МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински Факултет
Катедра по Медицинска Химия и Биохимия
Център по Молекулна Медицина

ДАРИНА ЛЮДМИЛОВА КАЧАКОВА

МОЛЕКУЛНО ПРОФИЛИРАНЕ ПРИ РАКА НА ПРОСТАТАТА

ДИСЕРТАЦИЯ

За
присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Научна специалност: „Молекулярна генетика”
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
Чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн,
Доц. д-р Радка Кънева, дб

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:
Гл. ас. д-р Атанаска Миткова, дб

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 325 страници,
176 фигури, 143 таблици.

Цитирани са 795 литературни източника и 20 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедра Медицинска Химия и Биохимия към Медицински факултет на Медицински университет – София съгласно правилника за условията и реда на придобиване на придобиване на научни степени в МУ - София на 05.03.2015.

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на 01.06.2015.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам благодарности на чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев за предоставената ми възможност за изработване на дисертацията. Бих искала да изкажа искрени благодарности и на научния ми ръководител доц. д-р Радка Кънева и на научния ми консултант гл. ас. д-р Атанаска Миткова. Благодаря им за търпението, всеотдайността, за напътствията и за получените знания и умения. Благодарна съм им за доверието, вярата в мен, искреността, съветите и помощта, които получих. Те бяха съпричастни и изживяваха с мен както радостите, така и тревогите.

Също така искам да благодаря на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които ме насърчаваха в трудните моменти, даваха ми съвети и ми помагаха.

Благодарна съм на нашите колаборатори в Клиниката по Урология и в Клиниката по Обща и клинична патология към Университетска болница „Александровска“, МУ-София, без които изработването на дисертацията не би било възможно.

Благодарна съм и на семейството ми, на съпруга ми, които ме подкрепяха през цялото време.

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

гДНК – геномна дезоксирибонуклеинова киселина (DNA)
ДНК- дезоксирибонуклеинова киселина (DNA)
ДПХ – доброкачествена простатна хиперплазия
ДХТ- дихидротестостерон
иРНК – информационна РНК (mRNA)
кДНК – копи ДНК (cDNA)
МАМ - млади асимптоматични мъже
микроРНК/ микроРНК-и - miRNA/miRNAs
мКРРП – метастатичен кастрационно резистентен рак на простатата
РНК – рибонуклеинова киселина (RNA)
РП - рак на простатата

Съкращения на латиница

aCGH – array Comparative Genomic Hybridization – сравнителна геномна хибридизация
bp – базови двойки
ddNTPs - дидезоксинуклеотид трифосфати
DMSO – диметилсулфоксид
dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат
DRE- дигитален ректален преглед
FDR – false discovery rate
GWAS - Genome Wide Association Studies (Големи геномни асоциативни проучвания)
HRMA – High resolution melting analysis – анализ чрез високорезолютивно топене на ДНК
kb – килобази
MS-HRMA – метил специфичен анализ чрез високо резолютивно топене на ДНК
PCA – principle component analysis – анализ на основните компоненти
PCR – Polymerase Chain Reaction – Полимеразна Верижна Реакция
PRACTICAL – Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer Associated Alterations in the Genome
PSA – простатно специфичен антиген
RT-PCR – Reverse Transcription PCR
ROC curve analysis– receiver operating characteristics curve – анализ на ROC кривите
SNP/SNPs – single nucleotide polymorphism/polymorphisms (еднонуклеотиден полиморфизъм/ еднонуклеотидни полиморфизми)
TE буфер – Tris – EDTA буфер
UV – ултравиолетова светлина

Списък на нуклеотидтрифосфатите

Дезоксинуклетидтрифосфат	**Съкращение**
дезоксиаденозинтрифосгат	дАТФ (A)
дезоксигуанинтрифосфат	дГТФ (G)
дезокситимидинтрифосфат	дТТФ (T)
дезоксицитозинтрифосфат	дЦТФ (C)

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ....1

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР....3
1.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ....3
1.2. АНАТОМИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ....4
1.3. ДИАГНОЗА....6
1.4. КЛАСИФИКАЦИЯ....7
1.5. РИСКОВИ ФАКТОРИ....8
1.5.1. Генетични рискови фактори - герминативни и соматични генетични и геномни промени при рака на простатата....8
1.5.1.1. Хромозомни локуси и гени, открити при анализите на скаченост....8
1.5.1.2. Генетични варианти открити в големи геномни асоциативни проучвания (GWAS)....9
1.5.1.3. Редки варианти в средно пенетрантни гени....13
1.5.1.4. Други гени показали асоциация с РП в проучвания от типа случаи-контроли....15
1.5.1.5. Соматични мутации при РП....17
1.5.1.6. Вариации в броя копия - чести геномни високо хетерогенни промени при РП. Хромотрипсис20
1.6. БИОМАРКЕРИ ПРИ РП....23
1.6.1. Имунохистохимични и експресионни биомаркери....23
1.6.2. Епигенетичните промени като биомаркери при РП....24
1.6.3. Клинично подобрени лабораторно разработени тестове при РП....31
1.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ....33

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ....35
2.1. ЦЕЛ....35
2.2. ЗАДАЧИ....35

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ....36
3.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ....36
3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ....42
3.3. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИТЕ МАТЕРИАЛИ....45
3.3.1. Обработка на серумите и плазмите....45
3.3.2. Обработка на пробите урина....45
3.3.3. Обработка на тъканите....45
3.3.4. Изолиране на ДНК....46
3.3.4.1. Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез полуавтоматизирана система Chemagic Magnetic Separtion Module I (Chemagen)....46
3.3.4.2. Изолиране на ДНК от урина....47
3.3.5. Изолиране на РНК....49
3.3.5.1. Изолиране на РНК от урина....49
3.3.5.1.1. Изолиране с помощта на ZR Urine RNA Isolation kit....49
3.3.5.1.2. Изолиране с помощта на Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit....50

3.3.5.2. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК-и от плазма 51
3.3.5.3. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК от тъкан 53
3.3.5.3.1. Изолиране РНК от радикални простатектомии с помощта на miRneasy Mini kit (Qiagen) 53
3.3.5.3.2. Изолиране на РНК от биопсии на контроли с ДПХ с помощта на miRNeasy Micro kit 53
3.3.6. Оценка на качеството и концентрацията на изолираната ДНК/РНК 53
3.3.6.1. Измерване на концентрацията и определяне на качеството на изолираната ДНК/РНК чрез спектрофотометричен метод 53
3.3.6.2. Измерване на концентрацията на изолираната ДНК/РНК с флуориметричен метод с помощта на Qubit (Life Technologies) 55
3.3.6.3. Определяне на концентрацията и RIN^e на изолираната РНК от тъкан чрез Agilent 2200 TapeStation Systems 56
3.3.6.4. Определяне на качеството на изолираната ДНК посредством агарозна гел електрофореза 57
3.3.7. Бисулфитно третиране на ДНК изолирана от урина 58
3.3.8. MSss I модифициране за изготвяне на 100% метилирани контроли необходими за анализа на промоторното хиперметилиране 60
3.3.9. Обратна транскрипция на изолираната РНК за синтез на кДНК 60
3.3.9.1. Обратна транксрипция на РНК изолирана от урина за синтез на кДНК 60
3.3.9.1.1. Работа с High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) 60
3.3.9.1.2. Работа със Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR 61
3.3.9.2. Обратна транскрипция на изолирана от плазма РНК, съдържаща и микроРНК-и за синтез на кДНК 62
3.4. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА 64
3.4.1. Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR) 64
3.4.2. Качествен контрол на полимеразната верижна реакция 68
3.4.3. Генотипиране на еднонуклеотидни полиморфизми (Single Nucleotide Polymorhisms – SNP) чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR) 70
3.4.4. Изследване на (CAG)n микросателитен полиморфизъм в AR гена чрез фрагментен анализ и капилярна електрофореза 74
3.4.5. Анализ на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* чрез топене с висока резолюция на ДНК (High Resolution Melting Analysis- HRMA) 76
3.4.6. Анализ на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* чрез MethyLight анализ 79
3.4.7. Експресионен анализ на *PCA3* (*DD3*), *PSA* (*KLK3*), *GSTP1, AMACR* и *GOLPH2* (*GOLM1*) в урина на пациенти и контроли чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR) 82
3.4.8. Експресионен анализ на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 в плазма на пациенти и контроли 84
3.4.9. микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове на туморна и нормална простатна тъкан 87
3.4.10. Директно секвениране (Секвениране по Sanger) 90
3.5. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ 93
3.5.1. Изчисляване на алелните и генотипни честоти. Изчисляване на хетерозиготност. Закон на Харди-Вайнберг 93

3.5.1.1. Изчисляване на алелните и генотипни честоти ... 93
3.5.1.2. Изчисляване на хетерозиготност ... 93
3.5.1.3. Закон на Харди-Вайнберг ... 93
3.5.2. Неравновесна скаченост ... 94
3.5.3. Статистическа проверка на хипотеза ... 95
3.5.3.1. Нулева хипотеза ... 95
3.5.3.2. Метод χ^2 ... 96
3.5.3.3. Тест на Фишер (Fishers's test) ... 97
3.5.3.4. Student's T тест анализ ... 98
3.5.4. Съотношения на шансовете, относителен риск (Odds ratio – OR) ... 99
3.5.5. Тест на Ман-Уитни (Mann–Whitney) за променливи с множество измервания ... 99
3.5.6. Оценка на процента на фалшиво позитивни резултати (асоциации) при множествени сравнения: тест на Benjamini–Hochberg FDR ... 100
3.5.7. Корелационни анализи ... 101
3.5.7.1. Корелационен коефициент на Пиърсън (Pearson) ... 101
3.5.7.2. Корелационен коефициент на Спиърман (Spearman) ... 102
3.5.8. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери ... 102
3.5.8.1. Анализ на ROC кривите на единични биомаркери ... 104
3.5.8.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите ... 104
3.5.9. Обработка на резулатите от микроРНК микрочиповия анализ ... 105
3.5.9.1. Нормализация на данните ... 105
3.5.9.2. Анализ на основните компоненти – PCA (Principle Component Analysis) ... 105
3.5.9.3. Volcano plot ... 106
3.5.9.4. Интерпретация на получените резултати ... 106
3.5.9.4.1. Откриване на гени регулирани от микроРНК-ите показали променена експресия ... 106
3.5.9.4.2. Откриване на клетъчни пътища, в които участват гените регулирани от микроРНК-ите показали променена експресия ... 106
3.5.9.4.3. Venn диаграми ... 106
3.5.9.4.4. Онтологичен анализ ... 106
3.5.9.4.5. Клъстерен анализ ... 107
3.5.9.4.5.1. Йерархичен клъстерен анализ ... 107

4. РЕЗУЛТАТИ ... 110
4.1. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ОТКРИТИ ПРИ GWAS ... 110
4.1.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs6465657 разположен в хромозомен локус 7q21.3 ... 110
4.1.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 8q24 ... 111
4.1.2.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs620861 ... 111
4.1.2.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs1016343 ... 112
4.1.2.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs4871008 ... 114

4.1.2.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs7841060 117
4.1.2.5. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите разположени в хромозомен локус 8q24 119
4.1.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 10q11.23 121
4.1.3.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs10993994 в *MSMB* 121
4.1.3.2. Резултати от Генетичен анализ на полиморфизъм в rs7920517 124
4.1.3.3. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите rs10993994 и rs7920517 за асоциацисция с РП 128
4.1.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 11p15.5 129
4.1.4.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs7127900 129
4.1.4.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs11603378 130
4.1.4.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs2239681 131
4.1.4.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs10770125 133
4.1.4.5. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs3842756 134
4.1.4.6. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs2070762 135
4.1.4.7. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs11564710 136
4.1.4.8. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs55930300 140
4.1.4.9. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите разположени на хромозомен локус 11p15.5 141
4.1.5. Резулати от генетичен анализ на полиморфизъм rs902774 разположен в хромозомен локус 12q13.13 142
4.1.6. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен регион 19q13.33 143
4.2. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ РАЗПОЛОЖЕНИ В ГЕНИТЕ *CYP1B1, AR* И *AMACR* 145
4.2.1. Резултати от генетичен анализ за асоциация с РП на полиморфизъм rs2567206 разположен на хромозомен локус 2p21 в гена *CYP1B1* 145
4.2.2. Резултати от генетичен анализ за асоциация с РП на тринуклеотидния повторен полиморфизъм (CAG)n в *AR* 146
4.2.3. Резултати от генетичен анализ за асоциация на полиморфизъм rs3195676 разположен на хромозомен локус 5p13.2 е гена *AMACR* 149
4.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ АНАЛИЗА НА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ *GSTP1, HIST1HK* И *RASSF2* В УРИНА 153
4.3.1. Резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина на пациенти с рак на простатата и контроли с помощта на MS-HRMA 153
4.3.1.1. Оптимизиране на условията на амплификация на праймерите за MS-HRM анализ и праймерите за секвениране 153
4.3.1.2. Оптимизиране на условията за протичане на MS-HRM анализа 154
4.3.1.3. Валидиране на метода чрез директно секвениране 157
4.3.1.4. Резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* 158

4.3.2. Резултати от анализ на промоторното хиперметилиране на *RASSF2* и *HIST1H4K* в урина на пациенти с рак на простатата и контроли с помощта на MethyLight метода. 161
4.3.2.1. Получени резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K*.....161
4.3.2.2. Получени резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *RASSF2* 164
4.4. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА *GSTP1, PSA, PCA3, AMACR* И *GOLPH2* (*GOLM1*) В УРИНА.....166
4.4.1. Резултати от експресионния анализ на *PSA* (*KLK3*) в урина на пациенти и контроли 166
4.4.2. Резултати от експресионния анализ на *PCA3* (*DD3*) в урина на пациенти и контроли.....169
4.4.3. Резултати от експресионния анализ на *AMACR* в урина на пациенти и контроли.....171
4.4.4. Резултати от експресионния анализ на *GSTP1* в урина на пациенти и контроли.....173
4.4.5. Резултати от експресионния анализ на *GOLM1* (*GOLPH2*) в урина на пациенти и контроли.....174
4.4.6. Обобщение на резултатите получени от експресионния анализ на биомаркери в урина..176
4.4.7. Резултати от мултимаркерен анализ на ROC кривите при комбиниране на експресионните биомаркери в урина и серумните стойности на PSA 177
4.5. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА let-7c, miR-30c, miR-141 И miR-375 В ПЛАЗМА 180
4.6. РЕЗУЛТАТИ ОТ микроРНК МИКРОЧИПОВИЯ АНАЛИЗ.....186
4.6.1. Оптимизиране на изолирането на РНК от простатна тъкан 186
4.6.2. Измерване на концентрацията и определянето на качеството на изолираните РНК с помощта на Nano Drop и Agilent 2200 TapeStation System. Изготвяне на 50 ng/µl разредки за miRNA експресионното профилиране чрез микрочипов анализ 186
4.6.3. Подбор на метод за нормализация на резултатите от микрочиповия анализ.....188
4.6.4. Контрол на качеството на резултатите и PCA (principle component analysis- анализ на основните компоненти) 188
4.6.5. Филтриране на получените резултати 189
4.6.6. Установяване на miRNAs с променена експресия в туморна простатна тъкан на пациенти с РП в сравнение с нормална тъкан на контроли с ДПХ 190
4.6.7. Определяне на таргетните гени регулирани от микроРНК-ите показали статистически значима променена експресия. Установяване на повлияните клетъчни пътища 193
4.6.8. Онтологичен анализ 195
4.6.9. Най-силно засегнати и важни за раковите клетки пътища повлияни от показалите диференциална експресия микроРНК-и, регулиращи участници в тях 196
4.6.9.1. MAPK сигнален път 196
4.6.9.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза 198
4.6.9.3. Wnt сигнален път.....199
4.6.9.4. Клетъчен цикъл 200
4.6.9.5. TGF-β сигнален път.....201
4.6.9.6. NOTCH сигнален път.....204
4.6.9.7. Toll-like receptor сигнален път.....204
4.6.9.8. Поправка на ДНК повреди 205
4.6.9.9. P53 сигнален път 205
4.6.9.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране.....207

4.6.9.11. Поддържане на теломерите 207
4.6.9.12. EGF-EGFR сигнален път 208
4.6.9.13. ID сигнален път 208
4.6.9.14. Енергиен метаболизъм 209
4.6.9.15. Отговор към оксидативен стрес 210
4.6.9.16. Клетъчна адхезия 211
4.6.9.17. Други важни гени регулирани от микроРНК-ите показали промяна в експресията 213
4.6.10. Определяне на белтък-белтъчните взаимодействия на важни туморсупресори и онкогени, регулирани от показалите диференциална експресия микроРНК-и в изследваните простатни тумори 214
4.6.11. Резултати от йерархичен клъстерен анализ 220

5. ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ 225
5.1. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОВЕДЕНИТЕ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ОТКРИТИ ПРИ GWAS 225
5.1.1. Обсъждане на резултатите получени за rs6465657 разположен на хромозомен локус 7q21.3, в гена *LMTK2* 225
5.1.2. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 8q24 225
5.1.3. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 10q11 227
5.1.4. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 11p15.5 229
5.1.5. Обсъждане на резултатите получени за rs902774 разположен на хромозомен локус 12q13 232
5.1.6. Обсъждане на резултатите получени за полиморфните варианти разположен на хромозомен локус 19q13.33 233
5.2. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОВЕДЕНИТЕ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНА *AMACR* И ГЕНИТЕ *AR* И *CYP1B1* СВЪРЗАНИ С МЕТАБОЛИЗМА НА АНДРОГЕНИТЕ 233
5.2.1. Обсъждане на резултатите получени за rs2567206 разположен на хромозомен локус 2p21, в гена *CYP1B1* 233
5.2.2. Обсъждане на резултатите получени за тринуклеотидния повтор (CAG)n разположен в екзон 1 на *AR* гена 234
5.2.3. Обсъждане на резултатите получени за rs3195676 разположен на хромозомен локус 5p13, в гена *AMACR* 235
5.3. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ АНАЛИЗА НА ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ *GSTP1, HIST1H4K* И *RASSF2* В УРИНА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ 237
5.3.1. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина 237
5.3.2. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина 239

5.3.2.1. Обсъждане на резултатите получени за *HIST1H4K* 239
5.3.2.2. Обсъждане на резултатите получени за *RASSF2* 241
5.4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА *GSTP1*, *PSA*, *PCA3*, *AMACR* И *GOLPH2* (*GOLM1*) В УРИНА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ 242
5.4.1. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *PSA* (*KLK3*) в урина.. 242
5.4.2. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *PCA3* в урина 243
5.4.3. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *AMACR* в урина 243
5.4.4. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *GSTP1* в урина 244
5.4.5. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *GOLM1* (*GOLPH2*) в урина 244
5.4.6. Обсъждане на резултати получени при комбинирането на експресионните профили на изследваните биомаркери в урина и серумните нива на *PSA* 245
5.5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА let-7c, miR-30c, miR-141 И miR-375 В ПЛАЗМА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ 246
5.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ микроРНК ЕКСПРЕСИОННОТО ПРОФИЛИРАНЕ ЧРЕЗ МИКРОЧИПОВЕ В ТУМОРНИ И НОРМАЛНИ ПРОСТАТНИ ТЪКАНИ 251
5.6.1. Обсъждане на микроРНК-ите, показали диференциална промяна 251
5.6.2. Обсъждане на повлияните гени и клетъчни пътища 254
5.6.2.1. MAPK сигнален път 255
5.6.2.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза 258
5.6.2.3. Wnt сигнален път 260
5.6.2.4. Клетъчен цикъл 262
5.6.2.5. TGF-β сигнален път 265
5.6.2.6. NOTCH сигнален път 265
5.6.2.7. Toll-like receptor сигнален път 267
5.6.2.8. Поправка на ДНК повреди 268
5.6.2.9. p53 сигнален път 270
5.6.2.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране 270
5.6.2.11. Поддържане на теломерите 270
5.6.2.12. EGF-EGFR сигнален път 272
5.6.2.13. ID сигнален път 272
5.6.2.14. Енергиен метаболизъм 274
5.6.2.15. Отговор към оксидативен стрес 275
5.6.2.16. Клетъчна адхезия 275
5.6.2.17. Други важни гени регулирани от микроРНК-ите показали промяна в експресията 276
5.6.3. Обсъждане на резултатите от PCA и клъстерния анализ 277

6. ИЗВОДИ 278

7. ПРИНОСИ 279

8. БИБЛИОГРАФИЯ 280

9. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ 312

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на простатата (РП) представлява основен здравен проблем в развитите страни тъй като има висока честота на заболеваемост и смъртност, и засяга най-често възрастните мъже. По тази причина е необходимо намирането на биомаркери, които да са по-надежни от серумните нива на PSA, да спомагат за ранно и неинвазивно диагностициране, ограничавайки броя на ненужните биопсии, да могат да се използват за разграничаване на пациентите с агресивни от неагресивни тумори и за прогнозиране на изхода от проведено лечение.

Въпреки напредъка в науката етиологията на РП не е напълно изсяснена. Единствените установени рискови фактори са възрастта, етноса и фамилната история. На генетичните фактори се дължат 42% от риска за развитие на това заболяване, но също е установено че и други фактори като възпаленията и имунната система, диетата, начина на живот оказват влияние. Все още не е изяснено взаимодействието между тях.

Предполага се, че андрогените играят важна роля не само за нормалното развитие на простатната жлеза, но също така участват и в простатната карциногенеза. Доказателство за това са установените различни нива на андрогените при афро американците в сравнение с останалите популации и наблюдаваната различна честота на заболеваемост от РП. Открити са и полиморфни варианти в гени, участващи в андрогеновия метаболизъм като *AR* и *CYP1B1*, които модифицират риска за развитие на това заболяване. Резултатите за някои от тях обаче са противоречиви и по тази причина е необходимо тяхното изследване в различни популации.

Епидемиологичните изследвания показват, че повишената консумация на червено месо и млечни продукти, които са главни източници на разклонени мастни киселинни, са асоциирани с риска за развитие на РП. В подкрепа на това е открито, че един от ензимите наречен AMACR, участващ в метаболизма на мастни киселини, е с повишена експресия в простатни тумори и полиморфизми в него модифицират риска за развитие на РП. Повишената активност на AMACR води до генериране на свободни радикали, за които е известно че предизвикват оксидативен стрес и ДНК повреди. Установено е, че оксидативният стрес е основен фактор в карциногенезата на простатната жлеза.

Благодарение на големите асоциативни проучвания (GWAS) са открити над 70 хромозомни локуса асоциирани с РП като те обясняват около 30% от риска за развитие на това заболяване и имат нисък до среден ефект. Необходимо е тяхното многократно валидиране в различни популации. По-голяма част от асоциираните полиморфни варианти се намират в извънгенни области на генома и по тази причина, за да се разберат точните механизми, водещи до възникване на РП трябва да се намерят гените отговорни за получените сигнали от GWAS. Това би спомогнало за по-точно определяне на индивидуалния риск за развитие на РП.

Простатната карциногенеза се съпътства от множество генетични, геномни и епигенетични промени. Някои от тези промени се изследват като потенциални диагностични и прогностични биомаркери. Тяхното валидиране е много трудно тъй като РП е хетерогенен и мултифокален (мултилокусен), и също така съществуват вариации в дизайна и използваните методи в отделните проучвания. Особен интерес обаче представляват неинвазивните биомаркери, които могат да се открият в телесни течности като урина и кръв (плазма/серум). Те дават възможност за изследване на пациенти с мултифокални и хетерогенни простатни тумори. Биомаркери изследвани в телесни течности при РП са например промоторното хиперметилиране, промяната в нивата на микроРНК-ите (miRNAs) и иРНК-ите (mRNAs). микроРНК-ите и CpG промоторното

метилиране са част от епигенетичния механизъм за контрол на експресията на гените, за който се предполага че е засегнат още в най-ранните етапи на простатната туморогенеза. Един от промоторно хиперметилираните биоамаркери интензивно изследван при РП е *GSTP1*. CpG промоторната област на този ген е метилирана във висок процент от изследваните биологични материли от пациентите с РП, но също така метилиране е открито и в проби на контроли без рак в някои проучвания. По тази причина ролята му в клиничната практика не е напълно изяснена. Промоторно хиперметилиране при РП е открито и при други гени като нови потенциални диагностични биоамаркери са *HIST1H4K* и *RASSF2*. Интензивно се изследват и нивата на експресия на иРНК-ите. Биомаркерите *AMACR, PCA3, PSA, GOLPH2* е установено, че имат променена експресия в урина от пациенти с РП в редица проучвания, но е необходимо тяхното валидиране.

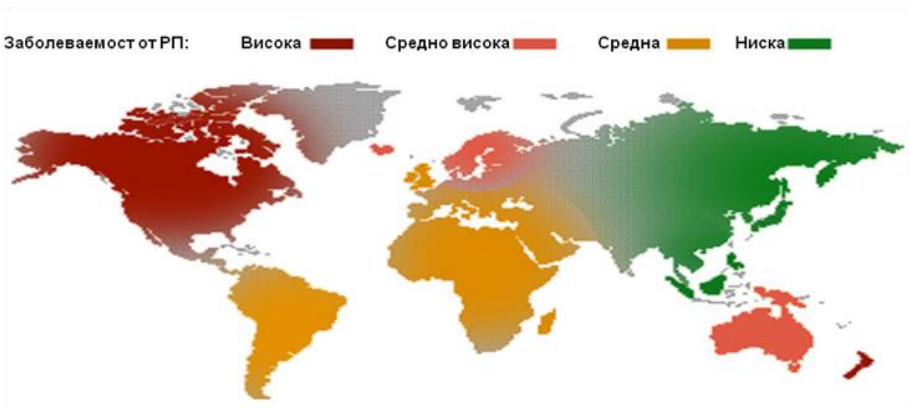
Обещаващи биомаркери са микроРНК-ите тъй като те функционират като туморсупресори и онкогени и са особено стабилни в сравнение с другите биомаркери. Редица проучвания показват, че нивата на експресия на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 са променени в плазма/серум на пациенти с РП спрямо контроли.

В настоящия дисертационен труд е посветен на валидиране и търсене на нови генетични, епигенетични и експресионни биомаркери с по-добра диагностична и предиктивна стойност в сравнение с утвърдените към момента с цел подобряване на скрининга и ранното откриване на РП в България. Проведохме асоциативни проучвания на подбрани от литературата (в гените *AR, CYP1B1*, *AMACR* и такива открити от GWAS), и неизследвани до този момент полиморфни варианти (в хромозомния локус 11p15). Бяха изследвани нивата на експресия на иРНК и промоторно хиперметилирани биомаркери в урина, нивата на експресия на микроРНК-и в плазма, с цел определяне на тяхната диагностична и прогностична стойност и сравнихме получените резултати с тези докладвани от други изследователи. Проведохме и микроРНК експресионно профилиране в туморни и нормални простатни тъкани чрез микрочипове, за да открием нови потенциални биоамаркери при РП.

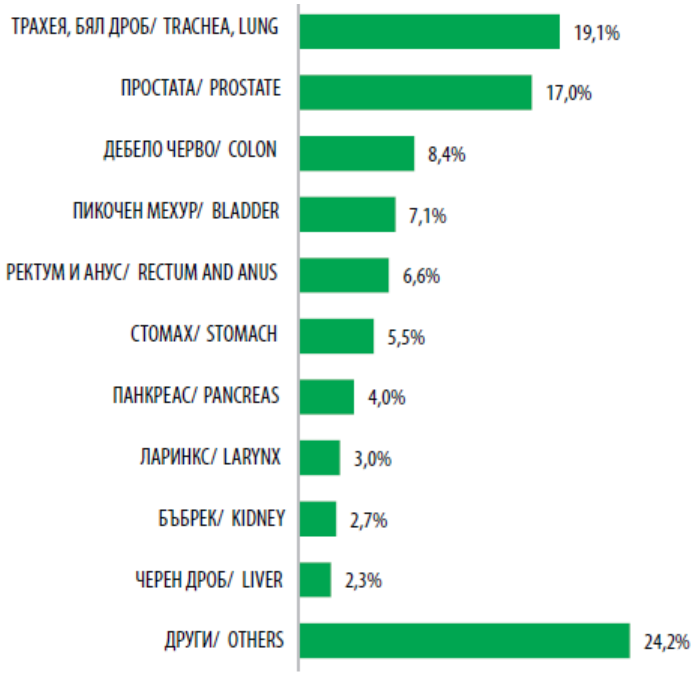
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

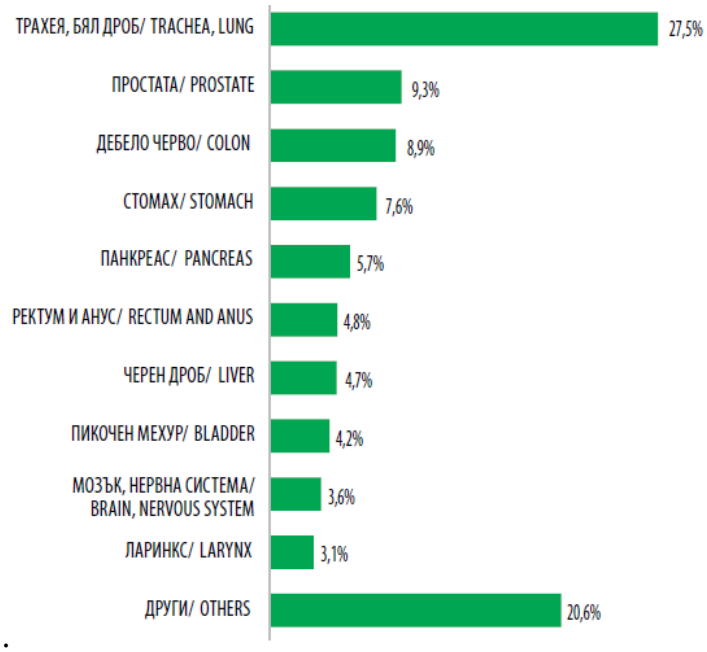
Ракът на простатата (РП) се развива в простатната жлеза. **Той представлява най-често диагностицираното малигнено заболяване и се нарежда на второ място по смъртност поради рак при мъжете в развитите страни** [2]. РП е хетерогенно заболяване, което може да протече асимптоматично или да се развие бързо и агресивно [3]. В Европа неговата честотата е 214 случая на 1000 мъже. **Засяга по-често възрастни мъже и по тази причина е основен здравен проблем в развитите страни**. Установено е, че приблизително 15% от онкологичните заболявания при мъжете в развитите страни и около 4% в развиващите се страни се дължат на РП [4]. Съществуват етнически различия в честотата на този тип рак: най-висока честота е наблюдавана при афроамериканците в САЩ, най-ниска честота в Азия (Фигура 1.1) [5]. Прогнозираната смъртност в Европа поради РП при мъжете за 2014 г. е 10.2/100000 или общо 70 000 смъртни случая от всички малигнени заболявания [6].



Фигура 1.1. Заболеваемост от РП в света.



Фигура 1.2. Процентно разпределение на най-честитите злокачествени заболявания (без немеланомни кожни тумори) при мъжете в България за 2012г [1]



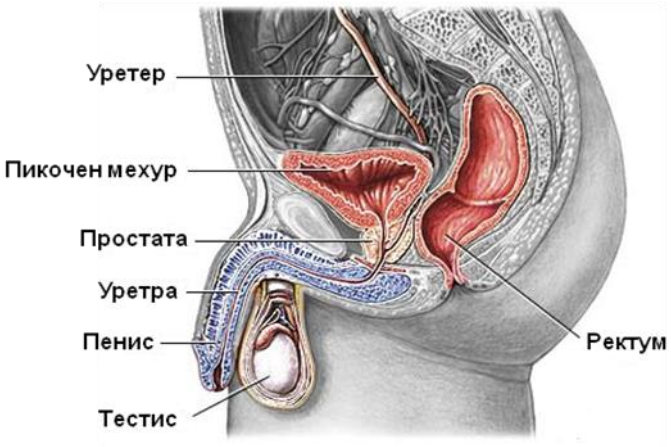
Фигура 1.3. Процентно разпределение на най-честите причини за смърт от злокачествени заболявания (без немеланомни кожни тумори) при мъжете в България за 2012г [1]

.

В България новите случаи на РП за 2012 година са 2946 (82.9 на 100 000) и това представлява 17% от всички малигнени заболявания (Фигура 1.2). На него се дължи 9.3% (26.3 на 100 000) от смъртността поради рак. Това нарежда заболяването на второ място по честота и по смъртност сред мъжете (Фигура 1.3). Очакваният брой нови случаи на РП за 2015 г. е 2783 [1].

1.2. АНАТОМИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Простатата подпомага продукцията и съхранението на семенната течност. Намира се в пелвиса под пикочния мехур и пред ректума, обгражда част от уретрата (Фигура 4) (E1). Тя е свързана със семенните торбички. Те произвеждат течност, която се слива с простатния секрет и така се формира сперма, в която се пренасят сперматозоидите (E2). Простатата съдържа много малки жлези (Фигура 5) и клетките й синтезират простатно специфичен антиген (PSA)- протеаза, която втечнява спермата. (E3).



Фигура 1.4. Разположение на простатата.

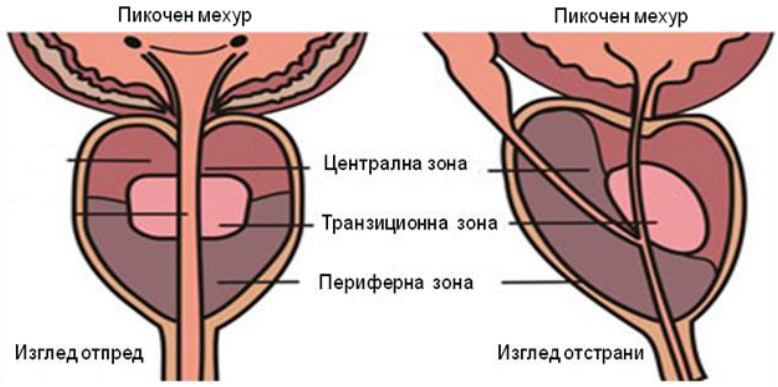
Три са най-честите простатни промени: доброкачествена простатна хиперплазия (не малигнено уголемяване на простатата, част от нормалния процес на остаряване при мъжете), простатитис (възпаление на простатата, понякога предизвикано от инфекция) и рак (E4,E5).

Развитата простатна жлеза се състои от луминални и базални епителни клетки заобиколени от строма (Фигура 1.5). Луминалните епителни клетки са поляризирани, обграждащи простатния лумен, а базалните клетки са удължени и разделят лумена от стромата. Тези клетки се разграничават въз основа на разнообразни клетъчни маркери. Луминалните епителни клетки експресират високи нива на AR (андроген рецептор) и са позитивни за цитокератини 8 и 18, CD57 и NKX3.1. Базалните епителни клетки експресират ниски нива на AR и са позитивни за цитокератини 5 и 14, p63, CD44 и GSTP1. Срещат се и невроендокринни клетки, които са AR-негативни, пост-митотични и секретират невропептиди и растежни фактори, необходими на луминалните клетки. Стромата има потенциална роля в поддържането на хомеостаза на епителните клетки и в прогресията на РП [7].



Фигура 1.5. Структура на простатната жлеза.

Повече от 95% от простатните тумори са аденокарциноми. От тях 70% се появяват в периферната зона, 15-20% в централната зона, и 10-15% в транзиционната зона (E6).



Фигура 1.6. Зони на простатната жлеза.

1.3. ДИАГНОЗА

Диагнозата РП се поставя след измерване на серумните нива на маркера PSA, извършване на дигитален ректален преглед (Digital Rectal Examination – DRE) и хистопатологично изследване на ултразвукова насочвана (Transrectal Ultrasound TRUS) простатна биопсия. Колкото по-високи са нивата на PSA, толкова по-вероятно е да има развит простатен аденокарцином [4]. Много мъже могат да имат РП при нормални стойности на PSA и това е показано в едно проучване за превенция на РП на Thomson и съавтори. Таблица 1.1 показва риска за развитие на РП според стойности на PSA при 2950 мъже от плацебо рамото в това проучване [8].

Таблица 1.1. Риск за развитие на РП в зависимост от ниски серумни стойности на PSA [9].

PSA стойност, ng/ml	Риск за развитие на РП, %
0-0.5	6.6
0.6-1	10.1
1.1-2	17.0
2.1-3	23.9
3.1-4	26.9
PSA- простатно специфичен антиген; РП- рак на простатата	

PSA е ензим, част от семейството на каликреините, известен още като каликреин свързана пептидаза 3 (KLK3) [10]. Синтезира се във високи нива от нормални и малигнени простатни епителни клетки и при патологични състояния като значително се секретира в извънклетъчните компартменти. По тази причина той е основният биомаркер, който се използва при диагностицирането на РП. Одобрен е от FDA (US Food and Drug Administration) през 1986 [11]. Серумните стойности на PSA също се използват за откриване на рецидиви и за проследяване на отговор към терапия при неоперативни и метастатични тумори [12], но не могат да бъдат използвани за разграничаване на агресивните от неагресивните карциноми тъй като и напредналите простатни карциноми могат да бъдат асоциирани с много ниски или нормални PSA нива [13].

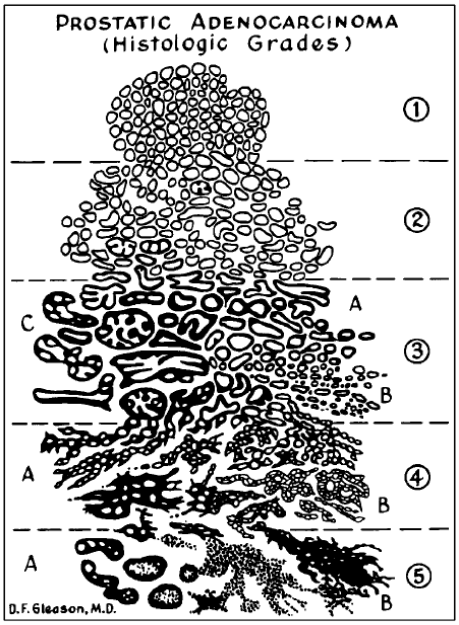
Съществуват редица ограничения в използването на PSA теста за скриниране на РП. Основният недостатък е, че тестът може да даде фалшиво положителни резултати. Голяма част от мъжете с повишени стойности на PSA (над 4.0 ng/mL) нямат РП и само 25% от пациентите, подложени на простатна биопсия поради повишени стойности на PSA, имат карцином (E7). Надеждността на PSA теста за скриниране на РП варира. В зависимост от избраните гранични стойности на биомаркера, специфичността и чувствителността се менят от 20 до 40% и от 70 до 90%, съответно. Площта под кривата (AUC - area under the curve) при ROC (receiver operating characteristic) curve анализа варира от 0.55 до 0.70 и показва способността на PSA да идентифицира пациентите с РП [14]. Стойности на AUC близки до 1 са на биомаркери, които са перфектни дискриминатори. Поради високия процент на фалшиво положителни резултати, PSA скринингът показва само 25-40% положителна предиктивна стойност [15]. Една от основните причини за ниската специфичност е, че PSA може да се повиши в резултат на различни неканцерогенни състояния като инфекции, травми и ДПХ [16, 17]. Някои медикаменти (например финастерид), еякулацията и простатните манипулации (като катетъризация, цистоскопия, простатен масаж) могат да повлияят PSA стойностите [11]. **PSA е простатно специфичен биомаркер, но не е раково специфичен.** Проучването PLCO - Prostate, Lung,

Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial (Скриниращо проучване на рака на простатата, рака на белия дроб, на колоректалния и овариален карцином) показва че PSA скринингът не води до понижаване на смъртността поради РП [18], но други две проучвания [19, 20] показват, че той редуцира смъртността.

1.4. КЛАСИФИКАЦИЯ

Важна част в оценяването на РП е определянето на стадия или до колко ракът се е разпространил. Определянето на стадия улеснява прогнозата и подпомага избора на терапия (E8).

TNM (Tumor/Nodes/Metastases) системата за класификация е възприета за всички видове рак и е основна. Нейните компоненти включват размера на тумора, броя на засегнатите лимфни възли и наличието на метастази [21]. **Система за класификация, възприета само за РП, е Gleason score - той се определя от патофизиолозите при наблюдение на микроскопски срези след биопсия** (Фигура 1.7). Gleason score варира между 2-10 и е показател за степента на различие между раковите и нормалните клетки, както и за вероятността за метастазиране (E9). Според сегашната международна конвенция Gleason score на откритите тумори в простатните биопсии е модифициран и представлява сбор от Gleason grade (стадий) на доминантния (най-често срещания, най-разпространен) карцином и най-високия наблюдаван Gleason стадий, независимо от неговото разпространение - не се използва правилото за 5%. При определяне на Gleason score на радикални простатектомии се използват двата най-разпространени туморни стадия, но ако съществува и трети стадий, е необходимо той също да се докладва [4].



Фигура 1.7. Gleason grade системата при РП [22].

Простатните тумори могат да се класифицират на ниско- средно- и високо-рискови. Това групиране първоначално е било предложено от D'Amico и негови колеги и е одобрено от National Comprehensive Cancer Network (NCCN) и American Urologic Association (AUA) [23]. Ниско рисковите простатни тумори имат Gleason score 6 при простатна биопсия, клинични стадии T1a, T1c, или T2a и PSA < 10 ng/mL. Простатните тумори с междинен риск могат да имат Gleason score 7, или PSA между 10-20 ng/mL, или клиничен стадий T2b или T2c. Високо рисковите локализирани карциноми притежават една от следните характеристики: Gleason score между 8 и 10, PSA стойности >20 ng/mL

или клиничен стадий T3a. Пациентите с T3b или T4 се класифицират като локално авансирали тумори [23].

1.5. РИСКОВИ ФАКТОРИ

Простатният карцином представлява голям проблем за здравната система и въпреки напредъка в науката, етилогията на това заболяване все още не е напълно изяснена. **Единствените установени рискови фактори са възрастта, етноса и фамилната история [24].** Рискът за развитие на РП се повишава значително след 50 годишна възраст. Само 1 на 10 000 мъже под 40 години се диагностицира с РП, но честотата се повишава на 1 на 38 при възраст от 40 до 59, и 1 на 14 при възраст 60-69 години. Повече от 65% от всички случаи на РП се диагностицират при мъже над 65 годишна възраст. В САЩ средната възраст, при която се диагностицира РП е 69. След тази възраст рискът за развитие на РП става по-висок от всички видове онкологични заболявания при мъжете или жените (E10,E11).

На генетичните фактори се дължат 42% от риска за развитие на РП [25]. Ако един родственик от първа линия има РП, то рискът за развитие на това заболяване е поне двоен. Ако са засегнати двама или повече роднини от първа линия, то рискът се увеличава с 5-11 пъти [26]. При приблизително 9% от пациентите, РП е наследствен, което се дефинира като наличие на трима или повече засегнати роднини или поне двама родственика с ранно начало (преди 55 годишна възраст) на заболяването [27].

Честотата на откритите простатни тумори при аутопсия е приблизително еднаква за различните части на света [28]. Това откритие е в рязък контраст с наблюдаваната честота на клиничния РП, която варира за различните географски области, като е най-висока в САЩ и Северна Европа и най-ниска в Югоизточна Азия [29]. Въпреки това е установено, че ако мъже от Япония мигрират в Хаваите, то техният риск за развитие на РП се увеличава. Ако се преместят в Калифорния, техният риск се увеличава дори повече, доближавайки се до този на американските мъже [29]. Тези открития показват, че екзогенни фактори повлияват риска за прогресия на латентен към клиничен РП. Фактори като диетата, сексуалното поведение, консумацията на алкохол, излагането на ултравиолетова радиация, хроничните възпаления [30, 31] и професионалната среда са важни за етиологията на заболяването [31]. **РП е заболяване, което се повлиява не само от генетични фактори, но и от фактори на средата.**

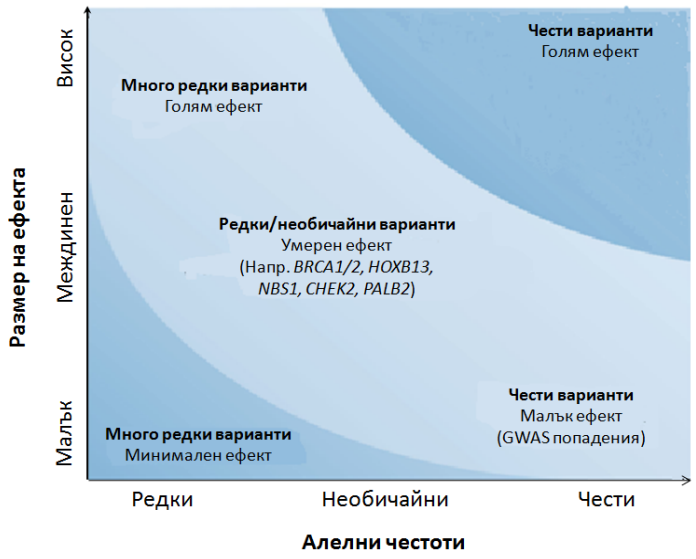
1.5.1. Генетични рискови фактори - герминативни и соматични генетични и геномни промени при рака на простатата

1.5.1.1. Хромозомни локуси и гени, открити при анализите на скаченост

Съществуват различни генетични модели, обясняващи предразположеността към развитие на РП. В някои от тези модели се включват редки варианти във високо пенетрантни гени, а в други чести варианти, асоциирани със слабо увеличаване на риска (въпреки че кумулативният риск може да бъде значителен при използването на много варианти, чийто ефект е мултипликативен). **Ранните доказателства за генетичната предразположеност за развитие на РП са от изследванията за скачеността** (linkage analyses). Скачеността е ко-сегрегация (ко-унаследяване) на генетичен маркер със заболяване [32]. Отделните проучвания предлагат различни модели за унаследяване на асоциираните с РП генетични варианти: доминантни, рецесивни, Х-свързани, във вариращи съотношения в зависимост от изследваната популация и полигенния компонент. Сегрегационните анализи нямат достатъчно сила да направят диференциация между отделните генетични модели [33].

Доказателства за скаченост за различни хромозоми (1-6, 8, 11, 15, 17, 19, 20, 22 и X) са докладвани в няколко проучвания на РП [34-60]. Те обаче не са потвърдени в други изследвания [61-70]. Международният консорциум за генетиката на рака на простатата (International Consortium for Prostate Cancer Genetics- ICPCG) провежда най-голямото проучване за скаченост, обединяващо над 1000 семейства от 10 международни групи. Те отриват хромозомен локус 22q, силно скачен със заболяването в семейства с повече от 5 родственика с ранно начало на РП [71]. До този момент не е открит генът, отговорен за генетичната предразположеност за развитие на РП в този регион. Изследванията за скачеността идентифицират и друг важен хромозомен локус, асоцииран с РП - 8q24 [72], а така също и няколко гена: *ELAC2* (17p12), *RNASEL* (1q25) и *MSR1* (8p22) [73-76]. Секвенирането на показалия скаченост хромозомен регион 17q21 доведе до идентифицирането на замяната G84E в *HOXB13* [77]. Някои открития не са валидирани в следващи проучвания и това поставя под съмнение тяхната асоциация с риска за развитие на РП. **Липсата на възпроизведими резултати и надеждни и категорични открития в голяма част от изследванията за скаченост показват, че РП е комплексно заболяване [33]**. Анализите за скаченост са най-подходящи за изучаване на редки варианти с висока пенетрантност. **Сега се предполага, че голяма част от генетичната основа на РП се дължи на многобройни гени и полиморфизми с ниска пенетрантност** (Фигура 1.8) [78].

Откритието на редки мутации с висока пенетрантност става възможно с използването на нови технологии като новогенерационното секвениране. Развитието на микрочиповия анализ дава възможност да се изследват едновременно милиони еднонуклеотидни полиморфизми (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) и да се провеждат големи геномни асоциативни проучвания (Genome Wide Association Studies - GWAS), които водят до откритието на множество асоциирани с РП варианти, с алелни честоти на редките алели поне 1% и нисък до среден ефект върху развитието на заболяването [32].



Фигура 1.8. Генетична архитектура на РП- показва че предразположеността към това заболяване най-вероятно да се дължи на смесен модел от чести и редки генетични варианти (Фигурата е адаптирана от Eeles et al, 2014 [33]).

1.5.1.2. Генетични варианти открити в големи геномни асоциативни проучвания (GWAS)

От 2006 година са публикувани 32 GWAS за РП (E12). **Идентифицирани са около 78 локуса, асоциирани със заболяването. Провеждат се допълнителни анализи за откриването на предразполагащите гени и функционалните промени в тях [25]**.

Сред първите открити SNPs асоциирани с РП са тези, разположени на хромозомния локус 8q24 [72, 79]. Този локус е беден на гени и е разположен в близост до *MYC* прото-онкогена, асоцииран с много видове онкологични заболявания. Предполага се, че 8q24 регионът повлиява експресията на *MYC* [80]. Друг потенциално клинично значим полиморфизъм е rs10993994 в *MSMB* гена на хромозома 10 [81]. Този ген кодира микросеминопротеин-β, секретиращ се от епителните клетки на простатата и регулиращ растежа [82]. Експресията му е висока в нормални и доброкачествени простатни тъкани и е ниска при РП. Рисковият алел на rs10993994 е локализиран в близост до транскрипционното стартово място на *MSMB* и се асоциира с редукция в експресията [83, 84]. В допълнение рисковият алел се асоциира с ниски белтъчни нива на MSMB в урина и кръв, и това прави експресията на този ген потенциален биомаркер, по-добър от PSA [83-85].

Еднонуклеотидни полиморфизми, асоциирани с РП, са открити също на хромозома 19, където се намират гени, кодиращи каликреини, подгрупа от серинови протеази като *KLK2* и *KLK3* (PSA) [86]. Финото картиране на 19q13 региона доведе до идентифицирането на кодиращ вариант в *KLK3*, който показва по-силна асоциация с РП в сравнение с първоначално откритията полиморфизъм при GWAS и води до потенциални промени в PSA [87].

Други полиморфни варианти са идентифицирани в интронните области на *LMTK2* гена, който кодира cdk5; *SLC22A3* гена, който кодира органичен катийонен транспортер; *RAD51B* гена, който е важен за ДНК поправката и *NUDT10,* който регулира ДНК фосфорилирането [81, 88].

В близост до *TERT* гена на 5p15 е идентифициран полиморфизмът rs2242652, който показва асоциация с високи нива на PSA, а така също с повишен риск за развитие на РП [89]. Известно е, че теломеразата е важна в регулирането на теломер-зависимото репликативно остаряване и SNPs в този регион са асоциирани с различни видове рак [90]. Финото картиране идентифицира общо 4 независимо асоциирани с риска за развитие на РП локуса в *TERT* региона, като един от тях се асоциира и с промени в генната експресия [91]. Друг полиморфизъм rs2121875 също е разположен в късото рамо на хромозома 5 в рамките на *FGF10* локуса, асоцииран с повишен риск за развитие на РП [89].

Две проучвания установяват връзка между РП и еднонуклеотидни полиморфизми, разположени в хромозомен регион 11q13.2 (rs79313429 и rs1089644910) [81, 92]. Полиморфизмът rs7931342 е локализиран в регион без известни гени [81], а полиморфизмът rs10896449 се намира на разстояние 67 kb от гена *MYEOV* [92]. Асоциация на хромозомен регион 11q13 с РП е намерена и при други GWAS [93-96]. Важността му за заболяването, по-нататък, е потвърдена и от финото картиране, при което два независими локуса (rs10896449 и rs12418451) на 11q13 са асоциирани с риска за развитие на РП [97]. В допълнение към асоциацията на еднонуклеотидните полиморфизми са наблюдавани и промени в броя копийни варианти в региона 11q13–11q14 [98-101].

Друг полиморфен вариант (rs11568818) с потенциална прогностична стойност в 11q22 се намира в рамките на региона, съдържащ гена *MMP7*. Този ген кодира матриксна металопротеиназа, която е важна за туморното метастазиране и MMP7 е потенциален прогностичен биомаркер за развитието на агресивен карцином и метастази [102].

При наскоро проведено GWAS на консорциума PRACTICAL, в което участват и български пациенти от ДНК банката на ЦММ, се открива значима асоциация с РП на полиморфизма rs7127900, локализиран върху късото рамо на хромозома 11 - локус 11p15 [103]. Полиморфизмът rs7127900 е разположен в близост до гените *IGF*, *IGF2*, *INS*, и *TH*, за които има данни, че участват в молекулярната патология на РП [104-106].

През 2013 Eeles и съавтори докладват 23 нови алели свързани с повишен риск за развитие на РП, от които 16 са асоциирани с агресивните форми на заболяването. В тяхното проучване полиморфизмът rs4245739, разположен на 1q32 в близост до *MDM4* гена, показва потенциална клинична значимост. MDM4 инхибира стопирането на клетъчния цикъл и апоптозата чрез понижаване нивата на p53 [88].

Въпреки осъществените многобройните геномни изследвания (анализи за скаченост и GWAS), все още не са идентифицирани главните рискови гени, свързани с патогенезата на РП. Това вероятно се дължи на редки регулаторни дефекти, които трудно се откриват и потвърждават. **Поради хетерогенната природа на РП един единствен полиморфизъм няма да бъде достатъчно надежден за диагностицирането и разграничаването на различните типове РП, а по-вероятно, диагнозата и прогнозата би могла да се базира на общия ефект на многобройни рискови фактори**.

Голяма част от откритите полиморфни варианти са некодиращи, и са разположени в интрони или междугенни региони. Те вероятно оказват своето влияние чрез промотори или енхансерни елементи, участващи в регулацията на генната експресия от далечни разстояния. Други възможни механизми включват структурни пренареждания, промени в ДНК структурата или в микроРНК свързващите места [107].

Таблица 1.2. Откритите при големите геномни асоциативни проучвания еднонуклеотидни полиморфизми, асоциирани с риска за развитие на РП, с близко разположените гени и техните функции.

SNP	Локус	Ген в съседство	Функция на гена	Библио-графия
rs1218582	1q21	*KCNN3*	Калмодулин свързващ	[88]
rs4245739	1q32	*MDM4* и *PIK3C2B*	Негативен TP53 регулатор и по тази причина водещ до инхибиране на стопирането на клетъчния цикъл и апоптоза и позитивен регулатор на клетъчната пролиферация	[88]
rs10187424	2p11	*GGCX/VAMP8*	SNARE взаимодействия във везикуларния транспорт	[89]
rs721048	2p15	В интрона на *EHBP1*	Eps15 хомоложен домен свързващ протеин	[108]
rs1465618	2p21	В интрона на *THADA*	Комплексен локус	[103]
rs13385191	2p24	*C2orf43*	Каталитична активност	[109]
rs11902236	2p25	*TAF1B*:*GRHL1*	TBP- асоцииран фактор	[88]
rs12621278	2q31	В интрона на *ITGA6*	Интегрини и повърхностно клетъчно адхезионно сигнализиране	[103]
rs2292884	2q37	*MLPH*	Екзофилиново субсемейство на Rab-ефекторните протеини	[89]
rs3771570	2q37	*FARP2*	Rac белтъчна сигнална трансдукция	[88]
rs2055109	3p11	-	-	[110]
rs2660753	3p12			[81]
rs7611694	3q13	*SIDT1*	Неизвестна	[88]
rs10934853	3q21	В интрона на *EEFSEC*	GTP свързващ, GTPase активност, нуклеотид свързващ, с транслационна и елонгационна факторна активност	[96]
rs6763931	3q23	В интрона на *ZBTB38*	Транскрипционен активатор, който се свързва към метилирана ДНК	[111]
rs10936632	3q26	*CLDN11/SKIL*	Миелин на ЦНС	[89]
rs1894292	4q13	*AFM* и *RASSF6*	Структурно свързани серумни транспортни белтъци	[88]

rs17021918	4q22	В интрона на *PDLIM5*	Цитоскелетна организация, спецификация на клетъчните линии и развитие на органната онкогенеза	[103]
rs12500426	4q22	-		[103]
rs7679673	4q24	*TET2*	Свързващ белтък на метални йони, оксидоредуктазна активност	[103]
rs2121875	5p12	*FGF10*	Важна роля в растежа на нормалните простатни епителни клетки	[111]
rs2242652	5p15	*TERT*	Теломераза, регулираща теломер зависимото репликативно остаряване	[89]
rs12653946	5p15	*IRX4*	Регулация на транскрипцията, ДНК зависим	[109]
rs6869841	5q35	*FAM44B (BOD1)*	Биориентирането на хромозомите в първото клетъчно делене	[88]
rs130067	6p21	Миссенс вариант в *CCHCR1*	Белтък свързваща	[89]
rs1983891	6p21	*FOXP4*	Семейството на FOX транскрипционни фактори	[89]
rs3096702	6p21	*NOTCH4*	Notch сигнална мрежа	[88]
rs2273669	6q21	*ARMC2* и *SESN1*	*ARMC2*	[88]
rs339331	6q22	*RFX6*	RFX семейство на транскрипционни фактори	[109]
rs9364554	6q25	В интрона на *SLC22A3*	Катион транспортерен ген	[81]
rs1933488	6q25	*RSG17*		[88]
rs10486567	7p15	В интрона на *JAZF1*	Транскрипционен репресор	[92]
rs12155172	7p21	*SP8*	Транскрипционен фактор	[88]
rs6465657	7q21	В интрона на *LMTK2*	Тирозин киназа	[81]
rs2928679	8p21	*SLC25A37*	Митохондриални транспортерни белтъци	[88]
rs1512268	8p21	*NKX3.1*	Хомеодомен съдържащ транскрипционен фактор	[103]
rs11135910	8p21	*EBF2*	Регулация на транскрипцията	[88]
rs1447295	8q24	-		[72]
rs6983267	8q24	-		[112]
rs16901979	8q24	-		[96]
rs10086908	8q24	-		[79]
rs12543663	8q24	-		[79]
rs620861	8q24	-		[79]
rs13254738	8q24	-		[113]
rs445114	8q24	-		[96]
rs817826	9q31	*RAD23B-KLF4*	Нуклеотид- ексцизионна репарация	[114]
rs1571801	9q33	*DAB2IP*	Ras GAP (GTPase-activating protein) туморен супресор	[115]
rs10993994	10q11	*MSMB* ген	MSMB регулира клетъчния растеж	[81, 92]
rs3850699	10q24	*TRIM8*	Лигазна активност	[88]
rs4962416	10q26	В интрона на *CTBP2*	Wnt сигнален път и Notch сигнален път	[92]
rs2252004	10q26	–		[110]
rs7127900	11p15	–		[103]
rs1938781	11q12	*FAM111A*	Протеолиза	[110]
rs7931342	11q13	–		[81, 92]
rs11568818	11q22	*MMP7*	Матриксна метало протеиназа асоциирана с метастатичния потенциал	[88]
rs902774	12q13	*KRT8*	Клетъчен структурен интегритет	[89, 111]
rs10875943	12q13	*TUBA1C/PRPH*	Белтък свързващ, GTP свързващ, GTPase активност, нуклеотид свързващ и структурно молекулна активност	[111]
rs1270884	12q24	*TBX5*	Транскрипционни фактори, участващи в регулацията на процесите на развитие	[88]

rs9600079	13q22	–		[109]
rs8008270	14q22	*FERMT2*	Актин цитоскелетната организация, клетъчната адхезия, регулация на клетъчната форма	[88]
rs7141529	14q24	*RAD51*	ДНК поправка	[88]
rs684232	17p13	*VPS53* и *FAM57A*	Белтъчен транспорт	[88]
rs4430796	17q12	В интрона на *HNF1B*	Хомеодомен съдържащото семейство на транскрипционни фактори	[116-118]
rs11649743	17q12	В интрона на *HNF1B*	Хомеодомен съдържащото семейство на транскрипционни фактори	[116, 118]
rs7405696	17q12	В интрона на *HNF1B*	Хомеодомен съдържащото семейство на транскрипционни фактори	[118]
rs7210100	17q21	*ZNF652*	Регулация на транскрипцията	[119]
rs11650494	17q21	*HOXB13*	Транскрипционен фактор	[88]
rs1859962	17q24	–		[120]
rs7241993	18q23	*SALL3*	Регулация на транскрипцията	[88]
rs2735839	19q13	*KLK2* и *KLK3* регионите	Серинови протеази	[81]
rs8102476	19q13	–		[96]
rs11672691	19q13	–		[121]
rs103294	19q13	*LILRA3*	Имунорецептори експресирани основно от моноцитите и В клетките	[114]
rs6062509	20q13	*ZGPAT*	Трансмемебранен адапторен фосфопротеин	[88]
rs2427345	20q13	*GATAS* и *CABLES2*	Циклин зависима киназна регулаторна активност	[88]
rs5759167	22q13	*BIK/TTLL1*	Апоптоза индуциращ BCL2-взаимодействащ белтък /Член на семейството на туболин тирозин лигазо подобните белтъци	[103]
rs2405942	Xp22	В интрон на *SHROOM2*	Амилорид-чувствителна натриево канална активност, бета-катенин свързващ	[88]
rs5945619	Xp11	*NUDT11*	Дифосфоинозитол- полифосфат дифосфатазна активност, хидролазна активност и свързващ метални йони белтък	[81, 108]
rs591943	Xq12	Андрогенов рецептор	Андроген рецепторна регулация	[89]

1.5.1.3. Редки варианти в средно пенетрантни гени

Таргетният мутационен анализ на кандидат гени доведе до откритието, че част от случаите на РП се дължат на герминативни мутации в гени със средна пенетрантност. Сред тях водеща роля имат *BRCA* гените, които участват в поправката на двойноверижните скъсвания в ДНК чрез хомоложна рекомбинация, както и в други важни процеси, свързани с поддържане на геномната стабилност. Мутациите в тези гени са асоциирани с фамилния рак на гърдата и яйчниците [65].

BRCA2

Герминативни мутации в *BRCA2* гена присъстват в 2% от пациентите с РП, диагностицирани преди 55 годишна възраст [65]. **Мъже с мутации в този ген имат 5 пъти по-висок риск за развитие на РП в сравнение с мъжете без мутация**. Рискът се повишава до над 7 пъти в семейства с ранно начало на заболяването [122, 123]. Различни изследователски групи установяват, че носителите на *BRCA2* мутации имат по-агресивен простатен карцином и по-лоша прогноза в сравнение в пациенти без мутации в този ген [124-127].

BRCA1

Носителите на мутации в *BRCA1* гена също имат повишен риск (приблизително 3.8 пъти) за развитие на РП до 65 годишна възраст в сравнение с общата популация. **Според Breast Cancer Linkage Consortium за мъжете носители на *BRCA1* мутации относителният риск за развитие на РП преди 65 годишна възраст е 1.82, а при тези над 65 годишна възраст рискът е както този за общата популация**. Към настоящия момент значението на *BRCA1* мутациите като прогностичен фактор за РП е все още неизяснено [128].

Други гени, участващи в ДНК поправката

Освен *BRCA* гените, изследвана е ролята и на други гени, участващи в ДНК поправката като *PALB2, BRIP1, PMS2, CHEK2* и *NBS1* за предразположеност към РП. Тъй като асоциация на мутации в тези гени със заболяването е намерена само в някои популации и няма възпроизведими резултати, към настоящия момент те не могат категорично да бъдат асоциирани с повишен риск за развитие на РП [129-131].

Lynch синдром

Известно е, че мъжете с Lynch синдром имат повишен риск за развитие на РП. Lynch синдромът се дължи на герминативни мутации в *MMR* гените - *MLH1, MSH2, MSH6* и *PMS2,* кодиращи белтъчни фактори от репарационната система за поправка на несъответствията (Mismatch Repair). При носителство на мутации в тези гени колоректалните карциноми са преобладаващият фенотип със 70% вероятност за развитие на заболяването на 70 годишна възраст, но съществува повишен риск и за развитие на тумори извън дебелото черво. като ендометриум, яйчници, стомах, уринарен тракт, простата и др. Рискът за развитие на простатни карциноми при мъже със синдром на Lynch е наблюдаван в няколко скорошни проучвания [132, 133]. **Grindedal и съавтори установяват, че кумулативният риск за развитие на РП на 70 годишна възраст при мъжете носители на мутации в *MMR* гените е 30% в сравнение с 9% за общата популация [131]**.

HOXB13

HOX гените играят важна роля в органогенезата на гръбначните и мутации в тях са наблюдавани при различни конгенитални (вродени) малформации [134]. *HOXB13* е ген, кодиращ транскрипционен фактор, който е жизнено важен за ембрионалното развитие на простатата, но запазва високи нива на експресия в нормални простатни жлези на възрастни [135]. *HOXB13* взаимодейства с ДНК свързващия домен на андрогеновия рецептор и понижава неговата експресия [136]. След финно картиране на хромозомен локус 17q21. Ewing и съавтори откриват, че герминативната мутация G84E (rs138213197) в *HOXB13* води до повишен риск за развитие на наследствен РП [77]. Асоциацията на *HOXB13* G84E мутацията с РП е валидирана и в други проучвания [137-139]. **Приблизително 5% от семействата с РП, главно с европейски произход, са носители на този вариант** [137]. Няколко проучвания предполагат, че G48E мутацията произлиза от скандинавските популации [140-142]. Честотата на тази мутация е значително по-висока при пациентите с РП в сравнение с незасегнатите мъже в общата популация и относителният риск за развитие на РП при носителите на мутацията варира между 3.3 и 20.1 в различните проучвания [77, 137, 140, 143-146]. В допълнение е установено, че мутиралият *HOXB13* увеличава риска за развитие на РП и в Китайската популация [147]. В тази популация е открита друга мутация G135E, която се среща 5 пъти по-често при пациенти с РП в сравнение със здрави контроли.

1.5.1.4. Други гени показали асоциация с РП в проучвания от типа случаи-контроли

Андрогените са изключително важни за развитието на простатната жлеза, но също така се предполага, че те играят роля и в простатната карциногенеза. Различни епидемиологични изследвания показват, че серумните нива на андрогените повлияват риска за развитие на РП при някои популации. Афро американците имат по-високи нива на серумен тестостерон и по-висок риск за развитие на РП за разлика от представителите на японската популация, при които рискът е нисък и се наблюдават ниски серумни нива на тестостерон. Също така е установено, че мъже с 5-алфа редуктазен дефицит не развиват РП и това заболяване много рядко възниква при мъже кастрирани преди пубертета или малко след него. Според епидемиологичните проучвания андрогените имат директно или индиректно влияние върху трансформацията на нормалните простатни тъкани в туморни [148]. В различни проучвания е наблюдавана асоциация между риска за развитие на РП и еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs) в гени, участващи в метаболизма на стероидните хормони [149-152], което дава допълнителни познания за генетичната основа на това заболяване. Някои от тези гени са представени в Таблица 1.3.

Хроничното възпаление играе важна роля за развитието на различни онкологични заболявания като рака на стомаха, рака на пикочния мехур, рака на черния дроб и рака на дебелото черво [153]. Предположено е, че то играе роля и в етиологията на РП [154]. В подкрепа на това предположение е открито, че полиморфизми в гените *MSR1*, *RNASEL* и *TLR4*, участващи във вродения имунен отговор при инфекции са асоциирани с РП [155-157].

Друг рисков фактор, модифициращ риска за развитие на РП е западната диета, богата на мазнини. Алфа метилацил CoA рацемазата (AMACR) метаболизира мастните киселините от диетата и е доказан тъканен биомаркер при РП с повишена експресия в туморите [158, 159]. Установено е, че полиморфизми в този ген модифицират риска за развитие на РП [160].

Ангиогенезата е друг важен път, засегнат в туморната прогресия. Ремоделирането на кръвоносните съдове осигурява кислород и хранителни вещества необходими за туморния растеж и прогресия. Докладвана е корелация между плътността на микросъдовете и прогресията на простатните тумори и е установена промяна в експресията на ангиогенните фактори асоциирана с клиничния стадий, Gleason score, с развитието на метастази и преживяемостта. Процесите на ангиогенеза се регулират от взаимодействието между активаторите: VEGF, EGF, интерлевкини, NOS, TGF-β, TNF-α, тромбоцитния растежен фактор, матриксни металопротеинази и инхибиторите: ендостатин, тромбоцитен фактро-4, тумастин, тромбоспондин-1, инхибитора на плазминогенния активатор, ангиостатин. Няколко проучвания показват, че полиморфизми в някои от гените, регулиращи ангиогенезата са свързани с повишен риск за развитие на РП (Таблица 1.3) [161].

Циркадните ритми регулират дневните осцилации на голям брой физиологични, метаболитни и поведенчески процеси. Нарушаването им разстройва физиологични и биохимични прецеси, което може да доведе до туморогенеза. Няколко епидемиологични изследвания показват, че нарушаването на циркадните ритми вследствие на честа смяна на часовите зони (като при пилотите), нощните смяни, супресирането на мелатонин чрез експозиция на светлина през нощта, нарушения в съня са свързани с повишен риск за развитие на РП [162]. Гените, регулиращи циркадните ритми функционират като тумор супресори или онкогени, тъй като участват в клетъчната пролиферация, апоптоза, контрол на клетъчния цикъл и отговора към ДНК увреждания. Например експресията на p53 се регулира от циркадния часовник, а главния циркаден регулатор, казеин киназа I, инициира

клетъчната пролиферация и туморогенеза. При РП е установено, че циркадните ритми регулират и метаболизма на андрогените и полиморфизми в гени, участващи в тяхната регулация са асоциирани с риска за развитие на това заболяване [163]. В Таблица 1.3 са представени част от гените, участващи в регулацията на циркадните ритми асоциирани с РП.

Друга важна стъпка в карциногенезата е нарушаване на адхезията. Един от гените, имащ ключова роля в адхезията е *CDH1* – Е кадхерин. Полиморфизми в този ген, повлияващи активността му, показват асоциация с РП в няколко проучвания [164].

В хода на карциногенезата се наблюдава значителна промяна в експресията на редица гени, включително и на тези, кодиращи микроРНК-ите. микроРНК-ите регулират експресията на тумор супресори и онкогени и по тази причина имат роля в туморната инициация и прогресия. Установено е, че приблизително 50% от гените за микроРНК-ите са локализирани в хромозомни региони, асоциирани с малигнени заболявания. Много епидемиологични изследвания демонстрират асоциацията на полиморфизми в микроРНК гените с развитието и прогресията на онкологичните заболявания, включително и РП [165].

Таблица 1.3. Някои гени показали асоциация с риска за развитие на РП в проучвания от типа случаи-контроли

Ген	Участие в клетъчни пътища	Референция
AR	Метаболизъм на стероиди	[166].
CYP1B1		[167, 168]
CYP17		[169, 170]
CYP19		[171, 172]
SRD5A2		[173]
VDR		[174, 175]
RNASEL	Имунен отговор. Защита към инфекции	[176]
TLR4		[177, 178]
AMACR	Метаболизъм на липиди	[160, 179]
miR-146a	Епигенетична регулация	[180]
miR-196a2		[181]
miR-499		[181]
VEGF	Ангиогенеза	[182]
HIF1A		[183]
ecNOS		[184]
FGF4		[185]
IGF1		[186]
CDH1	Адхезия	[164, 187, 188]
TIMELESS	Циркаден ритъм	[162]
NPAS2		[162]
PER3		[162]
CSNK1E		[162]
CLOCK		[189]
CRY1		[189]
CRY2		[189]

1.5.1.5. Соматични мутации при РП

Различни генетични събития могат да съпровождат туморогенезата. Герминативните варианти присъстват във всички клетки на тялото. За разлика то тях соматичните мутации възникват в простатните клетки и включват мутации, водещи до активация на онкогени и загуба на функции на тумор супресорни гени. Разнообразни механизми водят до соматични промени. Структурните лезии са чести при РП и водят до геномни пренареждания, включително амплификации, делеции или транслокации на сегменти от хромозоми. Хромозомните пренареждания могат да доведат до генни фузии. Точковите мутации възникват по-рядко при РП [190].

Промени в онкогенни пътища, срещащи се и при други видове рак

Фосфоинозитид- 3- киназния (PI3K) път

Този път е сред най-често засегнати сигнални пътища в онкогенезата. Активира се от промени в няколко различни сигнални компонента и засяга клетъчната пролиферация, оцеляване и инвазия. Мутации в PI3K пътя се срещат в приблизително 25-70% от простатните тумори като при метастази тяхната честотата е по-висока [190]. **Делеции в туморсупресорния ген *PTEN* (фосфатаза и тенсин хомолог) се срещат в около 40% от първичните тумори, а инактивиращи мутации в около 5-10% от тях** [191-194]. Функционални изследвания в моделни системи многократно потвърждават ролята на *PTEN* като важен туморсупресор при РП [195-197]. Амплификации и точкови мутации в *PIK3CA* гена, кодиращ каталитичната субединица на PI3K също водят до свръх активация на сигналния път. Амплификациите в този ген се срещат в около 25% от простатните тумори, а активиращите точкови мутации - в около 5% от тях [191{Chen, 2011 #128, 196]. По-рядко са наблюдавани мутации и в други гени от PI3K сигналния път като: *PHLPP1*, *MAGI2, CDKN1B, GSK3B* [191, 196, 198-201].

Ras/Raf/MAPK сигнален път

Свръхактивиране на компонентите на MAPK сигналния път се среща често при метастази на РП, но соматични мутации са наблюдавани рядко [202]. При РП се откриват редки фузионни гени, включващи *KRAS, RAF1,* и *BRAF* [203-205].

p53

Туморсупресорът p53 (*TP53*) е най-често мутиралия ген при рак [206]. Делеции в този локус са наблюдавани в приблизително 25-40% от простатните тумори, а точкови мутации в 5-40% тях [190].

Rb

RB1 генът, кодиращ ретинобластомния белтък Rb, рядко е делетирал в локализираните простатни тумори, но е инактивиран в повече от 45% от кастрационно резистентните простатни тумори [205]. Скорошни данни показват, че Rb модулира андроген рецепторното сигнализиране и инхибира прогресията към кастрационна резистентност [207].

MYC

MYC генът кодира транскрипционния фактор c-Myc с множество таргетни гени, който води до прогресия на клетъчния цикъл, клетъчно оцеляване и туморогенеза. Намира се в хромозомен локус 8q24 и често е амплифициран при РП [190].

Мутации в гени, участващи в хроматиновата регулация

Дисрегулацията на протеини, участващи в хроматиновата регулация, може да има широкообхватни клетъчни последствия, засягащи геномния контрол на генната експресия,

ДНК поправката и поддържането на геномната стабилност. В простатните тумори са идентифицирани мутации в гени като *KDM6A*/*UTX*, *MLL2*, *MLL3* и *EZH2*, които участват в модификацията на хистоните [206].

Промени, специфични за РП

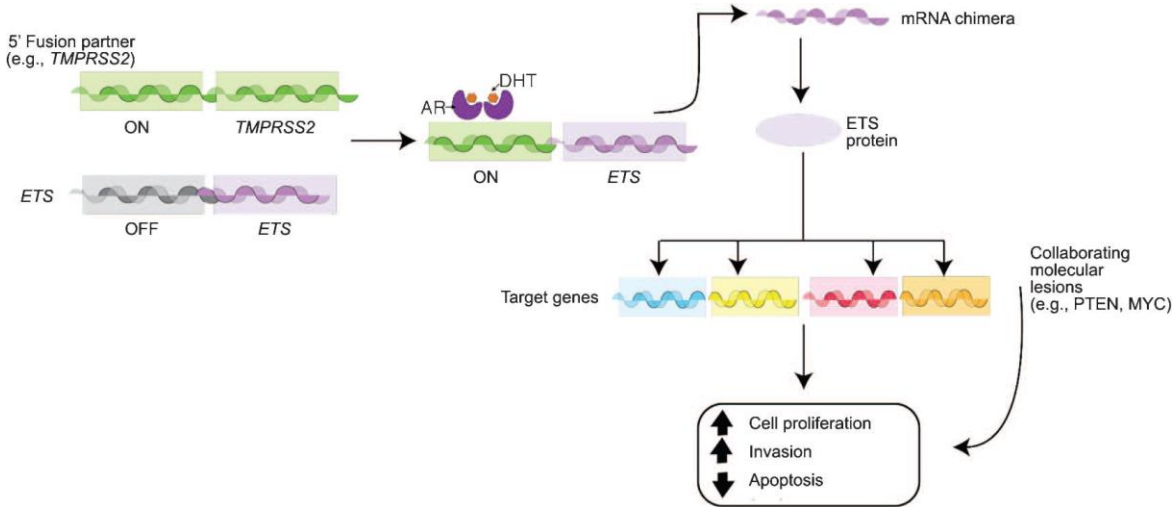
Лезии, засягащи андроген - сигнализацията

Наблюдаваната регресия на РП при пациенти след проведена кастрация доведе до заключението, че андрогеновата сигнализация играе важна роля в патогенезата на РП**.** В *AR* гена са наблюдавани точкови мутации, амплификации и промени в сплайсинга, водещи до конститутивна активност на рецептора, предимно при метастатичен кастрационно резистентен РП [208-211]. **Амплификации на *AR* се срещат в 46%, а точкови мутации в около 10% от третираните метастатични тумори, но тези лезии отсъстват в локализираните простатни тумори [202]**. Това показва, че *AR* няма роля в патогенезата на РП и мутации в този ген възникват по време на лечението като механизъм, водещ до резистентност към терапевтици, действащи върху андрогеновата ос [190]. Наблюдавани са и мутации в гените *NCOA2*, *EP300*, *NCOR2*, чиито продукти взаимодействат и модулират активността на AR [191, 199, 202, 212]. За разлика от *AR*, дерегулация или мутации в тези гени се наблюдават както в първичните простатни тумори, така и в метастазите.

ETS генни фузии

Първоначално хромозомните аберации са се считали за основна характеристика само на левкемиите, лимфомите и саркомите. Днес е известно, че по-малко от 1% от хромозомните пренареждания, водещи до заболявания, се срещат в епителните тумори (карциномите), които са най-честите човешки тумори, допринасящи за голяма част от заболеваемостта и смъртността, асоциирани с рака [213]. Драстично се променят възгледите за биологията на туморите след откритието на фузионните ETS транскрипционни фактори в простатните тумори от Tomlins и колеги [214].

Най-често срещаната фузия в простатните тумори е между гените *TMPRSS2* (21q22.3) и *ERG* (21q22.2), с честота около 50% [215]. Функциите на тази фузия за развитието на РП са представени във Фигура 1.9. Над 10 андроген регулирани гени като *TMPRSS2* са идентифицирани като 5’ фузионни партньори на *ETS* гените като: *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*, *FLI1* [216, 217]. Пренаражданията, включващи *ETS* гените са с честота от 27 до 79% в радикални простатектомии и биопсии [216].



Фигура 1.9. Функции на ETS фузиите при РП.

Когато фузия се случи между TMPRSS2 и ETS ген, TMPRSS2- 5’ промотора активира транскрипцията при наличие на андрогени и в някои случаи, на естрогени. Химерният транскрипт кодира скъсена версия на ETS

транскрипционния фактор. Свръхекспресията на ETS гените в простатната жлеза води до повишаване на клетъчната пролиферация, инвазия и инхибиране на апоптозата. Смята се, че кооперативни молекулярни събития също са важни за прогресията на РП **[213]**.

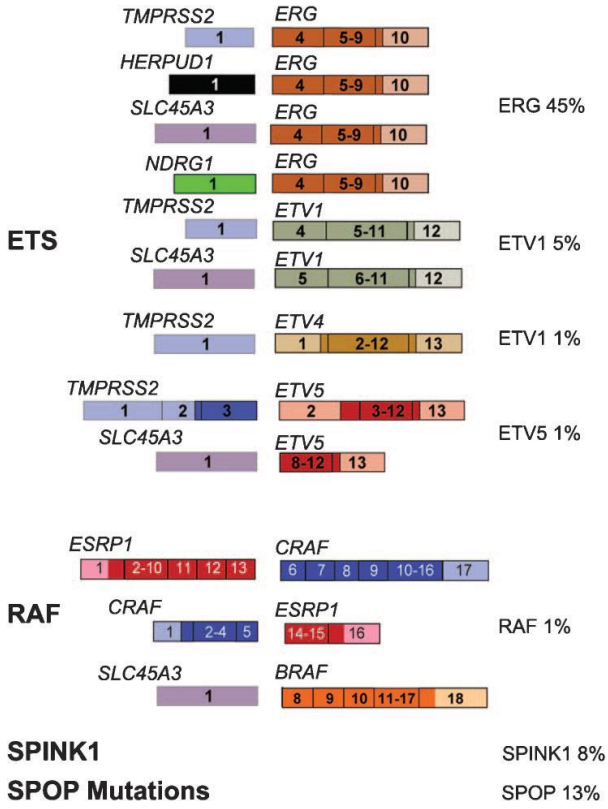
При РП се наблюдават и фузии, които не засягат *ETS* гените. Rubin и съавтори разработват система за класификация на откритите фузии, представена на Фигура 1.10. Тяхната класификационна система се състои от следните категории: 1) фузии, засягащи членовете на ETS транскрипционните фактори (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5* и *ELK4*); 2) фузии, засягащи RAF киназното семейство; и молекулярни събития, взаимоизключващите се с ETS пренаражданията при простатни тумори като 3) мутации, водещи до свръхекспресия на *SPINK1* и 4) *SPOP* мутации [213].

SPOP мутации и CHD1 делеции

Мутации в *SPOP* гена представляват най-честите точкови мутации в първичните простатни тумори с честота от 6-15%, наблюдавана в множество независими кохорти [191, 200, 212]. *SPOP* кодира субстрат, разпознаващ компонент на Циклин-3- базирана Е3-убиквитин лигаза и мутациите в него са открити главно в субстрат-свързващата цепнатина [206]. Един важен субстрат на SPOP е коактиваторът на AR - SRC-3. Дивият тип SPOP се свързва към SRC-3 и го разгражда, а мутантният SPOP губи тази способност и това води до увеличаване на андрогеновата сигнализация [218]. ***SPOP* мутациите не се срещат в тумори с *TMPRSS-ERG* фузия, а така също и в тумори с промени в PI3K сигналния път и с мутации/ делеции в *TP53* [191, 212]. *SPOP* мутациите обаче се срещат често в тумори с делеции на *CHD1* (5q21) и 6q21** [191]. *CHD1* кодира хромодомен хеликаза-ДНК свързващ белтък, който ремоделира хроматина и участва в регулацията на транскрипцията. Този ген е делетирал в около 10-15% от първичните и метастатични тумори без ETS пренареждания [191, 219] и води до повишаване на геномните пренареждания [220].

SPINK1

Сериновият пептидазен ихибитор Kazal type 1 (SPINK1) е секреторен белтък, свръхекспресиран в ETS-негативни тумори [216]. Свръхекспресията му е асоциирана с намаляване на периода на преживяемост без развитието на биохимичен рецидив [221].



Фигура 1.10. Класификация на фузионните гени при РП.

От класификацията са изключени фузиите с честота по-малка от 1%. Включени са и два допълнителни нефузионни класа молекулярно генетични промени, срещани при тумори без ETS пренареждания: SPINK1 и SPOP мутации **[**213**].**

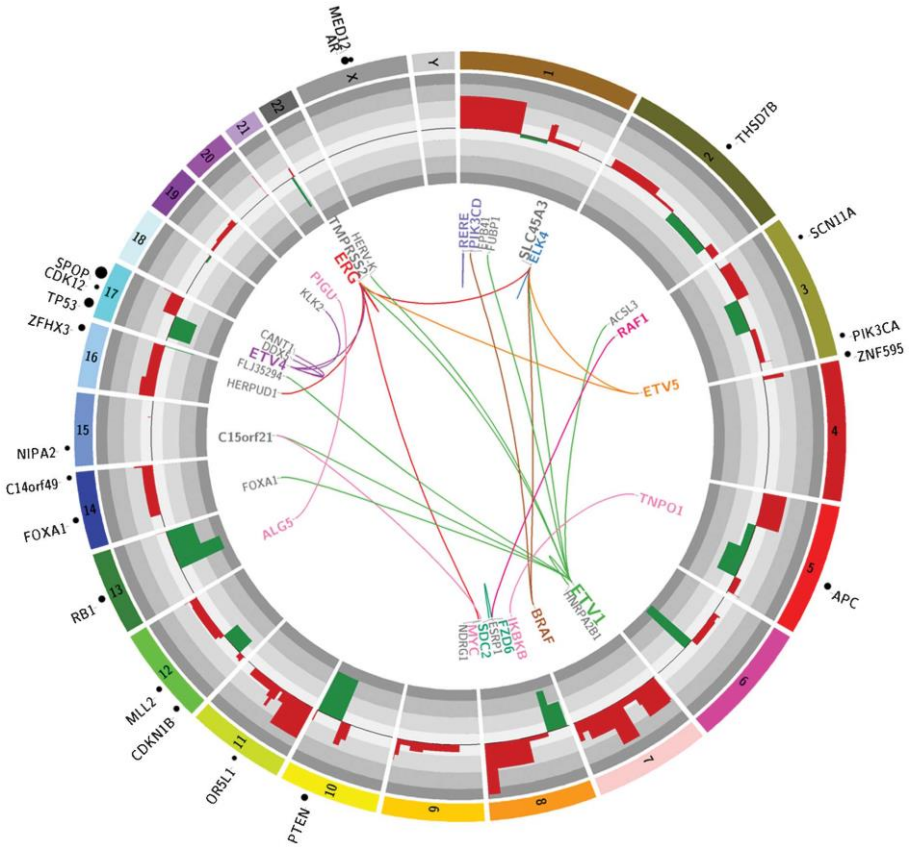
1.5.1.6. Вариации в броя копия - чести геномни високо хетерогенни промени при РП. Хромотрипсис

Аберациите, които водят до промяна в броя копия са чести, но изключително хетерогенни при РП [222].

Най-честите амплификации са следните: 1q, 2p, 7p, 8q, 9p/q, 14q, 16p, 17q, 20q и Xq, а най-честите делеции са наблюдавани в следните хромозомни региони: 2q, 4p/q, 5q, 6q, 8p, 10q, 12p, 13q, 16q, 17p/q, 18q, 21q и 22q (E13,E14).

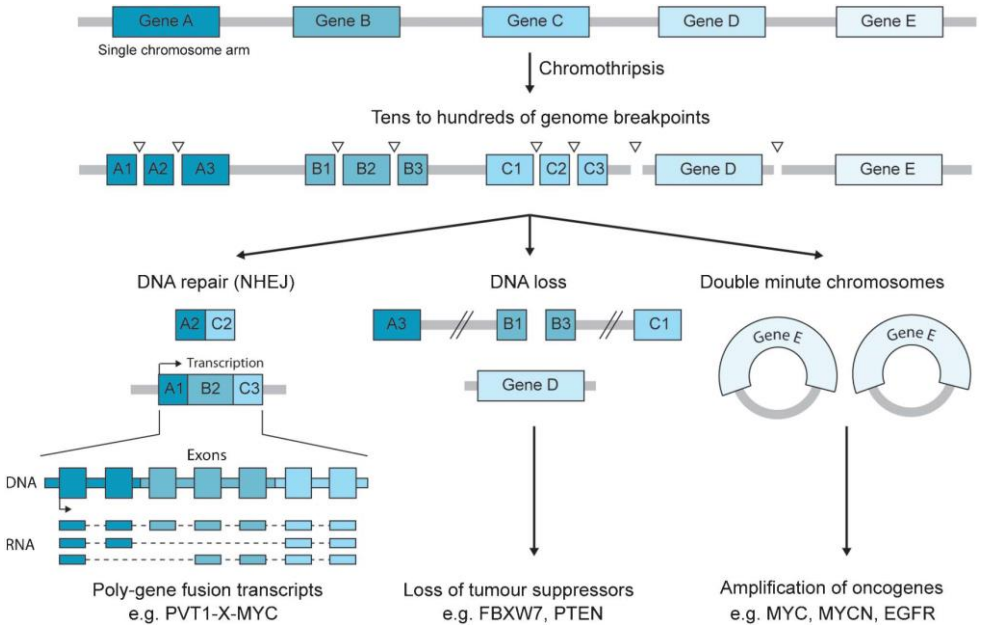
Едно скорошно поучване, обединяващо 372 простатни туморни генома от публикувани данни, използващо системен метод за идентифициране на таргети при рак, открива 90 региона, които често са засегнати при РП (73 амплификации и 17 делеции) – Фигура 1.11 [223].

При цялостен преглед на публикуваните aCGH данни за 17 различни онкологични заболявания се установява, че РП има най-високата честота на хромотрипсис (5.6%). Хромотрипсисът се характеризира с комплексни небалансирани геномни пренареждания, възникващи в единична клетка (Фигура 1.12) и може да инициира туморогенеза чрез едновременното делетиране на туморсупресори и създаването на онкогенни пренареждания (засягащи например *MYCN* или *EGFR*). Въпреки че съществуват проучвания, показващи връзката между хромотрипсиса при някои онкологични заболявания с неблагоприятната прогноза (множествена миеолома, остра миелоидна левкемия, невробластома), клиничните последствия на хромотрипсиса при РП все още не са изяснени [222].



Фигура 1.11. Често срещащи се молекулярни промени при РП.

Кръгова диаграма, показваща 90 хромозомни аберации от анализа на 372 простатни тумора (със зелено са обозначени делециите, а с червено- амплификациите). Мутиралите гени, открити в изследвания на големи туморни кохорти са представени като черни точки като размерът на точките е пропорционален на честота на докладваните мутации. Откритите фузии са представени във вътрешността на кръговата диаграма [222].

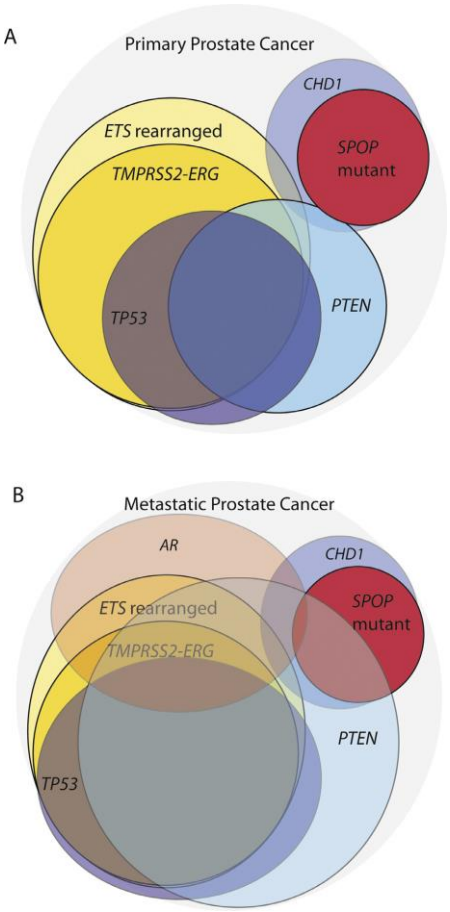


Фигура 1.12. Хромотрипсисът създава комплексни геномни пренареждания, които могат да бъдат онкогенни.

По време на хромотрипсис десетки до стотици разкъсвания могат да се формират в единично хромозомно рамо, създавайки фрагменти ДНК. Тези фрагменти след това неправилно се

поправят чрез нехомоложно свързване на краищата (NHEJ) и това води до фузия на множество гени и до делеция на други, включително туморсупресорни. Двойни малки хромозоми, съдържащи онкогени, могат да бъдат формирани и впоследствие амплифицирани. Транскрипцията от реконструираните фрагменти от гени може да доведе до получаването на полигенни фузионни транскрипти [222].

Въз основа на познанията за мутационните събития може да се разработи класификация на простатните тумори, представена във Фигура 1.13. **Установяването на последователността на геномните събитията при РП може да спомогне за идентифицирането на промените, асоциирани с инициирането на туморогенезата и с прогресията**. *ERG* пренареждания, например, са били наблюдавани в HGPIN (High Grade Prostate Intraephitelial Neoplasia), често намираща се в съседство с инвазивни простатни тумори [220]. *SPOP* мутациите също са открити в HGPIN и са наблюдавани само в ETS негативни тумори [191]. За разлика от тези открития, лезии в *PTEN*, *RB1*, *TP53* и *AR* са по-често срещани при тумори в напреднал стадий. Васа и съавтори установяват, че ERG пренареждания, делециите в *NKX3-1* (туморсупресорен ген, кодиращ простатно специфичен транскрипционен фактор) и мутациите в *SPOP* и *FOXA1* са най-ранните събития в простатната туморогенеза, последвани от лезии в *CDKN1B*, *CHD1* и *TP53*. В крайните стадии на туморогенезата се наблюдава инактивиране на PTEN [224].



Фигура 1.13. Молекулярна класификация на РП. **А)** *Голяма част от първичните тумори притежават ETS пренареждания, от които с най-висока честота е фузията TMPRSS2-ERG. Туморсупресорите PTEN и TP53 са делетирали или мутирали в 20-40% от първичните тумори, като промените в тях значително се припокриват едни с други, както и с ETS пренареждания. SPOP мутациите, които се появяват в приблизително 10% от простатните тумори, са взаимноизключващи се с ETS пренареждания и често - с делециите в PTEN, но са асоциирани с CHD1 делециите.* **В)** *Метастатичните тумори имат значително повишение на лезиите в PTEN и в други участници на PI3K сигналния път, а така също имат и увеличение на геномните пренареждания. Появат се мутации и амплификации на AR, главно при пациенти, подложени на андроген изчерпваща терапия .*

1.6. БИОМАРКЕРИ ПРИ РАКА НА ПРОСТАТАТА

Въвеждането на PSA скрининга доведе до значително подобряване диагностиката на РП, както и до намаляване на смъртността поради това заболяване [225]. Въпреки значителните усилия за откриването на по-надеждни биомаркери, които да изместят PSA, той все още е първа линия биомаркер за детекция на РП [226]. Провеждат се проучвания, които целят да подобрят PSA теста чрез измерване на свободен PSA или скъсени негови форми [227].

1.6.1. Имунохистохимични и експресионни биомаркери

Диагностицирането на РП в хистопатологичните проби се базира основно на комбинация от промени в клетките и архитектурата на тъканите. Морфологията в повечето случаи не е достатъчна за поставянето на сигурна диагноза. Диагностичната точност може да бъде подобрена чрез включване на имунохистохимични биомаркери [228]. Такива биомаркери са високомолекулните цитокератини, p63, AMACR и др. В допълнение имунохистохимичните биомаркери, като например ki67, могат да бъдат използвани за прогноза и предикция. Все повече проучвания обаче насочват своите усилия в търсенето на неинвазивни диагностични, прогностични и предиктивни биомаркери, които могат да бъдат изследвани в урина, кръв, еякулати с цел редуциране броя на ненужните биопсии, за ранно разграничаване на агресивните от неагресивните карциноми и по-бързо и надеждно проследяване на отговора към терапия.

Високомолекулни цитокератини и p63

Инвазивните простатни карциноми нямат базална мембрана и тази тяхна характеристика може да се използва за диагностицирането им. Съществуват антитела срещу високомолекулните цитокератини или цитокератин 5, а така също и срещу p63, които бележат слоя от базални клетки. Тези антитела се използват самостоятелно или в коктейл. Освен карциномите, понякога и доброкачествените лезии, като частичната атрофия, могат да са негативни за високомолекулните цитокератини и p63 [229]. По тази причина имунохистохимичните резултати трябва да се корелират с конвенционалната морфология [228].

AMACR

Алфа-метилацил-CoA-рацемаза (AMACR) е ензим, който играе важна роля в пероксизомното β-окисление на разклонените мастни киселини и техни деривати от млечните продукти и говеждото [230]. Той е участник в процесите на генериране на свободни радикали и по тази причина е заподозрян като един от участниците в патогенезата на простатния карцином – известно е, че оксидативния стрес е основен фактор на канцерогенезата при простатната жлеза [231]. **Наблюдавано е деветократно повишение на експресията на иРНК за *AMACR* в туморни, в сравнение с нормални простатни тъкани**. Повишената експресия на *AMACR* е доказана и на белтъчно ниво чрез имунохистохимични изследвания и Western blot анализи [232]. Имунохистохимичните изследвания показват, че чувствителността на AMACR като биомаркер варира между 80 и 100% при анализ на тънкоиглени биопсии [233]. AMACR показва позитивно оцветяване и при PIN, и в много редки случаи, в доброкачествени лезии като атрофия и аденозис. По тази причина имунохистохимичните резултати трябва да бъдат внимателно интерпретирани като се сравняват с хематоксилин и еозин оцветените биопсични срези [228]. Комбинирането на имунохистохимичните биомаркери p63 и AMACR значително подпомага идентифицирането на малигнените простатни клетки [234, 235]. **Високата**

експресия на *AMACR* и високата му специфичност в детекцията на простатни малигнени клетки, го прави кандидат за използването му като неинвазивен диагностичен биомаркер в урина. Zielie и съавтори демонстрират, че експресията на AMACR, нормализирана към PSA в урина може да се използва за отдиференциране на пациентите с клинично незначим простатен карцином [236]. В последствие Ouyang и съавтори откриват, че позитивната и негативната предиктивна стойност на експресията на *AMACR* в урина са 0.68 и 0.73, съответно. Те правят заключението, че *AMACR* е по-добър биомаркер при откриването на пациентите с РП, в сравнение със серумните нива на PSA. В допълнение, комбинирането на *AMACR* и *PCA3* score повишават чувствителността и специфичността на теста до 81% и до 84%, съответно [237].

Простатно-специфичен мембранен антиген (PSMA)

PSMA е трансмембранен гликопротеин, който се експресира на повърхността на простатните епителни клетки. Неговите нива са повишени в туморни, в сравнение с доброкачествени простатни тъкани, което го прави обещаващ диагностичен биомаркер [238]. **Установено е, че експресията на *PSMA* корелира с туморния стадий, анеуплоидността на туморите и биохимичния рецидив [239]**. При мъже със серумни PSA нива между 4 и 10 ng/ml, без предишни биопсии, е установено, че експресията на *PSMA*, измерена в урина, взета след дигитален ректален преглед, по-надеждно предсказва наличието на рак в сравнение с *PCA3* и *PSGR*. Комбинирането на трите биомаркери води до повишаване чувствителността на теста [240].

Ki-67

Протеинът Ki-67 широко се използва за определяне пролиферативния потенциал на туморните клетки. В множество изследвания е показано, че той е прогностичен биомаркер при пациенти с РП, лекувани чрез радикална простатектомия, радиотерапия или андроген изчерпваща терапия [241]. Имунохистохимичният биомаркер Ki-67 дава и допълнителна прогностична информация, освен тази от Gleason score, PSA нивата и туморното разпространение [241].

GOLPH2 (GOLM1)

GOLM1 (Голджи мембранен протеин 1, известен още като GOLPH2) е резидентен цис-Голджи мембранен протеин с неизвестна функция. Повишена експресия на този протеин е открита в простатни ракови тъкани [242]. **В редица проучвания се докладва, че повишената експресия на *GOLM1* транскрипта може да се използва като надежден диагностичен маркер** [243-245]. Varamblly и съавтори откриват, че в урина експресията на *GOLM1* е по-надежден биомаркер от серумните нива на PSA (AUC-0.622 спрямо 0.495) за детекция на РП (чувстивителност на теста - 59% и специфичност - 71%) [244]. В друго проучване на Laxman и съавтори се установява, че експресията на мултиплексния панел от маркери *GOLM1*, *SPINK1*, *PCA3* и фузията *TMPRSS2–ETS* е по-значим предиктивен фактор за РП, в сравнение с PCA3 score сам по себе си (AUC - 0.758 срещу 0.662), при чувствителност и специфичност на теста 65.9% и 76%, съответно [243].

1.6.2. Епигенетичните промени като биомаркери при РП

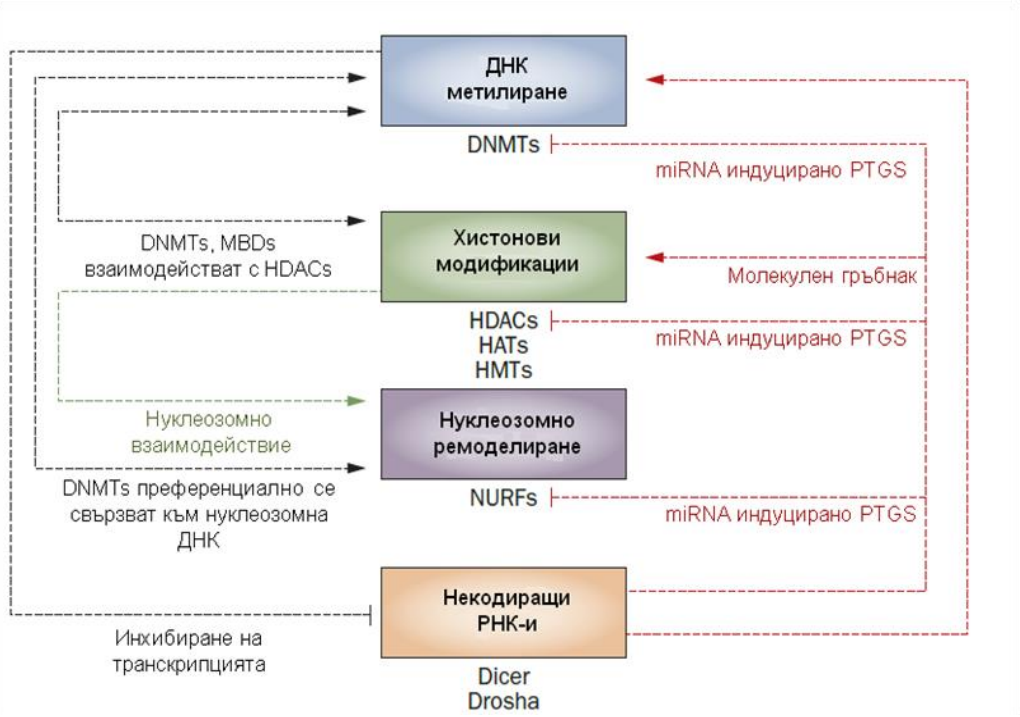
Епигенетичните промени са много чести при РП и се смята, че те допринасят както за развитието на заболяването, така и за неговата прогресия [246, 247]. **Въпреки че не са напълно изяснени точните механизми за възникването на епигенетичните промени при РП, фактът че те се появяват с много по-висока честота от мутациите и са обичайни за премалигнените етапи на заболяването, ги прави много атрактивни**

биомаркери за диагноза, прогноза и отговор към терапия [248]. На Фигура 1.14 са представени различните епигенетични механизми и взаимодействието между тях.

Промоторно хиперметилирани гени при РП

Метилирането на цитозиновите остатъци в CpG динуклеотидите е честа биохимична модификация в еукариотната ДНК. CpG динуклеотидиете не са случайно разпределени, а около 1% от тях се струпват в къси ДНК последователности, формирайки така наречените CpG острови. Промоторно асоциираните CpG острови нормално не са метилирани, с изключение на импринтираните гени и гените, разположени в инактивираната X хромозома при жените [249]. Промоторното хиперметилиране инхибира инициацията на транскрипцията директно (пречи на свързването на транскрипционни фактори) и индиректно (чрез привличане на метил- CpG свързващи белтъци, които взаимодействат с хистоновите деацетилази и хроматин ремоделиращите фактори, водещи до кондензация на хроматина). Нуклеозомното позициониране вероятно също играе роля в дирижирането на глобалното ДНК метилиране [249].

ДНК метилирането представлява най-изучаваната епигенитична модификация при РП. За разлика от РНК и белтъците, ДНК метилирането е относително стабилно дори и в телесни течности, и се среща в добре определени региони, за разлика от ДНК мутациите [250]. Глобалното хипометилиране, което представлява намаляване на нивото на ДНК метилирането, често се свързва с активацията на прото-онкогени и хромозомна нестабилност. Имунохистохимично изследване на простатни туморни тъкани показва значително понижение в глобалните нива на 5-метилцитозин при пациенти с рецидиви в сравнение с пациенти без рецидиви [251]. Ретротранспозонните елементи като LINE-1 и Alu (повторени ДНК елементи), метилирани в нормални тъкани, също са хипометилирани при РП [252, 253]. Едновременно с глобалното геномно хипометилиране при рак е открито и специфично промоторно хиперметилиране на гени, участващи в ДНК поправката, регулацията на клетъчния цикъл, апоптозата и туморната супресия (Таблица 1.4) [254].



Фигура 1.14. Различните лица на епигенетиката. *Съществува кооперативно взаимодействие между ДНК метилирането, хистоновите модификации, нуклеозомното ремоделиране и*

некодиращите РНК-и като микроРНК-ите (miRNAs). miRNAs могат да инактивират транскрипционно ключови епигенетични ензими. Дългите некодиращи РНК-и (lncRNA) могат да служат като молекулен гръбнак, координиращ хистоновите модификации. От своя страна транскрипцията на некодиращите РНК-и може да се регулира чрез ДНК метилиране. Dicer и Drosha са ензими, участващи в зреенето на miRNAs. Промотор насочвани малки интерфериращи РНК-и могат да индуцират секвенционно зависимо промоторно метилиране и да доведат до генно инактивиране в клетките на бозайниците. Използвани съкращения: DNMT- ДНК метилтрансфераза, HAT- хистонова ацетил трансфераза, HDAC- хистонова деацетилаза, HMT- хистон метилтрансфераза, MBD- белтъци с метил- CpG-свързващи домени, miRNA- микроРНК, NURF- нуклеозомен ремоделиращ фактор, PTGS- постранскрипционно генно замлъкване. Фигурата е адаптирана от Perry et al **[249].**

Таблица 1.4. Гени често метилирани при РП. (Адаптирана от: Jeronimo et al; [247].

Клетъчен път	Гени	Продукти на гените	Честота на метилиране (%)
Хормонален отговор	*AR*	Андрогенов рецептор	15-39
	ESR1	Естроген рецептор 1	19-95
	ESR2	Естроген рецептор 2	83-92
	RARβ2	β2 рецептор на ретиноевата киселина	68-95
	RARRES1	Респондер на рецептора на ретиноевата киселина (TIG1)	55-96
Контрол на клетъчния цикъл	*CCND2*	Циклин D2	32-99
	CDKN2A	Циклин зависим киназен инхибитор 2A (p16)	3-77
	RPRM	Репримо	-
	SFN	Стратифин (14-3-3 сигма)	99
Сигнална трансдукция	*DKK3*	Дикопф 3	68
	EDNRB	Ендотелинов рецептор тип B	15-100
	RASSF1A	Белтък 1 изоформа A на Ras асоциираното семейство	53-99
	RUNX3	Runt- свързан транскприционен фактор	24-44
	SFRP1	Секретиращ се frezzled свързан протеин 1	83
Туморна инвазия	*APC*	Фамилна аденоматоза полипозис	27-100
	CAV1	Кавеолин 1	90
	CDH1	E-кадхерин	27-69
	CDH13	Кадхерин 13	45-54
	CD44	Клъстер диференциращ антиген 44	19-72
	LAMA 3	α-3 ламинин	44
	LAM C2	γ-3 ламинин	41
	TIMP3	TIMP металопептидазен инхибитор 3	0-97
ДНК поправка	*GSTM1*	Глутатион S-трансфераза M1	58
	GSTP1	Глутатион S-трансфераза P1	79-95
	GPX3	Глутатион пероксидаза 3	93
	MGMT	O-6 метилгуанин ДНК метилтрансфераза	0-76
Апоптоза	*ASC*	Апоптоза асоцииран Speck подобен белтък, съдържащ CARD	37-78
	BCL2	B клетъчна лимфома 2	52-87
	DAPK	Death- асоциирана киназа	0-36
Други	*MDR1*	Рецептор 1 за множествена лекарствена резистентност	51-100
	PTGS2	Простагладин ендопероксидаза синтетаза 2	18-88
	HIC	Хиперметилиран при рак	99-100

***GSTP1* е най-широко изследвания епигенетичен биомаркер при РП**. Той е част от семейството на глутатион-S трансферазните мултифункционални ензими, които

конюгират реактивни субстрати с редуциран глутатион и участват в детоксикацията и предпазването на ДНК от оксиданти [255]. **Промоторно хиперметилиране на *GSTP1* се среща в около 90% от простатните тумори, в около 2/3 от HGPIN и не се среща или е изключително рядко в простатни тъкани от пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия**. Това го прави потенциален биомаркер за РП [256-259]. Според едно проучване ДНК метилирането на *GSTP1* може да се открие и в 50% от еякулатите, в 82% от серума и в 36% от урината на пациенти с РП [260]. Като цяло метилирането на *GSTP1* варира в отделните изследвания: между 70 и 100% в биопсии [259, 261, 262], и между 18.8% и 83.2% в урина [260, 263-268] на пациенти с РП.

За да се подобри диагностичната точност *GSTP1* като биомаркер, той е включван в панели с други промоторно хиперметилирани гени в тъкан и урина (Таблица 1.5). Комбинирането на *GSTP1* с *APC*, *RASSF1a*, *PTGS2* и *MDR1* в тъкан може да разграничи пациентите с РП от тези с ДПХ, с чувствителност от 97.3-100% и специфичност от 92-100%, съответно [269]. При изследване на метилационен панел от 10 хиперметилирани гени, включващ *GSTP1*, *RASSF1A*, *CDH1*, *APC*, *DAPK*, *MGMT*, *p14*, *p16INK4a*, *RARb2* и *TIMP3* се установява, че тези гени са значително промоторно хиперметилирани в урина при наличие на простатен карцином, с изключение на *p14* и *p16INK4a* [266]. Наблюдавана е корелация на хиперметилирането на *APC*, *RASSF1α* и *RUNX3* с PSA стойностите и Gleason score [251-253, 270].

Таблица 1.5. Диагностични и прогностични биомаркери, включващи промоторно хиперметилирани гени

Промяна	**Гени, които са засегнати**	**Биомаркер-приложение**	**Библио-графия**
Хипометилиране	Глобално ДНК хипометилиране	Прогностичен Ранна детекция	[251, 270, 271] [272, 273]
	IGF2	Ранна детекция	[274, 275]
Хиперметилиране	*GSTP1*	Ранна детекция Диагностичен Прогностичен	[260, 263, 267, 268, 276, 277] [260, 278] [268, 279]
	GSTP1/APC/MDR1	Диагностичен	[280]
	p16/ARF/MGMT/GSTP1	Ранна детекция	[267]
	GSTP1/APC/RARB2/RASSF1A	Ранна детекция	[266]
	GSTP1/APC/RARB2	Ранна детекция Прогностичен	[281] [268, 282]
	GSTP1/PTGS2/RPRM/TIG1	Прогностичен	[283]
	APC	Прогностичен	[284]
	GSTP1/APC/PTGS2/MDR1	Прогностичен Диагностичен	[269, 282] [280]
	PTGS2/CD44	Прогностичен	[285]
	GPR7/ABHD9/Chr3-EST	Прогностичен	[286]
	PITX2	Прогностичен	[287]

Хистонови модификации, асоциирани с РП

Хроматинът е най-високата степен на организация на ядрената ДНК и негова основна единица е нуклеозомата. Нуклеозомата се състои от белтъчно ядро (осем хистона), около което се усуква нишка от ДНК с дължина 147 bp [288]. Хистоните са динамични биомолекули, които участват в регулацията на транскрипцията, поправката и репликацията на ДНК [289]. Структурно хистоните притежават подвижна „опашка", която се подлага на пост-транслационни биохимични модификации като ацетилиране, метилиране, фосфорилиране и др. [290]. Ацетилирането на определени аминокиселини в хистоновите опашки намалява афинитета на хистоните към ДНК, което води до формирането на „отворена" хроматинова конформация, позволяваща осъществяването на транскрипция. Метилирането на хистоните се асоциира едновременно с транскрипционна активация и репресия. Метилирането на лизиновите остатъци в позиции 4, 36 и 79 на хистон H3 (H3K4me3, H3K36me и H3K79me) е характерно за активно транскрибиращите се гени, докато метилирането на лизиновите остатъци на 9-та и 27-ма позиция на хистон H3 (H3K9 и H3K27) и лизин 20 на хистон H4 (H4K20) е характерно за неактивния хетерохроматин [288]. **Глобалните нива на специфични хистонови модификации като H3K9Ac, H3K18Ac, H4K12Ac, H3K4Me2 и H4R3Me2 в първични простатни тумори са анализирани имунохистохимично и е установена корелация между всички хистонови модификации, с изключение на H3K9Ac, и простатния туморен стадий [291]. Нивата на H3K27Me3 значимо се различават между метастатични простатни тумори и не-малигнени простатни тъкани [292].** Съществуват противоречия в изследванията за хистоновите модификации като биомаркери при РП, които вероятно се дължат на ограниченията на имунохистохимията, на различните използвани антитела, както и на различните методи за извличане на антигена [248]. Хистоновите модификации могат да бъдат изследвани в ДНК, изолирана от плазма, серум или в циркулираща ДНК чрез ELISA метода. Установено е, че плазмените нива на H3K27Me3 значително са понижени при пациенти с метастази, в сравнение с пациенти с органно локализиран простатен карцином [293].

Таблица 1.6. Хистоновите модификации като биомаркери при РП

Хистонова модификация	Посока на промяна	Приложение на биомаркера	Библиография
H3ac/H3K9me2	Понижени	Ранна детекция	[294]
H4K20me 1, 2 и 3	Понижени	Прогноза	[295, 296]
H3K27me3	Понижени	Ранна детекция Прогноза	[297]
H3K18Ac/H3K4me2	Повишени	Прогноза	[296, 298]
H3K4me1	Повишени	Прогноза	[294]
H3K27me3	Повишени	Прогноза	[292]

Експресионни промени на микроРНК-и при РП

микроРНК-ите (miRNAs) са обширен клас ендогенни малки некодиращи РНК-и, дълги около 19-23 нуклеотида [299]. Те могат да регулират генната експресия [300] като се

свързват за 3'-нетранслиращите се региони (3'UTR) на матрични РНК-и (информационни РНК-и, mRNA) и индуцират тяхното разграждане или инхибират транслацията [301]. miRNAs са част са от глобалния регулаторен път, наречен РНК интерференция [302]. При човек са описани над 1424 микроРНК-и (E15) и се предполага, че те са отговорни за контрола на експресията на около 1/3 от човешките гени [303]. Те предлагат бърз фино настройващ и енергийно икономичен механизъм за пост- транскрипционен контрол на белтъчната експресия [304]. Поради неперфектната природа на взаимодействията между 3'-UTR на mRNA (иРНК) и miRNA, всяка miRNA може да има няколко различни mRNA мишени и всяка mRNA може да бъде мишена на многобройни микроРНК-и. Така се създава сложна мрежа за контрол на генната експресия [305].

Показано е, че микроРНК-ите регулират основни комплексни биологични процеси като диференциацията, клетъчния цикъл, сигналната трансдукция, апоптозата, имунния отговор и метаболизма. Промяната в тяхната експресия може да доведе до развитието, инвазията и метастазирането на различни видове рак, включително и РП [305, 306] .

Първоначално микроРНК-ите са изследвани в нормална и туморна тъкан (от биопсии или радикални простатектомии) [306-317], в метастази [318, 319] и в клетъчни линии на РП [302, 310, 320-324]. Идентифицирани са диагностични и прогностични панели, които напълно се различават или само частично се припокриват в отделните проучвания. Вероятните причини за това са хетерогенността на първичните тумори по отношение на генетичните им характеристики и метастатичния потенциал, контаминиране с нежелани клетъчни типове или малката изследвана група в някои проучвания. Използването на лазерна микродисекция спомага за по-точно и контролирано сравнение на туморна спрямо нормална тъкан и получаването на по-коректни резултати [325].

За да се преодолеят недостатъците при използването на първичните тумори, много от изследователите започват да анализират микроРНК експресията в кръвни проби (плазма, серум) [24, 300, 326-334] и дори и в урина [327, 335, 336]. Това става възможно, поради необичайната стабилност на miRNAs в телесни течности и лесната им детекция [328].

В Таблица 1.7 са представени част от най-важните изследвания, свързани с анализа на микроРНК-и в тъкани или телесни течности като биомаркери при РП.

Всички проучвания на асоциацията на микроРНК-и с РП показват, че те имат потенциала да влязат в клиничната практика като диагностични и прогностични биомаркери. Те са показали своята роля като онкогени или тумор супресори в зависимост от гена мишена, който регулират. miRNA експресията е динамична и се променя в зависимост от фазата на простатната карциногенеза. Това позволява те да бъдат използвани в бъдеще при персонализираната медицина. Детайлното разбиране на функциите на специфични miRNAs при РП и точното идентифициране на техните ключови мишени, ще бъде изключително важно за развитието на miRNA-базирана терапия. Тъй като miRNAs могат да модулират група от генни мрежи, те могат да се прилагат като терапевтични лекарства, които действат на принципа „с един удар, множество мишени". Необходимо е провеждането на допълнителни валидиращи проучвания преди навлизането им в клиничната практика. За да се подобри клиничната им стойност те биха могли да се комбинират с други биомаркери, асоциирани с РП.

Таблица 1.7. микроРНК-ите като потенциални биомаркери при РП

Дизайн на проучването	Биологичен материал	Диференциално експресирани miRNAs	Библио-графия
Пациенти с метастатичен РП спрямо здрави контроли	Плазма/ серум	miR-141	[326]
Корелация на броя на ЦТК (циркулиращи туморни клетки), PSA, LDH (лактат дехидрогеназа) и miRNA плазмени нива	Плазма	miR-141	[337]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли	Плазма	12 miRNA профил	[327]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли	Плазма	miR-21 и miR-221	[328]
Пациенти с метастатичен спрямо пациенти с локализиран РП	Серум	miRNA-375, miRNA-9*, miRNA- 141, miRNA-200b и miRNA-516a-3p	[329]
Пациенти в трети и четвърти туморен стадий спрямо здрави контроли	Серум	15 miRNA профил	[338]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли	Серум	10 miRNA профил	[331]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли и пациенти с ДПХ	Плазма	let-7e, let-7c, miR-30c, miR-622 и miR-1285	[332]
Пациенти с РП спрямо пациенти с ДПХ и здрави контроли	Серум	miR-26a, miR-32, miR-195 и let-7i но само при сравнение на пациенти с рак спрямо ДПХ	[333]
Пациенти с локализиран рак, с андроген зависим рак, с хормон нечувствителен рак и пациенти с ДПХ	Серум	miR-21 в пациенти с хормон резистентен рак	[300]
Пациенти с агресивен и неагресивен рак	Плазма	miR-20a, miR-21, miR-145, и miR-221	[334]
Пациенти с метастатичен спрямо локализиран карцином	Серум	miR-375, miR-378*, miR-141	[339]
Пациенти с метастатичен РП спрямо здрави контроли	Серум	miR-141, miR-375	[340]
Туморна спрямо нормална простатна тъкан	Радикални простатектомии	miR-125b, miR-145 и let-7c	[311]
Туморна спрямо нормална простатна тъкан	Макродисектирани простатни туморни тъкани	miR-520h, miR-494, miR-490, miR-1(-2), miR-133a(-1), miR-145 и miR-221	[322]
PIN тумори спрямо тумори без PIN	Простатектомии	19 miRNA профил	[312]
Туморна спрямо нормална простатна тъкан след лазерна микродисекция	Простатектомии	miR-23b, miR-145, miR-221 и miR-222	[325]
Туморна спрямо нормална простатна тъкан	Простатектомии	miR-96, miR-149, miR-181b, miR-182, miR-205, miR-375 и др.	[313]

Туморна спрямо нормална простатна тъкан	Формалин фиксирани и включени в парафин тъкани	9 miRNA профил	[341]
Туморна спрямо нормална простатна тъкан	Простатектомии	miR-375, miR-143 и miR-145	[306]
Първични тумори спрямо костни метастази	Тъкан	miR-508-5p, miR-145, miR-143, miR-33a и miR-100	[318]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли	Урина	miR-107 и miR-574-3p	[327]
Пациенти с РП спрямо пациенти с ДПХ	Урина	miR-1825, miR-484	[335]
Пациенти с РП спрямо здрави контроли	Урина	miR-205 и miR-214	[336]

1.6.3. Клинично подобрени лабораторно разработени тестове при РП

Циркулиращи туморни клетки

Циркулиращите туморни клетки (ЦТК) се отриват в кръвообращението и техния брой може да бъде биомаркер, служещ за детекция на рак. Самите клетки също могат да бъдат източник на молекулярна информация, като например наличието и експресията на *TMPRSS2-ERG* фузията, *AR* и *PTEN* [342]. Повишеният брой ЦТК в кръвта на пациенти с кастрационно резистентен простатен карцином е индикатор за лоша обща преживяемост [343, 344]. **CellSearch System (Veridex LLC) е система за детекция на ЦТК, получила одобрение от FDA (Food and Drug Administration, USA) за определяне прогнозата на РП при пациенти с кастрационно резистентен простатен карцином**. Няколко проучвания показват ползата от този тест в клинични изпитвания [345, 346].

ProPSA и Prostate Heath index (Простатен здравен индекс)

ProPSA е про-ензим, съдържащ лидерна последователност от 7 аминокиселини (АК), която се разпознава от ензими и се изрязва, за да се формира активен PSA. Той е форма на свободен PSA (fPSA). От proPSA могат да бъдат изрязани различен брой АК, така че той може да съдържа 5, 4 или 2 АК повече от активния PSA. **p2PSA формата е идентифицирана като най-честата форма в туморни екстракти и това предполага, че може да се използва за ранна детекция на РП и за идентифициране на неагресивните форми на РП** [347, 348].

Простатният здравен индекс (phi) е разработен от Beckman Coulter, Inc в сътрудничество с NCI Early Detection Research Network и е одобрен от FDA през 2012 г. Представлява математическа формула, включваща три биомаркера: p2PSA, fPSA и тоталния PSA (tPSA). **Phi се използва за разграничаване на пациенти с рак от тези с доброкачествени простатни изменения при възраст ≥50 години, тотални серумни PSA нива между 4 и 10 ng/ml, и при нормална находка след дигитален ректален преглед [349]**. Използването на proPSA и phi значително подобрява предиктивната точност при диагностицирането на РП [348].

Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) и Progensa

PCA3 е простатно специфичен ген. Представлява дълга некодираща информационна РНК, чиято експресия е повишена 66 пъти в над 90% от простатните тумори, в сравнение с нормални простатни тъкани [350, 351]. PCA3 представлява обещаващ неинвазивен диагностичен биомаркер, тъй като може да се изследва в урина [352]. **Разработен е Progensa PCA3 тест, който измерва концентрацията на РНК молекулите на PCA3 и PSA в урина, взета след дигитален ректален преглед и изчислява съотношението между двете РНК молекули**. Gen-Probe, Inc получава одобрение от FDA за прилагането на този тест през 2012 г. Тестът е подходящ за мъже, за които се предполага че имат рак въз основа на PSA нивата и/или резултатите от дигиталния ректален преглед и/или имат една или повече биопсии с негативен резултат [353, 354]. Stephan и съавтори обобщават резултатите от проучвания, включващи поне 200 пациенти с потвърдена диагноза след биопсия, при които е използван Progensa PCA3 теста и установяват, че AUC стойностите са около 0.7, с изключение на две изследвания. Чувствителността на теста варира между 44% до 88%, а специфичността между 40% и 81% [355].

