

**Universitat Autònoma de Barcelona**  
**Facultat de Biociències**  
**Departament de Biologia Cel·lular**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Estudi de les alteracions moleculars en els gens reguladors del cicle cel·lular *KLF6* i *TP53*, de les vies de transducció PI3K-AKT i RAS-MAPK, i identificació de nous gens amb potencial valor pronòstic en càncer de pròstata**

Memòria presentada per  
LAIA AGELL i CODINA  
Per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Josep Lloreta Trull i la Dra. Silvia Hernández Llodrà al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar dins del Grup de Recerca en Càncer Urològic

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Vist i plau dels codirectors de tesi:

Dr. Josep Lloreta

Dra. Silvia Hernández



A en Pau i a la mare  
que han lluitat i lluiten  
contra el càncer



## AGRAÏMENTS

Gràcies. Aquest és el sentiment que tinc després d'haver estat fent la tesi durant aquests anys. Moltíssimes gràcies a tothom qui m'ha ajudat, m'ha suggerit, m'ha deixat o m'ha explicat alguna cosa en algun moment o altre de la tesi. Moltíssimes gràcies perquè si he arribat fins aquí ha estat perquè he tingut molta gent al meu voltant que ha aportat el seu granet de sorra o en algun cas més aviat han aportat una pedra! Gràcies a tothom, de veritat! Gràcies a tothom amb qui he compartit algun moment o altre del món de la tesi.

En primer lloc gràcies al Pep i a la Silvia. No tinc paraules per agrair tot el que heu fet per mi. Gràcies per acollir-me tan bé, per ajudar-me, per animar-me i sobretot per confiar en mi. I gràcies no només per les coses laborals sinó també per tota l'ajuda i consells extralaborals.

Gràcies al Dr. Serrano per la seva ajuda i suport durant la meva estada dins del servei d'Anatomia Patològica que dirigeix.

Gràcies al Dr. Gelabert que em va oferir la possibilitat d'entrar a treballar en el grup d'investigació de càncer de pròstata. I gràcies també a tots els membres del grup de recerca en càncer urològic, gràcies a la Núria, a la Silvia, a la Marta Salido, a la Marta Lorenzo i al José Antonio Lorente. I gràcies a tota aquella gent que en algun moment o altre han passat pel grup.

Gràcies també a tota la gent de Biologia Molecular i Citogenètica que han estat la meva salvació en molts moments de dubte i que han tingut la paciència d'explicar-me molts protocols. I que sobretot, sobretot m'han deixat un raconet del seu laboratori per treballar. Una de les coses més preuades en el servei!

I en definitiva, gràcies a tothom amb qui he compartit en algun moment o altre despatx, ordinador, pipetes, temps de centrífuga, dinars de tupper, berenars, partits de volei, entregues de paquets, converses, contaminacions, ... gràcies per ser el meu dia a dia i contribuir en aquesta tesi. I gràcies també per pensar en mi i convidar-me a les sortides a la muntanya i per deixar-me formar part dels Subterràneos.

Gràcies a la Fundació IMIM per l'ajuda de l'enquadernació de la tesi.

I gràcies també a tota aquella gent que he tingut més aprop durant aquests anys de tesi. Gràcies Eli per acollir-nos tan bé durant aquell estiu que vam estar en el teu laboratori. Gràcies per fer que aquells dies fossin com estar en un "casal" on vam aprendre molt i ens ho vam passar molt bé. Gràcies pel teu caràcter vital i gràcies per ensenyar-me que hi ha una altra manera diferent de fer ciència.

Gràcies Núria, Isa i Gonzalo. Gràcies per compartir amb mi des d'aquell estiu d'inundacions a Praga molts més moments. Merci per estar al meu costat i animar-me en els moments més difícils.

Gràcies Gemma per deixar-me que pedalés al teu costat durant uns quants quilòmetres i gràcies també a la resta de Guerreres! Gràcies pels partits de volei, per les caminades i pels riures en general. M'heu donat molta alegria!

Gràcies Lúdia i Mercè, gràcies per tots els viatges que hem fet durant aquests estius de tesi i gràcies per les caminades de durant l'any que m'han servit per esbargir-me i distreure'm.

Moltíssimes gràcies als monitors de la Biciescola del BACC. Gràcies Anna, gràcies Laia, gràcies Eduard i gràcies Marc. Gràcies per les vostres sàbies i màgiques lliçons. De cada un de vosaltres he après coses genials. Coses que m'han servit dins i fora de la Biciescola. Gràcies pels consells, pels favors, per les reflexions i per fer el burro dalt d'una bicicleta. I moltes gràcies també a tots els alumnes de la Biciescola, que m'heu ensenyat que hi ha coses que s'aconsegueixen només si es té molta perseverança!!!

Gràcies Guillem, gràcies pel teu caràcter i pels teus consells en els moments claus. Encara que ens veiem poc sé que puc comptar amb tu per qualsevol cosa i en qualsevol moment. Gràcies per ser-hi!

Gràcies Marta, gràcies per tot! Gràcies per animar-me i escoltar-me. Gràcies per ser la meua companya de cistella. Però sobretot gràcies per estar tan present a la meua vida. Gràcies per deixar que t'expliqui les coses que em preocupen, les que m'agraden, les que em passen i les que m'han passat. I gràcies per fer amb mi el mateix!

Gràcies Anna, gràcies per ser-hi sempre. Passi el que em passi, sigui greu o banal, sigui urgent o no sempre hi ets, per animar-me, per aclarir-me i per escoltar-me. Gràcies perquè sempre tens alguna cosa a dir-me i sempre tens un raonament i un punt de vista nou que a mi no se m'havia acudit. Gràcies pels sopars, pels viatges, per la convivència, ... En resum, gràcies per fer-me de germana!

I moltes gràcies a la meua família que encara que no han acabat d'entendre massa ni què és la tesi ni de què va ni perquè la pròstata i no una altra cosa, sempre han tingut l'interès de preguntar i escoltar-me.

Gràcies a la Maria per fer-ho tot tan fàcil i ajudar-me en tot moment. Gràcies per tot el que m'estàs ensenyant.

I gràcies als meus pares que tampoc han acabat d'entendre massa de què va això d'una tesi ("què és el DEA?, però quan faràs la tesi?, i ja tens la tesi?") però han entès que era alguna cosa molt important per mi i que m'havien de recolzar. Gràcies per tot el que m'heu donat i si he arribat fins aquí és gràcies a vosaltres. Gràcies per ser tan lluitadors!

Moltíssimes gràcies a tothom

Els treballs presentats en aquesta tesi han estat finançats a través de les següents ajudes:

1. Beca predoctoral dins del Programa d'ajuts per a la contractació de personal investigador novell (FI) de la Generalitat de Catalunya (FI2009-2011)
2. FIS/Instituto Carlos III/FEDER PS06/008
3. FIS/Instituto Carlos III/FEDER PS09/01106
4. Beca de l'Associació Espanyola contra el Càncer 2006-2007
5. Beca de l'Associació Espanyola contra el Càncer 2008-2009

Aquests treballs han generat les següents publicacions:

1. **L.Agell**, S.Hernández, S. de Muga, J.A. Lorente, N. Juanpere, R.Esgueva, S.Serrano, A.Gelabert and J.Lloreta. *KLF6* and *TP53* mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations. *Mod Pathol.* 2008 Dec;21(12):1470-8.
2. **L. Agell**, S. Hernández, M. Salido, S.de Muga, N. Juanpere, M. Arumí-Uria, S. Menendez, M. Lorenzo, JA. Lorente, S. Serrano, and J.Lloreta. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* and *AKT1* mutations are and infrequent event. *Mod Pathol.* 2011 Mar;24(3):443-52.





---

---

## ÍNDEX

---

---



Abreviatures	1
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>3</b>
1.1. Anatomia i histologia de la pròstata	5
1.2. Epidemiologia del càncer de pròstata	10
1.3. Etiologia del càncer de pròstata	11
1.3.1. Edat	12
1.3.2. Factors ambientals i alimentaris	12
1.3.3. Herència genètica	13
1.3.4. Andrògens	14
1.4. Diagnòstic del càncer de pròstata	14
1.4.1. Antigen prostàtic específic (PSA)	15
1.5. Història natural del càncer de pròstata	16
1.5.1. Lessions precursors. Neoplasia intraepitelial prostàtica (PIN)	16
1.5.2. Histologia i grau histològic del càncer de pròstata	19
1.5.3. Varietats clínico-patològiques de càncer prostàtic	23
1.5.4. Progressió del càncer de pròstata. Metàstasi	23
1.6. Gens implicats en el càncer de pròstata	24
1.6.1. Alteracions en gens del cicle cel·lular i resposta al dany a l'ADN	26
1.6.1.1. <i>KLF6</i>	26
1.6.1.2. Alteracions descrites de <i>KLF6</i>	27
1.6.1.3. <i>TP53</i> i <i>MDM2</i>	29
1.6.1.4. Alteracions descrites de <i>TP53</i>	32
1.6.1.5. Alteracions descrites de <i>MDM2</i>	36
1.6.2. Alteracions en gens de les vies de transducció de senyal PI3K-AKT i RAS- MAPK	36
1.6.2.1. Via de PI3K-AKT	36
1.6.2.2. Alteracions descrites de <i>PIK3CA</i>	39
1.6.2.3. Alteracions descrites de <i>PTEN</i>	39
1.6.2.4. Alteracions descrites d' <i>AKT</i>	40
1.6.2.5. Família RAS i RAF	41
1.6.2.6. Alteracions descrites de <i>KRAS</i>	41
1.6.2.7. Alteracions descrites de <i>BRAF</i>	41
1.6.3. Altres gens freqüentment alterats en càncer de pròstata	42
1.6.3.1. <i>GSTP1</i>	42
1.6.3.2. <i>NKX3.1</i>	43
1.6.3.3. <i>AMACR</i>	43
1.6.3.4. <i>TMPRSS2</i>	44
1.7. Perfils d'expressió genètica del càncer de pròstata (Gene expression arrays)	46
1.7.1. Tipus de microarrays	47
1.7.2. Estudis d'arrays en càncer de pròstata	51
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>55</b>
2.1. Objectiu general	57
2.2. Objectius desglossats	57

3. RESULTATS	59
3.1. Article 1: <i>KLF6</i> and <i>TP53</i> mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations. Mod Pathol. 2008;21(12):1470-8	63
3.2. Article 2: PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but <i>PIK3CA</i> , <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> and <i>AKT1</i> mutations are and infrequent event. Mod Pathol. 2011 Mar;24(3):443-52. Epub 2010 Nov 26	75
3.3. Article 3: A 12-gene expression signature is associated with aggressive histology in prostate cancer. <i>SEC14L1</i> and <i>TCEB1</i> genes are potential markers of progression	87
4. DISCUSSIÓ	89
5. CONCLUSIONS	109
6. BIBLIOGRAFIA	113
7. ANNEXOS	147
7.1. Annex 1. Supplementary table article 1	149
7.2. Annex 2. Taula amb el total de casos analitzats en els articles 1 i 2	153
7.3. Annex 3. Article 3	161

**NOTA: Les imatges i les taules corresponents a l'article 3 estan incloses només en el CD adjunt a la tesi**

## LLISTA D'ABREVIACIONS

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
AP-site	Lloc apurínic/apirimídinic
AR	Receptor d'andrògens
ARN	Àcid ribonucleic
CDK	Quinasa dependent de ciclins
cADN	Àcid desoxiribonucleic complementari
CGH	de l'anglès <i>Comparative genomic hybridization</i>
COPEB	de l'anglès <i>Core promoter element-binding protein</i>
CZ	Zona central de la pròstata
DHT	Alfa-dihidrotestosterona
E	Àcid glutàmic
EGFR	de l'anglès <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ET	Ecografia transrectal
F	Fenilalanina
FFPE	Teixit fixat en formol i inclòs en parafina
FISH	de l'anglès <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FM	Estroma fibromuscular
G	Guanina
GSTP1	Glutació S-transferasa Pi
GP	Glàndula prostàtica
HBP	Hiperplàsia benigna de pròstata
IARC	de l'anglès <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IHQ	Immunohistoquímica
H	Histidina
K	Lisina
KLF6	de l'anglès <i>Krüppel-like factor</i>
L	Leucina
LOH	Pèrdua d'heterozigositat

MDM2	de l'anglès <i>Mouse double minute 2</i>
NKX3.1	NK3 transcription factor related focus 1
OMIM	de l'anglès <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	Prolina
pAKT	Proteïna AKT fosforilada
PB	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PTEN	de l'anglès <i>Phosphatase and tenisn homologue</i>
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,,5-b]pyridine
PIN	Neoplàsia intraepitelial prostàtica
PI3K	de l'anglès <i>Fosfatidilinositol 3-kinasa</i>
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat
PH	de l'anglès <i>Domini Pleckstrin Homology</i>
PKB	Proteïna quinasa B
PSA	Antigen prostàtic específic
PZ	Zona perifèrica de la pròstata
R	Arginina
Rb	Retinoblastoma
RMN	Ressonància magnètica nuclear
qRT-PCR	RealTime-PCR quantitativa
RTKs	Receptors tirosina quinasa
SSCP	de l'anglès <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
T	Timina
TAC	Tomografia axial computeritzada
TNM	Classificació Tumor-Node-Metastasis
TP53	<i>de l'anglès Tumor protein 53</i>
TR	Tacte rectal
TZ	Zona de transició de la pròstata
V	Valina
WT	de l'anglès <i>Wild type</i>

---

---

## **1. INTRODUCCIÓ**

---

---

**BIGTAN:** Apoteòtic!

Aquest mot exòtic  
em torna neuròtic,  
prostàtic, cianòtic,  
elefantiàtic,  
penibètic, tític  
i àdhuc apoplectic  
i arterioscleròtic.

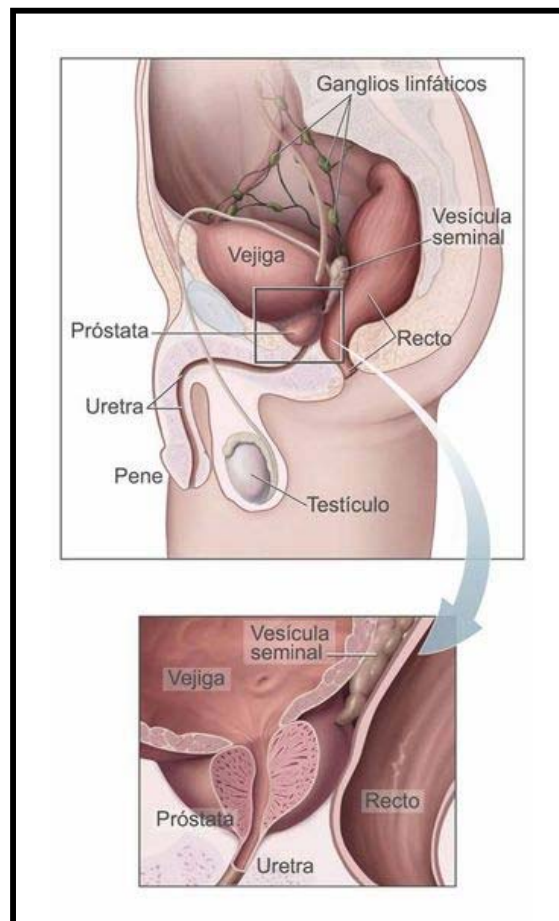
Primera història d'Esther  
Salvador Espriu





### 1.1. Anatomia i histologia de la pròstata

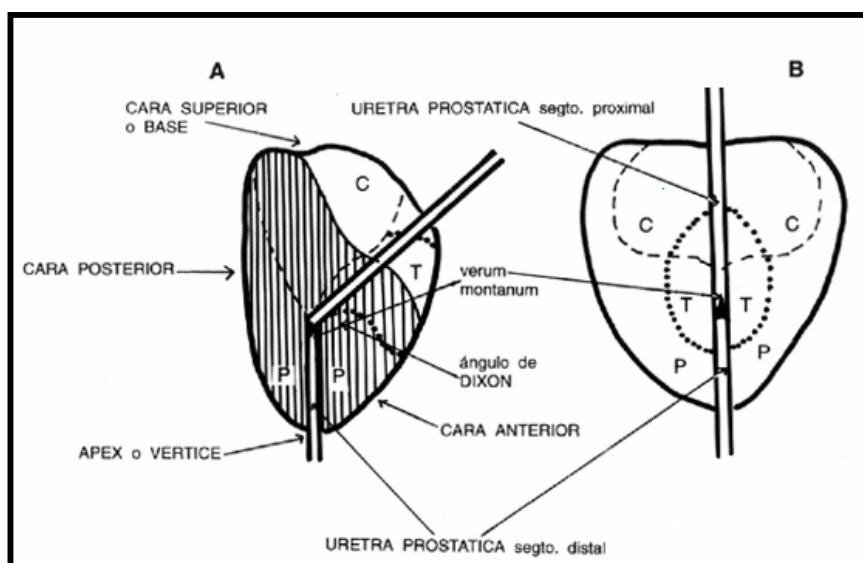
La pròstata és un òrgan glandular de la mida d'una castanya (de 25 a 45 cm<sup>3</sup>) que en condicions normals pesa aproximadament 20g. Està localitzada entre la bufeta urinària i el recte i la uretra la travessa longitudinalment [Figura 1]. És per això que la major part de creixements en aquest òrgan es tradueixen freqüentment en una obstrucció urinària. La funció de la pròstata és elaborar part de les secrecions que formen el semen, sense les quals els espermatozoides no podrien subsistir, ja que proporcionen els elements nutritius i altres substàncies que necessiten per mantenir la seva activitat.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Localització de la glàndula prostàtica. Extret de la pàgina web del National Cancer

Institute: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov).

Des del punt de vista anatòmic, en la pròstata podem diferenciar 3 zones: la **zona perifèrica** (PZ), la **central** (CZ) i la de **transició** (TZ) [Figura 2 i 3]. La PZ és la subunitat anatòmica més gran i és on es localitza el 70% del teixit glandular. És en aquesta regió on sol desenvolupar-se el carcinoma de pròstata. La CZ conté la resta de teixit glandular de la pròstata, aproximadament un 25%, i envolta els conductes ejaculadors. La TZ correspon al 5% restant de la pròstata i és la regió on, principalment, s'origina la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP).<sup>2</sup>



**Figura 2.** Esquema de les zones de la pròstata. A) Esquema d'un tall sagital i B) Esquema d'un tall coronari de la pròstata on es pot veure la zona central (C), la zona de transició (T) i zona perifèrica (P). Extret de la pàgina web: <http://escuela.med.puc.cl>.

Des del punt de vista histològic, la glàndula prostàtica està formada per un component **glandular** i un de **no glandular** [Figura 4]. El component glandular (*gp*) conté àcins i conductes prostàtics, formats per dos compartiments histològicament definits, el basal i el secretor, on trobem tres tipus diferents de cèl·lules [Figura 5 i 6]. El primer tipus són les **cèl·lules secretores o luminals**, són les més abundants, i són androgen-dependents. Aquestes cèl·lules es disposen en una sola capa i s'encarreguen de produir la secreció prostàtica. El segon tipus de **cèl·lules** són les **basals**, les quals formen una capa contínua de

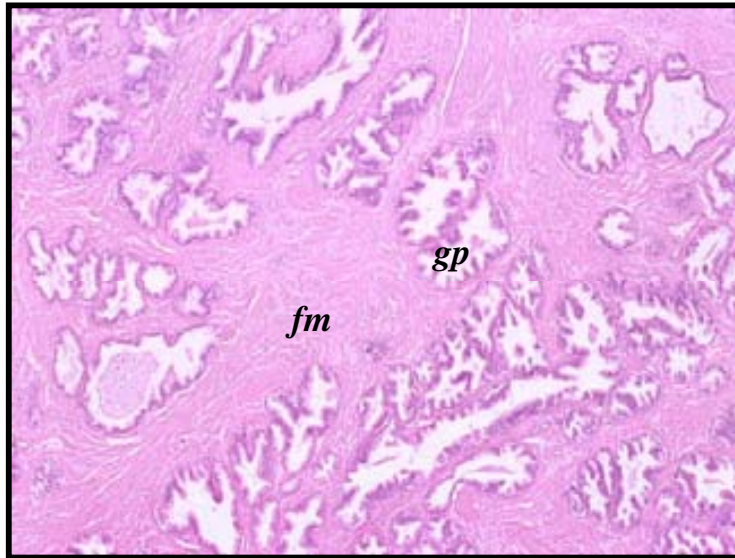
cèl·lules indiferenciades per sota de les cèl·lules luminals. És en aquesta capa on es troba el component de cèl·lules mare que donen lloc a les cèl·lules luminals. Les cèl·lules basals expressen uns nivells baixos del receptor d'androgen (AR) i no contribuïen a la secreció prostàtica. Finalment el tercer tipus són les **cèl·lules neuroendocrines**, són les menys abundants de totes, i tenen un origen embriològic desconegut, tot i que també es creu que s'originen en el compartiment de cèl·lules basals. Morfològicament són molt similars a les cèl·lules basals i es sospita que produeixen senyals paracrins que donen suport al creixement de les cèl·lules luminals.<sup>3</sup> Aquest component glandular està submergit en una matriu tissular d'estroma, formada per una barreja de teixit muscular, vascular i connectiu (*fm*).<sup>4</sup>



---

**Figura 3.** Imatge on es poden observar les 3 zones de la pròstata: la zona central (CZ), la zona de transició (TZ) i la zona perifèrica (PZ). (Imatge cortesia de Patricia Troncoso, M.D. Anderson Cancer Center)

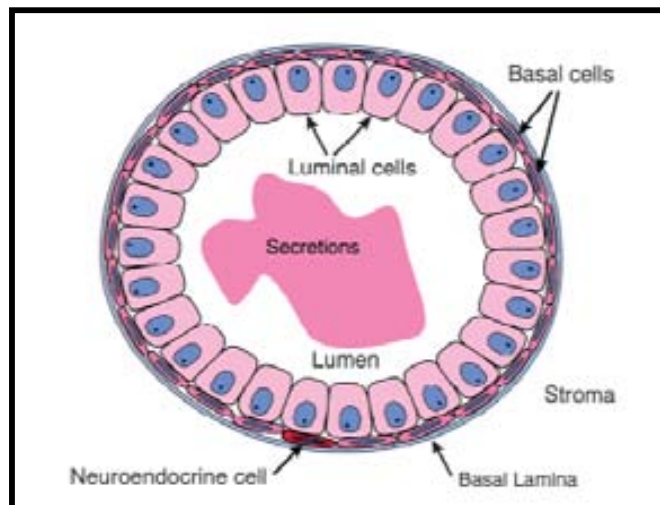
---



---

**Figura 4.** Imatge histològica de la pròstata on es pot veure el component glandular (glàndula prostàtica, *gp*) i el no glandular (estroma fibromuscular, *fm*).

---



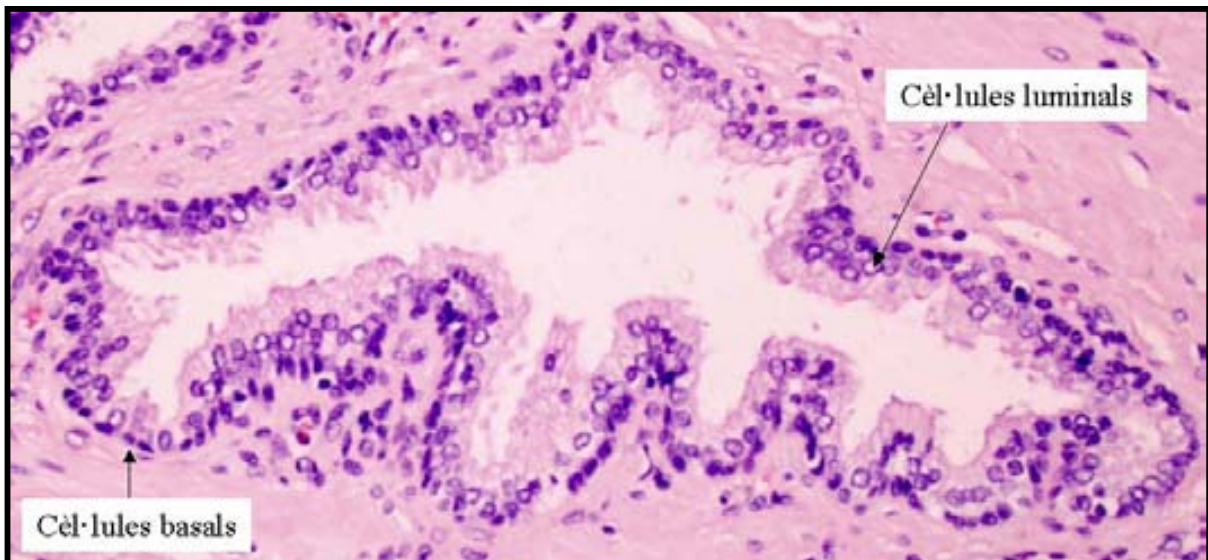
---

**Figura 5.** Esquema dels tres tipus de cèl·lules que hi ha en el component glandular de la pròstata. Extret d'Abate-Shen *et al.*, 2000.

---

Una altra de les diferències entre aquests dos tipus de cèl·lules és el perfil d'expressió de **citoqueratines**. Les citoqueratines són proteïnes estructurals intracel·lulars de diversos pesos moleculars que es poden posar de manifest mitjançant tècniques

d'immunohistoquímica. Així, per exemple, les cèl·lules basals expressen les citoqueratines 5, 14 i 15 i les cèl·lules secretores expressen la 8 i la 18.<sup>5</sup>



---

**Figura 6.** Imatge histològica d'una glàndula prostàtica on es poden observar les cèl·lules secretores i les cèl·lules basals.

---

El balanç entre proliferació i mort cel·lular està regulat pels nivells d'andrògens, principalment per la testosterona. A l'estroma, la testosterona és transformada a alfa-dihidrotestosterona (DHT) per l'acció de l'alfa-5-reductasa dels fibroblastes estromals. El complex intracel·lular DHT-receptor d'andrògens interacciona amb seqüències específiques de l'ADN (àcid desoxiribonucleic), regulant el procés de proliferació, diferenciació i mort de les cèl·lules epitelials.<sup>6</sup>

La devallada dels nivells d'andrògens, que com veurem més endavant, és un dels múltiples tractaments dels què es disposa per lluitar contra el càncer de pròstata, comporta la involució de les cèl·lules secretores, desencadenant els mecanismes de mort cel·lular programada. En canvi, les cèl·lules basals, en tenir nivells baixos de receptor d'andrògens, no es veuen gairebé afectades.

## **1.2. Epidemiologia del càncer de pròstata**

El càncer de pròstata és el tumor maligne no cutani més freqüent i una de les principals causes de mort per càncer en la població masculina als països desenvolupats.<sup>1</sup> S'estima que el risc de patir càncer de pròstata durant tota la vida en els homes és aproximadament del 5-15% i el risc de morir d'aquesta malaltia és del 1-3%.<sup>7</sup>

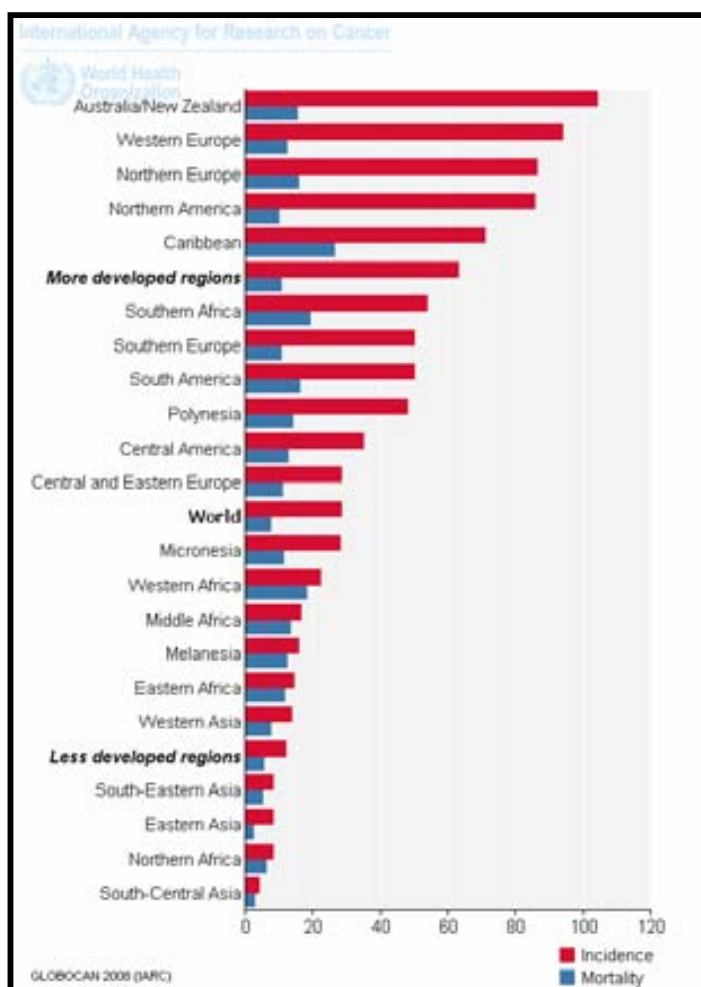
En general, el càncer de pròstata és una neoplàsia amb una relativa **baixa taxa de mortalitat**, sobretot si es compara amb altres tipus de tumors com el de la glàndula mamària o de pulmó. És per aquest motiu que les taxes de supervivència es miren als 10-15 en lloc dels 5 anys.

Segons el Centre Nacional d'Epidemiologia, a Espanya l'any 2002, el càncer de pròstata, excloent els tumors de pell no melanocítics, era el tercer tumor més freqüent en homes, i constituïa la tercera causa de mort per càncer, darrera del càncer de pulmó i de colon. La incidència de càncer de pròstata a Espanya, juntament amb Grècia, és de les més baixes de la Unió Europea. L'estimació de la incidència de càncer de pròstata a l'estat espanyol és de 36/100.000 habitants/any i la taxa de mortalitat és de 18,1/100.000 habitants/any, la qual cosa representa uns 7.200 individus/any.

A nivell europeu, la incidència de càncer de pròstata varia desde 17,4 al 61,8/100.000 habitants/any en funció de la regió.<sup>8</sup>

A nivell mundial, les xifres més elevades es donen a la població de raça negra d'Amèrica del Nord (120/100.000 habitants/any), seguida per Austràlia i per diversos països de l'oest i nord d'Europa, mentre que és relativament infreqüent en els països asiàtics **[Figura 7]**. Aquestes diferències podrien ser explicades per factors genètics i ambientals.





**Imatge 7.** Incidència del càncer de pròstata (nous casos/100.000 habitants/any) en diferents regions del món. Any 2008. Extret de la pàgina web: <http://globocan.iarc.fr/>.

### 1.3. Etiologia del càncer de pròstata

L'etiologia i els agents que condicionen l'evolució cap a un tumor de pròstata que es manifesta clínicament són poc coneguts. Es considera que és un **procés multifactorial** relacionat amb certes exposicions ambientals, estils de vida, edat, antecedents familiars de càncer de pròstata i factors genètics. Per contra, l'efecte de l'activitat física, l'activitat sexual, l'exposició al cadmi, la dieta rica en greixos saturats d'origen animal, el consum d'alcohol i el consum de carn vermella és controvertit.

### **1.3.1. Edat**

S'ha observat que la probabilitat de desenvolupar càncer de pròstata augmenta amb l'edat: és molt infreqüent abans dels 50 anys i augmenta ràpidament després d'aquesta edat. Tant és així, que el 90% dels casos diagnosticats són pacients de més de 65 anys. En general, es pot considerar que el càncer de pròstata és un tumor d'edats avançades.<sup>3</sup> Ara bé, cal dir que encara que la incidència d'aquest càncer augmenta amb l'edat, és en els pacients més joves quan mostra pitjor pronòstic.<sup>9</sup>

### **1.3.2. Factors ambientals i alimentaris**

La incidència de càncer de pròstata als Estats Units és significativament més alta que en d'altres llocs com, per exemple, Àsia. Es creu que això podria ser causat per factors ambientals i alimentaris.<sup>10</sup> Així, per exemple, un estudi realitzat en emigrants del Japó als EEUU va demostrar un augment del risc de patir càncer de pròstata a mesura que es passava de generació, arribant a un risc semblant al de la població nord-americana en les darreres generacions.<sup>11</sup>

S'ha observat que una alimentació basada en alts continguts en fibra i nivells baixos de greixos animals tenen un efecte protector davant del càncer de pròstata. Així mateix, una ingesta alta de greixos, especialment d'àcids grassos saturats, així com el consum alt de calories estan correlacionats amb un major risc de patir aquesta malaltia.<sup>12,13</sup>

També s'ha postulat que les vitamines A, D i E podrien actuar com a factors protectors.<sup>14,15</sup> Es creu, per exemple, que la vitamina E, disminueix l'estrès oxidatiu i la genotoxicitat. També exerceix un efecte antiproliferatiu i inhibeix les vies de senyalització cel·lular.

Probablement alguns greixos de l'alimentació es converteixen en andrògens, donant lloc a una estimulació androgènica de les cèl·lules tumorals quiescents. L'àcid gras més perillós, quan es consumeix en excés, és l'alfa-linolènic, el consum del qual triplica el risc de patir càncer de pròstata.<sup>12</sup> En canvi, els derivats de la soja (isoflavonoide) semblen tenir un



efecte protector per la inhibició de la funció 5-alfa reductasa i la inhibició de l'angiogènesi.<sup>16-18</sup>

### **1.3.3. Herència genètica**

El càncer de pròstata es pot dividir epidemiològicament en dos grups, l'**espontani** i l'**hereditari**. S'ha descrit que els factors hereditaris són els responsables d'aproximadament el 10% dels casos de càncer de pròstata i generalment estan associats a desenvolupaments primerencs de la malaltia.<sup>3</sup> El fet de tenir antecedents familiars amb càncer de pròstata augmenta el risc de patir la malaltia entre 1,5 i 5 vegades més, en funció del nombre de familiars afectats i del grau de parentiu.

Davant d'aquest fet és lògic, doncs, que s'hagi intentat buscar locis amb alta susceptibilitat familiar com per exemple: Xq27-28 (el gen candidat és HPCX), 1q24-25 (el gen candidat és HPC1, també anomenat RNASEL) i 17p11 (el gen candidat és HPC2, també anomenat ELAC).<sup>19-21</sup> A més a més, s'han identificat polimorfismes associats amb una major o menor susceptibilitat de patir càncer en els gens MSMB, LMTK2 i KLK3.<sup>22-25</sup>

Finalment, també es creu que les mutacions germinals dels gens BRCA1 i BRCA2 podrien augmentar el risc de patir càncer de pròstata<sup>26,27</sup> tot i que hi ha molts estudis que posen en entredit aquesta associació, especialment pel gen BRCA1, així com pel gen BRCA2.<sup>28,29</sup>

La dificultat que existeix per trobar gens que estiguin clarament associats amb el càncer de pròstata familiar podria ser deguda a què intervenen una gran quantitat de gens amb un efecte petit o moderat. El desenvolupament del càncer de pròstata en una persona amb unes característiques genètiques específiques, doncs, seria el resultat de l'acció conjunta d'aquests gens juntament amb la dieta alimentària i uns factors ambientals concrets.<sup>30,31</sup>

### 1.3.4. Andrògens

Els andrògens tenen un paper clau en el manteniment i desenvolupament de la glàndula prostàtica,<sup>3</sup> **estimulen la divisió cel·lular** de l'epiteli prostàtic a través de l'acció del seu receptor (AR)<sup>32</sup> i es creu que poden ser molt importants en l'etiologia del càncer de pròstata.

Ja als anys 40, Huggins *et al.*<sup>33</sup> va demostrar que l'eliminació dels andrògens, ja fos per extirpació quirúrgica dels testicles o bé per castració química, causava la regressió dels tumors de pròstata. També s'ha observat que els eunucs tenen una incidència de càncer de pròstata gairebé nul·la i que els homes joves consumidors d'anabolitzants tenen una major incidència de càncer de pròstata.<sup>34</sup>

Altres estudis demostren que els nivells de testosterona i sobretot de DHT són elevats en la raça negra, mitjans en la raça blanca i baixos en els d'origen japonès. El risc de càncer en aquests grups ètnics és proporcional als nivells d'andrògens.<sup>35,36</sup>

### 1.4. Diagnòstic del càncer de pròstata

El diagnòstic del càncer de pròstata representa, encara avui dia, una problemàtica sanitària de gran magnitud ja que a diferència d'altres càncers, com per exemple el de mama o el de bufeta, no es disposa d'una eina eficaç per la seva detecció precoç.<sup>37</sup>

Actualment els principals mètodes que s'utilitzen per diagnosticar el càncer de pròstata són la detecció de nivells elevats ( $\geq 4$  ng/ml) de l'**antigen prostàtic específic** (PSA) i el **tacte rectal** (TR). Malgrat que el PSA sigui més sensible que el TR, les dues proves són complementàries i sempre es realitzen conjuntament. Per altra banda, l'**ecografia transrectal** que havia estat considerada com un mètode útil en el diagnòstic precoç,<sup>38</sup> avui dia només s'utilitza per realitzar biòpsies sistemàtiques ecodirigides quan existeix la sospita d'un càncer de pròstata, ja sigui per una elevació sèrica del PSA o per una alteració en el tacte rectal. També hi ha altres tècniques com la **tomografia axial computeritzada**

(TAC) o la **ressonància magnètica nuclear (RMN)** que són molt útils per avaluar si un tumor de pròstata és localment avançat, però no serveixen per fer un diagnòstic precoç.

### **1.4.1. Antigen prostàtic específic (PSA)**

El PSA és una glicoproteïna sintetitzada per la pròstata normal, amb un pes de 34 kDa. La seva funció és la dissolució del coall seminal format durant l'ejaculació. Es sintetitza a les cèl·lules luminals de l'epiteli prostàtic i es secreta al líquid seminal. La seva producció depèn dels andrògens i de la mida de la glàndula prostàtica. És una proteïna de síntesi gairebé exclusiva a la pròstata, però també s'ha detectat en baixes concentracions a l'endometri, al teixit mamari normal, en els tumors mamaris, en neoplàsies adrenals i en els carcinomes renals.<sup>39</sup> Una petita part del PSA passa a la circulació sanguínia a través dels vasos prostàtics i és precisament aquest PSA el que es mesura per diagnòstic, pronòstic i seguiment del càncer de pròstata.

El PSA va ser descrit per primera vegada el 1970 pel grup de R. Ablin<sup>40</sup> i posteriorment l'any 1981 es va aconseguir aïllar en sèrum.<sup>41</sup>

Els nivells de PSA poden estar **elevats temporalment o persistentment** degut a processos inflamatoris (prostatitis), trauma, manipulacions físiques (endoscòpies), ejaculació, retenció urinària i patologia benigna hipertròfica.<sup>42</sup> Per tant, és important una adequada història clínica i repetir els nivells de PSA per diferenciar entre un PSA alt de forma transitòria d'un PSA elevat persistent.

Els **valors de referència** normal de PSA en sèrum són **< 4 ng/ml**, però varien en funció de l'edat. Per aquesta raó, un nivell de 4 ng/ml es considera elevat per un pacient de 50 anys però seria normal en un de 80 anys. Així mateix, els nivells de PSA oscil·len de forma aleatòria al voltant d'un 15% en un mateix individu. Per tant, de forma natural, un mateix individu pot tenir uns nivells de PSA de 3ng/ml en un anàlisi i a l'hora de repetir-lo pot donar valors de 3,2 o 2,8 ng/ml.

De forma genèrica podem dir que quan es desenvolupa un càncer de pròstata, els nivells de PSA solen augmentar per sobre de 4. Si els nivells es troben entre 4 i 10, la probabilitat de tenir un càncer de pròstata és del 25% i si els nivells de PSA són de més de 10, la possibilitat de patir un càncer de pròstata és del 67%.<sup>43</sup> Així doncs, es considera que l'elevació del PSA en plasma és proporcional a la massa tumoral present i, per tant, quan més avançat sigui el procés tumoral serà més freqüent trobar valors per sobre de la normalitat. No obstant, un cert percentatge de pacients amb càncer de pròstata tenen nivells normals de PSA. És per això que el PSA és un **marcador imperfecte**, té escassa sensibilitat i especificitat.

L'ús del PSA, a més a més, presenta un persistent debat en la literatura mèdica científica. La major part de les elevacions de PSA que es detecten en homes d'edat avançada tenen més a veure amb la presència d'hiperplàsia prostàtica que amb càncer, però són aquestes xifres les que porten a biopsiar més pacients i a detectar focus de càncer que podrien estar en les seves fases inicials de desenvolupament. Així doncs, es creu que actualment s'estan sobrediagnosticant casos, molts dels quals, potser no arribarien a tenir problemes reals amb el càncer de pròstata perquè l'evolució del càncer de pròstata és habitualment bastant lenta en el temps. S'estima que aproximadament un 30% dels homes de més de 50 anys presenten focus de tumor a la pròstata però només el 3% morirà per culpa del tumor. És per això que no està indicat el cribratge massiu a tota la població amb risc.

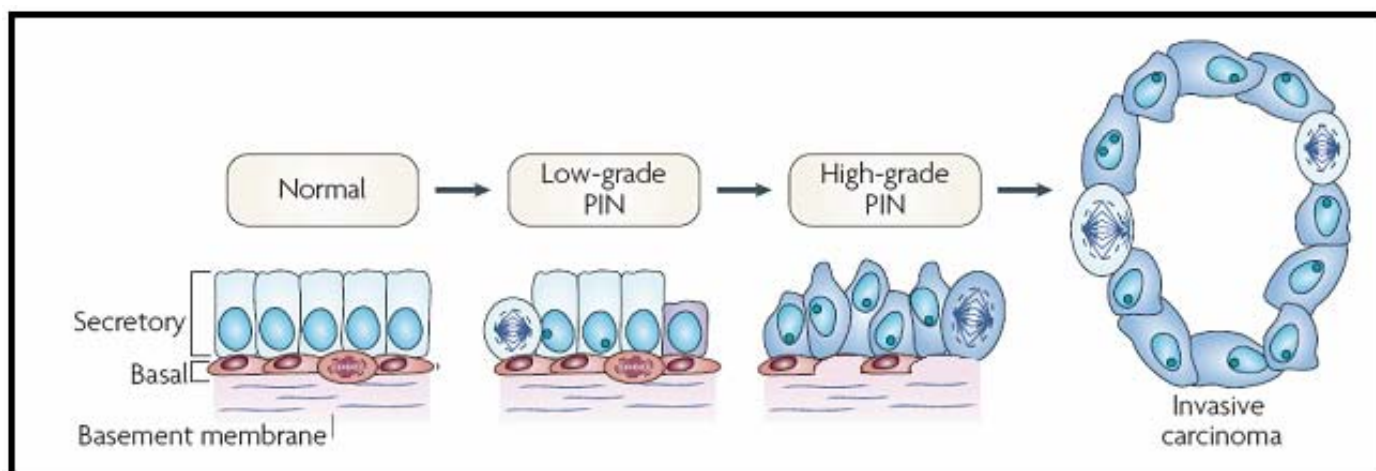
## **1.5. Història natural del càncer de pròstata**

### **1.5.1. Lesions precursors del càncer prostàtic. Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica (PIN)**

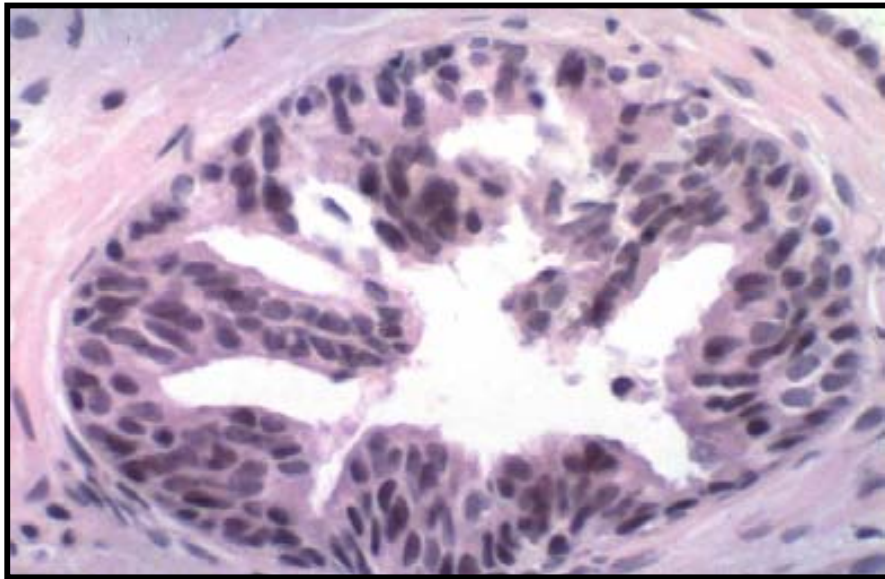
En el cas del càncer de pròstata, a diferència d'altres tipus de tumors, no es coneix encara la seqüència d'esdeveniments des del teixit normal fins al desenvolupament del càncer. Se sap, però, que hi ha una lesió prèvia a l'adenocarcinoma de pròstata que s'anomena neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN). El PIN es defineix com una proliferació intraluminal de l'epiteli secretor del sistema ducto-acinar prostàtic. Es caracteritza per un

espectre d'atípies citològiques que van des de mínimes desviacions de la normalitat a una atípia citològica severa, gairebé indistingible d'un adenocarcinoma ja establert. Sempre, però, es manté de forma més o menys contínua la capa de cèl·lules basals que envolten les cèl·lules epitelials de les glàndules i la relació harmònica amb l'estroma.<sup>44</sup>

Es pot diferenciar entre **PIN d'alt grau** i de **baix grau**. La diferenciació entre aquests dos graus es basa en criteris citològics [Figura 8]. El nucli de les cèl·lules que componen el PIN de baix grau està engrandit, és de mida variable i sol tenir un nuclèol petit o absent [Figura 9]. El PIN d'alt grau es caracteritza per cèl·lules amb un nucli engrandit, de mida relativament uniforme i amb un nuclèol prominent similar al que s'observa en el carcinoma [Figura 10]. La capa de cèl·lules basals està intacta o rarament interrompuda en el PIN de baix grau, mentre que en el PIN d'alt grau normalment és discontinua.<sup>45-47</sup>



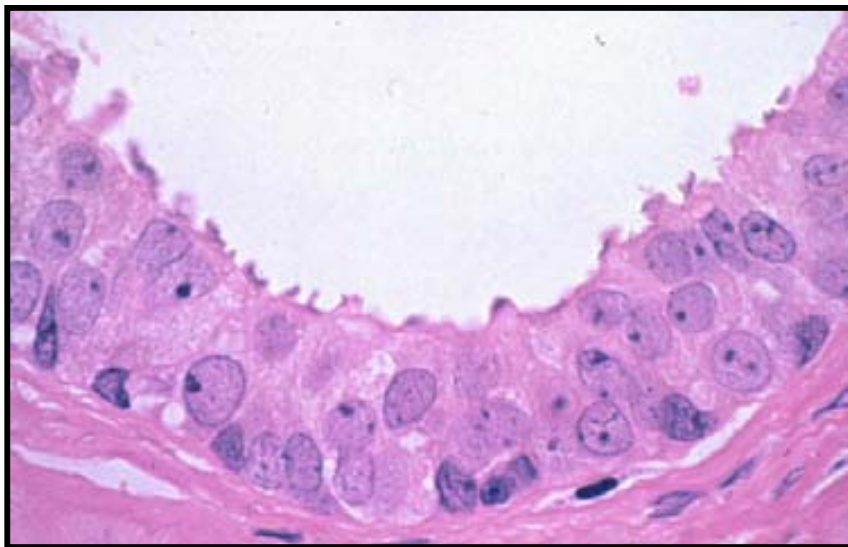
**Imatge 8.** Canvis cel·lulars que es produeixen en la neoplasia intraepitelial prostàtica. Modificat de De Marzo *et al.* (2007).



