

Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca
Facultatea de Biologie și Geologie

Strategii de analiză bioinformatică
în genomica funcțională aplicată la biologia
cancerului

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducator științific:
Prof. Dr. Nicolae Dragoș

Doctorand:
Loredana Bălăcescu (n.Terpe)

Cluj-Napoca

- 2011 -

CUPRINS

1	Introducere	3
2	Scopul studiului	4
3	Evaluarea genomică la nivel tisular. Studiul microarray	5
3.1	Materiale și metode	5
3.1.1	Material biologic	5
3.1.2	Izolarea ARN total	5
3.1.3	Reacția microarray. Tehnologia Agilent	5
3.1.4	Analiza bioinformatică a datelor microarray	5
3.1.5	Reacția RT-PCR	6
3.2	Rezultate și discuții	6
3.2.1	Analiza nivelelor de exprimare genică cu pachetul software Limma	6
3.2.2	Analiza nivelelor de exprimare genică cu softul Gene Spring GX	7
3.2.3	Compararea datelor microarray obținute cu cele două abordări bioinformaticice	8
3.2.4	Evaluarea profilului funcțional al genelor diferit exprimate între țesutul tumoral și țesutul normal de prostată	11
3.2.5	Evaluarea profilului funcțional al genelor diferit exprimate între țesutul tumoral și țesutul benign de prostată	20
3.2.6	Validarea datelor microarray	27
3.3	Concluzii	27
4	Evaluarea profilului molecular la nivel sangvin. Studiul PCR array	28
4.1	Materiale și metode	28
4.1.1	Material biologic	28
4.1.2	Izolarea ARN total	29
4.1.3	Reacția PCR array	29
4.1.4	Analiza statistică	29
4.2	Rezultate și discuții	29
4.3	Concluzii	31
5	Evaluarea proteinelor la nivel seric. Studiul Fast Quant array	32
5.1	Materiale și metode	32
5.1.1	Material biologic	32
5.1.2	Tehnologia Fast Quant array	32
5.1.3	Analiza statistică	32
5.2	Rezultate și discuții	32
5.3	Concluzii	35
6	Concluzii generale	35
7	Bibliografie selectivă	37

Cuvinte cheie: exprimare genică, microarray, angiogeneză, cancer, bioinformatică

1 Introducere

Cancerul este o boală genetică care apare ca urmare a unor alterări genetice și epigenetice la nivelul *oncogenelor*, *genelor supresoare de tumoră* și a altor *gene care controlează direct sau indirect proliferarea celulară*. Aceste alterări determină activarea sau inactivarea anormală a unor căi de semnalizare ducând la o proliferare necontrolată a celulelor transformate malign [1]. Din acest motiv înțelegerea dereglărilor apărute la nivelul căilor de semnalizare moleculară, în schimbul evaluării unei singure gene, poate aduce informații vitale în studiul acestei patologii.

Cancerul de prostată este una dintre cele mai frecvent diagnosticate patologii oncologice, reprezentând a doua cauză de deces în rândul populației masculine din țările industrializate. Cu toate acestea, rata de vindecare poate fi crescută în cazul în care boala este diagnosticată timpuriu. Diagnosticul și prognosticul cancerului de prostată este complicat datorită fenotipului său heterogen: este multi-focal, adeseori conține mai mult decât un grad histologic și deseori juxtapus și combinat cu hiperplazie benignă de prostată. Diagnosticul cancerului de prostată necesită markeri care pot să ajute la aprecierea riscului de progresie a bolii, ceea ce permite alegerea unui tratament optim.

Datorită tehnicilor de screening și diagnostic precoce, care s-au îmbunătățit în ultimii ani, multe dintre cazurile de cancer de prostată sunt diagnosticate în prezent în stadii incipiente. În prezent screeningul și diagnosticul cancerului de prostată se face prin determinarea serică a antigenului specific prostatic (PSA), tușeul rectal (DRE) și examenul histopatologic al țesutului de prostată recoltat prin biopsie.

PSA este considerat cel mai important biomarker pentru screeningul și depistarea precoce a cancerului de prostată [2]. Din păcate, există însă limitări în utilizarea PSA, în principal din cauza lipsei de specificitate în detectarea cancerului. PSA nu face distincție între cancerul de prostată și alte procese nonmaligne ale prostatei, cum ar fi hiperplazia benignă de prostată, inflamații și infecții sau între cancerele irelevante (cancere microscopice care nu pun în pericol viața pacientului) și cele relevante clinic. Aceste constatări fals pozitive duc la biopsii inutile sau la o supra diagnosticare și tratare a multor pacienți cu cancere microscopice irelevante care astfel nu pot beneficia de tratament local. Potrivit rezultatelor trialului de Prevenire a Cancerului de Prostată [3], 15,2% dintre bărbații cu nivel seric al PSA sub 4.0 ng / ml au fost diagnosticați cu cancer de prostată în timp ce doar 20-25% dintre

pacienții cu nivel seric PSA care depășește această cut off au avut confirmare histologică a cancerului de prostată [4].

Aceste constatări indică necesitatea de a se căuta biomarkeri eficienți în cancerul de prostată capabili de a detecta această maladie în fazele incipiente sau înainte de a metastaza. Progresele actuale în domeniul genomicii și în tehnologia microarray au facilitat studiul cancerului de prostată la nivel molecular pentru identificarea genelor relevante implicate în această patologie. Profilul de exprimare genică a probelor tumorale prin microarray se bazează pe prezumția că patternurile de exprimare genică sunt determinanți majori ai comportamentului celulelor tumorale. Folosind tehnologia microarray este posibilă identificarea la nivelul întregului genom a aberațiilor moleculare complexe asociate patologiei tumorale. În ciuda a numeroase studii efectuate pe acest subiect, mecanismele moleculare care stau la baza apariției cancerului de prostată sunt departe de a fi înțelese.

2 Scopul studiului

Scopul acestui studiu constă în analiza bioinformatică și biostatistică a datelor de tip array (*microarray*, *PCR array*, *Fast Quant array*) în patologia prostatei. Datorită caracterului interdisciplinar al acestei teze obiectivele au fost structurate în obiective metodologice și biologice.

Obiectiv metodologic:

- Analiza prin două abordări bioinformatică a datelor microarray obținute pe o platforma Agilent

Obiective biologice:

- Evaluarea diferențelor transcriptomice la nivel tisular în patologia prostatei pentru a identifica gene implicate în această patologie – *studiul microarray*
- Evaluarea la nivel sangvin a unui profil molecular cu posibilă valoare de predicție noninvazivă în cancerul de prostată – *studiul PCR array*
- Evaluarea serică a unor proteine angiogenice implicate în patologia prostatei – *studiul Fast Quant array*

3 Evaluarea genomică la nivel tisular. Studiul microarray

3.1 Materiale și metode

3.1.1 Material biologic

Pentru studiul de genomică funcțională bazat pe reacția microarray au fost utilizate probe biologice tisulare provenite de la 14 pacienți, selectați pe baza valorii PSA > 4 ng/ml, a tușeului rectal anormal și a diagnosticului histopatologic. Astfel au fost selectate: 6 probe de țesut normal de prostată (grupul normal), 4 probe de adenocarcinom de prostată (grupul tumoral), respectiv 7 probe de hiperplazie benignă de prostată (grupul benign). Probele tisulare pentru studiul de microarray au fost recoltate prin macrodisecție. Toate probele de adenocarcinom de prostată utilizate în studiu au avut un scor Gleason 7 (3+4, 4+3). Țesutul normal a provenit din piesele de prostatectomie radicală.

3.1.2 Izolarea ARN total

ARN total a fost izolat cu *Tri Reagent*[®] (*Sigma Aldrich*), purificat cu *RNeasy*[®] *Mini kit* (*Qiagen*) și evaluat calitativ și cantitativ cu Bioanalizorul 2100 (*Agilent Technologies*) respectiv cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*). Doar probele care au prezentat un raport 28S/18S ≥ 1.6 și un RIN > 7.5 au fost folosite în analiză.

3.1.3 Reacția microarray. Tehnologia Agilent

Evaluarea genomică la nivel tisular a fost realizată prin reacția microarray, tehnologia Agilent. Designul ales pentru acest studiu a implicat un marcaj one-color. După izolarea ARN, etapele reacției microarray urmate în cadrul studiului au fost următoarele:

- sinteza și purificarea sondelor microarray marcate fluorescent – *LILAK*[®] (*Low Input Linear Amplification Kit*[®]), *RNeasy*[®] *Mini kit* (*Qiagen*);
- hibridarea sondelor microarray pe lame microarray WHG (*Whole Human Genome*) 4x44k și spălarea lamelor – *In situ Hybridization Kit Plus*[®] (*Agilent Technologies*);
- scanarea lamelor și achiziția de imagini;

3.1.4 Analiza bioinformatică a datelor microarray

Imaginile au fost procesate cu softul Feature Extraction[®] (FE) v.10.5, Agilent. Conform obiectivelor studiului, pentru preprocesarea și analiza diferențială au fost folosite două

softuri: Gene Spring GX 11 (GS) și Limma (*Linear Models for Microarray Data*). Analiza funcțională a pachetului de gene diferit exprimate a fost realizată cu softul Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

3.1.5 Reacția RT-PCR

Nivele de exprimare genică obținute prin microarray au fost validate prin RT-PCR.

3.2 Rezultate și discuții

3.2.1 Analiza nivelelor de exprimare genică cu pachetul software Limma

Fișierele .txt furnizate de FE, conținând un număr de 45015 secvențe, au fost importate în Limma. Datele au fost normalizate prin metoda *quantile normalization* pentru a putea fi comparate. După suprimarea controalelor pozitive și negative, în Limma s-au obținut 43376 secvențe. Au fost filtrate spoturile saturate și neuniforme. Înlocuirea valorilor lipsă din matricea intensităților s-a realizat cu metoda KNN iar sumarizarea s-a făcut la nivelul sondelor. În urma acestor analize numărul secvențelor a fost redus la 41000. Cele 3 grupuri definite: *normal(N)*, *benign(H)*, *tumoral(C)* s-au clusterizat în poziții diferite ale spațiului PCA (figura 1)

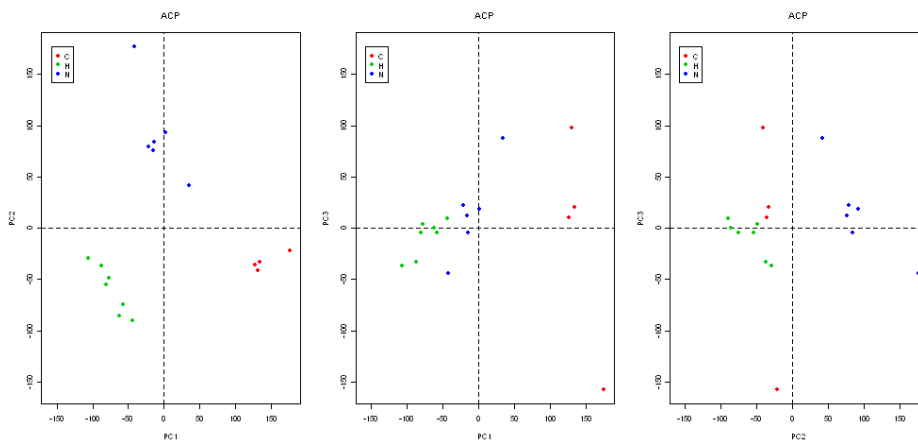


Figura 1. Analiza calitativă a probelor folosind reprezentarea PCA în Limma (albastru – grupul normal (N), roșu – grupul tumoral (C), verde – grupul benign (H))

Pentru identificarea genelor diferit exprimate între grupurile luate în studiu (*tumoral-normal*, *tumoral-benign*, *benign-normal*) s-a aplicat testul t moderat și corecția *False Discovery Rate* (FDR) dezvoltată de Benjamini și Hochberg. Cut off-ul pentru valoarea lui p-

ajustat a fost stabilit la 0.01 iar pentru valoarea fold change la ± 2 . Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Numărul genelor diferit exprimate între grupurile studiate, obținute cu Limma

Comparație	Nr. gene diferit exprimate	Cut-off p	Cut-off Fc
tumoral vs normal	1119	0.01	± 2
tumoral vs benign	3002	0.01	± 2
benign vs normal	1074	0.01	± 2

3.2.2 Analiza nivelelor de exprimare genică cu softul Gene Spring GX

Numărul secvențelor importate în GS a fost identic cu cel din Limma (45015 secvențe). Preprocesarea datelor în Gene Spring se realizează prin setarea inițială a parametrilor necesari, acest soft nu oferă posibilitatea de a controla fiecare etapă de preprocesare. Setările făcute în Gene Spring au fost similare celor din Limma. Datele au fost normalizate cu metoda *quantile normalization*. După suprimarea controalelor pozitive și negative, filtrarea spoturilor saturate și neuniforme, înlocuirea valorilor lipsă din matricea intensităților și sumarizare, numărul secvențelor a fost redus la 41093, cu 93 de secvențe mai multe decât în Limma. Evaluarea probelor în spațiul PCA evidențiază tendința de clusterizare a probelor în funcție de apartenența la grupurile luate în studiu: *normal*, *tumoral*, *benign* (figura 2).