Oncotype Dx

Genomic Health Inc предлага Oncotype DX Prostate Cancer Assay, който е разработен за тестване на малки 1 мм формалин фиксирани и включени в парафин тъкани, получени от провеждането на тънкоиглена биопсия. Измерват се нивата на експресия на 12 асоциирани с рака гени, които са представители на 4 различни групи, свързани с: андроген сигналния път (*AZGP1, KLK2, SRD5A2* и *RAM13C*), клетъчната организация (*FLNC, GSN, TPM2* и *GSTM2*), пролиферацията (*TPX2*) и процесите в стромата (BGN, COL1A1 и SFRP4). Определя се и експресията на 5 референтни гена (*ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1, PGK1*), служещи за нормализация и контрол на преаналитичната и аналитичната вариабилност. Получените резултати се комбинират алгоритмично и се калкулира Genomic Prostate Score (GPS) [356]. Тестът подпомага разделянето на пациентите с РП на групи според техния риск и избора на правилна терапия.

Prolaris score

Myriad Genetics, Inc предлага молекулярен тест, който директно измерва растежните характеристики на туморните клетки с цел определяне на риска от прогресия. Тестват се формалин фиксирани и включени в парафин тъкани от биопсии или радикални простатектомии. В теста са включени 46 различни гени, от които 31 са свързани с прогресията на клетъчния цикъл (CCP) и 15 са референтни [357-359]. Проучване на Myriad Genetics открива, че пониженатa експресия се асоциира с нисък риск от прогресия на заболяването, докато повишената експресия е показателна за висок риск от прогресия.

Prostarix

Prostarix е тест, извършващ се в CLIA сертифицирани лаборатории на Metabolon, Inc и се предлага чрез лабораториите Boswick. Разработен е за подпомагане на клиницистите при вземането на решение за провеждане на повторна биопсия при пациенти с нормална находка след дигитален ректален преглед и средно увеличени нива на PSA. Prostarix използва урина, отделена след провеждане на дигитален ректален

преглед и се базира на патентована метаболитна характеристика на 4 метаболита, определени чрез течна хроматография-мас спектрометрия (LC-MS) [360, 361].

TMPRSS2:ERG и Mi-prostate score

TMPRSS2:ERG (на кратко T2-ERG) фузията в урина има ниска чувствителност (37%), но висока специфичност (93%), което дава положителна предиктивна стойност от 94% след провеждане на дигитален ректален преглед. Въпреки че специфичността е висока, повечето простатни тумори са мултифокални (мултилокусни) и хетерогенни по отношение на фузията. За да се преодолее хетерогенността е необходимо включването на други биомаркери. Университетът на Мичиганската система за здравеопазване разработва Mi-Prostate Score теста, който комбинира три биомаркера: PCA3 от Progensa, T2:ERG фузията и серумните PSA нива, за да се оцени риска за развитие на агресивен РП. Тестът е валидиран в приблизително 2000 проби от урина [362-364] Изучавана е и прогностичната стойност на T2:ERG фузията, но съществуват противоречия за асоциацията на фузията с развитието на биохимични рецидиви, с преживяемостта [365-370] и високия Gleason score [363, 366, 371]. T2:ERG фузията обаче показва силна корелация с риска за развитие на висок туморен стадий [365, 366, 371].

ConfirmMDx

ConfirmMDx се предлага от MDxHealth, Inc. и представлява епигенетичен тест, в който се изследва промоторното хиперметилиране на *GSTP1, APC* и *RASSF1* с цел разграничаване на пациентите с истински негативни биопсии от тези, които може да имат скрит, недоказан рак с 90% негативна предиктивна стойност. Използва формалин фиксирани и включени в парафин биопсии. За осъществяването на теста е необходимо да е проведена 12 точкова биопсия. ConfirmMDx се основава на факта, че настъпват молекулярни промени в ДНК на клетките, които са в близост до тумора, така наречения ‘halo effect’ [372, 373].

Prostate Core Mitomic test

The Prostate Core Mitomic тестът се базира на откриването на делеции в митохондриалната ДНК (mtDNA) в простатни биопсии. Тестът цели да установи молекулярни промени в mtDNA в доброкачествена простатна тъкан, която е в близост до неоткрита туморна тъкан. Prostate Core Mitomic тестът класифицира истински негативните биопсии с висока негативна предиктивна стойност от 91% и открива пациентите с неоткрит карцином при биопсия с 84% чувствителност [374, 375].

1.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установените рискови фактори при РП като възрастта, фамилната история и етноса, както и биомаркерите в кръв и урина, подпомагат и допълват PSA теста в скрининга и диагностиката като преодоляват неговата ниска специфичност. Някои от откритите панели от биомаркери могат да бъдат полезни и в разграничаването на агресивните от неагресивните форми на РП. Предстои откриването и на нови биомаркери, които трябва да бъдат оценени според тяхното клинично приложение. Те трябва да спомогнат за редуциране броя на ненужните биопсии/простатектомии; за диференциране на латентните бавноразвиващи се тумори, подходящи за операбилно лечение; за проследяване

прогресията на заболяването и пациентите, които са само на наблюдение; за откриването на микрометастази, неразграничими с образните методи за диагностика; за разработването на таргетна терапия, и за прогнозиране на изхода от проведено лечение. Като цяло новите биомаркери трябва да доведат до намаляване на смъртността и подобряване качеството на живот на пациентите с РП.

Откриването и валидирането на нови биомаркери при РП е трудна задача тъй като, както и други видове тумори, той е силно хетерогенен и мултифокален. В допълнение инициацията и прогресията на РП зависи от множество фактори като: възпаленията и имунната система, генетичните, геномните и епигенетичните промени, теломерното скъсяване, диетата, начина на живот и други, чието взаимодействие е все още неизяснено.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Изследване на генетични фактори асоциирани с рака на простатата при български пациенти и анализ на промоторното хиперметилиране, нивата на експресия на иРНК и микроРНК в различни биологични материали за определяне на тяхната роля като диагностични и прогностични биомаркери.

2.2. ЗАДАЧИ

За изпълнението на поставената цел си възложихме следните задачи:

2.2.1. Подбор на пациенти с РП и контроли с български етнически произход (пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия - ДПХ, популационни контроли съответстващи по пол, възраст и етническа принадлежност на пациентите, млади асимптоматични мъже - МАМ) и събиране на различни биологични материали.

2.2.2. Оптимизиране на протоколите за изолиране на ДНК/РНК от изследваните биологични материали, където е необходимо.

2.2.3. Провеждане на асоциативно проучване с подбрани от GWAS показали асоциация с РП еднонуклеотидни полиморфни варианти разположени в различни хромозомни локуси (7q21, 8q24, 10q11, 11p15, 12q13, 19q13) и финно картиране на хромозомен локус 11p15 за прецизиране на асоциацията с РП получена за този локус.

2.2.4. Провеждане на асоциативно проучване с подбрани от литературата полиморфизми в *AMACR* и в гени, свързани с метаболизма на андроген (*CYP1B1*, *AR*).

2.2.5 Провеждане на генно експресионен анализ на *PCA3* (*DD3*), *PSA* (*KLK3*), *AMACR*, *GSTP1*, *COLPH2* (*GOLM1*) в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ чрез PCR в реално време, TaqMan технология.

2.2.6. Изследване на промоторното хиперметилиране на *GSTP1*, *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина на пациенти с РП и контроли (ДПХ и МАМ) чрез HRM, MethyLight.

2.2.7. Изследване на нивата на експресия на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 в плазма от пациенти с РП и контроли (ДПХ и МАМ) чрез PCR в реално време, SybrGreen технологията.

2.2.8. микроРНК експресионно профилиране в туморни и нормални простатни тъкани чрез микрочипов анализ.

2.2.9. Анализ на получените резултати.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Участниците бяха набирани при рутинен скрининг на пациентите, насочени към Клиниката по Урология, Университетска болница "Александровска", МУ - София за заболяване от простатен аденокарцином както и насочени от специалисти и общопрактикуващи лекари. Биологични проби като кръв и урина бяха взимани и от млади мъже, доброволци след подписване на информирано съгласие.

Клиникопатологичните характеристики на подбраните пациенти и контроли за извършването на отделните проучвания са показани в Таблици 3.1; 3.2; 3.3; 3.4; 3.5; 3.6.

Всички участници в проучването са с български етнически произход.

Таблица 3.1. Клиникопатологични характеристики на пациентите и контролите включени в асоциативните анализи (полиморфизми открити при GWAS и полиморфизмите в гените *CYP1B1, AR* и *AMACR*).

Характеристика	**Пациенти с РП, N = 318 n (%)**	**Контроли с ДПХ, N = 182 n (%)**
Възраст		
Средна възраст	68.71 ± 8.22 SD	67.14 ± 8.41 SD
Минимална възраст	47	48
Максимална възраст	90	86
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП		
≤64	95 (29.87%)	
>64	223 (70.13)	
PSA стойности		
Средни PSA стойности	28.86 ng/ml	4.7 ng/ml
<10 ng/ml	97 (30.50%)	105 (57.69%)
10 - 30 ng/ml	130 (40.88%)	15 (8.24%)
> 30 ng/ml	74 (23.27%)	2 (1.10%)
Липсващи стойности	17 (5.35%)	60 (32.97%)
Gleason score		
≤ 6	94 (29.56%)	
7	113 (35.53%)	
≥8	102 (32.08%)	
Липсват данни	9 (2.83%)	
Туморен стадий		
T1	42 (13.21%)	
T2	142 (44.65%)	
T3	111 (34.91%)	
T4	15 (4.72%)	
Липсват данни	8 (2.51%)	
Лимфни метастази		
N0	219 (68.87%)	
N1	89 (27.99%)	
Липсват дании	10 (3.14%)	
Далечни метастази		
M0	262 (82.39%)	
M1	40 (12.58%)	
Липсват дании	16 (5.03%)	

Таблица 3.2. Клиникопатологични характеристики на пациентите и контролите включени в експресионния анализ на биомаркери в урина.

Характеристика	**Пациенти с РП, N = 54 n (%)**	**Контроли с ДПХ N = 13 n (%)**
Възраст		
Средна възраст	67.31 ± 7.29 SD	67.5 ± 8.45 SD
Минимална възраст	51	52
Максимална възраст	80	82
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП		
≤64	21 (38.89%)	
>64	33 (61.11%)	
PSA стойности		
Средни PSA стойности	14.9 ng/ml	7.9 ng/ml
<10 ng/ml	16 (29.63%)	6 (46.15%)
10 -30 ng/ml	33 (61.11%)	4 (30.77%)
>30 ng/ml	3 (5.56%)	0 (0%)
Липсващи стойности	2 (3.70%)	3 (23.08%)
Gleason score		
≤6	13 (24.07%)	
7	24 (44.44%)	
≥8	15 (27.78%)	
Неизвестни	2 (3.70%)	
Туморен стадий		
T1	8 (14.81%)	
T2	28 (51.85%)	
T3	13 (24.07%)	
Неизвестни	5 (9.26%)	
Лимфни метастази		
N0	45 (83.33%)	
N1	4 (7.41%)	
Неизвестни	5 (9.26%)	
Далечни метастази		
M0	53 (98.15%)	
M1	1 (1.85%)	

Таблица 3.3. Клиникопатологични характеристики на пациентите и контролите включени в анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина.

Характеристика	**Пациенти с РП, N = 64 n (%)**	**Контроли с ДПХ N = 26 n (%)**	**Млади асимптоматични мъже N = 20 n (%)**
Възраст			
Средна възраст	68.13 ± 7.37 SD	65.46 ± 8.6 SD	24.2 ± 5.57 SD
Минимална възраст	51	48	17
Максимална възраст	90	82	34
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП			
≤64	22 (34.38%)		
>64	41 (64.06%)		
Неизвестни	1 (1.56%)		
PSA стойности			
Средни PSA стойности	18.02 ng/ml	10.36 ng/ml	
<10 ng/ml	20 (31.25%)	17 (65.38%)	
10 -30 ng/ml	33 (51.56%)	5 (19.23%)	
>30 ng/ml	7 (10.94%)	1(3.85%)	
Неизвестни	4 (6.25%)	3 (11.54%)	
Gleason score			
≤6	12 (18.75%)		
7	31 (48.44%)		
≥8	21 (32.82%)		
Неизвестни	0 (0%)		
Туморен стадий			
T1	9 (14.06%)		
T2	32 (50%)		
T3	18 (28.13%)		
T4	1 (1.56%)		
Неизвестни	4 (6.25%)		
Лимфни метастази			
N0	54 (84.37%)		
N1	6 (9.38%)		
Неизвестни	4 (6.25%)		
Далечни метастази			
M0	59 (92.19%)		
M1	1 (1.56%)		
Неизвестни	4 (6.25%)		

Таблица 3.4. Клиникопатологични характеристики на пациентите и контролите включени в анализа на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина.

Характеристика	Пациенти с РП, N = 57 n (%)	Контроли с ДПХ N = 29 n (%)	Млади асимптоматични мъже N = 50 n (%)
Възраст			
Средна възраст	66.7 ± 7.41 SD	65.8 ± 8.16 SD	24.4 ± 4.94 SD
Минимална възраст	51	49	17
Максимална възраст	85	83	34
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП			
≤64	24 (42.10%)		
>64	29 (50.88)		
Неизвестни	4 (7.02%)		
PSA стойности			
Средни PSA стойности	43.38 ng/ml	9.75 ng/ml	
<10 ng/ml	10 (17.54%)	17 (58.62%)	
10 -30 ng/ml	26 (45.61%)	10 (34.48%)	
>30 ng/ml	15 (26.32%)	1(3.45%)	
Липсващи стойности	6 (10.53%)	1 (3.45%)	
Gleason score			
≤6	11 (19.30%)		
7	25 (43.86%)		
≥8	19 (33.33%)		
Неизвестни	2 (3.51%)		
Туморен стадий			
T1	19 (33.33%)		
T2	23 (40.35%)		
T3	13 (22.81%)		
T4	0 (0%)		
Неизвестни	2 (3.51%)		
Лимфни метастази			
N0	53 (92.98%)		
N1	2 (3.51%)		
Неизвестни	2 (3.51%)		
Далечни метастази			
M0	54 (94.74%)		
M1	1 (1.75%)		
Неизвестни	2 (3.51%)		

Таблица 3.5. Клинични характеристики на пациентите и контролите включени в експресионен анализ на микроРНК-и в плазма.

Характеристика	Пациенти с РП, N = 59 n (%)	Контроли с ДПХ N = 16 n (%)	Млади асимптоматични мъже N = 11 n (%)
Възраст			
Средна възраст	67.37 ± 8.01 SD	67.5 ± 8.45 SD	26.82 ± 5.25
Минимална възраст	51	55	21
Максимална възраст	83	88	35
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП			
≤64	21 (35.59%)		
>64	38 (64.41%)		
PSA стойности			
Средни PSA стойности	19.43 ng/ml	11.24 ng/ml	
<10 ng/ml	17 (28.81%)	8 (50%)	
10 -30 ng/ml	32 (54.24%)	8 (50%)	
>30 ng/ml	7 (11.86%)	0 (0%)	
Липсващи стойности	3 (5.08%)	0 (0%)	
Gleason score			
≤6	13 (22.03%)		
7	24 (40.68%)		
≥8	22 (37.29%)		
Неизвестни	0 (0%)		
Туморен стадий			
T1	9 (15.25%)		
T2	29 (49.15%)		
T3	18 (30.51%)		
Неизвестни	3 (5.08%)		
Лимфни метастази			
N0	50 (84.75%)		
N1	6 (10.17%)		
Неизвестни	3 (5.08%)		
Далечни метастази			
M0	55 (93.22%)		
M1	2 (3.39%)		
Неизвестни	2 (3.39%)		

Таблица 3.6. Клиникопатологични характеристики на пациентите и контролите включени в микрочиповия експресионен анализ на микроРНК-и в нормална и туморна простатна тъкан.

Характеристика	**Пациенти с РП, N = 19 n (%)**	**Контроли с ДПХ N = 14 n (%)**
Възраст		
Средна възраст	66.84 ± 7.11 SD	66.15 ± 8.69 SD
Минимална възраст	55	48
Максимална възраст	84	77
Начална възраст при поставянето на диагнозата РП		
≤64	8 (42.11%)	
>64	11 (57.89%)	
PSA стойности		
Средни PSA стойности	22.01 ng/ml	9.64 ng/ml
<10 ng/ml	3 (15.79%)	7 (50.00%)
10 - 30 ng/ml	12 (63.16%)	6 (42.86%)
> 30 ng/ml	2 (10.53%)	0 (%)
Липсващи стойности	2 (10.53%)	1 (7.14%)
Gleason score		
Gleason score 6	1 (5.26%)	
Gleason score 7	10 (52.63%)	
Gleason score 8	4 (21.05%)	
Gleason score 9	2 (10.53%)	
Gleason score 10	2 (10.53%)	
Туморен стадий		
T1	1 (5.26%)	
T2	6 (31.58%)	
T3	10 (52.63%)	
T4	2 (10.53%)	
Лимфни метастази		
N0	11 (57.89%)	
N1	8 (42.11%)	
Далечни метастази		
M0	17 (89.47%)	
M1	2 (10.53%)	

3.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

Кръв от пациентите и контролите бе взимана в два вида епруветки: епруветки за кръв с ЕДТА и епруветки за серум. След центрофугиране от тях бяха отделяни плазма и серум за бъдещи молекулярно-биологични изследвания. От кръвта бе изолирана ДНК от 492 пациента с рак на простатата (РП) и 240 контроли с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ). Бяха събрани плазми от 441 пациента с РП и 183 контроли, и серуми от 65 пациента и 5 контроли. Бяха събрани биологични материали и от общо 50 млади асимптоматични мъже (МАМ). От всички бе взета урина, а 11 се съгласиха да дадат и кръв, от която се отдели плазма и се изолира РНК.

С цел дълготрайно съхранение отделените плазми, серуми и изолираните ДНК бяха замразени на -80ºC.

От пациенти с РП (187) и контроли с ДПХ (65), след ректално туширане, беше събирана урина. Част от урината директно замразихме на -80ºC за бъдещи метаболомни проучвания, а от останалата част отделихме клетки, които също замразихме с цел по-нататъшното им използване за изолиране на ДНК и РНК за генетични, епигенетични и експресионни анализи.

При провеждане на трансректално насочвана тънклоиглена простатна биопсия по установените европейски стандарти при ПСА над 4 ng/ml или подозрителна находка при ректално туширане с взимане на 8-12 проби за хистологично изследване бяха взимани и 1-2 допълнителни проби от най-съмнителните зони на жлезата при съответния пациент и поставяни в RNA later, и съхранявани в Центъра по Молекулна Медицина на -80ºC до момента на изолиране на РНК и ДНК. Така бяха събрани биопсични материали от 80 пациента с РП и 32 контроли с ДПХ.

Събрани бяха и тъкани от радикални простатектомии на 65 пациента. Тъканите от радикалните простатектомии бяха поставяни в RNA later и съхранявани на -80ºC подобно на биопсиите.

В проведеното асоциативно проучване бяха включени ДНК-и изолирани от кръв от 318 пациента с РП и 182 контроли с ДПХ.

В експресионния анализ на биомаркери в урина чрез Taq Man технологията бяха включени 54 пациента с РП и 13 контроли с ДПХ. От урината на подбраните проби бе изолирана РНК. Изолираната РНК бе използвана за синтез на кДНК, част от която бе използвана в експресионните анализи, а останалата част бе съхранена за по-нататъшни изследвания.

В проведеното изследване на промоторно хиперметилиране на GSTP1 чрез HRM анализ бяха подбрани урини от 64 пациенти с РП, 26 контроли с ДПХ и 20 МАМ. Анализът на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K1* и *RASSF2* в урина чрез MethyLight анализа включваше урини от 57 пациента с РП, 29 контроли с ДПХ и 50 МАМ. От подбраните урини бе изолирана ДНК. Част от тази ДНК беше използвана за бисулфитно превръщане, а останалата част бе съхранена за по-нататъшно използване. В някои случаи цялото количество ДНК бе изразходено за бисулфитното превръщане.

За експресионния анализ на микроРНК в плазма чрез PCR в реално време бяха подбрани 59 пациента с РП, 16 контроли с ДПХ и 11 МАМ. От изолираната РНК бе синтезирана кДНК, част от която бе използвана за провеждане на експресионния анализ на подбрани микроРНК, а останалата част съхранихме за бъдещи проучвания.

От събраните радикални простатектомии подбрахме 19, а от събраните простатни биопсии на ДПХ контроли подбрахме 14 за микроРНК екпсресионното профилиране чрез микрочипов анализ. От подбраните тъкани изолирахме РНК, част от която използвахме за анализа, а останалата част съхранихме.

Към настоящият момент създадената биобанка в Центъра по Молекулна Медицина съдържа:

- ДНК изолирана от кръв на 463 пациенти с аденокарцином на простатата и 240 контроли с ДПХ;
- Плазмена биобанка от 441 пациенти с РП и 183 контроли с доброкачествена простатна хиперплазия;
- Биобанка за серум на 65 пациенти и 5 контроли
- Биобанка за урина на 187 пациента с РП и 65 контроли с ДПХ
- Тъканна биобанка - биопсии от 80 пациенти с РП и 32 контроли с ДПХ; Радикални простатектомии на 65 пациента;

- Биобанка с урини на 187 пациенти с РП и 65 контроли с ДПХ;
- РНК и кДНК биобанка от урини на общо 67 пациенти и контроли;
- РНК биобанка от биопсии на 14 контроли с ДПХ
- РНК биобанка от радикални простатектомии на 19 пациента
- ДНК биобанка от урини на общо 170 пациенти с РП и контроли с ДПХ, 20 МАМ

Таблица 3.7. Проведени проучвания, вида използван биологичен материал и броя включени пациенти с РП, контроли с ДПХ и МАМ

Проучване	Използван биологичен материал	Брой пациенти с РП	Брой контроли с ДПХ	Брой популационни контроли	Брой МАМ
Асоциативни проучвания на еднонуклеотидни замени в различни хромозомни локуси открити при GWAS*	Венозна кръв	318	182	75	-
Асоциативни проучвания на полиморфизми в *AR*, *CYP1B1* и *AMACR* гените**	Венозна кръв	246	150	107	-
Анализ на експресионни биомаркери *PSA*, *PCA3*, *AMACR*, *GSTP1*, *GOLPH2*	Урина	54	13	-	-
Промоторно хиперметилиране на *GSTP1* чрез HRM анализ	Урина	64	26	-	20
Промоторно хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* чрез MethyLight	Урина	57	29	-	50
Експресионен анализ на let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375	Плазма	59	16	-	11
микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове	Тъкан от радикална простатектомия и биопсия	19	14	-	-

**- Всички еднонуклеотидни полиморфизми освен rs55930300 бяха изследвани в 190 пациенти с РП и 169 контроли, от които 90 са с ДПХ, а останалите 79 са здрави популационни контроли съответстващи на болните по пол, възраст и етническа принадлежност. Популационните контроли бяха избрани от съществуващата ДНК биобанка в Центъра по Молекулна медицина. Полиморфизмът rs55930300 бе изследван в 381 пациенти с РП и 257 контроли, от които 182 са с ДПХ, а останалите 75 са популационни контроли. Генотипирането на всички еднонуклеотидни замени бе осъществено с помощта на TaqMan метода.*

***-Тринуклеотидният повторен полиморфизъм в AR бе изследван чрез фрагментен анализ в 246 пациенти с РП и 261 контроли, от които 150 са с ДПХ и 107 са популационни контроли. Полиморфизмът rs2567206 в CYP1B1 бе генотипиран в 181 пациенти с РП и 168 контроли, от*

които 88 са с ДПХ, а останалите 80 са популационни контроли. Полиморфизмът в AMACR-rs3195676 бе генотипиран в 188 пациенти с РП и 163 контроли, от които 83 са с ДПХ, а останалите 80 са популационни контроли. Полиморфизмите в AMACR и CYP1B1 бяха изследвани чрез TaqMan метода.

3.3. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИТЕ МАТЕРИАЛИ

3.3.1. Обработка на серумите и плазмите

Серумните проби бяха събирани в BD Vacutainer ® SST™ II Advance. Епруветките съдържат силициев двуокис, активиращ кръвосъсирването и гел, който създава бариера между съсирека и серума след центрофугиране. След взимането на кръвта епруветките се обръщаха внимателно 5-6 пъти и се оставяха кръвта да се съсири за около 30 мин преди центрофугиране. Центрофугирането бе извършено на хладилна центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf) на 1300-2000g за 10-15 мин на стайна температура. Отделените серуми се отпипетираха в криоепруветки, които се съхраняваха на -80^{o}C.

Плазмите бяха отделяни от BD Vacutainer К3EDTA епруветки с кръв сходно на серумите. Кръвта след отделянето на плазмите бе използвана за изолиране на ДНК.

3.3.2. Обработка на пробите урина

Урината от пациенти с РП и контроли с ДПХ използвана за молекулярно биологичните анализи е взета след осъществяване на дигитален ректален преглед. Простатният масаж осигурява попадане на простатни клетки в урината.

Възможно е взимане на урина и след осъществяване на биопсия, но не е препоръчително тъй като след тази процедура има голяма вероятност да има кръв в отделената урина.

Урините, които са кървави не бяха включени в изследването.

Част от урината бе директно замразявана, а от останалата част бяха отделени клетки след центрофугиране на 2000g за 10 мин. Към клетките добавяхме RNA later и ги съхранявахме в криоепруветки до използването им за изолиране на ДНК или РНК. ДНК/РНК изолирана от проби урина с налични оксалати се оказа некачествена, тъй като не бе възможно осъществяването на амплификация. За редуциране на оксалатите и тяхното разтваряне, то след утаяване на клетките от урина добавяхме/промивахме с дестилирана вода или PBS. След разтварянето им осъществявахме последващо центрофугиране.

В анализите не бяха включвани проби урина взети от пациенти с катетър, тъй като не може да се гарантира присъствието на простатни епителни клетки.

Проби с концентрация на ДНК под 5 ng/µl не бяха включвани в последвашите анализи.

3.3.3. Обработка на тъканите

Всички събрани тъкани бяха съхранявани в криоепруветки с RNA later (специален буфер за съхранение на тъкани и предпазване на РНК, съдържаща се в тях от деградация).

Тъканите от радикалните простатектомии на пациентите с РП подбрани за изследване бяха макродисектирани, така че да се осигури >70% съдържание на ракови клетки при изолирането. Част от биопсичните материали на контролите с ДПХ бяха използвани за изолиране на РНК. В микроРНК (miRNA) експресионния анализ използвахме нормална тъкан от пациенти с ДПХ, а не съседна нормална тъкан от пациентите с простатни карциноми тъй като е възможно промяна в експресията да съществува и в нормалната тъкан в съседство на туморната, която да е възникнала в резултат на влиянието на раковите клетки.

3.3.4. Изолиране на ДНК

3.3.4.1. Изолиране на ДНК от венозна кръв чрез полуавтоматизирана система Chemagic Magnetic Separtion Module I (Chemagen)

Основни компоненти на системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)-(Фигура 3.1) са подвижен модул и магнитна глава. Върху подвижния модул се поставят: контейнер с чисти накрайници, епруветки с проби и епруветки с поредица от буфери. Магнитната глава носи метални пръчици (родове), които имат способността да се намагнитизират. За изолиране на ДНК се използва специален набор от реактиви, който включва различни буфери, както и магнитни частици (M–PVA Magnetic Beads).

Таблица 3.8. Използвани реактиви

Етап	Компоненти	Количество за 1 реакция (ml)
1	венозна кръв	6-8
	Лизиращ буфер	7-9
	Протеаза	25 µl
2	Свързващ магнитни частици буфер	25
	Магнитни частици	800 µl
Промиване	Миещ буфер 3	15
	Миещ буфер 4	15
	Миещ буфер 5	15
	Миещ буфер 6	22.5
Елуиране	Елуиращ буфер - съдържа 10 мМ Трис – HCl pH=8.0. TE буфер pH=8.0.	500 – 1000 µl

Използвана апаратура:

- Хладилна центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване – Vortex - Press-to-mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell).
- Системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen)

Принцип:

Отделянето на ДНК молекулите от останалите клетъчни компоненти става с помощта на магнитни частици. Магнитните частици се свързват с ДНК молекулите в пробата. При включване на електромагнита на апарата, родовете се намагнитизират и привличат магнитните частици от разтвора. Всеки от тях е снабден с накрайник и магнитните частици (заедно с ДНК молекулите) полепват по външната им страна. Принципът на действие на магнитните частици е следният: магнитните частици съдържат матрица от поливинилов алкохол, който в последствие се карбоксилира, за да може лесно да свързва белтъци, нуклеинови киселини и други амино- лиганди. Магнитните частици с –COOH групи могат да се свързват с полимерни или неполимерни молекули, които съдържат амино групи. Първо задължително условие е активирането на –COOH матрицата. За тази активация pH на средата трябва да бъде между 4.7 и 6. Среда с pH>7.5 е необходимо да бъде избягвана.

Намагнитизираните родове прехвърлят магнитните частици (и свързаните с тях ДНК молекули) през различни промиващи буфери. При потапяне в определен буфер, електромагнитът се изключва, при което магнитните частици се отделят от накрайниците. След това се включва електромоторът, родовете започват да се въртят и по този начин магнитните частици (заедно с ДНК) се диспергират в целия обем на разтвора. След това електромоторът се изключва, а електромагнитът се включва и магнитните частици (заедно

с ДНК) отново полепват по външната страна на накрайника (Фиг 3.2). По този начин свързаната с магнитните частици ДНК се промива в няколко промиващи буфери, след което започва етапа на елуиране на ДНК.

Елуирането протича по следния начин: по време на въртенето на металните родове ДНК молекулите се отделят от магнитните частици и остават в елуиращия буфер. Впоследствие магнитните частици отново полепват по външната страна на накрайниците. Последният етап се състои в автоматично отделяне на използваните накрайници от металните родове. Крайният резултат е получаване на чиста геномна ДНК с висока концентрация.



Фигура 3.1. Общ вид и принцип на действие на полуавтоматизираната система Chemagic Magnetic Separation Module station I (Chemagen) за изолиране на ДНК от венозна кръв.

Етапи**:**

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (натриев додецил сулфат - детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действие на протеиназата);
- Свързване на освободената от ядрата ДНК към магнитните частици;
- Отделяне на комплекса ДНК-магнитни частици от кръвно-клетъчния лизат;
- Няколкократно промиване с етанол съдържащи буфери;
- Освобождаване на пречистената ДНК от магнитните частици;

Процедура

- Получаване на клетъчен лизат -във всяка 50 ml епруветка се смесват определени количества венозна кръв с лизиращия буфер до 15 ml
- Прибавяне на 25 µl Протеаза. Разрушаване на клетъчните стени- активно смесване 20 мин
- Прибавяне на Свързващ буфер (25ml) и магнитни частици (800 µl). Активно смесване 10 мин.
- Промиване на комплекса ДНК-магнитни частици последователно в Буфери от 3 до 6.
- Елуиране на ДНК е елуиращ Буфер ЕВ (в зависимост от 500 до 1000µl)

Позициите на подвижния модул са номерирани във възходящ ред и в различните позиции се поставят епруветки със съответния буфер

3.3.4.2. Изолиране на ДНК от урина

Изолирането на ДНК от урина бе осъществено с помощта на ZR Urine DNA Isolation Kit (Zymo Research)

Таблица 3.9. Спецификации на ZR Urine DNA Isolation kit

Необходимо оборудване	Спринцовки (от 1мл и от 30-50 мл), центрофуга
Стартов материал	Урина
Количество стартов материал	30 мл, но може и по-малко или повече
ДНК чистота	Изолира се ДНК с високо качество, елуирана в елуиращ буфер или вода
ДНК свързващ капацитет на колонките	5 µg
Елуиращ обем	≥ 6 µl
ДНК добив	От женска урина добивът средно е 14-200 ng/ml, от мъжка урина 4-60 ng/ml



Фигура 3.2. Стъпки при изолирането на ДНК от урина със ZR Urine DNA Isolation Kit™

Таблица 3.10. Компоненти на ZR Urine DNA Isolation Kit

Компонент	**Количество/брой за изолиране на 20 проби урина**
Геномен Лизис буфер*	50 мл
ДНК пре-Промиващ буфер (DNA Pre-Wash buffer)	15 мл
гДНК Промиващ буфер (g-DNA Wash buffer)	50 мл
ДНК елуиращ буфер (DNA elution buffer)	1 мл
ZRC GF™ филтър	20 бр
Zymo-Spin™ IC колонки	20 бр
Събирателни епруветки (Collecion tubes)	20 бр

*****- *За по-добра ефективност на лизиращия буфер преди употреба се добавя се бета-меркаптоетанол, така че да представлява 0.5%- тоест 250 µl към 50 мл буфер*

Този кит осигурява лесно и бързо изолиране на тотална ДНК от клетки и биологични седименти в проби от урина. Клетките от урината се изолират с помощта на спринцовка и специален филтър. Тъй като вече клетките бяха отделени чрез центрофугиране и към тях беше добавен RNA later, то тази смес от клетки и буфер беше филтрирана с цел отстраняване на буфера и други извънклетъчни компоненти останали от урината след центрофугирането. След филтруването се осъществява лизиране на клетките и събиране на лизата, който може да бъде процесиран веднага или може да се съхрани до

една седмица на стайна температура. Лизатът се прехвърля в колонки със специална мембрана. ДНК се закача за нея и се промива няколко пъти с Wash буфери (промиващи). Накрая ДНК се разтваря в Elution (Елуиращ) буфер и се прехвърля в 1.5 мл епруветки. Така изолираната ДНК може да бъде съхранена на -20 ^{o}C или -80^{o}C, или може да бъде използвана веднага.

3.3.5. Изолиране на РНК

3.3.5.1. Изолиране на РНК от урина

Изолирането на РНК от урина бе осъществено с помощта на ZR Urine RNA Isolation kit (Zymo Research), но също така бе използван Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit (Fisher Scientific, но се предлага и от Norgen)

И двата кита предлагат бързо с помощта на колонки изолиране на тотална РНК, включваща и малки РНК молекули от урина. Не използват фенол или хлороформ. Изолира се РНК с добро качество. По време на изолирането се осъществява и пречистване от ДНК с помощта на Dnase I ензим.

3.3.5.1.1. Изолиране с помощта на ZR Urine RNA Isolation kit

Таблица 3.11. Спецификации на ZR Urine RNA Isolation kit

Време за процесиране	10 мин
Необходимо оборудване	Спринцовки (от 1мл и от 30-50 мл), центрофуга
Стартов материал	Урина
Количество стартов материал	30 мл, но може и по-малко или повече
Ензимно инактивиране и отстраняване на ДНК и пречистване на РНК	Обикновено 0.2-3 µg РНК се изолира от 30 мл урина.
РНК свързващ капацитет на колонките	5 µg
Елуиращ обем	6 µl
Чистота на РНК	РНК с високо качество се елуира с RNase free вода



Фигура 3.3. Стъпки при изолирането на РНК от урина със ZR Urine RNA Isolation Kit™

Таблица 3.12. Компоненти на ZR Urine RNA Isolation Kit

Компонент	**Количество/брой за изолиране на 20 проби урина**
Урина РНК буфер (Urine RNA buffer)	20 мл
РНК подготвящ буфер (RNA Prep buffer)	10 мл
РНК Промиващ буфер концентрат * (RNA Wash buffer concentrate)	12 мл
Вода пречистена от Dnase/RNase (Dnase/RNase-Free Water)	1 мл
ZRC GF™ филтър	20 бр
Zymo-Spin™ IC колонки	20 бр
Събирателни епруветки (Collecion tubes)	20 бр

*- *Преди употреба към Промиващия буфер се добавя 48 мл 100% етанол*

Този кит позволява изолиране на клетките от урината (30 мл) с помощта на спринцовка и специален филтър (сходно на кита за изолиране на ДНК от урина). Сходно на изолирането на ДНК от урина тъй като клетките бяха предварително центрофугирани и събрани, то филтрирахме тях (част от пробите урина бяха директно процесирани (обработени) със стриктно следване на протокола на кита). След филтрирането клетките се лизират и тоталната РНК се стабилизира с помощта на специфичен Urine RNA Buffer. Полученият лизат може да бъде използван веднага или по-късно след транспортиране и/или съхранение. Също така Urine RNA Buffer е подходящ за директно изолиране на РНК от микровезикули, които могат да се възстановяват от филтратите урина. Едностъпалното РНК изолиране се осъществява чрез матриксна адсорбция използвайки Zymo-Spin™ IC Columns. Процедурата по изолиране на РНК отнема около 5 мин. В резултат на използването на този кит води до получаването на високо качествена, тотална РНК от пробите урина, която е подходяща за последващи анализи на генната експресия.

3.3.5.1.2. Изолиране с помощта на Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit

Таблица 3.13. Спецификации на Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit

Максимален свързващ капацитет на колонките	50 µg РНК
Количество стартов материал Урина Клетки	 1-50 мл 1 x 10^6
Размер на пречистените РНК молекули	Всички размери, включително малки РНК-и (<200 нуклеотида)
Време за завършване на 10 пречиствания	20 мин
Среден добив	Около 1 µg РНК на 1 x 10^5 клетки, но варира в зависимост от броя клетки

Таблица 3.14. Компоненти на Urine Exfoliated Cell RNA Purification kit

Компонент	**Количество/брой за изолиране на 50 проби урина**
Лизис разтвор (Lysis Solution) *	40 мл
Промиваш буфер (Wash Solution) **	22 мл
Елуиращ буфер (Elution buffer)	5 мл
Колонки (Micro Spin Columns)	20 бр
Събирателни епруветки (Collection tubes)	20 бр
Елуиращи епруветки 1.7 ml (Elution tubes)	20 бр

* - *За по-добра ефективност на лизиращия буфер е необходимо добавянето на 10µl бета-меркаптоетанол към всеки 1 ml от лизиращия буфер*

**- *Преди първа употреба е необходимо добавянето на 95% етанол към промиващия буфер*

Пречистването за базира на хроматографски колонки със специфична смола, служеща за разделителна матрица. Стъпките на изолиране са следните: лизиране на утаените клетки с помощта на лизис разтвора; добавяне на етанол към лизата и пипетиране на лизата в колонките; зависимо от концентрацията на йони свързване на РНК, но не и останалите контаминиращи белтъци към колонката; двукратно промиване с промиващия буфер за отстраняване на замърсители и елуиране на пречистената РНК с помощта на елуиращ буфер.

3.3.5.2. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК-и от плазма

Изолирането на тотална РНК, включваща и микроРНК-и от плазма бе осъществено с помощта на специфичен кит: miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen).

Таблица 3.15. Спецификации на Min Elute Spin колонките на miRNeasy Serum/Plasma Kit

Максимален свързващ капацитет на колонките	45 µg РНК
Максимален обем, който може да се поеме от колонките	700 µl
РНК молекули	РНК > с дължина 18 нуклеотида приблизително
Минимален елуиращ обем	10 µl
Максимално количество серум/плазма, което може да бъде използвано	200 µl

Китът miRNeasy Serum/Plasma Kit комбинира фенол/гуанидин базираното лизиране на пробите и пречистване на тотална РНК с помощта на силициевите мембрани. QIAzol Lysis Reagent включен в кита е монофазен разтвор на фенол и гуанидин тиоцианат, който спомага лизирането, инхибира Rnases и също премахва чрез органична екстракция голяма част от клетъчната ДНК и протеините от лизата. Клетките или тъканите се хомогенизират в QIAzol Lysis Reagent. QIAzol Lysis Reagent се добавя към серума или плазмата. След добавянето на хлороформ и центрофугиране хомогената се разделя на водна и органична фаза. РНК се намира в горната, течна фаза, ДНК се намира в междинната фаза, а

белтъците в най-долната органична фаза или в междинната фаза. Горната водна фаза се отделя и се добавя към нея етанол, за да се осигурят подходящи условия за свързване на всички РНК молекули над 18 нуклеотида. След това пробата се поставя в колонка, където тоталната РНК се свързва към мембраната и фенолът и другите контаминиращи вещества се промиват. Висококачествена РНК се промива в малък обем RNase-free (пречистена, свободна от РНази) вода. Серумът и плазмата съдържат първоначално малки РНК-и и по тази причина набогатяване с микроРНК-и и други малки РНК-и в отделна фаза обикновено не се изисква.

Таблица 3.16. Компоненти на miRNeasy Serum/Plasma kit

Компонент	**Количество/брой за изолиране на 50 проби плазма**
Колонки заедно с 2 мл събирателни епруветки RNeasy® MinElute® Spin Columns (each packaged with a 2 ml Collection Tube)	50 бр
Събирателни епруветки (1.5мл) (Collection tubes (1.5ml))	50 бр
Събирателни епруветки (2 мл) (Collection tubes (2ml))	50 бр
QIAzol® Лизиращ реагент (QIAzol® Lysis Reagent)	50 мл
Буфер RWT*	15 мл
Буфер RPE**	11 мл
Вода пречистена от RNase RNase-Free Water	10 мл

*- *Буфер RWT се доставя като концентрат. Преди употреба за пръв път се добавят два обема етанол (96%–100%), както е отбелязано на опаковката, за да се получи работен разтвор*

**- *Буфер RPE се доставя като концентрат. Преди употреба за пръв път се добавят четири обема етанол (96%–100%), както е отбелязано на опаковката, за да се получи работен разтвор*.



Фигура 3.4. Стъпки при изолирането на РНК от плазма/серум с miRNeasy Serum/Plasma Kit

3.3.5.3. Изолиране на РНК, съдържаща и микроРНК от тъкан

Изолирането на тотална РНК, включваща и микроРНК-и от радикални простатектомии и биопсиите бе осъществено с помощта съответно на miRneasy Mini kit (Qiagen) и miRNeasy Micro kit (Qiagen)

3.3.5.3.1. Изолиране РНК от радикални простатектомии с помощта на miRneasy Mini kit (Qiagen)- компонентите и процедурата по изолирането е същата, както при miRNeasy Serum/Plasma Kit (точка 3.3.5.2).

Таблица 3.17. Спецификации на Min Elute Spin колонките на miRneasy Mini Kit

Максимален свързващ капацитет на колонките	100 µg РНК
Максимален обем, който може да се поеме от колонките	700 µl
РНК молекули	РНК > с дължина 18 нуклеотида приблизително
Минимален елуиращ обем	30 µl
Максимално количество стартов материал Животински клетки Животински тъкани	 1×10^7 50 мг (100 мг мастна тъкан)

Оптимизирахме стъпката на лизиране. След поставянето на тъканите в лизиращия реагент, за да се подпомогне хомогенизирането, епруветките бяха потапяни за няколко секунди в течен азот и след това бе използван механичен хомогенизатор. За да се осигури възможно най-пълно хомогенизиране пробите бяха оставяни за 5-10 мин на стайна температура на въртящ се вортекс (Multi Speed Vortex MSV-3500, Biosan).

3.3.5.3.2. Изолиране на РНК от биопсии на контроли с ДПХ с помощта на miRNeasy Micro kit - компонентите и процедурата по изолирането е същата, както при miRNeasy Serum/Plasma Kit (точка 3.3.5.2).

Таблица 3.18. Спецификации на Min Elute Spin колонките на miRneasy Micro Kit

Максимален свързващ капацитет на колонките	45 µg РНК
Максимален обем, който може да се поеме от колонките	700 µl
РНК молекули	РНК > с дължина 18 нуклеотида приблизително
Минимален елуиращ обем	10 µl
Максимално количество стартов материал Животински клетки Животински тъкани	 1×10^6 5 мг (10 мг мастна тъкан)

3.3.6. Оценка на качеството и концентрацията на изолираната ДНК/РНК

3.3.6.1. Измерване на концентрацията и определяне на качеството на изолираната ДНК/РНК чрез спектрофотометричен метод. Това бе осъществено с помощта на NanoDrop (Thermo Scientific)

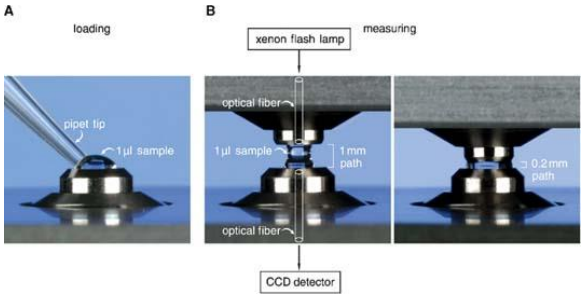
Концентрацията на изолираната геномна ДНК и тотална РНК беше измерена спектрофотометрично с помощта на NANODROP (Thermo Scientific). Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната λ= 260 nm от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК и РНК. Абсорбцията при λ= 280 nm дава концентрацията на белтъците.

1 O.D. при 260 nm за двойноверижна ДНК = 50 ng/µl от dsDNA (двДНК)

1 O.D. при 260 nm за едноверижна ДНК = 20-33 ng/µl от ssDNA (евДНК)

1 O.D. при 260 nm за РНК молекули = 40 ng/µl за РНК

Отношението на абсорбциите, измерени съответно при λ260 и λ280, показва чистотата на ДНК/РНК. Чистите ДНК проби дават А260/280 съотношение приблизително 1.8 като стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2- примеси от РНК. Чистите РНК проби дават А260/280 съотношение от около 2 като в този случай стойности под 1.8 показват примеси от белтъци. Върху А260/280 съотношението влияние оказва и киселинността на пробите. Отношението А260/А230 дава представа за съдържанието на други контаминиращи вещества, които абсорбират при λ230 или λ260. Чистите проби имат съотношение на А260/А230 в обхвата 2-2.2. Вещества, които поглъщат при λ230 са EDTA, въглехидратите и TRIzol (разтвор, който се използва за изолиране на РНК), Guanidine HCL (разтвор, който се използва за изолиране на ДНК). При контаминация с тях съотношението А260/А230 е понижено. Вещество, което поглъща при λ260 е гуанидин изотиоцианат, който се използва за изолиране на РНК. При контаминиране с него А260/А230 съотношението има високи стойности.



Фигура 3.5: Оценка на качеството и количеството на изолираните ДНК/РНК с помощта на NANODROP *А) От 1 до 2 µl от РНК/ДНК проба се диспенсира с помощта на типче върху долната оптична повърхност; В) След нанасянето на пробата горното рамо се сваля и горната оптична повърхност се докосва до пробата, формирайки течна колона с дължина на пътя на лъча определен от разстоянието между двете оптични повърхности.*

Процедура:

Разтворената във вода или елиуращ буфер от съответния кит ДНК/РНК проба се измерва, като се отчита абсорбцията при 280/260 nm. Апаратът автоматично изчисляване на концентрацията на ДНК/РНК въз основа на закона на Беер-Ламберт (Beer-Lambert) като се използва следната формула:

$$c = \frac{E_{260} x R}{\varepsilon \ x l}$$

c - концентрация на ДНК **(**µg/µl)

E_{260} - екстинкция при 260 nm

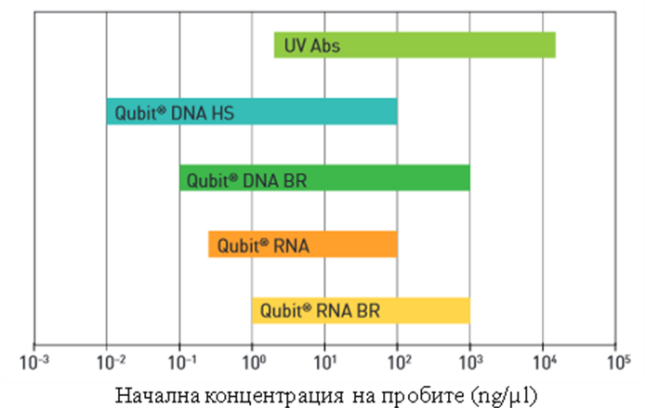
R – разреждане, **l** - ширина на кюветата

ε - десетичен моларен екстинкционен коефициент (за ДНК ε=26)

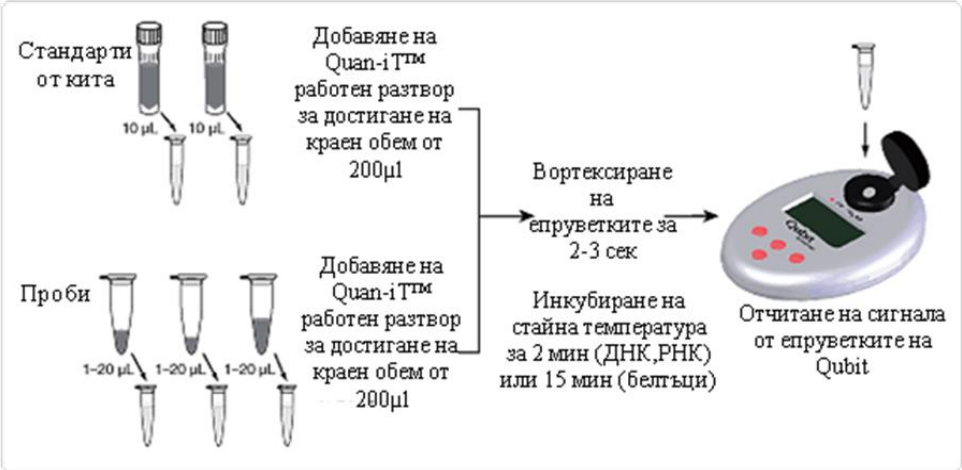
3.3.6.2. Измерване на концентрацията на изолираната ДНК/РНК с флуориметричен метод с помощта на Qubit (Life Technologies)

Спектрофотометричното измерване на ДНК и РНК е широко използван метод, но то не е достатъчно надеждно и точно. Установено е, че UV базираните абсорбционни измервания не са селективни и не могат да правят разграничение между ДНК, РНК, белтък, или свободни нуклеотиди или свободни аминокиселини. Стойностите получени за концентрацията могат да се повлияят от варирането на съотношението на базите в измерваните нуклеинови киселини и от присъствието на други контаминиращи вещества като свободни нуклеотиди, соли и органични съединения. В допълнение чувствителността на спектрофотометричните измервания е ниска като е невъзможно измерването на ДНК/РНК с много ниски концентрации. Флуоресцентно базираното определяне на концентрацията на нуклеиновите киселини е по-чувствително и специфично тъй като прави разграничение между ДНК и РНК и белтъци, и дава възможност да се измерват проби с много ниска концентрация.

Основната разлика между двата метода за измерване на концентрацията е, че Qubit флуорометъра използва флуоресцентни багрила. Всяко багрило е специфично за определена молекула: ДНК, РНК или белтък. Тези багрила имат изключително ниска флуоресценция докато не се свържат с техните таргетни молекули (ДНК, РНК или белтък). При свързването си те започват интензивно да флуоресцират. Добавят се към разтвор на пробите и те се свързват към таргетните молекули за няколко секунди и се достига равновесие за по-малко от 2 минути. При специфично количество на багрилото, количеството на флуоресцентния сигнал от пробата е директно пропорционален на концентрацията на измерваната молекула в разтвора. След това Qubit флуорометърът отчита флуоресцентния сигнал и определя концентрация като използва стандарти с известна концентрация. Чрез стандартите се определя съотношението между ДНК концентрацията и флуоресценцията и след това полученото съотношение се използва за калкулиране на концентрацията на измерваните проби.



Фигура 3.6. Сравнение на обхвата на концентрацията на измерваните проби чрез китовете на Qubit и UV спектрофотометричното измерване



Фигура 3.7. Протокол за работа с Qubit флуорометър

3.3.6.3. Определяне на концентрацията и RIN^e на изолираната РНК от тъкан чрез Agilent 2200 TapeStation Systems

TapeStation също използва флуоресцентни багрила специфични за молекулите, които се измерват, но освен че се определя концентрацията се осъществява и капилярна електрофореза, чрез която се определя качеството на изолираните нуклеинови киселини. При измерване на РНК проби, то се определя RIN (RNA integrity number). При електрофореза РНК молекулите обикновено се разделят на два основни пика, представляващи 18S и 28S рибозомна РНК (rRNA). В зависимост от метода на пречистване, то могат да се наблюдават и допълнителни малки пикове, които съответстват на 5S rRNA и други малки РНК-и. При наличие на деградиране на РНК молекулите, то постепенно изчезват пиковете при 18S и 28S рибозомна РНК и се появяват ниско молекулни пикове. Съотношението 28S/18S rRNA се използва за изчисляване на интегритета на РНК молекулите- RIN. RIN заема стойности от 1 до 10, отразяващи степента на деградация на РНК молекулите в пробите като RIN=10 показва възможно най-добро качество РНК. TapeStation системата определя RIN^e, което е еквивалент на RIN определян от Agilent 2100 Bioanalyzer. Разликата между RIN^e и RIN е в алгоритъма за пресмятането им.

РНК проби със стойности на RIN=5 могат да се използват за RT-PCR анализи, но не са подходящи за използване в микрочипови анализи. Проби със стойности на RIN над 7-8 са подходящи за провеждане на всякакви експерименти, включително и микрочипов анализ.



Фигура 3.8. Протокол за работа с RNA ScreenTape, TapeStation System. *Чрез RNA ScreenTape могат да се анализират прокариотни и еукариотни РНК молекули от 50-6000 нуклеотида. Количественият обхват на този кит е от 25 до 500 ng/µl.*

Таблица 3.19. Сравнение на методите за определяне на концентрациите на РНК/ДНК

	Qubit флуорометър	**NanoDrop,**	**TapeStation**
Количествен метод	Флуоресцентни-базирани багрила, които се свързват специфично към ДНК, РНК или белтък	UV абсорбционни измервания (измерва се 260 nm/280 nm съотношението)	Флуоресцентни-базирани багрила, които се свързват специфично към ДНК, РНК или белтък
Селективност към ДНК или РНК	Да Точно измерва ДНК и РНК в една и съща проба	Резултатите от проби, съдържащи ДНК и РНК са недискриминира-щи- не могат да се разграничат ДНК от РНК.	Да
Точност и прецизност при определяне на концентрацията	Точно количествено определя ДНК в проби с концентрации до 10 pg/µL	Значително определя по-високи концентрации. Съществуват вариации в измерванията на една и съща проба- CV%= 2	20% количествена точност и 5% прецизност (CV)
Чувствителност и обхват	Толерира обем от 1–20 µL от всяка проба. Ефективният обхват на измерванията: за РНК- 5-1000 ng; за ДНК- 10 pg/µL-1 µg/µL. Различни китове.	Използва се 1-2 µL от всяка проба. Може да се измерват проби с концентрации от 2 ng/µL до 15 µg/µL	Използва се 1-2 µL от всяка проба. Ефективният обхват на измерванията са: за ДНК- 10 pg/µL до 50 ng/µL и чувствителност 5 pg/µL; за РНК: 100 pg/µL до 500 ng/µL и чувствителност 100 pg/µL. Различни китове
Възможност за определяне на чистота на мерената нуклеинова киселина	Не	Да	Не
Възможност за определяне на интегритета на мерената нуклеинова киселина	Не	Не	Да
Време за измерване	<5 сек. на проба. При включване на подготвителните стъпки- ~ 2 мин	<5 сек. на проба. Няма подготвителни стъпки	<16 мин. за 16 проби едновременно. Подготвителните стъпки: ~ 7 мин.

3.3.6.4. Определяне на качеството на изолираната ДНК посредством агарозна гел електрофореза

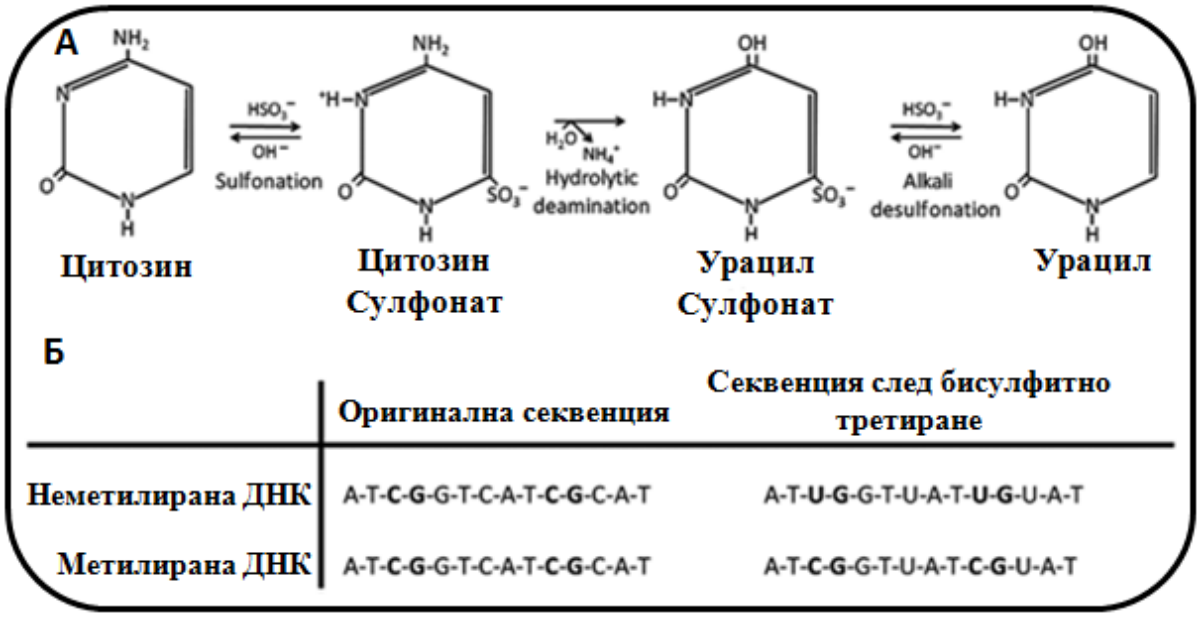
Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено посредством тестване на агарозна гел електрофореза върху 0.8 % агарозен гел и 1X TBE (трисборатен буфер). Визуализацията на фрагментите е осъществена посредством използване на етидиев бромид с концентрация 0.05 µl/ml. Чрез електрофорезата се определя цялостта на геномната ДНК и полуколичествено нейната концентрация като се използват и молекулни

маркери. При наличие на "пътека" (smearing), съставена от множество фрагменти, се прави изводът, че ДНК е деградирала и не може да се използва за анализ.

3.3.7. Бисулфитно третиране на ДНК изолирана от урина

Бисулфитното третиране бе осъществено с помощта на EZ DNA Methylation-Gold™ kit

Способността ефикасно да се открива и количествено определя ДНК метилирането е много важно при изучаването на епигенетичните промени при раковите заболявания. До днешна дата има много различни методи за изследване на ДНК метилирането, но най-разпространеният метод е бисулфитното превръщане. При този метод ДНК се третира с бисулфит, който превръща неметилираните цитозини в урацил, а метилираните цитозини остават непроменени (Фигура 3.9). Щом ДНК бъде бисулфитно превърната, то установяването на хиперметилирането може да се осъществи чрез метил специфичен PCR (MSP).



Фигура.3.9. **Бисулфитно третиране на ДНК***: (А) Процедурата се базира на химична реакция на едноверижна ДНК с натриев бисулфит (HSO_3^-) при ниско pH и висока температура. Химичните стъпки са следните: сулфониране на С атома на шеста позиция в цитозина, необратимо хидролитично деаминиране на С атом на 4-та позиция и създаване на урацилов сулфонат и най-накрая последващо десулфониране при алкални условия, при което се получава урацил. Метилирането при С-5 на цитозина затруднява сулфонирането на С-6 позиция в първата стъпка. Въпреки че 5-метилцитозинът може да взаимодейства с бисулфита, то реакцията е изключително бавна и равновесието е към 5-метилцитозин, отколкото към тимин. След третирането е необходимо пречистване, за да се премахнат солите и другите химикали използвани при третирането.* ***(Б)*** *Бисулфитното третиране превръща неметилираните цитозини в урацили, а метилираните цитозини си остават цитозини. Динуклеотъд CpG е показан в болд (bold).*

За бисулфитното третиране на ДНК използвахме EZ DNA Methylation-GoldTM Kit, който интегрира ДНК денатурация и бисулфитно превръщане в една стъпка (Фигура 3.10.). Това се постига като се използва температурна денатурация, а не химичната денатурация с натриев хидроксид. Възстановяването на ДНК след това третиране е над 75% тъй като китът е направен така, че деградирането на матрицата, загубата на ДНК по

време на третирането и пречистването да са сведени до минимум. Може да се третира ДНК с концентрация от 500 pg до 2 µg, което прави този кит подходящ за третиране на ДНК с ниска концентрация, каквато се получава при изолиране от урина. Оптимални резултати се получават при третиране на 200 до 500 ng ДНК. Ефикасността на превръщане също е много висока (> 99% от неметилираните цитозини се превръщат в урацил и > 99% от метилираните цитозини остават непроменени).

Таблица 3.20. Компоненти на EZ DNA Methylation-GoldTM Kit

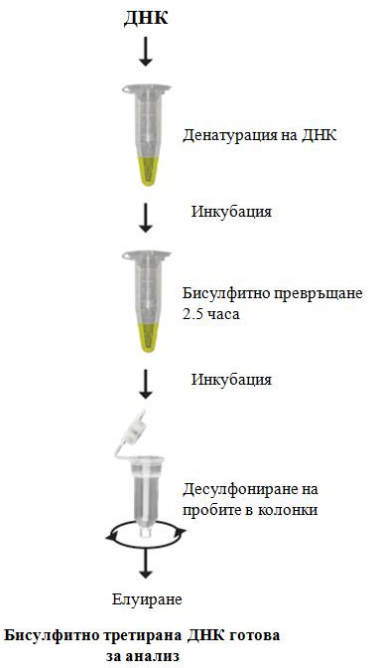
Компонент	**Количество/брой за третиране на 50 ДНК проби**
CT Conversion Reagent* (Превръщащ реагент)	5 епруветки
M-Dilution buffer (Буфер за разреждане)	1.5 ml
M-Dissolving buffer (Разтварящ буфер)	500 µl
M-Binding buffer (Свързващ буфер)	30 ml
M-Wash buffer** (Промиващ буфер)	6 ml
M-Desulfonation buffer (Десулфониращ буфер)	10 ml
M-Elution buffer (Елуиращ буфер)	1 ml
Zymo Spin™ IC Columns (Колонки)	50 бр
Collection tubes (Събирателни епруветки)	50 бр

**- 900 µl вода, 300 µl M-Dilution Buffer, и 50 µl M-Dissolving Buffer се добавят към всяка епруветка CT Conversion Reagent преди употреба.*

***- Добавя се 100% етанол към 6 ml концентрат на M-Wash Buffer преди първа употреба*

Бисулфитното третиране се осъществява при следните условия:
98°C за 10 мин
64°C за 2.5 часа
4°C съхранение до 20 часа

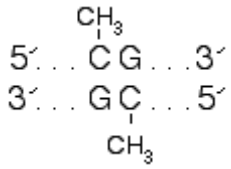
След това третиране следват стъпките по пречистване на ДНК. Концентрацията на пречистената ДНК бе определена с помощта на NanoDrop.



Фигура.3.10. Стъпки на бисулфитното превръщане и пречистване на ДНК с EZ DNA Methylation-GoldTM Kit

3.3.8. MSss I модифициране за изготвяне на 100% метилирани контроли необходими за анализа на промоторното хиперметилиране

M.SssI (New England Biolabs) е CpG метилаза и затова всеки CpG динуклеотид е мишена на този ензим (Фигура 3.11), който използва S-аденозил метионин (SAM) като донор на метилова група.



Фигура .3.11. Субстрат на ензима M.SssI

M.SssI третирана ДНК се използва като универсална 100% метилирана контролна ДНК при MethyLight анализа. ДНК изолирана от лимфоцити използвахме като субстрат в този протокол. Разредки на бисулфитно превърната M.SssI третирана ДНК използвахме за нормализиране на количеството бисулфитно превърната ДНК чрез построяване на ALU-C4 стандартни криви при анализа на промоторното хиперметилиране на HIST1H4K и RASSF2 чрез MethyLight метода.

Протокол за M.SssI модифициране:

- M.SssI третирането се осъществява за една нощ на 37^{o}C в разтвор съдържащ H_2O, 0.05µg/µL (50ng/ µL) от ДНК, 0,16 mM SAM, 1x реакционен буфер и 0.05 единици (U)/ µL ензим
- На следващия ден се добавя допълнително количество M.SssI ензим и SAM (1/3 от първоначалния обем) като и двата компонента заедно с водата да представляват 1/50 от първоначалния обем при третирането
- За да се постигне пълно метилиране на всички CpG динуклеотиди в геномната ДНК трябва да се извършат няколко третирания с ензим
- M.SssI третираната ДНК може да бъде съхранявана на +4 ^{o}C и 20 µL се използват при всяко бисулфитно третиране

3.3.9.Обратна транскрипция на изолираната РНК за синтез на кДНК

3.3.9.1. Обратна транскрипция на РНК изолирана от урина за синтез на кДНК

Обратната транскрипция бе извършено с помощта на следните китове High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits, Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR

3.3.9.1.1. Работа с High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)

Таблица 3.21. Състав на 2x мастер микс за обратна транскрипция.

Етап	**Компонент**	**Количество (µl) за една реакция**
Подготовка на РНК	РНК (до 2 µg)	x
	Свободна от РН-ази вода	10-x
Обратна транскрипция – синтез на кДНК	10X RT Buffer	2.0
	25X dNTP Mix (100mM)	0.8
	MiltiScribe Ензим-Обратна Транскриптаза	2.0
	RNase Inhibitor	1.0
	Nuclease-free H_2O	1.0
	Краен обем	**20.0**

Използвана Апаратура:
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Микроцентрофуга Micro CL 21 (Thermo Scientific)

Принцип:

В RT-PCR, матричната мРНК първо се превръща в комплементарна ДНК (кДНК) с помощта на ензим обратна транскриптаза. След това кДНК се използва като матрица за експоненциално амплифициране с PCR метода. До сега RT-PCR е най-чувствителния метод за откриване наличието на РНК. Използването на RT-PCR за откриване на РНК транскрипти води до революция в изследванията на генната експресия поради следните причини: 1) прави теоретично възможно установяването практически на всеки генен транскрипт; 2) елиминира необходимостта от голямо количество изходен материал, недостатък на Northern Blot анализа; 3) създаде възможност за толерантност към частичното разграждане на РНК, докато РНК секвенцията в областта на праймерите е непокътната;

Етапи:
- Подготовка на РНК пробата
- Провеждане на реакция на обратна транскрипция

Процедура:

Извършва се синтез на кДНК на базата на тотална мРНК, изолирана от свежа тъкан, с помощта на ензим обратна транскриптаза по протокол на производителя.
- Подготовка на РНК разредка с подходяща концентрация, еднаква за всички реакции
- Подготовка на 2х мастер микс за обратна транскрипция (2X RT master mix) с реактиви от кита, на лед, според таблица 3.22. Смесване и кратко центрофугиране.
- Провеждане на обратна транскрипция на PCR апарат по следната програма:

Таблица 3.22.

Температура	Време (мин)
25°C	10
37°C	120
85°C	5
4°C	изчакване/∞

- Съхраняване на готовите проби в хладилник на -20°C до пристъпване към следващата стъпка.

3.3.9.1.2. Работа със Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR

Включената в кита Super Script™ Reverse Transcriptase (в RT ензимния микс) е версия на M-MLV RT, която е модифицирана да редуцира RNase H активността и да осигурява повишена термична стабилност. Ензимът може да бъде използван за синтезиране на кДНК при температурен обхват 42-60°C, осигурявайки повишена специфичност и по-висок добив на кДНК и повече пълноразмерни продукти в сравнение с другите обратни транскриптази. Тъй като Super Script III RT не се инхибира от рибозомните и транспортните РНК, то може да се използва за синтез на кДНК от тотална РНК.

За разлика от предходния кит, който използва само случайни праймери, то при Super Script III RT кита се използват случайни и олиго (dT) праймери. 2X RT Реакционния

микс на този кит съдържа освен двата вида праймери, и $MgCl_2$, dNTP и буфер оптимизиран за qRT-PCR.

Към този кит за разлика от предходния е включен E. coli RNase H ензима, който премахва РНК матрицата от кДНК:РНК хибридите. По този начин се увеличава чувствителността на последващите анализи.

Миксът е създаден така че да позволява количествено определяне на по-малко от 10 копия от даден таргетен ген, но също така и точно количествено определяне на високо копийните иРНК в последващите анализи като използва максимум 1 μg тотална РНК за синтез на кДНК.

Процедура (протокол):

- Комбинират се следните компоненти на кита (Таблица 3.23) в епруветка като се работи на лед. За подготовка на повече от една реакция, може да се изготви мистър микс без РНК. Всичко се разбърква много внимателно.

Таблица 3.23. Компоненти на мастер микс за обратна транскрипция

Компонент	**Количество (μl) за една реакция**
2 x RT Reaction Mix	10
RT Enzyme Mix	2
РНК до 1 μg	x
RNase free H_2O	x
Краен обем	**20 μl**

- Следва инкубиране, като условията са представени в Таблица 3.24

Таблица 3.24.

Температура	**Време (мин)**
25°C	10
50°C	30
85°C	5
4°C	изчакване/∞

- Третиране с Rnase H- добавя се 1 μl (2 U) E. coli RNase H и се инкубира на 37°C за 20 мин.
- Съхранение на пробите на -20°C или директно използване

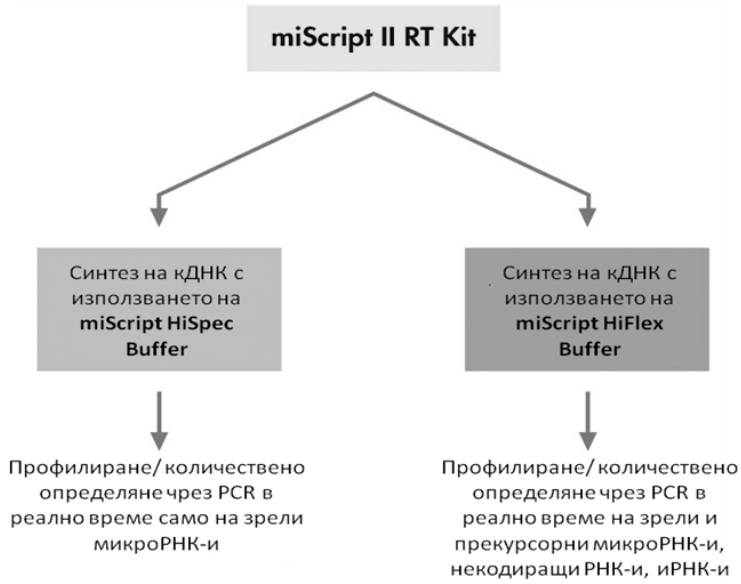
3.3.9.2. Обратна транскрипция на изолирана от плазма РНК, съдържаща и микроРНК-и за синтез на кДНК

Обратната транскрипция бе осъществена с помощта на miScript II RT Kit.

В кита са включени два различни буфера: HiSpec и HiFlex, чието предназначение е различно- фигура 3.12. В нашето проучване ние използвахме буфера HiSpec за синтез на кДНК само от зрелите miRNAs.

Когато обратно транскриптазната реакция се извършва в присъствието на miScript HiSpec Buffer, зрелите miRNAs и определени ядърцеви РНК-и и малки ядрени РНК-и (snoRNAs, snRNAs) се конвертират в кДНК. Зрелите miRNAs (микроРНК-и) се полиаденилират от poly(A) полимераза и обратно се транскрибират в кДНК с помощта на олиго-dT праймери. Полиаденилирането и обратната транскрипция се осъществява паралелно в една епруветка. Олиго-dT праймерите притежават поли-Т последователност в

3’ края си и универсална последователност- таг в 5’ края си, което позволява амплификация на зрелите miRNAs в следващата стъпка- real-time PCR (PCR в реално време). miScript Primer Assays използвани в комбинация с miScript SYBR Green PCR Kit спомагат за количественото определяне на зрелите miRNAs чрез PCR в реално време. Комбинацията от полиаденилиране и добавяне на универсален таг осигуряват специфичност на miScript Primer Assays и невъзможност за неспецифична амплификация на геномна ДНК.



Фигура 3.12. Детекция на miRNA, прекурсорни miRNA, други некодиращи RNA, и mRNA. Два буфера са включени в miScript II RT Kit

Като изходен материал за синтеза на кДНК използвахме 50ng тотална РНК. В таблица 3.25 са показани реактивите използвани за RT-PCR и техните количества.

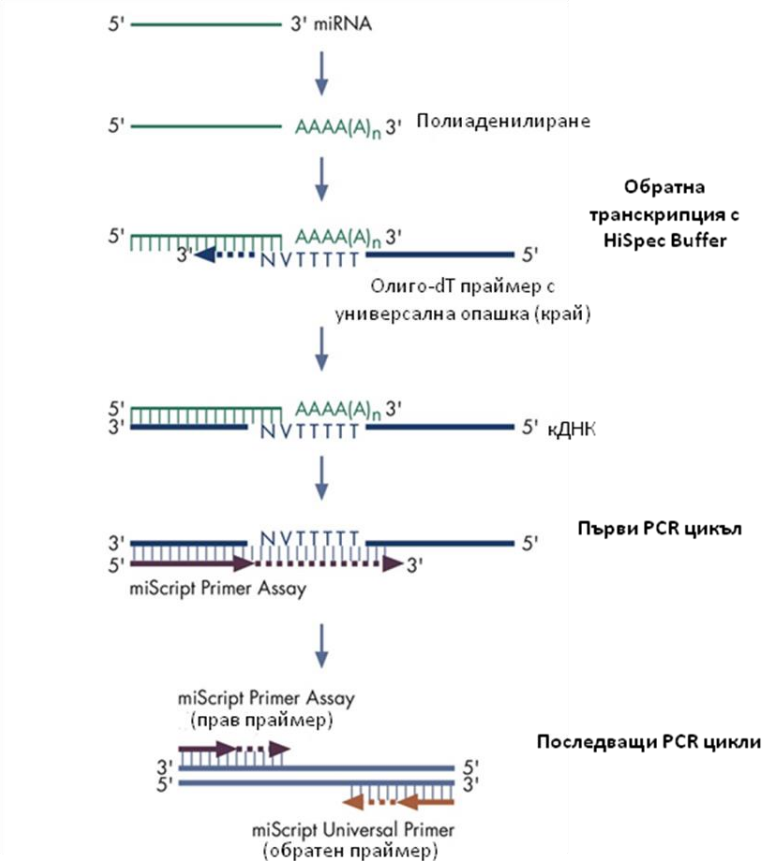
Таблица 3.25. Компоненти на RT-PCR реакцията.

Компонент	**Количество (µl) за една реакция**
5x miScript HiSpec Buffer	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
RNase- free H_2O	Варира
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
РНК матрица	Варира
Краен Обем	**20 µl**

Условията за протичане на обратната транскрипция са представени в таблица 3.26.

Таблица 3.26.

Температура	**Време (мин)**
37°C	60
95°C	5
4°C	изчакване/∞



Фигура 3.13. Селективна конверсия на зрелите микроРНК-и в кДНК с помощта на HiSpec buffer.

3.4. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА

3.4.1. Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод в молекулярната биология и молекулната диагностика. Методът е разработен от K. B. Mullis през 1985 г. и представлява ензимно амплифициране (намножаване) на специфична ДНК нуклеотидна последователност в ин витро условия. В рамките на няколко часа е възможно да се синтезират милиони копия от желаната ДНК последователност, като за целта се използват специфични олигонуклеотидни праймери и ензим ДНК полимераза.

Използвана Апаратура**:**

- Апарат за PCR-амплификация Veriti 96-well (ABI) или Bioer Gene Pro (Harlow scientific)

Етапи:

Полимеразната верижна реакция е изключително чувствителен и изисква само няколко ДНК молекули в една реакция. Затова е много важно да се избягва контаминация с чужда ДНК, присъстваща в лабораторията (бактерии, вируси или човешки източници). Започва с първоначална продължителна денатурация, която цели разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК (2 до 5 мин. при 92 до 95°C). Амплифицирането на желания участък се осъществява при многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура, всеки от които включва следните три стъпки:

- ***Термична денатурация*** *(denaturation)* - целта е да настъпи пълна денатурация на двойноверижните ДНК молекули до получаване на едноверижни матрици необходими за процеса на амплификация. Продължителността на тази стъпка обикновено е от 10 сек. до 1

мин., а необходимата температура от -90 до 98°C осигуряващ пълно разделяне на двойноверижната ДНК;

- ***Хибридизация*** *(annealing)- о*съществява се между праймерите и комплементарните им участъци от матричната, едноверижна ДНК. Температурата за осъществяване на това взаимодействие е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на използваните праймерни секвенции. Емпирично температурата на хибридизация на праймерите може да бъде изчислена по следната формула: **T°C хибридизация = [(A+T)$_{x2}$+(G+C)$_{x4}$]-5°C**
- ***Синтез*** *(elongation)* – под действието на полимеразата се осъществява синтез на нова ДНК верига, комплементарна на матричната ДНК верига. Синтезиране на нова, комплементарна на матричната, ДНК верига в посока 5΄→3΄. Температурата на този етап се определя от особеностите на използвания ензим така, че да се осигури най-високата ДНК-полимеразна активност на ензима. Обикновено тази температура е 72˚C. Продължителността на тази стъпка се определя от очакваната дължина на PCR продукта (1 мин. за PCR продукт с големина 1 кб, при използване на *Taq* полимераза).
- ***Краен продължителен синтез*** - Полимеразната верижна реакция завършва с този етап (5 до 10 мин. при 72°C), с цел да се осигури цялостно изграждане на някои частични синтезирани ДНК фрагменти.
- ***Оценка на продуктите получени в резултат на PCR реакцията,*** електрофоретично разделяне на 2% агарозен гел (вж. т. 3.4.2).

Принцип**:**

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Той е в основата и на MSP. Състои се в in vitro ензимно намножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Методът е разработен от Kary Mullis в 1985г, през 1993 г. той получава и Нобелова награда за откритието си. PCR е ключова техника, използвана при повечето анализи в молекулярната медицина. При стандартния метод се използват два вида праймери – прав и обратен. Първият се свързва с кодиращата верига (в посока 5'-3'), а другият се свързва с некодиращата (в посока 3'-5'). Тези праймери (около 20 бази) хибридизират със срещуположните вериги и служат като субстрат на полимеразата, създаваща комплементарни вериги чрез добавка на нуклеотиди. 4-те вида нуклеозидтрифосфати, полимеразата, матрицата, праймерите, магнезиев дихлорид и подходящ буфер оформят реакционната смес. Амплификацията протича в 20-40 повтарящи се цикъла, всеки състоящ се от 2-3 термични стъпки: денатурация на двойно верижната ДНК (93-95^{0}C), свързване на олигонуклеотидните праймери към двата края на таргетната секвенция (50-70^{0}C), копиране на желаната последователност чрез удължаване на праймерите от термостабилната (Taq) полимераза (70-75^{0}C). Секвенцията между праймерите може да се копира множество пъти. Амплифицираните фрагменти може да се разделят на агарозна гел електрофореза според размера си, както и чрез високо ефективна течна хроматография и капилярна електрофореза. Визуализацията става след оцветяване на гела с етидиев бромид или SYBR Green и флуоресценция на УВ светлина (трансилюминатор).

Във всяка амплификационна реакция участват:

- **ДНК** – едноверижна матрица за осъществявания процес, получена след термична денатурация на геномната ДНК.
- **Термостабилна ДНК полимераза (Taq полимераза)** – осъществява процеса на намножаване на желаната ДНК последователност. За първи път е изолирана от микроорганизма *Termophylus aquaticus.* Ензимът Taq полимераза е термостабилен и

запазва своята активност 45-60 мин. при 94˚C – т.е. през целия амплификационен процес. Оптималната температура за синтез с Taq полимеразата е 72˚C. Необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е 1 до 5 U. Катализира синтеза на нови ДНК вериги в посока 5′→3′.

- **Праймери** (зародиши) – представляват къси синтетични олигонуклеотиди (14–40 нуклеотида), комплементарни на ограничаващите намножаваната последователност участъци. От тях започва синтезата на ДНК при всеки нов цикъл на PCR–реакцията. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0.1–1.0μM. Секвенциите на използваните в настоящата работа праймери за анализ на (CAG)n тринуклеотидния повтор в AR и праймерите използвани за секвениране на GSTP1 са представени в Таблица 3.27. Температурата на анилинг на праймерите бе установена след провеждане на градиентен PCR.

Таблица3.27. Секвенция и температура на анилинг (Тан) на праймерите използвани за анализ на тринуклеотидния повтор (CAG)n в AR и за секвенционен анализ на GSTP1.

Ген/ Локализа-ция	Детекция	Секвенция на праймерите	Тан	Размер на продукта в bp
AR Xq12	(CAG)n	F 5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC- FAM -3' R 5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCTCAT - 3'	66^{o}C	222 x 3n (n е брой повтори)
GSTP1	CpG острови	F 5'- GAAAGAGGGAAAGGTTTTTT - 3' R 5'- CCATACTAAAAACTCTAAACCCCATC- 3'	56^{o}C	303

- **Дезоксирибонуклеозид трифосфати (dNTPs) – dATP, dGTP, dTTP, dCTP**. Служат като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига, като се включват избирателно на принципа на комплементарност на базите в структурата на ДНК. Задължително условие е четирите типа dNTP да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес. Оптималната концентрация е 20-200 μM за всеки нуклеотид.
- **Реакционен буфер** – осигурява подходящото pH=8.3–9.0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10-50 mM Tris-HCl с pH=8.3-9.0 ; до 50 mM KCl и 0.5-5.0 mM $MgCl_2$. Освен това, може да съдържа и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти (като DMSO – диметил сулфооксид), бетаин и други. Компонентите на буфера могат да варират качествено и количествено, в зависимост от изискванията на конкретната Taq полимераза.

Проведена е оптимизация на условията чрез вариране на температурата на анилинг и времето за амплификация. Оптимизирани бяха и количествата и концентрациите на използваните компоненти в PCR реакциите. Компонентите на PCR реакциите са представени в таблици 3.28 и 3.29, а условията за протичане на PCR реакциите са представени в таблица 3.30.

Таблица 3.28. Компоненти и количество на PCR реакционния микс за амплификация на AR

Компоненти на реакционната смес за PCR	**Количество (µl)**
ДНК ~50 ng/µl	1
Буфер 10х (без MgCl2)	1
Праймер F 10 pm/ µl	0.3
Праймер R 10 pm/ µl	0.3
$MgCl_2$ (50мМ)	0.3
dNTP 5 mM/ µl	0.8
Taq Platinum-полимераза (500U/ µl)	0.05
dH_2O	6.25
Краен обем	**10**

Таблица 3.29. Компоненти и количество на PCR реакционния микс за амплификация на GSTP1

Компоненти на реакционната смес за PCR	**Количество (µl)**
BSC ДНК ~20 ng/µl	2
Буфер 10х (без MgCl2)	1
Праймер F 20 pm/ µl	0.15
Праймер R 20 pm/ µl	0.15
$MgCl_2$ (50мМ)	0.3
dNTP 5 mM/ µl	0.8
Taq Platinum-полимераза (500U/ µl)	0.05
H_2O	5.55
Краен обем	**10**

Таблица 3.30. Условия за протичане на PCR реакциите

Етапи на PCR реакцията	**Времетраене, температура**	
	Амплификация на GSTP1	**Амплификация на AR**
Начална денатурация	95ºC 10 мин	95ºC 7 мин
Денатурация	94 ºC 1 мин	95 ºC 40 сек
Анилинг	56 ºC 40 сек	66 ºC 40 сек
Елонгация	72 ºC 1 мин	72 ºC 1 мин
Крайна елонгация	72 ºC 7 мин	72 ºC 7 мин
Брой цикли	**45**	**35**

3.4.2. Качествен контрол на полимеразната верижна реакция

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. За положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, за която е известно, че се амплифицира за даден маркер. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. От друга страна в отрицателната контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се замества с ddH2O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

Хоризонтална агарозна гел електрофореза

Използвани Реактиви и Разтвори:

Таблица 3.31. Състав и количество на използваните реактиви и разтвори при работа с агарозна гел електрофореза

Използвани реактиви	Състав	Количество	ddH_2O
5 x TBE buffer (pH=8,0)	90 mM Tris HCl 90 mM борна киселина 1 mM ЕДТА	54 g 27.5 g 4.76 g	до 1000 ml
0.8% агарозен гел	Агароза TBE буфер	0,8 g 20 ml	до 100 ml
2% агарозен гел	Агароза TBE буфер	2 g 20 ml	до 100 ml
3% агарозен гел	Агароза TBE буфер	3 g 20 ml	до 100 ml
Етидиев бромид 10mg/ml	----	1 g	до 100 ml
Разтвор за нанасяне на пробите 10x	0.25% brimphenol blue 15% Ficol или 30% глицерол	0,25 g 15 g 30 g	до 100 ml

Използвана Апаратура:

- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27**);**

- Нивелирана маса за изливане на гела;
- Вана за хоризонтална гел електрофореза (Science-Plus-UK);
- Стартови гребени с размер на зъбците 5 x 1mm;
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фото-документационна система и UV–трансилюминатор с дължина на вълната 315nm (MiniBisPro - Bio Imaging Systems)

Принцип:

Хоризонталната агарозна гел електрофореза представлява метод за разделяне, идентификация и пречистване на ДНК фрагменти. Методът позволява ДНК фрагментите да се разделят един от друг в зависимост от тяхната молекулна маса. Тази техника е използвана за определяне качеството и количеството на амплификационните продукти. За приблизителна оценка на дължината на ДНК фрагментите се използва молекулен маркер (ladder). Това е смес от ДНК фрагменти с известна, точно определена дължина. За целта е необходимо преди началото на електрофорезата маркерът да се нанесе успоредно с анализираните проби. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално pH ДНК фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анод). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите зависи от молекулната им маса, от концентрацията на агарозния гел, температурата, състава и йонната сила на използвания буфер и др. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минамално и ДНК фрагментите се придвижват по бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използава TBE буфер. След приключване на електрофоретичното разделяне, е необходима визуализация на ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид (0.5 μg/ml) се интеркалира между базите в молекулата на ДНК и позволява визуализиране на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина с дължина на вълната λ = 315 nm. Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор.

Етапи:

- Приготвяне на необходимия % агарозен гел
- Нанасяне на пробите върху него
- Протичане на електрофоретичното разделяне на амплифицирания продукт
- Визуализация на разделените по молекулна маса на амплифицирани продукти

Процедура:

- Приготвяне и отмерване на необходимите количества стартови реактиви и разтвори- агароза и 5xTBE буфер. Разтапяне на агарозата.
- Прибавяне на етидевият бромид при достигане на подходяща температура на хомогенната смес.
- Изливане на сместа в подходящо сглобена вана с поставени пластмасови гребени, оформящи стартовете.
- След като гела е стегнал и изстинал се отделя от ваната за изливане и се поставя във ваната за електрофоретично разделяне напълнена с пресен 1xTBE буфер.
- Смесване на 3μl PCR продукта с 3μl разтвор за нанасяне на пробите 10x и нанасянето им на гела. В един от стартовете на гела се нанася и молекулен маркер. Дължината на продуктите от PCR реакцията се идентифицират с помощта на ***молекулни маркери***. В настоящата работа бяха използван 3 молекулни маркер с дължина 50–1000б.дв. за MS-PCR,

100-1000 bp за PCR и 500-2500 bp за тестване на РНК интактност (New England BioLabs).

- Електрофоретично разделяне при 140 W за до 30 мин.
- Визуализиране на разделените фрагменти чрез UV- визуализираща система.

3.4.3. Генотипиране на еднонуклеотидни полиморфизми (Single Nucleotide Polymorhisms – SNP) чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR)

Използвана апаратура:

- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell)
- Beckman BIOMEK®FXp

Етапи:

- Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв;
- Определяне на концентрацията и качеството на изолираната ДНК;
- Изготвяне на 10 ng/µl разредки от стоковите разтвори на пациентите и контролите и разкапването им на 96-ямкови плаки;
- Подготовка на PCR микс;
- Разкапване на PCR микса и ДНК пробите в 384 ямкова плака с помощта на BIOMEK®FXp;
- Протичане на PCR реакцията в 7900 HT Fast Real-Time PCR
- Отчитане на получените резултати и анализ

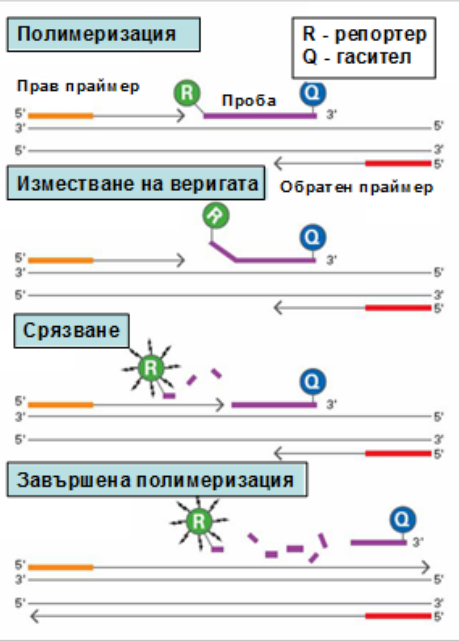
Принцип:

В настоящето изследване са използвани TaqMan® проби за качествено определяне на нуклеотидни последователности. Наличието на две сонди във всяка реакция, позволява генотипирането на двата варианта на еднонуклеотидните полиморфни замени в изследваната секвенция. Всеки TaqMan® експеримент се състои от два основни компонента: два специфични праймера, заграждащи интересуващия ни фрагмент ДНК, съдържащ варианта, който ще бъде изследван; две алел-специфични TaqMan® MGB сонди, за детекция на алелите на полиморфния вариант.

Алел специфичната TaqMan® MGB сонда включва:

- Маркерна боя (флуорохром) в 5’края си - обикновено VIC® багрило е свързано към 5’края на сондата за алел 1, а FAM™ багрилото е свързано към 5’ края на сондата за алел 2. Алел 1 VIC® флуоресцентно белязаната сонда отговаря на единия алел на полиморфизма, а Алел 2 FAM™ флуоресцентно белязаната сонда - на другия. Когато бъде възбудено под действие на енергията на лазерен лъч, всяко от тези багрила излъчва светлина с определена дължина на вълната;
- MGB (Minor groove binder), който повишава температурата на топене (Tm) за конкретната дължина на сондата, позволява дизайн на по-къси сонди. По-късите сонди повишават ефикасността на генотипиране;
- Нефлуоресцентен гасител (NFQ) в 3’края, който подтиска флуоресцентен сигнал, когато е в непосредствена близост до флуорохрома.

Етапите на реакцията при PCR в реално време са представени на Фигура 3.14:



Фигура 3.14. Етапи на полимеразната верижна реакция с използване на TaqMan проби

Всяка TaqMan® MGB сонда се свързва специфично за комплементарната ѝ секвенция между правия и обратния праймер. Когато сондата е интактна, близостта на гасителя до репортера действа, така че подтиска флуоресценцията на репортера.

По време на реакцията, хибридизиралата към матрицата сонда разделя репортера и гасителя. Натрупването на PCR продукти се детектира директно, като се следи увеличаването на флуоресценцията на репортера отчетена с лазер, като данните и обработката на резултатите се извършват чрез компютър. Поради наличието на праймер, Taq полимеразата започва изграждането на комплементарната верига, като спазва 5’->3’ полимеразната и екзонуклеазната активност По този начин Taq полимеразата започва да добавя нуклеотиди по растящата верига и премахва TaqMan® нуклеотидите от прицелната ДНК. Този процес отделя репортера от гасителя като по този начин репортера се активира. На база дължината на вълната на флуоресцентния сигнал, отделен от всяка проба, се определя кои алели присъстват в нея.

Първичната обработка на данните от проведената полимеразна верижна реакция в реално време е направена с програмния продукт на фирмата Applied Biosystems - SDSv2.2.2.

Реактивите, които са използвани и тяхното количество са представени в Табл. 3.32..

Таблица 3.32. Реактиви и тяхното количество използвани при HT Fast Real-Time PCR

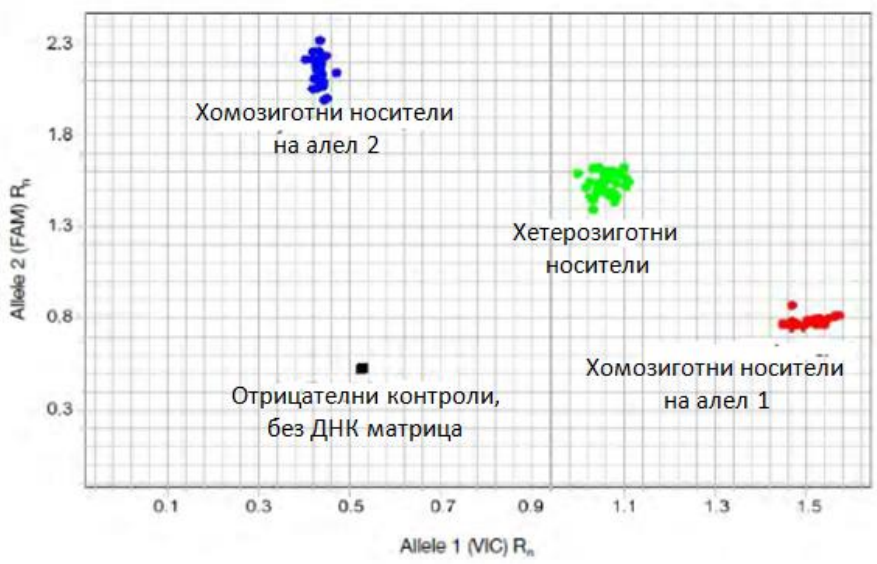
Компоненти	**Количество (µl)**
PCR MIX	2.5
40x SNP mix	0.125
dH_2O	1.375
ДНК (20ng/µl)	1
Краен обем	**5**

Термален профил за всички амплификации е представен в Таблица 3.33:

Таблица 3.33. Условия за протична на амплификациите за SNP генотипиране чрез TaqMan технологията

Стъпка	Температура	Времетраене	Цикли
Активиране на Ampli Taq Gold, UP ензим	95°C	10 мин	1
Денатурация	95°C	15 сек	40
Анилинг/ Елонгация	60 °C	1 мин	

След приключване на амплификацията се отчита сигнала от всяка ямка на плаката и се определя генотипа на всяка проба. Софтуерът прави Allele Discrimination plot, на който могат да се видят клъстери от проби в зависимост от техния генотип (Фигура 3.15)



Фигура 3.15. Примерен Allele Discrimination plot

Всички еднонуклеотидни полиморфизми изследвани чрез TaqMan метода са представени в таблица 3.34.

Във всяка една 384-ямкова плака бяха включвани и 4 негативни контроли, съдържащи PCR микс, но не и ДНК матрица. По този начин се следеше дали има контаминация. За да се определи възпроизводимостта на резултатите и точното определяне на генотипите, то 10% от пробите бяха повторени в независим експеримент. За всикчи изследвани полиморфни варианти не бе наблюдавана амплификация в негативните контроли и бе установена 100% конкордантност на резултатите при повторените проби.

Таблица 3.34. Описание на изследваните полиморфни варианти, информация за локуса и гена, в който се намират и тяхната локализация, и секвенция на TaqMan пробата

Локус/ Ген/ Локализа-ция	Полиморфи-зъм	Секвенция на пробата
2p21, CYP1B1 38303531	rs2567206	CGCTTCATCACAGCCACCTCCAATC[A/G]AGGCCGCACGGTGTCCCCAGAACCA
5p13.2 AMACR 34008100	rs3195676	CCCGGGGCCAGGCCGGACAGCTCCA[C/T]GACCGAGATGCCCTGCAGTGCCATG
7q21.3, LMTK2 97816327	rs6465657	TAATATCTGGTACGTATTGGCTTAC[C/T]GTTTTATTAGTCATTTCTTTGGCAA
8q24 128093297	rs1016343	CAAGACCATGTGTTACATTTCCCTC[C/T]CATGATTACTCACAGCTTCACAGTT
8q24 128093541	rs4871008	AAAATGCATGTTGTTTGAATCACAC[C/T]CTTTCAGATTATACAATTGTAGTCT
8q24 128096477	rs7841060	AGACATCAATATACAGTCTTTGTGT[G/T]TAAGAGGTTCATGGTCTACCTGAGA
8q24 128335673	rs620861	GATACACTAGCAGCTTACATCCTGA[A/G]CCTGGAAAAGCCACAGGCATTCAAC
10q11.23 MSMB 51549496	rs10993994	CTCACCTTGTTATCATTCCCAATGA[C/T]GTCGAATGCGTGGTTGCCCTCTCCA
10q11.23 51532621	rs7920517	TTCTAATACCATTTTCACTTCTCCC[A/G]AATTTTGTGGATCGTTTCTTGGTAT
11p15.5 IGF2 2165173	rs11603378	GGAAGGCGCTGCCGGGGATTCACCT[G/T]GGCTGGGGCGCGCGCGGAGCACTGG
11p15.5 IGF2 2167981	rs2239681	TGGATCCCTCCCTGCAGGCCCTGTC[A/G]TGGGGCAGGTACAGGGACTCCAATC
11p15.5 IGF2 2169014	rs10770125	GCTGGAATCCACCTCCTCCCACACA[A/G]GCTCGGTGGTGACTCTTCGGCCCCT
11p15.5 INS-IGF2 2180772	rs3842756	AAGTCACTTCTCAGTGGCCCCACCA[C/T]CCCTGGCCCCTCAGAGACCCCCGCA
11p15.5 TH 2186335	rs2070762	TCCCTGCTGTGTGGGGGCTGCTGCA[A/G]CCAGGGGTCGGTTTTCTCATCTGTG
11p15.5 2200329	rs11564710	GTGCTTTGACAGCAAATCACATCTC[A/C]TTGCAAGGCCACAGCCCGCCCTGGC
11p15.5 2233574	rs7127900	TTGGGCCATGCGAGGAATGATGGAC[A/G]GATGCAGGCTGCAGCATGGACAGGC
11p15.5 ASCL2 2292080	rs55930300	GGTGCGCCCCCTGCTCCCGGCAGGT**[A/G]**CTTAGTGCGCCCCCAAAGCAAGGTA
12q13.13 53273904	rs902774	GCTCCTCTGCTGCCTCCTAGTGGAT[A/G]TCTGATGTCTCTCCGGTTTGCACAA
19q13.33 KLK3 51349090	rs266849	AGAAAAGGAAC[A/G]ATAAACTAGTGTCATTAGCTTATAA
19q13.33 KLK15 51335943	rs2659056	CCCTCTCCCTGGGTCTCCCATGACC[C/T]TGTCCTAGACGCAGCCAGTGCTGCC

3.4.4. Изследване на (CAG)n микросателитен полиморфизъм в AR гена чрез фрагментен анализ и капилярна електрофореза

Използвана апаратура:

- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

Етапи:

- Изолиране на ДНК от венозна кръв
- Определяне на концентрацията и качеството на изолираната ДНК, и изготвяне на 50 ng/µl разредки
- Амплификация на белязани фрагменти чрез PCR технология ;
- Тестване на амплифицираните продукти на 2%-ен агарозен гел;
- Разделяне на амплифицираните продукти чрез използване на флуоресцентна капилярна електрофореза на автоматичен секвенатор (ABI Prism 3130 xl – Applied Biosystems) или Фрагментен анализ;
- Обработка на получените резултати с помощта на GeneMapper V 4.0 (ABI)

Принцип:

Първоначално микросателитните маркери са се изследвали чрез агарозна гел електрофореза. Но с този метод не може да се осъществи разделяне на фрагментите с висока резолюция и не се постига висока точност в определянето на дължината на алелите. Чрез полиакриламидната гел електрофореза се постига по-добро разделяне на фрагментите в сравнение с агарозната гел електрофореза. Въвеждането на флуоресцентните бои и лазерното отчитане допълнително подобряват резолюцията и точността на електрофорезата. Въпреки това голям напредък в точността в анализа на микросателитните маркери се постига с въвеждането на капилярната електрофореза от различни производители като например Applied Biosystems. Капилярната електрофореза позволява точно и възпроизведимо определяне на размерите на алелите като това става почти изцяло автоматично, което води до редуциране на грешките при отчитане.

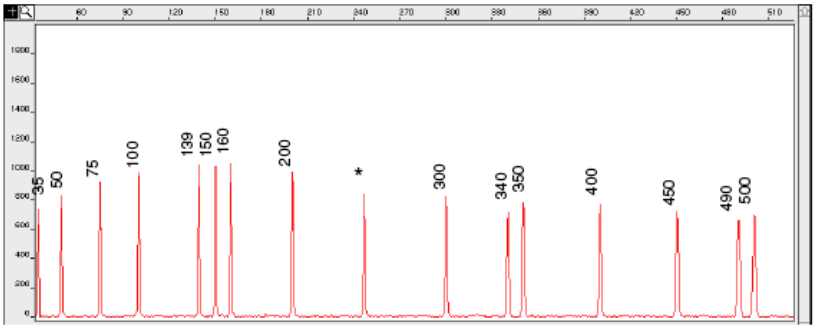
Капилярната електрофореза е процес на разделяне на фрагментите според техния размер въз основа на заряда, който носят. Разтворът с ДНК фрагментите се инжектира във всяка капиляра. По време на капилярната електрофореза продуктите от PCR реакциите (и други отрицателно заредени молекули като соли или свободни праймери и нуклеотиди) навлизат в капилярата в резултат на електрокинетичната инжекция. Продуктите след това се разделят по размер въз основа на техния общ заряд. Електрофоретичната подвижност на пробите може да бъде повлияна от условията на протичане на капилярната електрофореза: типа буфер, концентрацията, pH, температурата, количеството приложен волтаж и типа на полимера.

Преди да достигнат положителния електрод, флуоресцентно белязаните ДНК фрагменти разделени според размера си преминават през лазерен лъч. Лазерният лъч предизвиква багрилата прикрепени към фрагментите да флуоресцират. След това CCD камера отчита флуоресценцията. Флуоресцентните сигнали се конвертират в дигитални и след това данните могат да бъдат анализирани.

Всяка проба се смесва с вътрешен стандарт преди електрофореза. Вътрешният стандарт изпълнява две основни функции: 1) позволява определянето на размера на получените след електрофорезата пикове тъй като стандартът представлява смес от фрагментни с известна дължина (в bp – базови двойки) и дължината на пробата се

определя чрез сравнение на миграционната скорост по време на електрофорезата с тези на стандарта; 2) позволява коригиране на вариации в инжектирането, водещи до различия при сравнението на едни и същи ДНК фрагменти от различни капиляри, пускани по различно време или отчитани на различни инструменти.

В текущото проучване бе използван молекулния стандарт GeneScan™ ROX 500, при който дължината на фрагментите е от 35 до 500 bp (Фигура 3.16). Съдържа общо 16 фрагмента.



Фигура 3.16. Визуализация на броя и дължината на пиковете съдържащи се в GeneScan™ ROX 500

Процедура:

Преди провеждането на капилярната електрофореза PCR продуктите бяха смесвани с формамид и GeneScan™ ROX 500 като това е представено в Таблица 3.35. Бе оптимизирано количеството PCR продукт необходимо за провеждането на фрагментния анализ.

Бяха изготвени допълнително и алелни свидетели, съдържащи известен брой (CAG)n повтори определени чрез директно секвениране. В единият алелен свидетел включихме фрагменти съдържащи четен брой (CAG)n повтори (14, 16, 18. 20, 22, 24, 26, 28), а в другия фрагменти съдържащи нечетен брой повтори (15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31). По този начин контролирахме варирането в отделните експерименти.

Таблица 3.35. Количество на компонентите необходимо за провеждане на фрагментния анализ

Компонент	**Количество (в µl)**
PCR продукт	2.5
Hi-Di™ Формамид	9.8
GeneScan™ ROX 500	0.7
Краен обем	**13**

Отчитането на дължината на фрагментите бе осъществено с помощта на GeneMapper software.

3.4.5. Анализ на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* чрез топене с висока резолюция на ДНК (High Resolution Melting Analysis- HRMA)

Използвани реактиви:

Таблица 3.36. *Необходими реактиви за анализ*

Етап	Компоненти на реакционната смес	Количество за една реакция(µl)
Провеждане на PCR	Бисулфитно превърната ДНК	x- варира, но крайната концентрация е 25 ng
	10x Буфер	2.5
	5 mM dNTP	0.5
	$MgCl_2$	0.75
	Праймер F 10 pM	0.6
	Праймер R 10 pM	0.6
	Taq Platinum-полимераза (500U/ µl)	0.15
	dH_2O	варира
	Syto 9	0.9
	Краен обем	**25.0**
Контроли на PCR продукт	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) -100% метилирана(Qiagen)	2.5
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) -75% метилирана(Qiagen)	2.5
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl)(Qiagen) 50% метилирана	2.5
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) 25% неметилирана(Qiagen)	2.5
	контролна бисулфитна ДНК (10 ng/ µl) 100% неметилирана(Qiagen)	2.5

Използвана апаратура**:**

- Апарат за PCR-амплификация в реално време RotorGene 6000 (Qiagen).
- Устройство за разбъркване - Vortex-Press-to-mix (Snijders)

Етапи**:**

- Изолиране на ДНК от урина и определяне на концентрацията;
- Бисулфитно третиране на ДНК и определяне на концентрацията;
- Провеждане на PCR и MS-HRM анализ на RotorGene 6000
- Отчитане на резултатите

Принцип**:**

Методът се базира на факта, че едноверижни ДНК фрагменти (носещи или не мутация), които се различават дори по един нуклеотид, формират различни конформационни структури. Тези ДНК фрагменти с различна конформация се движат с различна скорост в електрофоретично поле и по този начин могат да бъдат идентифицирани.

Анализът чрез топене с висока резолюция (HRM) представлява високо ефективен и бърз метод за детекция на мутации, полиморфизми и епигенетични промени в двойно - верижната структура на ДНК. Първоначално е бил разработен за SNP генотипиране (Wojdacz TK et al., 2007), но в последствие набира широка популярност и за

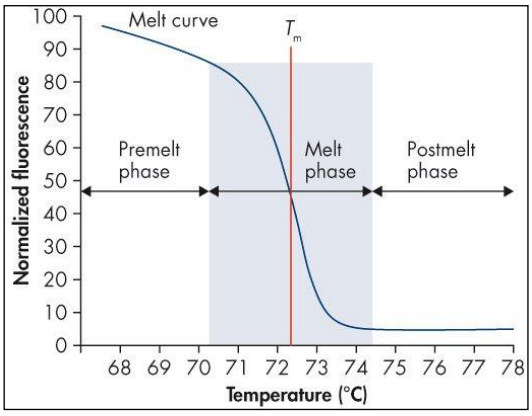
идентифициране и на друг вид генетични аберации. Тази техника се основава на поведението на дисоциация на ДНК в резултат на постепено повишаване на температурата. Профилът на топене на ДНК зависи от съдържанието на цитозин и гуанин и общото разпределение на базите в нуклеотидната секвенция. Районите, които са богати на аденин и тимин, се топят по-бързо, в сравнение с тези, които са богати на цитозин и гуанин.

Таблица.3.37. Основни класове единични базови замени и процентното им рапределение в човешкия геном.

Клас SNP :	Базова замяна:	Разлика в температурата на топене на хомозиготните проби:	Процентно разпределение при човек:
I	C/T и G/A	Голяма: >0.5°C	64%
II	C/A и G/T		20%
III	C/G		9%
IV	A/T	Много малка: <0.2°C	7%

При анализът чрез топене с висока резолюция прицелният участък от геномната секвенция се генерира чрез амплификация и след това се подлага на топене при условия на постепенно повишаване на температурата в малки интервали от време. Подобно на много PCR техники в реално време, HRM използва способността на някои багрила да флуоресцират без да инхибират PCR реакцията, когато са инкорпорирани в двойно-верижна ДНК [376]. **SYTO 9** представлява ново поколение флуоресциращо багрило, което се интеркалира в двойноверижната структура на ДНК. SYTO 9 може да се използва във високи концентрации без да повлияе протичането на реакцията, като показва еднаква склонност за свързване с области, богати на гуанин/цитозин и аденин/тимин, без предпочитания към типа последователност. Това превръща SYTO 9 в най – подходящото флуоресциращо багрило за HRM анализи на различни амплификационни продукти.

При провеждане на анализа, температурата се увеличава постепенно от ниска към висока. Флуоресценцията на третото поколение флуоресциращо багрило (**SYTO 9**) се измерва непрекъснато и се представя графично като функция от температурата. Повишена флуоресценция се измерва само тогава, когато багрилото е свързано с ДНК. При по-ниски температури флуоресценция е висока, тъй като ДНК е двойноверижна. При повишаване на температурата ДНК започва да се денатурира в резултат на топене на двойноверижната структура. При този процес багрилото се освобождава и флуоресценцията постепено намалява. При анализиране на резултатите температурата на топене (Тт) на дадена проба се наблюдава в т. нар. фаза на топене. При тази фаза промяна във флуоресценцията е най – голяма. Когато ДНК се стопи напълно, се наблюдава рязък спад в нивото на флуоресценция (Фигура 3.17.).



Фигура 3.17. Основни фази при топенето на двойноверижна ДНК. Синята крива показва типичен профил на топене на ДНК. Във фазата на топене се измерва Тт – температурата на топене.

Промяната във флуоресценцията на багрилото е показател за увеличаването на концентрацията ДНК по време PCR реакцията, а също така се използва и за проследяване профила на топене на ДНК по време на HRM анализа. HRMA дори позволява откриването на много фини разлики между две ДНК секвенции - дори при разлика само в един нуклеотид.

Едно от приложенията на HRM технологията е за анализ на метилиране чрез сравняване на профилите на топене на неизвестни проби с профилите на напълно метилирани и неметилирани контроли амплифицирани след бисулфитна модификация (MS-HRM). PCR продуктите на метилираните проби имат различен GC състав от PCR продуктите на неметилираните проби, в които цитозиновите ще са се превърнали в урацилови остатъци след бисулфитната модификация. По тази причина продуктите ще имат различен профил на топене. Анализът чрез топене с висока резолюция не дава информация за статуса на метилирани на отделни цитозини в изследваният локус, но може да направи разграничение между напълно и частично метилирани проби.

Праймерите използвани в MS-HRM анализа са избрани от изследването на Wojdacz и съавтори [376] и са представени в Таблица 3.38.

Таблица 3.38. Секвенции на праймерите за MS HRM и оптимални температури на анилинг ($T_{ан}$) за метилираната и неметилираната контролна ДНК.

Праймер MS-HRM	Секвенция	Размер на PCR продукта	$T_{ан}$
GSTP1_HRM_F	5`- GAGAAGTACGAGATGTGGGGAT -3`	68	57°C
GSTP1_HRM_R	5`- TACACTCCTAACCCCTCCCC -3`		

Коректният дизайн на праймерите позволява избягване на грешки при PCR реакциите. Пропорционалното амплифициране на бисулфитно модифицираните метилирани и неметилирани матрици може да бъде компрометирано от повлияване на PCR и преимуществено амплифициране на една от двете ДНК матрици тъй като те имат различно съдържание на бази. Този проблем е разпознат отдавна при анализирането на промоторно хиперметилираните гени като е наблюдавана преференциална амплификация на неметилираните вериги. Това относително диспропорционално амплифициране може да доведе до неправилно интерпретиране на резултатите и отчитане на по-малък процент метилиране от реалния. За да се избегне това, то трябва да се спазват определени правила при дизайна на праймерите: 1) всеки от праймерите трябва да съдържа един или два CpG динуклеотида; 2) CpG динуклеотидите трябва да са разположени колкото се може по-близо до 5'-края на всеки праймер; 3) температурите на топене на праймерите трябва да са много сходни като се допуска максимална разлика от 1ºC; 4) 3'-края на праймера трябва да съдържа един или повече T остатъци комплементарни на цитозиновите остатъци извън CpG динуклеотидите, за да се подсигури амплификация само на бисулфитно превърната ДНК; 5) праймерите трябва да отговарят на стандартните ограничения за избягване на формиране на вторични структури, праймерни димери и др; 6) праймерите да амплифицират фрагменти около 100 bp, за да се опрости сложността на профила на топене.

Условията за протичане на PCR реакциите и MS-HRMA са следните:

- начална денатурация 95°C - 10 мин.
- 95°C - 20 сек.
- 57°C - 20 сек.
- 72°C- 30 сек.

45 цикъла

- краен синтез 72°C - 5 мин.
- HRM 70-90ºC – 0.1ºC/сек

Температурата на анилинг на праймерите бе оптимизирана след провеждане на градиентен PCR. Амплификацията на достатъчно количество PCR продукти от бисулфитно модифицирани матрици обикновено изисква провеждането на по-голям брой цикли в сравнение със стандартните PCR амплификации. Броят на циклите бе оптимизиран като първоначално започнахме с 50 цикъла. Бяха оптимизирани и условията за протичане на HRM анализа: температурния диапазон и градусите, с които се покачва температурата през 1 секунда.

3.4.6. Анализ на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* чрез MethyLight анализ

Статусът на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* бе определен чрез метода MethyLight [377-382]

Използвана Апаратура:

- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell)
- Beckman BIOMEK®FXp

Етапи:

- Дизайн на праймерите и пробите за провеждането на анализа
- Изолиране на ДНК от урина и определяне на концентрацията
- M.SssI третиране на геномна ДНК за изготвяне на 100% метилирани контроли
- Бисулфитно третиране на ДНК и определяне на концентрацията
- Изготвяне на разредки от бисулфитно третираните ДНК-и
- Провеждане на MethyLight анализа
- Отчитане на резултатите и изчисляване на PMR (percentage relative to an M.SssI-treated methylated DNA reference sample)- процент метилиране определено спрямо M.SssI-третирана метилирана референтна ДНК проба.

Принцип:

MethyLight е бисулфитно зависим, количествен, флуоресцентно базиран (TaqMan) PCR в реално време метод, който открива и количествено определя ДНК метилирането в геномна ДНК. Представлява много чувствителен метод, който може да открие метилирани алели в присъствието на 10 000 пъти излишество на неметилирани алели. MethyLight методът се базира на специфична хибридизация на праймери и проби към метилирани матрици.

При този тип анализ се използват два типа реакции: 1) MethyLight реакции: бисулфитно превърнатата ДНК е матрица. Праймерите и пробата са специфични за метилирана ДНК и също така са специфични за бисулфитно третирана ДНК; 2) Бисулфитно специфична контролна реакция (ALU-C4): измерва количеството бисулфитно третирана ДНК в реакцията и служи за нормализация. Тази реакция не е специфична за метилирани матрици но е специфична за бисулфитно третирана ДНК. Следователно бисулфитно третираната ДНК от всяка проба и от M.SssI третираната ДНК се използват за два вида реакции като това се прави в две повторения. За всяка 384- ямкова плака се построява и 4 точкова стандартна крива с M.SssI третираната ДНК и ALU-C4 контролната реакция в 6 ямки като отново е в две повторения (общо 12 ямки).

Количеството метилирана ДНК бе определено с помощта на PMR. Формулата за изчисляване на PMR е следната:

$$[((\textbf{GENE}\text{-X mean value})_{sample}/(\textbf{ALU} \text{ mean value})_{sample}) / ((\textbf{GENE}\text{-X mean value})_{M.SssI}/(\textbf{ALU} \text{ mean value})_{M.SssI})] * 100$$

- Щом PCR програмата е свършила, то C(t) стойностите се конвертират в C(t) средни стойности и се изчислява Quantity mean с помощта на стандартната крива за всяка плака
- PMR стойностите се изчисляват поотделно и за двете стандартни криви. След това PMR стойностите, които се получават, се усредняват
- Проби с PMR стойности над 10 се смятат за метилирани

Дизайн на праймери и проби:

За дизайнът на TaqMan праймерите и пробите специфични за метилирана ДНК използвахме софтуера Beacon Designer 7. Този софтуер може да бъде открит на следния сайт: (http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index/methylight.html).

При дизайнът и изборът на праймери следвахме следните критерии и изисквания:

- За да разграничават метилирана от неметилирана ДНК, праймерите трябва да съдържат колкото се може повече CpG (поне един CpG) и най-добре да се намират на 3’ края. Поне една от трите бази в 3’ края на праймера трябва да е C от CpG.
- Избягване на праймери с висока вероятност за образуване на вторични структури и праймерни димери като се увеличи максимално дължината на праймерите
- Продуктът на праймерите не бива да е над 500bp (а за Real Time анализите над 300bp) тъй като ДНК може да е частично деградирала след бисулфитната модификация

При дизайна и избора на проби следвахме следните критерии и изисквания:

- В последователността на пробата трябва да се съдържат 3-5 потенциални метилационни места, за да се повиши специфичността и за да се намали погрешната хибридизация
- В свързващите места на пробата трябва да има поне няколко цитозина в матрицата, за да се осигури специфичността към бисулфитно превърната ДНК и за да се ограничи получаването на фалшиво положително резултати поради не пълно бисулфитно превръщане.
- Дълги повтарящи се последователности трябва да бъдат избягвани
- Tm на пробата трябва да е с 10^{o}C по-висока от тази на праймерите
- G+C съдържанието трябва да бъде 30%-80%
- Не трябва да има G в 5’ края на пробата
- Пробите трябва да са до 15-30 нуклеотида дълги
- Не повече от две G+C трябва да са на 3’ края
- Дължината на ампликона трябва да е 50-150bp (максимум 300bp). PCR продуктите трябва да са колкото се може по-къси, за да се повиши ефикасността

Последователността на праймерите и пробите са представени в Таблици 3.39 и 3.40.

Таблица 3.39. Използвани праймери и тяхната последователност

Праймер	**Последователност (5'→3')**
ALU-forward ALU-reverse	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA ATTAACTAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA
RASSF2-forward RASSF2- reverse	GAGAGGATAGCGGACGAGTAGATT CAACCAAACTAAACAAACGATAACCG
HIST1H4K- forward HIST1H4K- reverse	GATCACCGCCATAAATATAATCTACG TTGATAGAAAGGGACGTTTAATTATCG

Таблица 3.40. Използвани проби и тяхната последователност

Име на пробата	**Последователност (5'→3')**
ALU-Probe	6FAM-CCTACCTTAACCTCCC-MGBNFQ
RASSF2- Probe	6FAM-AAAACCGAACGCCCCGCCCTCCTC-TAMRA
HIST1H4K- Probe	6FAM-AAACGCCAAAACCGCACCCTCTACG-TAMRA

Процедура:

1) Приготвяне на праймерите и пробите

Тъй като праймерите и пробите са лиофилизирани след като бъдат синтезирани, то е необходимо те да бъдат разтворени в ddH_2O.

- Праймерите трябва да бъдат разтворени, така че крайната им концентрация да е 300μM
- Пробите трябва да бъдат разтворени, така че крайната им концентрация да е 100 μM
- Изготвяне на OligoMix, съдържащ 4μl от 300 μM forward праймер, 4μl от 300 μM reverse праймер, 4μl от 100 μM проба в 600 μl краен обем.

2) Първоначална MethyLight контролна PCR реакция

Тази реакция има за цел да определи максималното разреждане, до което могат да се доведат бисулфитно превърнатите проби. Използва се ALU-C4 контролната реакция и няколко разредки на бисулфитно превърната ДНК. Тъй като ALU-C4 реакцията е много чувствителна и дава много ниски C(t) стойности, то е прието, че пробата, която дава C(t)=22 е максимално разредена. Предпочитат се по-ниски C(t) стойности, за да се получат по-добри данни- C(t) стойности под 20.

3) TaqMan PCR реакции при MethyLight анализите

MethyLight анализът използва TaqMan PCR принципа, който изисква forward и reverse праймери, а така също и олигонуклеотидна проба, която излъчва флуоресцентен сигнал само след като бъде деградирана от 5'→3' екзонуклеазната активност на Taq полимеразата. Методът е описан в точка 3.4.3.

Реактивите, които са използвани и тяхното количество са представени в Таблица 3.41.

Таблица 3.41. Реактиви и тяхното количество използвани при MethyLight анализа

Компоненти	**Количество (μl)**
2x Ampli Taq Gold Master mix	5
Oligo mix	1.5
dH2O	1.5
DNA (5ng/μl)	2
Краен обем	10

При MethyLight анализа се използват два основни вида реакции коментирани по-горе. И при двете реакции се използва бисулфитно превърната ДНК като субстрат: реакции зависими от метилирането и специфични за метилирана ДНК и независими от метилирането контролни реакции

- При зависимите от метилиране реакции, праймерите и пробите са специфични за метилирана ДНК и така също са специфични за бисулфитно третирана ДНК. Те са комплементарни на CpG, а така също и на цитозини, които не се намират в динуклеотидите CpG (метилираните C в CpGs ще останат CpGs, но останалите цитозини и неметилираните CpG ще са се превърнали съответно в тимини или TpGs след бисулфитното превръщане и PCR).
- Бисулфитно специфичната контролна реакция (ALU-C4) измерва количеството бисулфитно превърната ДНК. Тези реакции не са специфични за метилирана ДНК, защото няма CpG динуклеотиди в праймерите и пробата, но са специфични за бисулфитно превърната ДНК. Използват се за нормализиране на различното количество и качество на ДНК пробите.

Термалният профил за всички амплификации е следния:

Стъпка 1: 95°C за 10 мин. – 1 цикъл

Стъпка 2: 95°C за 15 сек.
60°C за 60 сек. } **45 цикъла**

4) MethyLight анализ

За да се определи метилационния статус на специфичен ген чрез MethyLight анализ, то са необходими четири PCR реакции. Необходими са два вида проби: бисулфитно превърната ДНК от проба, която ни интересува и M.SssI третирана ДНК като контрола. За всяка една от тези ДНК се осъществява PCR реакция за гена, който ни интересува (в две повторения) и контролна PCR реакция (в две повторения), която мери количеството на амплифициращата се ДНК. Чрез използването на M.SssI третираната ДНК се подпомага контрола на вариациите в реактивите като праймери, проби, на реакционната ефективност, представянето на апарата. Правят се 2 независими 4-точкови стандартни криви като се използва ALU-C4 контролната реакция и M.SssI модифицирана бисулфитно превърната ДНК.

Стандартна крива-построяване:

- M.SssI третираната ДНК (50ng/µl) се разрежда ½- от нея се използва 2 µl. Това е първата проба от стандартната крива- 25ng/µl (но 50ng в PCR реакцията)
- 1:25 разредка на проба 1 (в две повторения)- това е проба 2- 2ng
- 1:25 разредка на проба 2 (в две повторения)- това е проба 3- 0.08ng
- 1:25 разредка на проба 3- 0.0032ng

За определянето на хиперметилирането на двата гена- *RASSF2* и *HIST1H4K*, то от всяка проба ни бяха необходими по 16 µl.

3.4.7. Експресионен анализ на *PCA3* (*DD3*), *PSA* (*KLK3*), *GSTP1, AMACR* и *GOLPH2* (*GOLM1*) в урина на пациенти и контроли чрез TaqMan технологията, PCR в реално време (Real Time PCR)

Използвана апаратура:

- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);

- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific)
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell)

Етапи:

- Изолиране на РНК от урина и определяне на качеството и концентрацията
- Обратна транскрипция за синтез на кДНК
- Изготвяне на разредки на кДНК
- Провеждане на PCR в реално време
- Анализ на генната експресия

Принцип и Процедура:

Принципът на TaqMan метода е описан в точка 3.4.3.

Този метод позволява осъществяването на мултиплексни PCR реакции тъй като пробите за отделните реакции могат да бъдат белязани с различни флуоресцентни багрила. Пробите за изследваните гени бяха белязани с FAM, а пробата за ендогенната контрола (референтна конртола) беше белязана с VIC. Това ни позволи провеждането на дуплексни PCR реакции, съдържащи праймерите и пробите за амплификация на един от изследваните гени и ендогенната контрола. За ендогенна контрола бе избран B2M гена, кодиращ β-2 микроглобулин.

Има два метода за определяне на генната експресия: абсолютен и относителен. В текущото проучване ние използвахме относително количествено определяне на генната експресия с използването на $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода.