---

**Imatge 9.** PIN de baix grau, el nucli de les cèl·lules està engrandit però és de mida variable. El nucleòol rarament és prominent.

---



---

**Imatge 10.** PIN d'alt grau, les cèl·lules tenen el nucli engrandit i de mida uniforme. El nucleol és prominent.

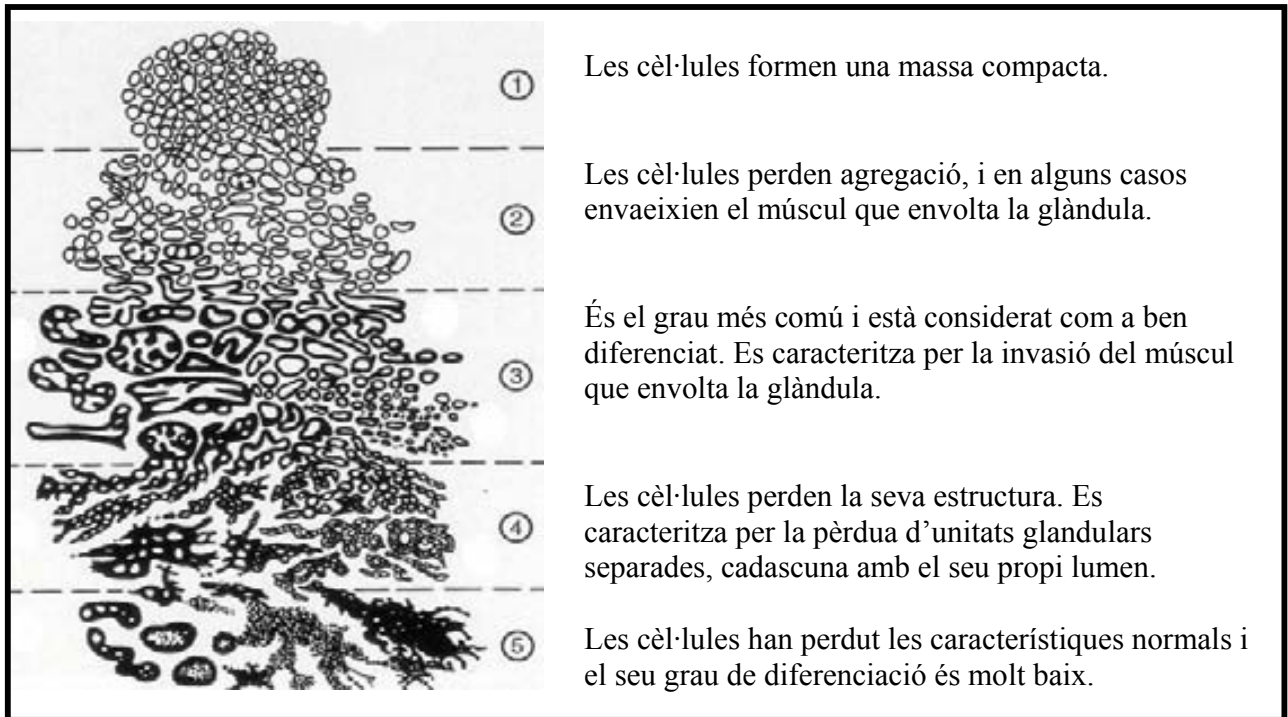
---

### 1.5.2. Histologia i grau histològic del càncer de pròstata

El 70% de casos de càncer de pròstata s'originen a la zona perifèrica i entre el 10% i el 15% a la zona central. La majoria de tumors, però, són multifocals i això fa que en un mateix pacient poguem detectar diferents focus de tumor.<sup>37</sup>

La major part dels tumors de la pròstata són de la varietat anomenada acinar o convencional. Aquest tipus de tumor es caracteritza per la presència de glàndules més o menys ben estructurades, augmentades en nombre, que estan infiltrant l'estroma prostàtic i que han perdut la relació normal amb aquest, ja que els manca la capa de cèl·lules basals que tenen les glàndules no tumorals. Degut a la gran heterogeneïtat del càncer de pròstata, és difícil la valoració del comportament biològic i la correlació de la morfologia microscòpica del tumor amb l'evolució de la malaltia. És per això, que va sorgir la necessitat d'establir protocols de gradació histològica. El més utilitzat de tots és el **sistema de Gleason**, descrit l'any 1966.<sup>48,49</sup> En aquest sistema, la classificació es basa en el grau de diferenciació glandular i en el patró de creixement tumoral. Així doncs, es discriminen **5 patrons**, en els quals hi ha una progressiva fusió de les glàndules i els marges del tumor estan menys definits [**Figura 11 i 12**]. En el patró de **Gleason 1**, les glàndules estan properes, són compactes però individuals, rodones i uniformes i amb el marge del tumor ben definit. En el **patró 2**, s'observa que les glàndules encara són individuals, rodones, i estan separades per estroma però són menys uniformes i els marges del tumor estan menys definits. El **Gleason 3** mostra glàndules individuals separades però al mateix temps de mides variables i irregulars, o bé formant masses glandulars amb estructura cribiforme. En canvi en la puntuació següent, **Gleason 4**, hi ha una fusió de glàndules i aquestes són petites, de vegades amb estructura cribiforme però de contorns irregulars. En el darrer nivell, **Gleason 5**, les glàndules estan absents i només s'observen cèl·lules atípiques en cordons o individualitzades i separades entre sí, tot i que també s'inclou en aquesta categoria la formació de masses tumorals més o menys compactes o cribiformes però amb focus de necrosi central. El grau final es compon de la suma dels dos patrons predominants i s'obtenen valors compresos entre el 2 i el 10. Els adenocarcinomes es

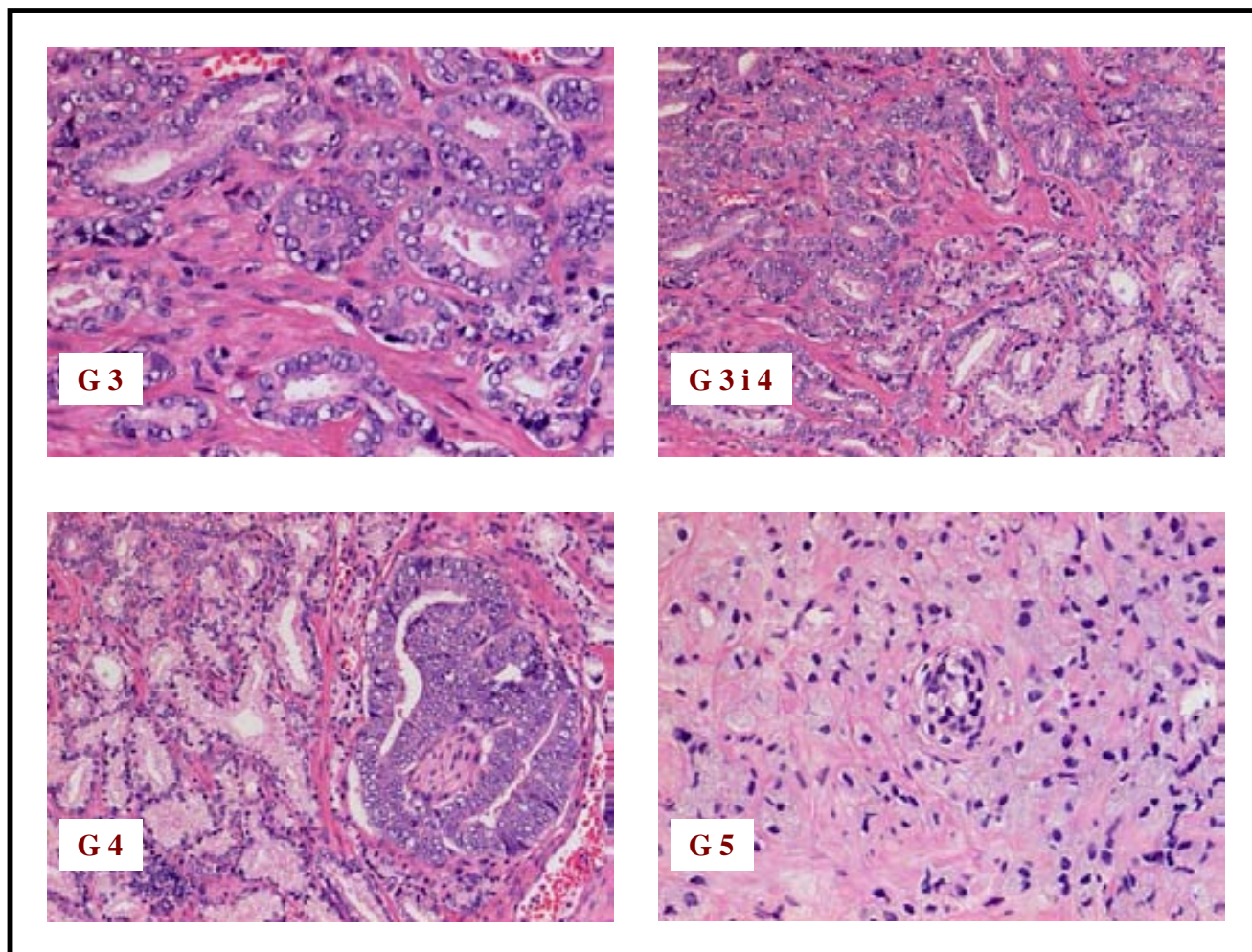
poden classificar, a grans trets, en **ben diferenciats** (valors entre 2 i 4), **moderadament diferenciats** (valors compresos entre 5 i 7) i **mal diferenciats** (valors entre 8 i 10).



**Figura 11.** Esquema dels diferents graus de diferenciació d'un carcinoma prostàtic. Adaptat de Gleason *et al.* (1966).

El sistema de gradació de Gleason s'ha correlacionat de forma significativa amb l'extensió local de la malaltia, la incidència de metàstasis ganglionars i òssies, la resposta terapèutica i la supervivència. Per això és el sistema que s'utilitza també en els algorismes de decisió terapèutica.<sup>32</sup>





**Figura 12.** Imatges histològiques de diferents graus de Gleason.

Per altra banda, els tumors es classifiquen en funció de l'estadi clínic i patològic. En aquest cas el sistema més utilitzat és la **classificació TNM** (tumor-node-metastasis) [Taula 1]. La T indica l'estatus del tumor primari i va des de la gradació 1 (tumor òrgan-confinat) fins a la 4 (tumor invasiu d'altres òrgans). La N indica l'absència de metàstasis ganglionars regionals (N0) o la presència (N1) i la M indica l'absència de metàstasis a distància (M0) o bé la presència (M1), la qual pot estar localitzada en els ganglis limfàtics no regionals (M1a), als ossos (M1b) o en d'altres localitzacions (M1c).

T: Tumor primari		N: Ganglis limfàtics regionals		M: Metàstasi a distància	
Tx	No es pot evaluar el tumor primari	Nx	No es poden evaluar els ganglis limfàtics regionals	Mx	No es poden evaluar les metàstasis
T0	No hi ha evidència de tumor primari	N0	No es detecten metàstasis ganglionars regionals	M0	No hi ha metàstasis a distància
T1	Tumor no evident clínicament, no palpable ni visible per tècniques d'imatge	N1	Es detecten metàstasis ganglionars regionals	M1	Hi ha metàstasis a distància
T1a	Tumor detectat fortuïtament en una extensió menor o igual al 5% del teixit resecat			M1a	Ganglis limfàtics no regionals
T1b	Tumor detectat fortuïtament en una extensió major al 5% del teixit resecat			M1b	Ossos
T1c	Tumor identificat mitjançant biòpsia d'agulla			M1c	Altres localitzacions
T2	Tumor limitat a la pròstata				
T2a	El tumor ocupa la meitat o menys d'un lòbul				
T2b	El tumor ocupa més de la meitat d'un lòbul				
T2c	El tumor abarca els dos lòbuls				
T3	Tumor que s'extén a través de la càpsula prostàtica				
T3a	Extensió extracapsular unilateral o bilateral				
T3b	Tumor que invaeix les vesícules seminals				
T4	Tumor que invaeix estructures veïnes				

**Taula 1.** Classificació TNM en tumors de pròstata.

### **1.5.3. Varietats clínico-patològiques de càncer prostàtic**

A més del càncer prostàtic convencional amb repercussió clínica, s'han creat unes categories un tant arbitràries, però que tenen com a objectiu identificar subgrups de tumors prostàtics que podrien ser susceptibles de tractaments més conservadors. Així, s'ha establert el terme **carcinoma insignificant** per aquells tumors de poc volum (<0,5 cc), amb un grau de Gleason no superior a 6 i que no s'extenen fora de la pròstata. Per altra banda, el terme **carcinoma incidental** s'utilitza per designar els casos de càncer de pròstata identificats de manera inesperada en extreure la bufeta urinària degut a la presència d'un carcinoma urotelial. El **carcinoma latent**<sup>50</sup> és aquell càncer de pròstata detectat en l'estudi autòptic de malalts que han mort per altres patologies. Aquests dos últims subgrups segurament no corresponen a diferents tipus de tumor prostàtic, sinó a diferents fases del desenvolupament del càncer de pròstata, i proporcionen un entorn ideal per estudiar la història natural de les primeres fases del càncer de pròstata i els mecanismes que converteixen un tumor prostàtic de baixa agressivitat, en un de clínicament evolutiu. Finalment, el subgrup de tumors prostàtics que han progressat i s'han fet insensibles als mecanismes de regulació hormonal s'anomenen **androgen-independents**. El coneixement dels perfils genètics diferencials d'aquestes categories és essencial per entendre'n la patogènia, preveure'n l'evolució i dissenyar estratègies més precises de tractament.<sup>1,44</sup>

### **1.5.4. Progressió del càncer de pròstata. Metàstasi**

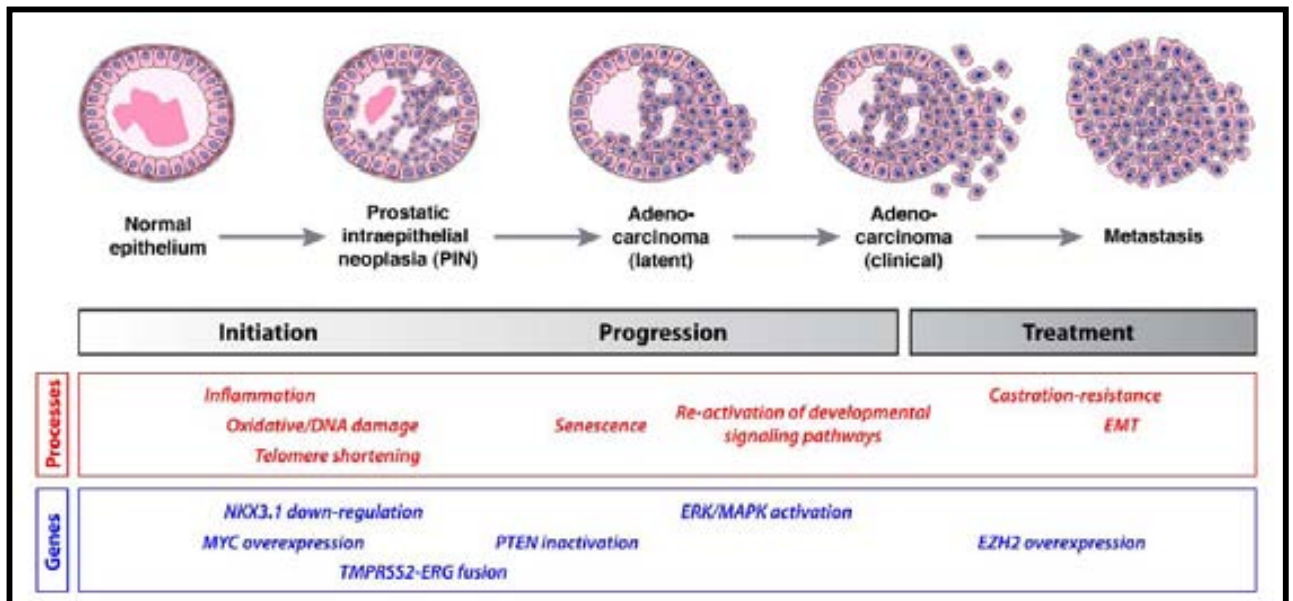
El càncer de pròstata normalment s'inicia com una lesió petita i ben diferenciada. Malgrat tot, però, un 30% dels pacients presentaran un tumor recurrent. Inicialment, el tumor (igual que el teixit prostàtic normal) és **dependent d'andrògens** pel seu creixement i supervivència. És per això que un dels tractaments per combatre el creixement del càncer i la seva supervivència és la teràpia de privació d'andrògens (inhibidors d'andrògens per exemple). Tot i així, molts pacients desenvoluparan un **tumor independent a andrògens** al cap d'un cert temps, ja que el tumor aconsegueix "escapar" de la inhibició dels andrògens i aconsegueix proliferar malgrat l'absència d'aquests.<sup>51</sup> Actualment el càncer de pròstata metastàtic es considera incurable<sup>52,53</sup> i els tractaments en aquests pacients tenen una finalitat pal·liativa.

Els teixits i òrgans on típicament metastatitza el càncer de pròstata són el **pulmó**, el **fetge** i la **pleura**, encara que el lloc **més freqüent és als ossos**. A diferència del que passa amb altres tipus de tumors que també fan metàstasis als ossos, com per exemple el càncer de mama, les metàstasis òssies del càncer de pròstata són característicament **osteoblàstiques** més que no pas osteolítiques.<sup>54</sup>

Avui dia, però, encara no coneixem quins són els mecanismes moleculars que causen el tropisme del càncer de pròstata cap als ossos. Aquesta manca de coneixement és deguda en part a la dificultat d'obtenir material de pacients amb metàstasis i per altra banda, a la dificultat d'aconseguir models de ratolins amb metàstasis òssies.<sup>1</sup> Els únics models d'experimentació dels que es disposa actualment són xenògrafs en els quals s'injecta intracardíacament o a la tibia gran quantitat de cèl·lules tumorals induint així metàstasis òssies.<sup>55,56</sup>

### **1.6. Gens implicats en la carcinogènesi prostàtica**

El procés de carcinogènesi suposa una **acumulació de lesions genètiques** que porten a una **proliferació cel·lular no controlada**, amb **disminució de la mort cel·lular**, aparició de la **capacitat d'invasió i disseminació**, a més de l'**aturada en el procés de diferenciació**. L'expressió del fenotip maligne dependrà de l'equilibri entre els gens promotors i supressors de la carcinogènesi. Aquest procés, doncs, precisa múltiples passos, entre els quals cal destacar la inflamació tissular, l'oxidació i el dany a l'ADN i l'escurçament de telòmers [Figura 13]. L'**expressió** de diversos **oncogens** és necessària per la transformació cel·lular, així com la **inactivació de gens supressors**. En estadis latents o lesions premalignes com en el PIN, només s'hauria produït una part dels passos necessaris per arribar al fenotip maligne pròpiament dit. Aquesta idea queda reforçada pel fet que en pacients amb múltiples mutacions s'incrementa la probabilitat de desenvolupar neoplàsies.



**Figura 13.** Esquema del procés d'iniciació i progressió del càncer de pròstata. Extret de Shen *et al.*

2010

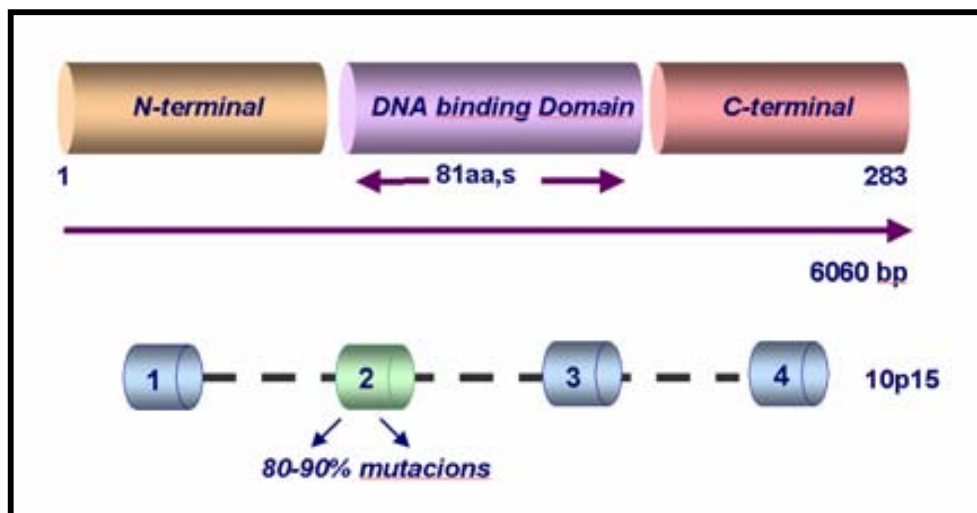
L'interès d'estudiar tots aquests gens és conèixer, al cap i a la fi, la història natural del càncer de pròstata i en última instància preveure i determinar quins pacients presentaran una ràpida progressió i quins evolucionaran més lentament i per tant, poder determinar en quins casos el pacient es podria beneficiar d'un tractament més conservador i en quins casos podria ser més adequat no prendre aquestes mesures.

Molts dels gens que s'han descrit alterats en càncer de pròstata pertanyen a la via de la regulació del cicle cel·lular i la resposta al dany a l'ADN i a les vies de transducció de senyals RAS-MAPK i PI3K-AKT.

## 1.6.1. Alteracions en gens del cycle cel·lular i resposta al dany a l'ADN

### 1.6.1.1 KLF6

*Krüppel-like factor (KLF6)*, també anomenat antigament com a *Core promoter element-binding protein (COPEB)*, és un **factor de transcripció** que s'ha identificat com un **gen supressor de tumors** i es localitza al braç curt del cromosoma 10 (10p15).<sup>57</sup> Pertany a una àmplia família de factors de transcripció anomenats Sp1-like/KLF que en el cas dels mamífers comprèn 24 membres. El gen de *KLF6* està format per 4 exons [Figura 15] i la proteïna presenta **tres regions**: un domini N-terminal, un domini d'unió a l'ADN format per tres dits de zinc, gràcies als quals s'uneix a regions d'ADN amb alt contingut de GC o motius del tipus "CACC", i un domini C-terminal.



**Figura 15.** Esquema de l'estructura de la proteïna KLF6 i del seu gen. També es mostra que l'exó 2 és on es produeixen la majoria de les mutacions descrites.

KLF6 està implicat en diferents processos cel·lulars com per exemple, **diferenciació, proliferació cel·lular, apoptosi i angiogènesi**.<sup>58</sup> També s'ha suggerit que KLF6 podria estar implicat en el control del cycle cel·lular mitjançant l'**activació de p21 de forma independent a p53**.<sup>59</sup> Aquest fet s'ha demostrat experimentalment *in vitro*<sup>58</sup> i *in vivo*.<sup>60</sup>

P21 és una proteïna inhibidora de les ciclines que impedeix la fosforilació de la proteïna RB (retinoblastoma). Quan RB no està fosforilat es manté unit als factors de transcripció E2F impedint la progressió del cycle cel·lular [Figura 16].

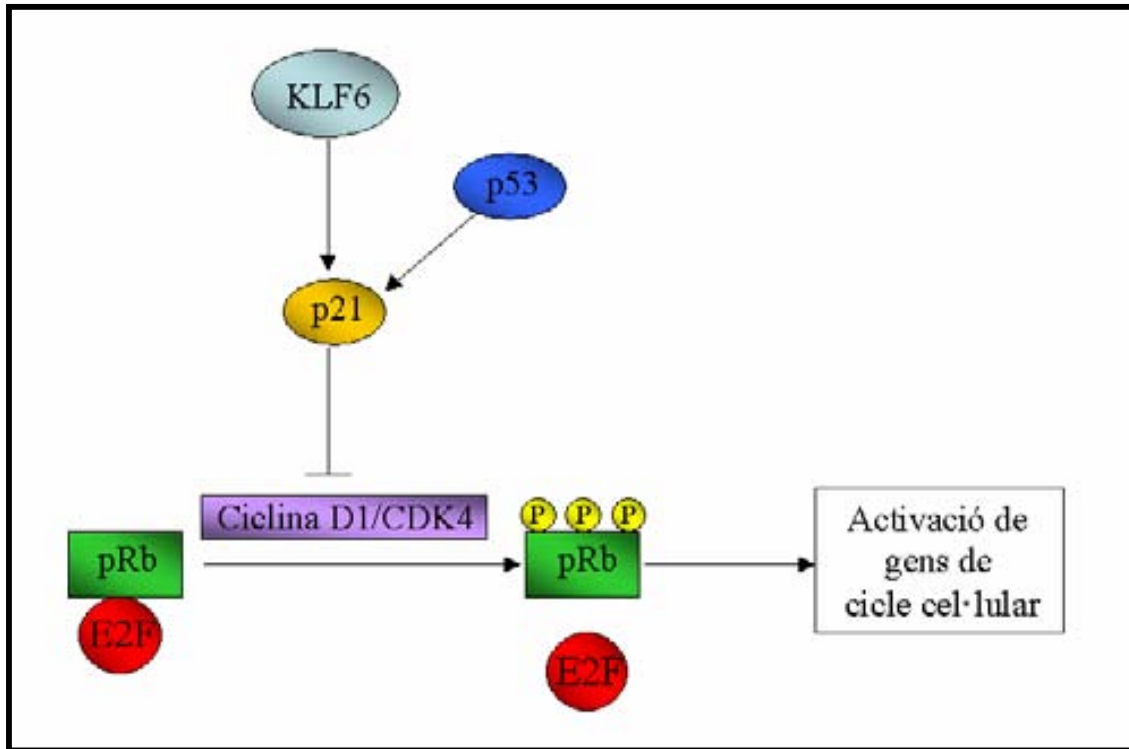


Figura 16. Esquema de l'activació de p21 a través de KLF6.

### 1.6.1.2. Alteracions descrites de KLF6

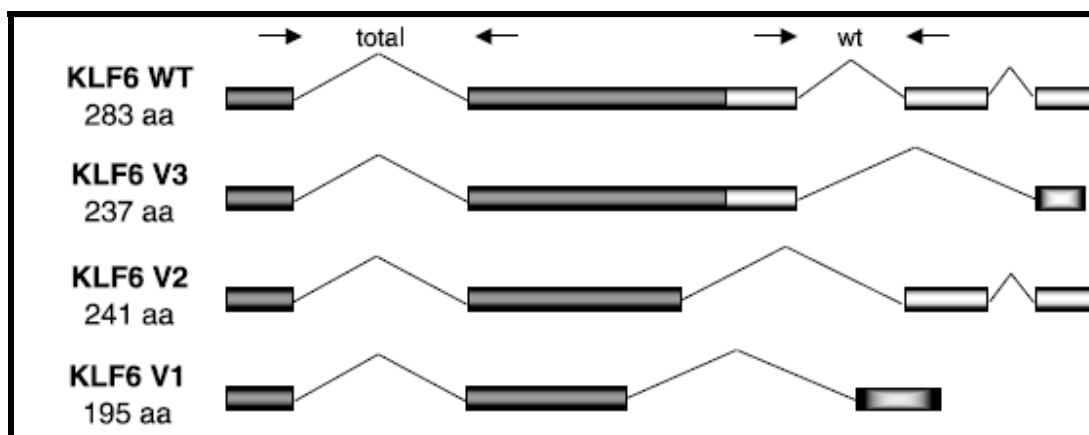
Diversos articles han assenyalat que *KLF6* pot ser **inactivat** mitjançant **mutacions**, **pèrdua al·lèlica**, i/o **metilació del promotor**.<sup>59,61-63</sup> A més, *KLF6* també s'ha descrit com un gen implicat en el desenvolupament i progressió del càncer mitjançant la regulació inhibidòria de l'oncogen *c-jun*<sup>64</sup> i l'activació del gen *E-cadherina*.<sup>65</sup>

Pel que fa a la **pèrdua d'heterozigositat (LOH)**, hi ha publicats diferents articles en càncer de pròstata. Alguns autors indiquen una freqüència del 77%<sup>66</sup> i d'altres al voltant del 28%.<sup>61</sup>

En el cas de les **mutacions de *KLF6***, s'han realitzat diferents estudis en diferents tipus de càncer. A més a més, la variable freqüència de mutació descrita en el gen *TP53* en càncer de pròstata recolza la idea de què hi ha algun altre gen implicat en el control del cicle cel·lular que podria estar alterat. *KLF6*, doncs, podria ser un bon candidat. En el cas del càncer de còlon, per exemple, hi ha una gran discrepància de resultats, entre un 0% i un 44%.<sup>67-70</sup> En els astrocitomes s'ha descrit una baixa o nul·la freqüència de mutació (0%-3%).<sup>71-74</sup> I en els tumors hepàtics les freqüències descrites varien del 0% al 15%.<sup>66,75-77</sup> En el cas del càncer de pròstata hi havia publicats, fins a l'aparició del nostre article i fins a dia d'avui, quatre articles. El primer<sup>59</sup> descrivia una alta freqüència de mutació (55%), mentre que el següent<sup>61</sup> publicava una freqüència del 15%. En els dos últims treballs, les prevalences descrites eren molt més baixes, del 0% i del 1% respectivament.<sup>78,79</sup> S'ha de destacar però, que els diferents treballs publicats presenten diferències metodològiques importants. A més, les discrepàncies dels resultats també podrien ser degudes a les diferències genètiques dels diferents grups poblacionals.

Referent a la **hipermetilació del promotor de *KLF6***, hi ha publicats diferents treballs que són contradictoris entre sí. Així, per exemple, hi ha articles que recolzen la hipòtesi de la inactivació de *KLF6* per hipermetilació del promotor<sup>80-83</sup> i d'altres que no la recolzen.<sup>84,85</sup> Per altra banda, els últims estudis de *KLF6* publicats en càncer de pròstata<sup>62,86</sup> indiquen que la presència d'un polimorfisme en línia germinal (IVS1 -27 G>A) causaria l'augment de formes de *splicing* alternatiu de *KLF6* [Figura 17]. Aquestes variants de *KLF6*, a la vegada, podrien unir-se a *KLF6 wt* inhibint les seves funcions.





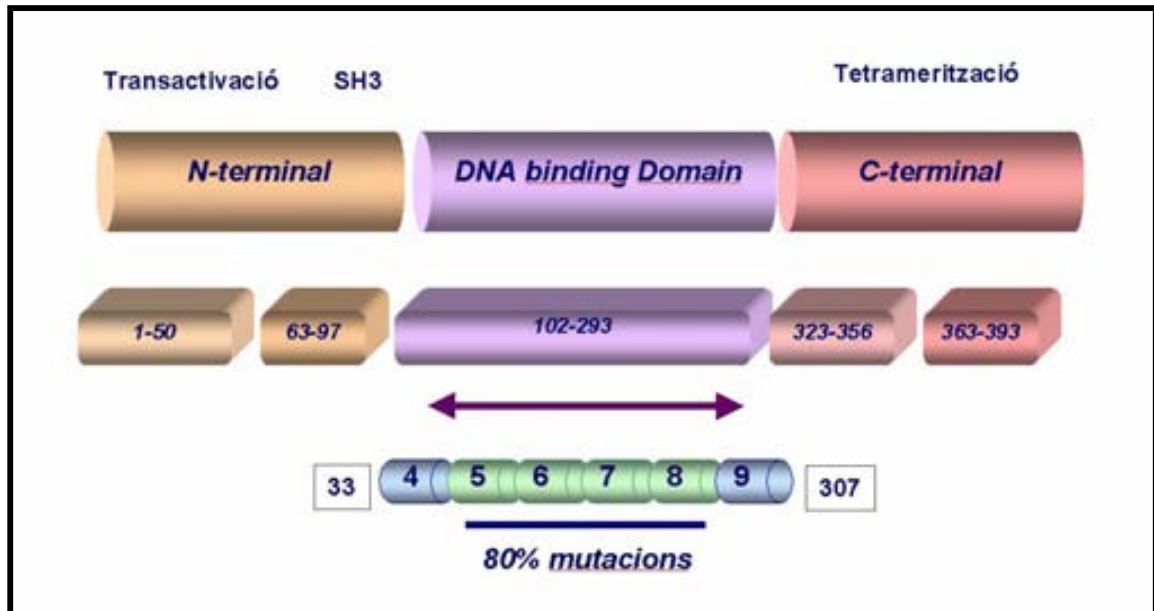
**Figura 17.** Organització genòmica de *KLF6* wt i les seves variants de *splicing* alternatiu. Extret de Narla *et al.* 2005.

### 1.7.2. TP53 i MDM2

*TP53* es localitza al braç curt del cromosoma 17 (17p13) i codifica per una proteïna nuclear de 53 KDa, d'aquí el seu nom. Es considera un **gen supressor de tumors** mutat en aproximadament el 50% dels tumors.<sup>87</sup> La proteïna de p53 presenta tres regions: un domini N-terminal que correspon a la regió de transactivació, una zona intermitja que és la responsable de la unió a l'ADN i un domini C-terminal on hi ha el domini de tetramerització, ja que la proteïna activa es troba en forma de tetràmer.<sup>88</sup> El gen de *TP53* està format per 11 exons, i és de l'exó 5 al 8 on s'han trobat el 80% de les mutacions descrites [**Figura 18**].<sup>89</sup>

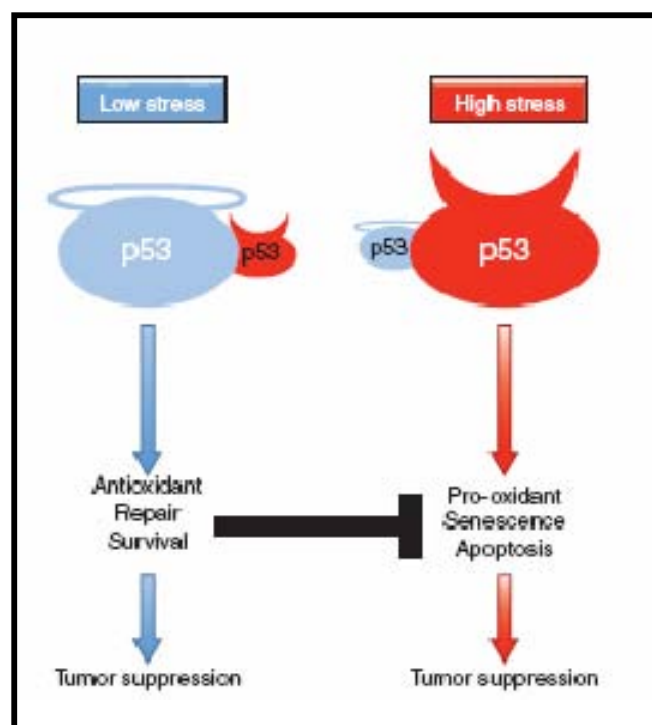
P53 actua com un detector de l'estrès cel·lular que respon als senyals de dany a l'ADN (s'activen proteïnes com ATM, ATR i CHK1/2), hipòxia, deprivació de nutrients i disfunció dels ribosomes causant l'**aturada del cicle cel·lular**.<sup>90-92</sup> P53 pot provocar l'aturada del cicle cel·lular en la fase G1/M (punt R) a través de l'activació de p21, la qual inhibeix la formació dels complexos cdk2/ciclinaE impedit la fosforilació de pRb. A més a més, p53 també participa en l'aturada del cicle cel·lular a la fase G2/M permetent la reparació de les lesions. En el cas que això no sigui possible, s'activa el sistema de mort

programada (apoptosi), forçant que les cèl·lules que contenen lesions a l'ADN no es dupliquin. És per aquest motiu que el gen *TP53* també es coneix amb el nom de “guardià del genoma”.<sup>93</sup>



**Figura 18.** Esquema de l'estructura de la proteïna p53 i del seu gen. També es mostren els exons on es produeixen la majoria de mutacions descrites.

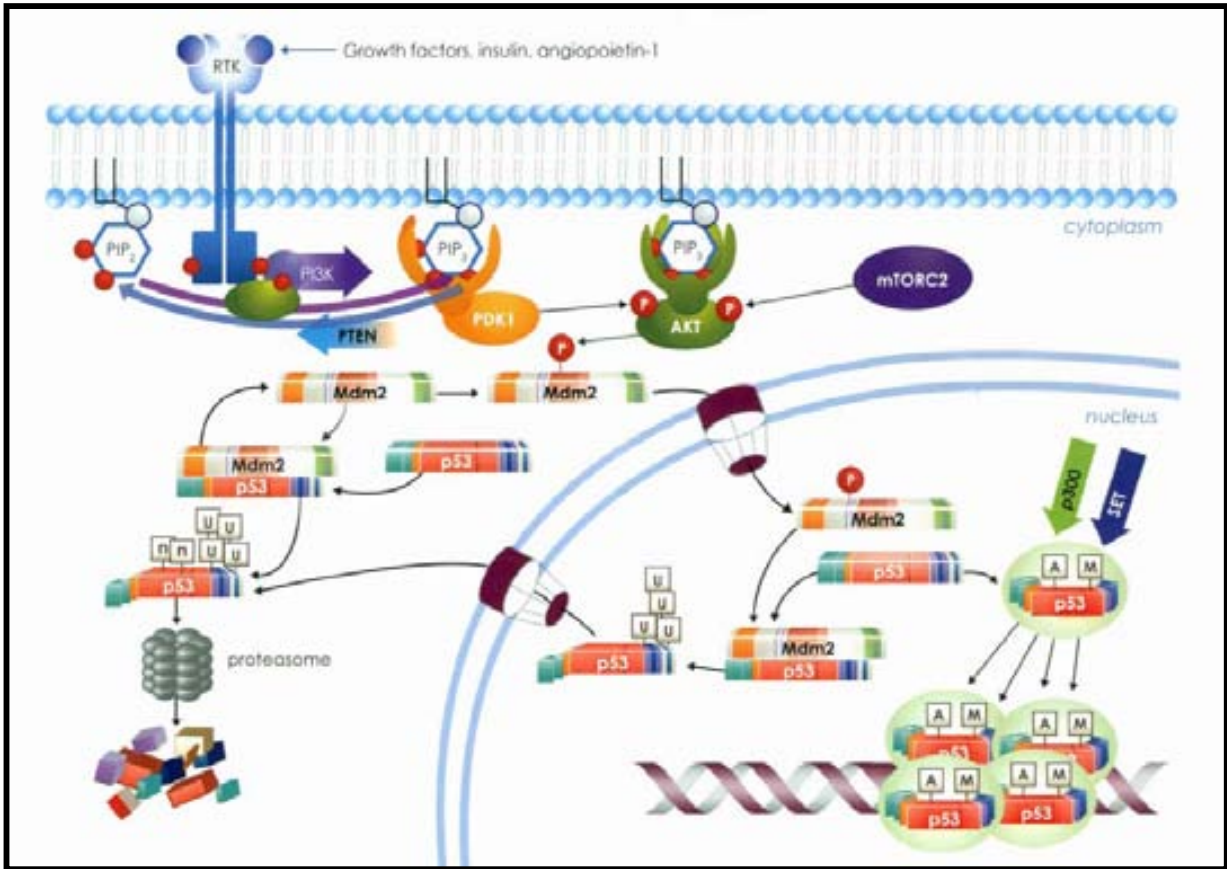
Per tant, p53 en situacions amb **poc estrès** cel·lular desencadena tota una sèrie de mecanismes de **reparació de l'ADN**, **senyals pro-supervivència** i **producció de proteïnes antioxidants**. I en el cas que l'**estrès cel·lular sigui molt alt** i no s'hagi pogut reparar el dany a l'ADN, p53 promou l'**apoptosi** o la **senescència** (estat permanent d'aturada cel·lular) per tal d'evitar la propagació de les cèl·lules malignes i activa proteïnes com BAX, FAS, NOXA i PUMA [Figura 20].<sup>94-96</sup>



**Figura 19.** P53 du a terme respostes diferents en funció dels nivells d'estrès cel·lular. Modificat de Gottlieb *et al.* 2009.

La concentració cel·lular de p53 està altament regulada, el seu principal element regulador és **MDM2**, que causa la degradació de p53 mitjançant el sistema d'ubiquïtinització i degradació pel proteosoma. De fet, MDM2 actua sobre p53 tant al nucli com al citoplasma. En el citoplasma, MDM2 provoca la ubiquïtinització de p53 i la marca per la seva degradació en el proteosoma. En el nucli, MDM2 s'uneix a p53 i emmascara el seu domini d'activació transcripcional i, a més a més, també ubiquïtinitza a p53, estimulant la seva migració cap al citoplasma on serà degradada [Figura 9].<sup>94,97</sup>

L'expressió de MDM2, a la seva vegada, també està regulada per p53 de manera que es mantenen baixos els nivells de p53 un cop s'ha reparat el dany cel·lular. Per altra banda, l'activació de la via de PI3K, a través d'AKT, causa la fosforilació de MDM2 provocant que migri del citoplasma al nucli i generant la ubiquïtinització de p53 [Figura 20].<sup>98</sup>

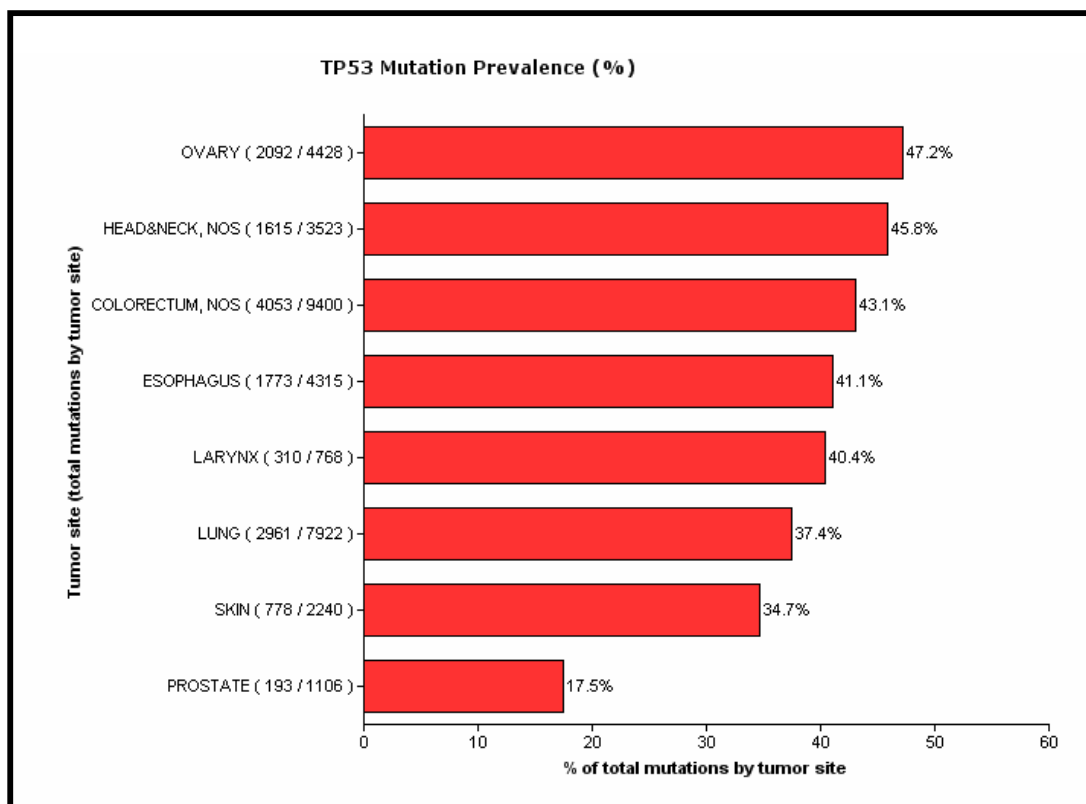


**Figura 20.** Esquema de la regulació de p53 per part de MDM2 i regulació de MDM2 per part d'AKT.  
Esquema realitzat per Tom Brock, extret del catàleg de Cayman Chemical 2010.

#### **1.6.1.4. Alteracions descrites de TP53**

El gen de *TP53* s'inactiva mitjançant **mutacions** i **pèrdua al·lèlica (LOH)**.<sup>87</sup>

En el cas de les mutacions, gairebé, s'han detectat en tots els tipus de càncer sent el càncer d'ovari, el de còlon i el d'esòfag els que tenen unes freqüències més elevades segons la base de dades de la International Agency for Research on Cancer (IARC) [Figura 21].

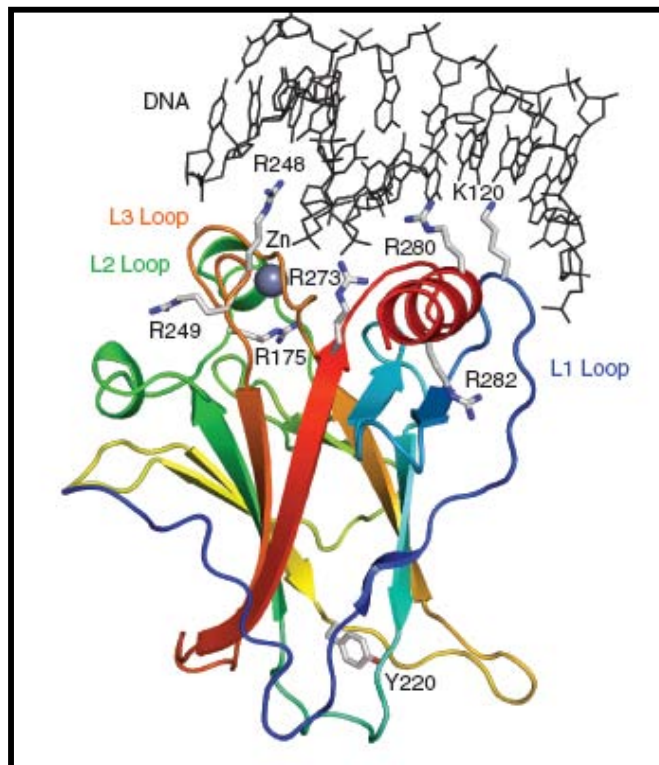


**Figura 21.** Distribució de la freqüència de mutació de *TP53* en diferents tipus de tumors. Extret de la pàgina web de la IARC ([www-p53.iarc.fr](http://www-p53.iarc.fr)). Actualitzat el novembre del 2010.