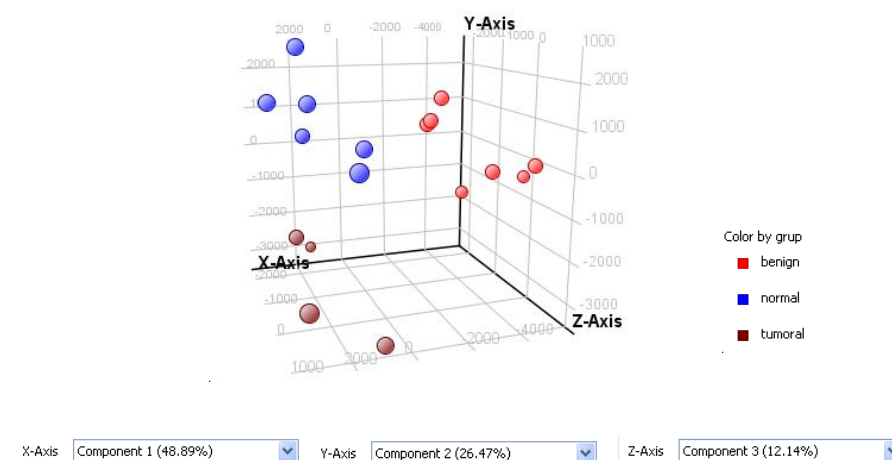


Figura 2 Analiza calitativă a probelor folosind reprezentarea PCA în GS (albastru – grupul *normal*, maro – grupul *tumoral*, roșu – grupul *benign*)

Pentru identificarea genelor diferit exprimate între grupurile luate în studiu (*tumoral vs normal*, *tumoral vs benign*, *benign vs normal*) s-a folosit testul t nepereche și corecția FDR, la

un cut off de 0.01 pentru valoarea lui p-ajustat. Au fost alese genele diferit exprimate cu un $F_c > 2$ respectiv < -2 (tabelul 2).

Tabel 2. Numărul genelor diferit exprimate între grupurile studiate, obținute cu GS

Comparație	Nr. gene diferit exprimate	Cut-off p	Cut-off f_c
tumoral vs normal	454	0.01	± 2
tumoral vs benign	5456	0.01	± 2
benign vs normal	2766	0.01	± 2

3.2.3 Compararea datelor microarray obținute cu cele două abordări bioinformatic

Rezultatele obținute prin cele două abordări au fost parțial diferite. Un număr de 312 gene diferit exprimate între grupurile *tumoral* și *normal*, au fost găsite cu ambele softuri în timp ce 807 gene diferit exprimate au fost identificate doar în Limma și doar 142 de gene diferit exprimate în GS. (figura 3)

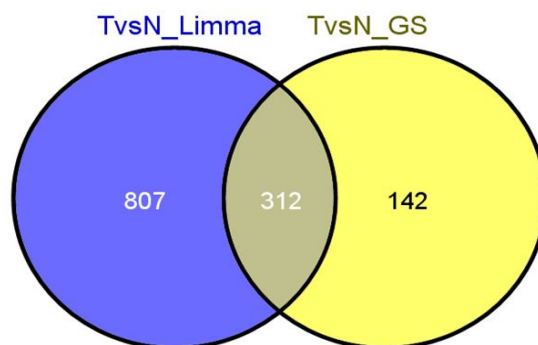


Figura 3. Reprezentarea cu ajutorul diagramei Venn a numărului de gene diferit exprimate între grupurile *tumoral* și *normal*, obținute cu Limma și GS

Comparația între grupurile *tumoral* și *benign* a pus în evidență un număr de 2664 gene supra și subexprimate în cancerul de prostată, comune în cele două abordări. 338 de gene au fost identificate doar în Limma și 2792 de gene în GS. (figura 4)

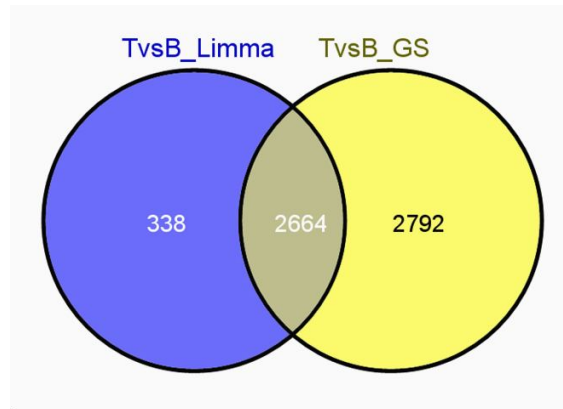


Figura 4. Reprezentarea cu ajutorul diagramei Venn a numărului de gene diferit exprimate între grupurile *tumoral* și *benign*, obținute cu Limma și GS

Și în cazul comparației dintre grupurile *benign* și *normal* s-au constatat diferențe: 116 gene identificate doar în Limma, 1808 gene identificate doar în GS și 958 de gene comune. (figura 5)

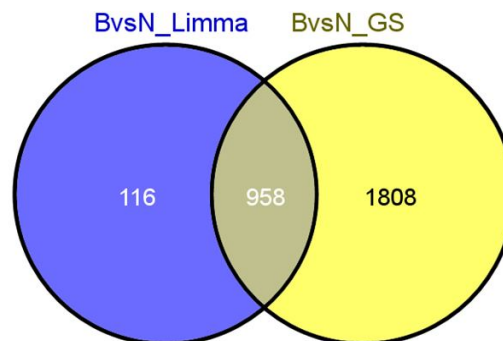


Figura 5. Reprezentarea cu ajutorul diagramei Venn a numărului de gene diferit exprimate între grupurile *benign* și *normal*, obținute cu Limma și GS

Profilul funcțional comparativ, realizat cu IPA, pentru seturile de gene diferit exprimate între țesutul tumoral și normal obținute cu Limma și GS a arătat o implicare a acestora în cancer, boli inflamatorii, boli genetice, moarte celulară. Procesele în care sunt implicate genele obținute cu Limma au fost mai semnificative d.p.d.v statistic. (figura 6)

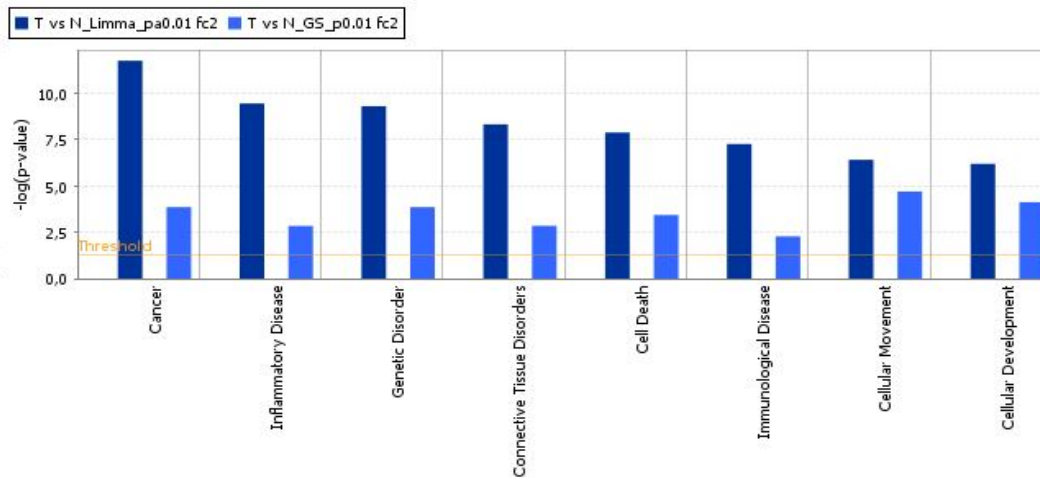


Figura 6. Compararea la nivel funcțional a genelor diferit exprimate între grupurile *tumoral* și *normal* obținute cu softurile Limma și GS

Rezultatele obținute cu cele softurile Limma și GS în cazul celorlalte comparații (*tumoral* și *benign*, *benign* și *normal*) sunt prezentate în figurile 7, 8.

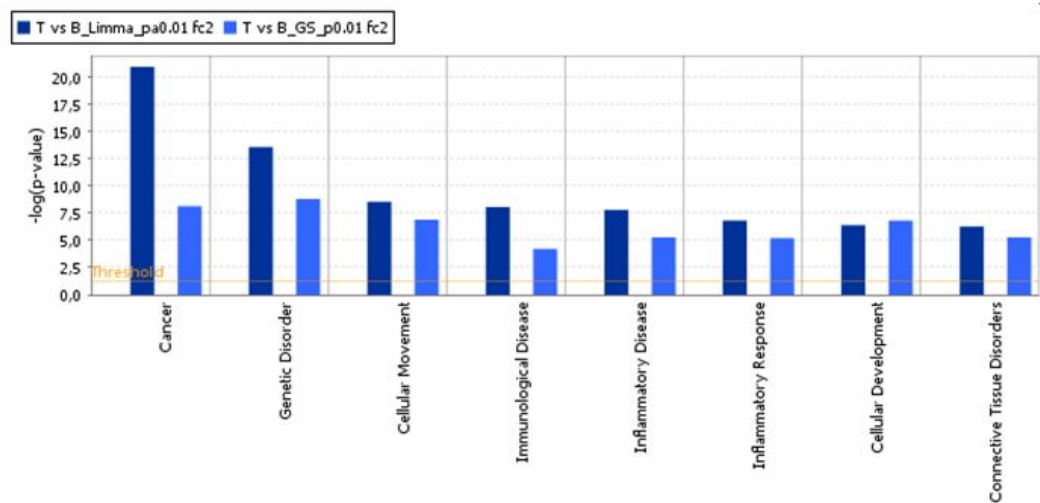


Figura 7. Compararea la nivel funcțional a genelor diferit exprimate între grupurile *tumoral* și *benign* obținute cu softurile Limma și Gene Spring

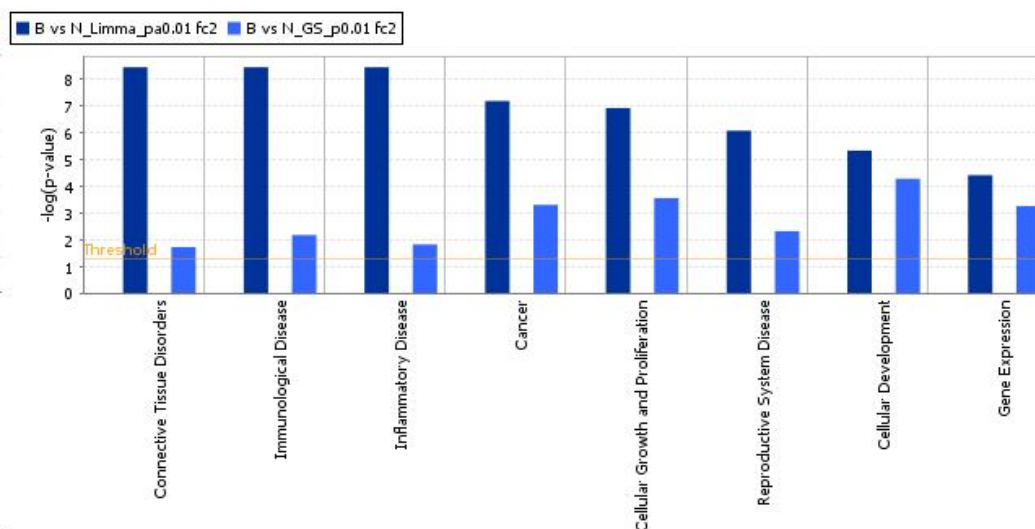


Figura 8. Compararea la nivel funcțional a genelor diferit exprimate între grupurile *benign* și *normal* obținute cu softurile Limma și GS

3.2.4 Evaluarea profilului funcțional al genelor diferit exprimate între țesutul tumoral și țesutul normal de prostată

Analiza funcțională s-a realizat cu IPA pentru pachetul de gene diferit exprimate identificate cu Limma. Cele mai importante procese în care au fost implicate genele identificate prin reacția microarray sunt prezentate în tabelul 3. Cu ajutorul sistemului IPA genele au fost grupate în 23 de rețele, 5 dintre acestea având scoruri mai mari de 20 și între 25-29 de gene focus din 35 posibile (figurile 9-13).

Tabel 3. Patologii și alterări genetice în care sunt implicate genele diferit exprimate în cancerul de prostată vs țesutul normal de prostată.

