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ <i>CMYC</i> *	P
ADCA	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS-ERG</i>	13	0.798	0.580
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	27	1.021	

**CMYC* λόγος *CMYC/PSA*x1000 (όπου *CMYC* είναι το γονίδιο μελέτης και *PSA* είναι το γονίδιο αναφοράς)

4.4. Έκφραση γονιδίων σε σχέση με την παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη

Στον πίνακα 4.4 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση δώδεκα γονιδίων σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη. Παρουσιάζονται οι σχέσεις των μέσων τιμών της έκφρασης του κάθε γονιδίου με το χιμαιρικό γονίδιο. Μελετήθηκαν συνολικά δώδεκα γονίδια, τα οποία είναι τα παρακάτω: *ERG* (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog), *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2), *SNAIL* (snail homolog 1), *CMYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), *PIMI* (pim-1 oncogene), *AR* (androgen receptor), *FZD4* (frizzled family receptor 4), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *NKX3.1* (NK3 homeobox 1), *ADRB2* (adrenoceptor beta 2, surface), *CDH1* (cadherin 1, type 1, E-cadherin) και τέλος *SNCA* (synuclein, alpha).

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε αφορά τη σύγκριση των μέσων τιμών της έκφρασης του γονιδίου *CMYC*.

Πίνακας 4.4 : Έκφραση διάφορων γονιδίων σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη.

ΓΟΝΙΔΙΟ		ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΚΦΡ. ΓΟΝ.*	P
<i>ERG</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	4.782	0.107
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	32	12.34	
<i>EZH.2</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	6	0.882	0.437
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	11	10.930	
<i>SNAIL</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	81.763	0.833
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	101.229	
<i>CMYC</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	1315.716	0.005
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	31	366.91	
<i>PIM1</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	40.740	0.094
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	14.192	
<i>AR</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	6	0.047	0.417
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	0.393	
<i>FZD4</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	326.516	0.633
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	235.347	
<i>PTEN</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	0.366	0.735
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	0.499	
<i>NKX3.1</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	3616.538	0.398
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	11	2286.018	
<i>ADRB2</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	258.125	0.453
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	11	538.273	
<i>CDH1</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	2.634	0.770
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	3.417	
<i>SNCA</i>	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	8	1727.174	0.943
	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	10	1641.720	

* λόγος μελετηθέντος γονιδίου /PSAx1000

4.5. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διάφορων γονιδίων, σε σχέση με την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη

Στους πίνακες 4.5 I και 4.5 II δίνονται συνοπτικά τα δεδομένα που αφορούν τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν ανάλογα με την παρουσία ή όχι του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.

Από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι στα δείγματα που είναι θετικά για το χμαιρικό γονίδιο, η έκφραση του γονιδίου *ERG* συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των γονιδίων *EZH2* ($r=0.825$, $p=0.043$), *CMYC* ($r=0.732$, $p=0.039$) και *PIMI* ($r=0.862$, $p=0.006$). Στα αρνητικά για το χμαιρικό γονίδιο, δείγματα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Βρέθηκε ότι η έκφραση του *EZH2* συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των γονιδίων *PIMI* ($r=0.825$, $p=0.043$), *ADRB2* ($r=0.857$, $p=0.029$) και *SNCA* ($r=0.867$, $p=0.025$), επίσης, η έκφραση του γονιδίου *CMYC* συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του γονιδίου *SNCA* ($r=0.899$, $p=0.002$), στα θετικά για το χμαιρικό γονίδιο δείγματα, ενώ στα αρνητικά δεν υπάρχουν αυτές οι συσχετίσεις.

Στα αρνητικά για το χμαιρικό γονίδιο, δείγματα, βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *CMYC* με την έκφραση των γονιδίων *PIMI* ($r=0.874$, $p=0.001$), *FZD4* ($r=0.942$, $p=0.000$), *PTEN* ($r=0.944$, $p=0.000$) και *ADRB2* ($r=0.803$, $p=0.005$).

Η έκφραση του γονιδίου *PTEN* σχετίζεται θετικά με την έκφραση των γονιδίων *PIMI*, *FZD4* και *ADRB2* στο σύνολο των δειγμάτων, ανεξάρτητα από την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου. Και σχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου *SNCA* στα θετικά δείγματα για το χμαιρικό γονίδιο και με την έκφραση των γονιδίων *CMYC* και *NKX3.1* στα αρνητικά για το χμαιρικό γονίδιο, δείγματα.

Πίνακας 4.5 I : Αποτελέσματα μελέτης των συσχετίσεων των επιπέδων έκφρασης των διαφόρων γονιδίων μεταξύ τους, σε σχέση με την παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου TMPRSS2-ERG σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη, (θετικές για το χιμαιρικό γονίδιο).

	ERG	EZH.2	SNAIL	CMYC	PIM1	AR	FZD4	PTEN	NKX3.1	ADRB2	CDH1	SNCA
ERG r		0.825	-0.130	0.732	0.862	0.182	0.614	0.600	0.292	0.566	-0.252	0.489
ERG p		0.043	0.758	0.039	0.006	0.730	0.105	0.116	0.483	0.143	0.547	0.219
EZH.2 r			-0.509	0.787	0.825	0.327	0.794	0.664	0.143	0.857	-0.082	0.867
EZH.2 p			0.302	0.063	0.043	0.527	0.059	0.150	0.787	0.029	0.877	0.025
SNAIL r				0.065	-0.133	-0.237	0.080	0.308	-0.233	-0.126	-0.148	-0.087
SNAIL p				0.879	0.753	0.652	0.850	0.457	0.578	0.767	0.726	0.837
CMYC r					0.931	0.251	0.981	0.942	0.423	0.944	-0.193	0.899
CMYC p					0.001	0.632	0.000	0.000	0.297	0.000	0.648	0.002
PIM1 r						0.248	0.891	0.839	0.362	0.870	-0.269	0.834
PIM1 p						0.635	0.003	0.009	0.378	0.005	0.519	0.010
AR r							0.295	0.218	0.061	0.416	0.742	0.335
AR p							0.570	0.678	0.909	0.412	0.091	0.516
FZD4 r								0.963	0.342	0.970	-0.177	0.956
FZD4 p								0.000	0.406	0.000	0.675	0.000
PTEN r									0.167	0.872	-0.240	0.888
PTEN p									0.693	0.005	0.567	0.003
NKX3.1 r										0.441	0.036	0.255
NKX3.1 p										0.274	0.933	0.542
ADRB2 r											-0.072	0.968
ADRB2 p											0.865	0.000
CDH1 r												-0.211
CDH1 p												0.615
SNCA r												
SNCA p												

r=Pearson correlation

Πίνακας 4.5 II : Αποτελέσματα μελέτης των συσχετίσεων των επιπέδων έκφρασης των διαφόρων γονιδίων μεταξύ τους, σε σχέση με την παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου TMPRSS2-ERG σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη, (αρνητικές για το χιμαιρικό γονίδιο).

	<i>ERG</i>	<i>EZH.2</i>	<i>SNAIL</i>	<i>CMYC</i>	<i>PIM1</i>	<i>AR</i>	<i>FZD4</i>	<i>PTEN</i>	<i>NKX3.1</i>	<i>ADRB2</i>	<i>CDH1</i>	<i>SNCA</i>
<i>ERG r</i>		-0.069	-0.303	-0.314	-0.418	0.189	-0.240	-0.189	-0.022	0.209	-0.067	0.592
<i>ERG p</i>		0.849	0.395	0.348	0.229	0.655	0.504	0.602	0.951	0.562	0.855	0.093
<i>EZH.2 r</i>			-0.379	0.051	-0.303	-0.132	-0.330	-0.309	0.195	-0.136	-0.171	-0.214
<i>EZH.2 p</i>			0.315	0.889	0.429	0.755	0.385	0.418	0.590	0.708	0.659	0.552
<i>SNAIL r</i>				0.513	0.722	-0.279	0.429	0.292	0.052	0.223	-0.232	0.482
<i>SNAIL p</i>				0.130	0.028	0.544	0.249	0.445	0.895	0.563	0.547	0.226
<i>CMYC r</i>					0.874	-0.279	0.942	0.944	0.552	0.803	-0.339	0.343
<i>CMYC p</i>					0.001	0.504	0.000	0.000	0.098	0.005	0.338	0.366
<i>PIM1 r</i>						-0.346	0.814	0.766	0.150	0.616	-0.404	0.384
<i>PIM1 p</i>						0.402	0.004	0.010	0.680	0.058	0.247	0.308
<i>AR r</i>							0.834	0.294	0.529	0.377	-0.107	0.379
<i>AR p</i>							0.010	0.479	0.178	0.357	0.801	0.355
<i>FZD4 r</i>								0.962	0.626	0.869	-0.301	0.582
<i>FZD4 p</i>								0.000	0.053	0.001	0.398	0.100
<i>PTEN r</i>									0.654	0.884	-0.246	0.621
<i>PTEN p</i>									0.040	0.001	0.493	0.075
<i>NKX3.1 r</i>										0.798	0.118	0.663
<i>NKX3.1 p</i>										0.003	0.746	0.036
<i>ADRB2 r</i>											-0.373	0.894
<i>ADRB2 p</i>											0.289	0.000
<i>CDH1 r</i>												-0.479
<i>CDH1 p</i>												0.192
<i>SNCA r</i>												
<i>SNCA p</i>												

r=Pearson correlation

4.6. Ανίχνευση του *TMPRSS2-ERG* και επίπεδα έκφρασης του *ERG* σε ούρα ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοψίες προστάτη

Στον πίνακα 4.6 I παρουσιάζονται συνοπτικά τα δεδομένα των μέσων τιμών που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *ERG* στα ούρα και ο αριθμός των δειγμάτων που ήταν θετικά για την παρουσία του χμιαρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε σχέση με την παρουσία καρκίνου του προστάτη στη βιοψία. Από τους 66 συνολικά ασθενείς, οι 14 βρέθηκαν θετικοί για κακοήθεια, σύμφωνα με τη βιοψία. Οι 11 από αυτούς ήταν θετικοί στο τεστ ούρων για το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* (ποσοστό 78%). Από τους υπόλοιπους 52, οι οποίοι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βιοψίας, ήταν αρνητικοί για καρκίνο του προστάτη, βρέθηκαν 15 θετικοί για το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* (ποσοστό 28%), η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.001$).

Πίνακας 4.6 I : Κλινικά χαρακτηριστικά προ βιοψίας σε σχέση με διάγνωση στον προστάτη.

	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ Ca N=52	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ Ca N=14	**p
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ <i>ERG</i> *	2.77 [0.7-12.1]	5.35 [1.5-131.5]	0.355
ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	15 (28.8%)	11 (78.6%)	0.001

*γονίδιο στόχος /PSA X1000

**N (%) σύγκριση με Fisher's exact tests; ο μέσος όρος [inter-quartile range]

Στον πίνακα 4.6 II δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της σχέσης που υπάρχει μεταξύ των διάφορων τύπων ιστολογικών ευρημάτων και την παρουσία ή όχι του χμιαρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Η διαφορά που προκύπτει είναι στατιστικά σημαντική ($p = 0.004$).

Πίνακας 4.6 II : Έλεγχος της κατανομής των θετικών για το χμιαϊκό γονίδιο σε σχέση με τον τύπο των ιστολογικών ευρημάτων της βιοψίας του προστάτη.