Дефиниции:

- **Ендогенна контрола, референтен ген**- контролата е ген, чиято експресия не варира между пробите, които се тестват.
- **Калибратор**- калибраторът е пробата към която се сравняват всички останали. RQ стойността на калибратора е 1, защото не варира при сравнение със себе си.
- **Ct (Cq)** - PCR цикъл. Обикновено един PCR run има около 40 цикъла. Ct е стойността, където PCR кривата пресича някакъв праг в линейната част на кривата. Тази стойност се използва в анализа. По-високите Ct стойности означават, че по-малко mRNA, miRNA присъстват.

PCR реакцията е експоненциален процес, където специфично амплифициращия се продукт в идеалния случай се удвоява след всеки цикъл. Количественото определяне на кДНК по време на амплификационната реакция се осъществява чрез проследяване на флуоресцентния сигнал от репортера – при нарастване на броя на амплифициращите се ампликони флуоресцентният сигнал също се увеличава. Измерваната Cq (Ct) стойност е логаритмична стойност, която е необходимо да бъде конвертирана в линейна количествена стойност чрез функцията: $RQunkn = 2^{\wedge-(\Delta\Delta Ct)}$.

ΔCt = Ct (ген)-Ct (енд.к.), където енд.к. – ендогенна контрола

ΔΔCt = ΔCt (изследвана проба) - ΔCt (калибратор) като ΔCt на калибратора представлява средната стойност получена от всички калибраторни проби (в случая ДПХ контролите)

RQ = 2- $^{\Delta\Delta Ct}$, където RQ е relative quantification (относително ниво на генната експресия)

Всяка една проба бе повторена три пъти и за изчисляване на ΔCt се взимат средните Ct стойности получени за изследвания ген и ендогенната контрола.

Като референтен ген (ендогенна контрола) при анализа на експресията на всички изследвани гени използвахме B2M (β-2 микроглобулин), както в изследванията на други авторски колективи [383, 384].

Всички контроли с ДПХ са калибратори, спрямо които се сравнява експресията на таргетния ген.

Стойността RQ показва с колко пъти е променена експресията в сравнение с калибратора. Калибраторът има RQ стойност 1. Всички проби се сравняват с калибратора. RQ стойност 10 означава, че изследваният ген е 10 пъти по-силно експресиран в дадена проба в сравнение с калибраторната проба. Стойност на RQ 0.1 означава че изследвания ген е с 10 пъти по-ниска експресия.

Приема се, че RQ е значима, когато стойността е > 2 или по-малко от 0.50. При стойност на RQ над 2 означава, че има положителна промяна в експресията (повишение) на съответния изследван ген. При стойност на RQ <0.50, промяната в експресията е с отрицателна стойност (понижение в експресията).

Изчисленията се извършват с помощта на софтуера SDS v.2.2.2 предназначена за използване с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Компонентите на PCR реакционните миксове и техните количества са представени в Таблица 3.42, а условията за протичане на PCR реакцията са като тези при SNP генотипирането представени в Таблица 3.33.

Таблица 3.42. Реактиви и тяхното количество използвани при анализа на генната експресия

Компоненти	Количество (µl)
2x Gene Expression Master mix	5
20x Gene expression assay (target gene)	0.5
20x Gene expression assay (B2M)	0.5
кДНК (100ng/µl) + dH_2O	4
Краен обем	10

3.4.8. Експресионен анализ на let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375 в плазма на пациенти и контроли

Използвана апаратура:

- 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf);
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific)
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Сух стерилизатор MMM (Ecocell)

Етапи:

- Изолиране на РНК от плазма и определяне на качеството и концентрацията
- Обратна транскрипция за синтез на кДНК
- Изготвяне на разредки на кДНК
- Провеждане на PCR в реално време
- Анализ на генната експресия

Относителната генна експресия на изследваните микроРНК-и в плазма бе определена с помощта на $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода описан в точка 3.4.7. За разлика от анализа на биомаркери в урина за анализ на микроРНК-и в плазма използвахме SybrGreen технологията.

Принцип:

Sybr Green багрилото се свързва към двойноверижна ДНК и по този начин се засичат PCR продуктите, които се акумулират при протичането на PCR циклите. Важна разлика между TaqMan технологията и Sybr Green, е че Sybr Green багрилото се свързва към всички двойноверижни ДНК молекули, включително и към неспецифичните продукти. По тази причина е много важно да се оптимизират PCR реакциите за да се получават надеждни резултати.

Принцип на действие на SybrGreen технологията:

1) Sybr Green I багрилото флуоресцира, когато е интеркалирано (свързано) към двойноверижна ДНК;

2) По време на PCR полимеразата амплифицира таргетната последователност, което води до създаването на PCR продукти, наречени ампликони;

3) При напредването на PCR циклите повече ампликони се създават. Тъй като Sybr Green се свързва към всички двойноверижни ДНК-и, то това води до увеличение на флуоресцентния сигнал пропорционално на количеството PCR продукти.

Друга разлика с TaqMan технологията е, че при Sybr Green не могат да се осъществяват мултиплексни PCR реакции.

Процедура:

При анализ на експресията на дадена микроРНК, то за всяка проба бе пускана в две отделни PCR реакции като всяка е в три повторения. В едната PCR реакция се слагат праймерите за излседванта микроРНК, а в другата се използват праймерите за амплификация на избраната ендогенна контрола. За нормализация бе използвана RNU6B като едногенна контрола сходно на много проучвания на микроРНК-и в тъкан и циркулация при РП [332, 385, 386]. Като калибратори бяха използвани или ДПХ контролите или МАМ.

Компенентите необходими за изготвятнеот на PCR микс са представени в Таблиця 3.44.

Таблица 3.43. Сравнение между TaqMan и SybrGreen технологията за осъществяване на PCR в реално време

Метод	Кратко описание	Предимства	Недостатъци
TaqMan	Използва флуоресцентно белязана проба, което позволява детекция на специфичен PCR продукт тъй като флуоресцентния сигнал се повишава. Отчитат се само специфични PCR продукти	• Специфична хибридизация между пробата и матрицата е необходимо за създаването на флуоресцентен сигнал и по този начин значително се намалява фоновия шум и честотата на фалшиво позитивни резултати • Два или няколко специфични таргета могат да бъдат детектирани в една реакция, когато пробите са белязани с различни багрила. Мултиплексният PCR може да намали цената и да подобри прецизността • Няма пост-PCR процесиране, което спестява време	Различна проба трябва да се синтезира за всяка една таргетна последователност
SybrGreen	Използва се багрило, което се свързва към двДНК и започва да флуоресцира и се акумулира при провеждането на PCR циклите. Чувствителен към всички двДНК-и, включително специфични и неспецифични продукти	• Позволява да се следи амплификацията на всяка една двойноверижна ДНК последователност • Не изисква проби и по тази причина се редуцира цената • Множество молекули от багрилото могат да се свържат към една единствена амплифицирана таргетна последователност като по този начин се увеличава чувствителността на детекция на амплифицираните продукти	• Тъй като се свързва към всяка двДНК, включително и към неспецифичните продукти, то може да доведе до получаването на фалшиво позитивни резултати • Понякога е необходимо оптимизиране на праймерите • Не могат да се провеждан мултиплексни PCR реакции • Топене на PCR продуктите се препоръчва, което удължава протокола и изисква визуален анализ на получените пикове.

Таблица 3.44. Компоненти за осъществяването на PCR в реално време за определяне на експресията на зрели микроРНК-и в 384-ямкови плаки

Компонент	**Количество за една реакция**
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
10x miScript Universal Primer	1 µl
10x miScript Primer Assay	1 µl
RNase-free вода	Варира
Матрица cDNA	≤ 1 µl
Краен обем	**10 µl**

Условията на PCR реакцията в реално време, които използвахме са обобщени в Таблица 3.45.

Таблица 3.45. Условия за протичане на real time PCR

Стъпка	**Време**	**Температура**	**Допълнителни коментари**
Първоначална стъпка на активация на PCR	15 мин	95ºC	HotStar Taq ДНК полимеразата се активира при тази стъпка
Условия на 3- стъпалния PCR			
Денатурация	15 сек	94 ºC	
Анилинг	30 сек	55 ºC	
Екстензия (Елонгация)	30 сек	70 ºC	Събиране на флуоресцентните сигнали
Брой цикли	**40 цикъла**		

3.4.9. микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове на туморна и нормална простатна тъкан

микроРНК експресионното профилиране бе осъществено с помощта на Agilent miRNA System.

Използвана апаратура:

- Вакуумна центрофуга
- Микрочипов скенер G2565CA (Agilent Technology)
- Хибридизационна камера с въртящ ротор (Agilent Technology)
- Магнитна бъркалка (x1 or x3) (Thermo Scientific)
- Магнитна бъркалка с възможност за нагряване
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Ледогенератор модел B20A (Fiochetti)
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Таймер
- Десикаторна кутия

Етапи:

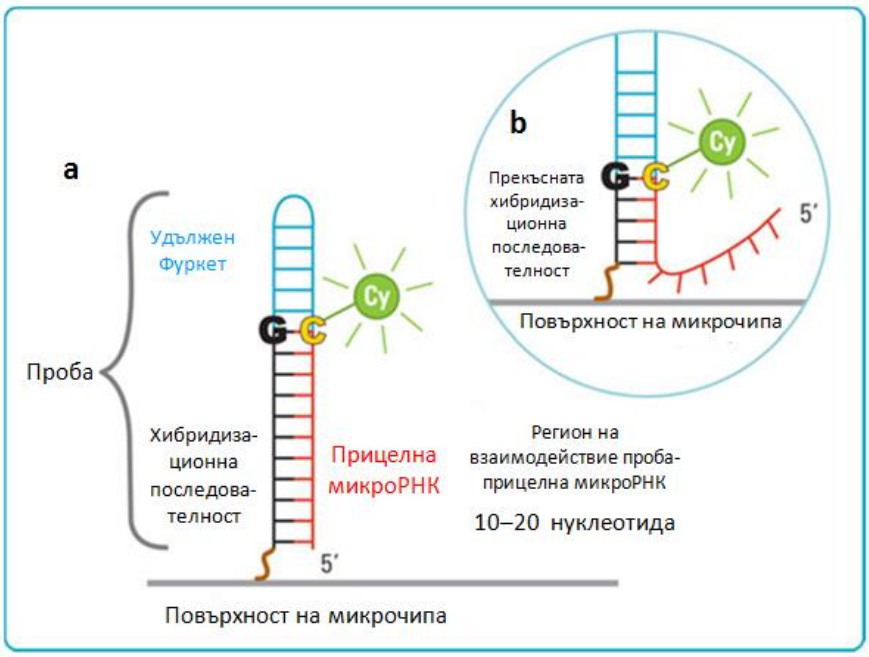
- Отдиференциране на туморна от нормална тъкан от радикалните простатектомии. Избор на нормална тъкан от биопсиите на контроли с ДПХ
- Изолиране на РНК от простатните тъкани

- Определяне на концентрацията и качеството на изолираните РНК-и
- Подготовка на РНК пробите
- Белязане на РНК пробите с Cyanine3-pCp
- Пречистване на белязаните РНК проби
- Хибридизационна реакция
- Промиване на микрочиповете
- Сканиране на микрочиповете с помощта на Feature Extraction Software
- Визуализация, детекция и анализ на резултатите с помощта на GeneSpring 12.6-GX-PA

Принцип и процедура

Профилирането на miRNA експресията представлява голям интерес поради значимата роля на тези къси некодиращи РНК молекули в клетъчната регулация. Експресионни профили на miRNAs са асоциирани с нарушенията на клетъчната регулация при различни видове рак.

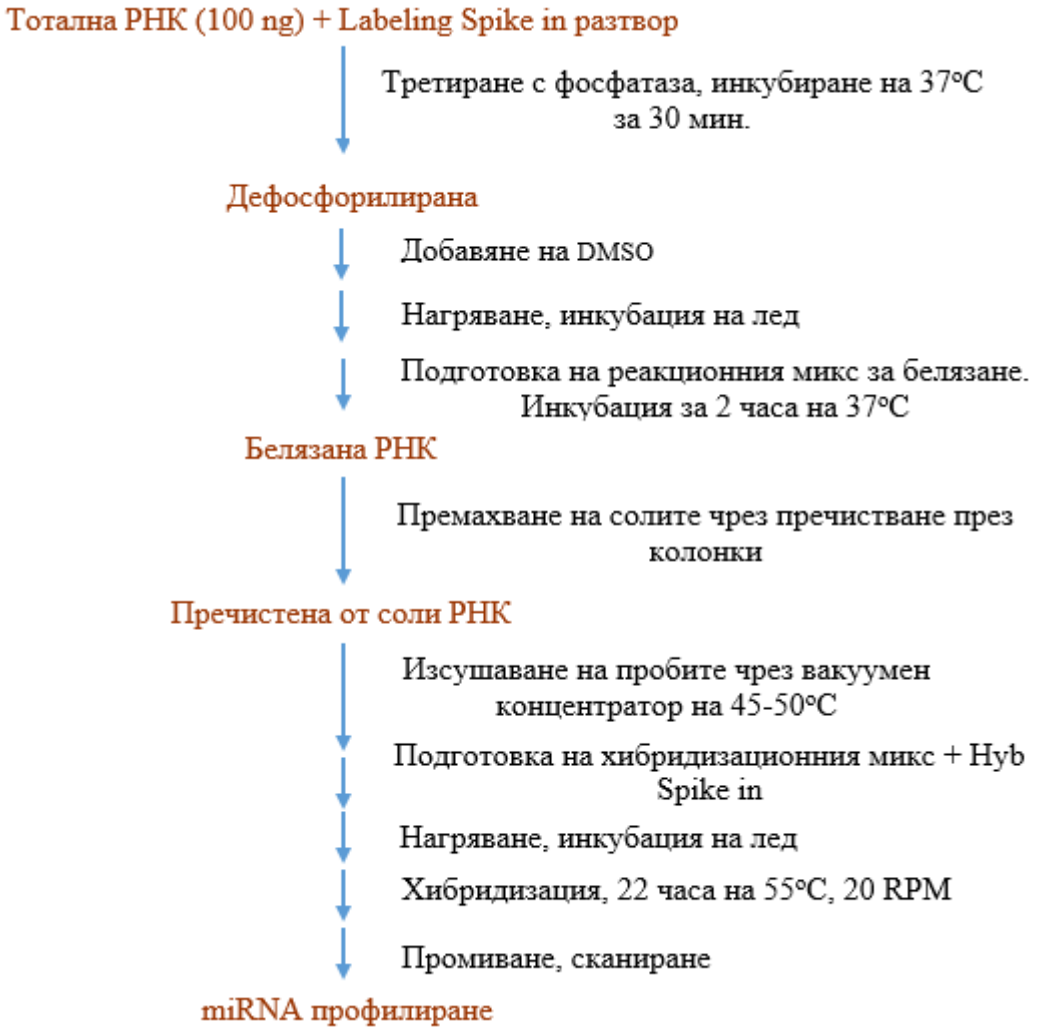
Профилирането на експресията на miRNAs може да бъде осъществено чрез системата на Agilent, която е точна и чувствителна система за микрочипов анализ. За реакцията на белязане е необходимо само 100 ng тотална РНК. Тази РНК се бележи чрез лигиране на Cy-3 pCp молекула към 3’ края на РНК след нагряване в присъствието на DMSO. Белязаният цитозин взаимодейства с гуанидин в 5’ края на пробата (сондата) и по този начин се придава стабилност на хибридизационния комплекс. В допълнение пробите (сондите) са с такъв дизайн, който осигурява както дискриминиране според последователността, но така също и по размер и това води до високо специфична детекция на зрели miRNAs. Пробите са с балансирана Tm и включват фуркетна последователност в 5’ края на пробата, Фигура 3.18. Белязането и дизайнът на проби позволява прецизно и точно измерване, което обхваща линеен динамичен диапазон от по-малко от 0.2 amol до 2 fmol от miRNA и граница на детекция от по-малко от 0.1 amol (D'Andrade PN et al, 2012).



Фигура 3.18. Дизайн на Agilent пробите. *Немодифицираната проба от микрочипа (в черно) е синтезирана последователност, която хибридизира към таргетна miRNA (в червено). Пробите са закотвени към повърхността на слайда (стъклото) чрез краче (в кафяво).* ***(a)*** *Включването на G остатък (в черно) към 5’ края на хибридизиращата последователност комплементира към 3’ крайния C остатък (в жълто), който се въвежда при белязането. G-C двойката в проба- таргет региона стабилизира взаимодействието. В допълнение всички проби (сонди) съдържат 5’*

фуркетна структура (в синьо), опираща региона на взаимодействие проба-таргет и стабилизираща свързването и повишаваща специфичността според размера. ***(b)*** *Tm на пробите (сондите) е еднаква за целия микрочип. За сонди, изискващи редукция на Tm това се осъществява чрез последователно елиминиране на бази до достигане на подходяща дължина в 3' края на хибридизиращата последователност така че проба- таргет взаимодействието е в рамките на 9-20 нуклеотида [387].*

Процедурата за подготовката на пробите и процесиране на микрочиповете е показана на Фигура 3.19.



Фигура 3.19. Работен процес за подготовка на пробите и процесиране на микрочиповете с колонките на Bio-Rad и Spike in.

За осъществяването на микрочиповия анализ следвахме протокола "miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb kit", version 2.4, September 2011 на фирмата производител. Използвахме чиповете: Agilent G4870A, miRBase release 16, 8x60k формат и с AMADID №31181. На всяко от 8-те полета на чипа са включени 1205 човешки miRNAs и 144 човешки вирусни miRNAs. Всяка miRNA е представена поне от 2 различни проби, за да може да дават информация за специфичността.

Използвахме незадължителния за микрочиповия анализ Agilent microRNA Spike-In кит, състоящ се от два microRNA Spike-In разтвора, които служат като технологични

контроли на белязането и хибридизацията. Използвахме този кит тъй като той подпомага разграничаването на значимите биологични данни от вариации и грешки при процесирането (обработването).

Таблица 3.46. Етапи в микрочиповия анализ и използвани консумативи

Етап	Компонент	Количество (µl) за една реакция
Подготовка на Spike In разтворите-приготвяне на серийни разредки	Labeling Spike-In	1
	Hyb Spike-In	1
Подготовка на РНК пробите	тотална РНК (50 ng/µl)	2
	10 x Calf Intestinal Phosphatase Buffer	0.4
	Labeling Spike-In (Third dilution)	1.1
	Calf Intestinal Phosphatase	0.5
	Краен обем	**4**
Денатурация	100% DMSO	2.8
Белязане (Лигазна реакция)	10 x T4 RNA Ligase Buffer	1
	Cyanine3-pCp	3
	T4 RNA Ligase	0.5
	Краен обем	**11.3**
Пречистване на белязаните РНК-и с Micro Bio-Spin 6 Columns и Сушене	RNase-Free H_2O	50
Хибридизационна реакция и Хибридизация за 20 часа	RNase-Free Water	17
	Hyb Spike-In	1
	10 x GE Blocking Agent	4.5
	2X Hi-RPM Hybridization Buffer	22.5
	Краен обем	**45**
Микрочип	Agilent G4870A, miRBase release 16, 8x60k	-
Промиване	Agilent GE Wash Buffer 1	600 ml
	Agilent GE Wash Buffer 2	300 ml

3.4.10. Директно секвениране (Секвениране по Sanger)

Директното секвениране бе използвано за потвърждаване на резултатите получени от фрагментния анализ на (CAG)n повтора в *AR* и резултатите получени от HRM анализа на промоторното хиперметилиране на GSTP1.

Използвана апаратура:

- Центрофуга 5810R за плаки (Ependorf).
- PCR апарат Bioer Gene Pro (Harlow scientific)
- Устройство за разбъркване Press–to–mix (Snijders);
- Автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

Принцип:

Секвенирането на PCR продуктите е референтен метод за директен ДНК анализ. При него, определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да

прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин, те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да синтезира ДНК. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатуриращa полиакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията.

Всеки от четирите дидезоксинуклеотида е белязан с два флуорофора –флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при λ=488 nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се засича от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

Етапи и процедура:

1) Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR. PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните маркери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да са чисти, без неспецифични допълнителни продукти.

2) Пречистване на продукта с ExoSAP. Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP, с цел премахване на dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – Екзонуклеаза I и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP), в буфер.

Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез директното му добавяне към PCR продукта в съотношение 1.5 µl/2 µl PCR продукт:0.4 µl ExoSAP + 1.6 µl dH_2O .

Сместа се инкубира с програма ExoSAP, на PCR апарат, при следните условия: 30 минути на 37ºC и 15 минути на 80ºC за инактивиране на двата ензима. Пречистените проби могат да се съхраняват на -80 ºC или -20 ºC.

3) Секвенционна реакция. Китът за секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1, (Appilied Biosystems), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към 3'-края на всеки един от четирите дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е свързано различно багрило. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация.

Таблица 3.47. Компоненти на секвенционната реакция

Компоненти на рекционната смес	**Количество (µl)**
Матрица (PCR продукт)	4
Праймер (F или R) – 20 pM	0.1
5x секвенционен буфер	2
Секвенционен микс (Big Dye v 3.1 500)	0.4
dH_2O	3.5
Краен обем	**10 µl**

Секвенционната реакция се провежда при следните температурни условия:

- 95°C – 3 мин.
- 95°C – 20 сек.
- 55°C – 20 сек.
- 60°C – 2 мин.

} **30 цикъла**

- 60°C – 5 мин.

4) Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависивост от броя проби, преутавяването може да се направи в епруветки или на плака. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя 3M натриев ацетат, 125 mM ЕДТА и 95% етанол. Така приготвените проби оставият да се инкубират за 15 минути. Време за преципитация, повече от 15 минути може, да доведе до загуба на по-късите фрагменти. След това се прави допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол. Така приготвените утайки се разтварят с 12 µl формамид. Използваните при секвенирането и преутаяването реактиви са представени в Таблица 3.48.

Таблица 3.48. Етапи на преутаяване и количество на използваните реактиви, когато се използват епруветки и когато се използва плака

Преутаяване в епруветки	Преутаяване в плака
1. EDTA- 1 µl NaAc- 1 µl 95% алкохол- 25 µl	1. EDTA- 1 µl NaAc- 1 µl 95% алкохол- 25 µl
2. Инкубиране-15 мин. на тъмно	2. Инкубиране- 15 мин. на тъмно
3. Центрофугиране- 20 мин./14000rpm/стайна температура	3. Центрофугиране- 30мин./3000 rpm/стайна температура
4. Изсушаване на утайките чрез центрофугиране- 30сек /500rpm или чрез вакуум, или чрез пипетиране на супернатантата	4. Изсушаване на утайките чрез центрофугиране- 1мин./180 rpm
5. 70% етанол- 35 µl	5. 70% етанол- 35 µl
6. Центрофугиране- 15мин./14000 rpm	6. Центрофугиране-15мин./1650 rpm
7. Изсушаване на утайките- по един от методите-напр. центрофугиране-30сек /500rpm	7. Изсушаване на утайките- центрофугиране-1мин./180 rpm
8. Съхранение за една нощ на тъмно с отворени капачета, на стайна температура с цел пълното изпаряване на етанолао	8. Съхранение на плаката за една нощ на тъмно, на стайна температура с цел пълното изпаряване на етанола
9. Разтваряне на утайките в 14 µl формамид	9. Разтваряне на утайките в 14 µl формамид

3.5. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Статистическите анализ бяха извършени с помощта на няколко статистически програми като: SPSS v.20 (Windows), Plink, Vassar stats (http://faculty.vassar.edu/), HaploView, MedCalc. Резултатите от асоциативните проучвания бяха проверени за отклоняване от закона на Харди-Вайнберг чрез интернет програма на Helmholtz-muenchen. (http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl)

3.5.1. Изчисляване на алелните и генотипни честоти. Изчисляване на хетерозиготност. Закон на Харди-Вайнберг

3.5.1.1. Изчисляване на алелните и генотипни честоти

За автозомен локус А с два алела А1 и А2 са възможни точно три генотипа: А1А1. А1А2 и А2А2. Изчисляването на генотипните честоти в извадката (пациенти. контроли) става чрез разделяне на броя на индивидите с конкретен генотип на общия брой изследвани индивиди. Например изчисляването на честотата на който и да е от генотипите става по следната формула:

f= Брой индивиди с дадения генотип / общ брой изследвани индивиди

Резултатът може да бъде представен в десетичен вид или като проценти след умножение по 100.

Сумата на всички генотипни честоти в извадката е равна на 1 (100%). Изчисляването на алелните честоти f(A1) и f(A2) в изследваната извадка става с помощта на следните формули:

$$\mathbf{f\,(A1)} = \frac{(2 \text{ х броя индивиди с генотип A1A1}) + \text{броя индивиди с генотип A1A2}}{2 \text{ х общия брой изследвани индивиди}}$$

$$\mathbf{f\,(A2)} = \frac{(2 \text{ х броя индивиди с генотип A2A2}) + \text{броя индивиди с генотип A1A2}}{2 \text{ х общия брой изследвани индивиди}}$$

3.5.1.2. Изчисляване на хетерозиготност

Хетерозиготността (H) е мярка за степента на полиморфност на изследвания автозомен локус. Тя изразява вероятността случайно избран индивид от популацията да е хетерозиготен по отношение на даден локус. Очакваната хетерозиготност (H) се изчислява при предположение, че популацията е в равновесие със закона на Харди-Вайнберг. Използва се следната формула:

$$H = 1 - \sum (p_i)^2$$

,

където p_i е честотата на $i^{тия}$ алел

3.5.1.3. Закон на Харди-Вайнберг

Основното положение залегнало в закона на Харди-Вайнберг е, че в една голяма, свободно кръстосваща се популация алелните и генотипните честоти в даден локус са постоянни. Математическият израз на закона може да се представи чрез следната формула:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2.p.q + q^2$$

,

където p е честотата на алела [A1], а q е честотата на алела [A2], като [A1] и [A2] са двата алела срещащи се в изследвания локус и p+q=1.

Когато това съотношение между алелните честоти е спазено в популацията и съответно в представителната извадка, която се изследва, то това означава, че съществува генетично равновесие за изследвания локус.

Могат да бъдат наблюдавани отклонения от закона на Харди-Вайнберг, които най-често се изразяват в повишена хомозитотност. Това може да се дължи на следните причини:

- Извадката не е подбрана добре и може да съдържа родствено свързани индивиди;
- В популацията липсва свободно кръстосване и в нея могат да съществуват отделни субпопулации, в които алелните честоти да се различават значително от тези характерни за общата популация;
- Върху популацията могат да действат селективни фактори;
- Методът на изследване на генотипните честоти в извадката не е достатъчно прецизен и това води до грешки при отчитането.

3.5.2. Неравновесна скаченост

Неравновесната скаченост възниква, когато генотипите на два или повече локуса не са независими един от друг, тоест съществува неслучайна асоциация на алелите от две или повече локуса в една и съща хромозома. Неравновесната скаченост се базира на измерването на проксималното геномно пространство. С други думи неравновесната скаченост е поява на някои комбинации от алели или генетични маркери в популацията по-често или по-рядко от очакваното при случайното формиране на хаплотипи от алелите, базирайки се на техните честоти. Възниква поради ограничена рекомбинация между два или повече локуса на една хромозома.

Нивото на неравновесната скаченост се повлиява от редица фактори като генетичната скаченост, селекцията, честотата на рекомбинация, честотата на мутациите, генетични дрифт, неслучайните кръстосвания и популационната структура.

Изчисляване на неравновесната скаченост:

Първоначално се определят хаплотипните честоти на два локуса с два алела:

Хаплотип	**Честота**
A1B1	χ_{11}
A1B2	χ_{12}
A2B1	χ_{21}
A2B2	χ_{22}

По този начин се определят относителните честоти, но те могат да бъдат използвани за определяне на честотите на всеки един от алелите:

Хаплотип	**Честота**
A1	$p_1 = \chi_{11} + \chi_{12}$
A2	$p_2 = \chi_{21} + \chi_{22}$
B1	$p_3 = \chi_{11} + \chi_{21}$
B2	$p_3 = \chi_{12} + \chi_{22}$

Честотата на хаплотипа A1B1 е χ_{11}, а според правилата на елементарната статистика $\chi_{11} = p_1q_1$. При отколонение от тази честота, то се наблюдава неравновесна скаченост, която се обозначава с *D*.

$$D = \chi_{11} - p_1q_1$$

Когато два алела са скачени това означва, че $D \neq 0$.

Стойностите за *D* лесно се пресмятат, но недостатък е, че зависят от честотите на алелите. Това е така, тъй като честотите са между 0 и 1. Ако даден локус има алелна честота 0 или 1, то неравновесно *D* не може да бъде наблюдавано. Когато алелните честоти за 0.5, то неравновесната скаченост *D* е максимална. Lewontin предлага нормализиране на D чрез деленето й с теоретичния максимум за наблюдаваните алелни честоти [388]

$$D' = \frac{D}{D_{\max}}$$

Където:

$$D_{\max} = \begin{cases} \min(p_1 q_1,\ p_2 q_2) & \text{когато } D < 0 \\ \min(p_1 q_2,\ p_2 q_1) & \text{когато } D > 0 \end{cases}$$

Неравновесната скаченост между изследваните маркери ($D^2/r2$) е изчислена с помощта на програмата HaploView 4.0 (Broad Institute of MIT & Harvard). а LD – блоковите структури са конструирани по алгоритъма „Confidence intervals" [389]. Като стойностите, които се показват в LD блоковеде са D'. LD блоковете се формират ако 95% от информативните сравнения са в силна неравновесна скаченост („strong LD"). Този алгоритъм игнорира маркерите с честота на редките алели < 0.05.

Обяснението на цветовете в LD блоковете е следното:

	D' < 1	D' = 1
LOD < 2	бяло	синьо
LOD ≥ 2	Нюанси на розовото	Светло червено и червено

За оценка на статистически значимите разлики е построена диаграма тип Manhattan (Manhattan plot). За целта е използвана програмата HaploView 4.0 и данните за хромозомната локализация и трансформираната в отрицателен десетичен логаритъм стойност на p за всеки изследван SNP.

3.5.3. Статистическа проверка на хипотеза

3.5.3.1. Нулева хипотеза

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни. Приема се, че според нея не съществува статистически значима разлика между сравняваните групи. Получените експериментални резултати се обясняват с действието на случайни фактори. Алтернативната (или още експериментална) хипотеза (H_1) е противоположна на нулевата хипотеза. Не се уточнява какъв е типът на зависимостта – т.е. дали присъствието на даден алел/генотип повишава или понижава риска за развитие на заболяването.

Първоначално трябва да се определи нивото на значимост – α (т.нар. Significance Level), което представлява вероятността (риска) да отхвърлим **H_0** хипотезата, дори ако тя е вярна. Най-често използваното ниво на значимост е α=0.05 или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли, когато всъщност е вярна. След това се изчислява и вероятността (P) за получаване на наблюдаваните данни (или на данни с още по-голяма разлика между двете групи) при положение, че нулевата хипотеза е вярна и двете групи всъщност не се различават.

- При $P>\alpha$ H_0 не се отхвърля, което означава. че между сравняваните групи не съществува доказуема (в случая) статистически значима разлика.
- При $P<\alpha$ H_0 се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи

съществува статистически значима разлика.

Нулевата хипотеза може да бъде проверена с различни статистически методи - $\chi 2$, Ман-Уитни U тест, анализа на Крускал-Уолис и др.

Избор на тест за проверка на хипотезата:

1) според вида на разглежданата променлива - непараметрични тестове при слаби скали (при категорийни/качествени или ординални стойности на разглежданата променлива) и параметрични тестове при силни скали (при интервални или количествени променливи);

2) според вида на разпределението на стойностите на променливата - параметричните методи имат изисквания към параметрите на разпределението (например изискват нормално/гаусово/ разпределение), докато при непараметричните част от параметрите нямат значение (или се толерира определено отклонение в стойностите им);

3) според наличието на зависимост между извадките, от които се получават сравняваните параметри, т.е. дали стойностите на променливата получени от едната група (извадка) се влияят от тези на другата. Извадките са независими, ако се сравняват стойностите на признака X в две групи, които нямат връзка помежду си и не споделят външни условия (ковариванти), които биха повлияли на признака X в определена посока. Пример: Две групи пациенти без роднински връзки помежду си. При наличие на роднински връзки резултатите от сравнението се изкривяват в полза на нулевата хипотеза (тъй като родните най-често имат сходни стойности на изследваните променливи). Ако са налице фактори на средата, които влияят на променливата (ковариванти), влиянието им може да бъде неутрализирано чрез групиране на стойностите на променливата според стойността на ковариванта.

4) според броя на сравняваните параметри (с колко извадки се работи) - два или повече.

3.5.3.2. Метод χ^2

Методът χ^2 се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни, произлизащи от някой естествен закон или с предварително приета хипотеза. Статистическият критерий χ^2 за всяка конкретна проверка има една емпирична (χ^2_{EM}) и една теоретична (χ^2_T) стойност. Въз основа на съотношението между тях се приема или отхвърля H_0. Сравнението се извършва между разпределените в матричен вид по колони и редове изследвани индивиди или обекти, според принадлежността им към една от разглежданите групи и наличието или отсъствието на разглежданите фактори/състояния.

Определяне на теоретичната стойност на критерия χ^2 (χ^2_T)

Теоретичната стойност се определя чрез готови таблици (или с компютърни програми), като се има предвид нивото на значимост (α) и броя на степените на свобода (degrees of freedom, df). Стойностите на $\chi 2$ зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били възприети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по формулата:

df = (n-1), където n е броят на сравняваните класове. При разглеждане на матрица с определен брой редове и колони броят на степените на свобода се изчислява по следната формула:

$$\mathbf{df} = (r-1)(c-1)$$, където:

r – брой на редовете в таблицата (най-често r = 2);

c – брой на колоните в таблицата (най-често c = 2).

След това е необходимо да се изчисли теоретично очакваният брой на индивидите във всяка отделна клетка (E, от англ. expected). Това става с помощта на формулата:

$$\mathbf{E_{cell}} = \frac{RxC}{N}$$

E_{cell} - теоретично очакван брой на индивидите в дадена клетка;
R – общ брой на индивидите в реда, в които се намира клетката;
C – общ брой на индивидите в колоната, в която се намира клетката;
N – общ брой на изследваните индивиди.

Изчисляване на емпиричната стойност на $\chi 2$

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

, където n: брой сравнявани класове (клетки в матрицата)
O_i : опитни (наблюдавани) стойности на клас i
E_i : очаквани стойности на клас i

Изваждането на 0.5 от абсолютната разлика между наблюдавания и очаквания брой обекти се нарича корекция на Йейтс (Yates) и се прилага, когато наблюдаваният брой обекти в някой от класовете (клетките) е по-малък от 10.

При приемане верността на нулевата хипотеза по метода $\chi 2$, съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на $\chi 2$ и стойностите на вероятността P, при различни степени на свобода и нива на значимост. Когато емпиричната стойност на χ^2 е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост (α) и степени на свобода (df), първоначалната нулева хипотеза се отхвърля като невярна.

Решението за приемане или отхвърляне на H_0 може да се вземе и въз основа съотношението между теоретичното предварително възприето ниво на значимост ($\alpha_т$ = 0.05) и оценението (по емпиричните данни) ниво на значимост $\alpha_{ем}$. Всъщност $\alpha_{ем}$ е вероятността за появяването на $\chi^2_{ЕМ}$ и може да се означи с p.

При $\chi^2_{ЕМ} > \chi^2_{Т}$ (или респ. $p < \alpha_т$). H_0 се отхвърля в полза на H_1. Приема се, че между наличието на определен алел/генотип и развитието на РГ съществува зависимост (асоциация).

При $\chi^2_{ЕМ} < \chi^2_{Т}$ (или респ. $p > \alpha_т$). H_0 не може да се отхвърли. Но това все още не означава. че тя е вярната хипотеза. В този случай интерпретацията е двузначна: или действително H_0 е вярна и поради това не се отхвърля или H_1 е вярната хипотеза, но това не може да се потвърди с конкретното проучване (например поради недостатъчния брой на наблюдаваните случаи).

Методът $\chi 2$ се прилага. когато са спазени следните условия:

- обемът на извадката надвишава 50 индивида;
- експериментално установеният брой на индивидите във всяка клетка е не по–малък от 5.

3.5.3.3. Тест на Фишер (Fishers's test)

Тестът на Фишер принадлежи към групата на непараметричните статистически методи и се прилага при анализ на категорийни данни (които имат точно определен обикновено малък брой стойности). Тестът на Фишер е изключително подходящ в случайте, когато използваната извадка е с малък размер, т.е. когато е възможно очакваната честота да е под 10 при една степен на свобода. Нарича се още точен, тъй като дава възможност значимостта на отклонението от нулевата хипотеза да се изчисли точно, а не на базата на приближения спрямо теоретична извадка, както е при метода χ^2. При използване на точния тест на Фишер може да се установи статистически значима разлика между две категорийни променливи, когато анализираните обекти се класифицират по два различни показателя.

Когато ограниченията за приложението на метода $\chi 2$ не могат да бъдат удовлетворени, вместо него може да се използва критерият на Фишер. Критерият се изчислява по следната формула:

$$\mathbf{P} = \frac{(a+b)!\,(c+d)!\,(a+c)!\,(b+d)!}{N!\,a!\,b!\,c!\,d!}$$

P – емпирична стойност на критерия на Фишер;
a, **b**, **c**, **d** – експериментално установен брой на индивидите в клетките на таблицата;
N – общ брой на изследваните индивиди.

При $P < \alpha$ H_0 се отхвърля в полза на H_1, а при $P > \alpha$ H_0 не може да бъде отхвърлена.

3.5.3.4. Student's T тест анализ

T-test е всеки статистически тест на хипотеза, в който тестовата статистика (test statistic) следва Student's T тест разпределението, когато нулевата хипотеза е вярна. Може да бъде използван за определяне дали две групи от данни статистически значимо се различават едни от други (тоест идват от различни разпределения) и най-често се прилага при нормално разпределение на данните в двете сравнявани групи.

t- разпределението е всъщност група разпределения, при които броят на степените на свобода (броят на независимите наблюдения за проба минус едно) определят конкретна крива на разпределението. С нарастването на размера на изследваната извадка (и по този начин степените на свобода), то t-разпределението придобива камбановидната форма на стандартното нормално разпределение.

Първоначално се формулира нулева хипотеза, която обикновено гласи, че няма разлика между наблюдаваните средни стойности на двете сравнявани групи и всяко получено различие е случайно. T- тестът може да бъде двустранен (two-sided, two-tailed), посочвайки просто, че средните не са еквивалентни, или едностранен (one-sided), определящ дали наблюдаваната средна стойност е по-голяма или по-малка от предсказаната средна стойност. След това се изчислява тестовата статистика- t и от t-разпределението – p-стойността за конкретния тест. При стойности на $p < 0.05$ нулевата хипотеза се отхвърля.

Повечето t-тестове имат следната форма: t = Z/s, където Z и s са функции на данните. Обикновено Z е избрана така, че да е чувствителна към алтернативната хипотеза (стойността на Z има тенденция да е по-голяма, ако алтернативната хипотеза е вярна), докато s е скаларен параметър, който позволява да се определи разпределението на t.

Пример за one-sample t-тест е:

$$t = \frac{Z}{(s/\sqrt{n})} = \frac{(\bar{X} - \mu)/(\sigma/\sqrt{n})}{(s/\sqrt{n})}$$

Където $\bar{X}$ е средна стойност на измерванията $X_1, X_2, ..., X_n$ на извадка n и s е стандартното отклонение. σ е популационното стандартно отклонение на данните.

Предположенията, които се правят при t-теста са следните:

- *X* следва нормално разпределение със средна стойност μ и дисперсия σ^2
- s^2 следва χ^2 разпределение с p степени на свобода при нулева хипотеза, където p е положителна константа
- Z и s са независими

Student's t-тестът бе използван например при сравнението на стойностите на ΔCt на даден пациент с тези получени за калибраторите за даден ген. Този тест широко се използва за идентифицирането на диференциално експресирани гени.

3.5.4. Съотношения на шансовете, относителен риск (Odds ratio – OR)

За оценяване размера на ефекта (effect size. сила на връзката между две променливи при статистически анализ) се анализира съотношението на шансовете (Odds Ratio. OR). OR е относителна мярка за риска или вероятността дадено събитие да се случи сред дадена група обекти. когато е налице даден фактор. в сравнение с група обекти, при които факторът липсва. Оценка на 95% доверителен интервал (95%CI) и съотношението на шансовете се прави на базата на заключенията за рисков алел за всеки полиморфизъм поотделно.

Величината Odds се изчислява чрез разделяне на броя на пациентите. които носят конкретния алел/генотип на броя на пациентите. които не носят конкретния алел/генотип. Величината $Odds_2$ се изчислява по аналогичен начин. но касае групата на контролите. OR се изчислява чрез разделяне на $Odds_1$ на $Odds_2$ в съответствие с формулата [390]:

$$OR = \frac{b\,c}{a\,d}$$

OR – Odds ratio;
a – брой пациенти, които не носят конкретния алел/генотип;
b – брой пациенти, които носят конкретния алел/генотип;
c – брой контроли, които не носят конкретния алел/генотип;
d – брой контроли, които не носят конкретния алел/генотип

При OR = 1. вероятността за развитие на заболяването е еднаква за двете групи (пациенти и контроли). В този случай проучваният фактор не оказва влияние върху развитието на заболяването.

При OR > 1. вероятността за развитие на заболяването е по-висока за групата на пациентите в сравнение с контролните индивиди. В този случай проучваният фактор е рисков за съответното заболяване.

При OR < 1. вероятността за развитие на заболяването е по-висока за групата на контролите в сравнение с болните индивиди. В този случай проучваният фактор оказва протективно (защитно) действие по отношение на заболяването.

95% доверителният интервал (CI) се използва за определи прецизността на изчислената стойност за OR. Голям доверителен интервал показва ниска прецизност на OR, докато тесен доверителен интервал показва висока прецизност, точност на получения OR. За разлика от p стойността 95% CI не измерва статистическата значимост.

3.5.5. Тест на Ман-Уитни (Mann–Whitney) за променливи с множество измервания

U-тестът на Ман-Уитни (който понякога се отбелязва и като W-тест на Ман-Уитни) има същата цел и познавателно значение, както независимия t-тест (теста на Стюдънт) за независими извадки, но постигането на тази цел се извършва на базата на други статистически съображения. Първата основна характеристика на U-теста е, че неговото провеждане не предявява изисквания към вида на разпределението на изследваната променлива. Влагайки известни несъществени за практиката елементи на неточност, може да се каже, че U-тестът на Ман-Уитни използва медианата вместо средното като цел и средство за извършване на сравнението. Медианата Me представлява другата следваща по важност мярка за централна тенденция на числови променливи след средното μ. Отклоненията във формата на разпределение на дадена метрична променлива се получават

най-вече като следствие от малкия обем на извадката, например по-малък от 30. Затова използването на непараметрични тестове се препоръчва именно в случаи на извадки с малки обеми. Втората важна характеристика на U-теста се състои в това, че обработката на резултатите от извадките не се извършва директно върху отчетените стойности на променливата, а върху техните поредни номера – рангове. Подреждането става като най-малката стойност получава ранг 1, следващата по големина получава ранг 2 и т.н., докато се изчерпят наблюденията.

Нека за променливата X разполагаме с извадка с обем m, а за променливата Y разполагаме с извадка с обем n. Като обединим двете извадки получаваме една обединена извадка с обем m+n, за която пресмятаме поредния номер на всяко наблюдение. Ако с Wx означим сумата от ранговете на стойностите от извадката за променливата X, то нулевата хипотезата гласи, че двете извадки произхождат от еднакво разпределени непрекъснати променливи, т.е. няма статистически значима разлика между Wx и Wy.

3.5.6. Оценка на процента на фалшиво позитивни резултати (асоциации) при множествени сравнения: тест на Benjamini–Hochberg FDR

Множественият сравнителен анализ (корекция при множествени изследвания; correction for multiple testing) е процедура, с помощта на която се коригира стойността на величината p (p – value) получена при провеждане на голям брой аналогични статистически тестове. Прилагането на тази процедура има за цел да намали вероятността от възникване на грешка от тип I (α грешка или получаване на фалшиво позитивен резултат), изразяваща се в погрешно отхвърляне на нулевата хипотеза.

Benjamini–Hochberg (BH) корекцията е модифициран вариант на корекцията на Бонферони (Bonferroni correction) и за разлика от нея не е толкова строга.

При BH метода първоначално p стойностите се сортират и ранкират (определят им се места в редицата). Най-малката p стойност се определят като номер 1, следващата е номер 2, а най-високата p стойност се определя като N (където N е общия брой на p-стойностите). След това всяка p стойност се умножава по N и се дели на своя определен номер като така се получава коригирана p стойност [391]. Тази тип корекция бе използван за коригиране на p стойностите получени от Mann-Whitney теста при микроРНК микрочиповия анализ.

Точната формула на BH е:

$$\tilde{p}_{(n)} = p_{(n)}$$

$$\tilde{p}_{(i)} = \min(\tilde{p}_{(i+1)}, (n/i)\, p_{(i)}), i = (n-1), \ldots, 1$$

,

където $p(1) \leq p(2) \leq \ldots\ldots\ldots \leq p(n)$ в конкретния случай е броя изследвани микроРНК-и.

Този тип корекция бе избрана тъй като се препоръчва от фирмата производител на микрочиповете използвани в проучването. Benjamini–Hochberg FDR корекцията не е толкова строга в сравнение с останалите методи за корекция, но осигурява добър баланс между откриване на статистически значимо повлияни микроРНК-и и ограничение на фалшиво позитивните резултати. Подходяща е за малки проучвания, каквото е нашето с включени само 19 туморни и 14 нормални простатни тъкани. Bonferoni корекцията е най-строгият метода и предлага най-консервативния подход за контрол на фалшиво позитивните резултати. Подходяща е за големи проучвания.

Интерпретирането на резултатите според подбрания тест за корекция е представено в Таблица 3.49.

Таблица 3.49.

Тип тест	Тип контрол на грешката	микроРНК-и (гени) идентифицирани по случайност след корекцията
Bonferoni	Family-wise error rate	Ако се тестват 10 000 гени, при избрана гранична стойност на $p \leq 0.05$, то 0.05 от гените ще са значими по случайност
Bonferorni Step-down		
Westfall and Young permutation		
Benjamini–Hochberg	False Discovery Rate	Ако се тестват 10 000 гена, при избрана гранична стойност на $p \leq 0.05$, то 5% от гените определени като статистически значими ще са идентифицирани по случайност

3.5.7. Корелационни анализи

Корелационният анализ е метод за обработка на статистически данни, използван за изучаване на зависимостта (корелацията) между променливи. При анализа се сравняват коефициентите на корелация между една или повече двойки променливи, за да се установят статистически взаимозависимости между тях. Когато върху дадено явление влияят много фактори, а се изследва само един от тях, зависимостта е непълна. Силата (степента) на корелационните зависимости се измерва с помощта на коефициенти на корелация. Стойността им се движи в границите от -1 до +1. В зависимост от измерителната скала, в която са изразени променливите, се ползват различни коефициенти на корелация.

3.5.7.1. Корелационен коефициент на Пиърсън (Pearson)

Най-широко използваният индекс за линейна зависимост е коефициентът на корелация на Пиърсън, индекс отразяващ степента, в която стойностите две променливи са линейно свързани (и потенциално зависими) една от друга. Прилага се, когато и двете променливи са количествени, а зависимостта им е близка до линейната по форма. Изчислява се по следната формула:

$$r = \frac{\sum((x_i - x_{bar})(y - y_{bar}))}{[(n - 1)s_x s_y]}$$

, където X и У са променливите, X_i е i-тата стойност на X, е средната стойност на X, n е броя на измерванията, и s_x е стандартното отклонение на стойностите на променливата X.

Стандартният символ, с който се бележи коефициентът на корелация е r. Коефициентът може да заема стойности от -1 до +1. Когато r = 0 няма линейна връзка между променливите, т.е няма никаква корелация. Когато r = 1 или r = -1 има пълна линейна корелация между стойностите на двете променливи. Това означава, че диаграмата на стойностите в тези случаи ще бъде права линия с положителен (или съответно отрицателен) наклон от 45 градуса. Знакът пред r показва посоката на зависимостта между двете променливи. Когато r е с положителен знак има права зависимост между двете променливи: при нарастване на x, нараства и y. Когато знакът е отрицателен, има обратна зависимост - с нарастване на x, y намалява. На единица изменение на едната променлива стойноститет на другата се променят средно със стойността на коефициента. Интерпретацията на r не може да бъде еднаква за резултати от рода на 0,3 и 0,7. Корелационната скала е ординална, а не интервална. Има два начина за тълкуване на коефициента. Единият използва директно получената стойност:

$0 < |r| < 0,3$ – слаба корелация
$0,3 <= |r| < 0,5$ – умерена корелация
$0,5 <= |r| < 0,7$ – значителна корелация
$0,7 <= |r| < 0,9$ – висока корелация
$0,9 <= |r| <= 1,0$ - много висока корелация

Вторият начин за тълкуване е чрез така наречения коефициент на детерминация, r^2. Стойността му се получава при повдигане на втора степен на коефициента r и отразява качеството на предиктивния модел, който бихме могли да построим върху данните. При линейната регресия този коефициент (отбелязван с R^2) отразява каква част от варирането в данните се отразява от модела.

3.5.7.2. Корелационен коефициент на Спиърман (Spearman)

Коефициентът на рангова корелация на Спиърман е подвид на коефициента на Пиърсън, но използвайки рангови данни или ординарни данни преобразувани в рангови. Използва се когато има нужда от непараметричен метод за определяне на корелацията (и следователно коефициентът на Пиърсън не може да бъде използван). Първоначалните данни се подреждат по големина и се заменят с ранговете си и разликите между ранговете при всяко от наблюденията на двете променливи се пресмята. Изчислява се по следната формула:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

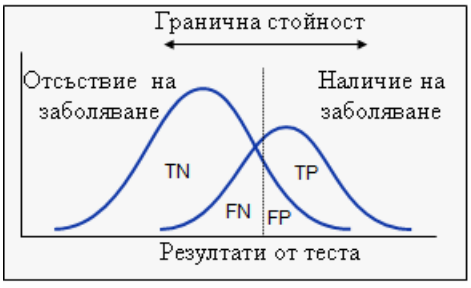
Коефициентът на Спиърман се означава с гръцката буква ρ („ро“, от там и наименованието „Spearman's rho“) или r_s.

Този метод се използва когато не е възможно получаването на действителни стойности на променливите, но е известен техният ред. Освен това този коефициент може да бъде по-добър показател, че съществува връзка между две променливи, когато връзката е нелинейна, за разлика от коефициента на Пиърсън. Прилагането му е по-подходящо и когато допускането, че двете променливи имат нормално разпределение на данните, не се потвърди.

3.5.8. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери

Диагностичната точност на даден биомаркер или точността на даден тест да разграничава пациентите със заболяване от тези без заболяване се определя с помощта на анализа на ROC кривите (Receiver Operating Characteristic curve) [392, 393]. Анализът на ROC кривите може да бъде използван за сравнение на диагностичната точност на два или повече лабораторни или диагностични тестове [394].

С помощта на диагностичните тестове много рядко има абсолютно точно разделяне на групата пациенти със заболяването и групата пациенти (контроли) без заболяването. Това е представено на Фигура 3.20



Фигура 3.20.

За всяка възможна гранична стойност избрана за разграничаване на двете групи винаги ще има правилно класифицирани пациенти със заболяването, като това са истински позитивни резултати на теста (TP - True positive fraction), но някои пациенти със заболяването няма да са класифицирани правилно и това са фалшиво негативни резултати (FN - False Negative fraction). От друга страна някои пациенти без заболяването ще бъдат

коректно класифицирани (истински негативни резултати: TN- True Negative fraction), но други ще бъдат класифицирани като пациенти със заболяване (фалшиво позитивни резултати: FP- False Positive fraction).

Таблица 3.50. Резултати след провеждане на диагностичен тест и определяне на TP, FN, FP, TN резултати.

Резултат от диагностичния тест	**Заболяване**	
	Присъства	**Отсъства**
Позитивен резултат	a (TP)	c (FP)
Негативен резултат	b (FN)	d (TN)
Общ брой	**a + b**	**c + d**

Въз основа на получените резултати се изчисляват: специфичността, чувствителността, позитивна предиктивна стойност (PPV), негативна предиктивна стойност (NPV) и др.

Чувствителността показва възможността резултатът от теста да е позитивен, когато заболяването присъства (честотата на истинските позитивни резултати, представя се в %).

Чувствителността се определя като: TP/ (TP+FN) = a / (a + b)

Специфичността показва вероятността резултатът от теста да е негативен, когато заболяването не присъства (честотата на истински негативните резултати, представя се в %).

Специфичността се определя като: TN / (TN +FP) = d / d + c

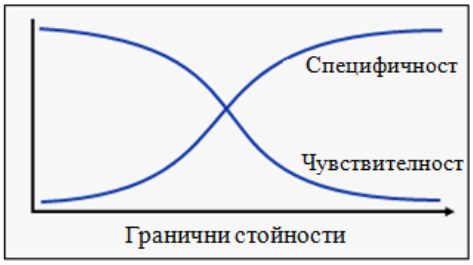
PPV представлява вероятността заболяването да присъства, когато тестът е положителен.

PPV се определя като: TP / (TP + FP) = a / (a + c)

NPV показва вероятността заболяването да отсъства, когато резултатът е негативен.

NPV се определя като: TN / (TN + FN) = d / (d + b)

При избор на високи гранични стойности на теста (биомаркера), то фалшиво позитивните резултати намаляват с увеличаването на специфичността, но в същото време чувствителността (истински позитивните резултати) се понижава. При избор на по-ниска гранична стойност се повишава чувствителността, но се увеличат фалшиво позитивните резултати и по тази причина специфичността намалява (Фигура 3.21).



Фигура 3.21. Зависимост на специфичността и чувствителността от избора на гранична стойност

ROC кривите представляват графични диаграми, илюстриращи изпълнението на бинарна класификаторна система при вариране на дискриминираща гранична стойност. Кривата се създава чрез представяне на честота на истински позитивни резултати (чувствителност) по оста y срещу честота на фалшиво позитивни резултати (1-специфичност) по оста x при различни стойности на теста (биомаркера). ROC кривите, съответстващи на високо дискриминативни диагностични тестове се локализират в близост до горния ляв ъгъл на диаграмата. ROC кривите, лежащи на диагоналната референтна линия принадлежат на диагностични тестове с ниска диагностична точност.

Площта под кривата - AUC (area under the curve) е ефективна и комбинирана стойност на чувствителността и специфичността, която показва валидността на диагностичните тестове. AUC се изчислява с помощта на непараметричен Mann-Whitney U тест. Максималната стойност AUC = 1 означава, че диагностичния тест прави перфектна дискриминация между болни и здрави. Това се получава, когато разпределенията на резултатите от теста на болните и здравите не се припокриват. AUC = 0.5 означава, че диагностичния тест е толкова точен, колкото и определянето на диагноза на случаен принцип. При AUC = 0 тестът неправилно определя всички здрави като болни, а всички болни като здрави, но това е малко вероятно да се случи в клиничната практика [395]. Доколко конкретната крива се различава от диагонала (и съответно от случайната класификация на обектите) се изчислява с помощта на непараметричен Mann-Whitney U тест.

За определянето на оптималната гранична стойност са предложени три метода. Два от методите дават еднаква тежест на чувствителността и специфичността.

- Първи метод: използва квадрата на разстоянието между (0, 1) горния ляв ъгъл на диаграмата и коя да е точка от кривата, тоест: $d^2= (1\text{-TP})^2+ FP^2=(1\text{-sensetivity})^2+ (1\text{-specificty})^2$. За да се получи оптимална гранична стойност се намира най-малката стойност на квадрата на това разстояние. По тази причина трябва да се изчисли това разстояние за всяка една гранична стойност
- Втори метод - наречен още Youden index (индекс на Youden) - използва максималното вертикално разстояние на кривата от точка (x, y) до диагоналната линия. Youden Index = TP-FP = Чувствителност + Специфичност -1. Определя се сбора на Чувствителността и Специфичността при всяка гранична стойност и се избира тази гранична стойност, при която сборът е най-голям
- Трети метод - включва финансовите разходи за правилно и неправилно диагностициране и цената необходима за по-натъшното диагностициране. За заболявания с ниска честота и голям процент фалшиво позитивни резултати при диагностициране, то се избира висока гранична стойност, за да се повиши специфичността. За заболявания с висока честота с фатални последствия при недиагностициране, се избира по-ниска гранична стойност, за да се повиши чувствителността.

За определянето на граничните стойности на изследваните биоамаркери използвахме метода на Youden.

3.5.8.1. Анализ на ROC кривите на единични биомаркери

Диагностичната точност на изследваните биомаркери в урина и плазма бе определяне чрез анализа на ROC кривите. Получените стойностите за AUC, както и специфичността и чувствителността бяха сравнявани при изследваните биомаркери, за да се определи този който най-добре разграничава пациентите от контролите. За надеждни биомаркери бяха определени тези, които разграничават по-добре пациентите с рака на простатата от контролите с доброкачествена простатна хиперплазия в сравнение със серумните стойности на PSA - утвърден биомаркер навлязъл в клиничната практика.

3.5.8.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите

За да определим дали диагностичната точност се подобрява при използване на комбинации от биомаркери проведохме мултимаркерен анализ на ROC кривите. Това бе осъществено с помощта на предварително изчисляване на коефициенти, определящи тежестта на всеки един от маркерите и даващи най-голяма площ на кривата при ROC curve анализа. Методът на изчисляване на коефициентите е описан от Pepe и Thompson [396]

3.5.9. Обработка на резулатите от микроРНК микрочиповия анализ

След хибридизация микрочиповете бяха процесирани според инструкциите на фирмата производител. Анализът на резултатите бе извършен с помощта на Gene Spring 12.6 GX-PA като бе избран 90th percentile алгоритъма за нормализация и без корекция на baseline.

3.5.9.1. Нормализация на данните

Суровите данни, които се получават от микрочиповия анализ не могат да бъдат използвани директно. Необходимо е те да се процесират.

Gene spring софтуерът позволява избор между следните методи за нормализация: Percentile shift, Scale, Quantile, Normalize to control genes, Normalize to External value.

Изборът на подходящ метод за нормализиране на данните от микрочиповете е много важен за отстраняване на варирането и за създаване на възможност за тяхното сравняване [397-399]. Има редица проучвания за анализ на mRNA експресионни микрочипове и са предложени няколко метода за нормализация на miRNA микрочипове [400-404]. Препоръчан метод от Agilent за нормализация на данните от miRNA микрочиповете е 90th percentile shift. Този метод за нормализация е използван в редица проучвания [405, 406]. При него интензитетите на сигналите от хибридизационните проби се коригират като се взима всяка колона от спотове на чипа поотделно и се изчислява n-перцентилът на експресионните стойности на микрочипа спрямо всички сигнали (където n има стойности от 0 до 100, в случая 90). Деветдесетият перцентил е граничната стойност между горните 10% на наблюдаваните стойности на една променлива (в случая интензитета на светене на спота на микрочипа) и останалите 90%. След това се изважда получената стойност от експресионните сигнали за всяка микроРНК проба [406].

3.5.9.2. Анализ на основните компоненти – PCA (Principle Component Analysis)

Този анализ представлява сложен математичен алгоритъм за редуциране на броя на измеренията на данните и в същото време запазва голяма част от варирането. Редукцията се осъществява чрез идентифициране на нови вариабилни (променливи), наречени основни компоненти, при които варирането в данните е максимално и съществува някаква корелация между тях. Чрез използването на няколко компонента всяка проба може да бъде представена чрез относително малък брой числови стойности. Пробите се визуализират и могат да се определят сходствата и различията между отделните проби и това подпомага тяхното групиране [407] .

В GeneSpring при PCA се калкулират стойности за три основни компонента и пробите могат да се нанесат визуално на 3D диаграма. Резултатите от този анализ могат да се използват за проверка на качеството на данните. В диаграмата с по една точка се отбелязва всяко поле на включените в анализа микрочипове (в случая една точка съответства на туморна или нормална тъкан съответно от пациент с РП или контрола с ДПХ) като оцветяването отразява експерименталните фактори, въведени предварително при групирането на пробите. Това позволява да се види наличие на различия между отделните групи, както и представители на едната група, които са подобни на другата (и обратно). В най-добрия случай реплицираните проби или пробите от една група клъстерират (се групират) заедно и отделно от другите групи. Компонентите в PCA са представени по X, Y и Z и са номерирани 1, 2, 3... според тяхната намаляваща значимост.

3.5.9.3. Volcano plot

Чрез Volcano plot се визуализира взаимоотношението между степента на промяна в експресията и статистическата значимост. Диаграмата визуално представя диференциалната експресия между две различни състояния, групи (наличие и отсъствие на

заболяване). Volcano plot се конструира като на у оста се представя отрицателен логаритъм (обикновено десетичен логаритъм) на p стойността. Така микроРНК-ите (или гените) с най-ниски p стойности (силно статистически значими) се появяват най-отгоре на графиката. На оста x се представя логаритъм от степента на промяна между двете сравнявани групи, отново в логаритмична форма. Използват се логаритмуваните стойности на степента на промяна в експресията, за да може промяната и в двете посоки (понижена и повишена експресия) да се визуализира на еднакви разстояния от центъра. Интерес представляват точките (микроРНК-ите или гените), намиращи се най-отгоре на графиката и разположени далеч вляво или дясно от центъра. Те имат най-голяма промяна в експресията (по тази причина се намират в ляво или дясно, най-далеч от центъра), но и имат най-голяма статистическа значимост тъй като се намират най-отгоре.

3.5.9.4. Интерпретация на получените резултати

3.5.9.4.1. Откриване на гени регулирани от микроРНК-ите показали променена експресия

Откриването на гените регулирани от микроРНК-ите показали диференциална промяна се осъществява с помощта на бази данни за предикция на мишени. GeneSpring поддържа следните бази данни: PITA, PicTar, TarBase, TargetScan и microRNA.org. Търсенето на гени става поотделно за микроРНК-ите показали повишена експресия и тези показали понижена експресия.

За определянето на валидираните мишени на микроРНК-ите използвахме допълнително и следните бази данни: miRWalk (http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/), и miRecords (http://mirecords.biolead.org/).

3.5.9.4.2. Откриване на клетъчни пътища, в които участват гените регулирани от микроРНК-ите показали променена експресия

Могат да се търсят пътищата, в които участват гените регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените регулирани от микроРНК-те с понижена експресия поотделно. GeneSpring използва следните бази данни: WikiPathways, BioPAX, GPML, Legacy, но също така позволява и използването на собствени конструирани пътища.

Допълнително използвахме и базата данни KEGG [408].

3.5.9.4.3. Venn диаграми

Тези диаграми използват кръгове, за да представят данни като позицията и припокриването на кръговете показва подобието/припокриването между данните. Математичното определение е следното: диаграма, в която математически набор или набор от категорийни твърдения се представят чрез припокриващи се кръгове в рамките на поле (граница), така че всички комбинации на съответните части са представени чрез разнообразни различни области в диаграмата.

Venn диаграмите бяха използвани за представяне на гените регулирани от микроРНК-ите с повишена и понижена експресия, а така също и за представяне на клетъчните пътища, в които участват гените с предполагаема повишена и понижена експресия.

3.5.9.4.4. Онтологичен анализ

Проектът за генна онтология (Gene Ontology- GO) цели да отговори на нуждата от непроменливи, уеднаквени описания на генните продукти от различните бази данни. Проектът GO развива три структурирани, контролирани речници (онтологии), чрез които се описват генните продукти във връзка с техните асоциирани биологични процеси, клетъчни компоненти и молекулни функции. Онтологичният анализ бе осъществен с помощта на интернет сайта: http://geneontology.org/.

Онтологичният анализ бе използван, за да се класифицират гените регулирани от микроРНК-ите с диференциална експресия според тяхното участие в клетъчни процеси и пътища най-силно засегнати в раковите клетки.

3.5.9.4.5. Клъстерен анализ

В Gene Spring могат да се направят различни типове клъстерен анализ:

- Йерархичен клъстерен анализ - използва се като метод, показващ взаимовръзките между нивата на експресия на подбрани miRNAs и серия от условия, състояния.
- K-Means клъстерен анализ- целта е да се създадат групи, при които в рамките на дадена група има голямо сходство, но ниско сходство между отделните групи, като предварително се задава броят на търсените групи
- SOM клъстерен анализ - клъстерна техника, която илюстрира взаимоотношението между групите чрез подреждане в двуизмерна диаграма, деляща отделните единици в групи въз основа на експресионните им профили. SOM диаграмите са полезни за визуализиране на отделните експресионни профили и определянето на кои от тях са вариации едни на други.

Използвахме йерархичен клъстерен анализ, но също проведохме и K-Means клъстерен анализ за проверим дали основните клъстери наблюдавани в йерархичния клъстерен анализ се запазват.

3.5.9.4.5.1. Йерархичен клъстерен анализ

Йерархичното клъстериране е метод, често използван при създаването на филогенетични дървета. Принципът на йерархичните алгоритми е изграждането на клъстерите в резултат на многократно присъединяване на двата "най-близки" гени или групи от гени (или други разглеждани обекти). Този подход се използва с цел да се сведе до минимум променливостта в рамките на групата. Връзката между гените се представя графично като дърво (дендрограма), чиито дължини на клоните отразяват степента на сходство между гените. Тези дендограми са полезни в способността им да представляват различни степени на сходство и по-далечни отношения между групи от тясно свързани гени, а също така изискват да се направят сравнително малък брой предположения за характера на данните. Изчислените дърветата могат да бъдат използвани за подредба на гените в таблица с данни, така че гените или групи от гени с подобни модели на експресия са разположени близко един до друг. Предимството на йерархичния метод, както е отбелязано и от Eisen (1998) [409], е, че естественият начин за възприемане и анализиране на голямо количество от данни е първо да се открият големите характеристики и разлики, а след това да се насочи вниманието върху по-малките детайли. С помощта на този метод се дава възможност за един и същи вид интуитивен подход в целия анализ на геномни данни. Въпреки че този подход е един от основните, който няма присъща специфичност към конкретния метод, използван при усвояването на геномните данни, той се е доказал в практиката като изключително полезен.

Йерархичните алгоритми винаги дават едно конкретно дърво, дори ако то не отразява истинската структура на реалната популация, от която произлизат данните. Макар дендрограмите да се считат за прости инструменти за визуализация, трябва да се подчертае, че това е много специално представяне на данните, което може да бъде напълно неуместно. Един от основните недостатъци на тези "алгоритмични" подходи е, че поради липса на точни и ясни статистически модели, е трудно да се оцени колко коректно са представени данните. Статистиците отбелязват, че йерархична клъстеризация страда от липса на устойчивост, липса на уникалност и инверсионни проблеми, които усложняват интерпретация на йерархията. Освен това детерминистката природа на йерархичното

групиране може да доведе до локално решение в групиране на резултатите, което обаче да не отразява най-добрата възможна подредба [410].

При йерархичното клъстериране се използват няколко варианта за изчисляване на разстоянията между обектите или групите:

1) Ward's rule - правило на Ward

При него разстоянието между клъстерите представлява сума от квадратите на отклоненията от точките до центроидите. Целта на Ward метода е да се намали сумата от квадратите за всеки отделен клъстер. Чрез този метод се получават клъстери със сходен брой наблюдения, но той е много чувствителен към силно отклоняващи се проби (outliers). Възможно е разстоянието между два клъстера да бъде по-голямо от dmax- максималната стойност в оригиналната матрица. Ако това се наблюдава, то сходството ще бъде негативно.

2) Single linkage rule - нарича се още nearest neighbor method

Разстоянието между два клъстера е минималното разстояние между наблюденията в единия клъстер и наблюденията в другия клъстер, тоест разстоянията между групите се определят от техните най-близки членове. При това групиране сходството на двете групи е сходството на техните най-подобни членове. Критериите за сливане са локални. Обръща се внимание единствено на зоната, където двата клъстера са най-близки един до друг. Други, по-отдалечени части на клъстера и цялостната структура на клъстера не се взимат под внимание. Този метод е подходящ, когато групите (клъстерите) са очевидно разделени. Когато стойностите (наблюденията) лежат много близко едни до други, то чрез Single метода се идентифицират дълги вериги подобни клъстери, които могат да имат относително големи разстояния, разделящи наблюденията в двата края на веригата и да не дават реална представа за структурата на популацията от обекти.

3) Правилото Centroid:

Разстояниятат между клъстерите представлява разстояние между клъстерните центроиди или средните стойности на всеки клъстер. Сходен е с Average метода.

4) Average linkage rule

Разстоянието между клъстерите е средното разстояние между наблюденията в един клъстер (група) и наблюденията в друг клъстер (група), тоест разстоянията между групите се определят от усреднените разстояния между всеки два техни члена. То представлява компромис между чувствителността на complete linkage клъстерирането на показатели с големи различия в стойностите и тенденцията на single linkage клъстериране да образува дълги клонове в дендрограмите, което не съответстват на идеята за целта на групирането (тоест окрупняване и компактно представяне на данните).

5) Complete linkage rule

Представлява клъстериране, при което на всяка стъпка разстоянията между групите се определят от техните най-далечни членове. При този вид йерархично групиране използваните критерии не са локални, а цялата структура на групирането може да повлияе клъстерирането. Това води до дефиниране на компактни клъстери с малки диаметри (разстояние между членовете) в големи, разнородни групи, като и увеличена чувствителност към големи различия в стойностите.

6) Median Linkage rule

Разстоянието между групите (клъстерите) се определя от средното разстояния между наблюденията в отделните клъстери. Сходен е на Average метода, но използва медианата вместо средната стойност и по този начин се намалява чувствителността към големи различия в групите.

Lance и Williams разработват формула, която обяснява методите за клъстериране [411].

$$d_{k(ij)} = \alpha_i d_{ki} + \alpha_j d_{kj} + \beta d_{ij} + \gamma |d_{ki} - d_{kj}|$$

Където d_{ij} е разстоянието между клъстерите *i* и клъстер *j*; $d_{k(ij)}$ разстоянието между клъстер *k* и новосформирания клъстер от обединението на групите *i* и *j*; и α_i, α_j, β и γ са параметри, които са зададени в зависимост от метода на йерархично клъстериране.

Метод за клъстериране	α_i	α_j	β	γ
Single	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	$-\frac{1}{2}$
Complete	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
Average	$\frac{n_i}{n_i+n_j}$	$\frac{n_j}{n_i+n_j}$	0	0
Weighted average	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
Centroid	$\frac{n_i}{n_i+n_j}$	$\frac{n_j}{n_i+n_j}$	$-\alpha_i\alpha_j$	0
Median	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{4}$	0
Ward's	$\frac{n_i+n_k}{n_i+n_j+n_k}$	$\frac{n_j+n_k}{n_i+n_j+n_k}$	$\frac{-n_k}{n_i+n_j+n_k}$	0

В текущото проучване бе използвано правилото на Ward при йерархичния клъстерен анализ.

Друга важна характеристика при клъстерирането е метриката, която повлиява формата на клъстерите. Например някои елементи могат да изглеждат разположени близко един до друг или далечни в зависимост от използваната метрика. Например в двуизмерното пространство разстоянието между точката (1,0) и началото (0,0) е винаги 1 според usual norms, но разстоянието между точката (1,1) и началото (0,0) може да бъде 2 при използване на Manhattan метричната система, $\sqrt{2}$ ако се използва Евклидовото разстояние или 1 при максималната метрична система. В таблицата (3.51) по-долу са представени най-често използваните метрики и формулите за техното изчисляване. Ние използвахме Евклидовото разстояние при клъстерирането на микроРНК.

Таблица 3.51. Най-често използваните метрични системи при йерархичното клъстериране

Метрична система-наименование	**Формула**
Euclidean	$\|a-b\|_2 = \sqrt{\sum_i (a_i - b_i)^2}$
Squared Euclidean	$\|a-b\|_2^2 = \sum_i (a_i - b_i)^2$
Manhattan	$\|a-b\|_1 = \sum_i \|a_i - b_i\|$
Maximum	$\|a-b\|_\infty = \max_i \|a_i - b_i\|$

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ОТКРИТИ ПРИ GWAS

За значими резултати в статисческите анализи за асоциация на полиморфизмите с РП приемахме стойностите под 0.05 за p, two tailed. За улеснение в таблиците с резултатите от статистическите анализи значимите p стойности са в болд.

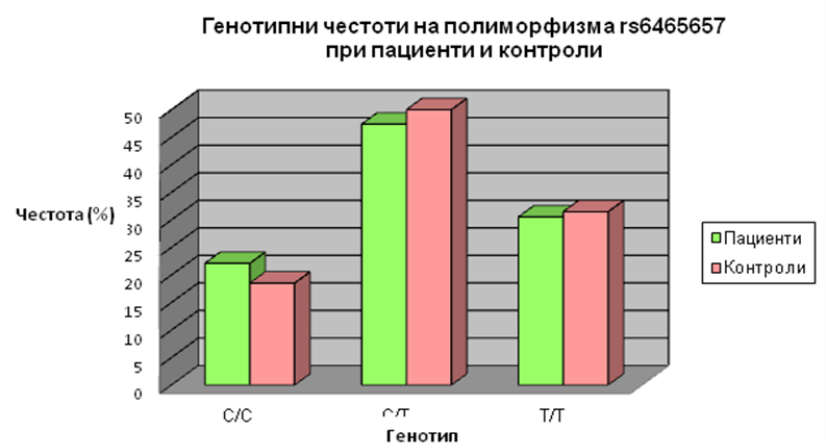
4.1.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs6465657 разположен в хромозомен локус 7q21.3

Полиморфизмът rs6465657 се намира в дългото рамо на хромозома 7, локус 7q21.3 и е в интрон 9 на *LMTK2* гена.

Не се открива статистически значима разлика в генотипните и алелните честоти между контролите и пациентите по отношение на изследвания полиморфизъм rs6465657 (Таблица 4.1, Фигура 4.1). Наблюдава се леко увеличена честота на C/C генотипа при болни (22.1%) спрямо контроли (18.52%), както и на алел C. Полиморфизмът не показа и статистически значима асоциация с риска за развитие на агресивно заболяване (Gleason score над 7, наличие на метастази). Резултатите не показаха отклонения от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.1. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs6465657 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=190)	Контроли (n=162)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	42 (22.1%)	30 (18.52%)	1.25 (0.74-2.1)	0.43
C/T	90 (47.37%)	81 (50%)	0.9 (0.6-1.4)	0.67
T/T	58 (30.53%)	51 (31.48%)	0.96 (0.61-1.5)	0.91
C	174 (45.79%)	141 (43.52%)	1.1 (0.81-1.48)	0.59
T	206 (54.21%)	183 (56.48%)	0.91 (0.68-1.23)	0.59



Фигура 4.1.

4.1.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 8q24

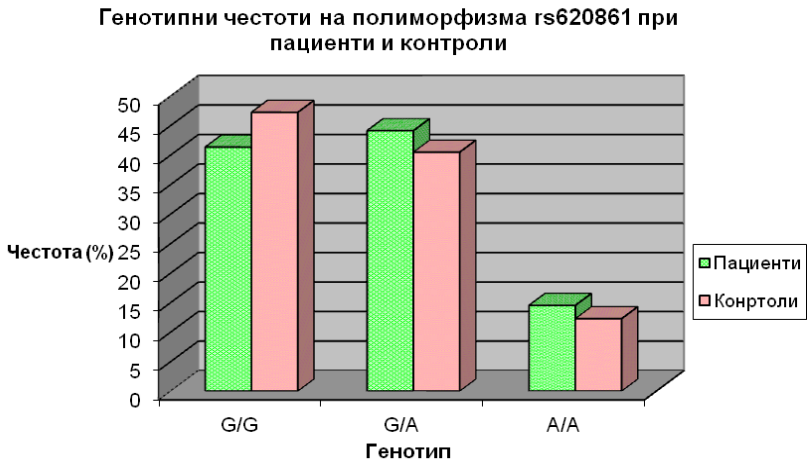
Чрез TaqMan технология, бяха изследвани следните полиморфни варианти разположени на хромозомния район 8q24: **rs1016346, rs4871008, rs7841060, rs620861**, асоциирани с РП.

4.1.2.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs620861

Получените генотипни и алелни честоти за полиморфизма rs620861 не се различават статистически значимо при пациентите и контролите (Таблица 4.2, Фигура 4.2). Полиморфизмът не показа и асоциация с развитието на метастази и тумори с висок Gleason score. Не се наблюдава статистически значимо отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.2. Статистически анализ за асоцииация на rs620861 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=179)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	74 (41.34%)	77 (47.24%)	0.79 (0.51-1.21)	0.28
G/A	79 (44.13%)	66 (40.49%)	1.16 (0.76-1.78)	0.51
A/A	26 (14.53%)	20 (12.27%)	1.22 (0.65-2.27)	0.63
G	227 (63.41%)	220 (67.48%)	0.83 (0.61-1.14)	0.29
A	131 (36.59%)	106 (32.52%)	1.2 (0.87-1.64)	0.29



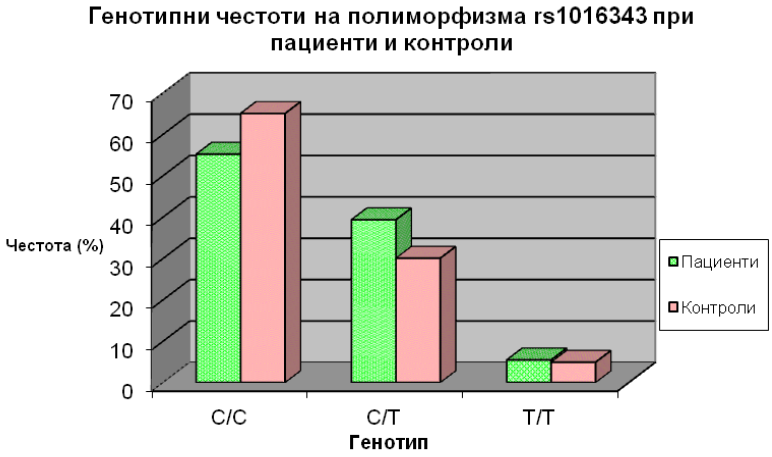
Фигура 4.2.

4.1.2.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs1016343

При анализа на получените резултати за rs1016343 не се установиха статистически значими различия в генотипните и алелните честоти между пациентите и контролите (Таблица 4.3, Фигура 4.3). Генотипите C/C (p=0.079) и C/T (p=0.07) показват тенденция за асоциация с риска за развитие на РП. Наблюдава се по-висока честота на алела T при пациентите в сравнение с контролите и вероятно този алел е рисков. Беше направена проверка за асоциация на полиморфизма с риска за развитие на висок Gleason score или метастази. Генотипът C/C се среща по-рядко в пациенти с метастази (Таблица 4.4, Фигура 4.4), както и в пациенти с висок Gleason score в сравнение с контроли (Таблица 4.5, Фигура 4.5) и резултатите са близки до статистическа значимост. Противоположно на генотипа C/C, генотипът C/T се среща по-често при пациентите с метастази (p=0.03), както и при тези с висок Gleason score в сравнение с контролите. Алелът T само по себе си увеличава риска за развитие на висок Gleason score с над 1.5 пъти като резултатът е статистически значим (p=0.04). Алелните и генотипните честоти на полиморфизма в изследваните пациенти и контроли не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.3. Статистически анализ за асоцииация на rs1016343 с РП

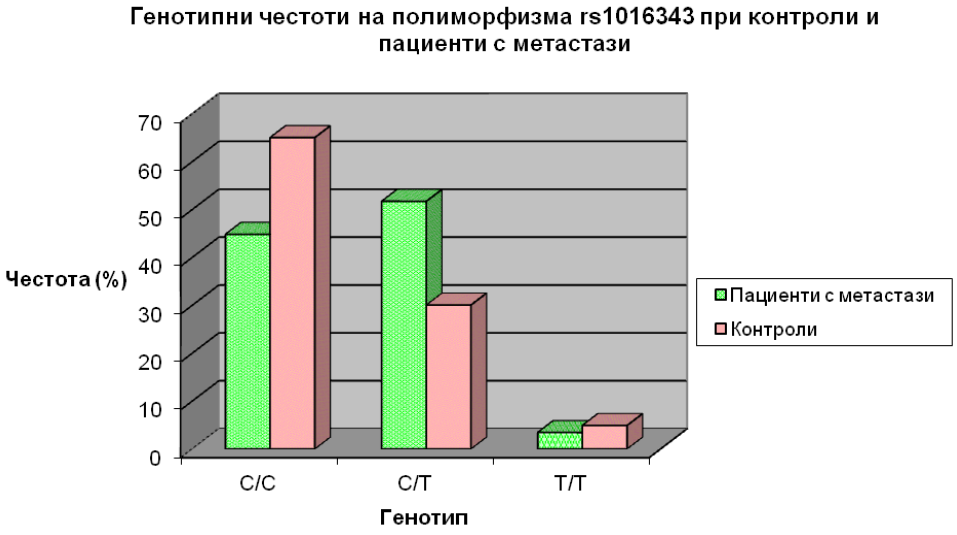
Генотип/ алел	Пациенти (n=183)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	101 (55.19%)	106 (65.03%)	0.66 (0.43-1.02)	0.079
C/T	72 (39.34%)	49 (30.06%)	1.51 (0.96-2.36)	0.07
T/T	10 (5.46%)	8 (4.91%)	1.12 (0.43-2.91)	1
C	274 (74.86%)	261 (80.06%)	0.74 (0.52-1)	0.12
T	92 (25.14%)	65 (19.94%)	1.35 (0.94-1.93)	0.12



Фигура 4.3

Таблица 4.4. Статистически анализ за асоциация на rs1016343 риска за развитие на метастази

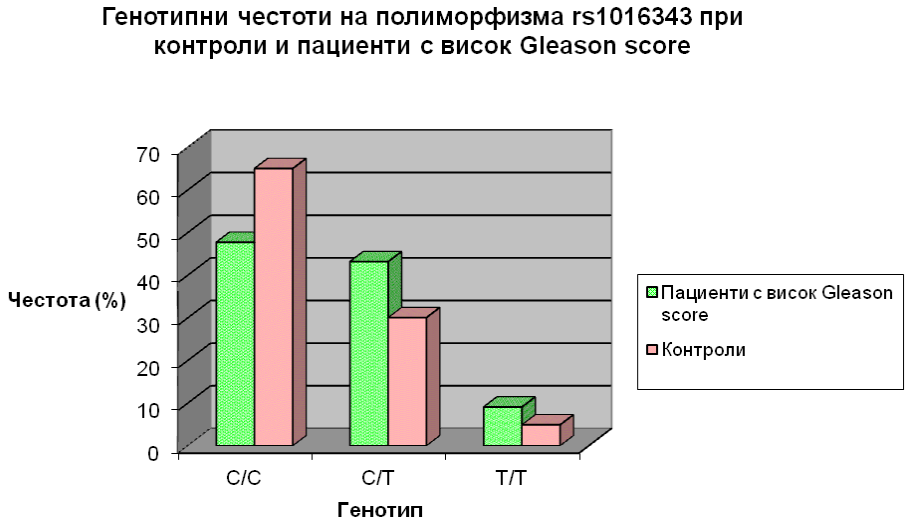
Генотип/ алел	Пациенти (n=29)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	13 (44.83%)	106 (65.03%)	0.44 (0.196-0.97)	**0.06**
C/T	15 (51.72%)	49 (30.06%)	2.49 (1.11-5.56)	**0.03**
T/T	1 (3.45%)	8 (4.91%)	0.69 (0.08-5.75)	1
C	41 (70.69%)	261 (80.06%)	0.6 (0.32-1.12)	0.12
T	17 (29.31%)	65 (19.94%)	1.66 (0.89-3.12)	0.12



Фигура 4.4

Таблица 4.5. Статистически анализ за асоцииация на rs1016343 с риска за развитие на Gleason score над 7

Генотип/ алел	Пациенти (n=44)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	21 (47.73%)	106 (65.03%)	0.49 (0.25-0.96)	**0.054**
C/T	19 (43.18%)	49 (30.06%)	1.77 (0.89-3.5)	0.11
T/T	4 (9.09%)	8 (4.91%)	1.94 (0.53-6.76)	0.47
C	61 (69.32%)	261 (80.06%)	0.56 (0.33-0.95)	**0.04**
T	27 (30.68%)	65 (19.94%)	1.77 (1.05-3)	**0.04**



Фигура 4.5

4.1.2.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs4871008

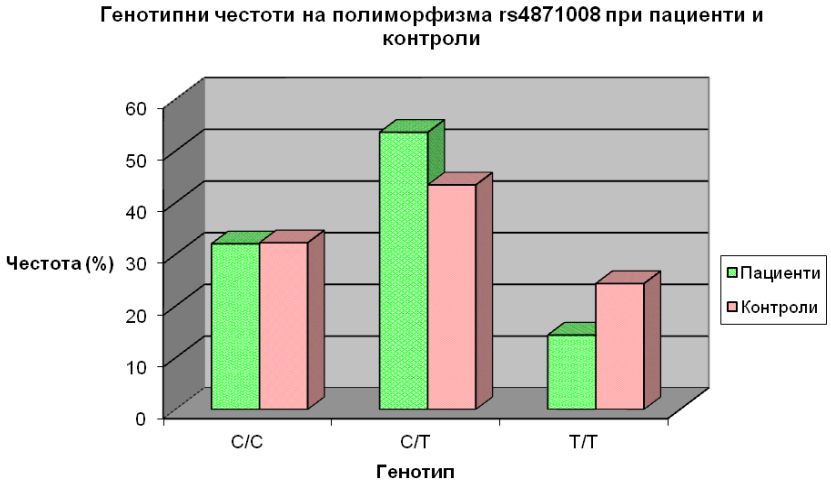
Статистическият анализ на резултатите получени за rs4871008 доведе до установяването на генотипна асоциация на полиморфизма с риска за развитие на РП (Таблица 4.6, Фигура 4.6).

Честотата на генотипът T/T статистически значимо се различава при пациентите в сравнение с контролите като се свързва с понижаване на риска за развитие на РП (OR-0.52). За разлика от него, C/T генотипът се среща по-често в пациентите и резултатът е близък до статистическа значимост. Алелът T има по-висока честота при контролите в сравнение с пациентите, но резултатът не достига значимост. Генотипът T/T (p=0.04), както и алелът T (p=0.027) сам по себе статистически значимо се асоциират с понижен риск за развитие на тумори с висок Gleason score (Таблица 4.7, Фигура 4.7). Полиморфизмът не показа статистически значима асоциация с риска за развитие на метастази.

Резултатите не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.6. Статистически анализ за асоцииация на rs4871008 с РП

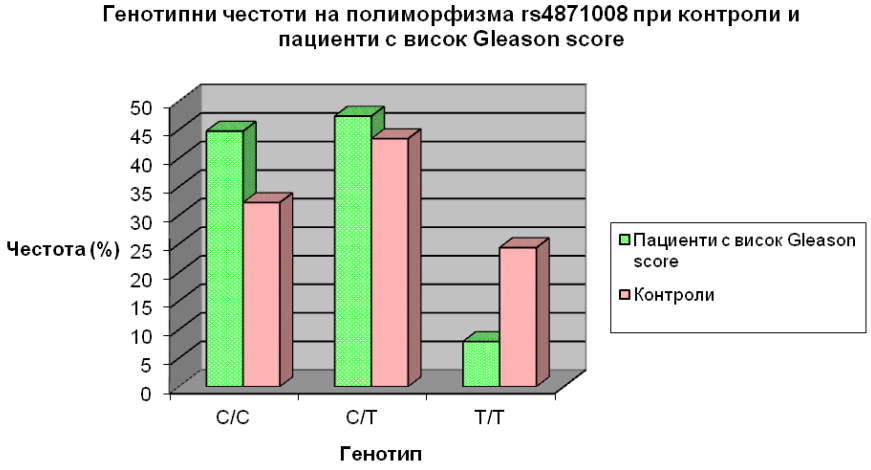
Генотип/ алел	Пациенти (n=153)	Контроли (n=152)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	49 (32.02%)	49 (32.24%)	0.99 (0.61-1.6)	1
C/T	82 (53.59%)	66 (43.42%)	1.5 (0.96-2.36)	0.09
T/T	22 (14.38%)	37 (24.34%)	0.52 (0.29-0.94)	**0.03**
C	180 (58.82%)	164 (53.95%)	1.22 (0.89-1.69)	0.25
T	126 (41.18%)	140 (46.05%)	0.82 (0.6-1.13)	0.25



Фигура 4.6

Таблица 4.7. Статистически анализ за асоцииация на rs4871008 с риска за развитие над Gleason score над 7

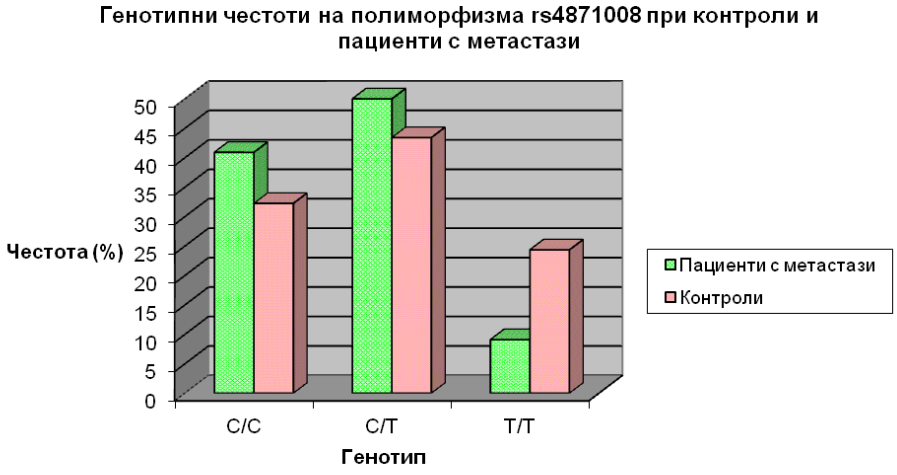
Генотип/ алел	Пациенти (n=38)	Контроли (n=152)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	17 (44.74%)	49 (32.24%)	1.7 (0.82-3.51)	0.18
C/T	18 (47.37%)	66 (43.42%)	1.17 (0.57-2.39)	0.72
T/T	3 (7.89%)	37 (24.34%)	0.27 (0.08-0.92)	**0.04**
C	52 (68.42%)	164 (53.95%)	1.85 (1.1-3.15)	**0.027**
T	24 (31.58%)	140 (46.05%)	0.54 (0.32-0.92)	**0.027**



Фигура 4.7

Таблица 4.8. Статистически анализ за асоцииация на rs4871008 с риска за развитие на метастази

Генотип/ алел	Пациенти (n=22)	Контроли (n=152)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	9 (40.91%)	49 (32.24%)	1.46 (0.58-3.64)	0.47
C/T	11 (50.00%)	66 (43.42%)	1.3 (0.53-3.19)	0.65
T/T	2 (9.09%)	37 (24.34%)	0.31 (0.07-1.39)	0.17
C	29 (65.91%)	164 (53.95%)	1.65 (0.85-3.2)	0.15
T	15 (34.09%)	140 (46.05%)	0.61 (0.31-1.18)	0.15



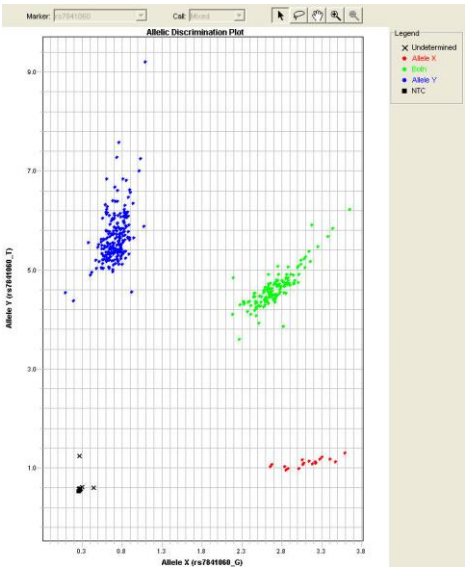
Фигура 4.8

4.1.2.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs7841060

След извършения анализ установихме, че има различия в алелните и генотипните честоти на rs7841060 при пациентите и контролите (Таблица 4.9, Фигура 4.10), но не се достига статистическа значимост.

Генотипът T/G, а така също и алелът G се срещат по-често при пациентите в сравнение с контролите. Противоположно на тях, генотипът T/T има по-висока честота при контролите в сравнение с пациентите и вероятно понижава риска за развитие на РП. Този генотип показва статистически значимо понижаване на риска от развитие на метастази (p=0.01) (Таблица 4.10) и тумори с висок Gleason score (p=0.05) (Таблица 4.11, Фигура 4.12) при РП. Алелът T сам по себе също понижава риска както за развитие на метастази (OR=0.53, p=0.05) (Таблица 4.10, Фигура 4.11), така и за развитие на тумори с висок Gleason score (OR= 0.596, p=0.06). Генотипът T/G статистически значимо трикратно повишава риска за развитие на метастази (p=0.009). Този генотип се среща и по-често при пациенти с висок Gleason score, като резултатът показва близка до статистически значима асоциация (p=0.07).

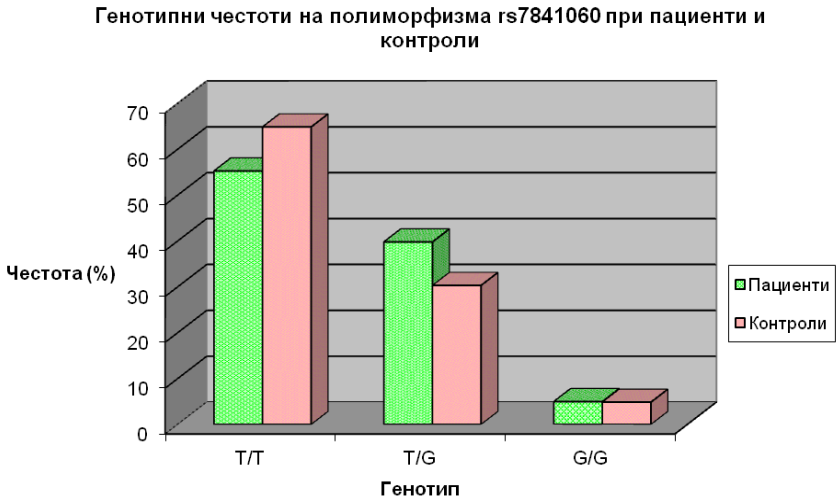
Получените резултатите не се отклоняват от закона на Харди-Вайнберг.



Фигура 4.9. Резултати от провеждането на PCR в реално време чрез TaqMan технологията. Разпределение на генотипните варианти за полиморфизъм rs7841060 (Allele discrimination plot)

Таблица 4.9. Статистически анализ за асоцииация на rs7841060 с РП

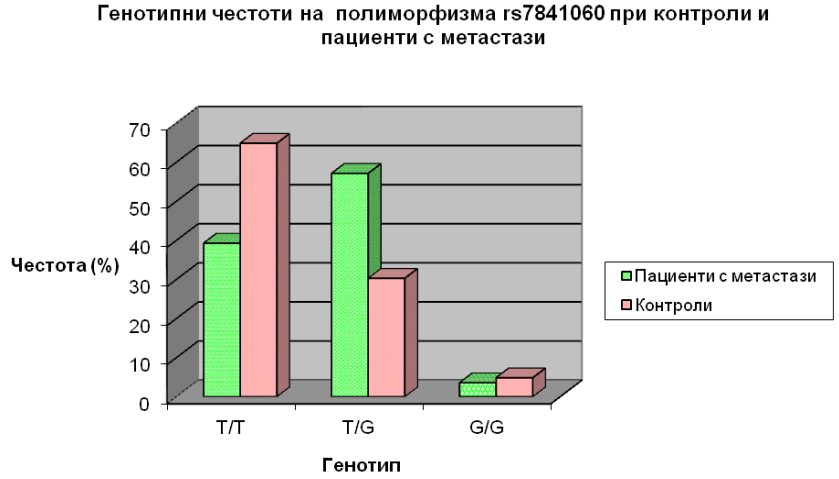
Генотип/ алел	Пациенти (n=181)	Контроли (n=165)	OR (95% CI)	P Fisher two tailed
T/T	100 (55.25%)	107 (64.85%)	0.67 (0.43-1.03)	0.08
T/G	72 (39.78%)	50 (30.30%)	1.52 (0.97-2.37)	0.07
G/G	9 (4.97%)	8 (4.85%)	1.03 (0.39-2.73)	1
T	272 (75.14%)	264 (80%)	0.76 (0.53-1.08)	0.14
G	90 (24.86%)	71 (20%)	1.32 (0.92-1.9)	0.14



Фигура 4.10

Таблица 4.10. Статистически анализ за асоцииация на rs7841060 с риска за развитие на метастази при РП

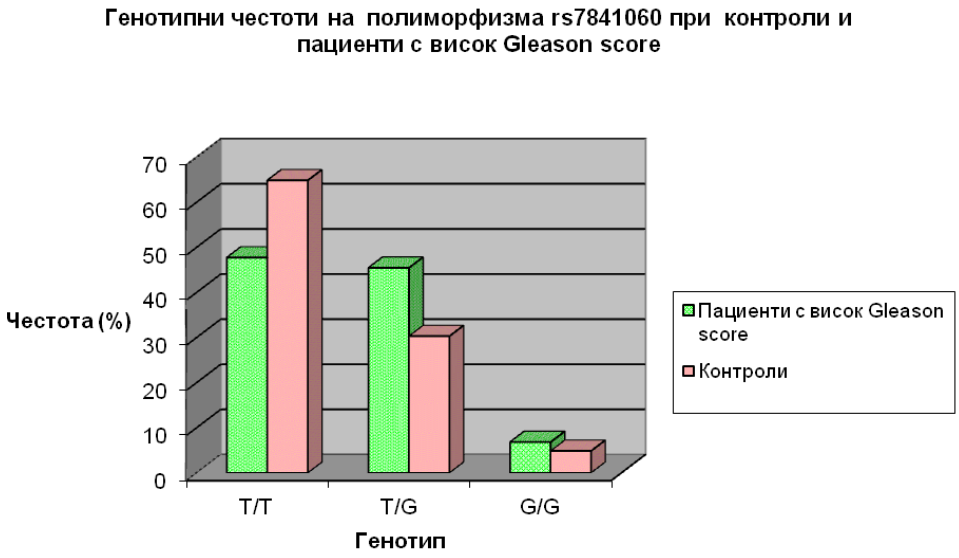
Генотип/ алел	Пациенти (n=28)	Контроли (n=165)	OR (95% CI)	P Fisher two tailed
T/T	11 (39.29%)	107 (64.85%)	0.35 (0.15-0.8)	**0.01**
T/G	16 (57.14%)	50 (30.30%)	3.07 (1.35-6.95)	**0.009**
G/G	1 (3.57%)	8 (4.85%)	0.73 (0.087-6.04)	1
T	38 (67.86%)	264 (80%)	0.53 (0.28-0.98)	**0.05**
G	18 (32.14%)	71 (20%)	1.89 (1.02-3.53)	**0.05**



Фигура 4.11

Таблица 4.11. Статистически анализ за асоцииация на rs7841060 с риска за развитие Gleason score над 7 при РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=44)	Контроли (n=165)	OR (95% CI)	P Fisher two tailed
T/T	21 (47.73%)	107 (64.85%)	0.49 (0.25-0.97)	**0.05**
T/G	20 (45.45%)	50 (30.30%)	1.92 (0.97-3.78)	0.07
G/G	3 (6.82%)	8 (4.85%)	1.44 (0.36-5.65)	0.7
T	62 (70.45%)	264 (80%)	0.596 (0.35-1.01)	0.06
G	26 (29.55%)	71 (20%)	1.68 (0.98-2.85)	0.06



Фигура 4.12

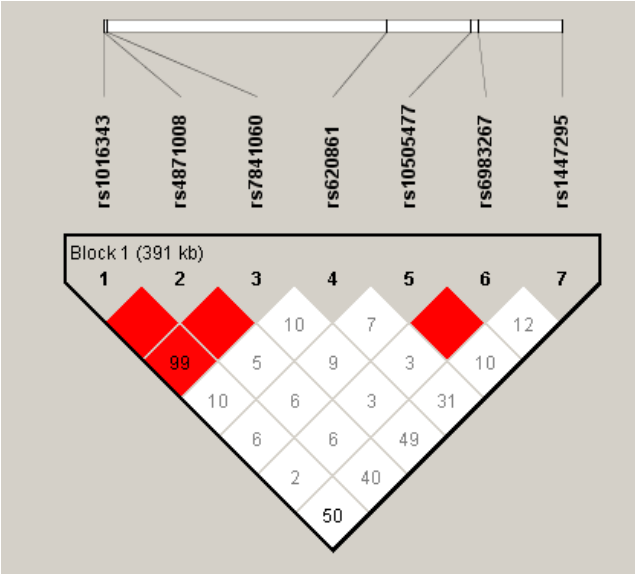
4.1.2.5. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите разположени в хромозомен локус 8q24

В хаплотипния анализ включихме и резултатите за още три полиморфни варианта (rs10505477, rs6983267, rs1447295), предварително изработени в рамките на дипломна работа.

Хаплотипният анализ не доведе до получаването на статистически значими резултати при сравняването на различните хаплотипни варианти при всички пациенти и контроли.

Когато се сравниха хаплотипните честоти на контролите и пациентите с висок Gleason score, се получиха статистически значими резултати (Таблица 4.12). Хаплотипът T-C-G-A-A-G-C на полиморфизмите rs1016343-rs4871008-rs7841060-rs620861-rs10505477-rs6983267-rs1447295 се среща по-често при пациентите с Gleason score над 7, отколкото при контролите, p= 0.0498. Следните хаплотипни комбинации също се срещат по-често при пациентите, отколкото при контролите и резултатите за тях са статистически значими: T-C-

G (rs1016343-rs4871008- rs7841060), p=0.343, C-G (rs4871008- rs7841060), p=0.343 и C-A (rs4871008- rs10505477), p=0.0188. Хаплотипите C-T-T (rs1016343-rs4871008- rs7841060), p=0.0243 и T-T (rs4871008- rs7841060) вероятно имат протективна роля тъй като се срещат по-често при контроли в сравнение с пациенти с висок Gleason score.



Фигура 4.13. Графика на неравновесно скачените изследвани полиморфни варианти на8q24

Таблица 4.12. Статистически анализ на хаплотипите на маркерите 1) rs1016343, 2) rs4871008, 3) rs7841060, 4) rs620861, 5) rs10505477, 6) rs6983267 и 7) rs1447295 за асоциация с висок Gleason score

Хаплотип							Честота	Пациенти, Контроли съотношения	χ 2	p
1	2	3	4	5	6	7				
T	C	G	A	A	G	C	0.029	0.061, 0.021	3.847	**0.0498**
C	T	T					0.425	0.318, 0.453	5.072	**0.0243**
T	C	G					0.218	0.302, 0.196	4.479	**0.0343**
	T	T					0.426	0.325, 0.453	4.603	**0.0319**
	C	G					0.218	0.302, 0.196	4.479	**0.0343**
	C			A			0.271	0.372, 0.244	5.522	**0.0188**



Фигура 4.14. Хаплотипни честоти на rs1016343- rs4871008- rs7841060- rs620861- rs10505477- rs6983267 - rs1447295 в LD блока за пациентите с висок Gleason

Хаплотипен анализ бе направен и с пациентите с метастази, но не се получиха статистически значими резултати вероятно заради малкия им брой.

4.1.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 10q11.23

Генетичен анализ на полиморфизмите **rs10993994** и **rs7920517** бе проведен за определяне на тяхната асоциация с РП при български пациенти. И двата полиморфни варианта са в един LD блок от 100 kb на хромозомен локус 10q11.23.

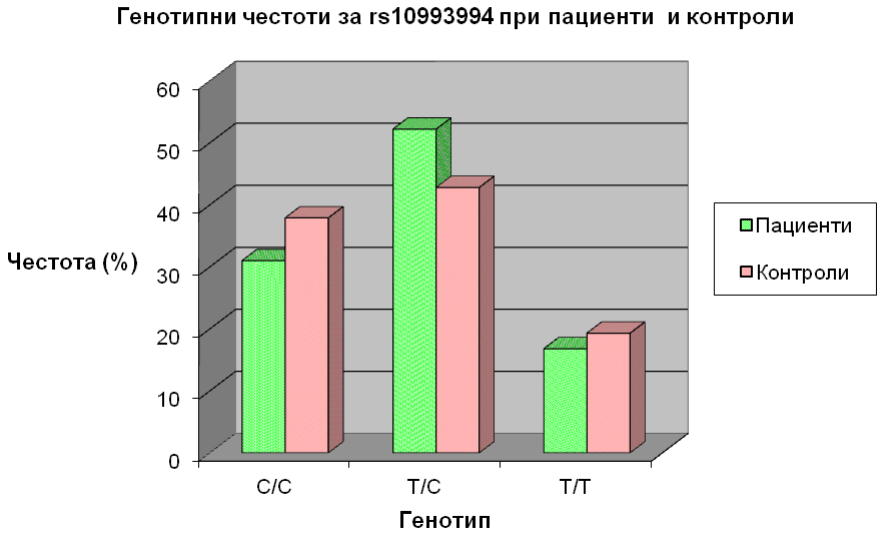
4.1.3.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs10993994 в *MSMB*

Сравнението на генотипните и алелните честоти на rs10993994 между пациентите и контролите не доведе до получаването на статистически значими разлики (Таблица 4.13, Фигура 4.15). Наблюдава се по-висока честота на генотипа T/C и на алела T при пациентите в сравнение с контролите.

При сравняването на алелните и генотипните честоти на пациентите с Gleason score над 7 и контролите също не се получиха статистически значими резултати и отново честотите на T/C генотипа и на алел T са по-високи сред пациентите (Таблица 4.14, Фигура 4.16).

Таблица 4.13. Статистически анализ за асоциация на rs10993994 с РП.

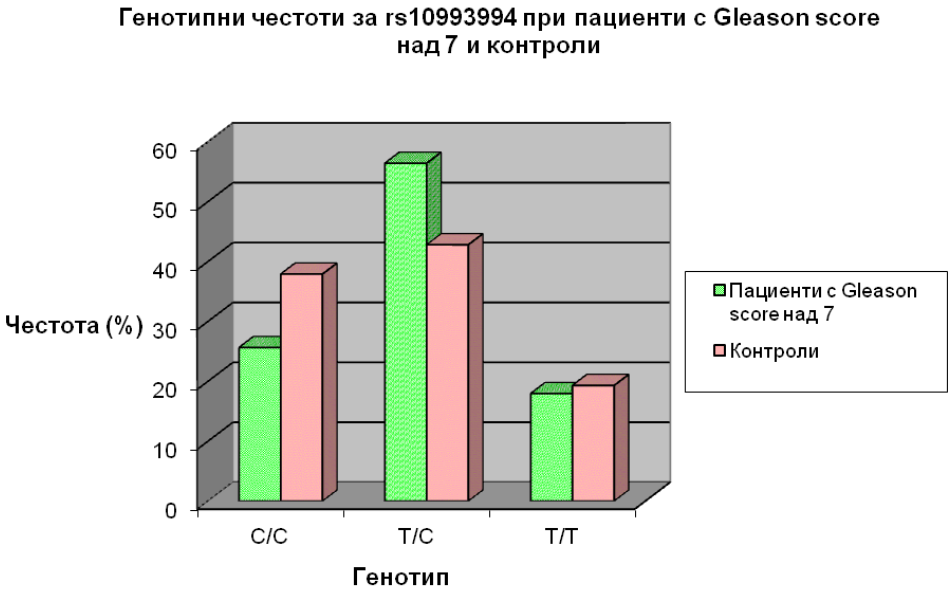
Генотип/ алел	Пациенти (n=161)	Контроли (n=161)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	50 (31.0%)	61 (37.9%)	0.74 (0.47-1.17)	0.24
T/C	84 (52.2%)	69 (42.8%)	1.45 (0.94-2.26)	0.12
T/T	27 (16.8%)	31 (19.3%)	0.85 (0.48-1.5)	0.66
C	184 (57.1%)	191 (59.3%)	0.91 (0.67-1.25)	0.63
T	138 (42.9%)	131 (40.7%)	1.09 (0.8-1.5)	0.63



Фигура 4.15

Таблица 4.14. Статистистически анализ за асоциация на rs10993994 с висок Gleason score при РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=39)	Контроли (n=161)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	10 (25.64%)	61 (37.9%)	0.56 (0.25-1.24)	0.19
T/C	22 (56.41%)	69 (42.8%)	1.73 (0.85-3.49)	0.15
T/T	7 (17.95%)	31 (19.3%)	0.92 (0.37-2.27)	1
C	42 (53.85%)	191 (59.3%)	0.80 (0.48-1.32)	0.44
T	36 (46.15%)	131 (40.7%)	1.25 (0.76-2.06)	0.44

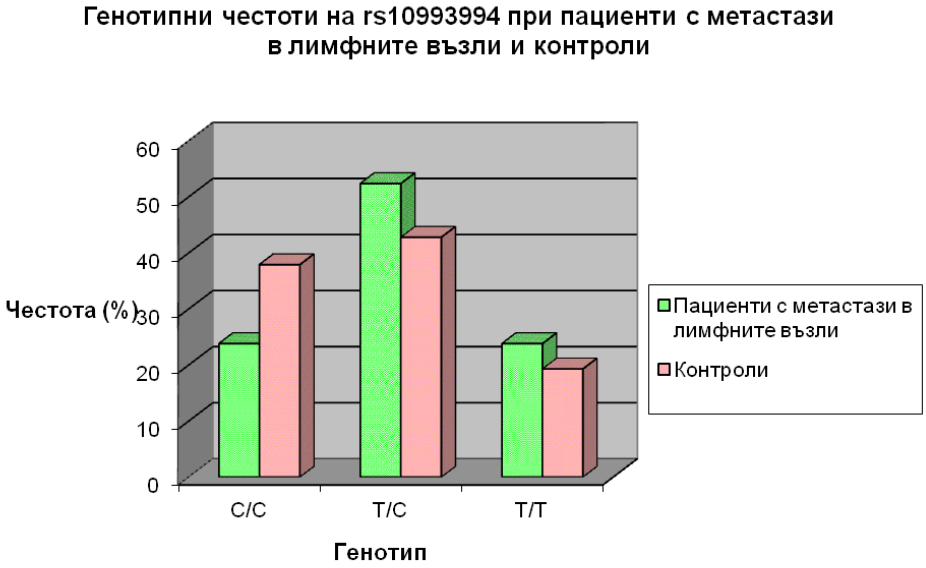


Фигура 4.16

Когато сравнихме генотипните и алелните честоти на пациентите с метастази в лимфните възли и контролите се наблюдават близки до статистическа значимост резултати (Таблица 4.15, Фигура 4.17). Генотипът C/C (p=0.059) се среща много по-често при контролите в сравнение с пациентите, което предполага че този генотип е протективен. Генотипните варианти T/C и T/T се срещат по-често при пациентите, но резултатите не са статистически значими.

Таблица 4.15. Статистически анализ за асоциация на rs10993994 с лимфни метастази при РП

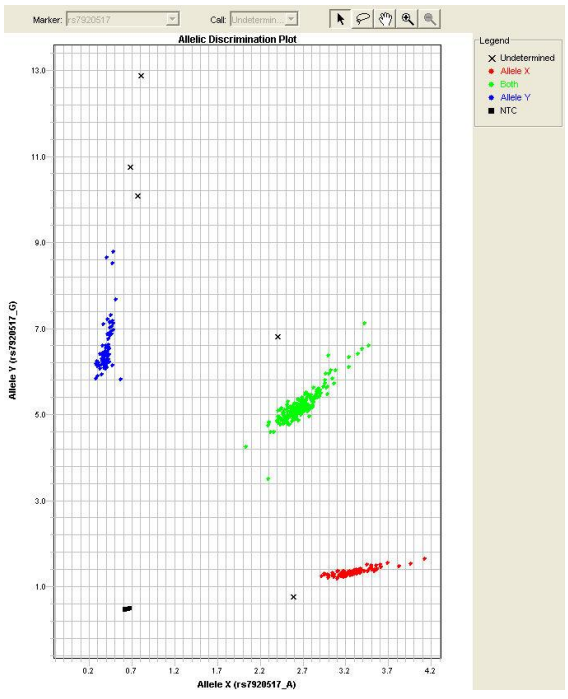
Генотип/ алел	Пациенти (n=63)	Контроли (n=161)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	15 (23.81%)	61 (37.9%)	0.51 (0.26-0.99)	**0.059**
T/C	33 (52.38%)	69 (42.8%)	1.47 (0.82-2.63)	0.23
T/T	15 (23.81%)	31 (19.3%)	1.31 (0.65-2.64)	0.47
C	63 (50%)	191 (59.3%)	0.69 (0.45-1.04)	0.09
T	63 (50%)	131 (40.7%)	1.46 (0.96-2.21)	0.09



Фигура 4.17

4.1.3.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм в rs7920517

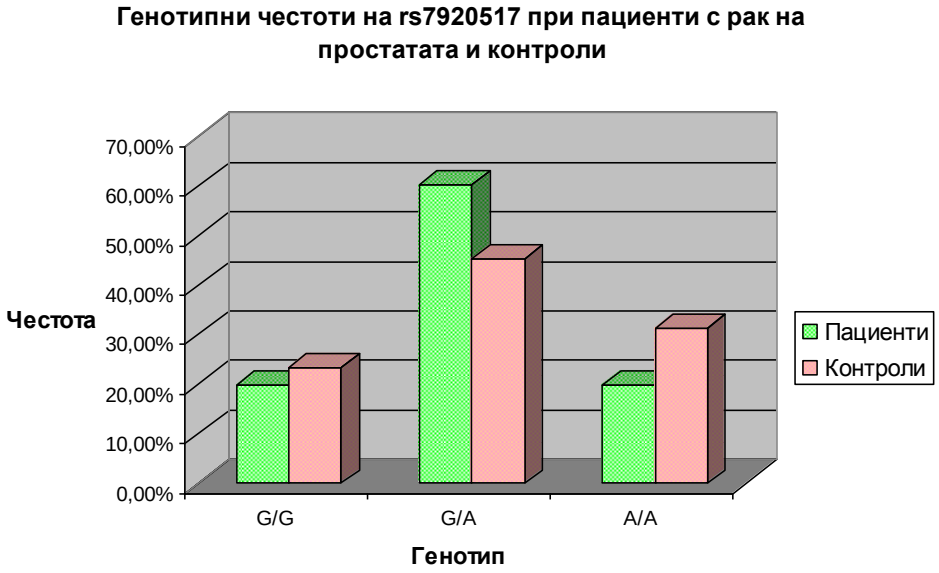
Полиморфизмът rs7920517 се намира в хромозомен локус 10q11 в близост до и в силна неравновесна скаченост с rs10993994, който е многократно докладван като свързан с риска за развитие на РП.



Фигура 4.18. Резултати от провеждането на PCR в реално време чрез TaqMan технологията. Разпределение на генотипните варианти за полиморфизъм rs7920517

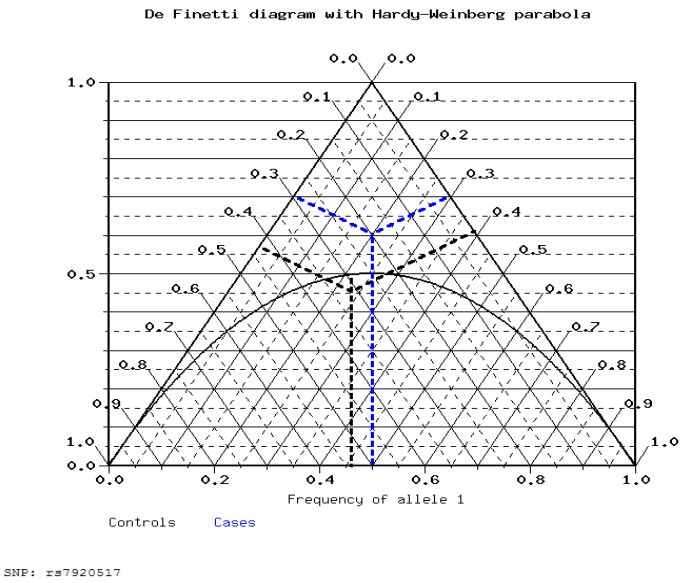
Таблица 4.16. Статистически анализ за асоциация на rs7920517 с РП.

Генотип/ алел	Пациенти (n=187)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	37 (19.79%)	38 (23.31%)	0.81 (0.48 -1.35)	0.43
G/A	113 (60.43%)	74 (45.4%)	1.84 (1.2-2.8)	**0.0053**
A/A	37 (19.79%)	51 (31.3%)	0.54 (0.33-0.88)	**0.014**
G	187 (50%)	150 (46.01%)	1.17 (0.87-1.58)	0.32
A	187(50%)	176 (53.99%)	0.85 (0.63-1.15)	0.32



Фигура 4.19

При сравняването на алелните и генотипните честоти в групата на пациентите и контролната извадка беше наблюдавана съществена разлика (Таблица 4.16, Фигура 4.19) за G/A и A/A генотипа. G/A генотипът се среща по-често при пациентите в сравнение с контролите и е свързан с почти двукратно увеличаване на риска за развитие на РП (p=0.0053). При изчисляване на HWE (Харди-Вайнберг) се забелязва излишък от хетерозиготи в групата на пациентите (p=0.0043 по Pearson; p=0.0042 по Llr; p=0.0055 по Exact) (Фигура 4.20).



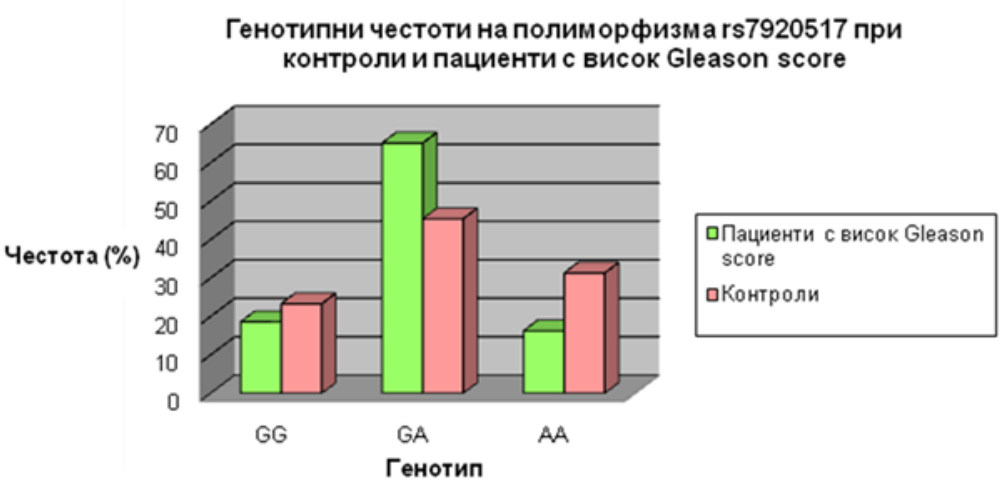
Фигура 4.20. Диаграма на де Финети, с Харди-Вайнберг парабола за rs7920517

Наблюдаваната алелна честота на G алела в настоящото изследване е по-висока при пациенти, макар че при G/G генотипа разликата е в обратна посока. Хомозиготите по А алела се срещат по-често при контролите и показват понижен риск за развитие на РП (p=0.014).

Бе направена и проверка за асоциация на полиморфизма с риска за развитие на агресивно заболяване (Таблици 4.17 и 4.18). Генотипът G/A се среща по-често при пациенти с метастази (p=0.07) или с висок Gleason score (p=0.026) в сравнение с контролите. Хомозиготното носителство на алел А се свързва с понижен риск както за развитие на агресивен простатен карцином с метастази, така и за ниско диференцирани тумори с висок Gleason score.

Таблица 4.17. Статистически анализ за асоциация на rs7920517 с риска за развитие на тумори с висок Gleason score при РП.

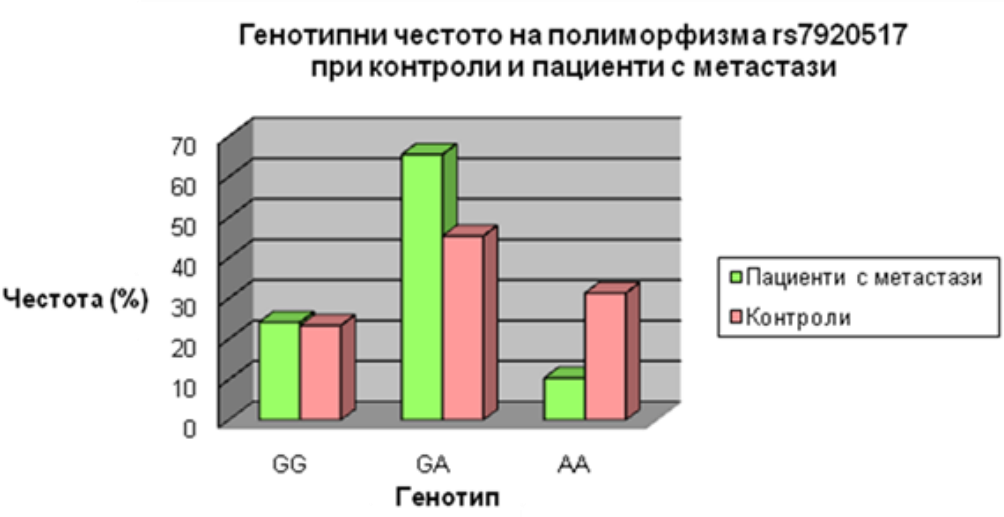
Генотип/ алел	**Пациенти (n=43)**	**Контроли (n=163)**	**OR (95% CI)**	**P Fisher, two-tailed**
G/G	8 (18.60%)	38 (23.31%)	0.75 (0.32 -1.76)	0.54
G/A	28 (65.12%)	74 (45.4%)	2.25 (1.12-4.52)	**0.026**
A/A	7 (16.28%)	51 (31.3%)	0.43 (0.18-1.02)	**0.06**
G	44 (51.16%)	150 (46.01%)	1.23 (0.76-1.98)	0.40
A	42 (48.84%)	176 (53.99%)	0.81 (0.51-1.31)	0.40



Фигура 4.21

Таблица 4.18. Статистически анализ за асоциация на rs7920517 с риска за развитие метастази при РП.

Генотип/ алел	Пациенти (n=29)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	7 (24.14%)	38 (23.31%)	0.96 (0.38 -2.41)	1
G/A	19 (65.52%)	74 (45.4%)	2.29 (1-5.22)	0.07
A/A	3 (10.31%)	51 (31.3%)	0.25 (0.07-0.87)	**0.024**
G	33 (56.90%)	150 (46.01%)	1.55 (0.88-2.72)	0.15
A	25 (43.10%)	176 (53.99%)	0.65 (0.37-1.13)	0.15



Фигура 4.22

4.1.3.3. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите rs10993994 и rs7920517 за асоциацисция с рака на простатата

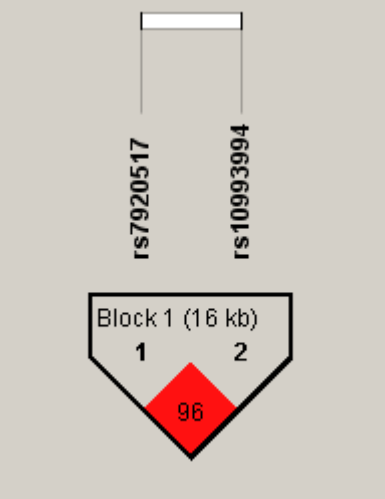
Хаплотипният анализ не доведе до получаването на статистически значими резултати, но тенденциите за асоциация наблюдавани за отделните полиморфизми се запазват (Таблици 4.19 и 4.20). Хаплотипът G-T (rs7920517-rs10993994) се среща по-често при пациентите, отколкото при контролите (0.415 срещу 0.398) и този хаплотип вероятно е рисков за развитие на РП, а хаплотипът A-C се среща по-често при контролите, така че той вероятно е протективен.