Patologii și alterări genetice	p value	nr. molecule implicate
Cancer (<i>Cancer</i>)	1,78E-12 - 2,59E-02	252
Boli inflamatorii (<i>Inflammatory Disease</i>)	3,58E-10 - 2,30E-02	234
Alterări genetice (<i>Genetic Disorder</i>)	5,02E-10 - 2,67E-02	453
Alterări ale genelor implicate în țesut conjunctiv (<i>Connective Tissue Disorders</i>)	4,79E-09 - 2,30E-02	157
Alterări musculare și osoase (<i>Skeletal and Muscular Disorders</i>)	2,30E-08 - 2,31E-02	219

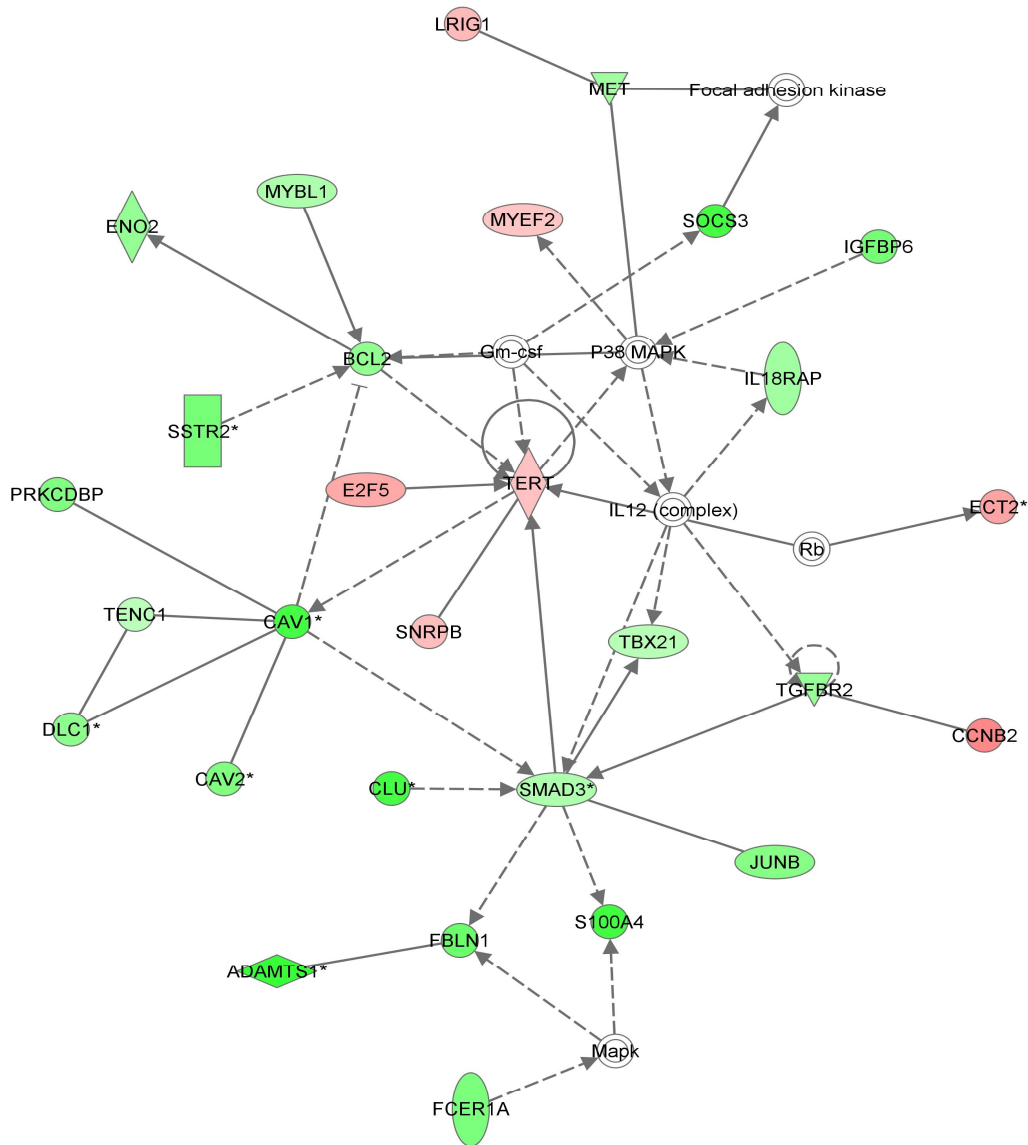


Figura 9. Cea mai importantă rețea (rețeaua nr.1) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în motilitatea celulară, dezvoltarea cancerului, creștere sau proliferare celulară. Săgețile indică direcția de interacțiune, care poate fi directă (linie continuă) sau indirectă (linie întreruptă). Intensitatea culorii indică gradul de reglare: roșu reprezintă o supraexprimare genică iar verde reprezintă o inhibare a exprimării genice. Genele incolore nu au fost identificate în experimentul nostru, ele fac parte din rețeaua prestabilită în care au fost integrate genele focus identificate în experimentul nostru de microarray.

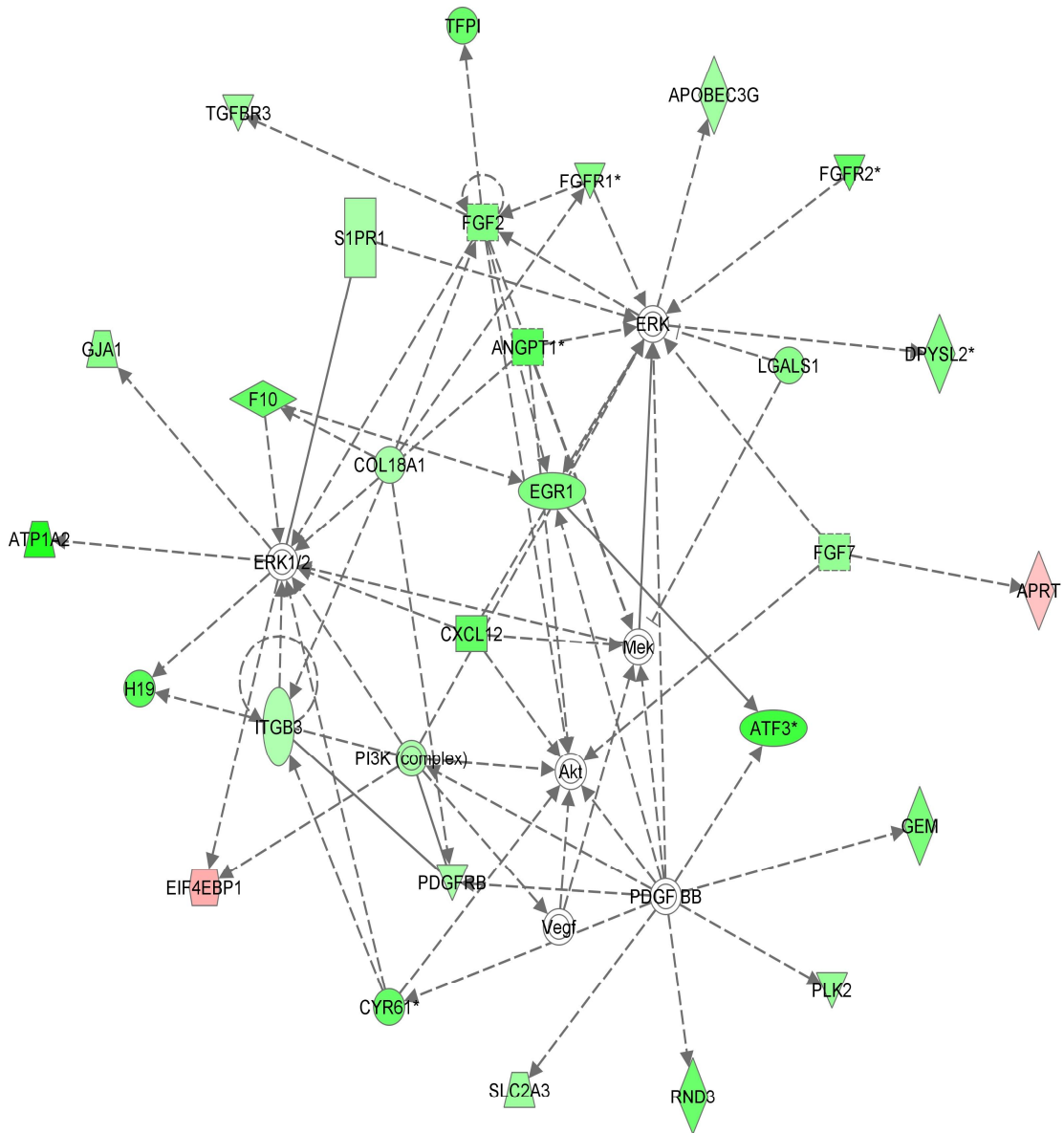
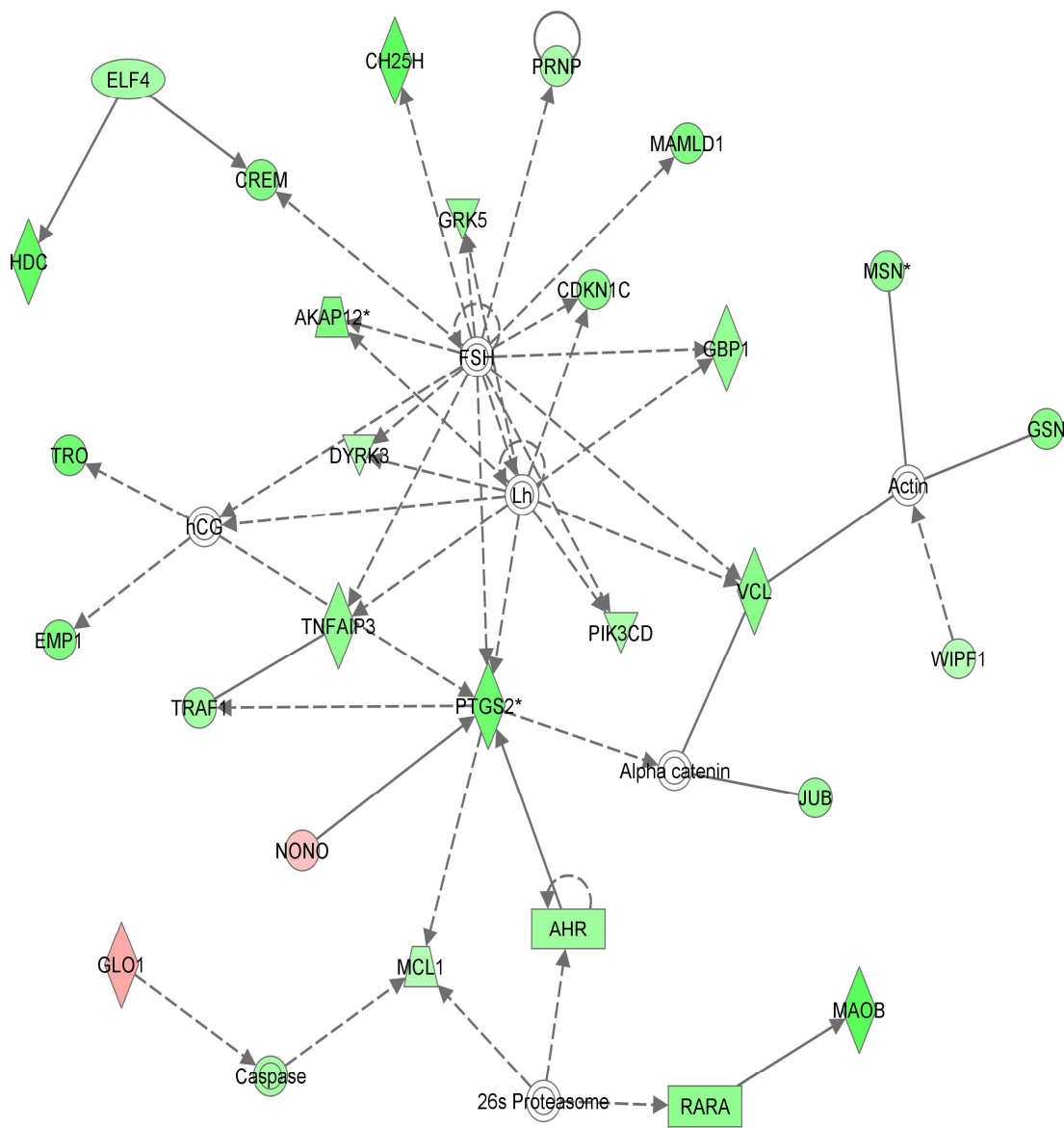
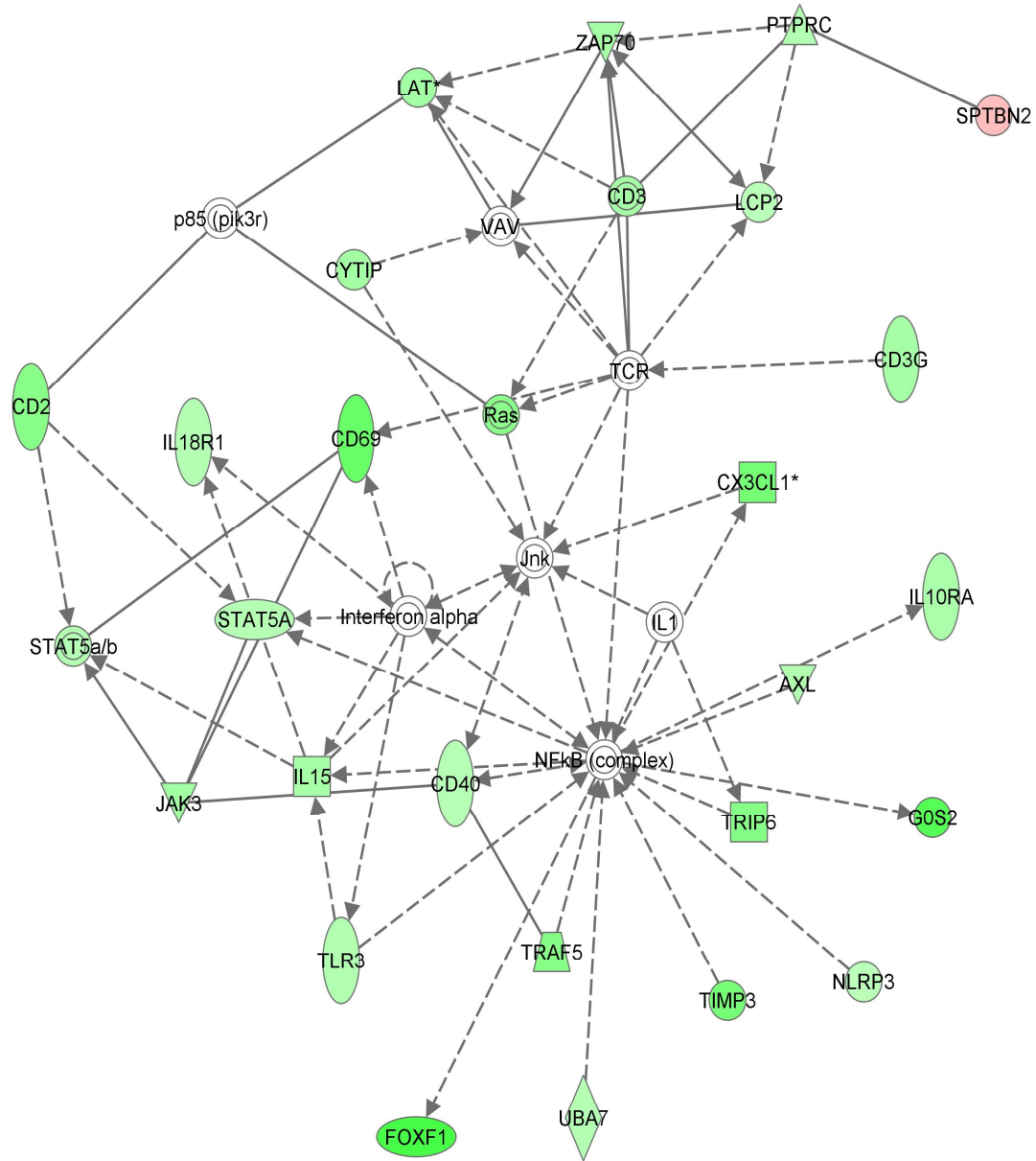


Figura 10. Rețeaua moleculară (rețeaua nr. 2) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în motilitate celulară, creștere și dezvoltare celulară, hematopoieză.



