

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina



Estudi dels gens *FGFR3*, *EGFR*, *PTEN*, *CXCR4* i
del gen de fusió *TMPRSS2-ERG* en càncer de
pròstata

Memòria presentada per
SILVIA DE MUGA SALLERAS
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 Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Vist i plau dels codirectors de tesi:

Dr. Josep Lloreta

Dra. Silvia Hernández

Els sota-signants, JOSEP LLORETA, doctor en Medicina, cap de secció d'Anatomia Patològica a l'Hospital del Mar i Catedràtic d'Anatomia Patològica de la Universitat Pompeu Fabra; i SILVIA HERNÁNDEZ, doctora en Biologia i Professora Agregada de la Universitat Pompeu Fabra

CERTIFIQUEN:

Que la Tesi Doctoral titulada ESTUDI DELS GENS *FGFR3*, *EGFR*, *PTEN*, *CXCR4* I DEL GEN DE FUSIÓ *TMPRSS2-ERG* EN CÀNCER DE PRÒSTATA, presentada per SILVIA DE MUGA SALLERAS, per tal d'accedir al títol de Doctora en Biologia, ha estat realitzada sota la seva direcció, estimant que reuneix els requisits formals i científics adients per la seva preceptiva lectura i defensa públiques.

I per a que així consti, i als efectes oportuns, signem la present certificació a Barcelona, a dia 10 de març de 2012.

Dr. Josep Lloreta

Dra. Silvia Hernández

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Sembla mentida, després de tants anys, finalment arriba el dia de presentar la feina feta en aquests 5 anys.

Quan vaig començar la carrera, sempre que algú em preguntava pel futur, jo assegurava que mai faria el doctorat. No, la meva idea era acabar la carrera i buscar feina, com la majoria de gent. Però mira, aquí estem, a punt de presentar la MEVA tesi. Per això vull agrair el recolzament de tots vosaltres, tots els que en un moment o altre m'heu ajuda't a aconseguir-ho!

Les últimes pràctiques de la universitat les vaig realitzar ja aquí, a l'Hospital del Mar, amb el Kiko com a responsable, i la Marta i la Blanca ensenyant-me a cariotipar. Va ser llavors quan em vaig començar a plantejar la possibilitat de fer el doctorat i vaig tenir la gran sort de poder unir-me a l'equip de recerca en càncer de pròstata d'en Pep Lloreta. Un grup petit en el que he estat sempre molt a gust. Moltes gràcies, principalment als meus directors de tesi, Pep i Silvia, que sempre m'heu guiat en la investigació a seguir, a valorar els resultats obtinguts, i a fer que la meva feina anés sempre endavant. Però sobretot per l'ambient que tenim en el grup, sempre molt proper i agradable, coneixent-nos i tractant-nos com a persones i amics; no simplement com a companys de feina. Gràcies també a la Laia, la Núria i la Marta, i a tots els que han participat en un moment o altre, que com a membres del mateix grup hem compartit laboratori, sessions, congressos, i bons moments per recordar.

Gràcies a totes les becàries que estaven i han estat tots aquests anys, l'Eulàlia, la Laura, la Cris, la Rocío, la Laia, l'Ana, la Mar, l'Alma, la Vera i l'Ana. Quantes hores compartides al laboratori, al menjador de l'hospital, els cafés post-dinars. I també fora de la feina, aquelles trobades per anar a fer una xocolata al carrer Petrixol amb els nens de la Blanca, esquiwades, berenars a casa d'una o altra, dinars a Purrubí...

Gràcies a les noies de molecular i citogenètica, que, sobretot als meus inicis, vau tenir la paciència d'ensenyar-me les tècniques, deixar-nos les poiates i resoldre dubtes. Simplement per fer-me un lloc als vostres laboratoris. I gràcies a les persones de

patologia que, també hem anat compartint moments, sobretot converses entre passadissos o compartint lloc de treball.

Com a qualsevol experiència o treball en que es dediquen moltes hores, inclús anys, hi ha moments que et sembla que el que estàs fent no et servirà per res, moments en que ho deixaries tot i marxaries ben lluny a fer una cosa totalment diferent. Però també hi ha molts moments en que disfrutes amb el que estàs fent, i molt! Disfrutes amb els resultats obtinguts i veus amb optimisme que allò pot servir per tenir una mica més de coneixement científic. Gràcies a la meva família, pares i germanes, que no sé si realment acaben d'entendre que és el que està fent la seva filla/germana, però sempre s'han interessat per veure com m'anava. Gràcies al Pol, la persona que més m'ha aguantat en els moments en que veus les coses negres i m'ha animat a tirar endavant en moments una mica més crítics. I naturalment, també gràcies a tots els amics que han viscut un moment o altre d'aquest procés, alguns companys de professió i altres sense cap relació amb la biologia, però tots han sentit a parlar de la meva tesis.

En definitiva, moltes gràcies a tots!

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

1. Beca predoctoral PIF2/PIF3 de la Fundació IMIM 2009-2011
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. Hernández 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 Jun;22(6):848-56. **IF: 4.406**
2. **De Muga S**, Hernández S, Agell L, Salido M, Juanpere N, Lorenzo M, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: Association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol.* 2010 May;23(5):703-12. **IF: 4.176**

ÍNDEX

LLISTAT DE TAULES.....	1
LLISTAT DE FIGURES.....	3
LLISTAT D'ABREVIATURES.....	5
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1. Anatomia i histologia de la pròstata.....	11
1.2. Mostreig i tractament del teixit prostàtic.....	15
1.3. Càncer de pròstata.....	17
1.3.1. Història natural del càncer de pròstata.....	17
1.3.1.1. Lesions benignes de la pròstata.....	17
1.3.1.2. Lesions precursorses.....	18
1.3.1.3. Lesions malignes de la pròstata.....	20
1.3.2. Classificació, grau histològic i altres factors pronòstic del càncer de pròstata.....	21
1.3.3. Mètodes de detecció clínica del càncer de pròstata.....	26
1.3.4. Varietats clínico-patològiques del càncer prostàtic.....	27
1.3.5. Gens implicats en la carcinogènesi prostàtica.....	29
1.3.5.1. Vies de senyalització intracel.lular dependents de receptors tirosina-quinasa (RTKs): FGFRs i EGFR.....	31
- FGFR3 en càncer.....	35
- FGFR3 en càncer de pròstata.....	38
- Relació entre mutacions de <i>FGFR3</i> i altres alteracions moleculars.....	38
- EGFR en càncer.....	41
- EGFR en càncer de pròstata.....	42
- Teràpies inhibidores d'EGFR.....	43
1.3.5.2. Via de transducció de senyal PI3K/PTEN-AKT	45
- PI3K en càncer.....	47
- PI3K en càncer de pròstata.....	48
- PTEN en càncer.....	48
- PTEN en càncer de pròstata.....	48

1.3.5.3. Reordenaments cromosòmics: Gen de fusió <i>TMPRSS2-ERG</i> ...	49
1.3.5.4. <i>CXCR4</i> : Gen relacionat amb el reordenament <i>TMPRSS2-ERG</i> ..	52

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	55
2.1. Hipòtesi.....	57
2.2. Objectius.....	59
3. RESULTATS	61
3.1. Article 1: Hernández S, de Muga S , Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, Mojal S, Serrano S, Lloreta J. <i>FGFR3</i> mutations in prostate cancer: Association with low grade tumors. <i>Mod Pathol.</i> 2009;22:848-56.....	65
3.2. Article 2: De Muga S , Hernández S, Agell L, Salido M, Juanpere N, Lorenzo M, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: Association with high-grade and advanced-stage carcinomas. <i>Mod Pathol.</i> 2010;23:703-12.....	77
3.3. Article 3 (enviat): De Muga S , Hernández S, Salido M, Lorenzo M, Agell L, Juanpere N, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J. <i>CXCR4</i> mRNA Overexpression in High Grade Primary Prostate Tumors: Lack of Association with <i>TMPRSS2-ERG</i> Rearrangement.....	89
4. DISCUSSIÓ	91
5. CONCLUSIONS	109
6. BIBLIOGRAFIA	113
7. ANNEXES	131
7.1. Annex 1: Article 3.....	133

7.2. Annex 2: Taula amb el total de casos analitzats en l'article 1 i 2, i els casos completats posteriorment a la publicació de l'article.....	155
7.3. Annex 3: Resum de les alteracions dels diferents gens estudiats (<i>PTEN</i> , <i>EGFR</i> , <i>FGFR3</i> , <i>TMPRSS2-ERG</i> i <i>CXCR4</i>).....	161
7.4. Annex 4: Resum de les alteracions als diferents gens agrupades segons els diferents graus de Gleason.....	163

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Modificacions del Sistema de Gleason (ISUP 2005) ⁽³⁶⁾

Taula 2. Classificació TNM en tumors de pròstata. Extret de Cowherd 2012 ⁽⁴⁰⁾

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Esquema que representa les 3 zones que es diferencien en la pròstata: zona perifèrica, zona central i zona de transició. Extret de <http://www.chronicprostatitis.com>

Figura 2. Glàndula prostàtica normal (A). Les glàndules presenten una capa basal externa i una línia interna secretora. Les cèl.lules són normals, sense nuclèols prominents. Neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau (HGPIN) (B). S'observa engrandiment nuclear i nuclèols prominents, així com una làmina basal incompleta

Figura 3. Esquema de la progressió de teixit prostàtic normal a PIN, i a carcinoma de pròstata. Extret de Bostwick i *cols.* 1987 ⁽³⁴⁾

Figura 4. Imatge histològica dels patrons de Gleason més freqüents

Figura 5. Diagrama esquemàtic del Sistema de Gleason original (A) i modificat per la ISUP l'any 2005 (B)

Figura 6. Model de conceptes moleculars de la progressió del càncer de pròstata. Extret de Tomlins i *cols.* 2007 ⁽⁴⁶⁾

Figura 7. Esquema de l'estructura del gen *FGFR3*, la seva proteïna i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites. La isoforma *FGFR3b* del gen conté l'exó 8 i la isoforma *FGFR3c* l'exó 9

Figura 8. Via de senyalització que dona lloc a l'activació de FGFR3. Extret de Wu i *cols.* 2005 ⁽⁷⁰⁾

Figura 9. Principals mutacions del gen *FGFR3* descrites en alteracions de l'esquelet, mieloma múltiple i càncer de bufeta (en negreta trobem els codons més freqüentment mutats)

Figura 10. Freqüència i localització de les mutacions de *FGFR3* en càncer de bufeta. Extret de Knowles i *cols.* 2007 ⁽⁸⁶⁾

Figura 11. Diferents vies de senyalització d'EGFR. Els 4 receptors de la família EGFR poden formar fins a 10 homo/heterodímers activats per diferents lligands. Extret de Yarden 2001 ⁽¹¹⁶⁾

Figura 12. Esquema de l'estructura del gen *EGFR* i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites

Figura 13. Via de senyalització de PI3K-AKT. Extret de Chalhoub i cols. 2009 ⁽¹⁶⁵⁾

Figura 14. Esquema de l'estructura de la proteïna de PTEN i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites

Figura 15. Gens de fusió *TMPRSS2-ERG* i *TMPRSS2-ETV1*. Extret de Tomlins i cols. 2006 ⁽⁴⁵⁾

LLISTAT D'ABREVIATURES

AAH	Hiperplàsia adenomatosa atípica
ACH	Acondroplàsia
ADN	Àcid desoxirribonucleic
Akt	De l'anglès <i>v-akt murine thymoma viral oncogene</i>
AMACR	De l'anglès <i>Alpha-methylacyl-CoA racemase</i>
AP-1	De l'anglès <i>Activator protein 1</i>
APC	De l'anglès <i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Àcid ribonucleic
ASAP	De l'anglès <i>Atypical small acinar proliferation</i>
ATBF1	De l'anglès <i>AT-binding transcription factor 1</i>
C15ORF21	De l'anglès <i>Chromosome 15 open reading frame 21</i>
CaP	Càncer de pròstata
CANT1	De l'anglès <i>Calcium activated nucleotidase 1</i>
CDKN1B	De l'anglès <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
c-MYC	De l'anglès <i>Myelocytomatosis oncogene</i>
CrK	De l'anglès <i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)</i>
DDX5	De l'anglès <i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5</i>
EGFR	De l'anglès <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERG	De l'anglès <i>ETS related gene</i>
ETS	De l'anglès <i>E twenty-six</i>
FDA	De l'anglès <i>Food and Drug Administration</i>
FGFs	De l'anglès <i>Fibroblast growth factors</i>
FGFR	De l'anglès <i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FISH	De l'anglès <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FRS2	De l'anglès <i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
GSTP1	De l'anglès <i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
Gp	Glàndula prostàtica
HB-EGF	De l'anglès <i>Heparina binding EGF</i>
Grb2	De l'anglès <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HCH	Hipocondroplàsia
HBP	Hiperplàsia benigna de pròstata

HGPIN	Neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau
HERV-K	De l'anglès <i>Human endogenous retrovirus K</i>
HNRPA2B1	De l'anglès <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>
IHQ	Immunohistoquímica
ISUP	De l'anglès <i>International Society of Urological Pathology</i>
KLF6	De l'anglès <i>Kruppel-like factor 6</i>
KLK2	De l'anglès <i>Kallikrein-related peptidase 2</i>
k-RAS	De l'anglès <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	Pèrdua d'heterozigositat
MAPK	De l'anglès <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCM	De l'anglès <i>Molecular Concept Map</i>
MoAbs	Anticòssos monoclonals
NcK	De l'anglès <i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
NDRG1	De l'anglès <i>N-myc downstream regulated 1</i>
NF-κB	De l'anglès <i>Nuclear factor-κB</i>
NKX3.1	De l'anglès <i>NK3 transcription factor related focus 1</i>
NSCLC	De l'anglès <i>Non small cell lung cancer</i>
PAP	Fosfatasa àcida prostàtica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PIN	Neoplàsia intraepitelial prostàtica
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat
PLCγ-1	Fosfolipasa C gamma-1
PSA	Antígen prostàtic específic
PTEN	De l'anglès <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
QRT-PCR	RealTime-PCR quantitativa
RARbeta2	De l'anglès <i>Retinoic acid receptor beta 2</i>
RTKs	Receptors tirosina-quinasa
SLC45A3	De l'anglès <i>Solute carrier family 45, member 3</i>
STATS	De l'anglès <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TDI	Displàsia tanatofòrica tipus I
TDII	Displàsia tanatofòrica tipus II

TGF-α	Factor α de creixement transformant
TKIs	Inhibidors tirosina quinasa
TMPRSS2	De l'anglès <i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TP53	De l'anglès <i>Tumor protein 53</i>
TURP	Resecció transuretral de pròstata
WHO	De l'anglès <i>World Health Organization</i>
WT	De l'anglès <i>Wild type</i>
ZP	Zona perifèrica de la pròstata
ZC	Zona central de la pròstata
ZT	Zona de transició de la pròstata

He après que
la vida és dura,
però jo ho sóc més!

He après que
les oportunitats no es perden mai,
les que tu deixes escapar
les aprofita un altre.

He après que un somriure
és un mètode econòmic
per millorar el teu aspecte.

He après que
no puc escollir com em sento,
però sempre hi puc fer
alguna cosa.

He après que
cal gaudir del viatge,
i no pensar només en la meta.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Anatomia i histologia de la pròstata

La pròstata és un òrgan glandular fibromuscular localitzat entre la bufeta urinària i el recte. La uretra travessa longitudinalment la pròstata, és per això que la major part de creixements anormals en aquest òrgan es tradueixen freqüentment en una obstrucció urinària ⁽¹⁾. La funció principal de la pròstata és la formació de secrecions, que constitueixen de la meitat a dos tercers parts del volum total de l'ejaculació (~ 3 mL).

La pròstata inicia el seu desenvolupament a la setena setmana de l'embriogènesi, a partir del mesènquima situat a la porció inferior i posterior del si urogenital, al voltant de la desembocadura del conducte de Wolf. La zona mesenquimal situada per sobre del conducte wolfià donarà lloc a la pròstata cranial, on normalment es desenvolupa la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) a partir dels 40-45 anys. En canvi, de la zona mesenquimal inferior al conducte de Wolf, derivarà la zona caudal de la pròstata, on s'originaran al voltant del 80% dels carcinomes prostàtics (CaP).

A la setmana 31-36 de la gestació, l'estructura bàsica de la pròstata està completament formada. A la pròstata fetal, els àcins prostàtics consisteixen en un agregat compacte de cèl.lules basals immadures, sovint amb metaplàsia escamosa dels conductes i la uretra. Després del naixement, la mida de la pròstata es manté estable fins els 10-12 anys, i durant la pubertat hi ha un augment considerable en la mida de la glàndula deguda als andrògens. Cap als 20 anys, la pròstata pesa uns 20g i es manté estable uns 30 anys ^(2,3).

Durant el desenvolupament embrionari existeix una interacció important entre les cèl.lules mesenquimals i les epitelials, ja que la morfogènesi epitelial prostàtica induïda per andrògens, així com el seu creixement i diferenciació secretora, es produeixen per mediació de factors tròfics que provenen de les cèl.lules mesenquimals que són positives per als receptors d'andrògens.

El model bàsic per descriure la pròstata en la actualitat és el de McNeal de 1968 ⁽⁴⁾. Des del punt de vista anatòmic, a la pròstata podem diferenciar 3 zones: zona

perifèrica (ZP), zona central (ZC) i zona de transició (ZT) [Figura 1]. La ZP 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 (CaP) i la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN). La ZC conté la resta de teixit glandular de la pròstata, aproximadament un 25%, i envolta els conductes ejaculadors. La ZT correspon al 5% restant de la pròstata i és la regió on principalment s'origina la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) ⁽⁵⁾.

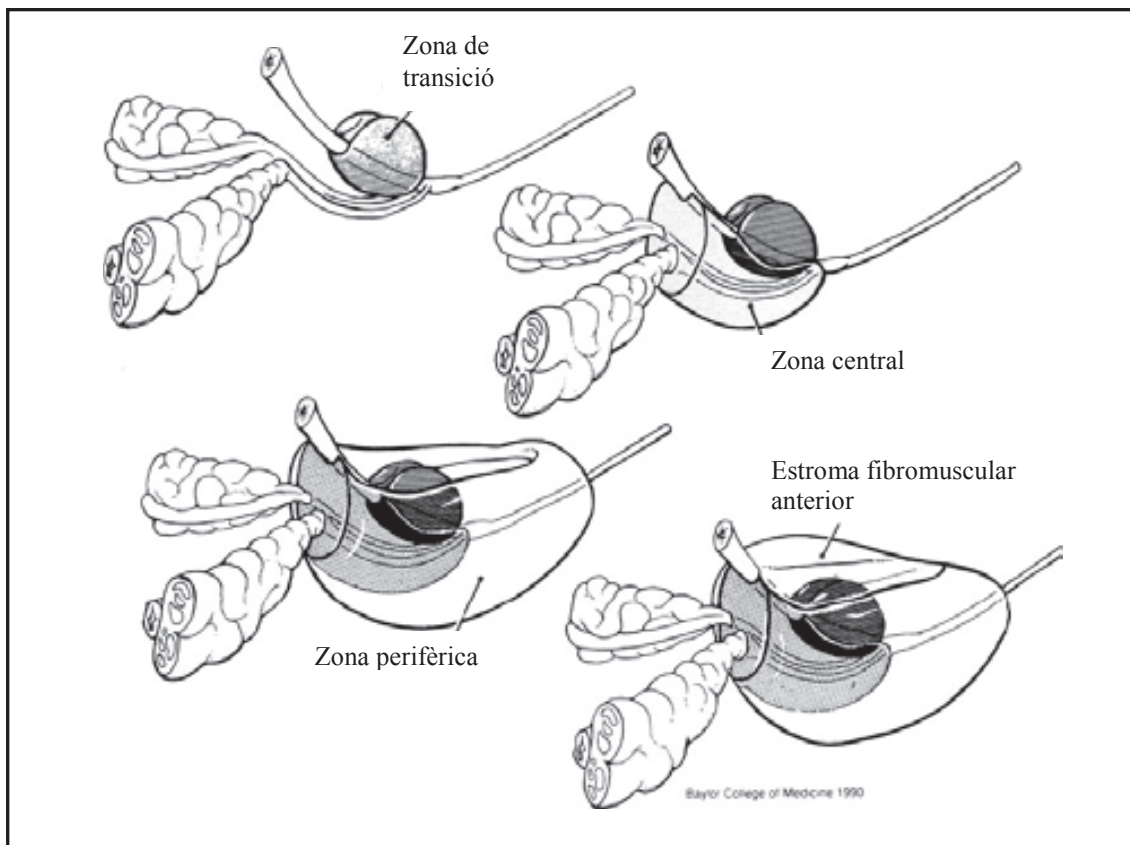


Figura 1. Esquema que representa les 3 zones que es diferencien en la pròstata: zona perifèrica, zona central i zona de transició. Extret de <http://www.chronicprostatitis.com>

La ZT i la ZP mostren diferències a l'expressió gènica. Alguns dels gens sobreexpressats a la ZT són: *FLJ10970*, *SLC14A1*, *ASPA*, *BST2*, *FLJ20037*, *GAGEC1*, i *COCH*; i a la ZP són: *THBS4*, *TFPI2*, *GDF15*, *HEPSIN*, *GIG2*, *TARP*, *EGRI*, *ADM*, *COBEP*, *RASD1*, i *ILB1*. També hi ha diferències en les característiques de l'estroma i l'epiteli. Les interaccions estroma-epiteli podrien ser, per tant, responsables de la

diferent localització de les malalties de la pròstata⁽³⁾. Hi ha gran relació entre els gens expressats en la zona perifèrica normal, i els gens sobreexpressats en el càncer de pròstata. Concretament, *GDF15* i *TARP* s'han vist sobreexpressats en ZP i sobrerregulats en càncer de pròstata, suggerint que hi pot haver una susceptibilitat a càncer influenciada per la signatura de gens de la zona perifèrica.

És poc freqüent la transformació maligna a la ZT, per això es creu que el perfil d'expressió d'aquesta zona pot tenir una funció protectora, amb gens i vies específiques involucrats en processos antitumorals^(6,7). Dues vies importants, reguladores del desenvolupament, de les quals molts gens es troben preferentment expressats a la zona de transició, són les vies Wnt i *forkhead*. Les proteïnes secretades per la via Wnt són mediadores importants de la senyalització cèl.lula-cèl.lula durant el desenvolupament i tenen un paper important en homeòstasi. Els gens *forkhead* són una família de factors de transcripció que regulen el desenvolupament i tenen un paper protector en el procés de transformació oncogènica⁽³⁾.

Des del punt de vista histològic, la glàndula prostàtica està formada per un component glandular (ZP, ZC i ZT) i un no glandular. El component glandular està format pels acins i conductes prostàtics, constituïts per dos compartiments histològicament definits, el basal i el secretor. El compartiment basal de l'epiteli glandular està format per 1 o 2 capes de cèl.lules indiferenciades, que es considera que són l'origen de les cèl.lules secretores i, per tant, es pensa que és el compartiment que conté les cèl.lules mare. El component secretor està format per un epiteli cilíndric pseudoestratificat. Els acins i conductes estan submergits en una matriu tissular d'estroma, teixit fibromuscular, vascular i connectiu que correspon al component no glandular⁽⁸⁾.

L'epiteli de la pròstata està format per 3 tipus principals de cèl.lules: cèl.lules secretores, cèl.lules basals i cèl.lules neuroendocrines. Les cèl.lules secretores diferenciades, que tenen una baixa activitat proliferativa, produeixen l'antigen prostàtic específic (PSA), fosfatasa àcida prostàtica (PAP), receptors d'andrògens, mucina àcida, i altres productes secretors. Les cèl.lules basals formen una línia aplanada en la perifèria de les glàndules, per sobre de la membrana basal. Separen les cèl.lules secretores dels acins prostàtics del teixit estromal que l'envolta. Aquestes cèl.lules tenen

la major activitat proliferativa de tot l'epiteli prostàtic, i es creu que actúen com a reserva per repoblar la població de les cèl.lules secretores, tot i que no es coneix exactament quin rol tenen en la glàndula prostàtica no maligna, ni queda gens clar el seu paper en el càncer ⁽⁹⁾. S'han trobat receptors de factors de creixement epidèrmic en aquestes cèl.lules, però no en les cèl.lules secretores, cosa que suggereix que podrien tenir un paper important en la regulació del creixement. Les cèl.lules neuroendocrines són el tipus cel.lular menys freqüent de l'epiteli prostàtic i normalment no es veuen en tincions de rutina d'hematoxilina i eosina. La seva funció no està clara, però sembla que tenen un rol endocrí-paracrí en la regulació del creixement i desenvolupament, similar a les cèl.lules neuroendocrines d'altres òrgans ⁽²⁾.

1.2. Mostreig i tractament del teixit prostàtic

Les formes més freqüents d'extreure mostres de teixit de pròstata són, per ordre de freqüència: biòpsies d'agulla, reseccions transuretrals, prostatectomies radicals i aspirats d'agulla ⁽¹⁰⁾.

- **Biòpsia d'agulla:** Consisteix en fer una punció de la pròstata amb agulles de petit calibre (de 14 a 18 g) per extreure una mostra de teixit. És, amb diferència, la forma més freqüent d'estudiar el teixit prostàtic en els laboratoris de patologia. Sobretot, s'obtenen mostres de zona perifèrica, però hi pot haver representació de la zona de transició o central.

- **Resecció transuretral (TURP):** S'utilitza freqüentment en el tractament de símptomes de prostatisme en pacients amb HBP obstructiva. Consisteix en la resecció de parènquima prostàtic a través de la mucosa uretral prostàtica. Els teixits extrets per TURP inclouen la zona de transició, teixits uretrals i periuretrals, fragments del coll de la bufeta i estroma fibromuscular anterior ⁽¹¹⁾.

- **Prostatectomia radical:** Consisteix en l'extracció total de la glàndula prostàtica, que és el tractament d'elecció en aproximadament la meitat dels pacients amb càncer de pròstata. La prostatectomia radical es pot fer amb cirurgia oberta o laparoscòpia ⁽¹²⁾.

- **Cistoprostatectomia radical:** Consisteix en l'extracció de la glàndula prostàtica quan es troba un carcinoma de bufeta amb invasió de la capa muscular pròpia. Els casos de cistoprostatectomies amb càncer de bufeta també presenten càncer de pròstata incidental en un rang molt variable, entre 10 i 60% dels casos ⁽¹³⁾. La detecció de carcinoma prostàtic incidental en les cistoprostatectomies radicals depèn de l'extensió del mostreig del teixit prostàtic. A més, molts dels casos de càncer de pròstata detectats a les cistoprostatectomies són carcinomes dels anomenats insignificants o clínicament indolents, normalment petits, òrgan confinats i que presenten un estadi i grau histològic menor que la major part dels casos de prostatectomia radical. Només una tercera part (32.8%) dels càncers de pròstata incidentals, trobats a cistoprostatectomies

radicals, es consideren clínicament significatius; mentre que dos tercers parts (67.2%) es consideren clínicament “insignificants”⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

- **Autòpsia:** L'estudi postmortem de la pròstata es fa per trobar un possible adenocarcinoma prostàtic ocult o clínicament inaparent, circumstància que s'ha documentat ja des de la cinquena dècada⁽¹⁷⁾. També en aquesta situació, la incidència de càncer en les diferents sèries està condicionada per l'exhaustivitat del mostreig patològic.

- **Aspirat d'agulla:** Es va utilitzar fins al 1930, però va caure en desús cap als anys 60. És un mètode segur, fàcil i molt acurat com a tècnica de diagnòstic citològic, però els aspirats d'agulla no són recomanats com a test de screening per càncer de pròstata en homes asimptomàtics ja que són poc sensibles i no proporcionen moltes de les dades amb valor pronòstic que aporten les biòpsies d'agulla^(18,19).

1.3. 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 ⁽²⁰⁾. La introducció de proves de detecció de l'antigen prostàtic específic (PSA) en sèrum, així com l'obtenció de biòpsies d'agulla ha permès augmentar el nombre de casos diagnosticats i ha aconseguit disminuir significativament la mortalitat d'aquest tumor ⁽²¹⁾. Malgrat l'elevat impacte social que presenta, són menys els estudis moleculars realitzats sobre aquest tipus de càncer que en altres càncers (www.ncbi.nih.gov). Algunes de les raons que dificulten els estudis moleculars en aquest tipus de càncer serien que és un tumor molt heterogeni, amb una barreja de cèl.lules estromals, epitelials i inflamatòries i sovint envoltat de glàndules benignes o normals. Això fa que un anàlisi de les proteïnes, àcids nucleics o altres substàncies, es vegi molts cops contaminat amb teixit normal de pròstata ⁽²²⁾.

1.3.1. Història natural del càncer de pròstata

1.3.1.1. Lesions benignes de la pròstata

Hi ha una gran varietat de lesions benignes que poden afectar a la pròstata ⁽¹⁰⁾.

- **Prostatitis:** És una infecció, habitualment aguda, de la pròstata, però també pot ser crònica i fins i tot granulomatosa. Pot coexistir amb el carcinoma de pròstata i pot ser difícil distingir entre prostatitis i carcinoma. Pot ser d'etologia bacteriana aguda o crònica, i també crònica no bacteriana, que sovint és asimptomàtica ⁽²³⁾. Una de les situacions que s'associen amb prostatitis crònica abacteriana és l'obstrucció de les glàndules perifèriques per la compressió de la hiperplàsia prostàtica. La prostatitis pot incrementar el PSA sèric.

- **Malacoplàquia:** És un procés inflamatori poc freqüent, que resulta d'una infecció mantinguda, i pot estar associat amb immunosupressió. Es dona amb més freqüència en la bufeta però també s'ha descrit en altres teixits, inclosa la pròstata ⁽²⁴⁾.

- **Hiperplàsia benigna de pròstata (HBP):** És un creixement benigne de la glàndula prostàtica molt freqüent, considerat pràcticament com un fenomen normal en homes d'edat avançada. La HBP pot provocar problemes com obstrucció urinària i les

seves conseqüències. Tot i que no hi ha una relació causal entre HBP i càncer de pròstata, tenen algunes similituds: la prevalença d'ambdós augmenta amb l'edat, el càncer es dona normalment en una glàndula hiperplàstica, i totes dues malalties són dependents dels andrògens pel seu creixement ⁽²⁵⁾.

- **Hiperplàsia de cèl.lules basals:** Normalment es dona en l'entorn de la HBP, però també s'associa a l'atròfia postinflamatòria.

1.3.1.2. Lesions precursors

Actualment, l'única lesió precursora reconeguda del càncer de pròstata és la neoplàsia prostàtica epitelial d'alt grau (HGPIIN) ⁽²⁶⁾, tot i que està en discussió el paper de la hiperplàsia adenomatosa atípica i de l'atròfia proliferativa postinflamatòria.

- **Neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN):** És el primer estadi acceptat de carcinogènesi, amb presència de la majoria de canvis fenotípics, bioquímics i genètics del càncer, però sense invasió de l'estroma fibromuscular. La classificació del PIN està establerta en 2 grups: **PIN d'alt grau** i **PIN de baix grau**.

Tant en el PIN de baix com d'alt grau, hi ha un increment marcat de la cel.lularitat luminal en glàndules que solen conservar el contorn i les dimensions normals, així com també una capa de cèl.lules basals més o menys contínua. Aquest creixement intraglandular sol ser en forma de delicades projeccions papil.lars sense eix connectiu. En el PIN de baix grau, no hi ha nuclèols, els nuclis són relativament petits i tendeixen a aglomerar-se i condensar-se cap al centre de les papil.lars. En el PIN d'alt grau, els nuclis són grans, sovint amb nuclèol prominent, i no solen reduir-se de mida ni condensar-se cap al centre de les papil.lars ⁽²⁷⁾. A més de la configuració papil.lar, en el PIN d'alt grau, hi pot haver penalls, estructures cribiformes o creixement pla ⁽²⁸⁾.

Tot i que sembla ben establert que el PIN és un precursor del càncer de pròstata, no està del tot clara la relació entre ambdós processos. Tanmateix, el PIN d'alt grau és un dels paràmetres a incloure en els informes patològics perquè sovint s'associa amb la presència d'un càncer o amb el seu desenvolupament posterior ⁽²⁷⁾ **[Figura 2]**.

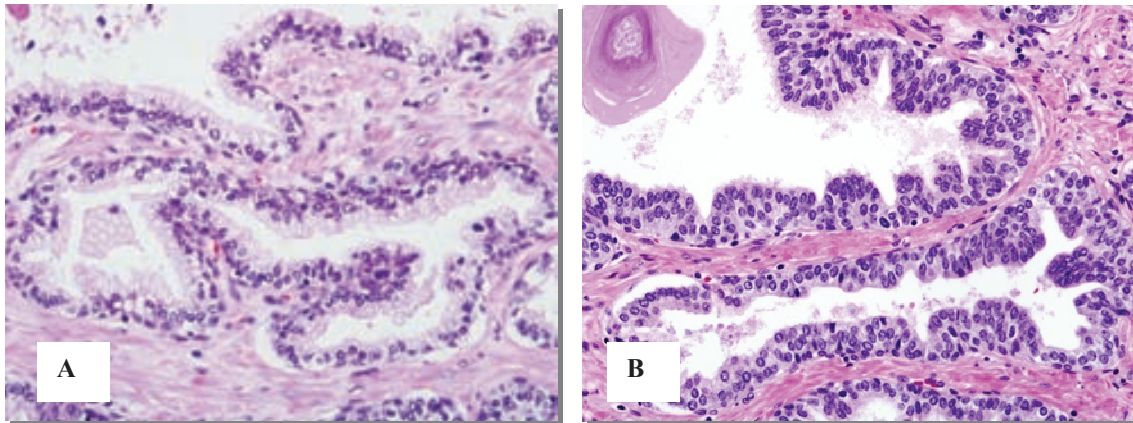


Figura 2. Glàndula prostàtica normal (A). Les glàndules presenten una capa basal externa i una línia interna secretora. Les cèl.lules són normals, sense nuclèols prominents. Neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau (HG PIN) (B). S'observa engrandiment nuclear i nuclèols prominents, així com una làmina basal incompleta

La incidència mitja descrita del PIN d'alt grau és d'un 9% de les biòpsies de pròstata, amb variacions des de 4.4% a 25% ^(27,29). Es troba una associació entre PIN i adenocarcinoma prostàtic, ja que la prevalença d'ambdós factors augmenta amb l'edat del pacient, i el PIN precedeix l'inici del càncer de pròstata en menys d'una dècada. Amb la desaparició de la capa de cèl.lules basals i la disrupció de l'estroma, es passaria d'un PIN d'alt grau a un carcinoma infiltrant **[Figura 3]**.

El PIN d'alt grau i el càncer de pròstata comparteixen alteracions genètiques similars. Per exemple, la pèrdua al·lèlica de 8p12-21 es freqüent tant en càncer com en PIN ⁽³⁰⁾. També trobem altres alteracions comunes com la pèrdua d'heterozigositat (LOH) de 8p22, 12pter-p12, 10q11.2, i el gen *PTEN*, i el guany dels cromosomes 7, 8, 10 i 12 i el 8p24. El PIN és epigenèticament similar al carcinoma en el percentatge d'al·lels metilats pels gens *APC*, *GSTP1* i *RARBeta2* ^(31,32). La fusió molecular *TMPRSS2-ERG* és troba en un 50% dels carcinomes de pròstata i en un 19-21% dels casos de PIN, però no en controls prostàtics benignes, cosa que suggereix que el reordenament molecular *TMPRSS2-ERG* és un factor que pot precedir a les alteracions cromosòmiques en la carcinogènesi prostàtica ^(2,33).

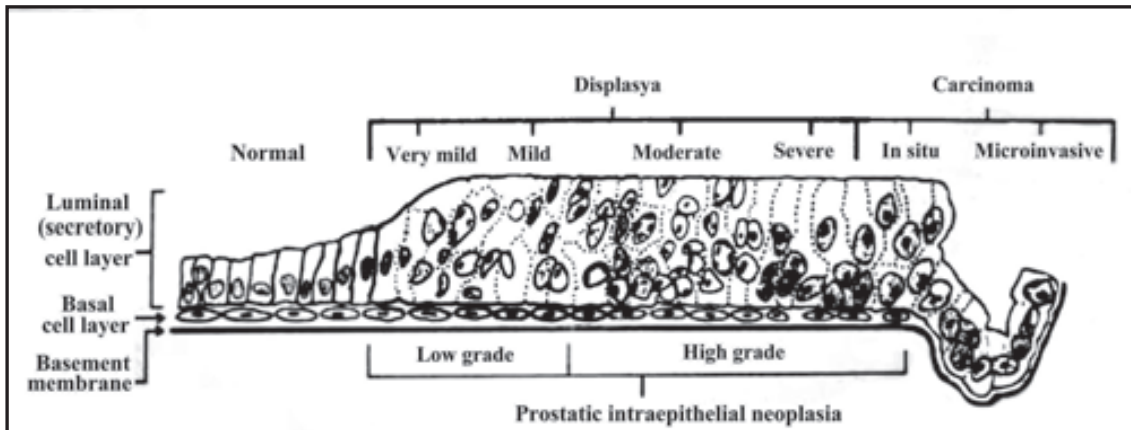


Figura 3. Esquema de la progressió de teixit prostàtic normal a PIN, i a carcinoma de pròstata. Extret de Bostwick i cols. 1987⁽³⁴⁾

Al llarg dels anys, diferents tipus de lesions han estat considerades com a precursors del càncer de pròstata, encara que s'han acabat descartant per manca d'evidències. Hi ha dues lesions que es creu que podrien estar relacionades amb el càncer de pròstata, tot i que les evidències són menors que les del PIN d'alt grau:

- **Hiperplàsia adenomatosa atípica (AAH):** També coneguda com a adenosi. És una lesió proliferativa caracteritzada per un acúmulo de petits acins, normalment en la zona de transició de la pròstata, i pot simular el patró d'un adenocarcinoma prostàtic⁽³⁵⁾.

- **Atrofia proliferativa postinflamatòria:** La presència d'inflamació induïx per una banda atrofia glandular. L'epiteli glandular pot respondre a aquesta atrofia amb senyals proliferatives, donant lloc a hiperplàsia postatròfica. En aquest procés proliferatiu, es creu que els radicals lliures generats per la inflamació i altres factors podrien induir canvis moleculars que constitueixen les primeres fases del desenvolupament d'un càncer. Més que un factor de risc, aquests canvis associats amb l'atrofia i la inflamació s'han relacionat amb la patogènia del càncer de pròstata⁽³³⁾.

1.3.1.3. Lesions malignes de la pròstata

- **Adenocarcinoma prostàtic:** Representa el 95% dels càncers de pròstata. La disposició arquitectònica i l'aparença de les cèl.lules tumorals depèn del grau del tumor

i la barreja de cèl.lules benignes i malignes és més freqüent que en tumors d'altres òrgans. Les característiques nuclears, com pot ser creixement, nuclèols, pèrdua de polaritat i aglomeració són els criteris emprats en el diagnòstic de malignitat ⁽¹⁰⁾. La major part dels adenocarcinomes són de fenotip acinar, però hi ha també adenocarcinomes amb fenotip ductal.

L'altre 5% de les lesions malignes són tumors amb altres línies de diferenciació: **carcinoma neuroendocrí de cèl.lula petita, carcinoma adenoide cístic, carcinoma de cèl.lules escamoses, carcinoma urotelial i carcinoma sarcomatoide** ⁽²⁶⁾.

1.3.2. Classificació, grau histològic i altres factors pronòstic del càncer de pròstata

La major part dels tumors de la pròstata són adenocarcinomes de la varietat anomenada acinar o convencional, que reproduïx els elements glandulars secretors. L'adenocarcinoma acinar, que és l'objecte del nostre estudi, es caracteritza per glàndules més o menys ben estructurades, augmentades en nombre, que estan infiltrant l'estroma prostàtic i han perdut la relació amb aquest, ja que els manca la capa de cèl.lules basals que tenen les glàndules normals. 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 ^(36,37). En aquest sistema, la classificació es basa en el grau de diferenciació glandular i el patró de creixement tumoral. Al llarg dels anys els patrons descrits per Donald F. Gleason el 1966 s'han anat ajustant per tal de millorar la reproductibilitat i el valor pronòstic i adaptar-los als canvis que suposa la utilització de la biòpsia amb agulla.

Es discriminen 5 patrons: 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 canvi en els successius patrons de Gleason les glàndules es van separant per la infiltració de l'estroma o bé es van fusionant, és a dir, es va perdent la capacitat de diferenciació glandular, i els marges del tumor estan menys definits. 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 en ben diferenciats (sumatoris

entre 2 i 6), moderadament diferenciats (sumatori = 7) i mal diferenciats (valors entre 8 i 10) [Figura 4].

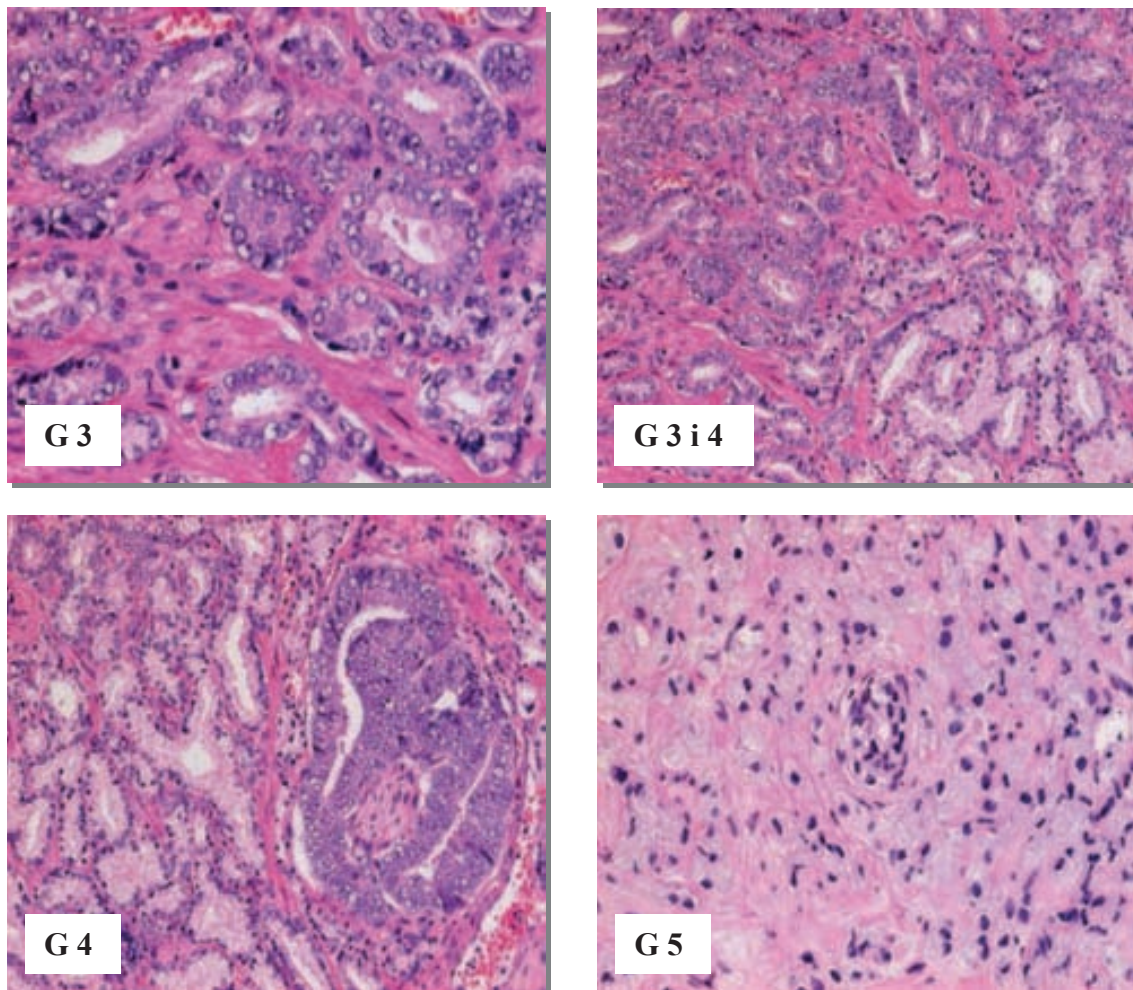


Figura 4. Imatge histològica dels patrons de Gleason més freqüents

El sistema de gradació de Gleason ⁽³⁷⁾ 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, i per això és el sistema que s'utilitza també en els algorismes de decisió terapèutica ⁽³⁸⁾.