Таблица 4.19. Статистически анализ на отделните полиморфни варианти на 10q11.23 за асоциация с РП

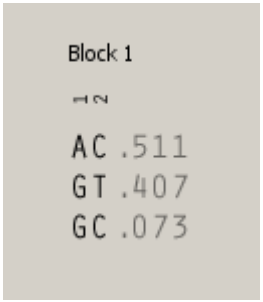
#	Наименование на полиморфизма	Алел	Пациенти, Контроли съотношения	$\chi 2$	p
1	**rs7920517**	G	0.491, 0.460	0.598	0.4392
2	**rs10993994**	T	0.429, 0.407	0.313	0.576

Таблица 4.20. Статистически анализ на хаплотипите на маркерите rs7920517 и rs10993994 за асоциация с РП

Хаплотип	Честота	Пациенти, Контроли съотношения	$\chi 2$	p
A-C	0.511	0.490, 0.532	1.157	0.282
G-T	0.407	0.415, 0.398	0.192	0.6615
G-C	0.073	0.081, 0.066	0.61	0.4347



Фигура 4.23. Графика на неравновесно скачените изследвани полиморфни варианти на 10q11.23



Фигура 4.24. Хаплотипни честоти на rs7920517-rs10993994 в LD блока за пациентите висок Gleason score и контроли (1- rs10505477, 2- rs6983267)

4.1.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен локус 11p15.5

Полиморфизмът **rs7127900** показал асоциация с РП в предходно проучване на консорциума PRACTICAL, включващо и български пациенти бе изследван в разширена извадка.

За да се разясни ролята на 11p15 региона за развитието на РП бяха подбрани 7 неизследвани до този момент полиморфизми разположени центромерно и един теломерно по отношение на полиморфизма rs7127900 показал асоциация с риска за развитие на РП. Подборът на полиморфизми за изследване бе осъществен с помощта на HapMap (E16) като критериите за избор бяха следните: да не показват скаченост с rs7127900, както и помежду си, честотата на минорните алели да е под 50% , но и над 5%, за да се определи ефекта им върху развитието на РП дори и при изследването на малка извадка.

Подбраните полиморфизми са следните: **rs11603378** (в интрон на IGF2), **rs2239681** (в интрон на IGF2), **rs10770125** (Leu144Pro замяна в гена INS-IGF2), **rs3842756** (в интрон на гена INS-IGF2), **rs2070762** (в интрон на TH), **rs11564710** (близо до TH гена), **rs55930300** (в ASCL2 гена).

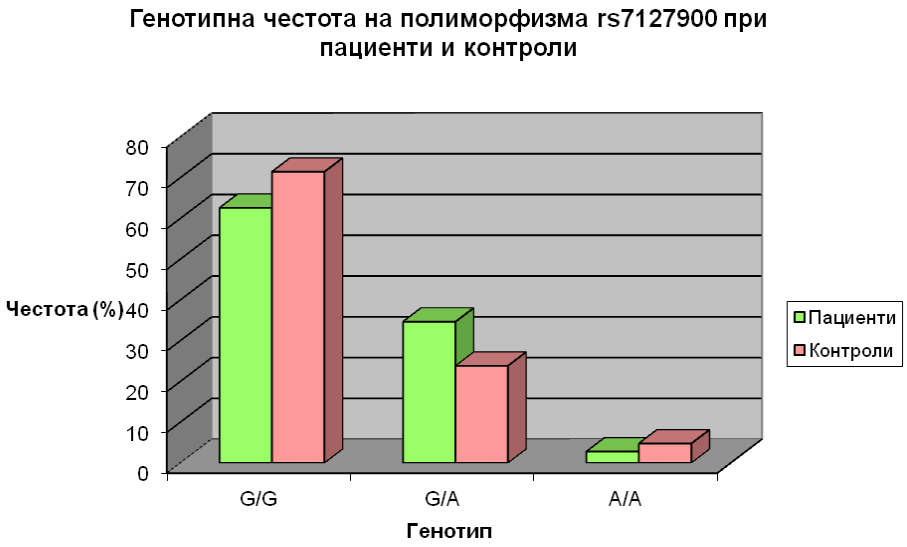
4.1.4.1. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs7127900

Статистическият анализ на този полиморфизъм доведе до получаването на статистически значими резултати за G/A генотипа (Таблица 4.21, Фигура 4.25). Генотипът G/G се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите и вероятно има протективна роля. Хетерозиготното носителство на А алела се среща по-често при пациентите като това води до над 1.5 пъти повишен риск за развитие на РП (p=0.034). Най-вероятно А алелът е рисков, но не получаваме статистически значими разлики в генотипните честоти за A/A, а така също и за самия алел А между пациентите и контролите. Това вероятно се дължи на ниската честота на алел А и размера на изследваната извадка. При тестването на Харди-Вайнберг равновесието не бяха открити отклонения.

Полиморфизмът rs7127900 не показа статистически значима асоциация с риска за развитие на метастази или с висок Gleason score.

Таблица 4.21. Статистически анализ за асоциация на rs7127900 с РП .

Генотип/ алел	Пациенти (n=185)	Контроли (n=162)	OR (95% CI)	P Fisher two-tailed
G/G	116 (62.7%)	116 (71.6%)	0.67 (0.42-1.05)	0.088
G/A	64 (34.6%)	38 (23.5%)	1.73 (1.08-2.77)	**0.034**
A/A	5 (2.7%)	8 (4.9%)	0.53 (0.17-1.67)	0.4
G	296 (80%)	270 (83.33%)	0.8 (0.54-1.12)	0.28
A	74 (20%)	55 (16.67%)	1.25 (0.85-1.84)	0.28



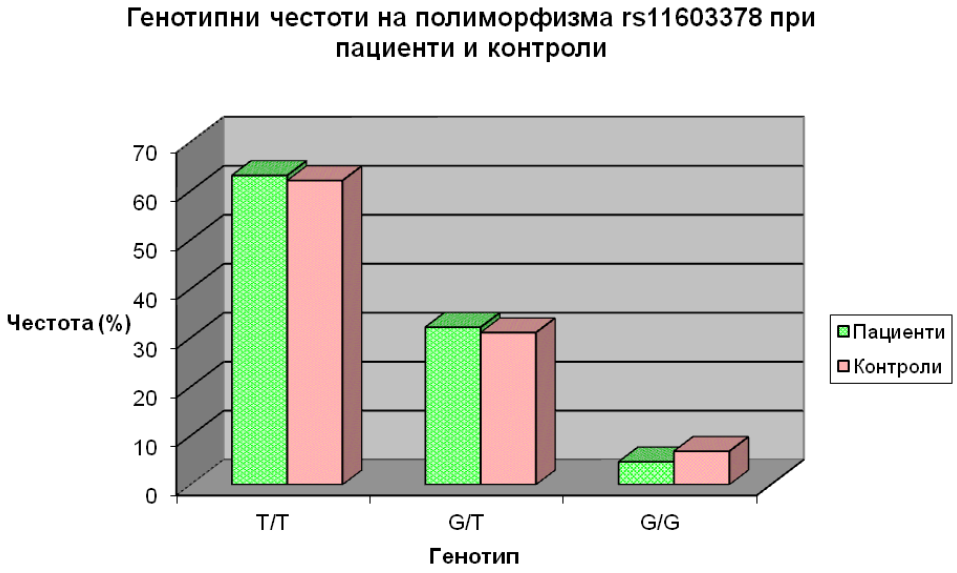
Фигура 4.25

4.1.4.2. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs11603378

Алелните и генотипните честоти на rs11603378 при пациентите и контролите не се различават значително и анализът не доведе до получаването на статистически значими резултати (Таблица 4.22, Фигура 4.26). Алелът G е рядък и поради тази причина трябва да се изследва по-голяма извадка, за да се установи дали този полиморфизъм има асоциация с РП. Получените резултати не се отклоняват от закона на Харди-Вайнберг. Полиморфизмът не показа статистически значима асоциация с клиникопатологичните характеристики на простатните тумори.

Таблица 4.22. Статистически анализ за асоциация на rs11603378 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=171)	Контроли (n=161)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
T/T	108 (63.16%)	100 (62.11%)	1.0457 (0.67-1.63)	0.91
G/T	55 (32.16%)	50 (31.06%)	1.05 (0.66-1.67)	0.91
G/G	8 (4.68%)	11 (6.83%)	0.67 (0.26-1.71)	0.48
T	271 (79.24%)	250 (77.64%)	1.1 (0.76-1.59)	0.64
G	71 (20.76%)	72 (22.36%)	0.91 (0.63-1.32)	0.64



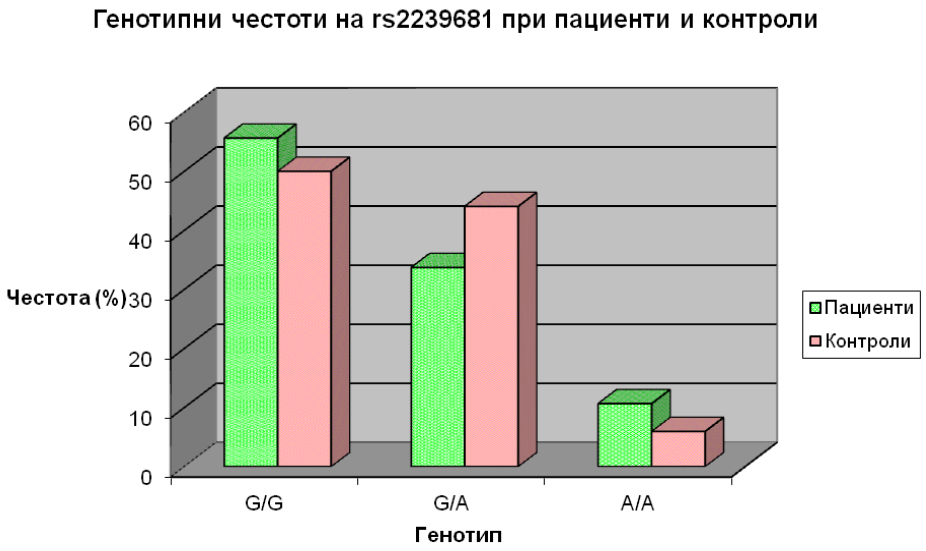
Фигура 4.26.

4.1.4.3. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs2239681

При сравняването на алелните и генотипните честоти на rs2239681 при всички пациенти и контроли не се постигнаха статистически значими резултати (Таблица 4.33, Фигура 4.27). Единствено генотипът G/A се среща по-често при контролите и резултатът е много близко до статистическа значимост (p=0.06). Не се наблюдава отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.33. Статистически анализ за асоциация на rs2239681 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=178)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	99 (55.62%)	84 (50%)	1.25 (0.82-1.91)	0.33
G/A	60 (33.71%)	74 (44.05%)	0.65 (0.41-1)	**0.06**
A/A	19 (10.67%)	10 (5.95%)	1.89 (0.85-4.19)	0.12
G	258 (72.47%)	242 (72.02%)	1.02 (0.73-1.43)	0.93
A	98 (27.53%)	91 (27.98%)	0.98 (0.7-1.36)	0.93

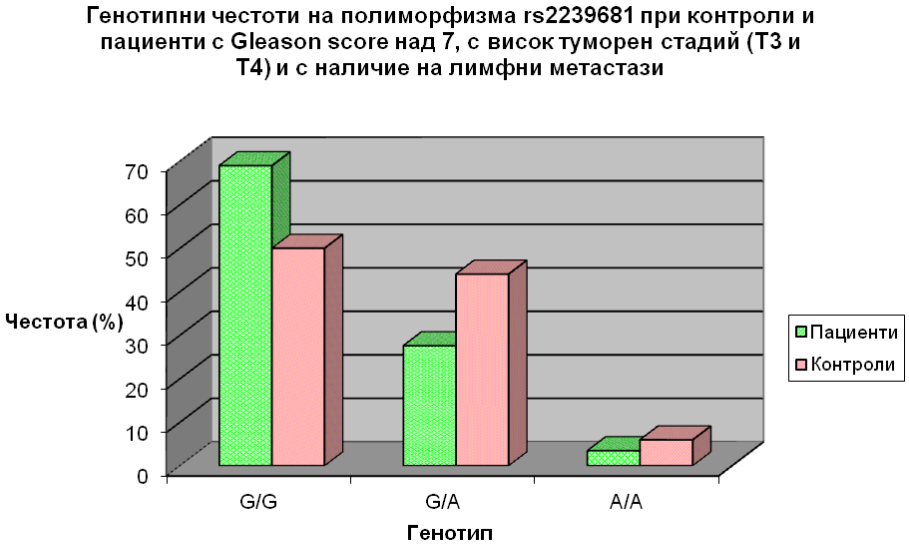


Фигура 4.27

При анализ за асоциация на полиморфизма rs2239681 с риска за развитието на РП с Gleason score над 7, с висок туморен стадий (T3 и T4) и с наличие на лимфни метастази също не се получиха статистически значими резултати (Таблица 4.34, Фигура 4.28), но се наблюдава по-висока честота на генотипа G/G при пациентите с агресивен рак в сравнение с контролите. Алелът G също се среща по-често при пациентите.

Таблица 4.34. Статистически анализ за асоциация на rs2239681 с развитие на РП с Gleason score над 7, висок туморен стадий (T3 и T4) и лимфни метастази

Генотип/ алел	Пациенти (n=29)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	20 (68.96%)	84 (50%)	2.22 (0.96-5.16)	0.07
G/A	8 (27.59%)	74 (44.05%)	0.48 (0.203-1.15)	0.11
A/A	1 (3.45%)	10 (5.95%)	0.56 (0.07-4.58)	0.71
G	48 (82.76%)	242 (72.02%)	1.86 (0.91-3.84)	0.11
A	10 (17.24%)	91 (27.98%)	0.54 (0.26-1.1)	0.11



Фигура 4.28.

4.1.4.4. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs10770125

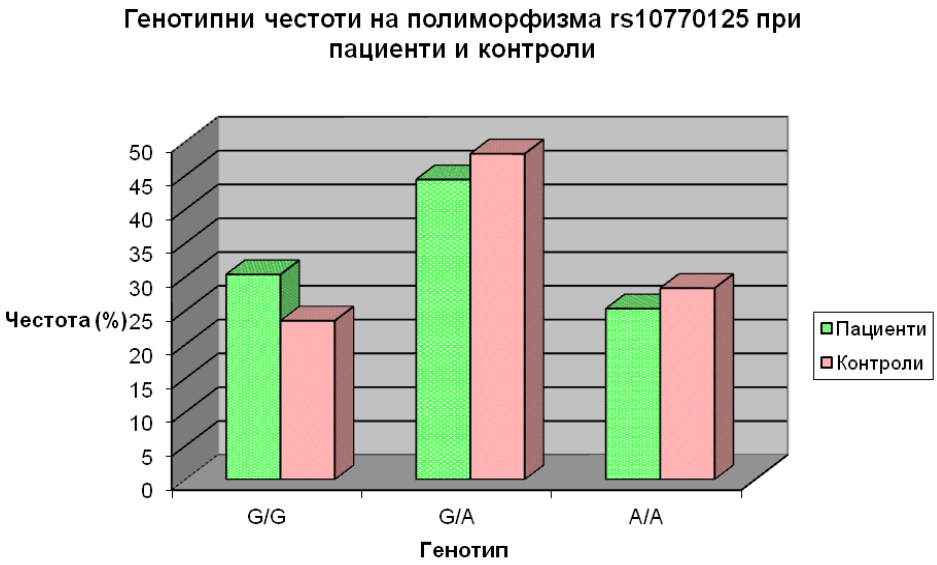
Статистическата обработка на получените резултати от генотипирането на пациентите и контролите за полиморфизъм rs10770125 не доведе до получаването на статистически значими разлики в генотипните и алелните честоти между изследваните групи (Таблица 4.35, Фигура 4.29). Наблюдава се по-висока честота на генотипа G/G, както и на алел G при пациентите в сравнение с контролите.

Резултатите не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

При сравняването на алелните и генотипните честоти на контролите с тези на пациентите с агресивни тумори също не се получиха статистически значими резултати.

Таблица 4.35. Статистически анализ за асоциация на rs10770125 с РП

Генотип/ алел	(n=178)	Контроли (n=166)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	54 (30.34%)	39 (23.49%)	1.42 (0.88-2.29)	0.18
G/A	79 (44.38%)	80 (48.19%)	0.86 (0.56-1.31)	0.52
A/A	45 (25.28%)	47 (28.3%)	0.86 (0.53-1.38)	0.54
G	187 (52.53%)	158 (47.59%)	1.22 (0.90-1.64)	0.22
A	169 (47.47%)	174 (52.41%)	0.82 (0.61-1.11)	0.22



Фигура 4.29

4.1.4.5. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs3842756

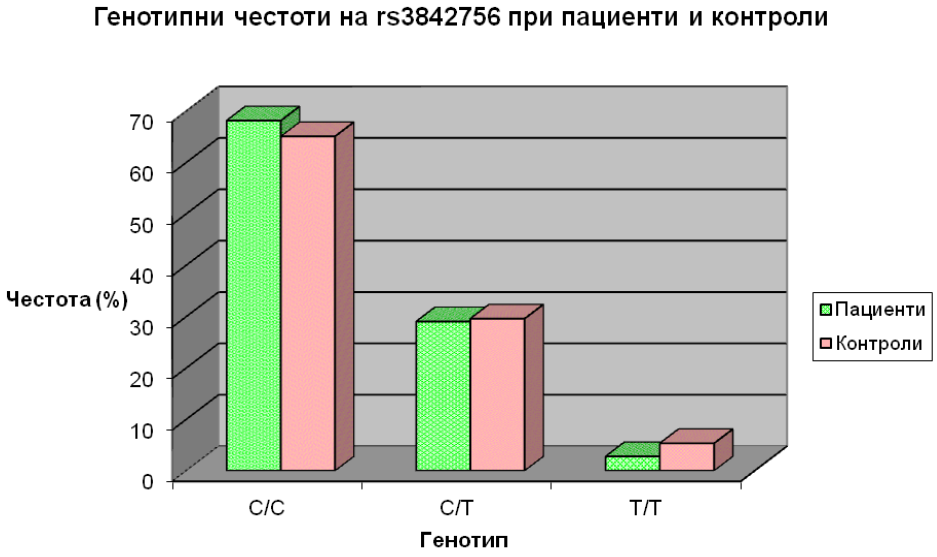
Обработката на получените резултати от генотипирането на полиморфизъм rs3842756 не доведе до получаването на статистически значима разлика в генотипните и алелните честоти между пациентите и контролите (Таблица 4.36, Фигура 4.30).

Резултатите не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

При сравняването на алелните и генотипните честоти на контролите с тези на пациентите с висок Gleason score, или тези с висок туморен стадий, или тези с метастази също не се получиха статистически значими резултати.

Таблица 4.36. Статистически анализ за асоциация на rs3842756 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=179)	Контроли (n=169)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	122 (68.16%)	110 (65.09%)	1.15 (0.73-1.79)	0.057
C/T	52 (29.05%)	50 (29.59%)	0.97 (0.61-1.55)	1
T/T	5 (2.79%)	9 (5.32%)	0.51 (0.17-1.56)	0.28
C	296 (82.7%)	270 (79.88%)	1.2 (0.82-1.76)	0.38
T	62 (17.32%)	68 (20.12%)	0.83 (0.57-1.22)	0.38



Фигура 4.30

4.1.4.6. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs2070762

Сравнението на алелните и генотипните честоти при пациентите и контролите доведе до получаването на статистически значими резултати (Таблица 4.37, Фигура 4.31). Генотипът G/G се среща по-често при пациентите, в сравнение с контролите и води до почти 1.7 пъти увеличен риск от развитие на РП (p=0.04, OR-1.685). Генотипът G/A (p=0.05, OR-0.65) се среща по-често при контролите и вероятно е протективен.

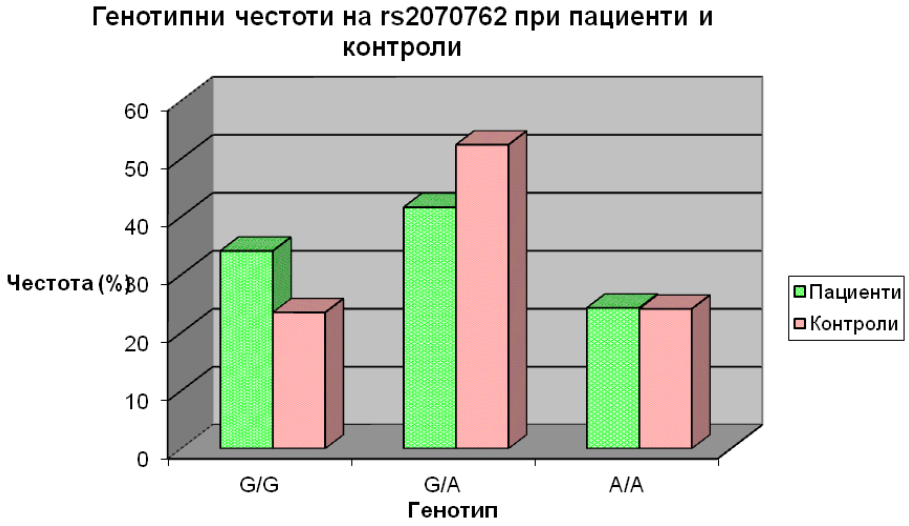
Резултатите не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Анализът за асоциация на този полиморфизъм с агресивен РП не доведе до получаването на статистически значими резултати.

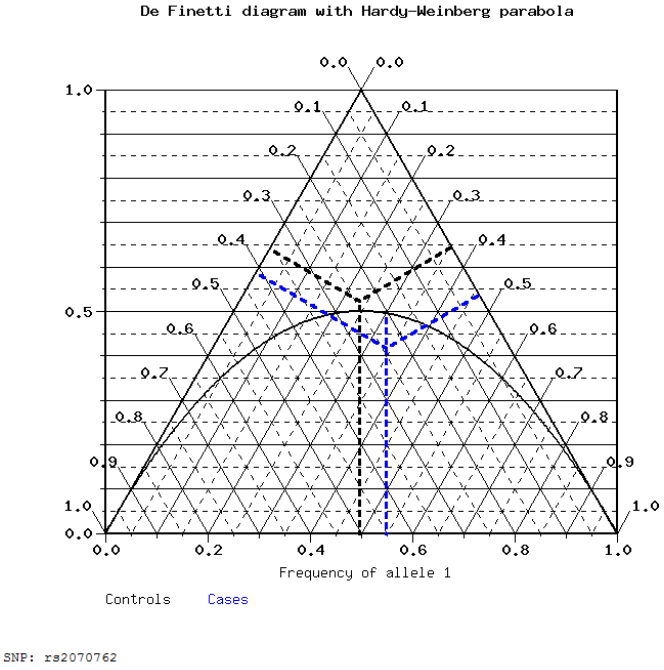
Разпределението на генотипните честоти при пациентите показа статистическо значимо отклонение от закона на Харди- Вайнберг (p=0.0359 по Pearson, p=0.0357 по Llr, p=0.045 по Exact) (Фигура 4.32). В тази група се наблюдават повече от очакваното хомозиготи по алел G и по-малко от очакваното хетерозиготни носители.

Таблица 4.37. Статистически анализ за асоциация на rs2070762 с РП

Генотип/ алел	**Пациенти (n=173)**	**Контроли (n=162)**	**OR (95% CI)**	**P Fisher, two-tailed**
G/G	59 (34.1%)	39 (23.49%)	1.685 (1.05-2.71)	**0.04**
G/A	72 (41.61%)	87 (52.41%)	0.65 (0.42-0.99)	**0.05**
A/A	42 (24.28%)	40 (24.1%)	1 (0.61-1.66)	1
G	190 (54.91%)	165 (49.7%)	1.23 (0.91-1.67)	0.19
A	156 (45.09%)	167 (50.3%)	0.8 (0.6-1.1)	0.19



Фигура 4.31



Фигура 4.32. Диаграма на де Финети, с Харди-Вайнберг парабола за rs2070762

4.1.4.7. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма rs11564710

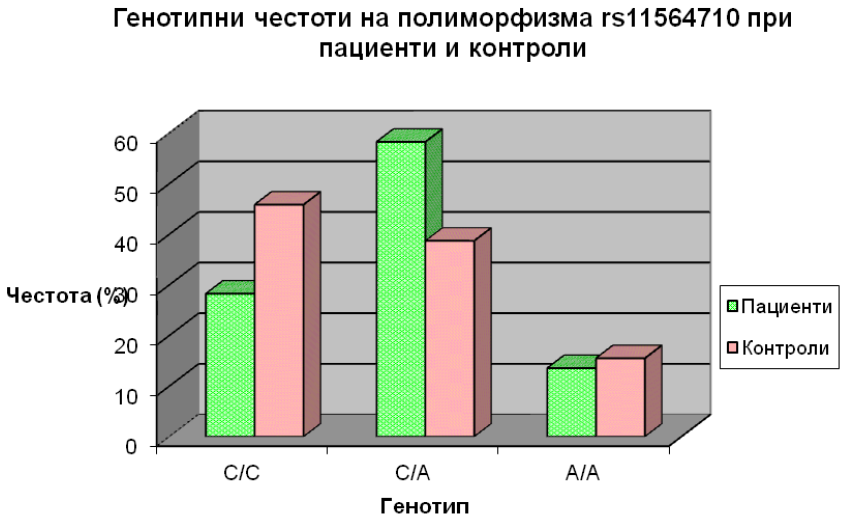
Полиморфизмът rs11564710 е най-близо разположен до предварително изследвания и показал асоциация полиморфизъм rs7127900. Намира се извън ген.

Сравнението на алелните и генотипните честоти при пациентите и контролите доведе до получаването на статитистически значими резултати (Таблица 4.38, Фигура 4.33). Генотипът C/C се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите и той има протективна роля, понижава риска за развитие на РП (OR=0.46, p=0.001). Хетерозиготното носителство на алел C обаче се среща по-често при пациентите и това води до 2.2 пъти

повишен риск за развитие на заболяването. Носителството на един алел С няма протективна роля. Алелът А е рисков, защото се среща по-често при пациентите в сравнение с контролите (OR=1.39, p=0.04) и в хетерозиготно състояние също повишава риска (OR=2.21, p=3 x 10^{-4}).

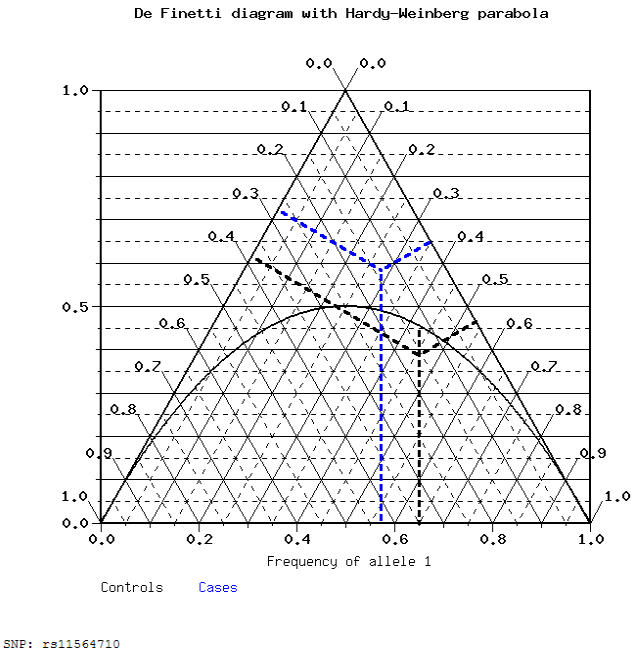
Таблица 4.38. Статистически анализ за асоциация на rs11564710 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=176)	Контроли (n=162)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	48 (28.23%)	77 (45.83%)	0.46 (0.296-0.73)	**0.001**
C/A	99 (58.24%)	65 (38.69%)	2.21 (1.43-3.41)	**3 x 10^{-4}**
A/A	23 (13.53%)	26 (15.48%)	0.85 (0.47-1.57)	0.65
C	195 (57.35%)	219 (65.18%)	0.72 (0.53-0.98)	**0.04**
A	145 (42.65%)	117 (34.82%)	1.39 (1.02-1.9)	**0.04**



Фигура 4.33:

Генотипните честоти при контролите не се отклоняват от закона на Харди-Вайнберг, но тези на пациентите се отклоняват статистически значимо (p=0.013 по Pearson, p=0.012 по Llr, p=0.018 по Exact) (Фигура 4.34)

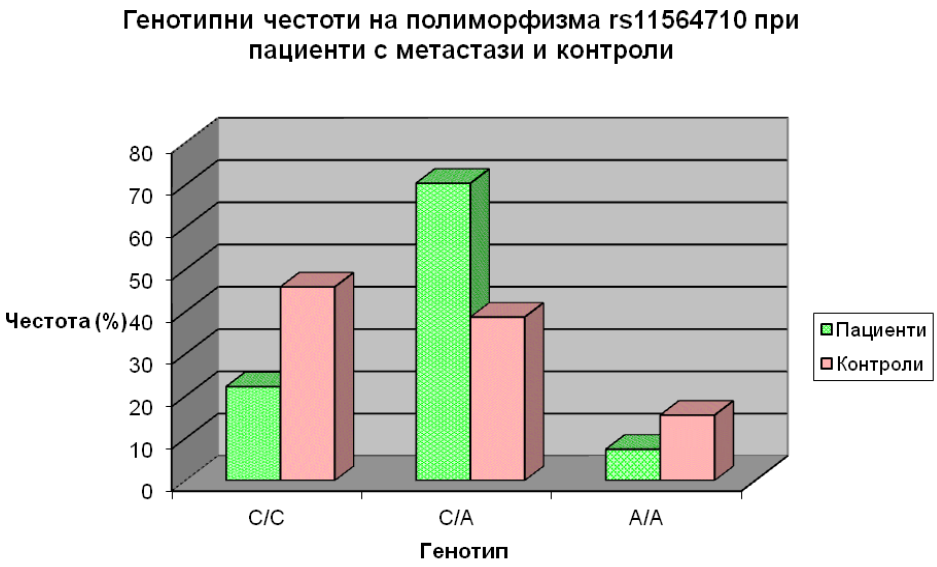


Фигура 4.34. Диаграма на де Финети, с Харди-Вайнберг парабола за rs11564710

При сравнението на алелните и генотипните честоти при пациентите с метастази и контролите също се наблюдава статистически значима разлика (Таблица 4.39, Фигура 4.35). В тази група отново рисков алел е А, а протективен е С. Статистическата значимост намалява. Генотипът С/А почти четирикратно увеличава риска за развитие на РП с метастази (OR=3.76, p=0.0029). Генотипът С/С е протективен. Той намалява риска за развитие на далечни метастази при пациенти с РП (OR-0.34, p=0.034).

Таблица 4.39. Статистически анализ за асоциация на rs11564710 с метастази при РП

Генотип/ алел	**Пациенти (n=27)**	**Контроли (n=162)**	**OR (95% CI)**	**P Fisher, two-tailed**
C/C	6 (22.22%)	77 (45.83%)	0.34 (0.13-0.88)	**0.034**
C/A	19 (70.37%)	65 (38.69%)	3.76 (1.56-9.09)	**0.0029**
A/A	2 (7.41%)	26 (15.48%)	0.44 (0.097-1.96)	0.38
C	31 (57.41%)	219 (65.18%)	0.72 (0.40-1.29)	0.29
A	23 (42.59%)	117 (34.82%)	1.39 (0.77-2.49)	0.29



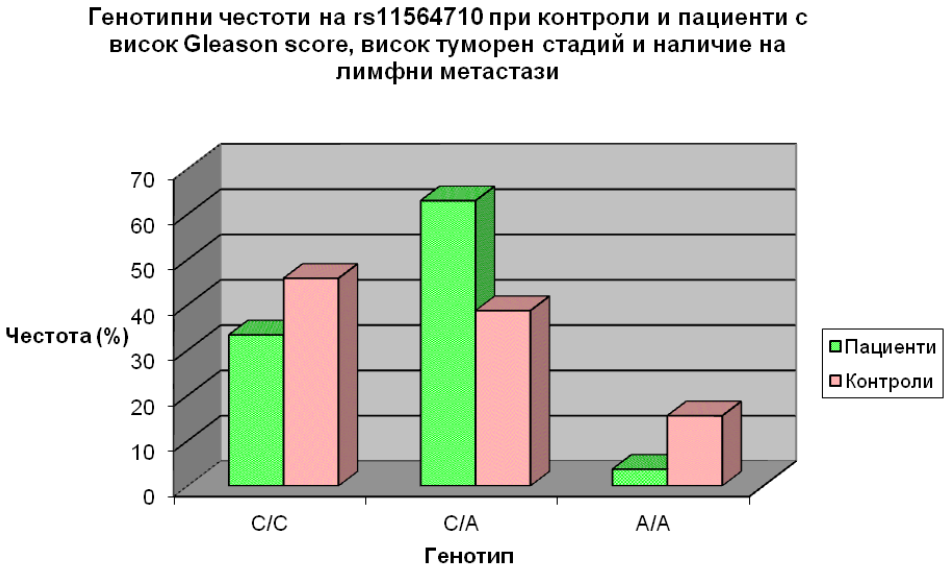
Фигура 4.35

Статистически значими резултати се получиха и при сравнението на алелните и генотипни честоти при контролите и пациентите с Gleason score над 7, с висок туморен стадий и с наличие на лимфни метастази (Таблица 4.40, Фигура 4.36). Генотипът C/A се среща по-често при пациентите в сравнение с контролите, p=0.021 и повишава риска за развитие на агресивни тумори с над 2.5 пъти.

Получената статистически значима асоциация на полиморфизма с риска за развитие на агресивен простатен карцином може да е по случайност.

Таблица 4.40. Статистически анализ за асоциация на rs11564710 с развитие на РП с Gleason score над 7, с висок туморен стадий (T3 и T4) и лимфни метастази

Генотип/ алел	Пациенти (n=27)	Контроли (n=162)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	9 (33.33%)	77 (45.83%)	0.59 (0.25-1.39)	0.3
C/A	17 (62.96%)	65 (38.69%)	2.69 (1.16-6.24)	**0.021**
A/A	1 (3.7%)	26 (15.48%)	0.21 (0.027-1.62)	0.13
C	35 (64.81%)	219 (65.18%)	0.98 (0.54-1.8)	1
A	19 (35.19%)	117 (34.82%)	1.02 (0.56-1.85)	1



Фигура 4.36

При проведения епистатичен анализ, включващ всички изследвани полиморфни варианти бе наблюдавано статистическо значимо епистатично взаимодействие след провеждане на корекция за множествени тествания при два от полиморфизмите на 11p.15.5: rs7127900 и rs11564710 (p=0.03).

4.1.4.8. Резултати от генетичен анализ на полиморфизъм rs55930300

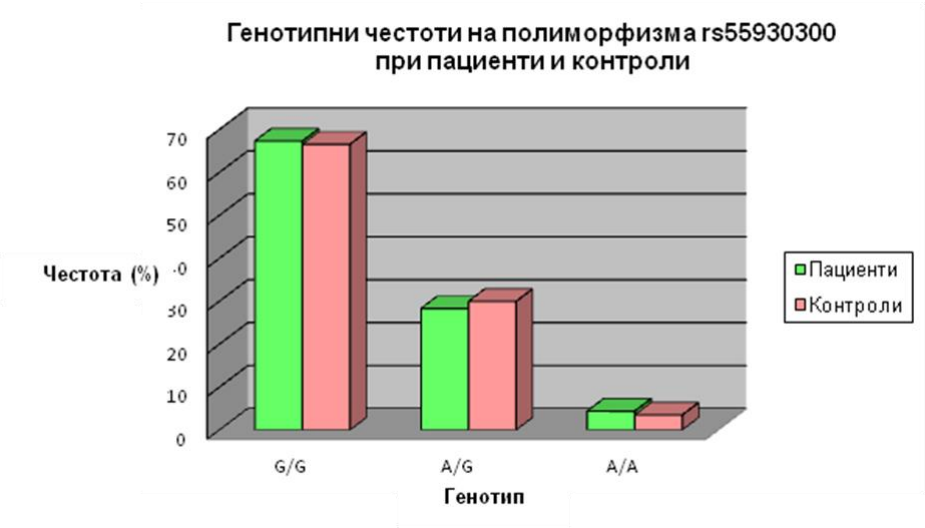
Полиморфизмът rs55930300 води до замяна на нуклеотида G с A в 5' UTR (нетранслиращия се регион) на *ASCL2* (achaete-scute complex homolog 2).

При сравняване на генотипните и алелните честоти на контролите (контролите с ДПХ и популационните контроли) и пациентите (Таблица 4.41) по отношение на изследвания полиморфизъм не се откри статистически значима разлика. Този полиморфизъм не показа асоциация и с клиникопатологичните характеристики като туморен стадий, Gleason score или наличие на метастази. Когато в статистическия анализ бяха включени само контролите с ДПХ или само популационните контроли също не се получиха статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти на пациентите спрямо контролите.

Таблица 4.41. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs55930300 с рак на простатата

Генотип/ алел	Пациенти (n=318)	Контроли (n=257)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	214 (67.3%)	171 (66.54%)	1.03 (0.73-1.46)	0.86
A/G	90 (28.3%)	77 (29.96%)	0.92 (0.64-1.32)	0.71
A/A	14 (4.4%)	9 (3.5%)	1.27 (0.54-2.98)	0.67
G	518 (81.45%)	419 (81.52%)	0.995	*
A	118 (18.55%)	95 (18.48%)	0.97	*

***-** Fisher тестът не може да изчисли p стойността за голяма извадка.

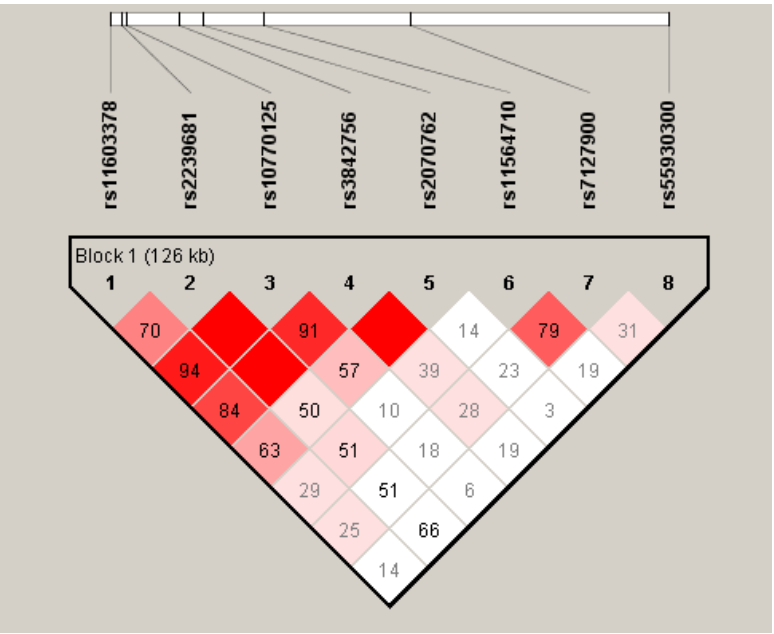


Фигура 4.37

Полиморфизмът не показа и статистическа значима асоциация с риска за развитие на агресивно заболяване (висок Gleason score, метастази). Не се наблюдава и отклонение на получените резултати от закона на Харди-Вайнберг.

4.1.4.9. Резултати от хаплотипен анализ на полиморфизмите разположени на хромозомен локус 11p15.5

В хаплотипния анализ бяха включени изследваните 8 полиморфни варианти в 11p15.5 хромозомен локус.



Фигура.4.38. Графика на неравновесно скачени изследвани полиморфни варианти в 11p15.5 хромозомен локус

Таблица.4.42. Статистически анализ на хаплотипите на полиморфизмите: 1) rs11603378; 2) rs2239681; 3) rs10770125; 4) rs3842756; 5) rs2070762; 6) rs11564710; 7) rs7127900; 8) rs55930300 **за асоциация с риска за развитие на РП**

Хаплотип								Честота	Пациенти, Контроли съотношения	χ 2	p
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**				
				A	C	G		0.308	0.272, 0.345	4.255	**0.0391**
					C	G		0.591	0.551, 0.632	4.731	**0.029**
			T	A	C			0.067	0.049, 0.085	3.514	0.0609
			T	A	C	G		0.062	0.045, 0.079	3.483	0.062
G	G	A	T	A	C	G	G	0.044	0.038, 0.050	0.588	0.4433

Хаплотипът A-C-G (rs2070762- rs11564710- rs7127900) показва статистически значима асоциация с риска за развитие на РП (Таблица 4.42). Среща се по-често при контроли в сравнение с пациентите и вероятно той има протективна роля. Тенденция за асоциация показа и хаплотипа T-A-C-G (rs3842756- rs2070762- rs11564710- rs7127900), p=0.062.

Проведохме хаплотипен анализ за асоциация на полиморфизмите с риска за развитие на висок Gleason score (над 7), но не се получиха статистически значими резултати. Тенденция за асоциация показа хаплотипа A-C-A (rs10770125- rs3842756- rs2070762) (p=0.0542), който се среща по-често при пациентите с висок Gleason score.

При хаплотипния анализ за асоциация с риска за развитие на метастази няколко хаплотипни комбинации се получиха статистически значими резултати представени в Таблица 4.43. Хаплотипът G-G-G-C (rs11603378- rs2239681- rs10770125- rs3842756) се среща по-често при пациенти с метастази в сравнение с контролите. Хаплотъпът G-G-C, в който не присъства rs2239681 също показва статистическа значима асоциация с риска за развитие на метастази.

Таблица 4.43. Статистически анализ на хаплотипите на полиморфизмите: 1) rs11603378; 2) rs2239681; 3) rs10770125; 4) rs3842756; 5) rs2070762; 6) rs11564710; 7) rs7127900; 8) rs55930300 **за асоциация с риска за развитие на метастази при РП**

Хаплотип								Честота	Пациенти, Контроли съотношения	χ 2	p
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**				
G	G	G	C					0.011	0.036, 0.006	4.163	**0.0413**
G		G	C					0.010	0.038, 0.006	4.905	**0.0268**
G		G						0.011	0.039, 0.006	4.822	**0.0281**
G	G	G	C	G	C	G	G	0.011	0.036, 0.007	3.838	0.0501

4.1.5. Резулати от генетичен анализ на полиморфизъм rs902774 разположен в хромозомен локус 12q13.13

Полиморфизмът rs902774 се намира в локус 12q13.13, на 12-та хромозома, където има обширен CpG остров.

Таблица 4.44. Статистически анализ за асоциация на rs902774 с РП .

Генотип/ алел	Пациенти (n=183)	Контроли (n=164)	OR (95 CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	138 (75.4%)	126 (76.83%)	0.92 (0.56-1.52)	0.80
G/A	38 (20.77%)	33 (20.12%)	1.04 (0.62-1.75)	0.89
A/A	7 (3.83%)	5 (3.05%)	1.26 (0.39-4.07)	0.77
G	314 (85.79%)	285 (86.89%)	0.91 (0.59-1.4)	0.58
A	52 (14.21%)	41 (13.11%)	1.1 (0.71-1.7)	0.58



Фигура 4.39

При разглеждане на получените алелни и генотипни честоти не се установява статистически значима разлика между разпределението им в групата на пациентите и в тази на контролите (Таблица 4.44, Фигура 4.39).

Полиморфизмът е тестван за отклонение от закона на Харди-Вайнберг и такова не е намерено.

4.1.6. Резултати от генетичен анализ на полиморфизми разположени в хромозомен регион 19q13.33

В хромозомен локус 19q13 бяха изследвани полиморфизмите **rs266849** и **rs2659056** разположени в близост до каликреин кодиращите гени.

При сравняване на генотипните и алелните честоти в групата на пациенти и контролната извадка и при двата изследвани полиморфизма не беше установена статистическа значима разлика (Таблици 4.45 и 4.46, Фигури 4.40 и 4.41).

Получените резултати не се отклоняват от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.45. Статистически анализ за асоциация на rs266849 с РП

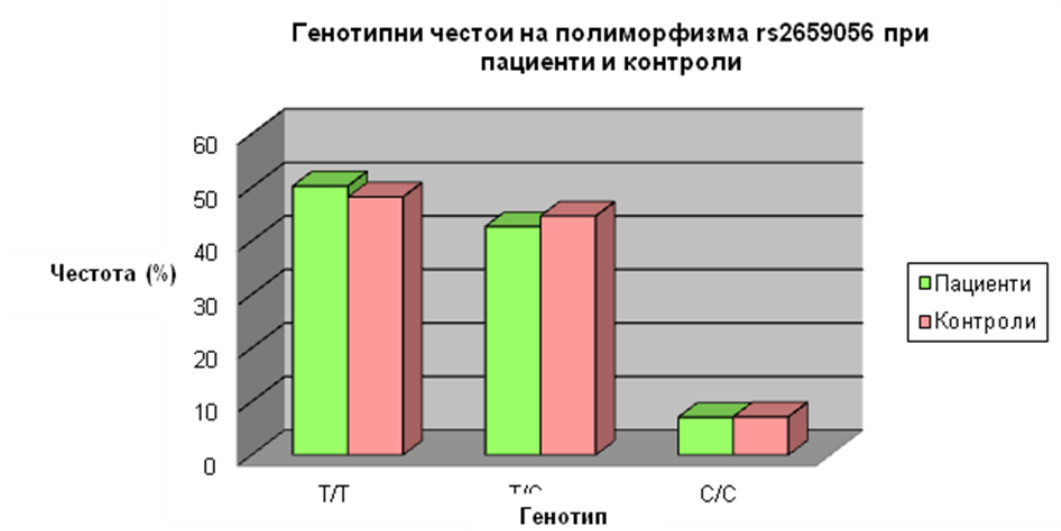
Генотип/ алел	Пациенти (n=184)	Контроли (n=160)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	6 (3.26%)	4 (2.5%)	1.31 (0.36-4.74)	0.76
G/A	64 (34.78%)	51 (31.88%)	1.14 (0.73-1.79)	0.65
A/A	114 (61.96%)	105 (65.63%)	0.85 (0.55-1.33)	0.50
G	76 (20.65%)	59 (18.44%)	1.15 (0.79-1.68)	0.50
A	292 (79.35%)	261 (81.56%)	0.87 (0.59-1.27)	0.50



Фигура 4.40

Таблица 4.46. Статистически анализ за асоциация на rs2659056 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=185)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
T/T	93 (50.27%)	81 (48.21%)	1.09 (0.71-1.65)	0.75
T/C	79 (42.70%)	75 (44.64%)	0.92 (0.61-1.41)	0.75
C/C	13 (7.03%)	12 (7.14%)	0.98 (0.44-2.22)	1
T	265 (71.62%)	237 (70.54%)	1.05 (0.76-1.46)	0.80
C	105 (28.38%)	99 (29.46%)	0.95 (0.68-1.31)	0.80



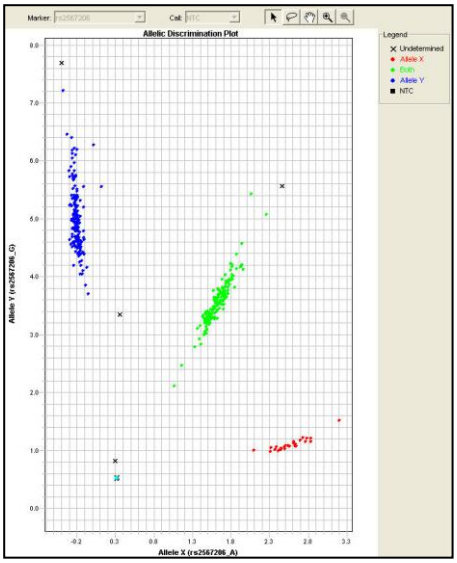
Фигура 4.41

Проведен беше и хаплотипен анализ за асоциация на изследваните в 19q13 полиморфни варианти с риска за развитие на РП, с клиникопатологичните характеристики като висок Gleason score и метастази, но не се получиха статистически значими резултати.

4.2. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВЕН АНАЛИЗ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ РАЗПОЛОЖЕНИ В ГЕНИТЕ *CYP1B1*, *AR* И *AMACR*

4.2.1. Резултати от генетичен анализ за асоциация с РП на полиморфизъм rs2567206 разположен на хромозомен локус 2p21 в гена *CYP1B1*

Полиморфизмът **rs2567206** се намира в промотора на гена *CYP1B1*. Генотипирането на изследваната извадка от пациенти с РП и контроли се извърши чрез PCR в реално време, Taq Man метода.



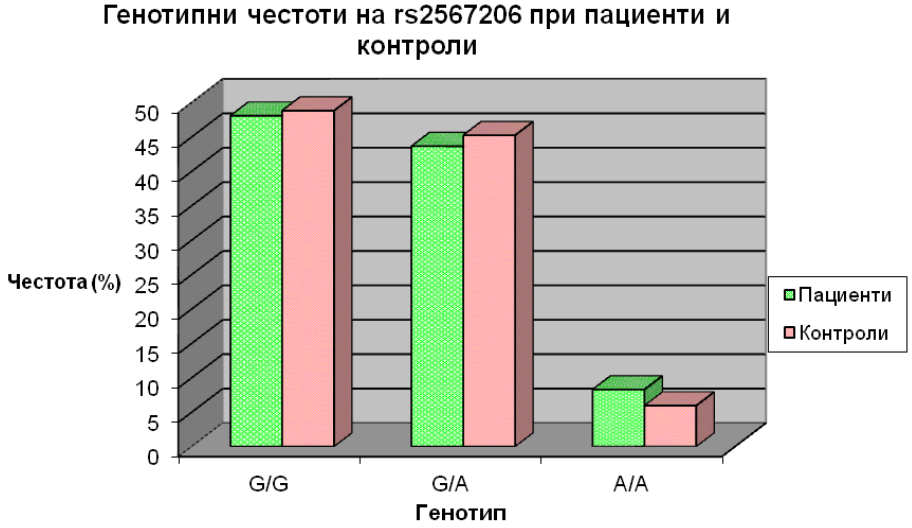
Фигура.4.42. Резултати от провеждането на PCR в реално време чрез TaqMan технологията. Разпределение на генотипните варианти за полиморфизъм rs2567206.

При анализа на получените резултати не се откриха статистически значими разлики в генотипните и алелните честоти при пациентите и контролите (Таблица 4.47, Фигура 4.43). Полиморфизмът не показа корелация с риска за развитие на агресивно заболяване.

Резултатите не показаха отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.47. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs2567206 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=181)	Контроли (n=168)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
G/G	87 (48.07%)	82 (48.81%)	0.97 (0.64-1.48)	0.91
G/A	79 (43.65%)	76 (45.24%)	0.94 (0.61-1.43)	0.83
A/A	15 (8.29%)	10 (5.95%)	1.43 (0.62-3.27)	0.42
G	253 (69.89%)	240 (71.43%)	0.93 (0.67-1.29)	0.68
A	109 (30.11%)	96 (29.57%)	1.08 (0.78-1.49)	0.68



Фигура 4.43.

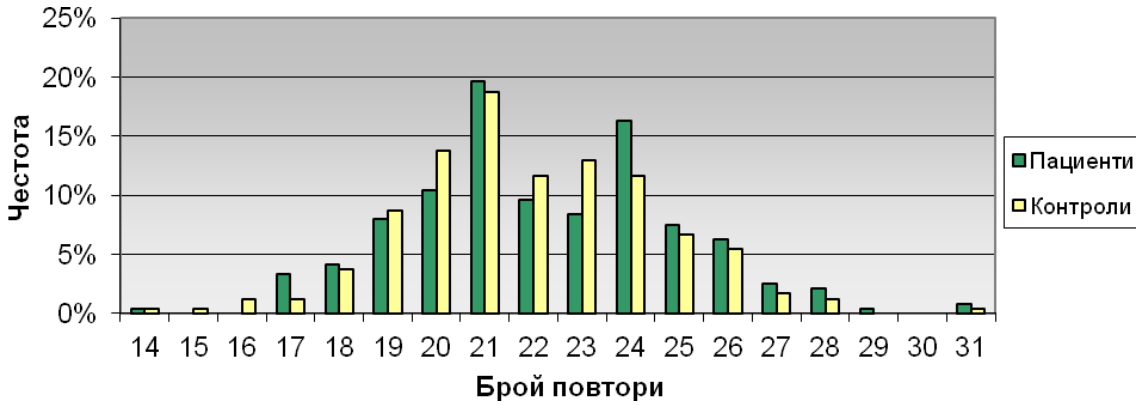
4.2.2. Резултати от генетичен анализ за асоциация с РП на тринуклеотидния повторен полиморфизъм (CAG)n в *AR*

Микросателитът (CAG)n в екзон 1 на *AR* с открити 17 алела при пациентите и контролите не показа асоциация с РП. Дължината на повторите варира между 14-29 и 31 като се наблюдава пик при алел 21 и още един при алел 24. Не открихме алел 30 сред пациентите и контролите. Разлика в честотата на късите алели (14-19 CAG повтори) между пациентите и контролите не бе открита. Не бе намерена и корелация на изследвания микросателит с агресивен РП.

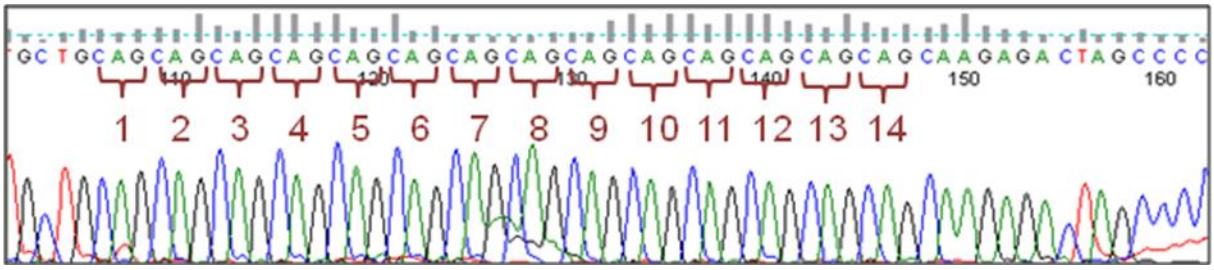
Резултатите от фрагментния анализ бяха потвърдени за някои пациенти чрез директно секвениране. Бяха секвенирани 40 проби, от които 4 с ДПХ и 36 с РП. Представени са електрофореграмите на няколко пациента с различен брой повтори.

Таблица 4.48. Алелни честоти на (CAG)n полиморфизма при пациентите с РП и контролите

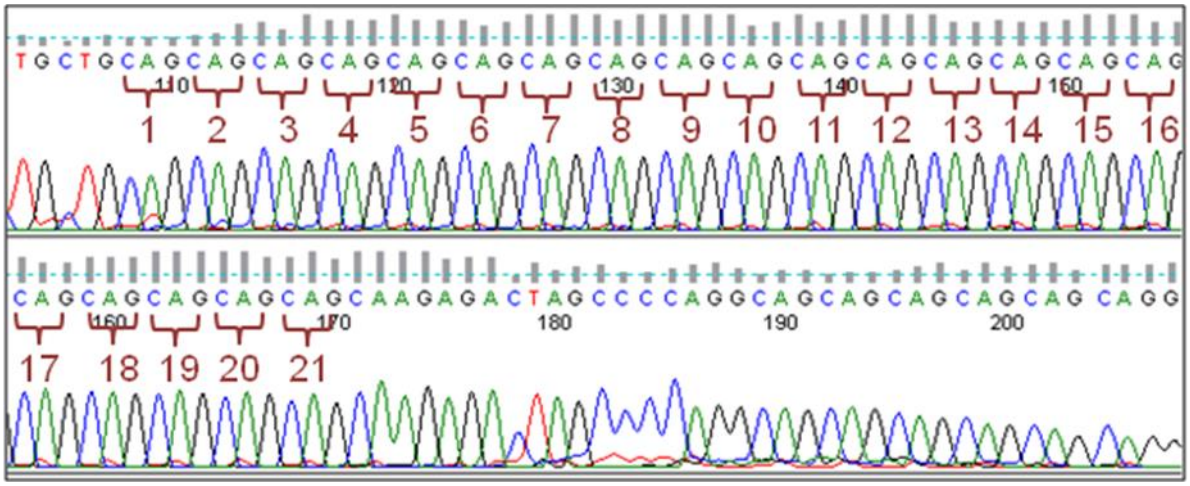
Алел (брой повтори)	Пациенти, честота в %	Контроли, честота в %
14	0.42	0.42
15	0	0.42
16	0	1.25
17	3.35	1.25
18	4.18	3.75
19	7.95	8.75
20	10.46	13.75
21	19.66	18.75
22	9.62	11.67
23	8.37	12.92
24	16.32	11.67
25	7.53	6.67
26	6.28	5.42
27	2.51	1.67
28	2.09	1.25
29	0.42	0
30	0	0
31	0.84	0.42



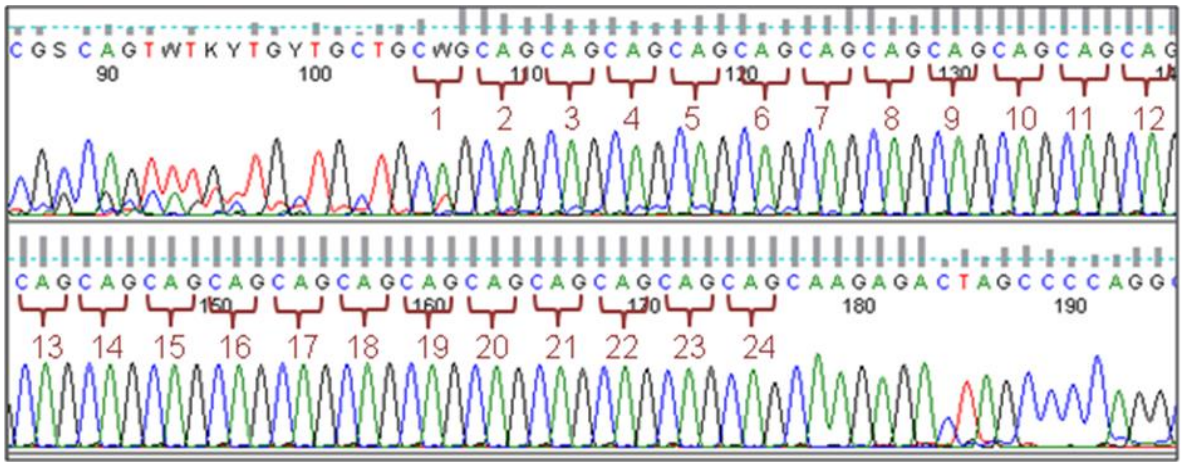
Фигура 4.44. (CAG)n полиморфизъм в *AR* при пациенти и контроли.



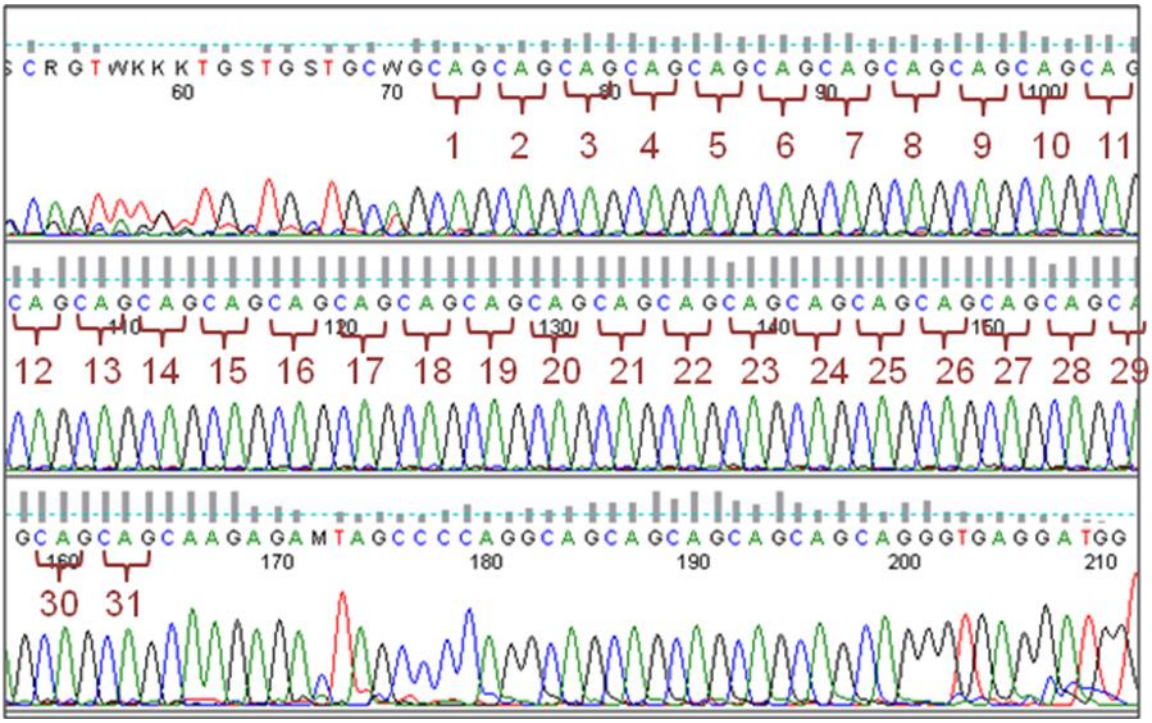
Фигура 4.45. Електрофореграма на пациент с 14 CAG повтора в екзон 1 на *AR*



Фигура 4.46. Електрофореграма на пациент с 21 CAG повтора в екзон 1 на *AR*



Фигура 4.47. Електрофореграма на пациент с 24 CAG повтора в екзон 1 на *AR*



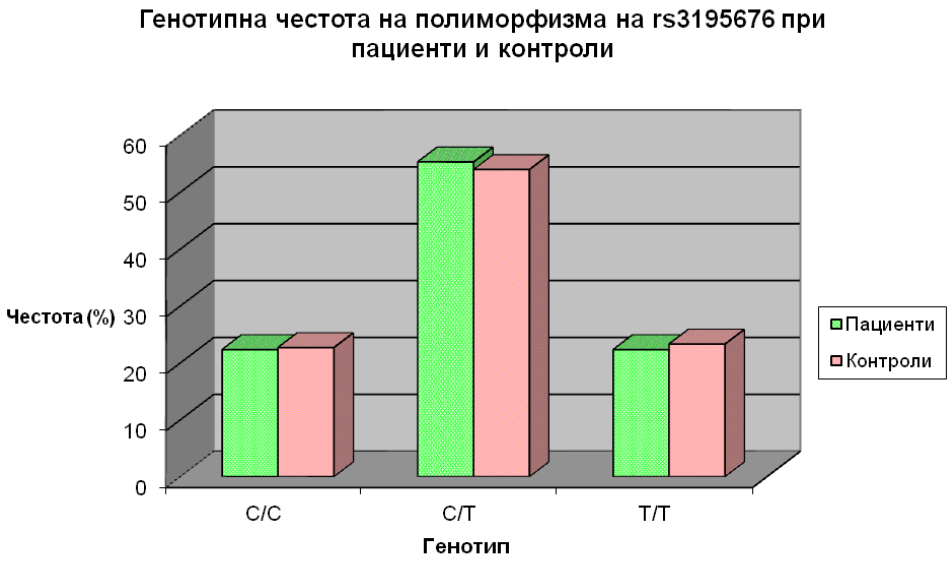
Фигура 4.48. Електрофореграма на пациент с 31 CAG повтора в екзон 1 на *AR*

4.2.3. Резултати от генетичен анализ за асоциация на полиморфизъм rs3195676 разположен на хромозомен локус 5p13.2 е гена *AMACR*

При сравнението на генотипните и алелните честоти на полиморфизма **rs3195676** на всички пациенти спрямо контролите не се получиха статистически значими резултати (Таблица 4.49, Фигура 4.49). Резултатите не показаха отклонение закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.49. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3195676 с РП

Генотип/ алел	Пациенти (n=188)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	42 (22.34%)	37 (22.7%)	0.98 (0.59-1.62)	1
C/T	104 (55.32%)	88 (53.99%)	1.06 (0.69-1.61)	0.83
T/T	42 (22.34%)	38 (23.31%)	0.95 (0.57-1.56)	0.9
C	188 (50%)	162 (49.7%)	1.01 (0.75-1.36)	0.94
T	188 (50%)	164 (50.3%)	0.99 (0.73-1.33)	0.94



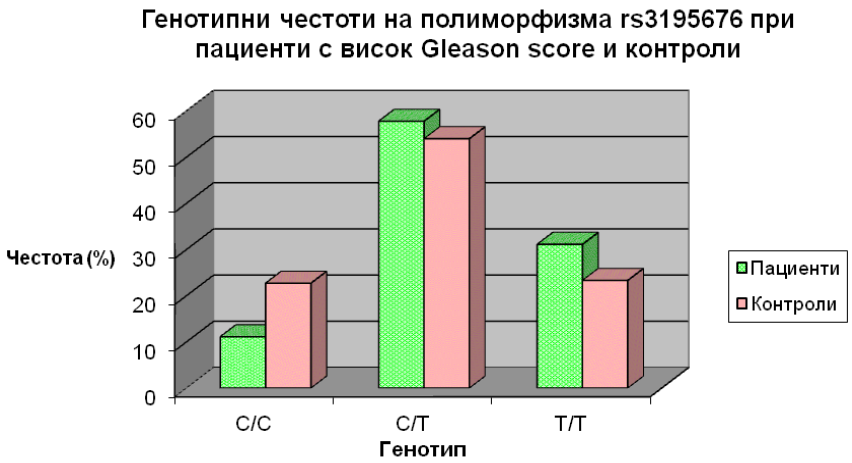
Фигура 4.49.

Полиморфизмът **rs3195676** беше проверен дали е асоцииран с риска за развитие на простатни тумори с висок Gleason score (Таблица 4.50, Фигура 4.50), с развитие на метастази (Таблица 4.51, Фигура 4.51), а така също и с двата фактора едновременно (Gleason score над 7 и наличие на метастази) (Таблица 4.52, Фигура 4.52). Алелът T се среща по-често при пациентите с висок Gleason score или с метастази, а така също при пациентите с висок Gleason score и метастази едновременно, но резултатите не достигат статистическа значимост. Най-високо OR за алел T се наблюдава при пациентите с висок Gleason score и метастази. Носителите на този алел имат 2 пъти повишен риск за развитие на агресивен РП с метастази. Алелът C и в трите групи пациенти вероятно е протективен. Генотипът C/C се среща само в 5% от пациентите с Gleason score над 7 и с метастази и в 22.7% от контролите. Този резултат също е близко до статистическа значимост (p=0.08) и има много нисък относителен риск (OR-0.18). Генотипът T/T се среща по-често и при трите групи пациенти в сравнение с контролите, но отново не се достига статистическа значимост.

Резултатите получени и при проведените анализа за асоциация не показаха статистически значимо отклонение от закона на Харди-Вайнберг.

Таблица 4.50. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3195676 с развитие на РП с висок Gleason score

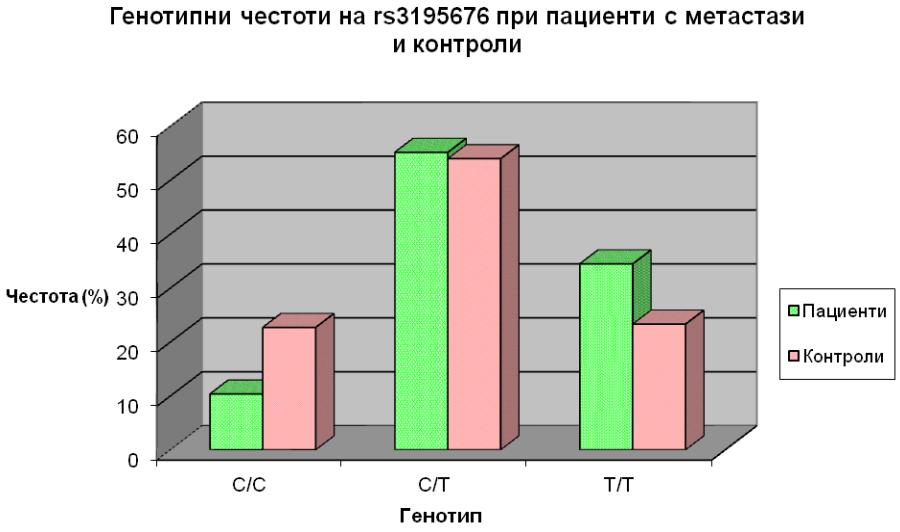
Генотип/ алел	Пациенти (n=45)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	5 (11.11%)	37 (22.7%)	0.43 (0.16-1.16)	0.97
C/T	26 (57.78%)	88 (53.99%)	1.17 (0.6-2.27)	0.74
T/T	14 (31.11%)	38 (23.31%)	1.49 (0.72-3.08)	0.33
C	36 (40%)	162 (49.7%)	0.67 (0.42-1.08)	0.12
T	54 (60%)	164 (50.3%)	1.48 (0.92-2.38)	0.12



Фигура 4.50.

таблица 4.51. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3195676 с развитие на РП с метастази

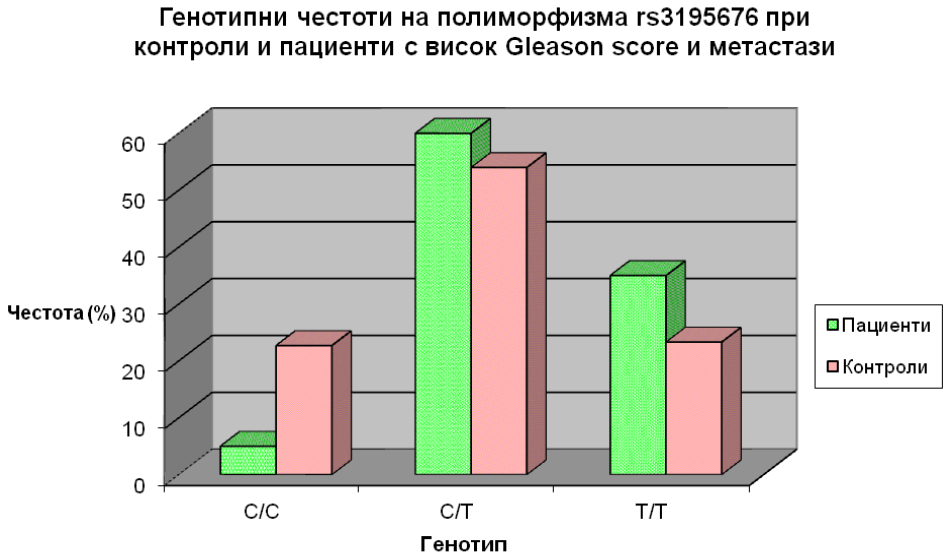
Генотип/ алел	Пациенти (n=29)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	3 (10.34%)	37 (22.7%)	0.39 (0.11-1.37)	0.15
C/T	16 (55.17%)	88 (53.99%)	1.05 (0.47-2.32)	0.54
T/T	10 (34.48%)	38 (23.31%)	1.73 (0.74-4)	0.24
C	22 (37.93%)	162 (49.7%)	0.62 (0.35-1.1)	0.12
T	36 (62.07%)	164 (50.3%)	1.62 (0.91-2.87)	0.12



Фигура 4.51.

Таблица 4.52. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3195676 с развитие на РП с висок Gleason score и метастази

Генотип/ алел	Пациенти (n=20)	Контроли (n=163)	OR (95% CI)	P Fisher, two-tailed
C/C	1 (5%)	37 (22.7%)	0.18 (0.02-1.38)	0.08
C/T	12 (60%)	88 (53.99%)	1.28 (0.5-3.29)	0.64
T/T	7 (35%)	38 (23.31%)	1.77 (0.66-4.76)	0.27
C	14 (35%)	162 (49.7%)	0.55 (0.27-1.08)	0.09
T	26 (65%)	164 (50.3%)	1.83 (0.92-3.64)	0.09



Фигура 4.52.

4.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ АНАЛИЗА НА ПРОМОТОРНО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ *GSTP1*, *HIST1HK* И *RASSF2* В *УРИНА*

Определянето на диагностичната точност на изследваните биомаркери бе осъществено с помощта на анализа на ROC кривите описан детайлно в раздел 3. Материали и Методи. Диагностичната точност на всеки от изследваните биомаркери бе сравнявана с тази получена за серумните стойности на PSA в съответната анализирана група от пациенти и контроли с ДПХ. За статистически значими резултати от всички проведени анализи се считаха стойности на two tailed p под 0.05

4.3.1. Резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина на пациенти с рак на простатата и контроли с помощта на MS-HRMA

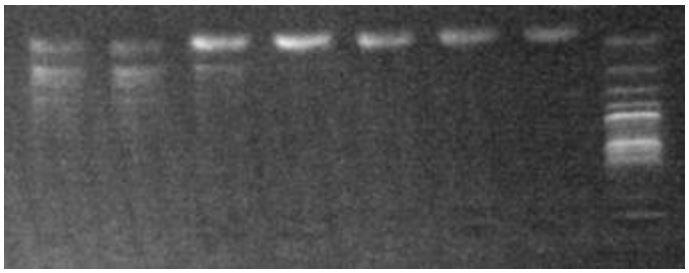
4.3.1.1. Оптимизиране на условията на амплификация на праймерите за MS-HRM анализ и праймерите за секвениране

За оптимизиране на температурата на анилинг на праймерните двойки осъществихме градиентни PCR-и. Праймерните двойки, които използвахме за анализ на промоторното хиперметилиране на *GSTP1*, техните установените експериментално оптимални температури на хибридизация (анилинг) са представени в Таблица 4.53.

Таблица 4.53. Нуклеотидна последователност на праймерите използвани за анализ на промоторното хиперметилиране на *GSTP1*, температурата на анилинг, размер на PCR продуктите и метод за детекция.

Нуклеотидна последователност на праймерите 5'-3'	Метод	Размер на амплифицирания PCR продукт (в bp)	Температура на анилинг
F- GAGAAGTACGAGATGTGGGGAT R- TACACTCCTAACCCCTCCCC	HRM анализ	68	57^{o}C
F- GAAAGAGGGAAAGGTTTTTT R- CCATACTAAAAACTCTAAACCCCATC	Директно секвениране	303	56^{o}C

На фигура 4.53. е представен един градиентен PCR тестван на 2% агарозен гел.



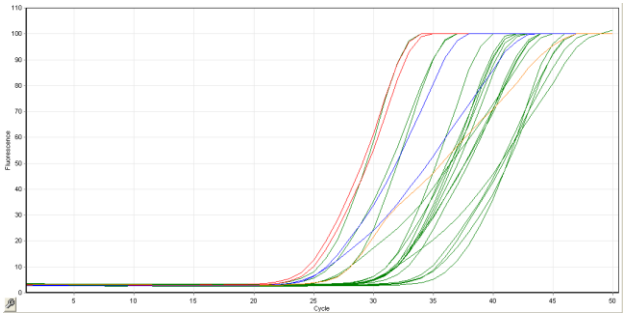
50 51 54 56 58.6 60.8 62.4 L100bp

Фигура 4.53. Градиентен PCR с праймерните двойки за HRM анализ. *От фигурата се вижда, че при по-ниските температури на анилинг (50; 51 и 54^{o}C) освен желания продукт има и неспецифики, а с увеличаване на температурата неспецификите изчезват и се засилва амплификацията на желания продукт. L100 bp е молекулен маркер*

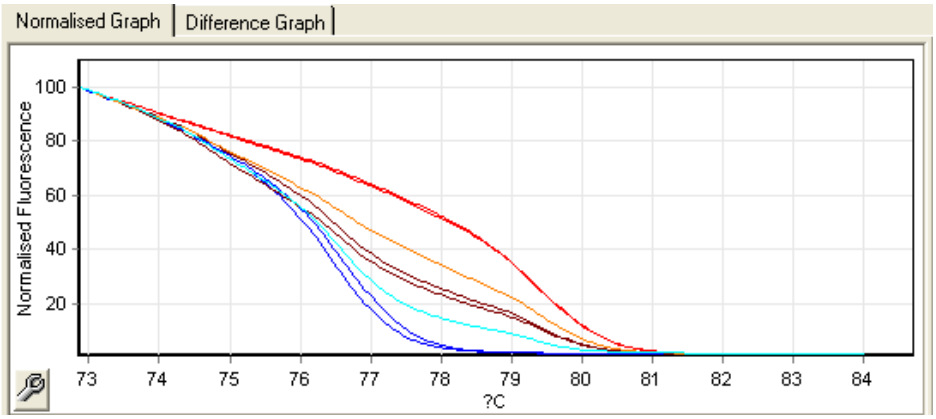
Условията за амплификация и PCR реакционните миксове използвани за анализ на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* са представени раздел 3. Материали и Методи

4.3.1.2. Оптимизиране на условията за протичане на MS-HRM анализа

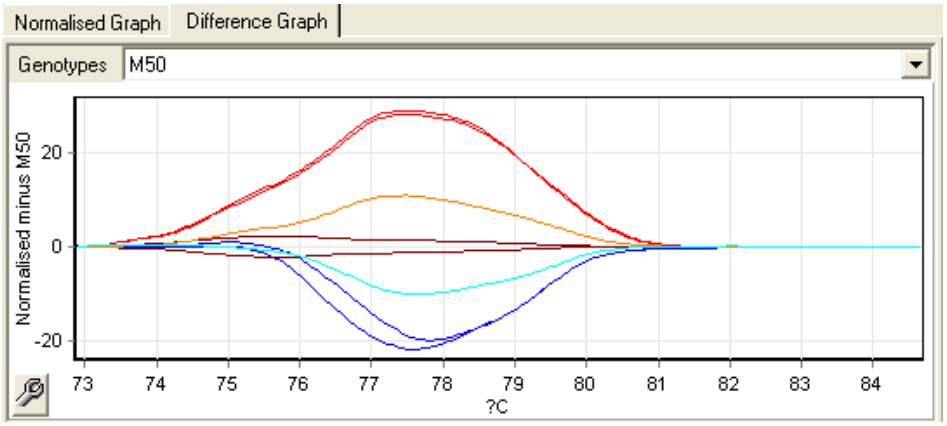
След като оптимизирахме условията за амплификация, оптимизирахме и условията за протичане на HRM анализа, така че да се получат ясно разграничими профили на топене при 100%, 75%, 50%, 25% и 0% метилиране.



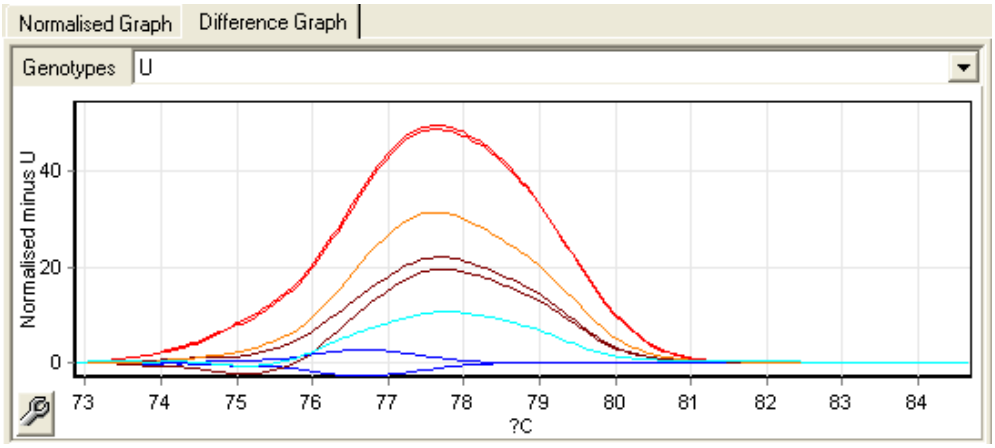
Фигура 4.54. Амплификация на таргетния участък, съдържащ CpG островите в GSTP1



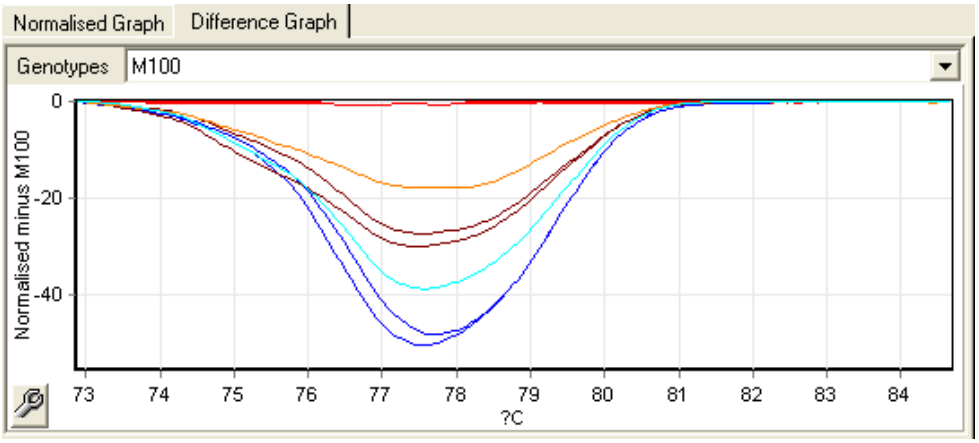
Фигура 4.55. Нормализирана графика на топенето с висока резолюция. *В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране*



Фигура 4.56. Диференциална графика на топенето спрямо профила на 50% метилирани проби. *В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране*

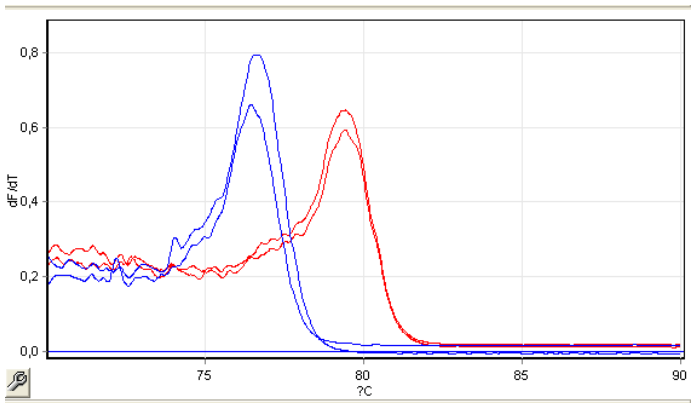


Фигура 4.57. Диференциална графика на топенето спрямо профила на 0% метилирани проби (100% неметилирана проба). *В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране*

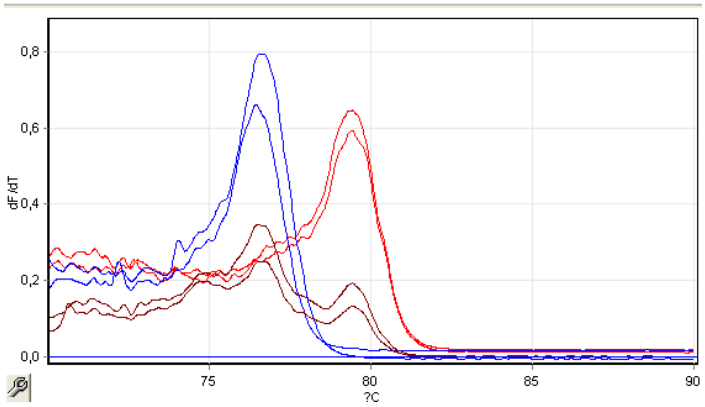


Фигура 4.58. Диференциална графика на топенето спрямо профила на 100% метилирани проби. *В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране*

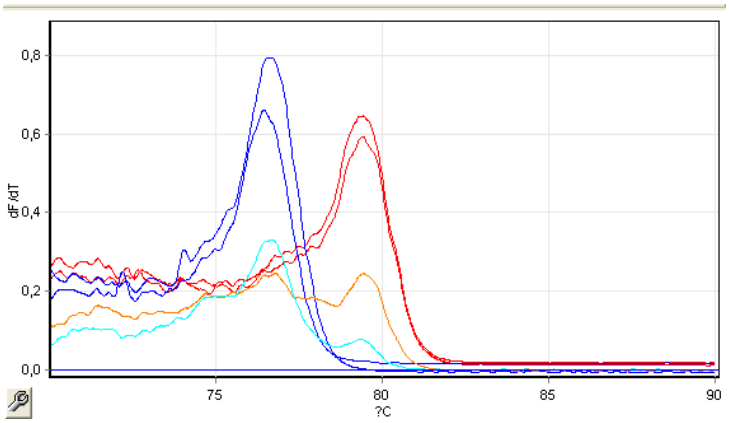
При обикновения анализ на топене на ампликоните (не с висока резолюция) също се получиха ясно разграничими профили показани на следните фигури. 3,4,5,6



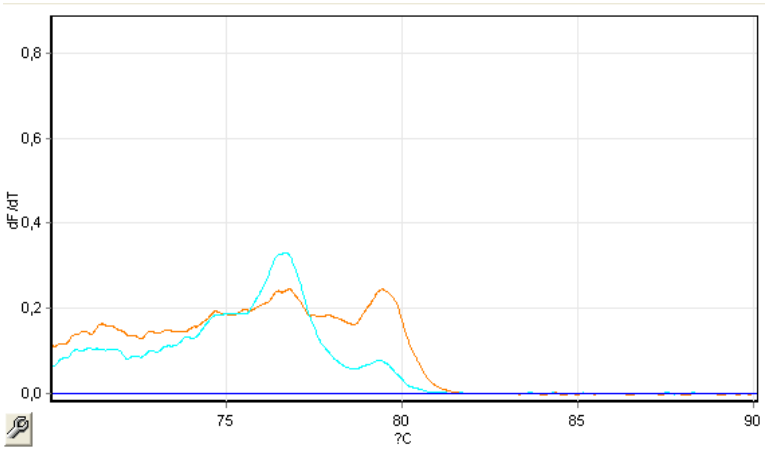
Фигура 4.59. Графика на топенето на 100% метилирани проби (в червено) и 100% неметилирани проби (в синьо)



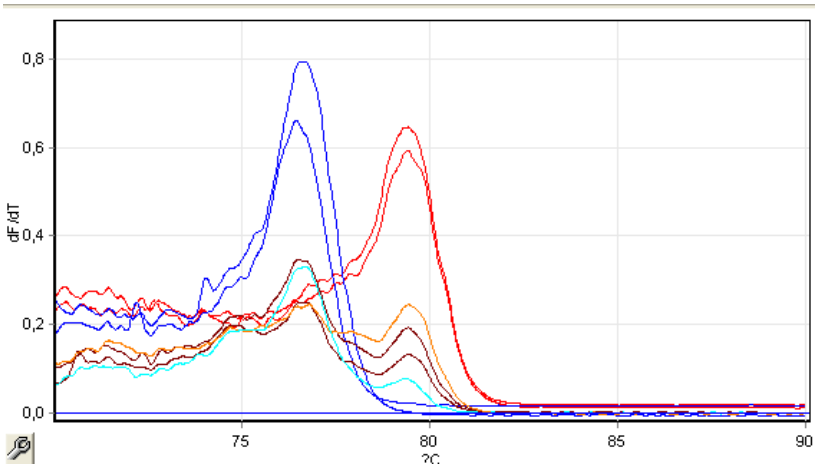
Фигура 4.60. Графика на топенето на 100% метилирани проби (в червено) и 100% неметилирани проби (в синьо) и 50% метилирани проби (в кафяво)



Фигура 4.61. Графика на топенето на 100% метилирани проби (в червено) и 100% неметилирани проби (в синьо), 75% метилирани проби (в оранжево) и 25% метилирани проби (в синьо-зелено)



Фигура 4.62. Графика на топенето на 75% метилирани проби (в оранжево) и 25% метилирани проби (в синьо-зелено)



Фигура 4.63. Графика на топенето на проби с различен процент метилиране. В червено- 100% метилирани проби; в оранжево- 75% метилирани проби; в кафяво- 50% метилиране; синьо-зелено- 25% метилиране и синьо- 0% метилиране

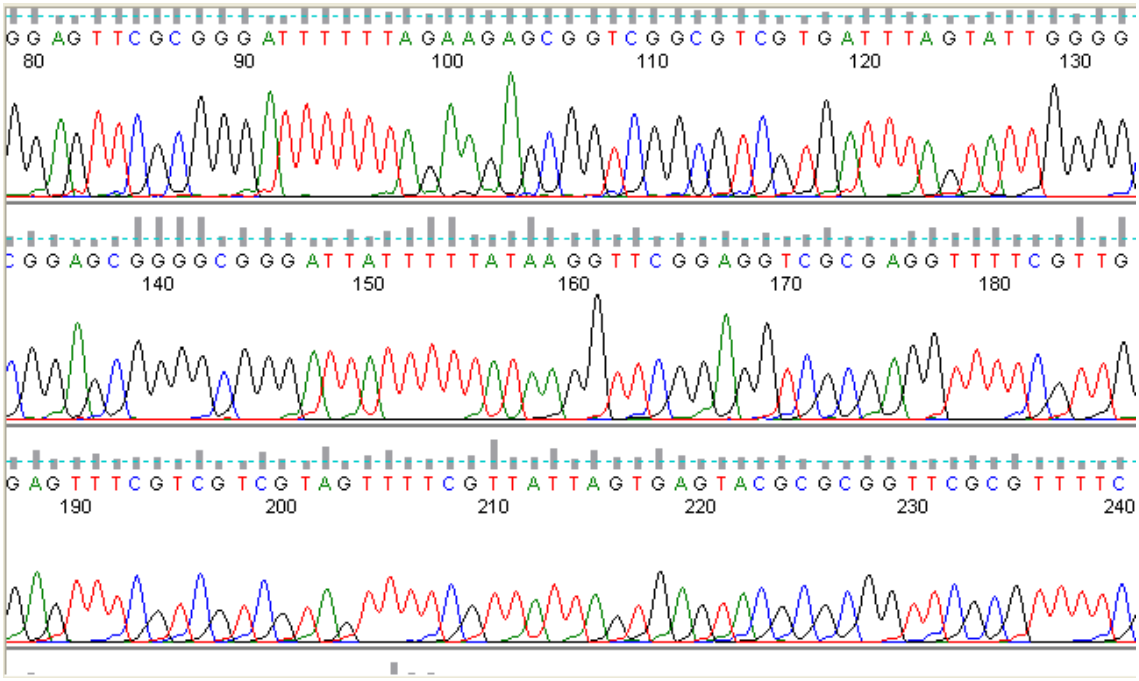
4.3.1.3. Валидиране на метода чрез директно секвениране

Произволни проби бяха подбрани и секвенирани за потвърждаване на валидността на метода. За съжаление голяма част от тях не успяхме да амплифицираме, вероятно поради наличие на инхибитори, недостатъчно доброто качество и ниската концентрация на изолираната ДНК.

По-долу е показана нуклеотидната последователност на PCR продукта, който се получава при използването на праймерите за секвениране и бисулфитно превърната ДНК с метилирани CG динуклеотиди. В сиво и подчертани са показани праймерите.

TGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTCGGTTAGTTGCGCGGCGATTTCGGGGATTTTAGGGCG
TTTTTTTGCGGTCGACGTTCGGGGTGTAGCGGTCGTCGGGGTTGGGGTCGGCGGGAGTTT
GCGGGATTTTTCAGAAGAGCGGTCGGCGTCGTGATTTAGTATTGGGGCGGAGCGGGGCGG
GATTATTTTTATAAGGTTCGGAGGTCGCGAGGTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTCGCAGTT
TTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTCGCGTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAGTTTTTAGT
ATGG

На фигура 4.64. е показана електрофореграма на проба, която е 100% метилирана.



Фигура 4.64. Електрофореграма на амплифициран участък от GSTP1, съдържащ CpG острови на проба, която е бисулфитно превърната и 100% метилирана.

4.3.1.4. Резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1*

В анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* бяха включени 64 пациента с РП, 26 контроли с ДПХ и 20 млади асимптоматични мъже.

Резултатите получени за промоторното хиперметилиране на пациенти и контроли с ДПХ и млади асимптоматични мъже са представени в Таблица 4.54. Пробите с метилиране ≥50% отчитахме за метилирани, а останалите за неметилирани. Статистически значими разлики в статуса на метилиране на *GSTP1* получихме при сравнението на пациентите с РП и младите асимптоматични мъже (Fisher Exact test p=0.000016, two tailed). Когато сравнихме контролите с ДПХ и пациентите с РП не получихме статистически значими резултати (Fisher Exact test p=0.8 two tailed, OR=1.25 (95%CI-0.48-3.31)). Независимият T тест анализ също показа, че няма статистически значима разлика между сравняваните групи (пациенти и контроли) (p=0.652 two tailed).

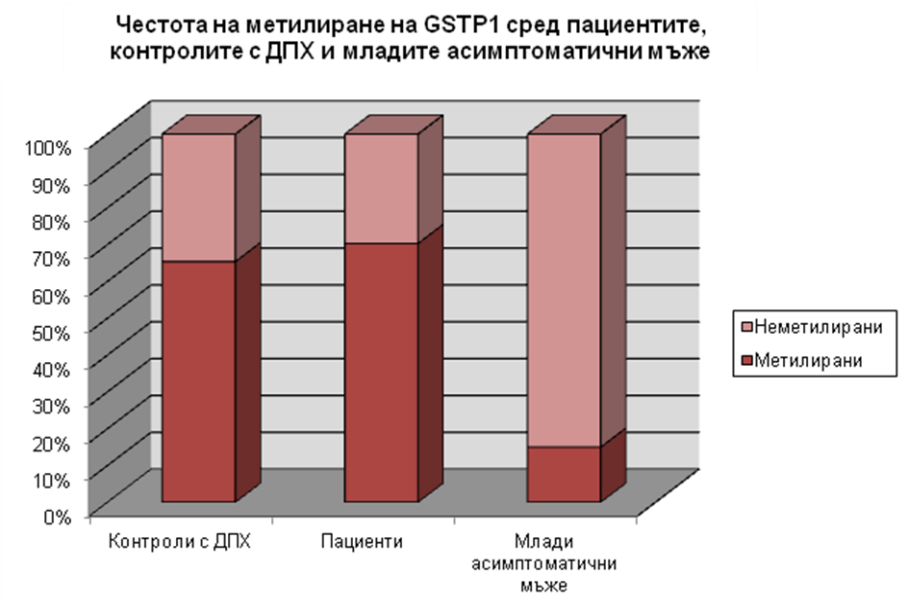
Промоторно хиперметилиране на GSTP1 показаха 70.31% (45) от пациентите с РП като от тях 5 (11.11%) показват 50% метилиране, а останалите ≥75% метилиране (Таблица 4.54, Фигура 4.65).

В нашето проучване откриваме висок процент (65.38%) метилиране и сред контролите с ДПХ (23.53% с 50% метилиране и 76.47% със 75% и 100% метилиране).

Промоторно хиперметилиране бе открито и в урината на трима млади асимптоматични мъже.

Таблица 4.54. Резултати за промоторното хиперметилиране на *GSTP1*.

Пациенти/Контроли (брой)	**Метилирани** (брой, %)	**Неметилирани** (брой, %)
МАМ (n=20)	3 (15%)	17 (85%)
Контроли с ДПХ (n=26)	17 (65.38%)	9 (34.62%)
Серумни PSA нива под 10	9 от 17 (52.94%)	7 от 9 (77.77%)
Серумни PSA нива над 10	6 от 17 (35.29%)	1 от 9 (11.11%)
Неизвестни PSA нива	1 от 17 (5.88%)	2 от 9 (22.22%)
Пациенти с РП (n=64)	45 (70.31%)	19 (29.69%)
T1	6 от 45 (13.33%)	3 от 19 (15.79%)
T2	24 от 45 (53.33%)	8 от 19 (42.1%)
T3	13 от 45 (28.89%)	5 от 19 (26.32%)
T3	0 от 45 (0%)	1 от 19 (5.26%)
Неизвестни	2 от 45 (4.44%)	2 от 19 (10.53%)
Gleason score 4-7	31 от 45 (68.89%)	12 от 19 (63.16%)
Gleason score 8-10	14 от 45 (31.11%)	7 от 19 (36.84%)
Серумни PSA нива под 10	17 от 45 (37.78%)	3 от 19 (15.79%)
Серумни PSA нива над 10	26 от 45 (57.78%)	14 от 19 (73.68%)
Неизвестни PSA нива	2 от 45 (4.44%)	2 от 19 (10.53%)

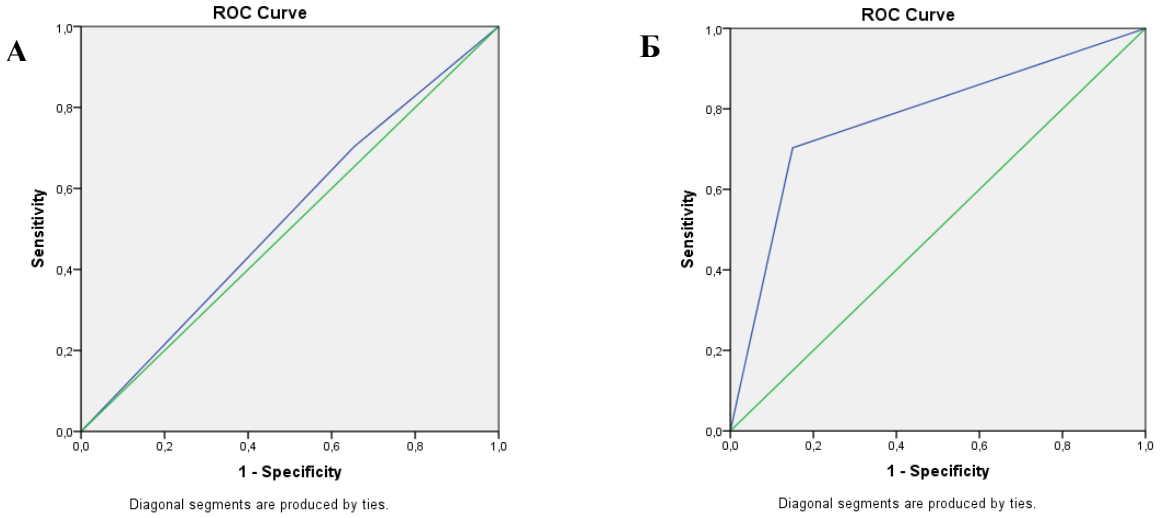


Фигура 4.65.

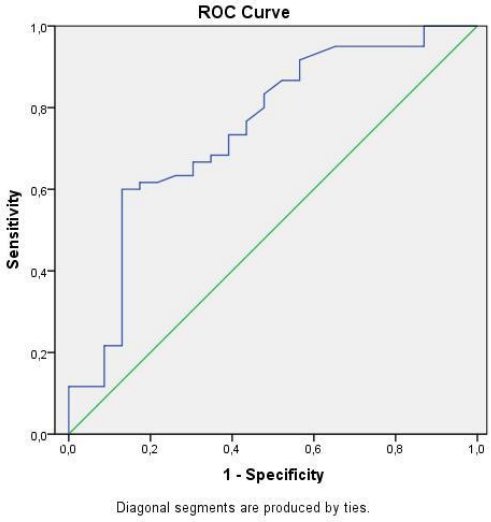
За определяне надежността, чувствителността и специфичността на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина (изследвано чрез MS-HRMA) като неинвазивен диагностичен маркер ние проведохме анализ на ROC кривте. Контролите с ДПХ показват висок процент метилиране (65.38%) и по тази причина специфичността на теста за наличие

на промоторно хиперметилиране определено в урина чрез HRM анализ е ниска- 0.35 (35%). Тъй като откриваме висок процент метилиране и сред пациентите (70.31%) чувствителността на метода е сравнително висока- 0.7 (70%).

Когато в анализа на ROC кривите включихме пациентите и контролите с ДПХ, то не получихме статистически значими резултати и площта на кривата (AUC) бе 0.525. Серумните нива на PSA в изследваната група от пациенти и контроли с по-голяма точност разграничават двете групи в сравнение с ДНК метилирането на *GSTP1* в урина, с AUC 0.745 (p=0.001) и чувствителност 73.3%, и специфичност 60.9% при гранична стойност от 9 ng/ml.



Фигура 4.66. Receiver operative curve (ROC) анализ за определяне на чувствителността и специфичността на ДНК метилирането на *GSTP1* биомаркера в урина. ***А)*** *При сравнение на пациенти с РП и контроли с ДПХ;* ***Б)*** *При сравнение на пациенти с РП МАМ. Зелената линия- диагонална референтна линия; синята линия- GSTP1*



Фигура 4.67. Receiver operative curve (ROC) анализ за определяне на чувствителността и специфичността на серумните нива на PSA за разграничаване на пациентите и контролите

Статистически значима разлика в метилирането има между пациентите и младите асимптоматични мъже и по тази причина, когато включихме в анализа на ROC кривите тези

две групи, то получихме голяма площ за AUC: 0.777 и резултатът бе статистически значим ($p<0.05$) със специфичност 85% (95% CI: 62.08 % - 96.62 %) и чувствителност 70.31% (95% CI: 57.58 % - 81.08 %).

За да проверим дали и в нашата изследвана група от пациенти и контроли ДНК метилирането на *GSTP1* е възрастово зависимо, ние проведохме корелационен анализ. За коефициента r на Pearson получихме стойността 0.225 и резултатът бе статистически значим ($p=0.018$, two tailed), което показва че в нашето проучване ДНК метилирането на GSTP1 корелира с възрастта.

4.3.2. Резултати от анализ на промоторното хиперметилиране на *RASSF2* и *HIST1H4K* в урина на пациенти с рак на простатата и контроли с помощта на MethyLight метода

За изследването на хиперметилирането на гените *HIST1H4K* и *RASSF2* ние използвахме количествен ДНК анализ на метилирането чрез MethyLight метода.

4.3.2.1. Получени резултати за промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K*

Резултатите получени за *HIST1H4K* са обобщени в Таблица 4.55.

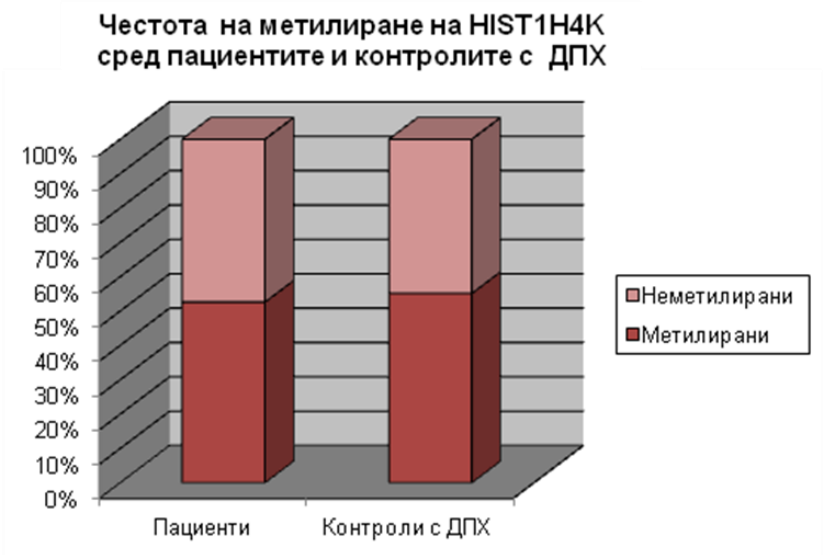
Таблица 4.55. Резултати за промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K*.

Пациенти/Контроли (брой)	**Метилирани** (брой, %)	**Неметилирани** (брой, %)
МАМ (n=43)	0 (0%)	43 (100%)
Контроли с ДПХ (n=29)	16 (55.17%)	13 (44.83%)
Серумни PSA нива под 10	8 от 15 (53.33%)	9 от 13 (69.23%)
Серумни PSA нива над 10	7 от 15 (46,67%)	4 от 13 (30.77%)
Пациенти с РП (n=57)	30 (52.63%)	27 (47.37%)
T1	12 от 29 (41.38%)	7 от 26 (26.92%)
T2	12 от 29 (41.38)	11 от 26 (42.31%)
T3	5 от 29 (17.24%)	8 от 26 (30.77%)
Gleason score 5-7	17 от 29 (58.62%)	19 от 26 (73.08%)
Gleason score 8-10	12 от 29 (41.38%)	7 от 26 (26.92%)
Серумни PSA нива под 10	5 от 26 (19.23%)	5 от 25 (20%)
Серумни PSA нива над 10	21 от 26 (80.77%)	20 от 25 (80%)

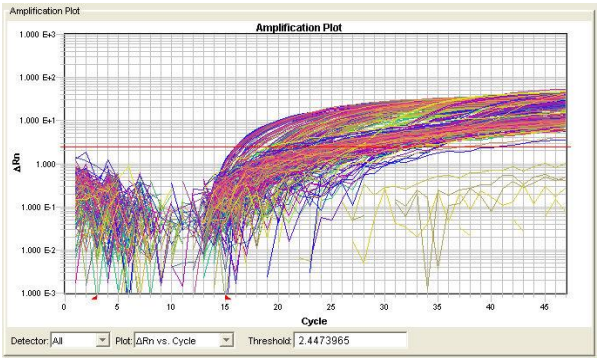
Нивото на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* не показа различия между пациентите с РП и контролите с ДПХ ($p=1$, two tailed, Fisher exact test). Метилиране бе наблюдавано в 52.63% от пациентите и 55.17% от контролите с ДПХ. Не отрихме метилиране в урината на младите асимптоматични мъже и при сравнение с пациентите с РП се получиха статистически значими резултати ($p=5.63x$ 10-11 two tailed, Fisher exact test). Дванадесет от пациентите с висок Gleason score показаха метилиране, а при 7 от тях не се открива такова. При пациентите с нисък Gleason score разпределението е почти по равно (17 метилирани и 19 неметилирани). Наблюдава се по-висок процент метилиране при

пациентите с висок Gleason score в сравнение с тези с нисък, но разликите не са статистически значими (p=0.2, OR=1.92 (95% CI-0.61-5.98)). Промоторното хиперметилиране не показа корелация с туморния стадий, нивата на PSA и Gleason score. Не бе възможно осъществяването на корелационен анализ за асоциация на метилирането с наличие на метастази тъй като само един пациент с метастази бе включен в изследването.

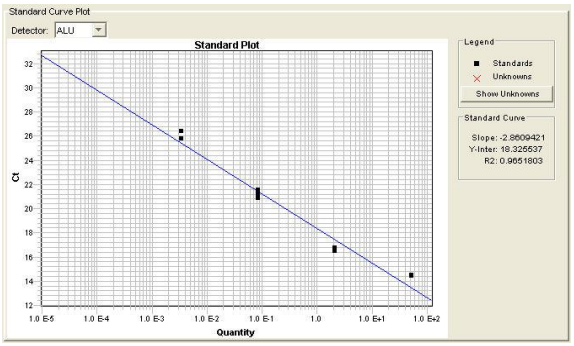
При сравнението на статуса на метилиране на *HIST1H4K* при пациенти с РП и младите асимптоматични мъже се получиха статистически значими резултати ($p=6.41x10^{-9}$).



Фигура 4.68.



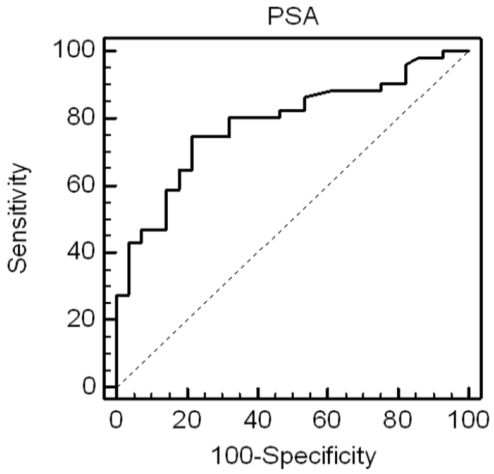
Фигура 4.69. Амплификационен плот получен след протичането на PCR в реално време за изследване промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K.*



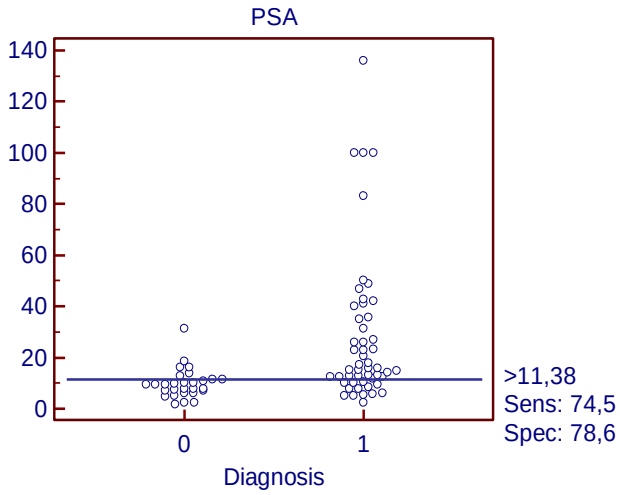
Фигура 4.70. Стандартна крива на ALU-C4 контролната реакция получена при MethyLight анализа на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K.*

Тъй като нивата на свободния тотален PSA широко се използват за предсказване на диагнозата при биопсия [412], то ние проверихме надежността на този маркер в изследваните пациенти и контроли. Установихме, че PSA (с граница 4 ng/ml) има чувствителност от 98.04% и ниска специфичност 14.29% за РП (AUC=0.785, 95%CI: 0.679-0.870, p<0.0001) при нашите пациенти (Фигура 4.71). Статистическият анализ показа, че критерият свързан с най-високия индекс на Youden (максималната потенциална

ефективност на биомаркер) е PSA стойността от 11.38 (чувствителност от 74.51% и специфичност от 78.57%) (Фигура 4.72).



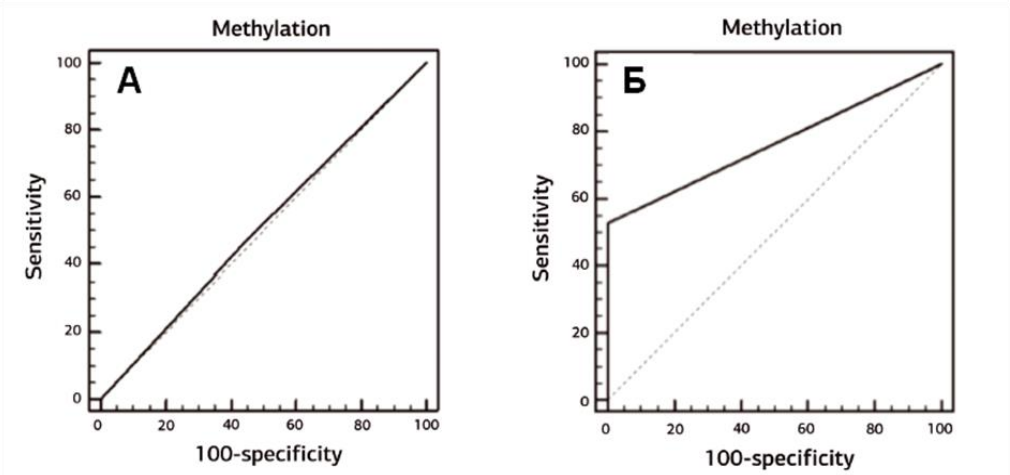
Фигура 4.71. Анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на серумните нива на PSA. Непрекъснатата линия- PSA, пунктираната линия- диагоналната референтна линия



Фигура 4.72. Интерактивна точкова диаграма на PSA стойностите, показваща точната гранична стойност- 11.38

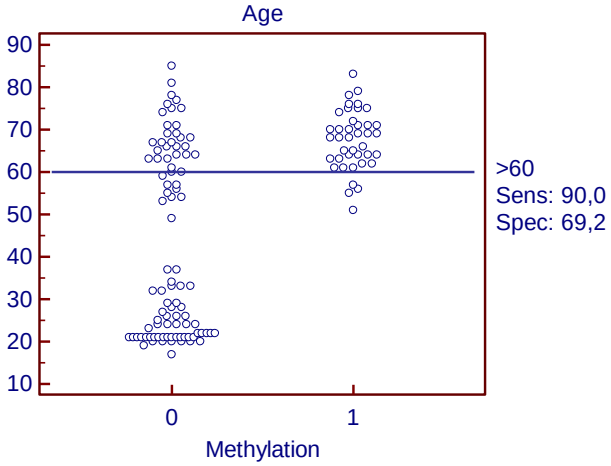
Проведохме анализ на ROC кривите, за да оценим чувствителността и специфичността на ДНК метилирането на *HIST1H4K* като биомаркер в урина като сравнихме пациентите с РП и контролите с ДПХ и МАМ.

Анализът на статуса на метилиране в ДНК от урина успешно диагностицира 30 от 57 изследвани пациенти с РП и чувствителността е 0.526 (52.6%). От 29 контроли с ДПХ, без наличие на РП, 13 показват метилиране на *HIST1H4K* промотора (специфичност 0.45). AUC е 0.513 (95% CI, 0.402-0.622), но резултатите не са статистически значими (p= 0.83). Когато обаче в анализа на ROC кривите се сравни метилирането при пациентите с РП и МАМ, се получават статистически значими резултати (AUC=0.763, 95% CI: 0.672-0.839, p<0.0001). Достигат се 100% специфичност и 52.63% чувствителност.



Фигура 4.73. Анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на ДНК метилирането на биомаркера HIST1H4K в урина: ***А)*** *При сравнение на пациенти и контроли с ДПХ****; Б)*** *При сравнение на пациенти и МАМ. Пунктирана линия- референтна диагонална линия; Непрекъсната линия- HIST1H4K*

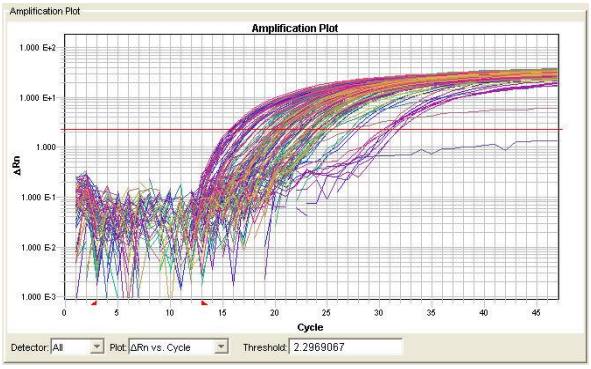
За да проверим дали промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* е зависимо от възрастта, осъществихме корелационен анализ, в който включихме всички изследвани групи- пациенти с РП, контроли с ДПХ, МАМ. Корелационният коефициент r на Pearson имаше стойност от 0.542 (95% CI, 0.408-0.653), което показва положителна статистическа значимост между възрастта и метилирането (p<0.0001).



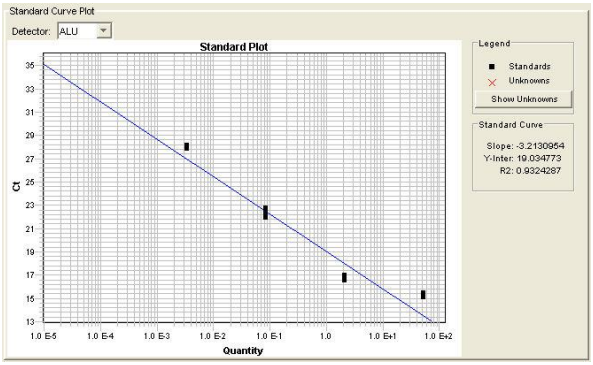
Фигура 4.74. Интерактивна точкова диаграма, показваща корелацията между метилирането и възрастта, и чувствителността и специфичността, когато граничната възраст е 60 години. С 0 са означени неметилираните проби, а с 1- метилираните.

4.3.2.2. Получени резултати от анализа на промоторното хиперметилиране на *RASSF2*

В нашето изследване не се наблюдава промоторно хиперметилиране на *RASSF2* нито в пациентите с простатен аденокарцином, нито в двете групи контроли (контролите с ДПХ и младите асимптоматични мъже). Наблюдавахме амплификация само в ALU-C4 контролните реакции, а така също и амплификация на гена в положителната контрола.



Фигура 4.75. Амплификационен плот получен след протичането на PCR в реално време за изследване промоторното хиперметилиране на *RASSF2*.



Фигура 4.76. Стандартна крива на ALU-C4 контролната реакция получена при MethyLight анализа на промоторното хиперметилиране на *RASSF2*

4.4. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА *GSTP1*, *PSA*, PCA3, *AMACR* И *GOLPH2* (*GOLM1*) В УРИНА

Диагностичната точност на всеки от изследваните експресионни биомаркери в урина сходно на промоторно хиперметилираните бе сравнявана с тази получена за серумните стойности на PSA в съответнити анализирани групи от пациенти и контроли с ДПХ. За статистически значими резултати от всички проведени анализи се считаха стойности на two tailed p под 0.05. Нивата на експресия при пациентите са определени с помощта на $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода описан в раздел 3. Материали и Методи. За калибратори са използвани контролите с ДПХ, а ендогенна контрола бе B2M.

4.4.1. Резултати от експресионния анализ на *PSA* (*KLK3*) в урина на пациенти и контроли

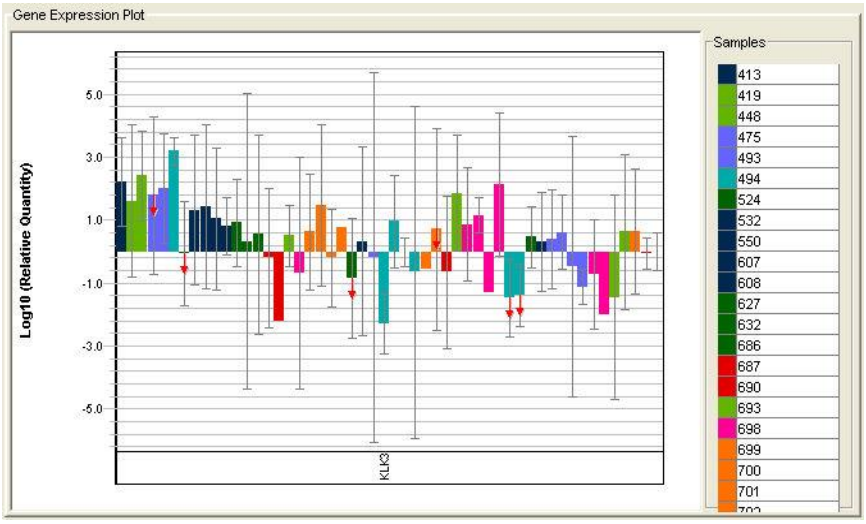
Експресионните профили на *PSA* на пациентите и контролите получени от SDS софтуера са показани на Фигура 4.77.

При сравнението на експресията на *PSA* в урина от пациенти с РП и контролите с ДПХ, независимият T тест анализ не показа статистически значими разлики (p=0.352 two tailed). Разпределението на пациентите според тяхната експресия е показано в Таблица 4.56.

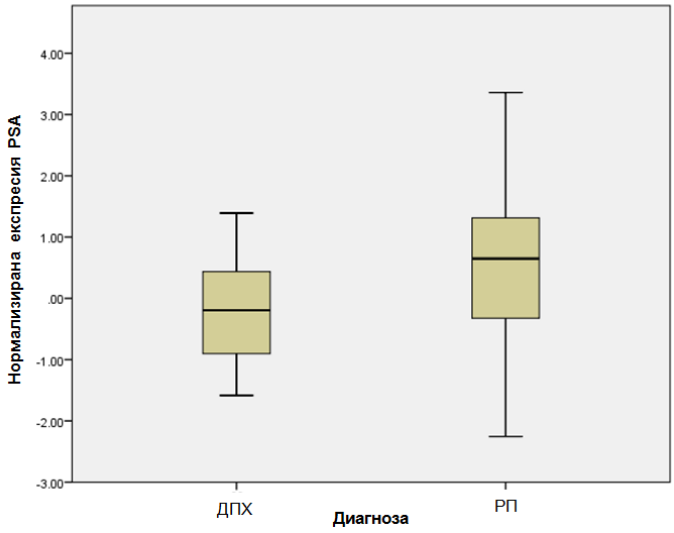
Таблица 4.56. Разпределение на пациентите според експресията на *PSA* при сравнение с контролите с ДПХ (калибратори)

Експресия	Брой пациенти (%)
Без значима разлика спрямо калибраторите	7 (12.96)
Понижена експресия	14 (25.93)
Повишена експресия	33 (61.11)

Според Student's T теста разликата в експресията при пациентите, показващи повишена експресия е статистически значима ($p<0.05$). При не всички пациенти с понижена експресия резултатът е статистически значим.



Фигура 4.77. Gene Expression plot, показващ експресионните профили на *PSA* при пациентите сравнени спрямо контролите

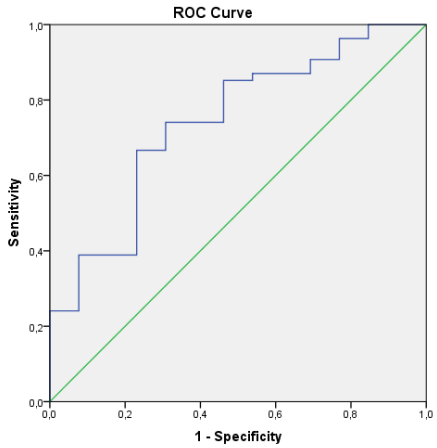


Фигура 4.78. Box plot графика, показваща нивата на експреси на *PSA* (*KLK3*) в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ

За да се провери дали експресията на *PSA* в урина корелира с възрастта, Gleason score, туморния стадий, наличието на лимфни метастази, както с нивата на експресия на останалите изследвани маркери, корелационен анализ бе проведен. Нивото на експресия на PSA в урина не показа връзка с нито един от клиникопатологичните характеристики, но показа статистически значима ($p<0.01$) положителна корелация с нивата на експресия на *PCA3, AMACR, GOLM1* с корелационни коефициенти на Pearson съответно 0.623, 0.727 и 0.524.

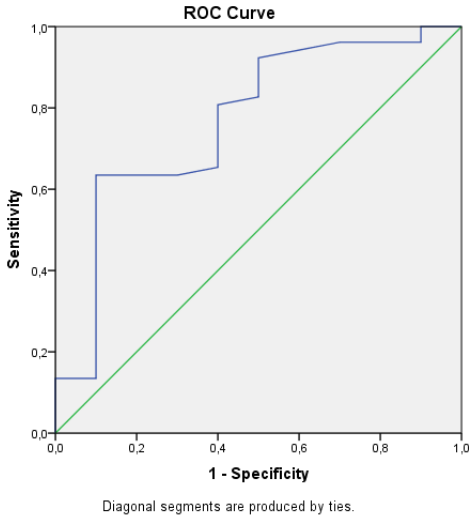
За да се определи надеждността на *PSA* биомаркера в урина да разграничи пациентите от контролите, анализ на ROC кривите бе проведен. Реалните RQ стойности бяха използвани с цел получаване на по-коректни резултати от анализа. Получихме статистически значими резултати ($p=0.044$ tow tailed) и AUC=0.694 (95% CI: 0.533-0.854). При гранична стойност на RQ=2 чувствителността е 61.11% и специфичността е 72.7%.