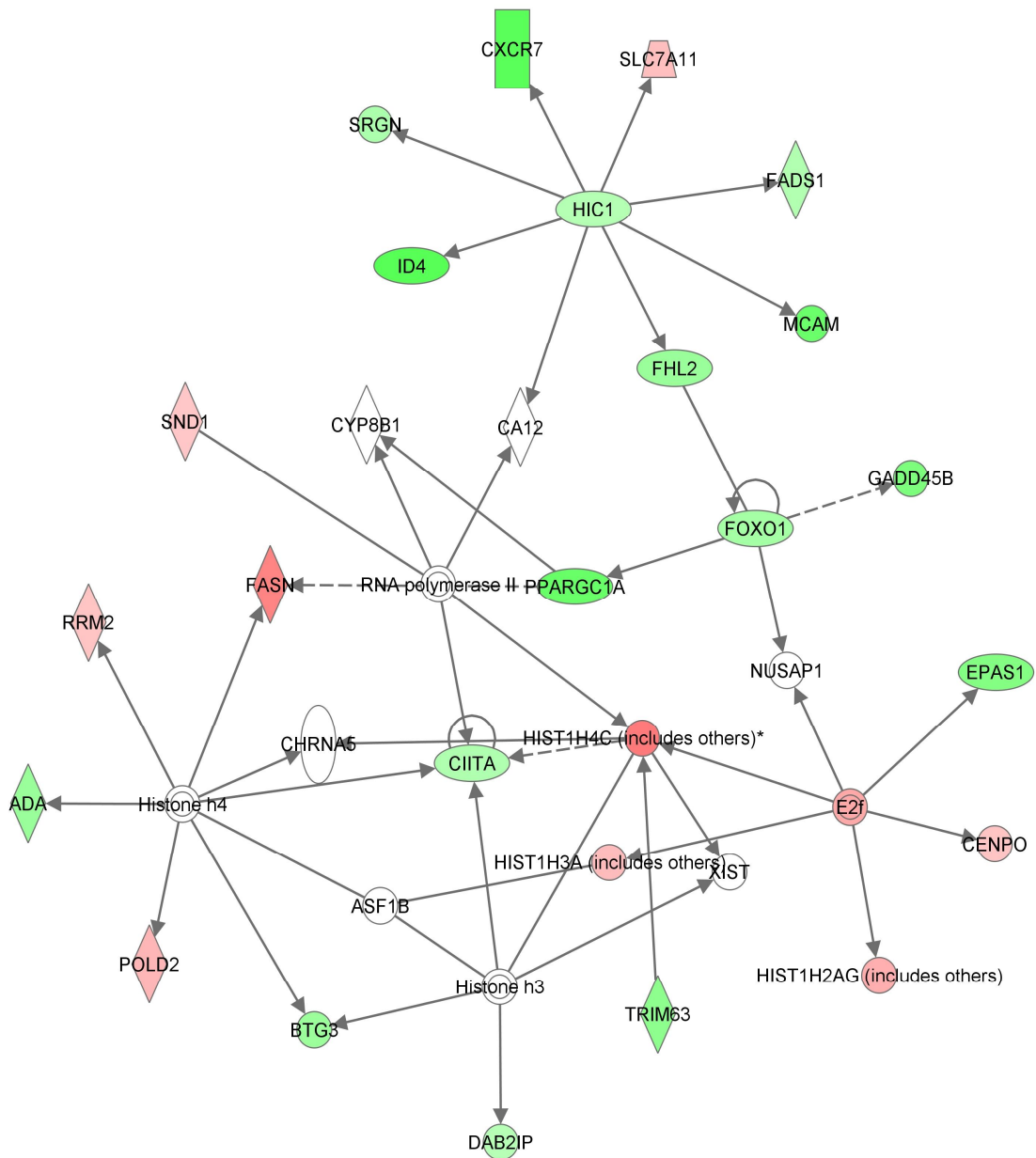
© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 11. Rețeaua moleculară (rețeaua nr. 3) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în dereglări genetice, patologii hematologice sau infecții.



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 12. Rețea moleculară (rețeaua nr. 4) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în motilitate celulară, dezvoltare și funcționare cardiovasculară, dezvoltare celulară.



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 13. Rețea moleculară (rețeaua nr. 5) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în transportul molecular, metabolismul acizilor nucleici, biochimia moleculelor mici.

În cele cinci rețele moleculare au fost identificate gene nodate cu implicații în cancerul de prostată: *TERT*, *BCL2*, *SMAD3*, *E2F5*, *CAVI*, *FBLN1* (rețeaua 1), *FGF2*, *FGF7*, *EGRI*, *PI3K*, *ITGB3*, *CXCL12* (rețeaua 2), *PTGS2*, *TNFAIP3* (rețeaua 3), *CD69*, *STAT5a/b* (rețeaua 4) *FASN*, *CIITA*, *HIC1*, *E2F1*, *FOXO1*, *HIST1H4C* (rețeaua 5).

Gena *TERT* a fost supraexprimată în studiul nostru, fiind un modulator al imortalității celulare. Studiul în domeniul a pus în evidență activarea acestei gene în cancerul de prostată [5, 6]. Din datele obținute de noi se observă că *TERT* este activat de factorul de transcriere E2F5. Deși există date care arată că factorul de transcriere E2F5 joacă un rol important în carcinogeneză, în domeniul cancerului de prostată nu există studii care să confirme implicarea acestei gene în inițierea și progresia tumorală [7, 8]. În studiul nostru *CAVI* și *CAV2* au fost subexprimate în cancerul de prostată comparativ cu țesutul normal de prostată. În majoritatea studiilor *CAVI* și *CAV2* sunt supraexprimate în cancerul de prostată față de țesutul normal, însă rezultatele noastre evidențiază nivele scăzute ale ambelor molecule. Acest aspect poate fi explicat prin faptul că țesuturile utilizate în studiul de genomics au provenit de la pacienți cu cancer de prostată având un scor Gleason 7 (3+4 sau 4+3). Tumorile de prostată stratificate ca Gleason 7 reprezintă un grup clinic heterogen cu un potențial biologic variabil și un răspuns clinic diferit [9]. Reducerea activității supresoare tumorale a *CAVI* a fost observată pe linii celulare tumorale, previzionându-se că tumorile umane pot prezenta nivele de exprimare reduse ale *CAVI*. *CAVI* poate fi supraexprimată, subexprimată sau neschimbată, în funcție de tipul de celule tumorale. În cancerul de prostată *CAVI* este în general supraexprimat cu excepția câtorva cazuri [10]. Exprimarea lui *CAVI* este pozitiv asociată cu scorul Gleason, implicarea ganglionară sau marginile de rezecție pozitive [11]. Gena *BCL2* este implicată în reglarea apoptozei, nivelul de exprimare al acesteia în cancerul de prostată fiind legat de agresivitatea tumorală [12]. În studiul nostru, *BCL2* este subexprimat fiind indirect blocat de *CAV1*. Fibulinele: *FBLN1*, *FBLN4* și *FBLN5* sunt proteine ale matricei extracelulare implicate în migrare și adeziune celulară. Nivele scăzute ale acestor proteine au fost asociate cu progresia cancerului de prostată. *FBLN1* a fost subexprimată în studiul nostru, fiind în concordanță cu datele din literatură [13].

Genele nodale identificate în a doua rețea moleculară: *FGF2*, *FGF7*, *PI3K*, *PDGFRB*, *ITGB3* și *CXCL12* sunt implicate în stimularea angiogenezei și progresia tumorală. Gena *EGRI* este o genă supresoare de tumoră, activitatea ei fiind inhibată în cancerul de prostată. Datele noastre au arătat nivele reduse ale acestei gene fiind confirmate și de alte studii [14]. Inhibarea căii de semnalizare *PI3K* poate activa calea de semnalizare a receptorilor de androgeni (AR). În mod similar inhibarea AR duce la activarea *AKT*. Ambele căi oncogenice

se reglează reciproc printr-o buclă de feedback . Inhibarea uneia duce la activarea celeilalte fapt ce duce la menținerea viabilității tumorale [15].

Gena *PTGS2* a fost subexprimată în studiul nostru, fiind în directă relație cu *BCL2*. Nivelul redus al exprimării *PTGS2* poate fi direct legat de inflamația redusă în zona tumorală [16]. Gena *TNFAIP3* a fost identificată ca o genă a cărei exprimare este direct legată de activitatea *TNF*, fiind implicată în progresia cancerului de prostată [17]. Gena *STAT5a/b* este implicată în transducția semnalelor moleculare, având un rol critic în viabilitatea și creșterea tumorală. Exprimarea nucleară a *STAT5a/b* este asociată cu un grad histologic ridicat, supraexprimarea acesteia fiind asociată cu recidiva rapidă [18, 19, 20]. Date recente arată că activitatea crescută a *STAT5a/b* poate fi implicată în progresia cancerului de prostată de la forma localizată la cea metastatică [21].

Nivele crescute ale *FASN* au fost asociate procesului de carcinogeneză la nivelul prostatei. Aceste observații sugerează faptul că *FASN* poate acționa ca și oncogenă în prezența de AR, efectul oncogenic se realizează prin inhibarea intrinsecă a căilor de inducere a apoptozei [22]. Genele supraexprimate în rețeaua cinci: *HIST1H2AG*, *HIST1H3A*, *HIST1H4C* sunt implicate în special în metabolismul acizilor nucleici, evidențiind o activitate transcripțională ridicată caracteristică în carcinogeneză. Factorul de transcriere *E2F1* este implicat în progresia tumorală, și a fost găsit supraexprimat în studiul nostru. Evaluarea *E2F1* împreună cu *Mki67* și *TOP2A* a subliniat posibilitatea utilizării acestei triplete ca un posibil biomarker (tri-marker) pentru îmbunătățirea prognosticului și a stratificării tratamentului în cancerul de prostată [23].

În tabelul 4 este prezentat topul primelor 10 gene supraexprimate respectiv subexprimate. Aceste gene sunt implicate în dezvoltare tumorală, motilitate, proliferare și creștere, interacțiuni și semnalizare celulară.

Tabel 4. Genele cu cele mai mari respectiv cele mai mici nivele de exprimare evidențiate în cancerul de prostată (Gleason 7) comparativ cu țesutul normal de prostată

Gene supraexprimate		Gene subexprimate	
Simbolul genei	Fc	Simbolul genei	Fc
<i>HPN</i>	+18.48	<i>ATPIA2</i>	-12.71
<i>GOLM1</i>	+16.79	<i>CFD</i>	-12.49
<i>AMACR</i>	+15.68	<i>DPT</i>	-12.16
<i>SIM2</i>	+13.27	<i>ADAMTS4</i>	-11.09
<i>FOLH1</i>	+10.87	<i>FOSB</i>	-10.46
<i>GPR160</i>	+9.25	<i>RNF112</i>	-10.13
<i>TMEFF2</i>	+8.73	<i>MAL</i>	-9.43
<i>CGREF1</i>	+8.63	<i>SMOC1</i>	-8.49
<i>GJB1</i>	+8.57	<i>COL4A6</i>	-8.13
<i>TMSB15A</i>	+7.89	<i>ADAMTS1</i>	-7.98

Printre genele obținute în studiul nostru și având cele mai mari nivele de exprimare în țesutul tumoral față de țesutul normal se numără: *HPN*, *AMACR*, *GOLM1*, *SIM2* și *FOLH1*, toate descrise de literatura de specialitate ca posibili biomarkeri pentru cancerul de prostată. Deasemenea *GPR160*, *TMEFF2* și *TMSB15A* sunt descrise ca posibili biomarkeri în cancerul de prostată prin nivelele lor de exprimare crescute în țesutul tumoral. [24, 25, 26, 27]. În studiul nostru, gena *CGREF1* a fost supraexprimată în țesutul tumoral față de țesutul normal de prostată. A fost studiată implicarea acestei în adeziunea și creșterea celulară, pe linii celulare neuronale primare, supraexprimarea *CGREF1* fiind asociată cu un risc crescut de mortalitate în cazul pacienților cu melanom metastatic [28, 29]. Însă, informații pe PubMed despre implicarea acestei gene în cancerul de prostată nu au fost găsite. *GJB1* este o altă genă supraexprimată în studiul nostru despre care nu au fost găsite informații pe PubMed în cancerul de prostată. Implicarea acesteia în oncogeneză a fost descrisă pentru localizări precum sân sau ficat [30, 31].