	ΚΑΡΚΙΝΟΣ	ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ	Χ. ΠΡΟΣΤΑΤΙΤΙΔΑ	p
ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	11 (78.6%)	7 (35.0%)	6 (25.0%)	0.004 ANOVA
ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>TMPRSS2-ERG</i>	3 (21.4%)	13 (65.0%)	18 (75.0%)	

Στον πίνακα 4.6 III παρουσιάζεται η πρόβλεψη της παρουσίας ή απουσίας καρκίνου του προστάτη κατά τη βιοψία χρησιμοποιώντας σαν δείκτη το χμιαϊκό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*.

Συγκεκριμένα, 26 ασθενείς, σε ποσοστό 39%, είναι θετικοί για το χμιαϊκό γονίδιο. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση που έγινε, ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη ήταν περισσότερο πιθανό να είναι θετικοί για το χμιαϊκό γονίδιο, (AUC 0.749, $p=0.002$) με ευαισθησία 79% και ειδικότητα 71%.

Πίνακας 4.6 III : Απόδοση του χμιαϊκού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* στην προβλέπιμη διάγνωση για καρκίνο του προστάτη: μονοπαραγοντικές αναλύσεις.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΨΙΑΣ PNB		ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (%)	AUC (95%) CI	UNIVARIE TE p VALUE
	ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ ΚΑΚΟΗ ΘΕΙΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ ΚΑΚΟΗ ΘΕΙΑ				
<i>TMPRSS2-ERG</i>			79	71	0.749 (0.604-0.893)	0.002
ΘΕΤΙΚΑ	11	15				
ΑΡΝΗΤΙΚΑ	3	37				

5. Συζήτηση

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου που εμφανίζεται στους άνδρες και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια.

Από μελέτες που έχουν γίνει, έχουν καταγραφεί πάνω από 350 γονίδια, τα οποία συνδέονται με την καρκινογένεση του προστάτη (www.sanger.ac.uk). Σε όλα αυτά έχουν καταγραφεί γενετικές βλάβες που απορυθμίζουν τη φυσιολογική λειτουργία τους με πιθανές συνέπειες στο φαινότυπο των κυττάρων του προστάτη.

Οι «βλάβες» που έχουν καταγραφεί στο γενετικό υλικό και είναι υπεύθυνες για τον καρκίνο του προστάτη, οφείλονται κυρίως είτε σε δομικές χρωμοσωμικές μεταβολές, που οδηγούν στο σχηματισμό χμαιρικών γονιδίων, σε γονιδιακές επεκτάσεις και ελλείψεις γονιδίων, είτε σε σημειακές μεταλλάξεις.

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί για πολλές από αυτές τις μεταβολές η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σαν μοριακοί δείκτες για την πρόγνωση, τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε τρία μέρη:

A. Στη μελέτη της παρουσίας και της έκφρασης των χμαιρικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη και της έκφρασης των γονιδίων *ERG* και *CMYC* σε σχέση με την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.

B. Στη μελέτη της παρουσίας και της έκφρασης των χμαιρικών γονιδίων σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης μίας σειράς γονιδίων σε σχέση με την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.

Γ. Στη μελέτη της ανίχνευσης του *TMPRSS2-ERG* σε κυτταρικά ιζήματα ούρων και η χρήση του σαν μοριακός διαγνωστικός δείκτης.

A. Μελέτη της παρουσίας των χμαιρικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη.

Το *TMPRSS2-ERG* είναι το πιο συχνό χμαιρικό γονίδιο που συναντάται στον καρκίνο του προστάτη και έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη σημασία του στον καρκίνο του προστάτη. Το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία, πάνω από το 95%, των αναδιατάξεων μεταξύ του *TMPRSS2* και της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS, που περιγράφονται σε καρκινώματα του προστάτη (216). Η πιο γνωστή «συγχώνευση» γίνεται μεταξύ του εξωνίου 1 του *TMPRSS2* και των εξωνίων 4 ή 5 του *ERG*. Μετά την αναδιάταξη η έκφραση του *ERG* ελέγχεται από τις 3' αμετάφραστες περιοχές του *TMPRSS2* που ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα (95, 217). Η παρουσία του σε καρκινώματα του προστάτη, στο σύνολο των δημοσιευμένων μελετών, βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό περίπου 50% (106).

Στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούνται μικρά ιστοτεμάχια και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του χμαιρικού γονιδίου είναι η RT-PCR (95, 107, 108, 218, 219). Σε μελέτες όπου είναι διαθέσιμο μεγαλύτερο κομμάτι δείγματος, χρησιμοποιείται συνήθως η μοριακή μέθοδος FISH. Η μέθοδος αυτή δίνει μία λιγότερη ειδική εικόνα ως προς την υπάρχουσα αναδιάταξη σε σύγκριση με τη μοριακή μέθοδο της RT-PCR. Ίσως αυτό οδηγεί κατά ένα τρόπο στην υπερεκτίμηση της συχνότητας της παρουσίας του χμαιρικού γονιδίου (102).

Οι υπάρχουσες μελέτες ως προς το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* είναι πολυάριθμες. Τα ποσοστά που προέκυψαν με τη χρήση της μοριακής μεθόδου RT-PCR κυμαίνονται από 15% έως 60% (96, 100, 106, 107, 216, 218-225).

Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό παρουσίας του χμαιρικού γονιδίου σε καρκινώματα του προστάτη ανέρχεται στο 25,76%.

Επίσης, οι μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για το χμαιρικό γονίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FISH δίνουν ποσοστά που κυμαίνονται από 35% έως 70% (102, 103, 106, 212, 214, 220, 222, 223, 226-228).

Στην παρούσα μελέτη, η παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα του προστάτη, χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, βρέθηκε σε ποσοστό 50%. Οπότε, και στις δύο προσεγγίσεις που έγιναν με τις μεθόδους RT-PCR και FISH, επιβεβαιώνεται το ποσοστό που δίνει η βιβλιογραφία.

Σε πολλές μελέτες που έχουν γίνει, εκτός από την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου στα καρκινώματα του προστάτη, έχει μελετηθεί η συσχέτιση της παρουσίας του *TMPRSS2-ERG* και των βαθμών Gleason. Οι απόψεις δίστανται. Άλλες θεωρούν ότι υπάρχει συσχέτιση και άλλες όχι.

Συγκεκριμένα οι μελέτες των Mehra et al., 2007, Saramaki et al., 2008, Yoshimoto et al., 2006, Lapointe et al., 2007, Lu et al., 2008, Perner et al., 2006 και 2007, Mosquera et al., 2007, FitzGerald 2008 και Wang 2006, δεν είχαν διαπιστώσει κάποιο είδος συσχέτισης (99, 102, 106, 211, 212, 214, 228-230). Αυτή η κατηγορία ενισχύει και η παρούσα μελέτη, αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* και του βαθμού Gleason.

Υπάρχουν, όμως και μελέτες που βρίσκουν κάποιου είδους διαφορετικές συσχετίσεις ανάμεσα στην παρουσία του χμαιρικού γονιδίου ή την έκφραση του *ERG* και το βαθμό Gleason (100, 221, 222, 231, 232).

Αυτές οι διαφορές μπορούν να εξηγηθούν τουλάχιστον εν μέρη από τις ξεχωριστές κλινικές εικόνες που έχουν τα διάφορα περιστατικά των καρκινωμάτων του προστάτη που μελετήθηκαν.

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* εξετάστηκαν άλλα τέσσερα χμαιρικά γονίδια σε καρκινώματα του προστάτη. Τα χμαιρικά γονίδια είναι τα παρακάτω: *TMPRSS2-ETV1*, *SLC45A3-ELK4*, *SLC45A3-ERG* και *NDRG1-ERG*.

Μελετήθηκε η παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ETV1* σε καρκινώματα του προστάτη. Το *ETV1* (7q21.2) είναι ο δεύτερος πιο συχνός 3' «παρτενέρ» του *TMPRSS2* μετά το *ERG* στα καρκινώματα του προστάτη. Σε κάποιες μελέτες δεν ανιχνεύεται καν το χμαιρικό αυτό γονίδιο (106, 211, 218). Άλλες μελέτες έχουν δείξει κάποια χαμηλά ποσοστά ως προς την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό της παρουσίας του χμαιρικού γονιδίου είναι 1% και 2% σύμφωνα με μελέτες του Tomlins το 2007 και το 2008, 1.2% σύμφωνα με το Tu JJ το 2007, 2% και 3% σύμφωνα με μελέτες του Mehra R το 2007 και το 2008 αντίστοιχα, καθώς και με τη μελέτη της ομάδας του Han B το 2008, όπου το ποσοστό είναι 5% (103, 213, 220, 225, 226, 233). Το ποσοστό που προέκυψε στα δείγματα που ελέγχθησαν από τη μελέτη, είναι ταυτόσημο με τα παραπάνω χαμηλά ποσοστά, αφού είναι 2.44%.

Το χμαιοικό mRNA *SLC45A3-ELK4*, αποτελείται από τμήματα των γονιδίων *SLC45A3* και *ELK4*. Η σύζευξη γίνεται συγκεκριμένα στο εξόνιο 1 του *SLC45A3* με το εξόνιο 2 του *ELK4*. Το *SLC45A3* (Solute carrier family 45, member 3), (είναι γνωστό και σαν prostate cancer-associated protein 6 ή prostein), εκφράζεται ειδικά στον προστάτη και ρυθμίζεται από τα ανδρογόνα. Αποτελεί πρωτεΐνη του κυττάρου και η λειτουργία της είναι η διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών. Συμμετέχει στη δημιουργία χμαιοικών γονιδίων, αποτελώντας τον 5' «παρτενέρ» αυτών. Πιθανά γονίδια με τα οποία συνδυάζεται στο 3', σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα αναφορές, είναι μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS (E26 Transformation Specific), όπως το *ERG*, το *ETV1*, το *ETV5*, καθώς και το *ELK4*, (ETS-domain protein SRF accessory protein 1), (226, 233-235). Το *ELK4* (ETS-domain protein SRF accessory protein 1) ρυθμίζεται και αυτό από τα ανδρογόνα. Είναι ειδική περιοχή του DNA, όπου συνδέονται μεταγραφικοί παράγοντες. 2) Εμπλέκεται στην προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Στα καρκινώματα του προστάτη γίνεται υπερέκφραση του *ELK4*, με ένα μηχανισμό ο οποίος δεν είναι ακόμα γνωστός (235).

Αυτό το χμαιοικό mRNA εμφανίζεται και σε καρκινώματα, καθώς και σε υπερπλασίες του προστάτη (235). Ανιχνεύεται όμως σε υψηλότερο ποσοστό στα καρκινώματα σε σχέση με τις υπερπλασίες του προστάτη, όπως ισχύει και στην περίπτωση του χμαιοικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* (235-238). Το χμαιοικό mRNA *SLC45A3-ELK4* παράγεται από cis-splicing μεταξύ των δύο γειτονικών γονιδίων και δεν εμπλέκονται αναδιατάξεις DNA ή trans-splicing. Το *SLC45A3-ELK4* ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και τα επίπεδά του συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου (92). Στην παρούσα μελέτη, το ποσοστό που βρέθηκε το χμαιοικό mRNA *SLC45A3-ELK4* σε καρκινώματα του προστάτη, ανέρχεται σε 84,62%.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε σε ένα δείγμα καρκινώματος του προστάτη, η ύπαρξη ενός χμαιοικού mRNA, το οποίο αποτελείται από τμήματα τριών γονιδίων, με την παρακάτω σειρά: *SLC45A3-ACPP-ELK4*. Τα γονίδια *SLC45A3* και *ELK4* βρίσκονται στην 1q32 και 1q32.1 αντιστοίχως, ενώ το *ACPP* (Prostatic Acid Phosphatase) είναι στην περιοχή 3q22.1. Η προστατική όξινη φωσφατάση συντίθεται σύμφωνα με τις ρυθμίσεις των ανδρογόνων και εκκρίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη.