Чувствителността е ниска тъй като има 38.89% фалшиво негативни резултати. Позитивната предиктивна стойност на биомаркера е 91.67% (95% CI: 77.51-98.15), а негативната предиктивна стойност е 32.26% (95% CI: 16.71-51.37).



Фигура 4.79. Анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на *PSA* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

При включването на серумните стойности на PSA в анализа на ROC кривите получихме статистически значими резултати p=0.008 и AUC=0.767 (95% CI: 0.597-0.938). Само една контрола има серумни PSA стойности под 4 ng/ml и ако тази стойност се вземе за гранична, то чувствителността е 100%, но специфичността е едва 10%. Тъй като средните серумни PSA стойности при контролите са 7.9 ng/ml, се налага използването на по-висока гранична стойност. При гранична стойност от 8.9 ng/ml (подбрана според метода на Youden), чувствителността е 76.9%, а специфичността е 60%. В нашето проучване серумните нива на PSA в сравнение с експресионните нива на този биомаркер в урина успяват с по-голяма чувствителност, но с по-ниска специфичност да разграничат пациентите от контролите при използването на подбраната гранична стойност (8.9 ng/ml). Получаваме и по-голяма площ на кривата от ROC анализа при използването на серумните нива на PSA.



Фигура 4.80. ROC curve анализ за определяне на чувствителността и специфичността на серумните нива на PSA за разграничаване на пациенти и контроли.

4.4.2. Резултати от експресионния анализ на *PCA3* (*DD3*) в урина на пациенти и контроли

В нашето изследване не бе възможно определянето на PCA3 "score" тъй като за изчисляването му са необходими специализирана апаратура и китове, с каквито не разполагаме. Ние осъществихме не абсолютно, а относително количествено определяне на *PCA3* нивата в урина.

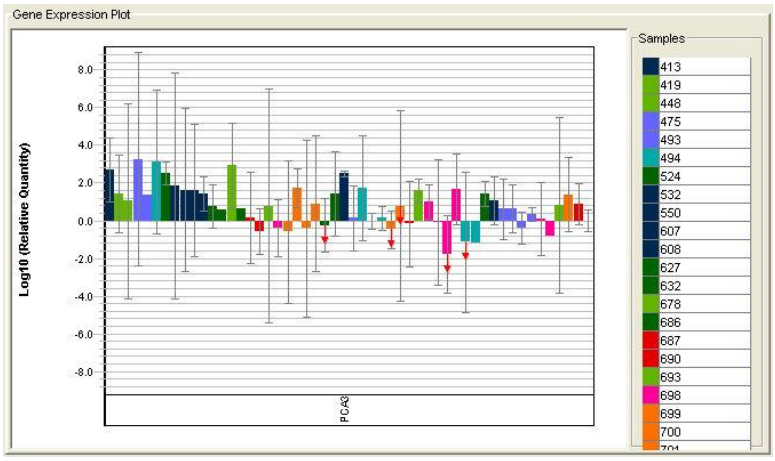
Получихме следните резултати от анализа:

- Независимият T тест анализ показа статистически значима асоциация на експресията на PCA3 с диагнозата (p= 0.021 two tailed)
- Разпределението на пациентите според експресията на *PCA3* е показано в Таблица 4.57. Повишена експресия показват 64.81% от пациентите, което е с 3.7% повече от намерената повишена експресия на PSA при пациентите.

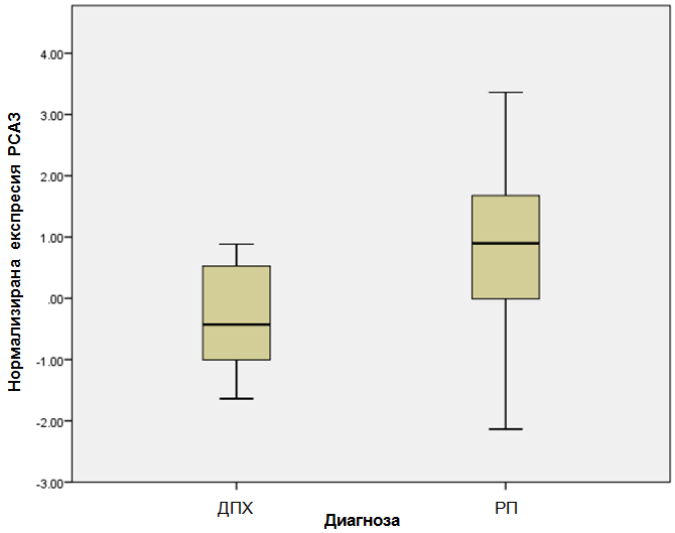
Таблица 4.57. Разпределение на пациентите според експресията на *PCA3* при сравнение с контролите с ДПХ (калибратори)

Експресия	Брой пациенти (%)
Без значима разлика спрямо калибраторите	9 (16.67)
Понижена експресия	10 (18.52)
Повишена експресия	35 (64.81)

- Според Student's T теста разликите в експресията на пациентите спрямо калибраторите са статистически значими (p<0.05).



Фигура 4.81. Gene Expression plot, показващ експресионните профили на *PCA3* при пациентите сравнени спрямо контролите

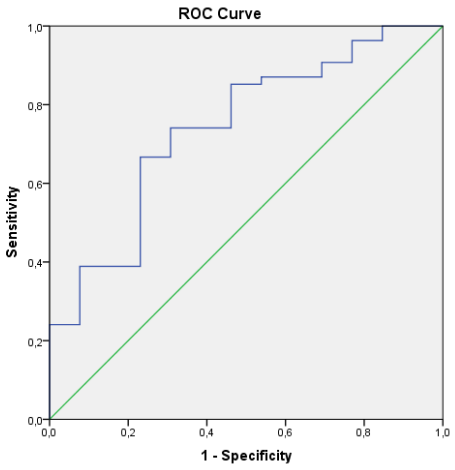


Фигура 4.82. Box plot графика, показваща нивата на експреси на *PCA3* в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ

➢ При провеждането на анализа на ROC кривите получихме статистически значими резултати (p=0.003 two tailed) и AUC=0.778 (95% CI: 0.654-0.901). При чувствителност 85.2%, специфичността бе 58.3%. Площта под кривата за PCA3 е по-голяма от тази, която получихме за PSA в урина, както и от тази на PSA в серум. *PCA3* показа и по-висока чувствителност, но малко по-ниска специфичност от PSA в серум. Фалшиво негативните резултати са 35.19%. Позитивната предиктивна стойност на *PCA3* е 87.50% (95% CI: 73.18-95.77), а негативната е 29.63% (95% CI: 13.79-50.18). В нашето изследване експресията на *PCA3* в урина като биомаркер превъзхожда тази на PSA в урина и серум, но не значително.

➢ Корелационен анализ, включващ нивата на експресия на *PCA3*, клиникопатологичните характеристики и нивата на експресия на останалите изследвани биомаркери в урина

Не открихме корелация на нивата на експресия на *PCA3* и клиникопатологичните характеристики, но има корелация с експресията на *PSA, AMACR* и *GOLM1* с корелационни коефициенти на Pearson съответно 0.623, 0.455 и 0.384 като резултатите са статистически значими (p<0.01 two tailed)



Фигура 4.83. Анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на *PCA3* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

4.4.3. Резултати от експресионния анализ на *AMACR* в урина на пациенти и контроли

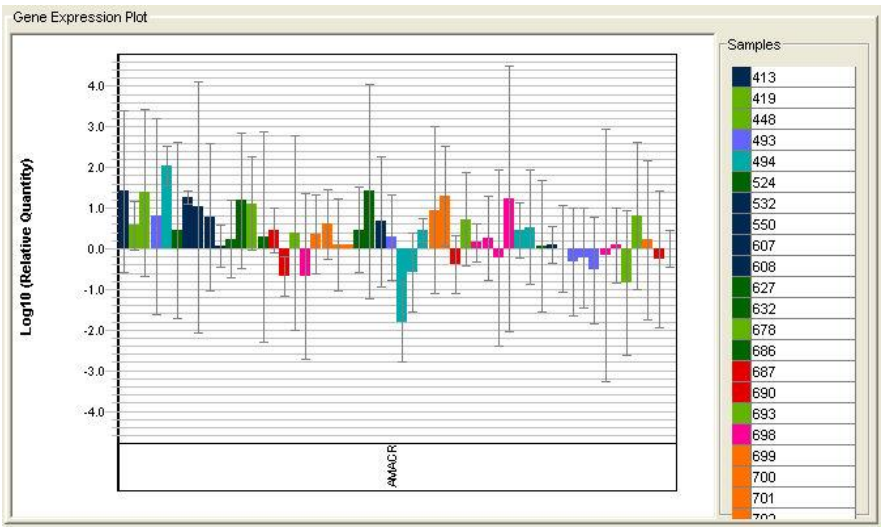
Сходно на *PCA3* и за *AMACR* не бе възможно определянето на "score".

При анализът на експресията на *AMACR* в урина при пациенти и контроли получихме следните резултати:

- Независимият T тест анализ показа статистически значима асоциация на експресията на *AMACR* с диагнозата (p= 0.021 two tailed)
- Разпределението на пациентите според експресията на *AMACR* е показано в Таблица 4.58.

Таблица 4.58. Разпределение на пациентите според експресията на *AMACR* при сравнение с контролите с ДПХ (калибратори)

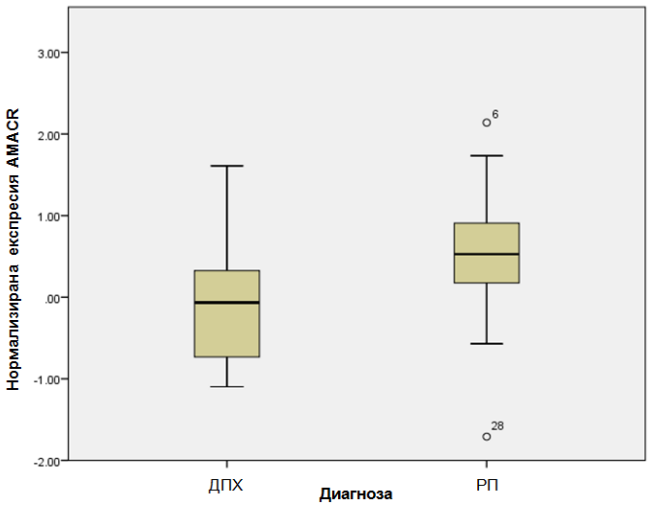
Експресия	Брой пациенти (%)
Без значима разлика спрямо калибраторите	16 (29.63)
Понижена експресия	5 (9.23)
Повишена експресия	33 (61.11)



Фигура 4.84. Gene Expression plot, показващ експресионните профили на *AMACR* при пациентите сравнени спрямо контролите

- Според Student's T теста разликите в експресията на пациентите спрямо калибраторите (ДПХ контролите) са статистически значими ($p<0.05$)
- За да определим надеждността на експресията на *AMACR* в урина да разграничи пациентите от контролите, проведохме анализ на ROC кривите и получихме статистически значими резултати (p=0.011 two tailed) и AUC=0.728 (95% CI: 0.553-0.903). При гранична стойност на RQ=2 чувствителността е 61.11% (95% CI: 46.88 % - 74.07 %), специфичността е 69.23% (95% CI: 38.61 % - 90.72 %), позитивна предиктивна стойност – 89.19% (95% CI: 74.56 % - 96.91 %) и негативна предиктивна стойност – 30% (95% CI: 14.76 % - 49.40 %). Фалшиво негативни резултати се получиха при 38.89%. Площта под кривата за AMACR е

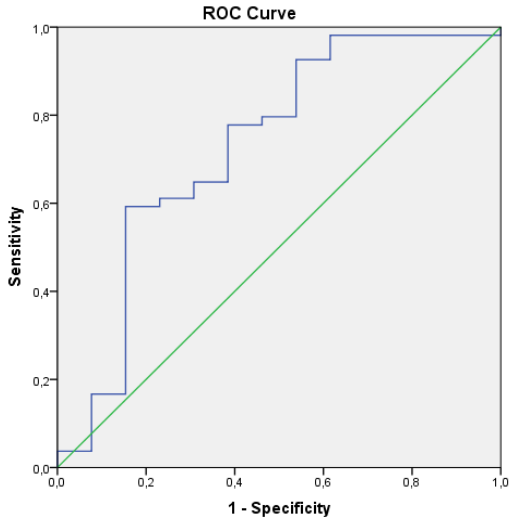
по-малка от тази, която получихме за PCA3, но по-голяма от тази на PSA. Чувствителността, която получихме за *AMACR* е същата като тази за *PSA*, но по-ниска от тази за *PCA3*, а специфичността е по-висока от тази на *PCA3* и по-ниска от тази на *PSA*. В нашето изследване експресията на *AMACR* в урина като биомаркер не превъзхожда тази на *PSA* и *PCA3* в урина, но разликата не е значителна.



Фигура 4.85. Box plot графика, показваща нивата на експреси на *AMACR* в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ

➢ Корелационен анализ, включващ нивата на експресия на *AMACR* и клиникопатологичните характеристики, както и нивата на експресия на останалите изследвани биомаркери в урина.

Нивата на експресия не показаха корелация с клиникопатологичните характеристики, но има корелация с нивата на експресия на *PSA, PCA3* и *GOLM1* с корелационни коефициенти на Pearson съответно 0.727, 0.455, 0.682 и $p<0.05$.



Фигура 4.86. ROC curve анализ за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на *AMACR* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

4.4.4. Резултати от експресионния анализ на *GSTP1* в урина на пациенти и контроли

За да допълним изследванията за промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина ние осъществихме и експресионен анализ в друга група от пациенти и контроли. Поради липсата на достатъчно изходен материал за анализ не успяхме да осъществим сравнение на резултатите от експресията и промоторното хиперметилиране при едни и същи пациенти и контроли.

Метилиране на CpG динуклеотидите в промоторните области на гените води до инхибиране на транскрипцията от тях. По литературни данни метилиране на *GSTP1* се открива във висок процент от пациентите с РП и следователно ние очакваме да наблюдаваме понижение на експресията на този ген при тях.

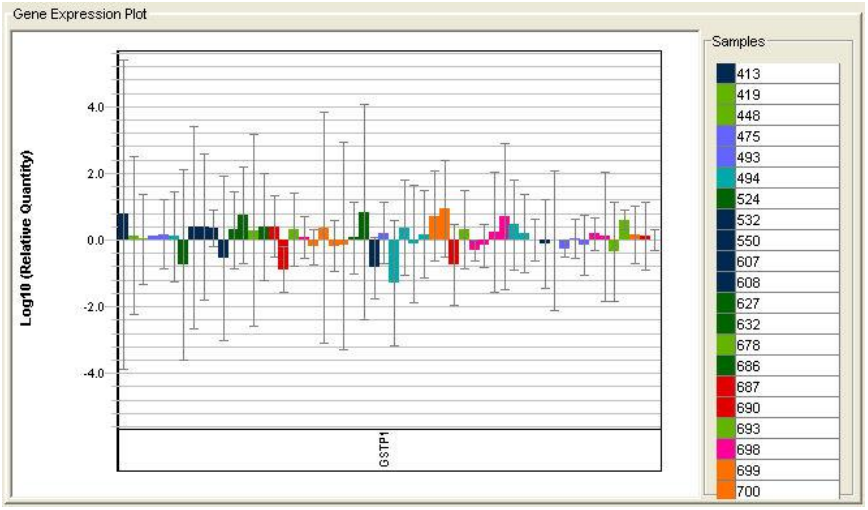
При сравнението на експресията на *GSTP1* mRNA при пациенти и контроли получихме следните резултати:

- Независимият Т тест анализ не показа статистически значима асоциация на експресията на *GSTP1* с диагнозата
- Разпределението на пациентите според експресията на *GSTP1* е показано в Таблица 4.59.

Таблица 4.59. Разпределение на пациентите според експресията на *GSTP1* при сравнение с контролите с ДПХ (калибратори)

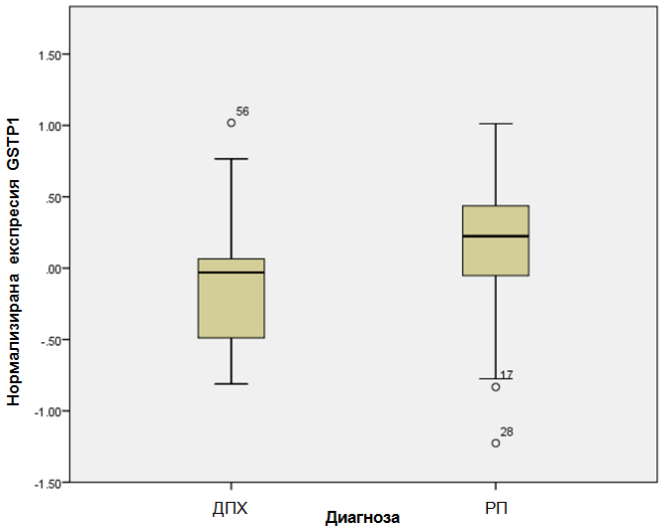
Експресия	Брой пациенти (%)
Без значима разлика спрямо калибраторите	27 (50)
Понижена експресия	6 (11.11)
Повишена експресия	21 (38.89)

Не наблюдавахме очакваните от нас резултати. По-голям брой пациенти показват повишена експресия, отколкото понижена. При 50% от пациентите не получихме нива на експресия статистически значимо различаващи се от тези на контролите.

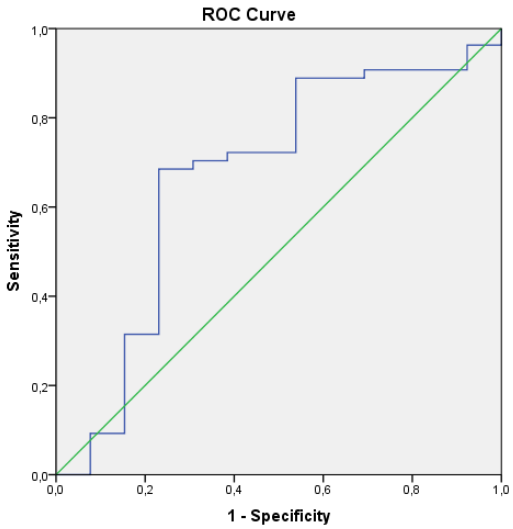


Фигура 4.87. Gene Expression plot, показващ експресионните профили на *GSTP1* при пациентите сравнени спрямо контролите

➢ При провеждането на анализа на ROC кривите получихме AUC= 0.67 (95% CI: 0.486-0.853), но резултатът не е статистически значим (p=0.059) (Фигура 4.88). Ако в изчисляването на чувствителността, за истински позитивни резултати се вземе броя на пациентите показали понижена експресия, се получава 11.11% (95% CI: 4.22 % - 22.64 %)



Фигура 4.87. Box plot графика, показваща нивата на експреси на *GSTP1* в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ



Фигура 4.88. Анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на *GSTP1* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

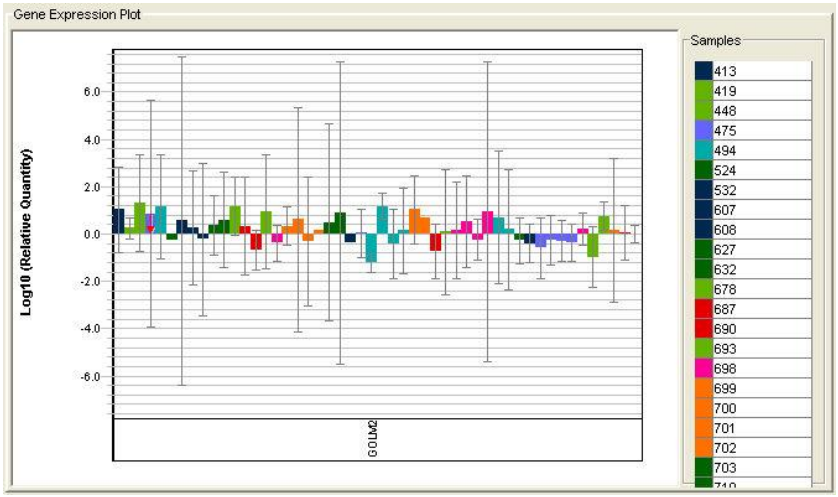
4.4.5. Резултати от експресионния анализ на *GOLM1* (*GOLPH2*) в урина на пациенти и контроли

При анализа на експресията на *GOLM1* при български пациенти с РП и контроли с ДПХ получихме следните резултати:

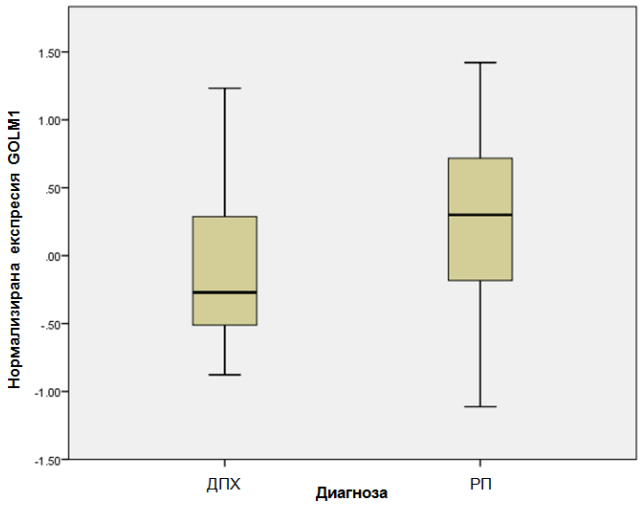
- Независимият Т тест анализ не показа статистически значима асоциация на експресията на *GOLM1* с диагнозата
- Разпределението на пациентите според експресията на *GOLM1* е показано в Таблица 4.60.

Таблица 4.60. Разпределение на пациентите според експресията на *GOLM1* при сравнение с контролите с ДПХ (калибратори)

Експресия	Брой пациенти (%)
Без значима разлика спрямо калибраторите	20 (37.04)
Понижена експресия	7 (12.96)
Повишена експресия	27 (50)

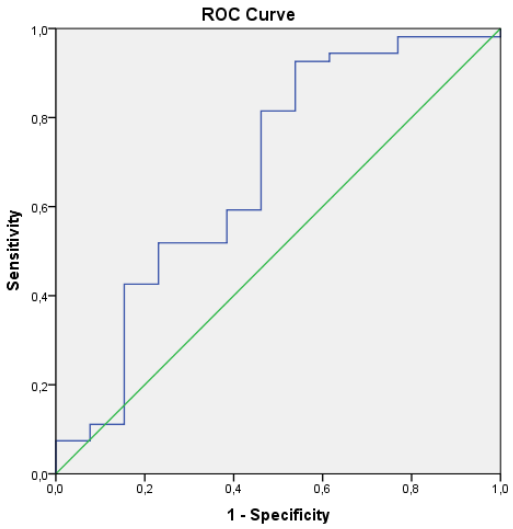


Фигура 4.89. Gene Expression plot, показващ експресионните профили на *GOLM1* на пациентите сравнени спрямо контролите



Фигура 4.90. Box plot графика, показваща нивата на експреси на *GOLM1* в урина на пациенти с РП и контроли с ДПХ

➢ Според Student's T теста разликите в експресията на пациентите, показващи повишена и намалена експресия спрямо калибраторите са статистически значими ($p<0.05$).



Фигура 4.91. ROC curve анализ за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на *GOLM1* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

➢ Проверихме диагностичната точност на биомаркера *GOLM1* чрез анализ на ROC кривите. Получихме AUC=0.678 (95% CI: 0.495-0.861) и резултатът бе статистически значим (p=0.047). При гранична стойност на RQ=2 чувствителността е 50% (95% CI: 36.08 % - 63.92 %), и специфичността е 76.92% (95% CI: 46.20 % - 94.69 %) с позитивна предиктивна стойност от 90% (95% CI: 73.44-97.77) и негативна предиктивна стойност от 27.03% (95% CI: 13.81-44.12). В нашето проучване *GOLM1* е по-надежден биомаркер от GSTP1, но не е по-добър от PSA, а така също и от останалите.

4.4.6. Обобщение на резултатите получени от експресионния анализ на биомаркери в урина

Таблица 4.61. Обобщение на резултатите получени от анализ на биомаркери в урина

Резултати: пациенти с РП спрямо контроли с ДПХ	***PSA***	***PCA3***	***GSTP1***	***AMACR***	***GOLPH2***
	Брой пациенти (%)				
Без значима разлика в експресията	7(12.96)	9 (16.67)	27 (50)	16 (29.63)	20 (37.04)
Понижена експресия	14 (25.93)	10 (18.52)	6 (11.11)	5 (9.23)	7 (12.96)
Повишена експресия	33 (61.11)	35 (64.81)	21 (38.89)	33 (61.11)	27 (50)
Резултати от анализа на ROC кривите					
AUC (95% CI)	0.694 (0.533-0.854)	0.778 (0.654-0.901)	0.670 (0.486-0.853)	0.728 (0.553-0.903)	0.678 (0.495-0.861)
P	0.044	0.003	0.059	0.011	0.047
Чувствителност (%)	61.11	85.2	11.11	61.11	50
Специфичност (%)	72.7	58.3	84.6	69.23	76.92

4.4.7. Резултати от мултимаркерен анализ на ROC кривите при комбиниране на експресионните биомаркери в урина и серумните стойности на PSA

Най-добро разграничаване между пациентите и контролите бе достигнато при използването на експресионните нива на *PCA3* в сравнение с останалите изследвани биомаркери в урина, както и от серумните нива на PSA. Проведохме мултимаркерен анализ на ROC кривите като включвахме различни комбинации от изследваните биомаркери, за да проверим дали диагностичната стойност би се подобрила в сравнение с тази на *PCA3*. При този анализ не включихме *GSTP1* тъй като той показа най-ниска диагностична точност и бе наблюдаван най-висок процент пациенти без промяна в експресията спрямо контролите.

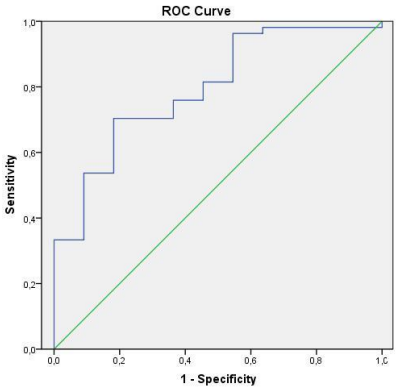
Получените резултати са представени в таблица 4.62.

Таблица 4.62. Резултати за AUC, специфичност и чувствителност при комбинирането на биомаркери.

Комбинация от биомаркери	AUC, (95% CI)	P	Чувствител-ност (%)	Специфич-ност (%)	Гранична стойност
AMACR и *GOLM1*	0.738 (0.565-0.911)	0.008	77.8	61.5	1.5
PSA и *PCA3*	0.764 (0.636-0.892)	0.006	74.1	54.5	1.33
PCA3* и *AMACR	0.832 (0.700-0.954)	3.5×10^{-4}	77.8	75	2.47
***PCA3* и серумен PSA**	0.831 (0.688-0.974)	0.002	71.2	77.8	13.08
PSA и AMACR	0.776 (0.624-0.928)	0.004	72.2	72.7	2.4
PCA3* и *GOLM1	0.821 (0.701-0.941)	0.001	70.4	83.3	3.46
PSA и *GOLM1*	0.731 (0.559-0.902)	0.017	90.7	54.5	0.68
PSA, PCA3* и *AMACR	0.823 (0.696-0.950)	0.001	75.9	91	2
PSA, PCA3 и *GOLM1*	0.813 (0.686-0.940)	0.065	77.8	72.7	2.51
PSA, AMACR и *GOLM1*	0.781 (0.627-0.935)	0.078	75.9	72.7	1.65
PCA3, AMACR* и *GOLM1	0.836 (0.716-0.957)	0.061	75.9	83.3	3.03
PSA, PCA3, AMACR и *GOLM1*	0.795 (0.657-0.933)	0.002	70.4	81.8	5.46

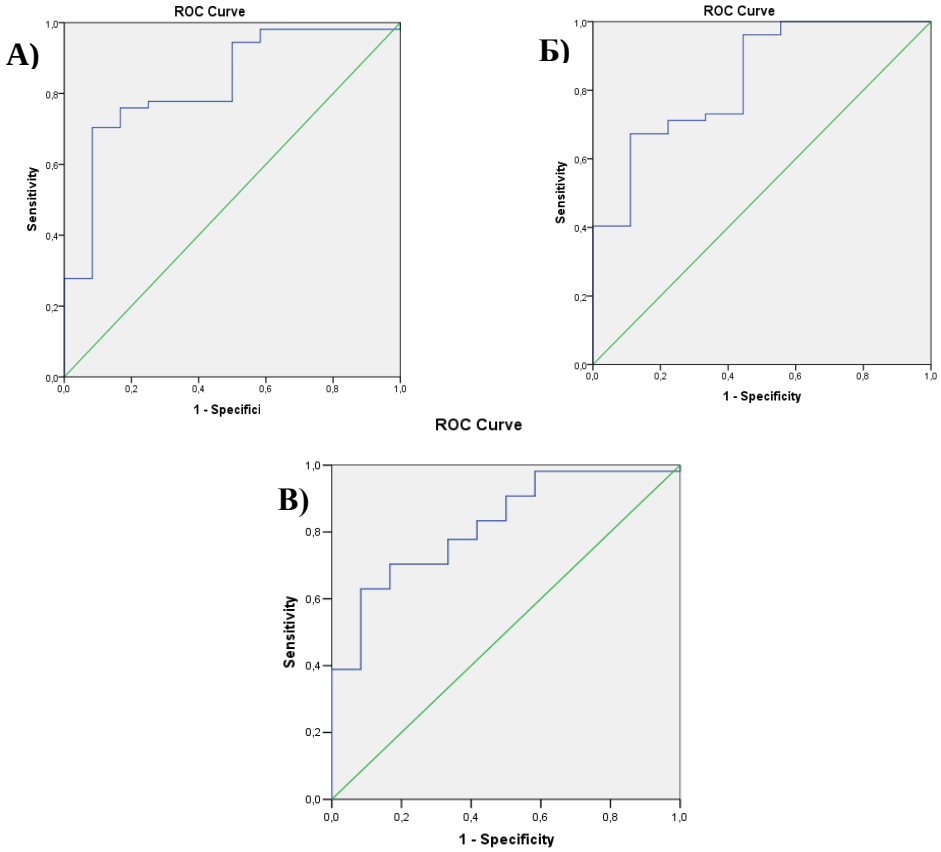
При комбинирането на всички изследвани биомаркери (без *GSTP1*) получихме AUC=0.795 (95% CI: 0.657-0.933), чувствителност 70.4% и специфичност 81.8%. В сравнение с *PCA3* маркера самостоятелно, комбинирането на всички биомаркери доведе до

получаването на малко по-висока стойност за AUC и по-добра специфичност, но по-ниска чувсвителност.



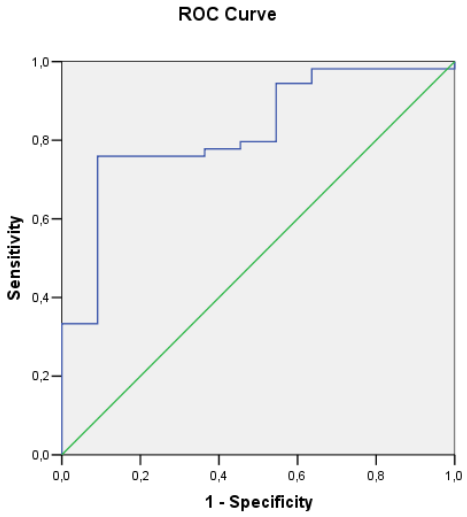
Фигура 4.92. Мултимаркерен анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на комбинацията от *PSA, PCA3, AMACR, GOLM1* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

Най- добрите комбинации от два маркера са между *AMACR* и *PCA3*; *PCA3* и серумен PSA и между *PCA3* и *GOLM1* с AUC съответно 0.832, 0.831 и 0.821 и сходни чувствителност и специфичност. Тези комбинации подобряват надеждността при разграничаването на пациентите и контролите в сравнение с използването на *PCA3* маркера сам по себе си. Кривите получени от ROC анализа са представени на фигура 4.93.



Фигура 4.93. Мултимаркерен анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на комбинацията от: А) *PCA3 и AMACR**;*** ***Б)*** *PCA3 и сесрумен PSA и* ***В)*** *PCA3 и GOLM1 в урина за разграничаване на пациенти и контроли.*

Най-добрата комбинация от три биомаркера, даваща най-високи стойности за AUC, специфичност и чувствителност, е между *PSA*, *PCA3* и *AMACR* и това води до подобряване на най-значимите резултати получени от комбинирането на два маркера (*AMACR* и *PCA3*, *PCA3* и серумен PSA, *PCA3* и *GOLM1*).



Фигура 4.94. Мултимаркерен анализ на ROC кривите за определяне на чувствителността и специфичността на експресията на комбинацията от *PSA*, *PCA3* и *AMACR* в урина за разграничаване на пациенти и контроли.

При комбинирането на *PCA3*, *AMACR* и *GOLM1* в анализа на ROC кривите също се получи висока стойност за AUC- 0.836, но резултатът не достигна статистическа значимост (p=0.061).

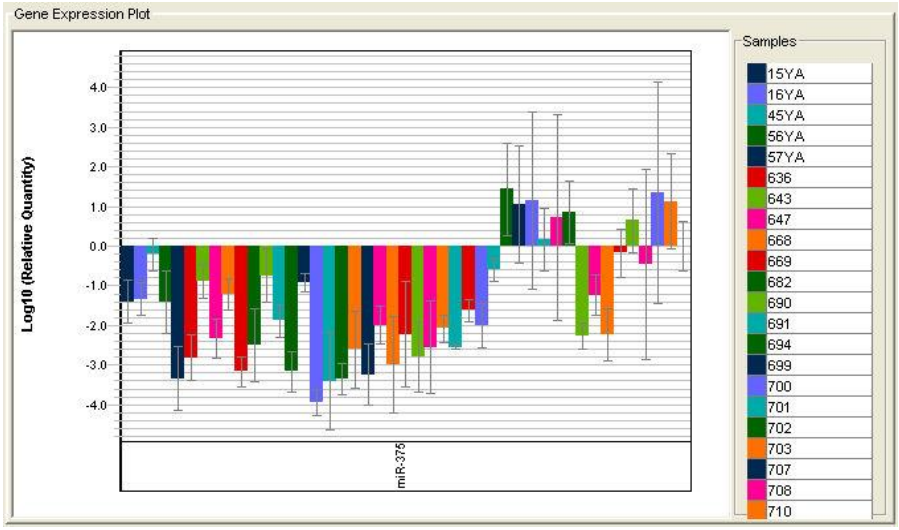
4.5. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА let-7c, miR-30c, miR-141 И miR-375 В ПЛАЗМА

За определянето на относителните експресионни нива на изследваните микроРНК-и в плазмените проби на пациентите с РП бяха използвани: *RNU6B* като референтен ген за нормализация и ДПХ контроли или млади асимптоматични мъже (МАМ) като калибраторни проби. Диагностичната точност на микроРНК-ите бе сравнена с тази на PSA получена при включването на изследваните пациенти и контроли.

Малко по-високи Ct стойности за *RNU6B* референтната контрола бяха наблюдавани в ДПХ групата в сравнение с тази на пациентите с РП и МАМ, но Mahn-Whitney тестът не показа статистически значими разлики в Ct стойностите между изучаваните групи.

Всички изследвани микроРНК-и особено miR-141 и miR-375 показаха понижена експресия в голям процент от пациентите в сравнение с ДПХ контролите. Понижена експресия на miR-141 и miR-375 бе открита в 71.43% и 83.05% от пациентите съответно в сравнение с ДПХ групата (Таблица 4.63). Когато използвахме МАМ като калибратори, то експресионните нива на голяма част от пациентите не достигнаха статистически значими разлики вероятно поради малката група от млади мъже.

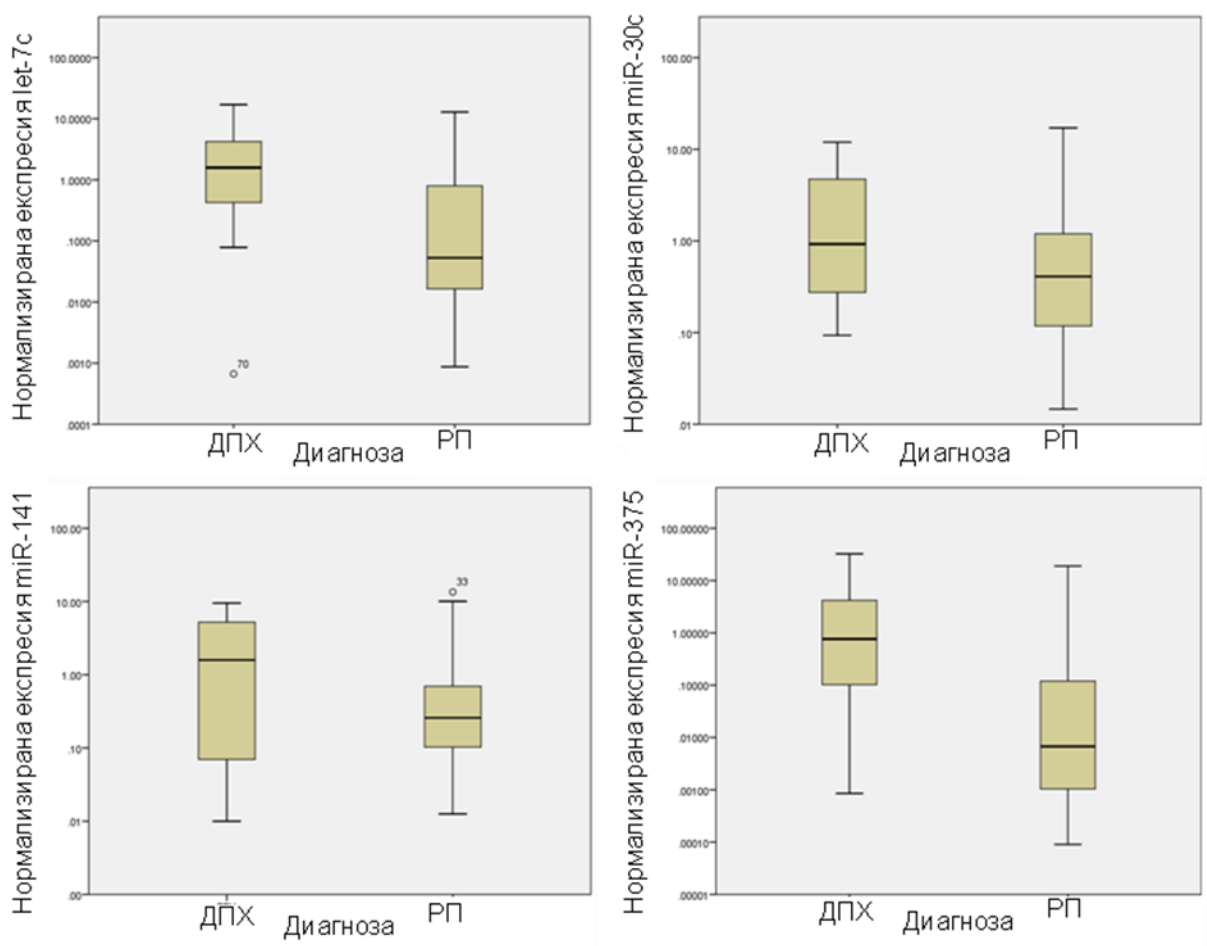
Не установихме експресия на miR-141 в 7 проби (4 ДПХ контроли и 3 пациента с РП) и средните Ct (Cq) стойности сред пациентите, ДПХ контролите и МАМ бяха както следва: 30, 34, 32.



Фигура 4.95. Gene expression plot, показващ експресионните профили на miR-375 на пациентите сравнени спрямо контролите с ДПХ.

Таблица 4.63. Резултати от микроРНК експресионния анализ в плазма на пациенти с РП и контроли с ДПХ, служещи за калибратори

Резултати: пациенти с РП спрямо контроли с ДПХ	**let-7c**	**miR-30c**	**miR-141**	**miR-375**
	Брой пациенти с РП (%)			
Без значима разлика в експресията	10 (16.95)	13 (22.03)	11 (19.64)	1 (1.7)
Понижена експресия	40 (67.8)	35 (59.32)	40 (71.43)	49 (83.05)
Повишена експресия	9 (15.25)	11 (18.64)	5 (8.93)	9 (15.25)



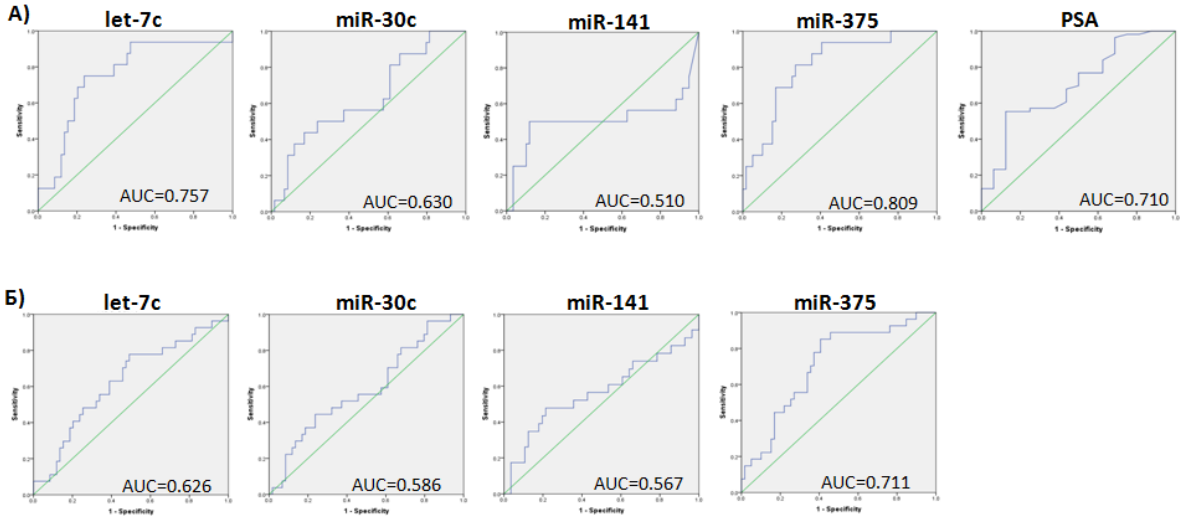
Фигура 4.96. Box plot графики, показващи плазмените микроРНК експресионни нива при пациенти с РП и ДПХ контролите. *Експресионните нива на микроРНК-ите (скала на у оста: log 10) са нормализирани към RNU6B. ДПХ контролите са използвани като калибратори*

Построихме ROC криви, за да установим потенциалната стойност на експресионните нива на анализираните микроРНК-и като диагностични биомаркери при РП (Фигура 4.97). miR-375 позволява най-точната дискриминация (AUC=0.809, 95% CI: 0.697-0.922, p=0.00016) на пациентите с рак от ДПХ контролите. При оптималната подбрана гранична стойност на RQ=2 чувствителността бе 81.3%, а специфичността 72.9%. miR-375 надминава серумните стойности на PSA (AUC=0.710, 95% CI: 0.559-0.861, p=0.013 с 76.8% чувствителност и 53.3% специфичност при гранична стойност 9.15 ng/ml) като диагностичен биомаркер в изследваната група. Избрахме 9.15 ng/ml като гранична стойност (сходно на другите ни изследвания) тъй като в изследваната група от пациенти и ДПХ контроли само един човек има PSA стойност под 4 ng/ml и средните нива са високи дори и при ДПХ групата. При гранична стойност от 4 ng/ml чувствителността е 100%, но специфичността е едва 6.2%.

Експресионните нива на let-7c също могат да разграничат пациентите от контролите с ДПХ. Получихме следните резултати: AUC: 0.757 (95% CI: 0.622-0.893, p=0.069) и с 75% чувствителност и 61% специфичност, но не се достига статистическа значимост. Получихме следни площи под кривите при анализа на ROC кривите за miR-30c и miR-141: 0.630 (95% CI: 0.475-0.786, p=0.079) и 0.510 (95% CI: 0.296-0.723, p=0.91), съответно. При оптималните гранични стойности чувствителността и специфичността на биомаркерите бяха: 62.5% и 42.4% за miR-30c и 50% и 71.2% за miR-141.

Построените ROC криви за определяне на диагностичната точност на тези микроРНК-и в разграничаването на пациентите с РП от ДПХ контролите и МАМ, когато последната група служи за калибратор, показаха по-малки площи: let-7c, 0.626 (95% CI: 0.498-0.755, p=0.626); miR-30c, 0.586 (95% CI: 0.455-0.717, p=0.204); miR-141, 0.567 (95% CI: 0.412-0.722, p=0.353); miR-375, 0.711 (95% CI: 0.595-0.826, p=0.02). При оптималните гранични стойности чувствителността и специфичността бяха: let-7c, 63% и 61%; miR-30c, 55.6% и 54.2%; miR-141, 56.5% и 57.1%; miR-375, 77.8% и 62.7%.

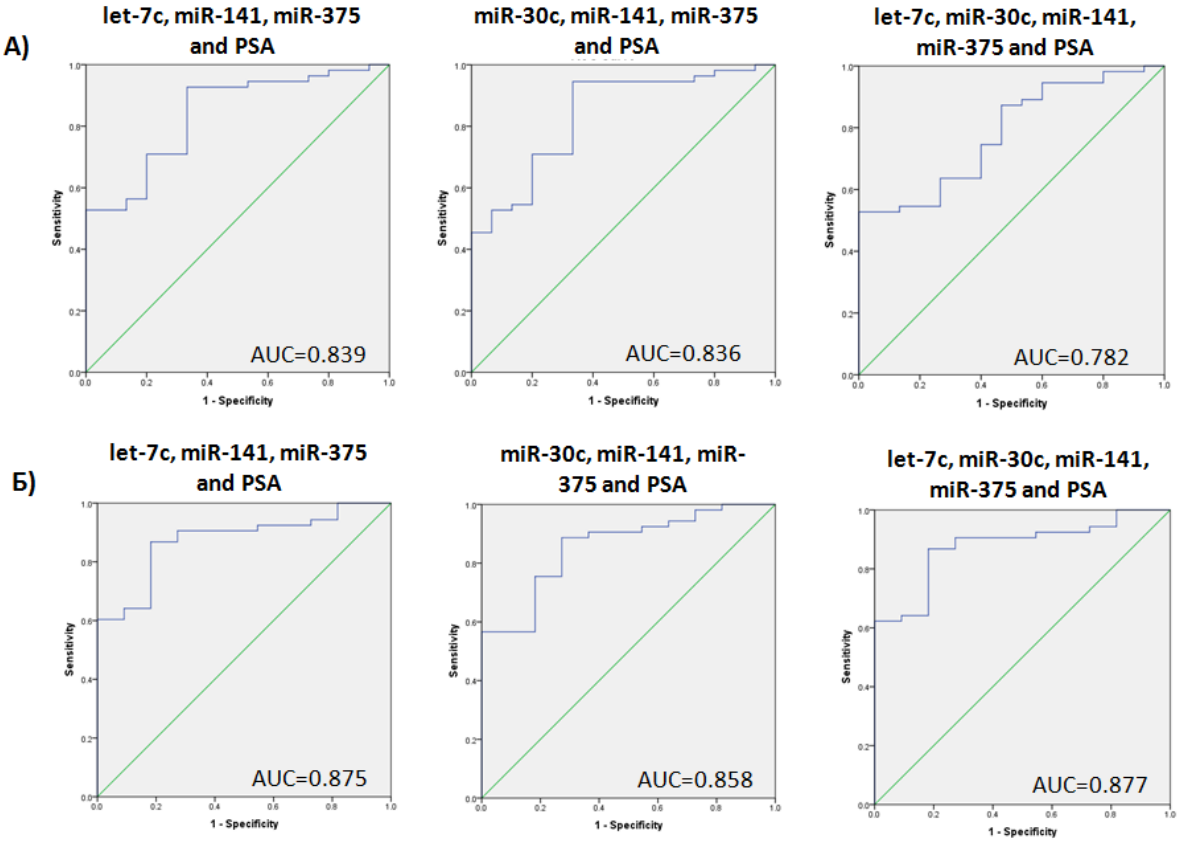
miR-375 експресията в плазма в нашето изследване показа, че е надежден неинвазивен биомаркер за разграничаване на пациентите с РП от двете групи контроли.



Фигура 4.97. Анализ на ROC кривите при използването на изследваните микроРНК и серумните стойност на PSA за разграничаване на пациентите с РП от контролите без рак: А) когато ДПХ контролите (n=16) са използвани като калибратор; **Б)** когато МАМ (n=11) са използвани като калибратор

Някои комбинации от изследваните микроРНК-и и PSA подобриха диагностичната точност в мултимаркерния анализ на ROC кривите. При използване на ДПХ контролите като калибраторни проби, то най-добрата комбинация от биомаркери с най-висока чувствителност бе между miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA, но специфичността бе по-ниска от тази на miR-375 (Таблица 4.64). Най-голямата площ под кривата (AUC) наблюдавахме при комбинирането на let -7c, miR-141, miR-375 и PSA. За съжаление комбинацията от всички пет биомаркера не надмина диагностичната точност на miR-375.

Сходни резултати получихме и когато в мултимаркерния анализ на ROC кривите използвахме МАМ като калибратори. При този анализ комбинацията от 5 биомаркера значително надмина miR-375 и най-голямата площ под кривата бе наблюдавана: 0.877.



Фигура 4.98. Мултимаркерен анализ на ROC кривите: А) когато ДПХ контролите са използвани за калибратор; **Б)** когато МАМ са използвани за калибратор

В допълнение ние проверихме дали изследваните микроРНК-и корелират с клиникопатологичните характеристики като Gleason score, туморен стадий, развитие на лимфни метастази и след това сравнихме резултатите с тези получени за PSA. Не успяхме да проверим дали експресионните нива на изследваните микроРНК-и корелират с развитието на далечни метастази, тъй като са включени само двама пациента с метастази. Само PSA показа статистически значима корелация с Gleason score, туморния стадий и развитието на лимфни метастази със следните корелационните коефициенти на Spearman: 0.612 ($p=5.31 \times 10^{-7}$); 0.576 ($p=4.21 \times 10^{-6}$) и 0.458 ($p=4.34 \times 10^{-4}$). Наблюдаваните корелации бяха потвърдени и с Mahn-Whitney U теста. Осъществихме анализ на ROC кривите с цел да определим дали серумните нива на PSA могат да предсказват наличието на лимфни метастази при поставянето на диагноза. Следните резултати бяха получени: AUC- 0.960 (95% CI: 0.908-1.00, p=0.001) и при гранична стойност от 27.1 ng/ml чувствителността бе 100% , а специфичността- 90%.

За да определим дали експресионните нива на изследваните микроРНК-и корелират с възрастта, то проведохме Spearmen тест, тъй като той беше подходящ за не нормално разпределение на данните. Не наблюдавахме статистически значима корелация между възрастта и експресионните нива на микроРНК-ите в плазма в трите групи (пациентите с РП, ДПХ и МАМ контролите) или като цяло.

Експресионните нива на let-7c показа статистически значима корелация с експресионните нива на miR-30c, miR-141 и miR-375 със следните корелационни коефициенти на Pearson: 0.650 ($p=2.84 \times 10^{-10}$), 0.447 ($p=5.7 \times 10^{-5}$) и 0.266 (p=0.021). Сходна корелация бе наблюдаване и за miR-141 и miR-30c (корелационен коефициент на Pearson: 0.371, p=0.001).

Таблица 4.64. Резултати показали статистическа значимост при мултимаркерния анализ ROC кривите, когато ДПХ контролите са използвани като калибратори

Комбинация от биомаркери	AUC (95% CI)	P стойност	Чувствителност (%)	Специфичност (%)
let-7c и miR-141	0.753 (0.598-0.908)	0.002	79.7	81.2
miR-141 и miR-375	0.695 (0.510-0.880)	0.017	74.6	75
let-7c и PSA	0.714 (0.560-0.868)	0.012	69.1	60
miR-30c и PSA	0.702 (0.546-0.858)	0.017	65.5	60
miR-141 и PSA	0.699 (0.551-0.846)	0.019	72.7	53.3
miR-375 и PSA	0.833 (0.727-0.938)	8.5×10^{-5}	85.5	66.7
let-7c, miR-30c и miR-141	0.753 (0.598-0.908)	0.002	79.7	81.2
let-7c, miR-141 и miR-375	0.816 (0.688-0.943)	1.2×10^{-4}	78	87.5
let-7c, miR-375 и PSA	0.838 (0.732-0.943)	7×10^{-5}	70.9	80
let-7c, miR-30c и PSA	0.719 (0.567-0.870)	0.01	72.7	53.3
let-7c, miR-141 и PSA	0.705 (0.554-0.857)	0.015	65.5	60
miR-30c, miR-375 и PSA	0.833 (0.725-0.940)	8.6×10^{-5}	70.9	80
miR-30c, miR-141 и PSA	0.699 (0.552-0.847)	0.019	65.5	60
miR-30c, miR-141 и miR-375	0.814 (0.686-0.941)	1.3×10^{-4}	76.3	87.5
let-7c, miR-30c, miR-375	0.662 (0.487-0.837)	0.048	71.2	62.5
miR-141, miR-375, PSA	0.834 (0.724-0.944)	8.0×10^{-5}	70.9	73.3
let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375	0.781 (0.635-0.927)	0.01	81.4	81.2
let-7c, miR-141, miR-375 и PSA	0.839 (0.733-0.944)	6.3×10^{-5}	92.7	66.7
let-7c, miR-30c, miR-375 и PSA	0.839 (0.735-0.943)	6.3×10^{-5}	92.7	66.7
let-7c, miR-30c, miR-141 и PSA	0.777 (0.657-0.897)	0.001	80	60
miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.836 (0.726-0.947)	7.1×10^{-5}	94.5	66.7
let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.782 (0.664-0.899)	0.001	63.6	73.3

Таблица 4.65. Резултати показали статистическа значимост при мултимаркерния анализ ROC кривите, когато MAM са използвани за калибратори

Комбинация от биомаркери	AUC (95% CI)	P стойност	Чувствителност (%)	Специфичност (%)
miR-375 и PSA	0.823 (0.709-0.936)	1.3×10^{-4}	85.7	73.3
let 7c и miR-375	0.701 (0.575-0.828)	0.003	76.3	66.7
let-7c и PSA	0.786 (0.669-0.903)	0.001	73.2	80
miR-30c и miR-375	0.693 (0.564-0.822)	0.004	74.6	70.4
miR-30c и PSA	0.714 (0.562-0.867)	0.011	76.8	53.3
miR-141 и miR-375	0.747 (0.636-0.858)	0.001	76.8	69.6
miR-141 и PSA	0.748 (0.585-0.911)	0.01	62.3	63.6
let-7c, miR-30c и miR-375	0.702 (0.574-0.830)	0.003	79.7	63
Let-7c, miR-30c и PSA	0.795 (0.680-0.910)	0.0005	78.6	80
let-7c, miR-141 и miR-375	0.714 (0.579-0.848)	0.003	73.2	73.9
let-7c, miR-375 и PSA	0.815 (0.696-0.935)	0.0002	78.6	80
let-7c, miR-141 и PSA	0.811 (0.676-0.947)	0.001	83	72.7
miR-30c, miR-375, PSA	0.824 (0.714-0.934)	0.0001	71.4	80
miR-30c, miR-141 и miR-375	0.688 (0.543-0.832)	0.009	82.1	60.9
miR-30c, miR-141 и PSA	0.768 (0.620-0.917)	0.005	69.8	63.6
let-7c, miR-30c, miR-141 и miR-375	0.769 (0.650-0.889)	0.0002	76.8	78.3
let-7c, miR-141, miR-375 и PSA	0.875 (0.779-0.971)	0.0001	86.8	81.8
let-7c, miR-30c, miR-375 и PSA	0.815 (0.690-0.940)	0.0002	82.1	80
let-7c, miR-30c, miR-141 и PSA	0.835 (0.726-0.945)	0.001	83	72.7
miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.858 (0.750-0.965)	0.00021	88.7	72.7
let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA	0.877 (0.782-0.971)	9×10^{-5}	86.8	81.8

4.6. РЕЗУЛТАТИ ОТ микроРНК МИКРОЧИПОВИЯ АНАЛИЗ

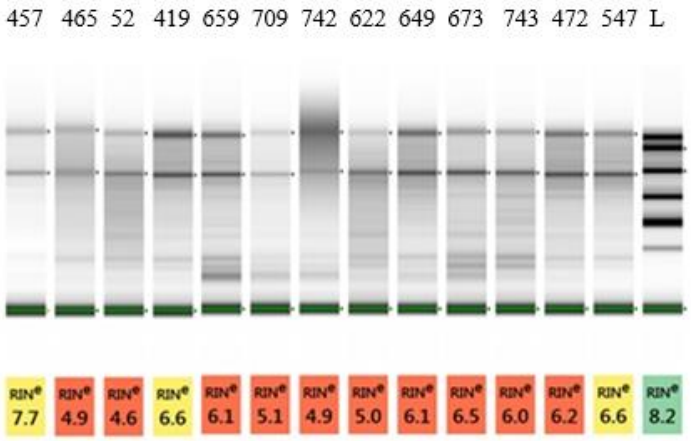
4.6.1. Оптимизиране на изолирането на РНК от простатна тъкан

За изолирането на РНК от радикални простатектомии и от биопсии използвахме китовете на Qiagen. Следвахме инструкциите на производителя. Оптимизирахме стъпката на лизиране. След поставянето на тъканите в лизиращия буфер, за да се подпомогне хомогенизирането, епруветките бяха потапяни за няколко секунди в течен азот и след това бе използван механичен хомогенизатор. За да се осигури възможно най-пълно хомогенизиране пробите бяха оставяни за 5-10 мин на стайна температура на въртящ се вортекс (Multi Speed Vortex MSV-3500, Biosan).

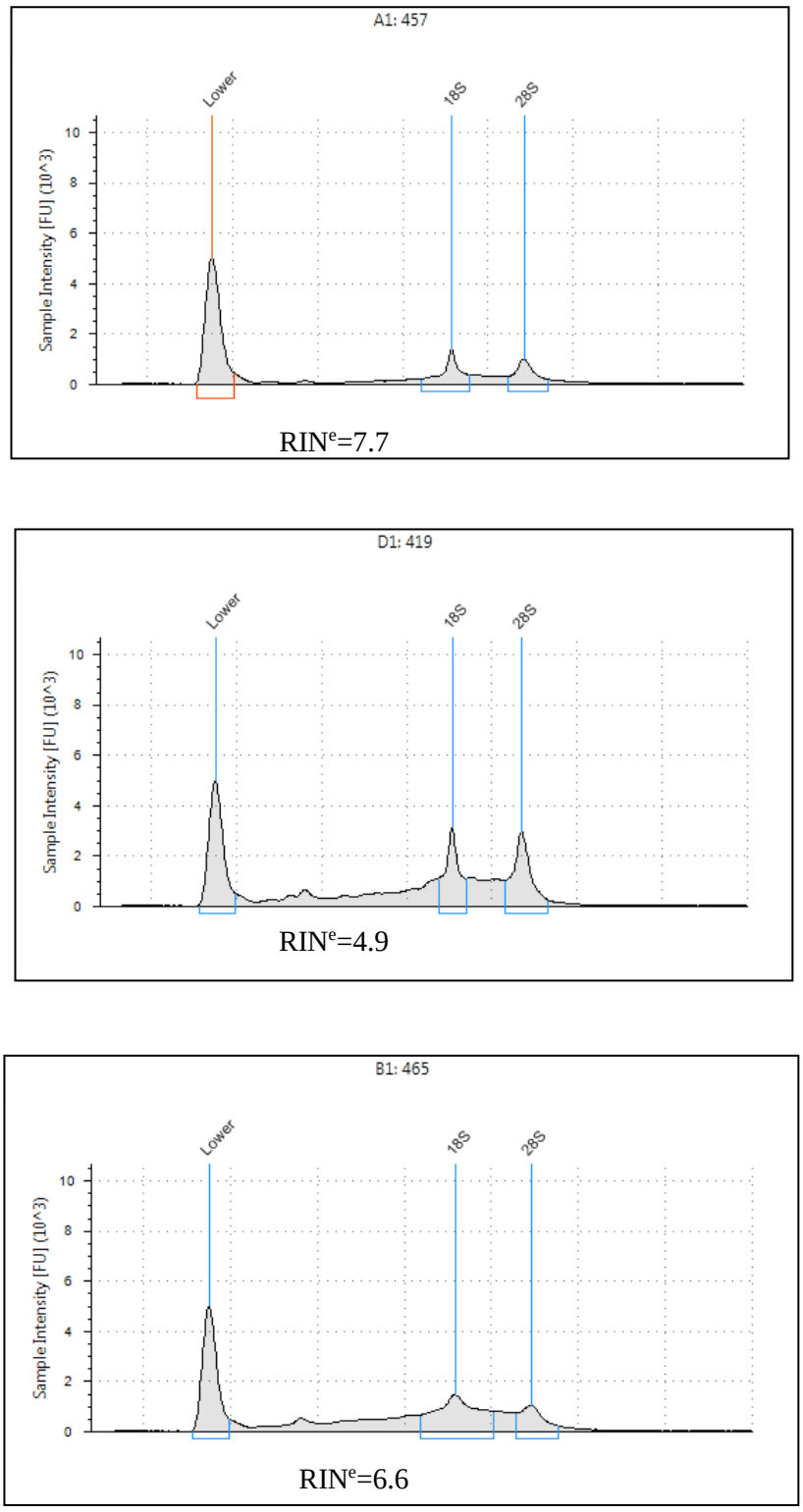
4.6.2. Измерване на концентрацията и определянето на качеството на изолираните РНК с помощта на Nano Drop и Agilent 2200 TapeStation System. Изготвяне на 50 ng/µl разредки за miRNA експресионното профилиране чрез микрочипов анализ.

Концентрациите на изолираните РНК-и от простатните тъкани бяха първоначално определени на NanoDrop, а след това, за да се провери тяхното качество бяха измерени на TapeStation като се следваше протокола на производителя. Концентрациите на РНК стоковете измерени на NanoDrop, изолирани от радикалните простатектомии варират от 200 до 2700 ng/µl, а на биопсиите от контроли с ДПХ от 40 до 190 ng/µl. Проби с концентрации под 50 ng/µl не бяха включени в последващия анализ на експресията на микроРНК-ите. Спрямо определените концентрации на NanoDrop бяха изготвени 50 ng/µl разредки от пробите и тези разредки бяха измерени на TapeStation. Стойностите за RIN^e (RNA integrity number), показващ РНК интегритета, качеството на изолираната РНК, вариране от 4 до 8. За провеждането на микроРНК експресионното профилиране подбрани бяха проби с RIN^e над 6.

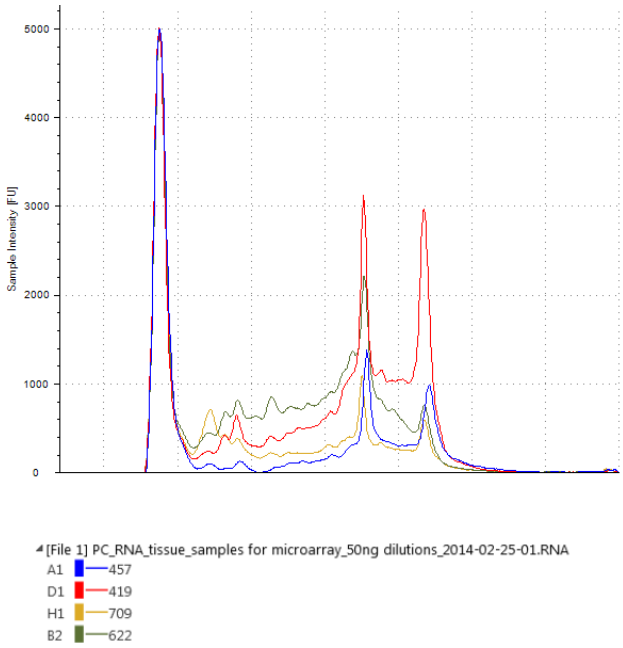
Фигури 4.99, 4.100 и 4.101 представят резултатите получени след анализ със системата TapeStation.



Фигура 4.99. TapeStation снимка на гел с профилите на разделяне на всяка проба и установените стойности за RIN^e. L е молекулен маркер



Фигура 4.100. Електрофореграми на тотална РНК от проби с различни стойности на RIN^e.



Фигура 4.101. Сравнение на електрофореграмите на няколко проби.

4.6.3.Подбор на метод за нормализация на резултатите от микрочиповия анализ

Необходима стъпка при анализа на данните от микрочиповете е тяхната нормализация.

Gene spring софтуерът позволява избор между следните методи за нормализация: Percentile shift, Scale, Quantile, Normalize to control genes, Normalize to External value)

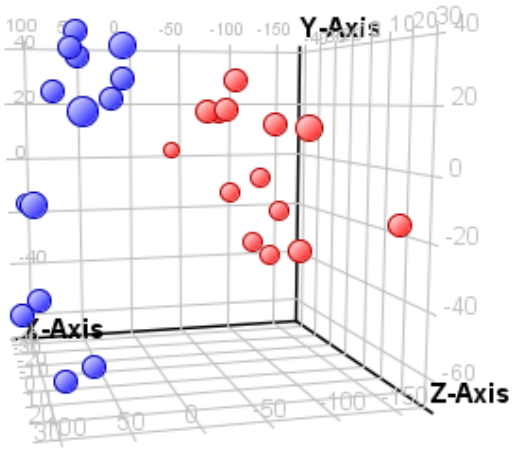
Изборът на подходящ метод за нормализиране на данните от микрочиповете е много важно за отстраняване на варирането и за създаване на възможност за тяхното сравняване [397-399]. Има редица проучвания за анализ на mRNA (иРНК) експресионни микрочипове и са предложени няколко методи за нормализация на miRNA (микроРНК) микрочипове [400-404]. Препоръчан метод от Agilent за нормализация на данните от miRNA (микроРНК) микрочиповете е 90th percentile shift. Този метод за нормализация е използван в редица проучвания [405, 406]. Описан е в раздел 3. Материали и Методи.

4.6.4. Контрол на качеството на резултатите и PCA (principle component analysis- анализ на основните компоненти)

Преди анализирането на резултатите бе осъществена проверка на качеството на отделните полета с проби от микрочиповете. В резултат на този анализ не бяха изключени проби, тъй като всички бяха с добри параметри.

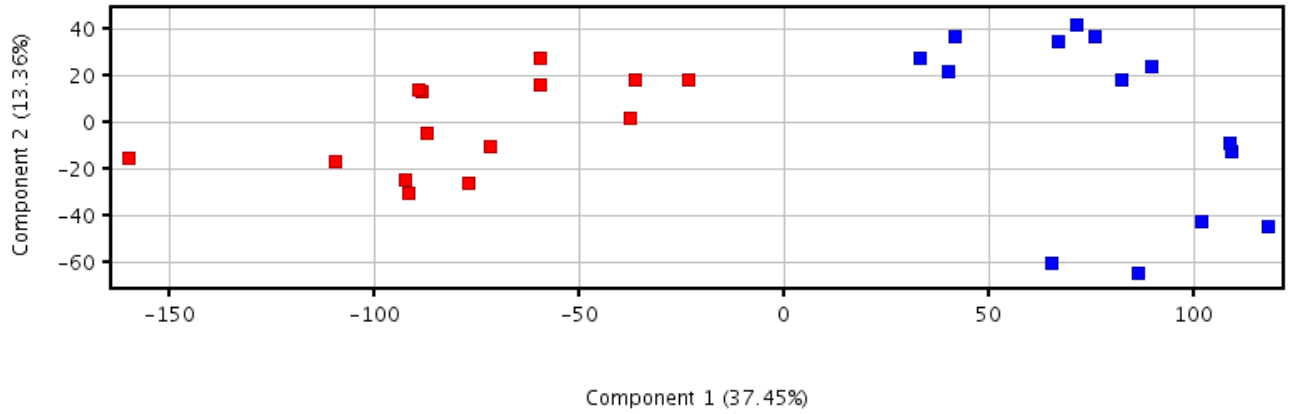
Бе проведен и PCA анализ, в който бяха включени данните от експресионния анализ на микроРНК-и (miRNAs) и данни за диагнозата- РП или ДПХ.

Според очакванията се получиха две основни групи. В едната група се намират всички контроли с ДПХ и петима от пациентите, а в другата всички останали пациенти с РП. За да се открият диференциално експресираните микроРНК-и между туморна и нормална простатна тъкан, изключихме пациентите, които не се разграничават от контролите в PCA. На Фигури 4.102 и 4.103 са показани резултатите от PCA след изключването на пациентите, които не се разграничават от контролите.



X-Axis Component 1 (37.45%) **Y-Axis** Component 2 (13.36%) **Z-Axis** Component 3 (6.48%)

Фигура 4.102. PCA, показващ разграничаването на пациентите и контролите на две групи въз основа на miRNA експресионните профили. Легенда: в червено са отбелязани контролите с ДПХ, а в синьо пациентите с РП.



Фигура 4.103. PCA стойности. Легенда: в червено са отбелязани контролите с ДПХ, а в синьо пациентите с РП.

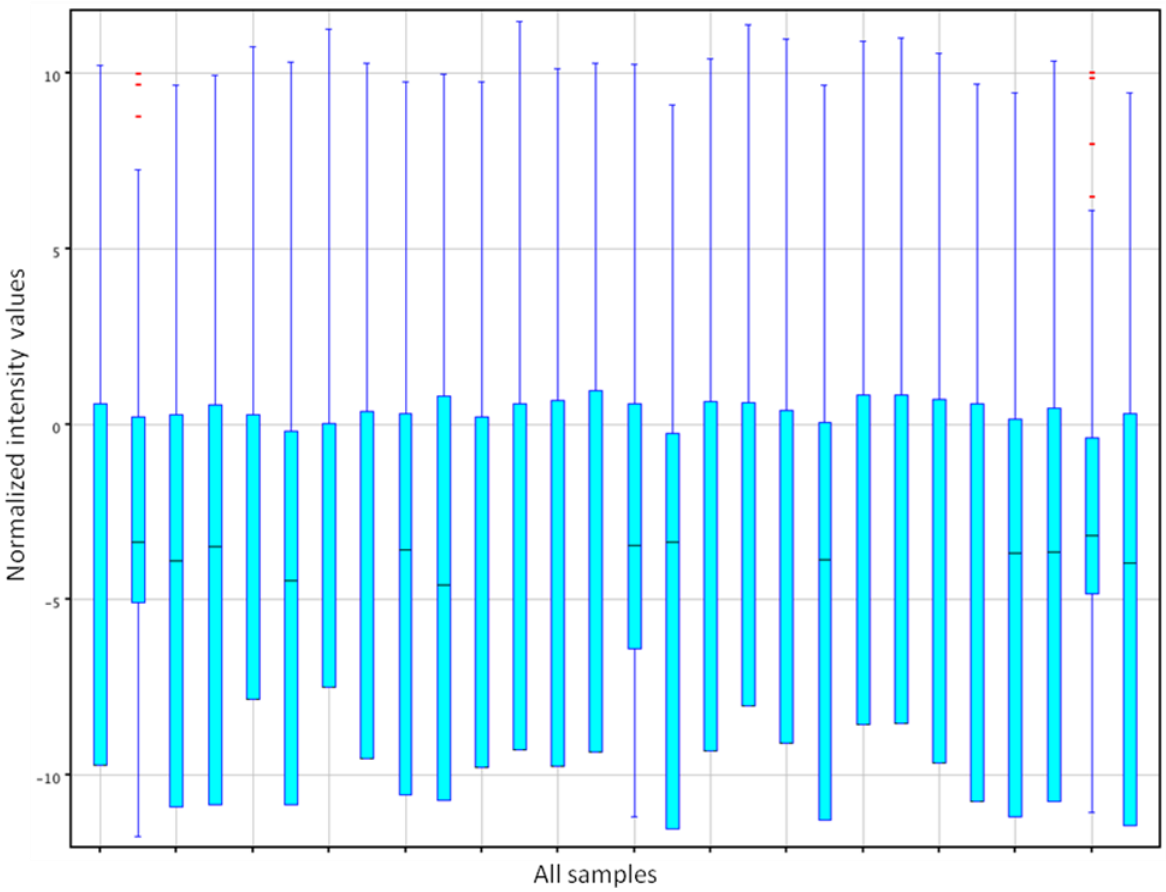
4.6.5. Филтриране на получените резултати

Първоначално филтрирахме микроРНК-ите според това дали са детектирани или не (Filter by Flags). В платформата на Agilent microRNA микрочиповете всяка една miRNA (микроРНК) е представена с няколко копия различни олигонуклеотидни хибридизационни проби [413]. Когато всички повторения на дадена микроРНК са без отчетен сигнал, то стойността за тази микроРНК е 0, а микроРНК-и с отчетен сигнал във всички свои повторения- 1. Тези стойности се отбелязват в колонката gIsGeneDetected. Когато има сигнал само от едно от повторенията на дадена микроРНК, то тази тя се изключва от анализа тъй като резултата не е надежден. След това филтриране микроРНК-и не отпадат.

Осъществихме и филтриране според експресията (Filter Probesets by Expression) върху суровите данни, което ни позволи да се изключат микроРНК-и с много ниски сигнали (интензитети) или тези, които са достигнали максимална сатурация. От 1368 микроРНК-и остават 418.

Последното филтриране, което приложихме е филтриране за грешки (Filter Probesets by Error). Изключихме микроРНК-и с коефициенти на вариране (CV) над 50%, тоест филтрирахме микроРНК-и, които показват вариране, отклонения само в отделни пациенти и/или контроли. Така от 418 останаха 302 микроРНК-и.

Всички проби в Box Whiskers plot (Фигура 4.104) изглеждат сходно и това показва, че няма проби, които да бъдат изключени от анализа поради големите си различия в нормализираните стойности на интензитетите.

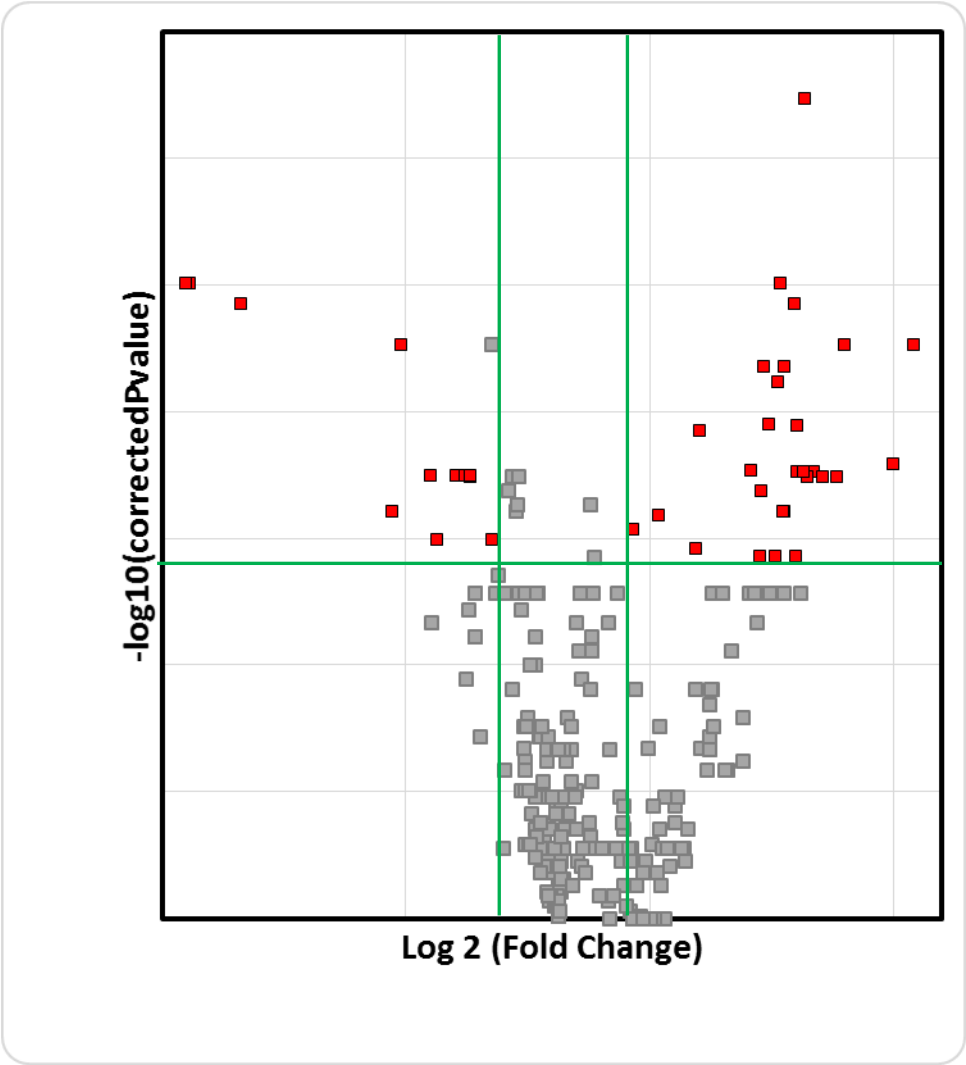


Фигура 4.104. Box Whiskers plot, показващ максималните и минималние стойности на всички проби; едно стандартно отклонение над и под средните стойности

4.6.6. Установяване на miRNAs с променена експресия в туморна простатна тъкан на пациенти с РП в сравнение с нормална тъкан на контроли с ДПХ

При сравнението между miRNA експресионните профили на пациентите и контролите бе използван Mann–Whitney unpaired тест и Benjamini–Hochberg FDR за множествени сравнения. За значими разлики приехме промяна в експресията ≥2 и p стойности <0.05. На Фигура 4.105 е представен Volcano plot, визуализиращ нивата на експресия на микроРНК-ите и статистическата значимост на получените резултати.

Статистически значима повишена експресия показаха 28 микроРНК-и, а 14 показаха статистически значима понижена експресия представени в Таблици 4.66 и 4.67.



Фигура 4.105. Volcano plot анализ на получените резултати

Таблица 4.66. микроРНК-и показали статистически значима повишена експресия в туморна тъкан от радикална простатектомия на пациентите с РП спрямо нормална тъкан на контроли с ДПХ

miRNA наименование	Промяна в експресията (FC)	logFC	p	p коригирана стойност	Номер на miRNA в miRBase
hsa-miR-4317	36.64	5.20	1.64×10^{-6}	5.86×10^{-4}	MIMAT0016872
hsa-miR-3679-3p	25.71	4.68	3.48×10^{-5}	3.11×10^{-3}	MIMAT0018105
hsa-miR-382	31.67	4.98	7.29×10^{-5}	3.77×10^{-3}	MIMAT0000737
hsa-miR-500a	20.43	4.35	1.67×10^{-4}	6.64×10^{-3}	MIMAT0004773
hsa-miR-99a*	27.27	4.77	1.54×10^{-4}	6.64×10^{-3}	MIMAT0004511
hsa-miR-17*	63.79	5.99	5.55×10^{-5}	7.54×10^{-3}	MIMAT0000071
hsa-miR-340	172.57	7.43	5.55×10^{-5}	7.54×10^{-3}	MIMAT0004692
hsa-miR-423-3p	24.78	4.63	2.14×10^{-4}	7.65×10^{-3}	MIMAT0001340
hsa-miR-29b-1*	22.06	4.46	3.48×10^{-4}	0.011	MIMAT0004514
hsa-miR-299-5p	33.07	5.05	3.83×10^{-4}	0.011	MIMAT0002890
hsa-miR-181c	8.26	3.05	1.98×10^{-4}	0.016	MIMAT0000258
hsa-miR-505*	17.02	4.09	6.19×10^{-4}	0.017	MIMAT0004776
hsa-miR-21*	128.76	7.01	3.22×10^{-4}	0.022	MIMAT0004494
hsa-miR-126*	41.47	5.37	5.15×10^{-4}	0.024	MIMAT0000444
hsa-miR-502-3p	32.76	5.04	4.08×10^{-4}	0.024	MIMAT0004775
hsa-miR-664	36.06	5.17	5.15×10^{-4}	0.024	MIMAT0005949
hsa-miR-24-1*	37.98	5.25	1.26×10^{-3}	0.025	MIMAT0000079
hsa-miR-362-3p	47.21	5.56	1.26×10^{-3}	0.025	MIMAT0004683
hsa-miR-590-5p	57.29	5.84	1.26×10^{-3}	0.025	MIMAT0003258
hsa-miR-150*	4.59	2.20	1.01×10^{-3}	0.025	MIMAT0004610
hsa-miR-362-5p	19.51	4.29	1.56×10^{-3}	0.028	MIMAT0000705
hsa-miR-381	27.27	4.77	2.37×10^{-3}	0.032	MIMAT0000736
hsa-miR-500a*	26.80	4.74	2.37×10^{-3}	0.032	MIMAT0002871
hsa-miR-186	3.19	1.67	2.91×10^{-3}	0.038	MIMAT0000456
hsa-miR-181d	7.74	2.95	3.56×10^{-3}	0.044	MIMAT0002821
hsa-miR-130b	32.01	5.00	4.33×10^{-3}	0.046	MIMAT0000691
hsa-miR-194	23.95	4.58	4.33×10^{-3}	0.046	MIMAT0000460
hsa-miR-582-5p	19.33	4.27	4.33×10^{-3}	0.046	MIMAT0003247

Таблица 4.67. микроРНК-и показали статистически значима понижена експресия в туморна тъкан от радикална простатектомия на пациентите с РП спрямо нормална тъкан от tru-cut биопсия на контроли с ДПХ

miRNA наименование	Промяна в експресията (FC)	logFC	p	p коригирана стойност	Номер на miRNA в miRBase
hsa-miR-196a	-172.17	-7.43	3.08×10^{-5}	3.11×10^{-3}	MIMAT0000226
hsa-miR-3180-5p	-181.39	-7.50	2.96×10^{-5}	3.11×10^{-3}	MIMAT0015057
hsa-miR-634	-83.97	-6.39	5.59×10^{-5}	3.77×10^{-3}	MIMAT0003304
hsa-miR-3147	-8.46	-3.08	5.55×10^{-5}	7.54×10^{-3}	MIMAT0015019
hsa-miR-1234	-3.57	-1.84	1.01×10^{-3}	0.025	MIMAT0005589
hsa-miR-144	-3.31	-1.73	1.01×10^{-3}	0.025	MIMAT0000436
hsa-miR-3682	-3.91	-1.97	0.001013	0.025	MIMAT0018110
hsa-miR-4253	-3.45	-1.79	1.01×10^{-3}	0.025	MIMAT0016882
hsa-miR-483-3p	-3.18	-1.67	1.01×10^{-3}	0.025	MIMAT0002173
hsa-miR-650	-5.63	-2.49	8.11×10^{-4}	0.025	MIMAT0003320
hsa-miR-215	-3.21	-1.68	1.26×10^{-3}	0.026	MIMAT0000272
hsa-miR-486-5p	-9.69	-3.28	2.38×10^{-3}	0.032	MIMAT0002177
hsa-miR-484	-2.35	-1.23	1.43×10^{-3}	0.032	MIMAT0002174
hsa-miR-494	-5.13	-2.36	1.40×10^{-3}	0.032	MIMAT0002816

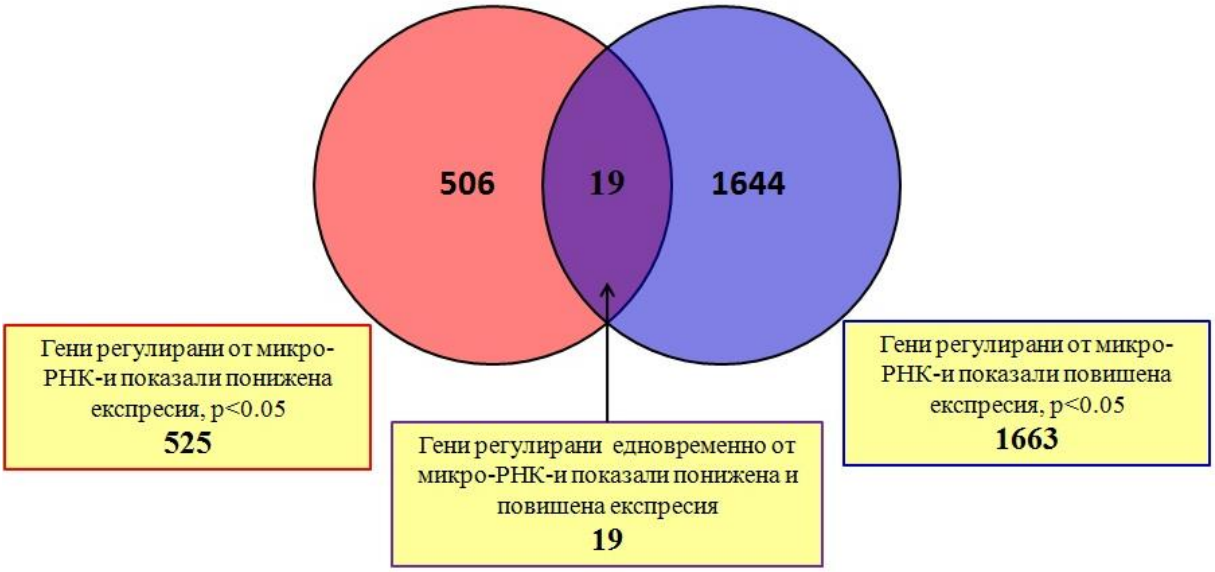
От микроРНК-ите с повишена експресия 4 показват промяна от 3-8 пъти, а при останалите микроРНК-и промяната е значителна и е над 17 пъти. От микроРНК-ите с понижена експресия три показват над 80 пъти променена експресия, а при останалите промяната е от 2 до 9 пъти.

Корелация на експресията на микроРНК-ите с клиникопатлогичните характеристики не бе установена вероятно поради малката група изследвани пациенти и котнроли.

4.6.7. Определяне на таргетните гени регулирани от микроРНК-ите показали статистически значима променена експресия. Установяване на повлияните клетъчни пътища

Установяването на таргетните гени регулирани от диференциално експресираните микроРНК-и, както и клетъчните пътища, в които участват бе осъществено с помощта на Gene Spring.

Бяха подбрани само тези гени, които статистически значимо се повлияват от диференциално експресираните микроРНК-и. Статистически значимо повлияни от микроРНК-и с понижена експресия са 525 гена, а от тези с повишена експресия са 1663 гена. Част от гените (19) се повлияват едновременно от микроРНК-ите с повишена и понижена експресия (Фигура 4.106).



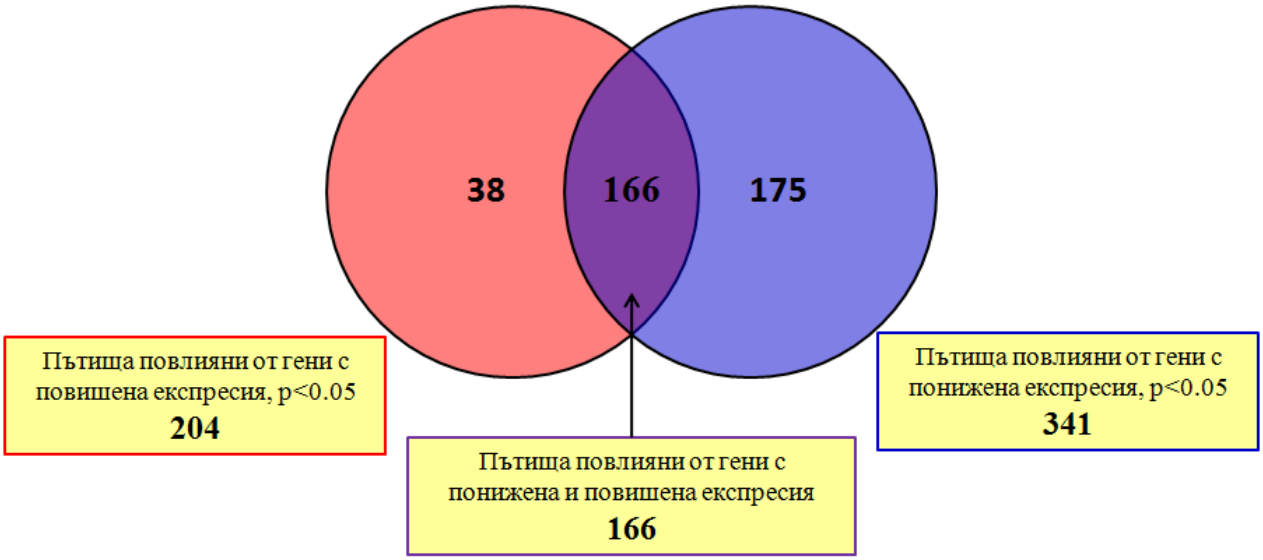
Фигура 4.106. Venn диаграма, показваща гените регулирани от мирко-РНК-ите с повишена и с понижена експресия

Гените с предполагаема повишена експресия, регулирани съответно от микроРНК-ите с установена понижена експресия статистически значимо повлияват 204 клетъчни пътя. Гените с предполагаема понижена експресия, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия статистически значимо повлияват 341 клетъчни пътя (Таблица 4.68).

Таблица 4.68. Брой установени диференциално експресирани miRNAs, брой статистически значимо повлияни таргетни гени и пътища.

Брой диференциално експресирани miRNAs	Брой установени статистически значимо повлияни гени	Брой статистически значимо повлияни клетъчни пътища
28 miRNAs с повишена експресия	1663	204
14 miRNAs с понижена експресия	525	341

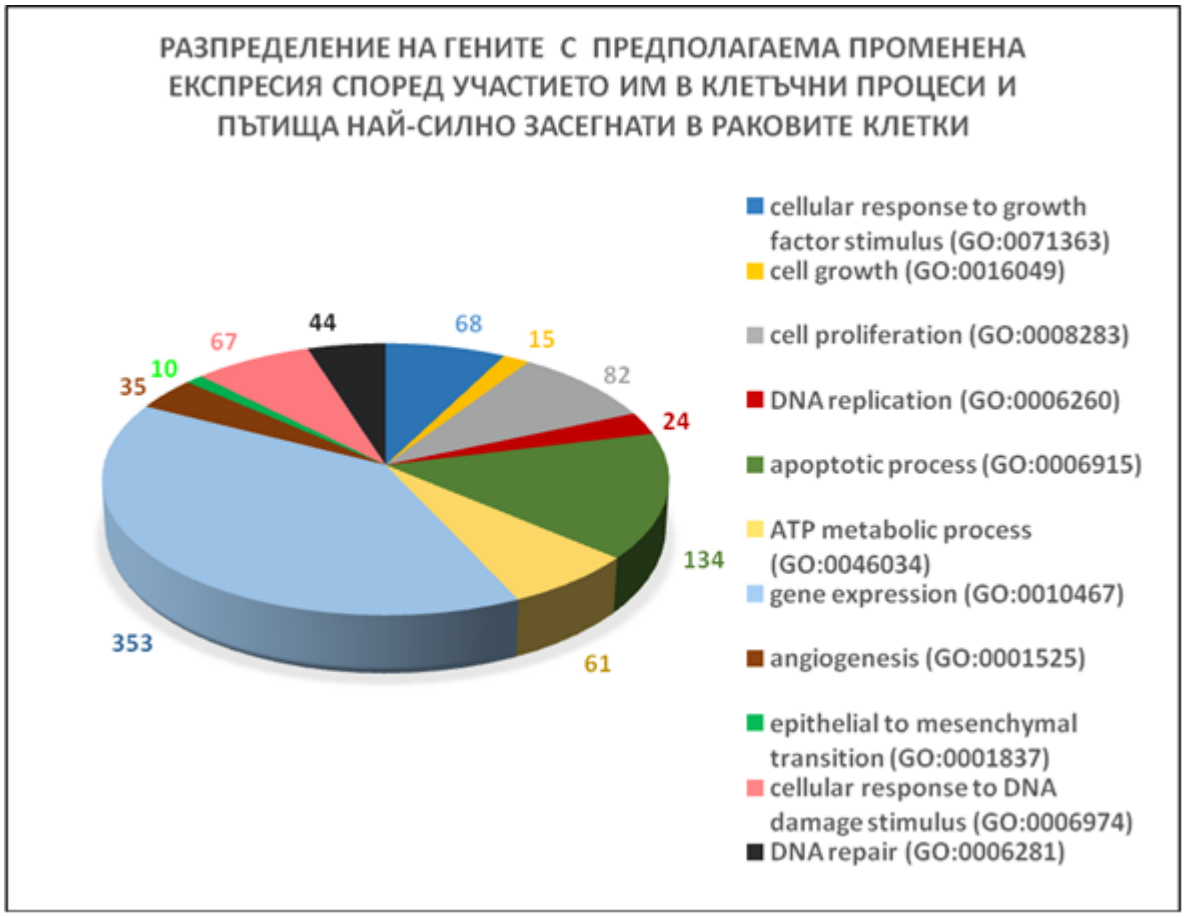
Част от пътищата са повлияни едновременно от гени с предполагаема повишена и понижена експресия (Фигура 4.107), съответно регулирани от микроРНК-и с понижена и повишена експресия. Друга част от пътищата са повлияни само то гени с повишена или понижена експресия.



Фигура 4.107. Venn диаграма, показваща засегнатите пътища от гени с предполагаема повишена и понижена експресия

4.6.8. Онтологичен анализ

Проведохме онтологичен анализ и избрахме основните клетъчни процеси и пътища променени в раковите клетки, за да определим разпределението на таргетните гени в тях (Фигура 4.108). Изборът на клетъчните пътища и процеси направихме, базирайки се на основните характеристики на раковите клетки, които са определени от Hanahan и съавтори - самодостатъчност по отношение на растежни фактори; нечувствителност към сигнали, потискащи клетъчния растеж; избягване на апоптоза; неограничен репликативен потенциал; активиране на ангиогенезата; тъканна инвазивност и метастазиране; репрограмиране на клетъчния метаболизъм [414, 415]. Подбраните клетъчни процеси и пътища са следните: клетъчен растеж, пролиферация, ДНК репликация, апоптоза, клетъчен отговор към растежни стимули, генната експресия, АТФ метаболитни процеси, клетъчен отговор към ДНК повреди, ДНК поправка, ангиогенеза и епително мезенхимна транзиция. Най-много таргетни гени регулирани от установените в текущото изследване диференциално експресирани микроРНК-и участват в генната експресия, апоптозата, клетъчната пролиферация, клетъчния отговор към растежни стимули и ДНК повреди, и АТФ метаболитните процеси (Фигура 4.108). Най-малко засегнати гени са тези, участващи в епително-мезенхимната транзиция, тъй като включените в проучването пациентите при провеждането на радикална простатектомия нямат наличие на метастази, а само в двама се откриват метастази след операцията.



Фигура 4.108.

4.6.9. Най-силно засегнати и важни за раковите клетки пътища повлияни от показалите диференциална експресия микроРНК-и, регулиращи участници в тях

4.6.9.1. MAPK сигнален път

В този път са засегнати общо 26 таргетни гена (от общо 168) като от тях 23 са регулирани от показалите увеличена експресия микроРНК-и и 3 са регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия (Таблица 4.69). Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са *MAP3K1* (*MEKK1*), *IL1A* и *MRAS*. Важни таргети на микроРНК-ите с повишена експресия са *NLK*, *TGFBR1*, *TGFB2*, *FAS*, *FASLG*, *GADD45A*, *DUSP10*, NF1. Тези белтъчни продукти участват и в други сигнални пътища като например тези свързани с апоптозата, TGF-β сигналния път, контрола на клетъчния цикъл и тн.

Най- много микроРНК-и с повишена експресия регулират *NF1* (23 бр.), *NLK* (19 бр.), *FAS* (16 бр.), а така също и *TGFB2* (17 бр.) и *TGFBR1* (15 бр.).

Таблица 4.69. Важни участници в MAPK сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират.

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК показали диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
MRAS	**повишена**	7	miR-3180-5p, miR-484, miR-486-5p, miR-196a, miR-3682, miR-144, miR-494
MAP3K1	**повишена**	9	miR-215, miR-3180-5p, miR-486-5p, miR-196a, miR-4253, miR-634, miR-650, miR-144, miR-494
IL1A	**повишена**	6	miR-3180-5p, miR-484, miR-3147, miR-196a, miR-144, miR-494
FAS	**понижена**	16	miR-340, miR-181c, miR-4317, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-126*, miR-194, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-505*
FASLG	**понижена**	10	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-590-5p, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-181d, miR-502-3p
NLK	**понижена**	19	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-21*, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-502-3p, miR-505*, miR-99a*
ATF2	**понижена**	13	miR-340, miR-181c, miR-582-5p, miR-382, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-505*
DUSP10	**понижена**	12	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-21*, miR-186, miR-194, miR-181d, miR-500a, miR-29b-1*
GADD45A	**понижена**	10	miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-382, miR-381, miR-362-5p, miR-181d, miR-130b, miR-500a, miR-29b-1*
TGFB2	**понижена**	17	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-3679-3p, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-126*, miR-186, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-500a, miR-29b-1*
TGFBR1	**понижена**	15	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-362-5p, miR-664, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-126*, miR-186, miR-24-1*, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-500a
NF1	**понижена**	23	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-3679-3p, miR-21*, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p, miR-500a, miR-99a*, miR-29b-1*

4.6.9.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза

Сигналните пътища свързани с клетъчната смърт са по-силно повлияни от микроРНК-ите, показващи повишена експресия. В Таблица 4.70 са представени статистически най-значимо повлияните гени. Общо 16 участника са потенциално инхибирани, а 7 са активирани (Таблица 4.70). Голяма част от инхибираните участници са гени, активиращи апоптозата и по тази причина тя най-вероятно е потисната.

Мишени на микроРНК-ите с повишена експресия са: *APAF1*, *FAS*, *FASL*, *DAXX*, *CASP11* (*SFRS2IP*; *SIP1*; *SCAF11*), *PTK2*, *ROCK1*, *BFL1* (*BCL2A1*), *HSPA1A*, *ARHGAP10*, *DCC*, *APPL1*, *MAP2K4*, *DSG1*, *SATB1*.

Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са: *DFFA*, *BBC3* (*PUMA*), *BIRC5* (Survivin), *UNC5A*, *TOLLIP*, *MAP3K1*, *IL1A*.

Таблица 4.70. Важни участници в апоптозата с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК показали диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
MAP3K1	**повишена**	9	Вече показани
IL1A	**повишена**	6	Вече показани
DFFA	**повишена**	6	miR-650, miR-484, miR-196a, miR-3682, miR-4253, miR-1234
BBC3	**повишена**	6	miR-3180-5p, miR-484, miR-494, miR-483-3p, miR-196a, miR-144
BIRC5 (Survivin)	**повишена**	9	miR-3180-5p, miR-650, miR-484, miR-483-3p, miR-3147, miR-144, miR-494, miR-1234, miR-634
UNC5A	**повишена**	5	miR-650, miR-3147, miR-1234, miR-634, miR-144
TOLLIP	**повишена**	5	miR-3180-5p, miR-483-3p, miR-3147, miR-1234, miR-144
FAS	**понижена**	16	Вече показани
FASLG	**понижена**	10	Вече показани
APAF1	**понижена**	11	miR-340, miR-664, miR-590-5p, miR-500a*, miR-381, miR-4317, miR-186, miR-24-1*, miR-130b, miR-502-3p, miR-505*
CASP11	**понижена**	17	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-4317, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-590-5p, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-502-3p, miR-500a
PTK2	**понижена**	12	miR-340, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-4317, miR-21*, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-423-3p
ROCK1	**понижена**	14	miR-340, miR-181c, miR-3679-3p, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-29b-1*

BFL1 (BCL2A1)	**понижена**	5	miR-181c, miR-382, miR-664, miR-381, miR-181d
HSPA1A	**понижена**	6	miR-340, miR-186, miR-582-5p, miR-181c, miR-664, miR-181d
ARHGAP10	**понижена**	10	miR-340, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-194, miR-29b-1*
DCC	**понижена**	16	miR-181c, miR-299-5p, miR-382, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-194, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-502-3p, miR-505*, miR-500a, miR-29b-1*
APPL1	**понижена**	13	miR-340, miR-362-3p, miR-664, miR-590-5p, miR-4317, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-29b-1*
MAP2K4	**понижена**	14	miR-340, miR-181c, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-582-5p, miR-382, miR-381, miR-186, miR-194, miR-24-1*, miR-150*, miR-181d, miR-502-3p, miR-500a
OCLN	**понижена**	7	miR-126*, miR-340, miR-362-5p, miR-194, miR-582-5p, miR-500a, miR-381
SATB1	**понижена**	19	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-4317, miR-362-5p, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p, miR-500a, miR-29b-1*
DSG1 (Desmoglein 1)	**понижена**	10	miR-362-3p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-130b, miR-500a
DAXX	**понижена**	5	miR-21*, miR-126*, miR-340, miR-186, miR-590-5p

4.6.9.3. Wnt сигнален път

Участници в този път, регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия са: *WNT4*, *WNT6*, *WNT5B*, *FZD2* и *RACGAP1*. Участниците реуглирани от микроРНК-ите с увеличена експресия са: *PAFAH1B1*, *PRKCE*, *PPP2R5E*, *PRKD1* и *NLK*. От тези таргетни гени PRKCE не се експресира нито в нормална, нито в туморна простатна тъкан и следователно е случайна мишена.

Таблица 4.71. Важни участници в Wnt сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
WNT4	**повишена**	6	miR-3180-5p, miR-650, miR-484, miR-4253, miR-1234, miR-634
WNT6	**повишена**	3	miR-3180-5p, miR-486-5p, miR-3147
WNT5B	**повишена**	5	miR-3180-5p, miR-484, miR-483-3p, miR-634, miR-144
FZD2	**повишена**	5	miR-494, miR-483-3p, miR-3147, miR-1234, miR-634
RACGAP1	**повишена**	6	miR-215, miR-650, miR-3147, miR-196a, miR-3682, miR-634
PAFAH1B1	**понижена**	18	miR-340, miR-181c, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p, miR-500a, miR-99a*
PPP2R5E	**понижена**	17	miR-340, miR-181c, miR-21*, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-24-1*, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p, miR-505*, miR-500a
PRKD1	**понижена**	13	miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-181d, miR-130b, miR-99a*
NLK	**понижена**	19	Вече показани

4.6.9.4. Клетъчен цикъл

Част от гените като *GADD45A* и др, участващи в контрола на клетъчния цикъл, регулирани от показалите диференциална експресия микроРНК-и са участници и в други сигнални пътища, които са разгледани.

Мишени на микроРНК-ите с повишена експресия са и гените: *HDAC8*, *PTTG1* (securin), *MAD2L1* (*MAD2*), *BUB3*, *FBXO5* (Emi1). Те най-вероятно са с понижена експресия.

Мишена на микроРНК-ите с понижена експресия е *MAD2L2* (*MAD2B*).

Най-силно повлияни са гените *HDAC8* и *BUB3*.

MAD2B и MAD2 са хомоложни и изпълняват еднакви функции в клетката. И двата гена се експресират в простатната жлеза. По-силно е повлиян *MAD2*, тъй като той се регулира от 9, а неговия хомолог *MAD2B* от 4 микроРНК-и. В допълнение микроРНК-ите, регулиращи MAD2 са с по-силно променена експресия в сравнение с микроРНК-ите, регулиращи MAD2B.

Друг не пряк регулатор на клетъчния цикъл, чиято експресия се регулира от диференциално експресираните микроРНК е PTEN. Шест микро РНК-и (miR-340, miR-181c,

miR-181d, miR-17*, miR-29b-1* и miR-186) от показалите повишена експресия и 3 (miR-144, miR-486, miR-494) от показалите понижена експресия регулират този туморсупресорния ген, но в анализа не се достига статистическа значимост. Най-вероятно е обаче неговата експресия да е инхибирана. микроРНК-ите, които го регулират са валидирани (E17).

Таблица 4.72. Важни участници в клетъчния цикъл с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
MAD2L2 (MAD2B)	**повишена**	4	miR-494, miR-4253, miR-650, miR-144
HDAC8	**понижена**	16	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-21*, miR-362-5p, miR-664, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-126*, miR-194, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-500a, miR-29b-1*
BUB3	**понижена**	13	miR-340, miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-500a*, miR-126*, miR-186, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p, miR-29b-1*
MAD2 (MAD2L1)	**понижена**	9	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-582-5p, miR-4317, miR-126*, miR-362-5p, miR-150*, miR-29b-1*
FBXO5 (Emi 1)	**понижена**	7	miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-181d, miR-590-5p, miR-382, miR-381
Securin (PTTG1)	**понижена**	5	miR-126*, miR-590-5p, miR-362-3p, miR-186, miR-381

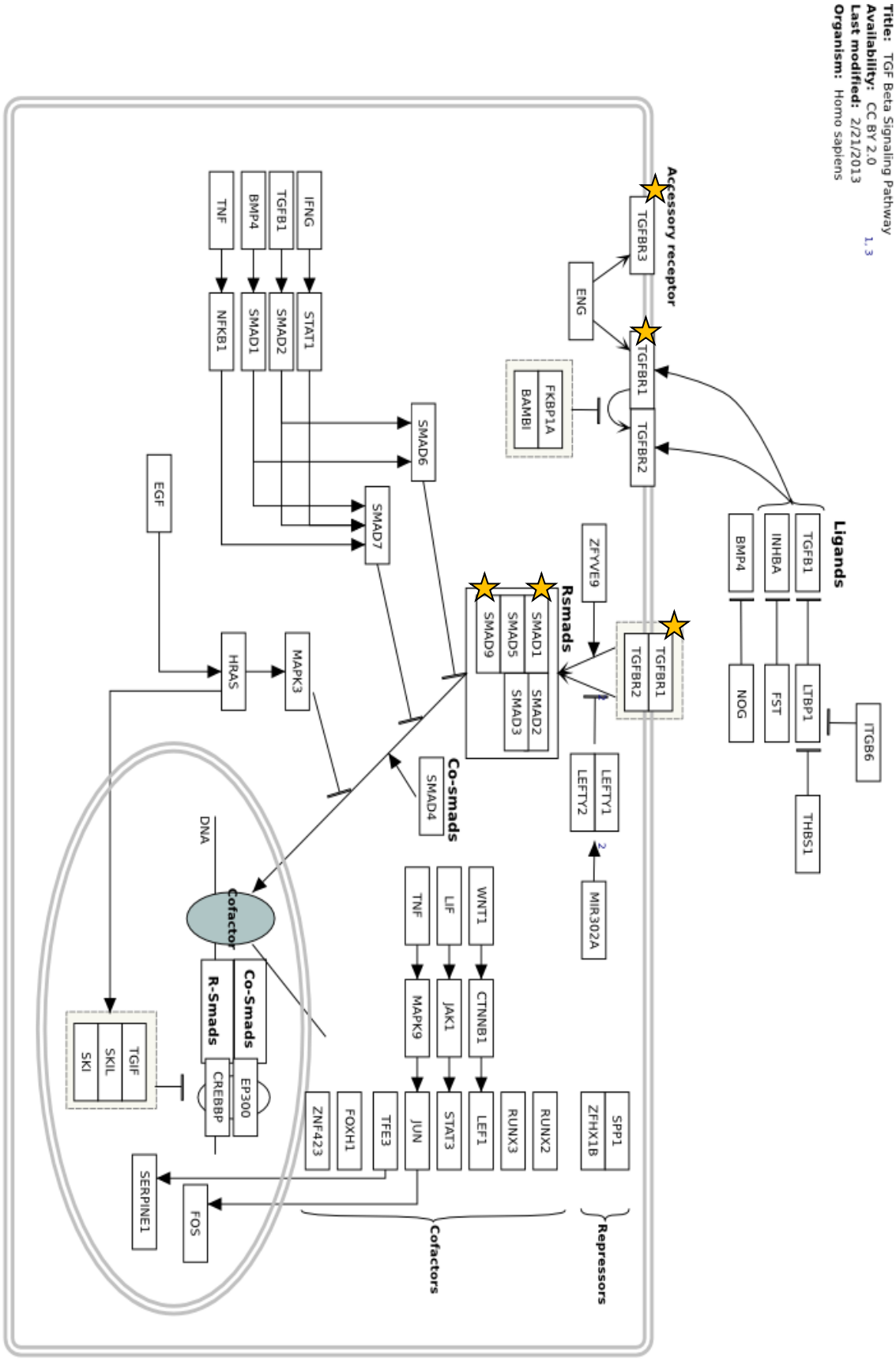
4.6.9.5. TGF-β сигнален път

Гени, участващи в TGF-β сигналния път и регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия са: TGF*B2*, *TGFBR1*, *TGFBR3*, *ATF2*, *SMAD1*, *SMAD9*. Мишени на микроРНК-ите с понижена експресия са: *SNX4* и *SNX11*.

Най-много микроРНК-и регулират *TGFB2* (17 бр.), *TGFBR1* (15 бр.) и *TGFBR3* (14 бр.).

Таблица 4.73. Важни участници в TGF-β сигнален път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
TGFB2	**понижена**	17	Вече показани
TGFBR1	**понижена**	15	Вече показани
TGFBR3	**понижена**	14	miR-340, miR-181c, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-502-3p
ATF2	**понижена**	13	Вече показани
SMAD1	**понижена**	10	miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-130b
SMAD9	**понижена**	10	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-381, miR-362-5p, miR-194, miR-181d, miR-130b
SNX4	**повишена**	7	miR-650, miR-484, miR-196a, miR-144, miR-4253, miR-494, miR-634
STK11	**повишена**	3	miR-483-3p, miR-650, miR-3682



Фигура 4.109.TGF-β сигнален път. Със звездички са показани част от гените, участващи в този сигнален път и регулирани от микроРНК-ите с променена експресия

4.6.9.6. NOTCH сигнален път

В NOTCH сигналния път гените *NOTCH4*, *FURIN* и *CIR* (*KCNJ5*, *GIRK4*; KATP1; *LQT13*; *KIR3*.4) са повлияни от микроРНК-ите показали понижена експресия, а *HEY1* и *NOTCH3* се регулират от микроРНК-ите с повишена експресия.

Таблица 4.74. Важни участници в NOTCH сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
NOTCH4	**повишена**	7	miR-215, miR-3180-5p, miR-650, miR-486-5p, miR-483-3p, miR-4253, miR-494
FURIN	**повишена**	6	miR-215, miR-4253, miR-650, miR-483-3p, miR-1234, miR-634
CIR	**повишена**	5	miR-215, miR-4253, miR-484, miR-196a, miR-1234
NOTCH3	**понижена**	8	miR-186, miR-181c, miR-24-1*, miR-664, miR-150*, miR-181d, miR-382, miR-381
HEY1	**понижена**	13	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-299-5p, miR-3679-3p, miR-381, miR-21*, miR-186, miR-362-5p, miR-181d, miR-502-3p, miR-500a, miR-29b-1*

4.6.9.7. Toll-like receptor сигнален път

От Toll-like рецепторния път експресията на *TLR4* е вероятно силно повлияна, тъй като той се регулира от 12 микроРНК-и показали повишена експресия.

Таблица 4.75. *TLR4*, участник в Toll-like receptor сигналния път и микроРНК-ите с повишена експресия, които го регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
TLR4	**понижена**	12	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-590-5p, miR-3679-3p, miR-21*, miR-126*, miR-362-5p, miR-17*, miR-181d, miR-130b, miR-500a

4.6.9.8. Поправка на ДНК повреди

Гените повлияни с диференциална експресия и участващи в ДНК поправката са: MSH2 част от MMR и гените: *TDG, LIG3, NTHL1* (*NTH1*; *OCTS3*) част от BER. Най-силно повлиян е *MSH2*.

Таблица 4.76. Важни гени, участващи в ДНК поправката с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

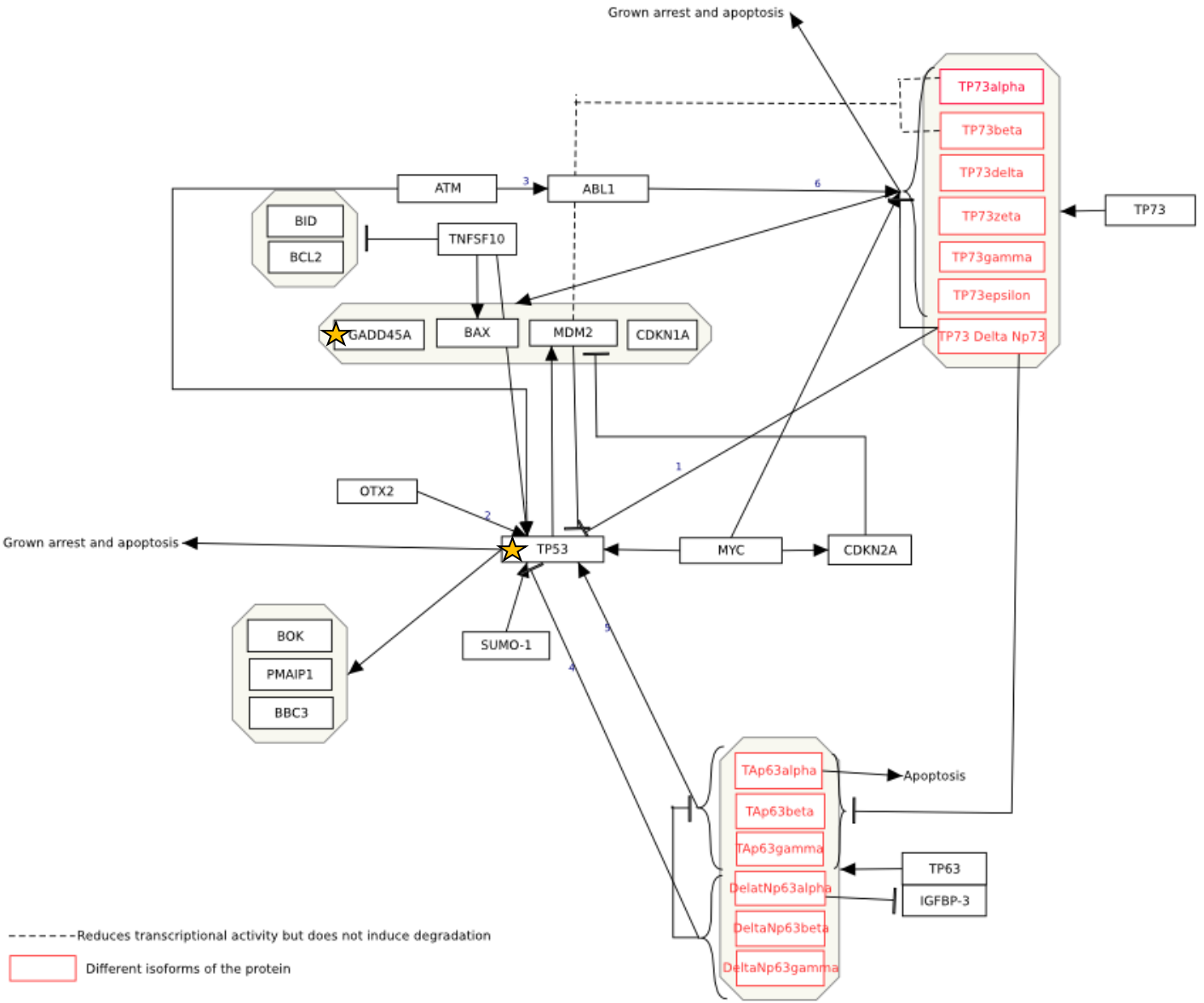
Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
MSH2	**понижена**	16	miR-340, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-381, miR-4317, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-17*, miR-181d, miR-29b-1*
TDG	**понижена**	12	miR-340, miR-362-3p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-3679-3p, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-17*, miR-99a*, miR-29b-1*
LIG3	**понижена**	8	miR-126*, miR-340, miR-186, miR-664, miR-181d, miR-130b, miR-3679-3p, miR-381
NTHL1	**понижена**	2	miR-362-3p, miR-590-5p

4.6.9.9. P53 сигнален път

В този път са засегнати най-силно са *GADD45A* и *TP53*.

Таблица 4.77. Важни гени, участващи в p53 сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
TP53	**понижена**	7	miR-340, miR-381, miR-21*, miR-186, miR-362-5p, miR-181d, miR-130b
GADD45A	**понижена**	10	Вече показани



Фигура 4.110. TP53 сигнален път. Със звездички са обозначени гените регулирани от микроРНК-ите показали диференциална промяна в експресията

4.6.9.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране

Участници в гликозилирането и мишени на микроРНК-ите с намалена експресия са *DOLPP1* и *MGAT3*.

Таблица 4.78. Важни гени, участващи в аспаргин- N- свързаното гликозилиране, с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

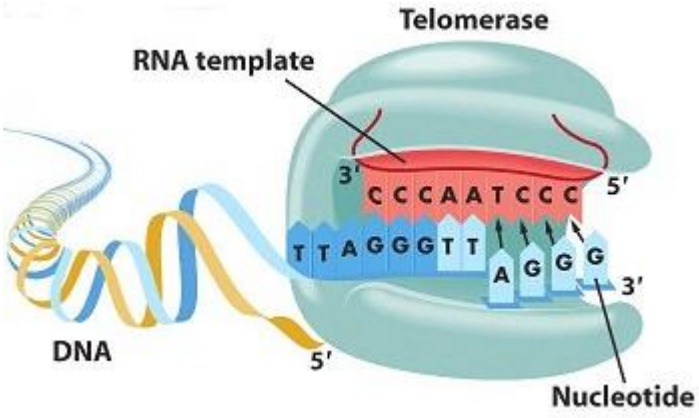
Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
DOLPP1	**повишена**	6	miR-650, miR-484, miR-483-3p, miR-3147, miR-144, miR-494
MGAT3	**повишена**	5	miR-4253, miR-484, miR-483-3p, miR-1234, miR-3682

4.6.9.11. Поддържане на теломерите

Експресията на *TERT*, участващ в поддържането на теломерите е вероятно с повишена експресия в изследваните простатни тумори вследствие на понижени нива на микроРНК-и, които го регулират. На Фигура 4.111 е представена основната функция на TERT.

Таблица 4.79. TERT, участващ в поддържането на теломерите и микроРНК показали понижена експресия, които го регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
TERT	**повишена**	4	miR-484, miR-483-3p, miR-1234, miR-144



Фигура 4.111. Удължаване на краищата на хромозомите с помощта на теломеразната активност на TERT.

4.6.9.12. EGF-EGFR сигнален път

Гени, участващи в EGF-EGFR сигналния път и които се регулират от микроРНК-ите показали диференциална експресия са следните: *ABI1* (*SSH3BP1*), *BCAR1* и MAP3K1. Най-силно е повлияна експресията на *ABI1*, тъй като е мишена на 13 микроРНК-и с повишена експресия (Таблица 4.80).

Таблица 4.80. Гени, участващи в EGF-EGFR сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

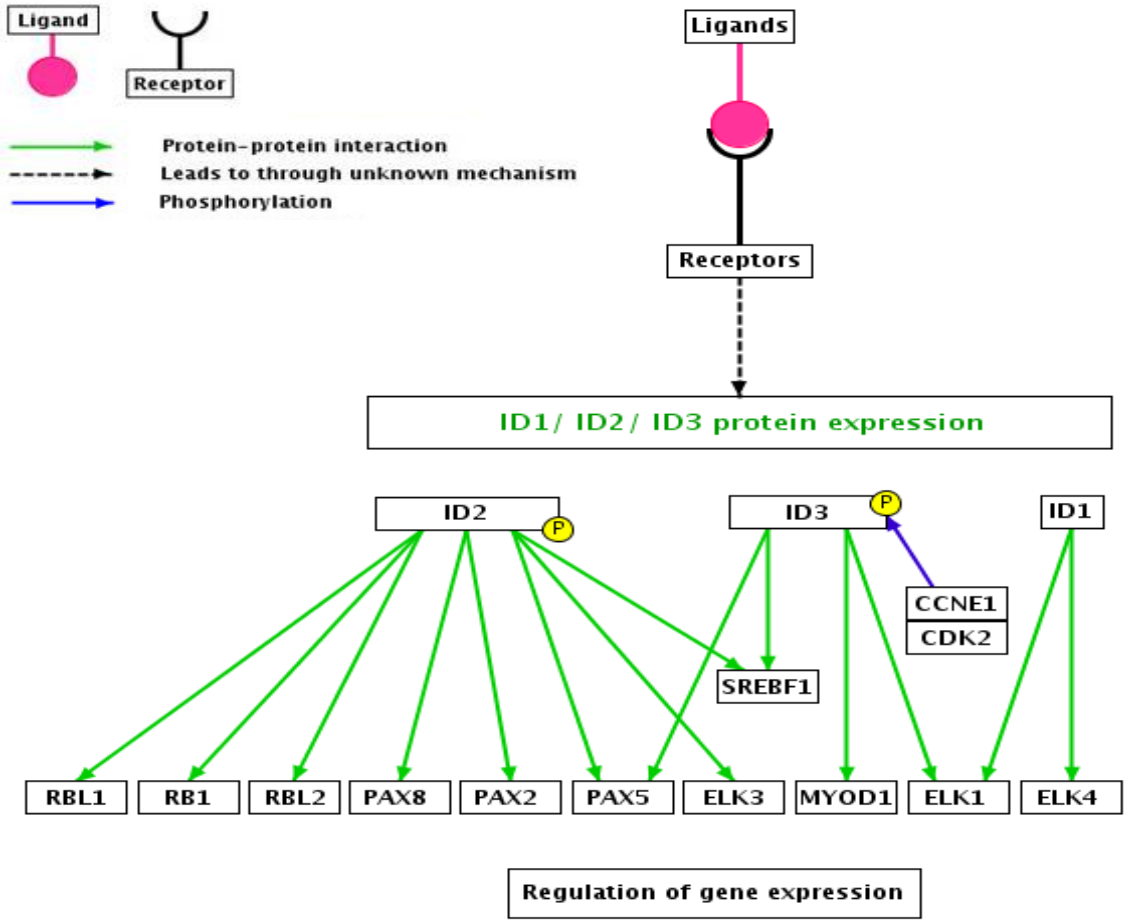
Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
ABI1	**понижена**	13	miR-340, miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-3679-3p, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-194, miR-24-1*, miR-150*, miR-181d, miR-500a
BCAR1	**повишена**	3	miR-484, miR-4253, miR-650
MAP3K1	**повишена**	9	Вече показани

4.6.9.13. ID сигнален път

В нашето проучване диференциално експресираните микроРНК регулират следните гени, участващи в ID сигнализирането: *ID4*, *SREBF1* и *PAX5*. В този сигнален път най-много микроРНК-и регулират *ID4* (Таблица 4.81).

Таблица 4.81. Важни гени, участващи в ID сигналния път с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
ID4	**понижена**	14	miR-340,miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-381, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-423-3p
SREBF1	**повишена**	4	miR-4253, miR-650, miR-486-5p, miR-1234
PAX5	**повишена**	5	miR-3180-5p, miR-4253, miR-650, miR-484, miR-3147



Фигура 4.112. ID сигнализиране

4.6.9.14. Енергиен метаболизъм

Някои от засегнатите гени участващи в енергийния метаболизъм са: *SLC25A4*, *ATP5J*, *ATP5G2*, *COX5A*, *COX7B*, *COX11*, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените *MDH2*, *PGAM2*, *SREBP1* регулирани от микроРНК-ите с намалена експресия. Най-много мирко-РНК-и регулират *SLC25A4* (14 на брой) и *COX11* (11 на брой). Вероятно по-слабо повлияни са гените регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия.