Avui en dia, alguns aspectes del sistema original de Gleason s'interpreten de manera diferent. Cap als anys 60, les prostatectomies radicals eren relativament poc freqüents, les pròstates no s'extreien senceres ni eren processades en la seva totalitat, ni tant extensament com actualment. Alguns aspectes relacionats amb les prostatectomies radicals, com la gradació de múltiples nòduls en la mateixa pròstata, o el fet de trobar un

patró terciari, no es contemplaven en el sistema de Gleason original. L'antic sistema de Gleason tampoc contemplava l'ús d'immunohistoquímica, que permet marcar les cèl·lules basals, ni tampoc definia com classificar variants de l'adenocarcinoma prostàtic descrites recentment. Finalment, quan Gleason va dissenyar el seu sistema, es va basar en mostres de resecció prostàtica, ja fos en fragments grans ("adenomectomia") o en mostres de resecció transuretral, però pràcticament no es feien biòpsies amb agulla, que són el principal mètode d'obtenció de mostres per al diagnòstic de càncer. Al llarg del temps, s'ha anat fent adaptacions del sistema a la situació de cada moment.

La més recent, ha estat feta per un grup de patòlegs urològics (*International Society of Urological Pathology*; ISUP) en una conferència consens a l'any 2005 ⁽³⁶⁾. Els principals criteris que van acordar i que han esdevingut estàndar es detallen tot seguit [Taula 1] i [Figura 5].

El **patró 1** de Gleason es caracteritza per glàndules uniformes, en masses circumscrites, ben diferenciades, petites i agrupades que no infiltren els teixits veïns. El patró 1 de Gleason és poc freqüent i es pot confondre amb la hiperplàsia adenomatosa atípica, lesió benigna amb una arquitectura i morfologia glandular similars, però amb capa basal conservada, si més no, en part. El **patró 2** de Gleason és similar al 1, però presenta acins més separats entre si, amb moderada variació de mida i forma, que no infiltren entre les glàndules normals. El **patró 3** de Gleason és el més freqüent de tots. És caracteritza per glàndules ovalades o arrodonides, netament separades entre si, que infiltren el parènquima prostàtic. Estan formades per cèl·lules amb nuclèol prominent i citoplasma sovint molt tenyit de pòrpora amb l'hematoxilina-eosina. Una altra varietat del patró 3 es caracteritza per masses cel·lulars de contorn ben arrodonit, amb espais glandulars regulars múltiples, patró anomenat cribiforme regular. El **patró 4** de Gleason es caracteritza per glàndules irregulars, fusionades entre si i mal formades, o be agregats cribiformes irregulars. Finalment, el **patró 5** de Gleason es caracteritza per la manca de llums glandulars ben definides, ja sigui per creixement de les cèl·lules tumorals en cordons o de manera individual, amb o sense morfologia en anell de segell, o be en forma de masses sòlides o cribiformes amb necrosi central.

Patró 1:

- Nòduls circumscrits, d'arrodonits a ovals, amb àcins o glàndules empaquetades però no fusionades i de mida mitja (més grans que patró 3)

Patró 2:

- Semblant a patró 1, agregats molt circumscrits, encara pot haver-hi mínima infiltració al voltant del nòdul del tumor, amb àcins més separats i menys uniformes que al patró 1

Patró 3:

- Glàndules netament separades, normalment més petites que les descrites al patró 1 ó 2. Infiltra entre els àcins prostàtics no neoplàstics i marcada variació en forma i mida
- Petits nòduls tumorals cribiformes de contorns rodons llisos, ben regulars

Patró 4:

- Fusió de glàndules
- Glàndules poc definides amb llums glandulars mal formades
- Glàndules cribiformes grans amb un contorn irregular
- Aspecte semblant al carcinoma de cèl.lules clares del ronyó (varietat "hipernefroide")

Patró 5:

- Essencialment no hi ha diferenciació glandular i les cèl.lules tumorals es disposen en cordons, agregats sòlids o de manera individual
- Comedocarcinoma: necrosis central en agregats papil.lars, cribiformes o sòlids

Taula 1. Modificacions del Sistema de Gleason (ISUP 2005) ⁽³⁶⁾

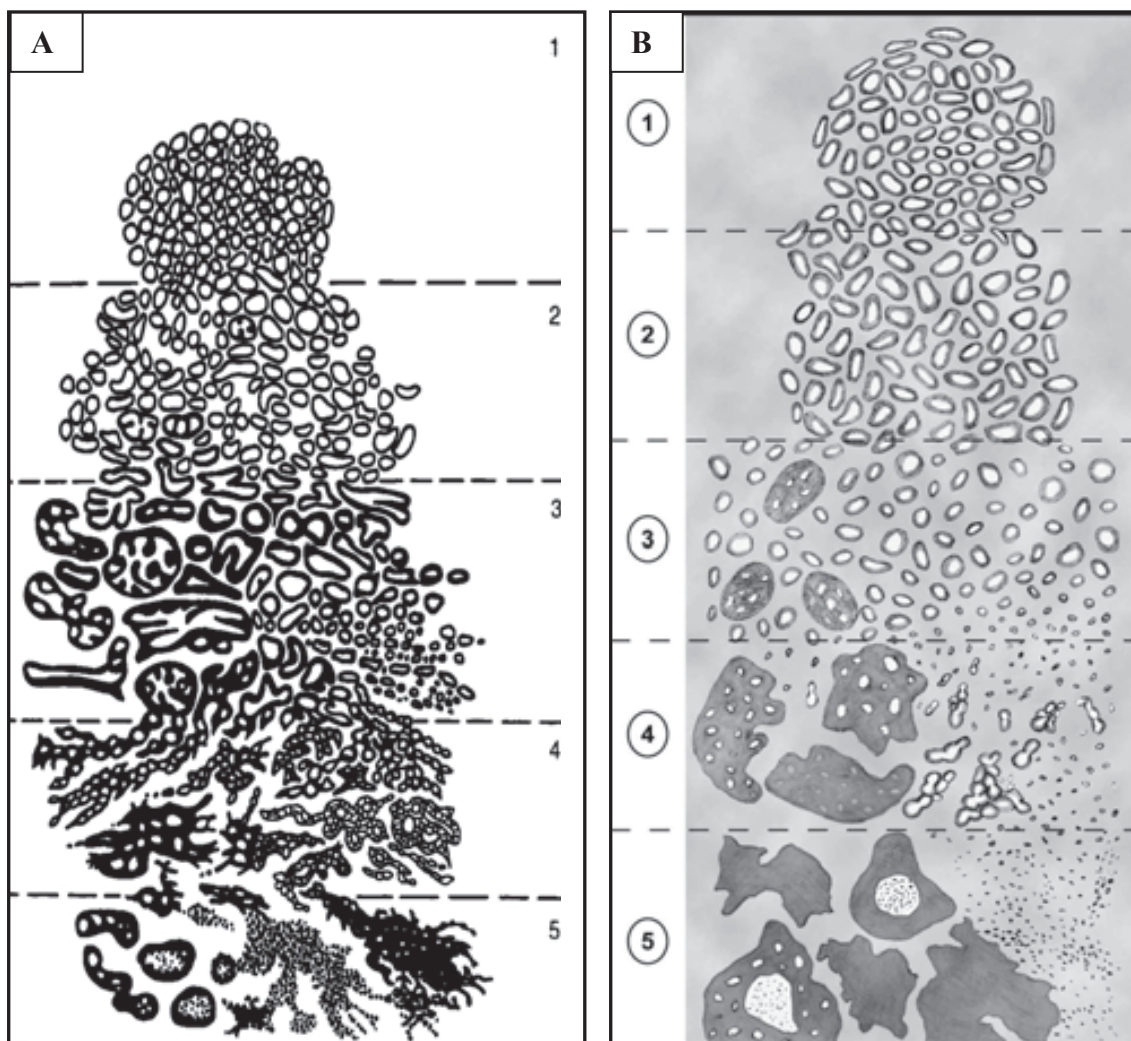


Figura 5. Diagrama esquemàtic del Sistema de Gleason original (A) i modificat per la ISUP l'any 2005 (B)

En el cas de les biòpsies d'agulla, es va acordar que, en un càncer de pròstata d'alt grau es pot ignorar un patró de baix grau si ocupa menys del 5% de l'àrea del tumor. En canvi, en cas contrari, si es detecta una àrea de tumor d'alt grau, per petita que sigui, s'ha d'incloure en el grau de Gleason. Així, s'ha d'informar del patró més abundant i el patró terciari en cas que sigui de més alt grau (es prescindeix llavors del patró secundari). En canvi, en les prostatectomies radicals, es continuaria assignant el Gleason segons els dos patrons principals i es faria un comentari apart del patró terciari. Així, per exemple, un cas amb abundant patró 4, una mica menys de 3 i una petita zona de 5 s'expressaria com $4+3 (+5) = 7 (+5 \text{ focal})$.

Tot i els canvis d'adaptació del Sistema de Gleason, i la moderada reproductibilitat interobservador que té, després de 40 anys és un dels predictors pronòstics més importants en càncer de pròstata.

Per tant, una acurada gradació del Gleason és un factor pronòstic crucial per decidir el tipus de tractament, com pot ser, prostatectomia radical, radiació o vigilància activa, ja que el grau de Gleason està associat amb l'agressivitat i pronòstic del càncer de pròstata ⁽³⁹⁾.

Per altra banda, també és molt important la classificació segons l'estadi del tumor, és el sistema TNM (tumor- nòdul- metastàsis), que inclou: la mida del tumor i el creixement local (T), l'extensió cap a nòduls o ganglis limfàtics metastàtics (N); i la presència de metastàsis (M). Els tumors es classifiquen segons la mida del tumor de T1 a T4; els nòduls de N0 a N3, i les metastàsis M0 o M1. A la **Taula 2** es mostra un esquema general de la classificació TNM ⁽⁴⁰⁾.

<p style="text-align: center;">Tumor primari (T)</p> <p>TX: El tumor no es pot avaluar</p> <p>T0: No hi ha evidència de tumor</p> <p>Tis: Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>T1,T2,T3,T4: Increment de volum i/o extensió local del tumor</p> <p style="text-align: center;">Ganglis limfàtics metastàtics (N)</p> <p>NX: El gangli no es pot avaluar</p> <p>N0: No hi ha evidència de gangli</p> <p>N1, N2, N3: Increment dels ganglis limfàtics</p> <p style="text-align: center;">Metàstasis a distància (M)</p> <p>MX: Presència de metàstasis no es pot avaluar</p> <p>M0: No hi ha metàstasis a distància</p> <p>M1: Presència de metàstasis a distància</p>

Taula 2. Classificació TNM en tumors de pròstata. Extret de Cowherd 2012 ⁽⁴⁰⁾

1.3.3. Mètodes de detecció clínica del càncer de pròstata

La pròstata és un òrgan que es troba relativament amagat i és més difícil d'explorar que altres, com la glàndula mamària o el còlon. Per la detecció clínica del

càncer de pròstata s'utilitzen habitualment dos procediments, el tacte rectal i la quantificació de les xifres de PSA en sèrum.

-Tacte rectal: Com que la major part dels CaP s'originen a la zona perifèrica i tenen una consistència augmentada respecte a la pròstata normal, clàssicament s'explorava la pròstata per palpació a través del recte. Tanmateix, aquesta tècnica detecta sobretot els tumors de la zona perifèrica posterior i se li solen escapar tumors d'altres localitzacions. Per això, i per l'aparició del PSA, el tacte rectal avui s'aplica més per determinar si existeix extensió extraprostàtica del tumor.

- Antigen prostàtic específic (PSA): La possibilitat de fer un test de sang per estudiar l'antigen prostàtic específic ha revolucionat el diagnòstic del càncer de pròstata des de fa 3 dècades. El PSA és una glicoproteïna de 237 aminoàcids produïda pràcticament de forma exclusiva en les cèl.lules epitelials prostàtiques, que és alliberada a la sang com a conseqüència d'una disrupció de l'arquitectura de la pròstata ⁽⁴¹⁾. La producció de PSA està sota control dels receptors d'andrògens. Es va establir que nivells de PSA més alts de 4ng/ml eren sospitosos de càncer de pròstata. El problema és que el PSA és òrgan específic més que tumor específic, i també pot estar elevat en altres situacions diferents de càncer, com la prostatitis o la HBP. Per això avui en dia, l'ús dels valors de PSA com a mètode de detecció precoç del càncer de pròstata és objecte d'una gran controvèrsia i s'ha vist a més que, amb aquest paràmetre es pot produir un sobrediagnòstic, i per tant, un sobretractament en molts casos ⁽⁴²⁾.

1.3.5. Varietats clínicopatològiques del càncer prostàtic

En funció del context clínic en el que es presenta o d'una sèrie de variables clíniques i patològiques es distingeixen diverses categories de càncer de pròstata:

- Carcinoma clínicament significatiu: Són la major part dels tumors tractats pels clínics. Aquests tumors es defineixen com a carcinomes detectats clínicament (per tacte rectal) amb grau de Gleason > 6 i/o volum > 0.5 cc i/o amb extensió extraprostàtica i/o metàstasis.

A més d'aquest tipus de càncer prostàtic convencional i amb repercussió clínica, s'han creat unes categories un tant arbitràries, que tenen però com a objectiu identificar subgrups de tumors prostàtics que podrien ser susceptibles de tractaments més conservadors. Així, s'han establert els termes:

- **Carcinoma clínicament insignificant:** 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, amb freqüència multifocals ^(16,43).

- **Carcinoma incidental:** Els casos de càncer de pròstata identificats de manera inesperada, en extreure la bufeta urinària i la pròstata (cistoprostatectomia radical) per un carcinoma urotelial (una varietat ben diferent del càncer prostàtic). En aquest subgrup, la incidència de carcinoma prostàtic és molt alta, al voltant del 50%. No es coneix si existeix alguna associació epidemiològica o patogenètica entre la carcinogènesi urotelial i prostàtica, però s'ha especulat sobre la possibilitat de que aquests casos incidentals podrien ser un reflex de la incidència real del càncer de pròstata en l'home adult ⁽⁴⁴⁾. Existeixen algunes similituds entre les neoplàsies urotelials papil·lars de baix grau de la bufeta urinària i els adenocarcinomes de pròstata: tots dos són tumors relativament indolents, de creixement lent, amb escassa activitat mitòtica, i ambdós poden progressar a varietats més agressives al incorporar noves alteracions genètiques.

- **Carcinoma latent:** Els casos de càncer de pròstata identificats de manera inesperada, en l'estudi autòptic de malalts que han mort per altres patologies. Alguns estudis d'autòpsia descriuen la presència d'adenocarcinoma prostàtic ocult o clínicament inaparent des de la cinquena dècada ⁽¹⁷⁾. Assumint la mitjana d'edat en la que sol presentar-se clínicament el carcinoma de pròstata, s'ha suggerit que existiria un període de latència d'una a tres dècades, des de les fases més inicials fins a la progressió del tumor. Per això, els carcinomes de pròstata que s'identifiquen en autòpsies de pacients que han mort per altres causes solen denominar-se carcinomes latents, i el seu estudi pot aportar informació relevant de la patogènia dels carcinomes de pròstata, de manera semblant als incidentals i sense les potencials implicacions moleculars d'una doble neoplàsia.

Aquests subgrups, segurament no corresponen a diferents tipus de tumor prostàtic, sinó a diferents períodes del seu desenvolupament, 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.

- **Tumors andrògen-independents (o castració independents):** Són el subgrup de tumors prostàtics que han progressat i s'han fet insensibles als mecanismes de regulació hormonal.

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.

1.3.6. Gens implicats en la carcinogènesi prostàtica

Els mecanismes moleculars del càncer de pròstata són poc coneguts i hi ha a la literatura una gran varietat de gens descrits com a implicats, molts d'ells amb una distribució molt heterogènia entre uns casos i uns altres. En comparació amb altres tipus de tumor, el càncer de pròstata és més difícil d'estudiar des del punt de vista molecular i d'establir una correlació amb la seva morfologia i clínica. Això es deu principalment a que és un tumor tant difícil d'explorar com d'obtenir-ne mostres i existeix, en molts casos, la dificultat de reconèixer macroscòpicament el teixit tumoral. Moltes mostres tumorals estan contaminades amb teixit normal. Per això, el nombre d'articles sobre aquest tipus de tumor és molt inferior al de tumors de prevalença similar, com el càncer de mama o còlon. Fent una cerca de PubMed, sobre càncer de pròstata, a data de 30 de gener de 2012, hi ha un total de 113.582, comparat amb 303.431 per càncer de mama, i 257.053 per còlon.

Tot i que el càncer de pròstata és una malaltia que es dona en homes d'avançada edat, alguns estudis demostren que homes sans d'entre 20 i 40 anys, ja poden presentar petits focus histològics de càncer de pròstata. Això suggereix que la formació d'aquest càncer pot començar en homes joves ⁽⁴¹⁾.

El càncer de pròstata és, molt sovint, multifocal i el procés de carcinogènesi dona lloc a 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. L'expressió de diversos oncogens serà necessària per la transformació cel·lular, a més de la inactivació de gens supressors. En estadis latents o lesions premalignes com la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN), només s'hauria produït una part dels passos necessaris per arribar al fenotip maligne pròpiament dit i, per tant, no progressarà cap a càncer clínicament detectable si no s'afegeixen altres alteracions. Aquesta idea queda reforçada pel fet que en pacients amb múltiples mutacions s'incrementa la probabilitat de desenvolupar neoplàsies ^(41,45).

Diferents estudis que analitzen patrons d'expressió utilitzant l'Oncomine (recurs bioinformàtic que cataloga i analitza els estudis de microarrays) (<http://www.oncomine.org>) i el Molecular Concept Map (MCM) (sistema que analitza les relacions entre conceptes moleculars, o gens biològicament relacionats) demostren que el PIN d'alt grau i el càncer de pròstata presenten gran similitud en l'expressió gènica. Es dona una diferència gènica més gran entre l'epiteli benigne de pròstata i el PIN (13.4% de les característiques mesurades), o entre el càncer de pròstata localitzat i la metàstasi (15.7%), que entre el PIN i el càncer de pròstata (1.2%) ⁽⁴⁶⁾. El procés més important que distingeix el PIN de l'epiteli benigne és un augment en la biosíntesi de proteïnes, probablement a través dels gens *ETS*. Igualment, el càncer de pròstata també presenta una elevada biosíntesi de proteïnes, i per tant una sobreexpressió dels gens *ETS*. En canvi, el que diferencia el càncer de pròstata localitzat de la metàstasi és l'augment de proliferació [Figura 6] .

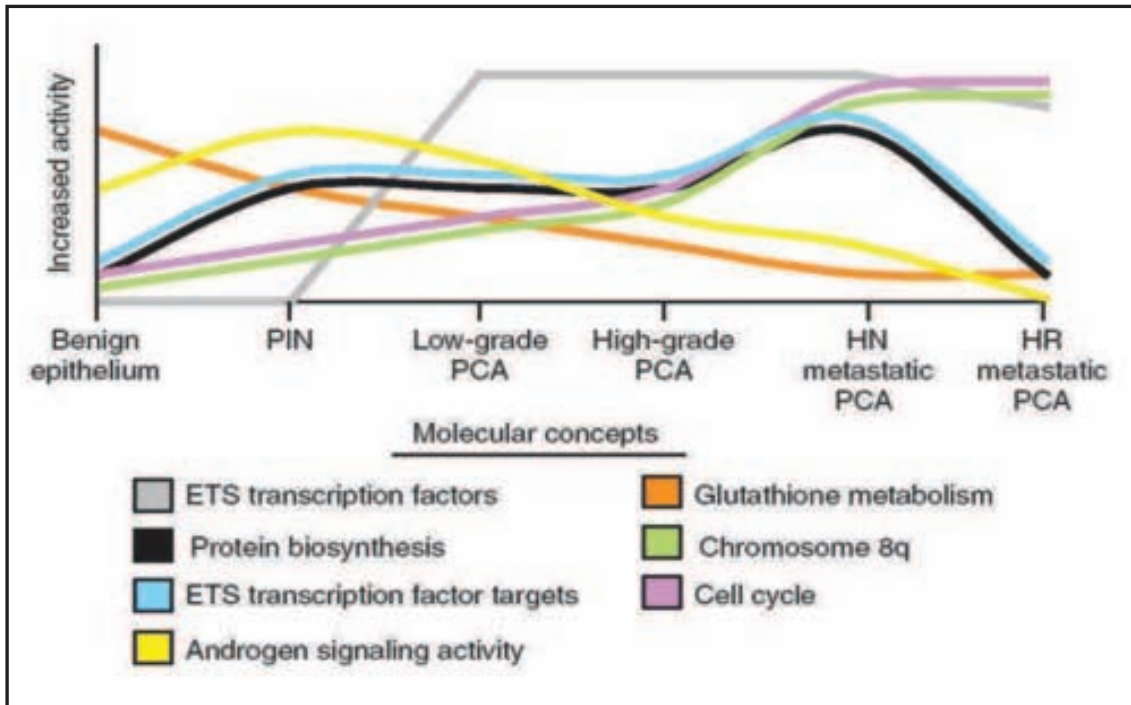


Figura 6. Model de conceptes moleculars de la progressió del càncer de pròstata. Extret de Tomlins i cols. 2007 ⁽⁴⁶⁾

La majoria d'alteracions descrites en el càncer de pròstata són mutacions somàtiques, amplificacions i delecions. Alguns dels gens descrits a la literatura ⁽⁴⁷⁾ com a alterats són: *PTEN*, *ATBF1*, *NKX3.1*, *KLF6*, *TP53*, *CDKN1B*, *AMACR*, *GSTP1*, *c-MYC* i *k-RAS*, entre d'altres. No s'ha identificat, però, cap gen en concret que tingui una rellevància clau, ja que pocs càncers de pròstata comparteixen totes o diverses alteracions ^(45,48).

1.3.6.1. Vies de senyalització intracel.lular dependents de receptors tirosina-quinasa (RTKs): FGFRs i EGFR

Els receptors tirosina-quinasa són una gran família de receptors, activats per la unió del lligand al seu domini extracel.lular, que indueix dimerització i activació del domini quinasa intracel.lular. Els receptors tirosina-quinasa tenen característiques comunes, com són: motius similars en el domini extracel.lular, homologia en el domini quinasa i activació de les mateixes proteïnes d'ancoratge i vies de senyalització ^(49,50). Múltiples respostes cel.lulars poden ser induïdes per l'activació d'aquests receptors, per

exemple, migració cel.lular, proliferació, supervivència o diferenciació. L'especificitat de l'efecte depèn del tipus cel.lular, de l'estat de diferenciació i del seu entorn ⁽⁵¹⁾.

Els factors de creixement tenen un paper crucial en el desenvolupament i la diferenciació cel.lular. Dintre d'aquests, els **factors de creixement de fibroblasts (FGFs)** constitueixen una família de com a mínim nou membres, els quals comparteixen una homologia del 30 al 70% en la seqüència primària d'aminoàcids.

Els FGFs participen en una gran varietat de respostes cel.lulars durant el desenvolupament embrionari i a l'organisme adult. En l'embriogènesi, els FGFs tenen un paper important en la morfogènesi, mitjançant la regulació de la proliferació cel.lular, diferenciació i migració cel.lular. A l'organisme adult, els FGFs són importants en el control del sistema nerviós, la reparació de teixits, la cicatrització de ferides i en l'angiogènesi ⁽⁵²⁾. Els FGFs poden ser causants d'una gran varietat de malalties. És ben conegut que les modificacions patològiques en l'expressió de FGFs donen lloc a l'aplàsia de la glàndula salival i al raquitisme hipofosfatèmic autosòmic dominant, mentre que mutacions en els receptors de *FGFs* donen una àmplia gamma de displàsies òssies. Les alteracions en la senyalització de FGFs es troben també associades amb la disrupció de l'homeòstasi de teixits; factor que contribueix al desenvolupament i progressió del càncer ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Per exemple, FGF1, 2, 6, 8 i 17 estan sobreexpressats en càncer de pròstata ⁽⁵⁶⁻⁶¹⁾. A més, l'expressió de FGF6 s'ha vist incrementada també en neoplàsia intraepitelial prostàtica ^(60,62).

Alteracions en els reguladors de la senyalització dels FGFs també afecten a la tumorigènesi ⁽⁶³⁾. La via de senyalització dels FGFs té un paper important en la biologia de la pròstata a través de les interaccions estroma-epiteli ⁽⁶⁴⁾.

Els efectes biològics dels FGFs es produeixen com a resultat de la transmissió de senyals intracel.lulars iniciada per la unió dels FGFs als receptors dels factors de creixement de fibroblastes (FGFRs). L'enllaç dels FGFs al receptor condueix a la seva dimerització, fet que sembla necessari per a l'activació del domini amb activitat intrínseca tirosina-quinasa i indueix la transfosforil.lació dels monòmers del receptor. Els llocs de fosforil.lació en tirosina serveixen com a punt d'ancoratge per la seva unió d'alta afinitat a diversos substractes cel.lulars amb dominis SH₂. Aquests dominis estan

presentes a molècules clau per a la senyalització post-receptor, com és la fosfolipasa C gamma-1 (PLC γ -1) i diverses molècules adaptadores com el FRS2, CrK, NcK i Grb2. Aquestes molècules s'enllacen per transmetre senyals a partir del receptor, generant una cascada de processos de fosforilació a través de diverses rutes com la de les MAPK. L'activitat de com a mínim tres factors de transcripció, com són AP-1, NF- κ B i STATS, és regulada per la via de les MAPK ⁽⁶⁵⁾. L'activitat d'AP-1 pot ser estimulada per diverses senyals extracel.lulars, que inclouen citoquines i factors de creixement, i és determinant en la inducció d'activació de gens de citoquines i de metal·loproteïnases. El resultat final de la senyalització coordinada és la transcripció de gens i la conseqüent resposta biològica ^(66,67).

El gran nombre de possibles lligands, les isoformes de *splicing* i la modulació de senyal per la matriu extracel.lular i/o altres receptors cel.lulars, genera un gran nivell de diversitat i múltiples possibles vies de control de l'activació dels **FGFRs** que, probablement, incrementen la diversitat en els efectes cel.lulars ⁽⁵¹⁾.

En aquest sentit, les mutacions trobades als gens *FGFRs* són de guany de funció. Les que es troben al domini catalític incrementen l'activitat tirosina quinasa independentment de lligand. Les que es troben als dominis transmembrana o extracel.lular de FGFRs activen els receptors mutants promovent la dimerització del receptor, independent de lligand, o alterant l'especificitat de la unió lligand-receptor ⁽⁵²⁾.

S'han descrit 4 variants del FGFRs denominats FGFR de l'1 al 4, amb una estructura general comuna caracteritzada per tenir un domini catalític tirosina-quinasa ^(65,66,68).

El transcrit de **FGFR3** conté 19 exons i la proteïna abarca de l'exó 2 al 18. Degut a l'*splicing* alternatiu existeixen dues isoformes que difereixen en la especificitat de l'unió a lligand. FGFR3c és la isoforma expressada en condrocits i FGFR3b s'expressa en cèl.lules epitelials **[Figura 7]**.

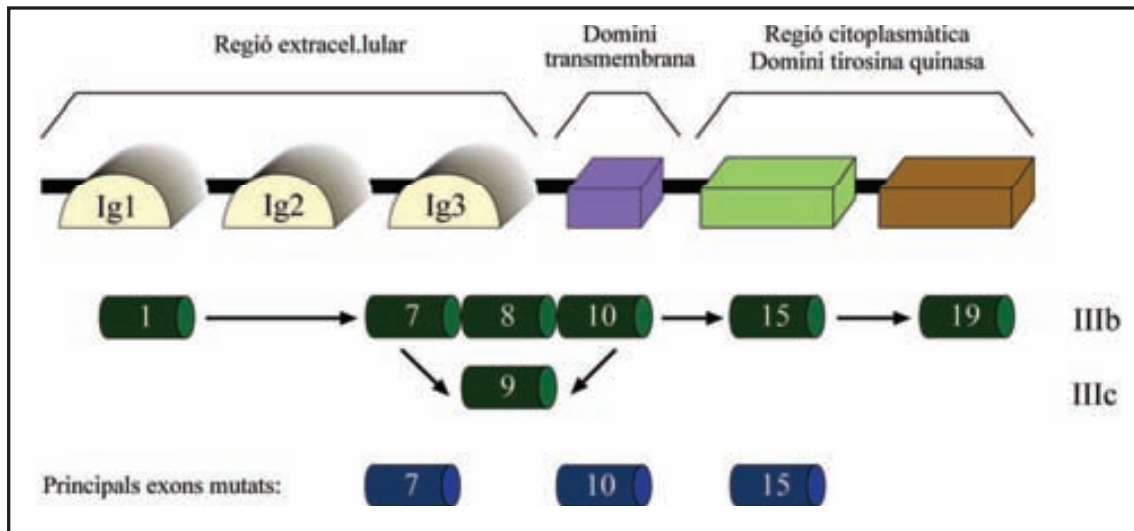


Figura 7. Esquema de l'estructura del gen *FGFR3*, la seva proteïna i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites. La isoforma *FGFR3b* del gen conté l'exó 8 i la isoforma *FGFR3c* l'exó 9

A la família dels FGFRs, l'arquetip és FGFR1 i la seva senyalització s'ha estudiat amb detall, sobretot la via RAS-MAPK. FGFR1 i FGFR3 tenen una forta homologia i això ha permès conèixer els mecanismes de senyalització de FGFR3. La dimerització del receptor comporta l'autofosforilació del receptor en els residus de tirosina, molt conservats entre els FGFRs. FGFR1 té 7 llocs d'autofosforilació, i 5 d'aquests es conserven en FGFR3 ⁽⁵¹⁾.

S'han identificat diferents vies activades per FGFR3. Les vies d'ERK1/2, p38 MAPK, i STAT (especialment STAT1) semblen ser les vies més importants en el creixement de l'esquelet; mentres que les vies RAS/MAPK, PLC- γ , i PI3K/AKT s'han vist implicades en càncer [Figura 8] ⁽⁶⁹⁾.

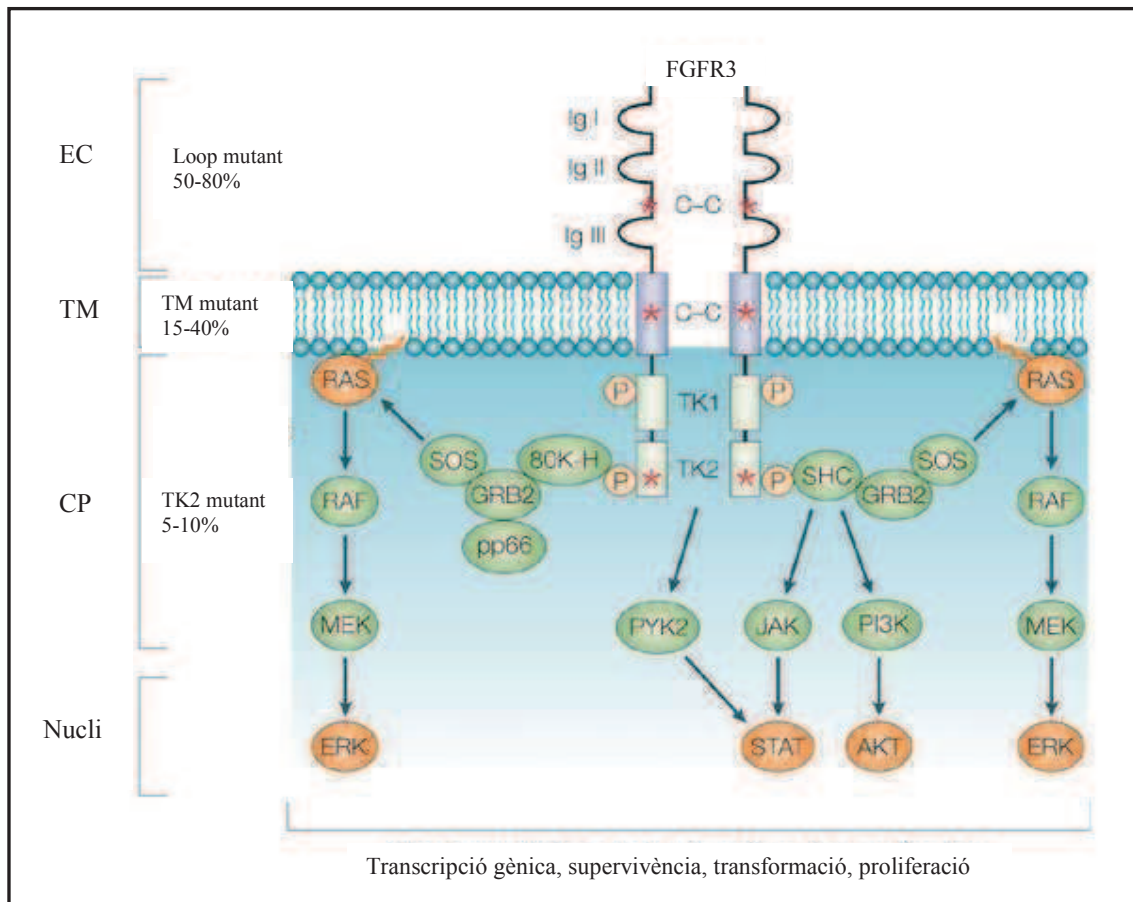


Figura 8. Via de senyalització que dona lloc a l'activació de FGFR3. Extret de Wu i cols. 2005 ⁽⁷⁰⁾

- FGFR3 en càncer.

Moltes displàsies severes òssies s'han relacionat amb mutacions puntuals en 3 membres de la família dels *FGFR* (*FGFR1*, *FGFR2* i *FGFR3*). Mutacions de *FGFR3*, idèntiques a les descrites en l'acondroplasia (ACH), la hipocondroplasia (HCH), i la displasia tanatofòrica (TDI i TDII) ⁽⁷¹⁻⁷³⁾, s'han descrit també com a mutacions somàtiques, bàsicament en càncer de bufeta i tumors benignes de pell, encara que també en mieloma múltiple i càncer de cèrvix ⁽⁷⁴⁻⁸⁰⁾

En càncer de bufeta i tumors benignes de pell és on s'han descrit les freqüències de mutacions més elevades, associades principalment a tumors de baix grau i estadi. En carcinoma cervical ⁽⁷⁵⁾, mieloma múltiple ⁽⁸¹⁾, carcinoma oral de cèl.lula escamosa ⁽⁸²⁾ i carcinoma colorectal ⁽⁸³⁾ també s'han descrit mutacions però en baixa freqüència. No

s'han trobat mutacions en pulmó, estómac, cervell o tumors renals; fet que indica que les mutacions de *FGFR3* podrien ser específiques de determinats tumors ⁽⁸⁴⁾.

Les mutacions de *FGFR3* en càncer de bufeta representen una de les alteracions oncogèniques més freqüents d'una proteïna quinasa en tumors sòlids. S'han descrit mutacions somàtiques de *FGFR3* en un 60-70% dels càncers de bufeta papil·lars i en un 16-20% dels carcinomes múscul-invasius. La majoria de mutacions activants, afecten el *loop* que connecta la immunoglobulina II i III, i es donen principalment als exons 7 (codons 248 i 249), 10 (codons 372, 373, 375, 383 i 393) i 15 (codó 652). Els canvis donen lloc a una cisteïna no aparellada, provocant dimerització lligand-independent del receptor i diferents graus d'activació constitutiva ⁽⁸⁵⁾ [Figura 9] .

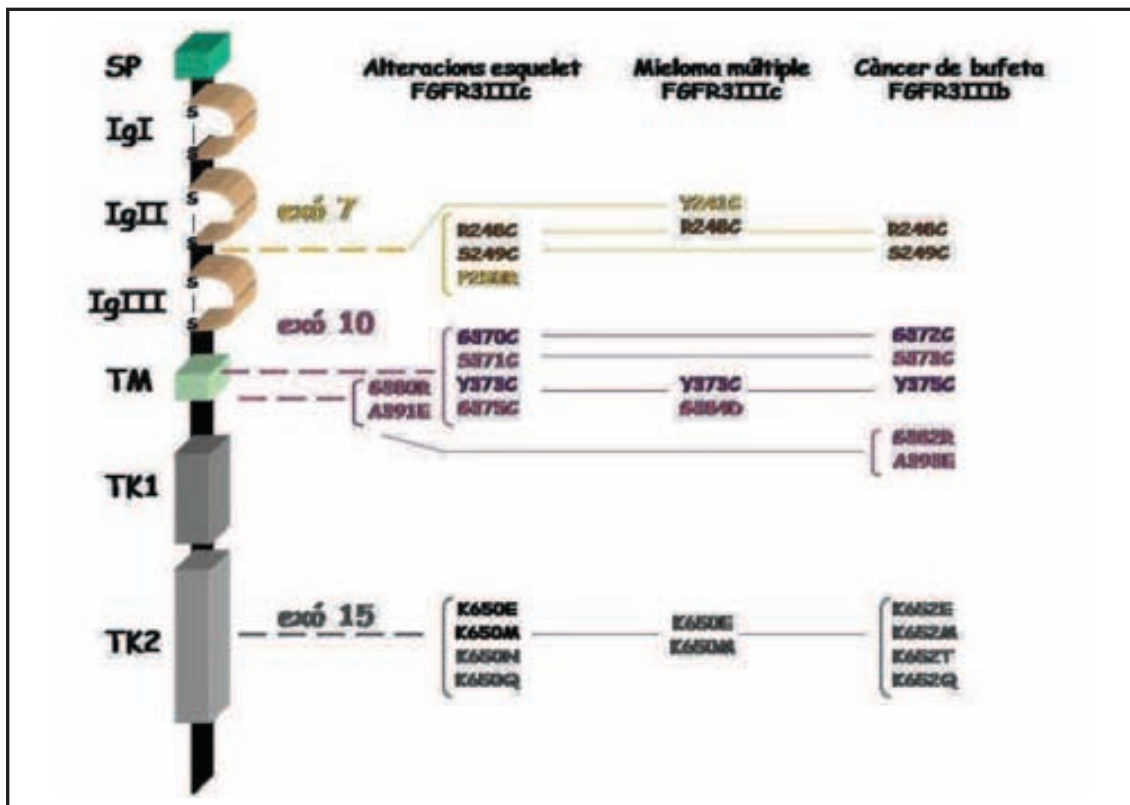


Figura 9. Principals mutacions del gen *FGFR3* descrites en alteracions de l'esquelet, mieloma múltiple i càncer de bufeta (en negreta trobem els codons més freqüentment mutats)

S'han descrit fins a 11 tipus de mutacions diferents. La **Figura 10** mostra els percentatges i localitzacions de les diferents mutacions descrites en càncer de bufeta ⁽⁸⁶⁾ (www.sanger.ac.uk, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). La mutació que

provoca un canvi d'arginina per cisteïna al codó 249 (S249C) és la més freqüent (70%) descrita en aquest tipus de càncer, seguida de la Y375C, amb canvi de tirosina per cisteïna (22%).

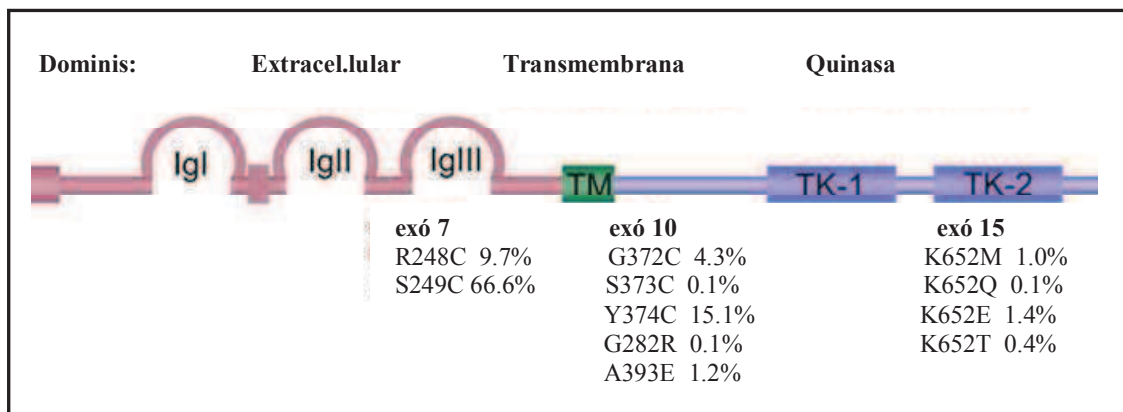


Figura 10. Freqüència i localització de les mutacions de *FGFR3* en càncer de bufeta. Extret de Knowles i cols. 2007 ⁽⁸⁶⁾

En tumors benignes de pell s'ha descrit una prevalença del 18-57% en queratosis seborreïques i fins al 86% en queratosis seborreïques de tipus adenoide. La mutació més freqüent en aquest tipus de tumors és la R248C (arginina per cisteïna) ⁽⁸⁷⁻⁹¹⁾.

En càncer de cèrvix s'han trobat percentatges baixos de mutacions de *FGFR3* (entre 0 i 25%) ^(75,80,92-95), el que suggereix que les mutacions d'aquest gen no representen una alteració oncogènica freqüent en aquest tipus de tumors. El canvi S249C és la única mutació descrita. Cappellen i cols ⁽⁷⁵⁾ van estudiar només 12 tumors cervicals, i van trobar un percentatge elevat de mutacions (25%). Posteriorment van ampliar el nombre de casos analitzats, i varen obtenir només un 5% de casos mutats, percentatge similar al descrit per Wu i cols ⁽⁹⁴⁾.

En mieloma múltiple, s'han descrit translocacions cromosòmiques t(4:14), que afecten a l'expressió de *FGFR3*. Al contrari que en tumors epitelials, aquestes mutacions estan associades amb més progressió del tumor ⁽⁹⁶⁾.

- **FGFR3 en càncer de pròstata.**

En tumors de pròstata, es dona una expressió diferencial dels FGFRs. La sobreexpressió de FGFR1 i/o FGFR2 en càncer de pròstata s'ha descrit a diferents articles, tot i que no s'han relacionat estadísticament amb paràmetres clínics ^(57,61,97). També s'ha descrit una forta associació entre alt grau de Gleason i augment de FGFR4 ⁽⁹⁸⁾.

L'expressió de proteïna de tots quatre receptors es troba quasi exclusivament en el citoplasma de les cèl·lules epitelials basals i luminals, amb senyals dèbils ocasionalment a l'estroma. La sobreexpressió de la proteïna FGFR1 és freqüent tant en càncers de pròstata inicials com en més avançats. Els nivells de FGFR2 són baixos en teixit de pròstata normal, en canvi hi ha un increment en càncer, tot i que no està relacionat amb el grau, l'estadi o la metastàsis. Els nivells d'expressió de FGFR3 són heterogenis amb senyals citoplasmàtiques i nuclears similars en epitelis prostàtics benignes i malignes. Tampoc es troba associació amb el grau, l'estadi o la metastàsis. Finalment, FGFR4 es troba augmentat en càncer respecte al teixit normal de pròstata i s'ha vist una associació significativa amb els tumors d'alt grau ^(59,61).