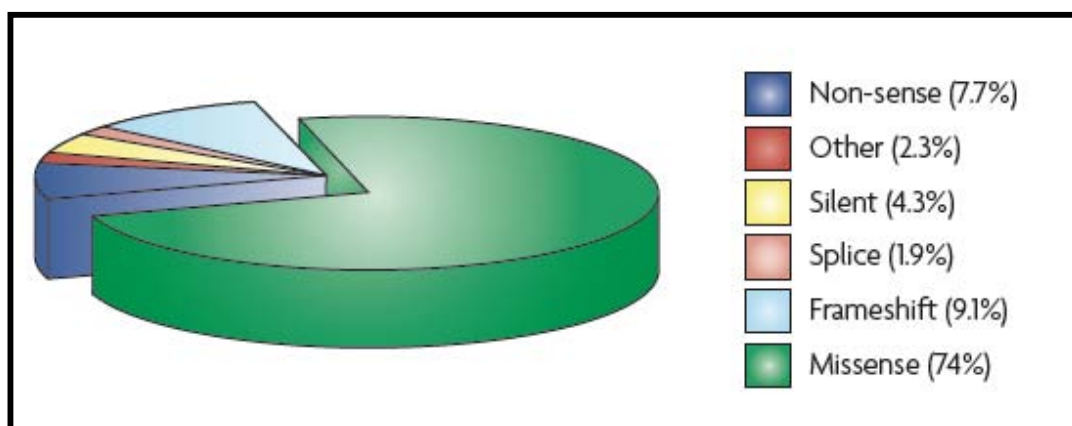
Pel que fa a la **freqüència de mutació de *TP53* en el càncer de pròstata** és controvertida. En la literatura hi ha publicats articles que descriuen una freqüència de mutació del 42%, mentre que altres ho situen al voltant del 3%<sup>29</sup> i la IARC la descriu del 17,5%. De totes maneres, sembla que hi ha autors que recolzen la idea de què les mutacions de *TP53* són un fenomen poc freqüent en tumors primaris, encara que són més freqüents en càncers tardans i metastàtics i androgen-independents.<sup>99</sup> D'altres creuen, però, que les mutacions de *p53* es produeixen en els estadis inicials del càncer.<sup>100</sup> Totes aquestes discrepàncies podrien venir donades, si més no en part, per l'alta heterogeneïtat de les sèries estudiades i també podria ser causada per diferències metodològiques entre els diferents estudis.<sup>101</sup>

La forma activa de p53, la proteïna *wild type*, forma tetràmers i es degrada ràpidament provocant que no es pugi detectar per immunohistoquímica (IHQ). Ara bé, algunes de les mutacions de *TP53* que afecten al domini d'unió a l'ADN [Figura 22] poden generar monòmers mutats, causant l'acumulació de proteïna mutada de forma anòmala al nucli.<sup>102</sup> Aquesta acumulació es pot detectar per IHQ<sup>29</sup> i es creu que podria ser deguda a una major estabilitat de la proteïna mutant, ja que el 80% de les mutacions descrites són de tipus *missense* (mutació que suposa un canvi d'aminoàcid) [Figura 23]<sup>89</sup> i provoquen la síntesi de proteïnes més difícils de ser degradades pel proteosoma. Els nivells elevats de p53 al nucli s'han correlacionat fortament amb estadis més agressius del càncer de pròstata.<sup>103</sup> Encara que, cal dir, que no sempre que es detecta acumulació de p53 al nucli és degut a una mutació del gen (ocasionalment en situacions d'estrès també hi pot haver una estabilització del complex MDM2-p53 o bé una sobreexpressió de *TP53*) i que no totes les mutacions de *TP53* cursen amb acumulació nuclear.<sup>92</sup>

Per altra banda, també s'ha estudiat molt en la literatura la possible relació entre la presència del **polimorfisme R72P** (canvi d'una arginina per una prolina en el codó 72) i el risc de patir càncer de pròstata.<sup>104-106</sup> Els articles publicats fins al moment són contradictoris, però, l'anàlisi de les dades que es tenen actualment sembla indicar que només les poblacions asiàtiques en les que es dona aquest polimorfisme podrien estar associades a un major risc de patir càncer de pròstata, mentre que la penetrança del polimorfisme en les poblacions caucàsiques seria molt més baixa.<sup>107</sup>



**Figura 22.** Estructura de l' ADN-binding domain de p53. Es resalten els codons que presenten una alta freqüència de mutació descrita en la base de dades de la IARC. Extret de Joerger *et al.* 2010.



**Figura 23.** Tipus i freqüència de les mutacions de *TP53* segons la base de dades la IARC. Extret de Brosh *et al.* 2009.

### **1.6.1.5. Alteracions descrites de MDM2**

L'amplificació de *MDM2* s'ha descrit en el 10% dels tumors humans.<sup>108</sup> També s'ha observat en molts tipus de tumors que hi pot haver sobreexpressió de MDM2 sense amplificació del gen.<sup>109</sup> En càncer de pròstata, no s'ha detectat amplificació de MDM2.<sup>110</sup> En canvi, sí que s'ha observat sobreexpressió de MDM2, la qual té lloc amb una freqüència del 30-40% i sembla que s'associa amb tumors d'estadis més avançats.<sup>111,112</sup> Leite *et al.*<sup>112</sup> també han proposat que aquells tumors que tenen sobreexpressió de p53 i de MDM2 tenen un comportament més agressiu.

### **1.6.2. Alteracions en gens de les vies de transducció de senyal PI3K-AKT i RAS-MAPK**

#### **1.6.2.1. Via de PI3K-AKT**

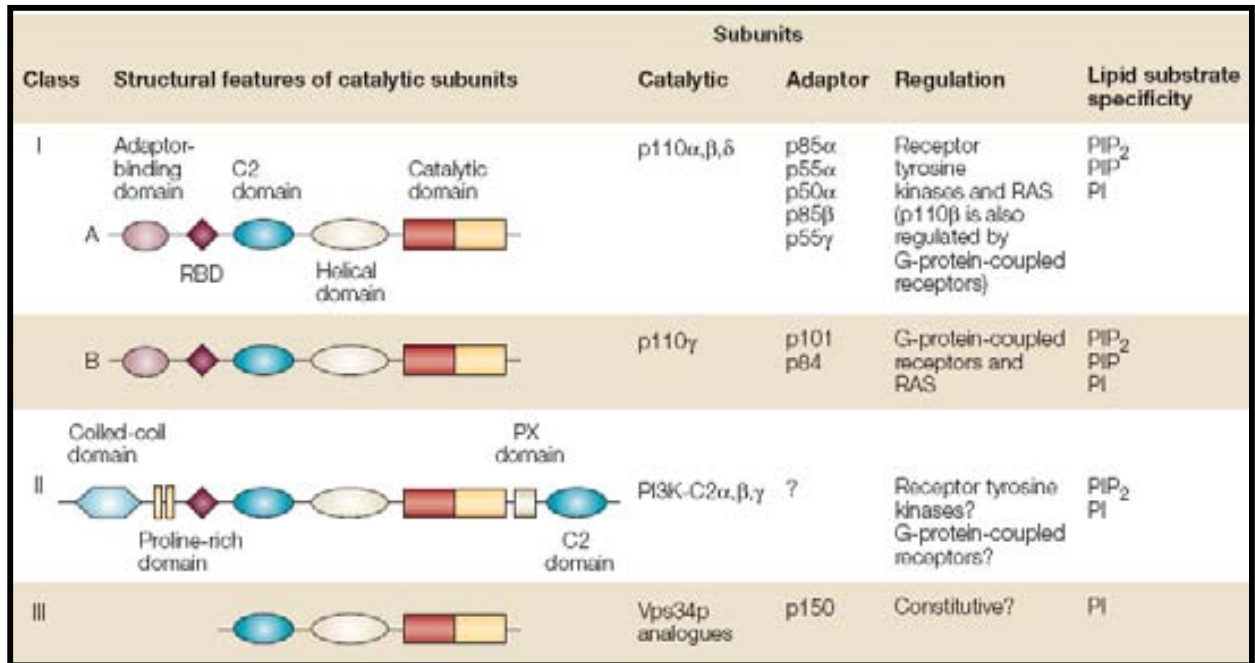
La via de PI3K-AKT s'ha descrit com una de les vies més desregulades en el càncer humà.<sup>113</sup>

Les fosfatidilinositol quinases (PI3Ks) són una família de proteïnes heterodimèriques formada per tres classes diferents que es diferencien entre elles en l'estructura, el substrat, la distribució tissular, el mecanisme d'activació i la funció [Figura 24]. De les tres classes la més implicada en la regulació de la proliferació i la tumorigènesi és la IA, la qual està formada per una **subunitat catalítica** (p110) i una **subunitat reguladora** (p85).<sup>114</sup>

La subunitat p110 presenta tres isoformes: la p110 $\alpha$ , la p110 $\beta$  i la p110 $\delta$  [Figura 10].<sup>115</sup> D'aquestes tres isoformes només de la **p110 $\alpha$** , també anomenada **PIK3CA**, s'han descrit mutacions i amplificacions en diferents tipus de tumors.<sup>114,116-119</sup> *PIK3CA* està localitzat en el cromosoma 3q26.32 i conté 20 exons. La proteïna de PIK3CA està formada per cinc dominis: un domini N-terminal anomenat ABD (adaptor binding domain) que és el responsable de la unió a la subunitat p85, un domini de unió a Ras, RBD (Ras binding domain) que causa l'increment de l'activitat de la proteïna, un domini anomenat C2 que es



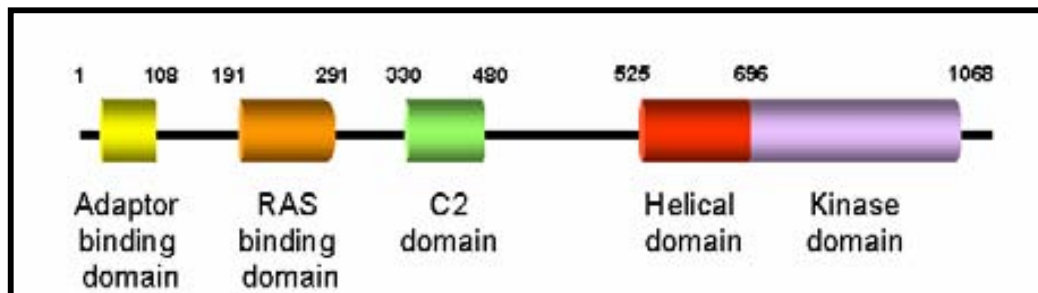
creu que seria el responsable de la unió a la membrana, un domini helical de funció desconeguda i un domini quinasa [Figura 25].<sup>120</sup>



**Figura 24.** Esquema de la família PI3Ks formada per tres classes diferents, classe I (Ai B), classe II i classe III. Extret d' Andreas *et al.* (2005)

La via de PI3K-AKT s'activa mitjançant els receptors tirosina quinasa (RTKs).<sup>115</sup> El procés que té lloc és el següent: la subunitat reguladora p85 de PI3K s'uneix mitjançant el seu domini SH2 a les tirosines fosforilades dels motius YxxM dels RTKs. Aquesta unió causa el reclutament de la subunitat catalítica PIK3CA cap a la membrana plasmàtica, causant la fosforilació del fosfatidilinositol (4,5) bifosfat (PIP<sub>2</sub>) a fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PIP<sub>3</sub>). La presència de PIP<sub>3</sub> a la membrana provoca la unió d'aquelles proteïnes que tenen dominis PH (pleckstrin homology) com, per exemple, AKT. Un cop AKT es troba a la membrana pot ser activada per PDK1 (quinasa 1 dependent de fosfoinositol) la qual fosforila a AKT en el residu Thr308.<sup>121,122</sup> Posteriorment, una segona fosforilació per part de PDK2 en el residu Ser473 causa l'activació completa d'AKT.<sup>123,124</sup> Un cop AKT és completament activa es desplaça de la membrana cap al citoplasma i d'aquí al nucli on

realitzarà múltiples funcions. D'aquestes cal destacar, el control de la síntesis proteïca, a través de l'activació de mTOR mitjançant la inhibició del complex TSC1 i TSC2, i el control del cicle cel·lular mitjançant la inhibició directa de p21 i p27. AKT també regula la supervivència mitjançant una acció antiapoptòtica, inactivant les proteïnes proapoptòtiques BAD i caspasa 9. Finalment, com s'ha comentat a l'apartat anterior, AKT també és capaç d'activar a MDM2 causant així la inhibició de p53.



**Figua 25.** Representació esquemàtica de PIK3CA i dels seus dominis.

Finalment, cal dir que l'activació de PI3K pot ser contrarestatada per l'acció de PTEN, el qual actua de forma oposada a PI3K, ja que pot defosforilar PIP3 i transformar-lo a PIP2.

*PTEN* és un gen supressor de tumors que regula negativament els nivells intracel·lulars de fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PIP3) causant la inhibició de la via de PI3K-AKT.<sup>118</sup>

La via de PI3K-AKT pot ser activada mitjançant els receptors tirosina quinasa o bé amb la unió de RAS actiu a la subunitat catalítica de PI3K.<sup>117</sup> Això fa que les vies PI3K-AKT i RAS-MAPK estiguin interconnectades i juguin un paper molt important en la tumorigènesi. Aquesta idea queda reforçada ja que s'ha observat (en línies cel·lulars de càncer de pròstata i en ratolins) que els tumors de pròstata són sensibles als tractaments amb inhibidors d'Akt/mTOR i d'ERK, indicant, per tant, que hi podria haver una sinèrgia important entre les dues vies.<sup>125,126</sup>

AKT és una serin-treonina quinasa que presenta 3 isoformes diferents, **AKT1**, **AKT2** i **AKT3**.<sup>127</sup> També s'ha publicat que AKT pot inhibir la via de Raf-MEK-ERK mitjançant la fosforilació de RAF.<sup>128</sup>

### **1.6.2.2. Alteracions descrites de PIK3CA**

*PI3K* pot ser activada principalment per dos tipus de mecanismes, **mutacions activadores** i **amplificacions**. Més del 80% de les mutacions descrites a la subunitat catalítica *PIK3CA* estan localitzades en els exons 9 i 20 (dominis helical i quinasa respectivament) i hi ha tres codons *hot spot*: E542K, E545K i H1047R.<sup>119</sup> Prèviament a la publicació del nostre article, només hi havia tres estudis que descriuen alteracions de *PIK3CA* en càncer de pròstata.<sup>129-131</sup> El primer estudi<sup>129</sup> trobava una freqüència d'amplificació de *PIK3CA* del 39% en tumors hormono-sensibles i del 50% en tumors hormono-independents mitjançant la tècnica de CGH (comparative genomic hybridization). El segon estudi<sup>130</sup> no va trobar cap mutació de *PIK3CA* en 12 mostres de càncer de pròstata analitzades. Finalment, el tercer article<sup>131</sup> descrivia, per primera vegada, mutacions de *PIK3CA* en una freqüència molt baixa, 2,5% (1 cas mutat de 40 mostres analitzades). En el mateix treball també trobaven una freqüència d'amplificació de *PIK3CA* del 13%.

### **1.6.2.3. Alteracions descrites de PTEN**

La delecció del braç curt del cromosoma 10 (10q23) és una de les alteracions més freqüents en el càncer de pròstata.<sup>29</sup> El 1997 es va descriure *PTEN* (*Phosphatase and tensin homologue*) com un bon gen candidat per a la regió 10q23.<sup>132</sup>

S'han descrit alteracions de *PTEN* en diferents tipus de tumors, com per exemple, en glioblastomes, en càncer de mama, en càncer de pulmó, en melanomes i en càncer de pròstata. Les alteracions somàtiques que s'han descrit de *PTEN* són: **mutacions**, **petites deleccions**, **delecció homozigota (LOH)** i **silenciament epigenètic**.<sup>115,133,134</sup>

En el cas del càncer de pròstata, s'ha observat que la pèrdua funcional de *PTEN* és una de les alteracions més freqüents.<sup>135</sup> Diferents estudis han indicat que l'haploinsuficiència de

*PTEN* podria tenir lloc en les fases inicials del càncer de pròstata i la pèrdua completa d'expressió de *PTEN* tindria lloc en els tumors d'alt grau i estadi.<sup>134,136-138</sup> Les mutacions de *PTEN* en tumors de pròstata localitzats s'han descrit amb una freqüència que va des del 0% al 16% en funció del grau i de l'estadi dels tumors i de la població d'estudi.<sup>29,139</sup> En canvi, la freqüència de mutació en tumors metastàsics s'ha descrit entre el 20 i el 60%.<sup>29,140-144</sup> Pel que fa a la pèrdua d'heterogositat, la freqüència en el càncer de pròstata és del 30-60%.<sup>134</sup>

Per altra banda, també s'ha pogut demostrar que la delecció de *PTEN* indueix càncer de pròstata en ratolins.<sup>145</sup> A més a més, la reintroducció de *PTEN* en línies cel·lulars de càncer de pròstata que no tenen *PTEN* indueix la parada de cicle cel·lular i l'apoptosi mitjançant la regulació negativa de la via de PI3K-AKT.<sup>29</sup>

#### **1.6.2.4. Alteracions descrites d'AKT**

Recentment, s'ha descrit una mutació recurrent d'*AKT1* en diferents tipus de tumors (càncer de mama, càncer de colon, càncer de pulmó i càncer d'ovari)<sup>146,147</sup> amb una freqüència de mutació que varia del 0 al 8%. La mutació es localitza al codó 17 amb un canvi d'àcid glutàmic (E) a lisina (K). La **mutació E17K** causa un canvi conformacional que provoca l'**activació constitucional** d'AKT1 de forma independent a PI3K.<sup>148</sup> En el cas del càncer de pròstata només s'han publicat 3 estudis sobre les mutacions d'*AKT*. En el primer es va detectar un sol cas mutat de 92 casos estudiats, i la mostra mutada presentava una sobreexpressió de proteïna fosforilada (pAKT) per IHQ, suggerint per tant, que la via d'AKT estaria activada.<sup>149</sup> El segon estudi<sup>150</sup> no va trobar cap mutació en 134 casos de pròstata analitzats. El tercer estudi, realitzat pel mateix grup que va publicar el primer article, va ampliar el nombre de mostres fins a un total de 214. Varen trobar 3 mutacions (freqüència de mutació:1,4%) i varen suggerir que les mutacions d'*AKT1* podrien estar associades a fenotips menys agressius, ja que els tres pacients amb tumors mutats tenien una alta supervivència.<sup>151</sup> Per altra banda, recentment, s'ha publicat un estudi<sup>152</sup> que ha analitzat les tres isoformes d'*AKT* mitjançant la tècnica de FISH (fluorescence *in situ*

hybridization). Només la isoforma *AKT1* va presentar amplifacions amb una freqüència d'alteració del 2,6% (1 cas de 38 analitzats).

#### **1.6.2.5. Família RAS i RAF**

La família de l'oncogèn *RAS* està formada per 3 gens diferents, ***KRAS*** (12p12), ***NRAS*** (1p13) i ***HRAS*** (11p15) que codifiquen per una proteïna de 21 kDa.<sup>153</sup> *RAS* s'activa mitjançant factors de creixement i s'uneix a les proteïnes RAF (també anomenades MAPKKs), entre les quals hi ha BRAF, que són les que activaran subseqüentment la fosforilació de MEK1 i MEK2 (MAPKKs) que al seu torn activaran a ERK1 i ERK2 (MAPKs).<sup>154</sup> Per tant, *RAS* activa a les MAPKs i a més pot activar altres proteïnes com per exemple PI3K.<sup>155</sup>

#### **1.6.2.6. Alteracions descrites de KRAS**

La freqüència de mutació del gen *KRAS* en diferents tumors humans és al voltant del 8% (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). En el cas del càncer de pròstata, s'ha descrit un màxim del 13%, encara que hi ha discrepàncies en els diferents articles publicats en funció de la població estudiada, ja que mentre en la població japonesa la freqüència de mutació descrita és del 10%, en el cas de la població americana no s'han trobat mutacions.<sup>74,156-159</sup> De fet, aquesta discrepància és recolzada per l'article publicat per Watanabe *et al.*,<sup>160</sup> els quals van analitzar casos de càncer de pròstata d'autòpsies de diferents ètnies i només van trobar mutacions de *KRAS* en les poblacions japoneses.

#### **1.6.2.7. Alteracions descrites de BRAF**

Recentment, s'han descrit mutacions activadores de *BRAF* en molts tipus diferents de tumors, especialment en melanomes malignes i en carcinomes papil·lars tiroïdals.<sup>158,161,162</sup> El 90% de les mutacions descrites es troben en el **codó 600** i en el cas del càncer de pròstata s'han trobat 3 tipus diferents de mutacions: GTG→GCG (V600A), GTG→ATG (V600M) i GTG→GAG (V600E). Pel que fa a la freqüència de mutació descrita en

càncer de pròstata, només s'han publicat tres estudis. El primer estudi<sup>162</sup> realitzat en un mostra de 17 pacients caucàsics no va trobar cap mutació. Per contra, el segon estudi,<sup>158</sup> realitzat en una població asiàtica, va descriure una freqüència de mutació del 10%. Finalment, el tercer estudi<sup>163</sup> realitzat en població americana no va detectar cap mutació en els 93 tumors analitzats.

Malgrat que les mutacions de *RAS* i *RAF* són poc freqüents en el càncer de pròstata s'ha descrit que aquesta via està alterada en els càncers de pròstata avançats.<sup>164</sup> A més a més, també s'ha descrit que l'activació de *RAF* o *RAS* en l'epiteli de pròstata de ratolí causa l'activació de la via de les MAPK i promou la formació de tumors.<sup>165,166</sup> Recentment, s'ha publicat<sup>167</sup> que una petita part dels tumors agressius podrien tenir una translocació dels gens *BRAF* o *CRAF* causant l'activació d'aquests i, per tant, es pensa que potser podria haver-hi altres mecanismes implicats en l'activació de la via, a més de les mutacions.

### **1.6.3. Altres gens freqüentment alterats en càncer de pròstata**

#### **1.6.3.1. *GSTP1***

El gen de la glutatió S-transferasa Pi (*GSTP1*) s'ha suggerit com un dels **gens supressors de tumors** més importants en el càncer de pròstata.<sup>30,44</sup> Les glutatió S-transferases són un conjunt d'enzims que prevenen l'aparició de càncer ja que catalitzen la conjugació de substàncies carcinogèniques i oxidants.<sup>168</sup> S'ha demostrat que en el càncer de pròstata el gen *GSTP1* s'inactiva mitjançant **hipermetilació del promotor** en més del 90% dels tumors,<sup>169,170</sup> i es creu que aquest procés tindria lloc en les etapes inicials del càncer de pròstata. *GSTP1* podria ser un bon marcador per detectar tumors òrgan-confinats i també es podria utilitzar per detectar tumors en aquelles biòpsies en les quals hi ha poca mostra.<sup>171</sup> També s'ha observat que el 60% de casos de PIN presenten la pèrdua d'expressió de *GSTP1* mitjançant hipermetilació de les illes CpG.<sup>172</sup>

La conseqüència de la pèrdua de *GSTP1* és l'increment de la vulnerabilitat davant de carcinògens oxidants com per exemple el 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,,5-b]pyridine (PhIP) que es troba en les carns molt fetes o cremades.<sup>173</sup> En aquest mateix sentit, s'ha

observat que l'expressió de *GSTP1* en la línia cèl·lular androgen-dependent LNCaP causa la inhibició de l'oxidació de l'ADN.<sup>168</sup>

### 1.6.3.2. NKX3.1

La **pèrdua** de la regió 8p21 és un fenomen que té lloc en el 90% dels tumors de pròstata i en el 60% de les lesions tipus PIN.<sup>174,175</sup> El gen candidat per aquesta regió és *NKX3.1* (*NK3 transcription factor related focus 1*) el qual té un paper essencial en el desenvolupament de la pròstata i del càncer de pròstata.<sup>44</sup>

*NKX3.1* és el primer gen marcador conegut que s'expressa en el desenvolupament de la pròstata i es detecta en les cèl·lules luminals. S'ha observat en ratolins que la pèrdua de *NKX3.1* causa defectes en la secreció prostàtica i en la morfogènesi dels conductes ductals.<sup>176</sup>

La pèrdua de *NKX3.1* està relacionada amb la progressió del càncer de pròstata. Així, per exemple, s'ha descrit que la pèrdua de *NKX3.1* té lloc en el 20% dels casos de PIN, en el 6% dels tumors de baix grau, en el 22% dels tumors d'alt grau, en el 34% dels tumors androgen-independents i en el 78% dels tumors metastàsics.<sup>177</sup>

El gen *NKX3.1* també té molt d'interès ja que s'uneix a l'ADN i reprimeix al gen *PSA*.<sup>178</sup> A la vegada, la pèrdua de *NKX3.1* provoca l'augment de les concentracions de PSA típic en la progressió del càncer de pròstata.

### 1.6.3.3. AMACR

L'enzim AMACR (alpha-methylacyl-CoA Racemase) **participa en el procés de la  $\beta$ -oxidació** de certs tipus d'àcids grassos<sup>179</sup> i s'ha identificat com un gen implicat en el desenvolupament del càncer de pròstata.<sup>30</sup>

La proteïna funcionalment activa es troba específicament sobreexpressada en l'epiteli de càncer de pròstata en comparació amb l'epiteli benigne. Els experiments amb microarrays d'ADN també han demostrat que *AMACR* és un dels gens més sobreregulats en tumors de pròstata.<sup>179-182</sup>

*AMACR*, però, també s'ha vist sobreexpressat en les lesions de tipus PIN, especialment en el PIN d'alt grau<sup>115,181,183</sup> i en glàndules normals.<sup>184,185</sup>

Malgrat les limitacions, pel que fa a la sensibilitat i especificitat, *AMACR* s'ha convertit en un marcador de gran ajuda per diagnosticar càncer de pròstata en biòpsies amb imatges dubtoses.<sup>186</sup>

#### **1.6.3.4. *TMPRSS2***

Estudis recents han identificat un reordenament cromosòmic que activa als factors de transcripció de la família ETS (*ERG*, *ETV1* i *ETV4*) en una gran quantitat de tumors de pròstata.<sup>187-193</sup>

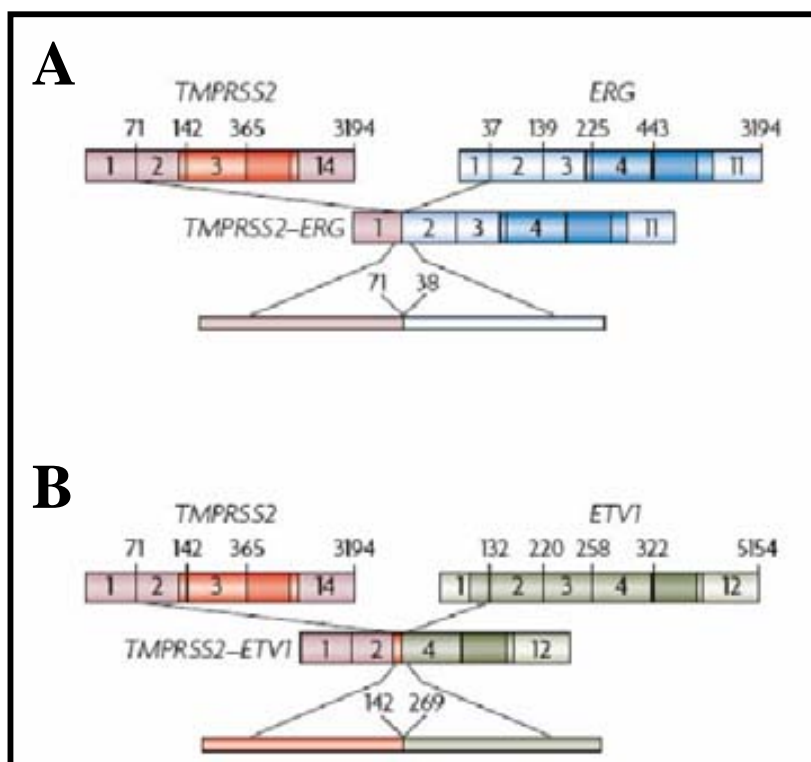
El reordenament més comú és el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* que genera una proteïna truncada d'*ERG* sota el control del promotor del gen *TMPRSS2*. *TMPRSS2* és una serin proteasa transmembrana que depèn de l'acció dels andrògens.<sup>187,189,194-196</sup> La **fusió de *TMPRSS2-ERG*** té lloc en una freqüència del 15% en les lesions de PIN d'alt grau i en un 50% en els tumors localitzats,<sup>191,197,198</sup> suggerint doncs, que aquestes reorganitzacions cromosòmiques tenen lloc tant en les fases inicials del desenvolupament del càncer com en la progressió tumoral.

*TMPRSS2* i *ERG* es troben en el cromosoma 21q22 i estan separats per 3Mb. La fusió té lloc generalment entre els exons 1 o 2 de *TMPRSS2* i els exons 2, 3, 4 o 5 d'*ERG* [**Figura 14**] i es genera per delecció (fenomen més freqüent) o bé per una translocació no balancejada intercromosòmica.<sup>189,194</sup>



Pel que fa als altres gens de fusió que es formen amb *TMPRSS2*, per exemple, *ETV1* i *ETV4*, constitueixen menys del 10% dels gens de fusió formats en el càncer de pròstata.<sup>3, 199</sup>

Malgrat l'elevada incidència d'aquest tipus de reordenaments cromosòmics, no es coneix realment la seva implicació funcional. S'han realitzat experiments de immunoprecipitació que han demostrat que ERG és capaç d'unir-se als gens diana del receptor d'andrògens i que també pot inhibir la via de senyalització d'aquest, contribuint al desenvolupament dels tumors androgen-independents.<sup>200</sup>



**Figura 14.** A) Gen de fusió TMPRSS2-ERG. B) Gen de fusió TMPRSS2-ETV1. Extret de Kumar-Shinha *et al.* 2008.

Els mètodes més utilitzats per detectar aquests gens de fusió han estat la qRT-PCR (real Time-PCR quantitativa) i FISH. Recentment, Park *et al.*<sup>201</sup> també han descrit, per primera vegada, un anticòs anti-ERG que correlaciona molt bé els nivells proteics d'ERG amb els reordenaments cromosòmics.

### **1.7. Perfils d'expressió genètica del càncer de pròstata**

El principal avantatge de les plataformes de microarrays d'ADN és la possibilitat d'**analitzar simultàniament l'expressió de milers de gens**.<sup>202</sup> Aquesta tecnologia es pot aplicar per obtenir dades d'expressió gènica que permeten, per exemple, la detecció de biomarcadors implicats en processos biològics, classificació de malalties complexes, estudis farmacogenòmics i detecció de formes d'*splicing* alternatiu.

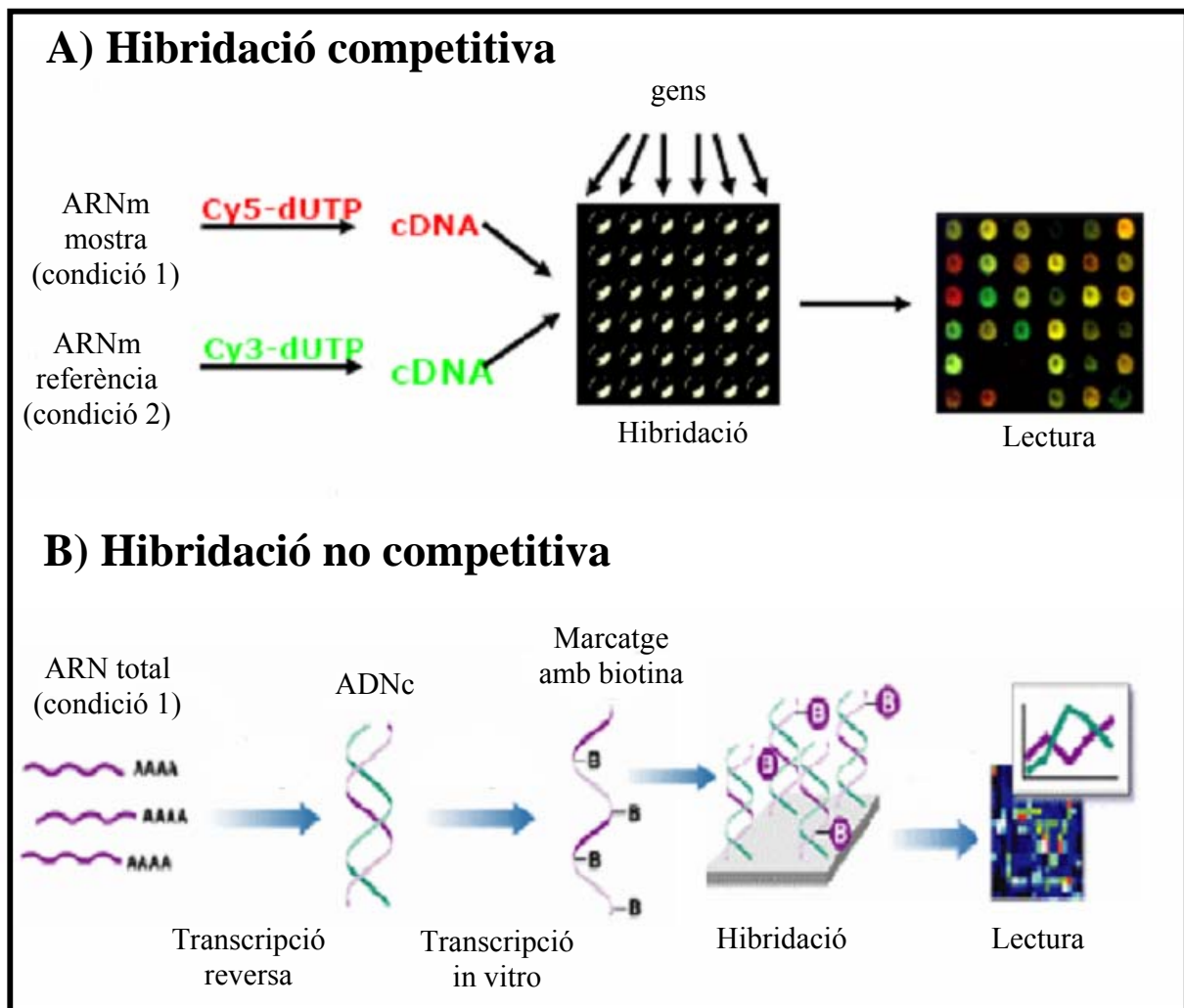
Un microarray o xip d'ADN conté una gran quantitat de molècules d'ADN adherides sobre un suport sòlid i disposades de forma ordenada formant una matriu de seqüències de dues dimensions. Aquests fragments de material genètic poden ser seqüències curtes d'oligonucleòtids o seqüències llargues d'ADN complementari (ADNc). Aquests fragments d'ADN monocatenaris immobilitzats en el suport sòlid s'anomenen sondes i de cada una de les sondes n'hi ha milers de còpies per pou. El processament de la mostra d'ARN consisteix en un primer pas de retrotranscripció, una amplificació i, posteriorment, un marcatge. Aquest últim es pot realitzar utilitzant diferents mètodes (fluorescents, enzimàtics, etc). A continuació, l'ADN marcat s'incuba amb les sondes dipositades en el suport sòlid permetent així, que hi hagi la hibridació de les seqüències homòlogues. Posteriorment, es realitzen rentats amb la finalitat de què només romanguin al xip aquells ADNs que estiguin units específicament a les sondes, obtenint, mitjançant un escàner, imatges de fluorescència per cada sonda. Finalment, es genera una matriu de dades amb els valors d'expressió de cada sonda i aquestes dades podran ser analitzades mitjançant eines bioinformàtiques.<sup>202</sup>

### 1.7.1. Tipus de microarrays

Existeixen bàsicament dos tipus diferents de microarrays: **arrays d'ADNc** i **arrays d'oligonucleòtids**, entre els quals trobem els GeneChips d'Affymetrix ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)).<sup>203</sup>

En els microarrays d'ADNc, l'ADN dipositat en el suport físic són oligonucleòtids sintètics d'entre 25 i 80 parells de bases. En canvi, en els arrays d'oligonucleòtids, les seqüències immobilitzades són de 25 nucleòtids. L'altra gran diferència entre els dos tipus de microarrays és que els arrays d'ADNc són molt econòmics i tenen una alta flexibilitat en el disseny experimental, però a la vegada presenten una baixa reproductibilitat i una baixa especificitat (hibridació creuada) i contenen poques sondes/gen (baixa densitat). En canvi, els arrays d'oligonucleòtids requereixen un equipament més especialitzat amb un elevat cost econòmic i tenen poca flexibilitat, però la fabricació és més ràpida i més robotitzada, amb una elevada reproductibilitat i especificitat i amb moltes sondes/gen (alta densitat).

Per altra banda, existeixen dos tipus diferents d'**hibridació** de la mostra, la **competitiva**, també anomenada de 2 colors, i la **no competitiva**. Els arrays d'ADNc sempre s'hibriden de forma competitiva i els arrays d'oligonucleòtids generalment s'hibriden de forma no competitiva (és el cas dels arrays d'Affymetrix) però també es poden hibridar de forma competitiva (és el cas dels arrays d'Agilent). En la hibridació competitiva es parteix de dues mostres diferents d'ARN (condició 1 i condició 2) que es retrotranscriuen a ADNc, es marquen amb fluorocroms diferents (generalment Cy3 i Cy5), es barregen i s'hibriden conjuntament en un mateix microarray. Els valors d'expressió, doncs, són sempre relatius a la mostra amb la que s'hibriden competitivament, no tenint mai valors absoluts. Per contra, en el cas de la hibridació no competitiva cada mostra s'hibrida en un microarray, es marca generalment amb biotina-estreptavidina i s'excita amb un làser a una longitud d'ona concreta. Els valors obtinguts indiquen la quantitat absoluta de cada transcrit que hi havia a la mostra inicial, permetent tenir valors absoluts d'expressió de cada mostra. Aquest fet, facilita la comparació de diferents patrons o condicions [Figura 26].



**Figura 26.** Imatge comparativa entre els 2 tipus d'hibridació de microarrays d'expressió. A) Hibridació competitiva i B) Hibridació no competitiva.

Finalment també es poden classificar els arrays segons la densitat de sondes que contenen: **alta densitat** i **baixa densitat**. L'empresa líder en la comercialització d'arrays d'alta densitat és Affymetrix amb un 60% del mercat total, encara que també hi ha altres companyies líders com Agilent, Illumina i Nimblegen. El principal avantatge d'aquest tipus d'arrays és que permeten l'estudi simultani d'una gran quantitat de regions genètiques, la qual cosa els fa molt atractius per a la investigació científica. Els arrays de baixa i mitja densitat, per contra, solen utilitzar-se per traslladar a una escala més pràctica els resultats obtinguts en els arrays d'alta densitat. Així, en els arrays d'alta densitat

L'interès recau en l'alta densitat d'integració i en els arrays de mitja i baixa densitat té molt més pes la fiabilitat, la rapidesa, la simultaneïtat i la flexibilitat. Totes aquestes característiques fan que el principal sector de mercat interessat en els arrays de baixa i mitja densitat sigui el clínic. Dins d'aquest camp Affymetrix també està desenvolupant arrays amb una clara aplicació diagnòstica.

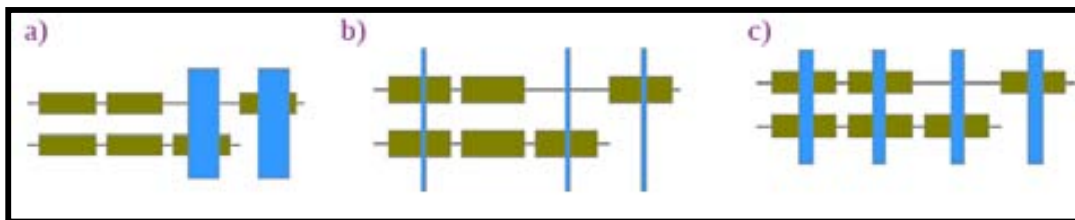
Els microarrays d'expressió d'Affymetrix els podem dividir en dos grups: els **arrays 3'**, que permeten fer estudis d'expressió gènica a través de sondes localitzades a l'extrem 3' dels gens, i els **whole-transcript expression arrays**, que permeten fer estudis d'expressió amb sondes distribuïdes al llarg de tot el gen, no només a l'extrem 3', conferint-los, per tant, una major robustesa [Taula 2]. Dins d'aquesta categoria s'hi troben els arrays GeneChip® Gene 1.0 ST i els arrays GeneChip® Exon 1.0 ST. Aquests últims permeten, a part de realitzar estudis d'expressió, fer estudis de splicing alternatiu, ja que disposen d'un elevat nombre de sondes per a cada un dels exons dels gens [Figura 27].

En el nostre treball hem utilitzat el GeneChip® Exon 1.0 ST Array d'Affymetrix, el qual conté més de 5 milions de sondes interrogant 262.000 transcrits. Aquest array, a més a més, té una alta densitat de sondes per gen, essent de mitjana 4 sondes/exó i 40 sondes/gen. D'aquesta manera, podem conèixer l'expressió del genoma complet a nivell genètic i, fins i tot, a nivell exònic. Mitjançant aquesta tècnica podem trobar quins gens es troben sobreregulats i infra regulats en una mostra en concret, comparant-la amb un altra o bé mitjançant un estudi comparatiu entre diverses mostres, en què es compara l'expressió dels gens de grups de mostres de diferents condicions.

Malgrat que els arrays són una eina molt potent per la gran quantitat de dades d'expressió genètica que generen, els resultats sempre s'han de validar mitjançant altres tècniques més sensibles i específiques, com per exemple la qRT-PCR.

Tipus d'arrays	Espècie	Nom de l'array
3' arrays	Humà *	GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array
		GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array
	Ratolí	GeneChip® Mouse Genome 430A 2.0 Array
		GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array
	Rata	GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array
	Altres espècies	Arabidopsis Genome Array
		Bovine Genome Array
Etc.		
Whole-transcript expression arrays	Humà	GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array
		GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array
	Ratolí	GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Array
		GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array
	Rata	GeneChip® Rat Exon 1.0 ST Array
		GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array

**Taula 2.** Catàleg dels arrays d'expressió que comercialitza Affymetrix. (\*) Només es fa referència als arrays més actuals.



**Figura 27.** Diferents tipus d'arrays d'alta densitat que comercialitza Affymetrix. A) Sondes presents en els arrays 3' B) Sondes presents en els arrays GeneChip® Gene 1.0 ST C) Sondes presents en els arrays GeneChip® Exon 1.0 ST. Font: Design and Performance of the GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 and Human Genome U133A 2.0 Arrays. Affymetrix Technical Note. [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)

Els estudis amb ARN, però, també presenten alguns inconvenients, com per exemple que els nivells d'ARNm no tenen perquè reflexar els nivells proteics. Així, per exemple, es poden donar situacions en què els nivells d'ARNm es trobin elevats però sense que això comporti una traducció a nivell de proteïna, o bé que sí que tingui traducció proteica, però que l'expressió de la proteïna no tingui una conseqüència fisiològica. Aquest seria el cas de proteïnes que es tradueixen però que la proteïna que es genera és truncada, essent per tant, no funcional.

### **1.7.2. Estudis d'arrays en càncer de pròstata**

Desconeixem quines alteracions moleculars estan implicades en el pas d'un adenocarcinoma prostàtic de baix grau cap a un tumor d'alt grau amb una evolució clínica més agressiva i és, en aquesta situació, on més s'està aplicant la tecnologia dels microarrays. El coneixement d'aquests canvis moleculars permetria desenvolupar marcadors pronòstic fiables i potencialment detectables en el sèrum. Aquests marcadors també podrien servir per dissenyar estratègies terapèutiques més adequades segons el risc de progressió de cada pacient. Finalment, a partir d'aquesta informació, es podrien desenvolupar noves dianes terapèutiques moleculars ajustades a cada fase de la carcinogènesi prostàtica.

La majoria d'estudis realitzats fins al moment en càncer de pròstata que han utilitzat els mètodes d'anàlisi genètic a gran escala s'han centrat en l'estudi de tumors avançats i metastàsics o bé en l'estudi de les diferències genètiques entre teixit normal i teixit tumoral de pròstata. Pocs, però, han distingit específicament entre tumors amb diferent grau de Gleason.<sup>204-206</sup>

En l'estudi publicat el 2002 per **Singh et al.**<sup>204</sup> es descrivia una **signatura de 29 gens** que permetia discriminar els diferents tumors en funció del grau de Gleason. Van analitzar un total de 52 mostres tumorals (24 tumors amb Gleason 6, 22 tumors amb Gleason 7 i 6 tumors amb Gleason  $\geq 8$ ). D'aquests 29 gens, 14 correlacionaven negativament amb el grau de Gleason i 15 gens correlacionaven positivament. Singh et al.<sup>204</sup> però, no van trobar cap correlació entre aquesta signatura de gens i les característiques clíniques o patològiques dels tumors analitzats (nivells de PSA, edat del pacient, pronòstic del pacient, etc).

El 2004 **Lapointe et al.**<sup>205</sup> van descriure una **signatura de 52 gens** (41 gens sobreexpressats i 11 gens infraexpressats), analitzant un total de 62 mostres, classificades en dos grups, tumors de baix grau i tumors d'alt grau. Per validar aquests resultats van triar un parell de gens, *AZPG1* i *MUC1* i van dur a terme IHQ en un set independent de 225 tumors primaris de pròstata dels quals tenien un seguiment clínic de com a mínim 5 anys.

L'expressió positiva d'AZGP1 i l'expressió negativa de MUC1 van associar-se amb un major temps lliure de malaltia, demostrant que l'expressió proteica d'AZGP1 i MUC1 podien ser bons predictors de la recurrència tumoral, independentment del grau de Gleason, de l'estadi i del PSA preoperatori.