Таблица 4.82. Гени, участващи в енергийния метаболизъм с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

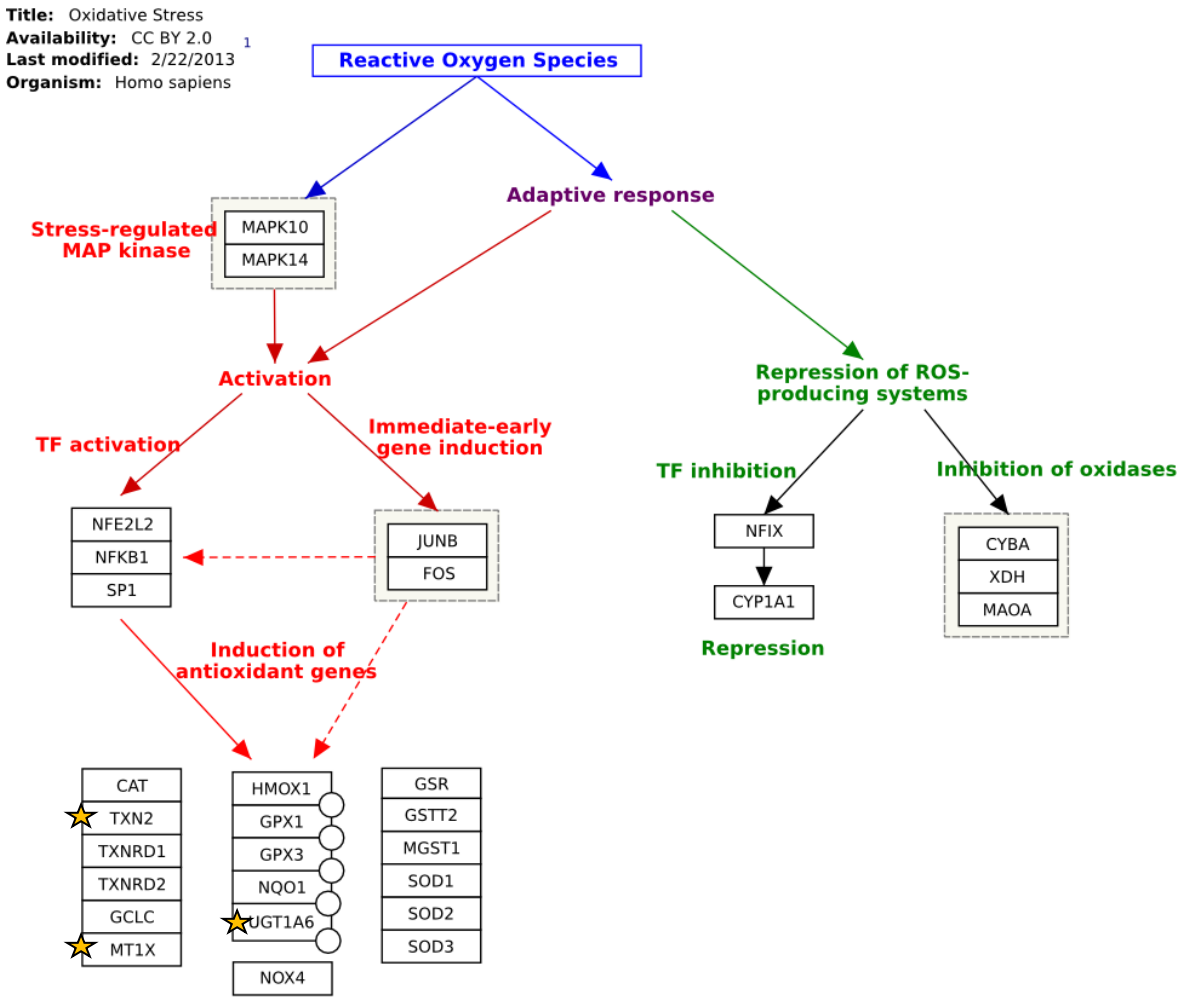
Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
SLC25A4	**понижена**	14	miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-4317, miR-21*, miR-126*, miR-362-5p, miR-181d, miR-423-3p, miR-29b-1*
ATP5J	**понижена**	4	miR-362-3p, miR-186, miR-582-5p, miR-382
ATP5G2	**понижена**	4	miR-126*, miR-590-5p, miR-664, miR-582-5p
COX5A	**понижена**	6	miR-130b, miR-500a, miR-362-5p, miR-181c, miR-150*, miR-181d
COX7B	**понижена**	5	miR-21*, miR-126*, miR-664, miR-150*, miR-181d
COX11	**понижена**	11	miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-382, miR-4317, miR-126*, miR-17*, miR-181d, miR-500a, miR-29b-1*
MDH2	**повишена**	2	miR-3682, miR-144
PGAM2	**повишена**	1	miR-3147
SREBP1	**повишена**	4	miR-4253, miR-650, miR-486-5p, miR-1234

4.6.9.15. Отговор към оксидативен стрес

Гените, участващи в отговора към оксидативен стрес (Фигура 4.113) и регулирани от микроРНК-ите с променена експресия са *TXN2*, *MT1X*, UGT1A6 (Таблица 4.83). Най-много микроРНК-и регулират *UGT1A6*.

Таблица 4.83. Важни гени, участващи в отговора към оксидативен с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
TXN2	**повишена**	4	miR-215, miR-650, miR-484, miR-3147
MT1X	**понижена**	6	miR-4317, miR-181c, miR-181d, miR-299-5p, miR-505*, miR-29b-1*
UGT1A6	**понижена**	12	miR-340, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-3679-3p, miR-382, miR-4317, miR-126*, miR-186, miR-181d, miR-130b, miR-29b-1*



Фигура 4.113. Отговор към оксидативен стрес. Със звездички са обозначени мишените на микроРНК-ите показали диференциална експресия.

4.6.9.16. Клетъчна адхезия

Клетъчната адхезия като цяло би следвало да е подтисната вследствие на действието на микроРНК-ите, тъй като са повлияни гените: *CAV2*, *MET*, *COL4A6*, *COL4A1*, *ITGA2*, *ITGA9*, *ITGB8*, *ITGAM*, *PIK3R*, *ARHGAP5*.

Таблица 4.84. Важни гени, участващи в отговора към оксидативен с предполагаема променена експресия. Брой и наименование на микроРНК-ите, които ги регулират

Наименование на участника в сигналния път	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
CAV2	**понижена**	15	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-382, miR-381, miR-4317, miR-126*, miR-150*, miR-130b, miR-500a, miR-99a*, miR-29b-1*
MET	**понижена**	14	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-3679-3p, miR-381, miR-4317, miR-186, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-500a
COL4A6	**понижена**	11	miR-181c, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-3679-3p, miR-381, miR-21*, miR-186, miR-17*, miR-181d, miR-29b-1*
COL4A1	**понижена**	13	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-4317, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-181d, miR-99a*
ITGA2	**понижена**	16	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-3679-3p, miR-382, miR-381, miR-21*, miR-126*, miR-362-5p, miR-194, miR-17*, miR-181d, miR-29b-1*
ITGA9	**понижена**	11	miR-340, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-126*, miR-362-5p, miR-194, miR-502-3p, miR-500a, miR-423-3p
ITGB8	**понижена**	16	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-362-5p, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-181d, miR-130b, miR-500a, miR-29b-1*
ITGAM	**понижена**	9	miR-21*, miR-340, miR-362-3p, miR-186, miR-362-5p, miR-150*, miR-590-5p, miR-382, miR-29b-1*
PIK3R	**понижена**	6	miR-126*, miR-582-5p, miR-505*, miR-590-5p, miR-664, miR-381
ARHGAP5	**понижена**	16	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-299-5p, miR-590-5p, miR-382, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-24-1*, miR-17*, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-500a, miR-29b-1*

4.6.9.17. Други важни гени регулирани от микроРНК-ите показали промяна в експресията

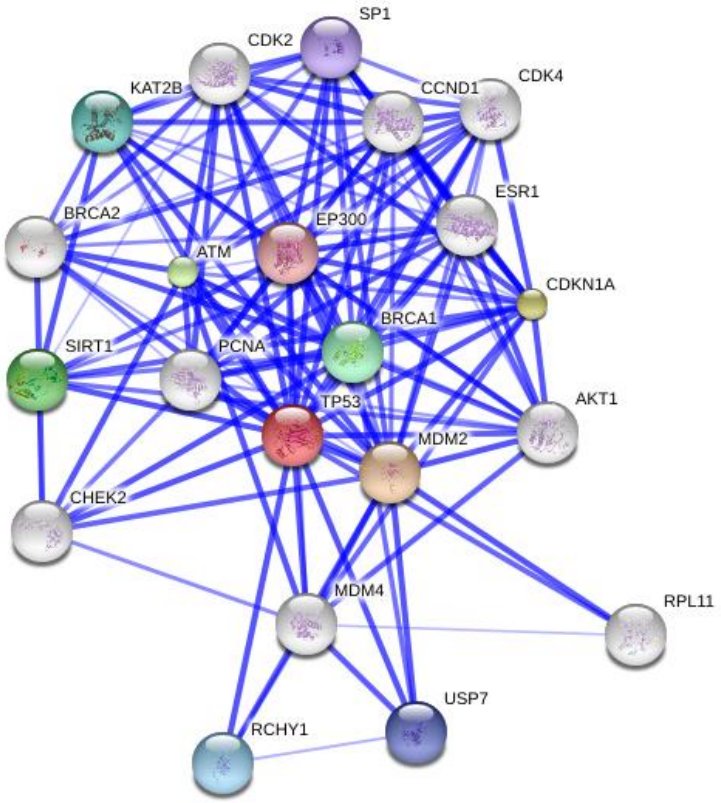
Някои от гените регулирани от микроРНК-ите с променена експресия и не попадащи в пътищата разгледани до този момент, но представляващи туморсупресори или онкогени са представени в Таблица 4.85. Най-силно повлиян вероятно е KLF9, тъй като той се регулира от 17 микроРНК-и с повишена експресия. От гените регулирани от микроРНК-ите с понижена експресия най-силно вероятно е повлиян RNMT.

Таблица 4.85. Гени с туморсупресорни или онкогенни функции при РП регулирани от микроРНК-ите с променена експресия в простатни тъкани

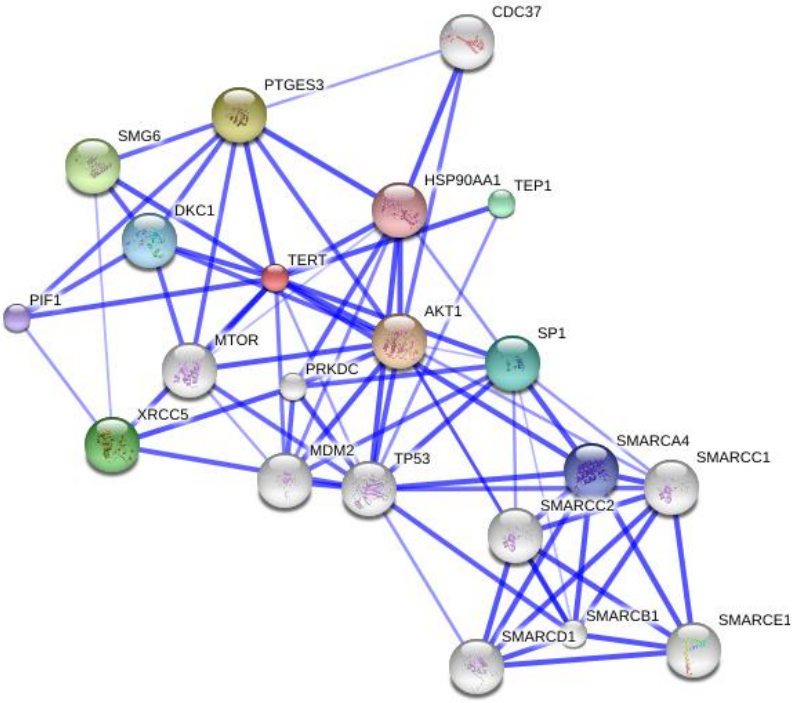
Наименование на гена	Предполагаема посока на промяна на експресията на участника	Брой микроРНК с диференциална експресия и регулиращи участника	Наименование на микроРНК-ите
KLF9	**понижена**	17	miR-340, miR-181c, miR-3679-3p, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-500a*, miR-382, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-24-1*, miR-181d, miR-505*, miR-500a, miR-29b-1*
TOB1	**понижена**	12	miR-340, miR-664, miR-582-5p, miR-590-5p, miR-381, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-194, miR-150*, miR-130b, miR-500a
DAZAP2	**понижена**	14	miR-340, miR-362-3p, miR-181c, miR-664, miR-582-5p, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-362-5p, miR-150*, miR-181d, miR-502-3p, miR-500a, miR-29b-1*
RUNX1	**понижена**	16	miR-362-3p, miR-181c, miR-3679-3p, miR-362-5p, miR-664, miR-582-5p, miR-500a*, miR-382, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-150*, miR-181d, miR-130b, miR-500a, miR-29b-1*
ITM2B	**понижена**	12	miR-340, miR-664, miR-299-5p, miR-582-5p, miR-381, miR-4317, miR-21*, miR-126*, miR-186, miR-194, miR-24-1*, miR-29b-1*
GATA2	**повишена**	6	miR-650, miR-486-5p, miR-144, miR-4253, miR-494, miR-1234
TLN1	**повишена**	6	miR-3180-5p, miR-4253, miR-650, miR-3147, miR-196a, miR-634
RNMT	**повишена**	9	miR-215, miR-3180-5p, miR-486-5p, miR-483-3p, miR-3147, miR-196a, miR-650, miR-144, miR-494

4.6.10. Определяне на белтък-белтъчните взаимодействия на важни туморсупресори и онкогени, регулирани от показалите диференциална експресия микроРНК-и в изследваните простатни тумори

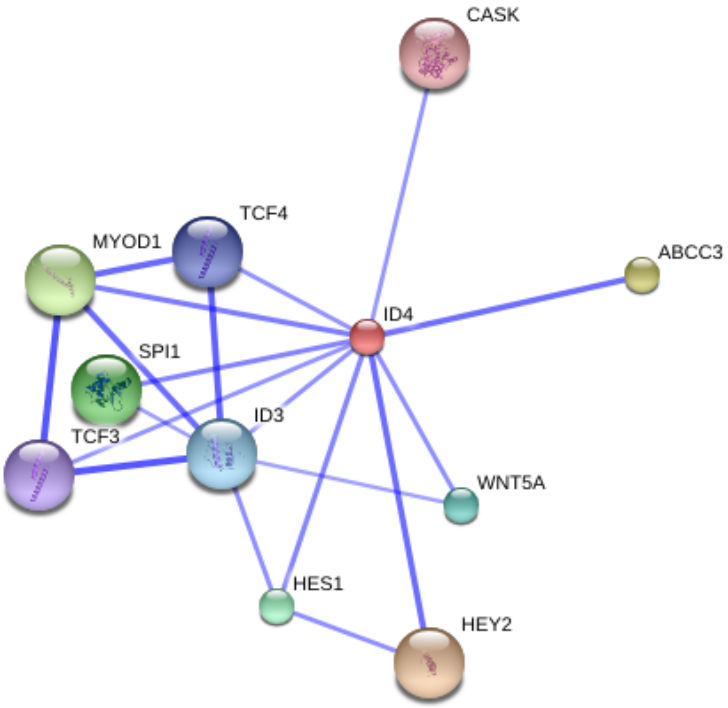
Определянето на белтък-белтъчните взаимодействия бяха определени с помощта на STING (E18) [416]. Бяха определени белтък-белтъчните взаимодействия на p53, TERT, ID4, KLF9, NLK, MAD2L1, DCC, ABI1L, NF1, FURIN, MSH2. Те показват, че промяната в нивата на подбраните гени повлиява активността или експресията на други важни гени.



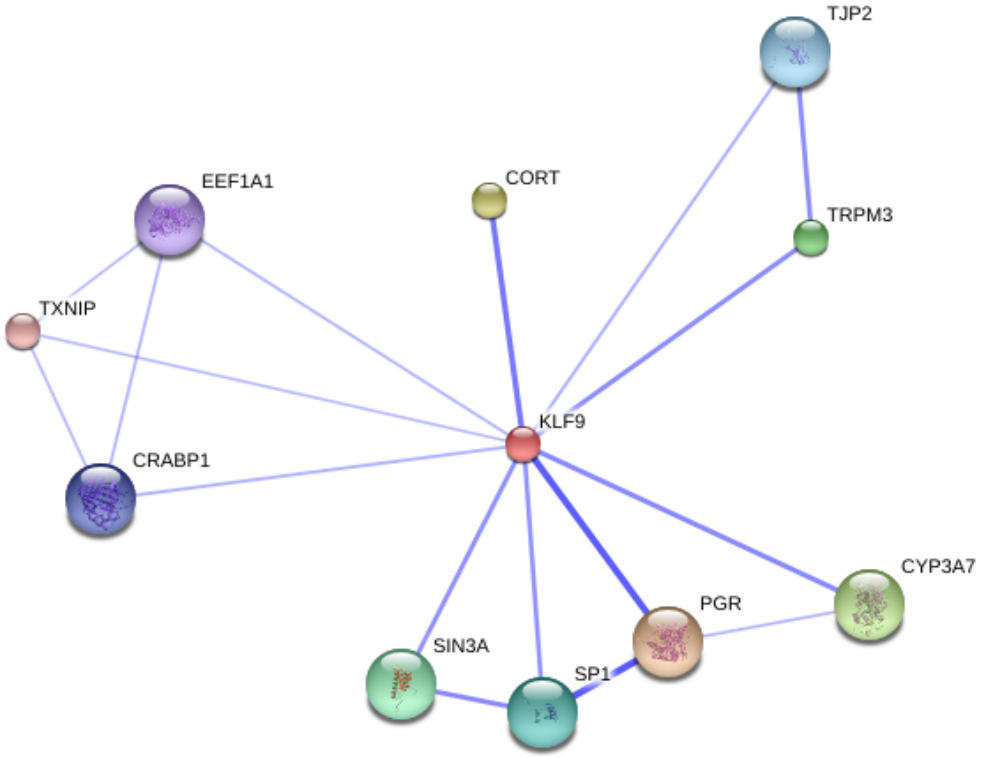
Фигура 4.114. Взаимодействие на p53 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



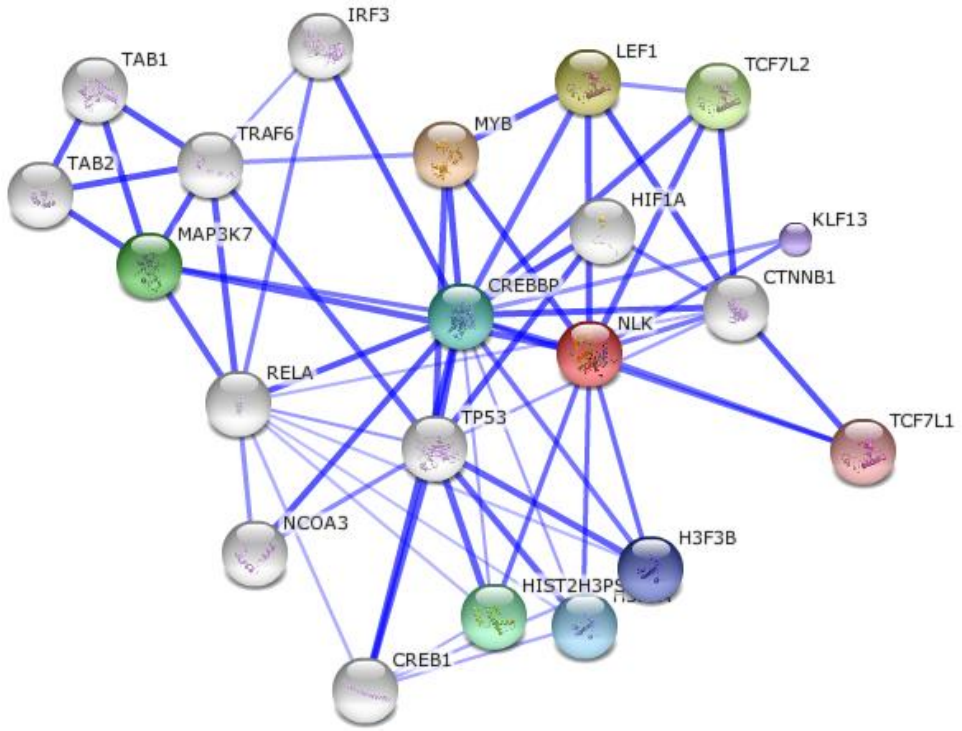
Фигура 4.115. Взаимодействие на TERT с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



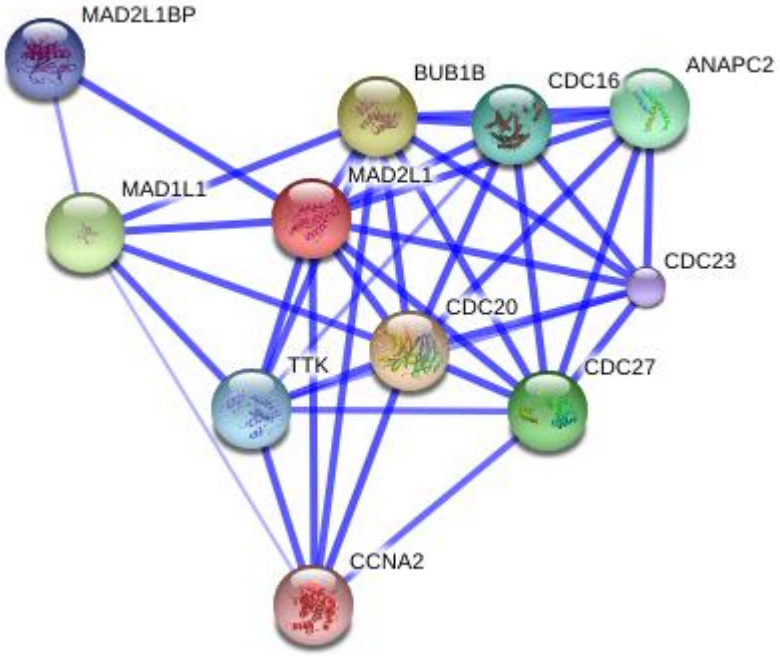
Фигура 4.116. Взаимодействие на ID4 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



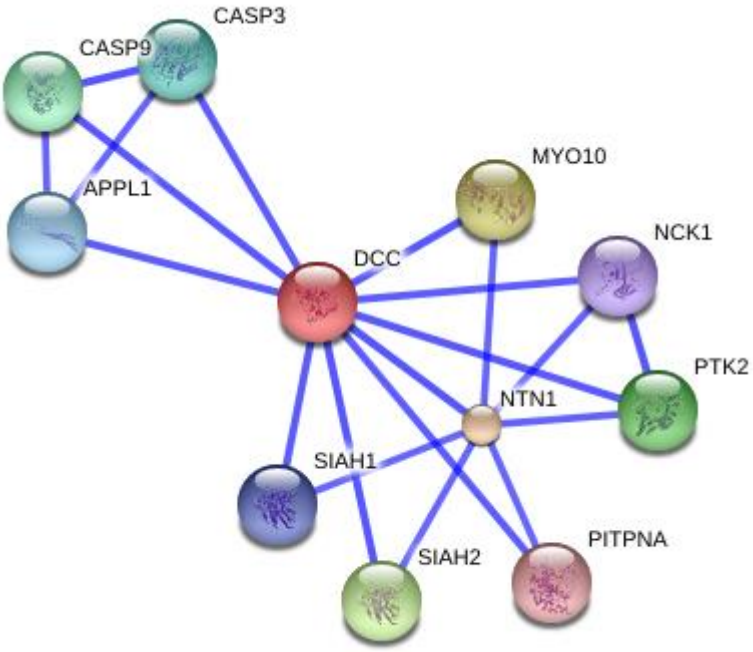
Фигура 4.117. Взаимодействие на KLF9 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



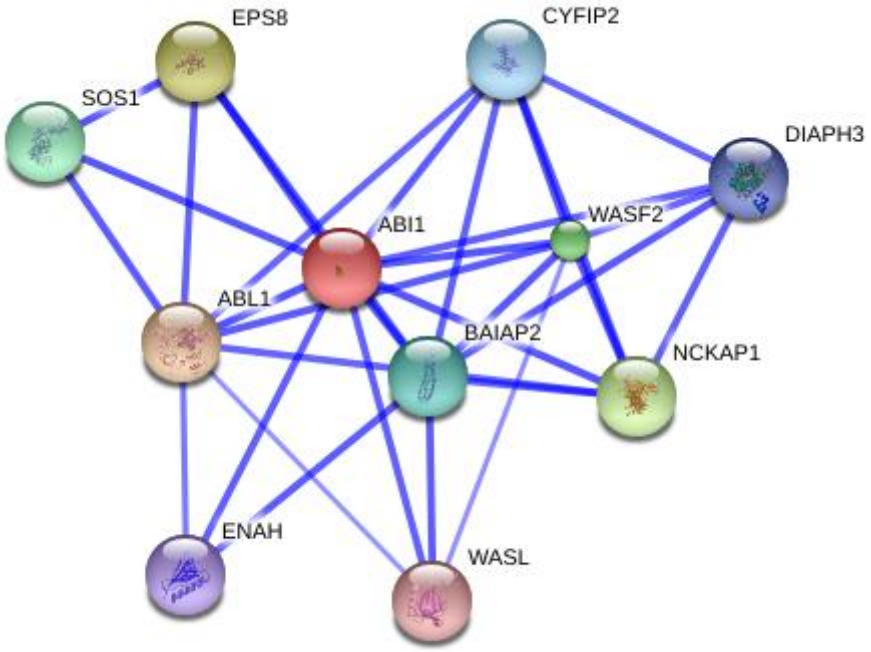
Фигура 4.118. Взаимодействие на NLK с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



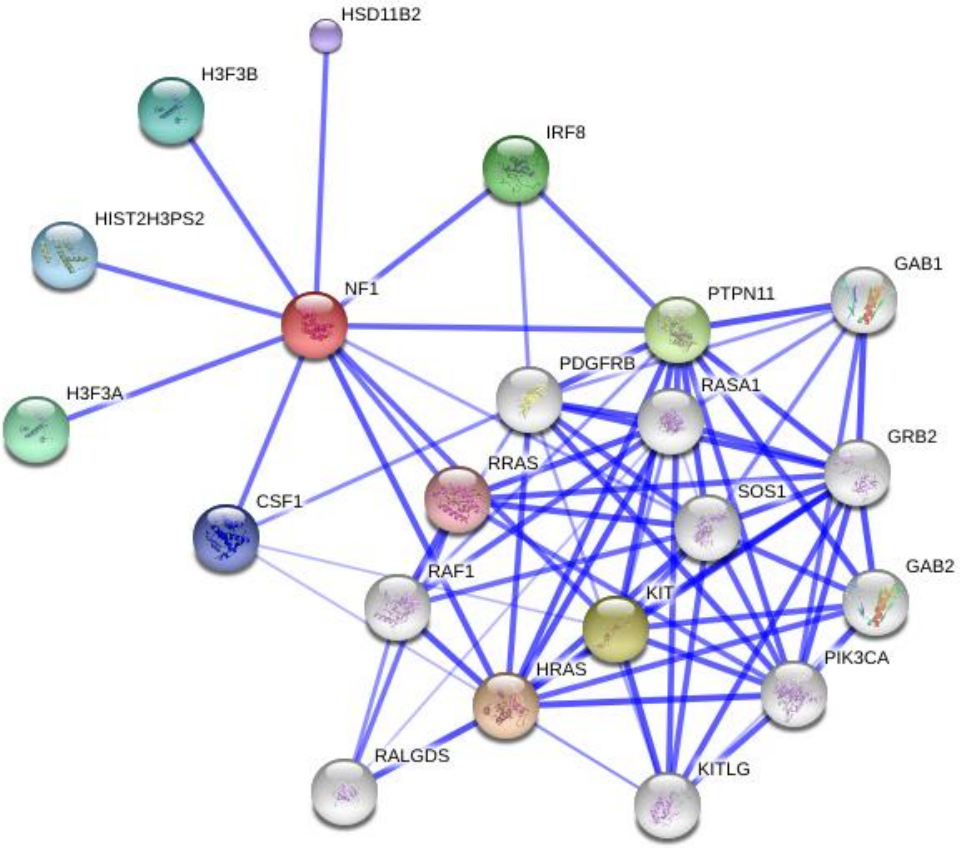
Фигура 4.119. Взаимодействие на MAD2L1 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



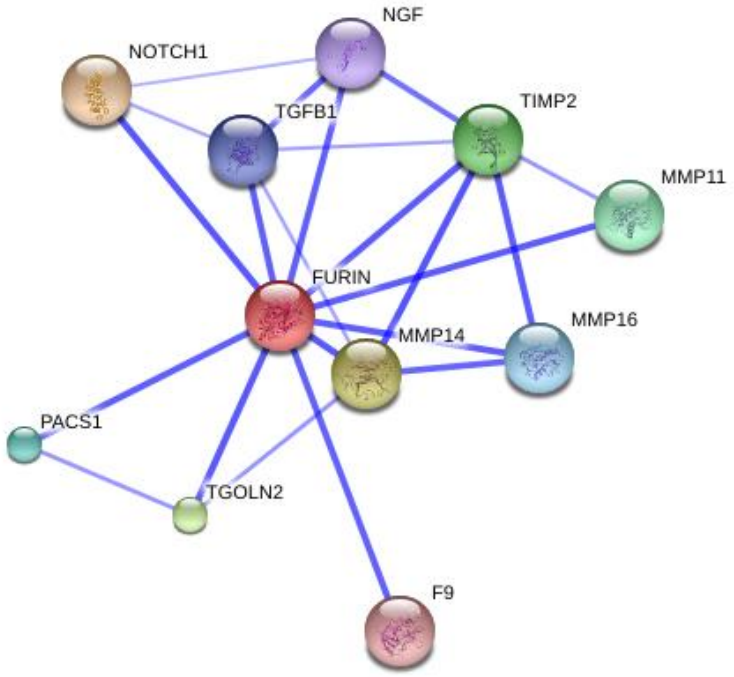
Фигура 4.120. Взаимодействие на DCC с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



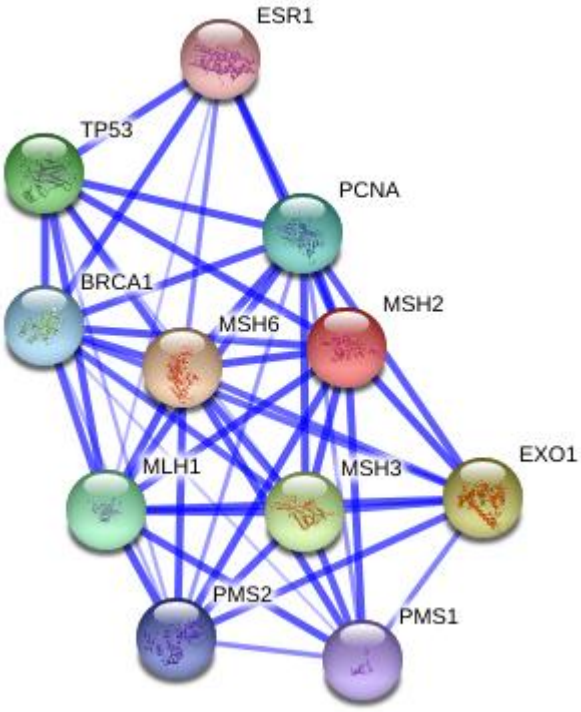
Фигура 4.121. Взаимодействие на ABI1L с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



Фигура 4.122. Взаимодействие на NF1 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



Фигура 4.123. Взаимодействие на FURIN с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии.



Фигура 4.124. Взаимодействие на MSH2 с други белтъци. По-силните взаимодействия, асоциации са показани с по-дебели линии

4.6.11. Резултати от йерархичен клъстерен анализ

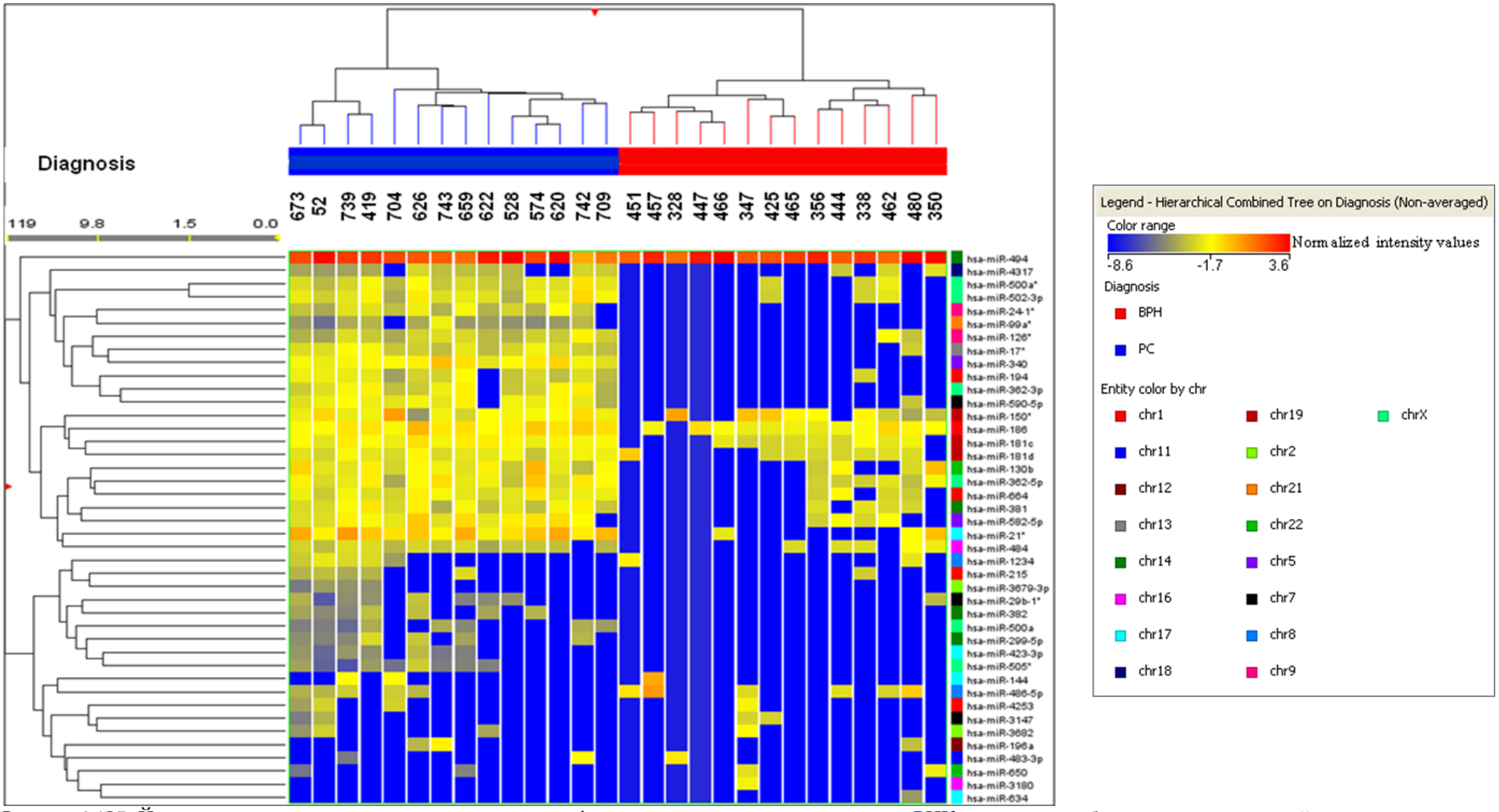
За да се определи дали има ясно разграничаване на пациентите от контролите въз основа на микроРНК експресионните им профили и за да се спомогне подбора на микроРНК-и за последващо валидиране, йерархичен клъстерен анализ бе проведен.

При клъстерния анализ се установи, че има добро разделяне на пациентите и контролите (Фигури 4.125 и 4.126.), които се обособяват в два отделни клъстера (групи). Когато в клъстерния анализ не се използват усреднените стойности, то пациентите се разделят на два основни подклъстера (подгрупи) въз основа на различия в клиникопатологичните характеристики и експресионните профили. Единият подклъстер включва 4-ма пациенти. Трима от тях са с Gleason score 7 и един с 10. При тях не се наблюдават лимфни или далечни метастази. Във втория голям подклъстер от десетина пациенти повечето са с Gleason score над 7 и с наличие на лимфни метастази (само трима са с Gleason score 7 като двама са без лимфни и далечни метастази). В този подклъстер попадат и двамата пациенти с далечни метастази. Може да се обобщи, че в първия клъстер се намират основно пациенти с неинвазивни и неагресивни тумори, а във втория основно пациенти с нискодиференцирани тумори и наличие на метастази (лимфни и/или далечни).

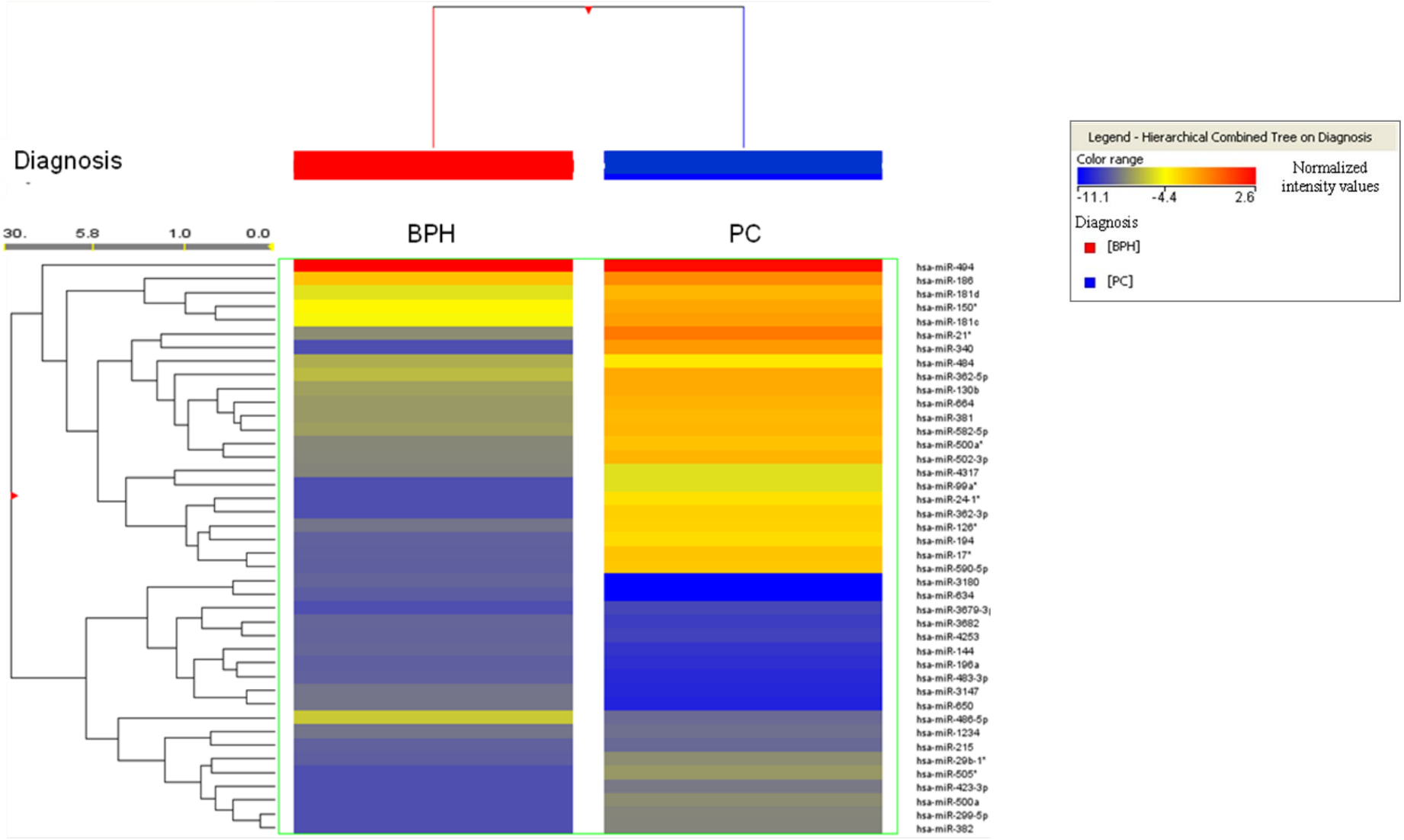
Контролите с ДПХ също се разделят на две основни подгрупи (Фигура 4.125), но това разделяне не корелира с възрастта или със серумните стойности на PSA, а се дължи на различия в експресионните профили.

Клъстерният анализ показва също, че доброто разграничаване на пациентите от контролите се дължи като цяло на микроРНК-ите с повишена експресия. Голяма част от микроРНК-ите с понижени нива се експресират в много малък брой пациенти и контроли, и достигането им до статистическа значимост може да е случайно. За да се определи тяхната цялостна роля за развитието на РП е необходимо да се изследват голям брой пациенти и контроли. Приложихме едно допълнително филтриране на резултатите с цел по-добро разграничаване на пациентите от контролите и подбор на микроРНК-и за валидиране в последващи проучвания. Филтрирахме всички микроРНК-и показали експресия в под 5 проби. Така от 14-те микроРНК показали понижена експресия останаха само 5 (miR-1234; miR-215; miR-486-5p; miR-484; miR-494), а от 28-те микроРНК-и с повишена експресия отпадна само една- miR-3679-3p. След филтрирането направихме отново клъстерен анализ. За разлика от предходния, то при този се вижда още по-ясно разграничаване на пациентите от контролите (Фигури 4.127 и 4.128). Субклъстерирането на контролите се запазва, а това на пациентите се променя незначително. При пациентите отново се наблюдават два основни подклъстера, но в първия попадат 5, а не 4. Един от пациентите с Gleason score 7 от втория основен субклъстер при предходния анализ се премества в първия подклъстер.

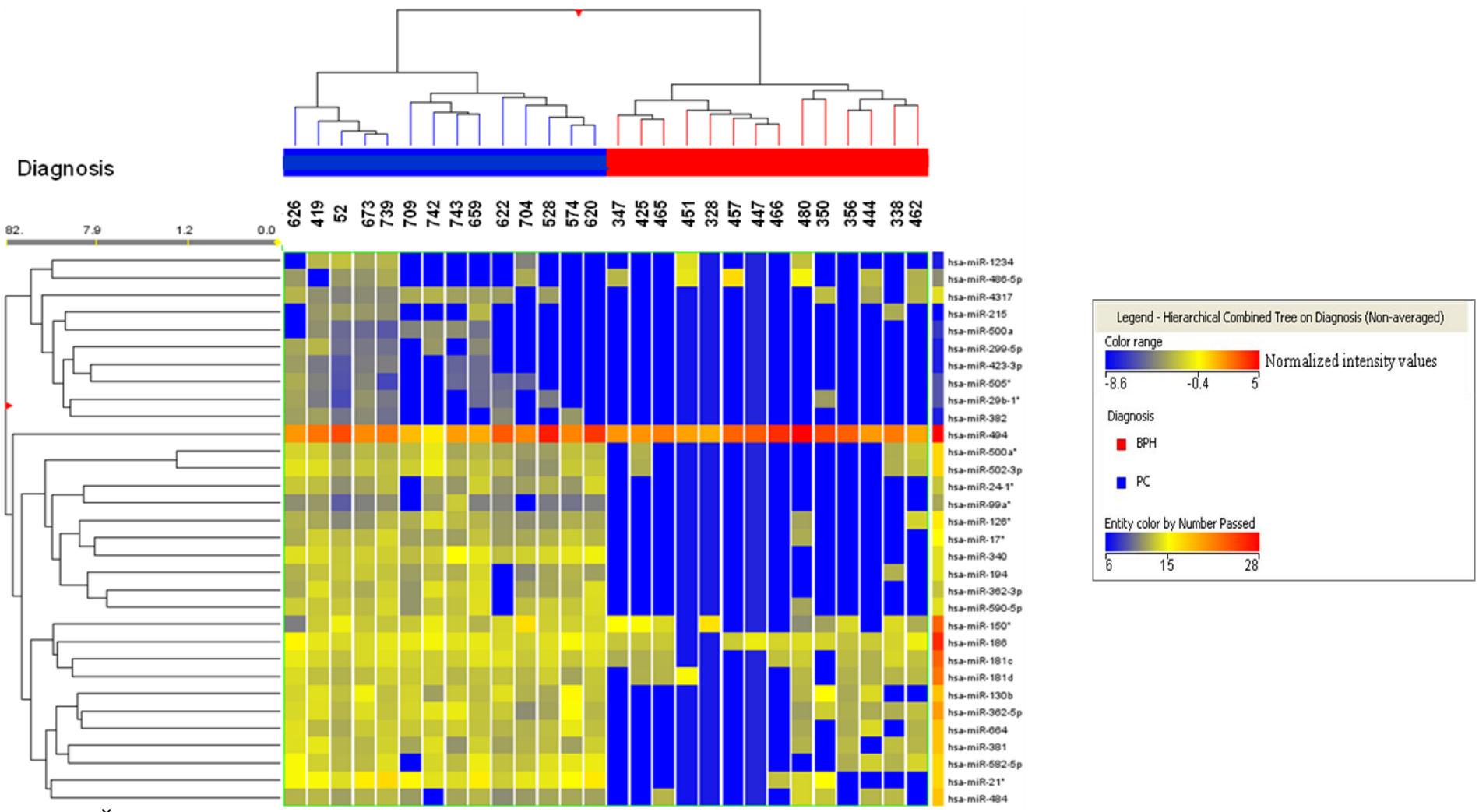
Проведохме и K-Means клъстерен анализ, за да проверим дали клъстерирането се запазва. И при този анализ наблюдавахме разделяне на два отделни клъстера на туморните и нормалните тъкани въз основа на разлики в експресионните профили.



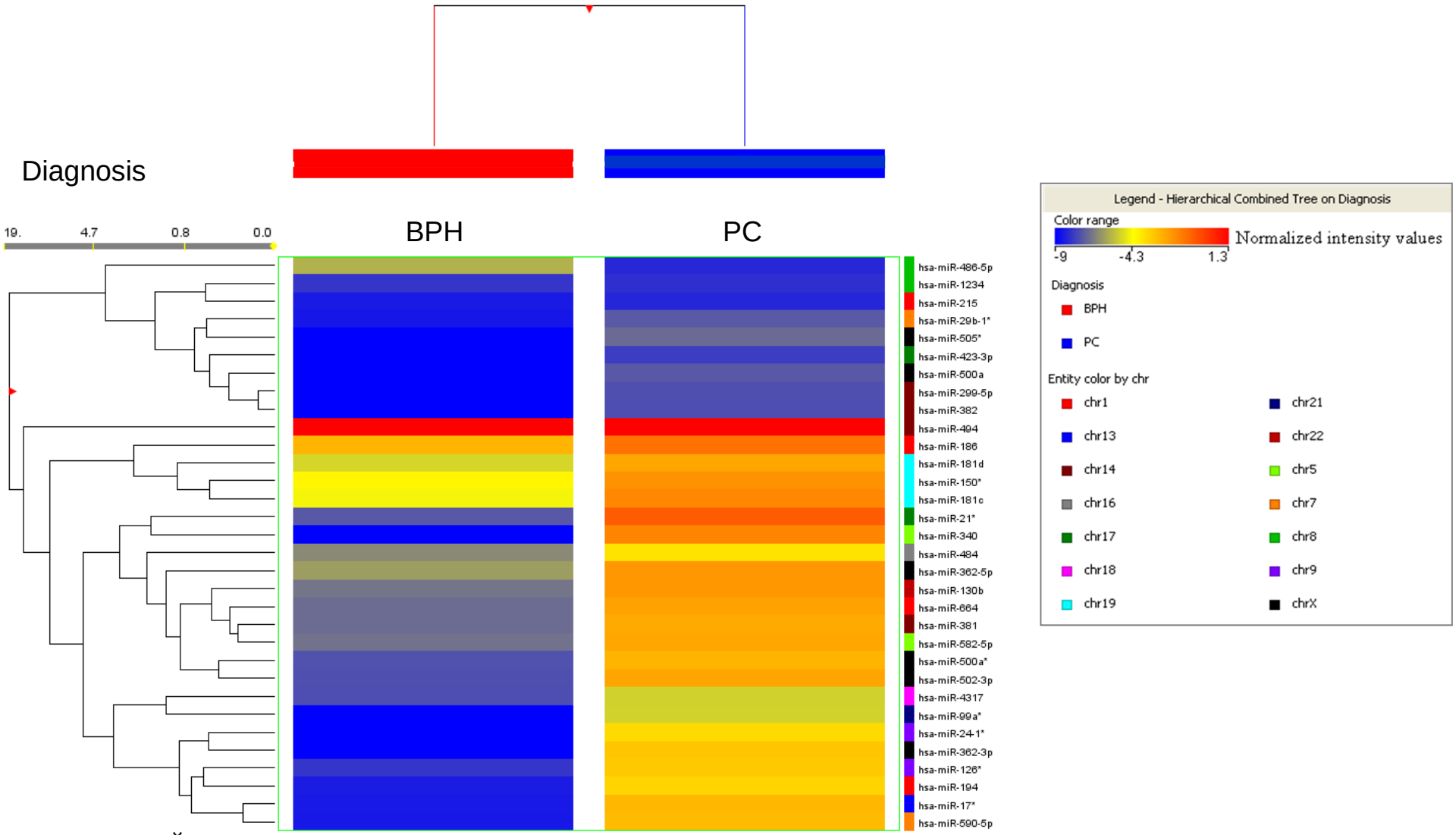
Фигура 4.125. Йерархичен клъстерен анализ въз основа на диференциално експресираните микроРНК-и диагнозата без усредняване на стойностите на пациентите и контролите. Обозначения: РС- пациенти с РП; ВРН- контроли с ДПХ



Фигура 4.126. Йерархичен клъстерен анализ въз основа на диференциално експресираните микроРНК-и диагнозата като са взети средните стойности. Обозначения: PC- пациенти с РП; BPH- контроли с ДПХ



Фигура 4.127. Йерархичен клъстерен анализ въз основа на диференциално експресираните микроРНК-и диагнозата без усредняване на стойностите на пациентите и контролите и след прилагане на допълнително филтриране на микроРНК-ите експресирани в под 5 проби. Обозначения: PC- пациенти с РП; BPH- контроли с ДПХ



Фигура 4.128. Йерархичен клъстерен анализ (след прилагане на филтриране на микроРНК-ите експресирани в под 5 проби) въз основа на диференциално експресираните микроРНК-и диагнозата като са взети средните стойности. Обозначения: PC- пациенти с РП; BPH- контроли с ДПХ

5. ОБСЪЖДАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

5.1. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОВЕДЕНИТЕ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ОТКРИТИ ПРИ GWAS

5.1.1. Обсъждане на резултатите получени за rs6465657 разположен на хромозомен локус 7q21.3, в гена *LMTK2*

Полиморфизмът **rs6465657** се намира в дългото рамо на Хромозома 7, локус 7q21.3 и е в интрон 9 на *LMTK2* гена. Този ген кодира лемурова тирозин киназа 2, която е трансмембранна киназа, участваща в ендозомалния транспорт. Взаимодейства с няколко белтъци, участващи в клетъчното делене, и с циклин зависимата киназа 5/p53 комплекса, участващ в поддържането на клетъчния цикъл. Има данни, че LMTK2 може да взаимодейства и с миозин IV, който регулира както PSA, така и васкуларния епидермален растежен фактор, за които се знае, че са асоциирани с рака [417]. Изглежда вероятно, редукцията в количеството или активността на LMTK2 да води до повишена пролиферативна способност на простатните клетки.

Няколко проучвания показват асоциация на rs6465657 в *LMTK2* гена с РП [81, 418, 419]

В нашето проучване не се достигат статистически значими резултати за този полиморфизъм, но се наблюдава леко увеличена честота на C/C генотипа при болни (22.1 %) спрямо контроли (18.52%), както и на алел C, което е в съгласие с публикуваните данни за рисков алел C в големи геномни изследвания (Таблица 4.1, Фигура 4.1). Вероятна причина за недостигането на значимост е малкия кумулативен ефект на полиморфния вариант върху риска за развитие на РП. В подкрепа на това предпложение е наблюдавания малък ефект на този полиморфизъм (OR=1.12; $p=1x10^{-9}$) върху риска за развитие на РП в големи асоциативни проучвания [93].

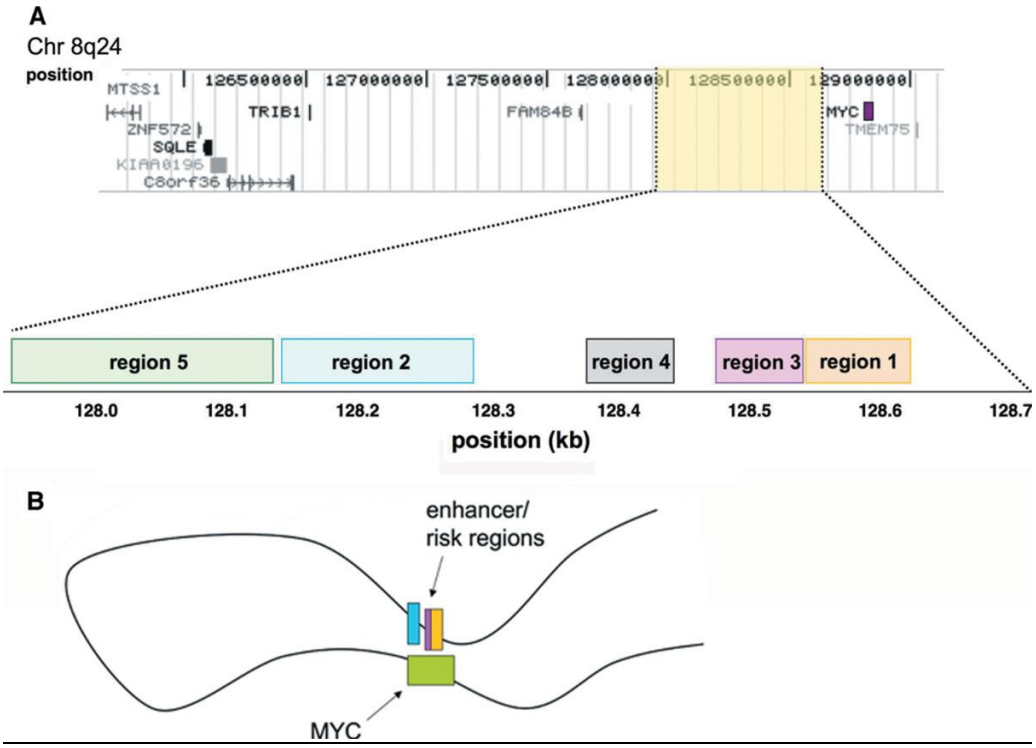
Друго възможно обяснение е, че този полиморфен вариант е по-силно асоцииран с риска за ранно развитие и фамилен РП [93, 418], както и с увеличен риск за фатален изход от заболяването [419], и с увеличен риск за развитие на метастази [124, 420]. В нашето проучване са включени само пациенти със спорадичен РП, без фамилна история. Имаме данни за общо шест починали вследствие на заболяването. Включени са и малък брой пациенти с метастази. Вероятно поради тези причини не се получават статистически значими асоциации.

5.1.2. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 8q24

Хромозомният район 8q24 показва най-висока степен на свързаност с РП при асоциативните проучвания на това заболяване, което определя положението му на гореща точка в генома.

Рисковите полиморфизми на 8q24 лежат в междугенни, некодиращи региони на генома. По тази причина механизмът, чрез който унаследените рискови варианти водят до рак, е неизвестен. Водеща хипотеза е, че рисковите алели повлияват регулацията на дистален ген. Най-близките гени до рисковия локус на 8q24 са *MYC* и *FAM84B*. В съгласие с тази хипотеза рисковият локус се оказва, че притежава епигенетични характеристики на генетичните енхансери (Фигура 5.1). Обаче РНК експресията на гените на 8q24, включително и *MYC* не корелира със статуса на рисковите алели в простатната тъкан. Техника за откриване на широко мащабно огъване на хроматина (метод за детектиране на хромозомната конформация) е била приложена за рисков регион 1 до 3. Били

идентифицирани силни и значителни взаимодействия между всеки рисков локус и *MYC*. Тези открития предполагат, че MYC участва в развитието на РП. Не е ясно как и кога се осъществява регулацията на *MYC* [25].



Фигура 5.1. Рисковият локус на РП на 8q24. (**A**) *Картина на 3Mb регион на 8q24, включително гените в областта и генната пустиня в жълто, където се намират рисковите варианти. Под тази картина са представени 5 локуса в генната пустиня асоциирани с РП.* (**B**) *Грубо представяне на огъването открито чрез 3C (chromosome conformation capture [25].*

Бяха изследвани 4 полиморфни варианта (rs1016346, rs4871008, rs7841060, rs620861) разположени в този локус и асоциирани с РП. От тях полиморфен вариант **rs620861** не показа никаква асоциация с риска за развитие на РП (Таблица 4.2, Раздел 4), както и с клиникопатологични характеристики на туморите при български пациенти. Честотата на G алелът е сходна с публикуваните данни [421]. Сходно на нашите резултати San Francisco и съавтори не наблюдават съществени разлики в генотипните честоти на този полиморфизъм при пациенти и контроли и не откриват асоциация с РП [172]. Вероятната причина е малката статистическа сила на проучванията, тъй като ефектът на полиморфизма е малък и са необходими голям брой пациенти и контроли за определяне на асоциацията му с РП.

Генотипът C/C на полиморфен вариант **rs1016343** (в регион 2 на 8q24) показва близка до статистически значима асоциация с риска за развитие на РП (p=0.079) (Таблица 4.3, Раздел 4). Вероятно генотипът има протективна роля тъй като се среща по-често при контролите. Получените генотипни честоти за този полиморфен вариант не се различават от публикуваните в литературата [422]. Хомозиготното носителство на алел T се среща рядко, но честотата на този алел е по-висока при пациентите в сравнение с контролите, което е съгласие с литературните данни. Статистически значима асоциация за алел T (OR-1.77 95% CI: 1.05-3, p=0.04) се наблюдава при сравнението на пациентите с висок Gleason score и контролите (Таблица 4.5, Раздел 4). Такава асоциация до този момент не е

докладвана. В нашето проучване Т алелът сам по себе си почти двукратно (OR=1.77) повишава риска за развитие на ниско диференцирани тумори. Противоположно на това хомозиготното носителство на С алела има протективна роля (OR=0.49) като резултатът е близко до статистическа значимост (p=0.059). Вероятно С/С генотипът понижава и риска за развитие на метастази (OR=0.44, p=0.06) (Таблица 4.4, Раздел 4). В допълнение генотипът С/Т повишава над 2 пъти риска за развитие на метастази (p=0.03, OR=2.49, 95% CI: 1.11-5.56).

Сходно на rs1016343, полиморфният вариант **rs7841060** не достига статистическа значима асоциация, когато се сравняват генотипните и алелните честоти между всички пациенти и контроли (Таблица 4.9, Раздел 4). rs7841060 обаче показва силна статистическа значима асоциация с клиникопатологичните характеристики като висок Gleason score и наличието на далечни метастази. В съгласие с литературните данни G алелът се среща по-често при пациентите [421]. Честота му е по-висока при пациентите с метастази или с висок Gleason score в сравнение с общия брой пациенти (Таблици 4.10, 4.11, Раздел 4). За разлика от досегашните проучвания, които намират асоциация на този полиморфизъм с риска за развитие на РП като цяло, то за пръв път се открива асоциация на полиморфния вариант с агресивността на заболяването, което го прави потенциален прогностичен биомаркер. Хомозиготното носителство на Т алела статистически значимо се асоциира с понижен риск за развитие на метастази (p=0.01, OR-0.35, 95% CI:0.15-0.8) и висок Gleason score (p=0.05, OR-0.49, 95% CI:0.25-0.97). Алелът G дори и в хетерозиготно състояние увеличава риска за развитие на агресивен простатен карцином с метастази (p=0.009; OR-3,07, 95% CI:1.35-6.95).

Резултатите за **rs4871008** са в съгласие с литературните данни [421]. Честотата на рисковия алел С е по-висока при пациентите в сравнение с контролите. Генотипът Т/Т се среща много по-често в контролите в сравнение с пациентите като значително понижава риска за развитие на РП (p=0.03, OR=0.52 95%CI: 0.29-0.94) (Таблица 4.6, Раздел 4). Същите тенденции се наблюдават при сравнението на пациентите с агресивен карцином с контролите (Таблици 4.7 и 4.8, Раздел 4). Вероятно този полиморфен вариант модифицира риска за развитие на простатен карцином, но също така неговото носителство може да повлиява прогресията на туморите.

Проведеният **хаплотипен анализ** допълва наблюдението, че изследваните полиморфизми са по-силно асоциирани с риска за развитие на агресивни тумори. Хаплотипът С-Т-Т (rs1016343-rs4871008-rs7841060) се асоциира с понижен риск за поява на тумори с висок Gleason score (Таблица 4.12, Раздел 4).

5.1.3. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 10q11

Изследваните полиморфните варианти rs10993994 и rs7920517 лежат в един LD блок от 100 kb на хромозомен локус 10q11.23 [423]. Най-силно асоциирания с РП полиморфизъм в този локус е rs10993994 [424].

Различни авторски колективи докладват за асоциацията на полиморфизма **rs10993994** с простатния карцином [423, 425, 426].

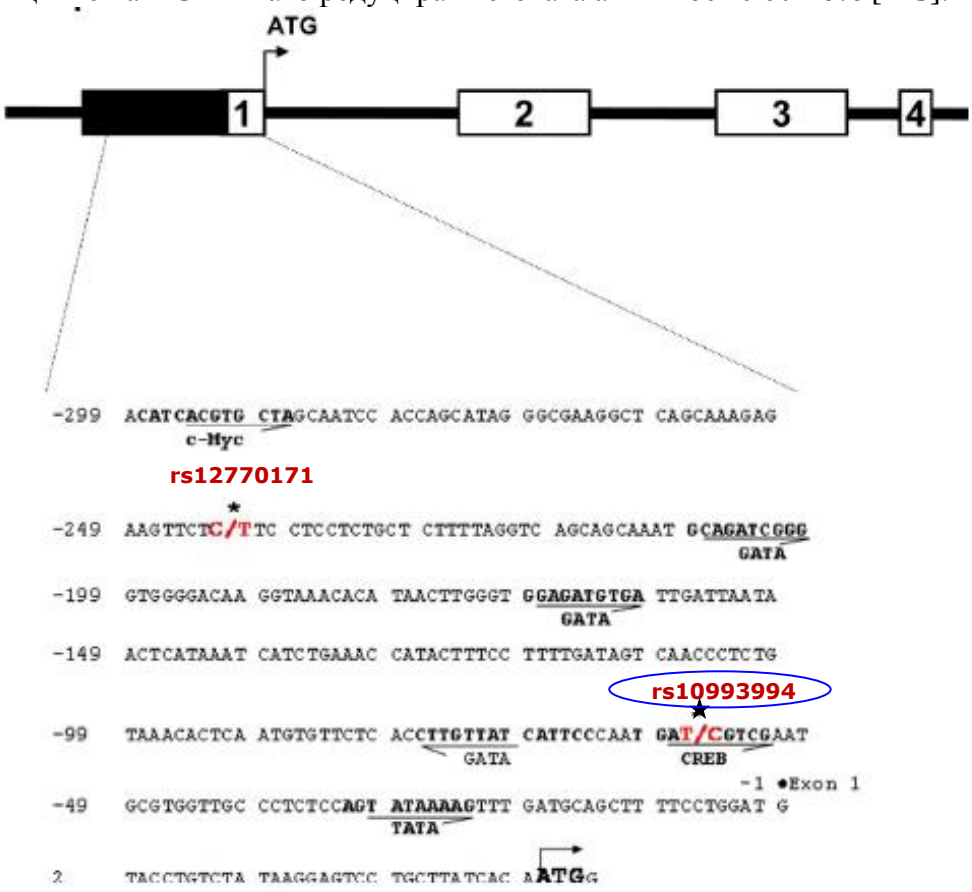
Полиморфизмът се намира на 57 bp преди стартовото място за транскрипция (в промоторната област) на гена *MSMB,* (Фигура 5.2), който би могъл да е замесен в етиологията на РП. Продуктът този ген е член на семейството на имуноглобулин свързващите фактори и се синтезира от епителните клетки в простатната жлеза преди да се секретира в семенната плазма [425]. Както простатният специфичен антиген (PSP94), продуктът на *MSMB* и неговия свързващ протеин PSPBP са докладвани като серумни

маркери за ранна детекция на агресивен РП [427, 428] и е предположено, че продуктът на *MSMB* гена може да функционира като туморсупресор [429]. По време на развитието на РП от ранните към късните етапи експресията на *MSMB* прогресивно намалява [430].

MSMB е способен да възпрепятства растежа и развитието на РП като инициира апоптоза, инхибира секрецията на матриксни металопротеинази, участващи в метастазирането, и като намалява медиираната от васкуларния растежен фактор васкуларизация [83, 429].

MSMB играе ключова роля в развитието на РП и всеки генетичен вариант, който има ефект върху нивата на *MSMB* експресията ще е добър кандидат за асоциация с РП

In vitro изследвания показват, че rs12770171 и rs10993994 имат съществен ефект върху функциите на MSMB като редуцират неговата активност с 60-70% [425].



Фигура 5.2. Схематично представяне на *MSMB*. *Четирите екзона са отбелязани като бели правоъгълници с цифри. Нуклетидната последователност на 336 bp MSMB гена, включително и 5' региона и Екзон 1, е показана с предполагаемите места за свързване с транскрипционни фактори и те са удебелени [425].*

В нашето проучване не откриваме статистически значими асоциация на полиморфизма **rs10993994** с риска за развитие на РП сходно на Waters и съавтори [95]. Наблюдават се някои тенденции и резултати близки до статистическа значимост. Алелът T, свързан с риска за развитие на РП по литературни данни, се среща по-често при пациентите в сравнение с контролите (Таблица 4.13, Раздел 4). Установено е, че алел T разрушава място разпознавано от транскрипционни фактори и така повлиява промоторната активност и експресията на *MSMB* гена [425]. Алелът T показва тенденция за асоциация с повишен риск за развитие на лимфни метастази (p=0.09, OR-1.46 95% CI:0.96-2.21) (Таблица 4.14,

Раздел 4). Хомозиготното носителство на алел С има протективна роля тъй като се среща по-често при контролите в сравнение с пациентите с лимфни метастази (p=0.059, OR-0.51 95% CI:0.26-0.99). Сходно на получените от нас резултати и в други проучвания се открива асоциация на Т алела на rs10993994 с риска за развитие на лимфни метастази или далечни метастази [420, 431]. Kader и съавтори, обаче установяват, че алел Т, който е асоцииран с повишен риск за развитие на РП, се среща по-често при пациенти с по-малко агресивни тумори, но тяхното проучване има ниска статистическа сила [426]. Тъй като рисковият Т алел е асоцииран с по-високи стойности на PSA в незасегнати контроли [81, 432, 433], то по-високата честота на този алел в пациенти с по-малко агресивни тумори може частично да се обясни със случайно разпределение на PSA стойностите. В допълнение има проучвания, които не откриват асоциация на rs10993994 с риска за развитие на агресивно заболяване [434]. По тази причина е необходимо провеждането на проучвания, включващи пациенти и контроли от различни популации, за да се разбере ролята на предразполагащите към развитие на РП варианти за повишаване на риска от развитие на агресивни тумори.

Другият изследван полиморфен вариант в 10q11- **rs7920517** показва асоциация с РП само в Европейската популация [423]. В нашето проучване статистически значими резултати се получиха за G/A и A/A генотипа (Таблица 4.16, Раздел 4). Генотипът G/A се свързва с повишен риск за развитие на РП (p=0.0053, OR-1.84 95% CI:1.2-2.8). Резултатите са в съгласие с публикуваните данни от геномно асоциативно изследване в два стадия, при които рискът свързан с хетерозиготно носителство варира от 1.10 до 1.18, докато рискът от хомозиготно носителство е в рамките на 1.47-1.99 [81]. Генотипът A/A има протективна роля и понижава риска за развитие на тумори с висок Gleason score (p=0.06, OR-0.43 95% CI:0.18-1.02) и метастази (p=0.024, OR-0.25 95% CI:0.07-0.87) (Таблици 4.17 и 4.18, Раздел 4).

Проведеният **хаплотипен анализ** не доведе до получаването на статистически значими резултати вероятно поради малката бройка изследвани пациенти и контроли.
И двата полиморфни варианта показват асоциация с РП при български пациенти, но за да се потвърдят получените резултати е необходимо провеждането на по-мащабно проучване.

5.1.4. Обсъждане на резултатите получени за полиморфни варианти разположени на хромозомен локус 11p15.5

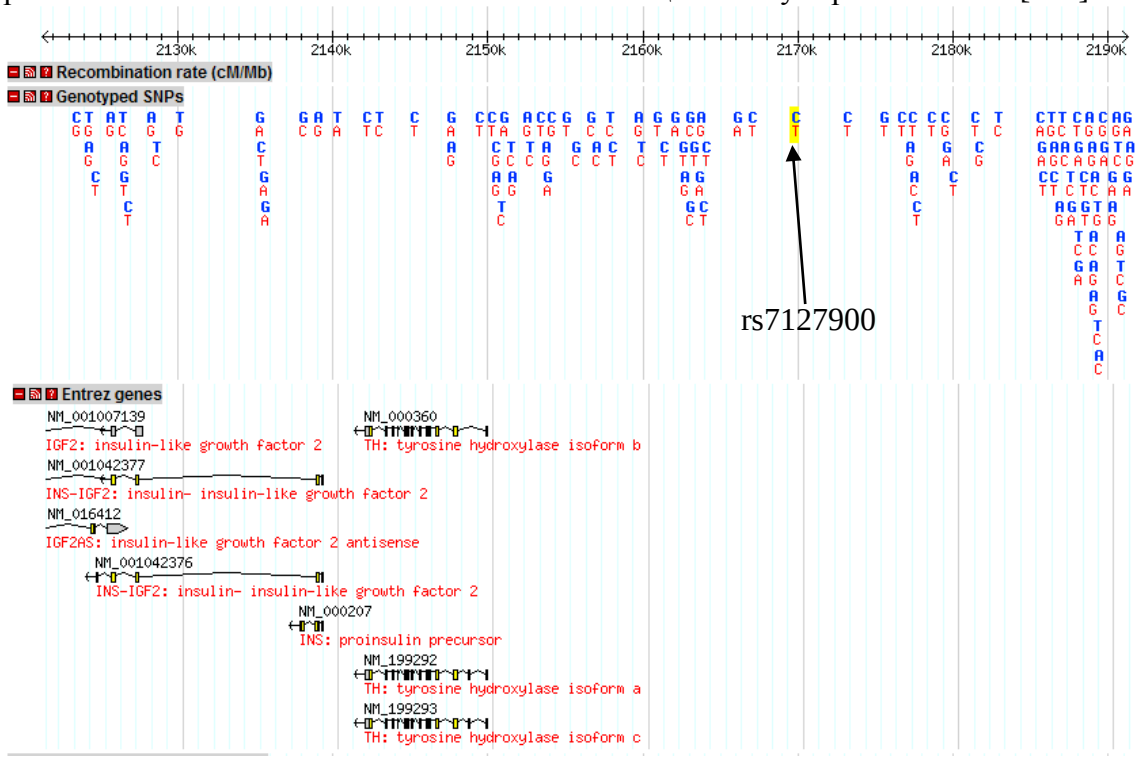
Полиморфизмът **rs7127900** е изследван в едно проучване на PRACTICAL консорциума, където показва високо OR и асоциация с РП и при включените български пациенти [103]. За да потвърдим намерената асоциация изследвахме този полиморфизъм в разширена кохорта от пациенти и контроли.

Полиморфизмът **rs7127900** се намира в късото рамо на хромозома 11, в локус 11p15 и близко разположен гени са *IGF*, *IGF2*, *INS*, *TH*, за които има данни, че имат роля в молекулярната патология на РП (Фигура 5.3) [104, 106].

За да се разясни ролята на този регион за развитието на РП бяха подбрани шест полиморфизми разположени центромерно и един теломерно по отношение на полиморфизма rs7127900. Целта бе да се направи опит да се прецизира асоциацията и открие полиморфен вариант в ген, който е отговорен за повишения риск за развитие на РП в този хромозомен локус. Полиморфизмите, които избрахме за изследване са следните: **rs11603378** (в интрон на *IGF2*), **rs2239681** (в интрон на *IGF2*), **rs10770125** (Leu144Pro замяна в гена *INS-IGF2*), **rs3842756** (в интрон на гена *INS-IGF2*), **rs2070762** (в интрон на *TH*), **rs11564710** (близо до TH гена), **rs55930300** (в *ASCL2* гена). Те не са изследвани досега за асоциация с РП.

Полиморфизмът **rs2070762** е изследван за асоциация с високо кръвно налягане. Той се намира в интрона на гена *TH*, кодиращ тирозин хидроксилаза, участващ в катехоламин биосинтезата и въвлечен в патогенезата на хипертонията. Wang и съавтори откриват значителни различия в генотипните и алелните честоти на rs2070762 при пациенти с хипертония и здрави контроли. Функционални анализи на този полиморфизъм показват, че G алелът функционира като енхансер в отсъствието на свързване с неидентифициран/и транскрипционен репресор или репресори [435].

Полиморфизмът **rs55930300** се намира в гена *ASCL2*. Този ген е член на семейството транскрипционни фактори със структурата спирала-примка-спирала. Активира транскрипцията на гените, които регулира, като се свързва към E box последователност (5'-CANNTG-3'). Димеризацията му с други белтъци със сходна структура (спирала-примка-спирала) е необходима за ефикасното му свързване към ДНК. ASCL2 участва в димеризацията на невроналните прекурсори в периферната и централната нервна система и е важен за поддържането на пролиферацията на трофобластите по време на плацентарното развитие. Два колектива откриват, че този ген е асоцииран с колоректалния карцином. Първоначално Jubb и съавтори откриват статистически значима повишена експресия на *ASCL2* в колоректалните тумори спрямо нормални тъкани [436], а след това Stange и съавтори, установяват амплификация на 11p15.5 локуса и потвърждават свръхекспресията на *ASCL2*, но и на *IGF2* в метастази в черния дроб на пациенти с колоректален карцином. Открита е и корелация на експресията на *ASCL2* с четири известни мишени на този транскрипционен фактор (*LGR5*, *EPHB3*, *ETS2* и *SOX9*). Предполага се, че променената експресия на ASCL2 повлиява метастатичния потенциал на туморните клетки [437].



Фигура 5.3. Разположение на rs7127900 спрямо най-близките гени на 11-та хромозома

Изследвахме полиморфния вариант **rs7127900** в разширена извадка от пациенти и контроли. Резултатите потвърждават ролята на rs7127900 за развитието на РП докладвани при изследването на PRACTICAL консорциума [103]. Носителството на рисковия алел A в хетерозиготно състояние статистически значимо се асоциира с РП (p=0.034 two tailed, OR=1.73 95% CI 1.08-2.77) (Таблица 4.21, Раздел 4). Генотипът A/A е много рядък и по тази

причина трябва да се изследва по-голяма извадка, за да се определи асоциацията му с РП. Генотипът G/G показва тенденция за асоциация с понижен риск за развитие на РП, тъй като се среща с около 10% по-често при контролите.

Статистически значими разлики в генотипните и алелните честоти между пациентите и контролите не се получиха за пет от полиморфните варианти разположени центромерно (**rs11603378, rs2239681, rs10770125, rs3842756**) и теломерно (**rs55930300**) на първоначално показалия асоциация полиморфизъм rs7127900. Това показва, че те не са отговорни за получилия се сигнал от GWAS за 11p15 региона. Тенденция за асоциация бе наблюдавана за **rs2239681** в *IGF2* тъй като G/G генотипът се среща по-често при пациенти с агресивни тумори (висок Gleason score, T3 или T4 туморен стадий и с лимфни метастази) и резултатът бе близък до статистическа значимост (p=0.07).

Статистически значима асоциация с РП бе наблюдавана за полиморфизмите **rs2070762** и **rs11564710**. Вероятно тези полиморфни варианти заедно с rs7127900 на 11p15 повлияват риска за развитие на заболяването. Генотипът G/G на rs2070762 се асоциира с повишен риск за развитие на РП (p=0.04, OR-1.685 95% CI:1.05-2.71) (Таблица 4.37, Раздел 4). Вероятно А алелът на този полиморфизъм е протективен тъй като се среща по-често при контроли в сравнение с пациенти и хетерозиготното носителство понижава риска за развитие на РП (p=0.05, OR-0.65 95%CI:0.42-0.99). По-голяма степен на значимост се получи за rs11564710 (Таблица 4.38, Раздел 4). Алелът С се среща по-често при контроли и е протективен, а алелът А се среща по-често при пациенти и е рисков като разликите са статистически значими (p=0.04). Дори и хетерозиготното носителство на рисковия алел А води до двукратно повишаване на риска за възникване на РП ($p=3 \times 10^{-4}$, OR-2.21 95% CI:1.43-3.41). Не се получиха статистически значими резултати за А/А генотипа вероятно защото той е рядък и за да се определи ефекта му върху риска за развитие на РП е необходимо изследването на по-голяма кохорта от пациенти и контроли. Този полиморфен вариант оказва и по-силен ефект върху предразположеността за развитие на РП от rs7127900 тъй като повишава риска с над 2 пъти в сравнение с 1.77 пъти.

Статистическата значими резултати се получиха за С/А и С/С генотипите на rs11564710 и при сравнение на контролите с пациентите с метастази (Таблица 4.39, Раздел 4). Вероятно рисковият алел А, модифициращ риска за развитие на РП повлиява и риска за развитие на агресивни тумори, както е наблюдавано за редица полиморфизми асоциирани с РП, но за да се потвърди това е необходимо провеждане на валидиращо проучване.

Проведеният **хаплотипен анализ** също показа, че определени хаплотипни комбинации от изследваните полиморфизми са статистически значимо асоциирани с РП. Установи се, че хаплотипни комбинации между полиморфизми, които не показаха статистически значима асоциация при изследването им поотделно, са асоциирани с риска за развитие на метастази (Таблица 4.43).

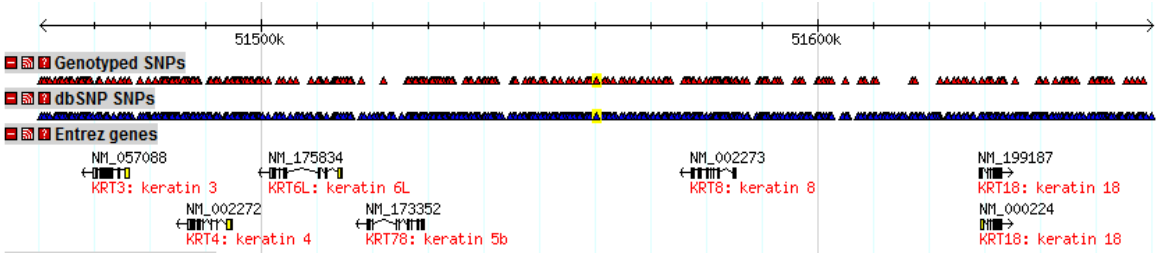
Открито бе и статистически значимо **епистатично взаимодействие** между **rs7127900** и **rs11564710**. Предполага се, че епистатичните взаимодействия са много важен фактор за изясняването на рисковите фактори за възникване на многофакторните заболявания [438]. До този момент GWAS (големите асоциативни проучвания) откриват варианти, които имат независим или кумулативен ефект върху развитието на мултифакторните заболявания. Но те не разкриват пълната генетична архитектура на заболяването. Големите асоциативни проучвания не показват дали полиморфизмите упражняват своите ефекти чрез взаимодействия с други полиморфизми (наречени епистатични взаимодействия) някъде в генома [439]. Установено е, че повечето полиморфизми, участващи в епистатични взаимодействия се намират в регулаторните области на гените като енхансерите [438, 440]. Възможно е rs11564710 да се намира в регулаторна област и неговото влияние върху риска за развитие на РП да се повлиява от

rs7127900. От друга страна получената значима стойност за статистическа епистаза е възможно да не се обяснява с биологична епистаза, а да е отражение на комбинирания ефект на двата полиморфизма. Макар и малко вероятно, възможно е наблюдението да е случайно.

Предстои с фино картиране в рамките на консорциума PRACTICAL да се прецизира допълнително асоциативния сигнал в 11p15.5 локуса и да се установи гена и функционалния полиморфизъм асоцииран с РП. Възможно е и да не може да се открие функционален полиморфизъм, ако предразположеността за развитие на РП се дължи на променена експресия повлияна от полиморфизми в енхансерните или други регулаторни области.

5.1.5. Обсъждане на резултатите получени за rs902774 разположен на хромозомен локус 12q13

Полиморфизмът **rs902774** се намира в клъстера на тип II кератиновото семейство, което включва набор от гени, участващи във формирането на цитоплазмени филаменти в епителните клетки (Фигура 5.4). Тези филаменти поддържат клетъчния интегритет и имат функции в сигналната трансдукция и клетъчната диференциация. Най-близкия ген (7kb теломерно) е *KRT8*, имащ роля в апоптозата [441]. Други съседни гени са: *EIF4B*, играещ съществена роля в метаболизма на РНК и необходим за клетъчната пролиферация и оцеляване [442]; и *TENC1*, който кодира фокална адхезионна молекула, която участва в регулацията на клетъчната подвижност. Гените отговорни за развитие на РП в този хромозомен локус (12q13) предстои да бъдат изяснени.

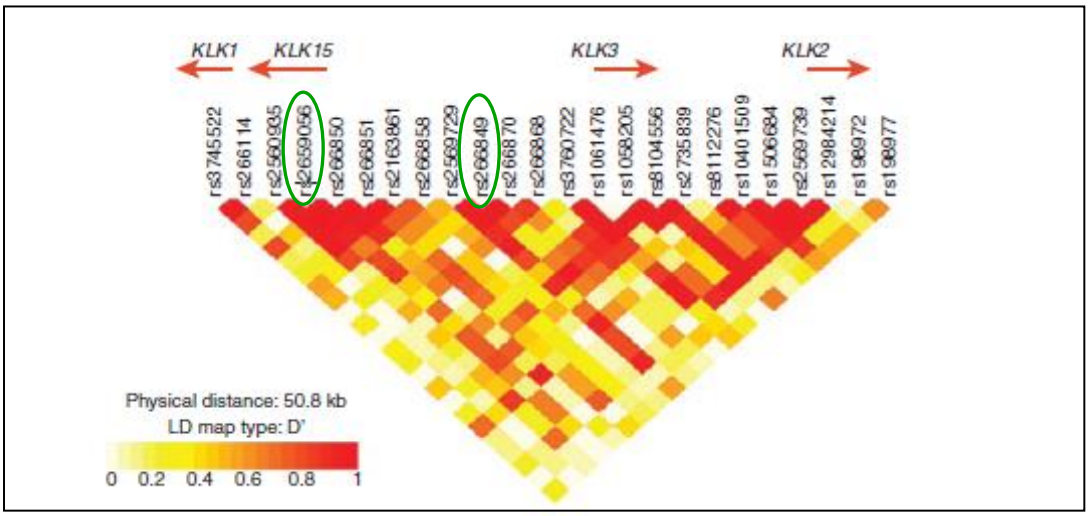


Фигура 5.4. Разположение на rs902774 (отбелязан в жълто) на хромозомен локус 12q13 спрямо най-близко разположените до него гени

Полиморфизмът rs902774 показва асоциация с РП в няколко проучвания [81, 111]. В проучването на Eeles и съавтори асоциацията се наблюдава само в първи етап, а във втория етап на валидиране асоциацията не се потвърждава, което може да се дължи на грешки от първи тип. В нашето проучване не се открива статистическа значима асоциация с РП (Таблица 4.44, Раздел 4).

От направените асоциативни изследвания може да се предположи, че ако полиморфизмът е асоцииран със заболяването, то той е ниско пенетрантен и с малък ефект, поради което е необходимо значително увеличение на броя на изследваните пациенти за да се определи ролята му за развитието на РП. Възможно е и да съществуват различия в ролята на този полиморфизъм за развитието на РП в различните етнически популации.

5.1.6. Обсъждане на резултатите получени за полиморфните варианти разположен на хромозомен локус 19q13.33



Фигура 5.5. Графика за неравновесна скаченост на маркери разположени в KLK гените. ***Полиморфизмите, които сме изследвали са оградени*** .

Хромозомният регион 19q12-13 представлява интерес, тъй като предишни експресионни анализи показват, че е свързан както с предразположеността към развитие на РП, така и с развитието на агресивни тумори [443-446]. Семейството на каликреин кодиращите гени се състои от 15 представители и се намира в малък регион от 320 kb [446].

Според скорошни асоциативни проучвания полиморфизмите **rs266849** в близост до *KLK3* и **rs2659056** в регулаторен регион на около 400 базови двойки от новооткрития екзон на *KLK15* показват асоциация с РП [81, 93, 447, 448]. Установено е, че те повлияват нивата на PSA [81]. Полиморфизмът rs2659056 е по-силно асоцииран с развитието на агресивни тумори [448]. Това може да се обясни с това, че замяната на A към G води до увеличаване на афинитета на свързване на ядрения рецептор RORalpha, който участва в контрола на клетъчния растеж и диференциация, а така също и в регулацията на метастатичното поведение при андроген независими простатни ракови клетки [449].

В нашето проучване резултатите не достигат до статистическа значимост вероятно поради малката статистическа сила. Наблюдаваните генотипни и алелни честоти и на двата полиморфни варианта не се различават от тези докладвани в други проучвания (Таблици 4.44 и 4.45, Раздел 4).

5.2. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОВЕДЕНИТЕ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНА *AMACR* И ГЕНИТЕ *AR* И *CYP1B1* СВЪРЗАНИ С МЕТАБОЛИЗМА НА АНДРОГЕНИТЕ

5.2.1. Обсъждане на резултатите получени за rs2567206 разположен на хромозомен локус 2p21, в гена *CYP1B1*

Тъй като експресията на *CYP1B1* е повишена в хормон-медиираните тумори, се предполага, че може да повлиява риска за развитие на стероид зависимите онкологични заболявания. *CYP1B1* е член на *CYP1* генното семейство и е един от основните ензими, участващи в хидроксилирането на 17β-оестрадиол (E2) на C4 позиция и тестостерон на C6β

и C12α позиции [450]. Белтъчна експресия на *CYP1B1* не се открива в нормална простатна тъкан за разлика от свръхекспресията му в туморна тъкан. Това предполага, че CYP1B1 биотрансформира антикарциногенни компоненти специфично в таргетни клетки и играе важна роля в резистентността към лекарства. Свръхекспресия на *CYP1B1* се наблюдава в премалигнените етапи, но е значително по-висока при туморна тъкан в сравнение с простатна тъкан с ДПХ [451].

CYP1B1 е важен ензим за активирането на екзогенни и ендогенни прокарциногени в реактивни метаболити, които предизвикват увреждания в ДНК [452].

CYP1B1 е много полиморфен и неговата активност и каталитична специфичност се регулират от няколко функционални не-синонимни еднонуклеотидни полиморфизми (SNP) [453]. В много изследвания се изследва връзката между тези полиморфизми и РП.

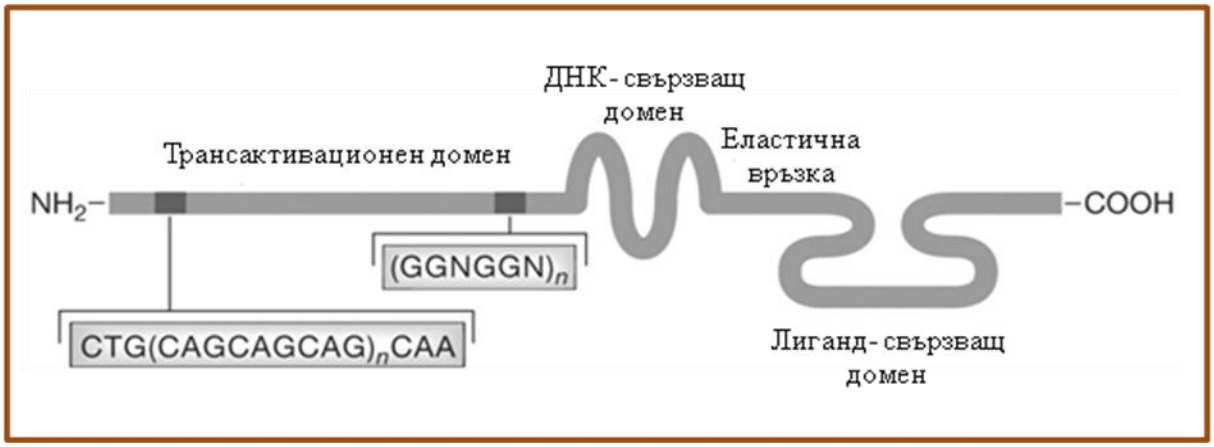
Beuten и съавтори изследват и нефункционален полиморфизъм в *CYP1B1* - **rs2567206** за асоциация с РП. Те установяват, че този вариант е асоцииран със значително понижаване на риска за развитие на агресивен РП при испанските кавказци [450]. В нашето проучване rs2567206 не показва асоциация с риска за развитие на РП (Таблица 4.47, Раздел 4), а така също и с клиникопатологичните характеристики, определящи агресивността на туморите. Това може да се дължи на малката група изследвани пациенти и контроли. Статистически значими резултати са получени в изследването на Beuten, но то включва общо 706 пациенти и 1334 контроли. В нашето проучване са включени 181 пациента и 168 контроли.

Честотите на G алела при пациентите (69.89%) и при контролите (71.43%) са много близки до тези докладвани от Beuten и съавтори- съответно 72% при пациентите и 73% при контролите с неиспанско кавказки произход, а при испанските кавказци честоти от 73% при пациентите и 76% при контролите.

5.2.2. Обсъждане на резултатите получени за тринуклеотидния повтор (CAG)n разположен в екзон 1 на *AR* гена

Растежът на простатната жлеза зависи от циркулиращите андрогени и вътреклетъчните стероидни сигнални пътища. Ефектите на андрогените се медиират от андрогеновия рецептор (AR), ядрен транскрипционен фактор кодиран от *AR* гена. Тринуклеотидният полиморфизъм **(CAG)n**, кодиращ полиглутаминов повтор (Q tract) в екзон 1 на този ген, се предполага, че е рисков фактор при РП [454].

Нормалният брой повтори на CAG микросателита е между 8 и 35, а средно около 20. Микросателитният повтор се асоциира с различия в активността на AR [455]. По-късите повтори водят до по-висока активност [456, 457] и са асоциирани с риска за развитие на РП, агресивни тумори, биохимични рецидиви и повишена смъртност поради заболяването [454, 458-461]. Въпреки това резултатите варират за различните етнически групи. Най-скорошните изследвания не откриват асоциация на този полиморфизъм с риска за развитие на РП [462, 463], прогресията и общата преживяемост, а така също с Gleason score или туморния стадий при поставянето на диагнозата [464]. Противоположните заключения вероятно са поради различия в дизайна, малките изследвани групи в някои проучвания, различия в средата, генетичните фактори и други случайни фактори, а така също и различия в приетата гранична стойност за дължина на повторите [465].



Фигура 5.6. Разположение на важни домени в AR. *Амино-крайния трансактивационен домен представлява повече от половината от белтъчната секвенция на рецептора. Показа ни са тринуклеотидните полиморфизми в екзон 1* (www.medscape.com).

В нашето проучване не намираме асоциация на този полиморфизъм с РП, което е в съгласие с последните изследвания [464]. В допълнение е установено в един мета анализ, че ≥ 20 повтора на този микросателитен полиморфизъм имат статистически значим протективен ефект за развитие на РП при мъжете на 45 годишна възраст [466]. Това показва че този повтор намалява риска за ранно възникване на РП. В нашето проучване не са включени нито пациенти, нито контроли под 47 годишна възраст и поради тази причина не можем да установим такава корелация.

Андрогеновият рецептор е много важен за развитието на РП. Той се експресира както в андроген зависими така и в андроген независими простатни тумори и експресията му е постоянна до прогресията на заболяването към хормон нечувствителен рак [467, 468]. Поради тази причина лечението на РП се фокусира върху блокиране на андрогеновата активност чрез андроген изчерпваща терапия, която води до атрофия на простатния епител [469]. Понижаването на експресията на *AR* води до редукция на туморния растеж при локализирани първични карциноми, а така също и при кастрационно резистентни карциноми. Първоначално андроген изчерпващата терапия е успешна при повечето пациенти (80%), но впоследствие туморите прогресират и стават нечувствителни към терапията и андроген независими. Вероятно хормоналната супресия индуцира свръхекспресия или амплификация на *AR* в кастрационно резистентни простатни тумори. Няколко механизма се предполага, че играят роля в реактивирането на *AR* след андроген изчерпваща терапия, включващи промяна в регулацията (предизвикваща свръхекспресия), мутации в гена (с придобиване на функции), алтернативен сплайсинг (правейки рецептора конститутивно активен), придобиване на ко-активаторна функция или загуба на ко-репресорна функция [469]. Това показва, че от първостепенно значение за развитието и прогресията на простатните карциноми са соматичните промени в раковите клетки, а герминативните промени като цяло вероятно имат незначително влияние.

5.2.3. Обсъждане на резултатите получени за rs3195676 разположен на хромозомен локус 5p13, в гена *AMACR*

AMACR кодира α-метилацил-CoA рацемаза, която участва в β окислението на разклонените мастни киселини и техни деривати, катализира конверсията на няколко R-метилацил-КоА мастни киселини в техните S-стерео изомери [470]. Тази му роля като участник в процесите на генериране на свободни радикали е причина този ензим да бъде

заподозрян като един от участниците в патогенезата на простатния карцином – известно е, че оксидативния стрес е основен фактор на канцерогенезата при простатната жлеза.

В допълнение няколко епидемиологични изследвания показват, че червеното месо и млечните продукти, които са главни източници на разклонени мастни киселинни, са асоциирани с риска за развитие на РП [471].

AMACR експресията е маркер за туморна диференциация. Този маркер има способността да потвърждава диагноза за злокачественост при простатна биопсия. Нивата на иРНК на гена за *AMACR* показват 9-кратно повишение в биопсии от карцином на простатата в сравнение с нормална простатни тъкани [160].

Открити са различни полиморфизми в *AMACR*, няколко мисенс замени M9V (rs3195676), G1175D, S291L, и K277E, които са асоциирани с РП[470].

Изследваният полиморфен вариант **rs3195676** води до аминокиселинната замяна метионин към валин в кодон 9 - M9V в екзон 2. Този полиморфизъм показва най-силна асоциация с РП от всички изследвани полиморфни варианти в AMACR [160, 470, 472, 473]. В нашето проучване не се достига статистическа значима асоциация (Таблица 4.49, Раздел 4), но генотипът C/C и алелът C се срещат по-често при контролите в сравнение с пациентите с агресивно заболяване (Таблици 4.50, 4.51 и 4.52, Раздел 4) и вероятно понижават риска за развитие на метастази и тумори с висок Gleason score. Установено е, че C алелът се предава по-често на незасегнатите родственици при фамилните случаи на РП [474], но също така редуцира и риска за възникване на заболяването при спорадичните случаи [35]. До този момент няма проучвания, които да изследват асоциацията на M9V с риска за развитие на агресивен простатен карцином. Трябва да се увеличи изследваната група, за да се определи асоциацията на този полиморфизъм с развитието на РП.

5.3. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ АНАЛИЗА НА ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ *GSTP1*, *HIST1H4K* И *RASSF2* В УРИНА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ

5.3.1. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* в урина

Най-проучваният епигенетичен биомаркер при РП е ДНК метилирането на *GSTP1* гена, който кодира ензим необходим за детоксикацията и предпазването на ДНК от оксиданти и електрофилни метаболити. Представлява атрактивен неинвазивен биомаркер тъй като може да бъде открит и изследван в телесни течности като серум, плазма и урина [248].

В нашето проучване промоторно хиперметилиране на *GSTP1* показаха 70.31% (45) от пациентите с РП и 65.38% (17) от контролите с ДПХ (Таблица 4.54 , Раздел 4). Сходни резултати за пациентите (76% метилирани) получават и Goessl и съавтори, когато използват QIAamp Viral Kit [260], но когато използват друг кит за изолиране- QIAamp Blood and Tissue Kit откриват метилиране само в 36% от пациентите. Видът на кита за изолиране очевидно определя качеството на изолираната ДНК, степента на нейната амплификация и влияе на чувствителността на детекция на промоторното хиперметилиране.

В биопсии от пациенти с РП метилирането на *GSTP1* варира между 70 и 100% в отделните проучвания [259, 261, 262], а в урина от 18.8% до 83.2% [260, 263-268]. Това вариране в метилирането, което се открива сред пациентите с РП може да се дължи на различните китове, които са използвани за изолиране на ДНК, на начина на съхранение на урината преди изолирането, на методите и праймерите, които са използвани за анализа на промоторното хиперметилиране.

В нашето проучване откриваме висок процент (65.38%) метилиране и сред контролите с ДПХ, каквото в повечето проучвания не откриват (Таблица 4.54, Фигура 4.65, Раздел 4). Goessl и съавтори [260] откриват само в 3% от контролите с ДПХ промоторно хиперметилиране на *GSTP1*, Roupret и съавтори в- 13.2% [266], а Gonzalgo и съавтори- в 33% от пациентите с неоткрит рак след биопсия, и в 67% от пациентите с простатна интерепителиална неоплазия или атипия [268]. В тъкан от пациенти с ДПХ също е докладвано промоторно хиперметилиране в изследването на Jeronimo и съавтори (в 29%) [263], а така също и в плазма от контроли без тумори по пикочно-половата система (в 10.6%) в изследването на Dumache и съавтори [475].

Тъй като контролите с ДПХ показват висок процент метилиране, то в анализа на ROC кривите не може да се направи надеждно разграничаване между тях и пациентите (AUC=0.525) и специфичността на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* е ниска (35%) (Фигура 4.66. А), Раздел 4). Това показва, че метилирането на *GSTP1* не е надежден диагностичен биомаркер. В сравнение с него серумните нива на PSA в изследваната група по-надеждно разграничава болните от здравите (AUC=0.745) с чувствителност 73.3%, и специфичност 60.9% при гранична стойност от 9 ng/ml (Фигура 4.67, Раздел 4). За гранична стойност на PSA избрахме 9 ng/ml тъй като средната му стойност при контролите с ДПХ е 10.36 и само в двама стойността е под 4 ng/ml.

В едно скорошно проучване *GSTP1* промоторното хиперметилиране в урина също не показва статистически значимост като предиктивен фактор за наличие на РП [476].

Метаанализ на биомаркера *GSTP1* показва, че специфичността в различните проучвания варира от 0.41 (41%) до 1 (100%) като в повечето е над 0.5 (50%). За разлика от сравнително високата специфичност, която се открива в повечето изследвания, чувствителността варира в широки граници от 0.05 (5%) до 1 (100%) [477]. Контролите спрямо, които се сравнява ДНК метилирането на *GSTP1* в пациентите с РП се различават в отделните проучвания и вероятно поради тази причина варира и процента метилиране, който се открива при тях. Използваните контроли повлияват върху специфичността на биомаркера, която се получава. В някои проучвания използват напълно здрави мъже, без урологични оплаквания и често с ниски средни стойности на PSA [264, 266, 478]. В нашето проучване контролите, които използвахме са възрастни мъже, с неоткрит рак след биопсия, с ДПХ и със средни PSA стойност 10.36 ng/ml. Така подбрани контроли използват редица други автори [260, 262]. В проучването на Hoque et al сред контролите присъстват и жени [267].

Поради варирането на специфичността и чувствителността на биомаркера *GSTP1* в отделните проучвания, то неговата роля като неинвазивен диагностичен маркер и навлизането му в клиничната практика все още не са напълно изяснени и предстоят още проучвания, в които трябва да се подберат подходящи китове за изолиране, методи за анализ и да се включат контроли, които са възрастни, нямат простатен карцином, но с урологични оплаквания (възпалителни процеси, ДПХ), тъй като в клиничната практика трябва да се прави разграничаване именно между тях и пациентите с простатни карциноми.

Когато в анализа на ROC кривите включихме пациентите и MAM, то получихме голяма площ на кривата (AUC)- 0.777 и резултатът бе статистически значим ($p<0.05$) със специфичност 85% (95% CI: 62.08 % - 96.62 %) и чувствителност 70.31% (95% CI: 57.58 % - 81.08 %) (Фигура 4.66. Б, Раздел 4)).

Тези резултати могат да се обяснят с корелация на промоторното хиперметилиране на *GSTP1* с възрастта. Kwabi-Addo и съавтори откриват зависимо от възрастта метилиране на *RARB2* (r = 0.4; P < 0.0001), *RASSF1A* (r = 0.27; P =0.01, GSTP1 (r = 0.59; P < 0.0001), *NKX2-5* (r = 0.27; P =0.008)- и *ESR1* (r = 0.244; P = 0.023) [479]. Те анализират промоторното хиперметилиране в 90 нормални простатни тъкани (45 от донори на възраст 17-68 години, 45 простатни тъкани на пациенти подложени на цистопростатектомия поради наличие на рак на пикочния мехур, на възраст 39-84 години) В допълнение те изследват 12 нормални простатни тъкани от пациенти с РП. Не откриват статистически значима разлика в степента на метилиране между пробите от донорите на органи и от пациентите с рак на пикочния мехур от една и съща възрастова група. Базирайки се на това, те откриват значително увеличаване на промоторното хиперметилиране на *RARB2*, *RASSF1A* и *GSTP1*, корелиращо с възрастта. Авторите заключават, че тъй като *GSTP1* е хиперметилиран при рака на простатата, но също така неговото метилиране е зависимо от възрастта, то при използването му като диагностичен биомаркер трябва да се вземе предвид, че се анализират проби от възрастни пациенти [479].

В нашето проучване след провеждане на корелационен анализ също се установи, че ДНК метилирането на *GSTP1* корелира с възрастта ($r=0.255$, $p=0.018$). За разлика от Kwabi-Addo и съавтори не получихме много висока стойност на корелационния коефициент тъй като открихме метилиране и в младите асимптоматични мъже, а това вероятно означава че метилирането на *GSTP1* може да се е повлияло от други фактори, освен възрастта. Разликите в метилирането между отделните хора може да е в резултат на различия в генетичната предразположеност към метилиране, начина на живот, диетата и други фактори; а така също и на случайния характер на метилирането. Промоторното хиперметилиране може да варира дори и в отделни проби на един и същ пациент, което може да се обясни с вариабилността в тъканния състав и степента на метилиране във всяка

отделна клетка [479]. В допълнение е установено, че съществуват етнически различия в промоторното хиперметилиране в нормални простатни тъкани, така и в туморни [480, 481].

Наличието на висок процент метилиране в контролите с ДПХ може да се обясни и с наличието на фалшиво позитивни резултати, макар това да е малко вероятно. Тъй като не бе възможно да потвърдим резултатите получени при контролите чрез друг метод, то не може да сме напълно сигурни в чувствителността и специфичността на MS-HRM анализа, въпреки че контролите с известна степен на метилиране винаги даваха еднакви профили при топене и всички проби са повторени в два независими експеримента. В нашето проучване не успяхме да потвърдим голяма част от получените резултати чрез секвениране, тъй като ДНК изолирана от урина е с лошо качество, вероятно накъсана и не бе възможна амплификацията на фрагменти с дължина 303 bp (каквито трябва да се получат при използването на праймерите за секвениране). HRM методът за анализ на промоторно хиперметилиране обаче е валидиран метод първоначално от Balic и съавтори [482]. Методът е използван широко за анализ на промоторното хиперметилиране, но не е напълно изключено поради лошо качество на изолираната ДНК от урина, процентът метилиране в пробите да не бъде определен правилно. Наличието на соли, белтъци и др. повлияват на термодинамиката на ДНК топенето. И това обаче е малко вероятно обяснение в конкретния случай. В нашето изследване всички проби се амплифицираха добре и нямаше такива с високи Cq (Ct) стойности, които да бъдат изключени от анализа. Получихме и резултати, които бяха възпроизводими в повторенията на всяка проба, което не би се получило при наличие на високо съдържание на соли. За да избегнем влиянието на солите ние осъществявахме разреждане на ДНК преди PCR.

Друга възможна причина за високия процент метилиране на *GSTP1* при контролите с ДПХ е вероятността да имат все още неоткрит рак или карцином in situ. Тъй като нямахме възможност да проследим тези пациенти за по-дълъг период от време, то не можем да потвърдим тази хипотеза.

5.3.2. Обсъждане на резултатите получени от анализа на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина

5.3.2.1. Обсъждане на резултатите получени за *HIST1H4K*

В нашето проучване проведохме анализ на промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* в урина от пациенти с РП и контроли. Подбрахме този ген, тъй като представлява обещаващ кандидат биомаркер, според предходно изследване, в което се намират разлики в ДНК метилирането в урина между пациенти с РП и контроли. Payne и съавтори наблюдават, че промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* има по-голяма честота при пациентите с РП в сравнение с *GSTP1* и *RASSF2*, както и по-ниска честота в МАМ в сравнение с *RASSF2* и *TFAP2E* [478].

Избрахме MethyLight, тъй като той представлява високо чувствителен метод способен да открива метилирани алели в присъствието на 10 000 пъти излишък от неметилирани алели. Анализът позволява и количествено определяне на ДНК метилирането [378].

Изследваният ген *HIST1H4K* кодира член на хистон H4 семейството и лежи в рамките на голям клъстер от репликационно-зависими хистонови гени на хромозома 6p21-22. Генът не съдържа интрони и транскриптите му нямат poly (поли) A опашки, но съдържат палиндромна терминираща последователност. Хистон H4 е сърцевинен компонент на нуклеозомите. Две молекули от всеки от четирите сърцевинни хистони (H2A, H2B, H3, и H4) формират октамер, около който приблизително 146 bp от ДНК се навива и

така се формира нуклеозома. Линкерният (свързващият) хистон H1 взаимодейства с линкерната ДНК между нуклеозомите и води до по-силно компактизиране на хроматина. Нуклеозомите ограничават достъпността на ДНК за клетъчната машинария, която изисква ДНК като матрица. Затова хистоните играят централна роля в регулацията на транскрипцията, ДНК поправката, ДНК репликацията и хромозомната стабилност. Достъпността към ДНК се регулира от комплексен набор от пост-транскрипционни модификации на хистоните (хистонов код) и нуклеозомно ремоделиране [483].

Освен *GSTP1* е установено, че и гените *RARβ2* и *RASSF1A*, които са хиперметилирани при простатни тумори показват и метилиране в здрав простатен епител, зависещо от възрастта [479]. За да определим дали метилирането на *HIST1H4K* е свързано с простатната карциногенеза или се дължи на промени свързани със стареенето, използвахме две групи контроли- контроли с ДПХ, които съответстват по възраст на пациентите и млади асимптоматични мъже.

Открихме много сходни честоти на метилиране при пациентите с РП (52.63%) и контролите с ДПХ (55.17%), докато метилиране не бе установено при МАМ (Таблица 4.55, Фигура 4.68, Раздел 4). По тази причина, когато в ROC анализа сравнихме пациентите спрямо контролите с ДПХ, не получихме статистически значими резултати и маркерът има ниска диагностична точност (AUC=0.513) (Фигура 4.73. (А)). В изследването на Payne и съавтори площта под кривата за този биомаркер достига 0.64 и резултатът е статистически значим. Получените в текущото проучване чувствителност от 52.6% и специфичност от 45% са сходни на тези докладвани от Payne и съавтори [478]. Относителната ниска специфичност на *HIST1H4K* промоторното хиперметилиране в двете проучвания вероятно може да се обясни с възможността част от ДПХ контролите да се диагностицират с карцином в последваща биопсия.

Метилирането на *HIST1H4K* успешно разграничава пациентите от младите мъже (AUC=0.763; 95% CI: 0.672-0.839, p<0.0001) и показва по-добра специфичност (100%), но по-ниска чувствителност (52.63%) в сравнение с резултати получени от Payne и съавтори (AUC=0.64; 95% CI: 0.55–0.72, p<0.00001) (Фигура 4.73. (Б)).

Получените резултати показват, че промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* няма по-добра специфичност и чувствителност от PSA като диагностичен биомаркер. Преоперативно измерените серумни стойности на PSA показват по-голяма чувствителност в разграничаването на пациентите с малигнена находка от тези с негативен резултат при биопсия (AUC=0.785, p< 0.0001, чувствителност от 74.51% и специфичност от 78.57%) (Фигура 4.71, Раздел 4) при гранична стойност от 11.38 ng/ml. В изследването на Payne и съавтори PSA биомаркера показва по-малка площ под кривата (AUC) като получения резултат не е статистически значим [478]. Избраната висока гранична стойност от 11.38 ng/ml (Фигура 4.72), отразяваща максималната потенциална ефективност на биомаркера PSA в нашето проучване може да се обясни със стратегията на събиране на урина, която е да се взима урина от пациенти, които са с по-високи нива на PSA и/или необичайна находка при дигитален ректален преглед. Това също е причина за високите средни нива на PSA (9.75 ng/ml) сред контролите с ДПХ.

Честота на хиперметилиране на *HIST1H4K* при пациентите с РП и контролите се различава значително от публикуваните данни. Открихме сходна честота на метилиране при пациентите (52.63%), и контролите (55.17%), докато в предходното изследване честотите са съответно 92% при пациентите и 84% при контролите [478]. Ние не наблюдаваме метилиране при младите мъже в сравнение с Payne и съавтори, които го откриват в 14% от изследваните. Това може да се дължи на различия в подбора на пробите, използваните методи или различни изследвани CpG позиции. Payne и съавтори използват HeavyMethyl анализ, за да определят метилирането на ДНК, докато в нашето проучване бе

използван MethyLight анализ. Тъй като MethyLight и HeavyMethyl анализите имат сходна чувствителност и специфичност, резултатите най-вероятно са повлияни от биологията на метилирането тъй като двата метода не могат да анализират точно еднакви CpG позиции [484].

Корелационният анализ показа статистически значимо, зависимо от възрастта хиперметилиране на *HIST1H4K* промоторната област в изследваната извадка от пациенти и контроли без рак (ДПХ контроли и млади мъже) (Фигура 4.74, Раздел 4), сходно на *GSTP1*. Тази корелация не е необичайна тъй като стареенето е многостранен процес, характеризиращ се с генетични и епигенетични промени в генома. Епигенетичните механизми са главни фактори, водещи до промени в геномната структура и функции, съпътстващи стареенето [485]. Много автори са показали, че геномното ДНК метилиране се понижава с възрастта в различни организми [486-488], както и при хората [489-491]. Заедно с глобалното хипометилиране на генома различни локуси стават метилирани в нормалните тъкани по време на стареенето [492]. Необходими са проучвания, които да определят дали транскрипционните промени са отговорни за натрупването на промени в ДНК метилирането по време на стареенето и дали тези промени увеличават предразположеността към развитие на тумори с възрастта [485]. Гените докладвани като хиперметилирани в не туморни тъкани са много: *ER, MYOD1, N33, IGF2, MLH1, p14ARF, LOX, p16INK4a, RUNX3, CDH1,* c-fos, *RARB2, RASSF1A, NKX2-5, GSTP1* и други [479, 493]. В едно проучване *HIST1H4K* показва понижена експресия в скелетните мускули на възрастни хора (65-71 годишни) в сравнение със скелетните мускули на млади хора (20-29 годишни), което вероятно се дължи на промоторно хиперметилиране [494]. Все още остава въпроса дали промоторното хиперметилиране на *HIST1H4K* в простатната жлеза предразполага стареещите клетки към неопластична трансформация. За да се отговори на този въпрос е необходимо изследването на по-голяма кохорта и пациентите с ДПХ показали *HIST1H4K* промоторно хиперметилиране, които да се проследяват, за да се определи дали ще развият рак след проведената първа биопсия. Ще бъде полезно и включването в анализа на пациенти с високо стадийна простатна интерепителиална хиперплазия.

5.3.2.2. Обсъждане на резултатите получени за *RASSF2*

Подбрахме *RASSF2*, сходно на *HIST1H4K*, тъй като представлява потенциален диагностичен биомаркер при РП [478]. *RASSF2* кодира член на RASSF1 семейството на RAS ефекторите, които негативно инхибират K-ras индуцираната онкогенетична трансформация [495]. Разглежда се като потенциален туморсупресорен ген. Може да инициира апоптоза и стопиране на клетъчния цикъл.

RASSF2 не показа промоторно метилиране в урина на включените пациенти с РП, контроли с ДПХ и МАМ. За разлика от нашето изследване това на Payne и съавтори открива метилиране в 37% от МАМ, 82% от мъжете с негативна биопсия и 59% от пациентите с РП. Това противоречие в получените резултатите може да се дължи на популационни различия, на различните използвани методи за анализ (Payne et al използват за анализ HeavyMethyl технологията) или на ниска ефективност и чувствителност на праймерите и пробата, което е малко вероятно, защото положителната контрола показа амплификация. За да се потвърди получения от нас резултат е необходимо да се направи нов анализ с различни по дизайн праймери и проба или да се анализира промоторното хиперметилиране в същата група с друг метод. Payne и съавтори получават много висока площ на кривата при анализа на ROC кривите при използването на промоторното хиперметилиране на *RASSF2* в урина за разграничаване на пациентите с рак от МАМ. По-

ниска площ (0.66) получават при разграничаването на пациентите от контролите с негативни биопсии. Авторите не коментират причината за по-високия процент промоторно хиперметилиране на *RASSF2* при контролите с негативна биопсия в сравнение с пациентите с РП. Очаква се метилирането на този биомаркер да е с по-висока честота при пациентите, тъй като представлява потенциален туморсупресорен ген. По голяма разлика между метилирането се наблюдава между МАМ и контролите с негативна биопсия, отколкото между пациентите с рак и контролите. На основа на наблюденията в настоящото изследване този биомаркер не се потвърди като надежден диагностичен или прогностичен биомаркер.

5.4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА *GSTP1*, *PSA*, *PCA3*, *AMACR* И *GOLPH2* (*GOLM1*) В УРИНА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ

5.4.1. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *PSA* (*KLK3*) в урина

Простатно специфичния антиген PSA е 33 kD серинова протеаза, който до момента е единствения биомаркер, който се използва за откриване на пациентите с РП, за проследяване и определяне на ефекта от терапия [248].

Търсят се други по-специфични и чувствителни биомаркери, тъй като PSA не е достатъчно надежден поради няколко причини. Няма гранични стойности на PSA, които могат категорично да диференцират пациентите с РП. Въпреки че високите серумни нива на PSA показват наличието на простатни туморни клетки, съществуват изследвания, които показват, че част от мъжете без простатен карцином също имат повишени нива на PSA [496] и при около 22% от мъжете с РП PSA стойностите са ниски [265]. Причината за това е, че PSA не е маркер специфичен за РП. Повишените нива на PSA могат да показват наличието на други простатни заболявания като ДПХ и простатитис [497, 498]. Серумните нива на PSA не могат да разграничат пациентите с индолентна форма на заболяването от тези с агресивна форма при поставянето на диагнозата. Използването на PSA за определянето на ефикасността от проведена терапия изисква мониторинг за дълъг период от време преди клиницистът да прецени дали лечението е подходящо за пациента.

При изследването на нов потенциален диагностичен и прогностичен биомаркер, чувствителността и специфичността му се сравняват с тези на PSA, тъй като до този момент той е единствения биомаркер за РП с широко клинично приложение в диагностицирането, проследяването и определянето на ефикасността от терапия. По тази причина ние сравнявахме надеждността на биомаркера PSA в урина и серум да разграничи пациентите с РП от контролите с тези получени за всеки един от изследваните биомаркери. Целта е намирането на маркер или комбинация от маркери по-специфични и чувствителни от PSA. В допълнение детекцията на експресия на *PSA* в урина показва наличието на простатни клетки [499] и всички пациенти, от чиято урина е изолирана РНК, но не се открива експресия на *PSA* се изключват от анализа.

При сравнение с контролите с ДПХ, статистически значима повишена експресия на *PSA* в урина показаха 61.11% от пациентите (Таблица 4.56, Раздел 4). По тази причина в анализа на ROC кривите този маркер не показа достатъчно добро разграничаване на пациентите от контролите (AUC=0.694) с чувствителност от 61.11% и специфичност от 72.7% (Фигура 4.79). За разлика от експресионните нива на *PSA* в урина, серумните нива на PSA дадоха по-точно разграничаване на пациентите от контролите (AUC=0.767) и с по-

висока чувствителност 76.9%, по-ниска специфичност- 60%, но при използване на гранична стойност от 8.9 ng/ml (Фигура 4.80).

Установено е, че белтъчните нива на PSA в урина не се разграничават значително при пациентите и ДПХ контролите, но съотношението на урина: плазма нивата се различава (AUC =0.63) [500, 501]. За разлика от тези проучвания на белтъчните нива на PSA в урина, в нашето изследваме намираме разлики в нивата на иРНК на *PSA* между пациентите и контролите. По литературни данни абсолютните нива на експресията на PSA се изследват в урина само с цел определяне на PCA3 score и AMACR score [236, 350].

5.4.2. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *PCA3* в урина

Експресията на *PCA3* се ограничава само в простатните тъкани [350, 502]. Генът, кодиращ PCA3, който функционира като некодираща РНК се намира на хромозома 9q21.2 [351].

Редица изследвания показват, че *PCA3* е по-добър биомаркер за предсказване на диагнозата при провеждане на биопсия [503-507].

Определянето на нивата на експресия на *PCA3* помага при решаването дали да се повтори биопсията при мъже с висок риск от развитие на РП, но с негативна първа биопсия. Първоначалните резултати в едно изследване, включващо много центрове, показва че PCA3 score (AUC= 0.787) е по-добър от PSA, от съотношението free (свободен) PSA-total PSA и PSA плътността (AUC-0.564, 0.594 и 0.684 съответно). Изследванията също показват корелация между PCA3 score и агресивността на заболяването- вероятността за развитие на метастази и туморния обем при радикална простатектомия [508, 509]. Друго предимство на PCA3 score е, че той не се повлиява от възрастта, наличието на простатис и от 5-α-редуктазни инхибитори [232]. Като цяло в различните проучвания AUC за този биомаркер варира от 0.72 до 0.87 [350, 510, 511]).

Резултатите от проведения относителен (сравнителен) експресионен анализ (Таблица 4.57, Раздел 4) показаха, че *PCA3* разграничава пациентите от контролите по-точно от PSA в урина и серум. Стойността за AUC (0.778) (Фигура 4.83, Раздел 4) е близка до тази получена за PCA3 score (0.787).

5.4.3. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *AMACR* в урина

α- метилацил коензим А рацемаза (AMACR) е ензим, който регулира пероксизомното β-окисление на разклонените мастни киселини. Имунохистохимичното изследване на AMACR в простатни тъкани понастоящем се използва при диагностицирането на РП в простатни биопсии с атипични лезии [512]. AMACR може да се открие и в проби от урина на ниво протеин и иРНК [236]. Zielie и съавтори откриват, че AMACR score (сходно на PCA3 score) - съотношението на *AMACR* и *PSA* mRNA в урина е предиктивен биомаркер за наличието на РП, а поотделно двата биомаркера нямат диагностична стойност [236]. Ouyang и съавтори. намират, че позитивната и негативната предиктивна стойност са 0.68 и 0.73 съответно. Те правят заключение, че AMACR тестът е по-добър в откриването на пациентите с РП в сравнение със серумните нива на PSA [237].

AMACR показа повишена ескпресия в 61.11% от пациентите спрямо контролите в настоящото проучване (Таблица 4.58, Раздел 4). Също толкова пациенти показаха повишена експресия на PSA, но има разлики в разпределението на пациентите в останалите две групи (понижена и без промяна), разграничаващи се по експресията. Експресията на *AMACR* показа по-добра диагностична точност (AUC=0.728) от *PSA* в урина, но не и от PSA

нивата в серум (Фигура 4.86). Получената площ под кривата за *AMACR* е по-висока от получената от Ouyang и съавтори (AUC=0.65), но за разлика от тях стойностите за специфичност и чувствителност са по-ниски (61.11% чувствителност спрямо 70% и 69.23% специфичност спрямо 71%) и диагностичната точност на този биомаркер не надминава тази на PSA в серум.

5.4.4. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *GSTP1* в урина

Понижена експресия *GSTP1* беше наблюдавана само в 11.11% от пациентите, а в 50% експресията бе без значима промяна спрямо контролите (Таблица 4.59, Раздел 4).

Получените резултати могат да се обяснят с наличието на промоторно хиперметилиране в голям процент от контролите с ДПХ. Това предположение бе потвърдено с изследване на ДНК промоторното хиперметилиране в част от анализираните пациенти и контроли. От 13-те контроли включени в експресионния анализ 11 са изследвани и за промоторно хиперметилиране на *GSTP1*. От тези 11 контроли 3 имат неметилирани промоторни области и 9 имат метилирани. Друго възможно обяснение е изолираната РНК от пробите-урина да е не само от простатни клетки, но и от други епителни клетки, които нямат понижение в експресията на *GSTP1* поради промоторно хиперметилиране.

В нашето проучване *GSTP1,* като експресионен биомаркер в урина, не се оказа надежден в разграничаването на пациентите от контролите. Такива резултатите получихме и за промоторното хиперметилиране.

5.4.5. Обсъждане на резултати получени при анализа на експресията на *GOLM1* (*GOLPH2*) в урина

GOLM1 (Голджи мембранен протеин 1, известен още като GOLPH2) е резидентен цис-Голджи мембранен протеин с неизвестна функция. Повишена експресия на този биомаркер е била открита в простатни ракови тъкани [242]. Докладвано е в редица проучвания, че повишената експресия на *GOLM1* транскрипта е потенциален диагностичен маркер [243-245]. Varamblly и съавтори откриват, че в урина експресията на *GOLM1* е по-надежден биомаркер от серумните нива на PSA (AUC-0.622 спрямо 0.495) за детекция на РП (чувствителност- 59% и специфичност- 71% [244]. Сходно на тях Laxman и съавтори установяват, че площта под кривата при анализа на ROC кривите за този биомаркер е AUC-0.664 [243]. В нашето проучване получихме малко по-висока площ под кривата (AUC=0.678) в сравнение с тези получени в проучванията на Varamblly и Laxman.

Експресията на *GOLPH2* (Фигура 4.91, Раздел 4)) показва по-добро разграничаване на пациентите от контролите в сравнение с експресиятат на *GSTP1*, но е по-малко надежден от PSA в серум и урина, както и от *PCA3* и *AMACR*. За разлика от проучванията на Varambally и Laxman *GOLPH2* не надминава диагностичната точност на серумните нива на PSA в нашето проучване. Това може да се дължи на много ниските стойности на AUC за серумните стойности на PSA докладвани от тези два авторски колектива (0.495 при Varambally и 0.508 при Laxman), различаващи се от публикуваните стойности в повечето проучвания.