Tot i que s'ha observat que la senyalització anòmala de FGFs està involucrada en la tumorigènesi prostàtica no es coneixen ni el paper funcional de FGFR3, ni les seves alteracions en càncer de pròstata.

En càncer de pròstata, només s'han publicat cinc estudis de l'estat mutacional de *FGFR3* ^(80,99-102). Nosaltres vam descriure per primer cop la presència de mutacions de *FGFR3* en càncer de pròstata i la vam identificar en un 8% dels casos. Els altres treballs no van trobar mutacions.

Relació entre mutacions de *FGFR3* i altres alteracions moleculars:

- ***FGFR3* i *TP53***: Les mutacions de *FGFR3* i de *TP53* en tumors urotelials són independents, però no excloents. Hi ha una forta associació entre les mutacions de *FGFR3* i els tumors de bufeta de baix grau, mentre que les mutacions inactivants de *TP53*, i amb acumulació anormal de proteïna p53, es troben associades amb carcinomes urotelials agressius i és poc freqüent trobar-les en malalties de baix grau o estadi ⁽⁷⁷⁾. Alguns estudis han trobat un nombre petit de tumors que presenten, simultàniament

mutacions de *FGFR3* i de *TP53* ^(77,103,104), però no s'ha trobat associació entre aquests casos amb ambdós gens mutats i el grau o l'estadi. Podria ser que els casos amb mutacions als dos gens pertanyin a un subgrup de tumors amb un patró de desenvolupament diferent, o podrien reflectir una poc freqüent progressió de tumors urotelials de baix grau amb mutacions de *FGFR3*.

- ***FGFR3* i *RAS***: Les mutacions de *FGFR3*, de la mateixa manera que les del gen *RAS*, són potencialment activadores de la via RAS-MAPK [Figura 8]. En aquest sentit, diferents estudis descriuen que les mutacions de *FGFR3* i *RAS* són mútuament excloents en tumors urotelials ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁹⁾. En total, un 85% dels carcinomes urotelials de baix grau i estadi Ta tenen mutacions en un o l'altre gen, suggerint que l'activació de la via de MAPK podria ser un procés necessari en la majoria de tumors ⁽⁸⁶⁾. Les mutacions de *RAS*, però, no estan associades al grau o l'estadi dels tumors urotelials. Molt recentment, un treball del nostre grup descriu la manca d'associació de les mutacions de *FGFR3* amb l'expressió proteica de pERK1/2, el que indica, per tant, que no activarien la via de MAPK (article en premsa).

- ***FGFR3*, *PIK3CA* i *PTEN***: Les mutacions de *PIK3CA* s'han identificat en un 20% de tumors urotelials superficials i s'ha vist una associació entre mutacions de *FGFR3* i *PIK3CA* ^(110,111). Per altra banda, en tumors urotelials d'alt grau i estadi, es troba pèrdua d'heterozigositat (LOH) i deleció homozigòtica de *PTEN*. Com que *PTEN* és un regulador negatiu d'Akt i per tant, de la via PI3K, es creu que la inactivació de *PTEN* i l'activació de *PIK3CA* poden tenir el mateix paper, i en alguns tipus de tumors, són dues alteracions mútuament excloents ^(112,113).

La família dels **receptors dels factors de creixement epidèrmic (EGFR o ErbB)** activa una complexa cascada de transducció de senyals que modula la proliferació cel.lular, supervivència, adhesió, migració i diferenciació. Hi ha quatre receptors diferents: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 i HER4/ErbB-4. L'activitat tirosina quinasa de transducció de senyal d'EGFR i els altres receptors està inactiva quan aquests es troben aïllats. Els principals lligands naturals d'EGFR són el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor α de creixement transformant (TGF- α), l'heparina binding EGF (HB-EGF), l'amfiregulina i la betacel.lulina ⁽¹¹⁴⁾, que activen el receptor unint-se al domini extracel.lular i induïnt la formació de receptors homodímers

o heterodímers. Els residus de tirosina d'un receptor són fosforilats per l'altre membre del receptor i formen llocs d'ancoratge per complexes de senyalització, formats per enzims citoplasmàtics i proteïnes adaptadores. La subseqüent dissociació d'aquests complexos de senyalització allibera efectors i proteïnes adaptadores activades en el citoplasma, on estimulen diferents cascades de transducció de senyals, com són la via de les MAPK, fosfoinositol quinasa, la quinasa antiapoptòtica AKT i altres reguladors transcripcionals [Figura 11] ^(115,116). Finalment, la senyal d'EGFR és inactivada principalment per endocitosis del complex receptor-ligand.

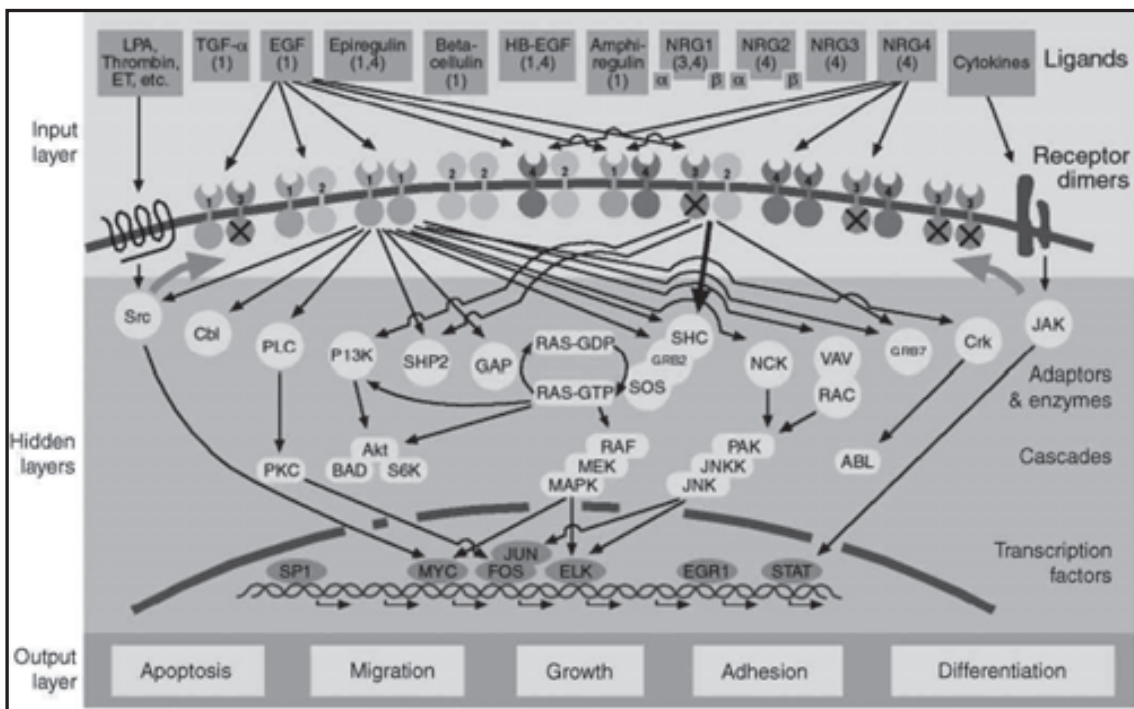


Figura 11. Diferents vies de senyalització d'EGFR. Els 4 receptors d'EGFR poden formar fins a 10 homo/heterodímers activats per diferents lligands. Extret de Yarden 2001 ⁽¹¹⁶⁾

El gen *EGFR* es troba al cromosoma 7p12-13 i codifica per a un receptor tirosina quinasa de 170 kDa. Totes les proteïnes ERBB tenen 4 dominis funcionals: un domini extracel·lular d'unió a lligand, un domini transmembrana, un domini intracel·lular tirosina quinasa i un domini regulador C-terminal. El domini extracel·lular està, a la vegada, dividit en 4 dominis. El domini tirosina quinasa està format per un lòbul N i un lòbul C; i l'ATP s'uneix a l'esquerra que es forma entre aquests dos lòbuls ⁽¹¹⁷⁾ [Figura 12].

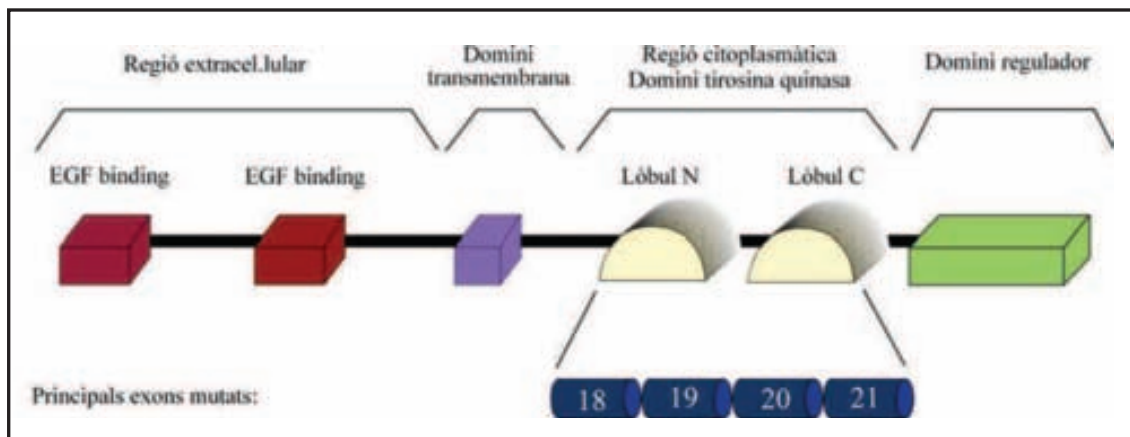


Figura 12. Esquema de l'estructura del gen *EGFR* i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites

Les proteïnes ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4 i els factors de creixement de la família EGF formen un sistema integrat on la senyal provocada per un receptor de forma individual, normalment es transmet a altres receptors de la mateixa família. Aquest mecanisme provoca amplificació i diversificació de la senyal inicial; factor important per la transformació cel·lular ⁽¹¹⁸⁾.

- EGFR en càncer.

Diferents famílies de factors de creixement i els seus receptors s'han vist involucrades en el creixement de cèl·lules cancerígenes. De tots ells, EGFR i la família dels EGF tenen un paper central en la patogènia i progressió de diferents tipus de carcinomes ⁽¹¹⁸⁾. EGFR es troba alterat en càncer humà mitjançant diferents mecanismes: mutacions somàtiques, sobreexpressió proteïca, amplificació gènica i alteracions genètiques estructurals (cromosòmiques).

En càncer de pulmó és on s'ha descrit la prevalença més elevada de mutacions, en baixa freqüència en càncer de pròstata i colorectal, i de manera molt poc freqüent, també s'ha descrit en càncer de cap i coll, pàncreas, esòfag i mama, entre d'altres ⁽¹¹⁹⁻¹²⁶⁾. Les principals mutacions descrites d'*EGFR* es troben localitzades en els quatre exons que comprenen el domini quinasa del receptor (de l'exó 18 al 21). El 90% de les mutacions d'*EGFR* són petites delecions que abasten els cinc aminoàcids dels codons 746-750 (ELREA) a l'exó 19, o mutacions *missense* que donen substitució de leucina

per arginina al codó 858 (L858R), a l'exó 21. Un 3% de les mutacions es donen al codó 719, amb substitució de glicina per cisteína, alanina o serina (G719X). A més, un 3% són mutacions amb inserció *in-frame* a l'exó 20. Aquests quatre tipus de mutacions rarament ocorren de forma simultània (www.sanger.ac.uk)⁽¹²⁷⁾.

Múltiples estudis han descrit sobreexpressió d'EGFR respecte al teixit normal en uns 10 tipus de càncer diferents. Els seus resultats permeten concloure que hi ha una relació entre la sobreexpressió d'EGFR i el pronòstic del tumor, particularment en càncer de cap i coll, ovàric, cervical⁽¹²⁸⁾, de bufeta^(129,130) i esofàgic. També hi ha evidència de relació entre sobreexpressió d'EGFR i càncer gàstric, colorectal, de mama i d'endometri^(131,132).

A més, s'han descrit amplifícacions gèniques, així com alteracions genètiques estructurals en diferents tipus de tumors, com són càncer de pulmó de cèl.lula no petita (NSCLC), glioblastoma, càncer de pàncreas, i càncer de cap i coll de cèl.lules escatoses. En càncer de pulmó s'ha detectat més amplifícació d'*EGFR* en tumors metastàsics que en tumors primaris⁽¹³³⁾. L'estudi d'amplifícacions per FISH ha esdevingut important per seleccionar pacients que responguin a les teràpies dirigides⁽¹³⁴⁾. En carcinomes colorectals, en canvi, no s'ha trobat relació entre els resultats de FISH i les característiques clínico-patològiques, però sí entre amplifícació d'*EGFR* i sobreexpressió de proteïna EGFR a la membrana⁽¹³⁵⁾.

- EGFR en càncer de pròstata.

En el teixit prostàtic s'ha descrit, amb mètodes immunohistoquímics, que l'expressió de TGF- α es dona a l'estroma, mentre que l'expressió d'EGFR (el seu receptor) es dona bàsicament a l'epiteli. En canvi, en la majoria dels càncers de pròstata, tant EGFR com el seu lligand TGF- α es co-expressen⁽¹¹⁴⁾. S'ha descrit expressió creixent d'EGFR durant la història natural del càncer de pròstata, així com una associació amb factors de mal pronòstic, com són alt grau, estadi avançat i progressió a un estadi hormono-refractari. També s'han descrit mutacions puntuals en el domini tirosina quinasa, petites delecions i amplifícació d'*EGFR*, especialment en adenocarcinomes de pròstata avançats^(136,137). Les primeres mutacions descrites van ser la G796S i la G735S, que provoquen substitució de glicina per serina; la E804G, que canvia àcid glutàmic per glicina i la R841K, amb canvi d'arginina per lisina. Les

mutacions G735S, G796S i E804G transformen la quinasa mutada en constitutivament activa ⁽¹³⁸⁾. Per una altra banda, un estudi del grup de Schlomm i cols ⁽¹³⁹⁾ que analitzava mutacions somàtiques, amplificació i expressió proteica d'EGFR, no va trobar mutacions d'aquest gen en càncer de pròstata. També s'han descrit diferents polimorfismes ⁽¹³⁷⁾.

Existeix controvèrsia a la literatura al voltant de l'existència de sobreexpressió d'EGFR en càncer de pròstata. Alguns estudis descriuen que el càncer de pròstata està associat amb una disminució significativa de l'expressió d'EGFR ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾. En canvi, també s'ha descrit que hi ha relació entre l'expressió d'EGFR i la progressió tumoral ^(137,143,144), fets que suggereixen un patró d'expressió bimodal, amb més expressió en el teixit normal que en les fases inicials del càncer i un guany d'expressió en relació amb la progressió. També existeix disparitat de resultats sobre l'expressió d'EGFR després de la teràpia hormonal i sobre la seva relació amb el desenvolupament de l'estat andrògen independent del tumor ⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁸⁾.

L'expressió d'EGFR augmenta significativament amb el grau de Gleason i amb els nivells de PSA en plasma. També s'ha descrit un augment de l'expressió a pacients tractats únicament amb cirurgia radical i no exposats a hormonoteràpia (41.4%), pacients que han rebut hormonoteràpia com a primera línia de tractament, abans de prostatectomia radical (75.9%), i pacients amb metàstasis i càncer hormono-refractari (100%) ⁽¹⁴³⁾. Sembla, per tant, que l'expressió d'EGFR està relacionada amb el desenvolupament del càncer de pròstata, i específicament amb la progressió cap a càncer andrògen-independent. També s'ha descrit una associació entre sobreexpressió d'EGFR i la raça afroamericana, una subpoblació en la que el càncer de pròstata sol ser més agressiu ⁽¹⁴⁹⁾.

L'amplificació d'*EGFR* a nivell d'ADN no és un fenomen habitual en càncer de pròstata. Diferents estudis descriuen una prevalença del 1-3% de casos amb amplificació ^(147,150).

Teràpies inhibidores d'EGFR:

La via d'EGFR va ser identificada com a una diana potencial per teràpia anticancerígena a principis dels anys 80, i actualment hi ha múltiples fàrmacs dirigits a

aquesta diana ⁽¹⁵¹⁾. Hi ha dos tipus d'inhibidors de la família d'EGFR que han estat aprovats en fase III i ara tenen ús clínic en el tractament del càncer colorectal avançat, del carcinoma de cèl.lules escatoses de cap i coll, carcinoma de cèl.lules no petites de pulmó (NSCLC) avançat, càncer pancreàtic i càncer de mama. El primer tipus d'inhibidors el constitueixen petites molècules tirosina quinasa inhibidores (TKIs), que competeixen amb l'ATP en el domini tirosina quinasa del receptor, com Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva), o Lapatinib. El segon tipus està format per anticossos monoclonals (MoAbs) dirigits contra el domini extracel.lular d'EGFR o ERBB2, com Trastuzumab (Herceptin) i Cetuximab (Erbix), dirigits contra ErbB2 i EGFR, respectivament ^(152,153).

En el NSCLC, s'ha demostrat que la resposta clínic a aquests tipus d'agents és més freqüent en dones que en homes, en població japonesa que en individus europeus o d'EEUU, en pacients amb adenocarcinoma que en altres subtipus histològics de càncer, i en individus que no han fumats mai que en aquells amb història de fumadors ⁽¹⁵⁴⁾.

S'ha descrit que la majoria de pacients amb NSCLC que responen al tractament amb gefitinib o erlotinib tenien tumors amb mutacions somàtiques activants en el domini quinasa d'*EGFR*, principalment delecions a l'exó 19 i la mutació puntual L858R ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁸⁾. També s'ha vist, però, pacients que responen al tractament i no tenen mutacions d'*EGFR*. La presència de mutacions no seria, per tant, l'únic factor determinant de resposta als TKIs ^(125,155,157). També s'ha descrit que un elevat nombre de còpies del gen *EGFR* es relaciona amb millor resposta a la teràpia dirigida, tot i que hi ha una gran variabilitat degut a les diferents poblacions estudiades, diferències en el disseny de l'estudi i variabilitat en els mètodes dels diferents laboratoris ^(159,160).

L'Erlotinib va ser aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) al novembre del 2004, i per l'Agència Europea del Medicament al juny del 2005, com a teràpia de segona o tercera línia en pacients amb NSCLC avançat o metastàtic. El Gefitinib va ser inicialment aprovat per la FDA l'any 2003. Diferents assajos en fase III, però, no van trobar diferències en la supervivència ni en els símptomes dels pacients no pre-seleccionats, i es va limitar l'ús del Gefitinib als pacients que ja s'estaven beneficiant o s'havien beneficiat prèviament. Al juliol del 2009, l'Agència Europea del Medicament va concedir l'aprovació de l'ús de gefitinib en qualsevol línia de tractament

per a pacients amb NSCLC que tenien mutacions activants d'*EGFR*. L'aprovació de gefitinib es troba restringida encara a EEUU, però des de principis del 2011 aquest fàrmac té llicència en 66 països arreu del món ^(161,162).

Tot i els grans beneficis que pot aportar el tractament amb EGFR-TKIs en NSCLC associat amb mutacions d'*EGFR*, la majoria dels pacients acaben desenvolupant resistència a aquests fàrmacs. En un 50-70% dels tumors de pacients que desenvolupen resistència als EGFR-TKIs, aquesta es dona per l'aparició de la mutació secundària T790M, o per l'amplificació del gen *MET*. En un 30-50% dels pacients, el mecanisme de resistència a gefitinib no es coneix ^(157,161).

A més, la baixa tasa de resposta als inhibidors tirosina quinasa d'*EGFR*, i l'elevat cost del tractament, remarquen la necessitat d'identificar, a priori, un subgrup de pacients que es pugui beneficiar d'aquests agents. S'ha de veure si la selecció segons la presència de mutacions activants d'*EGFR* és suficient per assegurar un avantatge en la supervivència, o calen altres criteris ⁽¹⁶¹⁾. Així, per exemple, el Cetuximab és el primer anticòs monoclonal anti-EGFR aprovat als Estats Units contra el càncer colorectal. Només els pacients que no presenten mutacions en *KRAS* responen a aquest anticòs.

La major part de la informació sobre aquests fàrmacs, doncs, està en relació al càncer de pulmó i, fins al moment, no hi ha estudis clínics de la seva potencial aplicació en càncer de pròstata.

1.3.6.2. Via de transducció de senyal PI3K/PTEN-AKT

La via de PI3K-AKT s'ha descrit com una de les vies més sovint desregulades en el càncer humà, ja que la majoria dels seus components s'han trobat mutats o amplificats en un gran nombre i varietat de tumors ⁽¹⁶³⁾. Aquesta desregulació sol ser deguda principalment a la pèrdua del gen *PTEN*, o a l'activació constitutiva de PI3K o de la seva diana AKT ⁽¹⁶⁴⁾ **[Figura 13]**.

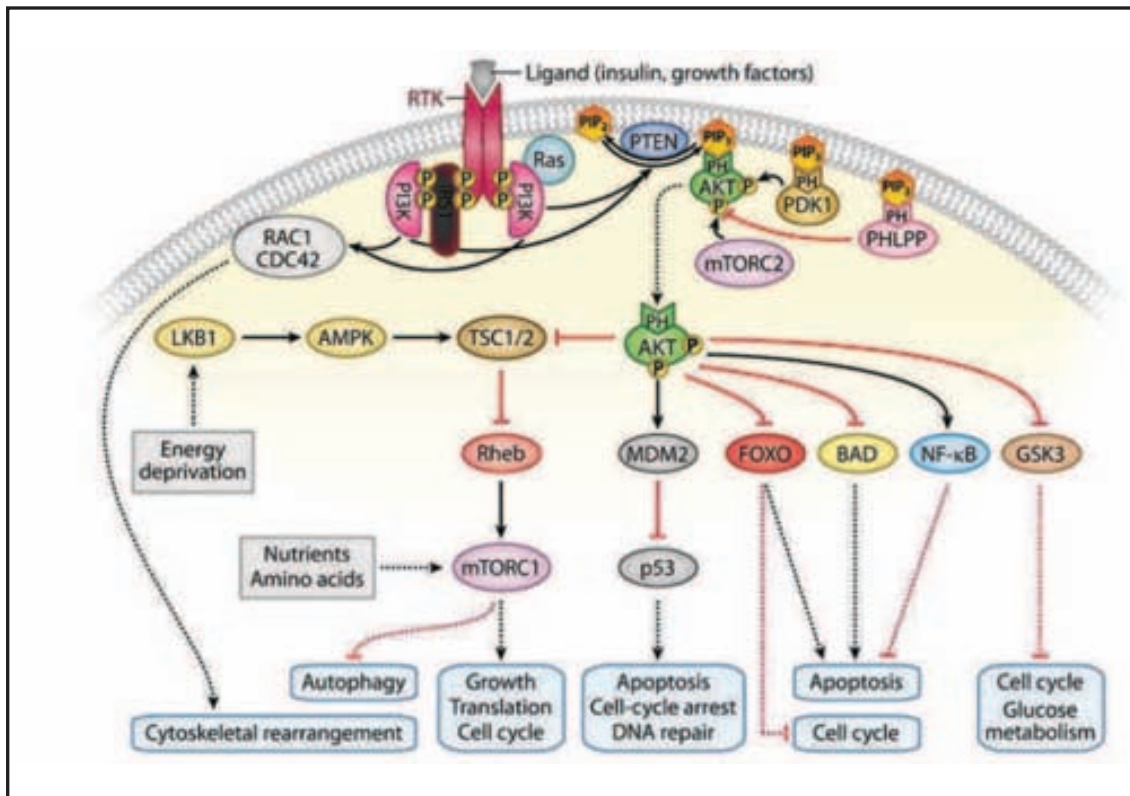


Figura 13. Via de senyalització de PI3K-AKT. Extret de Chalhoub i cols. 2009 (165)

Les fosfatidilinositol quinases (PI3Ks) són una família de proteïnes heterodimèriques, formada per tres classes, que es diferencien entre elles en l'estructura, el substrat, la distribució tissular, el mecanisme d'activació i la funció. La classe IA és la més implicada en la regulació de la proliferació i la tumorigènesi, i està formada per una subunitat catalítica (p110) i una subunitat reguladora (p85) ^(165,166).

La classe IA de la via PI3K és activada per receptors tirosina quinasa (RTKs), que s'hi uneixen directament, o a través de proteïnes adaptadores. Aquesta activitat produeix fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3), un regulador crític de la serina/treonina quinasa AKT, que activa diferents vies involucrades en la proliferació, el metabolisme i supervivència cel·lular ^(165,167). L'activació constitutiva de PI3K està associada al desenvolupament de càncer.

PTEN és l'única lípid-fosfatasa que interacciona amb la via de PI3K suprimint la supervivència cel·lular, així com la proliferació. Per això, no sorprèn que la pèrdua de *PTEN* tingui un gran impacte en múltiples aspectes del desenvolupament del càncer

⁽¹⁶⁸⁾. *PTEN* és un gen supressor de tumors, de manera que la via de senyalització PI3K-PTEN actua com a regulador crucial de la supervivència cel.lular ⁽¹⁶⁹⁾.

El gen *PTEN* es troba al cromosoma 10q23.31 i està format per dos dominis funcionals: un domini fosfatasa N-terminal i un domini C-terminal. Estructuralment es diferencien 3 regions: un domini de unió N-terminal fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2), una cua terminal que conté seqüències PEST (seqüències riques en prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T) que regulen l'estabilitat de la proteïna) i un domini d'interacció PDZ. Tot i que el domini N-terminal és el principal responsable de l'activitat fisiològica de PTEN, aproximadament un 40% de les mutacions es donen al domini C-terminal; fet que suggereix un paper important d'aquest domini en el manteniment de la funció de PTEN [Figura 14] ^(168,170).

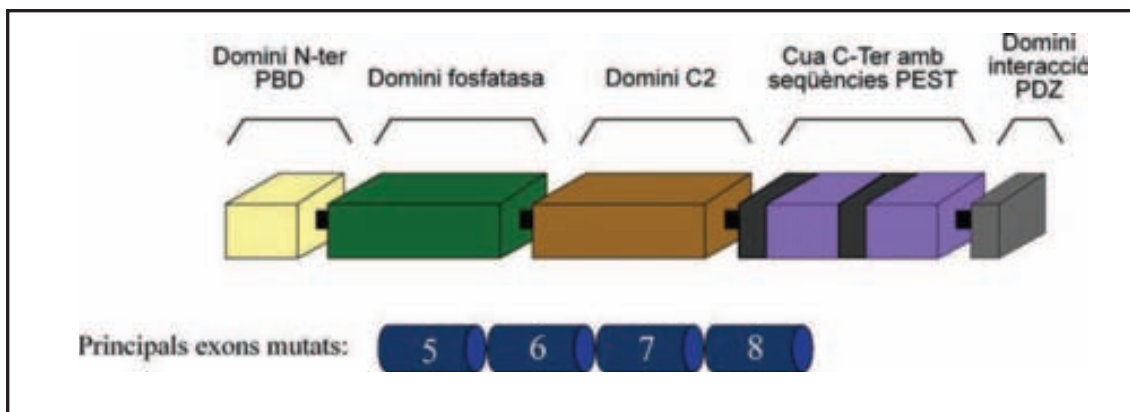


Figura 14. Esquema de l'estructura de la proteïna de PTEN i exons a on es produeixen la majoria de mutacions descrites.

- PI3K en càncer.

S'han descrit mutacions somàtiques de *PIK3CA*, el gen que codifica la subunitat catalítica p110 α , amb elevada freqüència en els tumors humans més comuns. La freqüència més alta de mutacions de *PIK3CA* es dona en càncer de mama, d'endometri, de còlon, via urinària i d'ovari ⁽¹⁶³⁾. Més del 80% d'aquestes mutacions es donen a dos regions, entre el domini helical i el domini catalític ⁽¹⁷¹⁾. Aquestes mutacions provoquen un augment de l'activitat de PI3K in vitro, i l'activació, per tant, d'AKT i indueixen la transformació de fibroblasts i cèl.lules mamàries epitelials. Igualment, la pèrdua de *PTEN* també dona lloc a elevats nivells d'AKT ⁽¹⁶⁵⁾.

- PI3K en càncer de pròstata.

Només quatre estudis han descrit alteracions de *PIK3CA* en càncer de pròstata (172-175). Sun i cols (174) van ser els primers a descriure mutacions d'aquest gen, amb una freqüència molt baixa, 2.5%, mentre que els altres 3 estudis no van trobar mutacions. Tres d'aquests estudis (172,174,175) descriuen guanys gènics de *PIK3CA* i en l'estudi del nostre grup, signat per Agell i cols (175) s'ha demostrat, per primer cop, la sobreexpressió d'ARNm de *PIK3CA* en un 40% dels casos.

- PTEN en càncer.

S'han descrit diferents tipus de mutacions en el gen *PTEN*, com són, pèrdua d'heterozigotisme (LOH), mutacions *frameshift*, delecions *inframe*, mutacions puntuals i silenciament epigenètic, entre d'altres (166,176,177). Les alteracions de *PTEN*, principalment delecions mono i bial·lèliques, s'han identificat en múltiples tipus de tumors, però els tres on es donen de forma més freqüent són el glioblastoma (178), el càncer endometrial (179) i el càncer de pròstata (180-182). Les mutacions germinals i somàtiques de *PTEN* també tenen un paper important en diferents tipus de tumors, com són d'endometri (38%), cervell (18%) i pell (14%) (165).

- PTEN en càncer de pròstata.

Una de les alteracions més freqüents en el càncer de pròstata és la delecció del braç curt del cromosoma 10 (10q23), i per tant, la pèrdua funcional de *PTEN* (47), ja que el braç del cromosoma que conserva el gen està també freqüentment inactivat per petites delecions (183). La inactivació de *PTEN* no sembla necessària per la iniciació del tumor prostàtic, però la seva pèrdua és una característica de progressió cap a l'adquisició del fenotip maligne (182,184-194). En canvi, les mutacions de *PTEN* són relativament rares en tumors primaris de pròstata.

La recerca sobre *PTEN* en càncer de pròstata s'ha centrat, principalment, en la detecció de les delecions genòmiques d'aquest gen. Estudis inicials, utilitzant l'anàlisi de microsatèl·lits, van descriure una pèrdua d'heterozigotisme del locus de *PTEN* en un 10-50% dels tumors primaris (182,184,186,189,192). En estudis més recents, mitjançant tècniques de FISH, entre d'altres, la freqüència en el càncer de pròstata és del 30-60% (176,181,191,193-197). En general, la pèrdua de *PTEN* és més freqüent en metastasis de càncer de pròstata que en tumors primaris, amb prevalences descrites al voltant del 50% dels

casos.^(190,195,198) S'ha descrit que la deleció i pèrdua consecutiva de la funció de *PTEN* en estadis inicials de l'oncogènesi prostàtica és un factor important, i donarà un fenotip més agressiu del tumor⁽¹⁹⁴⁾.

Alguns estudis evaluen la proteïna de *PTEN* per immunohistoquímica, i troben correlació entre presència o absència de la proteïna i la presència o absència de pèrdua d'heterozigotat de *PTEN* detectada per FISH^(187,193).

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, de l'estadi del tumor i de la població d'estudi^(47,199). En tumors metastàsics, en canvi, la freqüència de mutació s'ha descrit entre el 20 i el 60%^(47,185,189,192,200,201).

També s'ha demostrat, en ratolins, que la delecció de *PTEN* indueix càncer de pròstata⁽²⁰²⁾. A més, la reintroducció de *PTEN* en línies cel·lulars de càncer de pròstata que no tenen aquest gen, indueix la parada del cicle cel·lular i l'apoptosi mitjançant la regulació negativa de la via de PI3K-AKT⁽⁴⁷⁾.

1.3.6.3. Reordenaments cromosòmics: Gens de fusió *TMPRSS2-ETS*

Els reordenaments cromosòmics són un fet comú i força conegut en leucèmies, limfomes i sarcomes. En tumors epitelials però, no van començar a ser estudiats amb profunditat fins l'any 2005, quan el grup de Tomlins i cols⁽²⁰³⁾ van identificar la fusió *TMPRSS2-ETS* com un fenomen molt freqüent en càncer de pròstata. Posteriorment, diferents estudis, han confirmat la presència d'aquest reordenament en un 42 a 78% dels càncers de pròstata^(197,204-213).

El gen *TMPRSS2*, que pertany a una família de serina-proteases, s'expressa intensament tant en cèl·lules prostàtiques normals com en càncer de pròstata, i conté elements de resposta a andrògens en el seu promotor.

La família dels ETS (*E twenty-six*) és una de les famílies més importants de factors de transcripció. El seu nom prové d'una seqüència aïllada del virus oncogènic de l'eritroblastosi aviar, E26. Els gens *ETS* tenen funcions diverses, com són la regulació

de la proliferació cel.lular, la migració, l'apoptosi, el desenvolupament i les interaccions epiteli-mesènquima ^(214,215).

En una gran proporció de càncers de pròstata s'han descrit fusions recurrents entre la regió 5' no traduïda del gen *TMPRSS2* (21q22) i els gens de la família *ETS*. La fusió més freqüent es dona per reordenament entre els gens *TMPRSS2* i *ERG* (en un 85-90% dels casos) ^(203,216). També s'han trobat, menys sovint, reordenaments amb altres membres de la família *ETS*, com són *ETV1* (7p21) ⁽²⁰⁷⁾, *ETV4* (17q21) ⁽²¹⁷⁾, o *ETV5* (3q27) ⁽²¹⁸⁾ [Figura 15].

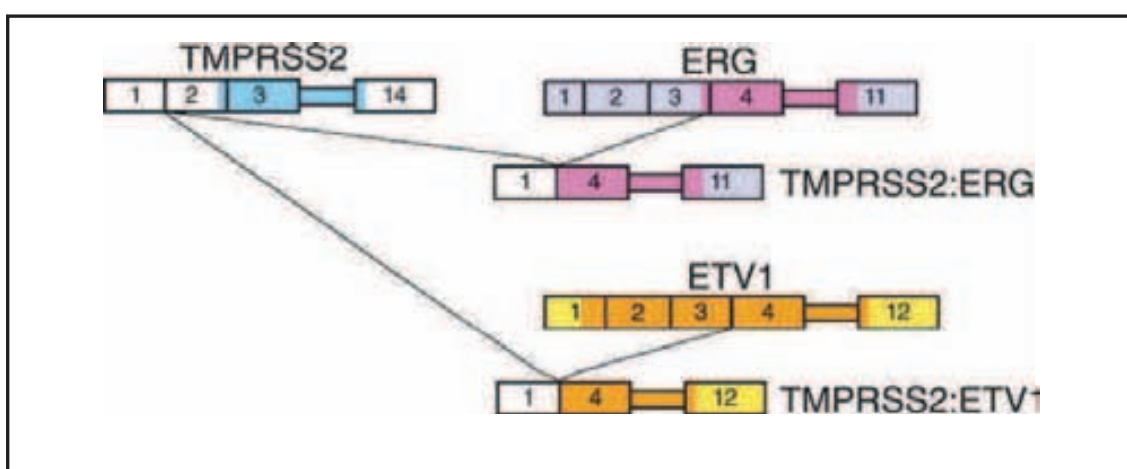


Figura 15. Gens de fusió *TMPRSS2-ERG* i *TMPRSS2-ETV1*. Extret de Tomlins i cols. 2006 ⁽⁴⁵⁾

Posteriorment, també s'han descrit altres parelles de reordenament a 5' com són *SLC45A3*, *HERV-K_22q11.23*, *C15ORF21*, *HNRPA2B1*, *KLK2*, *CANT1*, *FLJ35294*, *DDX5* i *NDRG1*. D'aquests, *SLC45A3*, *KLK2*, *CANT1* i *FLJ35294* són gens específics de pròstata, l'expressió dels quals és induïda per andrògens ^(205,216,219-221). S'ha vist que aquesta fusió provoca, en la majoria del casos, sobreexpressió del membre de la família *ETS* que hi està implicat.

TMPRSS2 i *ERG* són dos gens localitzats en el cromosoma 21 (21q22) i separats per menys de 3 megabases. La fusió de *TMPRSS2* amb *ERG* es dona per inserció intercromosòmica o per deleció d'una regió del cromosoma 21 (aproximadament 50% per cada mecanisme) ^(197,206,207,219,222).

La isoforma més freqüent del transcrit *TMPRSS2-ERG* conté l'exó 1 de *TMPRSS2* fusionat amb l'exó 4 d'*ERG*, tot i que s'han descrit més de 20 isoformes diferents ^(203,212,223-228). Com que l'exó 1 de *TMPRSS2* és no codificant, el transcrit de fusió resulta en una proteïna d'*ERG* truncada. No s'ha trobat mai aquesta fusió en glàndules prostàtiques benignes o en PIN allunyat del càncer de pròstata ⁽²²¹⁾.

Tomlins i *cols* ⁽²²¹⁾ afirmen que, tant *in vitro* com *in vivo*, el producte de la fusió *TMPRSS2-ERG* no és capaç de transformar línies cel·lulars benignes de pròstata o induir el desenvolupament d'adenocarcinoma en la pròstata de ratolí. Per contra, estudis anteriors suggerien que la fusió del gen *TMPRSS2-ERG* es donava en el context de lesions genètiques preexistents, com són la pèrdua de *NKX3-1* i/o d'al·lels de *PTEN*, en especial durant la transició de PIN a carcinoma ⁽²²⁹⁾.

Els diferents estudis publicats fins ara, mostren discrepàncies sobre l'associació de la fusió de *TMPRSS2-ERG* i els diferents factors pronòstic. Així, Perner i *cols* ⁽²⁰⁹⁾ van trobar el reordenament de *TMPRSS2-ERG* per deleció en un percentatge elevat de tumors, amb estadi elevat i metàstasis a ganglis limfàtics. No van observar associació significativa de la fusió amb el grau del tumor, però sí amb estadis avançats. Per altra banda, en el mateix treball, el reordenament de *TMPRSS2-ERG* mostrava una tendència a associar-se amb valors alts de PSA, en comparació amb els tumors de pròstata que no presentaven la fusió. Estudis posteriors del mateix grup, van confirmar l'associació de la fusió de *TMPRSS2-ERG* amb un fenotip de càncer de pròstata més agressiu ^(222,230,231).

Altres estudis, no obstant, defensen el contrari. Així, per exemple, Petrovics i *cols* ⁽²³²⁾ van publicar que una elevada expressió d'*ERG* es trobava associada a temps de supervivència lliure de recidiva de PSA més llarg, grau de diferenciació baix o moderat, baix estadi patològic i marges negatius. Saramaki i *cols* ⁽²³³⁾, també defensen la teoria de que els càncers de pròstata que presenten la fusió *TMPRSS2-ERG* estan associats a més bon pronòstic. Gopalan i *cols* ⁽²⁰⁶⁾, per altra banda, varen demostrar l'associació estadística de la presència del reordenament amb càncers de pròstata de baix grau de Gleason, però no varen trobar cap associació amb l'estadi patològic.

En el darrer any, s'han publicat diferents estudis sobre l'expressió de la proteïna d'ERG i la seva relació amb la presència del reordenament ^(234,235). Park i cols ⁽²³⁵⁾, van ser els primers en validar un anticòs monoclonal anti-ERG, varen demostrar una excel.lent concordança entre l'expressió immunohistoquímica d'ERG i la presència de reordenaments en aquest mateix gen, detectats mitjançant tècniques de FISH. No es van trobar diferències d'expressió d'ERG en funció de les diferents parelles 5' de la fusió.

Diferents estudis han descrit la relació entre el reordenament d'*ERG* i la pèrdua de *PTEN*, ja que tots dos són fenòmens freqüents en el càncer de pròstata i estan implicats en invasió, metàstasi i progressió tumoral ^(195,197,236,237) i s'ha descrit que aquests dos processos estan significativament associats. Yoshimoto i cols ⁽¹⁹⁷⁾ van descriure tres grups de pacients: un grup de mal pronòstic caracteritzat per tenir alteracions en tots dos gens, reordenament de *TMPRSS2-ERG* i pèrdua de *PTEN*, un grup intermig que presenta una o altra alteració i, per últim, un grup amb bon pronòstic que no presenta cap de les dues alteracions.

1.3.5.4. CXCR4: Gen relacionat amb el reordenament *TMPRSS2-ERG*

CXCR4 és un receptor de quimoquines que s'ha vist relacionat amb un gran nombre de processos biològics. És important en desenvolupament, hematopoesi, organogènesi i vascularització. També s'ha vist involucrat en el desenvolupament del càncer i la metàstasi ⁽²³⁸⁾. *CXCR4* es troba sobreexpressat en diferents metàstasis òrgan-específiques com la del càncer de mama, de ronyó i de pròstata. L'expressió de *CXCR4* en cèl.lules tumorals es correlaciona amb la severitat de la malaltia. *CXCL12* (també conegut com a SDF-1) té el *CXCR4* com a únic receptor i la seva interacció pot mediar l'adhesió cel.lular amb cèl.lules endotelials ⁽²³⁹⁾. Els efectes de la via SDF-1/*CXCR4* en càncer de pròstata es consideren multifactorials. Aquesta via està implicada en el *homing* de les cèl.lules tumorals en òrgans específics (metàstasis), així com en l'establiment i el creixement de cèl.lules tumorals a llocs específics, promoguts principalment pels efectes de *CXCR4* en l'adhesió, invasió i proliferació de les cèl.lules tumorals ^(240,241).

S'ha descrit que en línies cel.lulars malignes hi ha més expressió de *CXCR4* que en línies cel.lulars benignes, tant quant a ARN com a proteïna ^(242,243). També s'ha descrit una elevada expressió proteica de *CXCR4*, tant en tumors de pròstata localitzats

com en metàstasis, i més expressió en pacients amb metàstasis òssies comparats amb aquells que no en presenten. S'ha vist que la inhibició de CXCR4 amb ARNsi específics bloqueja l'efecte de la via CXCR4/SDF-1, i per tant, suprimeix la invasivitat *in vitro*, i la formació de metàstasis *in vivo* en càncer de pròstata. Aquesta via, per tant, podria ser una nova diana terapèutica pel tractament i la prevenció de les metàstasis en càncer de pròstata ⁽²⁴⁴⁾.

CXCR4 i *ADAMTS1* són dos gens fortament associats amb migració cel.lular i invasió, i s'han trobat sobrerregulats en presència de sobreexpressió d'ERG en càncer de pròstata ⁽²³⁶⁾. Cai i cols ⁽²⁴⁵⁾ van identificar diferents llocs d'unió als factors de transcripció ETS i van descriure que l'activació de TMPRSS2-ERG en cèl.lules de càncer de pròstata pot regular l'expressió de CXCR4 i, per tant, pot tenir un paper en el procés metastàtic.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1. HIPÒTESI

Donades les peculiaritats de la història natural del càncer de pròstata en comparació amb altres formes de càncer, és possible que les alteracions moleculars implicades en el seu desenvolupament facin que hi hagi un llarg període quiescent i que en alguns casos s'afegeixin altres canvis genètics que marcarien el pas a fases més agressives de la malaltia.