El 2006 True *et al.*<sup>206</sup> van descriure **una signatura de 86 gens**, classificant els tumors en dos grups: tumors de baix grau (grau de Gleason 3) i tumors d'alt grau (graus de Gleason 4 i 5). En aquest estudi es van analitzar 32 mostres diferents procedents de 29 pacients. Mitjançant microdissecció làser, es van seleccionar específicament 3 patrons de Gleason diferents: 12 mostres amb grau 3, 12 mostres amb grau 4 i 8 mostres amb grau 5. Aquesta signatura de 86 gens, dels quals 70 gens estaven sobreexpressats i 16 estaven infraexpressats, va ser capaç de determinar el grau de Gleason d'un grup independent de 30 tumors primaris de pròstata amb un 76% de precisió. True *et al.*<sup>206</sup> també van validar immunohistoquímicament els gens MAOA i DAD1 a partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi amb microarrays. Pel que fa al gen MAOA (implicat en el metabolisme de les amines), es van analitzar un total de 889 mostres de càncer de pròstata i 469 mostres normals de pròstata i els resultats van revelar que els nivells proteics de MAOA eren més elevats en l'epiteli benigne que no pas en l'epiteli normal i que el grau de Gleason 3 tenia uns nivells més baixos de MAOA que no pas les mostres amb Gleasons 4 i 5. Pel que fa al gen DAD1 (implicat en el procés d'apoptosi), es van analitzar 306 mostres amb càncer de pròstata i 131 mostres amb hiperplàsia benigna de pròstata. Els nivells proteics de DAD1 van ser més elevats en les mostres tumorals que no pas en les mostres amb hiperplàsia. I dins de les mostres tumorals, els tumors amb patrons 4 i 5 de Gleason van tenir major expressió que no pas aquells que tenien patró 3.

Finalment, el 2011 Ross *et al.*<sup>32</sup> van analitzar 23 tumors (13 mostres de Gleason 3+3 i 10 mostres de Gleason 4+4) utilitzant microdissecció làser. En total van descriure 670 gens diferencialment expressats entre el patró 6 i el 8. La majoria de gens sobreregulats en els tumors de Gleason 8 estaven localitzats en el cromosoma 8q i la majoria de gens infraregulats en els tumors de Gleason 6 es trobaven en el cromosoma 8p. A més a més, les



vies de senyalització més alterades van ser la del receptor d'andrògens, la del factor de creixement EGFR i les de TNF-alfa i Notch.

Analitzant els treballs previs conjuntament, s'observa que els dos primers estudis només tenen 3 gens (*SPARC*, *BGN* i *COL1A2*) en comú en els seus perfils i que cap d'aquests estan descrits dins de la signatura de True *et al.*<sup>206</sup> ni de Ross *et al.*<sup>32</sup> A més a més, l'únic gen que hi ha en comú entre Lapointe *et al.*<sup>205</sup> i True *et al.*<sup>206</sup> és l'*AZGP1*. Finalment els gens *TCEB1* i *KCTD12* han estat descrits tant per True *et al.*<sup>206</sup> com Ross *et al.*<sup>32</sup> Sorprenentment, no existeix cap gen comú al llarg d'aquests quatre estudis en càncer de pròstata. Això podria justificar-se pel fet que s'han utilitzat diferents plataformes i planteja la necessitat de continuar fent aquest tipus d'estudis en tumors de pròstata.



---

---

## **2. OBJECTIUS**

---

---

**Antígona:** Jo no estic feta per  
compartir l'odi, sinó l'amor

Antígona  
Sófocles



## **2.1 Objectiu general**

Per tal de combatre el càncer de pròstata d'una manera efectiva cal conèixer en detall els mecanismes moleculars a través dels quals el tumor s'estableix, prolifera i s'expandeix. Aquests coneixements ens han de permetre classificar els diferents tipus tumorals en funció de les alteracions que presenten i així poder aplicar el tractament que sigui més específic per cada pacient.

Malgrat que es té coneixement d'algunes alteracions en el càncer de pròstata no se sap amb profunditat quins gens estan implicats en la carcinogènesi pròstàtica. Per tant, l'objectiu general d'aquest treball és ampliar el coneixement de les bases moleculars del càncer de pròstata.

El nostre focus d'interès s'ha centrat bàsicament en dues vies, en primer lloc, estudi dels gens *KLF6* i *TP53* que són reguladors del cicle cel·lular i en segon lloc, estudi de gens implicats en la via de senyalització de PI3K-AKT. Finalment, també hem realitzat microarrays d'expressió amb l'intenció de detectar nous gens o noves vies implicades en la carcinogènesi prostatàtica.

L'interès d'estudiar tots aquests gens és conèixer, al cap i a la fi, la història natural del càncer de pròstata i en última instància preveure i determinar quins pacients presentaran una ràpida progressió i quins evolucionaran més lentament i per tant, poder determinar en quins casos el pacient es podria beneficiar d'un tractament més conservador i en quins casos podria ser més adequat no prendre aquestes mesures.

## **2.2. Objectius desglossats**

L'objectiu general es pot desglossar en els següents objectius concrets:

**Objectiu 1.** Determinar la freqüència de mutació dels gens *KLF6* i *TP53* i avaluar si podrien tenir relació amb els diferents grups clínico-patològics. El plantejament d'aquest

objectiu es basa en la hipòtesi de que els gens implicats en el cicle cel·lular poden ser claus en la carcinogènesi prostàtica i podrien estar diferencialment afectats en les diverses subvarietats clíniques i histopatològiques del càncer prostàtic.

**Objectiu 2.** Determinar la freqüència d'amplificació/sobreexpressió de *PIK3CA*, determinar la freqüència de mutació dels gens *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* i *AKT1* i finalment, determinar els nivells proteics de pAKT. Es parteix de la base que la via de PI3K-AKT és una de les vies més freqüentment alterades en diferents tipus de tumors i en el càncer de pròstata està molt poc estudiada.

**Objectiu 3.** Cercar gens que s'expressin de manera diferencial entre tumors amb diferent grau de Gleason mitjançant la tècnica dels microarrays d'oligonucleòtids. Es pretén buscar gens amb potencial ús com a marcadors amb valor diagnòstic o pronòstic. Els resultats obtinguts en els microarrays es validaran mitjançant l'ús de la tècnica de la PCR a temps real a nivell gènic i d'immunohistoquímica a nivell proteic.

---

---

### ***3. RESULTATS***

---

---

Estadísticament tot s'explica,  
personalment tot es complica

Mal d'escola  
Daniel Pennac





### **3. RESULTATS**

Els resultats d'aquesta tesi es presenten en format de tres articles:

#### **Article 1**

**L.Agell**, S.Hernández, S. de Muga, J.A. Lorente,N. Juanpere, R.Esgueva, S.Serrano, A.Gelabert and J.Lloreta. KLF6 and TP53 mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations. Mod Pathol. 2008 Dec;21(12):1470-8.

#### **Article 2**

**L. Agell**, S. Hernández, M. Salido, S.de Muga, N. Juanpere, M. Arumí-Uria, S. Menendez, M. Lorenzo, JA. Lorente, S. Serrano, and J.Lloreta. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are and infrequent event. Mod Pathol. 2011 Mar;24(3):443-52.

#### **Article 3**

**L. Agell**, S. Hernández, L. Nonell , M. Lorenzo, E. Puigdecamet, S.de Muga, N. Juanpere, R. Bermudi, PL. Fernández, JA. Lorente, S. Serrano, and J.Lloreta. A 12- gene expression signature is associated with aggressive histology in prostate cancer. SEC14L1 and TCEB1 genes are potential markers of progression (pendent d'acceptació, veure annex 3).



### **3.1. Article 1: KLF6 and TP53 mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations**

*KLF6* (Krüppel-like factor 6) s'ha descrit com un gen supressor de tumors implicat en la regulació del cicle cel·lular mitjançant l'activació de p21 d'una manera independent a p53. Molts estudis suggereixen que *KLF6* s'inactiva per pèrdua al·lèlica i per mutació somàtica, malgrat que hi ha una alta variabilitat en la freqüència de mutacions descrites (des de l'1% fins al 55%) en càncer de pròstata. *TP53* també regula el cicle cel·lular mitjançant l'activació de p21. En el càncer de pròstata la freqüència de mutació descrita varia entre el 3% i el 42%. En tots aquests articles hi ha una considerable heterogeneïtat de metodologies emprades. El nostre objectiu ha estat determinar la freqüència de mutació de *KLF6* i *TP53* en un grup ben definit de tumors de pròstata. S'han estudiat els 4 exons de *KLF6* i dels exons 4 al 9 de *TP53* en un grup de 103 casos, 90 procedents de teixit fixat en formol i inclòs en parafina (FFPE) i 13 procedents de teixit fresc. Tots els tumors van ser analitzats per PCR i seqüenciació directa. Tots els canvis van ser confirmats per una segona reacció de PCR i de seqüenciació directa independent. Només es va detectar una mutació (E227G) en un tumor (1%) en el gen de *KLF6* i en el cas de *TP53* es van detectar 3 mutacions diferents (L130H, H214R i Y234C) en 5 tumors (5%). Aquesta baixa freqüència de mutació està en concordança amb els últims articles publicats. El nostre estudi recolza fortament la idea de què les mutacions de *KLF6* i *TP53* no són fenòmens freqüents en el càncer de pròstata. En el cas d'utilitzar mostres procedents de FFPE és obligatori l'ús de com a mínim dos reaccions independents de PCR i seqüenciació per tal de confirmar les mutacions i excloure que els canvis siguin artefactes introduïts per la Taq-polimerasa.





# ***KLF6* and *TP53* mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations**

Laia Agell<sup>1,2,3</sup>, Silvia Hernández<sup>3</sup>, Silvia de Muga<sup>1,2,3</sup>, José A Lorente<sup>2,4</sup>,  
Núria Juanpere<sup>1,2</sup>, Raquel Esgueva<sup>1,2</sup>, Sergi Serrano<sup>1,2</sup>, Antoni Gelabert<sup>2,4</sup>  
and Josep Lloreta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain and <sup>4</sup>Department of Urology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) has been reported to act as a tumor suppressor gene involved in the regulation of the cell cycle by activating p21 in a p53-independent manner. Many studies suggest that *KLF6* is inactivated by allelic loss and somatic mutation. However, there is a high variability in the reported frequency of mutations (from 1 to 55%). *TP53* also regulates the cell cycle through the activation of p21. In prostate cancer, the reported frequency of *TP53* mutations ranges from 3 to 42%. In all these reports, there is a considerable degree of methodological heterogeneity. Our aim was to determine the frequency of *KLF6* and *TP53* mutations in a well-defined group of prostate tumors with different stages and Gleason grades. The four exons of *KLF6* and exons 4–9 of *TP53* were studied in 103 cases, including 90 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) and 13 frozen samples. All tumors were analyzed through PCR and direct sequencing. All changes found were confirmed by a second independent PCR and sequencing reaction. For *KLF6*, mutation (E227G) was only detected in one tumor (1%) and for *TP53*, three different mutations (L130H, H214R, and Y234C) were detected in five tumors (5%). This low mutation index is in keeping with recent papers on the subject. Our study strongly supports the notion that *KLF6* and *TP53* mutations are not frequent events in prostate cancer. When using FFPE tissues, it is mandatory to perform at least two independent rounds of PCR and sequencing to confirm mutations and exclude Taq polymerase-induced artifacts.

*Modern Pathology* (2008) 21, 1470–1478; doi:10.1038/modpathol.2008.145; published online 19 September 2008

**Keywords:** *KLF6*; *TP53*; prostate cancer; mutations; artifacts

Prostate cancer is the third most diagnosed cancer in Spain,<sup>1</sup> and it is the second leading cause of cancer death in American men.<sup>2</sup> Many different genes have been investigated for their potential roles in the development and progression of prostate cancer.<sup>3,4</sup> Two of these genes are Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) and *TP53*.

*KLF6* is a transcription factor that interacts with DNA through three zinc-fingers in its COOH-terminal domain. *KLF6* belongs to the KLF family, a family that is broadly involved in cell differentiation, development, growth-related signal transduc-

tion, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis.<sup>5</sup> It has been suggested that *KLF6* could be involved in the regulation of the cell cycle by activating p21 in a p53-independent manner.<sup>6</sup> This has been proven in several *in vitro*<sup>5</sup> and *in vivo* assays.<sup>7</sup> *KLF6* is believed to regulate cancer development and progression through the downregulation of the c-Jun oncoprotein<sup>8</sup> and the activation of E-cadherin.<sup>9</sup>

The reported frequency of *KLF6* mutations in different types of human cancer varies in the different published studies.<sup>10–29</sup> In prostate cancer, four studies have analyzed the frequency of *KLF6* mutations.<sup>6,30–32</sup> In the first published study, Narla *et al*<sup>6</sup> showed a very high frequency, 55%, whereas in the following study, Chen *et al*<sup>30</sup> obtained a lower frequency, around 15%. The results of two recent reports provided frequencies of 0 and 1%.<sup>31,32</sup> It should be noted that there were considerable

Correspondence: Dr J Lloreta, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail: jlloreta@imas.imim.es

Received 30 May 2008; revised and accepted 6 August 2008; published online 19 September 2008

differences in both the selected cohorts and the methodological approaches of these studies, which could, at least in part, explain the discrepancies in their results.

On the other hand, the reported frequency of loss of heterozygosity (LOH) in prostate cancer ranges from 28 to 77%.<sup>6,30</sup> *KLF6* promoter hypermethylation has been suggested as another possible inactivating mechanism,<sup>23,33–35</sup> although according to some authors<sup>35</sup> epigenetic alterations are not relevant in prostate cancer. Other studies have reported downregulation of *KLF6* mRNA levels in hepatocellular carcinoma (HCC) and in lung cancer cell lines, as well as in prostate cancer cell lines. Decreased expression of *KLF6* has been associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma and prostate cancer.<sup>30,36–39</sup>

The role that *KLF6* polymorphisms play in increasing the risk of developing prostate cancer is also controversial. Narla *et al*<sup>40</sup> proposed that the presence of a germline single-nucleotide polymorphism (SNP) (IVS1 -27G>A) in *KLF6* could produce a splicing variant that would reduce the activation of p21. This polymorphism was associated with an increased risk for prostate cancer,<sup>40</sup> but subsequent reports have shown contradictory results.<sup>32,41–44</sup> Moreover, the R201R polymorphism of *KLF6* has been reported to be of marginal importance in the predisposition of developing prostate cancer in a series of Finnish hereditary prostate cancer patients.<sup>45</sup>

The tumor suppressor gene *TP53* acts in response to diverse cell stress situations by regulating target genes that induce cell-cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism.<sup>46</sup> Like *KLF6*, *TP53* also regulates the cell cycle through the activation of p21.<sup>47</sup> Mutations of *TP53* occur in half of all human tumors.<sup>48</sup> In prostate cancer, the reported frequency of mutation of *TP53* in the different subgroups of prostate cancer is not well defined and ranges from 3 to 42%.<sup>2,49</sup> The vast majority of *TP53* mutations are missense point mutations<sup>50</sup> that affect the DNA-binding domain.<sup>51</sup> Many authors have used immunohistochemistry to evaluate the *TP53* gene status, because some mutations could lead to p53 protein accumulation and immunohistochemical detection. Nevertheless, immunohistochemical overexpression does not necessarily indicate gene mutation.<sup>2</sup> The amount of p53 protein in cells is determined mainly by the rate at which it is degraded through the activity of *HMDM2*. This process is related to a feedback loop, as p53 activates the transcription of *HMDM2*, and *HMDM2* stimulates p53 degradation.<sup>52</sup> It has also been reported that mutations in *TP53* and *CHEK2*, a gene activated in response to various DNA-damaging agents, could be mutually exclusive in 25% of prostate tumors.<sup>53</sup>

From all these studies, it is obvious that, although *KLF6* and *TP53* are important in controlling the cell cycle, their involvement in the pathogenesis of

prostate cancer is still controversial and uncertain. Thus, the main goal of the present study has been to elucidate the real frequency of *KLF6* and *TP53* mutations in a large group of prostate cancer samples classified by stage and Gleason grade and performing more than one round of PCR and sequencing, in order to avoid artifactual mutations and other methodological problems often encountered in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples.

## Materials and methods

### Tumor Samples and Patients

A total of 103 cases of prostate cancer selected from the files of the Department of Pathology at the Hospital del Mar in Barcelona, Spain, are the subject of this report. None of the patients received chemotherapy or hormonal therapy. A total of 90 of them were FFPE samples and 13 were frozen tissues, and none of them were matched. From these 103 cases, 77 were biopsy or prostatectomy specimens, 16 were tumors found at autopsy, so-called latent tumors, 8 were bone, and 2 lymph node metastases. Together, the Gleason grades of the biopsy, surgical, and autopsy specimens were:  $\leq 6$  in 30 cases, 7 in 36 cases, and  $\geq 8$  in 27 cases. In the surgical cases, TNM classification was performed whenever possible. Pathologic stage was pT2a in 6 cases, pT2b in 11 cases, pT3a in 16 cases, and pT3b in 2 cases. Prostatectomy specimens had been completely embedded, and with the tumor foci marked in every section, a map was obtained. Tumor volume was estimated by measuring the main diameters of the foci, considering the number of cross-sections in which they were present and the standard correction factor of 0.4. Many of the surgical cases with Gleason grade 6 had tumor volume greater than 0.5 cm<sup>3</sup>, and some had extra-prostatic involvement or positive margins, features that excluded them from the standard definition of 'insignificant' prostate cancer (ie, organ-confined tumors, with tumor volume 0.5 cm<sup>3</sup> and combined Gleason score 6 with no pattern 4). In a small subset of eight cases, found by needle biopsy and with Gleason 3 + 3, no surgical treatment was performed, and therefore, we lacked any detailed staging information (Supplementary Table 1). Two prostate cell lines (PC3 and DU145) were also included as controls, *TP53* and *KLF6* mutations have been reported in these cell lines.

### *KLF6* and *TP53* Mutation Analysis

Representative tumor areas containing at least 50% and usually around 90% tumor cells were selected and manually microdissected from FFPE tissue sections or frozen tissues. Standard H&E slides

served as templates. DNA was extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) from two to three consecutive 10 µm sections. To avoid the risk of PCR contamination, genomic DNA was extracted in a laboratory where neither PCR reactions were performed nor PCR products handled. *KLF6* exons 1–4 and *TP53* exons 5–8 were amplified by PCR and directly sequenced in all cases. In the 13 cryopreserved samples, exons 4 and 9 of *TP53* were also analyzed. As exon 2 of *KLF6* is very long, it was divided into three regions (2A, 2B, and 2C). The primer sequences and the size of the products used are shown in Table 1. PCR reactions were performed in a 25 µl volume using 10–50 ng of DNA, 0.2 µmol/l for each primer, 200 µmol/l deoxynucleotide triphosphates, 3.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 × PCR II buffer, and 1.5 U of Amplitaq Gold DNA Polymerase (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR conditions were as follows: 95°C (5 min) for 1 cycle, 95°C (40 s), 63°C (40 s), 72°C (40 s) for 40 cycles, and a final extension step of 72°C (5 min). PCR products were separated by electrophoresis and visualized with ethidium bromide. Samples without DNA templates were included in all assays as negative controls. PCR products were purified using the Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol.

**Table 1** Primer sequences, amplified fragment size, and primers' annealing temperatures for *KLF6* and *TP53*

Exon	Primer sequence	Fragment (bp)
<i>KLF6</i>		
1	F TCCGGGGAGACTTTCGGCTC	204
	R CTGTCCGGCCGGCTGCGTTTA	
2A	F AATCACGTGCCTTCTCTGGT	289
	R AAAGTTCCTCGGAGCTGTCA	
2B	F GATGTCAGCAGCGAATCCTC	251
	R TCGCCATTTCCCTTGTCAACC	
2C	F GCGGGACTTCGGGGGAAGCCA	168
	R AATGCAGTGGCGCCACCAG	
3	F AGTGAAGACATGGGCTGCTT	236
	R GCATTGTCTCAGGCACGTA	
4	F GCAAGGGATGGGAACCTAAC	102
	R CTCTCAGCCTGGAAGCCTTT	
<i>TP53</i>		
4	F CACCCATCTAACAGTCCCCCTTG	307
	R CTTGCACGGTCAGTTGCCCTGAG	
5	F TTTCAACTCTGTCTCCTTCTCT	250
	R TGGGCAACCAGCCCTGTCT	
6	F ACGACAGGGCTGGTTGCCCG	200
	R CTCCCAGAGACCCAGTT	
7	F CCTCATCTTGGGCCTGTCTT	210
	R CCAGGGTTCAGCGGCAAGCA	
8	F CTGCTCTTGCTTCTCTTTT	190
	R TCTCCTCCACCGCTTCTTGT	
9	F TTATGCTCAGATTCACCTTTAT	212
	R TGAGCTGTTTTACCTGCAATTG	

*KLF6*, Krüppel-like factor 6.

Non-autopsy cases were collected between 2000 and 2007, and autopsy cases were collected between 1993 and 2006. As most autopsy cases were relatively old, we checked the quality of the DNA by performing a previous control PCR. This multiplex PCR reaction consisted in the amplification of fragments of 100, 200, 300, 400, and 600 bp of the β-actin gene.

Mutation analysis was performed by direct sequencing of purified PCR products with the Big Dye Terminator Kit v.3.1 (PerkinElmer Applied Biosystems) using an ABI PRISM 377 instrument (PerkinElmer Applied Biosystems). Each PCR product was sequenced in both forward and reverse directions. The same sets of primers used for PCR amplification were also used for sequencing. In all cases where a change was identified in the first PCR reaction (42% of the cases for *KLF6* and 28% for *TP53*), an independent PCR amplification and sequencing was performed using the same DNA sample to verify the results. When we identified a new change in this second PCR, we performed a third, independent amplification and sequencing experiment. We considered there to be a confirmed mutation when we found the same change in two independent PCR and sequencing rounds. Taking the first, second, and third independent amplifications of *KLF6* and *TP53* together, the reproducibility of our mutational analysis was about 97%. In some cases, the mutational study could not be completed due to a failure of PCR reaction or small sample size. For this reason, the *KLF6* exon 2A could not be amplified in 10 cases, exon 2B in 5 cases, and exon 3 in 8 cases. For *TP53*, exon 5 could not be amplified in 6 cases, exon 6 in 10 cases, exon 7 in 7 cases, and exon 8 in 7 cases. In summary, amplification was not feasible for 27 exons of *KLF6* in 15 cases and for 30 exons of *TP53* in 17 cases.

## Results

For *KLF6*, a total of 43 changes were found in different exons in the first PCR amplification, 42 in the DNA from FFPE samples, and 1 in the DNA from the frozen samples. In the second independent PCR reaction and sequencing, only five changes were found at exactly the same point. Four of them were confirmed in the FFPE specimens (4 of 42, 9.5%), whereas the only mutation detected in frozen tissue was also confirmed in the second PCR. The other changes (38 of 43, 88.3%) were not confirmed by the second PCR and sequencing reaction.

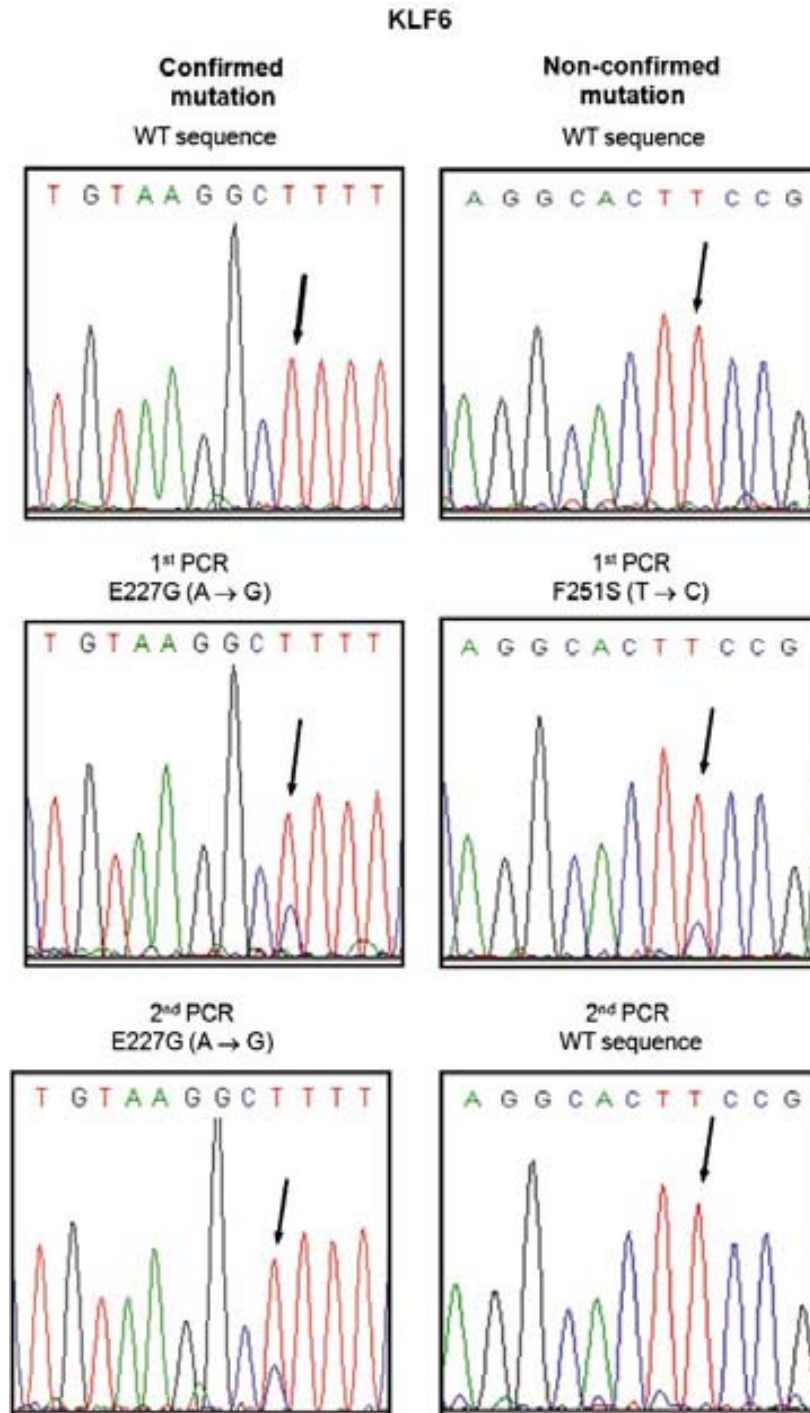
For *TP53*, 29 changes were detected in the first PCR amplification and sequencing reaction. Only 5 changes (17.2%) were confirmed in a second independent PCR reaction and sequencing (5 of 29). No changes in *TP53* were found in the frozen samples.

Thus, the overall frequency of artifacts was 36.9% (38/103) for *KLF6* and 23.3% (24/103) for *TP53*. All

the changes not confirmed in a second PCR and sequencing reaction were found in FFPE cases.

The analysis of the four exons of *KLF6* in the 103 cases revealed two different confirmed genetic mutations in five different tumors. The first change was a missense mutation detected only in one case and generating the transition T→C at codon 227 (Figure 1). This E227G mutation was located in exon

3, and the tumor had a Gleason grade=6. This mutation has not been reported in previous studies. The other change was detected in exon 1 on the 5'-UTR region (-4C>A) (Table 2). This change was detected in two independent PCR and sequencing reactions in four different tumors: two bone metastases, one found in a radical prostatectomy tumor with Gleason grade 8, and one from a grade 6. The



**Figure 1** KLF6 mutation. The change is indicated by an arrow. There was a mutation in exon 3, transition T→C at codon 227.



**Table 2** Summary of mutations found in *KLF6* and *TP53*

Case	Gene	Exon	Genetic change	Type of mutation	Gleason score	Type of sample	FFPE/Fresh tissue
1	<i>KLF6</i>	Exon 3	E227G	Missense	3+3	Clinically significant tumor	FFPE
2	<i>KLF6</i>	5'-UTR	-4C>A	—	3+3	Clinically significant tumor	Fresh tissue
3	<i>KLF6</i>	5'-UTR	-4C>A	—	4+4	Clinically significant tumor	FFPE
4	<i>KLF6</i>	5'-UTR	-4C>A	—	—	Bone metastases	FFPE
5	<i>KLF6</i>	5'-UTR	-4C>A	—	—	Bone metastases	FFPE
6	<i>TP53</i>	Exon 5	L130H	Missense	4+3	Clinically significant tumor	FFPE
7	<i>TP53</i>	Exon 5	L130H	Missense	4+4	Clinically significant tumor	FFPE
8	<i>TP53</i>	Exon 5	L130H	Missense	3+3	Autopsy	FFPE
9	<i>TP53</i>	Exon 6	H214R	Missense	4+5	Clinically significant tumor	FFPE
10	<i>TP53</i>	Exon 7	Y234C	Missense	3+4	Autopsy	FFPE
11	<i>TP53</i>	Exon 6	P223L	Missense	—	DU145	Cell line
12	<i>TP53</i>	Exon 8	V274F	Missense	—	DU145	Cell line

*KLF6*, Krüppel-like factor 6.

exon 1 -4C>A change was previously reported in LAPC-3 and LUCaP49 xenografts by Chen *et al.*<sup>30</sup> Bar-Shira *et al.*<sup>32</sup> described this alteration as a polymorphism, as it was detected in a control population and no statistical difference was found between prostate tumors and control samples.

No mutations in *KLF6* were detected in prostate cell lines PC3 and DU145. This is concordant with previous reports,<sup>31</sup> except for Chen *et al.*<sup>30</sup> who reported a mutation -29A>G in the 5'-UTR of the PC3 cell line.

For *TP53*, three different mutations were identified in five different tumors. Three cases, with Gleason grades 6, 7, and 8, respectively, had the transversion T→A, resulting in the mutation L130H in exon 5. The other two cases harbored the transition A→G, resulting in the mutations H214R in a case with Gleason 9 (Figure 2) and Y234C in a case with Gleason 7 in exons 6 and 7, respectively (Table 2). All the mutations occurred at codons previously reported to be mutated in prostate cancer, as well as in other cancer types ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)). Finally, in 8 of the 13 frozen samples, in which exons 4–9 were also analyzed, the previously reported R72P (G→C) polymorphism was detected ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1042522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1042522)). Three cases were homozygous for that change and five were heterozygous.

In the prostate cancer cell line PC3, no *TP53* mutations were detected, but in the DU145 cell line, two previously reported mutations were found.<sup>54–57</sup> They consisted of a transition C→T in codon 223 of exon 6, generating the missense mutation P223L and a transversion G→T in codon 274 of exon 8, resulting in the missense mutation V274F.

The analysis of *KLF6* and *TP53* revealed one and five truly mutated tumors, respectively. The remaining changes, 38 in *KLF6* and 24 in *TP53*, were artifacts. Most of these non-confirmed mutations involved the change of an adenine, suggesting that they could be artifactual mutations generated by Taq polymerase in the amplification process on FFPE samples.

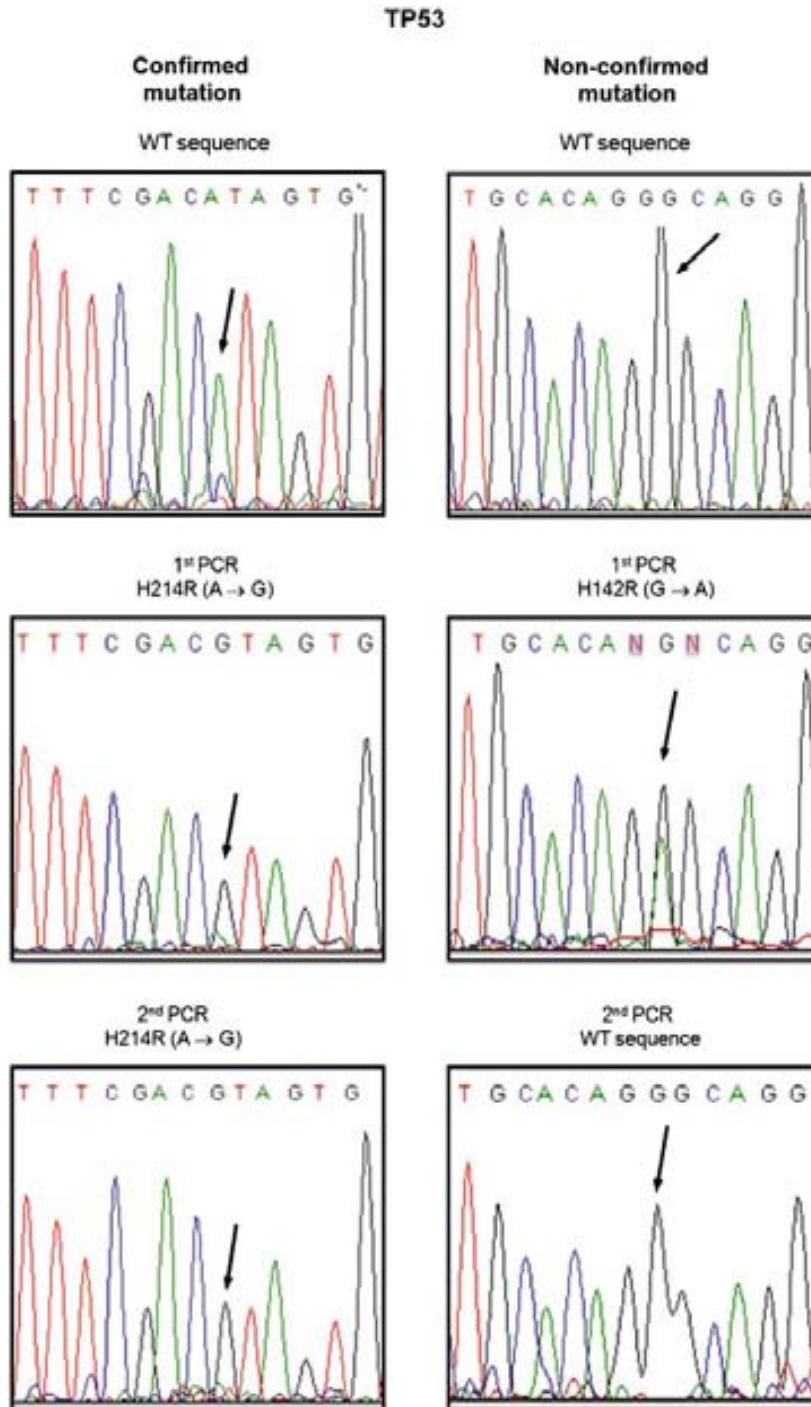
## Discussion

The described analysis of the four exons of *KLF6* in the 103 cases revealed only one real mutation, which generated the transition T→C at codon 227 (E227G). The extensive study of exons 5–8 of *TP53* showed three different mutations in five different tumors (L130H, H214R, and Y234C). The results obtained in the present study showed a very low frequency of mutation in *KLF6* (<1%) and also a low frequency in *TP53* (≈5%). The global rate was approximately 6%, with 6 out of 103 cases harboring mutations. Most of the mutations occurred in cases with a Gleason score of 7 or more, indicating that although *KLF6* and *TP53* are not prevalent in prostate cancer, they tend to occur in tumors with high Gleason scores.

A polymorphism -4C>A 5'-UTR was detected in *KLF6* in four (4%) different cases. Finally, a polymorphism (R72P) was identified in *TP53* in eight (8%) tumors.

In the case of *KLF6* the results are in concordance with the most recently published papers on *KLF6* mutations in prostate cancer,<sup>31,32</sup> and they contrast with the much higher frequencies found in earlier studies.<sup>6,30</sup> The rigorous methodological approach of our study strongly supports that many previously reported *KLF6* mutations were probably artifacts.

It is surprising that, whereas in their initial paper Narla *et al.*<sup>6</sup> reported that about half of their tumors had mutations in the *KLF6* gene, Chen *et al.*<sup>30</sup> subsequently found a lower frequency with only 15% mutations. Moreover, in the third published study, Mühlbauer *et al.*<sup>31</sup> found no *KLF6* mutations in any of their 32 cases. Finally, using a different approach, Bar-Shira *et al.*<sup>32</sup> reported a frequency of mutations of less than 1% with only two mutations in 300 cases. Furthermore, all of the mutations identified in these studies were different. Only Mühlbauer *et al.*<sup>31</sup> confirmed mutations by performing two independent amplification PCRs. In contrast with the other studies, they only analyzed exon 2. None of the other studies included methods to



**Figure 2** TP53 mutation. The change is indicated by an arrow. There was a mutation in exon 6, transition A→G at codon 214.

compensate for the possibility of artifacts being introduced by Taq polymerase. Although Chen *et al*<sup>30</sup> repeated the single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in the cases with band shift in DNA, sequencing was performed only once for one PCR product.

Discrepancies in the frequency of *KLF6* mutations have also been observed in HCC<sup>10–13</sup> (ranging between 0 and 15%) and colorectal carcinoma<sup>14–18</sup> (ranging between 0 and 44%). Similar to prostate

cancer, the first studies conducted on these other tumors indicated a high frequency of mutation, but this was not reproduced in subsequent reports. Song *et al*<sup>12</sup> in a recent study with PCR reactions performed in triplicate experiments, did not find any *KLF6* mutations in HCC. They related the controversial results in the previous series to genetic differences in the respective populations, PCR errors, or alternative splicing of *KLF6* due to a single polymorphism.

In the case of *TP53*, the most recent articles do not deal with the frequency of mutation in this gene. During the first years of *TP53* research in prostate cancer, many articles were published on this subject, and the reported frequency of mutation ranged from 3 to 42%.<sup>2,49</sup> The IARC database ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)) reports a prevalence of 17%. Some authors have postulated that *TP53* mutations are rare in primary prostate cancer and that they are more common in prostate tumors with higher stage or grade, as well as metastases or androgen-independent tumors.<sup>2</sup> Other authors argue that *TP53* mutations are also a common event in early stages of prostate cancer development.<sup>58</sup> Moreover, some papers report a strong association between prostate cancer bone metastases and a high frequency of *TP53* mutations.<sup>2,59</sup> In our study, no mutations were detected in metastatic tumors, but the number of metastatic cases was low. Meyers *et al*<sup>59</sup> performed PCR-SSCP and immunohistochemistry to detect somatic DNA alterations, but they only sequenced one case. The sensitivity of the PCR-SSCP technique to detect true mutations is lower than that of other currently used methods, such as direct sequencing. Many authors have used immunohistochemistry to evaluate the *TP53* gene mutation.<sup>2,59</sup> It is thought that some mutations generate an abnormal protein that is not adequately metabolized and accumulates in the nucleus, allowing its immunohistochemical detection. In any event, immunohistochemical overexpression does not necessarily indicate gene mutation, as the protein accumulation may result from abnormalities in other genes involved in *TP53* regulation and metabolism.<sup>2</sup>

In their paper, Mühlbauer *et al*<sup>31</sup> reported a 12% frequency of *TP53* mutations (3 out of 25). Their results are in keeping with the previous literature on the subject and are similar to the results of the present study.

A detailed methodological analysis of our results and those of the previous reports suggests that many of the discrepancies can be explained by technical issues. The fact that most molecular studies on prostate cancer use FFPE, whereas studies on other tumor types use frozen tissue sections as a source of DNA, is a crucial difference and must be examined with care. In the case of prostate cancer, the difficulties in retrieving fresh or frozen tumor tissue are obvious, as the gross appearance of prostate cancer is often very similar to that of normal, inflamed, or hyperplastic prostatic tissue. As a consequence, most molecular studies on prostate cancer are based on paraffin-retrieved material. This was the case in all four previous molecular studies on *KLF6*. The denaturation of DNA at AT-rich regions as a result of formaldehyde fixation, with the subsequent generation of free pyrimidine and purine residues, is well documented in the literature.<sup>60-63</sup> As a result of this phenomenon, Taq polymerase tends to insert adenosines when no template base is present, thus producing artificial

mutations that are subsequently amplified throughout the PCR process. The number of errors introduced by Taq polymerase in fresh tissue samples is in the order of 1 in every 10<sup>5</sup> base pairs, whereas in FFPE, it has been estimated at 1 in 500. The chances of finding the same artifact in a second independent PCR are extremely low. Therefore, this second PCR and sequencing reaction is mandatory on all FFPE samples in which a sequence change has been identified. Our results further support this notion, as all the artifacts in our cases were detected in FFPE tissue, whereas no artifacts were detected in frozen samples.

Different fixation protocols have been used to prevent DNA integrity problems.<sup>64</sup> However, none of the available fixatives ensures a complete preservation of DNA, and it is important to emphasize that the artifacts are induced not by fixation, but by Taq polymerase itself. In our retrospective study, we used one of the standard, buffered neutral formalin preparations. In order to exclude false-positive sequence mutations, we only accepted changes that were confirmed by two independent PCR amplifications. Interestingly, the initial frequency of mutation, including all detected changes, would have been around 42% for *KLF6* and 28% for *TP53*, a rate that is similar to those found in the early reports on both genes. In our study, most of these non-confirmed mutations (70%) were transitions or transversions involving the addition of an adenine. The impact of artifactual changes on DNA sequence is also exemplified in other reports. As such, in a previous study on *EGFR*<sup>65</sup> in lung cancer, many of the uncommon *EGFR* mutations found initially were discarded after performing multiple amplifications.

The different frequency of artifacts for *KLF6* and *TP53* (36.9% for *KLF6* and 23.3% for *TP53*) can be explained by the different number of base pairs (bp) amplified in each gene, namely 1250 bp for *KLF6* and 850 bp for *TP53*. Thus, the real proportion of artifacts introduced by Taq polymerase is very similar in both genes.

One of the suggested explanations for the discrepancies among the different authors relies on genetic differences in the populations studied, including diverse racial subgroups and variability in risk factors. But, in fact, this would be tenable only for very specific papers, as most of them have dealt with heterogeneous racial or geographical backgrounds.

It has recently been suggested that *KLF6* mutation may not be the only mechanism by which this gene could be involved in the pathogenesis of prostate cancer. DiFeo *et al*<sup>66</sup> pointed out that there are three different *KLF6*-inactivating mechanisms: LOH and somatic mutation, hypermethylation of the promoter, and dysregulated alternative splicing. They suggested that only the first and third mechanisms would be involved. Recent reports by Narla *et al*<sup>7</sup> support the notion that the loss of one *KLF6* allele, even in the absence of somatic mutations in the

remaining one, could be enough to contribute to cell proliferation and tumor development. The exact mechanism by which this would be effective is still unknown. Further studies are needed to investigate alternative mechanisms by which *KLF6* could be involved in the pathogenesis of prostate cancer.

On the other hand, the low index of *TP53* mutation could probably be assumed by the hypothesis that other molecules implicated in the p53 pathway, such as HMDM2, p14<sup>ARF</sup> or PI3K, may be altered.

In conclusion, the present study strongly supports the notion that *KLF6* as well as *TP53* mutations are not frequent events in prostate cancer, although they may occur in cases with a high Gleason score. Thus, the mutations in these two genes are not crucial in the pathogenesis of prostate cancer. Our study also emphasizes the need for carefully controlling DNA quality and for confirming sequence changes with independent amplification and sequencing rounds, in order to obtain reliable results in mutational studies.

## Acknowledgements

Grants FIS/Instituto de Salud Carlos III 965190005 and 06/1411, from the Ministry of Health of the Spanish Government and Support Grant 2006 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board).

## References

- 1 Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quinatas Viqueira A. Epidemiological situation of prostate cancer in Spain. *Actas Urol Esp* 2006;30:574–582.
- 2 Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006;15:433–447.
- 3 Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, *et al*. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett* 2007;249:5–13.
- 4 Kopper L, Tímár J. Genomics of prostate cancer: is there anything to translate? *Pathol Oncol Res* 2005;11:197–203.
- 5 Bieker JJ. Krüppel like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001;276:34355–34358.
- 6 Narla G, Heath KE, Reeves HL, *et al*. *KLF6*, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001;294:2563–2566.
- 7 Narla G, Kremer-Tal S, Matsumoto N, *et al*. *In vivo* regulation of p21 by the Krüppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2007;26:4428–4434.
- 8 Slavin DA, Koritschoner NP, Prieto CC, *et al*. A new role for the Krüppel-like transcription factor *KLF6* as an inhibitor of c-Jun proto-oncoprotein function. *Oncogene* 2004;23:8196–8205.
- 9 DiFeo A, Narla G, Camacho-Venegas O, *et al*. E-cadherin is a novel transcriptional target of the *KLF6* tumor suppressor. *Oncogene* 2006;25:6026–6031.
- 10 Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, *et al*. Frequent inactivation of the tumor suppressor Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;40:1047–1052.
- 11 Boyault S, Herault A, Balabaud C, *et al*. Absence of *KLF6* gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2005;41:681–682.
- 12 Song J, Kim CJ, Cho YG, *et al*. Genetic and epigenetic alterations of the *KLF6* gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1286–1289.
- 13 Pan XC, Chen Z, Chen F, *et al*. Inactivation of the tumor suppressor Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) by mutation or decreased expression in hepatocellular carcinomas. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7:830–836.
- 14 Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, *et al*. Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:1090–1103.
- 15 Lievre A, Landi B, Cote JF, *et al*. Absence of mutation in the putative tumor-suppressor gene *KLF6* in colorectal cancers. *Oncogene* 2005;24:7253–7256.
- 16 Cho YG, Choi BJ, Kim CJ, *et al*. Genetic alterations of the *KLF6* gene in colorectal cancer. *APMIS* 2006;114:458–464.
- 17 Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, *et al*. Difference in the role of loss of heterozygosity at 10p15 (*KLF6* locus) in colorectal carcinogenesis between sporadic and familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Oncology* 2007;71:131–135.
- 18 Mukai S, Hiyama T, Tanaka S, *et al*. Involvement of Krüppel-like factor 6 (*KLF6*) mutation in the development of nonpolypoid colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;29:3932–3938.
- 19 Cho YG, Kim CJ, Park CH, *et al*. Genetic alterations of the *KLF6* gene in gastric cancer. *Oncogene* 2005;24:4588–4590.
- 20 Chen HK, Liu XQ, Lin J, *et al*. Mutation analysis of *KLF6* gene in human nasopharyngeal carcinomas. *Ai Zheng* 2002;21:1047–1050.
- 21 Vax VV, Gueorguiev M, Dedov II, *et al*. The krüppel-like transcription factor 6 gene in sporadic pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:397–402.
- 22 Ito G, Uchiyama M, Kondo M, *et al*. Krüppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3838–3843.
- 23 DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, *et al*. Roles of *KLF6* and *KLF6-SV1* in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2006;12:3730–3739.
- 24 Jeng YM, Hsu HC. *KLF6*, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2003;105:625–629.
- 25 Kohler B, Wolter M, Blaschke B, *et al*. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene *KLF6* in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer* 2003;105:625–629.
- 26 Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G. *KLF6* is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer* 2003;105:625–629.
- 27 Koivisto PA, Zhang X, Sallinen SL, *et al*. Absence of *KLF6* gene mutations in human astrocytic tumors and cell lines. *Int J Cancer* 2004;111:642–643.
- 28 Camacho-Venegas O, Narla G, Teixeira MS, *et al*. Functional inactivation of the *KLF6* tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *Int J Cancer* 2007;16:1390–1395.
- 29 Teixeira MS, Camacho-Venegas O, Fernandez Y, *et al*. *KLF6* allelic loss is associated with tumor recurrence and markedly decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007;9:1976–1983.