Είναι γνωστό από τις μελέτες που έχουν γίνει, ότι το αυτό το χμαιοικό mRNA *SLC45A3-ELK4*, δημιουργείται από ένα μηχανισμό στο επίπεδο του mRNA

περισσότερο παρά από χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (235, 238). Η δημιουργία αυτού του χμαιρικού mRNA δείχνει ένα πιθανό συνδυασμό που πραγματοποιείται με το συνδυασμό τριών γονιδίων, από τα οποία τα δύο βρίσκονται σε γειτονική περιοχή του χρωμοσώματος 1 και το τρίτο στο χρωμόσωμα 3. Επίσης, παρατηρείται ότι η λειτουργία των δύο από τα τρία γονίδια που αποτελούν το χμαιρικό γονίδιο, και συγκεκριμένα το *SLC45A3* και το *ACPP*, επάγεται από τα ανδρογόνα. Αυτό το χμαιρικό γονίδιο παρουσιάζει ένα πολύπλοκο είδος «συγχωνεύσεων» γονιδίων που θα μπορούσε να έχει λειτουργική συνάφεια με την ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων. Τέλος, εξαιτίας της ετερογένειας που παρουσιάζει ο καρκίνος του προστάτη, έχει περιγραφεί η ύπαρξη κάποιων, τέτοιου είδους, σπάνιων, «μοναδικών», «ατομικών» χμαιρικών γονιδίων, σε όγκους ασθενών με καρκίνο του προστάτη (238).

Μελετήθηκαν άλλα δύο χμαιρικά γονίδια, το *SLC45A3-ERG* και το *NDRG1-ERG*. Τα γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό αυτών των χμαιρικών γονιδίων είναι κάποια ρυθμιζόμενα από τα ανδρογόνα, όπως το *SLC45A3* και το *NDRG1*, ως 5' «παρτενέρ» και το *ERG*, ως 3' «παρτενέρ» (92, 93, 95, 96, 226). Το ποσοστό παρουσίας των χμαιρικών γονιδίων σε καρκινώματα του προστάτη είναι πολύ μικρό. Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, ως προς τα άλλα δύο χμαιρικά γονίδια, *SLC45A3-ERG*, και *NDRG1-ERG*, δεν βρέθηκαν δείγματα που να είναι θετικά.

Επίσης, μελετήθηκε το επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων *ERG* και *CMYC*, σε καρκινώματα του προστάτη σε σχέση με την παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*. Tomlins et al., 2005 βρήκαν ότι το 95% των περιπτώσεων όπου υπάρχει υπερέκφραση του *ERG*, υπάρχει παράλληλα έκφραση του χμαιρικού γονιδίου (95). Αυτή η αύξηση της έκφρασης οφείλεται στην επαγόμενη από τα ανδρογόνα, μεταγραφής του χμαιρικού γονιδίου. Το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* προκαλεί μεταγραφική απορρύθμιση σε διάφορα γονίδια, τα οποία αποτελούν γνωστούς βιολογικούς δείκτες, όπως τα παρακάτω *CRISP3* (cysteine-rich secretory protein 3), *AMACR* (alpha-methylacyl-CoA racemase) και *MYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) (239). Αυτά τα γονίδια μπορεί να μην σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την κατάσταση του όγκου, αλλά μάλλον με την μεταγραφική αναδιαμόρφωση που προκαλείται από το *ERG*. Στη μελέτη του Sun C et al., 2008, προτείνεται ένα μοντέλο για τις λειτουργίες του *ERG* (216). Εμφανίζεται, λοιπόν, ότι η αύξηση της έκφρασης του *ERG*, η οποία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, συμβάλλει στην ανάπτυξη του

καρκίνου του προστάτη μέσω της «υπερρύθμισης» του ογκογονιδίου *CMYC* και της μείωσης της διαφοροποίησης του επιθηλίου του προστάτη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν αύξηση της έκφρασης του *ERG* στην παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου, το οποίο συμπίπτει με τη μελέτη του που προαναφέραμε, καθώς και με τη μελέτη του Saramaki O et al., 2008, του Petrovics G et al., 2005 και της Demichelis F et al., 2007 (102, 222, 240). Ως προς την έκφραση του *CMYC* σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, στη συγκεκριμένη μελέτη.

Στη μελέτη του Sun C et al., 2008, ο συνολικός αριθμός των όγκων του προστάτη ήταν 37 (216). Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των δειγμάτων των καρκινωμάτων του προστάτη ήταν 40. Επίσης, το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ήταν καθαροί όγκοι από καρκινώματα του προστάτη επιλεκτικά αφαιρεμένοι με τη χρήση λέιζερ πετυχαίνοντας μικροτομές σε όγκους ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν τομές από ολόκληρο τον όγκο. Επιπλέον, μελετήθηκε η άμεση συσχέτιση του *CMYC* με το *ERG* και όχι η έμμεση συσχέτιση του *CMYC* με το *TMPRSS2-ERG*, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη.

B. Μελέτη της παρουσίας των χμιαϊρικών γονιδίων σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη.

Έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες στις καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη (Benign Prostate Hyperplasia, BPH) οι περισσότερες εκ των οποίων αφορούν δείγμα του ίδιου αδένα, ο οποίος παράλληλα φέρει σε ένα τμήμα του καρκίνωμα του προστάτη (Prostate Cancer, CaP).

Η παρουσία του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, (Robert et al., 2012 και Clark et al., 2007), ανέρχεται σε ποσοστό 8.3% και 6% (108, 241). Ο αριθμός των δειγμάτων των δύο μελετών ήταν 48 και 31 δείγματα καλοηθών υπερπλασιών αντίστοιχα. Και στις δύο προαναφερόμενες μελέτες, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, ήταν η Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR. Υπάρχουν και μελέτες, όπως των Wang et al., 2006 και Rajput et al., 2007 που έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα ως προς την παρουσία του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* (107, 232) Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη του Wang μελετήθηκαν 28 δείγματα καλοηθών υπερπλασιών χρησιμοποιώντας τη μοριακή μέθοδο RT-PCR και στη μελέτη του Rajput ο αριθμός των μελετηθέντων δειγμάτων καλοηθών υπερπλασιών του προστάτη ήταν μόλις 5, τα οποία μελετήθηκαν με FISH. Ίσως, ο μικρός αριθμός δειγμάτων να ευθύνεται για τα αρνητικά αποτελέσματα των παραπάνω μελετών.

Στην παρούσα μελέτη, για τη διερεύνηση της παρουσίας του χμιαϊρικού γονιδίου στις καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τεχνικές. Το ποσοστό της παρουσίας του χμιαϊρικού γονιδίου είναι 18.42% με τη μέθοδο FISH, όπου μελετήθηκαν 38 συνολικά δείγματα καλοηθών υπερπλασιών και 3.45% με τη μέθοδο RT-PCR, όπου μελετήθηκαν 116 δείγματα καλοηθών υπερπλασιών, αντίστοιχα. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που γίνεται σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί αποκλειστικά μόνο με καλοήθη υπερπλασία του προστάτη.

Το υλικό των τομών των όγκων σε παραφίνη είναι δύσκολο να μελετηθεί, για αυτό το λόγο ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν με τη μέθοδο FISH ήταν μικρός. Όπως προαναφέρθηκε, τα δείγματα που μελετήθηκαν και με τις δύο τεχνικές, αφορούν ασθενείς οι οποίοι έχουν αποκλειστικά καλοήθη υπερπλασία του προστάτη.

Από τα δείγματα που μελετήθηκαν βρέθηκαν τέσσερα τα οποία ήταν αρνητικά με τη μέθοδο της RT-PCR και θετικά με το FISH. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε

και μετά από επαναλήψεις που έγιναν. Έχει παρατηρηθεί ότι ο καρκίνος του προστάτη είναι πολυεστιακός και ετερογενής, οπότε σε κάποιες περιοχές εμφανίζεται το χμιαρικό γονίδιο και σε κάποιες άλλες όχι (47, 108, 121, 212, 242). Από αυτές τις παρατηρήσεις πιθανολογείται ότι αυτό ίσως να ισχύει και στην περίπτωση των καλοηθών υπερπλασιών, δηλαδή μπορεί κανείς να θεωρήσει ότι και στις καλοήθειες συμβαίνει μία ανάλογη ετερογένεια. Επιπλέον, με τη μέθοδο του FISH η τομή που έχει γίνει στο ιστολογικό παρασκεύασμα διαπερνάει ολόκληρη την επιφάνεια του δείγματος, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα του «λάθους» λόγω ετερογένειας του δείγματος. Οπότε θα μπορούσε κάποιο δείγμα να είναι θετικό για τη παρουσία του χμιαρικού γονιδίου με τη μέθοδο FISH και αρνητικό με τη μέθοδο RT-PCR.

Η παρουσία του χμιαρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* είναι κοινή στα καρκινώματα του προστάτη. Επομένως η παρουσία του σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη θέτει μία σειρά από ερωτήματα. Το κυριότερο ερώτημα εστιάζεται στον πιθανό λειτουργικό ρόλο της παρουσίας του σε σχέση πάντα με την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη.

Στην προσπάθεια προσέγγισης αυτού του ερωτήματος, διερευνήθηκε σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη, η παρουσία και άλλων χμιαρικών γονιδίων, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων, που ενέχονται καρκινογένεση του προστάτη.

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* μελετήθηκαν ακόμα, σε καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη, τα παρακάτω χμιαρικά γονίδια: *SLC45A3-ELK4*, *TMPRSS2-ETV1* και *SLC45A3-ERG*, με τη μέθοδο της RT-PCR.

Τα δύο χμιαρικά γονίδια *TMPRSS2-ETV1* και *SLC45A3-ERG* μελετήθηκαν σε μικρότερο αριθμό δειγμάτων καλοηθών υπερπλασιών του προστάτη. Δεν βρέθηκε κανένα δείγμα θετικό για την παρουσία τους. Είναι γνωστό ότι αυτά τα χμιαρικά γονίδια είναι εξαιρετικά σπάνια σε καρκινώματα του προστάτη. Επόμενα είναι αναμενόμενο να είναι το ίδιο σπάνια ή να μην ανιχνεύονται ποτέ στις καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη.

Όπως έχει προαναφερθεί, το χμιαρικό mRNA *SLC45A3-ELK4* ανιχνεύεται σε υψηλότερο ποσοστό στα καρκινώματα σε σχέση με τις καλοήθειες υπερπλασίες του προστάτη. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται από το ποσοστό του χμιαρικού mRNA στην παρούσα μελέτη, το οποίο είναι 64.36% και μικρότερο σε σύγκριση με τα καρκινώματα του προστάτη όπου είναι 84.62%, όπως ήταν αναμενόμενο (235).