El càncer de pròstata és una malaltia molt complexa de patogènia poc coneguda. La seva evolució depèn de múltiples factors, molts d'ells encara per aclarir. S'estima que el càncer de pròstata s'inicia cap a la quinta dècada i afecta a un 80% dels homes de més de 80 anys, però només una petita minoria dels pacients presentaran símptomes al llarg de la seva vida. Hi ha molts càncers de pròstata que mai arribaran a evolucionar, sino que es mantindran latents de forma indefinida.

En funció de quins mecanismes moleculars estiguin involucrats en el desenvolupament del càncer, es podria predir si aquest tumor creixerà i presentarà un caràcter clínicament agressiu, i necessitarà, per tant, un tractament més radical per combatre'l. Per altra banda, si es tracta d'un tumor amb un patró de conducta més quiescent, que no evolucionarà o bé ho farà més lentament, podria aplicar-se un tractament conservador. El coneixement d'aquests factors moleculars decisius podria permetre desenvolupar noves proves per la detecció i seguiment del càncer de pròstata.

Els gens dels receptors dels factors de creixement poden ser decisius en la carcinogènesi prostàtica, i podrien estar diferencialment afectats en les diverses subvarietats clíniques i patològiques del càncer prostàtic. Tot i que sembla que una senyalització anòmala dels FGFs està involucrada en el càncer de pròstata, el paper funcional de FGFR3 i les seves alteracions en càncer de pròstata no es coneixen. En altres tipus de tumors, per exemple, en tumors d'uroteli de la via urinària o pell, sí que s'han realitzat estudis on s'han descrit mutacions molt rellevants, associades a tumors poc agressius.

El potencial paper pronòstic de les alteracions combinades dels gens *EGFR* i *PTEN*, el seu efector *downstream* en càncer de pròstata, no està ben definit. La fusió de *TMPRSS2* amb *ERG* s'ha descrit amb una prevalença del 42 al 78% en càncer de pròstata, i la seva relació amb el pronòstic és controvertida. Alguns estudis han suggerit que l'expressió de *CXCR4* podria estar relacionada amb aquest reordenament.

Tot això ens ha portat a formular els següents objectius.

2. 2. OBJECTIUS

2.2.1. Determinar, en càncer de pròstata, la prevalença de mutacions somàtiques en el gen *FGFR3*, un oncogen característicament associat amb tumors poc agressius, així com la seva associació amb la presència d'altres neoplasies concomitants en els diferents grups clínicopatològics.

2.2.2. Determinar, en càncer de pròstata, la prevalença de mutacions somàtiques en els gens *EGFR* i *PTEN*, l'expressió de proteïna i l'amplificació gènica d'EGFR. Estudiar la relació entre les alteracions d'*EGFR* i les mutacions de *PTEN* en aquest tipus de càncer i determinar l'associació de les diferents alteracions amb els diferents grups de càncer de pròstata classificats segons el grau de Gleason.

2.2.3. Analitzar la prevalença del reordenament entre *TMPRSS2* i *ERG* a la nostra sèrie de tumors prostàtics i la seva associació amb l'expressió de la proteïna ERG, la seva relació amb els nivells d'ARNm de *CXCR4* i el paper de *CXCR4* en els diferents grups de càncer de pròstata classificats segons el grau de Gleason.

RESULTATS

3. RESULTATS

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

Article 1

Hernández 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 Jun;22(6):848-56.

Article 2

De Muga S, Hernández S, Agell L, Salido M, Juanpere N, Lorenzo M, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: Association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol.* 2010 May;23(5):703-12.

Article 3

De Muga S, Hernández S, Salido M, Lorenzo M, Agell L, Juanpere N, Lorente JA, Serrano S, Lloreta J. *CXCR4* mRNA Overexpression in High Grade Primary Prostate Tumors: Lack of Association with *TMPRSS2-ERG* Rearrangement (enviat a Human Pathology, veure annex)

3.1. Article 1: Mutacions de *FGFR3* en càncer de pròstata: associació amb tumors de baix grau

El càncer de pròstata és la segona causa de mort per càncer en homes. El paper de *FGFR3* i les seves alteracions en el càncer de pròstata no són prou conegudes. S'han descrit mutacions de *FGFR3* en diferents tipus de tumors. Pocs estudis previs han analitzat l'estat mutacional de *FGFR3* en càncer de pròstata, i no han identificat cap mutació. En aquest treball, hem investigat la prevalença de mutacions somàtiques de *FGFR3* en una sèrie de tumors de pròstata. S'ha evaluat també la presència d'altres tumors en aquests pacients, en concret tumors urotelials, de pell, còlon i pulmó. L'anàlisi mutacional dels exons 7, 10 i 15 de *FGFR3* ha demostrat 9 mutacions en els 112 tumors de pròstata estudiats (8%). La mutació més freqüent ha estat el canvi d'aminoàcid (*missense*) S249C. La prevalença de mutacions en els tumors amb grau de Gleason = 6 ha estat del 18% (8/45) comparat amb el 3% (1/36) en tumors de grau = 7, i de 0% (0/31) en els de grau ≥ 8 i metastàtics ($p = 0.007$). La freqüència de mutacions de *FGFR3* en autòpsies i biòpsies ha estat del 6 i 9%, respectivament. La prevalença de mutacions de *FGFR3* en tumors de pròstata, de pacients que només tenen càncer de pròstata, ha estat del 2% comparat amb 23% en tumors de pròstata de pacients amb altres tumors associats ($p = 0.001$). Aquest és el primer estudi que descriu canvis moleculars de *FGFR3* en càncer de pròstata. Aquest gen no sembla tenir un paper central en la patogènesi del càncer de pròstata, però està associat significativament amb un subgrup de tumors de pròstata de baix grau i amb la presència d'altres tumors, sobretot bufeta i pell.

FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors

Silvia Hernández¹, Silvia de Muga^{2,3}, Laia Agell^{2,3}, Nuria Juanpere^{2,3}, Raquel Esgueva^{2,3}, José A Lorente^{3,4}, Sergi Mojal⁵, Sergio Serrano^{2,3} and Josep Lloreta^{1,2}

¹Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain;

²Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ³Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Department of Urology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain and ⁵Department of Biostatistics, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Prostate cancer is the second cause of cancer-related death in men of the Western World. The role of FGFR3 and its abnormalities in prostate cancer are not known. FGFR3 mutations have been reported in some human tumors. Few studies have analyzed the mutations of FGFR3 in prostate tumors, and no mutations have been previously reported. Prevalence of FGFR3 somatic mutations was investigated in a series of prostate tumors. The presence of other tumors in these patients, including urothelial, skin, colon, and lung neoplasms, was recorded. Mutational analysis of exons 7, 10, and 15 of FGFR3 revealed 9 mutations in the 112 prostate tumors studied (8%). Most of them consisted of the missense change S249C. The prevalence of mutations in tumors with combined Gleason score = 6 is 18% (8/45) compared to 3% (1/36) for tumors with grade = 7, and 0% (0/31) for those with grade ≥ 8 and metastases ($P = 0.007$). The frequency of FGFR3 mutations in autopsy and biopsy samples was 6 and 9%, respectively. The prevalence of FGFR3 mutations in prostate tumors from patients with only prostate cancer was 2% compared to 23% in prostate tumors from patients with other associated neoplasms ($P = 0.001$). This is the first report of molecular changes of FGFR3 in prostate cancer. This gene does not seem to be central to the pathogenesis of prostate cancer, but it is significantly associated with a subgroup of low-grade prostate tumors, and with the finding of other tumors, mainly arising in bladder and skin.

Modern Pathology (2009) 22, 848–856; doi:10.1038/modpathol.2009.46; published online 17 April 2009

Keywords: FGFR3; mutation; prostate cancer; bladder cancer; skin tumors

Prostate cancer is the second most common cause of cancer-related death in men of the Western World, and its incidence is increasing.^{1,2} The family of fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors are important in prostate organogenesis,^{3,4} and FGFR-MEK-ERK signaling is an integral part of prostate bud induction.⁵ The signaling pathways of FGFs also play prominent roles in prostate biology by mediating stromal–epithelial interactions.³ In the prostate, the aberrant signaling of FGFs is a strong factor in the disruption of tissue homeostasis, which, in turn, may contribute to prostate tumor development and progression.^{6–8} FGFs 6, 8, and 17 are overexpressed in human prostate cancer. In addition, FGF6 expression has also been found to be increased in prostatic intraepithelial

neoplasia.^{9–11} FGF-induced functions are mediated through high-affinity membrane receptor tyrosine kinases. FGF receptors (FGFR1–4) regulate diverse cellular processes, including cell growth, differentiation, and angiogenesis, and they differ in tissue expression, ligand specificity, signal pathway activation, and biological effects.^{12,13} There is a direct causal relationship between the activation of FGFR1 and the angiogenic switch.¹⁴

In prostate tumors, a differential and changing expression of FGFRs has been observed. FGFR1 and/or FGFR2 overexpression has been reported in prostate cancer in different papers. However, neither FGFR1 nor FGFR2 expression was found to be statistically related to clinical parameters.^{15–17} Although the overexpression of FGFR1 protein is a common event in both early and late prostate cancer, FGFR4 is increasingly expressed in high-grade tumors. Increased FGFR4 immunoreactivity appears to be significantly associated with decreased patient survival, but not with metastasis.^{17,18}

Alterations in FGF signaling regulators also have an impact on prostate tumorigenesis. In this regard, downregulation of *Sprouty 1* and *Sprouty 2* has been

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

Received 15 December 2008; revised and accepted 13 March 2009; published online 17 April 2009

recently reported.^{19–21} Although it seems that anomalous FGF signaling is involved in prostate carcinogenesis, the functional role of FGFR3 and its alterations in prostate cancer are not known. FGFR3 protein expression studies show heterogeneous expression levels in benign and malignant prostate epithelium.^{17,18} Gain-of-function mutations have been identified in different dominant autosomal human skeletal disorders such as hypochondroplasia, achondroplasia, and thanatophoric dysplasia.^{22–24} FGFR3 mutations identical to those found in these disorders have been reported in multiple myelomas, cervix and bladder cancer, colon cancer, and benign skin tumors.^{25–33} This gene constitutes a promising marker in the clinical management of patients with low-grade, non-muscle-invasive bladder tumors.²⁹ However, very few authors have analyzed the mutational status of the FGFR3 gene in prostate tumors.^{26,34} In this study, we have investigated the prevalence of FGFR3 somatic mutations, as well as the association with the presence of other concurrent neoplasms, in a large group of well-defined prostate tumors classified by combined Gleason score.

Materials and methods

Patients and Tumor Samples

A total of 112 prostate tumors, recruited retrospectively from the files of the Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, are the subject of this report. Of these cases, 85 were obtained from biopsy or surgical samples: 25 needle biopsy, 45 radical prostatectomy, and 15 cystoprostatectomy specimens; 18 were tumors found at autopsy, so-called latent tumors. In addition, one lymph node and eight bone metastases were included. To analyze the association of prostate cancer with other tumors, the samples were divided in two groups: a group (G1) with samples from patients with only prostate cancer ($n=82$) and a multiple tumor group (G2) made up of patients that, in addition to prostate cancer, had other tumors in different locations ($n=30$). The latter consisted of 18 patients with prostate and bladder tumors; 6 patients with prostate and skin tumors; 2 patients with prostate and colon cancer; 2 patients with prostate, bladder, and skin tumors; 1 patient with prostate and lung cancer; and 1 patient with prostate, bladder, and lung cancer. Among the patients with prostate and bladder cancer, with or without other associated tumors ($n=21$), 15 cases were obtained from cystoprostatectomy specimens and in the remaining 6 cases, prostate cancer samples were obtained from prostatectomy or needle biopsy and bladder tumor samples from transurethral biopsy specimens (Table 1). Based on combined Gleason score, the prostate tumors were classified as grade = 6 ($n=45$), grade = 7 ($n=36$), and grade ≥ 8 ($n=22$). Although no information on

Table 1 Summary of the cases according to the different tumor types found in patients

N = 112	Type of tumors	Number of cases
Group 1 ($n=82$)	Prostate	82
Group 2 ($n=30$)	Prostate and bladder	18
	Prostate and skin	6
	Prostate and colon	2
	Prostate and lung	1
	Prostate, bladder and skin	2
	Prostate, bladder and lung	1

grade was available from the respective primary tumors, metastatic samples ($n=9$) were grouped together with Gleason score of ≥ 8 , assuming they belonged to an aggressive category. Of the samples, 99 were obtained from formalin-fixed paraffin-embedded tumors (FFPE) and 13 samples from frozen tumors. In a subset of 16 cases with prostate and bladder cancer, three types of samples were collected: normal tissue, prostate tumor, and bladder tumor; in 15 of them, the normal and neoplastic prostate tissues was obtained from cystoprostatectomy specimens and in an additional case from needle biopsy. The autopsy samples dated from 1993 to 2006. The remaining cases were recruited between 2000 and 2005. Relevant clinical information was recorded, including age of patients, stage of prostate tumors, basal PSA values, follow-up PSA values, clinical tumor progression, PSA tumor progression, and the presence of previous, simultaneous, or subsequent tumors in other organs.

Cell Lines and Bladder Control Samples

Two prostate cancer cell lines (PC3 and DU145) and 10 additional superficial (pTa) bladder tumors were also included. The cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). These cases were graded according to both the 2004 WHO and the previous WHO/ISUP systems. Seven tumors were classified as high grade (one grade 3 and six grade 2 cases), and three as low grade (grade 1).

DNA Extraction

Standard H&E slides served as templates to select the tumor regions in homologous unstained slides. Areas containing a minimum amount of $>50\%$, and usually $>90\%$, tumor cells were manually microdissected from the corresponding sections of FFPE or frozen tissue sections. DNA was extracted from 2–3 consecutive $10\ \mu\text{m}$ sections using the Dneasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). To avoid the risk of PCR contamination, genomic DNA was extracted in a facility where neither PCR reactions were performed nor PCR products handled.

DNA Quality Checking

As most of the autopsy cases were relatively old, we checked the quality of the DNA by performing a previous control PCR. This multiplex PCR reaction involved the amplification of 100, 200, 300, 400, and 600 bp fragments of the β -actin gene.

FGFR3 PCR Amplification

FGFR3 exons 7 and 10 were amplified by PCR and sequenced in all samples. In addition, exon 15 amplification and sequencing was performed in 53 tumors. We used exon-specific primers binding to adjacent intron sequences. The primers were: AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG (forward) and CTGCAAGGTGTACAGTGACGCACA (reverse) for exon 7, CAACGCCCATGTCTTTGCAG (forward) and CAAGATCTCCCGTTCCCG (reverse) for exon 10, and GAGAGGTGGAGAGGCTTAG (forward) and TCATGCCAGTAGGACGCCT (reverse) for exon 15. PCR reactions were performed in a 25 μ l volume using 10–50 ng of DNA, 0.2 μ mol/l of each primer, 200 μ mol/l deoxynucleotide triphosphates, 3.5 mmol/l MgCl₂, 1 \times PCR II buffer, and 1.5 units of Ampliqa Gold DNA Polymerase (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, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol.

FGFR3 Mutation Analysis

Mutation analysis was done by direct sequencing of purified PCR products using an ABI PRISM 377 instrument and the Big Dye Terminator Kit v.3.1 (Perkin Elmer Applied Biosystems). Each PCR product was sequenced in both forward and reverse directions with the same sets of primers. All

sequence changes were confirmed as mutations with two independent rounds of PCR and direct sequencing. As quality control for 20% of wild-type cases, independent PCR products were amplified and sequenced to confirm the mutational results using DNA from the same tumor area. Ten superficial bladder (pTa) tumor samples were included in the mutational study as controls for the presence of mutations.

Statistical Analysis

Categorical variables are presented as frequencies and percentages. Fisher's exact test was used to compare categorical variables among groups. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

FGFR3 Mutation Analysis

The study included 112 prostate tumors, classified according to the revised Gleason system as grade = 6 (*n* = 45), grade = 7 (*n* = 36), and grade \geq 8 (*n* = 22). Nine metastatic cases were grouped with the combined Gleason score \geq 8 subset. The mutational analysis of exons 7, 10, and 15 of *FGFR3* revealed 9 mutations in the 112 prostate cancer samples (8%). Table 2 summarizes the pathologic features of the mutated cases. The most common mutation was the missense S249C substitution, which was present in seven tumors, followed by A393E, which was found in two tumors.

Less than 3% of *FGFR3* mutations in bladder tumors occur in exon 15,^{35,36} however in benign skin tumors such as seborrheic keratoses the prevalence of mutations in the exon 15 (hotspot 652) accounts to about 30% of the *FGFR3* reported mutations.³⁷ To test the possibility of finding exon 15 mutations in prostate cancer we screened a subgroup of 53 tumors, classified as grade = 6 (*n* = 23), grade = 7 (*n* = 20), grade \geq 8, and metastases (*n* = 10). No

Table 2 Spectrum of *FGFR3* mutations, polymorphisms, and pathological features of mutated prostate tumors

Case no.	Tumor precedence	Gleason	Type of alteration	codon
3	Prostatectomy	G4+3	Polymorphism	F386L
7	Prostatectomy	G4+3	Polymorphism	F386L
10	Prostatectomy	G3+3	Missense mutation	S249C
23	Cystoprostatectomy	G3+3	Missense mutation	S249C
41	Prostatectomy	G3+3	Missense mutation	S249C
52	Autopsy	G3+3	Missense mutation	S249C
53	Prostatectomy	G3+3	Missense mutation	A393E
77	Prostatectomy	G3+3	Missense mutation	A393E
92	Cystoprostatectomy	G3+3	Missense mutation	S249C
101	Prostatectomy	G3+3	Missense mutation	S249C
103	Cystoprostatectomy	G4+3	Missense mutation	S249C

mutation was found in exon 15 in any of these cases. From this subset of tumors, 2 presented the S249C substitution and 51 were wild type for exons 7 and 10.

The two prostate cancer cell lines (PC3 and DU145) were wild type for both exons. To test the sensibility of the technique for detecting mutations, we also performed the mutational analysis on 10 samples of superficial bladder tumors. Four of them (40%), classified as low grade ($n=1$) and high grade—grade 2 ($n=3$), presented *FGFR3* mutations.

The F386L germline single nucleotide polymorphism (SNP) was detected in two samples (2%), both of them from radical prostatectomy tumors with a combined Gleason score = 7 (Table 2). The prevalence of this polymorphism in heterozygosity is about 1% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Distribution of the *FGFR3* Mutations According to Combined Gleason Score

Of the 45 tumors classified as score = 6, 8 (18%) and 1 (3%) of the 36 tumors classified as score = 7 harbored a *FGFR3* mutation. Mutations were not found in any of the score ≥ 8 or the metastatic tumors (Figure 1; Fisher's exact test, $P=0.007$). Taking all the cases with combined Gleason score ≥ 7 and the metastases together, the percentage of mutations was 1.5% (1 of 67 cases), and the difference with combined Gleason score = 6 cases was also statistically significant (Fisher's exact test, $P=0.003$).

Distribution of the *FGFR3* Mutations According to Sample Origin

According to their origin, 85 cases were biopsy (needle biopsy, radical prostatectomy, or cystoprostatectomy tumors), 18 were tumors found at autopsy (latent tumors), and 9 samples were prostate cancer

metastases. Eight mutations were found in the 85 biopsy samples (9%); we detected a S249C mutation in one of the 18 autopsy cases (6%) whereas none of the metastatic samples harbored *FGFR3* mutations.

Relationship between *FGFR3* Status and Biochemical Recurrence

Of the 81 patients with available PSA data, biochemical recurrence was detected in 19, whereas in the remaining 62 cases there was no sign of biochemical or clinical recurrence at last follow-up. Of the cases, 8 presented *FGFR3* mutation and 73 were wild type. There was no association between the presence of *FGFR3* mutations and biochemical recurrence. However, there was a significant association between combined Gleason score and biochemical recurrence, as about 70% of Gleason score ≥ 8 and metastatic patients developed biochemical recurrence, whereas only 12% of Gleason score = 6 and 10% of Gleason score = 7 patients did recur (Fisher's exact test $P=0.0001$). These results are an indication that this series of patients was not biased and reflected the normal spectrum of the disease. When examining the possible association between specific mutations and biochemical recurrence, none of the six cases with the S249C mutation recurred, whereas the two cases with the A393E mutation did recur. Although this could reflect a real trend, the number of cases is too low to draw any definitive conclusions in this regard.

Distribution of the *FGFR3* Mutations in Cases with and without Other Associated Tumors

Taking into account the number of different tumor types, the cases were classified as group 1 (G1) when only prostate cancer was found ($n=82$), and group 2 (G2) when, in addition to prostate cancer, there were other neoplasms in different organs ($n=30$). In G2, 18 patients had prostate and bladder tumors, 6 patients had prostate and skin tumors, 2 patients presented with prostate and colon cancer, 2 patients with prostate, bladder, and skin tumors, 1 patient had prostate and lung cancer, and 1 patient prostate, bladder, and lung cancer (Table 1). The clinicopathologic features of all cases from G2 are summarized in Table 3.

FGFR3 mutations were found in only 2 of 82 (2%) cases from G1. In contrast, *FGFR3* mutations were present in 7 of 30 (23%) prostate cancer samples from G2 (Figure 2). This difference was statistically significant (Fisher's exact test, $P=0.001$). All the mutated cases from G2 had prostate cancer associated with only one additional neoplasm. Moreover, analyzing different tumor combinations in G2, 3 of 18 (17%) patients with only prostate and bladder cancer harbored a *FGFR3* mutation in the prostate tumor. In the subgroup with only prostate and skin tumors, three of six (50%) prostate cancer

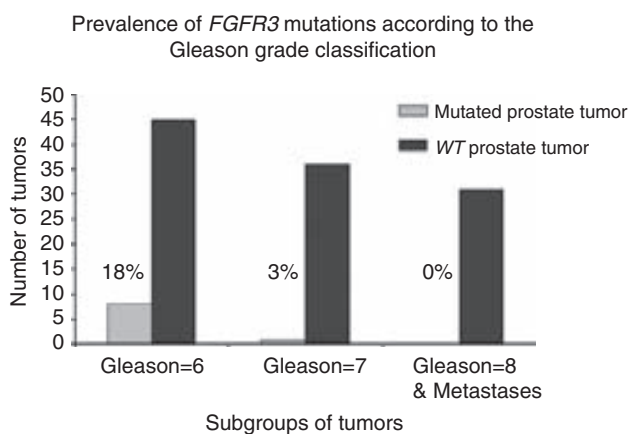
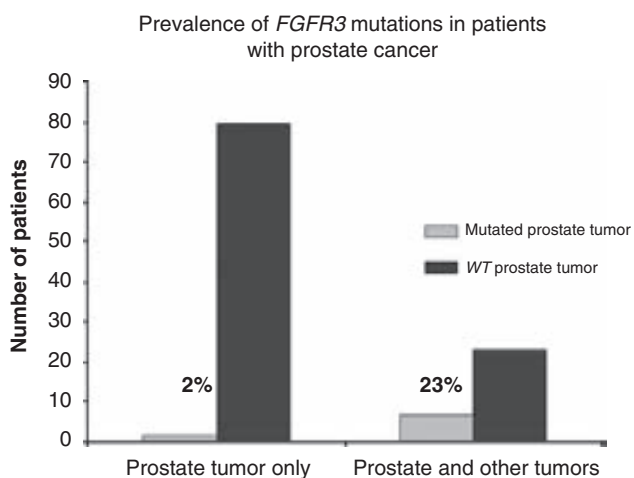


Figure 1 Prevalence of *FGFR3* mutations in the different tumor combined Gleason scores. 18% of tumors classified as Gleason score = 6 and 3% of tumors classified as Gleason score = 7 harbored a *FGFR3* mutation (Fisher's exact test, $P=0.007$).

Table 3 *FGFR3* mutation analysis in specimens of the mixed tumor group (G2)

Case no.	Sample type	Mixed tumor group (G2)				
		<i>FGFR3</i> status in prostate tumor	Gleason	Other tumors	<i>FGFR3</i> status in other tumors	<i>FGFR3</i> status in normal prostate
14	Cystoprostatectomy	WT	G3+4	Bladder T4G3	WT	WT
21	Cystoprostatectomy	WT	G3+4	Bladder T2G2	S249C	WT
25	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T4G3	WT	WT
23	Prostatectomy	S249C	G3+3	Bladder TaG1	WT	WT
27	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T2G3	WT	WT
37	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T4G3	WT	WT
43	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T1G3/lung cancer	WT/not done	WT
50	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T2G3	WT	WT
56	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T3G3	WT	WT
83	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder TaG3	WT	WT
85	Cystoprostatectomy	WT	G4+5	Bladder T4G3/squamous carcinoma skin	WT/not done	WT
88	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder TaG3	WT	WT
92	Cystoprostatectomy	S249C	G3+3	Bladder T2G3	WT	WT
103	Cystoprostatectomy	S249C	G4+3	Bladder T4G3	WT	WT
104	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T2G3/actinic keratosis	WT/not done	WT
108	Cystoprostatectomy	WT	G3+3	Bladder T3G3	WT	WT
26	Needle biopsy	WT	G3+4	Bladder TaG2	Not done	Not done
54	Needle biopsy	WT	G4+4	Bladder TaG2	Not done	Not done
63	Prostatectomy	WT	G3+4	Bladder T1G3	Not done	Not done
84	Needle biopsy	WT	G3+3	Bladder TaG2	Not done	Not done
100	Prostatectomy	WT	G4+3	Bladder TaG2	Not done	Not done
28	Metastasis	WT	—	Squamous carcinoma skin/actinic keratosis	Not done	Not done
41	Prostatectomy	S249C	G3+3	Basal cell carcinoma	Not done	Not done
53	Prostatectomy	A393E	G3+3	Seborrheic keratosis	Not done	Not done
68	Needle Biopsy	WT	G4+4	Seborrheic keratosis	Not done	Not done
76	Needle Biopsy	WT	G4+3	Seborrheic keratosis	Not done	Not done
77	Prostatectomy	A393E	G3+3	Seborrheic keratosis	Not done	Not done
10	Prostatectomy	S249C	G3+3	Colon cancer	Not done	Not done
40	Prostatectomy	WT	G3+4	Lung cancer	Not done	Not done
44	Prostatectomy	WT	G3+3	Colon cancer	Not done	Not done

**Figure 2** Prevalence of *FGFR3* mutations in the different tumor prostate groups according the presence of another type of cancer. The prevalence of *FGFR3* mutations in patients with only prostate tumors was 2 vs 23% in patients with prostate and other types of tumors (Fisher's exact test, $P = 0.001$).

samples presented a *FGFR3* mutation. Finally, one case with only prostate and colon cancer also had a *FGFR3* mutation. The two cases with prostate, bladder, and skin tumors, and the case with prostate and lung cancer were wild type for *FGFR3*, in the analysis of exons 7 and 10 (Figure 3). Comparing G1 to the subset of G2 cases with only prostate and bladder cancer, the difference in *FGFR3* mutation frequency (2 vs 17%) was also statistically significant (Fisher's exact Test, $P = 0.039$). The mutational status of all G2 cases is also summarized in Table 3.

In a subset of patients from G2, including all the cystoprostatectomy cases ($n = 15$) and an additional case with prostate and bladder biopsies, we also studied the presence of *FGFR3* mutations in the corresponding normal prostate and bladder tumors. All the normal prostate tissue samples were wild type for exons 7 and 10. Only one bladder tumor presented a S249C mutation (1 of 16; 6%), and in this case the corresponding prostate tumor and normal prostate tissue were wild type (Table 3).

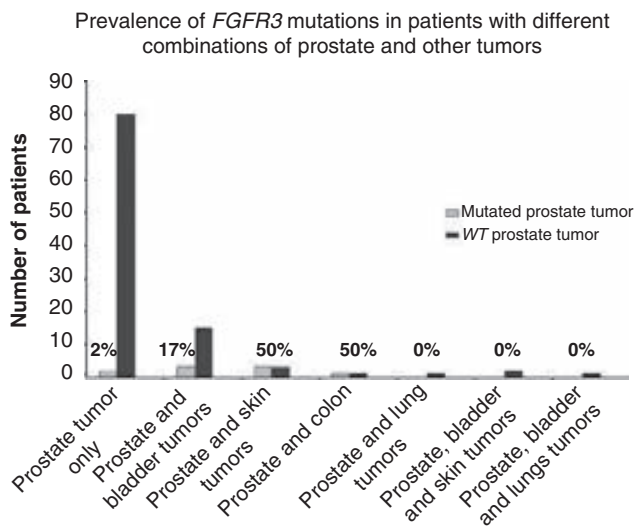


Figure 3 Prevalence of *FGFR3* mutations in the different combinations of prostate cancer and another type of tumors. The prevalence of *FGFR3* mutations in the cases with prostate and bladder tumors (17%) is significantly higher than in patients with only prostate cancer (Fisher's exact test, $P = 0.039$).

Discussion

Prostate cancer is the most common cancer in men in Europe and the second cause of cancer-related death in men of the Western World. Its incidence is increasing, but progression rate is only about 30%.^{1,2} More refined detection methods are increasing the number of patients that undergo radical treatment for tumors that perhaps would not progress or that would eventually progress after many years, thus resulting in increased survival and also higher morbidity rates.³⁸ Due to the difficulties in obtaining samples for high throughput molecular analysis from early tumors, genes that could be decisive for the transition from a latent status to an aggressive phase leading to progression are still unknown. Therefore, there are no clues to select patients for a less radical treatment or for a safe watchful waiting.

Many different genes have been investigated for their potential roles in the development and progression of prostate cancer.^{39,40} However, in the present time there are no relevant molecular markers associated with tumor progression, with the different subsets of prostate cancer or with some of the clinicopathological features of this type of tumor. There is a need to better identify patients who have a low risk of progression, to avoid overtreatment, as well as those who are likely to progress to treat them more aggressively.

FGFR3 molecular alterations seem to be restricted to a few types of human cancer. Mutations in this gene have been reported in bladder and cervix carcinoma, multiple myeloma, colon cancer and, more recently, in benign skin tumors.^{25–33} The relatively high prevalence of *FGFR3* mutations in benign skin tumors and in noninvasive bladder tumors suggests an association of *FGFR3* mutation

with low risk cancers.^{35,41} Although it seems that anomalous FGF signaling is involved in prostate carcinogenesis, the functional role of *FGFR3* and its alterations in prostate cancer are unknown.

The purpose of this study was to investigate the prevalence of *FGFR3* somatic mutations in a large group of well-defined prostate tumors classified by stage and combined Gleason score. This is the first report of the presence of *FGFR3* genetic alterations in prostate cancer. The mutational analysis revealed that the *FGFR3* gene is mutated in a small proportion (8%) of prostate tumors.

Nevertheless, if we grouped the cases according to the combined Gleason score, the presence of *FGFR3* abnormalities was associated with less aggressive prostate tumors, as 89% of mutations (8 out of 9) were found in tumors with a combined Gleason score = 6; 100% of mutations were present in tumors with Gleason score ≤ 7 and, consequently, none of the Gleason score ≥ 8 or the metastatic tumors harbored any mutations. Comparing all cases with combined Gleason score = 6 with those with combined Gleason score > 6 and metastases taken together, the presence of mutations in the former was statistically significant. Thus, we can conclude that mutations of *FGFR3* are associated with a subset of prostate tumors with low combined Gleason score.

Only two previous papers have analyzed the *FGFR3* mutational status in prostate cancer, all of them providing negative results.^{26,34} Sibley *et al*²⁶ analyzed the mutational status of exons 7, 10, and 15 in only 10 samples, as well as in prostate cancer cell lines DU145, PC3, and LNCap. In concordance with our study, DU145 and PC3 were wild type for *FGFR3*. They did not find *FGFR3* mutations in other tumors included in their series, such as stomach, colon, ovary, brain, and kidney cancers. In most of these subgroups, the number of samples was too low to allow any definitive conclusions on the mutational status of *FGFR3*. In a subsequent paper, Jang *et al*³³ reported the presence of *FGFR3* somatic mutations in about 5% of colon tumors in a series of 40 cases.

Naimi *et al*³⁴ investigated the mutational status of the junction between the Ig domains II and III of *FGFR3*, which included exon 7 of the gene, in 20 prostate tumors. In this study, no mutation was detected. According to our findings, the prevalence of mutations in Gleason score ≤ 7 cases is about 11%, and most of them were Gleason score = 6. In the Naimi *et al* study, only 14 tumors with Gleason score ≤ 7 were included, so their sample size approached the threshold for detection.

In summary, the vast majority of prostate tumors with a *FGFR3* mutation were low-grade tumors. Similar to what has been reported in bladder cancer, the alterations of this gene in prostate cancer appear to be associated with the less aggressive prostatic tumors. These findings are in keeping with the previously reported conception that *FGFR3*

mutations are more prevalent in low-grade or benign neoplasms.^{35,41}

According to the clinicopathological setting of the tumors, the prevalence of mutations in the autopsy (latent) tumors was 6% and in the biopsy samples 9%. In that sense, this gene does not seem to be selectively altered in the group of tumors found at autopsy, which theoretically would be mostly made up of low-grade, slowly growing tumors.

The review of the clinicopathological data of the patients revealed that some of them presented, in addition to the prostate cancer, other simultaneous or previous neoplasms in other sites. The other lesions identified in these patients were mostly urothelial and benign skin tumors, and there were also few cases associated with colon and lung tumors. The results of the mutational study were then compared in two subgroups: a subgroup of cases with only prostate cancer, G1, and another subgroup with prostate cancer and an additional different neoplasm, G2 (bladder, skin, colon, and lung). Comparing the *FGFR3* status between these two groups, the presence of *FGFR3* mutations was significantly more prevalent in G2. Of patients with prostate cancer and other tumors, 23% harbored a *FGFR3* mutation compared to 2% of *FGFR3* mutations in patients with prostate cancer only. When separately analyzing the different tumor combinations in G2, the prevalence of *FGFR3* mutations in patients with prostate and bladder tumors was much higher (17%) than that of patients with only prostate tumors (2%). Furthermore, 50% of cases with prostate and skin tumors harbored a *FGFR3* mutation in the prostate tumor. Finally, one case with prostate and colon cancer had a mutation. Therefore, it is possible to conclude that *FGFR3* mutations are more prevalent in a subset of prostate tumors from patients with concurrent bladder cancer. On the other hand, although the number of cases with both prostate and skin tumors is very low in our series, the coexistence of these two neoplasms seems to be strongly related with *FGFR3* mutations in the respective prostate carcinomas.

As *FGFR3* is a gene involved in bladder carcinogenesis and the presence of *FGFR3* mutations is also a common event in benign skin tumors,^{30–32,35,37,41} this association between bladder, skin, and prostate cancer could suggest a common role for *FGFR3* in their pathogenesis. However, the mutational analysis of the corresponding bladder tumors and normal prostate samples in some of the patients from our study revealed the wild-type status of the gene. In fact, if the mutation did not occur in the germline, the normal tissues should not harbor it. The lack of *FGFR3* mutations in the bladder tumors from the patients with *FGFR3* mutated prostate tumors could indicate that the two tumors are unrelated. However, it should be noted that most of the bladder tumors investigated in the mixed tumor group belonged to a group of invasive muscle bladder cancers. It is well known that *FGFR3* mutations are frequent

in superficial tumors but not in muscle-invasive tumors.^{27–29,35} Thus, another possible explanation for the discrepant mutational status of *FGFR3* in the bladder and prostate tumors could be that the bladder tumor had lost the mutated *FGFR3* allele along its progression.

The relationship between prostate and skin tumors has not yet been previously investigated. The finding that 50% of patients with prostate and skin tumors in our series harbored *FGFR3* mutations seems to indicate that this gene could be related with the pathogenesis not only of concurrent bladder and skin tumors, but also of the concurrent prostate and skin tumors. Interestingly, none of the two cases with prostate, bladder, and skin tumors harbored *FGFR3* mutations.

A possible association between *FGFR3* mutations and tumors in different organs has been postulated by different authors.^{32,41} The fact that a high proportion of low-grade urothelial carcinomas and benign skin tumors harbors *FGFR3* mutations suggested a potential involvement of these mutations in the pathogenesis of both entities. Furthermore, some patients with epidermal nevi developed an urothelial carcinoma at an early age. Nevertheless, neither the bladder tumors nor the epidermal nevi in these previous series displayed *FGFR3* mutations, and the authors suggested that other genes may be involved in the pathogenesis of both tumors in these patients or that *FGFR3* mutations could involve other exons.^{32,41} Our findings in prostate cancer have led us to speculate with an association between *FGFR3* mutations and presence of tumors in different organs, specially bladder and/or benign skin tumors. This not being a germline alteration, it can be speculated that mutations could involve selectively different tissues in the same patients. In this regard, previous studies in epidermal nevi revealed that *FGFR3* somatic mutations can occur in mosaicism. Skin mosaicism results when postzygotic mutations lead to the presence of two or more genetically different cell populations in the same individual.⁴² It has been shown that a proportion of epidermal nevi result from activating embryonic mutations in *FGFR3* and *PI3K* presenting with mosaicism in the skin.^{32,43,44}

In any event, similar to what has been reported for bladder and skin tumors, the association of *FGFR3* alterations with prostate and skin tumors cannot be firmly established from the results of this study, and it deserves further research in larger series of patients, to elucidate the role of *FGFR3* in the pathogenesis of different coexisting tumors. The cell type affected by the *FGFR3* mutation as well as different involved cofactors and signaling pathways may contribute to the diverse tumoral phenotypes.³¹

Another interesting finding was the identification of a *FGFR3* mutation in the prostate tumor from one of the two cases with a simultaneous colon cancer. Mutations in this gene have been previously identified in colorectal cancer by Jang *et al*,³³ and

it could be interesting to investigate the possible relationship between the two tumors in a larger cohort of patients.

With regard to the type of mutation, a wide range of somatic hotspot mutations have been described in low-grade urothelial carcinomas and in SK, whereas the majority of EN display the R248C substitution.^{35,41} The most common mutation found in our series of prostate tumors was S249C, whereas A393E was present in two tumors. The S249C substitution is the most frequent mutation described in bladder cancer and the only one found to date in cervical carcinomas. A393E is a rare mutation in bladder cancer, about 1% of all reported mutations. However, it has been associated with bladder tumors classified as low malignant potential neoplasms.^{25,29,35} In SK, the A393E substitution has been reported with a frequency of about 9% of the adenoid SK harboring *FGFR3* mutations.⁴⁵

In sharp contrast with the inhibitory role of the mutated forms of the *FGFR3* gene in bone growth, *FGFR3* mutations have been suggested to play an oncogenic role in human tumors.⁴⁶ However, the exact mechanism by which mutated *FGFR3b* is involved in epithelial tumor progression is not well understood. Moreover, the suggested oncogenic role of mutated *FGFR3* in different types of tumors is controversial, with a striking high prevalence of mutated benign skin tumors. In the S249C substitution, the newly created cysteine leads to the formation of bisulfite bonds between the extracellular domains of the two FGF receptors and to ligand-independent constitutive receptor activation. On the other hand, the A393E mutation increases the fraction of FGFR3 dimers resulting from dimer stabilization, measured by the change in the free energy of dimerization.^{35,47} In addition, Bernard-Pierrot *et al*⁴⁶ demonstrated that FGFR3b-S249C was able to transform NIH-3T3 cells, inducing their anchorage-independent growth and tumor transformation when injected subcutaneously into nude mice, with the transforming properties classically attributed to oncogenes.

In conclusion, the results of this study suggest that although *FGFR3* does not seem to be central in the pathogenesis of prostate cancer, it is associated with a subpopulation of low-grade prostate tumors, and also with a subset of prostate carcinomas found incidentally in patients with concurrent bladder cancer or skin tumors. More studies are needed to clarify whether *FGFR3* alterations are useful to identify patients with a low risk of progression, and to investigate the possible relationship between *FGFR3* and the presence of concurrent tumors in the same patients.

Acknowledgement

Grants FIS/Instituto de Salud Carlos III 965190005 and 06/1411, made by the Ministry of Health of the

Spanish Government, Support Grant 2006 and Support Grant 2008 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board).

References

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66.
- 2 Woolf SH. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. An examination of the evidence. *N Engl J Med* 1995;33:1401–1405.
- 3 Thomson A. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction* 2001;121:187–195.
- 4 Lin Y, Liu G, Zhang Y, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase is required for prostatic morphogenesis and the acquisition of strict androgen dependency for adult tissue homeostasis. *Development* 2007;134:723–734.
- 5 Kuslak SL, Marker PC. Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation* 2007;75: 638–651.
- 6 Jin C, McKeehan K, Guo W, *et al*. Cooperation between ectopic FGFR1 and depression of FGFR2 in induction of prostatic intraepithelial neoplasia in the mouse prostate. *Cancer Res* 2003;63:8784–8790.
- 7 Jin C, Wang F, Wu X, *et al*. Directionally specific paracrine communication mediated by epithelial FGF9 to stromal FGFR3 in two-compartment premalignant prostate tumors. *Cancer Res* 2004;64:4555–4562.
- 8 Wu X, Jin C, Wang F, *et al*. Stromal cell heterogeneity in fibroblast growth factor-mediated stromal-epithelial cell cross-talk in premalignant prostate tumors. *Cancer Res* 2003;63:4936–4944.
- 9 Heer R, Douglas D, Mathers ME, *et al*. Fibroblast growth factor 17 is over-expressed in human prostate cancer. *J Pathol* 2004;204:578–586.
- 10 Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, *et al*. Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:4245–4250.
- 11 Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, *et al*. High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF 8. *Cancer Res* 1998;58:2053–2056.
- 12 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:165–197.
- 13 Shaoul E, Reich-Slotky R, Berman B, *et al*. Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways. *Oncogene* 1995;10: 1553–1561.
- 14 Winter SF, Acevedo VD, Gangula RD, *et al*. Conditional activation of FGFR1 in the prostate epithelium induces angiogenesis with concomitant differential regulation of Ang-1 and Ang-2. *Oncogene* 2007;26:4897–4907.
- 15 Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1063–1071.
- 16 Valve EM, Nevalainen MT, Nurmi MJ, *et al*. Increased expression of FGF-8 isoforms and FGF receptors in

- human premalignant prostatic intraepithelial neoplasia lesions and prostate cancer. *Lab Invest* 2001;81:815–826.
- 17 Sahadevan K, Darby S, Leung HY, *et al*. Selective overexpression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol* 2007;213:82–90.
 - 18 Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, *et al*. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2005;92:320–327.
 - 19 Fritzsche S, Kenzelmann M, Hoffmann MJ, *et al*. Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:839–849.
 - 20 Kwabi-Addo B, Wang J, Erdem H, *et al*. The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:4728–4735.
 - 21 McKie AB, Douglas DA, Olijslagers SY, *et al*. Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:2166–2174.
 - 22 Horton WA, Lunstrum GP. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in achondroplasia and related forms of dwarfism. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:381–385.
 - 23 Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 2002;16:1446–1465.
 - 24 Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:205–213.
 - 25 Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, *et al*. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999;23:18–20.
 - 26 Sibley K, Stern P, Knowles MA. Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumors. *Oncogene* 2001;20:4416–4418.
 - 27 Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, *et al*. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1955–1959.
 - 28 Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, *et al*. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:5444–5450.
 - 29 Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, *et al*. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:3664–3671.
 - 30 Logie A, Dunois-Larde C, Rosty C, *et al*. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2005;14:1153–1160.
 - 31 Hafner C, Vogt T, Hartmann A. FGFR3 mutations in benign skin tumors. *Cell Cycle* 2006;5:2723–2728.
 - 32 Hernandez S, Toll A, Baselga E, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors. *J Invest Dermatol* 2007;127:1664–1666.
 - 33 Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2001;61:3541–3543.
 - 34 Naimi B, Latil A, Berthon P, *et al*. No evidence for fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3) R248C/S249C mutations in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2000;87:455–456.
 - 35 Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25:581–593.
 - 36 Hafner C, Hartmann A, van Oers JM, *et al*. FGFR3 mutations in seborrheic keratoses are already present in flat lesions and associated with age and localization. *Mod Pathol* 2007;20:895–903.
 - 37 van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, *et al*. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003;21:1912–1921.
 - 38 Damber JE, Aus G. Prostate cancer. *Lancet* 2008;371:1710–1721.
 - 39 Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, *et al*. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett* 2007;249:5–13.
 - 40 Kopper L, Tímár J. Genomics of prostate cancer: is there anything to ‘translate’? *Pathol Oncol Res* 2005;11:197–203.
 - 41 Hafner C, Hartmann A, Vogt T. FGFR3 mutations in epidermal nevi and seborrheic keratoses: lessons from Urothelium and skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:1572–1573.
 - 42 Toll A, Real F. Somatic oncogenic mutations, benign skin lesions and cancer progression: where to look next? *Cell Cycle* 2008;7:2674–2681.
 - 43 Christian Hafner C, van Oers JM, Vogt T, *et al*. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* 2006;116:2201–2207.
 - 44 Hafner C, López-Knowles E, Nuno ML, *et al*. Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13450–13454.
 - 45 Hafner C, van Oers JM, Hartmann A, *et al*. High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* 2006;126:2404–2407.
 - 46 Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Lardé C, *et al*. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 2006;27:740–747.
 - 47 Li E, You M, Hristova K. FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J Mol Biol* 2006;356:600–612.