3.2.5 Evaluarea profilului funcțional al genelor diferit exprimate între țesutul tumoral și țesutul benign de prostată

Cele mai importante procese în care au fost implicate genele identificate între țesutul tumoral și țesutul benign de prostată sunt prezentate în tabelul 5. Au fost obținute 25 de rețele, 11 dintre acestea au avut scorul și valoarea focus a genelor mai mari de 20 . În figurile 14-17 sunt prezentate primele 4 dintre aceste rețele moleculare care au integrat genele grupate pe baza funcțiilor lor.

Tabel 5. Patologii și alterări genetice în care sunt implicate genele diferit exprimate în cancerul de prostată vs țesutul benign de prostată.

Patologii și alterări genetice	p value	nr. molecule implicate
Cancer (<i>Cancer</i>)	1,07E-21 - 1,39E-02	566
Alterări genetice (<i>Genetic Disorder</i>)	2,59E-14 - 1,41E-02	1034
Patologii dermatologice (<i>Dermatological Diseases and Conditions</i>)	1,20E-13 - 1,41E-02	249
Boli ale sistemului reproductiv (<i>Reproductive System Disease</i>)	1,90E-13 - 5,17E-03	346
Alterări imunologice (<i>Immunological Disease</i>)	8,55E-09 - 1,41E-02	463

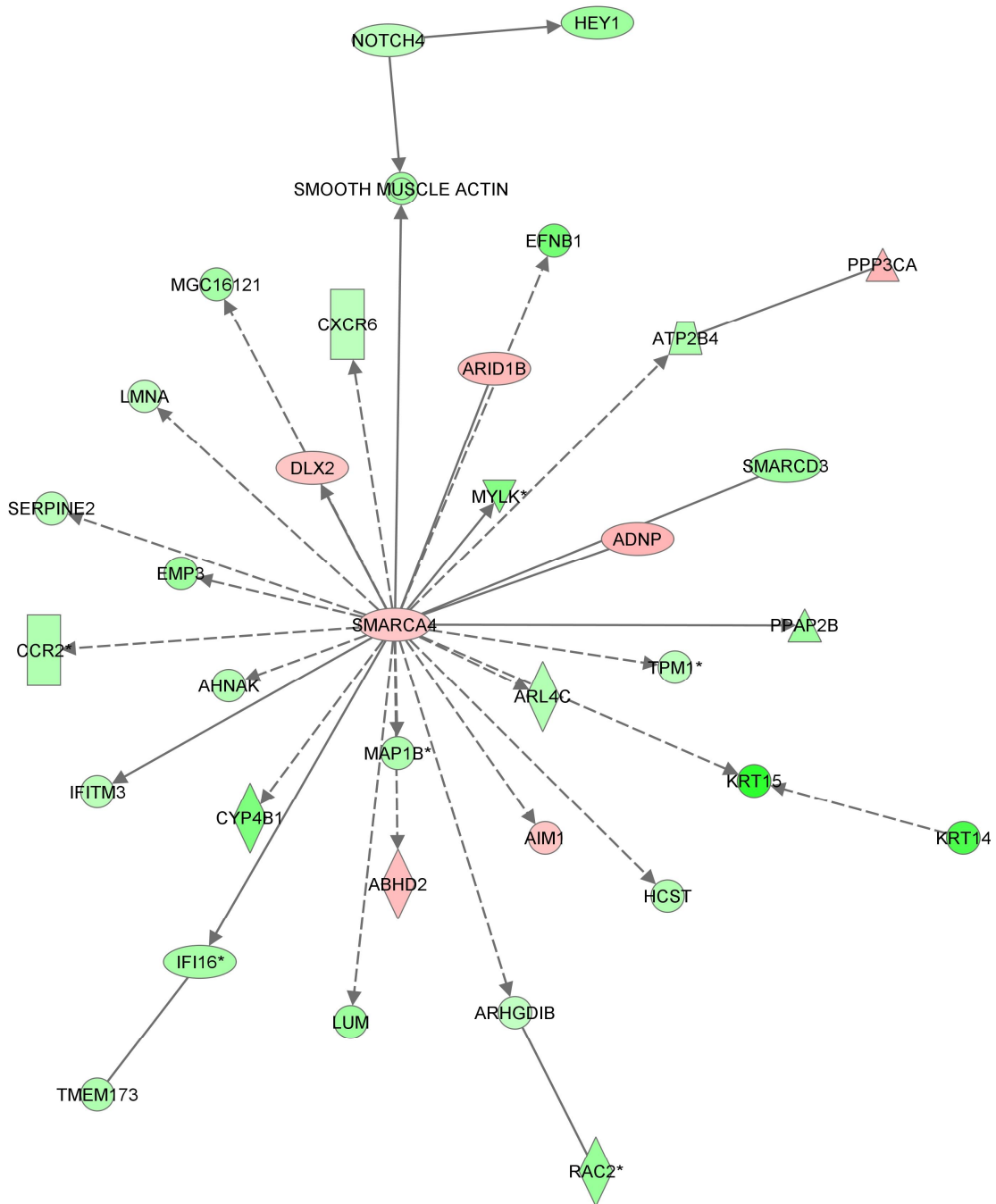


Figura 15. Rețeaua moleculară (rețeaua nr. 2) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în motilitate celulară, patologie dermatologică și cardiovasculară, la nivelul țesutului tumoral comparativ cu țesutul benign de prostată.

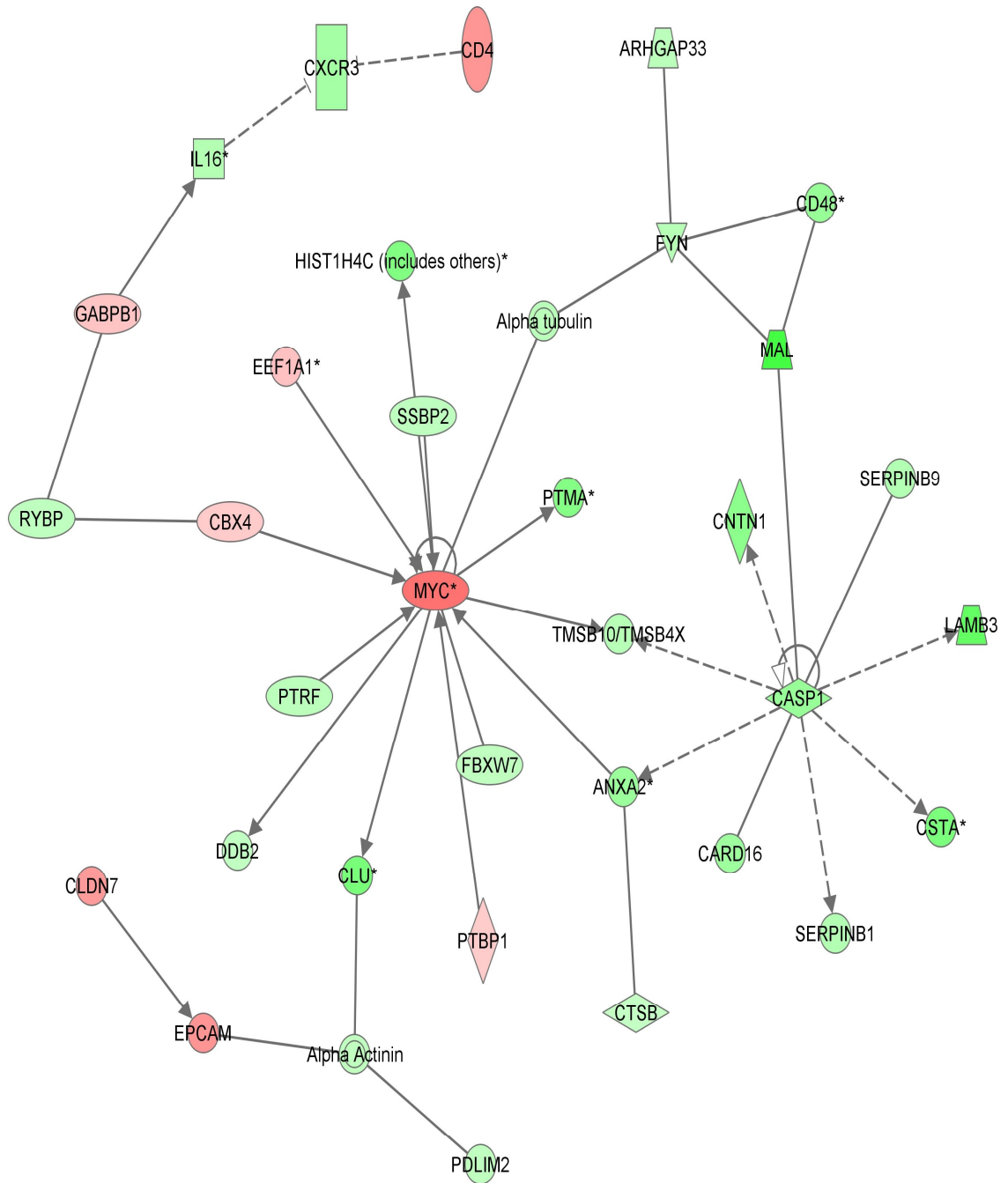


Figura 16. Rețeaua moleculară (rețeaua nr. 3) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în dezvoltare tumorală, patologie hematologică și dermatologică, la nivelul țesutului tumoral comparativ cu țesutul benign de prostată.

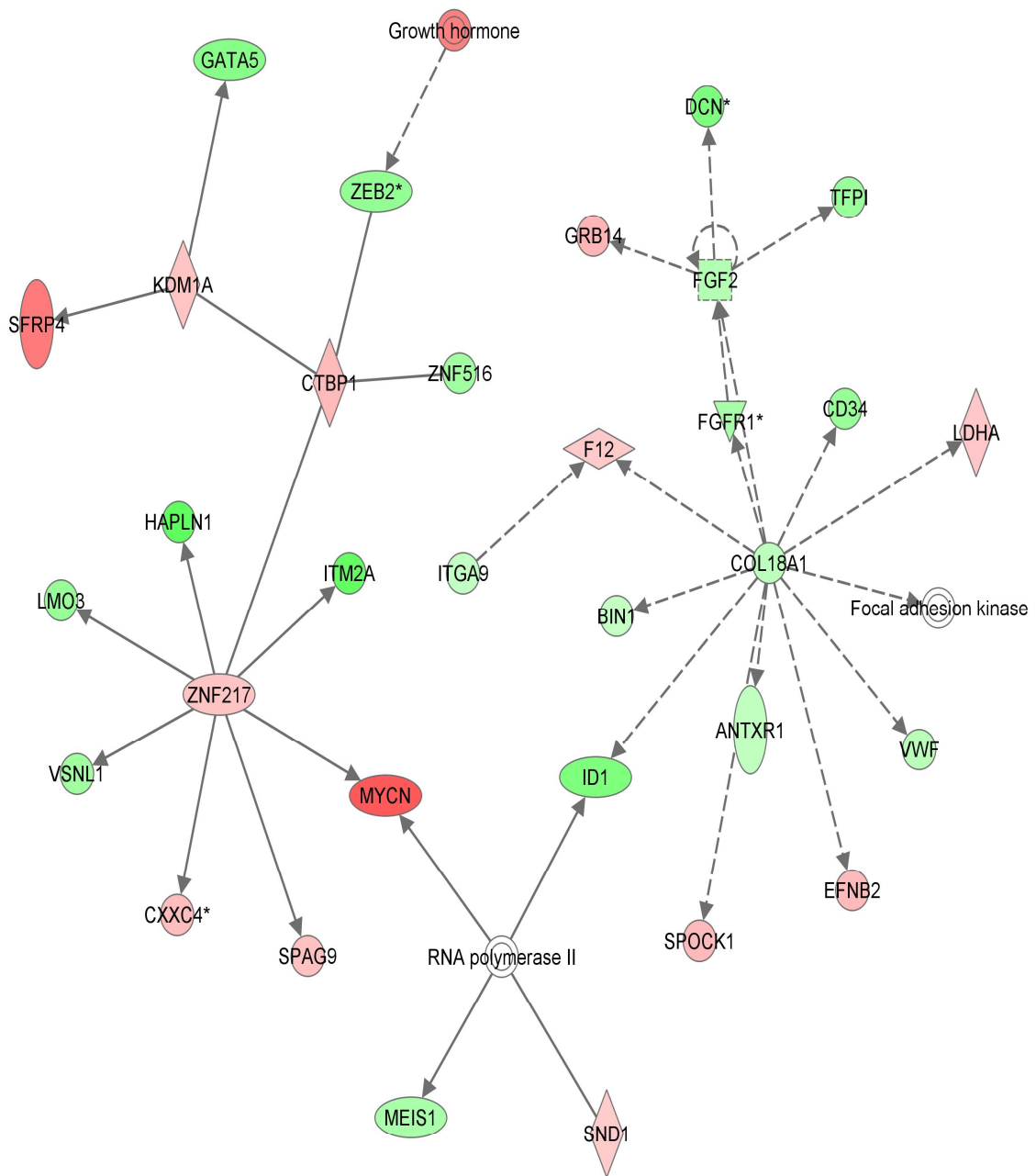


Figura 17. Rețeaua moleculară (rețeaua nr. 4) care integrează genele a căror funcții moleculare se regăsesc ca fiind implicate în motilitatea celulară, procese cardiovasculare

Genele nodate identificate în aceste rețele sunt: *CEBPA*, *FOXAI*, *JUN*, *MUC 4*, *RARA*, *RXRA*, *RORC* (rețeaua 1), *SMARCA4*, (rețeaua 2), *MYC*, *CASPI*, (rețeaua 3), *COL18A1*, *FGF2*, *ZNF217*, *MYCN* (rețeaua 4).