Για τη διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεων της παρουσίας του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* στις καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μιας σειράς γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με βλάβες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη των καρκινωμάτων του προστάτη. Συγκεκριμένα είναι τα εξής γονίδια: *ERG* (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog), *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2), *SNAIL* (snail homolog 1), *CMYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), *PIMI* (pim-1 oncogene), *AR* (androgen receptor), *FZD4* (frizzled family receptor 4), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *NKX3.1* (NK3 homeobox 1), *ADRB2* (adrenoceptor beta 2, surface), *CDH1* (cadherin 1, type 1, E-cadherin) και τέλος *SNCA* (synuclein, alpha).

Ο αριθμός δειγμάτων που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 14 μέχρι 19, εκτός από δύο περιπτώσεις, στη μελέτη της έκφρασης του *ERG* και του *CMYC*, όπου ο αριθμός δειγμάτων φθάνει στα 40 και 39, αντίστοιχα. Από αυτά τα θετικά για το χιμαιρικό γονίδιο δείγματα ήταν 8. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων οφείλεται στο ότι δεν υπήρχε αρκετό υλικό για επιπλέον μελέτη.

Στη σύγκριση των μέσων τιμών, η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά είναι αυτή που αφορά τη συσχέτιση των μέσων τιμών της έκφρασης του *CMYC* σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* ($p=0.005$), εύρημα το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες.

Η παρούσα μελέτη έδειξε αύξηση της έκφρασης του *CMYC* στα δείγματα που ήταν θετικά για την παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου. Ως προς την έκφραση του *ERG* σε σχέση με την παρουσία ή όχι του χιμαιρικού γονιδίου δεν σημειώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά, στην παρούσα μελέτη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο του Sun C et al., 2008, η παρουσία του χιμαιρικού γονιδίου οδηγεί σε υπερέκφραση του *ERG* και αυτό με τη σειρά του ρυθμίζει την έκφραση του ογκογονιδίου *CMYC* (216). Η μελέτη αυτή, όμως, έχει πραγματοποιηθεί σε καρκινώματα του προστάτη και όχι σε καλοήθεις υπερπλασίες του. Επίσης το υλικό που χρησιμοποιήθηκε αφορά δείγματα καρκινωμάτων του προστάτη που υποβλήθηκαν στην τεχνική του *microdissection* και επομένως το υλικό ήταν ομοιογενές. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν τομές από ολόκληρο τον όγκο και όχι μόνο από την εστιασμένη περιοχή που φέρει τις αλλοιώσεις και επόμενα είναι δυνατό η ετερογένεια του υλικού να μεταβάλει μία πιθανή συσχέτιση.

Η διερεύνηση των συσχετίσεων ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των δώδεκα γονιδίων που μελετήθηκαν, στηρίχθηκε στο γεγονός πως το σύνολό τους εντάσσεται σε μία σειρά κυτταρικών μονοπατιών, που εμπλέκονται σε σημαντικές ως προς την επαγωγή της καρκινογένεσης, κυτταρικές λειτουργίες. Η αλληλεπίδρασή τους πιθανολογεί και συσχέτιση της έκφρασής τους όσο αυτή μπορεί να προσεγγισθεί σε κλινικό υλικό, καθώς και τη μεταβολή αυτών των συσχετίσεων στην περίπτωση της παρουσίας του χμιαϊκού γονιδίου.

Ορισμένες από τις υφιστάμενες αλληλεπιδράσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και στις οποίες κεντρικό ρόλο έχει το *ERG*, είναι οι παρακάτω:

α) η λειτουργία του *ERG* επηρεάζει την έκφραση του *EZH2* και αυτό με τη σειρά του, την έκφραση και λειτουργία του *ADRB2*. Υπάρχει αλυσιδωτή επίδραση των λειτουργιών του ενός γονιδίου με το άλλο. Το *ADRB2* επηρεάζει το *CDH1* και αυτό το *SNCA*.

Το *ERG*, επίσης, επιδρά στους επιγενετικούς μηχανισμούς ρύθμισης (όπως η μεθυλίωση) μέσω του *EZH2* και αυτό διαδοχικά επηρεάζει αρνητικά την έκφραση του *NKX3.1*. Αυτό εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση του *TMPRSS2*, τμήμα του χμιαϊκού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.

β) το *ERG* ρυθμίζει επίσης, την έκφραση του *CMYC* και επάγει μέσω αυτού την ογκογένεση. Το *CMYC* με τη σειρά του συνεκφράζεται με το *PIM1*.

γ) το *ERG* επηρεάζει την έκφραση του *FZD4*, συγκεκριμένα συνεκφράζονται τα δύο αυτά γονίδια.

δ) το *ERG* επηρεάζει την έκφραση του *SNAIL*, το οποίο με τη σειρά του, αναστέλλει την έκφραση του *CDH1*.

Από την στατιστική ανάλυση που έγινε :

α) στα δείγματα που είναι θετικά για το χμιαϊκό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*, υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *ERG* και της έκφρασης των γονιδίων *EZH2* ($r=0.825$, $p=0.043$), *CMYC* ($r=0.732$, $p=0.039$) και *PIM1* ($r=0.862$, $p=0.006$). Στα αρνητικά για το χμιαϊκό γονίδιο, δείγματα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

β) Επίσης, βρέθηκε ότι η έκφραση του *EZH.2* έχει θετική συσχέτιση με την έκφραση των γονιδίων *PIM1* ($r=0.825$, $p=0.043$), *ADRB2* ($r=0.857$, $p=0.029$) και *SNCA* ($r=0.867$, $p=0.025$), στα θετικά για το χμιαϊκό γονίδιο δείγματα, ενώ στα αρνητικά δεν υπάρχει αυτή η συσχέτιση.

γ) Επιπλέον στα θετικά για το χμαιρικό γονίδιο δείγματα, η έκφραση του γονιδίου *CMYC* συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του γονιδίου *SNCA* ($r=0.899$, $p=0.002$).

Μελέτες έδειξαν την ογκογόνο δράση της πρωτεΐνης *ERG* μέσω κάποιων συγχωνεύσεων μεταξύ συγκεκριμένων γονιδίων, όπως *TMPRSS2-ERG*, *EWS-ERG* (*EWS*, Ewing sarcoma breakpoint region 1) και *FUS-ERG* (*FUS*, fused in sarcoma). Και τα τρία χμαιρικά γονίδια ρυθμίζουν σημαντικά την έκφραση του γονιδίου *PIMI* αυξάνοντάς τη. Το *PIMI* είναι ένα ογκογονίδιο που παράγει μία σερίνη/θρεονίνη κινάση πρωτεΐνη η οποία συχνά υπερεκφράζεται σε καρκίνους αιματολογικής και επιθηλιακής προέλευσης (243). Η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* επάγει την *PIMI* σε καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτη, ενισχύοντας τη σχέση μεταξύ της πρωτεΐνης και την αύξηση της έκφρασης του *PIMI* στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης στον προστάτη. Μια σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των δύο γονιδίων έχει παρατηρηθεί και σε καρκινώματα. Έρευνες έδειξαν ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* δένεται στον προωθητή του *PIMI*, υποθέτοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να είναι ένας άμεσος ρυθμιστής της έκφρασης του *PIMI*. Αυτή η δράση μπορεί να ευνοεί τη γονιδιωματική αστάθεια σε προκαρκινικό περιβάλλον. Οπότε υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του *ERG*, παρουσία του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* και της αύξησης της έκφρασης του *PIMI* (244, 245).

Επιπλέον η υπερέκφραση της παραγόμενης πρωτεΐνης του χμαιρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ποσότητας των «σπασμάτων» της διπλής έλικας σε κύτταρα του προστάτη, δημιουργώντας ένα θεωρητικά «επιρρεπή σε λάθη» φαινότυπο.

Προτείνεται, λοιπόν, η ύπαρξη ενός κυτταρικού περιβάλλοντος το οποίο ευνοεί γενετική αστάθεια που προκαλείται από τον άξονα *ERG*--->*PIMI*. Το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*, παρόλο που δεν μπορεί να παρέχει κάποιο πλεονέκτημα στην ανάπτυξη του κυττάρου, καθιστά τα επιθηλιακά κύτταρα επιρρεπή στην απόκτηση νέων μεταλλάξεων, οι οποίες θα επιλεγούν κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.

Επίσης, το *ERG* διαταράσσει τη σηματοδότηση του υποδοχέα ανδρογόνων (*AR*, Androgen Receptor) μέσω της αναστολής της έκφρασης του γονιδίου *AR*. Αυτό πετυχαίνεται με το δέσιμο της πρωτεΐνης *ERG* στην ειδική περιοχή του γονιδίου *AR*, προωθώντας την ανασταλτική δραστηριότητα του *AR* και προκαλώντας

κατασταλτικά επιγενετικά προγράμματα μέσω άμεσης ενεργοποίησης της H3K27 μεθυλτρανσφεράση EZH2, η οποία ανήκει σε μία οικογένεια polycomb πρωτεϊνών.

Το χμαιρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* έχει ένα κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου διαταράσσοντας την ειδική διαφοροποίηση του προστάτη και ισχυροποιώντας ένα πρόγραμμα αποδιαφοροποίησης με τη μεσολάβηση του γονιδίου *EZH2*.

Η πρωτεΐνη του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα, που μεσολαβούν στη δράση των στεροειδών ορμονών. Κυτταροπλασματικοί υποδοχείς ανδρογόνων, όταν δεσμεύονται από ανδρογόνα, μετατοπίζονται προς τον πυρήνα και δένονται στα στοιχεία παλινδρομικής απάντησης των ανδρογόνων (ARE, Androgen Response Elements), στα γονίδια στόχους (246). Η AR είναι κυρίαρχος για την ειδική διαφοροποίηση του προστάτη, επηρεάζοντας την έκφραση των ειδικών γονιδίων του προστάτη, όπως το *PSA* και *TMPRSS2*, και διατηρώντας τον φαινότυπο του διαφοροποιημένου επιθηλίου του προστάτη. Η υπερέκφραση του *EZH2* σε καρκινώματα του προστάτη προχωρημένων σταδίων, οδηγεί σε επιγενετική αποσιώπηση κάποιων ρυθμιστών ανάπτυξης και κάποιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Υπάρχει μία αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων *TMPRSS2-ERG*, *ERG* και *EZH2*. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση των ανδρογόνων οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του *ERG*. Ακολούθησε μία μείωση των επιπέδων των AR, αποδεικνύοντας την αρνητική σχέση μεταξύ τους. Οπότε, υπάρχει μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ των AR και *ERG*.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του *EZH2* αυξήθηκε με την υπερέκφραση του *ERG*, σε όγκους στον προστάτη. Επομένως, υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο *EZH2* και *ERG*. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν το μοντέλο ότι το *ERG* ενεργοποιεί το *EZH2*.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη ERG δένεται σε έναν αριθμό στόχων του *EZH2*, όπως τα *ADRB2*, (adrenoceptor beta 2, surface), *CDH1*, (cadherin 1, type 1, E-cadherin) *DAB2IP*, *SNCA*, (synuclein, alpha) και *SOCS*, (suppressor of cytokine signaling) (247). Ενώ το ERG ενεργοποιεί την έκφραση του *EZH2*, αυτό καταστέλλει έντονα την έκφραση των γονιδίων στόχων του *EZH2*, στηρίζοντας έτσι με την ενεργοποίηση του ERG, την επιγενετική αποσιώπηση μέσω του EZH2 στον καρκίνο του προστάτη. Επιπρόσθετα, η αποσιώπηση του *EZH2*, αποκατέστησε την έκφραση των γονιδίων

στόχων του *EZH2* όπως το *DAB2IP*, έλλειψη του οποίου εμπλέκεται στην διαδικασία της Epithelial to Mesenchymal Transition.