3.2. Article 2: Alteracions moleculars d'EGFR i PTEN en càncer de pròstata: associació amb carcinomes d'alt grau i estadi avançat

El càncer de pròstata és la segona causa de mort per càncer en homes. El paper de les alteracions combinades d'*EGFR* i *PTEN* en el pronòstic del càncer de pròstata no està ben establert i ha estat l'objectiu d'aquest estudi. La prevalença de les mutacions somàtiques d'*EGFR* i *PTEN*, l'amplificació d'*EGFR* i l'expressió proteica d'EGFR, s'han investigat en una sèrie d'adenocarcinomes de pròstata, classificats segons el sistema de gradació de Gleason. L'anàlisi mutacional va revelar 8 (8%) mutacions d'*EGFR* i 3 (3%) de *PTEN*, en 98 i 92 adenocarcinomes de pròstata, respectivament. La prevalença, en conjunt, de mutacions d'*EGFR* i *PTEN* va ser 11%. Es va trobar sobreexpressió d'EGFR en el 31% dels adenocarcinomes, amb una diferència marginalment significativa ($p = 0.068$) entre adenocarcinomes de Gleason ≤ 7 i Gleason ≥ 8 i metàstasis. Quatre casos (4 de 31; 13%) tenien guany del gen *EGFR* degut a polisomia del cromosoma 7. En el 35% dels adenocarcinomes es va trobar algun tipus d'alteració d'*EGFR-PTEN*, amb tendència a associar-se amb adenocarcinomes prostàtics d'estadi avançat ($p = 0.04$). El polimorfisme IVS18+19 també estava associat amb els adenocarcinomes prostàtics més avançats. Aquest és el primer estudi que analitza les mutacions d'*EGFR* i *PTEN* en la mateixa sèrie d'adenocarcinomes prostàtics. La sobreexpressió de proteïna és l'alteració més freqüent d'EGFR. Les mutacions en els gens *EGFR* i *PTEN* són un fet menor, tot i que el càncer de pròstata representa el segon tumor en el que les mutacions d'*EGFR* són més prevalents. Existeixen alteracions en la senyalització de la via d'*EGFR-PTEN* en una tercera part dels adenocarcinomes de pròstata, amb una incidència més alta en els casos més avançats.

Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas

Silvia de Muga^{1,2,3,6}, Silvia Hernández^{1,6}, Laia Agell^{2,3}, Marta Salido^{2,3,4}, Nuria Juanpere^{2,3}, Marta Lorenzo², José A Lorente^{3,5}, Sergio Serrano^{2,3} and Josep Lloreta^{1,2}

¹Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain;

²Department of Pathology, Hospital del Mar-IMAS-IMIM, Barcelona, Spain; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Molecular Cytogenetics Laboratory, Department of Pathology, Hospital del Mar-IMAS-IMIM, Barcelona, Spain and ⁵Department of Urology, Hospital del Mar-IMAS-IMIM, Barcelona, Spain

Prostate cancer is the second cause of cancer-related death in men of the Western world. The potential prognostic role of the combined alterations in EGFR and PTEN in prostate cancer is not well established. It was the aim of the study to investigate this role. Prevalence of *EGFR* and *PTEN* somatic mutations, *EGFR* amplification and EGFR protein expression were investigated in a series of prostate adenocarcinomas, classified according to the current Gleason grading system. Mutational analysis revealed eight *EGFR* and three *PTEN* mutations in 98 (8%) and 92 (3%) prostate adenocarcinomas, respectively. The combined prevalence of *EGFR*–*PTEN* mutations was 11%. EGFR overexpression was present in 31% of adenocarcinomas, with a marginally significant difference ($P=0.068$) between Gleason grade ≤ 7 adenocarcinomas and Gleason grade ≥ 8 and metastatic adenocarcinomas. Four cases (4 of 31; 13%) had an *EGFR* gene gain due to chromosome 7 polysomy. In 35% of adenocarcinomas we found some type of EGFR–PTEN alteration, with a tendency to be associated with advanced-stage prostate adenocarcinomas ($P=0.04$). The IVS18 + 19 polymorphism was also associated with more advanced prostate adenocarcinomas. This is the first study reporting mutations of *EGFR* and *PTEN* in the same series of prostate adenocarcinomas. Protein overexpression is the most frequent EGFR abnormality. Mutations in *EGFR* and *PTEN* genes are a minor event, although prostate cancer represents the third neoplasm in which the *EGFR* gene mutations are more prevalent. Alterations in the EGFR–PTEN signaling pathway are present in a third of prostate adenocarcinomas, particularly affecting the more advanced cases. *Modern Pathology* (2010) 23, 703–712; doi:10.1038/modpathol.2010.45; published online 5 March 2010

Keywords: EGFR; PTEN; mutation; overexpression; FISH; prostate cancer

EGFR belongs to the ErbB family of tyrosine kinase receptors.¹ They are activated by binding to peptide growth factors of the EGF family, leading to activation of multiple downstream pathways. The Ras-Raf-MEK-ERK1/2, STAT-3, and STAT-5, and the PI3K/PTEN-Akt-Mtor cascades are the main pathways activated downstream of ErbB receptors,

which have strong regulatory effects on cell proliferation, differentiation, survival and migration.^{2,3}

In many different cancer cell types, the ErbB pathway becomes hyperactivated by a range of mechanisms.^{2,4} Increased levels of *EGFR* gene expression have been reported in adenocarcinomas of the head and neck, lung, pancreas, bladder, ovary, cervix, brain, breast, colon and prostate, among others, and have been frequently associated to adverse prognosis.^{1,3,5,6}

EGFR gene amplification, as well as structural genetic alterations, has been reported in several adenocarcinoma types, including non-small-cell lung cancer (NSCLC), glioblastoma, pancreatic cancer, and head and neck squamous cell carcinoma.

Correspondence: Dr S Hernández, PhD, Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Passeig Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain.
E-mail: silvia.hernandez@upf.edu

⁶These authors contributed equally to this work.
Received 26 October 2009; revised 27 January 2010; accepted 28 January 2010; published online 5 March 2010

Point mutations or short DNA deletions have mainly been reported in lung cancer, with a low frequency in prostate and colorectal cancers and a very uncommon occurrence in head and neck, pancreas, esophagus and breast cancer, among others.^{3,6-12}

In prostate cancer, EGFR overexpression has also been described. Some studies report an increasing expression along the natural history of prostate cancer, as well as an association with poor prognostic factors such as high-grade, advanced-stage and progression to hormone refractory status.^{5,13} Recently, *EGFR* point mutations and amplification have been found in prostate cancer, particularly in advanced adenocarcinomas.^{14,15} However, the number of cases in these series is small, and on the other hand another recent study performing analysis of *EGFR* somatic mutations, amplification and protein expression in the same subsets of prostate adenocarcinomas did not find mutations.¹³

The PI3K-PTEN-AKT signaling pathway has been shown to be important in the survival and proliferation of human prostate cancer cells and to regulate prostate adenocarcinoma angiogenesis.^{16,17} In response to growth factors, the PI3K pathway can be activated by different protein tyrosine kinases, including the ErbB family and FGFRs among others. The PTEN phosphatase, in turn, has an important role in the regulation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) product (PIP₃), as a central negative regulatory factor of PI3K-AKT pathway.^{18,19} PI3K-AKT pathway is one of the major signal transduction pathways that promote cell growth, survival and proliferation. In addition, PTEN is involved in cell-cycle progression and regulation of DNA damage key checkpoint proteins. Moreover, PTEN regulates p53 stability, and p53 in its turn positively controls *PTEN* transcription.²⁰

PTEN alterations have been described in different human tumor types such as glioblastoma, breast cancer, lung cancer, melanoma and prostate cancer, among others. Somatic alterations of *PTEN* include point mutations, small deletions, homozygous deletions and epigenetic silencing.^{19,21} Functional loss of *PTEN* and subsequent activation of the AKT pathway is one of the most frequent abnormalities in prostate cancer progression, and chromosomal region mapping has shown *PTEN* to be the most frequently deleted gene in prostate cancer.²² Different studies have indicated that *PTEN* haploinsufficiency could be an early prognostic marker for prostate cancer, and complete loss of *PTEN* expression appears to correlate with advanced pathologic stage and high Gleason score.^{21,23-25} Somatic *PTEN* deletions and mutations have been described in primary and, more frequently, in metastatic prostate adenocarcinomas. The reported frequency of *PTEN* mutations in metastatic adenocarcinomas varies between 20 and 60%. In primary adenocarcinomas, lower frequencies have been reported, with discrepancy among the different studies, and an overall estimation of approximately 15%.²⁶⁻³¹ However,

both the number of papers analyzing somatic mutational status of *PTEN* and their sample size are too small to establish their actual prevalence in primary prostatic adenocarcinomas.

The potential prognostic role of the alterations in EGFR and its downstream effector PTEN in prostate cancer is not well established. Several clinical strategies are available to block EGFR receptor-mediated oncogenic function. It would be very important to determine the different types of aberrant events in EGFR and PTEN, to understand the pathogenesis and natural history of prostate cancer and to select appropriate treatment strategies with different inhibitors. In this study, we have investigated the prevalence of *EGFR* and *PTEN* somatic genetic alterations and protein expression in a large group of well-defined prostate adenocarcinomas from a Caucasian population, classified by stage and Gleason score.

Materials and methods

Patients and Adenocarcinoma Samples

A total of 98 prostate adenocarcinomas were selected retrospectively from the files of the Department of Pathology, at the Hospital del Mar in Barcelona, Spain, and were the subject of this report. From these, 12 were needle biopsy, 61 radical prostatectomy adenocarcinomas, 16 adenocarcinomas found at autopsy, so-called latent adenocarcinomas, 3 found at cystoprostatectomy (incidental) and 6 bone metastases. All adenocarcinomas were staged with the TNM classification. According to the current Gleason grading criteria, the prostate tumors were classified as combined Gleason scores 6 ($n=32$), 7 ($n=39$) and ≥ 8 ($n=21$). 89 samples were formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinomas, and 9 samples were frozen adenocarcinomas. Although no information on grade was available from the respective primary adenocarcinomas, metastatic samples ($n=6$) were grouped together with Gleason score ≥ 8 tumors, assuming they belonged to an aggressive category.

The autopsy samples dated from 1993 to 2007. The remaining cases were recruited between 2000 and 2008.

EGFR and PTEN Mutation Analysis

DNA extraction and DNA quality checking was performed in all samples as previously described.³² Exons 18-21 of *EGFR* and exons 5-8 of *PTEN* were amplified and sequenced in 98 cases for *EGFR* and in 92 cases for *PTEN* using tumor DNA. We used exon-specific primers binding to adjacent intron sequences except for exons 5 and 8 of *PTEN*, in which the primer comprised a part of the exon analyzed. The primers for *EGFR* were: CCCTTGCTCTGTGTTCTTG (forward) and TCATGGTCTGGTG

GGGA (reverse) for exon 18; AGCATGTGGCACCAT CTCAC (forward) and TCAGGCCACCTTTTCTC (reverse) for exon 19; AGCCACACTGACGTGCCTCT (forward) and ATAAGGAGCCAGGATCCTCA (reverse) for exon 20 and TGCAGAGCTTCTTCCCAT GA (forward) and AGGTGGCTTTAGGTCAGCCA (reverse) for exon 21. The primers for *PTEN* were CTTATTCTGAGGTTATCT (forward) and GGTGTAATGATATGTGCA (reverse) for exon 5A; CACTGTAAAGCTGGAAAGGGACG (forward) and TCCTCTTCC TGGATCTGAG (reverse) for exon 5B; TTTTCTGTCCACCAG (forward) and CCATGTATTGGAACAGT (reverse) for exon 6; CCTGTGAAATAATACTGGT (forward) and CATTGGGAGAAATATCCAA (reverse) for exon 7 and GTGATCAAGAAATCGATA (forward) and GGTTGTTGACTTGTATGT (reverse) for exon 8.

PCR reactions, product purification and mutation analysis were performed as previously described.³² PCR conditions were 95°C (5 min) for 1 cycle, 95°C (40 s), 63°C (40 s) for *EGFR* and 54°C (40 s) for *PTEN*, 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. Each PCR product was sequenced in both forward and reverse directions. All mutations reported were confirmed with two independent rounds of PCR and direct sequencing. As quality control, independent PCR products were amplified and sequenced in 14% of wild-type (wt) cases to confirm the mutational results using DNA from the same adenocarcinoma areas.

Immunohistochemistry of EGFR and PTEN

Immunohistochemical staining for EGFR was performed on 75 cases, all of them from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections, using a highly specific mouse monoclonal antibody (Clone H11; Dako, Glostrup, Denmark). In all samples, immunoreaction was revealed using the EnVision Plus system (Dako) and counterstained with hematoxylin. EGFR expression was evaluated semiquantitatively by estimating the percentage of positive adenocarcinoma cells as follows: score 0, no detection of positive cells; 1+, weak positivity in <10% cancer cells; 2+, moderate or strong positivity in 10–40% cancer cells and 3+, moderate or strong positivity in >50% cancer cells. An adenocarcinoma was considered to overexpress EGFR when the score was 2+ or 3+.

Fluorescence *in situ* Hybridization Analysis of EGFR

To assess the genetic status of *EGFR*, we carried out fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on formalin-fixed paraffin-embedded tissues, in the 31 cases in which there was tumor tissue available for

this purpose. The *EGFR* probe consists of two probes, one with the centromeric α -satellite probe, specific for chromosome 7 (spectrum green), and a locus-specific probe for the *EGFR* gene, located at 7p12 (spectrum orange) (Abbott Molecular Inc., Des Plaines IL, USA). We serially performed a hematoxylin-eosin stain and FISH in consecutive tissue sections. After pathological confirmation, FISH slides were deparaffinized, pretreated with EDTA solution in a microwave and digested with pepsin (0.05 mg/ml in 0.01 N HCL) for 30 min at 37°C. Tissue morphology was assessed by phase-contrast microscopy to ensure sufficient digestion of the collagen matrix. Pretreated tissue sections and probes were co-denatured at 78°C for 5 min and hybridized overnight at 37°C in a hot plate (Hybrite chamber; Abbot Molecular Inc.). After hybridization washes, slides were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI counterstain; Abbott Molecular Inc.).

Results were analyzed in a fluorescence microscope (Olympus; BX51) using the CytoVision software (Applied Imaging, Santa Clara, CA, USA). Tissue sections were scanned at low magnification ($\times 100$) with DAPI excitation. A minimum of 100 nuclei were scored by two observers. Based on previous publications,¹³ an adenocarcinoma was considered amplified if the *EGFR*/centromere 7 ratio was ≥ 2.0 . We used adjacent normal tissues from four cases as controls. The cutoff for polysomy (3–4 copies) was 7%.

Results

EGFR and *PTEN* Mutational Analyses

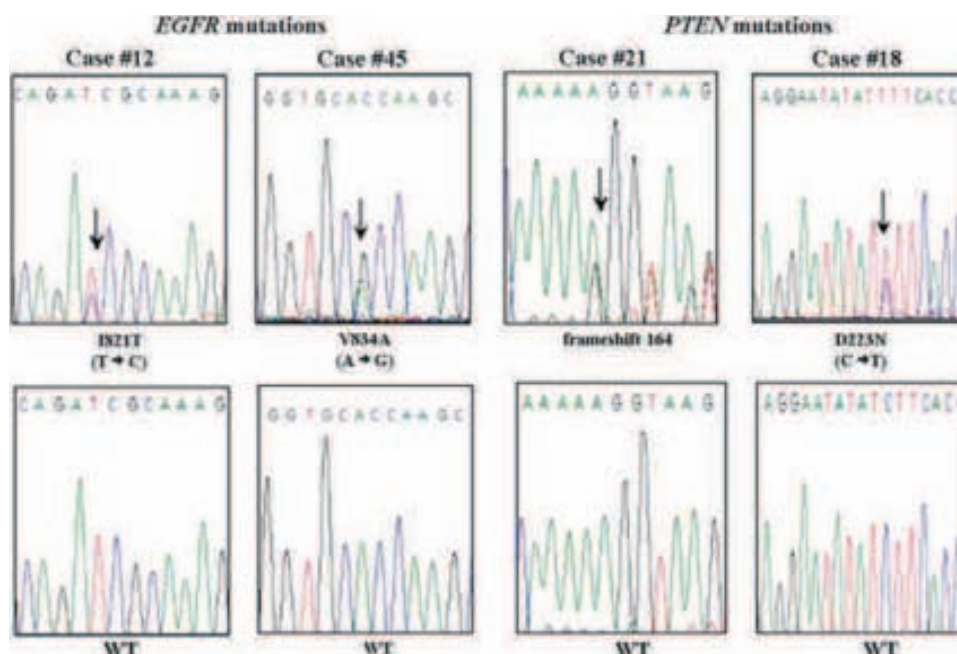
EGFR mutations were sought in 98 and *PTEN* mutations in 92 prostate adenocarcinoma samples. All the cases analyzed for *PTEN* were also tested for *EGFR*. Of 98, 8 (8.2%) adenocarcinomas harbored *EGFR* mutations, and of 92 adenocarcinomas, 3 (3.3%) had *PTEN* mutations (Table 1).

All *EGFR* mutations were located in exons 20 and 21. Two of them were found in Gleason score 6 adenocarcinomas (2 of 32; 6.3%) and 6 of them in Gleason ≥ 7 adenocarcinomas (6 of 66; 9.1%). We identified 5 mutations: I821T and I789I in exon 20, and L858L, H870N and V834A in exon 21. The most common mutation was V834A substitution, present in three adenocarcinomas. Only the L858L silent change had been previously reported (Figure 1).

We also found two polymorphisms: Q787Q in exon 20 and IVS18+19 in intron 18. Both of them have been described previously in normal population (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) with frequencies of 43 and 3%, respectively, in heterozygosity. The Q787Q polymorphism was detected in 69 cases (70.4%), and the intron 18 polymorphism IVS18+19 was detected in 17 cases (17.3%). Fifteen prostate adenocarcinomas presented both polymorphisms in the same sample.

Table 1 Spectrum of *EGFR* and *PTEN* mutations and pathological features of mutated prostate adenocarcinomas

Case no.	Adenocarcinoma precedence	Gleason's score	Mutation	Type of alteration	Gene	Codon
12	Prostatectomy	G3+4	I821T	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 20
69	Prostatectomy	G3+3	I821T	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 20
45	Prostatectomy	G3+4	V834A	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 21
27	Metastasis	G8-10	V834A	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 21
52	Prostatectomy	G3+4	V834A	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 21
48	Prostatectomy	G3+3	I789I	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 20
67	Prostatectomy	G3+4	H870N	Missense	<i>EGFR</i>	Exon 21
80	Prostatectomy	G4+5	L858L	Silent	<i>EGFR</i>	Exon 21
18	Cystoprostatectomy	G3+4	D223N	Missense	<i>PTEN</i>	Exon 7
21	Prostatectomy	G5+5	Del 164	Stop	<i>PTEN</i>	Exon 5
32	Prostatectomy	G3+4	P95S	Missense	<i>PTEN</i>	Exon 5

**Figure 1** *EGFR* and *PTEN* sequence analysis in prostate tumors. Case 1 presented a mutation in exon 20, transition T→C at codon 821. Case 2 presented a mutation in exon 21, transition A→G at codon 834. Case 3 presented a deletion of an adenine at codon 164 in exon 5. Case 4 presented a mutation in exon 7, transition C→T at codon 223.

Thus, the prevalence of both polymorphisms was higher in our series of prostate adenocarcinomas than in the SNPs database; 17.3 vs 3% for IVS18+19 and 70.4 vs 43% for Q787Q. Distribution of adenocarcinoma polymorphisms according to the Gleason score classification is shown in Figure 2. The presence of IVS18+19 was statistically associated with more aggressive prostate adenocarcinomas (Gleason ≥ 8 adenocarcinomas and metastases) (Fisher's exact test $P = 0.042$). With exception of two cases, all adenocarcinomas with IVS18+19 presented also Q787Q polymorphism.

Only 3 of 92 adenocarcinomas (3.3%) showed *PTEN* mutations. Two of them carried missense mutations, P95S (exon 5) and D223N (exon 7), and one had a deletion of an adenine leading to a premature stop in codon 164 (exon 5) (Figure 1). Both cases with missense mutations were Gleason

score 7 adenocarcinomas, and the case with the *PTEN* truncating mutation was a Gleason score 10 adenocarcinoma.

Taking together mutational analyses of both genes, 11 (11.6%) adenocarcinomas presented a genetic alteration in the *EGFR*-*PTEN* signaling pathway. Presence of *PTEN* and *EGFR* somatic alterations seemed to be mutually exclusive, because none of the adenocarcinomas harbored mutations in both genes.

For the statistical analysis, we have excluded three cases in which it was not possible to perform *PTEN* mutational study and *EGFR* was wt. If we analyze the overall prevalence of *EGFR* and *PTEN* mutations according to Gleason score, 2 of 32 (6.3%, Gleason score 6), 6 of 38 (16%, Gleason score 7) and 3 of 25 (12%, Gleason score ≥ 8 and metastases) had a mutation. Prevalence of mutations in Gleason

score 7 and >7 adenocarcinomas was similar, so considering only two groups (adenocarcinomas with Gleason score 6 vs adenocarcinomas with Gleason score ≥ 7), 2 of 32 (6.3%) adenocarcinomas with Gleason score 6 presented a mutation vs 9 of 63 (14.3%) adenocarcinomas with Gleason score ≥ 7 . Although, this difference is not statistically significant, it seems that mutations in EGFR-PTEN signaling pathways may be more frequent in high Gleason score adenocarcinomas.

EGFR and PTEN immunohistochemistry

In 75 adenocarcinomas we analyzed the protein expression using immunohistochemistry. Normal,

atrophic and hyperplastic prostate glands showed EGFR protein expression in basal cells. Neoplastic prostate glands had no expression in most of the cases ($n=48$), whereas EGFR immunostaining was detected in 27 adenocarcinomas. EGFR overexpression was considered when adenocarcinoma cells showed an immunohistochemical score from 2+ to 3+. Thus, 23 adenocarcinomas (31%) overexpressed EGFR. In 4 of 27 adenocarcinomas we found a very weak expression, classified as score 1+, and we grouped them with the negative cases. Nine adenocarcinomas were considered as score 2+, and 14 cases showing very strong EGFR expression were classified as score 3+. EGFR-overexpressing adenocarcinomas belonged to different Gleason score groups: 6 of 28 (21.4%) were Gleason score 6, 8 of 28 (28.6%) Gleason score 7 and 9 of 19 (47.4%) Gleason score ≥ 8 and metastases (Figure 3). Comparing adenocarcinomas with Gleason score ≤ 7 and adenocarcinomas with Gleason score ≥ 8 and metastases, 14 of 56 (25%) vs 9 of 19 (47.4%) showed EGFR overexpression (Pearson's χ^2 -test, $P=0.068$), indicating that there is a statistical trend toward EGFR overexpression to be associated with the more aggressive prostate adenocarcinomas. In 75 samples, both mutation and protein expression analyses were performed. There was no statistical association between the presence of mutation and EGFR overexpression.

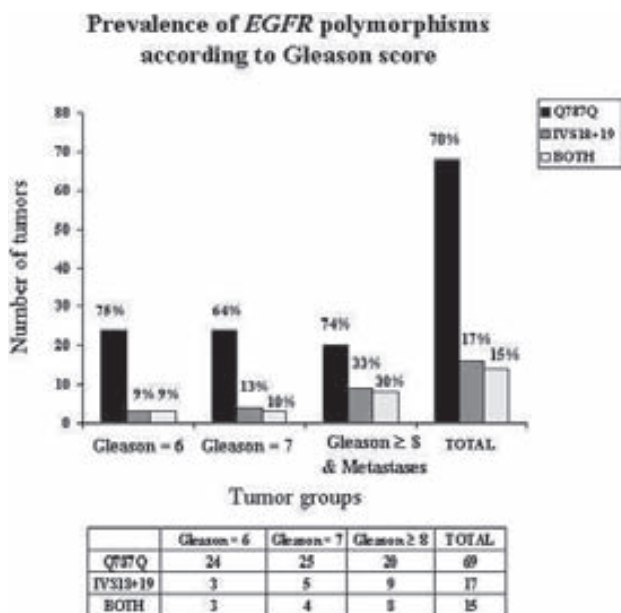


Figure 2 Prevalence of EGFR polymorphisms in the different adenocarcinoma Gleason scores. IVS18+19 is associated with more aggressive prostate adenocarcinomas (Gleason score ≥ 8 adenocarcinomas and metastases) (Fisher's exact test $P=0.042$).

FISH Analysis of EGFR

EGFR gene amplification was investigated by FISH analysis in 31 adenocarcinomas, 13 cases were Gleason score 6 and 14 were Gleason score ≥ 7 and 4 were Gleason score ≥ 8 and metastases. None of the 31 cases showed EGFR amplification, being EGFR/centromere 7 ratios <1.5 . Four cases (4 of 31; 13.3%) had gain of EGFR gene due to chromosome 7 polysomy. All of these cases had 3–5 copies of chromosome 7 in 30–70% of the cells (Figure 4).

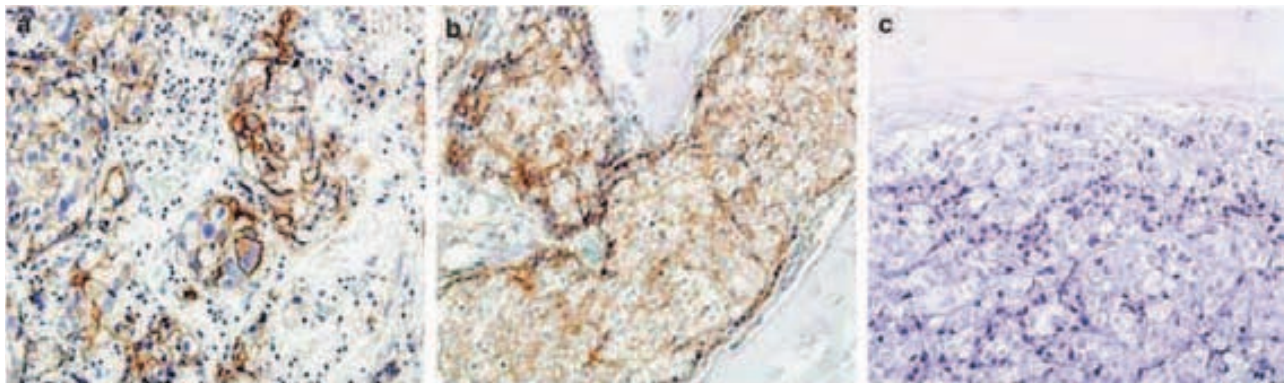


Figure 3 Examples of immunohistochemical expression of EGFR in prostate adenocarcinomas. (a) Gleason score 9, wild-type prostate adenocarcinoma showing moderate to strong EGFR expression. (b) Gleason score 9 bone metastatic adenocarcinoma, wild-type, showing moderate EGFR expression. (c) Absence of EGFR expression in a V834A bone metastatic mutant adenocarcinoma (original magnification, $\times 200$).

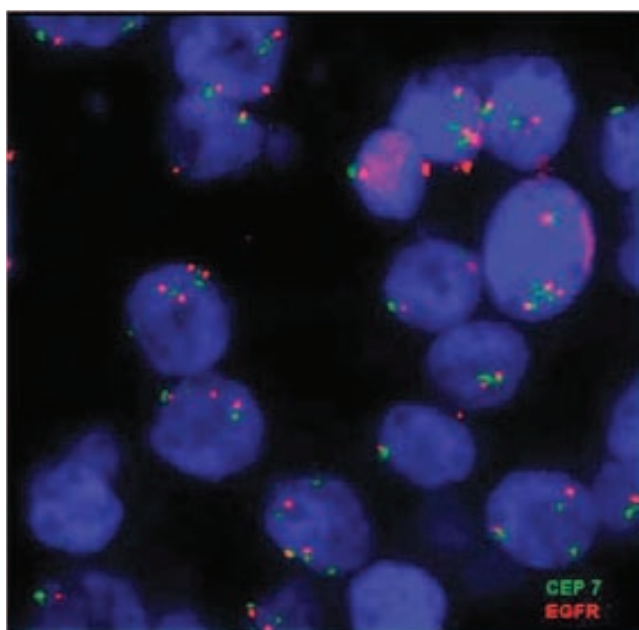


Figure 4 Cells with chromosome 7 polysomy. The adenocarcinoma cells show 3–4 signals of chromosome 17 (green) accompanied by 3–4 signals of *EGFR* gene (orange).

Although the number of cases with *EGFR* gain is low and we have not found statistical significance (Fisher's exact test, $P=0.120$), the presence of polysomy seems to be related with high-grade adenocarcinomas, as all cases with chromosome 7 gain were Gleason score ≥ 7 .

In 23 adenocarcinomas, immunohistochemistry of both EGFR and FISH analyses could be performed. There was no relationship between EGFR protein expression and gene copy number tested using FISH analysis: the five EGFR-overexpressing adenocarcinomas in this subgroup did not show *EGFR* gain and one adenocarcinoma with polysomy did not show EGFR immunostaining. No information regarding immunohistochemical expression was available for the other three cases with *EGFR* gain due to polysomy. However, the number of cases studied for both analyses was too low to draw definitive conclusions.

Total EGFR and PTEN Alterations

Including as EGFR alterations somatic mutation, copy number gain and/or immunohistochemical expression, 31 adenocarcinomas presented an aberrant event in the EGFR molecule or gene (Figure 5). The most frequent aberrant activating event was EGFR protein overexpression, present in 31.1% of prostate adenocarcinomas analyzed by immunohistochemistry. In 75 cases we performed both mutation and immunohistochemistry analyses, and in 30 cases we performed both mutation and FISH analyses. Overexpression and mutation were coexistent in only four cases. Nevertheless, taking into account that we have combined information on the three analyses in 23 adenocarcinomas only, it has not been possible to

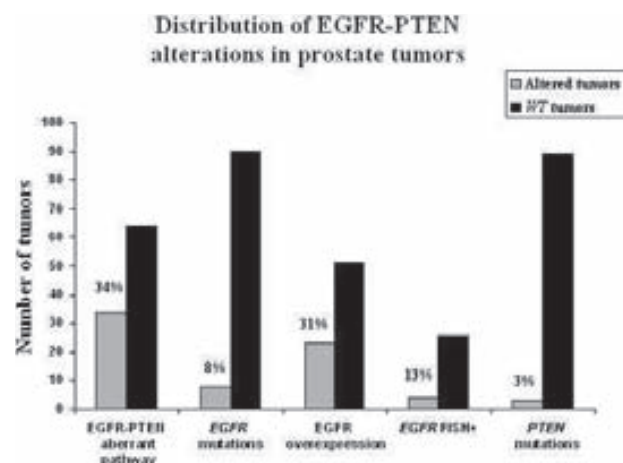


Figure 5 Distribution of EGFR-PTEN alterations in prostate adenocarcinomas. The most frequent type of alteration was EGFR overexpression, with a prevalence of 31%.

determine whether the different types of EGFR alterations are coexistent or exclusive. In any event, we tested the distribution of total EGFR aberrant events in our series of prostate adenocarcinomas. If we classify the altered EGFR adenocarcinomas according to their Gleason score, 8 of 32 Gleason score 6 adenocarcinomas (25%), 11 of 38 Gleason score 7 adenocarcinomas (29%) and 12 of 28 Gleason score ≥ 8 and metastases (43%) presented an EGFR alteration.

Comparing adenocarcinomas with Gleason scores ≤ 7 and >7 , we found that the prevalence of alterations was 27 vs 43%. Taking together total EGFR alterations and *PTEN* mutations, we found that 34 adenocarcinomas (35%) presented an aberrant event in the EGFR-PTEN signaling pathway. However, for the statistical analysis, we excluded negative cases in which it was not possible to test EGFR or *PTEN* alterations by all the techniques. Thus, in 52 adenocarcinomas we could test the association between immunohistochemistry and FISH positivity, mutations and Gleason classification. Alterations in the EGFR-PTEN signaling were related to an increasing Gleason score of the adenocarcinomas. Eight of 17 (47%) Gleason score 6, 13 of 20 (65%) Gleason score 7 and 13 of 15 (86.7%) of Gleason score ≥ 8 and metastases presented EGFR overexpression or EGFR copy number gain or somatic mutations (Pearson's χ^2 -test, $P=0.063$). Comparing Gleason score ≤ 7 adenocarcinomas with Gleason score ≥ 8 adenocarcinomas and metastases, we found that the presence of alterations in EGFR or *PTEN* was statistically associated with higher-grade prostate adenocarcinomas (Pearson's χ^2 -test, $P=0.04$; Figure 6).

Relationship between EGFR Status and Biochemical Recurrence

Of the 49 patients with available PSA data and a follow-up of at least 24 months, biochemical

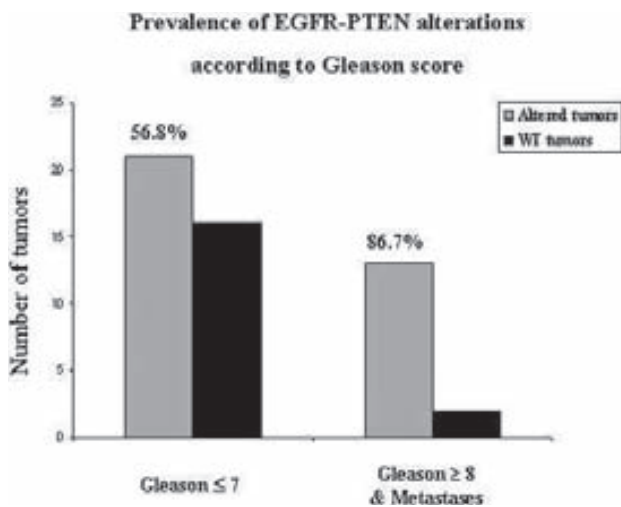


Figure 6 For the statistical analysis, we excluded negative cases in which it was not possible to test EGFR or PTEN alterations by all the techniques. Comparing Gleason score ≤ 7 with Gleason score ≥ 8 and metastases, EGFR-PTEN alterations are statistically associated with higher-grade prostate adenocarcinomas (Pearson's χ^2 -test, $P=0.04$).

recurrence was detected in 13, whereas in the remaining 36 cases there was no sign of biochemical or clinical recurrence at last follow-up. Fourteen cases in this subgroup with available PSA data showed some type of EGFR alteration and one presented a *PTEN* mutation, whereas the remaining 34 cases were wt. No statistical association between *EGFR-PTEN* mutations and recurrence, nor between EGFR overexpression and biochemical PSA values was found, although only 8% of cases without EGFR overexpression showed biochemical recurrence, whereas 30% of patients with EGFR-overexpressing adenocarcinomas did. In addition, there was no statistical association between the polymorphic variants and recurrence, although the percentage of patients who showed biochemical PSA increase at follow-up was higher in cases with the IVS18+19 variant (36.4%, corresponding to 4 of 11 cases with the polymorphism) compared with those without it (23.7%, or 9 from 29 cases without the polymorphism).

Finally, there was a significant association between combined Gleason score and biochemical recurrence, as about 67% of Gleason score ≥ 8 and metastatic patients developed biochemical recurrence, whereas only 24% of Gleason score 7 and none of Gleason score 6 patients did recur (Fisher's exact test $P<0.0001$). These results are an indication that this series of patients was not biased and reflected the normal spectrum of the disease.

Discussion

The molecular changes involved in the pathogenesis and the natural history of prostate adenocarcinoma are poorly understood. Thus, the essential steps that

mark the transition from the early phases of prostate cancer development to more aggressive stages of the disease are not known. The main parameters guiding therapy and prognosis are still pathological grade and stage. There is a need for new prognostic and therapeutic markers, particularly with the development of new molecular-targeted therapies, such as the anti-EGFR molecules. In this study, we have investigated the changes in EGFR and PTEN in different clinical-pathological subsets of prostate cancer.

Increased levels of *EGFR* gene expression have been detected in a high variety of human adenocarcinomas including prostate cancer, mainly using immunohistochemical techniques, and they have been frequently related to adverse prognosis. However, whether EGFR overexpression is a prognostic factor in patients with these adenocarcinomas is still controversial.^{1,3,6} Till date, very few reports have analyzed the *EGFR* mutational status in prostate cancer. In fact, only three articles have reported the presence of *EGFR* somatic mutations in this type of adenocarcinoma, all of them based on a small number of cases. To date, the prevalence of *EGFR* somatic mutations in prostate cancer published in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk) is about 6%. Douglas *et al*¹⁵ identified the presence of *EGFR* mutations in prostate cancer for the first time, and they found four not previously reported missense mutations in the tyrosine kinase domain of EGFR. The prevalence of mutations in this study was 4.5% (4 of 89 patients). Interestingly, the samples analyzed belonged to Caucasian, African American and Korean patients, and three of the four mutated adenocarcinomas were from Korean patients. Later on, Cai *et al*³³ reported that three of these four mutations were constitutively active oncogenic mutations. Schlomm *et al*¹³ also analyzed the *EGFR* exons 18–21, but did not find mutations, although the number of adenocarcinomas analyzed was very low. Cho *et al*¹⁴ reported nine *EGFR* mutations in three advanced prostate cancer cases, and they were not confirmed by additional independent rounds of PCR amplification and sequencing.

To the best of our knowledge, this is the first study in which the significance of the EGFR and PTEN alterations in prostate cancer is investigated focusing on the relationship among somatic mutations, gene amplification and protein expression. In addition, this is the largest series of prostate cancer cases in which *EGFR* mutations have been analyzed. Moreover, this is the first study reporting mutations of *EGFR* and *PTEN* in the same series of prostate adenocarcinomas. Our study data indicate a prevalence of 8.2% for *EGFR* and 3.3% for *PTEN* mutations. Taking together both genes, 11.3% prostate adenocarcinomas presented somatic point alterations in the EGFR-PTEN signaling pathway. The prevalence of mutations was higher in aggressive prostate adenocarcinomas (Gleason score

≥ 7), although this trend was not statistically significant. The presence of *EGFR* and *PTEN* mutations seemed to be mutually exclusive because none of the adenocarcinomas harbored mutations in both genes.

PTEN mutation prevalence in our series is lower than that reported previously. We have found only three *PTEN* mutations, two of them had been previously described in other tumor types^{34,35} and the missense mutation D223N has not been reported before. In the prostate cancer literature, *PTEN* mutations have been described with discrepant data.^{26–30} It is noteworthy that although *PTEN* mutations were reported in prostate cancer for the first time in 1997³⁶ relatively few papers have analyzed the mutational status of this gene in prostate cancer since then, and perhaps the number of adenocarcinomas tested in these studies has been too small to establish the true prevalence of somatic mutations in primary prostate cancer.

In the *EGFR* mutational analysis, the percentage of mutations is also low, about 8%. Nevertheless, the percentage of *EGFR* mutations reported in the literature on human adenocarcinomas is also low. The highest incidence of *EGFR* mutations in Caucasian patients (10%) has been reported in NSCLC, followed by adrenocortical carcinoma (9%) (<http://www.sanger.ac.uk/>). According to our study results, prostate cancer would be the third most frequent neoplasm harboring somatic *EGFR* mutations.

Most of *EGFR* mutations described in human adenocarcinomas are located in the tyrosine kinase domain, affecting exons 18–21. The in-frame deletion in exon 19 involving codons 746–753, and a missense mutation leading to a substitution at codon 858 (L858R) in exon 21, are two mutation hotspots, which account for more than 90% of all detected mutations in lung cancer.^{37–40} Codon 858 is the most frequently mutated hotspot for *EGFR* in human cancer, and missense mutation L858R is almost exclusive of lung cancer, where it constitutes around 42% of *EGFR* mutations (<http://www.sanger.ac.uk/>).

In our series of prostate adenocarcinomas we have found mutations in exons 20 and 21 of *EGFR*. Although the L858L change had already been reported in upper aerodigestive tract adenocarcinomas, the remaining mutations are described for the first time in this article. Interestingly, codons 834 and 870, which contained mutations in four prostatic adenocarcinomas in our series, have been found to be mutated in lung, thyroid and head and neck adenocarcinomas, but with different resulting amino-acid changes (<http://www.sanger.ac.uk/>). From previous reports in prostate cancer and other primary adenocarcinomas, data contained in the 'Catalogue of Somatic Mutations in Cancer' database (<http://www.sanger.ac.uk/>), and our own results, it appears that in lung cancer *EGFR* mutations occur mostly as hotspot somatic mutations, whereas in other adenocarcinoma types they are distributed in different codons along exons 18–21. The E709K

missense mutation, found in two prostate adenocarcinomas by Cho *et al*¹⁴ could be considered an exception, as it has been found also in 11 lung cancer samples (<http://www.sanger.ac.uk/>).

Several authors have analyzed the immunohistochemical expression of EGFR in prostate cancer. There is a high variability of EGFR expression, ranging from 1 to 100% in different studies.^{5,13,41,42} Data on the relationship between Gleason score and EGFR expression are also conflicting.^{43–45} In recent papers, there is more agreement in the association between EGFR immunostaining and advanced adenocarcinoma stage, high Gleason score and preoperative PSA. These results support a role for EGFR expression in the development of prostate cancer and in the progression to an androgen-independent, hormone-refractory clinical phase.^{5,13,42} Schlommm *et al*¹³ reported EGFR immunostaining in 18% of samples, in a large tissue microarray immunohistochemical study with more than 2000 adenocarcinomas. In addition, it has been suggested that EGFR overexpression is significantly less common in Caucasian (18%) than in African American (46%) and Korean (72%) patients.^{15,41} We have found EGFR expression in 31% of adenocarcinomas, a higher percentage than that of previous reports based on Caucasian populations.^{13,15,41} Moreover, our study results concur with those of Schlommm *et al*¹³ in finding an association between increased EGFR expression and high Gleason score. They also performed mutational analysis in the same cases, with negative results.