- 30 Chen C, Hyytinen ER, Sun X, *et al*. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1349–1354.
- 31 Mühlbauer K-R, Gröne H-J, Ernst T, *et al*. Analysis of human prostate cancers and cell lines for mutation in TP53 and KLF6 tumour suppressor genes. *Br J Cancer* 2003;98:687–690.
- 32 Bar-Shira A, Matarasso N, Rosner S, *et al*. Mutation screening and association study of the candidate prostate cancer susceptibility genes MSR1, PTEN, and KLF6. *Prostate* 2006;66:1052–1060.
- 33 Hirasawa Y, Arai M, Imazeki F, *et al*. Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2006;71:77–85.
- 34 Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, *et al*. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002;2:485–495.
- 35 Ito G, Uchiyama M, Kondo M, *et al*. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3838–3843.
- 36 Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, *et al*. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *J Hepatol* 2007;46:645–654.
- 37 Kettunen E, Anttila S, Seppanen JK, *et al*. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;149:98–106.
- 38 Beer DG, Kardia SL, Huang CC, *et al*. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816–824.
- 39 Glinsky GV, Glinskii AB, Stephenson AJ, *et al*. Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. *J Clin Invest* 2004;113:913–923.
- 40 Narla G, DiFeo A, Reeves HL, *et al*. A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 2005;65:1213–1222.
- 41 Seppala EH, Autio V, Duggal P, *et al*. KLF6 IVS1 -27G>A variant and the risk of prostate cancer in Finland. *Eur Urol* 2007;4:1076–1081.
- 42 Spinola M, Leoni VP, Galvan A, *et al*. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis of lung cancer risk detects the KLF6 gene. *Cancer Lett* 2007; 251:311–316.
- 43 DiFeo A, Feld L, Rodriguez E, *et al*. A functional role for KLF6-SV1 in lung adenocarcinoma prognosis and chemotherapy response. *Cancer Res* 2007;4:965–970.
- 44 Cho YG, Lee HS, Song JH, *et al*. KLF6 IVS1 -27G/A polymorphism with susceptibility to gastric cancers in Korean. *Neoplasma* 2008;1:47–50.
- 45 Koivisto PA, Hyytinen ER, Matikainen M, *et al*. Kruppel-like factor 6 germ-line mutations are infrequent in Finnish hereditary prostate cancer. *J Urol* 2004;2:506–507.
- 46 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;6810:307–310.
- 47 Osman I, Drobnjak M, Fazzari M, *et al*. Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin Cancer Res* 1999;5:2082–2088.
- 48 Soussi T, Wiman TG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 2007;12:303–312.
- 49 Gumerlock PH, Chi SG, Shi XB, *et al*. p53 abnormalities in primary prostate cancer: single-strand conformation polymorphism analysis of complementary DNA in comparison with genomic DNA. *J Natl Cancer Inst* 1997;1:66–71.
- 50 Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 2007;26:2243–2254.
- 51 Zambetti GP. The p53 mutation 'gradient effect' and its clinical implications. *Cell Physiol* 2007;213:370–373.
- 52 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;16:307–310.
- 53 Zheng L, Wang F, Qian C, *et al*. Unique substitution of CHEK2 and TP53 mutations implicated in primary prostate tumors and cancer cell lines. *Hum Mutat* 2006;27:1062–1063.
- 54 Van Bokhoven A, Varella-García M, Korch C, *et al*. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 2003;3:205–225.
- 55 Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, *et al*. Widely used prostate carcinoma cell lines share common origins. *Prostate* 2001;47:36–51.
- 56 Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, *et al*. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1993;23:123–134.
- 57 Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res* 1991;51:4716–4720.
- 58 Downing SR, Russell PJ, Jackson P. Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer. *Can J Urol* 2003;10:1924–1933.
- 59 Meyers FJ, Gumerlock PH, Chi SG, *et al*. Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors. *Cancer* 1998;83:2534–2539.
- 60 Williams C, Ponten F, Moberg C, *et al*. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999;155:1467–1471.
- 61 Hernandez S, Lloreta J. Manual vs laser micro-dissection in molecular biology. *Ultrastruct Pathol* 2006;30:221–228.
- 62 Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 1999;265:4718–4721.
- 63 Quach N, Goodman MF, Shibata D. *In vitro* mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol* 2004;265:4718–4721.
- 64 Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, *et al*. EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded vs frozen specimens. *Cell Oncol* 2007;29:257–264.
- 65 Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F. Assessing EGFR mutations. *N Engl J Med* 2006;2:526–528.
- 66 DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, *et al*. Roles of KLF6 and KSV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2006;12:3730–3739.

Supplementary Information accompanies the paper on Modern Pathology website (<http://www.nature.com/modpathol>)



### **3.2. Article 2: PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are and infrequent event**

Les vies de PI3K-AKT i RAS-MAPK estan desregulades en una gran quantitat de càncers per guany o pèrdua de funció en alguns dels seus components. El nostre propòsit ha estat identificar alteracions genètiques en els membres d'aquestes vies en el càncer de pròstata. S'han analitzat 102 tumors de pròstata, 79 casos que només tenien càncer de pròstata (grup 1) i 23 casos que tenien càncer de pròstata i càncer de bufeta (grup 2). En el grup 2 també es van analitzar els gens *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* i *AKT1* per seqüenciació directa i *BRAF* per piroseqüenciació en 20 de les 23 bufetes. Es va determinar els nivells de mRNA i el número de còpies del gen de *PIK3CA* (FISH) en 25 i 32 tumors de pròstata (grup 1 i 2) respectivament. En 55 tumors de pròstata es va analitzar pAKT per immunohistoquímica. Deu dels 25 (40%) tumors presentaven sobreexpressió de mRNA de *PIK3CA* i la sobreexpressió estava associada estadísticament amb tumors de grau de Gleason  $\geq 7$  ( $p=0.018$ ). El guany de còpies de *PIK3CA* es va detectar en 9 dels 32 (28%) tumors de pròstata. Tres dels 20 tumors de bufeta (15%) tenien mutacions en els gens de *PIK3CA*, *KRAS* i *AKT*, mentre que el corresponent tumor de pròstata era wt. També vam detectar un polimorfisme de *PIK3CA* (IVS9+91), no descrit fins al moment, en dos tumors de pròstata. El 56% dels tumors de pròstata analitzats van presentar sobreexpressió de pAKT. Hi ha associació estadística ( $p < 0.0001$ ) entre l'expressió immunohistoquímica forta de pAKT i els tumors amb alt grau de Gleason i amb les alteracions de *PIK3CA* (sobreexpressió de mRNA i/o guanys de còpies). El gen de *PIK3CA* està desregulat per sobreexpressió i per guany de còpies en el 40% i el 28% dels tumors de pròstata respectivament. Els tumors de pròstata amb alt grau estan associats amb la sobreexpressió però no amb el guany de *PIK3CA*. Les mutacions de *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* i *AKT1* són molt infreqüents en els tumors de pròstata malgrat que la via de PI3K està activada mitjançant el guany de *PIK3CA* i/o la sobreexpressió de mRNA causant un increment en els nivells d'expressió proteica de pAKT.





# PI3K signaling pathway is activated by *PIK3CA* mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* and *AKT1* mutations are infrequent events

Laia Agell<sup>1,2,7</sup>, Silvia Hernández<sup>3,7</sup>, Marta Salido<sup>1,4</sup>, Silvia de Muga<sup>1,2</sup>, Nuria Juanpere<sup>1,2</sup>, Montserrat Arumí-Uria<sup>1,3,5</sup>, Silvia Menendez<sup>5</sup>, Marta Lorenzo<sup>1</sup>, José A Lorente<sup>2,6</sup>, Sergio Serrano<sup>1,2</sup> and Josep Lloreta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Molecular Cytogenetics Laboratory, Department of Pathology, Hospital del Mar-IMAS-IMIM, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Cancer Research Program, IMIM, Barcelona, Spain and <sup>6</sup>Department of Urology, Hospital del Mar-IMAS-IMIM, Barcelona, Spain

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–AKT and RAS–MAPK pathways are deregulated in a wide range of human cancers by gain or loss of function in several of their components. Our purpose has been to identify genetic alterations in members of these pathways in prostate cancer. A total of 102 prostate tumors, 79 from prostate cancer alone (group G1) and 23 from bladder and prostate cancer patients (G2), are the subject of this study. In 20 of these 23, the bladder tumors were also analyzed. *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* and *AKT1* mutations were analyzed by direct sequencing, and *BRAF* also by pyrosequencing. *PIK3CA* quantitative mRNA expression and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) gains were tested in 25 and 32 prostate tumors from both groups (G1 and G2), respectively. Immunohistochemistry for pAKT was performed in 55 prostate tumors. Of 25 prostate tumors, 10 (40%) had *PIK3CA* mRNA overexpression that was statistically associated with Gleason score  $\geq 7$  ( $P=0.018$ ). *PIK3CA* copy gain was detected in 9 of 32 (28%) prostate tumors. Of 20 bladder tumors, 3 (15%) displayed mutations in *PIK3CA*, *KRAS* and *AKT1*, the corresponding prostate tumors being *wt*. We also detected a previously not reported *PIK3CA* polymorphism (IVS9+91) in two prostate tumors. In all, 56% of prostate tumors overexpressed pAKT. There is a statistical association ( $P<0.0001$ ) of strong pAKT immunostaining with high Gleason score, and with *PIK3CA* alterations (mRNA overexpression and/or FISH gains). *PIK3CA* gene is deregulated by mRNA overexpression and DNA gain in ~40 and 28% of prostate tumors, respectively. High-grade prostate tumors are associated with *PIK3CA* mRNA overexpression, but not with FISH status. *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* and *AKT1* mutations are very infrequent events in prostate tumors. However, PI3K signaling pathway is activated by *PIK3CA* FISH gain and/or mRNA overexpression, leading to an increased pAKT protein expression.

*Modern Pathology* (2011) 24, 443–452; doi:10.1038/modpathol.2010.208; published online 26 November 2010

**Keywords:** *AKT1*; FISH; *KRAS*; overexpression; *PIK3CA*; prostate

Correspondence: Dr S Hernández, PhD, Department of Pathology, Hospital del Mar, Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail: silvia.hernandez@upf.edu

<sup>7</sup>These two authors have contributed equally to this paper. Received 28 June 2010; revised 23 August 2010; accepted 23 August 2010; published online 26 November 2010

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway has been described as one of the most frequently deregulated pathways in cancer.<sup>1</sup> PI3K can be activated through interaction with tyrosine kinase receptors<sup>2,3</sup> or through the binding of active RAS to its catalytic subunit.<sup>4</sup> PI3K activity can be counterbalanced by the action of PTEN.<sup>5</sup>

Only the catalytic subunit p110 $\alpha$ , also called *PIK3CA*, has been reported to be mutated and

amplified in different human tumor types.<sup>2,6</sup> The RAS–MAPK and PI3K–AKT pathways are strongly interconnected and have a central role in tumorigenesis. RAS is activated by growth factors and hormone signaling, binding to RAF proteins (also named MAPKKs). The activation of RAF proteins causes the subsequent phosphorylation and activation of MEK1 and 2 (MAPKKs)/ERK1 and 2 (MAPKs).<sup>7</sup> The major downstream target of RAS is MAPKs, but it is also known to activate other targets like PI3K.<sup>8</sup> Furthermore, it has also been published<sup>9</sup> that AKT can inhibit the Raf–MEK–ERK pathway, through the inhibition of RAF phosphorylation.<sup>9</sup>

The PI3K signaling pathway can be activated by two main different mechanisms: activating mutation and amplification. More than 80% of mutations are clustered in exons 9 and 20 (helical and kinase domain) with three hot spot mutations, E542K, E545K and H1047R.<sup>6</sup> To date, only three studies have reported *PIK3CA* alterations in prostate cancer.<sup>10–12</sup> Two of them described *PIK3CA* amplification, and only the most recent study by Sun *et al*<sup>12</sup> found for the first time *PIK3CA* mutations in ~3% of prostate tumors. Data from the ‘Catalogue of Somatic Mutations in Cancer’ ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) reported a mutation frequency of 2%.

*KRAS* mutations have been described in up to 13% of prostate cancers, with differences in the prevalence rates between Japanese and American men.<sup>13–16</sup> Two reports have been published about *BRAF* mutations in prostate tumors, but only Cho *et al*<sup>16</sup> described 10% of mutations in their Asian population. Most of *BRAF* mutations in human cancer consist in the missense mutation V600E<sup>17</sup> (see <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). It has been reported that *BRAF* mutations occur in many tumor types in which *KRAS* is frequently mutated.<sup>16,18</sup>

To date, only one article has reported *AKT1* mutations in prostate cancer. Boormans *et al*<sup>19</sup> described the E17K change in 1 of 92 prostate tumors. The mutated sample presented a pAKT overexpression, suggesting activation of the *AKT* pathway.<sup>19</sup>

In summary, the constitutive activation of the PI3K–AKT and RAS–RAF pathways can result from different and/or complementary aberrant events, including constitutive active mutation, gene amplification, overexpression or loss of function. Although other authors have studied different components of the PI3K–AKT and RAS–RAF pathways, this is the first article in which various members of both pathways have been analyzed together in the same set of prostate samples in order to test their involvement in prostate cancer.

## Materials and methods

### Tumor Samples and Patients

A total of 102 cases of prostate cancer from the files of the Department of Pathology at the Hospital del Mar in Barcelona, Spain, are the subject of this

report. All cases were collected between 1997 and 2008. None of the patients received previous chemotherapy or hormone therapy. In all, 72 cases were formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples, 30 were frozen tissues, and none of them were matched. From these 72 cases, 65 were biopsy or prostatectomy specimens from patients with only prostate cancer (group G1; 7 were needle biopsies), and 23 were from patients who, in addition to prostate cancer, had another independent tumor in the bladder (group G2; 18 from cystoprostatectomy specimens and 5 from patients with radical prostatectomy and transurethral bladder biopsy). Stage and grade of the 23 bladder tumors from group 2 (G2) are shown in Table 1. In 6 patients from G2 with high grade and stage bladder cancer, we selected a previous bladder tumor biopsy with lower grade and stage for comparing molecular changes in *PIK3CA* in both bladder tumor samples. According to the Gleason grade, the 102 prostate samples were: 36 tumors with Gleason = 6, 52 with Gleason = 7 and 14 with Gleason ≥ 8.

### Mutational Analysis (PCR Reaction and Direct Sequencing)

In adequate tumor areas, manual microdissection and DNA extraction from FFPE and frozen tissues was performed as previously described.<sup>20</sup>

In this study, we focused on analyzing the hot spot mutation codons and surrounding exonic regions of *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* and *AKT1* in 81 prostate tumor samples from group G1 and 23 from G2. In group G2, we also performed mutational analysis of 20 corresponding bladder tumors. In addition, we also analyzed the 5' upstream region of exon 20 of *PIK3CA* in 56 samples (50 from group G1 and 6 from G2).

As previous studies have reported the presence of a pseudogene extending from exons 9 to 13 for *PIK3CA*, we designed specific primers for exon 9 in order to amplify only the standard gene sequence of *PIK3CA*.<sup>21–23</sup>

The primer sequences, annealing temperature, PCR product size, exons and hot spot codons analyzed are shown in Table 2.

PCR reactions, product purification (Qiagen, Crawley, UK) and mutational analysis were performed as previously described with the Big Dye Terminator Kit v.3.1 (ABIPRISM 377, PerkinElmer Applied Biosystems).<sup>20</sup> Each PCR product was sequenced in both forward and reverse directions. In all cases where a change was identified in the first PCR reaction, an independent PCR amplification and sequencing experiment was performed.

### BRAF Pyrosequencing Assay

A total of 54 samples were analyzed by pyrosequencing and direct sequencing. PCR amplification primers and annealing temperatures are shown in

**Table 1** Mutational status and pathological features in specimens of the double tumor group (G2)

Case no.	Gleason score	Bladder tumor stage and grade	Double tumor group (G2)		PIK3CA mutational analysis in previous bladder tumor	Previous bladder tumor stage and grade
			PIK3CA, KRAS, BRAF and AKT mutational analysis in matched prostate and bladder tumors			
			Prostate tumor	Bladder tumor		
59	3+4	TaG1	WT	WT	—	—
60	3+3	T3G3	WT	WT	—	—
61	3+3	TaG2	WT	Not done	—	—
62	3+3	T4G3	WT	WT	WT	T1G3
63	4+5	T3G3	WT	WT	—	—
64	3+3	T2G3	WT	WT	—	—
65	3+4	T2G2	WT	WT	WT	TaG2
66	3+3	T4G3	WT	G12V (KRAS)	—	—
67	3+3	TaG3	WT	WT	—	—
68	3+3	T2G3	WT	WT	WT	T1G3
69	3+3	TaG3	WT	WT	—	—
70	3+4	T4G3	WT	WT	—	—
71	3+3	T1G3	WT	WT	—	—
72	3+3	T3G3	WT	WT	—	—
73	4+5	T4G3	WT	WT	WT	TaG3
74	3+3	T2G3	WT	E17K (AKT)	—	—
75	3+3	T3G3	WT	Not done	—	—
76	3+3	T2G3	WT	WT	WT	TaG2
77	4+3	T4G3	WT	WT	WT	T1G2
78	5+4	T2G3	WT	Not done	—	—
79	3+3	T3aG3	WT	E545K (PIK3CA)	—	—
80	3+4	T1G3	WT	WT	—	—
81	3+4	T2G3	WT	WT	—	—

The shaded words represent the specific mutation and the gene abbreviation.

**Table 2** Primer sequences, amplified fragment size and annealing temperatures for PIK3CA, KRAS, BRAF and AKT1, and BRAF pyrosequencing

Exon		Primer sequence	Fragment (bp)	Hot spot codon	Temperature
PIK3CA	9	F	5'-AAAGCAATTTCTACACGAGATCCT-3'	191	542, 545
		R	5'-GGAATAAATAAAGCAGAATTTACA-3'		
	20A	F	5'-GCTCCAAACTGACCAAAC-3'	209	—
		R	5'-CTGAGCAAGAGGCTTTGG-3'		
20B	F	5'-TTCGAAAGACCCTAGCCT-3'	182	1047	
	R	5'-GCTCACTCTGGATTCACAC-3'			
KRAS	1	F	5'-CTGAAAATGACTGAATATAAACTTGT-3'	152	12, 13
		R	5'-GGTAAATCTTGTTTTAATATGCATAT-3'		
BRAF	15	F	5'-CCTTTACTTACTACACCTCAG-3'	153	600
		R	5'-GTGGATGGTAAGAATTGAGG-3'		
BRAF pyro	F	5'-AAATAGGTGATTTTGGRCTAGCTACA-3'	140	600	
	R	5'-GCATCTCAGGGCCAAAAATTTA-3'			
	S	5'-CCACTCCATCGAGATT-3'			
AKT1	1	F	5'-TCTGACGGGTAGAGTGTGCGT-3'	109	17
		R	5'-CTACTTCCTCCTCAAGAATGA-3'		

Table 2. PCR reactions were performed in a 25  $\mu$ l volume using 10–50 ng of DNA. The products underwent electrophoresis in an agarose gel to confirm successful amplification of the 140 bp PCR product. The PCR products were sequenced by the Pyrosequencing PSQ96 HS System (Biotage AB) following the manufacturer's instructions.

### Total RNA Extraction and Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from 25 frozen prostate tumor samples (Table 3) with Ultraspec and RNeasy Mini kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) from 10 to 15 sections of 10  $\mu$ m. All samples contained a

**Table 3** Number of prostate samples according to Gleason score, as analyzed by mutational analysis, FISH and qRT-PCR of *PIK3CA* and pAKT immunohistochemistry

	Total of samples	Mutational analysis	FISH analysis	qRT-PCR	Immunohistochemistry of pAKT
<i>Gleason score</i>					
6	36	32	13	10	14
7	52	42	15	12	30
≥8	14	11	4	3	11
<i>Total</i>					
0	102	81	32	25	55

minimum of 70% of tumor cells. We also selected four normal samples as controls. Total RNA purity and quality were assessed with the NanoDrop® ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

*PIK3CA* mRNA expression was analyzed by quantitative real-time PCR in the 25 samples, on the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System using the TaqMan® Gene Expression Assays probe and primer mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's specifications. The Assay Identification number was HS00180679\_m1. Human B2M was used as endogenous control. The samples were run in triplicate and the mean value was calculated for each case. Non-carcinomatous prostate tissues (4 cases/run) were used to normalize the data using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Values >1.9 reflect an over-expression of *PIK3CA* mRNA.

### ***PIK3CA* Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Analysis**

FISH analysis was carried out on FFPE tissues in 32 cases (Table 3). *PIK3CA* probe was prepared from bacterial artificial chromosome (BAC) clones (pooled RP11-680J18 and RP11-386L21) selected from the CHORI BAC/PAC resource (<http://bacpac.chori.org>) and positioned to G-banded metaphase spreads via FISH. BAC DNA was labeled directly in SpectrumGreen-dUTP® (Abbott Molecular, Des Plaines IL, USA). Then, we made a mixture of *PIK3CA* probe with a commercial centromeric  $\alpha$ -satellite probe specific for chromosome 3 (Abbott Molecular, Spectrum red), in which *PIK3CA* is located. Pretreated tissue sections and mixture of probes were co-denatured at 78 °C and hybridized overnight at 37 °C (Hybrite chamber; Abbot Molecular). After posthybridization washes, slides were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Abbott Molecular).

Results were analyzed in a fluorescence microscope (Olympus, BX51) using the Cytovision software (Applied Imaging, Santa Clara, CA, USA). A minimum of 100 nuclei were scored by two different observers. We used adjacent normal tissues from

five cases as controls, to establish the cutoff value (mean + 3 s.d.) for polysomy (3 to 4 copies; 3.3%) and for monosomy (45%).

### **Immunohistochemistry of pAKT in Prostate Tumors**

Immunohistochemical staining for pAKT was performed using the phospho-AKT (Ser473) antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). A total of 55 samples were tested for pAKT expression (14 tumors with Gleason = 6, 30 with Gleason = 7 and 11 with Gleason ≥8; Table 3). pAKT was detected in both cytoplasm and nucleus. The results were graded, considering separately cytoplasmic and nuclear immunostaining, as 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate; Figure 5a), and 3 (strong; Figure 5b). The score (histoscore) for each of them was the sum of the product of the staining intensity and corresponding tumor percentage (histoscore = [1 × (%1 + cells)] + [2 × (%2 + cells)] + [3 × (%3 + cells)]).<sup>24</sup> For this study, the tumor score was obtained from the addition of the nuclear and cytoplasmic histoscores. A final tumor score 0–50 was considered negative or weak, between 50 and 100 moderate and >100 was considered strong positivity.

## **Results**

### ***PIK3CA*, *KRAS* and *AKT1* Mutational Analysis**

No mutations were detected in *PIK3CA*, *KRAS* or *AKT1* in the prostate tumors from patients with only prostate cancer (G1) or in the tumors from patients with bladder and prostate cancer (G2). On the other hand, we identified a previously not reported polymorphism in intron 9 of *PIK3CA* (IVS9 + 91) in two prostate tumors (one in each group, G1 and G2), generated by a transition C → T. The corresponding normal adjacent prostate tissue and normal seminal vesicle tissue (in the case from G1 group) and the matched muscle-invasive (T2G3) bladder tumor and normal bladder tissue (in the case from G2), were also analyzed. All of them presented the IVS9 + 91, confirming the polymorphic nature of this change. Both prostate tumors harbored, in addition, the previously reported polymorphic change T1025T,

which was also present in the normal tissue from the two cases and in the bladder tumor from one of them. There seems to be an association between the presence of polymorphisms IVS9 + 91 and T1025T, because both were present at the same time and never occurred separately.

As stated above, in the study of the matched bladder and prostate tumors from G2, none of the prostate tumors harbored any mutations. In the respective bladder tumors from this group, we detected three mutated samples (3 of 20, 15%), with mutations in *PIK3CA*, *KRAS* and *AKT1* genes, respectively (Figure 1). All mutations were found in hot spot codons: E545K in *PIK3CA*, G12V in *KRAS* and E17K in *AKT1*. None of the bladder tumors had mutations in *BRAF*. Previous papers on *PIK3CA* alterations in bladder cancer have reported from 13 to 25% of mutations in this gene, but with a higher prevalence in superficial than in deeply infiltrating bladder tumors.<sup>25,26</sup> In our study, most of the bladder samples were high-grade and high-stage tumors (Table 1). For this reason, we also investigated *PIK3CA* mutations in previous

superficial bladder tumors in six patients from G2, also with negative results.

**BRAF Mutational Analysis by Direct Sequencing and Pyrosequencing Technique**

In order to confirm that no *BRAF* mutations were present, we not only performed direct sequencing but also pyrosequencing in prostate and bladder tumor samples. Different studies have found that pyrosequencing is a more sensitive and specific method than direct sequencing for detecting mutations. The limit for mutant allele detection ranges between 2.5 and 5% with the pyrosequencing technique, compared with the 10–20% obtained with direct sequencing.<sup>27–29</sup> As a positive control, we used a colon tumor harboring the V600E mutation, which was detected by both direct sequencing and pyrosequencing (Figure 2). Direct sequencing was performed in all prostate tumors and in 17 of the bladder tumors from G2, and we did not detect any mutation. Pyrosequencing was performed in 39

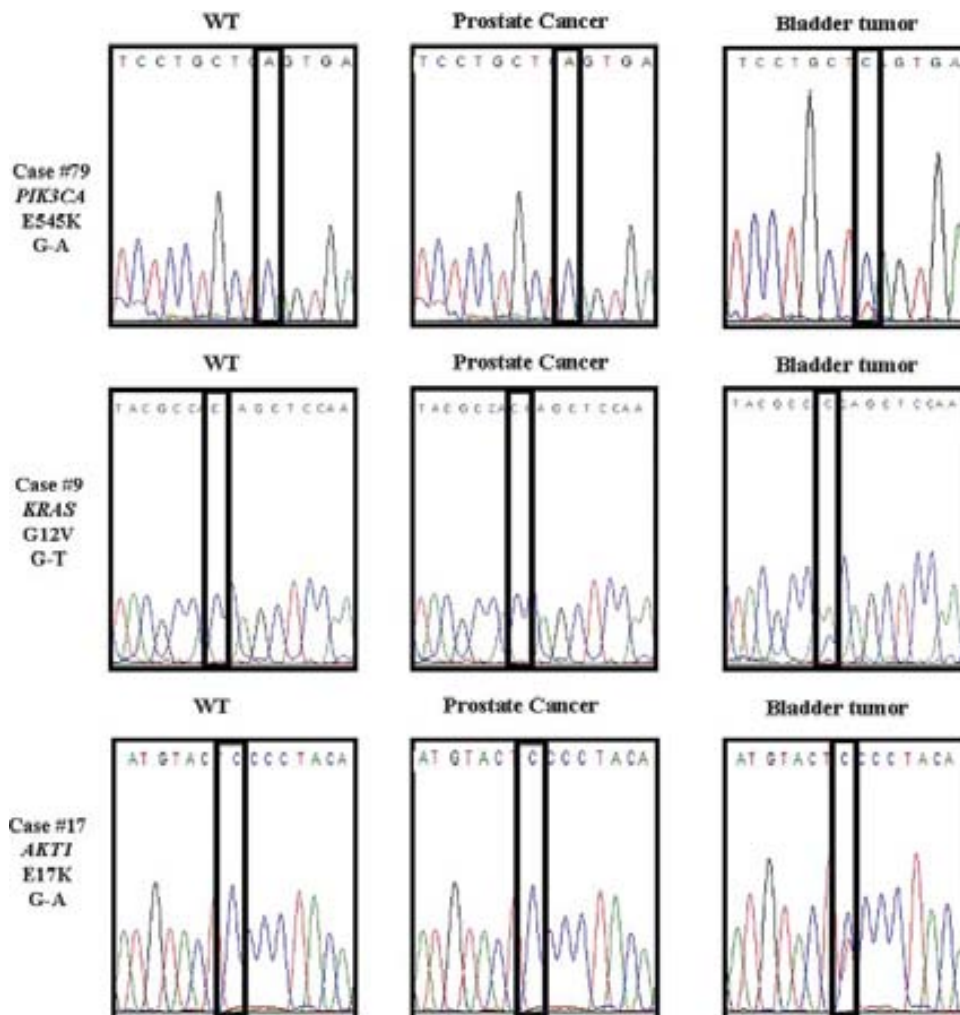
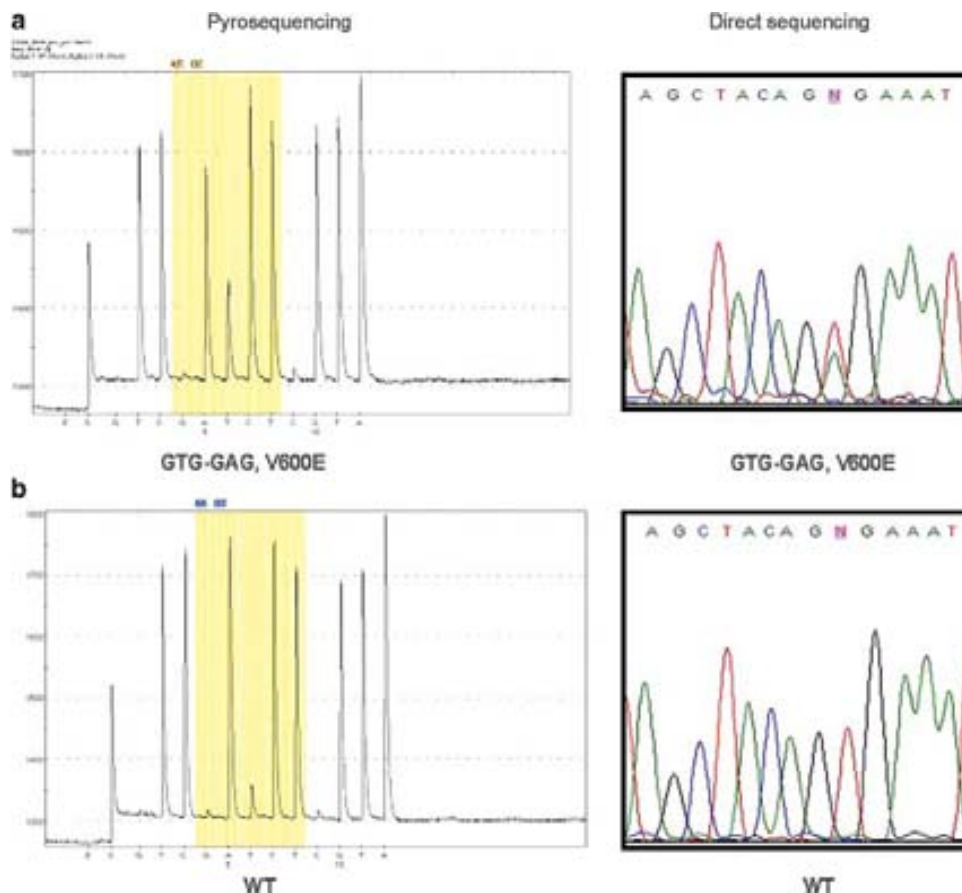


Figure 1 *PIK3CA*, *KRAS* and *AKT1* mutations in bladder tumors from patients with prostate and bladder cancer.



**Figure 2** Pyrograms and direct sequences of two samples. (a) Positive control: the change is detected by both pyrosequencing and direct sequencing. (b) Sample no. 4: the change is not detected by pyrosequencing or by direct sequencing.

prostate and 9 bladder tumors, all of them also analyzed by direct sequencing, and none of these 48 samples presented the codon 600 mutation.

### PIK3CA Quantitative mRNA Expression

The mRNA *PIK3CA* expression was investigated in 25 prostate tumors. From these 25 samples, 10 tumors were Gleason = 6, 11 were Gleason = 7 and 3 were Gleason  $\geq 8$ . The mRNA expression index ranged between 0.56 and 3.9. Based on the statistical analysis, the cutoff assumed for mRNA overexpression was  $>1.9$ . Of 25 prostate tumors, 10 (40%) showed *PIK3CA* overexpression, and all but one of them were Gleason  $\geq 7$  (1 case was Gleason = 6, 7 were Gleason = 7 and 2 were Gleason = 9; Figure 3). Thus, *PIK3CA* mRNA overexpression was statistically associated with high-grade Gleason score in prostate tumors (Fisher's exact test,  $P$ -value = 0.018). In 19 of these 25 samples, the mutation analysis was also performed with negative results.

### PIK3CA FISH Analysis

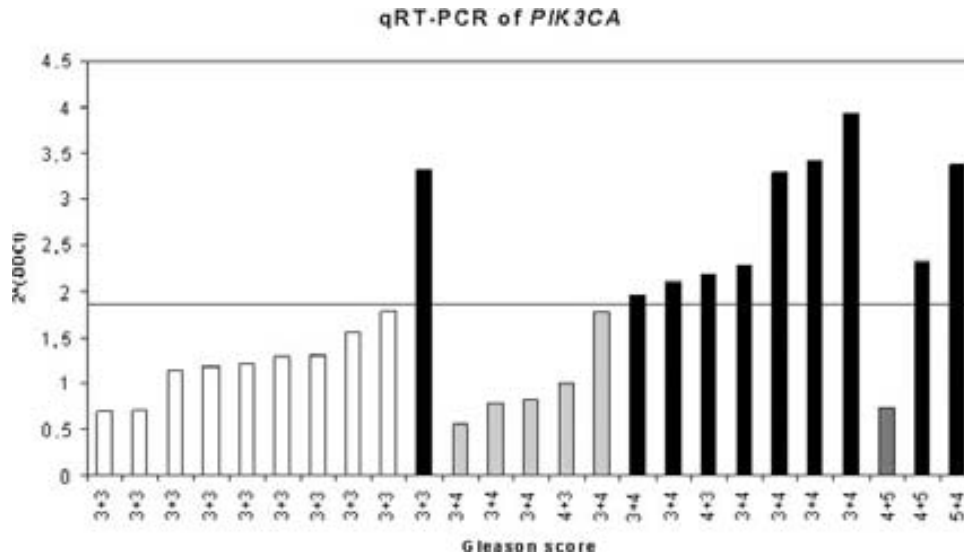
From the 81 prostate tumors in which mutational study was done, we were able to perform FISH

analysis in 32 samples. Of these 32 cases, 9 (28%) showed gain of *PIK3CA* gene because of chromosome 3 polysomy, being *PIK3CA*/centromere 3 ratio  $<1.5$  (Figure 4). All of these cases had 3 to 4 copies of chromosome 3 in 16–50% of cells. From these nine samples, three had Gleason = 6 and six samples had Gleason = 7. No statistical correlation was found between polysomy and Gleason score. From the ten cases in which we have information on *PIK3CA* by both FISH and qRT-PCR analysis, six cases showed concordant results (Table 4). Two cases with *wt* FISH showed mRNA overexpression. In the two other tumors we found copy number gain but not mRNA overexpression, and thus other molecular mechanisms might be regulating *PIK3CA* mRNA expression in these cases.

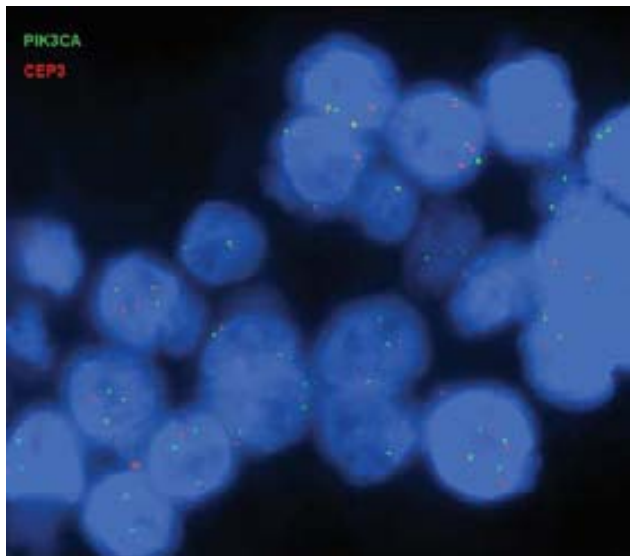
### Immunohistochemistry of pAKT and Association with PIK3CA Alterations

We could perform immunohistochemistry of pAKT in 55 prostate tumors (Figure 5a and b). In 40 of them, the mutational analysis was available and showed negative results. The total (nucleus + cytoplasm) histoscore of pAKT in the tumor samples ranged from 0 to 300. Considering strong expression,





**Figure 3** Histogram illustrating qRT-PCR results. *PIK3CA* mRNA overexpression was considered for a cutoff of > 1.9.



**Figure 4** Representative image of one sample with *PIK3CA* copy number gain. Green signals represent bacterial artificial chromosome (BAC) for *PIK3CA* and red signals represent chromosome 3 centromere probe.

**Table 4** Summary of prostate tumors in which *PIK3CA* FISH and/or qRT-PCR were available and in which pAKT immunohistochemistry was performed

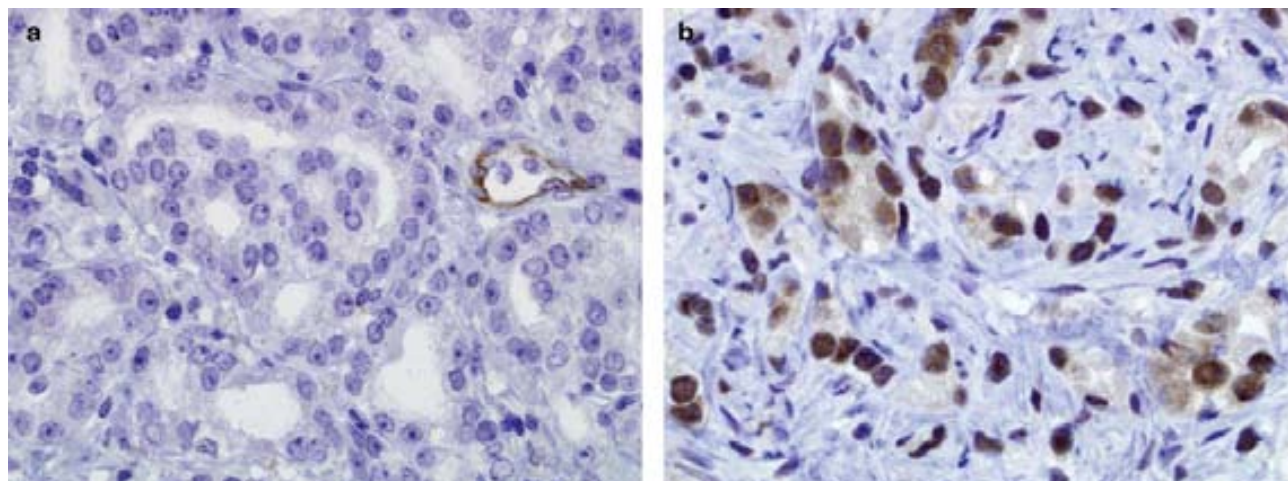
Case no.	Gleason score	FISH analysis	qRT-PCR analysis	Histoscore pAKT
12	3+4	wt	Not done	Low
15	4+3	wt	wt	Low
25	3+4	wt	Not done	Low
34	3+4	Gain	Not done	High
35	4+3	Gain	Not done	High
36	3+3	Not done	wt	Low
37	3+4	wt	Overexpressed	High
38	3+3	Not done	wt	Low
39	3+4	wt	Overexpressed	High
40	3+3	wt	wt	Low
41	3+4	Gain	Overexpressed	High
42	3+4	wt	Not done	Low
43	3+4	Not done	wt	Low
44	3+3	Gain	wt	Low
45	3+3	wt	wt	Low
48	3+3	Gain	Not done	High
50	3+3	wt	wt	Low
53	3+3	Gain	wt	Low
55	4+5	Gain	Overexpressed	High
67	3+3	wt	Not done	Low
78	5+4	Not done	Overexpressed	High

The shaded gain refers to gain in the number of gene copies for a specific gene in FISH analysis, while overexpressed refers to the mRNA expression levels as defined by quantitative RT-PCR or pAKT immunohistochemical histoscore values.

a histoscore > 100, there was a statistical correlation between high pAKT protein expression and the Gleason score ( $P < 0.0001$ ), as 1 of 14 Gleason = 6 (7.1%), 12 of 32 Gleason = 7 (37.5%) and 9 of 9 Gleason  $\geq 8$  (100%) showed high pAKT levels. In addition, there was a correlation between high intensity of pAKT expression and *PIK3CA* overexpression (qRT-PCR) and/or amplification (FISH analysis) ( $P < 0.0001$ ). For this statistical analysis, we classified a sample as having a *PIK3CA* change when one or both techniques (FISH gains or mRNA overexpression) were positive (Table 4).

## Discussion

This paper is the first to analyze the combined impact of the activation of PI3K–AKT and RAS–RAF pathways, rather than their individual members, on prostate cancer. It is also the first to report *PIK3CA* alteration by mRNA overexpression in ~40% of prostate cancer cases, in addition to *PIK3CA* copy number gain also in around 28% of tumors. *PIK3CA*



**Figure 5** (a) Prostate adenocarcinoma, Gleason score 4 + 3 = 7, showing lack of nuclear and cytoplasmic expression of pAKT in tumor cells. Note moderate (2+) cytoplasmic positivity in endothelial cells ( $\times 400$ ). (b) Prostate adenocarcinoma, Gleason score 4 + 5 = 9 (tertiary pattern 3), showing strong (3+) pAKT nuclear expression in 20%, moderate (2+) nuclear expression in 70%, weak (1+) nuclear expression in 10%, moderate (2+) cytoplasmic expression in 40% and weak (1+) cytoplasmic expression in 60% of tumor cells ( $\times 400$ ).

mRNA overexpression and/or FISH gain are associated with high levels of pAKT protein, and *PIK3CA* mRNA overexpression is associated with high-grade Gleason score in prostate tumors (Fisher's exact test,  $P = 0.040$ ).

The lack of mutations in *PIK3CA*, *AKT1*, *KRAS* and *BRAF* in our series of prostate cancer indicates that mutations in these genes are not key elements in prostate cancer pathogenesis. These results are in concordance with previous published studies, most of them based on a smaller number of cases or not precisely defining the clinicopathological features of the samples. In our study we have selected a larger, well-defined group of patients. Moreover, to the best of our knowledge, this study is the first to investigate different molecules of the PI3K signaling pathway in the same subset of patients. Another new approach of our study is to compare patients harboring only a prostate tumor (G1) and those with both prostate and bladder cancer (G2). This is based on a previous study from our group<sup>20</sup> in which a higher frequency of mutations of *FGFR3* was found in patients in whom prostate cancer occurred in association with tumors in bladder, skin and other tissues.

In several tumor types, alterations in different elements of PI3K–AKT and RAS–MAPK pathways are common events.<sup>30,31</sup> The constitutive activation of the PI3K pathway can result from different and/or complementary aberrant events. At present, there are only three reports on *PIK3CA* alterations in prostate cancer. Edwards *et al*<sup>10</sup> found amplification of *PIK3CA* in 39% of hormone-sensitive tumors and 50% of hormone-independent tumors by CGH arrays; Muller *et al*<sup>11</sup> also reported the lack of *PIK3CA* mutations in 12 cases of prostate cancer. A recent study<sup>12</sup> has reported *PIK3CA* mutations in prostate tumors for the first time, although only in 1 of 40 cases, along with *PIK3CA* amplification in

13% of the cases. Our results are in agreement with these reports on the null or very low occurrence of mutations in *PIK3CA*. In addition, we have also found gene copy number gain in  $\sim 28\%$  of tumors, and for the first time we also report *PIK3CA* mRNA overexpression in a high proportion of prostate tumors.

We have not found *KRAS* or *BRAF* mutations. Discrepancies in the frequency of mutation of *KRAS* and *BRAF* have been reported for prostate cancer. *KRAS* mutations have been found in up to 8% of prostate tumors (see <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).<sup>13–16</sup> The first study on *BRAF* alterations in prostate cancer<sup>18</sup> revealed no mutations in the prostate adenocarcinomas of 17 Caucasian patients (0/17). The second study, in Asian patients, found a frequency of *BRAF* and *KRAS* mutation of 10 and 7%, respectively.<sup>16</sup> Our series was made up of Caucasian patients and this could account for the lack of mutations in these genes. We confirmed this negative result for *BRAF* in a subset of cases by means of pyrosequencing.

The most recent reports on *AKT* suggest that only *AKT1* isoform shows mutations in certain types of human cancer, in a low proportion of cases.<sup>32</sup> We did not detect *AKT1* mutations in our samples, and in fact only a single case of prostate cancer with mutated *AKT1* has been reported in the literature.<sup>19</sup> Thus, our results confirm that *AKT1* mutations are very uncommon in prostate cancer, and that *AKT* may be activated through other mechanisms. Phosphorylation–activation of AKT could be the result of diverse alterations in different key genes of the PI3K–AKT pathway. In that sense, the only *AKT1* mutated prostate tumor reported to date<sup>19</sup> showed pAKT overexpression. Some authors have shown that AKT is upregulated in prostate cancer compared with benign prostatic tissue (BPT), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and primary tumors



graded 2–5 according to Gleason.<sup>33,34</sup> Interestingly, no change in the degree of AKT expression was detected in studies in which tumors had Gleason scores ranging from 6 to 10.<sup>35,36</sup> On the other hand, the staining intensity for pAKT has been reported to be significantly greater in prostate tumors with high Gleason grade (Gleason 8–10).<sup>35–37</sup> These reports are in concordance with the results of the present study, in which there was statistical correlation between pAKT expression and Gleason score  $P < 0.0001$ . Finally, we have also found a statistical correlation between pAKT and *PIK3CA* mRNA overexpression and/or *PIK3CA* copy gain  $P < 0.0001$ . Most of the cases analyzed with both techniques showed concordant results. Therefore, we can speculate that FISH gain could lead to an increase of *PIK3CA* mRNA expression and subsequent pAKT activation. On the other hand, it is also interesting to note that two cases with *wt* FISH showed mRNA overexpression and high levels of pAKT and two cases with FISH gain but not mRNA overexpression did not show high levels of pAKT intensity. Thus, other molecular mechanisms might be regulating *PIK3CA* mRNA expression in these cases.