CEBPA este un important factor de transcriere a cărui exprimare este crescută în cancerul de prostată. Datele noastre au aratat nivele crescute de exprimare ale *CEBPA* asemănătoare cu cele din literatura de specialitate [32]. Nivelele *FOXAI* sunt crescute în cancerul de prostată, datele din literatură leagă nivelele ridicate ale acestei gene de progresia tumorală cu posibilitatea de metastazare [33]. Unul dintre principalii factori de transcriere celulari implicați în dezvoltarea tumorală este *JUN*. În studiul nostru s-a observat un nivel crescut al genei care codifică acest factor de transcriere, în cancerul de prostată comparativ cu țesutul benign de prostată. Datele din literatură au arătat că izoforma *c-JUN* poate fi implicată în carcinogeneza alături de *NFKBI* [34]. Genele *RARA*, *RXRA*, *RORC*, identificate în studiul nostru, nu sunt descrise în literatură ca fiind implicate în progresia cancerului de prostată.

Gena *SMARCA4* sau *BRGI* joacă un rol important în reglarea diviziunii celulare, exprimări aberante ale acesteia fiind identificate într-o serie de cancere printre care și cel de prostată [35, 36]. Gena *MYC* codifică un alt factor de transcriere, a cărui exprimare începe să fie activată încă din stadiul timpuriu al carcinogenezei, în neoplazia intraepitelială prostatică [37]. Datele noastre arată nivele crescute ale genei *MYC* și ale izoformei *MYCN* în cancerul de prostată localizat, cu scor Gleason 7, comparativ cu țesutul benign de prostată. *CASPI* este implicată în activitatea apoptotică, nivele scăzute ale acestei gene fiind raportate în literatură, în cancerul de prostată comparativ cu țesutul normal și cel benign de prostată [38]. Rezultatele studiului nostru au confirmat aceste date. *COL18A1* și *FGF2* sunt implicate în modularea angiogenezei, fiind în relație directă cu receptorii de androgen [39]. *ZNF217* are rol în proliferare și invazie, nivele crescute de exprimare fiind semnalate în mai multe cancere printre care și cel de prostată [40]. Supraexprimarea genei *ZNF217* a fost observată și în studiul nostru, această genă fiind de asemenea un activator direct al genei *MYCN*.

Topul celor 10 gene cu cel mai mare respectiv cel mai mic nivel de exprimare în cancerul de prostată localizat scor Gleason 7 vs. țesutul benign de prostată este prezentat în tabelul 6.

Tabel 6. Genele cu cele mai mari respectiv cele mai mici nivele de exprimare evidențiate în cancerul de prostată (Gleason 7) comparativ cu țesutul benign de prostată.

Gene supraexprimate		Gene subexprimate	
Denumirea genei	Fc	Statusul genei	Fc
<i>OUD7A</i>	+25.05	<i>CFD</i>	-24.88
<i>GRIN1</i>	+23.38	<i>CYP3A5</i>	-24.01
<i>OR51E2</i>	+22.01	<i>CXCL13</i>	-23.67
<i>THBS4</i>	+21.23	<i>BMP5</i>	-18.46
<i>ATN</i>	+18.52	<i>NELL2</i>	-17.56
<i>HPN</i>	+18.18	<i>RNF112</i>	-17.09
<i>SOX18</i>	+17.35	<i>PNMT</i>	-16.52
<i>GOLMI</i>	+15.65	<i>NPPC</i>	-16.31
<i>CEBPA</i>	+15.61	<i>MLC1</i>	-15.91
<i>TARP</i>	+13.54	<i>SMOC1</i>	-14.68

Genele *HPN*, *GOLMI*, *AMACR*, *SIM2*, *FOLH1* au fost identificate cu nivele de exprimare similare atât în țesutul tumoral vs țesutul benign de prostată (fc *HPN* = 18.18, fc *GOLMI* = 15.65, fc *AMACR* = 11.16, fc *SIM2* = 8.93, fc *FOLH1* = 11.29) cât și în țesutul tumoral vs țesutul normal de prostată (fc *HPN* = 18.48, fc *GOLMI* = 16.79, fc *AMACR* = 15.68, fc *SIM2* = 13.27, fc *FOLH1* = 10.87). În țesutul benign de prostată comparativ cu țesutul normal aceste gene nu au fost diferit exprimate. Acest lucru argumentează faptul că aceste molecule pot reprezenta markeri care diferențiază cancerul de prostată de forma benignă și țesutul normal de prostată.

Dintre moleculele *GPR160* (fc = 9.25), *TMEFF2* (fc = 8.73) și *TMSB15A* (fc = 7.89) identificate în topul primelor 10 gene supraexprimate în cancerul de prostată față de țesutul normal, doar *GPR160* (fc = 3.97) și *TMSB15A* (fc = 4.76) au fost supraexprimate în cancerul de prostată față de țesutul benign, nivelele de exprimare fiind mai scăzute în cazul din urmă. Supraexprimări ale acestor gene nu au fost identificate între țesutul benign și cel normal de prostată.

Genele *CFD*, *RNF112* și *SMOC1* au fost subexprimate atât în țesutul tumoral față de cel benign (fc *CFD* = -24.88, fc *RNF112* = -17.09, fc *SMOC1* = -14.68) precum și în țesutul tumoral față de cel normal de prostată (fc *CFD* = -12.49, fc *RNF112* = -10.13, fc *SMOC1* = -8.49). De asemenea, genele *CGREF1*, *GJB1* și *E2F5* au fost găsite supraexprimate doar în țesutul tumoral de prostată față de cel benign (fc *CGREF1* = 6.01, fc *GJB1* = 3.18, fc *E2F5* = 3.33) și normal (fc *CGREF1* = 8.63, fc *GJB1* = 8.57, fc *E2F5* = 2.93). În țesutul benign de

prostată față de țesutul normal aceste gene nu au fost identificate ca fiind sub sau supraexprimate, evidențiind specificitatea acestora pentru cancerul de prostată. Pe fluxul de publicații PubMed, studiile privind implicarea acestor gene în cancerul de prostată sunt relativ puține fiind găsite doar studii pentru unele dintre aceste gene pe modele animale și linii celulare.

3.2.6 Validarea datelor microarray

Au fost alese pentru a fi validate prin RT-PCR 3 gene diferit exprimate între țesutul tumoral și țesutul normal de prostată: *TERT*, *CAVI* (rețeaua nr.1) și *FASN* (rețeaua 5). Nivelele de exprimare ale genelor obținute prin RT-PCR și prin microarray au prezentat o bună corelație.

3.3 Concluzii

În studiul de microarray s-a urmărit evaluarea diferențelor transcriptomice la nivel tisular în patologia prostatei prin strategii bioinformatică. Ca abordări bioinformatică au fost folosite softurile Gene Spring (Agilent) și pachetul software Limma, implementat în Bioconductor. Rezultatele obținute arată diferențe relativ mari între cele două abordări, deși algoritmul de analiză a fost același. În general, cu Gene Spring a fost identificat un număr mai mare de gene diferit exprimate (pentru comparația *tumoral vs benign*, *benign vs normal*). Limma a identificat un număr mai mare de gene diferit exprimate doar în comparația *tumoral vs normal*. O primă diferență între numărul secvențelor obținute prin cele două abordări apare după etapa de preprocesare, numărul secvențelor obținute în Gene Spring fiind cu 93 mai mare decât cele obținute cu Limma. Deoarece Gene Spring nu oferă acces la fiecare etapă de preprocesare este greu de precizat sursa acestor diferențe, ținând cont că algoritmul urmat în cele două abordări a fost același. Diferențele majore apar însă după analiza diferențială. Pentru identificarea genelor diferit exprimate între grupurile luate în studiu, în ambele softuri s-au aplicat testul t și corecția FDR. Diferența între testele t clasice implementate în GS și testele t îmbunătățite implementate în Limma constă în faptul că, acestea din urmă, estimează variabilitatea luând în considerare nu doar informația genelor testate ci și a altor gene care prezintă o variabilitate similară. Testul t moderat implementat în Limma oferă rezultate solide chiar și în cazul în care distribuțiile datelor nu sunt normale. Deoarece ambele softuri sunt larg folosite în prezent pentru analiza datelor microarray, este greu de precizat care abordare este

cea mai potrivită. Cu toate acestea, analiza funcțională realizată cu Ingenuity a aratat că genele obținute în Limma sunt mai semnificativ implicate în procesele asociate acestei patologii.

Pachetul de gene diferit exprimate obținut cu Limma a fost considerat de interes pentru analizele moleculare ulterioare. Au fost identificate 1119 gene diferit exprimate în cancerul de prostată comparativ cu țesutul normal de prostată, respectiv 3002 gene diferit exprimate între țesutul tumoral și cel benign de prostată. Cele mai importante alterări moleculare implicate în carcinogeneza prostatei au fost identificate în cadrul unor mecanisme moleculare precum: creștere și proliferare celulară, motilitate celulară, dereglări genetice, adeziune celulară, angiogeneză și apoptoză. Datele noastre au pus în evidență pachete de gene și gene nodale cu nivele de exprimare diferite, supra și subexprimate, în concordanță cu datele din literatură. Printre genele obținute în studiul nostru cu cele mai mari nivele de exprimare în țesutul tumoral față de țesutul normal respectiv față de țesutul benign se numără: *HPN*, *AMACR*, *GOLM1*, *SIM2* și *FOLH1*, toate descrise de literatura de specialitate ca posibili biomarkeri pentru cancerul de prostată.

Au fost identificate gene supraexprimate (*CGREF1*, *GJB1* și *E2F5*) respectiv subexprimate (*CFD*, *RNF112* și *SMOC1*) în țesutul tumoral comparativ cu țesutul normal și benign de prostată, pentru care informațiile pe PubMed referitoare la implicarea lor în tumorigeneza prostatei sunt puține și realizate doar pe modele animale și linii celulare. Nici una dintre aceste gene nu a fost diferit exprimată în țesutul benign față de țesutul normal de prostată, evidențiind specificitatea acestora în cancerul de prostată (Gleason 7). Studiul nostru a evidențiat faptul că aceste gene pot fi luate în considerare pentru validarea lor ca markeri în cancerul de prostată. Toate aceste gene împreună cu grupele de gene integrate în rețelele moleculare pot contribui la o mai bună înțelegere a patologiei moleculare a cancerului de prostată localizat, caracterizat de un scor Gleason 7.

4 Evaluarea profilului molecular la nivel sangvin. Studiul PCR array

4.1 Materiale și metode

4.1.1 Material biologic

În acest studiu au fost incluși 36 de subiecți: 19 pacienți cu adenocarcinom de prostată localizat, 11 pacienți cu afecțiuni benigne de prostată (hiperplazie benignă de prostată și

prostatite cronice) și 6 subiecți sănătoși. Pacienții au fost selectați și diagnosticați în aceleași condiții ca și în studiul de microarray, sângele fiind prelevat anterior intervenției chirurgicale.

4.1.2 Izolarea ARN total

Extracția ARN total s-a realizat prin aceleași metode ca și în studiul microarray.

4.1.3 Reacția PCR array

Reacția PCR array a fost folosită pentru evaluarea la nivel sangvin a 84 de gene implicate în modularea mecanismului de angiogeneză.

4.1.4 Analiza statistică

Metoda $\Delta\Delta C_t$, testul t și corecția FDR pentru testări multiple au fost folosite pentru stabilirea diferențelor statistice între grupurile luate în studiu.

4.2 Rezultate și discuții

Studiului PCR array a urmărit identificarea la nivel sangvin a unui profil molecular care să separe pacienții cu cancer de prostată de pacienții cu patologie benignă respectiv de persoanele fără afecțiuni ale prostatei. Ca lot control au fost considerați atât subiecții sănătoși cât și pacienții cu hiperplazie benignă. Semnătura moleculară a fost validată prin metoda loturilor de *testare* și *validare*. *Lotul de testare* a cuprins 13 subiecți: 6 subiecți sănătoși din lotul de control și 7 pacienți cu cancer de prostată. *Lotul de validare* a cuprins 23 de subiecți: 12 pacienți cu cancer de prostată și 11 pacienți cu hiperplazie benignă de prostată.