Using FISH, Schlommm *et al*¹³ also found gains in *EGFR* copy number due to chromosome 7 polysomy in 3.3% of cases, whereas *EGFR* amplification was observed in 0.3% of cases. In addition, they found a significant association of *EGFR* copy number gains with protein expression, and with higher-grade and advanced-stage adenocarcinomas. In our series, *EGFR* gains were identified in 4 of 30 adenocarcinomas (13.3%), all of them with a low copy number increase (3–5 copies) due to chromosome 7 polysomy. All FISH-positive adenocarcinomas were Gleason score ≥ 7 , and *EGFR* amplification was not found in any of them. Although there was no correlation between EGFR expression and *EGFR* copy number gains, a statistically significant association was found between increase in EGFR, due to either protein overexpression or chromosome 7 polysomy, and high Gleason score.

About 31% of prostate adenocarcinomas in the present series showed *EGFR* overactivation by mutation, overexpression and/or increased copy number. Taking together total EGFR alterations and *PTEN* mutations, 34 adenocarcinomas (35%) presented some sort of aberrant event in the EGFR-PTEN signaling pathway. Total alterations in EGFR-PTEN signaling were related to adenocarcinoma Gleason score, with a statistically significant association with Gleason score ≥ 8 and metastatic adenocarcinomas (Pearson's χ^2 -test, $P = 0.04$).

PTEN mutation represents a minor aberrant event in the pathogenesis of prostate adenocarcinomas. It would be interesting to investigate other *PTEN* alteration mechanisms, such as deletion or epigenetic inactivation. The most common mechanism for *PTEN* inactivation of both alleles is mutation of one of them and deletion of the other, although reduced *PTEN* protein levels are often seen in the absence of genomic abnormalities.^{46,47} Loss of heterozygosity (LOH) of *PTEN* has been frequently reported in primary prostate adenocarcinomas, but the proportion of adenocarcinomas with deletion of one allele and mutation of the other is low.^{29,48} Dong *et al*²⁶ reported, in a series of low-stage adenocarcinomas, that *PTEN* LOH and somatic mutations were uncommon, and they concluded that alteration of *PTEN* was not an early event in prostatic carcinogenesis. Conversely, different studies have indicated that *PTEN* haploinsufficiency could be an early prognostic marker for prostate cancer, and complete loss of expression appears to correlate with pathological markers of poor prognosis and tumor progression.^{20,21,23,25,30,49} Mouse models for prostate cancer also suggest that *PTEN* may have a role in initiation or early progression of the disease.^{18,37,50,51} Interestingly, adenocarcinomas from heterozygous *PTEN*(+/-) mice lose the wt *PTEN* allele, implying that adenocarcinoma formation requires lack of both *PTEN* alleles.²⁴

To the best of our knowledge this is the first paper and the largest series analyzing *EGFR* and *PTEN* mutations in prostate adenocarcinomas from Caucasian population, and also the first to report *EGFR* and *PTEN* mutations in the same series of prostate adenocarcinomas. In addition, we have also tested protein expression by immunohistochemistry and *EGFR* copy number by FISH. We conclude that the *EGFR* signaling pathway is involved in about one third of prostate adenocarcinomas, particularly in high Gleason score adenocarcinomas. Protein overexpression is the most frequent type of *EGFR* aberrant event. Furthermore, overrepresentation of *EGFR* due to chromosome 7 polysomy or protein overexpression is statistically associated with more aggressive prostate adenocarcinomas. Mutations in *EGFR* and *PTEN* are a minor event, although they are involved in about 11% of prostate cancers, and thus prostate cancer ranks third among adenocarcinomas with *EGFR* mutations. The use of tyrosine kinase inhibitors could be beneficial in the treatment of prostate cancer, however it is imperative to investigate other downstream regulatory elements of *EGFR* signaling, to choose the more adequate targets for effective cancer treatment.

Acknowledgements

The study was funded with grants FIS/Instituto Carlos III/FEDERPI06/1411 and PS09/01106 from the Spanish Ministry of Health and Support Grant

2008 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board). We thank Sergi Mojal (Department of Biostatistics, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain) for the technical support.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Normanno N, De Luca A, Bianco C, *et al*. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366:2–16.
- 2 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127–137.
- 3 Sibilio M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, *et al*. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007;75:770–787.
- 4 Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, *et al*. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:120–139.
- 5 Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, *et al*. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438–3444.
- 6 Sharma SV, Bell DW, Settleman J, *et al*. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169–181.
- 7 Janne PA, Johnson BE. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006;12:4416s–4420s.
- 8 Kwak EL, Jankowski J, Thayer SP, *et al*. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:4283–4287.
- 9 Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009;15:1133–1139.
- 10 Lee J, Jang KT, Ki CS, *et al*. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2007;109:1561–1569.
- 11 Lee JW, Soung YH, Kim SY, *et al*. Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2005;11:2879–2882.
- 12 Nagahara H, Mimori K, Ohta M, *et al*. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1368–1371.
- 13 Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, *et al*. Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6579–6584.

- 14 Cho KS, Lee JS, Cho NH, *et al*. Gene amplification and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2008;68:803–808.
- 15 Douglas DA, Zhong H, Ro JY, *et al*. Novel mutations of epidermal growth factor receptor in localized prostate cancer. *Front Biosci* 2006;11:2518–2525.
- 16 Fang J, Ding M, Yang L, *et al*. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate adenocarcinoma angiogenesis. *Cell Signal* 2007;19:2487–2497.
- 17 Gao N, Zhang Z, Jiang BH, *et al*. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:1124–1132.
- 18 Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in adenocarcinoma suppression. *Cell* 2000;100:387–390.
- 19 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in adenocarcinomaigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:150–158.
- 20 Liu W, Zhou Y, Reske SN, *et al*. PTEN mutation: many birds with one stone in adenocarcinomaigenesis. *Anticancer Res* 2008;28:3613–3619.
- 21 Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* 2006;241:184–196.
- 22 Liu W, Chang B, Sauvageot J, *et al*. Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:1018–1032.
- 23 Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, *et al*. Haploinsufficiency of the Pten adenocarcinoma suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11563–11568.
- 24 Schmitz M, Grignard G, Margue C, *et al*. Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. *Int J Cancer* 2007;120:1284–1292.
- 25 Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, *et al*. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 2007;97:678–685.
- 26 Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, *et al*. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. *Oncogene* 1998;17:1979–1982.
- 27 Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006;97:433–447.
- 28 Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:7465–7474.
- 29 Pesche S, Latil A, Muzeau F, *et al*. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* 1998;16:2879–2883.
- 30 Whang YE, Wu X, Suzuki H, *et al*. Inactivation of the adenocarcinoma suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5246–5250.
- 31 Sarker D, Reid AH, Yap TA, *et al*. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4799–4805.
- 32 Hernandez S, de Muga S, Agell L, *et al*. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2009;22:848–856.
- 33 Cai CQ, Peng Y, Buckley MT, *et al*. Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations. *Oncogene* 2008;27:3201–3210.
- 34 Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, *et al*. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:288–295.
- 35 Tashiro H, Blazes MS, Wu R, *et al*. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:3935–3940.
- 36 Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943–1947.
- 37 Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, *et al*. Mechanisms of *egfr* gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 2006;12:7252–7260.
- 38 Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;63:315–321.
- 39 Zhang X, Chang A. Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell lung cancer. *J Med Genet* 2007;44:166–172.
- 40 Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007;98:1817–1824.
- 41 Shuch B, Mikhail M, Satagopan J, *et al*. Racial disparity of epidermal growth factor receptor expression in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4725–4729.
- 42 Zellweger T, Ninck C, Bloch M, *et al*. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005;113:619–628.
- 43 Ibrahim GK, Kerns BJ, MacDonald JA, *et al*. Differential immunoreactivity of epidermal growth factor receptor in benign, dysplastic and malignant prostatic tissues. *J Urol* 1993;149:170–173.
- 44 Morris GL, Dodd JG. Epidermal growth factor receptor mRNA levels in human prostatic adenocarcinomas and cell lines. *J Urol* 1990;143:1272–1274.
- 45 Turkeri LN, Sakr WA, Wykes SM, *et al*. Comparative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Prostate* 1994;25:199–205.
- 46 Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:171–176.
- 47 Uzoh CC, Perks CM, Bahl A, *et al*. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. *BJU Int* 2009;104:556–561.
- 48 Feilolter HE, Nagai MA, Boag AH, *et al*. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998;16:1743–1748.
- 49 McMenamin ME, Soung P, Perera S, *et al*. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291–4296.
- 50 Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, *et al*. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1563–1568.
- 51 Ratnacaram CK, Teletin M, Jiang M, *et al*. Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2521–2526.

3.3. Article 3 (enviat a Human Pathology): Sobreexpressió de l'ARNm de CXCR4 en tumors prostàtics d'alt grau: manca d'associació amb el reordenament TMPRSS2-ERG

La fusió *TMPRSS2-ERG* s'ha descrit en un 42 a 78% dels càncers prostàtics. Més del 90% dels tumors de pròstata que sobreexpressen ERG, presenten aquesta fusió. La relació entre la presència de la fusió i el pronòstic és controvertida. *CXCR4* està sobreexpressat en un alt percentatge de metàstasis de càncer de pròstata. Diferents estudis han suggerit una associació entre *CXCR4* i la sobreexpressió d'ERG, donada pel reordenament *TMPRSS2-ERG*. L'objectiu d'aquest estudi va ser investigar la possible associació entre l'expressió de *CXCR4*, la fusió *TMPRSS2-ERG* i el grau de Gleason en càncer de pròstata. Per això, vam investigar el reordenament de *TMPRSS2-ERG* per FISH (n = 44), l'expressió de la proteïna d'ERG per IHC (n = 84), i l'expressió d'ARNm de *CXCR4* per RT-PCR quantitativa (n = 44) en una sèrie de tumors prostàtics primaris. El reordenament *TMPRSS2-ERG* i l'expressió proteica d'ERG van ser presents en quasi un 50% dels tumors, sense diferències estadístiques entre els diferents grups de Gleason. Hi havia una elevada concordança entre les tècniques de FISH i de IHC (Índex Kappa = 0.954). El 70% dels tumors de pròstata amb Gleason ≥ 8 sobreexpressaven l'ARNm de *CXCR4*, i la diferència en l'expressió de *CXCR4* amb els casos amb Gleason < 8 va ser estadísticament significativa (p = 0.009). No hi havia associació entre la proteïna d'ERG i l'expressió d'ARNm de *CXCR4*. En conclusió, els nostres resultats demostren, per primer cop, que la sobreexpressió de *CXCR4* està associada amb tumors de pròstata d'alt grau, encara que és independent del reordenament *TMPRSS2-ERG*. A més, els nostres resultats també confirmen la manca d'associació entre *TMPRSS2-ERG* i el grau de Gleason, i confirmen la utilitat de la immunohistoquímica d'ERG per la detecció del reordenament *TMPRSS2-ERG*.

DISCUSSIÓ

4. DISCUSSIÓ

El càncer de pròstata és el càncer més freqüent en homes a Europa, i la segona causa de mort per càncer en l'home, al món occidental. La seva incidència està augmentant, i la tasa de progressió es manté al voltant del 30% ^(246,247).

La determinació sèrica de l'antigen prostàtic específic i els mètodes de detecció més refinats estan incrementant el nombre de pacients que es sotmeten a tractament radical per tumors que potser estan en fases molt inicials, que no progressarien o que podrien arribar a progressar, però després de molts anys. Donen lloc, per tant, a un increment de la supervivència, però també a una tasa més elevada de morbiditat ⁽²⁴⁸⁾. Degut a la dificultat d'obtenir mostres amb un alt rendiment per fer anàlisis moleculars en tumors inicials, encara no es coneixen els gens que podrien ser decisius per a la transició d'un estat latent a una fase agressiva que porti a la progressió. Per tant, no hi ha criteris definitius i segurs per seleccionar pacients per a un tractament menys radical o per seguiment actiu (*safe watchful waiting*).

S'han investigat diferents gens per determinar el seu paper potencial en el desenvolupament i progressió del càncer de pròstata ^(249,250). No obstant, actualment no hi ha marcadors moleculars rellevants associats amb la progressió del tumor, amb els diferents subtipus de càncer de pròstata o amb alguna de les seves característiques clinicopatològiques. Cal una millor identificació dels pacients que tenen baix risc de progressió, per evitar el seu sobretractament, així com per poder predir quins pacients progressaran i tractar-los d'una forma més radical.

Les alteracions moleculars de *FGFR3* semblen restringides a determinats tipus de tumors humans. Les mutacions en aquest gen s'han descrit en càncer de bufeta i cèrvix, mieloma múltiple, càncer de còlon i, més recentment, en tumors benignes de pell ^(74-80,83,89). La relativa elevada prevalença de mutacions de *FGFR3* en tumors benignes de pell i en tumors de bufeta no invasius suggereix una associació entre mutacions de *FGFR3* i càncers de baix risc ^(86,251). Encara que sembla que la senyalització anòmala dels FGFs està involucrada en la carcinogènesi prostàtica, el paper funcional de *FGFR3* i de les seves alteracions en càncer de pròstata són encara desconeguts.

L'objectiu d'aquest estudi va ser investigar la prevalença de mutacions somàtiques de *FGFR3* en un ampli grup de tumors de pròstata ben definits, classificats per grau combinat de Gleason. Aquest, és el primer estudi sobre la presència d'alteracions genètiques de *FGFR3* en càncer de pròstata. L'anàlisi mutacional, comprovat per duplicat, va demostrar que *FGFR3* està mutat en una petita proporció (8%) de tumors de pròstata. També vam trobar el polimorfisme F386L en un 2% dels casos.

Si agrupem els casos segons el grau de Gleason, la presència d'alteracions de *FGFR3* estava associada amb els tumors de pròstata menys agressius, ja que el 89% de les mutacions (8 de 9) van ser trobades en tumors amb grau de Gleason = 6 i el 100% de les mutacions es van trobar en tumors amb grau de Gleason ≤ 7 i, conseqüentment, cap dels tumors amb grau de Gleason ≥ 8 ni els tumors metastàtics tenien mutacions d'aquest gen. Si comparem tots els casos de grau = 6 amb els casos de grau > 6 i metàstasis agrupats, la presència de mutacions en el primer grup era estadísticament significativa. Per tant, vam concloure que les mutacions de *FGFR3* estaven associades a un grup de tumors de pròstata amb baix grau combinat de Gleason.

Només dos estudis previs havien analitzat l'estat mutacional de *FGFR3* en càncer de pròstata, i cap d'ells va trobar mutacions^(80,101). Sibley i cols⁽⁸⁰⁾ van analitzar l'estat mutacional dels exons 7, 10 i 15 en només 10 mostres, i també en les línies cel·lulars de càncer de pròstata DU145, PC3 i LNCap. En concordança amb el nostre estudi, DU145 i PC3 van ser normals per *FGFR3*. Tampoc no van trobar mutacions en altres tipus de tumors inclosos al seu estudi, com càncer d'estómac, còlon, ovari, cervell i ronyó. En la majoria d'aquests subgrups, el nombre de mostres era massa baix per treure conclusions definitives. En un estudi posterior, Jang i cols⁽⁸³⁾ van descriure la presència de mutacions somàtiques de *FGFR3* en un 5% de tumors de còlon, en una sèrie de 40 casos.

Naimi i cols⁽¹⁰¹⁾ van investigar l'estat mutacional del punt de connexió entre els dominis II i III de la immunoglobulina de *FGFR3*, que inclou l'exó 7 del gen, en 20 tumors. En aquest estudi tampoc es van trobar mutacions. Segons els nostres resultats, la prevalença de mutacions en casos amb Gleason ≤ 7 es troba al voltant d'11%, i la

major part eren casos de Gleason = 6. A l'estudi de Naimi i cols ⁽¹⁰¹⁾, només van estudiar 14 tumors amb Gleason ≤ 7 , per tant, el nombre de mostres s'apropava al límit de detecció.

Segons les característiques clinicopatològiques dels tumors, la prevalença de mutacions als tumors d'autòpsies (latents) va ser 6% i en mostres de biòpsia 9%. En aquest sentit, aquest gen no sembla estar alterat selectivament en el grup de tumors trobats en autòpsia els quals, en teoria, són tumors quiescents, de baix grau i creixement lent.

Al revisar les dades clinicopatològiques dels pacients es va veure que, alguns d'ells presentaven, a part del càncer de pròstata, altres neoplàsies simultànies diferents i independents o prèvies. Les altres lesions identificades en aquests pacients eren, principalment, tumors urotelials i tumors benignes de pell, encara que també hi havia algun cas amb càncer de còlon o pulmó associats. Els resultats de l'estudi mutacional van ser comparats en dos subgrups: els casos que només tenien càncer de pròstata, G1, i els casos amb càncer de pròstata i una neoplàsia addicional diferent, G2 (bufeta, pell, còlon o pulmó). Comparant l'estat de *FGFR3* en aquests dos subgrups, la presència de mutacions de *FGFR3* era molt més prevalent en el G2. En el grup de pacients amb càncer de pròstata i altres tumors, un 23% tenia mutacions de *FGFR3* en el tumor prostàtic, comparat amb un 2% de mutacions en pacients que només tenien càncer de pròstata. En analitzar per separat les diferents combinacions de tumors del grup G2, la prevalença de mutacions de *FGFR3* en pacients amb càncer de pròstata i bufeta era molt superior (17%) que en pacients amb només tumor de pròstata (2%). A més, el 50% dels casos amb càncer de pròstata i de pell presentaven mutacions de *FGFR3* en el tumor de pròstata. Finalment, en un cas amb càncer de pròstata i còlon, el tumor prostàtic tenia una mutació. Per tant, és possible concloure que les mutacions de *FGFR3* són més prevalents en un subgrup de tumors de pròstata de pacients amb càncer de bufeta concomitant. Per altra banda, encara que el nombre de casos amb càncer de pròstata i pell és molt baix a la nostra sèrie, la seva coexistència sembla estar estretament relacionada amb mutacions de *FGFR3* en els respectius carcinomes de pròstata.

Com que *FGFR3* és un gen involucrat en carcinomes de bufeta i la presència de mutacions és també freqüent en tumors benignes de pell ^(76,79,86,89,104,251), aquesta

associació entre càncer de bufeta, pell i pròstata suggereix un paper comú de *FGFR3* en la seva patogènia. No obstant, l'anàlisi mutacional dels corresponents tumors de bufeta i mostres de pròstata normal en alguns dels pacients de l'estudi va demostrar que en aquestes lesions les cèl·lules no tenien mutacions en aquest gen. De fet, si la mutació no es dona en línia germinal, el teixit normal no hauria de contenir la mutació. La manca de mutacions de *FGFR3* en els tumors de bufeta dels pacients amb mutacions de *FGFR3* al tumor de pròstata podria indicar que els dos tipus de tumors no estan relacionats. Hem de tenir en compte però, que la majoria dels tumors de bufeta inclosos en el grup amb doble tumor (G2) eren en la seva major part carcinomes urotelials múscul-invasius. És ben conegut que les mutacions de *FGFR3* són freqüents en tumors superficials, però no en tumors múscul-invasius ^(74,77,78,86). Per tant, una altra possible explicació pel discrepant estat mutacional de *FGFR3*, en els tumors de bufeta i pròstata, podria ser que el tumor de bufeta hagués perdut l'al·lel mutat durant la progressió del tumor.

La relació entre tumors de pròstata i de pell no ha estat investigada prèviament. El fet de que el 50% dels pacients amb càncer de pròstata i pell, a la nostra sèrie, presentin mutacions de *FGFR3*, sembla indicar que aquest gen podria estar relacionat amb la patogènia, no només de càncers de bufeta i pell concomitants, com ja ha estat descrit prèviament per membres del nostre grup ⁽⁸⁹⁾, sinó també de l'associació entre càncer de pròstata i tumors de pell. És interessant que, cap dels dos casos amb triple tumor, de pròstata, bufeta i pell, no va presentar mutacions en cap dels tres tumors.

Diferents autors han suggerit una possible associació entre les mutacions de *FGFR3* i la presència de tumors en diferents òrgans ^(89,251). El fet de que una gran proporció de carcinomes urotelials de baix grau i tumors benignes de pell presentin mutacions de *FGFR3* suggereix una implicació d'aquestes mutacions en la patogènia de les dues entitats. A més, se sap que alguns pacients amb nevus epidèrmic desenvolupen un carcinoma urotelial de manera precoç. No obstant, ni els tumors de bufeta, ni els nevus epidèrmics en aquestes sèries prèvies presentaven mutacions de *FGFR3*, i els autors d'aquests treballs van suggerir que altres gens podien estar implicats en la patogènia d'aquests dos tumors en aquests pacients, o que les mutacions de *FGFR3* es podrien donar en altres exons no analitzats ^(89,251). Els nostres resultats en càncer de pròstata, semblen aportar la idea de l'associació entre mutacions de *FGFR3* i presència de tumors en diferents òrgans, especialment bufeta o pell. En no ser una mutació en

línia germinal, es podria pensar que les mutacions podrien afectar diferents teixits de manera selectiva, en els mateixos pacients. En aquest sentit, en estudis previs de nevus epidèrmics s'ha descrit que les mutacions somàtiques de *FGFR3* podrien produir-se en mosaic. Un mosaic, a la pell, es produeix quan mutacions postzigòtiques donen lloc a la presència de dues o més poblacions cel·lulars, genèticament diferents, en el mateix individu ⁽⁹¹⁾. S'ha vist que una proporció de nevus epidèrmics que tenen mosaicisme a la pell es donen per mutacions embrionàries activants en *FGFR3* i *PI3K* ^(89,252,253).

En qualsevol cas, de manera semblant al que passa amb els tumors de bufeta i de pell, l'associació d'alteracions de *FGFR3* amb tumors de pròstata i pell no queda establerta de manera definitiva a partir dels resultats d'aquest treball, calen més estudis en sèries més grans de pacients, per aclarir el paper de *FGFR3* en la patogènia dels diferents tumors coexistents. El tipus cel·lular afectat per les mutacions de *FGFR3*, així com els cofactors i vies de senyalització involucrats podrien contribuir als diferents fenotips tumorals ⁽⁷⁶⁾.

Per altra banda, vam identificar una mutació de *FGFR3* en el tumor de pròstata d'un dels dos casos amb tumor de còlon simultani. Les mutacions d'aquest gen havien estat prèviament descrites en càncer colorectal per Jang i *cols* ⁽⁸³⁾, i podria ser interessant investigar la possible relació entre aquests dos tipus de tumor en una cohort més gran de pacients.

Després del nostre, s'han publicat dos articles ^(100,102) que, com els previs, no han trobat mutacions en aquest gen. Tots dos articles utilitzen la tècnica SNaPshot, basada en una PCR múltiple on analitzen, alhora, 11 mutacions conegudes. No utilitzen, per tant, tècniques més sensibles que la nostra. En aquests estudis, s'han fet servir mètodes de detecció relativament poc sensibles.

Zuiverloon i *cols* ⁽¹⁰²⁾ van estudiar una sèrie més llarga de casos (n = 132), 28 d'ells amb un altre tumor coexistent. Van analitzar els exons 7, 10 i 15 de *FGFR3* i no van trobar mutacions en cap tumor de pròstata. Dels tumors simultanis analitzats, van trobar mutacions en un 60% dels tumors de bufeta, però no en tumors de pàncrees, pell, ronyó, estómac, còlon, fetge ni pulmó. Koufou i *cols* ⁽¹⁰⁰⁾ van estudiar 131 tumors de pròstata i 16 HBP i tampoc van trobar mutacions. Les tècniques emprades per aquests

dos estudis no eren més sensibles que la PCR i seqüenciació directa, utilitzades per nosaltres. No es pot descartar, per tant que, sabent que els tumors de pròstata són heterogenis i amb molt teixit normal contaminant, el problema sigui el dintell de detecció de les mutacions. En favor dels nostres resultats, després de la nostra publicació vam continuar analitzant un altre subgrup de tumors de pròstata amb tumors concomitants, en altres òrgans, i vam trobar dos nous mutants. Cal dir que en els nous casos vam observar que la freqüència final de mutacions no era tant elevada com la que havíem trobat en el nostre primer treball. En tot cas, els nostres resultats indiquen que la majoria de tumors de pròstata amb mutacions de *FGFR3* són de baix grau. De manera similar al que ha estat descrit en càncer de bufeta, les alteracions d'aquest gen en càncer de pròstata semblen associades amb els tumors prostàtics menys agressius. Aquests resultats coincideixen amb el concepte descrit prèviament, de que les mutacions de *FGFR3* són més prevalents en neoplàsies de baix grau o benignes ^(86,251).

Segons el tipus de mutació, s'han descrit un gran nombre de diferents mutacions somàtiques *hotspot* en carcinomes urotelials de baix grau i en queratosis seborreiques (QS), mentre que la majoria de nevus epidèrmics presenten la substitució R248C ^(86,251). La mutació més freqüent trobada a la nostra sèrie de tumors de pròstata va ser la S249C, seguida de la A393E, present en dos tumors. La substitució S249C és la mutació més freqüent en càncer de bufeta i l'única trobada en carcinoma cervical. La A393E és una mutació rara en càncer de bufeta, representa només un 1% de les mutacions descrites. No obstant, aquesta mutació s'ha associat amb tumors de bufeta classificats com a neoplasies de baix potencial de malignitat ^(75,78,86). En queratosis seborreiques, la substitució A393E s'ha descrit amb una prevalença al voltant del 9% de les QS adenoides que presenten mutacions de *FGFR3* ⁽²⁵⁴⁾.

Contrastant amb el paper inhibidor de les formes mutades del gen *FGFR3* en el creixement de l'ós, s'ha suggerit que, en els tumors humans, les mutacions poden tenir un paper oncogènic ⁽²⁵⁵⁾. El mecanisme exacte pel qual *FGFR3b* mutat pot estar involucrat en la progressió del tumor epitelial no es prou conegut. En la substitució S249C, les cisteïnes noves que es creen provoquen la formació de ponts bisulfur entre els dominis extracel·lulars dels dos receptors i una activació constitutiva del receptor, independent de lligand. Per altra banda, la mutació A393E incrementa la proporció de dímers de FGFR3, donant lloc a l'estabilització d'aquests, mesurada pels canvis en

l'energia lliure de dimerització ^(86,256). A més, Bernard-Pierrot i cols ⁽²⁵⁵⁾ van demostrar que *FGFR3b-S249C* era capaç de transformar les cèl·lules NIH-3T3, induint el seu creixement independent d'ancoratge i la transformació del tumor quan s'injectava subcutàniament en ratolins, amb les propietats transformadores que s'atribueixen clàssicament als oncogens.

En conclusió, els resultats d'aquesta part de l'estudi suggereixen que, encara que *FGFR3* no sembla ser un gen central en la patogènia del càncer de pròstata, està associat a una subpoblació de tumors de pròstata de baix grau, i també amb un grup de carcinomes de pròstata trobats incidentalment en pacients amb tumors de bufeta o pell concurrents. Caldran més estudis per aclarir si les alteracions de *FGFR3* són útils per identificar pacients amb baix risc de progressió, i per investigar la possible relació entre alteracions de *FGFR3* i la presència de tumors simultanis en altres òrgans dels mateixos pacients.

Com passa en altres tumors, també en el càncer de pròstata es necessiten nous marcadors, particularment amb el desenvolupament de noves teràpies dirigides a molècules diana com són les molècules anti-EGFR. En aquest estudi vam investigar els canvis en els gens *EGFR* i *PTEN* en diferents grups clínico-patològics de càncer de pròstata.

En una gran varietat d'adenocarcinomes humans, inclòs el càncer de pròstata, s'han detectat alts nivells d'expressió del gen *EGFR*, detectats sobretot amb tècniques d'immunohistoquímica, i s'han relacionat sovint amb mal pronòstic. Tanmateix, és encara controvertit si la sobreexpressió d'EGFR és un factor pronòstic en pacients amb aquests adenocarcinomes o no ^(118,125,126). Fins el moment de la publicació del nostre article, pocs estudis havien analitzat l'estat mutacional d'*EGFR* en càncer de pròstata. De fet, només tres articles havien descrit la presència de mutacions somàtiques d'*EGFR* en aquest tipus d'adenocarcinoma, tots ells en un nombre petit de casos. Fins avui, la prevalença de mutacions somàtiques d'*EGFR* publicada en càncer de pròstata al “*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*” (www.sanger.ac.uk) es situa al voltant del 7%.

Douglas i cols ⁽¹³⁷⁾ van identificar, per primer cop, la presència de mutacions d'*EGFR* en càncer de pròstata, es tractava de quatre mutacions amb canvi d'aminoàcid en el domini tirosina quinasa del gen, no descrites prèviament. La prevalença de mutacions en aquest estudi va ser 4.5% (4 de 89 pacients). Curiosament, les mostres analitzades pertanyien a pacients caucàsics, afroamericans i coreans, i tres d'aquests quatre adenocarcinomes mutats eren de pacients coreans. Posteriorment, Cai i cols ⁽²⁴⁵⁾ van descriure que tres d'aquestes quatre mutacions eren oncogèniques i constitutivament actives. Schlomm i cols ⁽¹³⁹⁾ també va analitzar els exons 18-21 d'*EGFR*, però no van trobar mutacions, potser perquè el nombre de casos analitzats era molt baix. Cho i cols ⁽¹³⁶⁾, per altra banda, van descriure 9 mutacions d'*EGFR* en tres casos de càncer de pròstata avançat, aquestes mutacions però no van ser confirmades amb rondes independents d'amplificació per PCR i seqüenciació addicionals.

Fins on hem pogut saber, aquest és el primer article on s'ha investigat conjuntament el significat de les alteracions d'*EGFR* i *PTEN* en càncer de pròstata, i on s'ha estudiat la relació entre mutacions somàtiques, amplificació gènica i expressió proteica. A més, és la sèrie de càncer de pròstata més gran en la que s'han analitzat les mutacions d'*EGFR*. També, aquest és el primer estudi que descriu mutacions d'*EGFR* i *PTEN* en la mateixa sèrie d'adenocarcinomes de pròstata. En aquest treball hem trobat una prevalença de 8.2% i 3% de mutacions d'*EGFR* i *PTEN*, respectivament. Considerant tots dos gens, un 11.3% dels adenocarcinomes de pròstata presentaven mutacions somàtiques puntuals a la via de senyalització d'*EGFR*-*PTEN*. Aquesta prevalença era més elevada en els adenocarcinomes prostàtics més agressius (grau de Gleason ≥ 7), tot i que aquesta tendència no era estadísticament significativa. La presència de mutacions d'*EGFR* i *PTEN* sembla ser mútuament excloent ja que cap adenocarcinoma presenta mutacions en tots dos gens.

La prevalença de mutacions de *PTEN* a la nostra sèrie ha estat més baixa que la descrita prèviament. Hem trobat només tres mutacions de *PTEN*, dues d'elles prèviament descrites en altres tipus de tumors ^(257,258) i una no descrita prèviament, que donava lloc al canvi d'aminoàcid D223N. En la literatura hi ha discrepàncies sobre les mutacions de *PTEN* en càncer de pròstata, ^(47,185,189,192,200). És important comentar que, encara que les mutacions de *PTEN* van ser descrites en aquesta neoplàsia per primer cop l'any 1997 ⁽²⁵⁹⁾, pocs estudis han analitzat l'estat mutacional d'aquest gen en càncer de

pròstata fins ara, i potser el nombre d'adenocarcinomes analitzats en aquests estudis era massa baix per establir la seva prevalença real.

En l'anàlisi mutacional d'*EGFR*, el percentatge de mutacions també era baix, al voltant del 8%. De fet, el percentatge de mutacions d'*EGFR* descrit a la literatura en adenocarcinomes humans també és baix. Actualment, la incidència més elevada de mutacions d'aquest gen (27%) s'ha descrit en NSCLC, seguit pel carcinoma de pròstata (7%) (www.sanger.ac.uk). D'acord amb els nostres resultats, el càncer de pròstata seria el segon tipus de neoplàsia en el que són més freqüents les mutacions d'*EGFR*.

La majoria de mutacions d'*EGFR* descrites en adenocarcinomes humans es troben al domini tirosina quinasa i afecten als exons 18-21. La deleció sense trencament de la pauta de lectura (*in-frame*) a l'exó 19, que abarca els codons 746-753, i la mutació amb canvi d'aminoàcid (*missense*) que dona una substitució en el codó 858 (L858R), a l'exó 21, són dues mutacions *hotspot*, que representen més del 90% de les mutacions detectades en càncer de pulmó ⁽²⁶⁰⁻²⁶³⁾. El codó 858 d'*EGFR* és el *hotspot* mutat més freqüentment en càncer; i la mutació amb canvi d'aminoàcid L858R és gairebé exclusiva de càncer de pulmó, en el que constitueix un 40% de les mutacions d'aquest gen (www.sanger.ac.uk).

A la nostra sèrie d'adenocarcinomes prostàtics només vam trobar mutacions als exons 20 i 21 d'*EGFR*. Tot i que el canvi L858L s'havia descrit en adenocarcinomes de les vies aèries supressores i l'esòfag, la resta de mutacions han estat descrites per primer cop al nostre article. És interessant comentar que els codons 834 i 870, que contenien mutacions en quatre adenocarcinomes prostàtics de la nostra sèrie, s'han trobat mutats també en adenocarcinomes de pulmó, tiroide i cap i coll, però amb altres canvis d'aminoàcids (www.sanger.ac.uk). Si es tenen en compte els estudis previs en càncer de pròstata i altres adenocarcinomes primaris, les dades que proporciona el "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (www.sanger.ac.uk) i els nostres resultats, sembla que en l'adenocarcinoma de pulmó les mutacions d'*EGFR* són principalment mutacions *hotspot*, mentre que en adenocarcinomes d'altres òrgans es troben distribuïdes en diferents codons al llarg dels exons 18-21. La mutació amb canvi d'aminoàcid E709K, trobada en dos adenocarcinomes prostàtics per Cho i *cols* ⁽¹³⁶⁾ es podria considerar una

excepció, ja que s'ha trobat amb més freqüència en mostres de càncer de pulmó (www.sanger.ac.uk).

Diferents autors han analitzat l'expressió immunohistoquímica d'EGFR en càncer de pròstata, amb una gran variabilitat en l'expressió, des de l'1 al 100% (139,143,149,264). La informació sobre la relació entre el grau de Gleason i l'expressió d'EGFR també és contradictòria (140,142,144). En estudis recents, hi sol haver acord en l'associació de l'expressió immunohistoquímica d'EGFR amb l'estadi tumoral avançat, l'alt grau de Gleason i el PSA preoperatori. Aquests resultats recolzen el paper de l'expressió d'EGFR en el desenvolupament del càncer de pròstata i en la progressió cap a fases clíniques andrògen-independents o hormono refractàries (139,143,264). Schlomm i cols (139), en un extens estudi immunohistoquímic d'una micromatriu de teixit (TMA, *tissue micro array*) amb més de 2000 adenocarcinomes, van descriure un 18% de casos positius. Per altra banda, s'ha suggerit que l'expressió d'EGFR és significativament menys freqüent en pacients caucàsics (18%) que en afroamericans (46%) i coreans (72%) (137,149). Nosaltres vam trobar expressió d'EGFR en un 31% d'adenocarcinomes, un percentatge més elevat que el descrit en estudis anteriors basats en poblacions caucàsiques (137,139,149), resultats que concorden amb els obtinguts per Schlomm i cols (139) ja que trobem una associació directa entre expressió d'EGFR i grau de Gleason. Schlomm i cols (139) van dur a terme, com nosaltres, l'anàlisi mutacional en els mateixos casos de l'estudi immunohistoquímic, però sense resultat.

Mitjançant tècniques de FISH, Schlomm i cols (139) també van trobar, com nosaltres, guanys en el nombre de còpies d'*EGFR*, deguts a polisomia del cromosoma 7, en el seu cas, en un 3.3% dels casos, i van trobar una associació significativa del guany del nombre de còpies d'*EGFR* amb l'expressió proteica, i també amb adenocarcinomes d'alt grau i estadi avançat. A la nostra sèrie, hem observat un guany d'*EGFR* en 4 de 30 adenocarcinomes (13.3%), tots ells amb un lleu increment en el nombre de còpies (3-5 còpies) degut a polisomia del cromosoma 7. Tots aquests tumors positius eren Gleason ≥ 7 , i l'amplificació d'*EGFR* no es va trobar en cap d'aquests casos. Tot i que no existia correlació entre expressió d'EGFR i guany d'*EGFR*, sí que es va trobar una associació entre augment d'expressió d'*EGFR*, ja fos degut a sobreexpressió de la proteïna o a polisomia del cromosoma 7, i grau de Gleason més alts.

En un 31% dels adenocarcinomes de pròstata de la nostra sèrie, es va demostrar un augment de l'activitat d'*EGFR*, ja fos per mutació, sobreexpressió i/o increment del nombre de còpies. Si considerem en conjunt el total d'alteracions d'*EGFR* i les mutacions de *PTEN*, 34 adenocarcinomes (35%) presentaven algun tipus d'abnormalitat en la via de senyalització d'*EGFR-PTEN*. Les alteracions en aquesta via estaven relacionades amb el grau de Gleason, i s'associaven de manera estadísticament significativa amb els adenocarcinomes amb grau de Gleason ≥ 8 i metastàsics (Prova de χ^2 de Pearson, $P = 0.04$).

Sembla que les mutacions de *PTEN* representarien una abnormalitat menor en la patogènia de l'adenocarcinoma prostàtic. Seria interessant investigar altres mecanismes d'alteració de *PTEN*, com deleció o inactivació epigenètica. El mecanisme més comú d'inactivació dels dos al·lels de *PTEN* és per mutació d'un d'ells i deleció de l'altre, tot i que freqüentment s'han trobat nivells baixos de proteïna de *PTEN* en absència d'abnormalitats genòmiques ^(265,266). La LOH de *PTEN* s'ha descrit freqüentment en adenocarcinomes prostàtics primaris, però la proporció d'adenocarcinomes amb deleció d'un al·lel i mutació de l'altre és baixa ^(186,189). Dong i cols ⁽¹⁸⁵⁾ van descriure, en una sèrie d'adenocarcinomes d'estadi baix, que tant la LOH com les mutacions somàtiques de *PTEN* eren poc freqüents, i van concloure que l'alteració de *PTEN* no era un procés inicial en el carcinoma prostàtic. Diferents estudis, en canvi, han obtingut dades en favor de que l'haploinsuficiència de *PTEN* podria ser un marcador inicial de pronòstic en el càncer de pròstata, i que la pèrdua d'expressió completa estaria relacionada amb marcadors patològics de mal pronòstic i progressió del tumor ^(176,177,183,188,192,194). En models murins de càncer de pròstata, també s'ha suggerit que *PTEN* pot estar implicat en la iniciació i progressió inicials de la malaltia ^(260,267-269). És interessant que, els adenocarcinomes dels ratolins heterozigots *PTEN* (+/-) perden l'al·lel normal de *PTEN*, fet que implica que la gènesi de l'adenocarcinoma requereix la pèrdua dels dos al·lels de *PTEN* ⁽²⁷⁰⁾.

Fins on hem pogut esbrinar, aquest és el primer article i la sèrie més llarga en la que s'analitzen conjuntament les mutacions d'*EGFR* i *PTEN* en adenocarcinomes de pròstata de població caucàsica, i també és el primer en descriure mutacions d'*EGFR* i *PTEN* en la mateixa sèrie de tumors prostàtics. A més, també vam investigar l'expressió proteica d'*EGFR* per immunohistoquímica i el nombre de còpies del gen per FISH.

Podem concloure que la via de senyalització d'EGFR està involucrada en una tercera part dels adenocarcinomes prostàtics, en especial en adenocarcinomes d'alt grau. La sobreexpressió proteica és el tipus d'alteració més freqüent d'EGFR. A més, una sobre-representació d'EGFR, ja sigui deguda a una polisomia del cromosoma 7 o a sobreexpressió proteica, està estadísticament associada amb els adenocarcinomes de pròstata més agressius. Les mutacions en *EGFR* i *PTEN* són un procés menys prevalent, tot i que estan implicades en un 11% dels càncers de pròstata. El càncer de pròstata representaria el tercer tipus d'adenocarcinoma amb més mutacions d'*EGFR*. Tot i que la utilització d'inhibidors tirosina quinasa podria aportar beneficis en el tractament del càncer de pròstata, caldrà investigar altres elements reguladors de la senyalització d'EGFR per escollir les dianes més adequades per a un tractament efectiu d'aquest tumor.

Per altra banda, encara que els nostres articles demostren la presència de mutacions somàtiques de *FGFR3*, *EGFR* i *PTEN* en una petita proporció de tumors de pròstata, la literatura més recent revela el reordenament cromosòmic dels gens *TMPRSS2* i *ERG* com l'alteració més freqüent descrita en aquest tipus de càncer.

Diferents articles han descrit la presència de diversos reordenaments entre membres de la família ETS i diferents parelles de fusió 5', sent *TMPRSS2-ERG* el reordenament més freqüent en càncer de pròstata i la causa més probable de sobreexpressió d'*ERG* ⁽²⁰³⁾. A més, estudis en múltiples tipus de neoplàsies, demostren que el reordenament *TMPRSS2-ERG* és una alteració genòmica exclusiva del càncer de pròstata i que no es troba a cap altra neoplàsia ⁽²⁷¹⁾.

Les implicacions pronòstiques de la fusió *TMPRSS2-ERG* en càncer de pròstata són controvertides, com també ho és la possibilitat de que aquest reordenament pugui ser un factor inicial o tardà en la patogènia del càncer de pròstata. En aquest sentit, alguns estudis semblen indicar que *ERG* pot tenir un paper protooncogènic en la iniciació d'aquest tumor ^(204,221). Diversos estudis han trobat una associació entre el reordenament i grau de Gleason baix, i entre l'expressió d'ARN d'*ERG* (amb o sense el reordenament) i factors pronòstic favorables ^(206,232). Altres estudis, per contra, assenyalen que la fusió *TMPRSS2-ERG* no és suficient per iniciar la neoplàsia intraepitelial prostàtica (o PIN) i que caldria la cooperació d'altres lesions

oncogèniques, com pot ser la pèrdua de *PTEN* ^(236,237). Perner i *cols* ⁽²⁰⁹⁾ van trobar una elevada prevalença del reordenament *TMPRSS2-ERG* en casos amb tumor d'alt estadi i metastàtics, però sense diferències significativament estadístiques entre els diferents graus del tumor (grau de Gleason) i l'estat de *TMPRSS2-ERG*. A la mateixa sèrie, els tumors amb reordenament per deleció mostraven una tendència estadística a associar-se amb una tasa elevada de recidiva del PSA en comparació amb els tumors que no presentaven la fusió. Hi ha altres estudis que també defensen l'associació de la fusió amb un fenotip més agressiu de càncer de pròstata ^(222,230,231).

A la nostra sèrie de tumors primaris de pròstata, vam trobar una elevada prevalença del reordenament en casos amb Gleason = 6, en comparació amb tumors amb Gleason ≥ 7 , mentre que la prevalença era molt similar en els casos de Gleason = 7 i Gleason ≥ 8 . Els nostres resultats concorden amb altres estudis que també van trobar una elevada proporció de tumors amb el reordenament en la categoria de Gleason baix ^(206,232). Tanmateix, de manera semblant a Demichelis i *cols* ⁽²³⁰⁾, nosaltres no vam trobar cap associació estadística entre la fusió i el grau del tumor.

Un estudi recent, amb l'anticòs anti-ERG en càncer de pròstata, ha descrit una elevada concordança entre la detecció immunohistoquímica de la proteïna d'ERG i el reordenament del gen identificat per FISH ⁽²³⁵⁾. Nosaltres hem evaluat l'expressió immunohistoquímica d'ERG per investigar la concordança entre el reordenament *TMPRSS2-ERG* i l'expressió proteica d'ERG en els nostres casos, així com l'associació entre l'expressió proteica d'ERG i el grau combinat de Gleason dels tumors. De manera semblant a estudis anteriors, la meitat dels tumors de pròstata de la nostra sèrie presentaven expressió proteica d'ERG ^(234,235). També vam trobar una bona concordança estadística entre els estudis de FISH i de IHQ, ja que tots els casos amb el reordenament *TMPRSS2-ERG* presentaven expressió d'ERG. Només va haver dos casos que expressaven la proteïna ERG i no es correlacionaven amb el reordenament *TMPRSS2-ERG*. En aquests casos, l'expressió proteica s'hauria d'explicar per algun altre mecanisme, diferent de la fusió.