Some of the patients in our study presented, in addition to prostate cancer, a simultaneous or previous urothelial neoplasm. Therefore, we have also performed the mutational study in the corresponding bladder tumors and we have found mutations in *PIK3CA*, *KRAS* and *AKT1* in some cases, but not in the respective prostate tumors. Data from the literature reveal that independent bladder tumors harbor ~13–25% of *PIK3CA* mutations.<sup>25,26</sup> We found a lower percentage of mutations of this gene (5%) in the bladder tumors from patients with prostate cancer. This difference could be related to the fact that bladder tumors in patients with and without prostate cancer could progress through different pathways, but it could also be explained by differences in the bladder tumors included in our study. Most of the bladder tumors from G2 were muscle invasive, whereas *PIK3CA* mutations are more frequent in superficial tumors.<sup>25,26</sup> To investigate whether the differences in the prevalence of *PIK3CA* mutations were because of the invasive nature of the G2 bladder tumors, we selected six of these cases in which a previous, superficial, low-grade bladder tumor was available, and we did not find *PIK3CA* mutations in any of them. Interestingly, the only bladder tumor with mutated *PIK3CA* in our study was deeply invasive and high grade (T3G3).

The main goal of this study has been to comprehensively assess the PI3K–AKT and RAS–RAF signaling pathway status in prostate tumors with and without associated bladder cancer. This is the first work in which several different genes rather than individual genes in the pathways have been investigated in a large group of prostate tumors. According to our results, mRNA overexpression emerges as a new type of *PIK3CA* alteration in prostate tumors. A high proportion of prostate

tumors are altered through *PIK3CA* mRNA overexpression and/or DNA gain, and mRNA overexpression is associated with high Gleason score ( $\geq 7$ ), whereas copy number gain is not. Although PI3K and AKT have been suggested to be promising molecular targets in the management of prostate cancer,<sup>36,38</sup> *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* and *AKT1* mutations represent very infrequent events in this tumor. We have shown, in addition, that *PIK3CA* amplification and/or mRNA overexpression are associated with higher levels of pAKT protein expression. However, more studies will be needed to further characterize if these changes could lead to a PI3K–AKT pathway activation that could justify the clinical use of *PIK3CA* and AKT inhibitors.

## Acknowledgements

We thank Sergi Mojal from the Department of Biostatistics, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, for his technical support. The study has been funded with Grants FIS/Instituto Carlos III/FEDER PS09/01106 from the Ministry of Health of the Spanish Government and Support Grant 2008 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board), and 'With the support of University and Research Department of Innovation, Universities and Enterprise of Generalitat de Catalunya and European Social Found' (Comisionat per Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu).

## Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497–5510.
- 2 Bader AG, Kang S, Zhao L, *et al*. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005;5:921–929.
- 3 Cayuela A, Rodriguez-Dominguez S, Martin VE, *et al*. Recent changes in prostate cancer mortality in Spain. Trends analysis from 1991 to 2005. *Actas Urol Esp* 2008;32:184–189.
- 4 Schonleben F, Qiu W, Remotti HE, *et al*. *PIK3CA*, *KRAS*, and *BRAF* mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/C) of the pancreas. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:289–296.
- 5 Cain RJ, Ridley AJ. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 2009;101:13–29.
- 6 Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 2006;18:77–82.
- 7 Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, *et al*. *BRAF*(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008;27:877–895.

- 8 Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, *et al*. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:611–618.
- 9 Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, *et al*. Differentiation stage-specific inhibition of the raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 1999;286:1738–1741.
- 10 Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, *et al*. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5271–5281.
- 11 Muller CI, Miller CW, Hofmann WK, *et al*. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leuk Res* 2007;31:27–32.
- 12 Sun X, Huang J, Homma T, *et al*. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. *Anticancer Res* 2009;29:1739–1743.
- 13 Blount LV, Cooke III DB. Point mutations in the ki-ras2 gene of codon 12 in the dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma system. *Prostate* 1996;28:44–50.
- 14 Konishi N, Hiasa Y, Tsuzuki T, *et al*. Comparison of ras activation in prostate carcinoma in Japanese and American men. *Prostate* 1997;30:53–57.
- 15 Konishi N, Nakamura M, Kishi M, *et al*. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:767–773.
- 16 Cho NY, Choi M, Kim BH, *et al*. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006;119:1858–1862.
- 17 Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, *et al*. Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855–867.
- 18 Cohen Y, Xing M, Mambo E, *et al*. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:625–627.
- 19 Boormans JL, Hermans KG, van Leenders GJ, *et al*. An activating mutation in AKT1 in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2008;123:2725–2726.
- 20 Hernandez S, de Muga S, Agell L, *et al*. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol* 2009;22:848–856.
- 21 Or YY, Hui AB, To KF, *et al*. PIK3CA mutations in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2006;118:1065–1067.
- 22 Saal LH, Holm K, Maurer M, *et al*. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2554–2559.
- 23 Tanaka Y, Kanai F, Tada M, *et al*. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene* 2006;25:2950–2952.
- 24 Chadha KS, Khoury T, Yu J, *et al*. Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13:933–939.
- 25 Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, *et al*. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 2006;66:7401–7404.
- 26 Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, *et al*. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6008–6017.
- 27 Tan YH, Liu Y, Eu KW, *et al*. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 2008;40:295–298.
- 28 Zhang L, Kirchhoff T, Yee CJ, *et al*. A rapid and reliable test for BRCA1 and BRCA2 founder mutation analysis in paraffin tissue using pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2009;11:176–181.
- 29 Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F. Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem* 2009;391:166–168.
- 30 Oikonomou E, Pintzas A. Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer Res* 2006;26:1077–1084.
- 31 Souglakos J, Philips J, Wang R, *et al*. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101:465–472.
- 32 Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, *et al*. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008;27:5648–5650.
- 33 Jendrossek V, Henkel M, Hennenlotter J, *et al*. Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. *BJU Int* 2008;102:371–382.
- 34 Liao Y, Grobholz R, Abel U, *et al*. Increase of AKT/PKB expression correlates with Gleason pattern in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2003;107:676–680.
- 35 Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, *et al*. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1168–1171.
- 36 Shukla S, Maclennan GT, Hartman DJ, *et al*. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2007;121:1424–1432.
- 37 Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, *et al*. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:5232–5236.
- 38 Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346(Pt 3):561–576.

**3.3. Article 3 (pendent d'acceptació, veure annex 3): A 12- gene expression signature is associated with aggressive histology in prostate cancer. SEC14L1 and TCEB1 genes are potential markers of progression.**

Malgrat que s'han postulat molts gens com a implicats en el procés de carcinogènesi prostàtica, no hi ha cap gen ni cap perfil de gens que hagi demostrat tenir prou robustesa com a valor pronòstic. El principal repte pel maneig clínic dels pacients és discriminar quins tumors tindran un creixement lent i quins tumors tindran una recaiguda. En aquest estudi s'ha comparat el perfil d'expressió de 18 mostres de càncer de pròstata (7 mostres de Gleason 6, 8 mostres de Gleason 7 i 3 mostres de Gleason $\geq$ 8). A més a més, també s'han analitzat 5 mostres no tumorals de pròstata. Totes les mostres van ser hibridades amb el GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array d'Affymetrix. L'anàlisi de microarrays va demostrar que hi ha 99 gens diferencialment expressats entre els tumors de Gleason 6, 7 i  $\geq$  8. Per tal de validar els resultats es va analitzar amb qRT-PCR l'expressió d'ARNm de 29 gens seleccionats, utilitzant targetes microfluídiques en una sèria ampliada fins a 30 mostres tumorals. Dels 29 gens analitzats, 18 es van validar (62%). Catorze gens presentaven sobrerregulació i 4 infra-regulació en els tumors de més alt grau de Gleason en la sèria ampliada de 30 tumors. Dins d'aquests 18 gens, 12 estaven diferencialment expressats entre els tumors de Gleason 6-7 vs  $\geq$  8. Finalment, es van analitzar els nivells proteics de dos gens de la signatura de 12 gens a través d'immunohistoquímica (*SEC14L1* i *TCEB1*). Els nivells elevats d'expressió proteica dels dos gens correlacionava amb el grau de Gleason, amb l'estadi i amb la progressió del PSA. Aquest estudi presenta un conjunt de gens que podrien ajudar a entendre les bases moleculars del càncer de pròstata i proporciona dos bons gens candidats com a marcadors de pronòstic i progressió en els tumors de pròstata.



---

---

## 4. DISCUSSIÓ

---

---

*Nixon i Frost es posen tensos anticipadament, com dos atletes esperant el tret. Aleshores el regidor fa un senyal a Frost: “Endavant!”.*

**Frost:** Senyor president, tractarem un munt de temes amb tot detall durant les properes sis hores, però m’agradaria començar totalment fora de context fent-li una pregunta que gairebé tots els nord-americans i gent de tot el món volen que faci:”Per què no va cremar les cintes?”

Nixon-Frost  
Peter Morgan



#### 4. DISCUSSIÓ

El càncer de pròstata és una malaltia molt heterogènia<sup>207</sup> tant a nivell histològic i clínic, com a nivell molecular. Aquest fet explica que, malgrat que el càncer de pròstata és un dels tumors més freqüents, es coneix poc quins són els gens que estan implicats en el procés de tumorogènesi.<sup>1</sup>

Durant el desenvolupament i progressió d'un càncer es produeix la pèrdua de funció de gens supressors de tumors i l'activació d'oncogens. L'interès d'estudiar aquests gens és conèixer la història natural del càncer de pròstata per poder preveure i determinar quins pacients presentaran una ràpida progressió i quins evolucionaran més lentament i per tant, oferir un tractament més adequat per cada pacient.

Els estudis moleculars fets fins ara han estat capaços d'identificar gens candidats i vies de senyalització, però cap no ha aconseguit identificar una alteració en un percentatge elevat de tumors de pròstata.<sup>44</sup> En els estudis que constitueixen aquesta tesi s'han analitzat les alteracions moleculars de dos grups de gens. En primer lloc, s'han estudiat dos gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, *KLF6* i *TP53*, i en segon lloc, s'han estudiat gens implicats en les vies de senyalització PI3K-AKT i RAS-MAPK (*PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* i *AKT1*). Finalment, també s'han estudiat quins gens podrien estar diferencialment expressats entre els tumors amb diferent grau de Gleason mitjançant la tècnica dels microarrays d'expressió.

*KLF6* s'ha descrit com un gen supressor de tumors implicat en la regulació del cicle cel·lular mitjançant l'activació de p21 d'una manera independent a p53. Molts estudis han suggerit que *KLF6* s'inactiva per pèrdua al·lèlica i per mutació somàtica, encara que s'ha descrit en càncer de pròstata una alta variabilitat en la freqüència de mutacions (des del 55% dels primers estudis fins al 1% dels més recents). *TP53* també regula el cicle cel·lular mitjançant l'activació de p21 i en el càncer de pròstata, la freqüència de mutació descrita varia entre el 3% i el 42%.

L'anàlisi dels quatre exons de *KLF6* en 103 tumors de pròstata va permetre la detecció d'una sola mutació, la transició T → C en el codó 227 (E227G). Per altra banda, en l'estudi dels exons 5-8 de *TP53* es van detectar 3 mutacions en cinc tumors de pròstata (L130H, H214R i Y234C). Els resultats obtinguts en el nostre estudi demostren una molt baixa freqüència de mutació de *KLF6* (<1%) i una baixa freqüència de *TP53* (≈5%). La taxa total de mutació és aproximadament del 6%, 6 tumors mutats d'un total de 103 casos analitzats. La majoria de mutacions es van produir en tumors de grau de Gleason 7 o més, indicant, doncs, que encara que les mutacions de *KLF6* i *TP53* no són prevalents podrien tendir a ocórrer en tumors amb graus de Gleason alts. Finalment, també es va detectar en quatre tumors (4%) el polimorfisme de *KLF6* -4 C>A 5'-UTR i en 8 tumors (8%) el polimorfisme R72P de *TP53*.

En el cas de *KLF6*, els resultats que hem obtingut estan en concordança amb els últims estudis publicats sobre les mutacions de *KLF6* en càncer de pròstata<sup>78,79</sup> i contrasten amb els primers estudis publicats, on es descrivien altes freqüències de mutació.<sup>59,61</sup> Les estrictes condicions metodològiques que s'han inclòs en el present estudi i els requisits que s'han explicat per identificar les mutacions recolzen la idea de què moltes de les mutacions de *KLF6* descrites inicialment podrien ser artefactes.

És soprenent el fet que Narla *et al.*<sup>59</sup> descrivíssin que la meitat dels tumors que van analitzar tinguessin mutacions al gen *KLF6*, mentre que Chen *et al.*<sup>61</sup> varen descriure una freqüència de mutació de només el 15%. A més a més, en un tercer article, Mülbauer *et al.*,<sup>78</sup> no van trobar mutacions en l'anàlisi de 32 tumors de pròstata. Finalment, Bar-Shira *et al.*<sup>79</sup> van descriure una freqüència de mutació inferior a l'1% ja que només es van detectar dues mutacions en l'anàlisi de 300 casos. A més, cap de les mutacions descrites en els diferents estudis eren coincidents. Encara més, l'únic de tots els estudis que confirma les mutacions, mitjançant dobles amplificacions de PCR independents, és el de Mülbauer *et al.*<sup>78</sup> Per contra, també és l'únic que només analitza l'exó 2 de *KLF6*. Cap dels altres estudis van realitzar altres tipus de tècniques per comprovar que els canvis detectats eren realment mutacions i no, per exemple, artefactes introduïts per la Taq-polimerasa. Malgrat que Chen *et al.*<sup>61</sup> van realitzar per duplicat l'anàlisi de SSCP (single strand conformation



polymorphism) en el cas que alguna banda d'ADN estigués desplaçada, la seqüenciació del producte de PCR es realitzava només una vegada, i per tant, no es verificà per duplicat l'evidència de què el canvi fos una mutació real.

La discrepància en la freqüència de mutació de *KLF6*, també s'ha observat en altres tipus de càncers com, per exemple, en els hepatocarcinomes (la freqüència varia del 0% al 15%)<sup>66,75-77</sup> i en el càncer de còlon (la freqüència varia del 0% al 44%).<sup>67-70,208</sup> De manera similar al càncer de pròstata, els primers estudis descriuen una freqüència de mutació alta que no ha estat confirmada pels estudis subsegüents. En aquest sentit, Song *et al.*<sup>76</sup> no varen detectar mutacions de *KLF6* en hepatocarcinomes, malgrat que van realitzar PCRs per triplicat. Les discrepàncies amb els estudis previs s'atribueixen a les diferències poblacionals de les mostres utilitzades en els diferents estudis, errors de la PCR o l'*splicing* alternatiu de *KLF6* degut a un polimorfisme.

En el cas de *TP53*, els articles més recents no analitzen la freqüència de mutació del gen. Durant els primers anys de recerca de *TP53* en càncer de pròstata, els estudis es van centrar en analitzar la freqüència de mutació del gen, la qual variava del 3% al 42%.<sup>29,101</sup> La base de dades de la IARC la descriu al voltant del 17%. Alguns autors han postulat que les mutacions de *TP53* tenen lloc amb una freqüència molt baixa en els tumors primaris de pròstata i que són més freqüents en tumors de pròstata d'alt grau o estadi, així com en tumors metastàsics o androgen-independents.<sup>29,99</sup> Altres autors, però, argumenten que les mutacions de *TP53* també tenen lloc en estadis inicials del càncer de pròstata.<sup>100</sup> En el nostre estudi no s'han detectat mutacions en els tumors metastàsics encara que cal dir que el nombre de mostres metastàsiques analitzades era baix. Eyers *et al.*<sup>99</sup> van realitzar l'anàlisi mitjançant PCR-SSCP i immunohistoquímica per detectar mutacions però només van seqüenciar un cas. La sensibilitat de la tècnica de la PCR-SSCP per detectar mutacions és inferior a la d'altres mètodes com, per exemple, la seqüenciació directa. Posteriorment, molts estudis s'han centrat en determinar els nivells proteics de p53 mitjançant IHQ, assumint que tota aquella proteïna de p53 que s'acumula al nucli en excés indicava l'existència de mutacions en el gen.<sup>29,99</sup> Aquest fet, però, no sempre és cert ja que en

alguns casos l'acumulació de p53 en el nucli podria venir donada per alteracions en altres gens que regulen la via de *TP53* com, per exemple, MDM2.<sup>29</sup>

Respecte als treballs que s'han publicat més recentment de *TP53*, Mülbauer *et al.*<sup>78</sup> descriuen una freqüència de mutació del 12% (3 casos mutats de 25 analitzats), molt pròxima a la nostra. Amb posterioritat al nostre article, ha aparegut publicat un altre estudi que analitza la freqüència de mutació de *TP53* en tumors de pròstata i ho correlaciona amb la progressió dels pacients.<sup>209</sup> Ecke *et al.*<sup>209</sup> descriuen una freqüència de mutació de *TP53* del 35,6% (32/90) i conclouen que el 40,6% (13/32) dels tumors mutats i el 15,5% (9/58) dels tumors *wt* progressen al cap de 25 i 45 mesos respectivament. El fet que la freqüència de mutació sigui molt més alta que la que es descriu en el nostre estudi podria ser degut a què Ecke *et al.*<sup>209</sup> no realitzen dobles PCRs independents per tal de confirmar que les mutacions descrites siguin reals, malgrat que utilitza mostres procedents de parafina, i a més a més, alguns pacients presenten dues mutacions en exons diferents. Per últim, també cal dir que la freqüència descrita (35,6%) és més elevada que la freqüència d'artefactes que descrivim en el nostre estudi (23%), recolzant la idea de què moltes de les mutacions que descriuen Ecke *et al.*<sup>209</sup> siguin probablement artefactes introduïts per la Taq-polimerasa.

Des del punt de vista metodològic, també s'observen diferències importants en els diferents estudis de càncer de pròstata realitzats [**Taula 3**]. Així, per exemple, molts estudis en càncer de pròstata parteixen de material que ha estat fixat en formol i inclòs en parafina, mentre que en els estudis amb altres tipus de tumors humans s'utilitza més freqüentment mostres en fresc. En el cas del càncer de pròstata és molt difícil obtenir material en fresc ja que macroscòpicament el tumor és molt similar al teixit normal, inflammat o hiperplàsic. Com a conseqüència, la majoria d'estudis moleculars en càncer de pròstata utilitzen mostres fixades en formol i incloses en parafina (FFPE). Aquest és el cas, per exemple, dels 4 articles previs al nostre sobre mutacions de *KLF6*. S'ha descrit a la literatura que les mostres fixades en formol pateixen múltiples lesions a les cadenes d'ADN, especialment en les regions riques en A-T, generant llocs *AP-site* (llocs apurinic/apirimidinic).<sup>210-214</sup> Aquestes regions no són reconegudes per la Taq-polimerasa, que actua col·locant una adenina per defecte, donant lloc a mutacions artefactuals durant el

procés d'amplificació de PCR. La freqüència d'errors introduïts per la Taq-polimerasa en teixit fresc és al voltant d'un per cada  $10^5$  parells de bases, mentre que en teixit fixat en formol i inclòs en parafina la freqüència és molt més alta, al voltant d'un error cada 500 parells de bases introduïdes. Els nostres resultats recolzen aquesta idea, ja que tots els artefactes detectats es van trobar en les mostres FFPE, mentre que en les mostres congelades no se'n va detectar cap. L'única manera d'assegurar que un canvi observat no és conseqüència d'un error de la Taq-polimerasa, sinó que és una mutació real, és mitjançant una segona amplificació de PCR del mateix teixit tumoral. Si al seqüenciar aquesta nova amplificació el canvi persisteix, es confirma la mutació. Per tant, s'ha d'anar amb especial cura quan es parteix de material fixat en formol i inclòs en parafina, ja que l'ús del formol introdueix múltiples lesions en les cadenes d'ADN. Cal emprar el mateix teixit tumoral en la nova PCR i seqüenciació, perquè si es fan servir mostres diferents aquestes podrien contenir mutacions diferents, a conseqüència de l'heterogeneïtat de tumors.

Per tal d'intentar aconseguir ADN amb major qualitat s'ha intentat utilitzar diferents protocols de fixació.<sup>215</sup> Malgrat tot, però, cap dels fixadors disponibles actualment garanteix una preservació completa de l'ADN. És important emfatitzar que els artefactes no són introduïts pel fixador sinó per la Taq-polimerasa. En el nostre estudi s'ha utilitzat una formulació estàndard de formaldehid en solució al 4% tamponat (pH 6,9) especial per histologia. Amb la finalitat d'excloure tots els falsos positius possibles, només vam acceptar com a mutacions reals tots aquells canvis que es van confirmar mitjançant dues amplificacions independents de PCR. És interessant comentar la freqüència d'artefactes. Per *KLF6* es van trobar 39 canvis en la primera PCR i només un es va confirmar, amb la qual cosa, doncs, la freqüència d'artefactes va ser del 36,8% (38 canvis no confirmats en 103 casos analitzats). Per *TP53*, dels 29 canvis trobats inicialment només 5 van resultar ésser mutacions. La freqüència d'artefactes va ser, per tant, del 23% (24 canvis no confirmats en 103 casos analitzats). Una altra dada interessant és que si comptabilitzessim tots els canvis detectats, tant les mutacions reals com les que no ho són, la freqüència de mutació de *KLF6* i *TP53* seria del 42% i del 28% respectivament. Aquestes freqüències

serien, doncs, similars a les dels estudis publicats inicialment. A més a més, també cal dir que en el nostre estudi la majoria de mutacions no confirmades (70%) eren transicions o

Autors	Exons estudiats	Tècnica utilitzada	Microdissecció	Parafina o tx. fresc	Freq. mutació	Mutacions	LOH
Narla et al. 2001	Tots els exons	Seqüenciació directa	Làser	Parafina	55% (18/33)	Totes a l'exó 2 menys un cas: A52T W64R S110N S111P S113F S116P A123D S137X S142P S180L G187R L169P L217S C265Y	77% (12/22)
Chen et al. 2003	Tots els exons	SSCP (x2) i seqüenciació directa	Manual	Parafina	15% (14/96)	Totes en exó 2: T35I L43F D88N P93S S120F K124M G189S	19%(4/21) xenografts i línies cel·lulars 28% (8/29) casos de c. de pròstata
Mühlbauer et al. 2003	Només exó 2	Seqüenciació directa (x2 PCR)	Làser	Parafina	0% (0/32)	També miren mutacions de TP53 (12%, 3/25)	-
Bar-Shira et al. 2006	Tots els exons	Seqüenciació directa + HPLC	Manual	Parafina i sang	1% (3/300)	Totes en l'exó 2: T122T P172L G160X	-
Agell et al. 2008	Tots els exons	Seqüenciació directa (x2 PCR)	Manual	Parafina i congelat	1% (1/104)	Exó 3: E227G	-

**Taula 3.** Taula comparativa de tots els estudis publicats sobre mutacions de *KLF6* en càncer de pròstata.

transversions que implicaven l'addició d'una adenina, el nucleòtid que més sovint s'introdueix de manera artefactual en aquesta situació, el que indica que segurament aquests canvis són fruit de les lesions que introdueix el formol en l'ADN. En concordança amb la nostra metodologia, cal destacar un article<sup>214</sup> que indica que moltes de les mutacions del gen *EGFR* que s'havien descrit amb una freqüència molt baixa en càncer de pulmó, en realitat eren artefactes.

La diferència en la freqüència d'artefactes entre *KLF6* (36,8%) i *TP53* (23%) pot ser deguda al nombre de parells de bases estudiades per cada gen. En el cas de *KLF6* s'han analitzat 1250 pb i per *TP53*, 850 pb. Així, doncs, la proporció d'artefactes introduïts per la Taq-polimerasa és similar en els dos gens.

Per tant, encara que també hi podrien estar implicades diferències poblacionals en els diversos estudis, l'explicació més plausible per les diferents freqüències de mutació descrites a la literatura en els dos gens rauria en les diferents estratègies metodològiques utilitzades per tal de detectar les mutacions.

DiFeo *et al.*<sup>216</sup> han suggerit que hi haurien tres mecanismes diferents d'inactivar *KLF6*: LOH i mutacions somàtiques, hipermetilació del promotor i desregulació de les formes de *splicing* alternatiu. En aquest article es suggereix que només el primer i el tercer mecanisme estarien implicats en el procés de carcinogènesi. Recolzant aquesta idea, Narla *et al.*<sup>60</sup> han descrit que la pèrdua d'un al·lel de *KLF6*, encara que sigui sense la presència de mutations de *KLF6* en l'altre al·lel, pot contribuir a la proliferació cel·lular i al desenvolupament tumoral. El mecanisme exacte d'aquest procés, però, encara és desconegut. Es necessiten més estudis per tal d'investigar el paper de *KLF6* en la patogènesi del càncer de pròstata, però sembla clar que les expectatives despertades inicialment per aquest gen no s'han confirmat.

Per altra banda, la baixa freqüència de mutació de *TP53* faria suposar que d'altres molècules de la via de p53 podrien estar alterades, com per exemple MDM2, p14<sup>ARF</sup>, o PI3K.

En conclusió, els resultats obtinguts, recolzen la idea que les mutacions de *KLF6* i de *TP53* són molt poc freqüents en el càncer de pròstata i quan tenen lloc es produeixen en aquells tumors que tenen un grau de Gleason alt. Així doncs, les mutacions en aquests dos gens no sembla que siguin claus en la patogènesi del càncer de pròstata. El nostre primer estudi reforça la idea de que l'única manera de confirmar que els possibles canvis que es detecten són realment mutacions i no artefactes introduïts per la Taq-polimerasa és realitzar dos PCRs de manera independent, ja que la probabilitat de que la Taq-polimerasa introdueixi el mateix error en el mateix punt de la seqüència d'ADN és molt baixa.

A causa de l'important paper de les alteracions en les vies PI3K-AKT i RAS-MAPK en diferents tipus de tumors humans, el segon objectiu abordat en aquesta tesi ha consistit en l'estudi de les alteracions en diferents gens d'aquestes vies (*PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* i *AKT*) en tumors de pròstata.

L'article que presentem és el primer en el qual s'analitzen, en un mateix grup de tumors de pròstata les vies de PI3K-AKT i RAS-RAF. Anteriorment, s'havien publicat altres estudis que només analitzaven algun gen puntual d'una d'aquestes vies, però mai abans, ni tampoc fins a l'actualitat, s'han estudiat molts elements de totes dues vies conjuntament en càncer de pròstata. Aquest estudi també és el primer en el qual s'ha descrit sobreexpressió dels nivells d'ARNm de *PIK3CA* en un 40% dels tumors de pròstata i guany de còpies del gen *PIK3CA* en un 28% dels tumors. A més a més, la sobreexpressió i/o el guany de còpies de *PIK3CA* està associat a més alts nivells proteics d'AKT fosforilat i la sobreexpressió de *PIK3CA* està associada amb aquells tumors de pròstata que tenen major grau de Gleason.

La manca de mutacions de *PIK3CA*, *AKT1*, *KRAS* i *BRAF* en la nostra sèrie indica que les mutacions d'aquests gens no són claus en el desenvolupament de la patogènesi del càncer de pròstata. Aquests resultats estan amb concordança amb els estudis prèviament publicats, molts dels quals estan realitzats sobre un nombre reduït de mostres o bé no especifiquen les característiques clinicopatològiques d'aquestes. En el nostre estudi s'ha seleccionat un grup ben definit i ampli de mostres. A més a més, aquest estudi és el primer en el qual s'investiguen diferents molècules de la via de senyalització de PI3K i RAS-RAF en el

mateix grup de pacients. Una altra aportació del nostre estudi és que s'han comparat conjuntament dos grups diferents de pacients. Per una banda, s'han estudiat pacients que només tenien càncer de pròstata (Grup 1) i per l'altra banda, s'han analitzat pacients que tenien a més d'un càncer de pròstata, un càncer de bufeta independent (Grup 2). L'interès d'aquesta comparació rau en el fet que en un estudi previ del nostre grup<sup>217</sup> es va observar que les mutacions del gen *FGFR3* són més freqüents en aquells pacients que, a part del càncer de pròstata, tenen altres tumors independents, com per exemple, càncer de bufeta o càncer de pell entre d'altres.

S'ha descrit en diferents tipus de tumors<sup>218,219</sup> que les alteracions en les vies de PI3K-AKT i RAS-MAPK podrien ocórrer a la vegada. L'activació constitutiva de la via de PI3K pot venir donada per alteracions en gens diferents i/o complementaris. Fins al moment actual, només hi ha tres articles referents a les alteracions de *PIK3CA* en tumors de pròstata. Edwards *et al.*<sup>129</sup> descriuen, mitjançant arrays de CGH, una freqüència d'amplificació de *PIK3CA* del 39% en tumors hormono-dependents i del 50% en tumors hormono-independents. Muller *et al.*<sup>130</sup> no detecten mutacions de *PIK3CA* encara que només analitzen 12 mostres. Finalment, en l'estudi més recent, Sun *et al.*<sup>131</sup> descriuen per primera vegada una única mutació de *PIK3CA* analitzant 40 casos. I també descriuen amplificacions del gen de *PIK3CA* en el 13% dels casos. Els nostres resultats estan en concordança amb la baixa o nul·la freqüència de mutació de *PIK3CA*. A més a més, en el nostre estudi es descriu una freqüència de guany de còpies de *PIK3CA* del 28% i per primer cop es descriu la sobreexpressió d'ARNm de *PIK3CA* en un alt percentatge de tumors de pròstata.

En la nostra sèrie analitzada no s'han detectat mutacions de *KRAS* ni de *BRAF*. Existeixen discrepàncies en la literatura sobre la freqüència de mutació de *KRAS* i *BRAF* en els tumors de pròstata. Les mutacions de *KRAS* s'han descrit al voltant del 8% en tumors de pròstata (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).<sup>156-158,220</sup> El primer estudi publicat<sup>162</sup> sobre les alteracions del gen *BRAF* en càncer de pròstata no va trobar mutacions en 17 mostres de pacients d'origen caucàsic. El segon estudi, realitzat sobre mostres d'origen asiàtic, va trobar una freqüència de mutació de *BRAF* i *KRAS* del 10% i del 7%

respectivament.<sup>158</sup> La nostra sèrie està formada per pacients d'origen caucàsic i aquesta podria ser una possible explicació de la manca de mutacions detectades en aquests dos gens. En el cas del gen *BRAF*, aquests resultats negatius van ser confirmats amb una segona anàlisi mitjançant piroseqüenciació en un subgrup de casos. La piroseqüenciació s'ha descrit com un mètode de detecció de mutacions més sensible i específic que d'altres, com per exemple, la seqüenciació directa. Així, el límit de detecció d'un al·lel mutat va del 2.5 al 5% en la piroseqüenciació i del 10 al 20% en la seqüenciació directa.<sup>221-223</sup>

Els articles més recents sobre *AKT* suggereixen que només la isoforma *AKT1* presenta mutacions en certs tipus de tumors encara que amb unes freqüències baixes.<sup>148</sup> En el nostre estudi no s'ha detectat cap mutació d'*AKT1* i de fet, en la literatura només s'han descrit 3 mutacions d'*AKT1* en tumors de pròstata (freqüència de mutació: 1,4%).<sup>149,151</sup> Així doncs, els nostres resultats confirmen que les mutacions d'*AKT1* són un fenomen molt poc freqüent en el càncer de pròstata i que l'activació d'*AKT* deu tenir lloc mitjançant altres mecanismes. L'activació d'*AKT* per la fosforilació d'aquesta proteïna podria ser el resultat de l'alteració en diferents gens de la via de PI3K-*AKT*. En aquest sentit, un dels tres casos en què s'ha descrit una mutació d'*AKT1* en càncer de pròstata<sup>149</sup> presentava sobreexpressió de pAKT. Alguns autors han demostrat que *AKT* està sobrerregulat en el càncer de pròstata en comparació amb el teixit benigne de pròstata i amb el PIN i que els tumors primaris amb grau de Gleason 6-10 tenien major expressió d'*AKT* que aquells tumors amb grau de Gleason 2-5.<sup>224,225</sup> Curiosament, no es detecten canvis en els nivells d'expressió d'*AKT* en els diversos tumors de grau 6 a 10.<sup>226,227</sup> Per altra banda, s'ha descrit que la intensitat dels nivells de pAKT és superior en aquells tumors de pròstata que tenen un elevat grau de Gleason (Gleason 8-10).<sup>226-228</sup> Aquests estudis estan en concordança amb els nostres resultats en els quals existeix correlació entre els nivells d'expressió de pAKT i el grau de Gleason ( $P < 0.0001$  prova de Fisher). Finalment, també hem observat que hi ha una correlació estadísticament significativa entre els nivells de pAKT i la sobreexpressió i/o el guany de còpies de *PIK3CA* ( $P < 0.0001$  prova de Fisher). La majoria de mostres en les quals s'ha pogut realitzar la tècnica del FISH (per quantificar el guany de còpies) i la qRT-PCR (per quantificar l'expressió d'ARN) eren concordants. Per tant, podem especular que el guany de còpies del gen *PIK3CA* podria contribuir en l'increment dels nivells



d'expressió d'ARNm de *PIK3CA* i subseqüentment causar l'activació de pAKT. Per altra banda, s'ha de dir que dues mostres van ser *wt* per la tècnica del FISH malgrat que els nivells de sobreexpressió de *PIK3CA* i de pAKT van ser elevats. A més, dos altres casos amb guany per FISH no van presentar sobreexpressió de *PIK3CA* ni nivells elevats de pAKT. Aquest fet ens suggereix que segurament hi poden haver altres mecanismes implicats en la regulació dels nivells d'ARNm de *PIK3CA*.

Alguns pacients del nostre estudi, a més del càncer de pròstata, també tenien simultàniament o prèviament un càncer de bufeta. És per aquest motiu que es va realitzar l'estudi mutacional no només del tumor de pròstata sinó també del tumor independent de bufeta. En les 17 mostres de tumor de bufeta analitzades es van detectar 3 mutacions en tres gens diferents (*PIK3CA*, *KRAS* i *AKT1*). Les mostres corresponents de tumor de pròstata, però, van ser *wt*. Està descrit en la literatura que la freqüència de mutació de *PIK3CA* en tumors de bufeta és del 13 al 25%.<sup>229,230</sup> La freqüència de mutació que hem trobat nosaltres, en canvi, és inferior (al voltant d'un 5%). Aquesta diferència podria ser explicada pel fet que aquells tumors de bufeta de pacients que també tenen un càncer de pròstata evolucionen de manera diferent als tumors de bufeta de pacients que no tenen cap altre tumor. Una altra explicació podria ser que les sèries analitzades presentessin característiques diferents a la nostra. Així, per exemple, la majoria de tumors de bufeta de la nostra sèrie presentaven infiltració muscular, però en canvi la majoria de mutacions que s'han descrit en la literatura tenen lloc en tumors superficials.<sup>229,230</sup> Per tal d'investigar si aquestes diferències podrien justificar la discrepància trobada en la freqüència de mutació de *PIK3CA*, i si la més baixa freqüència de mutacions era un efecte de la progressió tumoral en els nostres casos, es van seleccionar en 6 dels 17 casos una mostra prèvia al tumor de bufeta que fos superficial i de baix grau. Malgrat tot, però, en cap d'aquestes 6 mostres es van detectar mutacions de *PIK3CA*. De fet, l'única mutació de *PIK3CA* que es va poder detectar va ser en una mostra invasiva i d'alt grau (T3G3).

Aquest estudi ha permès tenir un coneixement més profund del paper de les vies de PI3K-AKT i RAS-RAF en els tumors de pròstata, amb o sense tumors urotelials de bufeta. Com ja s'ha comentat abans, aquest és el primer article en el qual s'han analitzat conjuntament,

en una sèrie extensa de tumors de pròstata, diferents gens de la mateixa via en comptes de gens individuals tal i com s'havia fet fins al moment. Segons els nostres resultats, la sobreexpressió d'ARNm podria ser una alteració rellevant de *PIK3CA* en els tumors de pròstata. Una alta proporció dels tumors de pròstata que hem analitzat presenten sobreexpressió d'ARNm i/o guany d'ADN de *PIK3CA*. També hem descrit que la sobreexpressió d'ARNm de *PIK3CA* està associada amb els tumors de pròstata de Gleason alt ( $\geq 7$ ) malgrat que el guany de còpies d'ADN de *PIK3CA* no ho està. Encara que PI3K i AKT s'han suggerit com a possibles dianes moleculars en el tractament del càncer de pròstata,<sup>227,231</sup> les mutacions de *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* i *AKT1* són fenòmens infreqüents en aquest tipus de tumors. A més, també hem descrit que les amplificacions i/o la sobreexpressió d'ARNm de *PIK3CA* estan associades amb nivells alts de pAKT. Malgrat tot, s'haurien de fer estudis funcionals per acabar de caracteritzar si aquestes alteracions poden causar l'activació de la via de PI3K-AKT i determinar si justificarien l'ús clínic dels inhibidors de PIK3CA i AKT.

Si analitzem globalment els dos primers treballs en total s'han estudiat 175 casos diferents (103 en el primer treball i 102 en el segon) i 30 casos han estat analitzats en ambdós treballs (**veure annex 3**). El grau de Gleason dels 175 casos va ser: 56 casos amb Gleason  $\leq 6$ , 70 amb Gleason 7, 39 amb Gleason  $\geq 8$  i 10 metàstasis òssies. En total s'han detectat 29 alteracions, 1 cas amb una mutació de *KLF6*, 5 casos amb mutacions de *TP53* i 23 casos amb sobreexpressió i/o guany de *PIK3CA* i/o sobreexpressió d'AKT. Les 29 alteracions es van detectar en 29 casos diferents. Només 5 dels 29 casos amb alteracions presentaven progressió tumoral, mentre que els 24 casos restants no van presentar progressió tumoral. Per altra banda, dels 146 casos sense alteració 27 van progressar i 119 no.

Finalment, el nostre tercer objectiu ha estat identificar nous marcadors moleculars predictors del comportament del càncer de pròstata i de la progressió tumoral. Els microarrays d'expressió genètica i la qRT-PCR són dues eines molt útils per classificar els tumors de pròstata a nivell molecular i podrien contribuir en la millora del diagnòstic i el pronòstic dels pacients amb càncer de pròstata.<sup>232</sup> En el tercer estudi, hem identificat una signatura nova de 12 gens, associada a patrons histològics de major agressivitat en càncer

de pròstata. Els gens *SEC14L1* i *TCEB1*, validats per IHQ, podrien ser potencials marcadors moleculars de la progressió i del pronòstic en el càncer de pròstata.

S'han publicat diferents estudis d'expressió genètica de microarrays en càncer de pròstata. Alguns articles han comparat el teixit normal amb el teixit tumoral de pròstata.<sup>233-241</sup> Per altra banda, altres articles han investigat els perfils d'expressió genètica associats amb diferents característiques clinicopatològiques com, per exemple, tumors òrgan-confinats i tumors metastàsics,<sup>242</sup> o comparant tumors amb diferents graus de Gleason.<sup>32,204-206</sup>

En el nostre estudi hem detectat 99 gens diferencialment expressats en mostres tumorals segons el grau de Gleason (tumors amb Gleason 6, Gleason 7 i Gleason  $\geq$  8). D'aquests 99 gens, 29 van ser seleccionats per ser validats mitjançant qRT-PCT. Finalment, 18 dels 29 gens (62%) es van validar. L'índex de validació en el nostre estudi és similar al que s'ha descrit en altres articles i il·lustra la necessitat de verificar els resultats obtinguts per microarrays mitjançant tècniques complementàries com, per exemple, la qRT-PCR.

En l'estudi comparatiu del teixit normal de pròstata inclòs en el nostre estudi, hem identificat 3.380 gens diferencialment expressats entre el teixit tumoral i el teixit normal. Els nostres resultats mostren que alguns dels primers 100 gens diferencialment expressats ja han estat descrits a la literatura prèviament en altres estudis d'expressió genètica comparant mostres tumorals versus normals. Així, per exemple, amb Bermudo *et al.*<sup>240</sup> tenim en comú 4 gens: *ROR2*, *LAMB3*, *CX3CL1* i *TACSTD1*. El gen *TACSTD1* també ha estat descrit per Welsh *et al.*<sup>234</sup> i per Luo *et al.*<sup>239</sup> amb el qual també tenim en comú el gen *KRT14*. Finalment, coincidim amb Vanaja *et al.*<sup>241</sup> en els gens *ZNF185*, *CSRPI* i *TRIM29*. Hi ha altres gens que, malgrat no estiguin entre els 100 primers gens diferencialment expressats, es troben dins de la signatura completa de 3.380 gens i que han estat àmpliament descrits en la literatura. Aquest és el cas, per exemple, del gen *AMACR*<sup>234, 239,240,243</sup> i de *KRT15*<sup>239,240</sup> que estan ubicats dins la llista entre els primers 400 gens.

Diversos autors han descrit prèviament perfils d'expressió associats amb els diferents subgrups dels tumors de pròstata. Així, per exemple, Singh *et al.*<sup>204</sup>, Lapointe *et al.*<sup>205</sup>, True

*et al.*<sup>206</sup> i Ross *et al.*<sup>32</sup> han identificat perfils d'expressió de 29, 52, 86 i 670 gens respectivament, classificant els tumors de pròstata en funció del seu grau de Gleason. Singh *et al.*<sup>204</sup> han analitzat 52 mostres tumorals (24 amb Gleason 6, 22 amb Gleason 7 i 6 amb Gleason  $\geq 8$ ) i 50 mostres de teixit normal de pròstata. En aquest estudi es van utilitzar microarrays d'oligonucleòtids amb sondes per 12.600 gens aproximadament. Lapointe *et al.*<sup>205</sup> van analitzar 62 tumors primaris de pròstata i 41 mostres de teixit normal de pròstata, amb microarrays de cDNA que contenien 26.000 gens. True *et al.*<sup>206</sup> van ser els primers en utilitzar microdissecció làser i varen analitzar 32 mostres diferents procedents de 29 prostatectomies radicals (12 mostres amb patró de Gleason 3, 12 mostres amb patró de Gleason 4 i 5 mostres amb patró de Gleason 5). El perfil d'expressió genètica de l'estudi va ser realitzat mitjançant l'ús de microarrays de cDNA fabricats pels mateixos autors. Finalment, Ross *et al.*<sup>32</sup> van analitzar 13 mostres de grau combinat de Gleason 6 i 10 mostres de Gleason 8 obtingudes a través de microdissecció làser. Les mostres van ser hibridades amb el HumanRef-8v3 (Illumina), el qual conté aproximadament 24.500 sondes.

Comparant els diferents articles, amb True *et al.*<sup>206</sup> compartim 9 gens: *KCTD12*, *YWHAZ*, *RAB2*, *SEC14L1*, *TCEB1*, *MYBPC1*, *HGD*, *AZGP1* i *DPP4*. D'aquests 9 gens, 8 van ser validats en el nostre estudi per qRT-PCR mentre que només un, *RAB2*, no es va validar. A més a més, el gen *AZGP1* és l'únic gen que tenim en comú amb Lapointe *et al.*<sup>205</sup>, els quals realitzen immunohistoquímica d'*AZGP1* per tal de validar els nivells proteics. Els resultats de Lapointe *et al.*<sup>205</sup> mostren que els nivells elevats d'expressió d'*AZGP1* estan associats a un menor risc de recurrència ( $P=0.0008$ ). També és interessant comentar que Ross *et al.*<sup>32</sup> descriuen tres gens, *TCEB1*, *KCTD1* i *PPM2C*, que també es troben presents en la signatura de gens de True *et al.*<sup>206</sup> així com en la nostra llista de gens validats. Amb Singh *et al.*<sup>204</sup> tenim en comú els gens *CCND2* i *RPL13*. *CCND2* no es va validar en els experiments de qRT-PCR i *RPL13* no va ser inclòs en l'estudi. Finalment, només hi ha tres gens en comú entre els estudis de Singh *et al.*<sup>204</sup> i Lapointe *et al.*<sup>205</sup>: *SPARC*, *BGN* i *COL1A2*. Cap dels subseqüents estudis<sup>32,206</sup> ni nosaltres hem detectat aquests tres gens.

L'estudi realitzat per Bermudo *et al.*<sup>240</sup> van identificar diferents signatures genètiques relacionades amb les cèl·lules luminals no tumorals, l'epiteli tumoral, les cèl·lules basals i el teixit estromal. En aquest estudi es descriu un guany recurrent en la regió 17q25.3 en càncer de pròstata. Precisament és en aquesta regió on es localitza el gen *THOC4*, el qual és un dels 99 gens de la nostra signatura. Malgrat tot, però, aquest gen no es va validar en el nostre estudi amb qRT-PCR.

Realitzant comparacions de grups de Gleason dos a dos, vam descobrir un perfil de 12 gens diferencialment expressats en tumors amb Gleason 6 i/o 7 versus tumors amb Gleason  $\geq 8$ . D'aquests, 4 es trobaven infraexpressats (*AZGP1*, *DPP4*, *HGD* i *MYBPC1*) i 8 sobreexpressats (*PARP1*, *PRKDC*, *PARP1*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *TCEB1*, *YWHAZ* i *ZNF706*). Aquests gens podrien ser potencials marcadors d'agressivitat histològica.

Alguns dels gens validats que hem detectat com diferencialment expressats en funció del grau de Gleason han estat prèviament descrits en diferents tipus de càncer, incloent el càncer de pròstata. Així, per exemple, *PARP1* es troba implicat en la regulació d'importants processos cel·lulars, com per exemple la diferenciació, la proliferació i la transformació tumoral. L'ús d'inhibidors de *PARP1* és una de les teràpies més prometedores en el tractament del càncer de mama i de pròstata.<sup>244,245</sup> El gen *SLPI* s'ha vist implicat en la maquinària de secreció del PSA en les cèl·lules prostàtiques.<sup>246</sup> El gen *DPP4* és secretat per les cèl·lules normals de pròstata i s'ha descrit que inhibeix el fenotip maligne de les cèl·lules de càncer de pròstata mitjançant la inhibició de la via de senyalització de bFGF.<sup>247</sup> Com ja hem dit, l'expressió del gen *AZGP1* està associada a un menor risc de recurrència en càncer de pròstata.<sup>206</sup> Altres autors han descrit que hi ha associació entre la pèrdua d'expressió de l'*AZGP1* i la recurrència del càncer de pròstata.<sup>248,249</sup> Els nostres resultats estan en concordància amb aquests treballs previs, ja que mostren infraexpressió del gen en tumors amb alt grau de Gleason.