Συμπερασματικά, το *ERG* ίσως έχει μια πιο σφαιρική επίδραση διαταράσσοντας τη διαφοροποίηση του προστάτη μέσω ανδρογόνων και οδηγεί σε μια κυτταρική αποδιαφοροποίηση μέσω του *EZH2*. Το *ERG* μέσω της πρωτεΐνης του, είναι ένας άμεσος ενεργοποιητής του *EZH2* και το επίπεδο της έκφρασης του *EZH2* συνδέεται με την κατάσταση του *ERG* σε μια ομάδα όγκων του προστάτη. Το *TMPRSS2-ERG* παίζει ένα κεντρικό ρόλο σαν ένας «κακοήθης ρυθμιστικός διακόπτης» που «κλείνει» τη σηματοδότηση των ανδρογόνων, αναστέλλοντας τη φυσιολογική διαφοροποίηση του προστάτη και ενεργοποιώντας την έκφραση του *EZH2*, το οποίο οδηγεί σε ένα πρόγραμμα αποδιαφοροποίησης.

Τέλος, από πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια WNT και TGF-β/BMP είναι σημαντικά συνδεδεμένα με γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται σε θετικούς για την παρουσία του χμαιοειδούς γονιδίου *TMPRSS2-ERG* όγκους του προστάτη (239).

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σε οργανισμούς-μοντέλα δείχνουν ότι το χμαιοειδές γονίδιο *TMPRSS2-ERG* αποτελεί πρώιμο γεγονός και δεν είναι ικανό από μόνο του να προκαλέσει καρκινογένεση. Άρα θεωρείται πιθανό σε ορισμένες υπερπλασίες ένας αριθμός κυττάρων να εκφράζει αυτό το χμαιοειδές γονίδιο, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι οδηγεί σε κακοήθεια.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στην έκφραση που μπορεί να μην είναι στατιστικά αδιαμφισβήτητες λόγω του αριθμού των δειγμάτων, δείχνουν ότι η παρουσία του χμαιοειδούς γονιδίου μπορεί να έχει επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων, με πιο εμφανή από τα ευρήματα, την καταρχήν απορρύθμιση των φυσιολογικών επιγενετικών μηχανισμών.

Γ. Στη μελέτη της ανίχνευσης του *TMPRSS2-ERG* σε κυτταρικά ιζήματα ούρων και η χρήση του σαν μοριακός δείκτης.

Η χρήση του PSA (ειδικού προστατικού αντιγόνου) σαν δείκτη για τον καρκίνο για τον προστάτη είναι ευρέως διαδεδομένη (248). Το PSA είναι ειδικό για ιστούς προστατικής προελεύσεως αλλά όχι ειδικό για τον καρκίνο. Τα επίπεδα του PSA στο πλάσμα είναι συχνά αυξημένα και σε καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη και στην προστατίτιδα. Έτσι, η εξέταση του PSA είναι συνδεδεμένη με σημαντικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα, με μεγάλη αναλογία (>50%) των βιοψιών να είναι αρνητικές για καρκίνο. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα του PSA δεν αποκλείουν καρκίνο του προστάτη και ότι 15% των ανδρών με τιμή του PSA 0-4 mg/ml αναπτύσσουν καρκίνο του προστάτη (249). Έτσι, η ανάγκη για μία μη επεμβατική μέθοδο, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει τον καρκίνο του προστάτη στα αρχικά στάδια, είναι αναγκαία. Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι οι εξετάσεις που βασίζονται στο PSA, αγνοούν την ετερογένεια της ανάπτυξης του καρκίνου, καθώς και την ενγενή ετερογένεια στα κύτταρα του όγκου, οπότε ίσως ανιχνεύει μόνο ένα ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου (250).

Σαν δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί κάποια γονίδια που φέρουν γενετικές και επιγενετικές μεταβολές. Εξετάζονται τρία είδη γονιδίων. Το πρώτο είδος αποτελείται από γονίδια που υπερεκφράζονται ειδικά σε προστατικά καρκινικά κύτταρα. Τέτοια γονίδια είναι τα παρακάτω: *PCA3*, prostate cancer antigen 3, *AMACR*, alpha methyl-CoA, *SPINK1*, serine peptidase inhibitor kazal type 1 (201, 251, 252). Γονίδια ειδικά για τον καρκίνο του προστάτη που μεταβάλλονται, όπως τα χμαιρικά γονίδια που εμπλέκουν το γονίδιο *TMPRSS2*, transmembrane protease serine 2 και τα μέλη της οικογένειας ETS, E-twenty six transcription factors (95). Και τέλος, τέλος μεταλλαγές ειδικές για τον καρκίνο του προστάτη, όπως η μεθυλίωση των περιοχών που φέρουν τους προωθητές των γονιδίων, όπως *GSTP1*, Glutathione S-transferase P, *RASSFA1A*, Ras association domain family member 1 (253, 254).

Έχοντας σαν πλεονέκτημα το γεγονός ότι τα προστατικά κύτταρα μπορούν να ανιχνευτούν στο αίμα και στα ούρα, μετά από δαχτυλική εξέταση (digital rectal examination, DRE), οι ειδικοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη μπορούν να ελέγχονται μέσω διαγνωστικών εξετάσεων τόσο στο αίμα όσο και στα ούρα (255).

Ανάμεσα από αυτούς τους δείκτες που μελετήθηκαν είναι και τα χμιαρικά γονίδια που αποτελούνται από το γονίδιο *TMPRSS2* και κάποιο από τα μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ETS (*ERG*, *ETV1* και *ETV4*). Το *TMPRSS2-ERG* είναι το πιο συχνό από αυτά και συναντάται περίπου στο 85% των όγκων που φέρουν χμιαρικά γονίδια στα οποία εμπλέκεται κάποιο μέλος της οικογένειας των ETS παραγόντων (256, 257). Μία πιθανή συνέπεια της παρουσίας αυτού του χμιαρικού γονιδίου είναι η υπερέκφραση του *ERG*, καθιστώντας έτσι την έκφραση του *ERG* εν δυνάμει βιολογικό δείκτη στον καρκίνο του προστάτη.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά, αξιολογήθηκε ο δείκτης *TMPRSS2-ERG* με μονοπαραγοντική ανάλυση ($p=0.001$) και φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη παρουσία κακοηθείας στη βιοψία.

Ενώ η παρουσία του χμιαρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σχετίζεται θετικά με την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη, η υπερέκφραση του *ERG* στα δείγματα που μελετήθηκαν δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ένας λόγος για αυτή τη διαφορά είναι ότι στη μετρούμενη έκφραση του *ERG* συμβάλλουν και φυσιολογικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα από άλλους ιστούς (ουροδόχο κύστη, νεφροί), συγκαλύπτοντας έτσι τυχόν διαφορές που υπάρχουν. Η ετερογένεια του δείγματος και οι διαφορές στην ευαισθησία της μεθόδου συνέβαλαν και αυτές στις παρατηρούμενες διαφορές.

Ένα κύριο ζήτημα σε αυτή τη μελέτη είναι η δυνατότητα της χρήσης μη επεμβατικών αναλύσεων που βασίζονται στα ιζήματα των ούρων για τον έλεγχο του καρκίνου του προστάτη.

Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG* σε κυτταρικά ιζήματα ούρων μετά από DRE, σε 11 από τις 14 θετικές για τον καρκίνο του προστάτη περιπτώσεις στη βιοψία, ενώ 37 από τις 52 αρνητικές για τον καρκίνο του προστάτη περιπτώσεις στη βιοψία, ήταν αρνητικές και για το χμιαρικό γονίδιο *TMPRSS2-ERG*. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση που έγινε, ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη ήταν περισσότερο πιθανό να είναι θετικοί για το χμιαρικό γονίδιο, (AUC 0.749, $p=0.002$).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η ειδικότητα είναι 71% και η ευαισθησία της μεθόδου είναι 79%. Αυτά τα ευρήματα είναι σύμφωνα με αυτά που βρέθηκαν σε προηγούμενες μελέτες, οι οποίες και αυτές αξιολογούν την χρήση των ούρων για την ανίχνευση του χμιαρικού γονιδίου ως δείκτη ειδικό για τον καρκίνο του προστάτη (256-258).

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι με την ποιοτική ανάλυση με RT-PCR του χμαιοειδικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*, σε κυτταρικά ιζήματα ούρων ασθενών που προορίζονται για βιοψία, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τις εξετάσεις ρουτίνας όπως του PSA και του DRE, υπάρχει η δυνατότητα να υπολογισθεί η πιθανότητα ενός θετικού για κακοήθεια αποτελέσματος. Αυτό μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη επιλογή των ασθενών που κατευθύνονται για βιοψία και στην αποφυγή μη απαραίτητων βιοψιών. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ανάγκη για μελλοντικές μελέτες σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών, που θα μπορούσαν να οριστικοποιήσουν ή όχι, την εφαρμογή μίας απλής διαδικασίας για την αξιολόγηση και την επιλογή των ασθενών που θα υποβληθούν σε βιοψία [Dimitriadis et al., 2012, in press Anticancer Research.vol33,issue1,2013].

6. Συμπεράσματα

1. Η συχνότητα της παρουσίας του χμαιοικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα είναι στα επίπεδα του 50%, ενώ για τα υπόλοιπα χμαιοικά γονίδια τα ποσοστά φαίνεται να είναι πολύ μικρά. Τα ποσοστά αυτά είναι ανεξάρτητα με την μέθοδο ταυτοποίησης.
2. Δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του βαθμού ιστολογικής κακοήθειας (grade) της μεθόδου Gleason και της παρουσίας ή μη του χμαιοικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.
3. Η υπερέκφραση του γονιδίου *ERG* που παρατηρήθηκε στα θετικά για την παρουσία του χμαιοικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* καρκινώματα, είναι σύμφωνη με τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, που αναδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο του *ERG* στην εξέλιξη της νόσου.
4. Η ανίχνευση του χμαιοικού γονιδίου σε καλοήθεις υπερπλασίες και η διαφορά που εμφανίζουν στην έκφραση γονιδίων οι συγκεκριμένες υπερπλασίες δείχνει ότι πρώτον πιθανά ετερογένεια να υφίσταται και μεταξύ των υπερπλασιών και δεύτερον ένα μέρος των υπερπλασιών να εμφανίζουν ορισμένες γενετικές αλλοιώσεις που είναι κοινές με αυτές που παρατηρούνται σε μια ομάδα καρκινωμάτων του προστάτη. Πιθανόν να συνδέονται με την πορεία της καρκινογένεσης.
5. Η δυνατότητα ανίχνευσης του χμαιοικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε ιζήματα κυττάρων στα ούρα και η θετική συσχέτιση του με την παρουσία κακοήθειας στις βιοψίες δείχνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μη επεμβατικός διαγνωστικός δείκτης.

7. Περίληψη στην Ελληνική

Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος στους άνδρες είναι ο καρκίνος του προστάτη ακολουθούμενος από τον καρκίνο του πνεύμονα και αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες.

Ένα από τα ερωτήματα που αφορά όλες τις καλοήθεις νόσους του προστάτη είναι το κατά πόσο η παρουσία τους αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Η καλοήθης υπερπλασία (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH) και το καρκίνωμα του προστάτη (Prostate Cancer, CaP) είναι συνήθεις ουρολογικές νόσοι στους ηλικιωμένους και υπάρχουν αρκετά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη πως ως ένα βαθμό υπάρχει αιτιακή συσχέτιση μεταξύ της καλοήθους υπερπλασίας και του καρκίνου του προστάτη.