5.4.6. Обсъждане на резултати получени при комбинирането на експресионните профили на изследваните биомаркери в урина и серумните нива на PSA

В нашето проучване най-надежден от изследваните биомаркери в разграничаването на пациентите от контролите се оказа *PCA3*, което е в съгласие с литературните данни [350, 503, 510, 511].

Съществуват проучвания, които откриват по-високи стойности на AUC и по-добри специфичност и чувствителност при комбинация на няколко маркера в сравнение с използването единствено на *PCA3* [243]. По тази причина проведохме мултимаркерен анализ на ROC кривите, в който не включихме *GSTP1*, тъй като той показа най-ниска диагностична точност, както като експресионен биомаркер, така и като промоторно хиперметилиран биомаркер в урина.

Комбинирането на биомаркери в нашето проучване доведе до подобряване на AUC, чувствителността и специфичността в разграничаването на пациентите и контролите в сравнение с използването на *PCA3* биомаркера сам по себе си (Таблица 4.62, Раздел 4). Комбинирането на експресионните профили на *PSA, PCA3* и *AMACR* дават много добра чувствителност и специфичност. Необходимо е изследването им да продължи в по-голяма група от пациенти и контроли с цел тяхното валидиране. Площта под кривата (AUC), която получихме е 0.823 и тази стойност показва добра диагностична точност, и е по-висока в сравнение с получените при комбинирането на *PCA3, SPINK1, GOLPH2, TMPRSS2-ERG* (AUC=0.758) в изследването на Laxman и съавтори [243] и при комбинирането на *PSMA, PCA3* и *PSGR* (AUC=0.74) в изследването на Rigau и съавтори [240].

Най-добрата комбинация между два биомаркера в нашето проучване е между *PCA3* и *AMACR* с чувствителност от 77.8% и специфичност от 75%. Ouyang и съавтори получават малко по-високи стойности за чувствителност и специфичност при комбинирането на тези два биомаркера в урина: 81% и 84% съответно. Това може да се обясни с различните методи за анализ на нивата на експресия. При проучването на Ouyang се използва абсолютно определяне на нивата на експресия и изчисляване на “score” въз основа на *PSA* mRNA, а в текущото прилагаме относителен (сравнителен) анализ на експресията без изчисляване на “score” [237].

Комбинирането на *PCA3, AMACR* и *GOLM1* доведе до получаването на най-голямата площ под кривата (AUC=0.836), но резултатът не достига статистическа значимост (p=0.06). Необходимо е изследването на по-голям брой пациенти и контроли, за да се определи диагностичната точност на тази комбинация от три биомаркера.

Комбинирането на 4 от изследваните биомаркери в урина (без *GSTP1*) също води до по-добро разграничаване на пациентите от контролите в сравнение с използването им поотделно или в сравнение със серумните нива на PSA. Резултатът достига статистическа значимост, но получената площ под кривата (AUC=0.795) е по-малка в сравнение с получените за останалите коментирани вече комбинации от биомаркери. Тази комбинация от 4 биомаркери в урина обаче има по-добра диагностична точност от намерената от Laxman и съавтори [243].

5.5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ ЕКСПРЕСИОННИЯ АНАЛИЗ НА let-7c, miR-30c, miR-141 И miR-375 В ПЛАЗМА НА ПАЦИЕНТИ С РП И КОНТРОЛИ

Първоначално микроРНК-ите са изследвани в нормални и туморни тъкани, в метастази, простатни ракови клетъчни линии [302, 306-324, 513]. Идентифицирани са диагностични и прогностични панели при РП, но те частично се припокриват или са напълно различни. Конфликтните резултати вероятно се дължат на разнообразния дизайн на проучванията, подценяването на проведена терапия при пациентите, методите за събиране на проби, присъствието на контаминиращи клетки и различната чувствителност и специфичност на използваните платформи за анализ [320]. В допълнение експресията на микроРНК-ите е динамична и се променя в зависимост от етапа на простатната карциногенеза, типа терапия и молекулярния път на всеки тумор.

За да се преодолеят част от недостатъците на микроРНК изследванията в тумори изследователите започват да анализират експресията на микроРНК-ите в по-достъпни биологични проби - кръв (плазма и серум) и дори урина [300, 326-329, 331-336, 338].

В настоящото изследване анализирахме експресионните нива на miR-141, miR-375, let-7c и miR-30c в плазма на пациенти с РП и контроли, състоящи се от мъже с ДПХ и МАМ с цел да определим диагностичната и прогностичната точност при български пациенти. Тези микроРНК-и интензивно се изследват и тяхната експресия корелира с развитието на РП, метастазите и други клиникопатологични характеристики [309, 326, 328, 339], но все още е необходимо провеждането на валидиращи проучвания в плазма и серум.

Определените в нашето изследване Ct стойности на miR-141 са високи и експресия не бе открита в няколко проби. Нивата на miR-141 са сходни в пациентите и МАМ, в съгласие с получените резултати в други проучвания [328, 333], но за разлика от намереното от Mitchell и съавтори [326]. Несъответствията между проучванията може да се дължат на различната концентрация и съдържание на микроРНК-и в плазма и серум, различните използвани методи за анализ (например включване на пре-амплификационна стъпка между обратната транскрипция и PCR в реално време за увеличаване на количеството на микроРНК-ите с ниска концентрация) и размера на изследваните групи от пациенти и контроли. Друго възможно обяснение е, че Mitchell и съавтори сравняват нивата на микроРНК-ите между пациенти с РП и метастази и здрави контроли. Ние не успяхме да намерим корелация на miR-141 с развитието на метастази, тъй като бяха анализирани много малък брой такива пациенти в нашата извадка. Не намерихме и корелация с други клиникопатологични характеристики (Gleason score, туморен стадий, засягане на лимфните метастази), вероятно поради малката изследвана група и ниските нива на тази микроРНК в плазма. Анализът на ROC кривите доказа, че нивата на miR-141 не могат надеждно да разграничат пациентите от ДПХ контролите и МАМ.

Нивата на експресия на miR-375 са сравнявани между различни групи пациенти с РП или между пациенти с кастрационно резистентни простатни тумори с метастази (мКРРП) и здрави контроли и е потвърдено, че циркулиращите нива на miR-375 са повишени в пациенти с мКРРП в сравнение със здрави контроли или пациенти с локализиран РП [327, 329, 339, 514]. В проведеното изследване ние сравнихме експресионните нива на тази микроРНК в пациенти и две групи контроли (ДПХ и МАМ). Открихме статистически значимо понижена експресия на miR-375 в 83.05% от пациентите в сравнение с контролите (Таблица 4.63, Раздел 4). В сравнение с МАМ, 45.76% от пациентите показаха намалена експресия. Несъответствието между получените от нас резултати и докладваните от други изследователи е възможно да се дължи на размера и състава на изследваните групи. В нашето проучване в групата от пациенти са включени само двама с метастази и 6 с

метастази в лимфните възли и това може да е причина за наблюдаваната понижена експресия (Таблица 3.5, Раздел 3). Експресията на miR-375 е понижена също при рак на стомаха [515, 516], сквамозните карциноми на главата и шията [517, 518], сквамозния клетъчен карцином на хранопровода [519], туморите на устата [520], недребноклетъчния рак на белия дроб [521], туморите на черния дроб [522], туморите на панкреаса [523], рака на дебелото черво [524, 525]. При рак на гърдата miR-375 е свръхекспресирана в ERα-позитивни ракови клетъчни линии и играе ключова роля в тяхната пролиферация [526]. Тъй като експресията на естрогеновия рецептор е повишена при развитието на РП, свръхекспресията на miR-375 може да спомогне за туморната прогресия. В изследването на Jung и съавтори е установено, че miR-375 действа като туморсупресор при туморите на устата и редуцира експресията на *CIP2A*, водещо до понижаване на MYC белтъчните нива и редуциране на пролиферацията, способността за формиране на колонии, миграцията и инвазивността [520]. При РП *MYC* също показва повишена експресия по време на туморогенезата [527] при андроген зависимите тумори и при КРРП [528, 529]. Механизмите водещи до промяна в експресията на MYC при РП все още не са напълно изяснени, но е възможно miR-375 да участва в неговата регулация, както при туморите на устата.

Анализът на ROC кривите в нашето проучване показа, че понижената експресия на miR-375 в плазма представлява най-надеждния и точен диагностичен биомаркер и може да разграничи пациентите с РП от контролите с висока чувствителност и специфичност (Фигура 4.97, Раздел 4). Експресионните нива на miR-375 в плазма могат да бъдат използвани не само като прогностичен, но и като диагностичен биомаркер, въпреки че не открихме статистически значима корелация на miR-375 с клиникопатологичните характеристики.

Наблюдаваната понижена експресия на miR-375 може да бъде обяснена не само с малкия брой пациенти с далечни метастази и позитивни лимфни възли, но също така с вероятното присъствие на други съпътстващи заболявания като диабет, простатитис, различни патофизиологични процеси, андроген изчерпваща терапия. miR-375 играе роля не само в карциногенезата, но има и важна роля в регулацията на ключови патофизиологични механизми като глюкозния метаболизъм [530], хепатит Б вирусните инфекции [531], участва и в мултиалергичните заболявания индуцирани от интерлевкин 13 (IL-13) [532] и в развитието на диабет [533-535]. Наскоро бе установено, че нивата на андрогеновия рецептор (AR) негативно корелират с медииранатa от промоторно хиперметилиране репресия на miR-375 в човешки простатни ракови клетъчни линии [536]. В AR негативните простатни тумори нивата на miR-375 са ниски поради хиперметилиране на неговия промотор поради висока активност на DNMT (ДНК метилтрансферази). В AR позитивни простатни тумори се наблюдава обратното [536].

Другите две изследвани микроРНК са let-7c и miR-30c. За членовете на let-7 семейството е открито, че са с понижена експресия при различни видове тумори с малки изключения. Конкретно при РП [332, 537], рака на гърдата [538], рак на яйчниците [539], при недребноклетъчния карцином на белия дроб [540] и при рака на черния дроб [541] let-7c е с понижена експресия. Установено е, че let-7c регулира онкогени, участващи в регулацията на клетъчния цикъл, клетъчната миграция, пролиферация, диференциация и епително-мезенхимната транзиция [542-546].

Експресионните нива на miR-30c са често повишени при различни тумори като при рака на яйчниците [547], мезотелиомата [548], първичен кожен анапластичен едро клетъчен лимфом [549], но са понижени при рака на гърдата [550], бъбречните тумори [551], РП [310, 332, 552-554] и рака на пикочния мехур [555].

В съгласие с други проучвания let-7c и miR-30 са с понижена експресия в голяма част от пациентите в сравнение с ДПХ контролите използвани за калибратори (Таблица 4.63, Фигура 4.96, Раздел 4). Но когато МАМ бяха използвани като калибратори, пациентите с РП се разпределят по равно в групи според експресията си (понижена, повишена и без промяна). По тази причина, когато използваме МАМ като калибратори в ROC анализа за всички изследвани микроРНК-и включвахме и ДПХ контролите с цел да определи дали разграничаването между пациентите с РП спрямо ДПХ контролите и МАМ ще се подобри. Анализът на ROC кривите показа, че когато ДПХ пробите бяха използвани като калибратори, let-7c нивата в плазма имат потенциал да се използват като диагностичен биомаркер за разграничаване на пациентите с РП от ДПХ контролите с AUC- 0.757 и чувствителност от 75% и специфичност от 61% (Фигура 4.97. А)). Специфичността бе по-висока, а чувствителността сходна на тази получени при анализа на ROC кривите на PSA. Сходна площ под кривата (AUC-0.784) за let-7c е получена от Chen и съавтори [332]. Когато МАМ бяха използвани като калибратори в анализа ROC кривите за разграничаване на пациентите от контролите с ДПХ бе наблюдавана по-малка площ на кривата AUC (0.626) (Фигура 4.97. Б)). Chen и съавтори получават по-голяма площ (AUC-0.775), но тяхната група от здрави контроли се състои от възрастни мъже без ДПХ и със средна възраст от 72 години. Те също така са анализирали по-голяма извадка, което също може да е причина за по-малката получена площ под кривата при анализа на ROC кривите. Нито let-7c, нито miR-30c показаха корелация с клиникопатологичните характеристики на заболяването.

След одобрението си през 1986 от Администрацията по храни и лекарства (FDA) в САЩ, PSA тестът прави революция в скрининга и диагностицирането на РП. Въпреки това съществуват ограничения в използването на PSA теста в скрининга на РП. Както бе коментирано вече тестът може да даде фалшиво позитивни и фалшиво негативни резултати. Повечето мъже с повишени нива на PSA (над 4.0 ng/mL) нямат РП, само около 25% от мъжете подложени на простатна биопсия поради повишени нива на PSA всъщност имат РП. Обратно на това, има пациенти с РП, при които стойностите на PSA са нормални [556].

Известно е, че цялостното представяне на PSA теста при скринирането на РП варира. В зависимост от приложените гранични стойности, специфичността и чувствителността на PSA заемат стойности от 20% до 40% и 70% до 90%, съответно [14]. Площта под кривата (AUC) при анализа на ROC кривите е между 0.55 и 0.70 за способността на PSA да идентифицира пациентите с РП [14]. Поради високата честота на фалшиво позитивни резултати, PSA скринингът за РП показва позитивна предиктивна стойност от само 25 до 40% [15]. Една от основните причини за ниската специфичност може да се дължи на това, че нивата на PSA се повишават в резултат на различни немалигнени състояния като инфекции, травми и ДПХ [16, 17]. В допълнение около 15-20% от мъжете с ниски нива на PSA (<4.0 ng/ml) имат РП и около 15% от тях имат високи Gleason score стойности [8].

Резултатите от нашето изследване са близки до тези публикувани в литературата. Площта под кривата е 0.710 (95% CI: 0.559-0.861, p=0.013), с чувствителност 76.8%, и специфичност 53.3% при гранична стойност от 9.15 ng/ml. При гранична стойност 4 ng/ml чувствителността е 100%, но специфичността е едва 6.2%. За разлика от други изследвания, определящи специфичността и чувствителността на PSA ние използвахме по-високи гранични стойности тъй като в нашата група от ДПХ проби средните PSA нива са 11.24 и има само една ДПХ контрола с PSA нива под 4 ng/ml.

Няколко проучвания показват, че мониторингът на PSA стойностите може да се използва за оценка на риска за развитие на агресивен рак (напреднал туморен стадий, висок

Gleason score и метастази) при пациенти с РП [557-561]. PSA нивата заедно с Gleason score и туморния стадий се използват, за да се изчисли риска за развитие на агресивен простатен карцином, за появата на биохимичен рецидив след радикална простатектомия в различни класификатори като D'Amico, CAPRA score [562, 563]. В съответствие с проучванията, които показват корелация на PSA с клиникопатологичните характеристики, открихме статистически значима корелация на PSA с Gleason score, туморния стадий и наличието на лимфни метастази със следните коефициенти на Spearman: 0.612 ($p=5.31 \times 10^{-7}$); 0.576 ($p=4.21 \times 10^{-6}$) и 0.458 ($p=4.34 \times 10^{-4}$). PSA нивата при диагностицирането предсказват наличието на лимфни метастази с 100% чувствителност и 90% специфичност, когато 27.1 ng/ml се използва за гранична стойност.

Анализът на ROC кривите бе използван и за да се оцени диагностичната стойност на комбинациите от изследваните микроРНК-и и PSA. По-висока диагностична стойност бе наблюдавана, когато комбинирахме микроРНК-ите с или без PSA (Фигура 4.98, Раздел 4). Най-добро разграничаване между пациентите с РП и двете групи контроли с 86.8% чувствителност и 81.8% специфичност се получи, когато бяха комбинирани всички биомаркери и MAM бяха използвани като калибратори (Таблица 4.65, Раздел 4). Получената площ под кривата бе 0.877. Когато ДПХ пробите бяха използвани като калибратори, то няколко комбинации от изследваните биомаркери могат по-надеждно да разграничат групите в сравнение с използването на биомаркерите поотделно (Таблица 4.64, Раздел 4). Когато всички 4 микроРНК-и се комбинират AUC е 0.781 и пациентите се разграничават от контролите с ДПХ с 81.4% чувствителност и 81.2% специфичност. Друга надеждна комбинация е между miR-30c, miR-141, miR-375 и PSA с AUC-0.836 и чувствителност от 94.5% и специфичност от 66.7%.

В заключение тези панели, състоящи се от микроРНК и PSA имат предимство пред използването на микроРНК-ите или PSA самостоятелно тъй като различните микроРНК имат променена експресия в различните субтипове на рака и PSA не е специфичен за наличието на рак.

Трябва да се отбележат няколко специфични проблема и ограничения. За първи път докладваме понижена експресия на miR-141 и miR-375 в плазма от пациенти с РП в сравнение с ДПХ проби. Възможна причина за това може да бъде хетерогенната група от пациенти включени в изследването със само двама пациента с далечни метастази. В други публикувани проучвания сравнения на нивата на експресия на циркулиращите miR-141 и miR-375 са правени между пациенти с РП с или без метастази или между пациенти с метастази и здрави контроли с цел разграничаване на пациентите с агресивен рак. За разлика от тях ние сравнихме нивата на експресия между всички пациенти и контроли. Друго възможно обяснение за miR-375 е, че тази микроРНК играе роля в няколко патологични процеса и се асоциира не само с рак, но и с диабет, алергични състояния и възпаления. За съжаление нямахме достатъчно данни за тези съпътстващи заболявания при анализираните пациенти, за да тестваме и тази хипотеза. В допълнение, експресионните нива на плазмените нива на miR-375 и CpG промоторното хиперметилиране на гена, кодиращ тази микроРНК могат да показват етнически различия, както това е показано в едно изследване на диабет тип II [564]. Също е намерено, че AR нивата негативно корелират с транскрипционната репресия на miR-375 чрез промоторно хиперметилиране в простатни ракови клетъчни линии [536]. По тази причина хормоналната терапия, повлияваща нивата на AR вероятно също повлиява нивата на miR-375 в човешки простатни ракови клетки и следователно и нивата на тази микроРНК в циркулация.

За miR-141 получихме по-високи стойности на Ct в сравнение с другите изследвани микроРНК-и вероятно поради ниските нива на тази микроРНК в плазма в сравнение със серум или поради не осъществяване на пре-амплификационна стъпка.

На второ място, трябва да се отбележи, че не наблюдавахме корелация на изследваните микроРНК-и с клиникопатологичните характеристики. Такива корелации бяха наблюдавани само за PSA. Вероятно експресионните нива на микроРНК-ите не са се повлияли драматично от Gleason score, туморния стадий и развитието на лимфни метастази както серумните нива на PSA в изследваните пациенти. Друго ограничение е сравнително малката изследвана извадка. Необходимо е провеждането на независимо изследване, включващо по-голяма група от пациенти и контроли, за да се направят окончателни заключения за използването на експресията на изследваните микроРНК в плазма, като по-надежден диагностичен маркер при РП.

5.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ микроРНК ЕКСПРЕСИОННОТО ПРОФИЛИРАНЕ ЧРЕЗ МИКРОЧИПОВЕ В ТУМОРНИ И НОРМАЛНИ ПРОСТАТНИ ТЪКАНИ

5.6.1. Обсъждане на микроРНК-ите, показали диференциална промяна

Чрез микрочиповата технология едновременно могат да се анализират стотици микроРНК-и. Това дава възможност на изследователите да проучат тяхната роля в карциногенезата. За пръв път Lu и съавтори показват, че микроРНК експресионните профили могат надеждно да отдиференцират малигнени от нормални тъкани, а така също и да разграничават различните видове тумори [565]. Първоначално е установено от няколко изследователи, че в голяма част от туморите (включително и тези при РП) съществува значително понижение на експресията на повечето от изследваните микроРНК-и в сравнение с нормални тъкани [310, 311, 565]. Глобалното понижение на експресията на микроРНК-ите в простатните карциноми обаче не е потвърдено в изследванията на Volinia и съавтори [566], както и в няколко скорошни проучвания [306, 313, 567], в които преобладават микроРНК-ите с повишена експресия или техният брой е равен на тези с намалена експресия. **В нашето проучване установихме, че по-голям брой от микроРНК-ите с установена промяна са с повишена експресия (28 на брой; Таблица 4.66, Раздел 4), отколкото с понижена (14 на брой; Таблица 4.67, Фигура 4.105, Раздел 4), което противоречи на първоначалните резултати за РП, но е в съгласие с няколко скорошни проучвания. В допълнение, в отделните изследвания са анализирани различен набор от микроРНК-и чрез различни платформи. Това може да е вероятна причина за противоречивите резултати.**

Изследвахме експресията на микроРНК-ите в **туморни тъкани от радикални простатектомии** тъй като по този начин може да се осигури достатъчно туморна тъкан и висок добив на РНК необходим за провеждането на микрочипов анализ. Сравнявахме експресията на микроРНК-ите в туморните тъкани спрямо **нормални простатни тъкани от биопсии на контроли с ДПХ**. Използвахме така подбрани нормални тъкани по две причини: 1) в клиничната практика е необходимо разграничаване на пациентите с рак от тези с ДПХ, а не диференциране на туморни и нормални тъкани в едни и същи пациенти и 2) възможно е възникване на промени в експресията на микроРНК в строма и нормални тъкани в близост до туморни. Сходен дизайн на експеримента е използван и в други проучвания [310, 566].

Установените микроРНК-и с повишена експресия (Таблица 4.66, Раздел 4) в изследваните от нас простатни тумори показват промяна от 3 до 172 пъти като повечето са с над 17 пъти промяна. По-голяма част от микроРНК-ите с понижена експресия (Таблица 4.67) показват от 2 до 9 пъти промяна, а 3 от тях над 80 пъти намалена експресия. **До този момент в изследванията на микроРНК профилите при РП чрез микрочипове не е докладвана толкова значителна промяна в експресията.** Степента на промяна на микроРНК-ите с повишена експресия в проучванията варира в границите 1.5 до 6.36 [306, 313, 568]. Аналогично, степента на промяна на тези с понижена, варира между 1.5 – 3 в литературата. Само в проучването на Не и съавтори се докладва промяна в експресията 58.96 пъти за една микроРНК с понижена експресия [568]. Трябва да се отбележи, че микроРНК-и с намалени нива, показващи над 80 пъти промяна в текущото изследване, се експресират в под 5 проби (туморни и нормални тъкани). Възможно е те да са случайно попадение, но също така е вероятно те да играят роля в простатната карциногенеза, но не при всички тумори. За да се изясни тяхното значение за развитието на РП е необходимо провеждането на проучване, включващо голям брой тумори и нормални тъкани.

Част от установените микроРНК с променена експресия са докладвани и в други проучвания на РП. От 28-те микроРНК с увеличена експресия, 7 са докладвани в литературата и са показали асоциация с РП и това са: miR-17*, miR-194, miR-126*, miR-299-5p, miR-381, miR-186, miR-582-5p. От 14-те микроРНК с понижена експресия, 7 са докладвани: miR-634, miR-1234, miR-144. miR-486-5p, miR-484, miR-494 и miR-196.

За някои от тези микроРНК-и получените от нас резултати са в съгласие с тези получени от други изследователи като например: **miR-17*** [273], **miR-194** [325, 569], **miR-126*** (miR-126-5p) [570, 571], **miR-582-5p** [572,] от показалите повишена експресия и **miR-634** [573], **miR-1234** [335], **miR-486-5p** [571], **miR-484** [335], **miR-494** [574], от показалите понижена експресия.

От установените микроРНК-и с диференциална промяна 9 спадат към miRNA* веригите. Прекурсорните микроРНК-и (pre-miRNA) се процесират и освобождават дуплекси miRNA/miRNA*. В общоприетия модел на микроРНК биогенезата една от веригите от дуплекса наречена верига-носител, спътник, обозначена като miRNA* се смята за неактивна и се разгражда [273]. **Обаче редица проучвания показват, че miRNA* (микроРНК*) веригите участват в регулацията на транслацията от иРНК** [575-579]. Yang и съавтори например установяват, че както miR-17-5p, така и miR-17-3p (miR-17*) инхибират TIMP3- металопептидазен инхибитор и повишената им експресия засилва простатния туморен растеж и инвазия, като увеличават клетъчната пролиферация, формирането на колонии, спомагат за клетъчното оцеляване и инвазивност [273]. В нашето проучване само експресията на **miR-17***, но не и тази на miR-17 показва статистически значима повишена експресия. Възможно обяснение е, че miR-17* има и допълнителни функции, разпознава и регулира и други мишени различни от тези на miR-17. Мишените на miR-17* е вероятно да имат по-голяма роля в инициацията на простатната карциногенеза в сравнение с тези на miR-17, които могат да имат по-голямо значение за туморната инвазивност и прогресия. Сходен резултат получихме за miR-21*. Вероятно тази микроРНК участва в регулацията на част от гените регулирани от miR-21, която показва повишена експресия в редица проучвания на РП [580-582]. Повишената експресия на miR-21 е установено, че корелира с появата на биохимичен рецидив, с по-агресивните клиникопатологични характеристики на простатните тумори и представлява добър прогностичен, а не диагностичен биомаркер. Не установихме статистически значима промяна на miR-21 в нашето проучване и това може да се обясни с включването само на двама пациенти с метастази. За да определим ролята на miR-21 и miR-17 за развитието на агресивни простатни тумори при български пациенти, то е необходимо провеждане на допълнително изследване, включващо голям брой тумори с различни клиникопатологични характеристики.

За микроРНК-ите **miR-194** и **miR-582-5p**, с повишена експресия в нашето проучване, е установено, че корелират с риска за поява на биохимичен рецидив и кастрационна резистентност [569, 572]. Експресията на miR-194 може да има и диагностична стойност тъй като е установено, че е повишена в над 40% от изследваните от Tong и съавтори радикални простатектомии на пациенти с различни клиникопатологични характеристики [325]. Това е в съгласие с получените от нас резултати. Експресията на miR-582-5p до този момент е изследвана само в ксенографтни модели и клетъчни линии на РП и нейната роля в простатната туморогенеза предстои да бъде изяснена.

Показалата понижена експресия **miR-634** вероятно има туморсупресорна роля в развитието на РП тъй като е установено, че потиска андроген-индуцираната пролиферация при простатни ракови клетъчни линии. Östling и съавтори показват, че miR-634, както и miR-541, miR-631, miR-644, miR-654–5p са по-ефикасни инхибитори на клетъчния растеж от AR siRNA или Casodex третиране [573].

Понижена експресия на **miR-1234** и **miR-484** е установена в урина на пациенти с РП в сравнение със здрави контроли като експресионните нива на miR-484 имат диагностична стойност за РП според Haj-Ahmad и съавтори [335]. До този момент не е доклавана диференциална експресия на тези две микроРНК-и в простатни тумори. В нашето проучване те показват понижена експресия .

Нивата на **miR-494** също не са анализирани в простатни тумори, а понижена експресия е установена в простатни ракови клетъчни линии. Открито е, че тази микроРНК регулира експресията на *CXCR4* и повишената и експресия води до инхибиране на растежа, иницииране на апоптоза и потискане на миграцията и инвазията на PC-3 и DU145 простатните ракови клетъчни линии in vivo [574].

Експресията на **miR-196** не е изследвана в простатни тумори, но е установено, че полиморфизъм (rs11614913) в гена, кодиращ тази микроРНК, повишава риска за развитието на РП [181].

За разлика от miR-634, miR-1234, miR-196, miR-484 и miR-494, които не са изследвани в простатни тъкани, **miR-486-5p** показва понижена експресия в простатни тумори [571, 583], което е в съгласие с получените от нас резултати.

Някои от микроРНК-ите показали повишена експресия в нашето проучване, но недокладвани до този момент в литературата за връзка с РП, са потенциални онкогени тъй като са показали повишена експресия при други онкологични заболявания. Например **miR-130b** показва повишена експресия при колоректалния карцином [584], сквамозните карциноми на главата и шията [585], рака на черния дроб [586], рака на яйчниците [587]. Установено е, че miR-130b регулира in vitro и in vivo експресията на пероксизомния пролиферативно-активиран рецептор γ (PPARγ) при рак на дебелото черво. Инхибирането на PPARγ повлиява нивата на PTEN, E-кадхерин, Snail и васкуларния ендотелен растежен фактор, които регулират клетъчната пролиферация, епително-мезенхимна транзиция и ангиогенеза [584]. Други микроРНК-и, които са потенциални онкогени са **miR-362-3p, miR-362-5p, miR-382, miR-423-3p, miR-502-3p, miR-99*, miR-29-b1*, miR-21*, miR-664, miR-590-5p, miR-186.** За да се потвърди ролята им за развитието на РП, трябва да се проведат допълнителни проучвания в независими извадки от пациенти и контроли.

miR-340 е с повишена експресия и показва най-значимата промяна в нашето проучване - 172.57 пъти. До този момент не е докладвана за връзка с РП, но е изследвана при други малигнени заболявания като меланома, рак на дебелото черво, остеосаркома, недребноклетъчния рак на белия дроб и други, където играе туморсупресорна роля [588-591]. Възможно е тя да има туморсупресорни функции при някои видове тумори, но онкогенни при РП, както това е показано за много други микроРНК-и. Предстои изясняването на ролята на miR-340 в простатната туморогенеза. В подкрепа на онкогенната роля на тази микроРНК при РП, са установените гени с туморсупресорни функции, които тя регулира, като FAS, FASL, NLK, NF1, TGFB2, BUB3, MAD2, MSH2 и други.

Потенциални туморсупресорни микроРНК-и, показали намалена експресия в текущото проучване са miR-144 и miR-215. Те са с установена понижена експресия при други тумори. miR-144 например има туморсупресорна роля при рака на щитовидната жлеза [592], ларингиалния карцином [593], рака на яйчниците [594], рака на пикочния мехур [595]. Установено е, че тази микроРНК регулира *EZH2* [595]. EZH2 е хистон-метилтрансфераза, която е с повишена експресия при РП и представлява прогностичен маркер [596]. Възможно е miR-144 да повлиява експресията на *EZH2* и при РП. Има едно проучване за РП, в което обаче експресията на тази микроРНК е повишена в простатни тумори [597]. Ролята на miR-144 като онкоген или туморсупресор при РП предстои да бъде изяснена.

miR-215 има туморсупресорна роля при рака на гърдата [598], рака на бъбреците [599] и рака на дебелото черво [600].

Изследваните от нас микроРНК-и в плазма като miR-375, mir-141, let-7c и miR-30c не достигат статистически значими разлики в експресията при изследването на простатни тумори чрез микрочиповия анализ. Това може да се дължи на малката изследвана група от пациенти и контроли, а така също на приетата гранична стойност от 2 за степен на промяна. Например, в изследването на Schaefer и съавтори, които също използват платформата на Agilent установяват, че miR-375 е с 1.52 пъти повишена експресия в простатни тумори [313]. Сходно на нашето проучвания и в други не се установява статистически значима променена експресия на тази микроРНК [310, 567, 568].

Експресията на miR-375 е повишена в петима пациенти (35.71% от общия брой пациенти) с РП в сравнение с контролите с ДПХ. Това е в подкрепа на литературните данни, но противоречи на предходните получени от нас резултати, тъй като в плазма miR-375 показва понижена експресия. miR-141 има понижена експресия в двама пациенти (14.29%) и също в толкова повишена. Поради тази причина не може да се направи категорично заключение. miR-30c и let-7c показват понижена експресия в един пациент и също в един повишена. Отново тези резултати не са достатъчни, за да се направи извод. Противоположните резултати, които получихме за miR-375 може да са случайни. По тази причина трябва да се изследват по-голям брой тумори и плазми от едни и същи пациенти, за да се определи дали има корелация в нивата на тази микроРНК в двата вида биологични материали. Сходно на нас, Kin и съавтори установяват повишена експресия на микроРНК в тъкани от атеросклеротични, абдоминални, аортни аневризми и понижена експресия на същите микроРНК-и в циркулация. Tanaka и съавтори също докладват, че плазмените нива на miR-92a са значително понижени в пациенти с неходжкинов лимфом в сравнение със здрави контроли, въпреки че тази микроРНК е значително повишена в малигнени лимфомни клетки [601]. Те спекулират, че раковите клетки осъществяват ендоцитоза на екзозомите отделени от други клетки и съдържащи miR-92a, което води до понижаване на нивата на тази микроРНК в кръв [601, 602]. Друго възможно обяснение е, че раковите клетки могат специфично да разграждат miR-92a в плазма директно или индиректно. Тези предположения могат да обяснят и наблюдаваните от нас резултати за miR-375, но на този етап това не може да се установи, преди да се проведат допълнителни изследвания.

Има редица проучвания за ролята на микроРНК-ите за развитието на РП. Част от докладваните микроРНК-и са показали променена експресия в единични изследвания и не са валидирани до този момент. За други съществуват противоречиви резултати. Изследователите, осъществяващи широко мащабно микроРНК експресионно профилиране чрез микрочипове, PCR-чипове или чрез новогенерационно секвениране докладват различен набор от микроРНК с променена експресия. Наблюдава се припокриване само за единични микроРНК-и. Всичко това показва, че са необходими още проучвания, а причините за вариациите в резултатите се дължат на различните методи за съхранение и процесиране на използваните биологичните материали, различните платформи и методи използвани за анализ на експресията, различните начини за нормализация на резултатите и ниската статистическа сила на извадките при някои проучвания. В допълнение, съществуват различия и в дизайна на самите проучвания.

5.6.2. Обсъждане на повлияните гени и клетъчни пътища

Проведеният онтологичен анализ показа, че най-много гени (mRNA) повлияни от микроРНК-ите с диференциална експресия (Фигура 4.108, Раздел 4) участват на

първо място в генната експресия, а след това в апоптозата, клетъчната пролиферация и клетъчния отговор към растежни фактори и ДНК, увреждащи стимули и др. Карциногенезата се инициира и съпътства от промяна в генната експресия. Вследствие на променената експресия се модулират важни клетъчни процеси, необходими за оцеляването на раковите клетки. Tang и съавтори използват данните от анализирани 4 miRNA микроочипове при РП, за да установят клетъчните пътища, които са повлияни от диференциално експресираните микроРНК-и. Те взимат под внимание хетерогенността на простатните тумори и използват различни статистически методи. Сходно на нашето проучване те откриват, че най-много гени имат GO термини свързани с транскрипцията (генната експресия) и нейната регулация [603].

За да се определи експресията на кои от иРНК-и наистина е повлияна от микроРНК-ите показали промяна, е необходимо тяхното изследване в простатните тумори. Част от тези иРНК са валидирани в други проучвания на РП или други малигнени заболявания, но редица от тях са установени чрез биоинформатични анализи. По тази причина е добре провеждането на допълнително валидиращо проучване на подбрани гени мишени.

Сигналните пътища най-силно повлияни от участници в тях с променена експресия са **MAPK сигналния път; пътищата, регулиращи апоптозата; клетъчната адхезия; клетъчния цикъл; ДНК поправката; Wnt сигналния път; EGF-EGFR сигналния път; p53 сигналния път; NOTCH сигналния път и други**. В един метаанализ на данните от експресионното профилиране на гени (mRNA) чрез микрочипове се установяват няколко клетъчни пътища асоциирани с простатната карциногенеза. Голяма част от пътищата докладвани в този метаанализ са силно засегнати вследствие действието на микроРНК-ите и в текущото проучване [604]. Няколко пътища обаче важни за простатната карциногенеза, като например метаболизма на пурини, аргинин, пролин и глутатион, коментирани в метаанализа, са слабо засегнати в нашето проучване и по тази причина не са разглеждани. Shtivelman и съавтори определят като важен път и андроген рецепторното сигнализиране, което не е разглеждано в метаанализа [605]. В нашето проучване този път е слабо засегнат. Това може да се обясни с факта, че експресията и активността на участниците в него са основно повлияни от мутации, амплификации, делеции, които са по-чести при метастатичните кастрационно резистентни карциноми [605]. **Продължават да се откриват и нови пътища засегнати при простатната карциногенеза.** Например в проучването на Tang и съавтори се откриват два нови пътя с потенциална роля при РП: 1) лиганд-независимо активиране на ESR1 и ESR2, и 2) мембранно свързан ESR1 и сигнализиране свързано с растежните фактори [603]. **РП е хетерогенен и по тази причина в отделните проучвания се установяват различни повлияни пътища, като е затруднено определянето на най-важните и най-силно засегнатите. Част от установените пътища се докладват в няколко проучвания докато други са установени само в единични изследвания. За да се разбере молекулната основа на РП, е необходимо натрупването на още данни и тяхното коректно анализиране.**

5.6.2.1. MAPK сигнален път

Митоген активираните протеин киназни (MAPK) сигнални пътища са **еволюционно консервативни сред еукариотите и е установено че играят роля в набор от биологични процеси, включващи клетъчния растеж, диференциация, апоптоза, възпаление и отговор на клетката към стресови стимули** [606]. Съществуват 4 основни MAP киназни пътя, в които участват: извънклетъчно сигнално регулирана киназа (ERK, известен още като p42/44 MAP киназа), c-*jun* N-терминална киназа (JNK, известна още като стрес активирана протеин киназа- 1- SAPK1), Big MAP киназа (BMK, още известна като ERK5), и p38 MAPK (още известна като SAPK2/RK) [607].

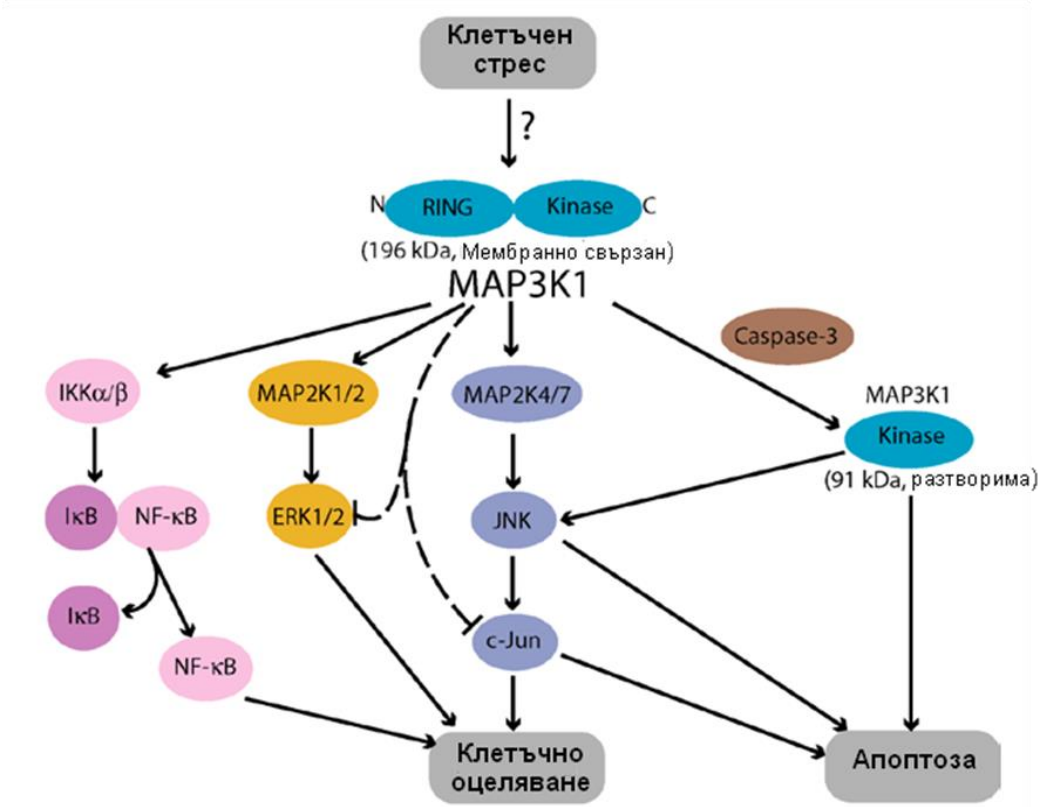
Участниците в този път, които са свързани със стопиране на клетъчния цикъл и водещи до апоптоза са повлияни от микроРНК-и с повишена експресия, тоест тези участници са инхибирани. Позитивно са повлияни участници, които повишават клетъчната пролиферация и възпалителните процеси (Таблица 4.69, Раздел 4).

MRAS е с предполагаема повишена експресия. Представлява **онкоген**, част от RRAS субгрупата и е отговорен за клетъчната трансформация и диференциация [608-610]. MRAS взаимодейства и регулира SHOC2-PP1 комплекса, който на свой ред дефосфорилира S259 на RAF протеините, когато са свързани към други RAS белтъци. MRAS играе важна роля за активирането на ERK от рецепторни тирозин кинази и RAS [611]. **За разлика от H/K/N-RAS гените, активирането на *MRAS* чрез мутации при рак е изключително рядко събитие** [612]. **В нашето проучване *MRAS* е мишена на микроРНК-и с понижена експресия, а неговият инхибитор *NF1* е мишена на микроРНК-и с повишена експресия. По тази причина е възможно *MRAS* експресията да е увеличена в изследваните простатни тумори. Установено е, че повишената експресия на този ген подпомага миграцията и инвазията на клетките, туморната прогресия и епително-мезенхимната транзиция** [613] [614].

NF1 е важен **туморсупресор** и мутации в него водят до доминантното генетично заболяване неврофиброматоза тип 1. Мутации или делеции в този ген обаче са открити и при множество онкологични заболявания като рака на гърдата [615], рака на белия дроб [616], глиобластома [617] и др. **При РП този ген е много рядко мутирал** (E19), но е възможно експресията му да е понижена в изследваните простатни тумори вследствие на действието на микроРНК-ите с повишена експресия. Според Човешкия Белтъчен атлас (E20) NF1 е с отсъстваща или понижена експресия в повече от половината изследвани туморни тъкани в сравнение с нормални тъкани, което е в подкрепа на получените от нас резултати. **Този ген се регулира от най-много микроРНК-и с повишени нива и вероятно неговата експресия е силно намалена в изследваните простатни тумори**. NF1 предпазва от клетъчен свръхрастеж чрез регулация на RAS белтъците, които стимулират клетъчния растеж и делене. Установено е, че NF1 регулира и други белтъци (Фигура 4.122, Раздел 4.).

MAP3K1 или *MEKK1* (MEK kinase 1) е с предполагаема повишена експресия в изследваните простатни тумори. Принадлежи към MAP3K семейството и STE суперсемейството [618]. Активира се от различни стимули като растежни фактори, провъзпалителни цитокини, нарушения в микротубулите и във формата на клетките, ниска температура, хиперосмоларност и други стресови стимули [619, 620]. Активираният MAP3K1 стимулира както MAP2K4/7-JNK, така и MAP2K1/2-ERK1/2 сигналните пътища. Докладвано е, че MAP3K1 също активира p38 сигналния път. В отговор на провъзпалителни цитокини и специфични стресови стимули, MAP3K1 може да фосфорилира и да активира IκB киназа α и β, водещо до NF-κB активиране. ERK и NF-κB сигналните пътища инициират клетъчно оцеляване докато JNK, действащ чрез AP-1 транскрипционни фактори (основно c-Jun) има както про- така и анти- апоптотични ефекти в зависимост от клетъчния тип и вида стимули [621].

Установена е връзка между MAP3K1 и хормон рецепторното сигнализиране. MAP3K1 може да активира транскрипционната активност на андрогеновия рецептор (AR) в простатни ракови клетки вероятно чрез JNK и p38 сигналните пътища. Това показва, че има онкогенни функции при РП, което е в съгласие с получените от нас резултати [622].



Фигура 5.7. Двойствените функции на MAP3K1, определящи съдбата на клетката. *Активирането на MAP2K4/7-JNK-c-Jun, MAP2K1/2-ERK1/2 и NF-κB от MAP3K1 с пълна дължина инициира клетъчно оцеляване докато действието на каспази, водещи до образуването на хидрофилен цитоплазмен домен от MAP3K1 индуцира апоптозата. MAP3K1 също убиквитинира c-Jun и ERK1/2, водещо до тяхното разграждане [621]*

NLK (Nemo-like kinase) е MAPK- подобна киназа, принадлежаща към пролин-насочваното серин/треонин киназно суперсемейство, което се състои от MAPK кинази и циклин зависими кинази (CDK) [623] и се регулира от 19 микроРНК-и с повишена експресия. **Установено е, че NLK може драматично да промени активността на други транскрипционни фактори като NF-κB, Smads, AP1 и p53 [624, 625], като това се вижда и от анализа на белтък-белтъчните взаимодействия** (Фигура 4.118, Раздел 4). Медиатор е на Wnt сигналния път, като директно се свързва към c-Myb, супресор на апоптозата и води до неговото фосфорилиране, убиквитиниране и протеозомно-зависимо разграждане. Може да индуцира апоптоза и играе важна роля в регулацията на клетъчния растеж и развитие [626]. Следователно е **важен туморсупресор, регулиран от микроРНК-ите с повишена експресия и вероятно с понижени нива в изследваните простатни тумори.**

Установено е, че експресията на този ген е понижена при метастази в сравнение с нормална простатна тъкан и първични простатни тумори и е показано, че индуцира апоптоза в простатни ракови клетки. Инхибирането на експресията на ендогенен NLK води до повишаване на андроген рецепторно медиираната транскрипционна активност. Повишената експресия на NLK корелира с понижаване на нивата на AR [627]. NLK е туморсупресор с намалена експресия в туморна тъкан в сравнение с нормална тъкан и при рак на дебелото черво [628], рака на гърдата [626], недребноклетъчния рак на белия дроб

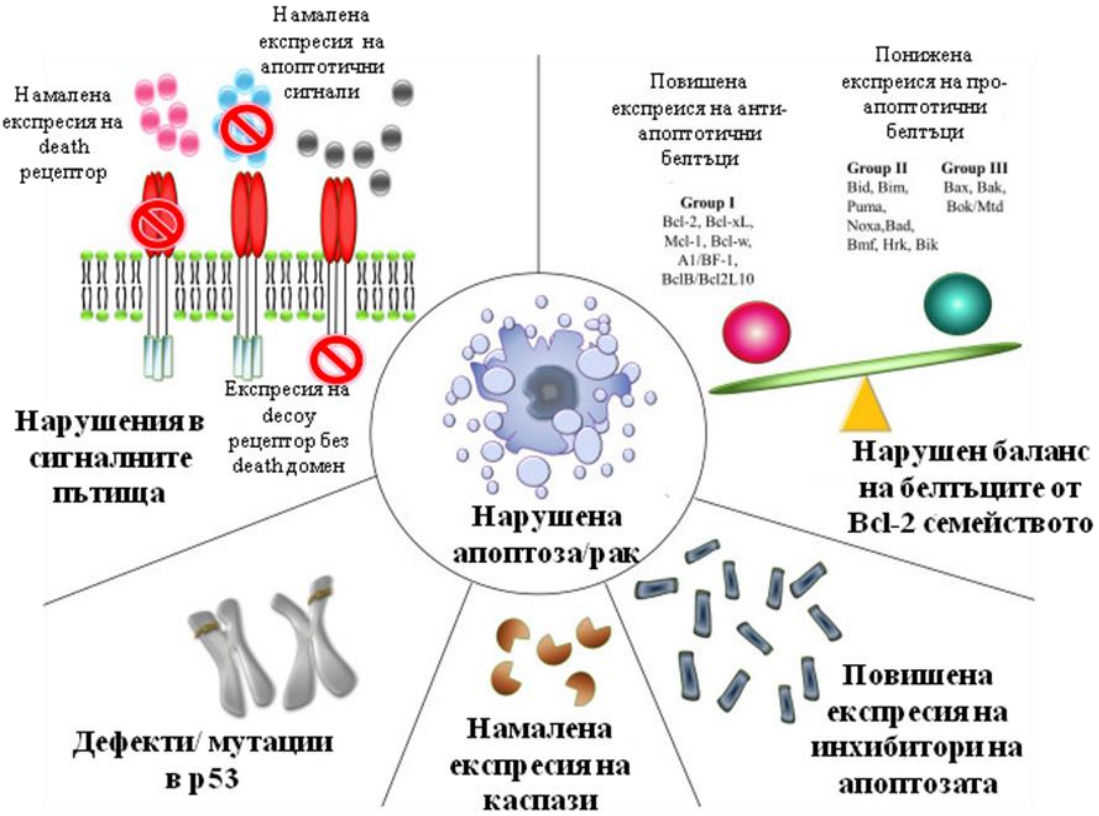
[629], при глиома [630] и други, и често експресията му корелира с хистологичния стадий и развитието на метастази като това го прави потенциален прогностичен маркер.

ATF2 също е мишена на 13 микроРНК-и показали промяна в експресията. **Вероятно този ген е с понижена експресия.** Член е на семейството на активиращите (ATF- cAMP-зависими транскрипционни фактори) и CREB (cAMP-response-element-binding) транскрипционни фактори, които могат да хомодимеризират или хетеродимеризират с членове на Jun, Fos или Maf транскрипционни фактори. Формираните комплекси регулират разнообразни клетъчни функции: като отговор към стрес, ембрионалното развитие и клетъчната смърт. За да е активен, ATF2 трябва да бъде фосфорилиран от JNK, p38 (MAPK14) или от ERK1. След като бъде активиран в резултат на стресови и цитокинови стимули, ATF2 допринася за клетъчния отговор към хипоксичен или осмотичен стрес, ДНК повреди, вирусни инфекции и апоптоза. **Установено е, че ATF2 е онкоген при меланома и е туморсупресор при немалигнени кожни тумори и рака на гърдата. Противоположните функции на ATF2 са свързани с неговата субклетъчна локализация.** В ядрото ATF2 стимулира глобална транскрипция и е отговорен за клетъчния отговор при ДНК повреди, а така също участва и в клетъчното развитие, пролиферация и апоптоза. ATF2 може да бъде транслоциран в цитозола и при генотоксичен стрес той уврежда митохондриалния мембранен потенциал и инициира апоптоза [631]. **При РП няма достатъчно проучвания, които да обяснят ролята на ATF2 като туморсупресор или онкоген.** Ricote и съавтори установяват, че ATF2 е с по-висока експресия в простатни тумори в сравнение с нормална простатна тъкан с и без ДПХ [632]. Според Човешкия белтъчен атлас обаче експресията на ATF2 е понижена в голям процент от изследваните тумори в сравнение с нормалните простатни тъкани, които показват средно и високо имунохистохимично оцветяване (E20).

5.6.2.2. Сигнални пътища свързани с апоптоза

Апоптозата и гените, които я контролират повлияват развитието на малигнен фенотип [633]. Kerr и съавтори още през 70-те години установили, че апоптозата може да се използва като механизъм за отстраняване на малигнени клетки, хиперплазия и предотвратяване на туморната прогресия [634]. Съществуват различни механизми (Фигура 5.2), чрез които раковите клетки инхибират апоптозата като основните са: 1) нарушаване на баланса между про-апоптотичните и анти-апоптотичните белтъци; 2) редукция на каспазната активност; 3) засягане на Death рецепторното сигнализиране [633].

В резултат на диференциално експресираните микроРНК-и апоптозата се инхибира тъй като се нарушава баланса между про-апоптотичните белтъци и анти-апоптотичните белтъци, редуцира се каспазната активност и се повлияват сигнални пътища свързани с апоптозата. Модулиран е и отговора на клетката към стресови сигнали. От каспазите е инхибирана ***CASP11***. Повишена е експресията на инхибитора на апоптозата сървивин (***BIRC5***). Потиснат е външния път на апоптозата чрез инхибиране на Death рецептора ***FAS*** и неговия лиганд ***FASL***, а така също някои от активаторите на апоптозата: ***APAF1, ARHAGP10***. Инхибирана е и експресията на ***DCC***, който индуцира алтернативен път на клетъчна смърт. С понижена експресия е и ***TP53***, главен туморсупресорен ген, чиято основна функция е да индуцира апоптозата. Модулатори на отговора на клетката към стресови стимули повлияни от микроРНК-ите са например ***GADD45A*** и ***IL1A*** **(Таблица 4.70, Раздел 4)**.



Фигура 5.8 Механизми, водещи до инхибиране на апоптозата в раковите клетки.

Нелогично е повлияна експресията на някои от гените като например ***DAXX*** и ***PTK2***, които трябва да са с повишена експресия тъй като инхибират апоптозата, а така също и ***PUMA*** (*BBC3*), който е повлиян от микроРНК с понижена експресия, а той е белтък, участващ в индукцията на апоптозата [635, 636]. ***DSG1*** е установено, че не се експресира в простатни епителни клетки и по тази причина е случайна мишена [637].

APPL1 участва в регулацията на клетъчната пролиферация, в ендозомната биогенеза и прави връзка между адипонектин и инсулин сигналния път [638]. Индиректно участва в регулацията на апоптозата чрез взаимодействие с Akt сигналния път. Установено е, че понижаване или изключване на експресията на този ген води до индуциране на апоптоза [639].

Експресията на този ген е повишена при РП в сравнение с немалигнени простатни клетъчни линии, което е в съгласие с наблюдаваната променена ендозомна биогенеза при РП [638]. В нашето проучване APPL1 се повлиява от микроРНК-и с повишена експресия и се предполага, че го инхибират, което противоречи на литературните данни. Възможно е този ген да е случайна мишена на установените диференциално експресирани микроРНК-и.

Генът **DCC** (deleted in colorectal cancer) е туморсупресорен ген и първоначално е открито, че е с понижена експресия в над 50% от туморите на дебелото черво [640]. Загуба или намалена експресия на този ген след това се открива и при езофагиалния карцином, рака на стомаха, рака на гърдата, рака на панкреаса, рака на пикочния мехур, невробластомите, глиомите, някои левкемии [640-644]. Установено е, че и при РП експресията на този ген е понижена [645]. В нашето проучване 16 микроРНК-и, които са с повишена експресия регулират DCC (Таблица 4.70) и вероятно белтъчните нива на този ген са понижени, което е в съгласие с литературните данни. DCC кодира молекула, която има голяма хомология с адхезионните молекули. Клетъчно адхезионните молекули са

повърхностни клетъчни рецептори, които имат важна роля в множество процеси като ембриогенезата, образуването на тромби, излекуването на рани, насочването на клетките, имунни реакции, а така също и туморната прогресия и метастазиране [645]. Установено е още, че DCC инициира клетъчна смърт независимо от митохондриално-зависимия път и death receptor/caspase-8 сигналния път. DCC взаимодейства с caspase-3 и caspase-9 (Фигура 4.120, Раздел 4. Резултати) и води до активирането им без да е необходимо наличието на цитохром с или Apaf-1. По тази причина DCC определя допълнителен път за независимо от формирането на апоптозома активиране на каспазите [646].

ROCK1 е потенциален онкоген [647], но има изследвания, които показват че понижени нива на този ген имат анти-апоптотичен ефект [648]. В нашето проучване ROCK1 се регулира от микроРНК-ите с повишена експресия. Предстои изясняването на ролята на този ген в простатната карциногенеза.

SATB1, който е мишена на микроРНК-ите с повишена експресия е потенциален онкоген при РП [649], но е установено че повишената му експресия води до апоптоза при ракови клетъчни линии на Т-клетъчна лимфома [650]. По тази причина провеждането на допълнителни анализи са необходими за определяне на точните му функции за развитието на РП.

IL-1, а така също и TNF-α са важни провъзпалителни цитокини, които участват в инициацията и прогресията на няколко злокачествени заболявания [651]. Установено е, че провъзпалителните цитокини могат да инхибират p-53 индуцираната апоптоза [652]. IL-1 семейството се състои от два основни агонистични лиганда, IL-1α и IL-1β, кодирани съответно от *IL1A* и *IL1B* [653]. В нашето проучване **IL1A** е мишена на микроРНК-ите с понижена експресия и вероятно този провъзпалителен цитокин е с увеличена експресия.

Повърхностно клетъчния рецептор **FAS** наречен още Apo-1 или CD95 е член на семейството рецептори TNF (тумор некрозис фактор) и NGF (невроналния растежен фактор). Индуцира клетъчна смърт чрез Fas/Fas лиганд (FasL) взаимодействия [654]. FAS, а така също и неговият лиганд са вероятно с понижена експресия, тъй като се регулират ог микроРНК-и с установена понижена експресия в нашето проучване.

GADD45A играе съществена роля като стресов сензор, който модулира клетъчния отговор към различни стресови условия, включващи генотоксичен и онкогенен стрес. Той медиира отговор към стресови стимули взаимодействайки и модулирайки функциите на неговите партньори, които играят ключови роли в клетъчния контрол, ДНК поправката и клетъчното оцеляване. Установено е че действа като туморсупресор в RAS- активирана туморогенеза чрез увеличаване на JNK-медиирана апоптоза и p38- медиирано стареене, но в същото време е открито че действа като онкоген при тумори с повишена експресия на c-Myc. По тази причина GADD45A действа като туморсупресор или онкоген чрез въздействане на различни ефекторни пътища [655]. В нашето изследвания GADD45A вероятно е с понижена експресия тъй като е мишена на микроРНК-ите показали повишена експресия. Тези резултати са в съгласие с други проучвания на РП [656, 657].

5.6.2.3. Wnt сигнален път

Wnt сигналният път регулира ембрионалния растеж, определя клетъчната съдба, регулира пролиферацията, полярността и миграцията. Също така участва в поддържането на популациите на стволовите клетки. Силно консервативен път от червеи до бозайници.

Действието на микроРНК-ите активира пътя тъй като позитивно е повлияна експресията на няколко Wnt лиганди (*WNT4*, *WNT6*, *WN5B*) и един от техните рецептори (*FZD2*), а са инхибирани някои туморсупресорни гени като *PPP2R5E*, *PKD1*

(Таблица 4.71). Експресията на ***RACGAP1*** вероятно е повишена, а този ген е потенциален онкоген. **Вследствие на активирането на този път се увеличава пролиферацията и се инхибират апоптотичните сигнали** [658, 659].

Wnt белтъците са голямо семейство на цистеин богати, секретиращи се лиганди, които се свързват към рецептори, пронизващи мембраната 7 пъти и кодирани от frizzled гените. Активираните рецептори предават сигналите към цитоплазмения белтък Dishevelled (Dvl), който образува комплекс с аксин, продукт на гена *AXIN1* и предизвиква дефосфорилиране. Аксинът служи като гръбнак и за поддържането в близост на APC и β-катенин (кодиран от *CTNNB1*). Така подпомага фосфорилирането на APC и β- катенина от гликоген синтаза киназа 3 β (GSK3β) [660]. В клетъчни линии на рак на гърдата е открито, че освен *WNT1* с повишена експресия са *WNT4* и *WNT6*, а така също и *FZD1* и *FZD2*. Вероятно тези гени са с повишена експресия и при РП, но трябва да се направят експресионни анализи.

PAFAH1B1 е като цяло с понижена експресия в туморна спрямо нормална простатна тъкан (E20).

PPP2R5E (PP2A) принадлежи към семейството на фосфатаза 2A регулаторна субединица B и действа като тумор супресор. Установено е, че при рак на стомаха и при рак на дебелото черво този ген е с понижена експресия и играе важна роля в регулацията на пролиферацията и апоптозата [661, 662]. Регулира се от микроРНК-ите с повишена експресия и вероятно е с намалена експресия, което е в съгласие с литературните данни.

Промяна в експресията на **PRKD1** (PKD1) води до развитието на рак. Активираният PKD1 се транслоцира от мембраната към цитоплазмата и към ядрото, където регулира редица пътища. Активирането на различни мембранни рецептори като GPCR и рецептори на други растежни фактори води до активирането на PDK1 от PLC-PKC сигналния път чрез формирането на диацилглицерол (DAG). DAG модулира PKD1 като се свързва с него и инициира фосфорилирането му от PKC. PKD1 може да бъде активиран още и от Golgi Gβγ-PKCε в апарата на Голджи, от каспаза 3 чрез протеолитично скъсяване, от оксидативен стрес, водещ до активиране на PKD1 на митохондриалната повърхност чрез действието на SRC-Abl киназа и PKC, от UVB активирана SRC киназа и от PKC независим самоактивиращ механизъм. PKD1 регулира трафика на везикули от апарата на Голджи до мембраната, които участват в контрола на клетъчната адхезия, клетъчната полярност и подвижност. В зависимост от клетъчния тип, PKD1 действа като тумор супресор или онкоген. PKD1 инхибира туморогенезата при РП, рак на гърдата, гастроинтестиналния тракт, което е в съгласие с получените от нас резултати. PKD1 инхибира туморогенезата като подпомага клетъчната адхезия и инхибира протеини, участващи в клетъчната миграция, инвазия, пролиферация и епително-мезенхимната транзиция. PKD1 фосфорилира E - кадхерин и β - катенин и по този начин засилва клетъчната адхезия. PKD1 спомага за поддържането на клетъчната полярност чрез фосфорилирането на Par-1 и чрез регулирането на TGN носителите. Активираният PKD1 също може да инхибира транскрипционната активност на β -катенин и AR, което води до редуциране на клетъчната пролиферация. Също така инхибира епително-мезенхимната транзиция чрез регулиране на активността на snail транскрипционен фактор. Негативно регулира и клетъчната инвазия чрез повлияване на нивата на MMP белтъците чрез модулиране нивата на HDAC. Повишена експресия на PDK1 се свързва с развитието на рак на панкреаса, рак на кожата. Ролята му като онкоген се предполага и за РП, макар че за това има противоречия. Някои от пътищата, които се модулират от PKD1 и са свързани и с неговата проонкогенна роля, са клетъчното оцеляване и пролиферация. Активираният PKD1 засилва ДНК синтезата и активира Erk1/2 и MAPK сигналния път, което от своя страна води до акумулирането на c-Fos. В същото време намалява апоптотичните сигнали чрез супресиране на функцията на

JNK сигналния път, водещо до понижаване на нивата на c-Jun. При оксидативен стрес PKD1 активира на NFkB пътя и клетъчното оцеляване. PKD1 експресията също така подпомага ангиогенезата чрез регулиране активността на HDAC5 и HDAC7 [663].

RACGAP1 е GTPase активиращ протеин, принадлежащ на микротуболи-асоцииираното белтъчно семейство, което регулира организацията на митотичното вретено. Открито е, че неговата експресия е повишена при РП, рак на дебелото черво, рак на стомаха, рак на белия дроб, рака на гърдата, рак на черния дроб, меланома и други и се свързва с лоша прогноза, което е в съгласие с получените от нас резултати [664-670]. RACGAP1 регулира активността на RAC1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) и CDC42 (Cell Division Cycle 42), които са част от RHO семейството на малки GTP свързващи белтъци. RAC1 и CDC42 регулират окислението на NADPH и по този начин продукцията на реактивни кислородни радикали (ROS) [671]. Повишаването на ROS от своя страна може да доведе до увеличаване на ДНК повредите.

5.6.2.4. Клетъчен цикъл

Клетките, които прогресират през клетъчния цикъл без да преминават през контролните пунктове формират малигнени тумори. По тази причина нарушената регулация на клетъчния цикъл е важна стъпка в карциногенезата [672]

Действието на диференциално експресираните микроРНК води до преодоляване на контролните пунктове. Инхибирани са важни участници в контрола на клетъчния цикъл като *BUB3, MAD2, PTTG1* и *Emi1*, които играят роля във формирането на делителното вретено, в разделянето на сестринските хроматиди и правилното навлизане в митоза (Таблица 4.72, Раздел 4).

Случайна мишена е **HDAC8,** тъй като той не се открива в епителните клетки, а се експресира в цитоплазмата на стромалните клетки [673] и е установено, че е с по-ниска експресия в доброкачествени и туморни простатни тъкани в сравнение с други злокачествени образувания [674].

Гените играещи роля в контролните пунктове на клетъчния цикъл, водещи до стопиране на митозата, когато хромозомите не са подравнени, са от съществено значение за туморите, характеризиращи се с геномна нестабилност [675]. Повечето солидни тумори съдържат анеуплоидни клетки, което означава че митотичния контрол е толерантен към пролиферацията на клетки с хромозомни аберации. Установено е, че тумори дефицитни на **BUB3** също така избягват апоптоза и показват неопластичен растеж, анеуплоидност и висок пролиферативен потенциал. По тази причина BUB3 е тумор супресор [676]. От микроРНК-ите показали повишена експресия 13 регулират BUB3 експресията. Вероятно той е с понижена експресия, което е в съгласие с литературните данни.

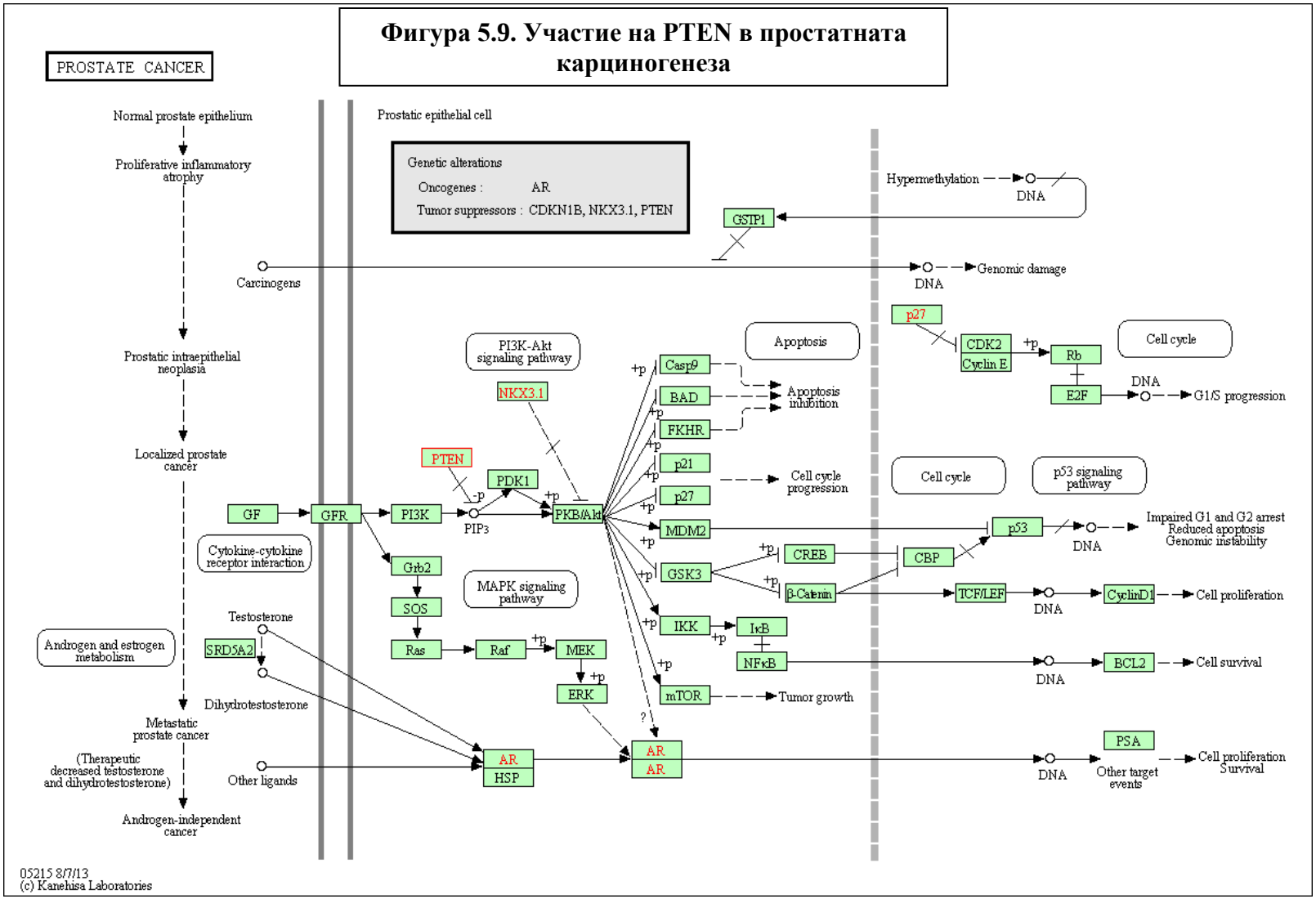
Друг важен белтък, който играе ключова роля в контролния пункт за правилно формиране на митотично вретено и преминаването от метафаза към анафаза е **MAD2.** Ракови клетъчни линии, експресиращи ниски нива на MAD2 показват дефектен контрол на митотичното делене, съпътствано от хромозомна нестабилност. По тази причина MAD2 има съществена роля в малигнената трансформация на епителните клетки, инициирайки анеуплоидност и предразполагайки простатните епителни клетки към карциноген-индуцирана малигнена трансформация. Понижена експресия на този ген е наблюдавана в ракови клетъчни линии на рака на гърдата, на яйчниците, на белия дроб [677], на тестисите [678], на черния дроб [679], при назофарингиалния карцином [680] и рака на простата [681]. Xu и съавтори показват за пръв път, че експресията на MAD2 е понижена в простатни туморни тъкани от пациенти с РП в сравнение с нормални простатни тъкани на пациенти с ДПХ. Установяват още, че нивата на експресия на MAD2 корелират с Gleason score [682].

PTTG1 кодира секурин, който регулира разделянето на сестринските хроматиди по време на анафаза чрез повлияване на сепаразата. Установено е, че ракови клетки, в които PTTG1 е отстранен чрез хомоложна рекомбинация показват висока хромозомна нестабилност, но парадоксално на това свръх експресията на секурин води до развитието на тумори в NUDE мишки [683]. Zhu и съавтори установяват, че PTTG1 е с повишена експресия в туморни тъкани в сравнение с нормални простатни тъкани и предполагат, че този ген има онкогенни функции [684]. За да се установи ролята му за развитието на РП трябва да се направят още изследвания. В нашето проучване PTTG1 се повлиява по-слабо от микроРНК-ите с увеличена експресия в сравнение с BUB3 и MAD2 и е възможно микроРНК-ите да не оказват влияние върху белтъчните му нива.

Emi1 (ранен митотичен инхибитор) инхибира APC/C (анафаза инициращия комплекс, Циклозома) по време на S и G2 фазите и е важен за правилното навлизане в митозата. Инхибира APC/C като се свързва към неговите активатори CDC20 и FZR1/CDH1. Emi1 има съществена функция в клетъчната пролиферация като предпазва клетката от реплициране. Репликирането след изчерпване на Emi1 се дължи на преждевременно активиране на APC/C, а това води до дестабилизиране на геминин (geminin) и циклин A [685]. Изследвания на мутантни Danio rerio ембриони, неекспресиращи Emi1, показват наличието на хромозомна ререпликация, неразделяне и полиплоидност. Установено е, че клетки на бозайници без Emi1 разчитат на топоизомераза II алфа- зависимо декатениране, за да могат да продължат към метафаза. Всичко това показва, че Emi1 е критичен регулатор на геномната стабилност по време на ембриогенезата и вероятно играе важна роля като туморсупресор при рак [686]. По тази причина той е логична мишена на микроРНК-ите показали повишена експресия.

PTEN **вероятно също е с намалена експресия в резултат на действието на микроРНК-ите.** Този ген кодира фосфатаза и тенсин хомолог и е един от най-често мутиралите туморсупресорни гени при рак. PTEN регулира нивата на фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата [687]. Повлиява нивата на CDKN1B (p27)- друг туморсупресорен ген и инхибира PI3K–Akt (фосфоинозитол-3-киназа- AKT) сигналния път, който води до G1/S прогресия, клетъчна пролиферация и инхибиране на апоптозата [3] (Фигура 5.3). В около 40% от простатните тумори PTEN е делетирал. Тази честота е по-висока в туморите в напреднал стадий [190]. Регулацията на експресията му чрез микроРНК е друг начин за неговото инхибиране в туморите без мутации и делеции в PTEN.

Фигура 5.9. Участие на PTEN в простатната карциногенеза



5.6.2.5. TGF-β сигнален път

TGF-β е повсеместен цитокин, който има главна роля в много клетъчни процеси. Придобиването или загубата на функции на TGF-β сигналния път и неговите компоненти води до развитието на различни заболявания, включително и рак. **В епителните клетки TGF-β функционира като туморсупресор тъй като инхибира пролиферацията, индуцира апоптоза и медиира диференциацията. В друг контекст обаче TGF-β може да инициира туморната прогресия чрез повишаване на инвазивността и метастатичния потенциал. По тази причина TGF-β има противоположна роля и вероятно това зависи отчасти от стадия, в който се намира тумора** [688].

Според ефекта, който упражняват микроРНК-ите показали диференциална експресия предполагаме, че TGF-β сигналният път е инхибиран. С понижена експресия са както един от цитокините (*TGFB2*), два от рецепторите (*TGFBR1, TGFBR3*), така и белтъците, участващи в предаването на сигнала и регулацията на експресията (*SMAD1, SMAD9*) (Таблица 4.73, Фигура 4.109, Раздел 4).

TGF-β е част от голямо семейство на структурно сходни цитокини. Има три изоформи на TGF-β лигандите (TGF-β 1–3), които участват в разнообразни клетъчни процеси, включващи пролиферация, адхезия, подвижност, апоптоза, диференциация и регулация на имунния отговор [688]. С предполагаема понижена експресия е само една от изоформите: **TGF-β 2**. Сигналната каскада се инициира, когато активен TGF-β се свърже към трансмембранни серин - треонин киназни рецептори. Това води до активирането на SMAD белтъци, които на свой ред навлизат в ядрото на клетката, свързват се към ДНК и повлияват експресията на рецица гени.

Инхибирането на клетъчния цикъл се осъществява чрез повишаване нивата на експресия на циклин-зависимите кинази $p15^{Ink4b}$, $p21^{Cip1}$, и $p57^{Kip2}$ и понижаване на експресията на гените свързани с пролиферацията като c-Myc и белтъците от ID семейството [688].

От всички компоненти на TGF-β сигналния път е установено, че *TGFBR3* е най-често засегнат и е с понижена експресия при РП. При изключване на експресията на този ген се инициира фокусна формация и увеличена експресия на *CD133*, който е маркер открит при простатни ракови стволови клетки [689].

При липса на TGF-β рецепторите се намалява преживяемостта на пациенти с рак на дебелото черво, на гърдата и на простатата [690-692].

За повлияния от най-много микроРНК-и, показали повишена експресия в нашето проучване, TGFB2 е установено, че метилирането на неговия промотор корелира с Gleason score [693].

5.6.2.6. NOTCH сигнален път

NOTCH сигналният път играе ключова роля за нормалното развитие на множество тъканни и клетъчни типове чрез повлияване на диференциацията, оцеляването, пролиферацията, които силно зависят от силата на сигнала и клетъчния контекст [694]. **Елементи от NOTCH сигналния път играят важна роля за развитието на РП и неговата прогресия като онкогени и туморсупресори [695].**

Повлияни участници в NOTCH сигналния път, които имат потенциална връзка с карцинотенезата са *FURIN* и *CIR*, с вероятна повишена експресия, и *HEY1*, с вероятна намалена експресия (Таблица 4.74, Раздел 4).

В бозайници NOTCH сигналният път се състои от четири рецептора (Notch1-Notch4) и 5 лиганда (Jagged1 и 2 и Delta-like 1, 3, и 4). За да се инициира сигналния път, мембранно свързан лиганд на изпращащата клетка се свързва към рецептор на получаващата клетка. Свързването на лиганда катализира протеолитично активиране на мебранно свързания рецептор, при което от него се освобождава вътреклетъчен домен. Notch вътреклетъчният домен след това навлиза в ядрото като се свързва към RBPJ/CBP транскрипционни фактори и активира Notch таргетни гени, включващи транскрипционни репресори, принадлежащи към HES и HEY белтъчните семейства [696].

***HEY1* е най-силно повлиян, тъй като се регулира от 13 микроРНК-и с повишена експресия.** В подкрепа на предполагаемия ефект на диференциално експресираните микроРНК-и е установено, че нивата на *HEY1* иРНК са понижени в простатни тумори [697]. **Следователно HEY1 – медиирания NOTCH сигнален път може да инхибира простатната туморогенеза** [696]. HEY1 директно се свързва към N-крайния активационен домен на AR и по този начин инхибира сигнализирането [698].

NOTCH3 и ***NOTCH4*** също са мишени на показалите диференциална експресия микроРНК-и, но те не се експресират в нормална и простатна тъкан и простатни ракови линии [696, 699] и следователно тези гени нямат отношение към действието на съответните микроРНК при РП.

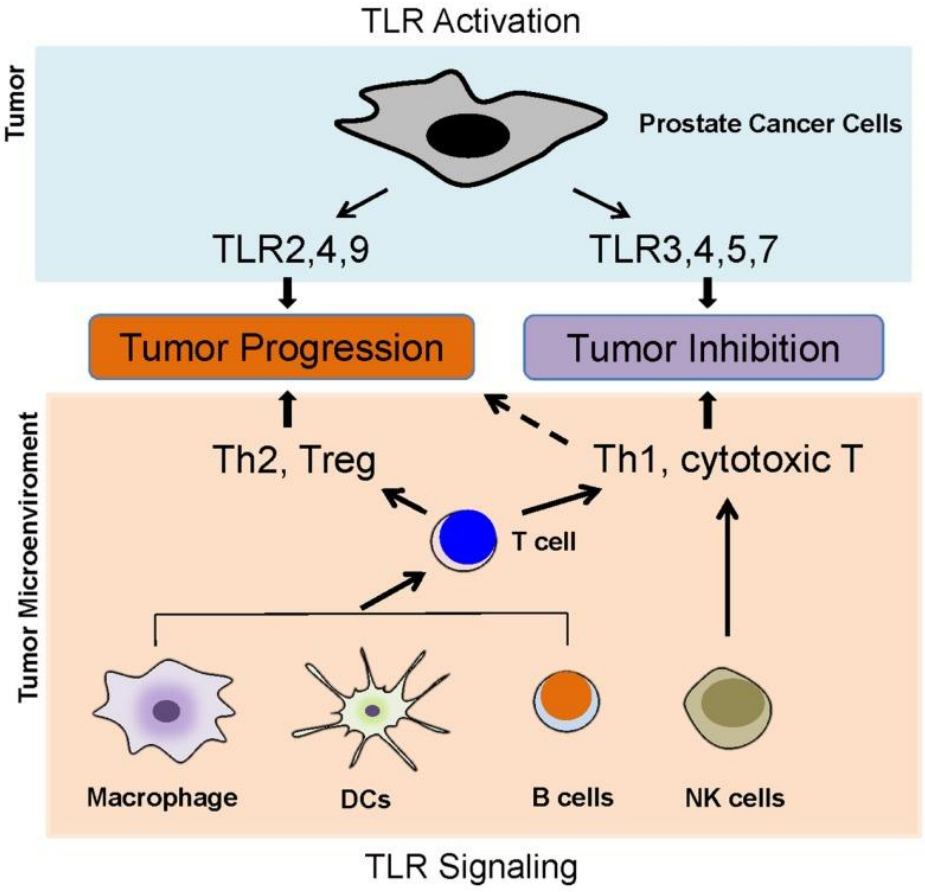
FURIN е повсеместно експресиран член на пробелтъчното конвертазно семейство. Функционира като активатор на неактивни прекурсорни протеини, които са важни за правилно физиологично функциониране като растежни фактори и хормони, рецептори, плазмени протеини и матриксни металопротеинази (MMP) [700]. Въпреки че функциите на FURIN са жизнено важни, то неговата повишена активност може да доведе до развитието на патологични състояния като Алцхаймер, артрит, атеросклероза и рак [701-703]. Свръхекспресия на FURIN иРНК е открита при тумори на гърдата, на главата и шията, на белия дроб, в глиомните тумори[704-707]. Експресията му корелира с туморната агресивност и по тази причина се предполага, че той има голяма прогностична стойност [706, 708, 709].

CIR е интегрален мембранен протеин и представлява калиев канал. Този канал има по-голям афинитет да пропуска калиеви йони да навлизат в клетката, отколкото да излизат. Регулира се от G-белтъци. Калиевите канали са трансмембранни протеини, образуващи пори и регулиращи множество биологични процеси чрез контрол върху потока на калиеви йони през клетъчната мембрана. Нарушаване на функциите на калиевите канали води до развитието на заболявания като епилепсия, сърдечна аритмия и невромускулни синдроми като всички тези заболявания са известни като каналопатии. Нарастващи доказателства показват, че раковите заболявания представляват друга категория каналопатии асоциирани с промяна в експресията на белтъците, формиращи каналите. Това се подкрепя от факта, че модулиращи калиевите канали агенти имат антитуморна ефективност. Калиевите канали регулират поведението на раковите клетки, тяхната пролиферация и миграция [710]. Блокери на калиевите канали водят до растежно инхибиране на простатни ракови клетъчни линии [711]. По тази причина предполагаемата повишена експресия на CIR е свързана с простатната туморогенеза.

5.6.2.7. Toll-like receptor сигнален път

Toll-like рецепторите (TLR) основно се експресират от имунните клетки като дендритните, макрофагите и NK клетките. Експресията на TLR в тези клетки води до активирането на вродения имунитет и в резултат се секретират про-възпалителни цитокини, хемокини, адхезионни молекули, с които се подпомага адаптивния имунен отговор. **Съществуват доказателства, че TLR също се експресират от туморните клетки. Активирането на тези рецептори в туморните клетки и в туморната микросреда е „нож с две остриета" в туморната прогресия** [712].

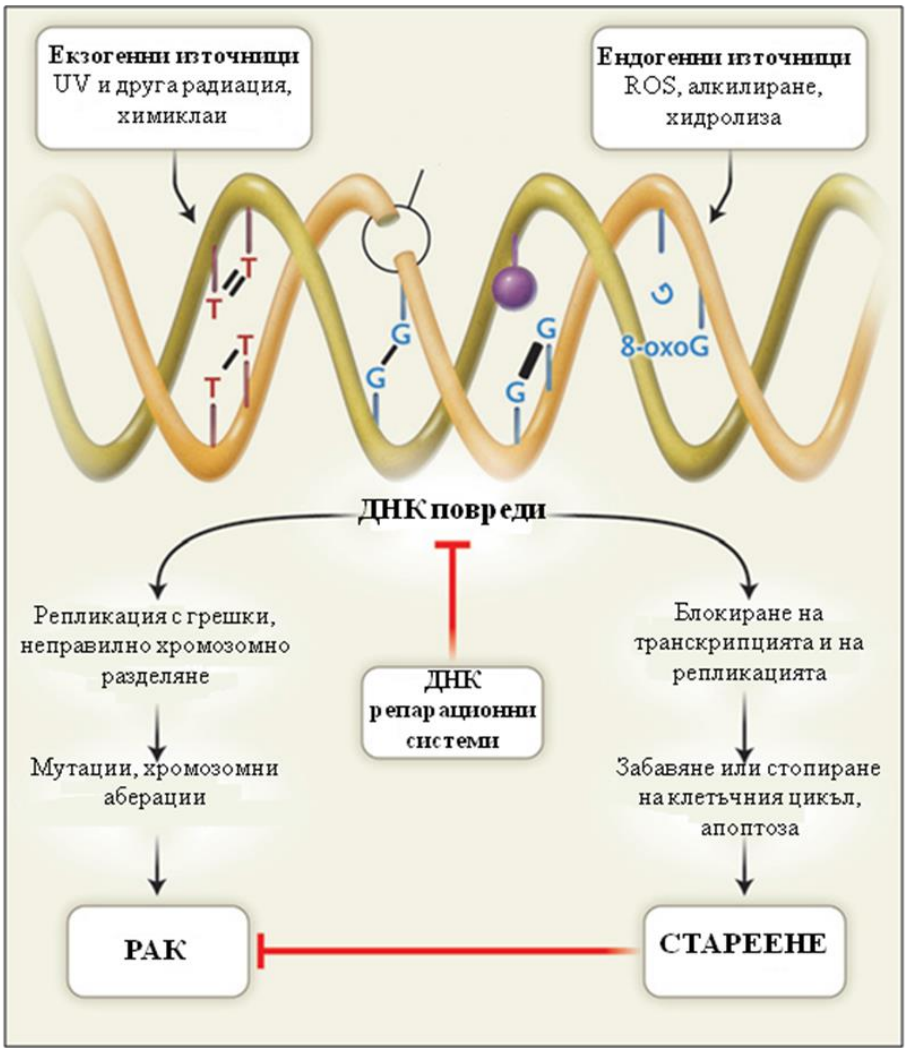
Мишена на показалите повишена експресия микроРНК-и е ***TLR4*** (Таблица 4.75, Раздел 4). Най-вероятно неговата експресия е понижена в изследваните простатни туморни тъкани, но ефекта върху туморогенезата не може да се тълкува категорично. **Експресирането на *TLR4* от простатните ракови клетки може да подпомогне туморния растеж, но в същото време може да го инхибира** (Фигура 5.4).



Фигура 5.10. Toll-like рецепторите и рака на простата. *Активирането на TLR в туморните клетки и в туморната микросреда води до комплексен сценарий. Активирането на TLR в антиген представящите клетки като дендритните, макрофагите и В клетките може да доведе или до Th1 и Т цитотоксичен отговор или до Th2 и Treg отговор. Активирането на TLR2, 4, и 9 в простатните ракови клетки може да инициира туморния растеж, но активирането на TLR3, 4, 5, и 7 може да инхибира РП [712]* **.**

5.6.2.8. Поправка на ДНК повреди

ДНК молекулата се уврежда от ендогенни кислородни свободни радикали и екзогенни химикали. **Установено е, че ДНК мутации възникват спонтанно около 20 000- 40 000 пъти всеки ден [713]. По тази причина съществуват различни пътища за поправка на ДНК. Дефекти в тези пътища може да доведат до увеличаване на мутациите, до геномна нестабилност и до развитието на рак включително и РП.** ДНК репарационната система включва базова ексцизионна репарация (BER), нуклеотид ексцизионна репарация (NER), mismatch репарация (MMR) и поправка на двойноверижни скъсвания (DSBR) [714].



Фигура 5.11. Източници и последствия от ДНК повредите. *Последствията от ДНК повредите са две. При непоправка или репликация на повредената матрица, в оцелелите клетки могат да възникнат трайни промени в генетичния код под формата на мутации или хромозомни аберации, които увеличават риска за развитие на рак. Алтернативно на това повредите в ДНК могат да попречат на транскрипционните процеси или да стопират репликацията, което може да доведе до клетъчна смърт или клетъчно стареене. Индуцираната от ДНК увреждания апоптоза предпазва от възникването на рак [715].*

МикроРНК-ите показали диференциална експресия повлияват както MMR, така и BER репарационните системи, тъй като инхибират експресията на *MSH2, TDG, LIG3, NTHL1* (*NTH1*; *OCTS3*) (Таблица 4.76, Раздел 4).

Като цяло мутации в ***MSH2*** са изключително редки в първични простатни тумори (E19). Pritchard и съавтори откриват мутации в *MSH2* и *MSH6* в 12% от изследваните пациенти с напреднал стадий РП и с тумори, характеризиращи се с множество еднонуклеотидни мутации, диференцирани като група на хипермутирали тумори [716]. Промоторно хиперметилиране на *MSH2* при РП до този момент не е докладвано. **Вероятно в началните етапи на простатната туморогенеза експресията на *MSH2*, както и други гени, участващи в ДНК поправката се инхибира от микроРНК-и с променена експресия.**

LIG3 е уникален сред човешките LIG гени, тъй като кодира множество полипептиди с ДНК лигазна функция, различаващи се по N и C края. Един от тези полипептиди се насочва към митохондриите, където участва в поддържане на митохондриалния геном [717]. Установено е, че LIG3 медиира акумулирането на SSBR белтъците XRCC1 и PNKP на местата с ДНК повреди. Струпването на LIG3 на местата с ДНК повреди не е зависимо от инициираното от BRCT домените взаимодействие с XRCC1 [718]. **Инхибирането на експресията на този ген от микроРНК-ите показали повишена експресия може да е причина за натрупването на промени в митохондриалния геном, каквито са наблюдавани в началните етапи на простатната карциногенеза** [719].

TDG (тимин ДНК гликозилаза) е ензим, който отстранява тиминовите остатъци от неправилно комплентирани нуклеотидни двойки G/T в CpG островите. Отстранява също така неправилно свързания урацил и 5-бромоурацил в нуклеотидната двойка G/U [720, 721]. TDG катализира първата стъпка от базовата ексцизионна репарация (BER) като отстранява неправилно свързаната база и създава апуриново/апиримидиново място, което след това се изрязва от AP ендонуклеаза и последвано от инкорпорирането на правилния нуклеотид от ДНК полимераза. В допълнение към неговата антимутагенна роля, за TDG е установено, че участва в регулацията на транскрипцията. Той взаимодейства с транксрипционните фактори, рецептори за ретиноевата киселина (RAR), ретиноидния X рецептор (RXR), естрогеновия рецептор (ERα), c-jun, тироидния транскрипционен фактор 1 (TTF1), хроматин ремоделиращи ензими и DNMT [722].

Експресията на TDG се активира от p53 и загубата на функции на p53 може да засегне процесите медиирани от TDG и по тази причина негативно да се повлиява генетичната и епигенетичната стабилност [720]. **Понижаването на експресията на TDG може да доведе до натрупване на повече грешки в ДНК, а така също и до промоторно хиперметилиране на туморсупресорни гени.**

NTH1 белтъкът известен още като NTHL1 има както ДНК гликозилазна активност, така и апуринова/апиримидинова (AP) лиазна активност. Разпознава и отстранява различни окислени пиримидинови производни, включително тимин гликол, 5-хидроксицитозин, 5-хидрокси-6-хидротимин, 5,6-дихидроксицитозин, 5-хидроурацил, 5-формилурацил и формамидопиримидини. Установено е, че този ензим е с понижена експресия при рак на стомаха [723]. Възможно е неговата експресия да е понижена в изследваните от нас пациенти в резултат на действието на диференциално експресираните микроРНК-и.

5.6.2.9. p53 сигнален път

p53 сигналният път (Фигура 4.110, Раздел 4) е един от най-силно засегнатите в карциногенезата на туморите. Пътищата свързани с отговора на клетката към ДНК повреди, медиирани и регулирани от тумор супресора p53 играят важна роля в поддържането на геномна стабилност, в регулацията на клетъчния цикъл, стареенето на клетките и апоптозата. Стареенето на клетките и апоптозата са важни тумор супресорни пътища предпазващи от неконтролируема пролиферация на трансформираните клетки [724]. Установено е, че p53 не само се противопоставя на онкогенната трансформация, но също така регулира не-клетъчния отговор към ДНК повреди като медиира отстраняването на увредените клетки чрез вродената имунна система [725-727]. p53 е инактивиран в резултат на мутации в около 50% от туморите [728].

Около 25-30% от простатните тумори имат мутации в *TP53*, но като цяло мутациите в този ген са по-късни събития в простатната карциногенеза [190, 729]. **Въпреки че в началните етапи на простатната туморогенеза може да няма мутации в *TP53*, които да го инактивират, то може той да бъде регулиран епигенетично от микроРНК-ите.** В изследваните в текущото проучване простатни тумори най-вероятно експресията на този важен туморсупресор е намалена (Таблица 4.77). **p53 взаимодейства и регулира активността на редица други важни тумор супресорни гени (Фигура 4.114, Раздел 4) и по тази причина намалената му експресия би имала големи последствия**.

5.6.2.10. Аспаргин- N- свързано гликозилиране

Установено е, че промени в гликозилирането са една от характеристиките на малигнената трансформация и туморната прогресия. Ембрионалното развитие, както и активирането на раковите клетки се съпровождат с промени в гликозилирането. Туморните клетки се характеризират с повишаване на нивата на гликопептидите [730].

Участници в гликозилирането и мишени на микроРНК-ите с намалена експресия са *DOLPP1* и *MGAT3*. **DOLPP1** е долихол пирофосфат фосфатаза, а **MGAT3** е манозил (бета-1,4-)- гликопротеин (Таблица 4.78, Раздел 4). Тези ензими са необходими за поддържането на оптимални нива на долихол свързани олигозахариди [730] и вероятно в изследваните простатни тумори те са с повишена експресия.

При РП е установено, че гликоформи на PSA са повишени в простатни тумори и техните нива корелират с туморната агресивност [731]

5.6.2.11. Поддържане на теломерите

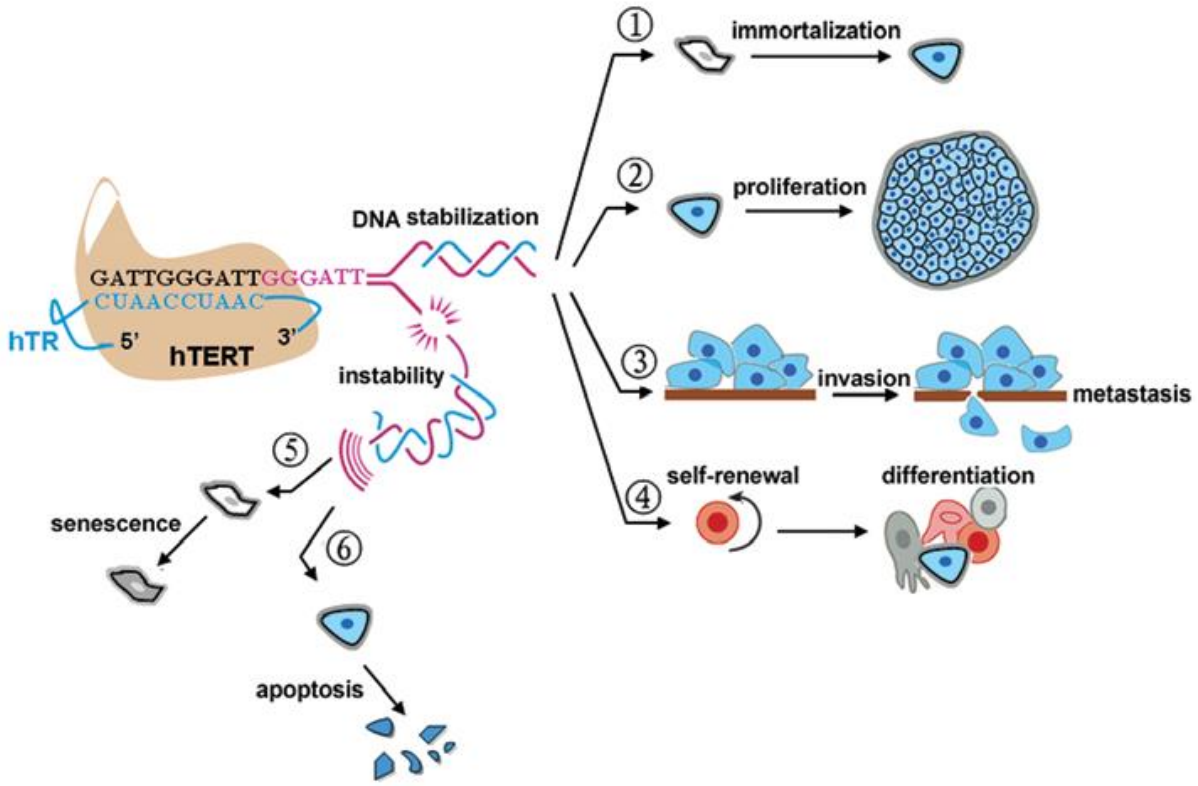
Повечето туморни клетки експресират теломераза и имат стабилна дължина на теломерите [732].

Експресията на ***TERT*** в изследваните простатни тумори вероятно се повлиява и от някои микроРНК-и показали понижена експресия (Таблица 4.79, Раздел 4).

Теломерите са физичните краища на хромозомите и се състоят от тандемно повторени G- богати ДНК секвенции при хората и гръбначните. Прогресията през репликативните цикли води до теломерно-зависимо стопиране на клетъчния цикъл и апоптоза. За да се преодолее това, теломеразата, рибонуклеопротеинов комплекс добавя TTAGGG повтори в краищата на хромозомите. TERT е обратна транскриптаза и е субединица на теломеразата. **Присъствието на TERT е задължително за анормалната клетъчна пролиферация и обезсмъртяване на повечето тумори** *(>85%)* [733]. Установено е, че TERT играе роля за метастатичната прогресия на рака

на стомаха [734] и това предполага, че въпреки че не е онкоген сам по себе си, то нейното инхибиране представлява тумор супресорен механизъм, както за ранните, така и за късните туморни стадии (Фигура 5.6). Експресията на другите две субединици на теломеразата: човешката теломеразна РНК hTR и теломеразния асоцииран белтък (TP1) нямат определящо значение за теломеразната активност както TERT [733]. **Открито е, че TERT участва индиректно и директно в регулацията на генната експресия.** Индиректно повлиява генната експресия като участва в епигенетичните модификации или модулира хроматиновата структура чрез повишаване на нивата на експресия и стабилизиране на ДНК 5-метилцитозин трансфераза 1. TERT може директно да повлияе експресията на редица гени чрез взаимодействие с хроматин ремоделиращи белтъци или транскрипционни фактори като NF-kβ, β-катенин, p65. TERT участва и в регулацията на генната експресия в митохондриите [735]

При простатни тумори е установено, че TERT има повишена експресия и ядрена локализация в началните етапи, но при прогресията на заболяването към по-висок туморен стадий TERT се локализира в цитоплазмата [736]. Предполага се, че в цитоплазмата теломеразата предпазва митохондриите от оксидативен стрес [737] и спомага за оцеляването на клетките при състояния на хипоксия [738]. Установени са редица белтък – белтъчни взаимодействия (Фигура 4.115, Раздел 4. Резултати).



Фигура 5.12. Характеристиките на hTERT го правят идеална терапевтична мишена при малигнените заболявания. *Свръхекспресия на hTERT води до: 1) обезсмъртяване на първичните ракови клетки; 2) подпомагане на пролиферацията на туморните клетки; 3) спомагане на туморната инвазивност и метастазиране; 4) поддържане на стволовите клетки чрез запазване на самообновяващите се свойства и плурипотентността. Репресията на hTERT води до: теломерна загуба и до: 5) загуба на превенция от стресово индуцирано стареене на нормалните клетки и 6) апоптоза на туморните клетки [733].*

Експресията на *TERT* се регулира от свързването към неговия промотор на онкогените SP1 и c-Myc [739] и туморсупресорите HER2 и p53 [740]. Понижаването на неговата експресия се медиира от инхибирането на действието на ДНК метилтрансферазите и хистон ацетилтрансферазите върху неговия промотор [741]. Теломеразната активност се регулира и от андрогените in vivo [742]. Установено е, че влияние върху експресията на TERT оказват и микроРНК-ите. Hrdličková и съавтори доказват влиянието на 6 микроРНК-и (let-7g*, miR-133a, miR-138-5p, miR-342-5p, miR-491-5p, и miR-541-3p) върху експресията на TERT чрез луциферазен тест [743]. Този авторски колектив не е изследвал нито една от показалите в нашето проучване диференциална експресия микроРНК-и. Все още няма достатъчно валидиращи проучвания, доказващи влиянието на микроРНК-ите, разпознаващи TERT и неговата експресия.

5.6.2.12. EGF-EGFR сигнален път

EGF-EGFR сигналният път е важен за карциногенезата на различни видове солидни тумори, включително и РП [744]. Повишена експресия на EGFR и ErbB2 се асоциира с по-агресивно клинично поведение на туморите и корелира с лоша прогноза [745, 746]. Около 40-80% от простатните тумори експресират високи нива на EGFR [747].

Гени, участващи в EGF-EGFR сигналния път и които се регулират от микроРНК-ите показали диференциална експресия са следните: *ABI1* (*SSH3BP1*), *BCAR1* и *MAP3K1* (Таблица 4.80, Раздел 4).

Мутации в ***ABI1*** или промяна в експресията са открити в ракови клетки от различни тъкани, в които *ABI1* е предположено да има туморсупресорни или онкогенни функции. **ABI1 играе ролята на онкоген в развитието на левкемия и рак на гърдата. Противоположна роля играе при рака на стомаха и РП, тъй като при тях се наблюдава понижена експресия.** Вероятно е с понижена експресия и в изследваните простатни тумори. Abi1 е ключов компонент на WAVE2 комплекса. WAVE комплексите имат важна роля в разнообразни клетъчни процеси като клетъчната миграция, формирането на адхезивни връзки, което показва, че Abi1 е важен за формирането на клетъчно адхезивни контакти. Генетичното инактивиране на ABI1 води до понижаване на WAVE1 и WAVE2, което не може да се компенсира от увеличаване на експресията на Abi2 [748].

Предполагаемата повишена експресия на ***BCAR1*** също е логична тъй като това е наблюдавано в простатни тумори. **Установено е, че експресията на този ген корелира с висок Gleason score и с риска за развитие на рецидиви след радикална простатектомии [749, 750].** Експресията на *BCAR1* показва и обратно пропорционална зависимост със загуба на хетерозиготност на 16q23 и се асоциира с повишени нива на EGFR и негативна експресия на KAI1 [749].

5.6.2.13. ID сигнален път

Има нарастващи доказателсва, че Id белтъците са жизнено важни пролиферативни фактори за различни клетъчни типове. Голям брой изследвания откриват промяна в експресията на Id белтъците при различни човешки тумори [751].

ID гените (*ID1*, *ID2*, *ID3* и *ID4*) са част от bHLH (basic helix loop helix) семейството. Белтъците от това семейство се свързват към ДНК и регулират тъканно-специфичната транскрипция. За разлика от Id1, Id2 и Id3, функциите на **Id4**, който е мишена на диференциално експресираните микроРНК-и в нашето проучване са по-малко проучени (Таблица 4.81, Раздел 4). Докладвани са както туморсупресорни, така и онкогенни свойства на Id4 [752]. Туморсупресорна роля на Id4, въз основа не неговото промоторно хиперметилиране, е била предположена при левкемия [753], рак на гърдата [754], рак на дебелото черво [755] и рак на стомаха [756]. Про-туморният ефект на Id4 се наблюдава при рак на пикочния мехур [757] и рак на гърдата при плъхове [758]. Id4 е единственият от ID гените, които са с променена експресия вследствие на хромозомната транслокация t(6;14)(p22;q32) в В клетъчна остра лимфобластна левкемия и В клетъчна прекурсорна остра лимфобластична левкемия [759, 760].

Понижена експресия на ***ID4*** е наблюдавана и при РП. В DU145 простатната ракова клетъчна линия понижената експресия на този ген се дължи на промоторно хиперметилиране. Ектопична експресия на *ID4* в тези клетъчни линии води до увеличаване на апоптозата и намаляване на клетъчната пролиферация поради стопиране на S фазата. Ектопичната експресия на този *ID* ген в други простатни ракови линии като PC3 води до удължена G2/M фаза. На молекулярно ниво тези промени се дължат на повишени нива на AR, E-кадхерин, p21, p27 и p53 в DU145 клетки. Това предполага, че **ID4 действа директно като туморсупресор чрез повлияване на йерархията на клетъчните процеси на множество нива, което води до понижаване на пролиферацията и промяна в морфологията вероятно медиирано от индукцията на инхибирани туморсупресори** [752]. Sharma и съавтори показват, че намалената експресия на *ID4* в простатни ракови клетъчни линии и в простатни тумори се дължи на промоторно хиперметилиране [761]. Друг възможен епигенетичен механизъм, регулиращ експресията на ID4 е инхибиране на транслацията чрез микроРНК-и. Вероятно експресията на този ген е понижена в туморните тъкани на изследваните пациенти, но за да се потвърди това, то трябва да се изследват експресионните нива на този ген. За да се определи причината за промяната в експресията му, то трябва да се изследва и промоторното хиперметилиране.

***SREBP1* (*SREBF1*)** (sterol regulatory element binding protein 1) е главният транскрипционен регулатор на ензимите от липидната синтеза. Този ген е с повишена експресия при различни видове рак като колоректалния карцином, рака на гърдата, рака на черния дроб, ендометриалния карцином, рака на панкреаса и др. [762-767]. Повишените нива на *SREBF1* корелират с малигнената трансформация, туморната прогресия и метастазиране при рака на гърдата и рака на простата [768]. ***SREBP1* свръхекспресията сама по себе си е достатъчна да повиши туморогенността и инвазивността на простатни ракови клетки, а инхибирането му намалява de novo синтезата на мастни киселини и предизвиква инхибиране на туморния растеж и индукция на апоптоза.** SREBP1 представлява и важна връзка между онкогенното сигнализиране и туморния метаболизъм. Akt и mTORC1 инициират натрупването на SREBP1 в ядрото, а на свой ред Akt/mTORC1 се активира от SREBP1 медиираната липогенеза [768]. **Важността на липидите за раковата прогресия е установена от няколко изследвания, показващи че нормалните клетки, с изключение на тези от черния дроб и адипозната тъкан, използват свободни мастни киселини от храната, а раковите клетки осъществяват de novo липогенеза, за да задоволят 90% от тяхната завишена нужда от липиди** [769].

PAX5, мишена на 5 микроРНК-и, показали понижена експресия, е част от PAX семейството на ядрени транскрипционни фактори, високо консервативни и необходими

за нормалното развитие, поправката, регенерацията на специфични тъкани. Тъй като туморите имитират макар и по един хаотичен начин процеса на ре-диференциация, не е изненадващо, че PAX гените са с повишена експресия при различни видове онкологични заболявания. **PAX5 е необходим за правилното развитие на В клетките и е открито, че е с повишена експресия при левкемия, дребноклетъчен рак на белия дроб, рак на устата, рак на гърдата, рак на пикочния мехур, което показва че той е онкоген** [770-774]. Няма достатъчно проучвания за експресията на този ген при РП. Agostinelli и съавтори показват, че 4 от 21 от изследваните простатни тумори имат повишена експресия на PAX5. **Ролята на този ген престои да се изясни за развитието на РП.**

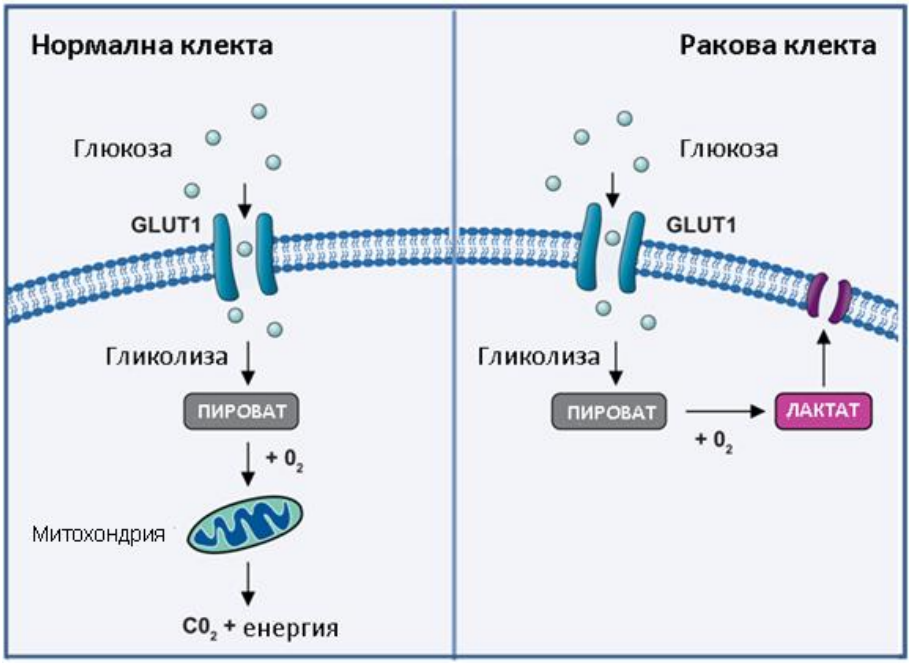
5.6.2.14. Енергиен метаболизъм

Една от основните характеристики на раковите клетки е промяна на метаболизма [415]. **Метаболитните промени, подпомагащи усилен растеж и задоволяващи високите енергийни нужди са важни за туморната прогресия**. Установено е, че туморите имат завишен глюкозен метаболизъм, но също така се наблюдават промени в метаболизма на амино киселини и липиди [775-777].

При РП са установени генетични и епигенетични промени, засягащи метаболитните пътища [778-781].

Част от гените, участващи в липидния и глюкозния метаболизъм са засегнати от микроРНК-ите показали диференциална експресия (Таблица 4.82, Раздел 4). Като цяло, най-вероятният ефект от действието на микроРНК-ите е повишаване на глюкозния метаболизъм, което е нормално за раковите клетки, инхибиране на електрон транспортната верига, тъй като АТФ в раковите клетки се синтезира основно в цитоплазмата, усилване на триацилглицерол биосинтезата.

Някои от засегнатите гени са: *SLC25A4, ATP5J, ATP5G2, COX5A, COX7B, COX11*, регулирани от микроРНК-ите с повишена експресия и гените *MDH2, PGAM2, SREBP1* регулирани от микроРНК-ите с намалена експресия.



Фигура 5.13. Warburg ефект при раковите клетки. *Раковите клетки превръщат наличната глюкоза в лактат независимо от наличието на кислород* [782]

MDH2- митохондриалната малат дехидрогеназа е установено, че е с повишена експресия при РП и корелира с преживяемостта на пациентите след провеждане на неоадювантна химиотерапия [783]. Тези резултати са в съгласие с предположението, че този ген е с повишена експресия в резултат на действието на показалите диференциална експресия микроРНК-и.

5.6.2.15. Отговор към оксидативен стрес

Оксидативният стрес участва в различни физиологични и патологични процеси, включително ДНК увреждане, пролиферация, келтъчна адхезия и оцеляване. Има доказателства, че играе роля и в в карциногенезата. Реактивните кислородни видове (ROS) водят до натрупване на повреди в ДНК, което от своя страна може да задейства сигнална трансдукция, водеща до стопиране на клетъчния цикъл или индукция на транскрипция, геномна нестабилност и развитие на рак [784].

Гените, участващи в отговора към оксидативен стрес и регулирани от микроРНК-ите с променена експресия са *TXN2, MT1X, UGT1A6* (Таблица 4.83, Фигура 4.113, Раздел 4).

TXN2 има анти-апоптотични функции и неговата експресия вероятно е повлияна положително, тъй като се регулира от микроРНК-и с понижена експресия. Повишената му експресия спомага за оцеляването на раковите клетки.

Експресията на ***MT1X*** е установено, че е с понижена експресия при РП [785], което е в съгласие с нашето предположение.

Полиморфизми в ***UGT1A6*** се асоциират с повишен риск за възникване на биохимичен рецидив при пациенти с РП. Установено е, че андрогеновите метаболити се инактивират чрез глюкоринидация, което се катализира от UDP-глюкоронозилтрансферази [786], към които спада и UGT1A6. микроРНК-ите с повишена експресия регулират и други UDP- глюкоронозилтрансферази като *UGT1A1, UGT1A3, UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B10*. По този начин нивата на андрогените няма да бъдат повлияни от тези ензими, а това е важно тъй като развитието на РП е зависимо от нивата на андрогените.

5.6.2.16. Клетъчна адхезия

Клетъчната адхезия осигурява директна връзка между извънклетъчния матрикс и актиновия цитоскелет. **Отслабената клетъчна адхезия води до модулиране на клетъчната подвижност, пролиферация и апоптоза и осигурява молекулната основа за възникване на хистопатологични промени в простатната туморогенеза**. При РП е установено, че голяма част от интегрините, колагените, кавеолините и други, участващи в клетъчната адхезия са с понижена експресия. В съгласие с литературните данни с предполагаема понижена експресия вследствие на действието на микроРНК-ите с установена повишена експресия, са интегрините *ITGA2, ITGA9, ITGB8, ITGAM,* два типа колагени *COL4A6, COL4A1*, а така също *CAV2, MET* и други (Таблица 4.84, Раздел 4). **Предполага се, че нарушаването на интегрин-медиираната клетъчна адхезия към извънклетъчния матрикс е движеща сила за развитието на РП. С възрастта експресията на колагените намалява, а се увеличават несвързаните интегрини, което води до интегрин асоциирана клетъчна смърт. Клетките се стремят да избегнат клетъчната смърт като инхибират експресията на**

интегрините, а това от своя страна води до повишаване на малигнения потенциал [604].

5.6.2.17. Други важни гени регулирани от микроРНК-ите показали промяна в експресията

Установихме, че някои от микроРНК-ите регулират по единични представители от различни клетъчни пътища (Таблица 4.85, Раздел 4). Те представляват интерес тъй като са туморсупресори или онкогени, повлияващи апоптозата, клетъчната пролиферация, транскрипцията и други важни клетъчни функции.

KLF9 е туморсупресорен ген при РП. Седемнадесет от микроРНК-ите показали повишена експресия го регулират и вероятно той е с понижена експресия в изследваните тумори. Установено е, че нивата на KLF9 са изключително ниски при простатни ракови клетъчни линии. Свръхекспресията на този ген драматично супресира пролиферацията и предизвиква стопиране на клетъчния цикъл в G2/M фазата и предизвиква апоптоза в клетъчни линии на РП. Експресията на KLF9 инхибира активацията на AKT и регулираните от него гени. Инхибирането на туморния растеж е потвърдено и при ксенографти на РП [787].

TOB1 също е вероятен туморсупресор, който е инактивиран в редица тумори и е повлиян от микроРНК-ите с повишена експресия [788]. Вероятно той е с понижена експресия и при РП. Установено е, че TOB-knockout мишки спонтанно формират тумори и TOB експресия липсва при рак на белия дроб, рака на щитовидната жлеза, рака на стомаха и рака на гърдата [788].

DAZAP2 е показал туморсупресорна роля при миелома, където е с понижена експресия. Този ген участва в различни биологични и патологични процеси като сперматогенезата, клетъчното сигнализиране, регулацията на транксрипцията, РНК сплайсинга [789]. Неговата роля за развитието на РП не е установена, но вероятно той е с понижена експресия.

RUNX1 е част от андроген рецепторния път. Потенциален туморсупресор, който вероятно е с понижена експресия в изследваните простатни тумори. Установено е, че репресията на RUNX1 е важна за инициирането на растеж от EZX2 в AR- независими клетки. В клинични проби на РП, нивата на експресия на RUNX1 корелират с лоша прогноза. Загуба на експресия на този ген е ключова стъпка за прогресията на РП [790].

Сходно на RUNX1 генът ***ITM2B*** е потенциален тумосупресор тъй като се намира в хромозомен регион 13q14, който се характеризира със загуба на хетерозиготност в около 41% от простатните тумори и експресията му е понижена в тумори, носители на делеции в този хромозомен регион [791].

GATA2 е онкоген, който се повлиява от микроРНК-ите с понижени нива и вероятно неговата експресия е повишена. GATA2 е транскрипционен фактор, който спомага за увеличението на други транскрипционни фактори. Повишени нива на този ген в метастатични простатни ракови тъкани корелира с лоша прогноза. Инхибирането му в LNCaP клетъчни линии води до редукция на клетъчната миграция, тъканна инвазивност, фокална адхезия и до драматична промяна на клетъчните транскриптоми. Това показва, че GATA2 играе критична роля в процесите на метастазиране при РП [792].

TLN1, кодиращ Талин 1 белтъка, участва в адхезията на клетката като се свързва с различни адхезионни молекули като интегрини, винулин, фокалната адхезионна киназа и актин. Играе важна роля в активацията на интегрините. Установено е, че белтъка талин може да инхибира експерсията на Е-кадхерин, която обратно

пропорционално корелира с туморната прогресия. Установена е значително повишена експресия на TLN1 в метастази в сравнение с нормална и туморна простатна тъкан от пациенти с РП [793]. Това показва, че TLN1 е важен онкоген за прогресията на РП и тъй като той е мишена на микроРНК с понижена експресия, то най-вероятно неговите нива също са повлияни.

RNMT кодира РНК (гуанин-7-) метилтрансфераза, катализираща добавянето на метилови групи към 5' края на иРНК. Установено е, че увеличаването на метилирането на 5' краищата на иРНК води до увеличаване на експресията на циклин D1 и на Myc-регулирани гени, които са важни за иницииране на клетъчна трансформация [794]. До този момент експресията на този ген не е изследвана при РП, но е установено, че при рака на дебелото черво той е потенциален онкоген [795].

5.6.3. Обсъждане на резултатите от PCA и клъстерния анализ

Проведеният анализ на основните компоненти (Principal Component Analysis, PCA) показа добро разграничаване на туморните от нормалните простатни тъкани въз основа на микроРНК експресионните профили (Фигура 4.102, Раздел 4). Пет от 19-те туморни тъкани обаче не се разделят ясно от групата на нормалните тъкани и по тази причина те бяха изключени от последващите анализи за откриване на диференциално експресираните микроРНК-и. Сходно на нашето проучване и други изследователски групи наблюдават диференциране (агрегиране) на туморните и нормалните проби, но и не съвсем категорично разграничаване. В проучванията на Schaefer и Wach се наблюдават не само преминаване на туморни проби към нормалните, каквото и ние наблюдавахме, но и преминаване на нормални проби към туморните [306, 313]. Точната причина за попадането на част от изследваните туморни проби в близост до групата на нормалните тъкани не може да бъде установена. Възможно обяснение е наличие на по-голям процент нормална тъкан или строма в тях След изключването на туморните проби, които не се отделят от нормалните се получи много добро разграничаване на двете групи. По тази причина и в клъстерния анализ (Фигури 4.125, 4.126) не бе наблюдавано смесване на нормалните и туморните проби сходно на Не и съавтори [568]. Те включват обаче 4 туморни тъкани и съответните им нормални тъкани от общо 20 изследвани тъканни двойки. За разлика от тях ние включихме 14-те туморни проби и всички нормални проби (14 на брой). При включването в клъстерния анализ на 27 от микроРНК-ите с повишена експресия и 5 от микроРНК-и с намалена експресия, детектирани в над 5 проби се получава още по-добро разграничаване на туморните от нормалните тъкани (Фигури 4.127 и 4.128, Раздел 4)

6. ИЗВОДИ

1. Полиморфните варианти rs6465657 (7q21, *LMTK2*), rs620861 (8q24), rs11603378 (11p15), rs10770125 (11p15), rs3842756 (11p15), rs55930300 (11p15), rs902774 (12q13), rs266849 (19q13, *KLK3*), rs2659056 (19q13, *KLK15*) не показаха статистически значима асоциация с РП или с клиникопатологичните характеристики (висок Gleason score, метастази) при български пациенти вероятно поради малката статистическа сила на проучването и малкия ефект, който те оказват върху предразположеността за развитие на заболяването.

2. Изследваните полиморфни варианти в гените *CYP1B1* и *AR*, участващи в андрогеновия метаболизъм, както и полиморфизма в *AMACR* не показаха статистически значима асоциация с РП при български пациенти, което може да се дължи на малкия им ефект върху развитието на заболяването и недостатъчната статистическа сила на проучването.

3. Потвърди се асоциацията на полиморфизмите rs1016343, rs7841060 и rs4871008 в 8q24 и на полиморфизма rs7920517 в 10q11 с РП при български пациенти като за пръв път бе наблюдавана асоциация на полиморфизмите в 8q24, както и на техни хаплотипни комбинации с риска за развитие на агресивни тумори, което трябва да се валидира в разширена извадка.

4. Полиморфизмът rs10993994 (10q11, *MSMB*) показа тенденция за асоциация с риска за развитие на лимфни метастази при български пациенти, което е в съгласие с литературните данни.

5. Потвърди се асоциацията на rs7127900 в 11p15 с риска за развитие на РП и се намери нов полиморфизъм - rs11564710 в този локус, който е по-силно асоцииран с РП като се свързва с два пъти повишен риск за развитие на заболяването.

6. Диагностичната и прогностичната роля на промоторно хиперметилираните биомаркери *GSTP1*, *HIST1H4K* и *RASSF2* в урина при РП не бе валидирана, тъй като не открихме *RASSF2* промоторно хиперметилиране при пациентите и контролите и наблюдавахме статистически значима корелация на метилирането на *GSTP1* и *HIST1H4K* с възрастта.

7. От изследваните експресионни биомаркери в урина *PCA3* и *AMACR* показаха най-надеждно разграничаване на пациентите с РП от контролите с ДПХ, което е в съгласие с литературните данни. Комбинирането им с *PSA* в урина показа по-добра диагностична точност от използването им поотделно, както и от серумните нива на PSA.

8. Установено бе, че нивата на miR-375 в плазма разграничават пациентите с РП от контролите с ДПХ с по-голяма диагностична точност от серумните нива на PSA, както и от нивата на експресия на *PCA3* в урина.

9. Комбинирането на изследваните микроРНК-и в плазма (let-7c, miR-30c, miR-141, miR-375) и серумните нива на PSA с по-добра диагностична точност разграничават пациентите с РП от контролите с ДПХ в сравнение с използването на биомаркерите поотделно или използването на комбинации от изследваните биомаркери в урина.

10. От проведения микроРНК микрочипов анализ се установиха 28 микроРНК-и с повишена и 14 микроРНК-и с понижена експресия в туморни простатни тъкани като от тях 28 са нови недокладвани до този момент в литературата за връзка с РП и представляват потенциални диагностични биомаркери.

11. Установените микроРНК-и с диференциална промяна в туморна спрямо нормална простатна тъкан имат потенциални онкогенни и туморсупресорни функции.

12. Клъстерният анализ показа, че 27 от микроРНК-ите с повишена експресия и 5 от микроРНК-ите с понижена експресия в туморни простатни тъкани най-надеждно разграничават пациентите от контролите и тези микроРНК-и могат да бъдат анализирани в последващи валидиращи проучвания.

7. ПРИНОСИ

Научно фундаментални приноси

1. Открити са нови микроРНК-и с потенциални онкогенни и туморсупресорни функции с променена експресия в туморни простатни тъкани, представляващи интерес за валидиране в последващи проучвания.

2. Потвърдена е в разширена извадка от български пациенти асоциацията на локус на 11p15 хромозома с РП, открит при предходно геномно асоциативно изследване на консорциума PRACTICAL. Намерена е по-силна асоциация от първоначалната с нов полиморфизъм в региона, rs11564710 свързан с повишен риск за развитие на РП.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е асоциацията на открити при големи геномни проучвания полиморфни варианти в хромозомните локуси 8q24 (rs1016343, rs4871008, rs7841060) и 10q11 (rs7920517) с РП при български пациенти.

Научно приложни

1. Изследваните промоторно хиперметилирани гени в урина не са добри неинвазивни диагностични и прогностични биомаркери тъй като не се установи промоторно хиперметилиране на *RASSF2*, а това на *HIST1H4K* и *GSTP1* показа корелация с възрастта, а не с диагнозата при български пациенти.

2. За пръв път се открива, че експресионните нива на miR-375 в плазма са потенциален диагностичен биомаркер при РП, превъзхождащ серумните нива на PSA, както и изследваните експресионни нива на *AMACR* и *PCA3* в урина показали най-добра диагностична точност.

3. Комбинирането на изследваните микроРНК-и в плазма и серумните нива на PSA по-надежно разграничават пациентите с РП от контролите с доброкачествена простатна хиперплазия като превъзхождат комбинациите получени от изследваните биомаркери в урина и серумен PSA.

Методични приноси

1. За пръв път са въведени и използвани MethyLight метода за анализ на промоторно хиперметилиране и микроРНК микрочипов анализ в България.