Tres gens de la signatura de 12, *ZNF19A*, *TCEB1* i *ZNF706*, estan localitzats en la regió 8q21-23, la qual es troba amplificada en més del 40% de tumors primaris de pròstata i, a més a més, està associada a tumors d'alt grau.<sup>250</sup>

L'estudi immunohistoquímic de *SEC14L1* i *TCEB1* es va realitzar amb l'objectiu de determinar l'expressió proteica d'aquests dos gens. La proteïna SEC14L1 pertany a la família de factors citològics SEC14, la qual té un paper important en el transport intracel·lular.<sup>251</sup> Els nostres resultats indiquen que l'expressió intensa de SEC14L1 (nivells d'histoscore  $\geq 180$ ) està associada amb els tumors de Gleason  $\geq 8$  i amb estadis tumorals més avançats. A més a més, els nivells d'histoscore  $\geq 215$  de SEC14L1 estan associats amb la progressió bioquímica. Per altra banda, els nostres resultats també van demostrar que el gen *TCEB1* està sobrerregulat en tumors de Gleason  $\geq 8$ . *TCEB1* es localitza en la regió 8q21.11. Precisament, el guany del braç llarg del cromosoma 8 és una de les alteracions més descrites en els tumors avançats de càncer de pròstata i, a més a més, està associada amb un pitjor pronòstic.<sup>252,253</sup> Porkka *et al.*<sup>254</sup> han demostrat per FISH que el 23% dels tumors hormono-independents presenten amplificacions del gen *TCEB1*, mentre que cap dels tumors hormono-dependents en tenien (només presentaven baixos nivells de guany el 30% dels tumors). Finalment, Jalava *et al.*<sup>255</sup> han demostrat que *TCEB1* promou la invasió cel·lular en les cèl·lules de càncer de pròstata. Els nostres resultats demostren que els nivells immunohistoquímics alts de TCEB1 (histoscore  $\geq 125$ ) estan associats amb els tumors de Gleason  $\geq 8$  i amb la progressió bioquímica. Així mateix, els nivells d'histoscore  $\geq 215$  estan associats amb l'estadi tumoral. Seria interessant, de cara al futur, fer un seguiment d'aquells tumors amb un grau de Gleason  $\leq 7$  i que tenen nivells proteics elevats de SEC14L1 i de TCEB1, ja que segons els nostres resultats, aquestes alteracions podrien servir per detectar els tumors amb baix grau de Gleason que tindrien un major risc de progressió tumoral.

En conclusió, els resultats del tercer estudi que hem inclòs en aquest projecte demostren que existeix un perfil d'expressió genètica suficientment robust per distingir els tumors de pròstata amb Gleason 6, 7 i  $\geq 8$ . A més a més, els nostres resultats també demostren que hi

ha una signatura de 12 gens associada amb els tumors d'alt grau i que podria constituir un bon perfil indicatiu d'agressivitat tumoral. També s'han validat per immunohistoquímica els nivells proteics de dos gens de la signatura de 12, *SEC14L1* i *TCEB1* i els resultats han demostrat que l'expressió d'aquests dos gens està associada a una major agressivitat i que podrien ser dos bons marcadors de progressió tumoral. Seria interessant en un futur estudiar el paper patogènic dels altres 10 gens de la signatura.





---

---

## ***5. CONCLUSIONS***

---

---

“Pensar contra el corrent del temps és heroic.  
Dir-ho una bogeria”

Eugène Ionesco



## **5. CONCLUSIONS**

**5.1.** Les mutacions de *KLF6* són un fenomen infreqüent en el càncer de pròstata, ja que estan presents en menys de l'1% dels tumors de la nostra sèrie.

**5.2.** Les mutacions de *TP53* són també una alteració poc freqüent en els tumors de pròstata i, si bé es van trobar preferentment en casos amb Gleason alt, també se'n varen identificar en menor proporció en casos amb Gleason baix o casos d'autòpsia, que es consideren habitualment casos de lenta evolució.

**5.3.** L'elevada freqüència de mutacions d'aquests gens descrita en la literatura podria ser deguda a la presència d'artefactes induïts per la fixació de les mostres en formol i a la introducció artefactual de nucleòtids per part de la Taq-polimerasa en el procés de la PCR, tot i que no es pot descartar que hi hagin influït les diferències genètiques entre les poblacions estudiades.

**5.4.** Per confirmar possibles mutacions és recomanable fer una segona amplificació de PCR i posterior seqüenciació. Hauria de ser imperatiu dur a terme aquesta segona amplificació en casos en els quals el teixit ha estat fixat en formol i inclòs en parafina.

**5.5.** Les mutacions de *PIK3CA*, *BRAF*, *KRAS* i *AKT1* són infreqüents en els tumors de pròstata.

**5.6.** El gen *PIK3CA* es troba desregulat en un 40% dels tumors de pròstata mitjançant la sobreexpressió d'ARNm i, en un 28% de casos, a través del guany de còpies d'ADN.

**5.7.** La sobreexpressió d'ARNm del gen *PIK3CA* està associada estadísticament amb els tumors de Gleason  $\geq 7$ .

**5.8.** Hi ha associació estadística dels nivells alts de proteïna AKT fosforilada (activa) amb els tumors d'alt grau de Gleason i amb les alteracions de *PIK3CA* (sobrexpressió d'ARNm i/o guany de còpies d'ADN).

**5.9.** Existeix un perfil d'expressió d'ARN, de 99 gens detectat mitjançant l'array d'Affymetrix Human Array GeneChip® Exon 1.0 ST, que és capaç de discriminar entre els tumors de Gleason 6, 7 i  $\geq 8$ .

**5.10.** D'aquests 99 gens, les alteracions diferencials d'expressió d'*AZGP1*, *CAMK1D*, *CDKN1B*, *DPP4*, *HGD*, *KCTD12*, *MYBPC1*, *NCOA3*, *PARP1*, *PPM2C*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *SUMO2*, *TCEB1*, *YWHAZ* i *ZNF706* es van validar mitjançant qRT-PCR.

**5.11.** Existeix un perfil de 12 gens que diferencia els tumors de Gleason  $\geq 8$  dels de Gleason 6-7 (*AZGP1*, *DPP4*, *HGD*, *MYBPC1*, *PARP1*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *TCEB1*, *YWHAZ* i *ZNF706*). Aquests 12 gens podrien ser bons marcadors d'agressivitat tumoral.

**5.12.** Els nivells elevats d'expressió proteica de *SEC14L1* i *TCEB1* es correlacionen amb el grau de Gleason, amb l'estadi i amb la progressió bioquímica dels tumors. Aquests dos gens podrien ser bons candidats per ser utilitzats com a marcadors de pronòstic i de progressió en el càncer de pròstata.

---

---

## ***6. BIBLIOGRAFIA***

---

---

**PROFESSOR:** T'hi hauràs d'acostumar. Estàs atrapat. Veus? Ara sí.

**NOI:** Atrapat?

**PROFESSOR:** Tu vas llegir l'assaig. Ets l'única persona que el coneix. Quan jo mori només quedaran fragments barrejats a la teva memòria. L'assaig és definitivament teu. Només teu. Una herència. La utilitzaràs o no, però és una herència que no pots rebutjar.

Ara la portes dins la pell.

Testament

Josep M. Benet i Jornet



- 1 Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010; **24**:1967-2000.
- 2 Ware JL. Prostate cancer progression. implications of histopathology. *Am J Pathol* 1994; **145**:983-93.
- 3 Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000; **14**:2410-34.
- 4 Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: Diagnosis and staging. *Asian J Androl* 2009; **11**:74-80.
- 5 Varma M, Jasani B. Diagnostic utility of immunohistochemistry in morphologically difficult prostate cancer: Review of current literature. *Histopathology* 2005; **47**:1-16.
- 6 Daniels NA, Nielson CM, Hoffman AR, Bauer DC, Osteoporotic Fractures In Men (MrOS) Study Group. Sex hormones and the risk of incident prostate cancer. *Urology* 2010; **76**:1034-40.
- 7 Walsh PC. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2005; **174**:1292-3.
- 8 Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F, European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2008; **53**:68-80.
- 9 Peyromaure M, Valeri A, Rebillard X, Beuzeboc P, Richaud P, Soulie M, Salomon L, CCAFU. Characteristics of prostate cancer in men less than 50-year-old]. *Prog Urol* 2009; **19**:803-9.

- 10 Carter BS, Carter HB, Isaacs JT. Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer. *Prostate* 1990; **16**:187-97.
- 11 Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among japanese and white immigrants in los angeles county. *Br J Cancer* 1991; **63**:963-6.
- 12 Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**:1571-9.
- 13 Vlajinac H, Ilic M, Marinkovic J, Sipetic S. Nutrition and prostate cancer. *J BUON* 2010; **15**:698-703.
- 14 Venkateswaran V, Klotz LH. Diet and prostate cancer: Mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nat Rev Urol* 2010; **7**:442-53.
- 15 Jayachandran J, Freedland SJ. Prevention of prostate cancer: What we know and where we are going. *Am J Mens Health* 2008; **2**:178-89.
- 16 Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**:2690-4.
- 17 Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 1997; **57**:2916-21.
- 18 Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in japanese men. *Lancet* 1993; **342**:1209-10.



19 Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, Ewing C, Wilkens E, Bujnovszky P, Bova GS, Walsh P, Isaacs W, Schleutker J, Matikainen M, Tammela T, Visakorpi T, Kallioniemi OP, Berry R, Schaid D, French A, McDonnell S, Schroeder J, Blute M, Thibodeau S, Gronberg H, Emanuelsson M, Damber JE, Bergh A, Jonsson BA, Smith J, Bailey-Wilson J, Carpten J, Stephan D, Gillanders E, Amundson I, Kainu T, Freas-Lutz D, Baffoe-Bonnie A, Van Aucken A, Sood R, Collins F, Brownstein M, Trent J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* 1998; **20**:175-9.

20 Xu J, Zheng SL, Carpten JD, Nupponen NN, Robbins CM, Mestre J, Moses TY, Faith DA, Kelly BD, Isaacs SD, Wiley KE, Ewing CM, Bujnovszky P, Chang B, Bailey-Wilson J, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001; **68**:901-11.

21 Xu J, Zheng SL, Chang B, Smith JR, Carpten JD, Stine OC, Isaacs SD, Wiley KE, Henning L, Ewing C, Bujnovszky P, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Linkage of prostate cancer susceptibility loci to chromosome 1. *Hum Genet* 2001; **108**:335-45.

22 Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Yu K, Chatterjee N, Welch R, Hutchinson A, Crenshaw A, Cancel-Tassin G, Staats BJ, Wang Z, Gonzalez-Bosquet J, Fang J, Deng X, Berndt SI, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Jr, Hoover R, Hayes RB, Hunter DJ, Chanock SJ. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 2008; **40**:310-5.

23 Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Ardern-Jones AT, Hall AL,

O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A, Lewis S, Brown PM, Jhavar SG, Tymrakiewicz M, Lophatananon A, Bryant SL, UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators, British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology, UK ProtecT Study Collaborators, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Fisher C, Jamieson C, Cooper CS, English DR, Hopper JL, Neal DE, Easton DF. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; **40**:316-21.

24 Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Magnusdottir DN, Orlygsdottir G, Jakobsdottir M, Stacey SN, Sigurdsson A, Wahlfors T, Tammela T, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Saez B, Godino J, Navarrete S, Fuertes F, Murillo L, Polo E, Aben KK, van Oort IM, Suarez BK, Helfand BT, Kan D, Zanon C, Frigge ML, Kristjansson K, Gulcher JR, Einarsson GV, Jonsson E, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Smith JR, Schleutker J, Barkardottir RB, Kong A, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, Stefansson K. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2009; **41**:1122-6.

25 Kader AK, Sun J, Isaacs SD, Wiley KE, Yan G, Kim ST, Fedor H, DeMarzo AM, Epstein JI, Walsh PC, Partin AW, Trock B, Zheng SL, Xu J, Isaacs W. Individual and cumulative effect of prostate cancer risk-associated variants on clinicopathologic variables in 5,895 prostate cancer patients. *Prostate* 2009; **69**:1195-205.

26 Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: A review of the literature. *J Clin Oncol* 2004; **22**:735-42.

27 Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; **129C**:65-73.

28 Kirchoff T, Kauff ND, Mitra N, Nafa K, Huang H, Palmer C, Gulati T, Wadsworth E, Donat S, Robson ME, Ellis NA, Offit K. BRCA mutations and risk of prostate cancer in ashkenazi jews. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:2918-21.

29 Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006; **97**:433-47.

30 Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005; **58**:673-84.

31 De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**:256-69.

32 Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, Kauffman RA, Dolen EM, Kallakury BV. Prognostic markers in prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; **2**:129-42.

33 Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 2002; **167**:948,51; discussion 952.

34 Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001; **23**:1355-90.

35 Shibata A, Whittemore AS. Genetic predisposition to prostate cancer: Possible explanations for ethnic differences in risk. *Prostate* 1997; **32**:65-72.

36 Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: Androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol* 2003; **149**:469-77.

37 Madu CO, Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer* 2010; **1**:150-77.

- 38 Waterhouse RL, Resnick MI. The use of transrectal prostatic ultrasonography in the evaluation of patients with prostatic carcinoma. *J Urol* 1989; **141**:233-9.
- 39 Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: A decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999; **162**:293-306.
- 40 Ablin RJ, Bronson P, Soanes WA, Witebsky E. Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. *J Immunol* 1970; **104**:1329-39.
- 41 Grayhack JT, Bockrath JM. Diagnosis of carcinoma of prostate. *Urology* 1981; **17**:54-60.
- 42 Gretzer MB, Partin AW. PSA markers in prostate cancer detection. *Urol Clin North Am* 2003; **30**:677-86.
- 43 Mistry K, Cable G. Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract* 2003; **16**:95-101.
- 44 Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol* 2006; **1**:243-71.
- 45 Epstein JI. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009; **454**:1-16.
- 46 Ayala AG, Ro JY. Prostatic intraepithelial neoplasia: Recent advances. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**:1257-66.
- 47 Chrisofos M, Papatsoris AG, Lazaris A, Deliveliotis C. Precursor lesions of prostate cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007; **44**:243-70.

48 Epstein JI, Allsbrook WC, Jr, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee. The 2005 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**:1228-42.

49 Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966; **50**:125-8.

50 Yatani R, Kusano I, Shiraishi T, Hayashi T, Stemmermann GN. Latent prostatic carcinoma: Pathological and epidemiological aspects. *Jpn J Clin Oncol* 1989; **19**:319-26.

51 Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**:34-45.

52 Arya M, Bott SR, Shergill IS, Ahmed HU, Williamson M, Patel HR. The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 2006; **15**:117-28.

53 Mazhar D, Waxman J. Gene therapy for prostate cancer. *BJU Int* 2004; **93**:465-9.

54 Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:21-8.

55 Corey E, Quinn JE, Bladou F, Brown LG, Roudier MP, Brown JM, Buhler KR, Vessella RL. Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: Intra-tibial injection of human prostate cancer cells. *Prostate* 2002; **52**:20-33.

56 Singh AS, Figg WD. In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. *J Urol* 2005; **174**:820-6.

57 Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. DNA copy number alterations in prostate cancers: A combined analysis of published CGH studies. *Prostate* 2007; **67**:692-700.

58 Bieker JJ. Kruppel-like factors: Three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001; **276**:34355-8.

59 Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001; **294**:2563-6.

60 Narla G, Kremer-Tal S, Matsumoto N, Zhao X, Yao S, Kelley K, Tarocchi M, Friedman SL. In vivo regulation of p21 by the kruppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2007; **26**:4428-34.

61 Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF, Jr, Vessella RL, Dong JT. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003; **162**:1349-54.

62 Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebring S, Komiya A, McDonnell SK, Wiley KE, Jacobsen SJ, Isaacs SD, Walsh PC, Zheng SL, Chang BL, Friedrichsen DM, Stanford JL, Ostrander EA, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Xu J, Thibodeau SN, Friedman SL, Martignetti JA. A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 2005; **65**:1213-22.

63 Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects. *Am J Pathol* 2003; **162**:1047-52.

64 Slavin DA, Koritschoner NP, Prieto CC, Lopez-Diaz FJ, Chatton B, Bocco JL. A new role for the kruppel-like transcription factor KLF6 as an inhibitor of c-jun proto-oncoprotein function. *Oncogene* 2004; **23**:8196-205.

65 DiFeo A, Narla G, Camacho-Vanegas O, Nishio H, Rose SL, Buller RE, Friedman SL, Walsh MJ, Martignetti JA. E-cadherin is a novel transcriptional target of the KLF6 tumor suppressor. *Oncogene* 2006; **25**:6026-31.

66 Boyault S, Herault A, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Absence of KLF6 gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2005; **41**:681,2; author reply 682-3.

67 Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJ, Martignetti JA, Friedman SL. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; **126**:1090-103.

68 Lievre A, Landi B, Cote JF, Veyrie N, Zucman-Rossi J, Berger A, Laurent-Puig P. Absence of mutation in the putative tumor-suppressor gene KLF6 in colorectal cancers. *Oncogene* 2005; **24**:7253-6.

69 Cho YG, Choi BJ, Kim CJ, Song JW, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic alterations of the KLF6 gene in colorectal cancers. *APMIS* 2006; **114**:458-64.

70 Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, Funata N, Mori T. Difference in the role of loss of heterozygosity at 10p15 (KLF6 locus) in colorectal carcinogenesis between sporadic and familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Oncology* 2006; **71**:131-5.

71 Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2003; **105**:625-9.

72 Kohler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G. Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer* 2004; **111**:644-5.

73 Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G. KLF6 is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer* 2004; **111**:640-1.

74 Koivisto PA, Zhang X, Sallinen SL, Sallinen P, Helin HJ, Dong JT, Van Meir EG, Haapasalo H, Hyytinen ER. Absence of KLF6 gene mutations in human astrocytic tumors and cell lines. *Int J Cancer* 2004; **111**:642-3.

75 Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, Thung SN, Schwartz M, Difeo A, Katz A, Bruix J, Bioulac-Sage P, Martignetti JA, Friedman SL. Frequent inactivation of the tumor suppressor kruppel-like factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; **40**:1047-52.

76 Song J, Kim CJ, Cho YG, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic and epigenetic alterations of the KLF6 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; **21**:1286-9.

77 Pan XC, Chen Z, Chen F, Chen XH, Jin HY, Xu XY. Inactivation of the tumor suppressor kruppel-like factor 6 (KLF6) by mutation or decreased expression in hepatocellular carcinomas. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; **7**:830-6.

78 Muhlbauer KR, Grone HJ, Ernst T, Grone E, Tschada R, Hergenhahn M, Hollstein M. Analysis of human prostate cancers and cell lines for mutations in the TP53 and KLF6 tumour suppressor genes. *Br J Cancer* 2003; **89**:687-90.

79 Bar-Shira A, Matarasso N, Rosner S, Bercovich D, Matzkin H, Orr-Urtreger A. Mutation screening and association study of the candidate prostate cancer susceptibility genes MSR1, PTEN, and KLF6. *Prostate* 2006; **66**:1052-60.

80 Ito G, Uchiyama M, Kondo M, Mori S, Usami N, Maeda O, Kawabe T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y. Kruppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**:3838-43.



81 Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, Hod E, DiFeo A, Yea S, Lee JS, Schwartz M, Thung SN, Fiel IM, Banck M, Zimran E, Thorgeirsson SS, Mazzaferro V, Bruix J, Martignetti JA, Llovet JM, Friedman SL. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *J Hepatol* 2007; **46**:645-54.

82 Kettunen E, Anttila S, Seppanen JK, Karjalainen A, Edgren H, Lindstrom I, Salovaara R, Nissen AM, Salo J, Mattson K, Hollmen J, Knuutila S, Wikman H. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: Expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **149**:98-106.

83 Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, Taylor JM, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; **8**:816-24.

84 Seppala EH, Autio V, Duggal P, Ikonen T, Stenman UH, Auvinen A, Bailey-Wilson JE, Tammela TL, Schleutker J. KLF6 IVS1 -27G>A variant and the risk of prostate cancer in finland. *Eur Urol* 2007; **52**:1076-81.

85 Spinola M, Leoni VP, Galvan A, Korsching E, Conti B, Pastorino U, Ravagnani F, Columbano A, Skaug V, Haugen A, Dragani TA. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis of lung cancer risk detects the KLF6 gene. *Cancer Lett* 2007; **251**:311-6.

86 DiFeo A, Martignetti JA, Narla G. The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2009; **12**:1-7.

87 Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**:a001008.

- 88 Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: From structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**:a000919.
- 89 Soussi T, Lozano G. P53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**:834-42.
- 90 Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 2009; **137**:413-31.
- 91 Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: Multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007; **26**:1306-16.
- 92 Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**:701-13.
- 93 Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**:15-6.
- 94 Brady CA, Attardi LD. P53 at a glance. *J Cell Sci* 2010; **123**:2527-32.
- 95 Gottlieb E, Vousden KH. P53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**:a001040.
- 96 Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010; **9**:145-52.
- 97 Waning DL, Lehman JA, Batuello CN, Mayo LD. Controlling the Mdm2-mdmx-p53 circuit. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; **3**:1576-93.
- 98 Manfredi JJ. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev* 2010; **24**:1580-9.

99 Meyers FJ, Gumerlock PH, Chi SG, Borchers H, Deitch AD, deVere White RW. Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors. *Cancer* 1998; **83**:2534-9.

100 Downing SR, Russell PJ, Jackson P. Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer. *Can J Urol* 2003; **10**:1924-33.

101 Gumerlock PH, Chi SG, Shi XB, Voeller HJ, Jacobson JW, Gelmann EP, deVere White RW. p53 abnormalities in primary prostate cancer: Single-strand conformation polymorphism analysis of complementary DNA in comparison with genomic DNA. the cooperative prostate network. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**:66-71.

102 Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; **26**:2157-65.

103 Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995; **1**:1111-8.

104 Henner WD, Evans AJ, Hough KM, Harris EL, Lowe BA, Beer TM. Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate* 2001; **49**:263-6.

105 Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Takei T, Nakazato H, Okugi H, Koike H, Ono Y, Ito K, Kurokawa K, Yamanaka H. A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in japanese. *J Biomed Sci* 2003; **10**:430-5.

106 Huang SP, Wu WJ, Chang WS, Wu MT, Chen YY, Chen YJ, Yu CC, Wu TT, Lee YH, Huang JK, Huang CH. p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**:2217-24.

- 107 Zhang J, Zhuo WL, Zheng Y, Zhang YS. Polymorphisms of TP53 codon 72 with prostate carcinoma risk: A meta-analysis. *Med Oncol* 2010; **27**:540-6.
- 108 Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**:3453-9.
- 109 Watanabe T, Ichikawa A, Saito H, Hotta T. Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996; **21**:391,7, color plates XVI following 5.
- 110 Ittmann M, Wiczorek R, Heller P, Dave A, Provet J, Krolewski J. Alterations in the p53 and MDM-2 genes are infrequent in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1994; **145**:287-93.
- 111 Osman I, Drobnjak M, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: Impact on tumor progression. *Clin Cancer Res* 1999; **5**:2082-8.
- 112 Leite KR, Franco MF, Srougi M, Nesrallah LJ, Nesrallah A, Bevilacqua RG, Darini E, Carvalho CM, Meirelles MI, Santana I, Camara-Lopes LH. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 2001; **14**:428-36.
- 113 Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene* 2008; **27**:5497-510.
- 114 Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:921-9.
- 115 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1784**:150-8.

- 116 Cayuela A, Rodriguez-Dominguez S, Martin VE, Candau BR. Recent changes in prostate cancer mortality in Spain. Trends analysis from 1991 to 2005. *Actas Urol Esp* 2008; **32**:184-9.
- 117 Schonleben F, Qiu W, Remotti HE, Hohenberger W, Su GH. PIK3CA, KRAS, and BRAF mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/C) of the pancreas. *Langenbecks Arch Surg* 2008; **393**:289-96.
- 118 Cain RJ, Ridley AJ. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 2009; **101**:13-29.
- 119 Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 2006; **18**:77-82.
- 120 Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 2006; **94**:455-9.
- 121 Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; **7**:606-19.
- 122 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**:1098-101.
- 123 Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **4**:988-1004.
- 124 Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; **411**:355-65.
- 125 Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 2008; **118**:3051-64.

126 Goc A, Al-Husein B, Kochuparambil ST, Liu J, Heston WW, Somanath PR. PI3 kinase integrates akt and MAP kinase signaling pathways in the regulation of prostate cancer. *Int J Oncol* 2011; **38**:267-77.

127 Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:10983-5.

128 Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the raf-MEK-ERK pathway by akt. *Science* 1999; **286**:1738-41.

129 Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, Bartlett JM. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:5271-81.

130 Muller CI, Miller CW, Hofmann WK, Gross ME, Walsh CS, Kawamata N, Luong QT, Koeffler HP. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leuk Res* 2007; **31**:27-32.

131 Sun X, Huang J, Homma T, Kita D, Klocker H, Schafer G, Boyle P, Ohgaki H. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. *Anticancer Res* 2009; **29**:1739-43.

132 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; **275**:1943-7.

133 Liu W, Zhou Y, Reske SN, Shen C. PTEN mutation: Many birds with one stone in tumorigenesis. *Anticancer Res* 2008; **28**:3613-9.

134 Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* 2006; **241**:184-96.

135 Liu W, Chang B, Sauvageot J, Dimitrov L, Gielzak M, Li T, Yan G, Sun J, Sun J, Adams TS, Turner AR, Kim JW, Meyers DA, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; **45**:1018-32.

136 Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M. Haploinsufficiency of the pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:11563-8.

137 Schmitz M, Grignard G, Margue C, Dippel W, Capesius C, Mossong J, Nathan M, Giacchi S, Scheiden R, Kieffer N. Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. *Int J Cancer* 2007; **120**:1284-92.

138 Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Torres CH, Soares FA, Squire JA. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 2007; **97**:678-85.

139 Dong JT, Li CL, Sipe TW, Frierson HF, Jr. Mutations of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancers from chinese patients. *Clin Cancer Res* 2001; **7**:304-8.

140 Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, Li CL, Heise C, McClintock DE, Grant CD, Chung LW, Frierson HF, Jr. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. *Oncogene* 1998; **17**:1979-82.

141 Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005; **24**:7465-74.

142 Pesche S, Latil A, Muzeau F, Cussenot O, Fournier G, Longy M, Eng C, Lidereau R. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* 1998; **16**:2879-83.

143 Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:5246-50.

144 Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:4799-805.

145 Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas GV, Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. Prostate-specific deletion of the murine pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 2003; **4**:209-21.

146 Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, MousSES S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007; **448**:439-44.

147 Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, De Gisi S, Malara N, Savino R, Rocco G, Chiappetta G, Franco R, Tirino V, Pirozzi G, Viglietto G. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle* 2008; **7**:665-9.

148 Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, Scarpa A, Leenstra S, Frattini M, Barbareschi M, Grammastro MD, Sciarrotta MG, Zanon C, Marchetti A, Bardelli A. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008; **27**:5648-50.



149 Boormans JL, Hermans KG, van Leenders GJ, Trapman J, Verhagen PC. An activating mutation in AKT1 in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2008; **123**:2725-6.

150 Eom HS, Kim MS, Hur SY, Yoo NJ, Lee SH. Absence of oncogenic AKT1 E17K mutation in prostate, esophageal, laryngeal and urothelial carcinomas, hepatoblastomas, gastrointestinal stromal tumors and malignant meningiomas. *Acta Oncol* 2009; **48**:1084-5.

151 Boormans JL, Korsten H, Ziel-van der Made AC, van Leenders GJ, Verhagen PC, Trapman J. E17K substitution in AKT1 in prostate cancer. *Br J Cancer* 2010; **102**:1491-4.

152 Kirkegaard T, Witton CJ, Edwards J, Nielsen KV, Jensen LB, Campbell FM, Cooke TG, Bartlett JM. Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH. *Histopathology* 2010; **56**:203-11.

153 Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**:779-827.

154 Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008; **27**:877-95.

155 Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Al-Harbi S, Ibrahim M, Al-Nuaim A, Ahmed M, Amin T, Al-Fehaily M, Al-Sanea O, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a middle eastern population. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**:611-8.

156 Blount LV, Cooke DB, 3rd. Point mutations in the ki-ras2 gene of codon 12 in the dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma system. *Prostate* 1996; **28**:44-50.

157 Konishi N, Hiasa Y, Tsuzuki T, Tao M, Enomoto T, Miller GJ. Comparison of ras activation in prostate carcinoma in japanese and american men. *Prostate* 1997; **30**:53-7.

158 Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006; **119**:1858-62.

159 Shen Y, Lu Y, Yin X, Zhu G, Zhu J. KRAS and BRAF mutations in prostate carcinomas of chinese patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; **198**:35-9.

160 Watanabe M, Shiraishi T, Yatani R, Nomura AM, Stemmermann GN. International comparison on ras gene mutations in latent prostate carcinoma. *Int J Cancer* 1994; **58**:174-8.

161 Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R, Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; **116**:855-67.

162 Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**:625-7.

163 Liu T, Willmore-Payne C, Layfield LJ, Holden JA. Lack of BRAF activating mutations in prostate adenocarcinoma: A study of 93 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; **17**:121-5.

164 Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010; **18**:11-22.

165 Jeong JH, Wang Z, Guimaraes AS, Ouyang X, Figueiredo JL, Ding Z, Jiang S, Guney I, Kang GH, Shin E, Hahn WC, Loda MF, Abate-Shen C, Weissleder R, Chin L. BRAF

activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *PLoS One* 2008; **3**:e3949.

166 Pearson HB, Phesse TJ, Clarke AR. K-ras and wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res* 2009; **69**:94-101.

167 Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, Han B, Cao Q, Cao X, Suleman K, Kumar-Sinha C, Dhanasekaran SM, Chen YB, Esgueva R, Banerjee S, LaFargue CJ, Siddiqui J, Demichelis F, Moeller P, Bismar TA, Kuefer R, Fullen DR, Johnson TM, Greenson JK, Giordano TJ, Tan P, Tomlins SA, Varambally S, Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* 2010; **16**:793-8.

168 Nelson WG, De Marzo AM, Dewese TL, Lin X, Brooks JD, Putzi MJ, Nelson CP, Groopman JD, Kensler TW. Preneoplastic prostate lesions: An opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **952**:135-44.

169 Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. 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; **91**:11733-7.

170 Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 1999; **18**:1313-24.

171 Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2003; **169**:1138-42.

172 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; **91**:540-52.

173 Nelson CP, Kidd LC, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Groopman JD, Nelson WG, Kensler TW. Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res* 2001; **61**:103-9.

174 Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res* 1996; **56**:2411-6.

175 Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, Zhuang Z, Bostwick DG, Liotta LA, Linehan WM. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 1995; **55**:2959-62.

176 Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 1999; **13**:966-77.

177 Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP, Gelmann EP. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 2000; **60**:6111-5.

178 Chen H, Nandi AK, Li X, Bieberich CJ. NKX-3.1 interacts with prostate-derived ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res* 2002; **62**:338-40.

179 Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; **287**:1662-70.

180 Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: Interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; **62**:4427-33.

181 Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, Ewing CM, Platz EA, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Trent JM, Isaacs WB, De Marzo AM. Alpha-methylacyl-CoA racemase: A new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002; **62**:2220-6.

182 Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, Pihan G, Cai F, Babcook JS, Rathanaswami P, Reed SG, Xu J, Fanger GR. P504S: A new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**:1397-404.

183 Wu CL, Yang XJ, Tretiakova M, Patton KT, Halpern EF, Woda BA, Young RH, Jiang Z. Analysis of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 2004; **35**:1008-13.

184 Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg Pathol* 2004; **28**:239-43.

185 Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG, Grignon DJ, Fanger GR, Amin MB. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**:1588-96.

186 Evans AJ. Alpha-methylacyl CoA racemase (P504S): Overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J Clin Pathol* 2003; **56**:892-7.

187 Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin

MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; **310**:644-8.

188 Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B, Yu J, Wang L, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Roulston D, Shah RB, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007; **448**:595-9.

189 Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, Peltola M, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, Nees M, Kallioniemi O. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 2006; **66**:10242-6.

190 Mehra R, Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT, Pienta KJ, Ghosh D, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Shah RB. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 2007; **20**:538-44.

191 Mosquera JM, Perner S, Genega EM, Sanda M, Hofer MD, Mertz KD, Paris PL, Simko J, Bismar TA, Ayala G, Shah RB, Loda M, Rubin MA. Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 2008; **14**:3380-5.

192 Rouzier C, Haudebourg J, Carpentier X, Valerio L, Amiel J, Michiels JF, Pedeutour F. Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: Retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; **183**:21-7.

193 Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2008; **14**:3395-400.

194 Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, Tchinda J, Tomlins SA, Hofer MD, Pienta KG, Kuefer R, Vessella R, Sun XW, Meyerson M, Lee C, Sellers WR, Chinnaiyan AM, Rubin MA. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; **66**:8337-41.

195 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; **66**:8347-51.

196 Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, Eeles R, Martin FL, Phillips DH, Crundwell M, Christmas T, Thompson A, Fisher C, Kovacs G, Cooper CS. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 2007; **26**:2667-73.

197 Clark J, Attard G, Jhavar S, Flohr P, Reid A, De-Bono J, Eeles R, Scardino P, Cuzick J, Fisher G, Parker MD, Foster CS, Berney D, Kovacs G, Cooper CS. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 2008; **27**:1993-2003.

198 Albadine R, Latour M, Toubaji A, Haffner M, Isaacs WB, Platz E, Meeker AK, Demarzo AM, Epstein JI, Netto GJ. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2009; **22**:1415-22.

199 Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**:497-511.

200 Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, Wu L, Li J, Hu M, Gong Y, Cheng H, Laxman B, Vellaichamy A, Shankar S, Li Y, Dhanasekaran SM, Morey R,

Barrette T, Lonigro RJ, Tomlins SA, Varambally S, Qin ZS, Chinnaiyan AM. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 2010; **17**:443-54.

201 Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM, Chiu YL, Esgueva R, Mehra R, Suleman K, Varambally S, Brenner JC, MacDonald T, Srivastava A, Tewari AK, Sathyanarayana U, Nagy D, Pestano G, Kunju LP, Demichelis F, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* 2010; **12**:590-8.

202 Broadhead ML, Clark JC, Dass CR, Choong PF. Microarray: An instrument for cancer surgeons of the future? *ANZ J Surg* 2010; **80**:531-6.

203 Calvo A, Gonzalez-Moreno O, Yoon CY, Huh JI, Desai K, Nguyen QT, Green JE. Prostate cancer and the genomic revolution: Advances using microarray analyses. *Mutat Res* 2005; **576**:66-79.

204 Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR, Sellers WR. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 2002; **1**:203-9.

205 Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:811-6.

206 True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, Beer TM, Gelmann E, Datta M, Mostaghel E, Knudsen B, Lange P, Vessella R, Lin D, Hood L, Nelson PS. A molecular correlate to the gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:10991-6.

207 Reynolds MA. Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 2008; **271**:13-24.



208 Mukai S, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Involvement of kruppel-like factor 6 (KLF6) mutation in the development of nonpolypoid colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; **13**:3932-8.

209 Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, Sachs MD, Lenk SV, Rudolph BD, Loening SA. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res* 2010; **30**:1579-86.

210 Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999; **155**:1467-71.

211 Hernandez S, Lloreta J. Manual versus laser micro-dissection in molecular biology. *Ultrastruct Pathol* 2006; **30**:221-8.

212 Paabo S, Irwin DM, Wilson AC. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 1990; **265**:4718-21.

213 Quach N, Goodman MF, Shibata D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol* 2004; **4**:1.

214 Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F. Assessing EGFR mutations. *N Engl J Med* 2006; **354**:526,8; author reply 526-8.

215 Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grunberg K, Rodriguez JA, Giaccone G. EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: Comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. *Cell Oncol* 2007; **29**:257-64.

216 DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, Camacho-Vanegas O, Narla J, Rose SL, Kalir T, Yao S, Levine A, Birrer MJ, Bonome T, Friedman SL, Buller RE, Martignetti JA. Roles of

KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:3730-9.

217 Hernandez S, de Muga S, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, Mojal S, Serrano S, Lloreta J. FGFR3 mutations in prostate cancer: Association with low-grade tumors. *Mod Pathol* 2009; **22**:848-56.

218 Oikonomou E, Pintzas A. Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer Res* 2006; **26**:1077-84.

219 Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, Silver J, Ogino S, Hooshmand S, Kwak E, Freed E, Meyerhardt JA, Saridaki Z, Georgoulas V, Finkelstein D, Fuchs CS, Kulke MH, Shivdasani RA. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**:465-72.

220 Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2002; **93**:767-73.

221 Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology* 2008; **40**:295-8.

222 Zhang L, Kirchhoff T, Yee CJ, Offit K. A rapid and reliable test for BRCA1 and BRCA2 founder mutation analysis in paraffin tissue using pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2009; **11**:176-81.

223 Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F. Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem* 2009; **391**:166-8.

224 Jendrossek V, Henkel M, Hennenlotter J, Vogel U, Ganswindt U, Muller I, Handrick R, Anastasiadis AG, Kuczyk M, Stenzl A, Belka C. Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. *BJU Int* 2008; **102**:371-82.

225 Liao Y, Grobholz R, Abel U, Trojan L, Michel MS, Angel P, Mayer D. Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2003; **107**:676-80.

226 Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. Immunohistochemical demonstration of phospho-akt in high gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; **8**:1168-71.

227 Shukla S, Maclennan GT, Hartman DJ, Fu P, Resnick MI, Gupta S. Activation of PI3K-akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2007; **121**:1424-32.

228 Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh PM. Phosphorylation of akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2004; **64**:5232-6.

229 Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardon A, Serra C, Real FX. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 2006; **66**:7401-4.

230 Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:6008-17.

231 Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; **346 Pt 3**:561-76.

232 Hoheisel JD. Microarray technology: Beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* 2006; **7**:200-10.

233 Magee JA, Araki T, Patil S, Ehrig T, True L, Humphrey PA, Catalona WJ, Watson MA, Milbrandt J. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:5692-6.

234 Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr, Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:5974-8.

235 Chaib H, Cockrell EK, Rubin MA, Macoska JA. Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 2001; **3**:43-52.

236 Bull JH, Ellison G, Patel A, Muir G, Walker M, Underwood M, Khan F, Paskins L. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer* 2001; **84**:1512-9.

237 Chetcuti A, Margan S, Mann S, Russell P, Handelsman D, Rogers J, Dong Q. Identification of differentially expressed genes in organ-confined prostate cancer by gene expression array. *Prostate* 2001; **47**:132-40.

238 Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; **412**:822-6.

239 Luo JH, Yu YP, Cieply K, Lin F, DeFlavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M. Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog* 2002; **33**:25-35.

240 Bermudo R, Abia D, Ferrer B, Nayach I, Benguria A, Zaballos A, del Rey J, Miro R, Campo E, Martinez-A C, Ortiz AR, Fernandez PL, Thomson TM. Co-regulation analysis of closely linked genes identifies a highly recurrent gain on chromosome 17q25.3 in prostate cancer. *BMC Cancer* 2008; **8**:315.

241 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; **63**:3877-82.

242 LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* 2002; **62**:4499-506.

243 Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 2007; **39**:41-51.

244 Dong Y, Bey EA, Li LS, Kabbani W, Yan J, Xie XJ, Hsieh JT, Gao J, Boothman DA. Prostate cancer radiosensitization through poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation. *Cancer Res* 2010; **70**:8088-96.

245 Haffner M, De Marzo AM, Meeker AK, Nelson WG, Yegnasubramanian S. Transcription-induced DNA double strand breaks: Both an oncogenic force and potential therapeutic target? *Clin Cancer Res* 2011;.

246 Catz SD. Characterization of Rab27a and JFC1 as constituents of the secretory machinery of prostate-specific antigen in prostate carcinoma cells. *Methods Enzymol* 2008; **438**:25-40.

247 Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res* 2005; **65**:1325-34.

248 Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, Eggleton SA, Grygiel JJ, Stricker PD, Biankin AV, Kench JG, Sutherland RL. Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**:1420-4.

249 Yip PY, Kench JG, Rasiah KK, Benito RP, Lee CS, Stricker PD, Henshall SM, Sutherland RL, Horvath LG. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in margin-positive, localized prostate cancer. *Prostate* 2011;.

250 Tsuchiya N, Slezak JM, Lieber MM, Bergstralh EJ, Jenkins RB. Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **34**:363-71.

251 Zhao S, Xu C, Qian H, Lv L, Ji C, Chen C, Zhao X, Zheng D, Gu S, Xie Y, Mao Y. Cellular retinaldehyde-binding protein-like (CRALBPL), a novel human Sec14p-like gene that is upregulated in human hepatocellular carcinomas, may be used as a marker for human hepatocellular carcinomas. *DNA Cell Biol* 2008; **27**:159-63.

252 Ribeiro FR, Jeronimo C, Henrique R, Fonseca D, Oliveira J, Lothe RA, Teixeira MR. 8q gain is an independent predictor of poor survival in diagnostic needle biopsies from prostate cancer suspects. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:3961-70.

253 Saramaki O, Visakorpi T. Chromosomal aberrations in prostate cancer. *Front Biosci* 2007; **12**:3287-301.

254 Porkka K, Saramaki O, Tanner M, Visakorpi T. Amplification and overexpression of elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. *Lab Invest* 2002; **82**:629-37.

255 Jalava SE, Porkka KP, Rauhala HE, Isotalo J, Tammela TL, Visakorpi T. TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009; **124**:95-102.

---

---

## *ANNEXOS*

---

---

Sempre et criticaran,  
parlaran malament de tu  
i serà difícil que trobis algú  
que aprovi totes les teves actituds.

Aleshores...  
Viu com et sembli!  
La vida és una obra de teatre  
que no permet assaigs...

Per tant...canta, balla, pinta, riu,estima  
i viu intensament cada moment de la vida...  
Abans no baixi el teló  
i l'obra acabi sense aplaudiments.

Charles Chaplin





**ANNEX 1. Supplementary Table 1 de l'article 1**

Summary of clinico-pathologic data. Tumor size measurements are given in mm. PSA values are expressed in ng/ml. NA: not applicable.