Pe lotul de testare a fost identificată o semnătură moleculară alcătuită din 28 de gene diferit exprimate între pacienții cu cancer de prostată și subiecții sănătoși. Pentru toate replicatele biologice au fost luate în calcul numai genele care au avut un p ajustat prin corecția FDR sub 0.05 și un nivel de exprimare ≥ 1.5 respectiv ≤ -1.5 . Clusterizarea supervizată a pus în evidență două cluster principale, unul în care sunt grupați pacienții cu cancer de prostată și celălalt cluster care grupează pacienții din lotul de control (figura 18).

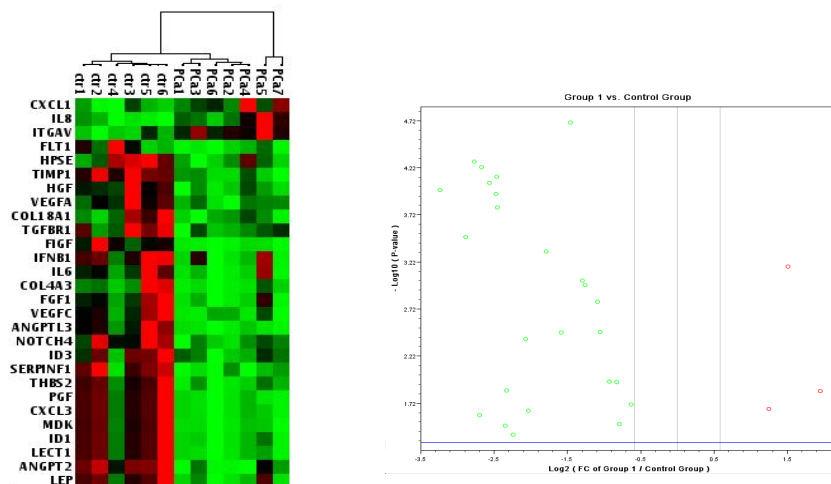


Figura 18. Semnătura supervizată obținută în etapa de *testare* care separă pacienții cu cancer de prostată față de subiecți sănătoși. Partea dreaptă a figurii prezintă graficul Volcano plot cu distribuția celor 28 de gene cu p ajustat <0.05 și nivel de exprimare ≤ -1.5 și ≥ 1.5 .

Semnătura supervizată a fost validată pe un alt set de subiecți. Datele obținute au arătat că semnătura moleculară identificată la nivel sangvin pe *lotul de testare* separă foarte bine și pacienții din *lotul de validare*. S-au obținut două cluster majore, unul care grupează pacienții cu cancer de prostată și unul care grupează pacienții din lotul de control (hiperplazie benignă, prostatită cronică, respectiv subiecți sănătoși) (figura 19).

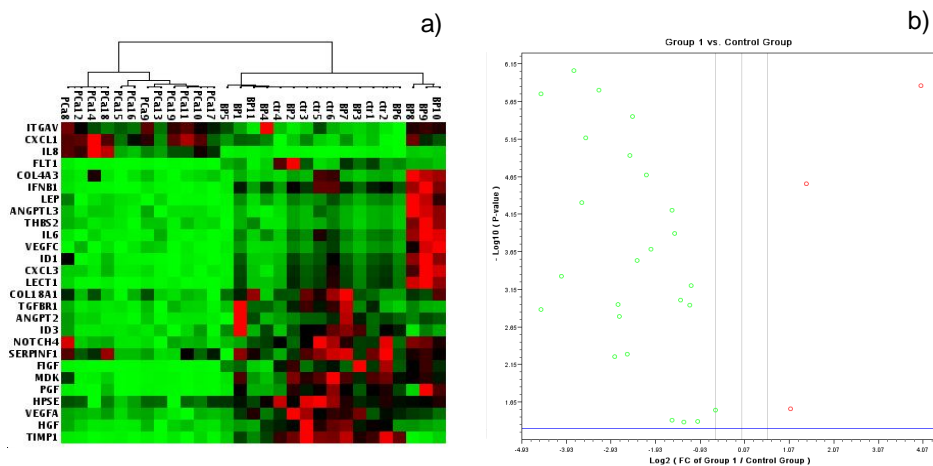


Figura 19. a) separarea pacienților cu cancer de prostată de grupul de control (hiperplazie, prostatită cronică, respectiv țesutul normal de prostată) pe baza semnăturii supervizate obținută pe lotul de *testare*. b) graficul Volcano Plot pentru cele 28 de gene cu p ajustat <0.05 și nivel de exprimare ≤ -1.5 și ≥ 1.5 .

Specificitatea semnăturii moleculare a fost testată și în raport cu alte patologii tumorale: cancer de col uterin (n=5), cancer de sân (n=8), carcinoame de căi biliare (colangiocarcinoame) (n=6) și hepatocarcinoame (n=10). Din clusterizarea obținută se observă că probele de cancer de prostată sunt grupate separat de celelalte patologii tumorale (figura 20).

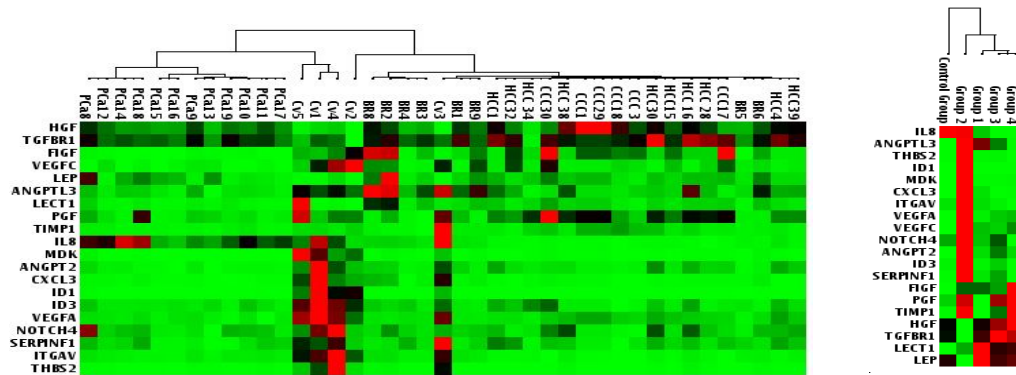


Figura 20. Clusterizare ierarhică care prezintă specificitatea semnăturii supervizate obținute pe sângele integral, la pacienții cu cancer de prostată comparativ cu alte patologii tumorale (CV- cancer de col uterin, BR- cancer de sân, CCC-colangiocarcinoame, HCC – hepatocarcinoame).

4.3 Concluzii

Rezultatele noastre indică faptul că o semnătură moleculară bazată pe un set de 28 de gene implicate în modularea angiogenezei poate să separe pacienții cu cancer de prostată față de afecțiunile benigne ale prostatei (hiperplazie benignă singură sau asociată cu prostatita cronică) respectiv față de subiecții sănătoși. Semnătura supervizată obținută în acest studiu este independentă de valoarea PSA, scor Gleason, procent de celule tumorale la nivelul prostatei. Genele identificate în această semnătură supervizată sunt implicate în modularea angiogenezei, atât în mod direct prin stimularea proliferării celulelor endoteliale cât și indirect prin modularea interacțiunilor între tumoră și gazdă prin intermediul răspunsului imun și al moleculelor de adeziune [41,42,43,44,45]

5 Evaluarea proteinelor la nivel seric. Studiul Fast Quant array

5.1 Materiale și metode

5.1.1 Material biologic

În acest studiu au fost introduși 40 de subiecți: 7 pacienți cu adenocarcinom de prostată (PCa), 11 pacienți cu hiperplazie benignă de prostată (BPH), 6 pacienți cu prostatită cronică (CP) și 6 subiecți sănătoși (control). De la toți subiecții s-a prelevat sânge, anterior terapiei sau intervenției chirurgicale, din care ulterior a fost separat serul.

5.1.2 Tehnologia Fast Quant array

Tehnologia Fast Quant array (*Whatman*) a fost utilizată pentru evaluarea proteinelor serice. Fast Quant array combină avantajele metodei ELISA cu capacitatea exploratorie a tehnologiilor array, permițând evaluarea simultană a până la 8 proteine din orice fluid biologic.

5.1.3 Analiza statistică

Analiza statistică a fost realizată cu softul *SPSS (Statistical package for Social Sciences)*. Pentru compararea grupurilor luate în studiu a fost folosit testul t, valoarea $p < 0.05$ fiind considerată statistic semnificativă.

5.2 Rezultate și discuții

Scopul studiului Fast Quant a fost de a evalua implicarea unui set de 8 molecule angiogenice (PDGF-BB, VEGF, FGF-b, ANG, KGF, TIMP-1, ICAM-1, ANGPT-2) în cancerul de prostată.

Dintre cele 8 molecule angiogenice analizate, 4 molecule (ANG, ICAM-1, VEGF și FGF-b) au prezentat valori în afara curbei standard la nivelul tuturor grupurilor luate în studiu, nefiind astfel posibilă cuantificarea lor. Testul Shapiro-Wilk a fost folosit pentru verificarea normalității distribuțiilor moleculelor ANGPT-2, KGF, PDGF-BB și TIMP-1, cuantificate pe baza curbei standard.. Aceste molecule au prezentat distribuții normale pentru toate grupurile luate în studiu, ceea ce a permis aplicarea testului parametric t pentru analiza statistică. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 7.

Tabel 7. Diferențe statistic semnificative ($p < 0.05$) pentru KGF, ANGPT-2 , PDGF-BB și TIMP-1.

	KGF		ANGPT-2		PDGF-BB		TIMP-1	
	t	p	t	p	t	p	t	p
Control/PCa	1.520	0.193	1.416	0.174	-1.306	0.211	5.077	0,000
Control/BPH	0.153	0.881	2.273	0.038	-3.198	0.008	4.240	0.001
Control/CP	0.512	0.621	2.623	0,037	-2.179	0.083	3.401	0,008
PCa/BPH	-2.447	0.022	1.308	0.204	-1.861	0.076	-0.369	0.716
PCa/CP	-2.071	0.050	1.944	0.068	-1.786	0.091	-0.277	0.785
BPH/CP	0.425	0.677	0.206	0.839	-0.552	0.591	0.022	0.983

PCa: adenocarcinom de prostată; BPH: hiperplazie benignă; CP: prostatita cronică

Rezultatele studiului au evidențiat concentrații statistic semnificativ scăzute ale proteinei KGF în cancerul de prostată (218.96 pg/ml) față de hiperplazia benignă (371.28 pg/ml) și prostatita cronică (334.68 pg/ml) (figura 21). KGF este un factor de creștere stromal important în medierea activităților induse de androgen în hiperplazia benignă și cancerul de prostată. Rezultatele noastre sunt în concordanță cu cele publicate de Metha și colaboratorii care au raportat de asemenea nivele scăzute ale KGF în PCa față de BPH [46]. În țesutul sănătos de prostată , KGF, cunoscut ca și FGF-7, este un factor de creștere paracrin sintetizat în celulele stromale cu efect asupra celulelor epiteliale. Huang și colaboratorii au demonstrat că efectele mitogene și antiapoptotice ale KGF sunt corelate cu inducerea exprimării *CCND1* și *BCL2* în liniile celulare de prostată [47].

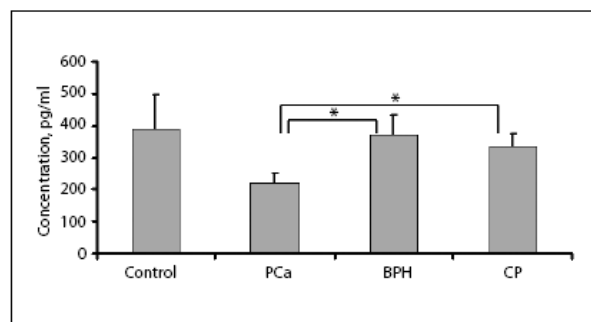


Figura 21. Concentrația medie a proteinei KGF în grupurile control, PCa, BPH și CP obținută prin FASTQuant® (* $p < 0.05$).

ANGPT-2, o altă moleculă pro-angiogenică, a avut concentrații statistic semnificativ scăzute în hiperplazia benignă (4728.05 pg/ml) și prostatita cronică (4512.8 pg/ml) față de

control (7632.25 pg/ml) (figura 22). ANGPT-1 și ANGPT-2 sunt principalii reglatori ai creșterii și regresie vasculare, deși, în patologia prostatei rolul angiopoietinelor nu este cunoscut [48]. ANGPT-2 prezintă și proprietăți anti-angiogenice [49]. ANGPT-2 poate induce apoptoza celulelor endoteliale prin inhibarea abilității de remodelare vasculară a ANGPT-1 [50]. Nivele anormale ale ANGPT-1, ANGPT-2 și receptorului acestora Tie-2 au fost raportate în cancerul de prostată [51, 52].

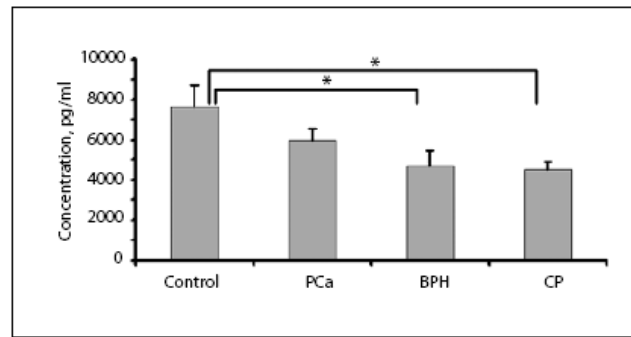


Figura 22. Concentrația medie pentru ANGPT-2 în control, PCa, BPH și CP obținută prin FAST Quant® (* p < 0.05).