Όλες οι σχετικές μελέτες σε υλικό βιοψιών δείχνουν πως η καλοήθης υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη συνυπάρχουν αρκετά συχνά. Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν, επίσης, μία συσχέτιση ανάμεσα στα καρκινώματα και τις καλοήθεις υπερπλασίες του προστάτη, με τη μεγαλύτερη από αυτές να δείχνει πως υπάρχει μόνο μία μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκινωμάτων σε ασθενείς με καλοήθη υπερπλασία του προστάτη.

Ωστόσο παρά τις ομοιότητες και τα κοινά τους στοιχεία, υπάρχουν αρκετά ισχυρά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη ότι η καλοήθης υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη δεν σχετίζονται αιτιακά και ότι η παρουσία της υπερπλασίας του προστάτη δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον αδένα. Επίσης, οι υπάρχουσες γενετικές πληροφορίες που αφορούν τις καλοήθεις παθήσεις του προστάτη είναι πενιχρές παρά την αναφερόμενη σχέση τους με τα καρκινώματα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της παρουσίας και της συχνότητας ενός αριθμού χμαιορικών γονιδίων σε καρκινώματα προστάτη, της παρουσίας ή μη των αντίστοιχων χμαιορικών γονιδίων σε καλοήθεις υπερπλασίες, καθώς και της δυνατότητας χρήσης των χμαιορικών γονιδίων ως διαγνωστικών δεικτών στον καρκίνο του προστάτη.

Μελετήθηκαν συνολικά 116 δείγματα καλοηθών υπερπλασιών, 66 δείγματα καρκινωμάτων του προστάτη και 66 δείγματα ούρων με μοριακή ανάλυση, καθώς και σε 38 δείγματα καλοηθών υπερπλασιών και 12 δείγματα καρκινωμάτων του

προστάτη έγινε περαιτέρω ανίχνευση του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* με την τεχνική της φθορίζουσας in-situ υβριδοποίησης (FISH).

Η ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η συχνότητα της παρουσίας του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε καρκινώματα είναι στα επίπεδα του 50% ενώ για τα υπόλοιπα χμιαϊρικά γονίδια τα ποσοστά φαίνεται να είναι πολύ μικρά. Τα ποσοστά αυτά είναι ανεξάρτητα με την μέθοδο ταυτοποίησης και βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του βαθμού ιστολογικής κακοήθειας (grade) της μεθόδου Gleason και της παρουσίας ή μη του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG*.

Σημαντικό εύρημα ήταν πρώτον η ανίχνευση του χμιαϊρικού γονιδίου σε καλοήθεις υπερπλασίες και η διαφορά που εμφανίζουν στην έκφραση γονιδίων οι συγκεκριμένες υπερπλασίες, η οποία δείχνει ότι πιθανά η ετερογένεια να υφίσταται και μεταξύ των υπερπλασιών και δεύτερον ένα μέρος των υπερπλασιών να εμφανίζουν ορισμένες γενετικές αλλοιώσεις που είναι κοινές με αυτές που παρατηρούνται σε μια ομάδα καρκινωμάτων του προστάτη. Η ανίχνευση του χμιαϊρικού γονιδίου με FISH στις καλοήθεις υπερπλασίες και κυρίως η επιβεβαίωση της παρουσίας του είναι ένα εύρημα που δεν έχει μέχρι σήμερα δημοσιευτεί και ως εκ τούτου χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Ένα σπουδαίο εύρημα ήταν η δυνατότητα ανίχνευσης του χμιαϊρικού γονιδίου *TMPRSS2-ERG* σε ιζήματα κυττάρων στα ούρα και η θετική συσχέτιση του με την παρουσία κακοήθειας στις βιοψίες, όπου συμπεραίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μη επεμβατικός διαγνωστικός δείκτης.

8. Περίληψη στην Αγγλική

CYTOGENETICS AND MOLECULAR CYTOGENETICS STUDY OF PROSTATE NEOPLASMS

Velaeti Stamatia

Abstract

The most common cancer in men is prostate cancer followed by lung cancer, the second leading cause of death in men.

One of the prevalent questions concerning all benign diseases of the prostate is whether their presence increases the risk of prostate cancer. Benign prostatic hyperplasia (Benign Prostatic Hyperplasia, BPH) and prostate carcinoma (Prostate Cancer, CaP) are common urologic diseases in the elderly and there is enough evidence supporting the view that up to a degree there is co-relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

All relevant studies in biopsy material showing that benign prostatic hyperplasia and prostate cancer coexist quite often. Epidemiological studies also show a correlation between carcinomas and benign prostate hyperplasia, with most of them indicating that there is only a small increase in the risk of tumors in patients with benign prostatic hyperplasia.

However, despite the similarities and common elements, there is enough strong evidence supporting the view that benign hyperplasia and carcinoma of the prostate are not co-related and that the presence of prostatic hyperplasia does not increase the risk of cancer in the gland. Also, the existing genetic information concerning the benign diseases of the prostate is poor despite the indicated relationship to the cancer.

The purpose of this study is to investigate the presence and frequency of a number of fusion genes in prostate carcinomas, the presence or absence of the corresponding fusion genes in benign hyperplasia and the possibility of using fusion genes as diagnostic markers for prostate cancer.

116 samples of benign hyperplasia were studied, 66 carcinomas of the prostate samples and 66 urine samples with molecular analysis, and in 38 samples of benign

hyperplasia and 12 samples of prostate carcinomas was further detection of the fusion gene *TMPRSS2-ERG* with the technique of fluorescent in-situ hybridization (FISH).

The interpretation and evaluation of the results showed that the frequency of the presence of the fusion gene *TMPRSS2-ERG* in tumors is in the levels of 50% and the remaining fusion genes rates seem to be very small. These rates are independent of the method for identification and were in agreement with literature data.

There is no correlation between the degree of histological malignancy (grade) of the Gleason process and of the presence or absence of the fusion gene *TMPRSS2-ERG*.

An important finding was the detection of the fusion gene in benign hyperplasia and the difference exhibited in gene expression by specific hyperplasia, which indicates that possible heterogeneity exists in between hyperplasia, as well as the fact that part of hyperplasia exhibit some genetic alterations that are common to those observed in a group of carcinomas of the prostate. The detection of the fusion gene by FISH in benign hyperplasia and especially the confirmation of its presence is a finding that has not yet been published and therefore requires further investigation

An outstanding finding was the possibility of detection of the fusion gene *TMPRSS2-ERG* in sediment cells in urine and the positive correlation with the presence of malignancy in the biopsies, where it is concluded that it may be used as non-invasive diagnostic marker.

9. Βιβλιογραφία

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):789-99.
2. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74.
3. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):436-40.
4. Helleman J, van Staveren IL, Dinjens WN, van Kuijk PF, Ritstier K, Ewing PC, et al. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:201.
5. Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M, Zhang XP. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res*. 2006;34(15):4115-25.
6. Hoogervorst EM, van Steeg H, de Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutat Res*. 2005 Jul 1;574(1-2):3-21.
7. Timms BG. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation; research in biological diversity*. 2008 Jul;76(6):565-77.
8. Richard L Drake; Wayne Vogl; Adam W M Mitchell Gray's anatomy PECL, ©2005 ; 409-410.
9. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):199-215.
10. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):256-69.
11. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*. 2007 Sep-Oct;25(5):398-400.
12. Klein EA, Silverman R. Inflammation, infection, and prostate cancer. *Current opinion in urology*. 2008 May;18(3):315-9.
13. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 2):S6-11; discussion S-2.
14. DeWeese TL, Hruszkewycz AM, Marnett LJ. Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology*. 2001 Apr;57(4 Suppl 1):137-40.
15. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett*. 2009 Sep 18;282(2):125-36.
16. Minelli A, Bellezza I, Tucci A, Rambotti MG, Conte C, Culig Z. Differential involvement of reactive oxygen species and nucleoside transporters in cytotoxicity induced by two adenosine analogues in human prostate cancer cells. *Prostate*. 2009 Apr 1;69(5):538-47.
17. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003 Dec 22;62(6 Suppl 1):3-12.
18. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Dec 1;78(5):1292-300.
19. Feldman D, Skowronski RJ, Peehl DM. Vitamin D and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1995;375:53-63.

20. Feldman D, Krishnan A, Moreno J, Swami S, Peehl DM, Srinivas S. Vitamin D inhibition of the prostaglandin pathway as therapy for prostate cancer. *Nutr Rev*. 2007 Aug;65(8 Pt 2):S113-5.
21. Swami S, Krishnan AV, Feldman D. Vitamin D metabolism and action in the prostate: implications for health and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Dec 5;347(1-2):61-9.
22. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res*. 1994 Feb 1;54(3):805-10.
23. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Albertelli MA, et al. Dietary vitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology*. 2012 Jun;153(6):2576-87.
24. Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem*. 2003 Feb 1;88(2):363-71.
25. Cramer SD, Peehl DM, Edgar MG, Wong ST, Deftos LJ, Feldman D. Parathyroid hormone--related protein (PTHrP) is an epidermal growth factor-regulated secretory product of human prostatic epithelial cells. *Prostate*. 1996 Jul;29(1):20-9.
26. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):78-85.
27. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R103-21.
28. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*. 1993 Sep;150(3):797-802.
29. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Nov 2;86(21):1600-8.
30. Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004 Aug 15;129C(1):65-73.
31. Xu J, Sun J, Kader AK, Lindstrom S, Wiklund F, Hsu FC, et al. Estimation of absolute risk for prostate cancer using genetic markers and family history. *Prostate*. 2009 Oct 1;69(14):1565-72.
32. Wolk A. Diet, lifestyle and risk of prostate cancer. *Acta Oncol*. 2005;44(3):277-81.
33. Dagnelie PC, Schuurman AG, Goldbohm RA, Van den Brandt PA. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU Int*. 2004 May;93(8):1139-50.
34. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, et al. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Oct 6;85(19):1571-9.
35. Platz EA, Clinton SK, Giovannucci E. Association between plasma cholesterol and prostate cancer in the PSA era. *Int J Cancer*. 2008 Oct 1;123(7):1693-8.
36. Chan JM, Giovannucci EL. Dairy products, calcium, and vitamin D and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev*. 2001;23(1):87-92.
37. Kolonel LN. Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiol Rev*. 2001;23(1):72-81.