8. БИБЛИОГРАФИЯ

[1] Registry BNC. Cancer Incidence in Bulgaria 2012. 2014;Tom XXIII(Volume XXIII).
[2] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol. 2005 Mar;16(3):481-8.
[3] Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. J Clin Pathol. 2005 Jul;58(7):673-84.
[4] Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. Eur Urol. 2014 Jan;65(1):124-37.
[5] Giwercman C, Giwercman A, Pedersen HS, Toft G, Lundin K, Bonde JP, et al. Polymorphisms in genes regulating androgen activity among prostate cancer low-risk Inuit men and high-risk Scandinavians. Int J Androl. 2008 Feb;31(1):25-30.
[6] Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. Ann Oncol. 2014 Aug;25(8):1650-6.
[7] Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. Semin Oncol. 2013 Jun;40(3):244-58.
[8] 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.
[9] Loukola A, Chadha M, Penn SG, Rank D, Conti DV, Thompson D, et al. Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CYP17A1, CYP3A4, and SRD5A2. Eur J Hum Genet. 2004 Apr;12(4):321-32.
[10] Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest. 1985 Nov;76(5):1899-903.
[11] Loeb S, Catalona WJ. What to do with an abnormal PSA test. Oncologist. 2008 Mar;13(3):299-305.
[12] Ilic D, O'Connor D, Green S, Wilt TJ. Screening for prostate cancer: an updated Cochrane systematic review. BJU Int. 2011 Mar;107(6):882-91.
[13] Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for prostate cancer. Annu Rev Med. 2009;60:139-51.
[14] Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. Sci Transl Med. 2012 Mar 28;4(127):127rv3.
[15] Schroder FH, Carter HB, Wolters T, van den Bergh RC, Gosselaar C, Bangma CH, et al. Early detection of prostate cancer in 2007. Part 1: PSA and PSA kinetics. Eur Urol. 2008 Mar;53(3):468-77.
[16] Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. N Engl J Med. 2001 May 3;344(18):1373-7.
[17] 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.
[18] Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. N Engl J Med. 2009 Mar 26;360(13):1310-9.
[19] Crawford ED, Grubb R, 3rd, Black A, Andriole GL, Jr., Chen MH, Izmirlian G, et al. Comorbidity and mortality results from a randomized prostate cancer screening trial. J Clin Oncol. 2011 Feb 1;29(4):355-61.
[20] Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med. 2012 Mar 15;366(11):981-90.
[21] Fisseler-Eckhoff A. [New TNM classification of malignant lung tumors 2009 from a pathology perspective]. Pathologe. 2009 Dec;30 Suppl 2:193-9.
[22] Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. Mod Pathol. 2004 Mar;17(3):292-306.
[23] Silberstein JL PS, Lewis B, Sartor O. Current clinical challenges in prostate cancer. Transl Androl Urol. 2013;2(3):122-36.
[24] Gonzales JC. Development of novel biomarkers in cancer: Detection of circulating miR-141 as a potential prognostic marker for prostate cancer. Las Vegas: University of Nevada, Las Vegas; 2010.
[25] Pomerantz MM, Freedman ML. Genetics of prostate cancer risk. Mt Sinai J Med. 2010 Nov-Dec;77(6):643-54.
[26] Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. Eur Urol. 2012 Oct;62(4):656-61.
[27] Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. World J Urol. 2012 Apr;30(2):143-8.

[28] Breslow N, Chan CW, Dhom G, Drury RA, Franks LM, Gellei B, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. Int J Cancer. 1977 Nov 15;20(5):680-8.
[29] Kheirandish P, Chinegwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. Br J Cancer. 2011 Aug 9;105(4):481-5.
[30] Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. N Engl J Med. 2003 Jul 24;349(4):366-81.
[31] Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. Clin Epidemiol. 2012;4:1-11.
[32] Mikropoulos C, Goh C, Leongamornlert D, Kote-Jarai Z, Eeles R. Translating genetic risk factors for prostate cancer to the clinic: 2013 and beyond. Future Oncol. 2014 Aug;10(9):1679-94.
[33] Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. Nat Rev Urol. 2014 Jan;11(1):18-31.
[34] Fitzgerald LM, McDonnell SK, Carlson EE, Langeberg W, McIntosh LM, Deutsch K, et al. Genome-wide linkage analyses of hereditary prostate cancer families with colon cancer provide further evidence for a susceptibility locus on 15q11-q14. Eur J Hum Genet. 2010 Oct;18(10):1141-7.
[35] FitzGerald LM, Patterson B, Thomson R, Polanowski A, Quinn S, Brohede J, et al. Identification of a prostate cancer susceptibility gene on chromosome 5p13q12 associated with risk of both familial and sporadic disease. Eur J Hum Genet. 2009 Mar;17(3):368-77.
[36] Christensen GB, Baffoe-Bonnie AB, George A, Powell I, Bailey-Wilson JE, Carpten JD, et al. Genome-wide linkage analysis of 1,233 prostate cancer pedigrees from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics using novel sumLINK and sumLOD analyses. Prostate. 2010 May 15;70(7):735-44.
[37] Camp NJ, Cannon-Albright LA, Farnham JM, Baffoe-Bonnie AB, George A, Powell I, et al. Compelling evidence for a prostate cancer gene at 22q12.3 by the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. Hum Mol Genet. 2007 Jun 1;16(11):1271-8.
[38] Schaid DJ, Stanford JL, McDonnell SK, Suuriniemi M, McIntosh L, Karyadi DM, et al. Genome-wide linkage scan of prostate cancer Gleason score and confirmation of chromosome 19q. Hum Genet. 2007 Jul;121(6):729-35.
[39] Baffoe-Bonnie AB, Kittles RA, Gillanders E, Ou L, George A, Robbins C, et al. Genome-wide linkage of 77 families from the African American Hereditary Prostate Cancer study (AAHPC). Prostate. 2007 Jan 1;67(1):22-31.
[40] Schaid DJ, McDonnell SK, Zarfas KE, Cunningham JM, Hebbring S, Thibodeau SN, et al. Pooled genome linkage scan of aggressive prostate cancer: results from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. Hum Genet. 2006 Nov;120(4):471-85.
[41] Wiklund F, Gillanders EM, Albertus JA, Bergh A, Damber JE, Emanuelsson M, et al. Genome-wide scan of Swedish families with hereditary prostate cancer: suggestive evidence of linkage at 5q11.2 and 19p13.3. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):290-7.
[42] Lange EM, Robbins CM, Gillanders EM, Zheng SL, Xu J, Wang Y, et al. Fine-mapping the putative chromosome 17q21-22 prostate cancer susceptibility gene to a 10 cM region based on linkage analysis. Hum Genet. 2007 Mar;121(1):49-55.
[43] Goddard KA, Witte JS, Suarez BK, Catalona WJ, Olson JM. Model-free linkage analysis with covariates confirms linkage of prostate cancer to chromosomes 1 and 4. Am J Hum Genet. 2001 May;68(5):1197-206.
[44] Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. Nat Genet. 2001 Feb;27(2):172-80.
[45] Schleutker J, Baffoe-Bonnie AB, Gillanders E, Kainu T, Jones MP, Freas-Lutz D, et al. Genome-wide scan for linkage in finnish hereditary prostate cancer (HPC) families identifies novel susceptibility loci at 11q14 and 3p25-26. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):280-9.
[46] Schleutker J, Matikainen M, Smith J, Koivisto P, Baffoe-Bonnie A, Kainu T, et al. A genetic epidemiological study of hereditary prostate cancer (HPC) in Finland: frequent HPCX linkage in families with late-onset disease. Clin Cancer Res. 2000 Dec;6(12):4810-5.
[47] Zheng SL, Xu J, Isaacs SD, Wiley K, Chang B, Bleecker ER, et al. Evidence for a prostate cancer linkage to chromosome 20 in 159 hereditary prostate cancer families. Hum Genet. 2001 May;108(5):430-5.
[48] Badzioch M, Eeles R, Leblanc G, Foulkes WD, Giles G, Edwards S, et al. Suggestive evidence for a site specific prostate cancer gene on chromosome 1p36. The CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Coordinators and Collaborators. The EU Biomed Collaborators. J Med Genet. 2000 Dec;37(12):947-9.
[49] Xu J, Gillanders EM, Isaacs SD, Chang BL, Wiley KE, Zheng SL, et al. Genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes in the Johns Hopkins hereditary prostate cancer families. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):320-5.
[50] Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, et al. Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. Am J Hum Genet. 2001 Aug;69(2):341-50.
[51] Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, et al. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):175-9.

[52] Xu J. Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. Am J Hum Genet. 2000 Mar;66(3):945-57.
[53] Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. Am J Hum Genet. 1998 Jun;62(6):1416-24.
[54] Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL, et al. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. Am J Hum Genet. 1999 Mar;64(3):776-87.
[55] Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. Science. 1996 Nov 22;274(5291):1371-4.
[56] Berry R, Schroeder JJ, French AJ, McDonnell SK, Peterson BJ, Cunningham JM, et al. Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. Am J Hum Genet. 2000 Jul;67(1):82-91.
[57] Bailey-Wilson JE, Childs EJ, Cropp CD, Schaid DJ, Xu J, Camp NJ, et al. Analysis of Xq27-28 linkage in the international consortium for prostate cancer genetics (ICPCG) families. BMC Med Genet. 2012;13:46.
[58] Lu L, Cancel-Tassin G, Valeri A, Cussenot O, Lange EM, Cooney KA, et al. Chromosomes 4 and 8 implicated in a genome wide SNP linkage scan of 762 prostate cancer families collected by the ICPCG. Prostate. 2012 Mar;72(4):410-26.
[59] Jin G, Lu L, Cooney KA, Ray AM, Zuhlke KA, Lange EM, et al. Validation of prostate cancer risk-related loci identified from genome-wide association studies using family-based association analysis: evidence from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). Hum Genet. 2012 Jul;131(7):1095-103.
[60] Easton DF, Schaid DJ, Whittemore AS, Isaacs WJ. Where are the prostate cancer genes?--A summary of eight genome wide searches. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):261-9.
[61] Slager SL, Zarfas KE, Brown WM, Lange EM, McDonnell SK, Wojno KJ, et al. Genome-wide linkage scan for prostate cancer aggressiveness loci using families from the University of Michigan Prostate Cancer Genetics Project. Prostate. 2006 Feb 1;66(2):173-9.
[62] Schaid DJ, Chang BL. Description of the International Consortium For Prostate Cancer Genetics, and failure to replicate linkage of hereditary prostate cancer to 20q13. Prostate. 2005 May 15;63(3):276-90.
[63] Janer M, Friedrichsen DM, Stanford JL, Badzioch MD, Kolb S, Deutsch K, et al. Genomic scan of 254 hereditary prostate cancer families. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):309-19.
[64] Cunningham JM, McDonnell SK, Marks A, Hebbring S, Anderson SA, Peterson BJ, et al. Genome linkage screen for prostate cancer susceptibility loci: results from the Mayo Clinic Familial Prostate Cancer Study. Prostate. 2003 Dec 1;57(4):335-46.
[65] Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, et al. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. Am J Hum Genet. 2003 Jan;72(1):1-12.
[66] Cancel-Tassin G, Latil A, Valeri A, Guillaume E, Mangin P, Fournier G, et al. No evidence of linkage to HPC20 on chromosome 20q13 in hereditary prostate cancer. Int J Cancer. 2001 Aug 1;93(3):455-6.
[67] Hsieh CL, Oakley-Girvan I, Balise RR, Halpern J, Gallagher RP, Wu AH, et al. A genome screen of families with multiple cases of prostate cancer: evidence of genetic heterogeneity. Am J Hum Genet. 2001 Jul;69(1):148-58.
[68] Singh R. No evidence of linkage to chromosome 1q42.2-43 in 131 prostate cancer families from the ACTANE consortium. Anglo, Canada, Texas, Australia, Norway, EU Biomed. Br J Cancer. 2000 Dec;83(12):1654-8.
[69] Eeles RA, Durocher F, Edwards S, Teare D, Badzioch M, Hamoudi R, et al. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group U.K. Familial Prostate Cancer Study Collaborators. Am J Hum Genet. 1998 Mar;62(3):653-8.
[70] McIndoe RA, Stanford JL, Gibbs M, Jarvik GP, Brandzel S, Neal CL, et al. Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer-susceptibility gene at 1q24-25. Am J Hum Genet. 1997 Aug;61(2):347-53.
[71] Xu J, Dimitrov L, Chang BL, Adams TS, Turner AR, Meyers DA, et al. A combined genomewide linkage scan of 1,233 families for prostate cancer-susceptibility genes conducted by the international consortium for prostate cancer genetics. Am J Hum Genet. 2005 Aug;77(2):219-29.
[72] 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.
[73] Meitz JC, Edwards SM, Easton DF, Murkin A, Ardern-Jones A, Jackson RA, et al. HPC2/ELAC2 polymorphisms and prostate cancer risk: analysis by age of onset of disease. Br J Cancer. 2002 Oct 7;87(8):905-8.
[74] Wiklund F, Jonsson BA, Brookes AJ, Stromqvist L, Adolfsson J, Emanuelsson M, et al. Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. Clin Cancer Res. 2004 Nov 1;10(21):7150-6.
[75] Maier C, Haeusler J, Herkommer K, Vesovic Z, Hoegel J, Vogel W, et al. Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene. Br J Cancer. 2005 Mar 28;92(6):1159-64.
[76] Hope Q, Bullock S, Evans C, Meitz J, Hamel N, Edwards SM, et al. Macrophage scavenger receptor 1 999C>T (R293X) mutation and risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb;14(2):397-402.

[77] Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. N Engl J Med. 2012 Jan 12;366(2):141-9.
[78] Witte JS. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. Nat Rev Genet. 2009 Feb;10(2):77-82.
[79] 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.
[80] Ahmadiyeh N, Pomerantz MM, Grisanzio C, Herman P, Jia L, Almendro V, et al. 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 25;107(21):9742-6.
[81] 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.
[82] Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, Field H, Guy M, Al Olama AA, et al. Mutation analysis of the MSMB gene in familial prostate cancer. Br J Cancer. 2010 Jan 19;102(2):414-8.
[83] Whitaker HC, Kote-Jarai Z, Ross-Adams H, Warren AY, Burge J, George A, et al. The rs10993994 risk allele for prostate cancer results in clinically relevant changes in microseminoprotein-beta expression in tissue and urine. PLoS One. 2010;5(10):e13363.
[84] Whitaker HC, Warren AY, Eeles R, Kote-Jarai Z, Neal DE. The potential value of microseminoprotein-beta as a prostate cancer biomarker and therapeutic target. Prostate. 2010 Feb 15;70(3):333-40.
[85] Haiman CA, Stram DO, Vickers AJ, Wilkens LR, Braun K, Valtonen-Andre C, et al. Levels of beta-microseminoprotein in blood and risk of prostate cancer in multiple populations. J Natl Cancer Inst. 2013 Feb 6;105(3):237-43.
[86] Cramer SD, Chang BL, Rao A, Hawkins GA, Zheng SL, Wade WN, et al. Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. J Natl Cancer Inst. 2003 Jul 16;95(14):1044-53.
[87] Kote-Jarai Z, Amin Al Olama A, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, Saunders E, Guy M, et al. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. Hum Genet. 2011 Jun;129(6):687-94.
[88] Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. Nat Genet. 2013 Apr;45(4):385-91, 91e1-2.
[89] 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.
[90] Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. Nat Genet. 2009 Feb;41(2):221-7.
[91] Kote-Jarai Z, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Dadaev T, Jugurnauth-Little S, et al. Fine-mapping identifies multiple prostate cancer risk loci at 5p15, one of which associates with TERT expression. Hum Mol Genet. 2013 Jun 15;22(12):2520-8.
[92] 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.
[93] Kote-Jarai Z, Easton DF, Stanford JL, Ostrander EA, Schleutker J, Ingles SA, et al. Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: the PRACTICAL Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Aug;17(8):2052-61.
[94] Breyer JP, McReynolds KM, Yaspan BL, Bradley KM, Dupont WD, Smith JR. Genetic variants and prostate cancer risk: candidate replication and exploration of viral restriction genes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Jul;18(7):2137-44.
[95] Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Monroe KR, Stram DO, Henderson BE, et al. Generalizability of associations from prostate cancer genome-wide association studies in multiple populations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Apr;18(4):1285-9.
[96] Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, et al. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1122-6.
[97] Zheng SL, Stevens VL, Wiklund F, Isaacs SD, Sun J, Smith S, et al. Two independent prostate cancer risk-associated Loci at 11q13. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Jun;18(6):1815-20.
[98] Rokman A, Koivisto PA, Matikainen MP, Kuukasjarvi T, Poutiainen M, Helin HJ, et al. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic hybridization. Prostate. 2001 Feb 15;46(3):233-9.
[99] Das K, Lau W, Sivaswaren C, Ph T, Fook-Chong S, Sl T, et al. Chromosomal changes in prostate cancer: a fluorescence in situ hybridization study. Clin Genet. 2005 Jul;68(1):40-7.
[100] Kasahara K, Taguchi T, Yamasaki I, Kamada M, Shuin T. Genetic changes in localized prostate cancer of Japanese patients shown by comparative genomic hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 2005 May;159(1):84-8.

[101] Jiang M, Li M, Fu X, Huang Y, Qian H, Sun R, et al. Simultaneously detection of genomic and expression alterations in prostate cancer using cDNA microarray. Prostate. 2008 Oct 1;68(14):1496-509.
[102] Szarvas T, Becker M, Vom Dorp F, Meschede J, Scherag A, Bankfalvi A, et al. Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy. Int J Cancer. 2011 Mar 15;128(6):1486-92.
[103] 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.
[104] Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. Science. 1998 Jan 23;279(5350):563-6.
[105] Stattin P, Bylund A, Rinaldi S, Biessy C, Dechaud H, Stenman UH, et al. Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. J Natl Cancer Inst. 2000 Dec 6;92(23):1910-7.
[106] Ho GY, Melman A, Liu SM, Li M, Yu H, Negassa A, et al. Polymorphism of the insulin gene is associated with increased prostate cancer risk. Br J Cancer. 2003 Jan 27;88(2):263-9.
[107] Freedman ML, Monteiro AN, Gayther SA, Coetzee GA, Risch A, Plass C, et al. Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. Nat Genet. 2011 Jun;43(6):513-8.
[108] 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.
[109] 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.
[110] Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, et al. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. Nat Genet. 2012 Apr;44(4):426-9, S1.
[111] Schumacher FR, Berndt SI, Siddiq A, Jacobs KB, Wang Z, Lindstrom S, et al. Genome-wide association study identifies new prostate cancer susceptibility loci. Hum Mol Genet. 2011 Oct 1;20(19):3867-75.
[112] Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. Nat Genet. 2007 May;39(5):645-9.
[113] Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, et al. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. Nat Genet. 2007 May;39(5):638-44.
[114] Xu J, Mo Z, Ye D, Wang M, Liu F, Jin G, et al. Genome-wide association study in Chinese men identifies two new prostate cancer risk loci at 9q31.2 and 19q13.4. Nat Genet. 2012 Nov;44(11):1231-5.
[115] 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.
[116] Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Purcell LD, Gao Z, et al. Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. Nat Genet. 2008 Oct;40(10):1153-5.
[117] Rojas PA, Torres-Estay V, Cerda-Infante J, Montecinos VP, Dominguez J, Arenas J, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism from chromosome 17q12 with the aggressiveness of prostate cancer in a Hispanic population. J Cancer Res Clin Oncol. 2014 May;140(5):783-8.
[118] Berndt SI, Sampson J, Yeager M, Jacobs KB, Wang Z, Hutchinson A, et al. Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. Hum Mol Genet. 2011 Aug 15;20(16):3322-9.
[119] Haiman CA, Chen GK, Blot WJ, Strom SS, Berndt SI, Kittles RA, et al. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. Nat Genet. 2011 Jun;43(6):570-3.
[120] Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. Nat Genet. 2007 Aug;39(8):977-83.
[121] Amin Al Olama A, Kote-Jarai Z, Schumacher FR, Wiklund F, Berndt SI, Benlloch S, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies to identify prostate cancer susceptibility loci associated with aggressive and non-aggressive disease. Hum Mol Genet. 2012 Jan 15;22(2):408-15.
[122] Thompson D, Easton D. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. Am J Hum Genet. 2001 Feb;68(2):410-9.
[123] Consortium TBCL. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 1999 Aug 4;91(15):1310-6.
[124] Gallagher DJ, Vijai J, Cronin AM, Bhatia J, Vickers AJ, Gaudet MM, et al. Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. Clin Cancer Res. 2010 May 15;16(10):2819-32.
[125] Narod SA, Neuhausen S, Vichodez G, Armel S, Lynch HT, Ghadirian P, et al. Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. Br J Cancer. 2008 Jul 22;99(2):371-4.
[126] Mitra A, Fisher C, Foster CS, Jameson C, Barbachanno Y, Bartlett J, et al. Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. Br J Cancer. 2008 Jan 29;98(2):502-7.

[127] Castro E, Goh C, Olmos D, Saunders E, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. J Clin Oncol. 2013 May 10;31(14):1748-57.
[128] Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. Br J Cancer. 2012 May 8;106(10):1697-701.
[129] Silva J, Teixeira AL, Lobo F, Mauricio J, Medeiros R. DNA repair system and prostate cancer progression: the role of NBS1 polymorphism (rs1805794). DNA Cell Biol. 2012 Jul;31(7):1182-6.
[130] Cybulski C, Wokolorczyk D, Kluzniak W, Kashyap A, Golab A, Slojewski M, et al. A personalised approach to prostate cancer screening based on genotyping of risk founder alleles. Br J Cancer. 2013 Jun 25;108(12):2601-9.
[131] Grindedal EM, Moller P, Eeles R, Stormorken AT, Bowitz-Lothe IM, Landro SM, et al. Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Sep;18(9):2460-7.
[132] Watson P, Riley B. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. Fam Cancer. 2005;4(3):245-8.
[133] Engel C, Loeffler M, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Dietmaier W, et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. J Clin Oncol. 2012 Dec 10;30(35):4409-15.
[134] Goodman FR, Scambler PJ. Human HOX gene mutations. Clin Genet. 2001 Jan;59(1):1-11.
[135] Economides KD, Capecchi MR. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. Development. 2003 May;130(10):2061-9.
[136] Jung C, Kim RS, Zhang HJ, Lee SJ, Jeng MH. HOXB13 induces growth suppression of prostate cancer cells as a repressor of hormone-activated androgen receptor signaling. Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):9185-92.
[137] Xu J, Lange EM, Lu L, Zheng SL, Wang Z, Thibodeau SN, et al. HOXB13 is a susceptibility gene for prostate cancer: results from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). Hum Genet. 2013 Jan;132(1):5-14.
[138] Shang Z, Zhu S, Zhang H, Li L, Niu Y. Germline homeobox B13 (HOXB13) G84E mutation and prostate cancer risk in European descendants: a meta-analysis of 24,213 cases and 73, 631 controls. Eur Urol. 2013 Jul;64(1):173-6.
[139] Huang H, Cai B. G84E mutation in HOXB13 is firmly associated with prostate cancer risk: a meta-analysis. Tumour Biol. 2013 Feb;35(2):1177-82.
[140] Karlsson R, Aly M, Clements M, Zheng L, Adolfsson J, Xu J, et al. A population-based assessment of germline HOXB13 G84E mutation and prostate cancer risk. Eur Urol. 2012 Jan;65(1):169-76.
[141] Laitinen VH, Wahlfors T, Saaristo L, Rantapero T, Pelttari LM, Kilpivaara O, et al. HOXB13 G84E mutation in Finland: population-based analysis of prostate, breast, and colorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013 Mar;22(3):452-60.
[142] Chen Z, Greenwood C, Isaacs WB, Foulkes WD, Sun J, Zheng SL, et al. The G84E mutation of HOXB13 is associated with increased risk for prostate cancer: results from the REDUCE trial. Carcinogenesis. 2013 Jun;34(6):1260-4.
[143] Breyer JP, Avritt TG, McReynolds KM, Dupont WD, Smith JR. Confirmation of the HOXB13 G84E germline mutation in familial prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012 Aug;21(8):1348-53.
[144] Akbari MR, Trachtenberg J, Lee J, Tam S, Bristow R, Loblaw A, et al. Association between germline HOXB13 G84E mutation and risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2012 Aug 22;104(16):1260-2.
[145] Schroeck FR, Zuhlke KA, Siddiqui J, Siddiqui R, Cooney KA, Wei JT. Testing for the recurrent HOXB13 G84E germline mutation in men with clinical indications for prostate biopsy. J Urol. 2013 Mar;189(3):849-53.
[146] Stott-Miller M, Karyadi DM, Smith T, Kwon EM, Kolb S, Stanford JL, et al. HOXB13 mutations in a population-based, case-control study of prostate cancer. Prostate. 2012 May;73(6):634-41.
[147] Lin X, Qu L, Chen Z, Xu C, Ye D, Shao Q, et al. A novel germline mutation in HOXB13 is associated with prostate cancer risk in Chinese men. Prostate. 2013 Jan;73(2):169-75.
[148] Correa JP-S, Julio. Mechanisms of Carcinogenesis in Prostate Cancer. In: D C, ed. *Mechanisms of Oncogenesis*: Springer Netherlands 2010:295-304.
[149] Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, Fromont G, Mangin P, Cormier L, et al. Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens. J Clin Oncol. 2007 Aug 20;25(24):3596-602.
[150] Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R, et al. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. BJU Int. 2009 Dec;104(11):1560-72.
[151] Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA, et al. Allelic variants of aromatase and the androgen and estrogen receptors: toward a multigenic model of prostate cancer risk. Clin Cancer Res. 2001 Oct;7(10):3092-6.
[152] Mononen N, Schleutker J. Polymorphisms in genes involved in androgen pathways as risk factors for prostate cancer. J Urol. 2009 Apr;181(4):1541-9.
[153] Sun J, Wiklund F, Zheng SL, Chang B, Balter K, Li L, et al. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. J Natl Cancer Inst. 2005 Apr 6;97(7):525-32.

[154] Sfanos KS, Hempel HA, De Marzo AM. The role of inflammation in prostate cancer. Adv Exp Med Biol. 2014;816:153-81.
[155] Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. Nat Genet. 2002 Feb;30(2):181-4.
[156] Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ, et al. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. Nat Genet. 2002 Oct;32(2):321-5.
[157] Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, Hedelin M, Li L, Adami HO, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the CAncer Prostate in Sweden Study. Cancer Res. 2004 Apr 15;64(8):2918-22.
[158] Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, et al. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. Biochem Soc Trans. 2001 May;29(Pt 2):250-67.
[159] 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.
[160] Wright JL, Neuhouser ML, Lin DW, Kwon EM, Feng Z, Ostrander EA, et al. AMACR polymorphisms, dietary intake of red meat and dairy and prostate cancer risk. Prostate. 2011 Apr;71(5):498-506.
[161] Amankwah EK, Sellers TA, Park JY. Gene variants in the angiogenesis pathway and prostate cancer. Carcinogenesis. 2012 Jul;33(7):1259-69.
[162] Markt SC, Valdimarsdottir UA, Shui IM, Sigurdardottir LG, Rider JR, Tamimi RM, et al. Circadian clock genes and risk of fatal prostate cancer. Cancer Causes Control. 2015 Jan;26(1):25-33.
[163] Zhu Y, Zheng T, Stevens RG, Zhang Y, Boyle P. Does "clock" matter in prostate cancer? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Jan;15(1):3-5.
[164] Naylor SL. SNPs associated with prostate cancer risk and prognosis. Front Biosci. 2007;12:4111-31.
[165] Ma XP, Zhang T, Peng B, Yu L, Jiang de K. Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. PLoS One. 2013;8(11):e79584.
[166] Zhai XL, Qu XW, Guo L, Ha QH. Correlation study between the polymorphism of repetitive sequence in gene CAG of androgen receptor and the occurrence and progression of prostate cancer. Asian Pac J Trop Med. 2014 Apr;7(4):301-4.
[167] Liu JY, Yang Y, Liu ZZ, Xie JJ, Du YP, Wang W. Association between the CYP1B1 polymorphisms and risk of cancer: a meta-analysis. Mol Genet Genomics. 2014 Apr;290(2):739-65.
[168] Zhang H, Li L, Xu Y. CYP1B1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer: a meta-analysis. PLoS One. 2013;8(7):e68634.
[169] Wang Y, Zhang Y, Meng H, Hou X, Li Z, Liu Q, et al. Quantitative Assessment of the Association Between CYP17 rs743572 Polymorphism and Prostate Cancer Risk. Cell Biochem Biophys. 2015 Mar;71(2):983-91.
[170] Wang F, Zou YF, Feng XL, Su H, Huang F. CYP17 gene polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis based on 38 independent studies. Prostate. 2011 Aug 1;71(11):1167-77.
[171] Travis RC, Schumacher F, Hirschhorn JN, Kraft P, Allen NE, Albanes D, et al. CYP19A1 genetic variation in relation to prostate cancer risk and circulating sex hormone concentrations in men from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 Oct;18(10):2734-44.
[172] San Francisco IF, Rojas PA, Torres-Estay V, Smalley S, Cerda-Infante J, Montecinos VP, et al. Association of RNASEL and 8q24 variants with the presence and aggressiveness of hereditary and sporadic prostate cancer in a Hispanic population. J Cell Mol Med. 2014 Jan;18(1):125-33.
[173] Dusenka R, Tomaskin R, Kliment J, Dobrota D, Dusenkova S, Vilckova M, et al. Polymorphism of the SRD5A2 gene and the risk of prostate cancer. Mol Med Rep. 2014 Dec;10(6):3151-6.
[174] Zhang Q, Shan Y. Genetic polymorphisms of vitamin D receptor and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. J Buon. 2013 Oct-Dec;18(4):961-9.
[175] Jingwi EY, Abbas M, Ricks-Santi L, Winchester D, Beyene D, Day A, et al. Vitamin D Receptor Genetic Polymorphisms Are Associated with PSA Level, Gleason Score and Prostate Cancer Risk in African-American Men. Anticancer Res. 2015 Mar;35(3):1549-58.
[176] Wei B, Xu Z, Ruan J, Zhu M, Jin K, Zhou D, et al. RNASEL Asp541Glu and Arg462Gln polymorphisms in prostate cancer risk: evidences from a meta-analysis. Mol Biol Rep. 2012 Mar;39(3):2347-53.
[177] Weng PH, Huang YL, Page JH, Chen JH, Xu J, Koutros S, et al. Polymorphisms of an innate immune gene, toll-like receptor 4, and aggressive prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014;9(10):e110569.
[178] Kutikhin AG, Yuzhalin AE. Are Toll-like receptor gene polymorphisms associated with prostate cancer? Cancer Manag Res. 2012;4:23-9.

[179] Chen N, Wang JR, Huang L, Yang Y, Jiang YM, Guo XJ, et al. Significant Association of Alpha-Methylacyl-CoA Racemase Gene Polymorphisms with Susceptibility to Prostate Cancer: a Meta-Analysis. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(5):1857-63.
[180] Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. Prostate. 2010 Apr 1;70(5):467-72.
[181] George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. Mol Biol Rep. 2011 Mar;38(3):1609-15.
[182] Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY, Chen WC. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. Urology. 2003 Aug;62(2):374-7.
[183] Chau CH, Permenter MG, Steinberg SM, Retter AS, Dahut WL, Price DK, et al. Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1alpha gene may confer susceptibility to androgen-independent prostate cancer. Cancer Biol Ther. 2005 Nov;4(11):1222-5.
[184] Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, et al. Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. Clin Cancer Res. 2002 Nov;8(11):3433-7.
[185] Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. Clin Cancer Res. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6169-78.
[186] Schumacher FR, Cheng I, Freedman ML, Mucci L, Allen NE, Pollak MN, et al. A comprehensive analysis of common IGF1, IGFBP1 and IGFBP3 genetic variation with prospective IGF-I and IGFBP-3 blood levels and prostate cancer risk among Caucasians. Hum Mol Genet. 2010 Aug 1;19(15):3089-101.
[187] Deng QW, He BS, Pan YQ, Sun HL, Xu YQ, Gao TY, et al. Roles of E-cadherin (CDH1) genetic variations in cancer risk: a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(8):3705-13.
[188] Qiu LX, Li RT, Zhang JB, Zhong WZ, Bai JL, Liu BR, et al. The E-cadherin (CDH1)--160 C/A polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. Eur J Hum Genet. 2009 Feb;17(2):244-9.
[189] Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrander EA, et al. Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. Cancer Res. 2009 Dec 15;69(24):9315-22.
[190] Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Gronberg H, et al. The mutational landscape of prostate cancer. Eur Urol. 2013 Oct;64(4):567-76.
[191] 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.
[192] Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature. 2013 Jul 12;487(7406):239-43.
[193] Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. Cancer Cell. 2013 Feb 11;23(2):159-70.
[194] Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer Res. 1997 Nov 15;57(22):4997-5000.
[195] Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. Nat Genet. 2009 May;41(5):619-24.
[196] Chen M, Pratt CP, Zeeman ME, Schultz N, Taylor BS, O'Neill A, et al. Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. Cancer Cell. 2011 Aug 16;20(2):173-86.
[197] Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, et al. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. PLoS Biol. 2003 Dec;1(3):E59.
[198] Sun X, Huang J, Homma T, Kita D, Klocker H, Schafer G, et al. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. Anticancer Res. 2009 May;29(5):1739-43.
[199] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 2010 Jul 13;18(1):11-22.
[200] Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature. 2011 Feb 10;470(7333):214-20.
[201] Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. Cancer Res. 2007 Sep 15;67(18):8504-10.
[202] Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature. 2012 Jul 12;487(7406):239-43.
[203] Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, et al. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. Nat Med. 2010 Jul;16(7):793-8.
[204] Wang XS, Shankar S, Dhanasekaran SM, Ateeq B, Sasaki AT, Jing X, et al. Characterization of KRAS rearrangements in metastatic prostate cancer. Cancer Discov. 2011 Jun;1(1):35-43.

[205] Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. Eur Urol. 2012 May;63(5):920-6.
[206] Barbieri CE, Tomlins SA. The prostate cancer genome: perspectives and potential. Urol Oncol. 2014 Jan;32(1):53 e15-22.
[207] Aparicio A, Den RB, Knudsen KE. Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. Nat Rev Urol. 2011 Oct;8(10):562-8.
[208] Linja MJ, Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 Nov;92(4):255-64.
[209] Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet. 1995 Apr;9(4):401-6.
[210] Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 2009 Jan 1;69(1):16-22.
[211] Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. Cancer Res. 2012 Jul 15;72(14):3457-62.
[212] Lindberg J, Mills IG, Klevebring D, Liu W, Neiman M, Xu J, et al. The mitochondrial and autosomal mutation landscapes of prostate cancer. Eur Urol. 2013 Apr;63(4):702-8.
[213] Rubin MA. ETS rearrangements in prostate cancer. Asian J Androl. 2012 May;14(3):393-9.
[214] 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.
[215] Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA. Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update. Arch Pathol Lab Med. 2009 Jul;133(7):1033-40.
[216] 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.
[217] Paulo P, Barros-Silva JD, Ribeiro FR, Ramalho-Carvalho J, Jeronimo C, Henrique R, et al. FLI1 is a novel ETS transcription factor involved in gene fusions in prostate cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2012 Mar;51(3):240-9.
[218] Geng C, He B, Xu L, Barbieri CE, Eedunuri VK, Chew SA, et al. Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 23;110(17):6997-7002.
[219] Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. Cancer Res. 2013 May 1;73(9):2795-805.
[220] Liu W, Lindberg J, Sui G, Luo J, Egevad L, Li T, et al. Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer. Oncogene. 2012 Aug 30;31(35):3939-48.
[221] Ateeq B, Tomlins SA, Laxman B, Asangani IA, Cao Q, Cao X, et al. Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer. Sci Transl Med. 2011 Mar 2;3(72):72ra17.
[222] Wyatt AW, Mo F, Wang Y, Collins CC. The diverse heterogeneity of molecular alterations in prostate cancer identified through next-generation sequencing. Asian J Androl. 2013 May;15(3):301-8.
[223] Kim TM, Xi R, Luquette LJ, Park RW, Johnson MD, Park PJ. Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes. Genome Res. 2013 Feb;23(2):217-27.
[224] Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. Cell. 2013 Apr 25;153(3):666-77.
[225] Marta GN, Hanna SA, Fernandes da Silva JL, Carvalho Hde A. Screening for prostate cancer: an updated review. Expert Rev Anticancer Ther. 2013 Jan;13(1):101-8.
[226] Sartori DA, Chan DW. Biomarkers in prostate cancer: what's new? Curr Opin Oncol. 2014 May;26(3):259-64.
[227] Jansen FH, Roobol M, Jenster G, Schroder FH, Bangma CH. Screening for prostate cancer in 2008 II: the importance of molecular subforms of prostate-specific antigen and tissue kallikreins. Eur Urol. 2009 Mar;55(3):563-74.
[228] Bjartell A, Montironi R, Berney DM, Egevad L. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. Acta Oncol. 2011 Jun;50 Suppl 1:76-84.
[229] Wang W, Sun X, Epstein JI. Partial atrophy on prostate needle biopsy cores: a morphologic and immunohistochemical study. Am J Surg Pathol. 2008 Jun;32(6):851-7.
[230] Kumar-Sinha C, Shah RB, Laxman B, Tomlins SA, Harwood J, Schmitz W, et al. Elevated alpha-methylacyl-CoA racemase enzymatic activity in prostate cancer. Am J Pathol. 2004 Mar;164(3):787-93.
[231] De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. Urology. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):55-62.

[232] Hessels D, Schalken JA. Urinary biomarkers for prostate cancer: a review. Asian J Androl. 2013 May;15(3):333-9.
[233] Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. Am J Surg Pathol. 2003 Aug;27(8):1128-33.
[234] Fleshman RL, MacLennan GT. Immunohistochemical markers in the diagnosis of prostate cancer. J Urol. 2005 May;173(5):1759.
[235] Jiang Z, Li C, Fischer A, Dresser K, Woda BA. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. Am J Clin Pathol. 2005 Feb;123(2):231-6.
[236] Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. J Urol. 2004 Sep;172(3):1130-3.
[237] Ouyang B, Bracken B, Burke B, Chung E, Liang J, Ho SM. A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer. J Urol. 2009 Jun;181(6):2508-13; discussion 13-4.
[238] Burger MJ, Tebay MA, Keith PA, Samaratunga HM, Clements J, Lavin MF, et al. Expression analysis of delta-catenin and prostate-specific membrane antigen: their potential as diagnostic markers for prostate cancer. Int J Cancer. 2002 Jul 10;100(2):228-37.
[239] Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Kaur P, Gray K, et al. Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. Clin Cancer Res. 2003 Dec 15;9(17):6357-62.
[240] Rigau M, Ortega I, Mir MC, Ballesteros C, Garcia M, Llaurado M, et al. A three-gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer. Prostate. 2011 Dec;71(16):1736-45.
[241] Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster CS, et al. Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. Br J Cancer. 2009 Mar 24;100(6):888-93.
[242] Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature. 2001 Aug 23;412(6849):822-6.
[243] Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. Cancer Res. 2008 Feb 1;68(3):645-9.
[244] Varambally S, Laxman B, Mehra R, Cao Q, Dhanasekaran SM, Tomlins SA, et al. Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer. Neoplasia. 2008 Nov;10(11):1285-94.
[245] Kristiansen G, Fritzsche FR, Wassermann K, Jager C, Tolls A, Lein M, et al. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. Br J Cancer. 2008 Sep 16;99(6):939-48.
[246] Schulz WA, Hatina J. Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. J Cell Mol Med. 2006 Jan-Mar;10(1):100-25.
[247] Jeronimo C, Bastian PJ, Bjartell A, Carbone GM, Catto JW, Clark SJ, et al. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. Eur Urol. 2011 Oct;60(4):753-66.
[248] Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. Cancer Lett. 2014 Jan 28;342(2):248-56.
[249] Perry AS, Watson RW, Lawler M, Hollywood D. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. Nat Rev Urol. 2010 Dec;7(12):668-80.
[250] Ransohoff DF. Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. Science. 2003 Mar 14;299(5613):1679-80.
[251] Brothman AR, Swanson G, Maxwell TM, Cui J, Murphy KJ, Herrick J, et al. Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? Cancer Genet Cytogenet. 2005 Jan 1;156(1):31-6.
[252] Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA. High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. Prostate. 1999 May 15;39(3):166-74.
[253] Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, et al. Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. Genes Chromosomes Cancer. 2002 Sep;35(1):58-65.
[254] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet. 2000 Apr;16(4):168-74.
[255] Bhavsar T, McCue P, Birbe R. Molecular diagnosis of prostate cancer: are we up to age? Semin Oncol. 2013 Jun;40(3):259-75.
[256] Cairns P. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. Nat Rev Cancer. 2007 Jul;7(7):531-43.

[257] 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.
[258] Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW, Span PN, Spyratos F, Sweep FC, et al. Methylated genes as new cancer biomarkers. Eur J Cancer. 2009 Feb;45(3):335-46.
[259] Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. Am J Pathol. 2003 Sep;163(3):923-33.
[260] Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;945:51-8.
[261] 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.
[262] 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.
[263] Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. Urology. 2002 Dec;60(6):1131-5.
[264] Rogers CG, Gonzalgo ML, Yan G, Bastian PJ, Chan DY, Nelson WG, et al. High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection. J Urol. 2006 Nov;176(5):2280-4.
[265] Henrique R, Jeronimo C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. Eur Urol. 2004 Nov;46(5):660-9; discussion 9.
[266] Roupret M, Hupertan V, Yates DR, Catto JW, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. Clin Cancer Res. 2007 Mar 15;13(6):1720-5.
[267] Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. J Clin Oncol. 2005 Sep 20;23(27):6569-75.
[268] Gonzalgo ML, Pavlovich CP, Lee SM, Nelson WG. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. Clin Cancer Res. 2003 Jul;9(7):2673-7.
[269] Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. Cancer Res. 2004 Mar 15;64(6):1975-86.
[270] Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8954-67.
[271] Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. J Pathol. 2007 Feb;211(3):269-77.
[272] Cho NY, Kim JH, Moon KC, Kang GH. Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm. Virchows Arch. 2009 Jan;454(1):17-23.
[273] Yang X, Du WW, Li H, Liu F, Khorshidi A, Rutnam ZJ, et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. Nucleic Acids Res. 2013 Nov;41(21):9688-704.
[274] Jarrard DF, Bussemakers MJ, Bova GS, Isaacs WB. Regional loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs in human prostate tissues. Clin Cancer Res. 1995 Dec;1(12):1471-8.
[275] Bhusari S, Yang B, Kueck J, Huang W, Jarrard DF. Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer. Prostate. 2011 Nov;71(15):1621-30.
[276] Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. J Cell Biochem. 2004 Feb 15;91(3):540-52.
[277] Devaney J, Stirzaker C, Qu W, Song JZ, Statham AL, Patterson KI, et al. Epigenetic deregulation across chromosome 2q14.2 differentiates normal from prostate cancer and provides a regional panel of novel DNA methylation cancer biomarkers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Jan;20(1):148-59.
[278] 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.
[279] Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, et al. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. Clin Cancer Res. 2005 Jun 1;11(11):4037-43.

[280] Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC, et al. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6582-8.
[281] Baden J, Adams S, Astacio T, Jones J, Markiewicz J, Painter J, et al. Predicting prostate biopsy result in men with prostate specific antigen 2.0 to 10.0 ng/ml using an investigational prostate cancer methylation assay. J Urol. 2011 Nov;186(5):2101-6.
[282] Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Muller SC, et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. Clin Cancer Res. 2005 Jun 1;11(11):4097-106.
[283] Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Buttner R, Muller SC, et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. Prostate. 2008 Jan 1;68(1):42-9.
[284] Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D, Hoque MO, Carvalho AL, Costa VL, et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. Clin Cancer Res. 2007 Oct 15;13(20):6122-9.
[285] Woodson K, O'Reilly KJ, Ward DE, Walter J, Hanson J, Walk EL, et al. CD44 and PTGS2 methylation are independent prognostic markers for biochemical recurrence among prostate cancer patients with clinically localized disease. Epigenetics. 2006 Oct-Dec;1(4):183-6.
[286] Cottrell S, Jung K, Kristiansen G, Eltze E, Semjonow A, Ittmann M, et al. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. J Urol. 2007 May;177(5):1753-8.
[287] Banez LL, Sun L, van Leenders GJ, Wheeler TM, Bangma CH, Freedland SJ, et al. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. J Urol. 2010 Jul;184(1):149-56.
[288] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705.
[289] Mellor J. The dynamics of chromatin remodeling at promoters. Mol Cell. 2005 Jul 22;19(2):147-57.
[290] Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. Heredity (Edinb). 2010 Jul;105(1):4-13.
[291] Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. Nature. 2005 Jun 30;435(7046):1262-6.
[292] Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Gutgemann I, Walter B, et al. Global histone H3K27 methylation levels are different in localized and metastatic prostate cancer. Cancer Invest. 2011 Feb;30(2):92-7.
[293] Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, et al. Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease. Clin Chim Acta. 2010 Oct 9;411(19-20):1452-6.
[294] Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gutgemann I, et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. Prostate. 2010 Jan 1;70(1):61-9.
[295] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet. 2005 Apr;37(4):391-400.
[296] Behbahani TE, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Baumann C, Gutgemann I, et al. Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis. BMC Urol. 2012;12:5.
[297] Pellakuru LG, Iwata T, Gurel B, Schultz D, Hicks J, Bethel C, et al. Global levels of H3K27me3 track with differentiation in vivo and are deregulated by MYC in prostate cancer. Am J Pathol. 2012 Aug;181(2):560-9.
[298] Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Oct;19(10):2611-22.
[299] Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009 Jan 23;136(2):215-33.
[300] Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. Prostate. 2011 Feb 15;71(3):326-31.
[301] Sun R, Fu X, Li Y, Xie Y, Mao Y. Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. BMC Genomics. 2009;10:93.
[302] Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. Cell Cycle. 2010 Mar 1;9(5):923-9.
[303] Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Camara-Lopes LH, et al. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer--from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. Urol Oncol. 2011 Aug;31(6):796-801.
[304] Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. Commun Integr Biol. 2010 Sep;3(5):478-81.
[305] Xu J, Li CX, Lv JY, Li YS, Xiao Y, Shao TT, et al. Prioritizing candidate disease miRNAs by topological features in the miRNA target-dysregulated network: case study of prostate cancer. Mol Cancer Ther. 2011 Oct;10(10):1857-66.

[306] Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T, et al. MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. Int J Cancer. 2012 Feb 1;130(3):611-21.
[307] Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, van Leenders GJ, Moller S, Trapman J, et al. Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. Oncogene. 2012 Feb 23;31(8):978-91.
[308] Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, Gleave M, et al. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. PLoS One. 2011;6(9):e24950.
[309] Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Zhang J, Chen X, et al. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. J Biol Chem. 2012 Jan 6;287(2):1527-37.
[310] 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.
[311] 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.
[312] Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. Prostate. 2008 Aug 1;68(11):1152-64.
[313] Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. Int J Cancer. 2010 Mar 1;126(5):1166-76.
[314] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 9;105(36):13421-6.
[315] Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. Cancer Res. 2009 Sep 15;69(18):7165-9.
[316] Li T, Li RS, Li YH, Zhong S, Chen YY, Zhang CM, et al. miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. J Urol. 2012 Apr;187(4):1466-72.
[317] Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nat Med. 2008 Nov;14(11):1271-7.
[318] Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu X, Xiong D, et al. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. PLoS One. 2011;6(5):e20341.
[319] Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Stenger N, Rudiger T, Strobel P, et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. Int J Cancer. 2010 Jul 15;127(2):394-403.
[320] Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2010 Mar;17(1):F1-17.
[321] Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. Eur Urol. 2011 May;59(5):671-81.
[322] 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.
[323] Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. Oncogene. 2011 Feb 3;30(5):619-30.
[324] DeVere 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.
[325] Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. Cancer Gene Ther. 2009 Mar;16(3):206-16.
[326] Mitchell P. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10513-8.
[327] Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhees B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. Br J Cancer. 2012 Feb 14;106(4):768-74.
[328] Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. Tumour Biol. 2011 Jun;32(3):583-8.
[329] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. Int J Cancer. 2011 Feb 1;128(3):608-16.
[330] Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. Mol Cancer. 2010;9:306.

[331] Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. Cancer Res. 2011 Jan 15;71(2):550-60.
[332] Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM, et al. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. Prostate. 2012 Sep 15;72(13):1443-52.
[333] Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. Urology. 2011 May;77(5):1265 e9-16.
[334] Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. Prostate. 2012 Sep 15;72(13):1469-77.
[335] Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. J Cancer. 2014;5(3):182-91.
[336] Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, et al. MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. PLoS One. 2013;8(10):e76994.
[337] Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Vogelzang NJ, Ward DC. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. Clin Genitourin Cancer. 2011 Sep;9(1):39-45.
[338] Lodes MJ, Caraballo M, Suciu D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. PLoS One. 2009;4(7):e6229.
[339] Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. Prostate. 2013 Mar;73(4):346-54.
[340] Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. Int J Cancer. 2012 Aug 1;131(3):652-61.
[341] Carlsson J, Davidsson S, Helenius G, Karlsson M, Lubovac Z, Andren O, et al. A miRNA expression signature that separates between normal and malignant prostate tissues. Cancer Cell Int. 2011;11(1):14.
[342] Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. Cancer Res. 2009 Apr 1;69(7):2912-8.
[343] Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):7053-8.
[344] de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res. 2008 Oct 1;14(19):6302-9.
[345] Pal SK, Twardowski P, Josephson DY. Beyond castration and chemotherapy: novel approaches to targeting androgen-driven pathways. Maturitas. 2009 Oct 20;64(2):61-6.
[346] Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. Lancet Oncol. 2009 Mar;10(3):233-9.
[347] Hori S, Blanchet JS, McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. BJU Int. 2013 Oct;112(6):717-28.
[348] Lazzeri M, Abrate A, Lughezzani G, Gadda GM, Freschi M, Mistretta F, et al. Relationship of chronic histologic prostatic inflammation in biopsy specimens with serum isoform [-2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and prostate health index in men with a total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml and normal digital rectal examination. Urology. 2014 Mar;83(3):606-12.
[349] Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, Kagan J, Mizrahi IA, Broyles DL, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 May;19(5):1193-200.
[350] Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol. 2003 Jul;44(1):8-15; discussion -6.
[351] 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.
[352] Filella X, Foj L, Mila M, Auge JM, Molina R, Jimenez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. Tumour Biol. 2013 Jun;34(3):1337-47.
[353] Auprich M, Bjartell A, Chun FK, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. Eur Urol. 2011 Nov;60(5):1045-54.

[354] Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ, Qian J, Drewnowska KP, Kaminetsky JC, et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. J Urol. 2012 Nov;188(5):1726-31.
[355] Stephan C, Ralla B, Jung K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1846(1):99-112.
[356] Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. BMC Genomics. 2013;14:690.
[357] Cuzick J, Berney DM, Fisher G, Mesher D, Moller H, Reid JE, et al. Prognostic value of a cell cycle progression signature for prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. Br J Cancer. 2012 Mar 13;106(6):1095-9.
[358] Freedland SJ, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, et al. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013 Aug 1;86(5):848-53.
[359] Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. J Clin Oncol. 2013 Apr 10;31(11):1428-34.
[360] McDunn JE, Li Z, Adam KP, Neri BP, Wolfert RL, Milburn MV, et al. Metabolomic signatures of aggressive prostate cancer. Prostate. 2013 Oct;73(14):1547-60.
[361] Jung K, Reszka R, Kamlage B, Bethan B, Stephan C, Lein M, et al. Tissue metabolite profiling identifies differentiating and prognostic biomarkers for prostate carcinoma. Int J Cancer. 2013 Dec 15;133(12):2914-24.
[362] 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. 2013 Jul;31(5):566-71.
[363] Cornu JN, Cancel-Tassin G, Egrot C, Gaffory C, Haab F, Cussenot O. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript integrated with PCA3 score, genotyping, and biological features are correlated to the results of prostatic biopsies in men at risk of prostate cancer. Prostate. 2013 Feb 15;73(3):242-9.
[364] Leyten GH, Hessels D, Jannink SA, Smit FP, de Jong H, Cornel EB, et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. Eur Urol. 2014 Mar;65(3):534-42.
[365] Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. Br J Cancer. 2007 Dec 17;97(12):1690-5.
[366] 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.
[367] Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. Oncol Rep. 2007 May;17(5):1033-6.
[368] 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.
[369] 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.
[370] 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.
[371] 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.
[372] Stewart GD, Van Neste L, Delvenne P, Delree P, Delga A, McNeill SA, et al. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: results of the MATLOC study. J Urol. 2013 Mar;189(3):1110-6.
[373] Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. Clin Chem Lab Med. 2012 Oct 1;50(10):1707-21.
[374] Parr RL, Mills J, Harbottle A, Creed JM, Crewdson G, Reguly B, et al. Mitochondria, prostate cancer, and biopsy sampling error. Discov Med. 2013 Apr;15(83):213-20.
[375] Verschoor ML, Ungard R, Harbottle A, Jakupciak JP, Parr RL, Singh G. Mitochondria and cancer: past, present, and future. Biomed Res Int. 2013;2013:612369.
[376] Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. Nat Protoc. 2008;3(12):1903-8.

[377] Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E, et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):3807-13.
[378] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2000 Apr 15;28(8):E32.
[379] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. Cancer Res. 1999 May 15;59(10):2302-6.
[380] Campan M. WD, Trinh B., Laird, PW. . MehtyLight. Methods Mol Biol. 2009;507:325-7.
[381] Weisenberger D CM, Long T, Laird PW. Determination of CpG Island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer using MethyLight. Nature Protocols. 2006.
[382] Dallol A, Al-Ali W, Al-Shaibani A, Al-Mulla F. Analysis of DNA methylation in FFPE tissues using the MethyLight technology. Methods Mol Biol. 2011;724:191-204.
[383] Quek SI, Ho ME, Loprieno MA, Ellis WJ, Elliott N, Liu AY. A multiplex assay to measure RNA transcripts of prostate cancer in urine. PLoS One. 2012;7(9):e45656.
[384] Pressinotti NC, Klocker H, Schafer G, Luu VD, Ruschhaupt M, Kuner R, et al. Differential expression of apoptotic genes PDIA3 and MAP3K5 distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. Mol Cancer. 2009;8:130.
[385] Gordanpour A, Nam RK, Sugar L, Bacopulos S, Seth A. MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR). J Vis Exp. 2012(63):e3874.
[386] Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. Exp Mol Med. 2010 Nov 30;42(11):749-58.
[387] D'Andrade PN, Fulmer-Smentek S. Agilent microRNA microarray profiling system. Methods Mol Biol. 2012;822:85-102.
[388] Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. Genetics. 1964 Jan;49(1):49-67.
[389] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.
[390] Szumilas M. Explaining odds ratios. J Can Acad Child Adolesc Psychiatry. 2010 Aug;19(3):227-9.
[391] Benjamini Y. HY. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of theRoyal Statistical Society B. 1995;57:289-300.
[392] Metz CE. Basic principles of ROC analysis. Semin Nucl Med. 1978 Oct;8(4):283-98.
[393] Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem. 1993 Apr;39(4):561-77.
[394] Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. Ann Intern Med. 1981 Apr;94(4 Pt 2):557-92.
[395] Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med. 2013 Spring;4(2):627-35.
[396] Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. Biostatistics. 2000 Jun;1(2):123-40.
[397] Nguyen DV, Arpat AB, Wang N, Carroll RJ. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. Biometrics. 2002 Dec;58(4):701-17.
[398] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. Nat Genet. 2002 Dec;32 Suppl:496-501.
[399] Ransohoff DF. How to improve reliability and efficiency of research about molecular markers: roles of phases, guidelines, and study design. J Clin Epidemiol. 2007 Dec;60(12):1205-19.
[400] Huber W, von Heydebreck A, Sueltmann H, Poustka A, Vingron M. Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. Stat Appl Genet Mol Biol. 2003;2:Article3.
[401] Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15;31(4):e15.
[402] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003 Apr;4(2):249-64.
[403] Schadt EE, Li C, Ellis B, Wong WH. Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. J Cell Biochem Suppl. 2001;Suppl 37:120-5.
[404] Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res. 2002 Feb 15;30(4):e15.
[405] Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, et al. Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. PLoS One. 2012;7(6):e39309.

[406] Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja MN, Das S. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. Sci Rep. 2013;3:1555.
[407] Ringner M. What is principal component analysis? Nat Biotechnol. 2008 Mar;26(3):303-4.
[408] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res. 2012 Jan;40(Database issue):D109-14.
[409] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14863-8.
[410] Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 16;96(6):2907-12.
[411] Lance GN WW. A general theory of classificatory sorting strategies: 1. Hierarchical systems. Computer Journal 1967;9:373–80.
[412] Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. Jama. 1998 May 20;279(19):1542-7.
[413] Lopez-Romero P, Gonzalez MA, Callejas S, Dopazo A, Irizarry RA. Processing of Agilent microRNA array data. BMC research notes. 2010;3:18.
[414] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
[415] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
[416] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucleic acids research. 2011 Jan;39(Database issue):D561-8.
[417] Puri C, Chibalina MV, Arden SD, Kruppa AJ, Kendrick-Jones J, Buss F. Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis. Oncogene. 2010 Jan 14;29(2):188-200.
[418] Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. Early onset prostate cancer has a significant genetic component. Prostate. 2012 Feb 1;72(2):147-56.
[419] Shui IM, Lindstrom S, Kibel AS, Berndt SI, Campa D, Gerke T, et al. Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Eur Urol. 2014 Jun;65(6):1069-75.
[420] Bao BY, Pao JB, Lin VC, Huang CN, Chang TY, Lan YH, et al. Individual and cumulative association of prostate cancer susceptibility variants with clinicopathologic characteristics of the disease. Clin Chim Acta. 2010 Sep 6;411(17-18):1232-7.
[421] Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, Jacobs KB, Gonzalez-Bosquet J, Hayes RB, et al. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1055-7.
[422] Salinas CA, Kwon E, Carlson CS, Koopmeiners JS, Feng Z, Karyadi DM, et al. Multiple independent genetic variants in the 8q24 region are associated with prostate cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 May;17(5):1203-13.
[423] Liu H, Wang B, Han C. Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. Prostate. 2011 Feb 1;71(2):209-24.
[424] Chang BL, Cramer SD, Wiklund F, Isaacs SD, Stevens VL, Sun J, et al. Fine mapping association study and functional analysis implicate a SNP in MSMB at 10q11 as a causal variant for prostate cancer risk. Hum Mol Genet. 2009 Apr 1;18(7):1368-75.
[425] Lou H, Yeager M, Li H, Bosquet JG, Hayes RB, Orr N, et al. Fine mapping and functional analysis of a common variant in MSMB on chromosome 10q11.2 associated with prostate cancer susceptibility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 12;106(19):7933-8.
[426] Kader AK, Sun J, Isaacs SD, Wiley KE, Yan G, Kim ST, et al. Individual and cumulative effect of prostate cancer risk-associated variants on clinicopathologic variables in 5,895 prostate cancer patients. Prostate. 2009 Aug 1;69(11):1195-205.
[427] Bjartell AS, Al-Ahmadie H, Serio AM, Eastham JA, Eggener SE, Fine SW, et al. Association of cysteine-rich secretory protein 3 and beta-microseminoprotein with outcome after radical prostatectomy. Clin Cancer Res. 2007 Jul 15;13(14):4130-8.
[428] Reeves JR, Dulude H, Panchal C, Daigneault L, Ramnani DM. Prognostic value of prostate secretory protein of 94 amino acids and its binding protein after radical prostatectomy. Clin Cancer Res. 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):6018-22.
[429] Beke L, Nuytten M, Van Eynde A, Beullens M, Bollen M. The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. Oncogene. 2007 Jul 5;26(31):4590-5.
[430] Vanaja DK, Cheville JC, Iturria SJ, Young CY. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. Cancer Res. 2003 Jul 15;63(14):3877-82.

[431] Ahn J, Kibel AS, Park JY, Rebbeck TR, Rennert H, Stanford JL, et al. Prostate cancer predisposition loci and risk of metastatic disease and prostate cancer recurrence. Clin Cancer Res. 2011 Mar 1;17(5):1075-81.
[432] Wiklund F, Zheng SL, Sun J, Adami HO, Lilja H, Hsu FC, et al. Association of reported prostate cancer risk alleles with PSA levels among men without a diagnosis of prostate cancer. Prostate. 2009 Mar 1;69(4):419-27.
[433] Chang BL, Hughes L, Chen DY, Gross L, Ruth K, Giri VN. Validation of association of genetic variants at 10q with prostate-specific antigen (PSA) levels in men at high risk for prostate cancer. BJU Int. 2014 May;113(5b):E150-6.
[434] Xu J, Isaacs SD, Sun J, Li G, Wiley KE, Zhu Y, et al. Association of prostate cancer risk variants with clinicopathologic characteristics of the disease. Clin Cancer Res. 2008 Sep 15;14(18):5819-24.
[435] Wang L, Li B, Lu X, Zhao Q, Li Y, Ge D, et al. A functional intronic variant in the tyrosine hydroxylase (TH) gene confers risk of essential hypertension in the Northern Chinese Han population. Clin Sci (Lond). 2008 Sep;115(5):151-8.
[436] Jubb AM, Chalasani S, Frantz GD, Smits R, Grabsch HI, Kavi V, et al. Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. Oncogene. 2006 Jun 8;25(24):3445-57.
[437] Stange DE, Engel F, Longerich T, Koo BK, Koch M, Delhomme N, et al. Expression of an ASCL2 related stem cell signature and IGF2 in colorectal cancer liver metastases with 11p15.5 gain. Gut. 2010 Sep;59(9):1236-44.
[438] Sung MK, Bang H, Choi JK. Understanding Epistatic Interactions between Genes Targeted by Non-coding Regulatory Elements in Complex Diseases. Genomics Inform. 2014 Dec;12(4):181-6.
[439] Wei WH, Hemani G, Haley CS. Detecting epistasis in human complex traits. Nat Rev Genet. 2014 Nov;15(11):722-33.
[440] Wei WH, Guo Y, Kindt AS, Merriman TR, Semple CA, Wang K, et al. Abundant local interactions in the 4p16.1 region suggest functional mechanisms underlying SLC2A9 associations with human serum uric acid. Hum Mol Genet. 2014 Oct 1;23(19):5061-8.
[441] He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE. The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem. 2002 Mar 29;277(13):10767-74.
[442] Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Topisirovic I, Martineau Y, Gibbs BF, et al. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. Mol Cell Biol. 2010 Mar;30(6):1478-85.
[443] Emami N, Diamandis EP. Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. Clin Chem. 2008 Oct;54(10):1600-7.
[444] Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. Nat Rev Cancer. 2004 Nov;4(11):876-90.
[445] Klein RJ, Hallden C, Cronin AM, Ploner A, Wiklund F, Bjartell AS, et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single-nucleotide polymorphisms: kallikreins and prostate cancer. Cancer Prev Res (Phila). 2010 May;3(5):611-9.
[446] Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. Endocr Rev. 2010 Aug;31(4):407-46.
[447] Knipe DW, Evans DM, Kemp JP, Eeles R, Easton DF, Kote-Jarai Z, et al. Genetic variation in prostate-specific antigen-detected prostate cancer and the effect of control selection on genetic association studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Jul;23(7):1356-65.
[448] Batra J, Lose F, O'Mara T, Marquart L, Stephens C, Alexander K, et al. Association between Prostinogen (KLK15) genetic variants and prostate cancer risk and aggressiveness in Australia and a meta-analysis of GWAS data. PLoS One. 2011;6(11):e26527.
[449] Moretti RM, Montagnani Marelli M, Motta M, Limonta P. Role of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the control of the metastatic behavior of androgen-independent prostate cancer cells. Oncol Rep. 2002 Sep-Oct;9(5):1139-43.
[450] Beuten J, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, et al. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. Carcinogenesis. 2008 Sep;29(9):1751-7.
[451] Carnell DM, Smith RE, Daley FM, Barber PR, Hoskin PJ, Wilson GD, et al. Target validation of cytochrome P450 CYP1B1 in prostate carcinoma with protein expression in associated hyperplastic and premalignant tissue. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004 Feb 1;58(2):500-9.
[452] Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Turner A, Hawkins GA, Wiley KE, et al. Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer. Br J Cancer. 2003 Oct 20;89(8):1524-9.
[453] Pastina I, Giovannetti E, Chioni A, Sissung TM, Crea F, Orlandini C, et al. Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms associated with response to docetaxel in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) patients. BMC Cancer. 2010;10:511.
[454] Akinloye O, Gromoll J, Simoni M. Variation in CAG and GGN repeat lengths and CAG/GGN haplotype in androgen receptor gene polymorphism and prostate carcinoma in Nigerians. Br J Biomed Sci. 2011;68(3):138-42.
[455] Bosland MC, Mahmoud AM. Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens. J Carcinog. 2011;10:33.

[456] Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. J Mol Endocrinol. 2000 Aug;25(1):85-96.
[457] Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Res. 1994 Aug 11;22(15):3181-6.
[458] Zeegers MP, Kiemeney LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004 Nov;13(11 Pt 1):1765-71.
[459] Strom SS, Gu Y, Zhang H, Troncoso P, Babaian RJ, Pettaway CA, et al. Androgen receptor polymorphisms and risk of biochemical failure among prostatectomy patients. Prostate. 2004 Sep 1;60(4):343-51.
[460] Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, et al. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. Cancer Res. 2000 Sep 15;60(18):5111-6.
[461] Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, et al. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. Cancer Res. 1997 Mar 15;57(6):1194-8.
[462] Lindstrom S, Ma J, Altshuler D, Giovannucci E, Riboli E, Albanes D, et al. A large study of androgen receptor germline variants and their relation to sex hormone levels and prostate cancer risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Sep;95(9):E121-7.
[463] Price DK, Chau CH, Till C, Goodman PJ, Baum CE, Ockers SB, et al. Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. J Urol. 2010 Dec;184(6):2297-302.
[464] Misra D, Xie W, Regan MM, Ross RW, Lee GS, Germain D, et al. Germline CAG repeat length of the androgen receptor and time to progression in patients with prostate cancer treated with androgen deprivation therapy. BJU Int. 2011 Oct;108(7):1086-91.
[465] Robins DM. Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: of humanized mice and men. Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 16;352(1-2):26-33.
[466] Gu M, Dong X, Zhang X, Niu W. The CAG repeat polymorphism of androgen receptor gene and prostate cancer: a meta-analysis. Mol Biol Rep. 2012 Mar;39(3):2615-24.
[467] Knudsen KE, Penning TM. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. Trends Endocrinol Metab. 2010 May;21(5):315-24.
[468] Yuan X, Balk SP. Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. Urol Oncol. 2009 Jan-Feb;27(1):36-41.
[469] Eisermann K, Wang D, Jing Y, Pascal LE, Wang Z. Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. Transl Androl Urol. 2013 Sep 1;2(3):137-47.
[470] Zheng SL, Chang BL, Faith DA, Johnson JR, Isaacs SD, Hawkins GA, et al. Sequence variants of alpha-methylacyl-CoA racemase are associated with prostate cancer risk. Cancer Res. 2002 Nov 15;62(22):6485-8.
[471] Chan JM, Giovannucci EL. Dairy products, calcium, and vitamin D and risk of prostate cancer. Epidemiol Rev. 2001;23(1):87-92.
[472] FitzGerald LM, Thomson R, Polanowski A, Patterson B, McKay JD, Stankovich J, et al. Sequence variants of alpha-methylacyl-CoA racemase are associated with prostate cancer risk: a replication study in an ethnically homogeneous population. Prostate. 2008 Sep 15;68(13):1373-9.
[473] Daugherty SE, Shugart YY, Platz EA, Fallin MD, Isaacs WB, Pfeiffer RM, et al. Polymorphic variants in alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. Prostate. 2007 Oct 1;67(14):1487-97.
[474] Levin AM, Zuhlke KA, Ray AM, Cooney KA, Douglas JA. Sequence variation in alpha-methylacyl-CoA racemase and risk of early-onset and familial prostate cancer. Prostate. 2007 Oct 1;67(14):1507-13.
[475] Dumache R, Puiu M, Motoc M, Vernic C, Dumitrascu V. Prostate cancer molecular detection in plasma samples by glutathione S-transferase P1 (GSTP1) methylation analysis. Clin Lab. 2014;60(5):847-52.
[476] Dimitriadis E, Kalogeropoulos T, Velaeti S, Sotiriou S, Vassiliou E, Fasoulis L, et al. Study of genetic and epigenetic alterations in urine samples as diagnostic markers for prostate cancer. Anticancer Res. 2013 Jan;33(1):191-7.
[477] Wu T, Giovannucci E, Welge J, Mallick P, Tang WY, Ho SM. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. Br J Cancer. 2011 Jun 28;105(1):65-73.
[478] Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, et al. DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. Prostate. 2009 Sep 1;69(12):1257-69.
[479] Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3796-802.
[480] Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Pookot D, et al. Ethnic group-related differences in CpG hypermethylation of the GSTP1 gene promoter among African-American, Caucasian and Asian patients with prostate cancer. Int J Cancer. 2005 Aug 20;116(2):174-81.

[481] Kwabi-Addo B, Wang S, Chung W, Jelinek J, Patierno SR, Wang BD, et al. Identification of differentially methylated genes in normal prostate tissues from African American and Caucasian men. Clin Cancer Res. 2010 Jul 15;16(14):3539-47.
[482] Balic M, Pichler M, Strutz J, Heitzer E, Ausch C, Samonigg H, et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. J Mol Diagn. 2009 Mar;11(2):102-8.
[483] Albig W, Doenecke D. The human histone gene cluster at the D6S105 locus. Hum Genet. 1997 Dec;101(3):284-94.
[484] Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, et al. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucleic Acids Res. 2004;32(1):e10.
[485] Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. J Appl Physiol (1985). 2010 Aug;109(2):586-97.
[486] Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vaniushin BF. [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. Biokhimiia. 1967 Sep-Oct;32(5):988-93.
[487] Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. J Biol Chem. 1987 Jul 25;262(21):9948-51.
[488] Romanov GA, Vanyushin BF. Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. Biochim Biophys Acta. 1981 Apr 27;653(2):204-18.
[489] Drinkwater RD, Blake TJ, Morley AA, Turner DR. Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA. Mutat Res. 1989 Jan;219(1):29-37.
[490] Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. Jama. 2008 Jun 25;299(24):2877-83.
[491] Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. Ann Hum Genet. 2004 May;68(Pt 3):196-204.
[492] Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. Trends Genet. 2007 Aug;23(8):413-8.
[493] Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. Ageing Res Rev. 2009 Oct;8(4):268-76.
[494] Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Bhatt K, Shah B, et al. Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. Exp Gerontol. 2004 Mar;39(3):369-77.
[495] Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. Gastroenterology. 2005 Jul;129(1):156-69.
[496] Neal DE, Donovan JL. Prostate cancer: to screen or not to screen? Lancet Oncol. 2000 Sep;1(1):17-24.
[497] Roehrborn CG, McConnell JD, Lieber M, Kaplan S, Geller J, Malek GH, et al. Serum prostate-specific antigen concentration is a powerful predictor of acute urinary retention and need for surgery in men with clinical benign prostatic hyperplasia. PLESS Study Group. Urology. 1999 Mar;53(3):473-80.
[498] Schatteman PH, Hoekx L, Wyndaele JJ, Jeuris W, Van Marck E. Inflammation in prostate biopsies of men without prostatic malignancy or clinical prostatitis: correlation with total serum PSA and PSA density. Eur Urol. 2000 Apr;37(4):404-12.
[499] Fontenete S, Silva J, Teixeira AL, Ribeiro R, Bastos E, Pina F, et al. Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis. Int Braz J Urol. 2011 Nov-Dec;37(6):719-26.
[500] Irani J, Salomon L, Soulie M, Zlotta A, de la Taille A, Dore B, et al. Urinary/serum prostate-specific antigen ratio: comparison with free/total serum prostate-specific antigen ratio in improving prostate cancer detection. Urology. 2005 Mar;65(3):533-7.
[501] Bolduc S, Lacombe L, Naud A, Gregoire M, Fradet Y, Tremblay RR. Urinary PSA: a potential useful marker when serum PSA is between 2.5 ng/mL and 10 ng/mL. Can Urol Assoc J. 2007 Nov;1(4):377-81.
[502] de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeney 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.
[503] Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. Clin Chem. 2006 Jun;52(6):1089-95.
[504] Hessels D, Schalken JA. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. Nat Rev Urol. 2009 May;6(5):255-61.
[505] Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. J Urol. 2008 Apr;179(4):1587-92.
[506] Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. Eur Urol. 2008 Nov;54(5):1081-8.
[507] Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SM, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. Urology. 2007 Mar;69(3):532-5.

[508] Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, Bhadkamkar V, Blase A, Kumar SV, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. J Urol. 2008 May;179(5):1804-9; discussion 9-10.
[509] Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, Chen Y, Blase A, Furusato B, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. J Urol. 2008 Nov;180(5):1975-8; discussion 8-9.
[510] Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. Eur Urol. 2004 Aug;46(2):182-6; discussion 7.
[511] Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. Urology. 2004 Aug;64(2):311-5; discussion 5-6.
[512] Jiang Z, Woda BA. Diagnostic utility of alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) on prostate needle biopsy. Adv Anat Pathol. 2004 Nov;11(6):316-21.
[513] Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. Rna. 2008 Mar;14(3):417-24.
[514] Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Chery L, Siddiqui J, et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. PLoS One. 2013;8(7):e69239.
[515] Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. Cell Res. 2010 Jul;20(7):784-93.
[516] Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2339-49.
[517] Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2009 Apr 15;15(8):2850-5.
[518] Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. Am J Pathol. 2012 Mar;180(3):917-28.
[519] Mathe EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, et al. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. Clin Cancer Res. 2009 Oct 1;15(19):6192-200.
[520] Jung HM, Patel RS, Phillips BL, Wang H, Cohen DM, Reinhold WC, et al. Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA-mRNA interactions. Mol Biol Cell. 2013 Jun;24(11):1638-48, S1-7.
[521] Li Y, Jiang Q, Xia N, Yang H, Hu C. Decreased expression of microRNA-375 in nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. J Int Med Res. 2012;40(5):1662-9.
[522] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. Hepatology. 2008 Jun;47(6):1955-63.
[523] Zhou J, Song S, Cen J, Zhu D, Li D, Zhang Z. MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. Oncol Res. 2012;20(5-6):197-203.
[524] Dai X, Chiang Y, Wang Z, Song Y, Lu C, Gao P, et al. Expression levels of microRNA-375 in colorectal carcinoma. Mol Med Rep. 2012 May;5(5):1299-304.
[525] Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, et al. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. J Cell Mol Med. 2012 Nov;16(11):2655-66.
[526] de Souza Rocha Simonini P, Breiling A, Gupta N, Malekpour M, Youns M, Omranipour R, et al. Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. Cancer Res. 2010 Nov 15;70(22):9175-84.
[527] Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML, Zhang J, Matusik R, et al. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. Cancer Cell. 2003 Sep;4(3):223-38.
[528] Hawksworth D, Ravindranath L, Chen Y, Furusato B, Sesterhenn IA, McLeod DG, et al. Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2010 Dec;13(4):311-5.
[529] 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.
[530] Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2009 Nov;20(9):452-9.

[531] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. Cancer Res. 2010 Dec 1;70(23):9798-807.
[532] Lu TX, Lim EJ, Wen T, Plassard AJ, Hogan SP, Martin LJ, et al. MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. Mucosal Immunol. 2012 Jul;5(4):388-96.
[533] Erener S, Mojibian M, Fox JK, Denroche HC, Kieffer TJ. Circulating miR-375 as a biomarker of beta-cell death and diabetes in mice. Endocrinology. 2013 Feb;154(2):603-8.
[534] Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature. 2004 Nov 11;432(7014):226-30.
[535] Tang X, Tang G, Ozcan S. Role of microRNAs in diabetes. Biochim Biophys Acta. 2008 Nov;1779(11):697-701.
[536] Chu M, Chang Y, Li P, Guo Y, Zhang K, Gao W. Androgen receptor is negatively correlated with the methylation-mediated transcriptional repression of miR-375 in human prostate cancer cells. Oncol Rep. 2014 Jan;31(1):34-40.
[537] Schubert M, Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Joniau S, Stroebel P, et al. Distinct microRNA expression profile in prostate cancer patients with early clinical failure and the impact of let-7 as prognostic marker in high-risk prostate cancer. PLoS One. 2013;8(6):e65064.
[538] Cava C, Bertoli G, Ripamonti M, Mauri G, Zoppis I, Della Rosa PA, et al. Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition. PLoS One. 2014;9(5):e97681.
[539] Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih Ie M, Zhang Y, et al. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. PLoS One. 2008;3(6):e2436.
[540] Zhao B, Han H, Chen J, Zhang Z, Li S, Fang F, et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. Cancer Lett. 2014 Jan 1;342(1):43-51.
[541] Li J, Shi W, Gao Y, Yang B, Jing X, Shan S, et al. Analysis of microRNA expression profiles in human hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Clin Lab. 2013;59(9-10):1009-15.
[542] Dong Q, Meng P, Wang T, Qin W, Qin W, Wang F, et al. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. PLoS One. 2010;5(4):e10147.
[543] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell. 2005 Mar 11;120(5):635-47.
[544] Kong D, Heath E, Chen W, Cher ML, Powell I, Heilbrun L, et al. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. PLoS One. 2012;7(3):e33729.
[545] Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. Nat Genet. 2007 May;39(5):673-7.
[546] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev. 2007 May 1;21(9):1025-30.
[547] Lee H, Park CS, Deftereos G, Morihara J, Stern JE, Hawes SE, et al. MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. World J Surg Oncol. 2012;10:174.
[548] Busacca S, Germano S, De Cecco L, Rinaldi M, Comoglio F, Favero F, et al. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Mar;42(3):312-9.
[549] Benner MF, Ballabio E, van Kester MS, Saunders NJ, Vermeer MH, Willemze R, et al. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma shows a distinct miRNA expression profile and reveals differences from tumor-stage mycosis fungoides. Exp Dermatol. 2012 Aug;21(8):632-4.
[550] Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andres R, Marquez-Rodas I, Osorio A, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. PLoS One. 2012;7(6):e38847.
[551] Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. World J Urol. 2011 Jun;29(3):367-73.
[552] Ling XH, Han ZD, Xia D, He HC, Jiang FN, Lin ZY, et al. MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer. Mol Biol Rep. 2014 May;41(5):2779-88.
[553] Ren Q, Liang J, Wei J, Basturk O, Wang J, Daniels G, et al. Epithelial and stromal expression of miRNAs during prostate cancer progression. Am J Transl Res. 2014;6(4):329-39.
[554] Song H, Liu Y, Pan J, Zhao ST. Expression profile analysis reveals putative prostate cancer-related microRNAs. Genet Mol Res. 2013;12(4):4934-43.

[555] Wang G, Zhang H, He H, Tong W, Wang B, Liao G, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. Int Urol Nephrol. 2010 Mar;42(1):95-102.
[556] NCI. Prostate-specific antigen (PSA) test. 2014 [cited 2014 January 8]; Available from: http://www.cancer.gov.beckerproxy.wustl.edu/cancertopics/factsheet/detection/PSA
[557] Antenor JA, Roehl KA, Eggener SE, Kundu SD, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for Stage T1c disease. Urology. 2005 Jul;66(1):156-60.
[558] Corcoran NM, Casey RG, Hong MK, Pedersen J, Connolly S, Peters J, et al. The ability of prostate-specific antigen (PSA) density to predict an upgrade in Gleason score between initial prostate biopsy and prostatectomy diminishes with increasing tumour grade due to reduced PSA secretion per unit tumour volume. BJU Int. 2012 Jul;110(1):36-42.
[559] Kundu SD, Roehl KA, Yu X, Antenor JA, Suarez BK, Catalona WJ. Prostate specific antigen density correlates with features of prostate cancer aggressiveness. J Urol. 2007 Feb;177(2):505-9.
[560] Ulmert D, Cronin AM, Bjork T, O'Brien MF, Scardino PT, Eastham JA, et al. Prostate-specific antigen at or before age 50 as a predictor of advanced prostate cancer diagnosed up to 25 years later: a case-control study. BMC Med. 2008;6:6.
[561] Vickers AJ, Cronin AM, Bjork T, Manjer J, Nilsson PM, Dahlin A, et al. Prostate specific antigen concentration at age 60 and death or metastasis from prostate cancer: case-control study. Bmj. 2010;341:c4521.
[562] D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. Jama. 1998 Sep 16;280(11):969-74.
[563] Patel AA, Chen MH, Renshaw AA, D'Amico AV. PSA failure following definitive treatment of prostate cancer having biopsy Gleason score 7 with tertiary grade 5. Jama. 2007 Oct 3;298(13):1533-8.
[564] Chang X, Li S, Li J, Yin L, Zhou T, Zhang C, et al. Ethnic differences in microRNA-375 expression level and DNA methylation status in type 2 diabetes of Han and Kazak populations. J Diabetes Res. 2014;2014:761938.
[565] 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.
[566] 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.
[567] Feng J, Huang C, Diao X, Fan M, Wang P, Xiao Y, et al. Screening biomarkers of prostate cancer by integrating microRNA and mRNA microarrays. Genet Test Mol Biomarkers. 2013 Nov;17(11):807-13.
[568] He HC, Han ZD, Dai QS, Ling XH, Fu X, Lin ZY, et al. Global analysis of the differentially expressed miRNAs of prostate cancer in Chinese patients. BMC Genomics. 2013;14:757.
[569] Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, et al. Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. Br J Cancer. 2013 Aug 6;109(3):641-50.
[570] Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, et al. Plasma miRNAs as Biomarkers to Identify Patients with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer. Int J Mol Sci. 2013;14(4):7757-70.
[571] Song C, Chen H, Wang T, Zhang W, Ru G, Lang J. Expression profile analysis of microRNAs in prostate cancer by next-generation sequencing. Prostate. 2015 Apr;75(5):500-16.
[572] Maeno A, Terada N, Uegaki M, Goto T, Okada Y, Kobayashi T, et al. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions. Prostate. 2014 Dec;74(16):1604-12.
[573] Ostling P, Leivonen SK, Aakula A, Kohonen P, Makela R, Hagman Z, et al. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. Cancer Res. 2011 Mar 1;71(5):1956-67.
[574] Shen PF, Chen XQ, Liao YC, Chen N, Zhou Q, Wei Q, et al. MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer. Prostate. 2014 May;74(7):756-67.
[575] Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. Nucleic Acids Res. 2007;35(17):5944-53.
[576] Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. Rna. 2011 Feb;17(2):312-26.
[577] Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. Nat Struct Mol Biol. 2008 Apr;15(4):354-63.
[578] Lee DY, Shatseva T, Jeyapalan Z, Du WW, Deng Z, Yang BB. A 3'-untranslated region (3'UTR) induces organ adhesion by regulating miR-199a* functions. PLoS One. 2009;4(2):e4527.
[579] Guo L, Liang T, Gu W, Xu Y, Bai Y, Lu Z. Cross-mapping events in miRNAs reveal potential miRNA-mimics and evolutionary implications. PLoS One. 2011;6(5):e20517.
[580] Mishra S, Lin CL, Huang TH, Bouamar H, Sun LZ. MicroRNA-21 inhibits p57Kip2 expression in prostate cancer. Mol Cancer. 2014;13:212.
[581] Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. BMC Urol. 2012;12:14.

[582] Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M, et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. Mol Cancer. 2010;9:12.
[583] Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. PLoS One. 2009;4(11):e8003.
[584] Colangelo T, Fucci A, Votino C, Sabatino L, Pancione M, Laudanna C, et al. MicroRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. Neoplasia. 2013 Sep;15(9):1086-99.
[585] Chen D, Cabay RJ, Jin Y, Wang A, Lu Y, Shah-Khan M, et al. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. J Oral Maxillofac Res. 2013;4(1):e2.
[586] Wang WY, Zhang HF, Wang L, Ma YP, Gao F, Zhang SJ, et al. High expression of microRNA-130b correlates with poor prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. Diagn Pathol. 2014;9:160.
[587] Zong C, Wang J, Shi TM. MicroRNA 130b enhances drug resistance in human ovarian cancer cells. Tumour Biol. 2014 Dec;35(12):12151-6.
[588] Fernandez S, Risolino M, Mandia N, Talotta F, Soini Y, Incoronato M, et al. miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer. Oncogene. 2014 Aug 25;0.
[589] Goswami S, Tarapore RS, Poenitzsch Strong AM, TeSlaa JJ, Grinblat Y, Setaluri V, et al. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mRNA is inhibited by coding region determinant-binding protein (CRD-BP). J Biol Chem. 2015 Jan 2;290(1):384-95.
[590] Takeyama H, Yamamoto H, Yamashita S, Wu X, Takahashi H, Nishimura J, et al. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer. Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):976-85.
[591] Cai H, Lin L, Cai H, Tang M, Wang Z. Combined microRNA-340 and ROCK1 mRNA profiling predicts tumor progression and prognosis in pediatric osteosarcoma. Int J Mol Sci. 2014;15(1):560-73.
[592] Guan H, Liang W, Xie Z, Li H, Liu J, Liu L, et al. Down-regulation of miR-144 promotes thyroid cancer cell invasion by targeting ZEB1 and ZEB2. Endocrine. 2014 Mar;48(2):566-74.
[593] Lu ZM, Lin YF, Jiang L, Chen LS, Luo XN, Song XH, et al. Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. Onco Targets Ther. 2014;7:525-33.
[594] Theriault BL, Basavarajappa HD, Lim H, Pajovic S, Gallie BL, Corson TW. Transcriptional and epigenetic regulation of KIF14 overexpression in ovarian cancer. PLoS One. 2014;9(3):e91540.
[595] Guo Y, Ying L, Tian Y, Yang P, Zhu Y, Wang Z, et al. miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. Febs J. 2013 Sep;280(18):4531-8.
[596] Valdes-Mora F, Clark SJ. Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. Oncogene. 2014 May 19;0.
[597] Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. J Cancer. 2013;4(5):350-7.
[598] Zhou SW, Su BB, Zhou Y, Feng YQ, Guo Y, Wang YX, et al. Aberrant miR-215 expression is associated with clinical outcome in breast cancer patients. Med Oncol. 2014 Nov;31(11):259.
[599] Khella HW, Bakhet M, Allo G, Jewett MA, Girgis AH, Latif A, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. Carcinogenesis. 2013 Oct;34(10):2231-9.
[600] Vychytilova Petra MJ, Merhautova Jana , Radova Lenka ,Svoboda Marek , Vyzula Rostislav, Slaby Ondřej MiR-215 as an important tumor suppressor in colorectal cancer patients. *Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days X*. Olomouc 2014.
[601] Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, et al. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. PLoS One. 2009;4(5):e5532.
[602] Ohyashiki K, Umezu T, Yoshizawa S, Ito Y, Ohyashiki M, Kawashima H, et al. Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. PLoS One. 2011;6(2):e16408.
[603] Tang Y, Yan W, Chen J, Luo C, Kaipia A, Shen B. Identification of novel microRNA regulatory pathways associated with heterogeneous prostate cancer. BMC systems biology. 2013;7 Suppl 3:S6.
[604] Gorlov IP, Byun J, Gorlova OY, Aparicio AM, Efstathiou E, Logothetis CJ. Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data. BMC Med Genomics. 2009;2:48.
[605] Shtivelman E, Beer TM, Evans CP. Molecular pathways and targets in prostate cancer. Oncotarget. 2014 Sep 15;5(17):7217-59.
[606] Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. Nature. 2012 Feb 16;482(7385):419-22.
[607] Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. Genes Cancer. 2013 Sep;4(9-10):342-59.

[608] Quilliam LA, Castro AF, Rogers-Graham KS, Martin CB, Der CJ, Bi C. M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6. J Biol Chem. 1999 Aug 20;274(34):23850-7.
[609] Ehrhardt GR, Leslie KB, Lee F, Wieler JS, Schrader JW. M-Ras, a widely expressed 29-kD homologue of p21 Ras: expression of a constitutively active mutant results in factor-independent growth of an interleukin-3-dependent cell line. Blood. 1999 Oct 1;94(7):2433-44.
[610] Kim R, Trubetskoy A, Suzuki T, Jenkins NA, Copeland NG, Lenz J. Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. J Virol. 2003 Feb;77(3):2056-62.
[611] Rodriguez-Viciana P, Oses-Prieto J, Burlingame A, Fried M, McCormick F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. Mol Cell. 2006 Apr 21;22(2):217-30.
[612] Young LC, Hartig N, Munoz-Alegre M, Oses-Prieto JA, Durdu S, Bender S, et al. An MRAS, SHOC2, and SCRIB complex coordinates ERK pathway activation with polarity and tumorigenic growth. Mol Cell. 2013 Dec 12;52(5):679-92.
[613] Huang S, Holzel M, Knijnenburg T, Schlicker A, Roepman P, McDermott U, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF-beta receptor signaling. Cell. 2012 Nov 21;151(5):937-50.
[614] Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Chen ST, Moretz JM, Aragon RJ, et al. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. BMC Cancer. 2010;10:562.
[615] Wallace MD, Pfefferle AD, Shen L, McNairn AJ, Cerami EG, Fallon BL, et al. Comparative oncogenomics implicates the neurofibromin 1 gene (NF1) as a breast cancer driver. Genetics. 2012 Oct;192(2):385-96.
[616] Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008 Oct 23;455(7216):1069-75.
[617] Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. Cancer J. 2014 Jan-Feb;20(1):66-72.
[618] Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. Biochem Cell Biol. 2004 Dec;82(6):658-63.
[619] Xia Y, Makris C, Su B, Li E, Yang J, Nemerow GR, et al. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5243-8.
[620] Yujiri T, Sather S, Fanger GR, Johnson GL. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. Science. 1998 Dec 4;282(5395):1911-4.
[621] Pham TT, Angus SP, Johnson GL. MAP3K1: Genomic Alterations in Cancer and Function in Promoting Cell Survival or Apoptosis. Genes Cancer. 2013 Nov;4(11-12):419-26.
[622] Abreu-Martin MT, Chari A, Palladino AA, Craft NA, Sawyers CL. Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer. Mol Cell Biol. 1999 Jul;19(7):5143-54.
[623] Harada H, Yoshida S, Nobe Y, Ezura Y, Atake T, Koguchi T, et al. Genomic structure of the human NLK (nemo-like kinase) gene and analysis of its promoter region. Gene. 2002 Feb 20;285(1-2):175-82.
[624] Yasuda J, Tsuchiya A, Yamada T, Sakamoto M, Sekiya T, Hirohashi S. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 22;308(2):227-33.
[625] Yasuda J, Yokoo H, Yamada T, Kitabayashi I, Sekiya T, Ichikawa H. Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. Cancer Sci. 2004 Jan;95(1):52-7.
[626] Huang Y, Jiang Y, Lu W, Zhang Y. Nemo-like kinase associated with proliferation and apoptosis by c-Myb degradation in breast cancer. PLoS One. 2013;8(7):e69148.
[627] Emami KH, Brown LG, Pitts TE, Sun X, Vessella RL, Corey E. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. Prostate. 2009 Oct 1;69(14):1481-92.
[628] Han Y, Kuang Y, Xue X, Guo X, Li P, Wang X, et al. NLK, a novel target of miR-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. Biomed Pharmacother. 2014 Jun;68(5):497-505.
[629] Lv L, Wan C, Chen B, Li M, Liu Y, Ni T, et al. Nemo-like kinase (NLK) inhibits the progression of NSCLC via negatively modulating WNT signaling pathway. J Cell Biochem. 2014 Jan;115(1):81-92.
[630] Cui G, Li Z, Shao B, Zhao L, Zhou Y, Lu T, et al. Clinical and biological significance of nemo-like kinase expression in glioma. J Clin Neurosci. 2011 Feb;18(2):271-5.
[631] Lau E, Ronai ZA. ATF2 - at the crossroad of nuclear and cytosolic functions. J Cell Sci. 2012 Jun 15;125(Pt 12):2815-24.
[632] Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt F, Fraile B, Onsurbe P, Paniagua R, et al. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. J Pathol. 2006 Feb;208(3):401-7.
[633] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2011;30:87.
[634] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

[635] Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. J Cell Sci. 2003 Jan 15;116(Pt 2):345-52.
[636] Kurenova E, Xu LH, Yang X, Baldwin AS, Jr., Craven RJ, Hanks SK, et al. Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. Mol Cell Biol. 2004 May;24(10):4361-71.
[637] Barber AG, Castillo-Martin M, Bonal DM, Rybicki BA, Christiano AM, Cordon-Cardo C. Characterization of desmoglein expression in the normal prostatic gland. Desmoglein 2 is an independent prognostic factor for aggressive prostate cancer. PLoS One. 2014;9(6):e98786.
[638] Johnson IR, Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Weigert R, Butler LM, Brooks DA. Altered endosome biogenesis in prostate cancer has biomarker potential. Mol Cancer Res. 2014 Dec;12(12):1851-62.
[639] Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, Rhinn M, Giner A, Habermann B, et al. The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. Cell. 2008 May 2;133(3):486-97.
[640] Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science. 1990 Jan 5;247(4938):49-56.
[641] Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, et al. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. Cancer Res. 1992 Jun 1;52(11):3099-102.
[642] Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. Cancer Res. 1992 Dec 1;52(23):6525-30.
[643] Hohne MW, Halatsch ME, Kahl GF, Weinel RJ. Frequent loss of expression of the potential tumor suppressor gene DCC in ductal pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. 1992 May 1;52(9):2616-9.
[644] Koren R, Dekel Y, Sherman E, Weissman Y, Dreznik Z, Klein B, et al. The expression of DCC protein in female breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2003 Jul;80(2):215-20.
[645] Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, Chen YQ. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. Cancer Res. 1993 Jun 15;53(12):2723-7.
[646] Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, et al. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):3416-21.
[647] Zhang C, Zhang S, Zhang Z, He J, Xu Y, Liu S. ROCK has a crucial role in regulating prostate tumor growth through interaction with c-Myc. Oncogene. 2014 Dec 4;33(49):5582-91.
[648] Surma M, Handy C, Chang J, Kapur R, Wei L, Shi J. ROCK1 deficiency enhances protective effects of antioxidants against apoptosis and cell detachment. PLoS One. 2014;9(3):e90758.
[649] Mao L, Yang C, Wang J, Li W, Wen R, Chen J, et al. SATB1 is overexpressed in metastatic prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth and invasion. J Transl Med. 2013;11:111.
[650] Wang Y, Su M, Zhou LL, Tu P, Zhang X, Jiang X, et al. Deficiency of SATB1 expression in Sezary cells causes apoptosis resistance by regulating FasL/CD95L transcription. Blood. 2011 Apr 7;117(14):3826-35.
[651] Rodriguez-Berriguete G, Sanchez-Espiridion B, Cansino JR, Olmedilla G, Martinez-Onsurbe P, Sanchez-Chapado M, et al. Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF-alpha signaling pathways in prostate cancer. Cytokine. 2013 Nov;64(2):555-63.
[652] Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature. 1991 Jul 25;352(6333):345-7.
[653] Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? Immunol Rev. 2008 Apr;222:222-41.
[654] Waring P, Mullbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. Immunol Cell Biol. 1999 Aug;77(4):312-7.
[655] Tront JS, Huang Y, Fornace AJ, Jr., Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. Cancer Res. 2010 Dec 1;70(23):9671-81.
[656] Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamanaka M, et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. Mol Cancer. 2007;6:14.
[657] Ramachandran K, Gopisetty G, Gordian E, Navarro L, Hader C, Reis IM, et al. Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target. Cancer Res. 2009 Feb 15;69(4):1527-35.
[658] Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. Oncol Rep. 2006 Mar;15(3):701-7.
[659] Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, et al. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. Int J Oncol. 2004 Nov;25(5):1337-42.
[660] Yardy GW, Brewster SF. Wnt signalling and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2005;8(2):119-26.
[661] Liu X, Liu Q, Fan Y, Wang S, Liu X, Zhu L, et al. Downregulation of PPP2R5E expression by miR-23a suppresses apoptosis to facilitate the growth of gastric cancer cells. FEBS Lett. 2014 Aug 25;588(17):3160-9.

[662] Cristobal I, Manso R, Rincon R, Carames C, Senin C, Borrero A, et al. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):938-47.
[663] Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. Mol Cancer Res. 2011 Aug;9(8):985-96.
[664] Gulzar ZG, McKenney JK, Brooks JD. Increased expression of NuSAP in recurrent prostate cancer is mediated by E2F1. Oncogene. 2012 Jan 3;32(1):70-7.
[665] Imaoka H, Toiyama Y, Saigusa S, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, et al. RacGAP1 expression, increasing tumor malignant potential, as a predictive biomarker for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. Carcinogenesis. 2015 Mar;36(3):346-54.
[666] Saigusa S, Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Shimura T, Kitajima T, et al. Clinical significance of RacGAP1 expression at the invasive front of gastric cancer. Gastric Cancer. 2015 Jan;18(1):84-92.
[667] Liang Y, Liu M, Wang P, Ding X, Cao Y. Analysis of 20 genes at chromosome band 12q13: RACGAP1 and MCRS1 overexpression in nonsmall-cell lung cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2013 Mar;52(3):305-15.
[668] Pliarchopoulou K, Kalogeras KT, Kronenwett R, Wirtz RM, Eleftheraki AG, Batistatou A, et al. Prognostic significance of RACGAP1 mRNA expression in high-risk early breast cancer: a study in primary tumors of breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. Cancer Chemother Pharmacol. 2012 Jan;71(1):245-55.
[669] Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Upregulation of Rac GTPase-activating protein 1 is significantly associated with the early recurrence of human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2011 Sep 15;17(18):6040-51.
[670] Zhang P, Bai H, Fu C, Chen F, Zeng P, Wu C, et al. RacGAP1-driven focal adhesion formation promotes melanoma transendothelial migration through mediating adherens junction disassembly. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 2.
[671] Iannetti A, Ledoux AC, Tudhope SJ, Sellier H, Zhao B, Mowla S, et al. Regulation of p53 and Rb links the alternative NF-kappaB pathway to EZH2 expression and cell senescence. PLoS Genet. 2014 Sep;10(9):e1004642.
[672] Chow A. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. Nature Education. 2010;3(9):7.
[673] Waltregny D, North B, Van Mellaert F, de Leval J, Verdin E, Castronovo V. Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells. Eur J Histochem. 2004 Jul-Sep;48(3):273-90.
[674] Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. Oncol Rep. 2007 Oct;18(4):769-74.
[675] Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, et al. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. Clin Cancer Res. 2006 Jan 15;12(2):405-10.
[676] Morais da Silva S, Moutinho-Santos T, Sunkel CE. A tumor suppressor role of the Bub3 spindle checkpoint protein after apoptosis inhibition. J Cell Biol. 2013 Apr 29;201(3):385-93.
[677] Takahashi T, Haruki N, Nomoto S, Masuda A, Saji S, Osada H, et al. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. Oncogene. 1999 Jul 29;18(30):4295-300.
[678] Fung MK, Cheung HW, Wong HL, Yuen HF, Ling MT, Chan KW, et al. MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1773(6):821-32.
[679] Sze KM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Association of MAD2 expression with mitotic checkpoint competence in hepatoma cells. J Biomed Sci. 2004 Nov-Dec;11(6):920-7.
[680] Wang X, Jin DY, Wong YC, Cheung AL, Chun AC, Lo AK, et al. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. Carcinogenesis. 2000 Dec;21(12):2293-7.
[681] Prencipe M, McGoldrick A, Perry AS, O'Grady A, Phelan S, McGrogan B, et al. MAD2 downregulation in hypoxia is independent of promoter hypermethylation. Cell Cycle. 2010 Jul 15;9(14):2856-65.
[682] Xu K, Wang X, Xue W, Wang X, Hou S. [Expressions of MAD2 and p55CDC in prostate cancer and their correlations with the prostate cancer grading]. Beijing Da Xue Xue Bao. 2003 Dec 18;35(6):586-90.
[683] Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nat Rev Cancer. 2005 Oct;5(10):773-85.
[684] Zhu X, Mao Z, Na Y, Guo Y, Wang X, Xin D. Significance of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) in prostate cancer. Anticancer Res. 2006 Mar-Apr;26(2A):1253-9.
[685] Machida YJ, Dutta A. The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. Genes Dev. 2007 Jan 15;21(2):184-94.

[686] Rhodes J, Amsterdam A, Sanda T, Moreau LA, McKenna K, Heinrichs S, et al. Emi1 maintains genomic integrity during zebrafish embryogenesis and cooperates with p53 in tumor suppression. Mol Cell Biol. 2009 Nov;29(21):5911-22.
[687] Bunney TD, Katan M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. Nat Rev Cancer. 2010 May;10(5):342-52.
[688] Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2012 Sep 1;18(17):4514-21.
[689] Sharifi N, Hurt EM, Kawasaki BT, Farrar WL. TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. Prostate. 2007 Feb 15;67(3):301-11.
[690] Bacman D, Merkel S, Croner R, Papadopoulos T, Brueckl W, Dimmler A. TGF-beta receptor 2 downregulation in tumour-associated stroma worsens prognosis and high-grade tumours show more tumour-associated macrophages and lower TGF-beta1 expression in colon carcinoma: a retrospective study. BMC Cancer. 2007;7:156.
[691] Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, et al. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):206-17.
[692] Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N. Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. Int J Cancer. 1997 May 16;71(4):573-9.
[693] Liu L, Kron KJ, Pethe VV, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, et al. Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGFbeta2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. Int J Cancer. 2011 Nov 15;129(10):2454-62.
[694] Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. Cancer Biol Ther. 2002 Sep-Oct;1(5):466-76.
[695] Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer. Differentiation. 2008 Jul;76(6):699-716.
[696] Carvalho FL, Simons BW, Eberhart CG, Berman DM. Notch signaling in prostate cancer: a moving target. Prostate. 2014 Jun;74(9):933-45.
[697] Wang XD, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, et al. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. Dev Biol. 2006 Feb 1;290(1):66-80.
[698] Belandia B, Powell SM, Garcia-Pedrero JM, Walker MM, Bevan CL, Parker MG. Hey1, a mediator of notch signaling, is an androgen receptor corepressor. Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(4):1425-36.
[699] Scorey N, Fraser SP, Patel P, Pridgeon C, Dallman MJ, Djamgoz MB. Notch signalling and voltage-gated Na+ channel activity in human prostate cancer cells: independent modulation of in vitro motility. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2006;9(4):399-406.
[700] Coppola JM, Bhojani MS, Ross BD, Rehemtulla A. A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. Neoplasia. 2008 Apr;10(4):363-70.
[701] Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Oct;3(10):753-66.
[702] Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. Mol Carcinog. 2005 Nov;44(3):151-61.
[703] Taylor NA, Van De Ven WJ, Creemers JW. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. Faseb J. 2003 Jul;17(10):1215-27.
[704] Cheng M, Watson PH, Paterson JA, Seidah N, Chretien M, Shiu RP. Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. Int J Cancer. 1997 Jun 11;71(6):966-71.
[705] Mbikay M, Sirois F, Yao J, Seidah NG, Chretien M. Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. Br J Cancer. 1997;75(10):1509-14.
[706] Bassi DE, Mahloogi H, Al-Saleem L, Lopez De Cicco R, Ridge JA, Klein-Szanto AJ. Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. Mol Carcinog. 2001 Aug;31(4):224-32.
[707] Mercapide J, Lopez De Cicco R, Bassi DE, Castresana JS, Thomas G, Klein-Szanto AJ. Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. Clin Cancer Res. 2002 Jun;8(6):1740-6.
[708] Khatib AM, Siegfried G, Chretien M, Metrakos P, Seidah NG. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. Am J Pathol. 2002 Jun;160(6):1921-35.
[709] Page RE, Klein-Szanto AJ, Litwin S, Nicolas E, Al-Jumaily R, Alexander P, et al. Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. Cell Oncol. 2007;29(4):289-99.
[710] Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. J Cell Biol. 2014 Jul 21;206(2):151-62.
[711] Abdul M, Hoosein N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. Cancer Lett. 2002 Dec 1;186(1):99-105.
[712] Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-like receptors and prostate cancer. Front Immunol. 2014;5:352.
[713] Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. Nat Rev Cancer. 2001 Oct;1(1):22-33.

[714] Henriquez-Hernandez LA, Valenciano A, Foro-Arnalot P, Alvarez-Cubero MJ, Cozar JM, Suarez-Novo JF, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes as risk factors associated to prostate cancer progression. BMC Med Genet. 2014;15(1):143.
[715] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. N Engl J Med. 2009 Oct 8;361(15):1475-85.
[716] Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, Zhang X, Smith C, Coleman I, et al. Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. Nat Commun. 2014;5:4988.
[717] Tomkinson AE, Howes TR, Wiest NE. DNA ligases as therapeutic targets. Transl Cancer Res. 2013 Jun;2(3).
[718] Abdou I, Poirier GG, Hendzel MJ, Weinfeld M. DNA ligase III acts as a DNA strand break sensor in the cellular orchestration of DNA strand break repair. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(2):875-92.
[719] Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. Elife. 2014;3.
[720] da Costa NM, Hautefeuille A, Cros MP, Melendez ME, Waters T, Swann P, et al. Transcriptional regulation of thymine DNA glycosylase (TDG) by the tumor suppressor protein p53. Cell Cycle. 2012 Dec 15;11(24):4570-8.
[721] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature. 2013 Oct 24;502(7472):472-9.
[722] Dalton SR, Bellacosa A. DNA demethylation by TDG. Epigenomics. 2012 Aug;4(4):459-67.
[723] Goto M, Shinmura K, Igarashi H, Kobayashi M, Konno H, Yamada H, et al. Altered expression of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer. Carcinogenesis. 2009 Aug;30(8):1345-52.
[724] Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. Trends Genet. 2012 Mar;28(3):128-36.
[725] Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. Cell. 2006 Dec 29;127(7):1323-34.
[726] Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature. 2007 Feb 8;445(7128):661-5.
[727] Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature. 2007 Feb 8;445(7128):656-60.
[728] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat. 2007 Jun;28(6):622-9.
[729] VanderWeele DJ, Brown CD, Taxy JB, Gillard M, Hatcher DM, Tom WR, et al. Low-grade prostate cancer diverges early from high grade and metastatic disease. Cancer Sci. 2014 Aug;105(8):1079-85.
[730] Varki Ajit KRaTB. Glycosylation Changes in Cancer In: Varki A CR, Esko JD, ed. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ediiton ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009.
[731] Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. Clin Proteomics. 2011;8(1):7.
[732] Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):331-41.
[733] Lu MH, Liao ZL, Zhao XY, Fan YH, Lin XL, Fang DC, et al. hTERT-based therapy: a universal anticancer approach (Review). Oncol Rep. 2012 Dec;28(6):1945-52.
[734] Lu MH, Deng JQ, Cao YL, Fang DC, Zhang Y, Yang SM. Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis. Exp Ther Med. 2012 Apr;3(4):728-34.
[735] Zhou J, Ding D, Wang M, Cong YS. Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. BMB Rep. 2014 Jan;47(1):8-14.
[736] Gasinska A, Luczynska E, Wilk W, Cichocka A. Differences in the expression of telomerase and prostate-specific membrane antigen in non-advanced prostatic cancer. Folia Histochem Cytobiol. 2013;51(1):66-72.
[737] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. J Cell Sci. 2008 Apr 1;121(Pt 7):1046-53.
[738] Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. Bioessays. 2008 Aug;30(8):728-32.
[739] Kanzawa T, Komata T, Kyo S, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Down-regulation of telomerase activity in malignant glioma cells by p27KIP1. Int J Oncol. 2003 Dec;23(6):1703-8.
[740] Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, Dubos S, Tsougos I, Theodorou K, et al. The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells. Int J Oncol. 2009 Nov;35(5):1141-9.
[741] Meeran SM, Patel SN, Chan TH, Tollefsbol TO. A novel prodrug of epigallocatechin-3-gallate: differential epigenetic hTERT repression in human breast cancer cells. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Aug;4(8):1243-54.
[742] Moehren U, Papaioannou M, Reeb CA, Grasselli A, Nanni S, Asim M, et al. Wild-type but not mutant androgen receptor inhibits expression of the hTERT telomerase subunit: a novel role of AR mutation for prostate cancer development. Faseb J. 2008 Apr;22(4):1258-67.

[743] Hrdlickova R, Nehyba J, Bargmann W, Bose HR, Jr. Multiple tumor suppressor microRNAs regulate telomerase and TCF7, an important transcriptional regulator of the Wnt pathway. PLoS One. 2014;9(2):e86990.
[744] Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer. 2004 Dec;11(4):689-708.
[745] Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. Breast Cancer. 2007;14(2):132-49.
[746] Lichtner RB. Estrogen/EGF receptor interactions in breast cancer: rationale for new therapeutic combination strategies. Biomed Pharmacother. 2003 Dec;57(10):447-51.
[747] Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1766(1):120-39.
[748] Xiong X, Chorzalska A, Dubielecka PM, White JR, Vedvyas Y, Hedvat CV, et al. Disruption of Abi1/Hssh3bp1 expression induces prostatic intraepithelial neoplasia in the conditional Abi1/Hssh3bp1 KO mice. Oncogenesis. 2012;1:e26.
[749] Fromont G, Vallancien G, Validire P, Levillain P, Cussenot O. BCAR1 expression in prostate cancer: association with 16q23 LOH status, tumor progression and EGFR/KAI1 staining. Prostate. 2007 Feb 15;67(3):268-73.
[750] Fromont G, Rozet F, Cathelineau X, Ouzzane A, Doucet L, Fournier G, et al. BCAR1 expression improves prediction of biochemical reccurence after radical prostatectomy. Prostate. 2012 Sep 1;72(12):1359-65.
[751] Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. Oncogene. 2001 Dec 20;20(58):8326-33.
[752] Carey JP, Asirvatham AJ, Galm O, Ghogomu TA, Chaudhary J. Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer. BMC Cancer. 2009;9:173.
[753] Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, et al. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. Nat Genet. 2005 Mar;37(3):265-74.
[754] Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, et al. Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. BMC Cancer. 2008;8:154.
[755] Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS. Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. Clin Cancer Res. 2004 Nov 15;10(22):7475-83.
[756] Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, et al. Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. Oncogene. 2003 Oct 9;22(44):6946-53.
[757] Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA. Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. Mol Cancer. 2005;4(1):16.
[758] Shan L, Yu M, Qiu C, Snyderwine EG. Id4 regulates mammary epithelial cell growth and differentiation and is overexpressed in rat mammary gland carcinomas. Am J Pathol. 2003 Dec;163(6):2495-502.
[759] Bellido M, Aventin A, Lasa A, Estivill C, Carnicer MJ, Pons C, et al. Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2003 Sep;88(9):994-1001.
[760] Russell LJ, Akasaka T, Majid A, Sugimoto KJ, Loraine Karran E, Nagel I, et al. t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Blood. 2008 Jan 1;111(1):387-91.
[761] Sharma P, Chinaranagari S, Patel D, Carey J, Chaudhary J. Epigenetic inactivation of inhibitor of differentiation 4 (Id4) correlates with prostate cancer. Cancer Med. 2012 Oct;1(2):176-86.
[762] Li W, Tai Y, Zhou J, Gu W, Bai Z, Zhou T, et al. Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. Cell Cycle. 2012 Jun 15;11(12):2348-58.
[763] Yang Y, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bornman DM, Gabrielson EW, et al. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. Exp Cell Res. 2003 Jan 15;282(2):132-7.
[764] Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, et al. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. Cancer Res. 2004 Mar 15;64(6):2212-21.
[765] Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, et al. Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. Eur J Cancer. 2005 Jun;41(9):1316-22.
[766] Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2011 Mar;140(3):1071-83.
[767] Sun Y, He W, Luo M, Zhou Y, Chang G, Ren W, et al. SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. Tumour Biol. 2015 Jan 15.

[768] Nambiar DK, Deep G, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits aberrant lipid metabolism, proliferation and emergence of androgen-independence in prostate cancer cells via primarily targeting the sterol response element binding protein 1. Oncotarget. 2014 Oct 30;5(20):10017-33.
[769] Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. Biochim Biophys Acta. 2013 Oct;1831(10):1518-32.
[770] Kanteti R, Nallasura V, Loganathan S, Tretiakova M, Kroll T, Krishnaswamy S, et al. PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. Lab Invest. 2009 Mar;89(3):301-14.
[771] Denk D, Bradtke J, Konig M, Strehl S. PAX5 fusion genes in t(7;9)(q11.2;p13) leukemia: a case report and review of the literature. Mol Cytogenet. 2014;7(1):13.
[772] Norhany S, Kouzu Y, Uzawa K, Hayama M, Higo M, Koike H, et al. Overexpression of PAX5 in oral carcinogenesis. Oncol Rep. 2006 Nov;16(5):1003-8.
[773] Ellsworth RE, Seebach J, Field LA, Heckman C, Kane J, Hooke JA, et al. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. Clin Exp Metastasis. 2009;26(3):205-13.
[774] Agostinelli C, Sabattini E, Gjorret JO, Righi S, Rossi M, Mancini M, et al. Characterization of a new monoclonal antibody against PAX5/BASP in 1525 paraffin-embedded human and animal tissue samples. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010 Dec;18(6):561-72.
[775] Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. 2013 Nov;12(11):829-46.
[776] Zhang F, Du G. Dysregulated lipid metabolism in cancer. World J Biol Chem. 2012 Aug 26;3(8):167-74.
[777] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 2008 Jan;7(1):11-20.
[778] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Cancer. 2008 Jul;8(7):497-511.
[779] Arnold RS, Sun CQ, Richards JC, Grigoriev G, Coleman IM, Nelson PS, et al. Mitochondrial DNA mutation stimulates prostate cancer growth in bone stromal environment. Prostate. 2009 Jan 1;69(1):1-11.
[780] Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. Mol Cancer. 2006;5:17.
[781] Nelson PS. Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. J Urol. 2004 Nov;172(5 Pt 2):S28-32; discussion S3.
[782] Marie SK, Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. Clinics (Sao Paulo). 2011;66 Suppl 1:33-43.
[783] Liu Q, Harvey CT, Geng H, Xue C, Chen V, Beer TM, et al. Malate dehydrogenase 2 confers docetaxel resistance via regulations of JNK signaling and oxidative metabolism. Prostate. 2013 Jul;73(10):1028-37.
[784] Dayem AA, Choi HY, Kim JH, Cho SG. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. Cancers (Basel). 2010;2(2):859-84.
[785] Garrett SH, Sens MA, Shukla D, Flores L, Somji S, Todd JH, et al. Metallothionein isoform 1 and 2 gene expression in the human prostate: downregulation of MT-1X in advanced prostate cancer. Prostate. 2000 May 1;43(2):125-35.
[786] Barbier O, Belanger A. Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferases in the human prostate. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008 Apr;22(2):259-70.
[787] Shen P, Sun J, Xu G, Zhang L, Yang Z, Xia S, et al. KLF9, a transcription factor induced in flutamide-caused cell apoptosis, inhibits AKT activation and suppresses tumor growth of prostate cancer cells. Prostate. 2014 Jun;74(9):946-58.
[788] Kundu J, Wahab SM, Kundu JK, Choi YL, Erkin OC, Lee HS, et al. Tob1 induces apoptosis and inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by activating Smad4 and inhibiting betacatenin signaling. Int J Oncol. 2012 Sep;41(3):839-48.
[789] Shi Y, Luo S, Peng J, Huang C, Tan D, Hu W. The structure, expression and function prediction of DAZAP2, a down-regulated gene in multiple myeloma. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2004 Feb;2(1):47-54.
[790] Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, et al. RUNX1, an androgen- and EZH2-regulated gene, has differential roles in AR-dependent and -independent prostate cancer. Oncotarget. 2015 Feb 10;6(4):2263-76.
[791] Latil A, Chene L, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O. Extensive analysis of the 13q14 region in human prostate tumors: DNA analysis and quantitative expression of genes lying in the interval of deletion. Prostate. 2003 Sep 15;57(1):39-50.
[792] Chiang YT, Wang K, Fazli L, Qi RZ, Gleave ME, Collins CC, et al. GATA2 as a potential metastasis-driving gene in prostate cancer. Oncotarget. 2014 Jan 30;5(2):451-61.
[793] Sakamoto S, McCann RO, Dhir R, Kyprianou N. Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. Cancer Res. 2010 Mar 1;70(5):1885-95.
[794] Cowling VH. Enhanced mRNA cap methylation increases cyclin D1 expression and promotes cell transformation. Oncogene. 2010 Feb 11;29(6):930-6.

[795] Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, Muto T, Miyaguchi K, Mogushi K, et al. Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberrations and gene expression data. Cancer Inform. 2010;9:147-61.

Използвани електронни източници:

E1. http://www.psa-rising.com/prostatecancer/prostate.htm
E2. www.ustoo.org
E3. http://www.psa-rising.com/prostatecancer/prostate.htm
E4. http://www.prostate-cancer-institute.org/about-prostate-cancer/prostate-anatomy.html,
E5. http://men.webmd.com/human-anatomy-the-prostate
E6. http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/ProstateOverviewID5041.html
E7.http://www.cancer.gov.beckerproxy.wustl.edu/cancertopics/factsheet/detection/PSA.
E8. http://healthguide.howstuffworks.com/prostate-cancer-in-depth2.htm
E9. www.cancerinfo.tri-kobe.org
E10.http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.5802027/k.D271/Prostate_Cancer_Risk_Factors.htm;
E11.http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-risk-factors
E12. www.genome.gov/gwastudies/
E13. http://www.academia.edu/340306/Gene_Copy_Number_Alterations_In_Prostate_Cancer;
E14. http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/ProstateOverviewID5041.html
E15. http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org_hsa
E16. http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
E17. http://www.umm.uni-heidelberg.de
E18.http://string-db.org
E19. http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
E20. http://www.proteinatlas.org

9. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ

9.1. Публикации в списания

1. **Kachakova D**, Mitkova A, Popov E, Beltcheva O, Vlahova A, Dikov T, Hristova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R. Evaluation of the clinical value of the newly identified urine biomarker HIST1H4K for diagnosis and prognosis of prostate cancer in Bulgarian patients. J BUON. 2013 Jul-Sep;18(3):660-8. **IF=0.706**
2. **Kachakova D**, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R. Combinations of Serum Prostate-Specific Antigen and Plasma Expression Levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as Potential Better Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer. DNA Cell Biol. 2014 Dec 18. [Epub ahead of print], **IF=1.991**
3. **Д. Качакова**, А. Миткова, Радка Кънева, Ваньо Митев. Ракът на простатата-генетично, геномно и епигенетично заболяване. Биоамаркери. Studia Oncologica,Октомври 2014

9.2. Участия в конгреси и конференции свързани с темата на дисертацията

1. Kaneva Radka, **Kachakova Darina**, Mitkova Atanaska, Popov Elenko, Vlahova Aleksandrina, Dikov Tihomir, Christova Svetlana, Kremensky Ivo, Mitev Vanio, and Slavov Chavdar, "*CYP1B1* polymorphic variants associated with prostate cancer risk in Bulgaria", Poster presentation. European Human Genetics Conference , 23 – 26 May 2009 Vienna, Austria. /vol. 17, supplement 2, P06.072, p. 182/
2. **Kachakova Darina**, Mitkova Atanaska, Popov Elenko, Vlahova Aleksandrina, Dikov Tihomir, Christova Svetlana, Kremensky Ivo, Mitev Vanio, Kaneva Radka, and Slavov Chavdar , "Association of *SRD5A2* polymorphic variants with prostate cancer risk in Bulgaria", Poster presentation. 8th Balkan Meeting on Human Genetics, 14 – 17 May 2009 Cavtat, Croatia
3. Slavov Ch, **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Kremensky I, Mitev V, and Kaneva R. Role of genetic polymorphism in SRD5A2 gene in progression of prostate cancer. 30th Congress of the Societe Internacionale d'Urologie, November 1-5, 2009, Shanghai, China
4. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Association study of polymorphic variants in chromosome locus 8q24 linked with prostate cancer in Bulgarian patients", 21-st Meeting of the European Association of Cancer Research, 26-29 June 2010, Oslo, Norway, /volume 8, number 5, 873, p.220
5. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Polymorphic variants in *CYP1B1* linked with increased risk for prostate cancer in Bulgarian patients", The European Human Genetics Conference, 12-15 June 2010, Gothenburg, Sweden, /vol. 18, supplement 1, P06.135, p. 189-190
6. Popov E, **Kachakova D**, Boyadjieva M, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Kremensky I, Slavov Ch, Mitev V, Kaneva R, "Role of genetic polymorphism in SRD5A2 gene in progression of prostate cancer", IX International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 13-16 may, 2010, /vol. LXII, supplement to issue 1/2010, ICMS 2010/PP 22 Preclinic, p. 65/
7. Popov E, **Kachakova D**, Mitkova A, Kaneva R, Vlahova A, Dikov T, Slavov C, Mitev V, Kremensky I, "Prostate cancer risk association with SNP polymorphic variants of CYP1B1 gene in the Bulgarian population", 25th Anniversary EAU (European Association of

Urology) Congress, Barcelona, Spain, 16-20 April 2010, /vol. 9, issue 2, ISSN 1569-905, 748, p. 242/

8. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Dodova R, Vlahova A, Dikov T , Christova S, Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "Association analysis in Bulgarian prostate cancer patients adds support to a newly identified susceptibility locus on chromosomo 8q24", The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands, /vol. 19, supplement 2, P06.181, p. 231
9. Vlahova A, Dikov T , Christova S, **Kachakova D**, Mitkova A, Genadieva M, Popov E , Slavov C, Mitev V and Kaneva R, "AMACR polymorphic variant rs3195676 and prostate cancer aggressiveness in Bulgarian patients", 23rd European Congress of Pathology, 27 August- 1 September 2011, Helsinki, Finland, Virhows archive, The European Journal of Pathology, Vol 459,Supplement 1, p. S294
10. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Beltcheva O, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Promoter hypermethylation of HIST1H4K and RASSF2 in urine from prostate cancer patients", European Association for Cancer Research conference, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain, /vol.48, supplement 5, 520, p. S123-124
11. **Качакова Д**. Генетични и епигенетични промени при рака на простатата. Национален симпозиум „Акад. Чудомир Начев"; 06-07 юни 2012; София, България; устна презентация
12. Slavov C, **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Association analysis of rs 2567206 polymorphism in promoter region of CYP1B1 with the risk for development prostate cancer in Bulgarian patients", 32nd Congress of the Societe Internationale d'Urologie, September 30- October 4, 2012, Fukuoka, Japan, Urology 80, supplement 3A, EP309, p.S296
13. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A,. Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R;"Association analysis of polymorphisms in candidate genes on 11p15 locus with prostate cancer in Bulgarian patients**",** The European Human Genetics Conference, 8-11 June 2013, Paris, France, /vol. 21, supplement 2, P11.216, p. 316
14. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A,. Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, Genetic and epigenetic changes in prostate cancer. The search of diagnostic and prognostic biomarkers. XI-th Intrenational Medical Science Conference for students and young doctors, 16-19 october 2013, Medical University- Pleven, Bulgaria, p 15, lectur
15. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A,. Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "Analysis of GSTP1 promoter hypermethylation in urine samples of Bulgarian prostate cancer patients and controls", The European Human Genetics Conference, 31 May-3 June, 2014, Milan, Italy, Vol. 22, supplement 1, P16.67-S, p. 318
16. **Kachakova D**, Popov E, Mitkova A, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Slavov C, Mitev V, Kaneva R, "miR-141 and miR-375 expression in plasma samples from Bulgarian prostate cancer patients and controls", European Association for Cancer Research conference, 5-8 July 2014, Munich, Germany, Vol. 50, supplement 5, 397, p. S95
17. **Д. Качакова,** д-р А.Влахова; Молекулни биомаркери при рак на простатата; Първа Национална Конференция „Молекулярна патология в онкологията"; София, България; 06-07 юни 2014; устна презентация

9.3. Участие в проекти свързани с темата на дисертацията

1. 2009-2012г. - Проучване на генетични варианти свързани с повишен риск и търсене на диагностични, прогностични и експресионни маркери при рака на простатата, МОН
2. 2010-2011г. - Изследване на промоторно хиперметилиране на биомакери в урина, асоциирани с рака на простатата и оценяване на тяхната диагностична стойност при български пациенти, МУ-София
3. 2011-2012г. - Асоциативно проучване на полиморфни варианти, разположени в хромозомен локус 11p15 и оценяване на тяхната значимост за развитието на рака на простатата, МУ-София (докторантски проект)
4. 2012-2013г. - Експресионно профилиране на miRNAs в простатни тъкани и плазма при български пациенти, МУ-София (докторантски проект)
5. 2013-2014г. - miRNAs експресионно профилиране в плазма и урина от пациенти с рак на простатата, МУ-София (докторантски проект)
6. 2012-2014г. - Експресионно профилиране на miRNAs при рак на простатата и подбор на диагностични и прогностични биомаркери, МОН