L'expressió proteica d'ERG en la nostra sèrie es limitava únicament a les glàndules neoplàsiques, i la majoria de tumors eren o bé completament positius, o completament negatius. Només en dos tumors vam detectar heterogeneïtat d'expressió,

amb una zona positiva i una altra de negativa. En un d'aquests casos, varem poder fer FISH, i vam demostrar que el reordenament *TMPRSS2-ERG* es restringia a la zona amb expressió immunohistoquímica, mentre que la zona que no expressava ERG tampoc presentava el reordenament. Aquests resultats confirmen la bona associació entre el reordenament i l'expressió proteica d'ERG. Segons el grau de Gleason, la prevalença de tumors ERG-positius va ser semblant en els grups amb Gleason 6 i 7, però més baixa en el grup amb Gleason ≥ 8 . No obstant, com en l'anàlisi de detecció del reordenament *TMPRSS2-ERG*, aquesta diferència no era estadísticament significativa.

Cai i cols ⁽¹³⁸⁾ van identificar diferents llocs consens d'unió a ERG en la regió promotora del gen *CXCR4*. Aquest gen s'ha trobat sobreexpressat en línies cel.lulars de càncer de pròstata amb sobreexpressió d'ERG. A més, l'activació de *TMPRSS2-ERG* sembla capaç de regular l'expressió de *CXCR4* i la subseqüent progressió a la metastasi ⁽²³⁶⁾. A part de la seva possible relació amb ERG, *CXCR4*, per ell mateix, és una diana interessant d'investigar en el càncer de pròstata. La interacció *CXCR4-CXCL12* s'ha vist involucrada en migració, invasió i metastasi òssia en el càncer de pròstata ^(240,241,243). L'ARNm de *CXCR4* es troba sobreexpressat en línies cel.lulars del càncer de pròstata, així com també en una elevada proporció de metastasis d'aquest tumor ^(241,243,272). Hart i cols ⁽²⁷³⁾ van suggerir que *CXCR4* podria ser un factor clau en la implantació de la metastasi prostàtica a l'os.

Per estudiar el paper de *CXCR4* en els diferents grups de tumors primaris de pròstata, i la seva relació amb el reordenament *TMPRSS2-ERG*, vam analitzar l'expressió de l'ARNm de *CXCR4* per RT-PCR quantitativa, comparant-la amb l'expressió d'ERG detectada per immunohistoquímica. Vam trobar sobreexpressió d'ARNm de *CXCR4* en una tercera part dels casos, sobreexpressió que era significativament més alta en els tumors amb Gleason ≥ 8 . Per altra banda, només en una petita proporció dels tumors amb Gleason ≤ 7 hi havia sobreexpressió d'aquest gen. Diferents publicacions han descrit la sobreexpressió immunohistoquímica de *CXCR4*, tant en tumors de pròstata localitzats, com en metastasis ^(241,242,272,274). Així, Akashi i cols ⁽²⁷²⁾ van descriure que l'expressió proteica de *CXCR4* predia un mal pronòstic en els càncers de pròstata amb metastasis òssies. En aquest estudi, no es van trobar diferències estadísticament significatives en l'expressió de *CXCR4* respecte als nivells de PSA, el grau de Gleason, la resposta clínica al tractament hormonal, o la presència de

metàstasis òssies, però això podria ser degut a que el seu estudi ja estava restringit a un subgrup de pacients amb malaltia avançada.

Fins on hem pogut esbrinar, només hi ha un estudi previ, el de Sun i cols⁽²⁷⁴⁾ sobre els nivells d'ARNm de *CXCR4* en càncer de pròstata. Aquests autors van utilitzar una base de dades prèviament publicada⁽²⁷⁵⁾, i van identificar un increment dels nivells d'ARNm de *CXCR4* en hiperplàsia benigna de pròstata (HBP), en càncer de pròstata localitzat i en tumors metastàtics, encara que no van trobar diferències significatives entre HBP i les diferents categories de grau del tumor. En el nostre treball, hem descrit per primer cop, que l'ARNm de *CXCR4* es troba significativament sobreexpressat en un alt percentatge de tumors de pròstata, més del 70% en els casos d'alt grau de Gleason, però amb només un 20.5% dels tumors amb Gleason 6 i 7. Com ja hem comentat abans, diferents estudis han descrit que el reordenament *TMPRSS2-ERG* pot donar lloc a un augment en l'expressió de *CXCR4*^(236,245). Els nostres resultats, en canvi, semblen indicar que no hi ha associació estadística entre el reordenament d'*ERG* i la sobreexpressió de *CXCR4*. Per això, vam plantejar la hipòtesi de que potser només en una petita proporció dels casos que sobreexpressen *CXCR4* aquest fet estaria relacionat amb al reordenament d'*ERG*. Considerant que el producte de la proteïna de la majoria de fusions d'ETS, inclosa la isoforma més comuna *TMPRSS2-ERG*, és una proteïna truncada, més que una proteïna quimérica⁽²²⁵⁾, podem especular que no tots els productes de la fusió *TMPRSS2-ERG* seran capaços d'activar les molècules efectores d'*ERG*, com per exemple, *CXCR4* i *ADAMTS1*⁽²⁴⁵⁾. El reordenament *TMPRSS2-ERG* podria representar només un dels mecanismes que donarien lloc a l'expressió aberrant de *CXCR4*, i els tumors d'alt grau podrien desenvolupar sobreexpressió de *CXCR4* per altres mecanismes. Caldrà portar a terme més estudis per poder conèixer el valor pronòstic de l'expressió de *CXCR4*, i per investigar si aquesta molècula podria ajudar a identificar casos de baix grau amb més risc de progressió.

En conclusió, els nostres resultats confirmen la manca d'associació entre la fusió *TMPRSS2-ERG* i el grau histològic en el càncer de pròstata, així com l'excel·lent correlació entre el reordenament d'*ERG* i la detecció immunohistoquímica de la seva proteïna. Per altra banda, aquest estudi demostra que l'expressió d'ARNm de *CXCR4* és independent del reordenament *TMPRSS2-ERG*, i també demostra, per primer cop, una associació estadística entre l'augment de l'ARNm de *CXCR4* i el càncer de pròstata

d'alt grau. Cal fer més estudis per determinar si la sobreexpressió de *CXCR4* en els tumors de baix grau pot identificar un subgrup amb més risc de progressió.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

5.1. La presència d'alteracions de *FGFR3* podria estar associada a tumors de baix grau, ja que gran part de les mutacions en aquest gen s'han trobat a casos amb Gleason = 6.

5.2. No s'han trobat diferències en la prevalença de mutacions de *FGFR3* entre els casos d'autòpsia i de biòpsia, però sí que s'ha detectat un percentatge molt més alt de mutacions en les cistoprostatectomies que en els altres subgrups.

5.3. *FGFR3* no sembla un gen important en la patogènia del càncer de pròstata, però pot ser útil com a possible marcador de càncer de pròstata de baix grau, i pot ser més rellevant en aquells casos que s'associen a tumors de bufeta o de pell concomitants.

5.4. L'estratègia més fiable per confirmar una possible mutació és realitzar una segona PCR. Es recomanable fer aquesta segona amplificació de manera independent per confirmar qualsevol canvi i hauria de ser un requisit imperatiu en casos en els que el teixit ha estat fixat en formol i inclòs en parafina.

5.5. En un 31% dels adenocarcinomes de pròstata, es detecta sobreactivació d'*EGFR* ja sigui per mutació, sobreexpressió o increment en el nombre de còpies del gen.

5.6. El tipus d'alteració més freqüent d'*EGFR* és la sobreexpressió proteica.

5.7. La prevalença de mutacions de *PTEN* a la nostra sèrie de tumors és més baixa que la descrita a la literatura, però el nombre de casos analitzats en aquests estudis previs és massa reduït per establir la prevalença real de mutacions somàtiques en aquest gen.

5.8. Les mutacions d'*EGFR* i *PTEN* serien una alteració menor en la patogènia del càncer de pròstata.

5.9. La prevalença de mutacions en la via de senyalització EGFR-PTEN en conjunt és significativament més elevada en adenocarcinomes de pròstata d'alt grau (Gleason \geq 8).

5.10. Les mutacions d'*EGFR* i *PTEN* semblen mútuament excloents en el càncer de pròstata, ja que cap cas presenta mutacions en ambdós gens.

5.11. El reordenament *TMPRSS2-ERG* es troba en un 50% dels càncers de pròstata i no està associat estadísticament amb els diferents graus de Gleason.

5.12. Hi ha una excel·lent correlació entre el reordenament d'*ERG* i la detecció immunohistoquímica de la proteïna que codifica.

5.13. S'ha trobat sobreexpressió d'ARNm de *CXCR4* en una tercera part dels tumors de pròstata, i s'ha vist associada estadísticament amb els tumors amb alt grau de Gleason. Caldria més estudis per determinar si la sobreexpressió de *CXCR4* en tumors de baix grau podria ser un indicador de risc de progressió.

5.14. L'expressió de l'ARNm de *CXCR4* és independent del reordenament *TMPRSS2-ERG*, i per tant, de l'expressió de la proteïna d'*ERG*. *CXCR4* pot estar regulat per altres mecanismes, independents d'*ERG*.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

1. Del Hoyo J. Anatomia i funció de la pròstata. In: La pròstata. Proa; 1985. p.21-30.
2. Bostwick DG, Cheng L. Urologic Surgical Pathology. Mosby Elsevier; 2008.
3. Timms BG, Lee CW, Aumuller G, Seitz J. Instructive induction of prostate growth and differentiation by a defined urogenital sinus mesenchyme. *Microsc Res Tech* 1995;30:319-32.
4. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 1968;49:347-57.
5. Stevens A, Lowe J. Sistema reproductor masculino. In: *Histología humana*. Madrid: Harcourt; 1999. p.309-26.
6. Heul-Nieuwenhuijsen L, Hendriksen PJ, van der Kwast TH, Jenster G. Gene expression profiling of the human prostate zones. *BJU Int* 2006;98:886-97.
7. Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol* 2007;210:111-21.
8. Young B, Heath J. Aparato genital masculino. In: *Histología funcional*. Madrid: Harcourt; 2000. p.328-40.
9. Ware JL. Prostate cancer progression. Implications of histopathology. *Am J Pathol* 1994;145:983-93.
10. Humphrey PA. Prostate Pathology. ASCP Press; 2003.
11. Smith RD, Patel A. Transurethral resection of the prostate revisited and updated. *Curr Opin Urol* 2011;21:36-41.
12. Samaratunga H, Montironi R, True L, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 1: specimen handling. *Mod Pathol* 2011;24:6-15.
13. Montironi R, Cheng L, Mazzucchelli R, et al. Critical evaluation of the prostate from cystoprostatectomies for bladder cancer: insights from a complete sampling with the whole mount technique. *Eur Urol* 2009;55:1305-9.
14. Barbisan F, Mazzucchelli R, Scarpelli M, et al. Urothelial and incidental prostate carcinoma in prostates from cystoprostatectomies for bladder cancer: is there a relationship between urothelial and prostate cancer? *BJU Int* 2009;103:1058-63.
15. Mazzucchelli R, Barbisan F, Scarpelli M, et al. Is incidentally detected prostate cancer in patients undergoing radical cystoprostatectomy clinically significant? *Am J Clin Pathol* 2009;131:279-83.
16. Trpkov K, Yilmaz A, Bismar TA, Montironi R. 'Insignificant' prostate cancer on prostatectomy and cystoprostatectomy: variation on a theme 'low-volume/low-grade' prostate cancer? *BJU Int* 2010;106:304-15.
17. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993;150:379-85.
18. Diamantis A, Magiorkinis E, Koutselini H. Fine-needle aspiration (FNA) biopsy: historical aspects. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:191-7.

19. Maksem JA, Berner A, Bedrossian C. Fine needle aspiration biopsy of the prostate gland. *Diagn Cytopathol* 2007;35:778-85.
20. Eble J, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumors of Urinary System and Male Genital Organs*. 2004. Lyon: IARC Press.
21. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. The decline in cancer mortality in the European Union, 1988-1996. *Eur J Cancer* 2000;36:1965-8.
22. Ware JL. Prostate cancer progression. Implications of histopathology. *Am J Pathol* 1994;145:983-93.
23. Sharp VJ, Takacs EB, Powell CR. Prostatitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2010;82:397-406.
24. Wagner D, Joseph J, Huang J, Xu H. Malakoplakia of the prostate on needle core biopsy: a case report and review of the literature. *Int J Surg Pathol* 2007;15:86-9.
25. Djavan B, Eckersberger E, Finkelstein J, et al. Benign prostatic hyperplasia: current clinical practice. *Prim Care* 2010;37:583-97, ix.
26. Dickinson SI. Premalignant and malignant prostate lesions: pathologic review. *Cancer Control* 2010;17:214-22.
27. Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 2004;6:171-9.
28. Epstein JI. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009;454:1-16.
29. Steiner MS. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer risk reduction. *World J Urol* 2003;21:15-20.
30. Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, et al. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 1995;55:2959-62.
31. Costa VL, Henrique R, Jeronimo C. Epigenetic markers for molecular detection of prostate cancer. *Dis Markers* 2007;23:31-41.
32. Perry AS, Foley R, Woodson K, Lawler M. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:357-77.
33. Laurila M, van der KT, Bubendorf L, et al. Detection rates of cancer, high grade PIN and atypical lesions suspicious for cancer in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:3068-72.
34. Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 1987;59:788-94.
35. Zhang C, Montironi R, Maclennan GT, et al. Is atypical adenomatous hyperplasia of the prostate a precursor lesion? *Prostate* 2011;71:1746-51.
36. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1228-42.
37. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:125-8.
38. Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, et al. Prognostic markers in prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2:129-42.

39. Moon SJ, Park SY, Lee TY. Predictive factors of Gleason score upgrading in localized and locally advanced prostate cancer diagnosed by prostate biopsy. *Korean J Urol* 2010;51:677-82.
40. Cowherd SM. Tumor staging and grading: a primer. *Methods Mol Biol* 2012;823:1-18.
41. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010;24:1967-2000.
42. Bul M, Schroder FH. Screening for prostate cancer---the controversy continues, but can it be resolved? *Acta Oncol* 2011;50 Suppl 1:4-11.
43. Chen ME, Johnston DA, Tang K, Babaian RJ, Troncso P. Detailed mapping of prostate carcinoma foci: biopsy strategy implications. *Cancer* 2000;89:1800-9.
44. Bostwick DG. The pathology of incidental carcinoma. *Cancer Surv* 1995;23:7-18.
45. Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol* 2006;1:243-71.
46. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 2007;39:41-51.
47. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006;97:433-47.
48. Sun J, Liu W, Adams TS, et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate* 2007;67:692-700.
49. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-34.
50. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
51. L'Hote CG, Knowles MA. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 2005;304:417-31.
52. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:139-49.
53. Jin C, McKeegan K, Guo W, et al. Cooperation between ectopic FGFR1 and depression of FGFR2 in induction of prostatic intraepithelial neoplasia in the mouse prostate. *Cancer Res* 2003;63:8784-90.
54. Jin C, Wang F, Wu X, et al. Directionally specific paracrine communication mediated by epithelial FGF9 to stromal FGFR3 in two-compartment premalignant prostate tumors. *Cancer Res* 2004;64:4555-62.
55. Wu X, Jin C, Wang F, Yu C, McKeegan WL. Stromal cell heterogeneity in fibroblast growth factor-mediated stromal-epithelial cell cross-talk in premalignant prostate tumors. *Cancer Res* 2003;63:4936-44.
56. Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 1999;189:564-9.
57. Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1063-71.
58. Gnanapragasam VJ, Robinson MC, Marsh C, et al. FGF8 isoform b expression in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1432-8.

59. Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, et al. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2005;92:320-7.
60. Heer R, Douglas D, Mathers ME, Robson CN, Leung HY. Fibroblast growth factor 17 is over-expressed in human prostate cancer. *J Pathol* 2004;204:578-86.
61. Sahadevan K, Darby S, Leung HY, et al. Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol* 2007;213:82-90.
62. Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A, Ittmann M. Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:4245-50.
63. Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, Williams ED. Aberrant fibroblast growth factor receptor signaling in bladder and other cancers. *Differentiation* 2007;75:831-42.
64. Thomson AA. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction* 2001;121:187-95.
65. Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, et al. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 1991;11:5068-78.
66. Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999;42:609-21.
67. Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 1999;4:D165-D177.
68. Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, et al. High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF 8. *Cancer Res* 1998;58:2053-6.
69. Degnin CR, Laederich MB, Horton WA. Ligand activation leads to regulated intramembrane proteolysis of fibroblast growth factor receptor 3. *Mol Biol Cell* 2011;22:3861-73.
70. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005;5:713-25.
71. Horton WA, Lunstrum GP. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in achondroplasia and related forms of dwarfism. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:381-5.
72. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 2002;16:1446-65.
73. Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:205-13.
74. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1955-9.
75. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999;23:18-20.
76. Hafner C, Vogt T, Hartmann A. FGFR3 mutations in benign skin tumors. *Cell Cycle* 2006;5:2723-8.
77. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, et al. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:5444-50.

78. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:3664-71.
79. Logie A, Dunois-Larde C, Rosty C, et al. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2005;14:1153-60.
80. Sibley K, Stern P, Knowles MA. Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene* 2001;20:4416-8.
81. Fracchiolla NS, Luminari S, Baldini L, et al. FGFR3 gene mutations associated with human skeletal disorders occur rarely in multiple myeloma. *Blood* 1998;92:2987-9.
82. Zhang Y, Hiraishi Y, Wang H, et al. Constitutive activating mutation of the FGFR3b in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;117:166-8.
83. Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2001;61:3541-3.
84. Karoui M, Hofmann-Radvanyi H, Zimmermann U, et al. No evidence of somatic FGFR3 mutation in various types of carcinoma. *Oncogene* 2001;20:5059-61.
85. di Martino E, L'Hote CG, Kennedy W, Tomlinson DC, Knowles MA. Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner. *Oncogene* 2009;28:4306-16.
86. Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25:581-93.
87. Garcia-Vargas A, Hafner C, Perez-Rodriguez AG, et al. An epidermal nevus syndrome with cerebral involvement caused by a mosaic FGFR3 mutation. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2275-9.
88. Hafner C, Vogt T, Landthaler M, Musebeck J. Somatic FGFR3 and PIK3CA mutations are present in familial seborrhoeic keratoses. *Br J Dermatol* 2008;159:214-7.
89. Hernandez S, Toll A, Baselga E, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors. *J Invest Dermatol* 2007;127:1664-6.
90. Hida Y, Kubo Y, Arase S. Activation of fibroblast growth factor receptor 3 and oncogene-induced senescence in skin tumours. *Br J Dermatol* 2009;160:1258-63.
91. Toll A, Real FX. Somatic oncogenic mutations, benign skin lesions and cancer progression: where to look next? *Cell Cycle* 2008;7:2674-81.
92. Dai H, Holm R, Kristensen GB, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) - analyses of the S249C mutation and protein expression in primary cervical carcinomas. *Anal Cell Pathol* 2001;23:45-9.
93. Rosty C, Aubriot MH, Cappellen D, et al. Clinical and biological characteristics of cervical neoplasias with FGFR3 mutation. *Mol Cancer* 2005;4:15.
94. Wu R, Connolly D, Ngelangel C, et al. Somatic mutations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) are uncommon in carcinomas of the uterine cervix. *Oncogene* 2000;19:5543-6.
95. Yee CJ, Lin O, Boyd J. Analysis of fibroblast growth factor receptor 3 S249C mutation in cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1848-9.

96. Keats JJ, Reiman T, Belch AR, Pilarski LM. Ten years and counting: so what do we know about t(4;14)(p16;q32) multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2006;47:2289-300.
97. Valve EM, Nevalainen MT, Nurmi MJ, et al. Increased expression of FGF-8 isoforms and FGF receptors in human premalignant prostatic intraepithelial neoplasia lesions and prostate cancer. *Lab Invest* 2001;81:815-26.
98. Murphy T, Darby S, Mathers ME, Gnanapragasam VJ. Evidence for distinct alterations in the FGF axis in prostate cancer progression to an aggressive clinical phenotype. *J Pathol* 2010;220:452-60.
99. Hernandez S, de Muga S, Agell L, et al. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol* 2009;22:848-56.
100. Koufou S, Lunz JC, Borchardt A, et al. Mutational activation of FGFR3 is not involved in the development of prostate cancer. *Pathobiology* 2010;77:249-52.
101. Naimi B, Latil A, Berthon P, Cussenot O. No evidence for fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3) R248C/S249C mutations in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2000;87:455-6.
102. Zuiverloon TC, Boormans JL, Trapman J, van Leenders GJ, Zwarthoff EC. No evidence of FGFR3 mutations in prostate cancer. *Prostate* 2011;71:637-41.
103. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, et al. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63:8108-12.
104. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003;21:1912-21.
105. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, et al. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5218-25.
106. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, et al. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 2010;5:e13821.
107. Pandith AA, Shah ZA, Siddiqi MA. Oncogenic role of fibroblast growth factor receptor 3 in tumorigenesis of urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010.
108. Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, et al. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6008-17.
109. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Steven K, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer* 2011;129:78-87.
110. 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;66:7401-4.
111. Sjodahl G, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One* 2011;6:e18583.
112. Byun DS, Cho K, Ryu BK, et al. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003;104:318-27.
113. 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;65:2554-9.

114. Kambhampati S, Ray G, Sengupta K, et al. Growth factors involved in prostate carcinogenesis. *Front Biosci* 2005;10:1355-67.
115. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5268-72.
116. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S3-S8.
117. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010;277:301-8.
118. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366:2-16.
119. Janne PA, Johnson BE. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006;12:4416s-20s.
120. Kwak EL, Jankowski J, Thayer SP, et al. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:4283-7.
121. Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009;15:1133-9.
122. Lee J, Jang KT, Ki CS, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2007;109:1561-9.
123. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2005;11:2879-82.
124. Nagahara H, Mimori K, Ohta M, et al. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1368-71.
125. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-81.
126. Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007;75:770-87.
127. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010;277:301-8.
128. Shen L, Shui Y, Wang X, et al. EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy. *BMC Cancer* 2008;8:232.
129. Grivas PD, Day M, Hussain M. Urothelial carcinomas: a focus on human epidermal receptors signaling. *Am J Transl Res* 2011;3:362-73.
130. Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor isoforms and epidermal growth factor receptor/ErbB1 expression in bladder cancer and their relation to clinical outcome. *Cancer* 2007;109:2016-24.
131. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S9-15.
132. Saif MW. Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:357-69.

133. Han C, Ma J, Zhao J, et al. EGFR mutations, gene amplification, and protein expression and KRAS mutations in primary and metastatic tumors of nonsmall cell lung cancers and their clinical implications: a meta-analysis. *Cancer Invest* 2011;29:626-34.
134. Cappuzzo F. EGFR FISH versus mutation: different tests, different end-points. *Lung Cancer* 2008;60:160-5.
135. Dekanic A, Dobrila DR, Budisavljevic I, et al. Strong nuclear EGFR expression in colorectal carcinomas is associated with cyclin-D1 but not with gene EGFR amplification. *Diagn Pathol* 2011;6:108.
136. Cho KS, Lee JS, Cho NH, et al. Gene amplification and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2008;68:803-8.
137. Douglas DA, Zhong H, Ro JY, et al. Novel mutations of epidermal growth factor receptor in localized prostate cancer. *Front Biosci* 2006;11:2518-25.
138. Cai CQ, Peng Y, Buckley MT, et al. Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations. *Oncogene* 2008;27:3201-10.
139. Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, et al. Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6579-84.
140. Ibrahim GK, Kerns BJ, MacDonald JA, et al. Differential immunoreactivity of epidermal growth factor receptor in benign, dysplastic and malignant prostatic tissues. *J Urol* 1993;149:170-3.
141. Mellon K, Thompson S, Charlton RG, et al. p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol* 1992;147:496-9.
142. Turkeri LN, Sakr WA, Wykes SM, et al. Comparative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Prostate* 1994;25:199-205.
143. Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, et al. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438-44.
144. Morris GL, Dodd JG. Epidermal growth factor receptor mRNA levels in human prostatic tumors and cell lines. *J Urol* 1990;143:1272-4.
145. Bartlett JM, Brawley D, Grigor K, et al. Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol* 2005;205:522-9.
146. Hernes E, Fossa SD, Berner A, Otnes B, Nesland JM. Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer* 2004;90:449-54.
147. Marks RA, Zhang S, Montironi R, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: a fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Prostate* 2008;68:919-23.
148. Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* 2006;66:1437-44.
149. Shuch B, Mikhail M, Satagopan J, et al. Racial disparity of epidermal growth factor receptor expression in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4725-9.
150. Skacel M, Ormsby AH, Pettay JD, et al. Aneusomy of chromosomes 7, 8, and 17 and amplification of HER-2/neu and epidermal growth factor receptor in Gleason score 7 prostate

- carcinoma: a differential fluorescent in situ hybridization study of Gleason pattern 3 and 4 using tissue microarray. *Hum Pathol* 2001;32:1392-7.
151. Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. *Clin Cancer Res* 2006;12:7222-31.
 152. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
 153. Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009;77:400-10.
 154. Ando M, Okamoto I, Yamamoto N, et al. Predictive factors for interstitial lung disease, antitumor response, and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 2006;24:2549-56.
 155. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-54.
 156. Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, et al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 2009;15:4493-8.
 157. Okamoto I. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy. *FEBS J* 2010;277:309-15.
 158. Sugio K, Uramoto H, Onitsuka T, et al. Prospective phase II study of gefitinib in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *Lung Cancer* 2009;64:314-8.
 159. Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2009;62:970-7.
 160. Martin V, Mazzucchelli L, Frattini M. An overview of the epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridisation challenge in tumour pathology. *J Clin Pathol* 2009;62:314-24.
 161. Cataldo VD, Gibbons DL, Perez-Soler R, Quintas-Cardama A. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *N Engl J Med* 2011;364:947-55.
 162. Costanzo R, Piccirillo MC, Sandomenico C, et al. Gefitinib in non small cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:815269.
 163. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-510.
 164. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal* 2007;19:2487-97.
 165. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:127-50.
 166. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:150-8.
 167. Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol* 2010;12:882-9.
 168. Zhang S, Yu D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4325-30.
 169. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6:184-92.

170. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* 2008;27:5443-53.
171. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* 2006;18:77-82.
172. 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.
173. 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.
174. Sun X, Huang J, Homma T, et al. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. *Anticancer Res* 2009;29:1739-43.
175. Agell L, Hernandez S, Salido M, et al. 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.
176. Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* 2006;241:184-96.
177. Liu W, Zhou Y, Reske SN, Shen C. PTEN mutation: many birds with one stone in tumorigenesis. *Anticancer Res* 2008;28:3613-9.
178. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009;100:2235-41.
179. Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 2000;16:109-22.
180. Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JJ, et al. Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin Cancer Res* 2007;13:3860-7.
181. Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* 2009;218:505-13.
182. Wang SI, Parsons R, Ittmann M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 1998;4:811-5.
183. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, et al. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11563-8.
184. Cairns P, Okami K, Halachmi S, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:4997-5000.
185. Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, et al. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. *Oncogene* 1998;17:1979-82.
186. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998;16:1743-8.
187. Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, et al. PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:6563-73.
188. McMenamin ME, Soung P, Perera S, et al. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-6.

189. Pesche S, Latil A, Muzeau F, et al. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* 1998;16:2879-83.
190. Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, et al. Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res* 1998;58:204-9.
191. Verhagen PC, van Duijn PW, Hermans KG, et al. The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol* 2006;208:699-707.
192. Whang YE, Wu X, Suzuki H, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5246-50.
193. Yoshimoto M, Cutz JC, Nuin PA, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;169:128-37.
194. Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, et al. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 2007;97:678-85.
195. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol* 2009;22:1083-93.
196. McCall P, Witton CJ, Grimsley S, Nielsen KV, Edwards J. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer? *Br J Cancer* 2008;99:1296-301.
197. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 2008;21:1451-60.
198. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18:11-22.
199. 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.
200. Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:7465-74.
201. 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.
202. Wang S, Gao J, Lei Q, et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 2003;4:209-21.
203. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644-8.
204. Albadine R, Latour M, Toubaji A, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:1415-22.
205. Esgueva R, Perner S, LaFargue J, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol* 2010;23:539-46.
206. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res* 2009;69:1400-6.
207. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 2007;20:538-44.

208. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res* 2009;15:4706-11.
209. Perner S, Demichelis F, Beroukhi R, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:8337-41.
210. Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, et al. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:717-9.
211. Svensson MA, LaFargue CJ, MacDonald TY, et al. Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer. *Lab Invest* 2011;91:404-12.
212. Tu JJ, Rohan S, Kao J, et al. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 2007;20:921-8.
213. Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. *Oncol Rep* 2007;17:1033-6.
214. Maroulakou IG, Bowe DB. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 2000;19:6432-42.
215. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827-37.
216. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007;448:595-9.
217. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:3396-400.
218. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:73-80.
219. Han B, Mehra R, Dhanasekaran SM, et al. A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:7629-37.
220. Hermans KG, van der Korput HA, van Marion R, et al. Truncated ETV1, fused to novel tissue-specific genes, and full-length ETV1 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:7541-9.
221. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177-88.
222. Attard G, Clark J, Ambrosine L, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:253-63.
223. Clark J, Merson S, Jhavar S, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 2007;26:2667-73.
224. Hu Y, Dobi A, Sreenath T, et al. Delineation of TMPRSS2-ERG splice variants in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4719-25.
225. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol* 2007;20:467-73.
226. Liu W, Ewing CM, Chang BL, et al. Multiple genomic alterations on 21q22 predict various TMPRSS2/ERG fusion transcripts in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:972-80.

227. 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.
228. Wang J, Cai Y, Yu W, et al. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res* 2008;68:8516-24.
229. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 2007;31:882-8.
230. Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007;26:4596-9.
231. Nam RK, Sugar L, Wang Z, et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2007;6:40-5.
232. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 2005;24:3847-52.
233. Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, et al. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:3395-400.
234. Falzarano SM, Zhou M, Carver P, et al. ERG gene rearrangement status in prostate cancer detected by immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2011.
235. Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM, et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* 2010;12:590-8.
236. Carver BS, Tran J, Gopalan A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 2009;41:619-24.
237. King JC, Xu J, Wongvipat J, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 2009;41:524-6.
238. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathol Int* 2010;60:497-505.
239. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, et al. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915-24.
240. Gladson CL, Welch DR. New insights into the role of CXCR4 in prostate cancer metastasis. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1849-51.
241. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62:1832-7.
242. Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, et al. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:656-63.
243. Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest* 2004;84:1666-76.
244. Xing Y, Liu M, Du Y, et al. Tumor cell-specific blockade of CXCR4/SDF-1 interactions in prostate cancer cells by hTERT promoter induced CXCR4 knockdown: A possible metastasis preventing and minimizing approach. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1839-48.
245. Cai J, Kandagatla P, Singareddy R, et al. Androgens Induce Functional CXCR4 through ERG Factor Expression in TMPRSS2-ERG Fusion-Positive Prostate Cancer Cells. *Transl Oncol* 2010;3:195-203.
246. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.

247. Woolf SH. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. An examination of the evidence. *N Engl J Med* 1995;333:1401-5.
248. Damber JE, Aus G. Prostate cancer. *Lancet* 2008;371:1710-21.
249. Kopper L, Timar J. Genomics of prostate cancer: is there anything to "translate"? *Pathol Oncol Res* 2005;11:197-203.
250. Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett* 2007;249:5-13.
251. Hafner C, Hartmann A, Vogt T. FGFR3 mutations in epidermal nevi and seborrheic keratoses: lessons from urothelium and skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:1572-3.
252. Hafner C, van Oers JM, Vogt T, et al. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* 2006;116:2201-7.
253. Hafner C, Lopez-Knowles E, Luis NM, et al. Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13450-4.
254. Hafner C, van Oers JM, Hartmann A, et al. High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* 2006;126:2404-7.
255. Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Larde C, et al. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 2006;27:740-7.
256. Li E, You M, Hristova K. FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J Mol Biol* 2006;356:600-12.
257. Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, et al. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:288-95.
258. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:3935-40.
259. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-7.
260. Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, Agelopoulos K, Buerger H. Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 2006;12:7252-60.
261. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;63:315-21.
262. Zhang X, Chang A. Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell lung cancer. *J Med Genet* 2007;44:166-72.
263. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007;98:1817-24.
264. Zellweger T, Ninck C, Bloch M, et al. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005;113:619-28.
265. Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:171-6.

266. Uzoh CC, Perks CM, Bahl A, et al. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. *BJU Int* 2009;104:556-61.
267. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-90.
268. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1563-8.
269. Ratnacaram CK, Teletin M, Jiang M, et al. Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2521-6.
270. Schmitz M, Grignard G, Margue C, et al. Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. *Int J Cancer* 2007;120:1284-92.
271. Scheble VJ, Braun M, Beroukhi R, et al. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod Pathol* 2010;23:1061-7.
272. Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* 2008;99:539-42.
273. Hart CA, Brown M, Bagley S, Sharrard M, Clarke NW. Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process. *Br J Cancer* 2005;92:503-12.
274. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003;89:462-73.
275. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412:822-6.

ANNEXES

7.1. Annex 1: Article 3

CXCR4 mRNA Overexpression in High Grade Prostate Tumors: Lack of Association with *TMPRSS2-ERG* Rearrangement

Silvia de Muga ^{1, 5}, Silvia Hernández ², Marta Salido ³, Marta Lorenzo ¹, Laia Agell ¹, Núria Juanpere ¹, José A. Lorente ^{4, 6}, Sergio Serrano ^{1, 6}, Josep Lloreta ^{1, 2}

The two first authors have contributed equally to this paper

Authors' Affiliations:

¹Department of Pathology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar-IMIM, Barcelona, Spain

²Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

³Molecular Cytogenetics Laboratory, Department of Pathology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar-IMIM, Barcelona, Spain

⁴Department of Urology, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar-IMIM, Barcelona, Spain

⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁶ Department of Morphologic Sciences, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Running title: CXCR4 and *TMPRSS2-ERG* in prostate

Correspondence to:

Silvia Hernández

Department of Health and Experimental Sciences

Universitat Pompeu Fabra

Passeig Maritim 25-29

08003-Barcelona, Spain

Phone (+3493) 248 30 31

Fax (+3493) 248 31 31

e-mail: silvia.hernandez@upf.edu

Abstract

The *TMPRSS2-ERG* fusion has been reported in 42 to 78% of prostate tumors. More than 90% of tumors that overexpress ERG harbor the fusion. The relationship between the *TMPRSS2-ERG* fusion and prognosis is controversial. *CXCR4* is overexpressed in a very high percentage of metastatic prostate tumors. Different studies have suggested an association between *CXCR4* and ERG overexpression resulting from the *TMPRSS2-ERG* rearrangement. The aim of the present study has been to investigate the possible relationship between *CXCR4* expression, *TMPRSS2-ERG* fusion and Gleason grade in prostate cancer. For this purpose, *TMPRSS2-ERG* rearrangement was investigated by FISH (n= 44), ERG protein expression by IHC (n= 84), and *CXCR4* mRNA expression by quantitative RT-PCR (n= 44) in a series of primary prostate adenocarcinomas. *TMPRSS2-ERG* rearrangement and ERG protein expression were present in almost 50% of the cases, without statistical differences between the different Gleason score groups. There was a very high concordance between FISH and IHC techniques (Kappa Index = 0.954). Seventy percent of Gleason ≥ 8 prostate tumors overexpressed *CXCR4* mRNA, and the difference in *CXCR4* expression with Gleason < 8 cases was statistically significant (p = 0.009). There was no association between ERG protein and *CXCR4* mRNA expression. In conclusion, our results reveal for the first time that *CXCR4* overexpression is associated with high Gleason score prostate tumors, but that it is independent of the *TMPRSS2-ERG* rearrangement. In addition, our results also support the lack of association of *TMPRSS2-ERG* with Gleason grade, and confirm the usefulness of ERG IHC in the detection of *TMPRSS2-ERG* rearrangement.

Keywords: *CXCR4*; *TMPRSS2*; ERG; rearrangement; overexpression; prostate cancer

Introduction

Tomlins *et al.*¹ reported for the first time recurrent gene fusions of the 5'UTR (untranslated region) of *TMPRSS2* with *ETS* family members in prostate cancer. Different studies have confirmed the occurrence of *TMPRSS2-ERG* fusion in 42 to 78% of prostate tumors.²⁻¹²

In addition to *ERG* or *ETV1*, other less frequent fusion variants between the 5'UTR of *TMPRSS2* and other *ETS* family members, such as *ETV4*¹³ and *ETV5*,¹⁴ have been identified. Moreover, also other less common 5' fusion partner genes have been found in prostate tumors.^{3,15-17}

More than 90% of prostate tumors overexpressing *ERG* harbor the fusion between *ERG* and *TMPRSS2* genes. On the other hand, *ETV1* expression is found in 6-16% of prostate tumors, and only 1% of it is related to the *TMPRSS2-ETV1* fusion.^{1,17}

The different studies performed until now show marked discrepancies about the association between the *TMPRSS2-ERG* fusion and prognostic factors.^{4,7,18-21} Attard *et al.*¹⁸ report a significant association between *TMPRSS2-ERG* rearrangement and high serum PSA, advanced tumor stage, and high Gleason grade. Other reports support an association with aggressive behavior but fail to relate it to Gleason grade.^{7,22} In contrast, some authors have found a statistical association with low Gleason grade, longer PSA progression-free survival and lower tumor stage.^{4,21}

In a similar way, some papers have indicated that *ERG* could have a proto-oncogenic role in prostate tumor initiation,^{2,23} whereas others have reported that aberrant *ERG* expression is a progression event in prostate tumorigenesis, and that *TMPRSS2-ERG* rearrangement does not suffice to initiate prostatic neoplasia.²⁴

Recently, Park *et al.*²⁵ developed a novel anti-*ERG* antibody, whose expression has a good correlation with the detection of *ERG* rearrangements by FISH. The protein

product of *TMPRSS2-ERG* isoform, similar to almost all ETS fusions, is a truncated rather than a chimeric ERG protein and therefore it may result in an increased functional activity.²⁶ Thus, the functional consequences of the *TMPRSS2-ERG* fusion product are dependent on the downstream effects of ERG overexpression. Cai *et al.*²⁷ identified several consensus ERG transcription factor binding sites in the promoter region of *CXCR4*. In addition, *CXCR4*, and also *ADAMTS1*, have been found upregulated in the presence of ERG overexpression in prostate cancer, indicating that these two genes could be *ERG* downstream pathway genes.²⁴ *CXCR4* is a chemokine receptor factor that belongs to the family of G protein-coupled receptors and has been shown to play a crucial role in a number of biological processes.²⁸ Several studies have suggested that *CXCR4* overexpression could play an important role in prostate cancer metastases.²⁹⁻³⁵ In prostate cancer cell lines, *CXCR4* expression is regulated by the *TMPRSS2-ERG* fusion.^{24,27,32} In *TMPRSS2-ERG* positive VPCa cells line, ERG and *CXCR4* are highly expressed, and ERG binds to the *CXCR4* promoter sequences.²⁷ Prostate specific ERG expression has been associated with transcriptional upregulation of *CXCR4*.²⁴ There are no studies dealing with the relationship between *TMPRSS2-ERG* fusion and *CXCR4* overexpression in clinical samples of patients with prostate cancer.

In this paper, we have analyzed the relationship between quantitative mRNA expression of *CXCR4*, *TMPRSS2-ERG* rearrangement assessed by ERG protein expression, and Gleason grade in a series of primary prostate tumors. In addition we have investigated the prevalence of the *TMPRSS2-ERG* rearrangement by FISH and by ERG IHC, and also their relationship with tumor grade.

Materials and Methods

Patients and Tumor samples

Seventy-five prostate tumors were selected retrospectively from the files of the Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc) and 12 from the Tumor Bank of the Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. From these, 83 were needle biopsy or radical prostatectomy specimens and 4 were tumors found at autopsy, so-called latent tumors. All tumors were staged with the TNM classification. According to the current Gleason grading criteria, the prostate tumors were combined Gleason score = 6 (n = 37), combined Gleason score = 7 (n = 32) and combined Gleason score ≥ 8 (n = 18). In 43 tumors we had only formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues, in 3 tumors we had only frozen tissues and in 41 we had both types of samples.

The biopsy samples were collected between 2000 and 2011, with a follow-up time from 1 to 143 months (mean = 40.7). The autopsy samples dated from 1993 to 2009.

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) analysis of TMPRSS2-ETS fusion

To assess the genetic status of *TMPRSS2* and *ERG* genes, FISH was carried out on FFPE tissues from 44 prostate tumors. *TMPRSS2-ERG* gene rearrangement status was evaluated using break-apart probes. The following bacterial artificial chromosome (BAC) clones were used: RP11-35C4 5' and CTD-210307 3' for *TMPRSS2* gene; and CTD-2102A22 5' and CTD-2341018 3' for *ERG* gene. We used consecutive sections for hematoxylin-eosin (H&E) and FISH in each of the samples. FISH technique and analysis were performed as previously described.³⁶

A normal pattern, without rearrangement, was considered when the sample showed 2 pairs of juxtaposed red and green signals; a translocation pattern through

deletion was identified when a juxtaposed red and green signal and a single red or single green signal were observed and finally, a translocation pattern but without deletion was recognized when a juxtaposed red and green signal and a single red plus a single green for the rearranged allele were seen.

Evaluation of ERG protein expression by immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical analysis was carried out on FFPE tumor tissue in 84 out of the 87 prostate tumors using a primary rabbit anti-ERG monoclonal antibody (clone EPR3864, Epitomics, Burlingame, CA, USA) and the Dako Envision+System-HRP (DAKO, Glostrup, Denmark).

There were no significant differences in the intensity of ERG staining, so only two patterns of expression were considered: negative cases (without any detectable staining) or positive cases (with positive nuclear staining). We used endothelial cells as internal positive control in each slide (Figure 1).²⁵

Total RNA Extraction and CXCR4 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted from 44 frozen prostate tumor samples and from 4 non-tumor prostate samples, used as controls, as previously reported.³⁷ All samples contained at least 70% of tumor cells. 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). According to combined Gleason score, tumors were: Gleason 6 (n = 19), Gleason 7 (n = 16) and Gleason ≥ 8 (n = 9).

CXCR4 mRNA expression was analyzed by quantitative Real-Time PCR in the 44 samples, with the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System and using the TaqMan® Gene Expression Assay probe and primer mix (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). The Assay Identification number for *CXCR4* was Hs00976734_m1, and the *GADPH* (4310884E) gene was used as internal control. The samples were run in triplicate and the mean value was calculated for each case. Non-neoplastic prostate samples (4 cases/run) were used to normalize the data using the $\Delta\Delta C_t$ method. Values > 2 were considered to indicate *CXCR4* mRNA overexpression.

Statistical analysis

Categorical variables are presented as frequencies and percentages. Fisher's Exact test was used to compare categorical variables among groups. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The agreement between FISH and IHC techniques was calculated using the Cohen's Kappa Index.