38. Hsing AW, Sakoda LC, Chua S, Jr. Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer. *Am J Clin Nutr.* 2007 Sep;86(3):s843-57.
39. Yoshizawa K, Willett WC, Morris SJ, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm EB, et al. Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Aug 19;90(16):1219-24.
40. Gu FL, Xia TL, Kong XT. Preliminary study of the frequency of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer in China. *Urology.* 1994 Nov;44(5):688-91.
41. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Feb 17;91(4):317-31.
42. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000 Oct 1;14(19):2410-34.
43. De Marzo AM, Coffey DS, Nelson WG. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 1999 Mar;53(3 Suppl 3a):29-39; discussion -42.
44. Grignon DJ. Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod Pathol.* 2004 Mar;17(3):316-27.
45. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology.* 2012 Jan;60(1):59-74.
46. Madu CO, Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer.* 2010;1:150-77.
47. Bostwick DG, Shan A, Qian J, Darson M, Maihle NJ, Jenkins RB, et al. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer.* 1998 Nov 1;83(9):1995-2002.
48. Qian J, Jenkins RB, Bostwick DG. Determination of gene and chromosome dosage in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology.* 1998 Oct;20(5):373-80.
49. Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology.* 1989 Dec;34(6 Suppl):16-22.
50. DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet.* 2003 Mar 15;361(9361):955-64.
51. Turner RD, Belt E. The results of 1,694 consecutive simple perineal prostatectomies. *J Urol.* 1957 Jun;77(6):853-63.
52. Sommers SC. Endocrine changes with prostatic carcinoma. *Cancer.* 1957 Mar-Apr;10(2):345-58.
53. Labess M. Occult carcinoma in clinically benign hypertrophy of the prostate; a pathological and clinical study. *J Urol.* 1952 Dec;68(6):893-6.
54. Bostwick DG, Cooner WH, Denis L, Jones GW, Scardino PT, Murphy GP. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer.* 1992 Jul 1;70(1 Suppl):291-301.
55. Ornstein DK, Rao GS, Smith DS, Andriole GL. The impact of systematic prostate biopsy on prostate cancer incidence in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia undergoing transurethral resection of the prostate. *J Urol.* 1997 Mar;157(3):880-3; discussion 3-4.
56. Sheldon CA, Williams RD, Fraley EE. Incidental carcinoma of the prostate: a review of the literature and critical reappraisal of classification. *J Urol.* 1980 Nov;124(5):626-31.
57. Holund B. Latent prostatic cancer in a consecutive autopsy series. *Scandinavian journal of urology and nephrology.* 1980;14(1):29-35.

58. Armenian HK, Lilienfeld AM, Diamond EL, Bross ID. Relation between benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. A prospective and retrospective study. *Lancet*. 1974 Jul 20;2(7873):115-7.
59. Chokkalingam AP, Nyren O, Johansson JE, Gridley G, McLaughlin JK, Adami HO, et al. Prostate carcinoma risk subsequent to diagnosis of benign prostatic hyperplasia: a population-based cohort study in Sweden. *Cancer*. 2003 Oct 15;98(8):1727-34.
60. Lee C. Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epithelial interaction. *The Prostate Supplement*. 1996;6:52-6.
61. McConnell JD, Bruskewitz R, Walsh P, Andriole G, Lieber M, Holtgrewe HL, et al. The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia. Finasteride Long-Term Efficacy and Safety Study Group. *N Engl J Med*. 1998 Feb 26;338(9):557-63.
62. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):215-24.
63. Shah US, Getzenberg RH. Fingerprinting the diseased prostate: associations between BPH and prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2004 Jan 1;91(1):161-9.
64. Schenk JM, Kristal AR, Neuhaus ML, Tangen CM, White E, Lin DW, et al. Biomarkers of systemic inflammation and risk of incident, symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol*. 2010 Mar 1;171(5):571-82.
65. Foster CS. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate Supplement*. 2000;9:4-14.
66. Schroder FH, Blom JH. Natural history of benign prostatic hyperplasia (BPH). *The Prostate Supplement*. 1989;2:17-22.
67. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*. 1988 Dec;12(12):897-906.
68. Schenk JM, Kristal AR, Arnold KB, Tangen CM, Neuhaus ML, Lin DW, et al. Association of symptomatic benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol*. 2011 Jun 15;173(12):1419-28.
69. Haverkamp J, Charbonneau B, Ratliff TL. Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: a current review. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 1;103(5):1344-53.
70. Bardia A, Platz EA, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Nelson WG. Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Current opinion in pharmacology*. 2009 Aug;9(4):419-26.
71. Blum DL, Koyama T, M'Koma AE, Iturregui JM, Martinez-Ferrer M, Uwamariya C, et al. Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 1;14(23):7790-7.
72. Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, Dick JD, De Marzo AM, Isaacs WB. A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. *Prostate*. 2008 Feb 15;68(3):306-20.
73. Schaid DJ, Guenther JC, Christensen GB, Hebring S, Rosenow C, Hilker CA, et al. Comparison of microsatellites versus single-nucleotide polymorphisms in a genome linkage screen for prostate cancer-susceptibility Loci. *Am J Hum Genet*. 2004 Dec;75(6):948-65.

74. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*. 2005 Jul;26(7):1170-81.
75. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):652-8.
76. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 19;103(38):14068-73.
77. Goh CL, Schumacher FR, Easton D, Muir K, Henderson B, Kote-Jarai Z, et al. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. *J Intern Med*. 2012 Apr;271(4):353-65.
78. Chung CC, Magalhaes WC, Gonzalez-Bosquet J, Chanock SJ. Genome-wide association studies in cancer--current and future directions. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):111-20.
79. Varghese JS, Easton DF. Genome-wide association studies in common cancers--what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev*. 2010 Jun;20(3):201-9.
80. Kote-Jarai Z, Olama AA, Giles GG, Severi G, Schleutker J, Weischer M, et al. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet*. 2011 Aug;43(8):785-91.
81. Gudmundsson J, Sulem P, Rafnar T, Bergthorsson JT, Manolescu A, Gudbjartsson D, et al. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):281-3.
82. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Giles GG, Guy M, Severi G, et al. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1116-21.
83. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat Genet*. 2010 Sep;42(9):751-4.
84. Duggan D, Zheng SL, Knowlton M, Benitez D, Dimitrov L, Wiklund F, et al. Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Dec 19;99(24):1836-44.
85. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):316-21.
86. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):310-5.
87. Lin DW, FitzGerald LM, Fu R, Kwon EM, Zheng SL, Kolb S, et al. Genetic variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF genes are prognostic markers of prostate cancer-specific mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Sep;20(9):1928-36.
88. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006 Aug;16(8):949-61.
89. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*. 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R57-66.

90. Aplan PD. Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends in genetics* : TIG. 2006 Jan;22(1):46-55.
91. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009 Dec 11;139(6):1069-83.
92. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jul;8(7):497-511.
93. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 20;29(27):3659-68.
94. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):187-98.
95. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):644-8.
96. Pflueger D, Terry S, Sboner A, Habegger L, Esgueva R, Lin PC, et al. Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res*. 2011 Jan;21(1):56-67.
97. Makkonen H, Kauhanen M, Paakinaho V, Jaaskelainen T, Palvimo JJ. Long-range activation of FKBP51 transcription by the androgen receptor via distal intronic enhancers. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jul;37(12):4135-48.
98. Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10242-6.
99. Mosquera JM, Perner S, Demichelis F, Kim R, Hofer MD, Mertz KD, et al. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J Pathol*. 2007 May;212(1):91-101.
100. Hu Y, Dobi A, Sreenath T, Cook C, Tadase AY, Ravindranath L, et al. Delineation of TMPRSS2-ERG splice variants in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4719-25.
101. Rouzier C, Haudebourg J, Carpentier X, Valerio L, Amiel J, Michiels JF, et al. Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 May;183(1):21-7.
102. Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3395-400.
103. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol*. 2007 May;20(5):538-44.
104. Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, et al. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):4233-8.
105. Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):48627-30.
106. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8337-41.

107. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8347-51.
108. Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene.* 2007 Apr 19;26(18):2667-73.
109. Clark J, Attard G, Jhavar S, Flohr P, Reid A, De-Bono J, et al. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene.* 2008 Mar 27;27(14):1993-2003.
110. Mosquera JM, Perner S, Genega EM, Sanda M, Hofer MD, Mertz KD, et al. Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 1;14(11):3380-5.
111. Albadine R, Latour M, Toubaji A, Haffner M, Isaacs WB, E AP, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2009 Nov;22(11):1415-22.
112. Bergerheim US, Collins VP, Ekman P, Kunimi K. Recessive genetic mechanisms in the oncogenesis of prostatic carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology Supplementum.* 1991;138:93-6.
113. Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJ, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1993 Sep 1;53(17):3869-73.
114. Trapman J, Sleddens HF, van der Weiden MM, Dinjens WN, Konig JJ, Schroder FH, et al. Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1994 Dec 1;54(23):6061-4.
115. Bergerheim US, Kunimi K, Collins VP, Ekman P. Deletion mapping of chromosomes 8, 10, and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991 May;3(3):215-20.
116. Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):3091-102.
117. Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):2959-62.
118. Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, et al. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res.* 1996 May 15;56(10):2411-6.
119. Swalwell JI, Vocke CD, Yang Y, Walker JR, Grouse L, Myers SH, et al. Determination of a minimal deletion interval on chromosome band 8p21 in sporadic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Feb;33(2):201-5.
120. Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, et al. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):10683-90.
121. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010 Sep 15;24(18):1967-2000.

122. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* 2000 Nov 1;60(21):6111-5.
123. Asatiani E, Huang WX, Wang A, Rodriguez Ortner E, Cavalli LR, Haddad BR, et al. Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1164-73.
124. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell.* 2008 May 2;133(3):403-14.
125. Wang SI, Parsons R, Ittmann M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 1998 Mar;4(3):811-5.
126. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5246-50.
127. Bertram J, Peacock JW, Fazli L, Mui AL, Chung SW, Cox ME, et al. Loss of PTEN is associated with progression to androgen independence. *Prostate.* 2006 Jun 15;66(9):895-902.
128. Dong B, Kim S, Hong S, Das Gupta J, Malathi K, Klein EA, et al. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30;104(5):1655-60.
129. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4291-6.
130. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science.* 1988 Apr 15;240(4850):324-6.
131. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews.* 2004 Apr;25(2):276-308.
132. Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Sep 15;91(18):1574-80.
133. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1997 Feb 1;57(3):524-31.
134. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrison J, Severi G, et al. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1058-60.
135. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012 Jun;44(6):685-9.
136. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):624-9.
137. Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM, Vessella RL, Visakorpi T. The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Jul;45(7):639-45.
138. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7(6):531-6.

139. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1815-26.
140. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1747-52.
141. Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol.* 2003 Mar;169(3):1138-42.
142. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
143. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
144. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.
145. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6162-70.
146. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1788-93.
147. Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-related cancer.* 2010 Mar;17(1):F1-17.
148. Shi XB, Tepper CG, White RW. MicroRNAs and prostate cancer. *J Cell Mol Med.* 2008 Sep-Oct;12(5A):1456-65.
149. De Vere White RW, Vinall RL, Tepper CG, Shi XB. MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. *Urol Oncol.* 2009 May-Jun;27(3):307-11.
150. Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 11;104(50):19983-8.
151. Sun T, Wang Q, Balk S, Brown M, Lee GS, Kantoff P. The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3356-63.
152. Sun T, Yang M, Kantoff P, Lee GS. Role of microRNA-221/-222 in cancer development and progression. *Cell Cycle.* 2009 Aug;8(15):2315-6.
153. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature.* 2010 Jun 24;465(7301):1033-8.
154. Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 2005 May 4;293(17):2095-101.
155. Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, DiPaola RS, et al. Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA.* 2009 Sep 16;302(11):1202-9.
156. Eggener SE, Scardino PT, Carroll PR, Zelefsky MJ, Sartor O, Hricak H, et al. Focal therapy for localized prostate cancer: a critical appraisal of rationale and modalities. *J Urol.* 2007 Dec;178(6):2260-7.