Case number	Sample type	Gleason	Tumor Volume	Pathologic Stage	PSA	Positive margins
1	RADICAL	3+4	16*16*8	PT3A	8,47	NO
2	RADICAL	3+4	35*20*15	PT3A	24,18	YES
3	RADICAL	3+3	18*15*10	PT2B	6,2	YES
4	RADICAL	3+3	30*20*15	PT3A	6,02	YES
5	AGULLA	4+5	NA	PT3A	10,01	NA
6	RADICAL	3+4	20*15*10	PT2B	5,18	NO
7	RADICAL	3+3	40*20*15	PT2B	7,25	NO
8	RADICAL	4+3	80*10*45	PT3A	9	YES
9	RADICAL	3+3	30*25*12	PT3A	15,4	YES
10	NEEDLE	4+3	NA	NA	NA	NA
11	NEEDLE	5+5	NA	NA	12,09	NA
12	NEEDLE	4+5	NA	NA	62	NA
13	NEEDLE	4+5	NA	NA	MISSING	NA
14	RADICAL	3+4	30*15*12	PT3A	9,87	YES
15	RADICAL	3+4	14*10*9	PT2B	6,47	YES
16	NEEDLE	3+4	NA	NA	MISSING	NA
17	RADICAL	3+3	30*15*15	PT3A	4,01	YES
18	RADICAL	4+3	15*20*8	PT2B	5,02	NO
19	RADICAL	3+4	14*10*5	PT2B	6,88	YES
20	NEEDLE	3+4	NA	NA	4,9	NA
21	RADICAL	3+3	40*20*20	PT3A	9,4	YES
22	RADICAL	3+3	28*18*15	PT2B	6,18	NO
23	NEEDLE	4+4	NA	NA	200	NA
24	NEEDLE	4+4	NA	NA	20,41	NA
25	RADICAL	3+4	23*15*14	PT2B	6,76	NO
26	INTRAOPERATIVE BIOPSY	4+4	NA	PT3A	19,89	NA
27	RADICAL	3+3	15*13*10	PT2A	15,24	NO
28	NEEDLE	3+4	NA	NA	17,81	NA
29	NEEDLE	4+5	NA	NA	32,17	NA
30	RADICAL	3+3	36*27*18	PT3A	4,5	YES
31	NEEDLE	4+4	NA	NA	1227	NA
32	RADICAL	3+3	36*25*15	PT3A	6,25	YES
33	RADICAL	3+4	16*14*10	PT2B	11,4	NO
34	NEEDLE	4+4	NA	NA	44,4	NA
35	NEEDLE	4+4	NA	NA	5,9	NA
36	RADICAL	3+4	13*10*4	PT2A	8,1	NO
37	RADICAL	4+3	30*14*10,	PT2A	15,37	YES
38	NEEDLE	4+5	NA	NA	9,24	NA

Case number	Sample type	Gleason	Tumor Volume	Pathologic Stage	PSA	Positive margins
39	NEEDLE	3+3	NA	NA	12,15	NA
40	RADICAL	4+3	18*15*10 (total)	PT2A	5,78	NO
41	RADICAL	3+3	16*10*5	PT2A	5,27	NO
42	NEEDLE	3+4	NA	PT2B	4,69	NA
43	RADICAL	3+4	14*10*9	PT2B	5,41	NO
44	RADICAL	4+3	27*13*10	PT3B	7,8	Yes
45	NEEDLE	5+5	NA	NA	53,24	NA
46	NEEDLE	4+4	NA	NA	8,7	NA
47	NEEDLE	4+4	NA	NA	494	NA
48	NEEDLE	4+3	NA	NA	14,7	NA
49	NEEDLE	4+4	NA	NA	85,46	NA
50	RADICAL	4+5	40*28*22	PT3B	10	NO
51	TURB	5+4	NA	NA	11	NA
52	NEEDLE	4+5	NA	NA	11,7	NA
53	NEEDLE	4+4	NA	NA	405	NA
54	NEEDLE	3+4	NA	NA	15	NA
55	RADICAL	3+4	20*20*2	PT2A	16,79	NO
56	NEEDLE	3+4	NA	NA	7,66	NA
57	TURB	3+4	NA	NA	3,88	NA
58	TURB	3+3	8*6*2	NA	4,76	NA
59	NEEDLE	4+5	NA	NA	10,23	NA
60	NEEDLE	3+3	NA	NA	8,5	NA
61	NEEDLE	4+5	NA	NA	77,5	NA
62	RADICAL	3+3	18*15*15	PT3A	6,5	NO
63	NEEDLE	3+3	NA	NA	6,1	NA
64	NEEDLE	3+3	NA	NA	11,06	NA
65	AUTOPSY	3+3	NA	NA	MISSING	NA
66	AUTOPSY	3+3	NA	NA	7,5	NA
67	AUTOPSY	3+3	NA	NA	6,9	NA
68	AUTOPSY	5+5	NA	NA	MISSING	NA
69	AUTOPSY	4+4	NA	NA	462	NA
70	AUTOPSY	4+4	NA	PT3	22	NA
71	AUTOPSY	3+3	NA	NA	124	NA
72	AUTOPSY	3+4	NA	NA	2,77	NA
73	AUTOPSY	3+4	NA	NA	3,2	NA
74	AUTOPSY	3+3	NA	NA	3,15	NA
75	AUTOPSY	3+4	NA	PT3	MISSING	NA
76	AUTOPSY	4+5	NA	PT3	MISSING	NA
77	AUTOPSY	5+5	NA	NA	9,15	NA
78	AUTOPSY	3+4	NA	NA	11,53	NA
79	AUTOPSY	3+3	NA	NA	16,72	NA
80	AUTOPSY	3+3	NA	NA	MISSING	NA
81	BONE MARROW MET	-	NA	M1	97,5	NA
82	BONE MARROW MET	-	NA	M1	72,6	NA

Case number	Sample type	Gleason	Tumor Volume	Pathologic Stage	PSA	Positive margins
83	BONE MARROW MET	-	NA	M1	4400	NA
84	BONE MARROW MET	-	NA	M1	2156	NA
85	BONE MARROW MET	-	NA	M1	32	NA
86	BONE MARROW MET	-	NA	M1	MISSING	NA
87	BONE MARROW MET	-	NA	M1	20,4	NA
88	BONE MARROW MET	-	NA	M1	MISSING	NA
89	LYMPH NODE MET	-	NA	N1	15	NA
90	LYMPH NODE MET	-	NA	N1	81	NA
91	RADICAL	3+3	NA	NA	NA	NA
92	RADICAL	3+4	33*25*18	PT2A	11,35	NA
93	RADICAL	3+3	15*8*3	PT2A	7,7	NA
94	RADICAL	3+4	25*20*19	PT2A	12	NA
95	RADICAL	3+3	12*10*10	PT2A	4,55	NA
96	RADICAL	3+4	20*20*16	PT3A	6,06	NA
97	RADICAL	3+4	40*35*20	PT3A	10,25	NA
98	RADICAL	3+4	27*13*10	PT3A	7,8	NA
99	RADICAL	3+3	32*30*18	PT2A	5,08	NA
100	RADICAL	3+3	20*15*15	PT2A	4,4	NA
101	RADICAL	3+4	20*17*17	PT3A	4,24	NA
102	RADICAL	3+4	25*20*18	PT3A	13	NA
103	RADICAL	3+3	20*12*8	PT2A	6,42	NA



**ANNEX 2. Taula amb el total de casos analitzats en els articles 1 i 2**

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>	FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>	IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
1	3+4	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	17	-
2	3+4	WT	WT	WT	No fet	WT	No	54	-
3	3+3	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	82	-
4	3+3	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	30	-
5	4+5	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	12	-
6	3+4	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	88	-
7	3+3	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	77	-
8	4+3	<b>TP53 (L130H)</b>	WT	No fet	No fet	No fet	No	78	<b>Mutació TP53 (L130H)</b>
9	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	98	-
10	4+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	81	-
11	5+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	12	-
12	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	32	-
13	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
14	3+4	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	53	-
15	3+4	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	73	-
16	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	28	-
17	3+3	<b>KLF6 (E227G)</b>	No fet	No fet	No fet	No fet	No	96	<b>Mutació KLF6 (E227G)</b>
18	4+3	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	66	-
19	3+4	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	66	-
20	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	66	-
21	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	98	-
22	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	99	-
23	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	68	-
24	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió bioquímica)</b>	78	-
25	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	71	-
26	4+4	<b>TP53 (L130H)</b>	No fet	No fet	No fet	No fet	No	92	<b>Mutació de TP53 (L130H)</b>
27	3+3	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	87	-
28	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	4	-
29	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	9	-

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
			FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>					
30	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	33	-
31	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	4	-
32	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	96	-
33	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	109	-
34	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
35	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	77	-
36	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió bioquímica)	95	-
37	4+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió bioquímica)	54	-
38	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	33	-
39	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	79	-
40	4+3	WT	WT	WT	No fet	No fet	No	66	-
41	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua seguiment	-	-
42	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	72	-
43	3+4	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	86	-
44	4+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	12	-
45	5+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
46	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	94	-
47	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	18	-
48	4+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió bioquímica)	31	-
49	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	10	-
50	4+5	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	39	-
51	5+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	28	-
52	4+5	<b><i>TP53</i> (H214P)</b>	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	<b>Mutació de <i>TP53</i> (H214P)</b>
53	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	16	-
54	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	53	-
55	3+4	WT	WT	No fet	No fet	WT	No	101	-
56	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	68	-
57	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	100	-

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
			FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>					
58	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	115	-
59	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
60	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	21	-
61	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
62	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
63	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
64	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
65	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
66	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
67	3+3	<b>TP53 (L130H)</b>	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	<b>Mutació de TP53 (L130H)</b>
68	5+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
69	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
70	4+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
71	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
72	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
73	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
74	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
75	3+4	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
76	4+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
77	5+5	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
78	3+4	<b>TP53 (Y234C)</b>	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	<b>Mutació de TP53 (Y234C)</b>
79	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
80	3+3	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	-	-	-
81	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	5	-
82	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	7	-
83	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	15	-
84	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	15	-
85	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	17	-

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>	IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
			FISH de <i>PIK3CA</i>							
86	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	7	-	
87	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	19	-	
88	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí	Cas consulta	-	
89	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	No	126	-	
90	-	WT	No fet	No fet	No fet	No fet	Sí (progressió clínica M1)	83	-	
91	3+3	WT	WT	No fet	WT	WT	No	28	-	
92	3+4	WT	WT	Guany	Sobre-expressió	Sobre-expressió	No	53	Guany i sobre-expressió de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d' <i>AKT</i>	
93	3+3	WT	WT	No fet	WT	WT	No	68	-	
94	3+4	WT	WT	WT	Sobre-expressió	Sobre-expressió	No	46	Sobreexpressió de <i>PIK3CA</i> i d' <i>AKT</i>	
95	3+3	WT	WT	WT	WT	No fet	Sí (progressió clínica local)	3	-	
96	3+4	WT	WT	Guany	Sobre-expressió	Sobre-expressió	No	52	Guany i sobreexpressió de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d' <i>AKT</i>	
97	3+4	WT	WT	WT	No fet	WT	Sí (progressió bioquímica)	47	-	
98	3+4	WT	WT	No fet	WT	No fet	No	11	-	
99	3+3	WT	WT	Guany	WT	WT	No	48	Guany de <i>PIK3CA</i>	
100	3+3	WT	WT	WT	WT	No fet	Sí (progressió bioquímica)	30	-	
101	3+4	WT	WT	WT	No fet	WT	No	40	-	
102	3+4	WT	WT	No fet	No fet	No fet	No	94	-	
103	3+3	WT	WT	Guany	No fet	Sobre-expressió	No	70	Guany de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d' <i>AKT</i>	
104	3+4	No fet	WT	WT	No fet	WT	No	19	-	
105	3+4	No fet	WT	WT	WT	No fet	No	48	-	
106	4+3	No fet	WT	WT	WT	No fet	No	36	-	



Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
			FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>					
107	3+4	No fet	WT	WT	WT	WT	No	48	-
108	3+3	No fet	WT	WT	No fet	WT	No	55	-
109	3+3	No fet	WT	WT	No fet	No fet	No	44	-
110	4+4	No fet	WT	WT	WT	WT	No	36	-
111	4+4	No fet	WT	WT	No fet	No fet	No	48	-
112	3+3	No fet	WT	WT	No fet	WT	No	49	-
113	4+5	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió clínica M1)</b>	19	-
114	5+4	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió local)</b>	17	-
115	3+4	No fet	WT	WT	No fet	WT	No	12	-
116	4+3	No fet	WT	<b>Guany</b>	No fet	No fet	No	31	<b>Guany de <i>PIK3CA</i></b>
117	4+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	21	-
118	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	44	-
119	4+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	32	-
120	4+4	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	<b>Sí (progressió bioquímica)</b>	40	-
121	3+4	No fet	WT	<b>Guany</b>	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	26	<b>Guany de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d'AKT</b>
122	4+3	No fet	WT	<b>Guany</b>	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	<b>Sí (progressió bioquímica)</b>	11	<b>Guany de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d'AKT</b>
123	3+3	No fet	WT	<b>Guany</b>	WT	<b>Sobre-expressió</b>	No	25	<b>Guany de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d'AKT</b>
124	3+4	No fet	WT	No fet	WT	Not done	<b>Sí</b>	9	-
125	4+5	No fet	WT	<b>Guany</b>	<b>Sobre-expressió</b>	<b>Sobre-expressió</b>	<b>Sí</b>	12	<b>Guany i sobreexpressió de <i>PIK3CA</i> i sobreexpressió d'AKT</b>
126	3+4	No fet	WT	No fet	WT	Not done	No	9	-
127	3+4	No fet	WT	No fet	WT	Not done	No	6	-
128	3+4	No fet	WT	No fet	WT	Not done	No	3	-
129	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	18	-
130	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	78	-
131	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	Pèrdua de seguiment	-	-
132	4+5	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	69	-
133	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	12	-
134	3+4	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	7	-

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
			FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>					
135	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	5	-
136	3+3	No fet	WT	WT	No fet	WT	No	87	-
137	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	6	-
138	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	70	-
139	3+4	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	7	-
140	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	8	-
141	3+3	No fet	WT	WT	No fet	No fet	No	36	-
142	3+4	No fet	WT	WT	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
143	3+3	No fet	WT	WT	No fet	No fet	No	38	-
144	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	87	-
145	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	12	-
146	4+3	No fet	WT	No fet	No fet	WT	No	24	-
147	5+4	No fet	WT	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	<b>Sobre-expressió</b>	No	14	<b>Sobreexpressió de <i>PIK3CA</i> i d'<i>AKT</i></b>
148	3+3	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	No	66	-
149	3+4	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
150	3+4	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-
151	3+4	No fet	WT	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No fet	No	14	-
152	4+3	No fet	WT	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No fet	No	15	-
153	4+5	No fet	WT	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No fet	No	11	-
154	3+4	No fet	WT	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No fet	No	15	-
155	3+3	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No fet	No	9	-
156	3+3	No fet	No fet	No fet	WT	No fet	No	10	-
157	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	31	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>
158	4+3	No fet	No fet	No fet	No fet	WT	No	35	-
159	3+3	No fet	No fet	No fet	No fet	WT	No	36	-
160	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	37	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>
161	4+5	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	23	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>
162	4+5	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	<b>Sí (progressió bioquímica)</b>	18	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>
163	3+3	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	36	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>
164	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	<b>Sobre-expressió</b>	No	32	<b>Sobreexpressió d'<i>AKT</i></b>

Cas	Gleason	Mutacions de <i>KLF6</i> i <i>TP53</i>	Mutacions de <i>PIK3CA</i> - <i>AKT</i> - <i>KRAS</i> - <i>BRAF</i>			FISH de <i>PIK3CA</i>	qRT-PCR de <i>PIK3CA</i>	IHQ pAKT	Progressió	Temps de seguiment (mesos)	Resum alteració
165	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	No	26	Sobreexpressió d'AKT	
166	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	Sí (progressió clínica M1)	28	Sobreexpressió d'AKT	
167	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	Pèrdua de seguiment	-	Sobreexpressió d'AKT	
168	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	No	21	Sobreexpressió d'AKT	
169	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	WT	No	29	-	
170	4+5	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	Sí (progressió clínica M1)	13	Sobreexpressió d'AKT	
171	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	Sobre-expressió	No	36	Sobreexpressió d'AKT	
172	3+3	No fet	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-	
173	3+3	No fet	No fet	WT	No fet	No fet	No fet	Pèrdua de seguiment	-	-	
174	3+3	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	WT	Pèrdua de seguiment	-	-	
175	3+4	No fet	No fet	No fet	No fet	No fet	WT	Pèrdua de seguiment	-	-	



**ANNEX 3. Article 3**

A 12-GENE EXPRESSION SIGNATURE IS ASSOCIATED WITH AGGRESSIVE HISTOLOGY IN PROSTATE CANCER. *SEC14L1* AND *TCEB1* GENES ARE POTENTIAL MARKERS OF PROGRESSION.

Short title: Identification of differentially expressed genes in prostate cancer

Laia Agell, B.Sc.<sup>1,2</sup>, Silvia Hernández, Ph.D.<sup>3</sup>, Lara Nonell B.Sc.<sup>4</sup>, Marta Lorenzo<sup>1</sup>, Eulàlia Puigdecamet B.Sc.<sup>4</sup>, Silvia de Muga, B.Sc.<sup>1,2</sup>, Nuria Juanpere, M.D.<sup>1,2</sup>, Raquel Bermudo Ph.D.<sup>5,6</sup>, Pedro L. Fernández M.D., Ph.D.<sup>5,7</sup>, José A. Lorente, M.D., Ph.D.<sup>2,8</sup>, Sergio Serrano, M.D., PhD<sup>1,2</sup>, and Josep Lloreta, M.D., Ph.D.<sup>1,3</sup>

*The two first authors have contributed equally to this paper*

Authors' Affiliation:

<sup>1</sup>Department of Pathology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Servei d'Anàlisi de Microarrays, IMIM (Institut de Recerca Hospital del Mar), Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Tumour Bank, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer Biobank, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Department of Cell Biology, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Department of Pathology, Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Department of Urology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar-IMIM, Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Silvia Hernández

Department of Pathology; Hospital del Mar

Department of Health and Experimental Sciences; Universitat Pompeu Fabra

Passeig Maritim 25-29 08003-Barcelona, Spain

Phone (+3493) 248 30 32

Fax (+3493) 248 31 31

e-mail: [silvia.hernandez@upf.edu](mailto:silvia.hernandez@upf.edu)

Key words: expression profiling, microarray, prostate cancer, SEC14L1 and TCEB1.

### **Abstract**

Although many genes have been proposed to be involved in prostate carcinogenesis, no single gene or gene profile has shown to have prognostic value. The main challenge for clinical management is to distinguish slowly growing tumors from those that will relapse. In this study, we compared expression profiles of 18 prostate cancer samples (7 with combined Gleason score= 6, 8 with Gleason= 7 and 3 with Gleason  $\geq$ 8) and 5 non-neoplastic prostate samples, using the Affymetrix Human Array GeneChip® Exon 1.0 ST. Microarray analysis revealed 99 genes showing statistically significant differences among tumors with Gleason score 6, 7 and  $\geq$  8. In addition, mRNA expression of 29 selected genes was analyzed by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) with microfluidic cards in an extended series of 30 prostate tumors. Eighteen of the 29 genes (62%) were independently confirmed by qRT-PCR (14 upregulated and 4 downregulated in higher Gleason score samples) in the extended series. This list was further narrowed down to 12 genes that were differentially expressed in tumors with Gleason score 6-7 *vs*  $\geq$ 8. Finally, the protein levels of two genes from the 12-gene signature (*SEC14L1* and *TCEB1*) were additionally validated by immunohistochemistry. Strong protein expression levels of both genes were statistically associated with high combined Gleason score, advanced stage, and PSA progression. This set of genes may contribute to a better understanding of the molecular basis of prostate cancer. *TCEB1* and *SEC14L1* are two good candidate markers for predicting prognosis and progression of prostate cancer.

## INTRODUCTION

In spite of the high incidence of prostate cancer (PCa), only 30% of patients will be afflicted by tumor progression. PCa is the third most diagnosed cancer in Spain<sup>1</sup> and the second leading cause of cancer death in American men.<sup>2</sup> There have been numerous advances in basic research on PCa initiation and progression, as well as clinical advances that have improved patient outcome,<sup>3</sup> but there are still challenges to face, such as identifying which relevant genes are altered and classifying patients into clearly defined high-risk and low-risk groups in order to improve their specific management.

The main screening technology that has revolutionized the diagnosis of PCa over the past three decades is the detection of serum prostate-specific antigen (PSA). In fact, the widespread use of serum PSA has resulted in the identification of an increasing number of asymptomatic low-stage tumors in younger men. Although early diagnosis provides an opportunity for curative surgery, new recommendations<sup>4</sup> favor later and less frequent PSA screening, because many patients with clinically localized low-grade carcinomas, may not require aggressive treatment and are candidates for active surveillance, since their tumors are relatively indolent. One of the goals of current research in PCa is the identification of molecular markers for the early distinction between patients with more aggressive tumors, that will have a higher risk of progression, and, on the other hand, patients with apparently similar tumors that will carry a much lower risk of progression.

Many molecular studies have shown that genetic alterations are important for prostate carcinogenesis, but few oncogenes or tumor suppressor genes have been consistently linked to prostate adenocarcinoma.<sup>3,5</sup> Microarray technology is a powerful tool for detecting differentially expressed genes and can be very useful to search for new prognostic markers that can be translated into clinical practice. In the case of PCa, the microarray gene expression studies performed previously have compared the expression profiles between normal and tumoral prostate tissues,<sup>6-14</sup> and between prostate tumor samples classified according to different clinicopathological features, such as for example metastatic vs. organ-confined tumors<sup>15</sup> or the different Gleason score categories.<sup>16-19</sup>

There are previous studies<sup>16-19</sup> reporting differentially expressed genes in association with Gleason score. Singh *et al.*<sup>16</sup> analyzed 52 prostate tumor samples and identified a gene expression signature of 29 genes associated with Gleason score. They

have also developed a model that, using gene expression data alone, accurately predicted patient outcome after prostatectomy. Lapointe *et al.*<sup>17</sup> reported a 52 gene expression signature in 62 primary prostate tumors in which two genes (AZGP1 and MUC1) were associated to higher Gleason score. The expression of these genes was validated by immunohistochemistry (IHC), concluding that they were strong predictors of tumor recurrence. True *et al.*<sup>18</sup> used laser microdissection of prostate tissue to isolate cancer cells from Gleason patterns 3, 4 and 5. They identified an 86 gene profile that distinguished high grade from low grade carcinomas. Very recently, Ross *et al.*<sup>19</sup>, using also tissue laser microdissection, reported 670 genes that were differentially expressed between Gleason scores 6 and 8. The main involved pathways were androgen receptor signaling, growth factor and cytokine mediated pathways.

In this paper, we report a gene expression signature of 99 genes differentially expressed in Gleason score 6, 7 and  $\geq 8$  tumors. From these 99 genes, mRNA expression of 29 selected genes was validated by qRT-PCR in TaqMan low density arrays (TLDA), and 18 out of 29 genes (62%) were confirmed as differentially expressed. Subsequently, this signature was further refined to 12 genes that were differentially expressed in tumors with Gleason scores 6-7 vs  $\geq 8$ . As a result, a signature of PCa with aggressive histology was obtained. Furthermore, we analyzed the protein expression levels of two of these genes (*SEC14L1* and *TCEB1*) as possible markers for tumor subtypes: high protein levels of both genes were correlated with Gleason score  $\geq 8$ , advanced tumor stage and progression. Our results support the existence of an aggressive histology gene expression signature in PCa. *TCEB1* and *SEC14L1* emerge as new potential molecular markers of poor prognosis in PCa.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Tumor Samples and Patients**

Thirty frozen and 43 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) prostate cancer samples were the subject of this study. From the 30 frozen samples, twenty-nine were obtained from radical prostatectomy specimens, and one from a cystoprostatectomy specimen with an incidentally detected tumor. From the 43 FFPE samples, 39 were prostatectomy specimens and 4 were needle biopsies. Samples were collected from 2002 to



2010; 20 of them were obtained from the Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc) and 10 from the Tumor Bank of the Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. Samples were obtained following ethical and institutional protocols. Tissue fragments were embedded in OCT medium, snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . We also included 5 frozen non-tumor prostate samples as controls. Detailed pathological and clinical data for all the frozen specimens are provided in Table 1. With regard to the FFPE tissues in which the correlation between clinical variables and immunohistochemical expression was performed, the mean follow-up was 34.3 months (11 – 101 months). Tumor progression was considered when PSA values were  $> 0.4$  ng/ml after prostatectomy. None of the cases had received pre or postoperative radiation nor hormone therapy.

### **Total RNA isolation**

Microscopical examination of hematoxylin-eosin (H&E) stained sections from frozen tissues was used to select the tumor area. All cases contained a minimum of 70% of tumor cells. Total RNA was extracted from 30 frozen prostate tumor samples and 5 non-tumor samples with Ultraspec (Biotecx Laboratories, Houston, U.S.A) and RNeasy Mini kit (Qiagen, Cathsworth, CA, U.S.A.) from 10-15 sections of  $10\ \mu\text{m}$  in thickness. Total RNA purity and quality were assessed with NanoDrop® ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.) and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, U.S.A.). Only samples with good RNA integrity (RNA integrity number, RIN) were subsequently used in microarray experiments.

### **Microarray hybridization**

A total of 23 frozen prostate samples were used for microarray analysis. Of these, 5 were normal prostate tissues and 18 were prostate tumor tissues. Prostate tumors were grouped according to Gleason score: Gleason 6 ( $n= 7$ ), Gleason 7 ( $n= 8$ ) and Gleason  $\geq 8$  ( $n= 3$ ). Two hundred ng of total RNA from each sample were processed and hybridized to Affymetrix Human Array GeneChip® Exon 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to the Affymetrix GeneChip® Whole Transcript Sense Target Labelling Assay. After hybridization, the array was washed and stained in the Affymetrix GeneChip®

Fluidics Station 450. The stained array was scanned using an Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G, generating .CEL files for each array.

### **Gene expression profile analysis**

After quality control of raw data, it was background-corrected, quantile-normalized and summarized to a logarithmic gene-level by the robust multi-chip average (RMA)<sup>20</sup> obtaining a total of 18,708 transcript clusters, which roughly correspond to genes. Core annotations were used to summarize data into transcript clusters. Normalized data were then filtered to avoid noise created by non-expressed transcript clusters. Only transcripts with an intensity signal of more than a 50% in any of the groups were considered for further analysis, which lead to 10,452 transcript clusters. Linear Models for Microarray (LIMMA)<sup>21</sup>, a moderate t-statistics model, was used for detecting differentially expressed genes among the conditions in study. Correction for multiple comparisons was performed using false discovery rate and only genes with an adjusted *P-value* under 0.05 were considered significant. Hierarchical cluster analysis was also performed to see how data aggregated and to generate heatmaps. All data analysis was performed in R (version 2.11.1) with packages *aroma.affymetrix*, *Biobase*, *Affy*, *limma* and *genefilter*. Functional analysis was performed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, version 9.0 <http://www.ingenuity.com>) and GSEA software.<sup>22</sup> The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus<sup>23</sup> and are accessible through GEO Series accession number GSE30512 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30521>).

### **Quantitative real-time RT-PCR analysis**

Twenty-nine genes were selected for expression validation through qRT-PCR in TaqMan Low Density Array (TLDA; Applied Biosystems, Foster City, CA). In addition to the 18 tumor samples previously analyzed in the Affymetrix Human Array GeneChip® Exon 1.0 ST, 12 new samples from additional prostate tumors were included in this analysis. All these cases (n= 30) were grouped according to their Gleason score as follows: Gleason 6 (n= 12), Gleason 7 (n= 11) and Gleason ≥8 (n= 7). Custom-designed TLDA's contained primers and probes for 29 genes (Supplementary table 1). Different criteria were

applied to select these genes: some belonged to PI3K-AKT signaling pathway or to RAS family; other genes were involved in cell cycle control or DNA repair; another group of genes was located at chromosome 8 in a region reported to be amplified in 40% of high grade prostate cancer tumors<sup>24</sup> and, finally, others genes had been reported in previous gene expression analyses on prostate cancer.<sup>16-19</sup> TLDA was configured for the analysis of 32-gene sets in triplicate, using an ABI PRISM 7900 HT instrument (Applied Biosystems). A total of 100  $\mu$ l of reaction mixture with 50  $\mu$ l of cDNA template (1000 ng) and an equal volume of TaqMan® universal master mix (Applied Biosystems) were added to each loading port of TLDA. Thermal cycler conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 94.5°C and 30 s at 97°C, and 1 min at 59.7°C for 40 cycles. The threshold cycle (Ct) was automatically given by SDS2.1 software package (Applied Biosystems). Relative quantification values (RQ) were determined using the equation:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Average threshold cycle values were obtained using the SDS 2.1 software (Applied Biosystems). The relative expression level of each target gene was displayed as  $\Delta Ct = Ct_{ref} - Ct_{target}$ . *GAPDH* and *B2M* were used as endogenous control genes, and according to a previous study *HPRT1* was also included.<sup>25</sup> Normalization was performed using the geometric mean of the three housekeeping genes<sup>26</sup>, and gene expression was validated by an ANOVA test.

### **Immunohistochemistry of SEC14L1 and TCEB1 in prostate tumors**

Immunohistochemical staining for SEC14L1 and TCEB1 were performed with SEC14L1 antibody (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and TCEB1 antibody (ProteinTech Group, Inc, Chicago, IL), respectively. SEC14L1 was used at 1:50 dilution after antigen retrieval with citrate buffer pH9 in autoclave, and TCEB1 was used at 1:25 dilution after antigen retrieval with citrate buffer pH 9 in autoclave.

Forty-three new independent samples not used in the previous mRNA expression analysis were tested for SEC14L1 and TCEB1 protein immunostaining (15 tumors with Gleason = 6, 17 with Gleason = 7 and 11 with Gleason  $\geq$  8). Each antibody was detected in both cytoplasm and nucleus. The results were graded, considering separately cytoplasm and nuclear immunostaining, as 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate), and 3 (strong). The score (histoscore) for each of them, was the sum of the product of the staining intensity and

corresponding tumor percentage (Histoscore = [1 x (%1+ cells)] + [2 x (%2+ cells)] + [3 x (%3+ cells)]). For this study, the global tumor histoscore was obtained from the addition of the nuclear and cytoplasmic histoscore.

### **Statistical analysis**

Categorical variables are presented as frequencies and percentages, and quantitative variables as median and range. The Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) was obtained to quantify the discrimination power and to determine the optimal cut-off points for SEC14L1 and TCEB1 histoscore values respect to Gleason score ( $\geq 180$  and  $\geq 125$ ), tumor stage ( $\geq 180$  and  $\geq 215$ ), and progression ( $\geq 210$  and  $\geq 125$ ). Fisher's Exact test was used to assess the relationship between two categorical variables. A *P-value*  $> 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The relationship with PSA progression was analyzed using Kaplan-Meier (Long-Rank) test in 42 patients (one case was lost for follow-up). For progression-free survival analysis, patients were censored at the time of their last clinical follow-up appointment or when a raise in serum PSA  $> 0.4$  ng/ml was detected.

## **RESULTS**

### **Gene expression profile associated with prostate cancer**

In the gene expression microarray experiments performed on 18 prostate tumor samples and 5 normal prostate samples, we identified an initial set of 3,380 genes differentially expressed between prostate cancer and normal prostate tissue (Supplementary table 2).

For the present work, we have mainly concentrated on comparing tumor samples, classified according to Gleason score. We have identified a cohort of 99 differentially expressed genes that could distinguish between tumors with combined Gleason score = 6 (3+3), tumors with Gleason = 7 (3+4 or 4+3) and the more aggressive tumors (Gleason score  $\geq 8$ ) (Figure 1 and Supplementary table 3). The analysis of these genes, using the Ingenuity Pathways Analysis software, showed 6 top canonical pathways: 1) Pi3K/AKT

(*CDKN1B* and *YWHAZ*), 2) Estrogen Receptor (*PRKDC* and *NCOA3*), 3) Glioma signaling (*CAMK1D*), 4) DNA double-strand break repair by non-homologous end joining (*PARP1* and *PRKDC*), 5) Cell cycle: G1/S Checkpoint Regulation (*CDKN1B*) and 6) Granzyme B signaling (*PARP1* and *PRKDC*). Calculation was performed either according to ratio (the number of genes from the data set mapping to the canonical pathway in question divided by the total number of genes mapping to the same canonical pathway) or significance.

### **Gene validation by qRT-PCR analysis and prostate cancer aggressive histology signature**

We selected 29 of these 99 genes to be validated by qRT-PCR on TLDA. The selection was based on the current literature<sup>3,5</sup> and on our previous reports on PCa<sup>27,28</sup>. In this qRT-PCR validation analysis we used a group of 30 cases, that was made up of the 18 tumor samples previously analyzed in the microarray study, plus a second set of 12 new prostate tumor samples that we had available. We did not restrict the validation analysis to this second set due to its small size.

Eighteen out of the 29 genes (62%) were validated (Supplementary table 1). These 18 validated genes were: *AZGP1*, *CAMK1D*, *CDKN1B*, *DPP4*, *HGD*, *KCTD12*, *MYBPC1*, *NCOA3*, *PARP1*, *PPM2C*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *SUMO2*, *TCEB1*, *YWHAZ*, and *ZNF706*. All of them had significant p values by the ANOVA test. We performed a series of comparisons (Gleason 6 vs  $\geq 8$ , Gleason 7 vs  $\geq 8$ , and Gleason 6 vs 7), with the purpose of selecting those genes that could distinguish Gleason  $\geq 8$  cases from the rest (Table 2). Using this approach, we narrowed down to 12 the number of genes distinguishing low ( $\leq 7$ ) from high grade ( $\geq 8$ ) tumors. From this signature of 12 genes, 4 were downregulated (*AZGP1*, *DPP4*, *HGD*, and *MYBPC1*) and 8 were upregulated (*PARP1*, *PRKDC*, *PARP1*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *TCEB1*, *YWHAZ* and *ZNF706*) in tumors with Gleason score  $\geq 8$  (Table 2 and Figure 2). With regard to the downregulated genes, the level of downregulation ranged from 0.14 for *MYBPC1* gene and 0.416 for *DPP4*. Among the upregulated genes, the degree of upregulation ranged from 1.6 for *PARP1* to 5.5 for *SLPI* (Figure 2).

### **Immunohistochemical validation of SECL14L1 and TCEB1**

From the final 12-gene signature associated with high grade, we selected two genes, *SEC14L1* and *TCEB1*, to investigate the relationship between their protein expression levels assessed by immunohistochemistry and clinical-pathological parameters (combined Gleason score, pathologic stage, PSA progression free survival). For this purpose, we used an independent set of 43 primary prostate tumors. The two genes were selected because, in the qRT-PCR study they showed moderate upregulation, clear separation between Gleason groups, and a relatively narrow range of expression.

The evaluation of protein expression was based on the histoscore calculation (nucleus + cytoplasm) which ranged from 100 to 375 for SEC14L1 and from 5 to 280 for TCEB1. Different cut-off levels were used for the correlation with combined Gleason score, stage and PSA progression (see Materials and Methods section). A SEC14L1 histoscore  $\geq 180$  was statistically associated with Gleason score  $\geq 8$  ( $p= 0.03$  Fisher's Exact Test); thus, 17 (53%) of 32 Gleason score  $\leq 7$  vs 10 (90%) of 11 Gleason  $\geq 8$  tumors showed high SEC14L1 protein levels (Figure 4). A TCEB1 histoscore  $\geq 125$  was also statistically associated with high Gleason score ( $p= 0.003$ , Fisher's Exact Test); 7 (22%) of the 32 Gleason  $\leq 7$  vs all of the 11 (100%) Gleason  $\geq 8$  tumors showed high TCEB1 protein levels. Furthermore, there were no statistical differences between tumors with combined Gleason scores 6 and 7 in the histoscore levels of SEC14L1 ( $p= 0.076$ , Fisher's Exact) and TCEB1 ( $p= 0.941$ , Fisher's Exact Test). These results are in concordance with qRT-PCR analysis.

With regard to pathological tumor stage, a TCEB1 histoscore  $\geq 215$  was statistically associated with high ( $\geq pT3$ ) tumor stage ( $p= 0.04$ , Fisher's Exact Test). Also a SEC14L1 histoscore  $\geq 180$  was statistically associated with high tumor stage ( $p= 0.03$  Pearson Chi-square).

Finally, a Kaplan-Meier analysis for PSA progression-free survival performed on 42 patients showed that there was a statistical association between progression and histoscore levels of TCEB1  $\geq 125$  (Log Rank= 0.001) (Figure 5A) and of SEC14L1  $\geq 210$  (Log Rank= 0.0058) (Figure 5B).

## DISCUSSION

Gene-expression profiling by means of microarrays and qRT-PCR techniques has been shown as a useful tool to classify tumors at the molecular level. Its application may be helpful in improving diagnosis, prognosis and patient stratification.<sup>29</sup> The discovery of new therapeutic targets and new means for customizing therapy specific to patient profiles is a key objective in the management of PCa. Several previous reports on gene expression microarrays have been published in prostate tumors. Some papers have compared normal prostate *vs.* prostate tumor tissues and have found different gene signatures associated with PCa.<sup>6-14</sup> On the other hand, other studies have investigated the gene expression profiles associated with the different clinicopathological prostate tumor categories, such as, organ-confined *vs.* metastatic tumors<sup>15</sup> or among different Gleason score groups.<sup>16-19</sup>

The main goal of our approach has been to identify new molecular predictors of prostate tumor behavior and progression. The present study identifies a new prostate cancer signature, with a 12-gene expression profile associated with aggressive histology. Two genes, *SELCL14L1* and *TCEB1*, validated by IHC, emerge as potential molecular markers for prostate cancer progression and prognosis.

In the comparative of normal *versus* tumoral prostate samples, we have reported 3,380 differentially expressed genes. Our results show that some of the top 100 differentially expressed genes have been previously reported. For example, Bermudo *et al.*<sup>13</sup> reported 26 validated genes by qRT-PCR in tumor *vs* normal samples. From these, we have 4 genes in common: *ROR2*, *LAMB3*, *CX3CL1* and *TACSTD1*. *TACDST1* gene was reported by Welsh *et al.*<sup>7</sup> and by Luo *et al.*<sup>12</sup>, with whom we also share *KRT14* gene. Finally, we also share *ZNF185*, *CSRP1* and *TRIM29* genes with Vanaja *et al.*<sup>14</sup> Thus, the concordance with previous expression-profiling studies shows that our method replicates results. There are other genes among the first 400 genes of the list that have also been well documented in the literature, such as *AMACR*<sup>7,12,13,30</sup> and *KRT15*.<sup>12,13</sup>

In our study we have initially detected 99 genes that were differentially expressed in tumor samples according to Gleason score. From these, 29 genes were selected to be assessed by qRT-PCR analysis and 62% of them were validated. The validation index in our study is similar to other previous reports, and illustrates the need of verifying the

results of microarray assays by complementary techniques such as qRT-PCR and IHC. The lack of validation of the genes could be to the heterogeneity of the prostate tissue or to sequence differences between the probes used for the qRT-PCR and microarrays analysis.

Several reports have investigated the expression profiles associated with PCa. Different authors have identified expression signatures with 29, 52, 86 and 670 genes, respectively, that were statistically associated with Gleason score.<sup>16-19</sup> Comparing our results with previous literature, our study shares with True *et al.*<sup>18</sup> nine genes: *KCTD12*, *YWHAZ*, *RAB2*, *SEC14L1*, *TCEB1*, *MYBPC1*, *HGD*, *AZGP1* and *DPP4*. From these, 8 were validated in our qRT-PCR study and one was not (*RAB2*). In addition, *AZGP1* is the only one gene that we have in common with Lapointe *et al.*<sup>17</sup> They validated this gene by immunohistochemistry and also found that strong expression of *AZGP1* was associated with decreased risk of recurrence (P= 0.0008), independent of tumor grade, stage, and preoperative prostate-specific antigen levels. On the other hand, Ross *et al.*<sup>19</sup> reported three genes (*TCEB1*, *KCTD12* and *PPM2C*) there were also present in the signature of True *et al.*<sup>18</sup> as well as in our own set of validated genes. We have two other genes in common with Singh *et al.*,<sup>16</sup> *CCND2* and *RPL13*. *CCND2* was not validated in our qRT-PCR study, and *RPL13* was not included among the 29 genes selected for qRT-PCR validation. Finally, we found 3 genes in common with Singh *et al.*<sup>16</sup> and Lapointe *et al.*<sup>17</sup> studies (*SPARC*, *BGN* and *COL1A2*). However, subsequent studies<sup>18,19</sup> including ours have found not found these genes in their signature.

By performing comparisons two by two, we have selected those genes that distinguished Gleason  $\leq 7$  and  $\geq 8$  tumors, thus refining a gene signature with 12 differentially expressed genes. From these 12 genes, 4 were downregulated (*AZGP1*, *DPP4*, *HGD* and *MYBPC1*) and 8 were upregulated (*PARP1*, *PRKDC*, *PARP1*, *PRKDC*, *RNF19A*, *SEC14L1*, *SLPI*, *TCEB1*, *YWHAZ* and *ZNF706*). These genes could be markers of an aggressive phenotype. Several validated genes that we found to be associated with Gleason score in our analysis, have been previously linked to different human neoplasms, including prostate cancer. For example, *PARP1* is involved in the regulation of various important cellular processes such as differentiation, proliferation, and tumor transformation. The use of inhibitors of *PARP1* is a recent promising therapy in breast and prostate cancer.<sup>31,32</sup> The *SLPI* gene has been reported to be involved in the secretory



machinery of prostate-specific antigen in prostate carcinoma cells.<sup>33</sup> *DPP4* is secreted by the normal prostate and has been reported to inhibit the malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking bFGF signaling pathway.<sup>34</sup> *AZGP1* is associated with decreased risk of prostate cancer recurrence.<sup>18</sup> Some authors have reported an association between the loss of *AZGP1* expression and recurrence of prostate cancer.<sup>35,36</sup> Our results are in keeping with these studies, as we have found *AZGP1* to be downregulated in high grade tumors. Finally, 3 of the 12 genes in our refined set (*RNF19A*, *TCEB1* and *ZNF706*) are located in 8q21-23, a region amplified in > 40% of primary prostate cancers and associated with higher cancer grades.<sup>24</sup>

We performed an immunohistochemical study of *SEC14L1* and *TCEB1* to further validate their protein expression levels of these genes. The protein encoded by *SEC14L1* gene belongs to the SEC14 cytosolic factor family and its role in intracellular transport system have been previously analysed.<sup>37</sup> Our results indicate that strong immunostaining of *SEC14L1* (histoscore levels  $\geq 180$ ) is associated with Gleason score  $\geq 8$  and tumor stage. Moreover, histoscore levels  $\geq 215$  are associated with biochemical progression. On the other hand, our analysis has revealed that *TCEB1* gene is also upregulated in tumors with Gleason score  $\geq 8$ . Interestingly, *TCEB1* is located at chromosome region 8q21.11, and the gain of the long arm of chromosome 8 (8q) is one of the most commonly recurrent findings in advanced prostate tumors, and it is associated with poor prognosis.<sup>38,39</sup> Moreover, Porkka *et al.*<sup>40</sup> have shown by FISH analysis, that 23% of hormone-independent tumors had amplification of *TCEB1* gene, whereas none of the hormone-dependent prostate tumors did, and that amplification of *TCEB1* was associated with advanced androgen-independent prostate cancer.<sup>40</sup> Finally, Jalava *et al.*<sup>41</sup> have shown that *TCEB1* promotes invasion in prostate cancer cells.

Our results indicate that strong immunohistochemical expression of *TCEB1* and *SEC14L1* is associated with Gleason score  $\geq 8$ , tumors stage and biochemical progression. It will be interesting to follow-up patients with Gleason score  $\leq 7$  and high *SEC14L1* and *TCEB1* protein levels, to assess if they could be the patients in this grade group that are at a higher risk of tumor progression.

In conclusion, the present study reveals global gene expression differences that are sufficiently robust to distinguish tumors with Gleason scores 6, 7 and  $\geq 8$ . In addition,

these results show that there is a 12-gene signature associated with aggressive tumor histology. Protein levels of two genes in this 12-gene signature, *SEC14L1* and *TCEB1*, have been identified as good candidate predictors of progression. The role of the remaining genes in this signature in the pathogenesis of prostate cancer remains to be elucidated.

### **Disclosure/conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

The study has been funded with Grants FIS/Instituto Carlos III/FEDER PS09/01106 from the Ministry of Health of the Spanish Government and Support Grant 2008 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board), FIS PI080274 from the Instituto de Salud Carlos III and ‘With the support of University and Research Department of Innovation, Universities and Enterprise of Generalitat de Catalunya and European Social Fund’ (Comissionat per Universitats i Recerca del Departament d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu). The authors thank to Parc de Salut Mar-Biobank and Tumor Bank of the Hospital Clínic-Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer Biobank (IDIBAPS) and the Xarxa de Bancs de Tumors de catalunya for providing the samples used in the study. We also thank Sergi Mojal for his help with the statistical analysis.

### **Figure legends**

**Figure 1.** Heatmap showing the 99 differentially expressed genes for the three analyzed conditions (prostate carcinomas with combined Gleason scores 6, 7 and  $\geq 8$ ).

**Figure 2.** Box plot for the 12-gene signature, comparing the qRT-PCR gene expression levels in prostate tumors with combined Gleason score  $\leq 7$  vs  $\geq 8$ . The 12 genes are displayed in the X axis and the respective expression levels in the Y axis. ° indicates outlayer values and \* indicates extreme outlayer values.

**Figure 3.** Immunohistochemical expression of *SEC14L1* and *TCEB1* (200x). A) Combined Gleason score 3 + 4 (+5) PCa showing moderate to strong *SEC14L1* expression

(histoscore = 310). B) Combined Gleason score 3 + 3 tumor showing weak SEC14L1 expression (histoscore = 110). C) Gleason 3 + 4 case showing moderate to strong TCEB1 expression (histoscore = 195). D) Gleason 3 + 3 tumor showing weak TCEB1 expression (histoscore = 120).

**Figure 4.** SEC14L1 and TCEB1 IHC expression according to combined Gleason score (A and B) and according to pathological stage (C and D). A) Fifty three percent (17/32) of Gleason  $\leq 7$  and 90% (10/11) of Gleason  $\geq 8$  tumors had strong SEC14L1 expression. B) Twenty-two percent (7/32) of Gleason  $\leq 7$  tumors and the eleven (100%) tumors with Gleason  $\geq 8$  had strong TCEB1 expression. C) Fifty percent (13/26) of  $\leq$  pT2 and 76.4% (13/17) of  $\geq$  pT3 tumors had strong SEC14L1 expression. D) Eleven percent (3/26) of  $\leq$  pT2 and 35% (6/17) of  $\geq$  pT3 tumors had strong TCEB1 expression.

**Figure 5.** PSA progression-free survival (Kaplan-Meier) plots for SEC14L1 (A) and TCEB1 (B). Follow-up (months) is shown in the X axis and the Y axis indicates cumulative PSA progression-free survival.

#### Table legends

**Table 1.** Clinical-pathological features (Gleason score, tumor stage and PSA progression) of the samples analyzed in the microarray and in the qRT-PCR studies.

**Table 2.** t-test and ANOVA analysis of the 12 gene signature.

**Supplementary table 1.** List of the 29 genes selected for validation by qRT-PCR analysis. Gene symbol, ID name assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) and their adjusted p-value in the microarray analysis are indicated. Validated genes are shown in bold.

**Supplementary table 2.** List of 3,380 genes differentially expressed in tumor vs normal prostate samples.

**Supplementary table 3.** List of 102 Affymetrix ID that map 99 unique gene symbols according to HUGO, differentially expressed among the three conditions (Gleason score 6, 7 and  $\geq 8$ ).

## REFERENCES

1. Cayuela A, Rodriguez-Dominguez S, Martin VE, Candau BR. Recent changes in prostate cancer mortality in Spain. Trends analysis from 1991 to 2005. *Actas Urol Esp* 2008; **32**:184-9.
2. Kopper L, Timar J. Genomics of prostate cancer: Is there anything to "translate"? *Pathol Oncol Res* 2005; **11**:197-203.
3. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010; **24**:1967-2000.
4. Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, *et al.* American Cancer Society Prostate Cancer Advisory Committee. American cancer society guideline for the early detection of prostate cancer: Update 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; **60**:70-98.
5. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006; **97**:433-47.
6. Magee JA, Araki T, Patil S, *et al.* Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:5692-6.
7. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:5974-8.
8. Chaib H, Cockrell EK, Rubin MA, Macoska JA. Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 2001; **3**:43-52.
9. Bull JH, Ellison G, Patel A, *et al.* Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer* 2001; **84**:1512-9.
10. Chetcuti A, Margan S, Mann S, *et al.* Identification of differentially expressed genes in organ-confined prostate cancer by gene expression array. *Prostate* 2001; **47**:132-40.
11. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, *et al.* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; **412**:822-6.
12. Luo JH, Yu YP, Cieply K, *et al.* Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog* 2002; **33**:25-35.
13. Bermudo R, Abia D, Ferrer B, *et al.* Co-regulation analysis of closely linked genes identifies a highly recurrent gain on chromosome 17q25.3 in prostate cancer. *BMC Cancer* 2008; **8**:315.

14. Vanaja DK, Chevillie 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; **63**:3877-82.
15. LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, *et al.* Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* 2002; **62**:4499-506.
16. Singh D, Febbo PG, Ross K, *et al.* Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 2002; **1**:203-9.
17. Lapointe J, Li C, Higgins JP, *et al.* Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:811-6.
18. True L, Coleman I, Hawley S, *et al.* A molecular correlate to the gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:10991-6.
19. Ross AE, Marchionni L, Vuica-Ross M, *et al.* Gene expression pathways of high grade localized prostate cancer. *Prostate* 2011;.
20. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**:e15.
21. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**:Article3.
22. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:15545-50.
23. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**:207-10.
24. Tsuchiya N, Slezak JM, Lieber MM, Bergstralh EJ, Jenkins RB. Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **34**:363-71.
25. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, *et al.* Gene expression studies in prostate cancer tissue: Which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 2005; **83**:1014-24.

26. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**:RESEARCH0034.
27. Agell L, Hernandez S, Salido M, *et al.* J. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are infrequent events. *Mod Pathol* 2011; **24**:443-52.
28. de Muga S, Hernandez S, Agell L, *et al.* Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: Association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol* 2010; **23**:703-12.
29. Hoheisel JD. Microarray technology: Beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* 2006; **7**:200-10.
30. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, *et al.* Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 2007; **39**:41-51.
31. Dong Y, Bey EA, Li LS, *et al.* Prostate cancer radiosensitization through poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation. *Cancer Res* 2010; **70**:8088-96.
32. Haffner M, De Marzo AM, Meeker AK, Nelson WG, Yegnasubramanian S. Transcription-induced DNA double strand breaks: Both an oncogenic force and potential therapeutic target? *Clin Cancer Res* 2011;.
33. Catz SD. Characterization of Rab27a and JFC1 as constituents of the secretory machinery of prostate-specific antigen in prostate carcinoma cells. *Methods Enzymol* 2008; **438**:25-40.
34. Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res* 2005; **65**:1325-34.
35. Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, *et al.* Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**:1420-4.
36. Yip PY, Kench JG, Rasiah KK, *et al.* Low AZGP1 expression predicts for recurrence in margin-positive, localized prostate cancer. *Prostate* 2011;.
37. Zhao S, Xu C, Qian H, *et al.* Cellular retinaldehyde-binding protein-like (CRALBPL), a novel human Sec14p-like gene that is upregulated in human hepatocellular carcinomas,

may be used as a marker for human hepatocellular carcinomas. *DNA Cell Biol* 2008; **27**:159-63.

38. Ribeiro FR, Jeronimo C, Henrique R, *et al.* 8q gain is an independent predictor of poor survival in diagnostic needle biopsies from prostate cancer suspects. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:3961-70.

39. Saramaki O, Visakorpi T. Chromosomal aberrations in prostate cancer. *Front Biosci* 2007; **12**:3287-301.

40. Porkka K, Saramaki O, Tanner M, Visakorpi T. Amplification and overexpression of elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. *Lab Invest* 2002; **82**:629-37.

41. Jalava SE, Porkka KP, Rauhala HE, Isotalo J, Tammela TL, Visakorpi T. TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009