Rezultatele studiului au evidențiat nivele scăzute ale proteinei TIMP-1 în toate grupurile (BPH (22984.35 pg/ml), CP (22891.10 pg/ml) și PCa (21832.70 pg/ml)) comparativ cu lotul control(46172.24 pg/ml) (figura 23). TIMP-1 inhibă angiogeneza prin legarea de metaloproteazele de matrice (MMP) și inhibarea activității acestora, blocând proliferarea celulară și inducând subexprimarea genei *VEGF* [53]. În cancerul de prostată există o dereglare a acestei relații dintre MMP și TIMP-1, cu o pierdere semnificativă a TIMP-1 [54, 55]. TIMP-1 are un rol multifuncțional în tumorigeneza prostatei, incluzând inhibarea activității catalitice a MMP, promovarea creșterii, inhibarea apoptozei și reglarea angiogenezei.

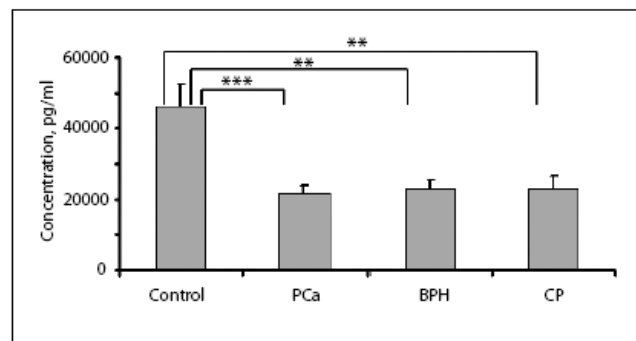


Figura 23. Concentrația medie a TIMP-1 în control, PCa, BPH și CP obținută prin FAST Quant® analysis (** p < 0.01, *** p < 0.001).

Nivele crescute ale proteinei PDGF-BB au fost identificate în hiperplazia benignă (10800.66 pg/ml) față de grupul control (5988.72 pg/ml) (figura 24). PDGF-BB funcționează ca și un “factor de competență” care induce un set de gene implicate în răspunsul timpuriu care se exprimă în faza G1 a ciclului celular, inclusiv p21(WAF1/CIP1) un mediator funcțional al genei supresoare de tumoră *TP53* în punctul de control G1/S al ciclului celular [56].

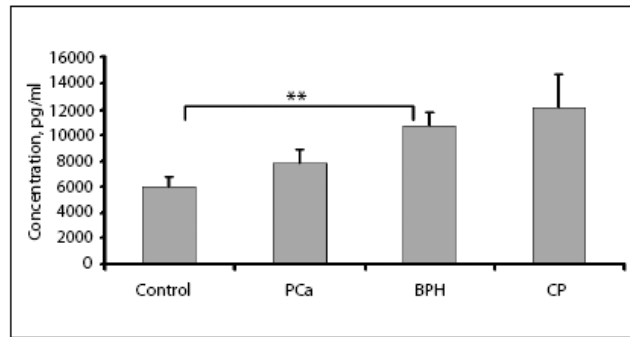


Figura 24. Concentrația medie a PDGF-BB în control, PCa, BPH și CP obținut prin FAST Quant® (** $p < 0.01$).

5.3 Concluzii

Studiul Fast Quant array a evidențiat concentrații diferite ale celor 4 proteine angiogenice (KGF, PDGF-BB, ANGPT-2 și TIMP-1) evaluate în serul pacienților cu patologia prostatei. KGF prezintă concentrații statistic semnificativ crescute în afecțiunile benigne ale prostatei (hiperplazie benignă și prostatită cronică) față de cancerul de prostată. Nivelul seric al TIMP-1 este statistic semnificativ scăzut în serul pacienților cu afecțiuni benigne și maligne ale prostatei față de subiecții sănătoși. Luate împreună, TIMP-1 și KGF ar putea diferenția cancerul de prostată de afecțiunile benigne și de subiecții sănătoși, însă pentru validarea acestor rezultate se impune un studiu pe un număr mult mai mare de pacienți.

6 Concluzii generale

Scopul acestei teze de doctorat a constat într-o evaluare moleculară multiplă la nivel tisular, sangvin și seric prin tehnologii de tip array: microarray, PCR array și Fast Quant array, în vederea identificării diferențelor moleculare în cancerul de prostată comparativ cu patologia benignă a prostatei și subiecții sănătoși. Rezultatele obținute permit formularea următoarelor concluzii generale:

- 1) Analiza bioinformatică a evidențiat diferențe relativ mari între softurile Limma și Gene Spring, deși algoritmul de analiză a fost același.
- 2) La nivel tisular a fost identificat un set de gene diferit exprimate (*CGREF1*, *GJB1*, *E2F5*, *CFD*, *RNF112* și *SMO1*) în cancerul de prostată comparativ cu forma benignă și țesutul normal de prostată, care au fost descrise pe PubMed doar pe modele animale, linii celulare sau alte localizări tumorale. Nici una dintre aceste gene nu a fost diferit exprimată în țesutul benign față de țesutul normal de prostată, evidențiind specificitatea acestora în cancerul de prostată. Aceste gene pot fi luate în considerare pentru validarea lor ca markeri pentru cancerul de prostată.
- 3) La nivel sangvin a fost identificată o semnătură moleculară formată din 28 de gene care separă pacienții cu cancer de prostată față de cei cu afecțiuni benigne ale prostatei respectiv față de subiecții sănătoși, independentă de valoarea PSA, scor Gleason, procent de celule tumorale la nivelul prostatei. Validarea acestei semnături moleculare pe un număr mare de pacienți poate furniza date noi, importante în patologia prostatei. Confirmarea acestei semnături ar putea constitui o alternativă pentru reducerea numărului biopsiilor de prostată la pacienții cu afecțiuni benigne ale prostatei.
- 4) Proteinele angiogenice evaluate la nivel seric, luate individual, nu au fost specifice patologiei tumorale prostatice, însă evaluarea serică a unui *panel de proteine angiogenice* poate aduce informații utile în această patologie.

7 Bibliografie selectivă

1. Hanahan D., Weinberg R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5):646-74.
2. Rao A.R., et al., *The discovery of prostate-specific antigen*. BJU Int, 2008. 101(1):5-10.
3. Thompson I.M., et al., *Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter*. N Engl J Med, 2004. 350(22):2239-46.
4. Catalona W.J., *Prostate cancer screening*. BJU Int, 2004. 94(7):964-6.
5. Elmore LW, et al., *Overexpression of telomerase-associated chaperone proteins in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinomas*. Oncol Rep, 2008. 20(3):613-7.
6. Valenti M.T., et al., *The effects on hTERT gene expression is an additional mechanism of amino-bisphosphonates in prostatic cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2008. 580(1-2):36-42.
7. Jiang Y., et al., *A potential oncogenic role of the commonly observed E2F5 overexpression in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2011. 17(4):470-7.
8. Umemura S., et al., *Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome*. Br J Cancer, 2009. 100(5):764-71.
9. Stark J.R., et al., *Gleason score and lethal prostate cancer: Does 3+4 = 4+3?* J Clin Oncol, 2009. 27(21):3459-64.
10. Pflug B.R., et al., *Caveolin expression is decreased following androgen deprivation in human prostate cancer cell lines*. Prostate, 1999. 40(4): 269-73.
11. Yang G., et al., *Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: A novel prognostic marker*. Cancer Res, 1999. 59(22):5719-23
12. Revelos K., et al., *Immunohistochemical expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy*. Anticancer Res, 2005. 25(4):3123-33.
13. Wlazlinski A., et al., *Downregulation of several fibulin genes in prostate cancer*. Prostate, 2007. 67(16):1770-80.
14. Gregg J.L., et al., *Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection*. BMC Cancer, 2010. 10:165.
15. Carver B.S., et al., *Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer*. Cancer Cell, 2011 19,(5):575-86.
16. Kim B.H., et al., *Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia: is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer?* Korean J Urol, 2011. 52(4):253-9.
17. Golovko O., et al., *A20 gene expression is regulated by TNF, Vitamin D and androgen in prostate cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. 94(1-3):197-202.
18. Tan S.H., Nevalainen M.T., *Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers*. Endocr Relat Cancer, 2008. 15(2):367-90.
19. Li H., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade*. Cancer Res, 2004. 64(14):4774-82.
20. Li H., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription-5 in prostate cancer predicts early recurrence*. Clin Cancer Res, 2005. 11(16):5863-8.
21. Gu L., et al., *Stat5 promotes metastatic behavior of human prostate cancer cells in vitro and in vivo*. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(2):481-93.
22. Migita T., et al., *Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. 101(7):519-32.
23. Malhotra S., et al., *A tri-marker proliferation index predicts biochemical recurrence after surgery for prostate cancer*. PLoS One, 2011. 6(5):e20293.

-
24. Varambally S., et al., *Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer*. Neoplasia, 2008. 10(11):1285-94.
 25. Halvorsen O.J., et al., *Increased expression of SIM2-s protein is a novel marker of aggressive prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. 13(3):892-7.
 26. Maraj B.H., Markham A.F., *Prostate-specific membrane antigen (FOLH1): recent advances in characterising this putative prostate cancer gene*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 1999. 2(4):180-5.
 27. Romanuik T.L., et al., *Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts*. Am J Pathol, 2009. 175(6):2264-76.
 28. Devnath S., et al., *Cgr11 encodes a secretory protein involved in cell adhesion*. Eur J Cell Biol, 2009. 88(9):521-9.
 29. Bogunovic D., et al., *Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival*. Proc Natl Acad Sci, 2009. 106(48):20429-34.
 30. Li Q., et al., *Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2007. 121(3):536-46.
 31. Kanczuga-Koda L., *Increased expression of gap junction protein--connexin 32 in lymph node metastases of human ductal breast cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2007. 45 Suppl 1:S175-80.
 32. Yin H., et al., *In prostate cancer C/EBPalpha promotes cell growth by the loss of interactions with CDK2, CDK4, and E2F and by activation of AKT*. Prostate, 2009. 69(9):1001-16.
 33. Jain R.K., et al., *High-level expression of forkhead-box protein A1 in metastatic prostate cancer*. Histopathology, 2011. 58(5):766-72.
 34. Galardi S., et al., *NF-kB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(9):3892-902.
 35. Medina P.P., et al., *Sanchez-Cespedes M. Involvement of the chromatin-remodeling factor BRG1/SMARCA4 in human cancer*. Epigenetics, 2008. 3(2):64-8.
 36. Sun A., et al., *Aberrant expression of SWI/SNF catalytic subunits BRG1/BRM is associated with tumor development and increased invasiveness in prostate cancers*. Prostate, 2007. 67(2):203-13.
 37. Koh C.M., et al., *MYC and Prostate Cancer*. Genes Cancer, 2010. 1(6):617-28.
 38. Winter R.N., et al., *Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer*. Cancer Res, 2001. 61(3):1227-32.
 39. Isayeva T., et al., *Tumoristatic effects of endostatin in prostate cancer is dependent on androgen receptor status*. Prostate, 2009. 69(10):1055-66.
 40. Bar-Shira A., et al., *Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft*. Cancer Res, 2002. 62(23):6803-7.
 41. Dean J.P., Nelson P.S., *Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis*. Br J Cancer, 2008. 98(2):245-9.
 42. Raman D., et al., *Role of chemokines in tumor growth*. Cancer Lett, 2007. 256(2):137-65.
 43. Golovine K., et al., *Depletion of intracellular zinc increases expression of tumorigenic cytokines VEGF, IL-6 and IL-8 in prostate cancer cells via NF-kB dependent pathway*. Prostate, 2008. 68(13):1443-9.
 44. Halin S., et al., *Extratumoral Macrophages Promote Tumor and Vascular Growth in an Orthotopic Rat Prostate Tumor Model*. Neoplasia, 2009. 11(2):177-86.

-
45. Gorlov I, et al., *Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data*. BMC Med Genomics, 2009. 2:48.
 46. Metha P.B., et al., *Serum keratinocyte growth factor measurement in patients with prostate cancer*. J Urol, 2000. 164(6):2151-5.
 47. Huang Y.W., et al., *Effect of keratinocyte growth factor on cell viability in primary cultured human prostate cancer stromal cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. 100(1-3):24-33.
 48. Lind A.J., et al., *Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer*. Prostate, 2005. 62(4):394-9.
 49. Huss W.J., et al., *Angiogenesis and prostate cancer: Identification of a molecular progression switch*. Cancer Res, 2001. 61(6):2736-43.
 50. Murdoch C., et al., *Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2*. J Immunol, 2007. 178(11):7405-11.
 51. Caine G.J., et al., *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1*. Eur J Clin Invest, 2003. 33(10):883-90.
 52. Caine G.J., et al., *Significant decrease in angiopoietin-1 and angiopoietin-2 after radical prostatectomy in prostate cancer patients*. Cancer Lett, 2007. 251(2):296-301.
 53. Jiang Y., et al., *Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer*. Oncogene, 2002. 21(14):2245-52.
 54. Brehmer B., et al., *Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2003. 6(3):217-22.
 55. Liu A.Y., et al., *Analysis of prostate cancer by proteomics using tissue specimens*. J Urol, 2005. 173(1):73-8.
 56. Kim H.E., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-signaling mediates radiation-induced apoptosis in human prostate cancer cells with loss of p53 function*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. 39(3):731-6.