157. Sartor AO, Hricak H, Wheeler TM, Coleman J, Penson DF, Carroll PR, et al. Evaluating localized prostate cancer and identifying candidates for focal therapy. *Urology*. 2008 Dec;72(6 Suppl):S12-24.
158. True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, et al. A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 18;103(29):10991-6.
159. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):21-8.
160. Basler JW, Thompson IM. Lest we abandon digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Dec 2;90(23):1761-3.
161. Mahon SM. Screening for prostate cancer: informing men about their options. *Clinical journal of oncology nursing*. 2005 Oct;9(5):625-7.
162. Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int*. 2008 Jan;101(1):5-10.
163. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril*. 1973 Feb;24(2):134-44.
164. Sensabaugh GF, Golden VL. Phenotype dependence in the inhibition of red cell acid phosphatase (ACP) by folates. *Am J Hum Genet*. 1978 Sep;30(5):553-60.
165. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative urology*. 1979 Sep;17(2):159-63.
166. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987 Oct 8;317(15):909-16.
167. Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol*. 1994 Nov;152(5 Pt 1):1358-68.
168. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol*. 1999 Aug;162(2):293-306.
169. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):268-78.
170. Mettlin C, Lee F, Drago J, Murphy GP. The American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. Findings on the detection of early prostate cancer in 2425 men. *Cancer*. 1991 Jun 15;67(12):2949-58.
171. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA*. 1993 Aug 25;270(8):948-54.
172. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology*. 1993 Oct;42(4):365-74.
173. Eklund CM, Tammela TL, Schleutker J, Hurme M. C-reactive protein haplotype is associated with high PSA as a marker of metastatic prostate cancer but not with overall cancer risk. *Br J Cancer*. 2009 Jun 16;100(12):1846-51.
174. Kulkarni D, Miller GA. Multiple primary neoplasms developing in a case of prostate cancer. *The Ulster medical journal*. 2003 May;72(1):55-7.
175. Kuefer R, Varambally S, Zhou M, Lucas PC, Loeffler M, Wolter H, et al. alpha-Methylacyl-CoA racemase: expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):841-8.

176. Zha S, Ferdinandusse S, Denis S, Wanders RJ, Ewing CM, Luo J, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase as an androgen-independent growth modifier in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21):7365-76.
177. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Iczkowski KA, Chu PG, Tretiakova MS, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology.* 2004 Sep;45(3):218-25.
178. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002 Apr 3;287(13):1662-70.
179. Jiang Z, Woda BA, Yang XJ. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a marker for prostate cancer. *JAMA.* 2002 Jun 19;287(23):3080-1; author reply 1.
180. Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, et al. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1501-3.
181. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3943-53.
182. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 1995;30(6):445-600.
183. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11733-7.
184. Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2727-30.
185. Chu DC, Chuang CK, Fu JB, Huang HS, Tseng CP, Sun CF. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction to detect hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking the GSTP1 gene to diagnose prostate carcinoma. *J Urol.* 2002 Apr;167(4):1854-8.
186. Riegman PH, Vlietstra RJ, Klaassen P, van der Korput JA, Geurts van Kessel A, Romijn JC, et al. The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19. *FEBS Lett.* 1989 Apr 10;247(1):123-6.
187. Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, et al. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Res.* 2001 Aug 15;61(16):6029-33.
188. Ramirez ML, Nelson EC, Evans CP. Beyond prostate-specific antigen: alternate serum markers. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008;11(3):216-29.
189. Beckett ML, Cazares LH, Vlahou A, Schellhammer PF, Wright GL, Jr. Prostate-specific membrane antigen levels in sera from healthy men and patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4034-40.
190. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene.* 2000 Mar 2;19(10):1288-96.

191. Han KR, Seligson DB, Liu X, Horvath S, Shintaku PI, Thomas GV, et al. Prostate stem cell antigen expression is associated with gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer. *J Urol*. 2004 Mar;171(3):1117-21.
192. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, et al. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1735-40.
193. Isshiki S, Akakura K, Komiya A, Suzuki H, Kamiya N, Ito H. Chromogranin a concentration as a serum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer. *J Urol*. 2002 Feb;167(2 Pt 1):512-5.
194. Uetsuki H, Tsunemori H, Taoka R, Haba R, Ishikawa M, Kakehi Y. Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. *J Urol*. 2005 Aug;174(2):514-8.
195. Paul B, Dhir R, Landsittel D, Hitchens MR, Getzenberg RH. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4097-100.
196. Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Inman BA, et al. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7893-900.
197. Chavin G, Sheinin Y, Crispen PL, Boorjian SA, Roth TJ, Rangel L, et al. Expression of immunosuppressive B7-H3 ligand by hormone-treated prostate cancer tumors and metastases. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):2174-80.
198. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19458-63.
199. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. 2009 Feb 12;457(7231):910-4.
200. Thompson TC, Tahir SA, Li L, Watanabe M, Naruishi K, Yang G, et al. The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010 Mar;13(1):6-11.
201. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5975-9.
202. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2695-8.
203. Kirby RS, Fitzpatrick JM, Irani J. Prostate cancer diagnosis in the new millennium: strengths and weaknesses of prostate-specific antigen and the discovery and clinical evaluation of prostate cancer gene 3 (PCA3). *BJU Int*. 2009 Feb;103(4):441-5.
204. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*. 2006 Nov 15;107(2):102-8.
205. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009 May 19;100(10):1603-7.
206. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, et al. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med*. 2009;7:4.

207. Osoegawa K, de Jong PJ, Frengen E, Ioannou PA. Construction of bacterial artificial chromosome (BAC/PAC) libraries. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]*. 2001 May;Chapter 5:Unit 5 15.
208. Osoegawa K, Woon PY, Zhao B, Frengen E, Tateno M, Catanese JJ, et al. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics*. 1998 Aug 15;52(1):1-8.
209. Frengen E, Weichenhan D, Zhao B, Osoegawa K, van Geel M, de Jong PJ. A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*. 1999 Jun 15;58(3):250-3.
210. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3396-400.
211. Yoshimoto M, Joshua AM, Chilton-Macneill S, Bayani J, Selvarajah S, Evans AJ, et al. Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement. *Neoplasia*. 2006 Jun;8(6):465-9.
212. Mehra R, Han B, Tomlins SA, Wang L, Menon A, Wasco MJ, et al. Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):7991-5.
213. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, Cao X, Wang L, Menon A, et al. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3584-90.
214. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jun;31(6):882-8.
215. Pettersson C, Johansson B, Pandis N, Gorunova L, Ingvar C, Idvall I, et al. Clonal chromosome-aberrations in fibrocystic breast disease-associated with increased risk of cancer. *Int J Oncol*. 1994 Dec;5(6):1207-10.
216. Sun C, Dobi A, Mohamed A, Li H, Thangapazham RL, Furusato B, et al. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene*. 2008 Sep 11;27(40):5348-53.
217. Mertz KD, Setlur SR, Dhanasekaran SM, Demichelis F, Perner S, Tomlins S, et al. Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. *Neoplasia*. 2007 Mar;9(3):200-6.
218. Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, Soller W, Lundgren R, Panagopoulos I. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Jul;45(7):717-9.
219. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, Costa V, Henrique R, Jeronimo C, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*. 2006 Oct;8(10):826-32.
220. Tu JJ, Rohan S, Kao J, Kitabayashi N, Mathew S, Chen YT. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol*. 2007 Sep;20(9):921-8.

221. Attard G, Clark J, Ambroisine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Jan 10;27(3):253-63.
222. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*. 2007 Jul 5;26(31):4596-9.
223. Setlur SR, Mertz KD, Hoshida Y, Demichelis F, Lupien M, Perner S, et al. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Jun 4;100(11):815-25.
224. Nam RK, Sugar L, Wang Z, Yang W, Kitching R, Klotz LH, et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jan;6(1):40-5.
225. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. 2008 Feb;10(2):177-88.
226. Han B, Mehra R, Dhanasekaran SM, Yu J, Menon A, Lonigro RJ, et al. A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Sep 15;68(18):7629-37.
227. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Ludkovski O, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2008 Dec;21(12):1451-60.
228. FitzGerald LM, Agalliu I, Johnson K, Miller MA, Kwon EM, Hurtado-Coll A, et al. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:230.
229. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, Li C, Kaygusuz G, van de Rijn M, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol*. 2007 Apr;20(4):467-73.
230. Lu Q, Nunez E, Lin C, Christensen K, Downs T, Carson DA, et al. A sensitive array-based assay for identifying multiple TMPRSS2:ERG fusion gene variants. *Nucleic Acids Res*. 2008 Nov;36(20):e130.
231. Sterbis JR, Gao C, Furusato B, Chen Y, Shaheduzzaman S, Ravindranath L, et al. Higher expression of the androgen-regulated gene PSA/HK3 mRNA in prostate cancer tissues predicts biochemical recurrence-free survival. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):758-63.
232. Rajput AB, Miller MA, De Luca A, Boyd N, Leung S, Hurtado-Coll A, et al. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *Journal of clinical pathology*. 2007 Nov;60(11):1238-43.
233. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):595-9.
234. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):73-80.
235. Rickman DS, Pflueger D, Moss B, VanDoren VE, Chen CX, de la Taille A, et al. SLC45A3-ELK4 is a novel and frequent erythroblast transformation-specific fusion transcript in prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2734-8.

236. Makkonen H, Jaaskelainen T, Pitkanen-Arsiola T, Rytinki M, Waltering KK, Matto M, et al. Identification of ETS-like transcription factor 4 as a novel androgen receptor target in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2008 Aug 21;27(36):4865-76.
237. Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(17):5103-8.
238. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. 2009 Mar 5;458(7234):97-101.
239. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Falth M, Metzger J, Kacprzyk LA, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC Cancer*. 2011;11:507.
240. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furusato B, Sun C, Chen Y, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*. 2005 May 26;24(23):3847-52.
241. Robert G, Jannink S, Smit F, Aalders T, Hessels D, Cremers R, et al. Rational basis for the combination of PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion for prostate cancer diagnosis. *Prostate*. 2012 Jun 5.
242. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology*. 1994 Jan;43(1):60-6; discussion 6-7.
243. Nawijn MC, Alendar A, Berns A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan;11(1):23-34.
244. Kunderfranco P, Mello-Grand M, Cangemi R, Pellini S, Mensah A, Albertini V, et al. ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One*. 2010;5(5):e10547.
245. Magistroni V, Mologni L, Sanselicio S, Reid JF, Redaelli S, Piazza R, et al. ERG deregulation induces PIM1 over-expression and aneuploidy in prostate epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6(11):e28162.
246. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine reviews*. 2007 Dec;28(7):778-808.
247. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, et al. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*. 2008 Dec 11;27(58):7274-84.
248. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991 Apr 25;324(17):1156-61.
249. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004 May 27;350(22):2239-46.
250. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol*. 2011 May 19.
251. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, Varambally S, Mehra R, Perner S, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):519-28.

252. Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 2002 Apr 15;62(8):2220-6.
253. Li LC, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jan 19;97(2):103-15.
254. Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. Epigenetic alterations in human prostate cancers. *Endocrinology.* 2009 Sep;150(9):3991-4002.
255. Fujita K, Pavlovich CP, Netto GJ, Konishi Y, Isaacs WB, Ali S, et al. Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology. *Hum Pathol.* 2009 Jul;40(7):924-33.
256. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, Bueti G, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4706-11.
257. Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med.* 2011 Aug 3;3(94):94ra72.
258. Cao DL, Ye DW, Zhang HL, Zhu Y, Wang YX, Yao XD. A multiplex model of combining gene-based, protein-based, and metabolite-based with positive and negative markers in urine for the early diagnosis of prostate cancer. *Prostate.* 2011 May 15;71(7):700-10.