Results

Detection of TMPRSS2-ERG rearrangements by FISH and distribution according to combined Gleason score

We have investigated by FISH the presence of the *TMPRSS2-ERG* rearrangement in a set of 44 tumors (Table 1). The *TMPRSS2* rearrangement was found in 19 (47.5%) of them, 12 through the deletion of one allele (most frequently 3') and 6 through translocation, while one case harbored both rearrangement and amplification of *TMPRSS2*. To assess whether the 3' partner of the fusion was the *ERG* gene, we have analyzed *ERG* status. The FISH test for *ERG* was successful in 37 cases and from these, *ERG* rearrangement was found in 15 (40.5%). The *TMPRSS2-ERG* fusion was confirmed in 14 of the 15 cases. In another case in which we found rearrangement of the *ERG* gene we could not perform *TMPRSS2* FISH analysis, thus we were not able to

confirm *TMPRSS2* as the 5' partner of the fusion in this case. Also, in 4 *TMPRSS2* rearranged cases it was not possible to perform the FISH analysis for *ERG*, and in one *TMPRSS2* rearranged case, *ERG* was not rearranged but had a gain.

Finally, we found *TMPRSS2* and/or *ERG* gains but not rearrangement in 4 cases: in 2 cases we detected only a gain of the *TMPRSS2* gene and other two cases harbored both a *TMPRSS2* and an *ERG* gain.

According to combined Gleason score and considering only the 34 cases with information available for both genes, we found that 53.8% (7 of 13) of Gleason 6 group, 38.5% (5 of 13) of Gleason 7 and 37.5% (3 of 8) of the cases with Gleason score ≥ 8 harbored the *TMPRSS2-ERG* rearrangement. There were no statistically significant differences among the different Gleason categories.

ERG immunostaining analysis, distribution according to Gleason score and correlation with TMPRSS2-ERG rearrangement

As *TMPRSS2-ERG* fusion results in a marked nuclear ERG protein expression detected by IHC,³ we have analyzed ERG immunostaining in a set of 84 prostate tumors. Forty four of them are the same in which we have previously checked the presence of rearrangement by FISH. Tumor nuclei were either positive or completely negative with the ERG antibody (Figure 1). Forty-seven of 84 (56%) prostate tumors showed ERG protein expression. In two cases, there were ERG-positive and ERG-negative areas. The remaining cases showed homogeneous ERG expression. According to Gleason score, we found that 58.3% (21 of 36) of Gleason 6; 54.8% (17 of 31) of Gleason 7 and 53% (9 of 17) of Gleason ≥ 8 cases showed ERG expression. This difference was not statistically significant.

From the 44 cases analyzed also by FISH, we found ERG expression in 21 cases (47.7%). There is a statistical association between rearrangement and protein

expression (Kappa Index = 0.954 (0.866-1.0; 95% CI)) (Figure 2). We did not detect any *TMPRSS2-ERG* rearranged case with a negative ERG immunostaining.

Considering the 44 cases analyzed by both IHC and FISH techniques, 14 (66.7%) of the 21 cases with positive ERG immunostaining harbored the *TMPRSS2-ERG* rearrangement. In 5 cases FISH analysis could not be completed for both genes and another case showed *TMPRSS2* but not *ERG* rearrangement. Finally, only one case without any rearrangement detectable by FISH, showed ERG protein expression. In these two cases with no detectable *ERG* rearrangement, ERG protein expression could be due to a type of alteration different from the *TMPRSS2-ERG* fusion. Interestingly, we identified also one case in which we found positivity for FISH as well as for IHC in a region of the tumor, while another region was negative for both techniques, confirming the good association between rearrangement and protein expression.

Quantitative CXCR4 mRNA expression and ERG protein expression

mRNA *CXCR4* expression was investigated by qRT-PCR in 44 prostate tumors for which we had adequate frozen samples available. From these, 19 tumors were Gleason 6, 15 were Gleason 7, and 10 were Gleason ≥ 8 . Based on the statistical analysis, the cut-off assumed for mRNA overexpression was > 2 and 14 of 44 (31.8%) prostate tumors showed *CXCR4* overexpression. According to the Gleason score 26.3% (5 of 19) of Gleason 6 tumors, 13.3% (2 of 15) of Gleason 7 tumors and 70% (7 of 10) of the Gleason ≥ 8 tumors overexpressed *CXCR4* (Figure 3). Thus, *CXCR4* mRNA overexpression was statistically associated with high Gleason score (Fisher's Exact Test, $p = 0.009$). In 41 of these 44 samples, ERG immunostaining analysis was also performed and from these, mRNA overexpression was found in 11. Seven of these 11 cases (63.6%) showed positive expression of ERG protein. However, there was a higher percentage of cases (21 of 28, 75%) with ERG immunostaining without *CXCR4*

mRNA overexpression (Figure 4). Thus, there was no statistical association between ERG protein and *CXCR4* mRNA expression, indicating that *CXCR4* could be upregulated by an ERG independent mechanism.

Discussion

The presence of multiple types of rearrangement between ETS family members and different 5' fusion partners is well documented in the literature, being the *TMPRSS2-ERG* the most frequently reported in prostate cancer and the most likely aberrant cause of ERG overexpression.¹ Moreover, the studies performed with multiple types of human neoplasms reveal that *TMPRSS2-ERG* rearrangement is a genomic alteration specific for prostate cancer and not found in other human neoplasms.³⁸

There is controversy on the prognostic implications of the *TMPRSS2-ERG* fusion in prostate cancer and about the possibility that *TMPRSS2-ERG* rearrangement could be either an early or a late event in prostate carcinogenesis. In that sense, different studies have indicated that ERG could have a proto-oncogenic role in prostate tumor initiation.^{2,23} Other studies report that the *TMPRSS2-ERG* fusion is not enough to initiate prostate neoplasia (nor PIN) and that other cooperating oncogenic lesions, such as *PTEN* losses, would be required.^{24,39}

Perner *et al.*⁷ found a higher prevalence of *TMPRSS2-ERG* rearrangements in cases with high tumor stage and metastases, but without statistically significant differences. In the same series, cases with rearrangement through deletion showed a statistical trend for higher PSA biochemical recurrence rates when compared with prostate tumors without the fusion. Other reports support the association of *TMPRSS2-ERG* fusion with a more aggressive prostate cancer phenotype.¹⁸⁻²⁰

On the other hand, many studies have reported an association between rearrangement and low Gleason grade, and between *ERG* RNA expression (with or without rearrangement) and favorable prognostic factors.^{4,21}

In our series of primary prostate tumors, we have found a higher percentage of rearrangement in cases with Gleason = 6 compared to tumors with Gleason ≥ 7 , while the percentage of tumors with the rearrangement was very similar in Gleason = 7 and Gleason ≥ 8 cases. Our results are in concordance with other reports that have found a larger proportion of FISH positive tumors in the low Gleason categories.¹⁸⁻²⁰ Nevertheless, similar to Demichelis *et al.*¹⁹ we did not find any statistical association between fusion status and tumor grade.

A recent study, using a novel anti-ERG antibody, has shown a very good concordance between ERG protein immunostaining and *ERG* rearrangement detected by FISH in prostate cancer. We have assessed the immunohistochemical expression of ERG to investigate the concordance between *TMPRSS2-ERG* rearrangement and ERG protein expression in our cases, as well as the association between ERG protein expression and the combined Gleason score of the tumors. Similar to previous reports,^{25,40} about half of the prostate tumors showed ERG protein expression. We also found a very good statistical concordance between FISH and IHC analysis, as in all cases with *TMPRSS2-ERG* rearrangement there was expression of the ERG protein. There were only two cases in which ERG expression did not correlate with *TMPRSS2-ERG* rearrangement. In these cases, ERG protein expression should be explained through another mechanism, different from the *TMPRSS2-ERG* fusion. ERG protein expression was limited only to the neoplastic glands, and most tumor samples were either positive or completely negative. In two tumors we detected heterogeneous expression, with a positive and a negative ERG region. In one of them, FISH analysis could be performed,

and it revealed the *TMPRSS2-ERG* rearrangement in the ERG protein positive region, while the ERG negative region did not harbor the translocation. These findings further confirm the good association between rearrangement and ERG protein expression. According to the Gleason score, the percentage of ERG-positive tumors was similar in the Gleason 6 and 7 groups, but lower in the Gleason ≥ 8 group. However, as in the *TMPRSS2-ERG* detection analysis, this difference was not statistically significant.

Cai *et al.*²⁷ identified several consensus ERG binding sites in the promoter region of *CXCR4* gene. *CXCR4* has been found up-regulated in prostate cancer cell lines in the presence of ERG overexpression, and *TMPRSS2-ERG* activation seems to be able to regulate *CXCR4* expression and subsequent metastatic spread.²⁴ Regardless of its possible relationship with ERG, *CXCR4* by itself is a very interesting target to investigate in prostate cancer. The *CXCR4-CXCL12* interaction has been involved in prostate cancer cell migration, invasion and bone metastasis.^{31,34,35} *CXCR4* mRNA is overexpressed in prostate cancer cell lines as well as in a very high percentage of metastatic prostate samples.^{29,34,35} Hart *et al.*³² hypothesized that *CXCR4* is the key of prostate metastatic implantation in bone marrow.

In order to assess the role of *CXCR4* in the different groups of primary prostate tumors and its relationship with the *TMPRSS2-ERG* rearrangement, we have analyzed the mRNA quantitative expression of *CXCR4*, along with the immunohistochemical detection of ERG expression. We have found *CXCR4* mRNA overexpression in about one third of the cases, with a statistically significant higher expression in Gleason ≥ 8 prostate tumors. On the other hand, only a low percentage of tumors with Gleason ≤ 7 in our series overexpressed this gene. Several studies have reported, *CXCR4* overexpression in both localized and metastatic prostate tumors by means of IHC.^{29,35,41,42} Thus, Akashi *et al.*²⁹ showed that *CXCR4* protein expression predicts poor

prognosis in prostate cancer with bone metastases. They did not find any statistically significant differences in *CXCR4* expression with respect to pretreatment PSA level, combined Gleason score, clinical response to hormonal therapy, or extent of bone metastasis, but this may be due to the fact that their study was restricted to a subgroup of patients with advanced disease.

To the best of our knowledge, only one previous study has investigated *CXCR4* mRNA expression in primary prostate cancer: Sun *et al.*,⁴² using secondary data analysis from a previous cDNA microarray study,⁴³ reported increased *CXCR4* mRNA levels in prostatic hyperplasia (BPH), localized PCa and metastatic tumors, although no significant differences were found among BPH and the different tumor grade categories. In the present paper, we report for the first time that *CXCR4* mRNA is significantly overexpressed in a large percentage, over 70%, of prostate tumors with high combined Gleason score, but only in about 20.5% of tumors with Gleason scores 6-7. As we commented on previously, different studies have indicated that *TMPRSS2-ERG* rearrangement can lead to increased *CXCR4* expression.^{24,27} However, our results seem to indicate that there is no statistical association between *ERG* rearrangement and *CXCR4* quantitative mRNA expression. We hypothesize that only a low proportion of *CXCR4* overexpressing cases are due to the *ERG* rearrangement. Considering that the protein product of almost all ETS fusions, including the most common *TMPRSS2-ERG* isoform, is a truncated ETS protein rather than a chimeric protein,⁴⁴ we can speculate that not all *TMPRSS2-ERG* fusion protein products will be able to activate *ERG* downstream targets such as *CXCR4* and *ADAMTS1*.²⁷ *TMPRSS2-ERG* rearrangement could represent only one of the mechanisms for *CXCR4* aberrant overexpression, and high grade tumors could develop *CXCR4* overexpression through alternative mechanisms. More studies will be required to assess the prognostic value of *CXCR4*

expression, and to investigate whether this molecule could help to identify a subset of low grade cases with *TMPRSS2-ERG* fusion that could be at a higher risk of progression.

In conclusion, our results support the lack of association between *TMPRSS2-ERG* fusion and histological grade in prostate cancer, as well as the excellent correlation between *ERG* rearrangement and ERG immunohistochemistry. On the other hand, our results also indicate that *CXCR4* mRNA expression is independent of the *TMPRSS2-ERG* rearrangement, and show for the first time a statistical association between the increased *CXCR4* mRNA and high grade prostate cancer. Further studies are needed to determine if CXCR4-overexpressing, low grade prostate tumors constitute a subset with a higher risk of progression.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

The study has been funded with grants FIS/ Instituto Carlos III/ FEDER PS09/01106 from the Spanish Ministry of Health and Support Grant 2008 from the Spanish Association Against Cancer (Barcelona Territorial Board). With the support of ‘University and Research Department of Innovation, Universities and Enterprise of Generalitat de Catalunya and European Social Found’ and a personal IMIM Foundation grant. We thank Sergi Mojal (Department of Biostatistics, “Institut Municipal d’Investigació Mèdica, Hospital del Mar”, Barcelona, Spain) for the technical support. We also thank to the “Xarxa de Bancs de Tumors” sponsored by “Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC)” (Biobanc-PSMAR), to Pedro L. Fernández and Raquel Bermudo (Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain) and the Tumor Bank of the “Hospital Clínic-Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer” (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

References

1. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644-648.
2. Albadine R, Latour M, Toubaji A, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:1415-1422.
3. Esgueva R, Perner S, LaFargue J, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol* 2010;23:539-546.
4. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res* 2009;69:1400-1406.
5. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 2007;20:538-544.
6. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res* 2009;15:4706-4711.
7. Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:8337-8341.
8. Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, et al. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:717-719.
9. Svensson MA, LaFargue CJ, MacDonald TY, et al. Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer. *Lab Invest* 2011;91:404-412.
10. Tu JJ, Rohan S, Kao J, et al. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 2007;20:921-928.
11. Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. *Oncol Rep* 2007;17:1033-1036.
12. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 2008;21:1451-1460.
13. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:3396-3400.
14. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:73-80.

15. Han B, Mehra R, Suleman K, et al. Characterization of ETS gene aberrations in select histologic variants of prostate carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:1176-1185.
16. Hermans KG, Bressers AA, van der Korput HA, et al. Two unique novel prostate-specific and androgen-regulated fusion partners of ETV4 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:3094-3098.
17. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007;448:595-599.
18. Attard G, Clark J, Ambroisine L, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:253-263.
19. Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007;26:4596-4599.
20. Nam RK, Sugar L, Wang Z, et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2007;6:40-45.
21. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 2005;24:3847-3852.
22. Demichelis F, Rubin MA. TMPRSS2-ETS fusion prostate cancer: biological and clinical implications. *J Clin Pathol* 2007;60:1185-1186.
23. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177-188.
24. Carver BS, Tran J, Gopalan A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 2009;41:619-624.
25. Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM, et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* 2010;12:590-598.
26. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, et al. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 2009;56:275-286.
27. Cai J, Kandagatla P, Singareddy R, et al. Androgens Induce Functional CXCR4 through ERG Factor Expression in TMPRSS2-ERG Fusion-Positive Prostate Cancer Cells. *Transl Oncol* 2010;3:195-203.
28. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathol Int* 2010;60:497-505.
29. Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* 2008;99:539-542.

30. Arya M, Patel HR, McGurk C, et al. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol* 2004;4:291-303.
31. Gladson CL, Welch DR. New insights into the role of CXCR4 in prostate cancer metastasis. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1849-1851.
32. Hart CA, Brown M, Bagley S, Sharrard M, Clarke NW. Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process. *Br J Cancer* 2005;92:503-512.
33. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, et al. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915-1924.
34. Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest* 2004;84:1666-1676.
35. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62:1832-1837.
36. 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;23:703-712.
37. Agell L, Hernandez S, Salido M, et al. 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;24:443-452.
38. Scheble VJ, Braun M, Beroukhim R, et al. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod Pathol* 2010;23:1061-1067.
39. King JC, Xu J, Wongvipat J, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 2009;41:524-526.
40. Falzarano SM, Zhou M, Carver P, et al. ERG gene rearrangement status in prostate cancer detected by immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2011.
41. Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, et al. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:656-663.
42. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003;89:462-473.
43. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412:822-826.

44. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol* 2007;20:467-473.

Figure 1. ERG Immunostaining (A-C). (A) Strong ERG expression in tumor cells of Gleason 6 prostate adenocarcinoma (x40 and x100). (B) Strong ERG expression in tumor cells of Gleason 7 prostate adenocarcinoma (x40 and x200). (C) Completely negative immunostaining in Gleason 6 prostate adenocarcinoma (left) and in a Gleason 6 autopsy tumor (right) (x200).

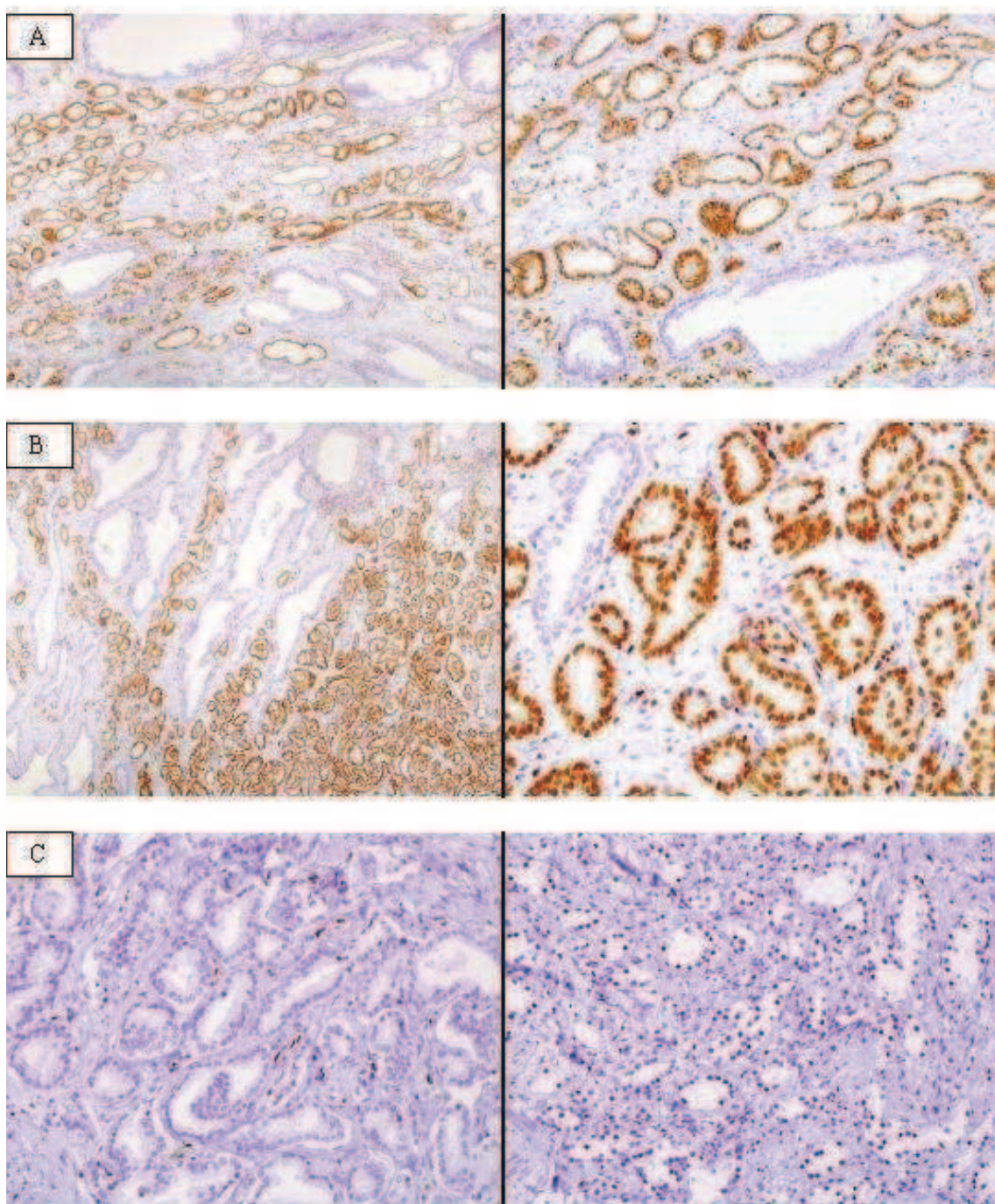


Figure 2. *ERG* rearrangement by FISH and *ERG* protein expression by IHC. (A) Case without *ERG* rearrangement that did not express *ERG* protein. (B)(C) Cases with the *ERG* rearrangement detected by FISH, and expressing the *ERG* protein.

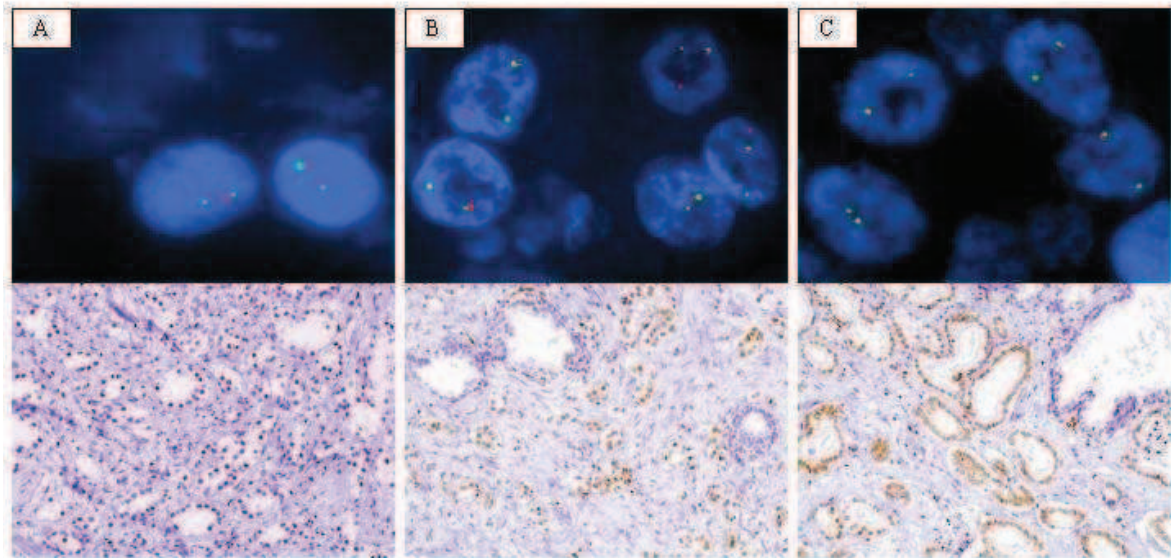


Figure 3. *CXCR4* mRNA expression in prostate tumors according to the different Gleason grades.

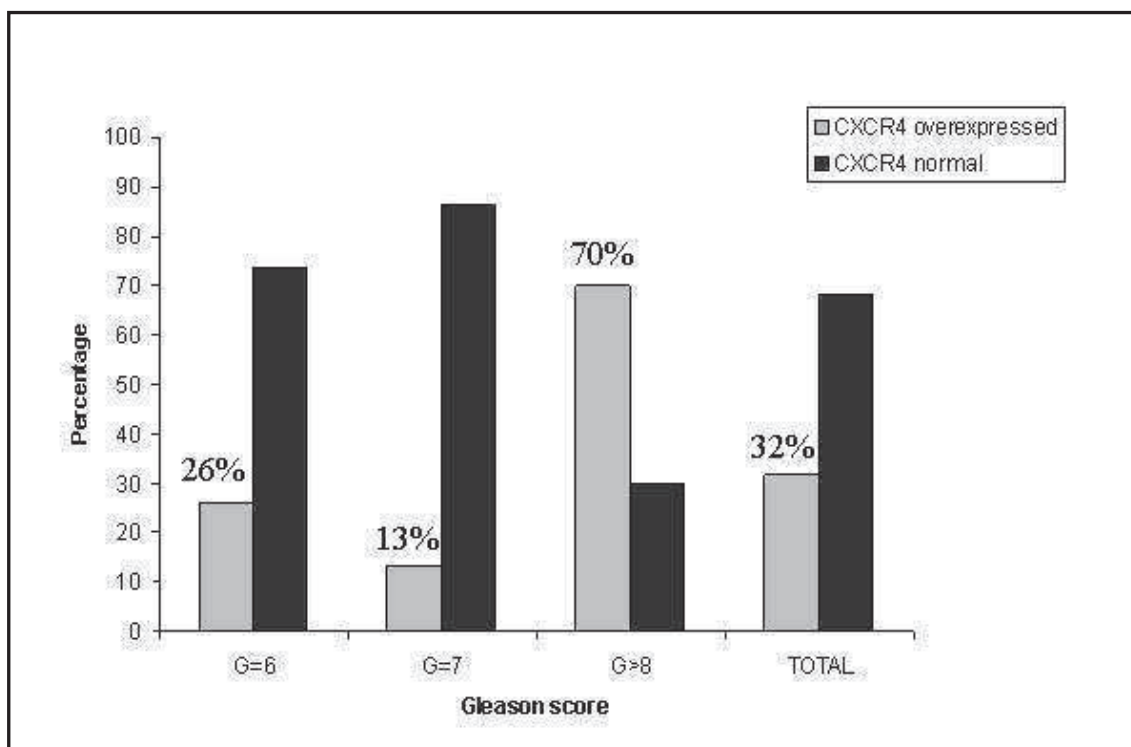


Figure 4. Correlation between ERG protein expression and *CXCR4* mRNA overexpression.

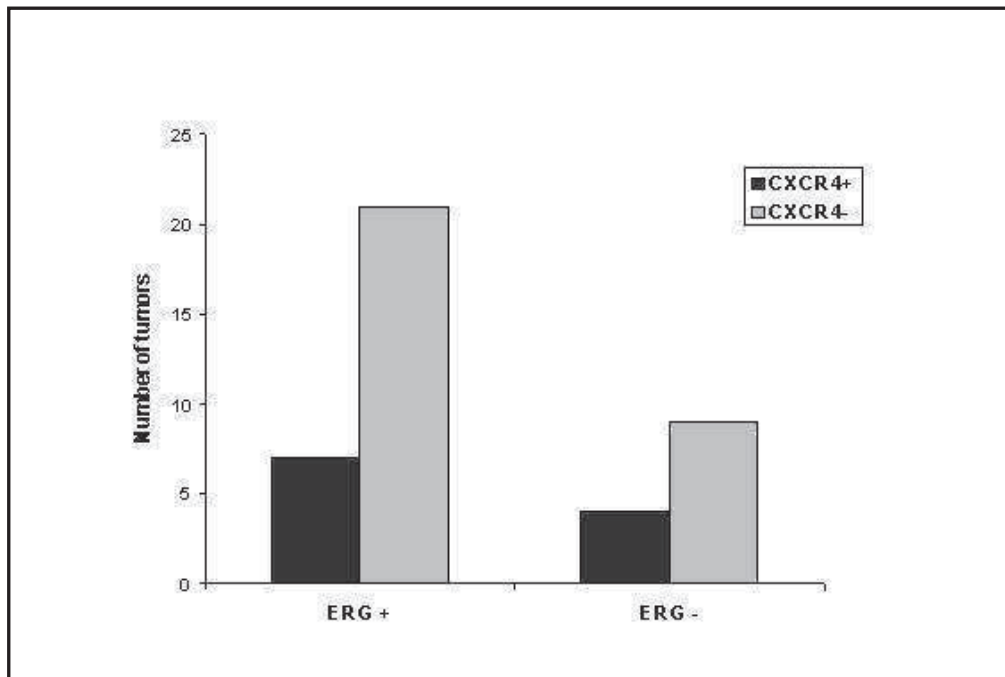


Table 1. *TMPRSS2* and *ERG* status detected by FISH analysis.

NUMBER OF TUMORS	TMPRSS2 STATUS	ERG STATUS
14	REARRANGED	REARRANGED
4	REARRANGED	Not successful
1	REARRANGED	GAIN
1	Not successful	REARRANGED
2	GAIN	GAIN
2	GAIN	WT ^a
14	WT	WT ^a
3	Not successful	WT ^a
3	WT	Not successful

^aWild type

7.2. Annex 2: Taula amb el total de casos analitzats en l'article 1 i 2, i els casos completats posteriorment a la publicació dels articles.

#	GLEASON	PROGRESSIÓ	MUTACIONS <i>P TEN</i>	MUTACIONS <i>EGFR</i>	FISH <i>EGFR</i>	IHQ EGFR	MUTACIONS <i>FGFR3</i>	ALTERACIONS TOTALES
1	6	1	WT	WT	-	-	WT	WT
2	6	0	WT	WT	-	WT	WT	WT
3	6	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
4	6	0	WT	WT	WT	WT	S249C	FGFR3
5	6	0	WT	WT	-	WT	WT	WT
6	6	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
7	6	0	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
8	6	Pèrdua seguiment	WT	WT	-	WT	WT	WT
9	6	-	WT	WT	-	Sobreexpressió	WT	EGFR
10	6	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT
11	6	0	WT	WT	-	-	WT	WT
12	6	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
13	6	0	WT	WT	WT	WT	S249C	FGFR3
14	6	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
15	6	0	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
16	6	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
17	6	-	WT	WT	-	Sobreexpressió	WT	EGFR
18	6	-	WT	WT	-	-	S249C	FGFR3
19	6	0	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
20	6	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
21	6	0	WT	I789I	WT	WT	WT	EGFR
22	6	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT
23	6	0	WT	WT	-	WT	WT	WT
24	6	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT
25	6	1	WT	WT	WT	WT	WT	WT
26	6	-	WT	WT	-	WT	WT	WT

27	6	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
28	6	-	-	I821T	-	-	-	-	-	WT	EGFR	WT
29	6	-	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
30	6	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
31	6	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR	WT
32	6	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
33	6	-	-	WT	-	-	-	-	-	WT	-	-
34	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
35	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
36	6	-	WT	WT	WT	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
37	6	-	WT	-	-	-	WT	WT	-	WT	-	-
38	6	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
39	6	-	-	WT	-	-	-	-	-	WT	-	-
40	6	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
41	6	-	-	-	-	-	-	-	-	A393E	FGFR3	WT
42	6	-	WT	WT	-	-	-	-	-	WT	WT	WT
43	6	-	-	WT	-	-	-	-	-	WT	-	-
44	6	0	-	-	-	-	-	-	-	A393E	FGFR3	WT
45	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
46	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
47	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	S249C	FGFR3	WT
48	6	0	-	-	-	-	-	-	-	S249C	FGFR3	WT
49	6	-	WT	WT	-	-	-	-	-	WT	WT	-
50	6	-	WT	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
51	6	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
52	7	0	WT	WT	WT	Guany	WT	WT	WT	WT	EGFR	WT
53	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
54	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
55	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
56	7	1	WT	WT	WT	-	WT	WT	-	WT	WT	WT
57	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	-	WT	WT	WT

58	7	0	WT	WT	WT	WT	-	-	WT	WT
59	7	-	WT	WT	I821T	WT	Sobrexpressió	-	WT	EGFR
60	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
61	7	0	D223N	WT	WT	WT	-	S249C	WT	PTEN i FGFR3
62	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
63	7	-	WT	WT	WT	-	WT	-	-	-
64	7	0	P95S	WT	WT	-	WT	WT	WT	PTEN
65	7	1	WT	WT	WT	WT	-	-	-	-
66	7	1	WT	WT	WT	-	-	WT	WT	WT
67	7	0	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
68	7	-	WT	WT	V834A	-	Sobrexpressió	WT	WT	EGFR
69	7	0	WT	WT	WT	-	-	WT	WT	WT
70	7	0	-	-	V834A	-	Sobrexpressió	WT	WT	EGFR
71	7	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
72	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
73	7	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
74	7	-	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
75	7	0	WT	WT	H870N	-	WT	WT	WT	EGFR
76	7	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	-	-
77	7	-	WT	WT	WT	-	Sobrexpressió	WT	WT	EGFR
78	7	0	WT	WT	WT	-	-	WT	WT	WT
79	7	1	WT	WT	WT	-	-	WT	WT	WT
80	7	-	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
81	7	0	WT	WT	WT	-	Sobrexpressió	S249C	WT	EGFR i FGFR3
82	7	0	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
83	7	-	WT	WT	WT	WT	Sobrexpressió	-	-	EGFR
84	7	1	WT	WT	WT	WT	WT	-	-	-
85	7	-	WT	WT	WT	Guany	-	WT	WT	EGFR
86	7	-	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT	WT
87	7	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
88	7	0	WT	WT	WT	-	Sobrexpressió	-	-	EGFR

89	7	-	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	-	-
90	7	-	-	-	-	-	-	-	WT	-	-
91	7	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
92	7	-	WT	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
93	7	-	WT	WT	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	WT	EGFR
94	7	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	-
95	7	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	-
96	7	-	-	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	-
97	7	0	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
98	7	-	WT	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
99	7	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
100	7	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	-
101	8	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	-	-
102	8	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	-	-
103	8	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
104	8	-	WT	WT	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	WT	EGFR
105	8	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
106	8	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	-	-	-
107	8	0	WT	WT	WT	WT	Guany	-	-	-	EGFR
108	8	-	-	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	-
109	8	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	-
110	8	-	WT	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
111	8	-	-	-	-	-	-	-	WT	WT	-
112	8	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
113	9	1	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
114	9	1	WT	WT	WT	WT	WT	Sobreexpressió	-	-	EGFR
115	9	1	WT	WT	WT	WT	Guany	-	-	-	EGFR
116	9	1	WT	WT	WT	WT	WT	Sobreexpressió	-	-	EGFR
117	9	-	WT	WT	WT	WT	WT	-	WT	WT	WT
118	9	0	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
119	9	-	WT	WT	WT	WT	WT	Sobreexpressió	WT	WT	EGFR

120	9	1	-	-	-	-	-	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
121	9	1	WT	-	-	-	-	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
122	9	-	-	-	-	-	-	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
123	9	-	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
124	9	-	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
125	9	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-
126	9	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-
127	9	-	-	-	-	-	-	-	-	WT	-
128	10	Pèrdua seguiment	fra164, STOP 166	-	-	-	-	WT	-	WT	PTEN
129	10	-	WT	-	-	-	-	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
130	10	-	WT	-	-	-	-	WT	WT	WT	WT
131	10	-	WT	-	-	-	-	WT	Sobreexpressió	WT	EGFR
132	Metàstasi	1	WT	-	-	-	-	V834A	WT	WT	EGFR
133	Metàstasi	1	WT	-	-	-	-	WT	-	-	-
134	Metàstasi	1	WT	-	-	-	-	WT	-	WT	WT
135	Metàstasi	1	WT	-	-	-	-	WT	WT	WT	WT
136	Metàstasi	1	WT	-	-	-	-	WT	WT	-	-
137	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	WT	WT	WT	-
138	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
139	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
140	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
141	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	WT	-	WT	-
142	Metàstasi	1	-	-	-	-	-	H870N	-	WT	EGFR
143	PC3		-	-	-	-	-	-	-	WT	-
144	DU145		-	-	-	-	-	-	-	WT	-

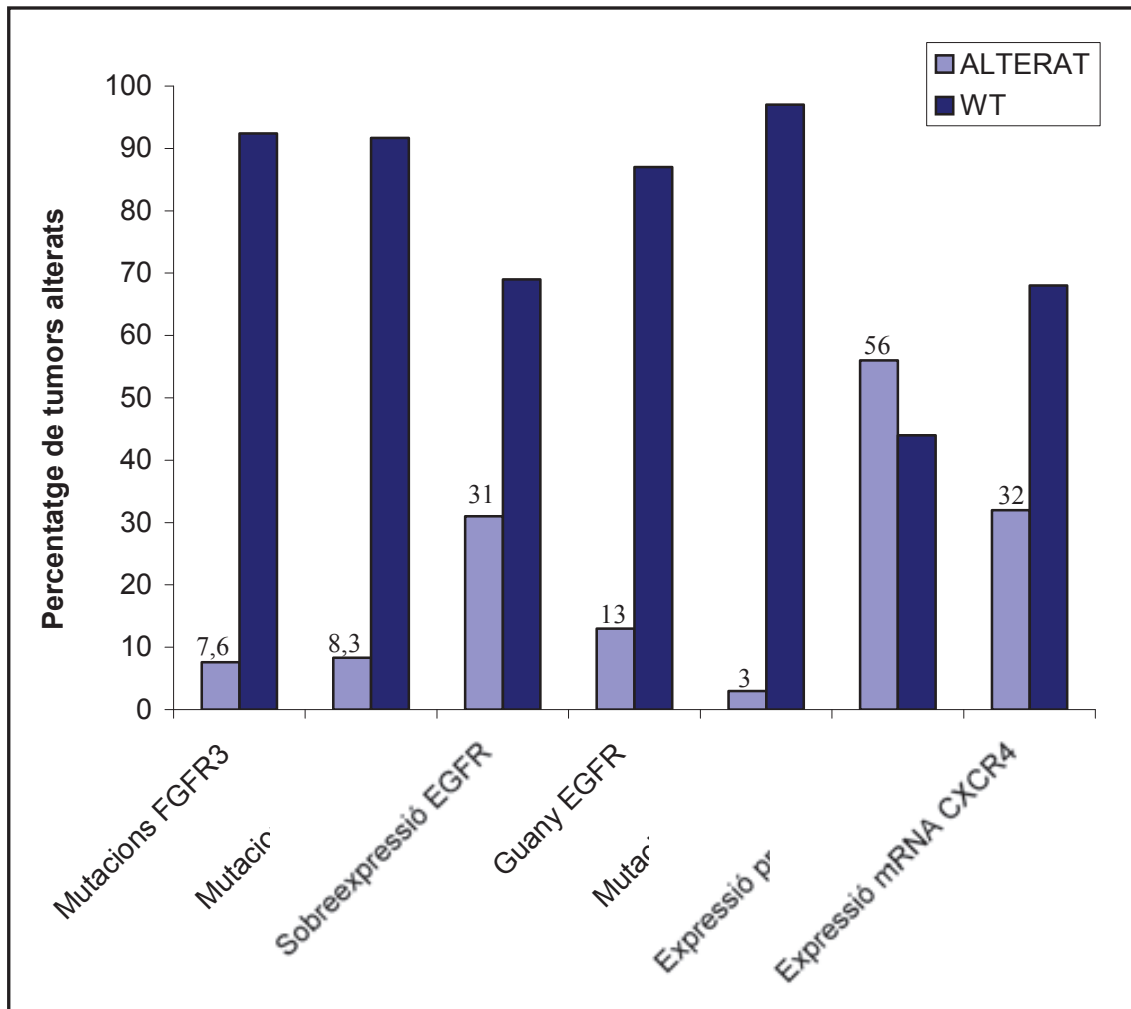
I: Progressió bioquímica i/o clínica

0: No progressió

(-): No fet/No disponible

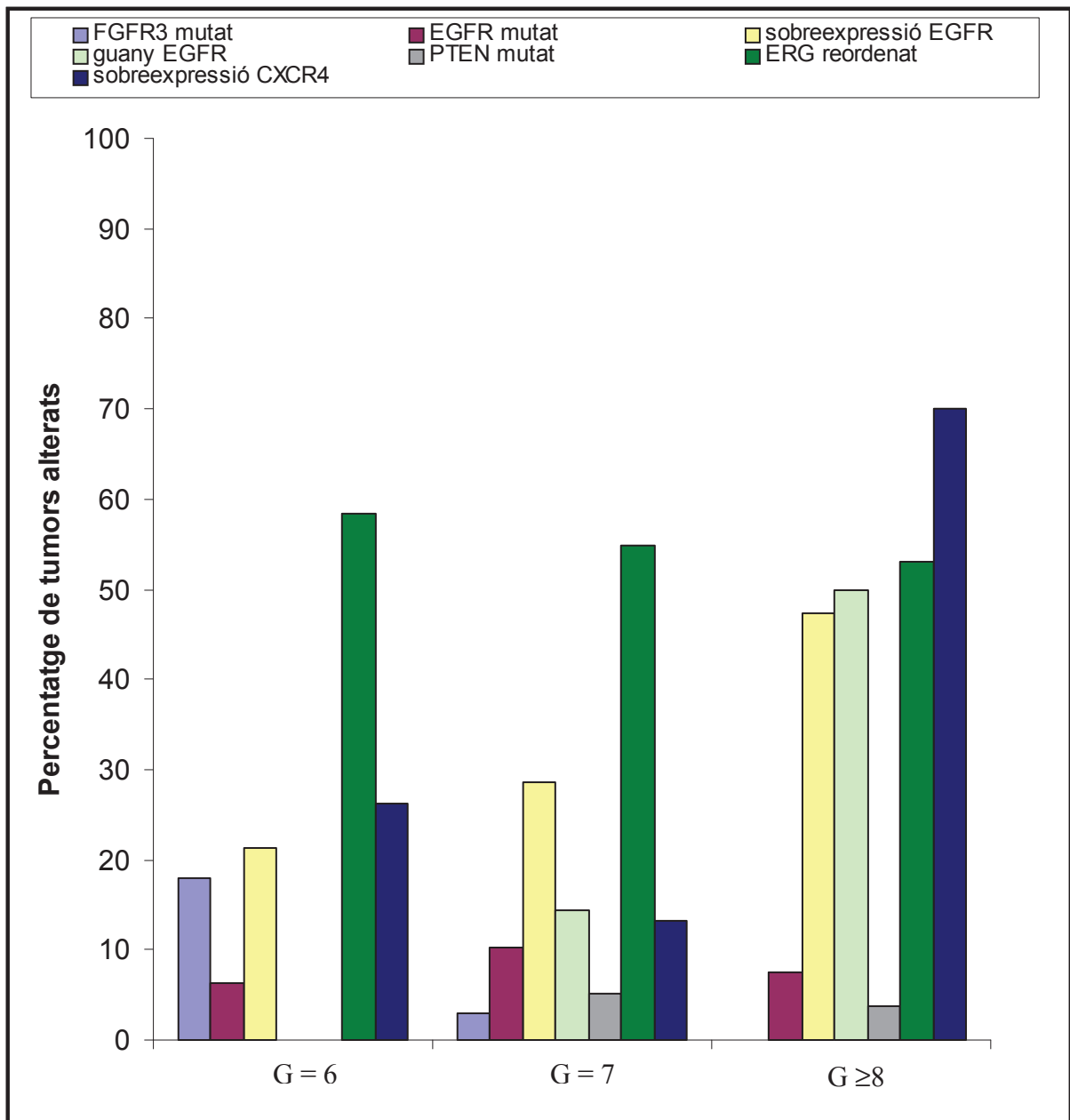
Anàlitzats post-artícles

7.3. Annex 3: Resum de les alteracions dels diferents gens estudiats (*PTEN*, *EGFR*, *FGFR3*, *ERG* i *CXCR4*).



Després d'analitzar les diferents alteracions en els gens *PTEN*, *EGFR*, *FGFR3*, *ERG* i *CXCR4* podem concloure que les mutacions somàtiques són una petita representació de les alteracions detectades en els tumors de pròstata respecte a d'altres tipus d'alteracions, com són el reordenament *TMPRSS2-ERG* (mesurat per la detecció proteica d'ERG), la sobreexpressió proteica d'EGFR i la sobreexpressió d'ARNm de *CXCR4*.

7.4. Annex 4: Resum de les diferents alteracions trobades agrupades segons els graus de Gleason.



Si considerem els diferents subgrups de tumors segons el grau de Gleason, podem concloure que les mutacions de *FGFR3* es troben estadísticament associades a tumors de pròstata de baix grau ($p = 0.007$). Considerant el total d'alteracions d'EGFR (mutació, sobreexpressió i guany) i les mutacions de *PTEN*, i comparant els casos amb Gleason ≤ 7 i els casos amb Gleason ≥ 8 trobem que està estadísticament associat amb els tumors de pròstata d'alt grau ($p = 0.04$). El reordenament d'*ERG* presenta una

prevalença similar en tots els grups de Gleason i, per últim, la sobreexpressió d'ARNm de *CXCR4* es troba associada als tumors més agressius ($p = 0.009$).