

Iida Kulman

ETURAUHASSYÖVÄN GENEETTISTEN ALITYYPPIEN EROJA RNA-TASOLLA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Joulukuu 2021

TIIVISTELMÄ

Iida Kulman: Eturauhassyövän geneettisten alityyppien eroja RNA-tasolla / Comparing the genetic subtypes of the prostate cancer in RNA-level

Kandidaatin työ

Tampereen yliopisto

Tekniikan ja luonnontieteiden kandidaatin tutkinto-ohjelma, biotekniikka

Joulukuu 2021

Eturauhassyöpä on miesten yleisimpiä syöpiä. Syövästä tekee haastavan diagnosoitavan se, että syövällä on havaittu olevan useita geneettisiä alityyppejä. Alityypistä riippuen syövän aggressiivisuus ja hoidettavuus voivat erota, mutta myös tiettyä alityyppiä sairastavilla potilailla syövän aggressiivisuus voi vaihdella. Työn tavoitteena on vertailla eturauhassyövän geneettisten alityyppejä RNA-tasolla ja selvittää tilastollisen testauksen avulla alityyppejä erottavista geeneistä ekspressoituneimmat geenit. Tilastollisen testauksen avulla datasta saatiin selville tilastollisesti merkittävimmät alityyppien geenit ja verrattaessa geenejä, saatiin selville geenit, jotka erottivat geneettisiä alityyppejä. Alityyppejä erottavien geenien lisäksi haluttiin selvittää, miten eri alityyppien kasvaimet luokitellaan Gleasonin summan perusteella ja miten Gleasonin summien perusteella alityypit jakautuvat eri luokkiin.

Työssä tutkittava data ladattiin TCGA-tietokannasta. Tämän lisäksi Rstudiolla laadittiin ohjelma, joka määrittää geeneille p-arvon, jonka perusteella funktio määrittää datassa esiintyvistä geeneistä ekspressoituneimmat geenit. Geenien joukosta suodatetaan vielä varsinaisten syöpänäytteiden sisältämät geenit ja verrataan alityyppejä ekspressoituneimpien geenien perusteella. Verrattaessa eturauhassyövän alityyppejä, alityypit jaetaan ETS-positiivisiin ja ETS-negatiivisiin alityyppeihin. Ryhmien perusteella verrattiin alityyppejä erottelevia geenejä.

Kun saadaan selville eturauhassyövän alityyppejä erottelevat, ekspressoituneimmat geenit, alityyppejä erotteleville geeneille ajetaan pathway-analyysit käyttämällä DAVID-työkalua. Pathway-analyysia tehtiin ETS-positiivisia alityyppejä erottaville geeneille ja valittiin työn kannalta olennaisimmat pathwayt, jotka voivat vaikuttaa eturauhassyövän puhkeamiseen ja syövän ilmentymiseen. ETS-negatiivisia alityyppejä erottaville geeneille ajettiin pathway-analyysia yhdistämällä listaan ETS-positiivisia alityyppejä erottavia geenejä. Listan perusteella saatiin pathway-analyysi eturauhassyöväälle ja RAP1 pathway-analyysi. Analyysien perusteella arvioidaan, miten pathway ja tietyt geenit vaikuttavat syövän syntyyn.

Työssä saatiin selville, miten pathway-analyysin avulla voidaan arvioida syövän syntyyn vaikuttavia mekanismeja ja miten tiettyjen geenien liiallinen ilmeneminen vaikuttaa signaalintireitteihin geneettisellä tasolla ja siten solutasolla. Tämän lisäksi saatiin selville, mitkä ovat yleisimmät ja toisaalta harvinaisemmat eturauhassyövän alityypit sekä, arvioida potilaan riskiä saada korkea Gleasonin summan eturauhassyöpä, kun hän sairastaa tiettyä eturauhassyövän geneettistä alityyppiä.

Avainsanat: Eturauhassyöpä, geneettinen alityyppi, pathway-analyysi, Gleasonin summa

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. ETURAUHASSYÖVÄN GENEETTISET ALITYYPIT JA GLEASONIN SUMMA	3
2.1 Geneettinen perimä ja RNA	3
2.2 Geneettiset mutaatiot ja syöpä	4
2.3 Eturauhanen ja eturauhassyöpä.....	6
2.4 Eturauhassyövän geneettiset alityypit	8
2.5 Pathway-analyysi syövän analysoinnissa	10
2.6 Gleasonin summa eturauhassyövän diagnosoinnissa	13
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
3.1 Ekspressoituneimmat geenit tilastollisella testauksella	19
3.2 Alityyppejä erottelevat geenit	20
3.3 Geenien pathway-analyysi	21
3.4 Gleasonin summa alityypeille	21
4. TULOKSET	22
4.1 Eturauhassyövän geneettiset alityypit	22
4.2 Alityyppien erot RNA-tasolla.....	23
4.3 Alityyppejä erottelevien geenien pathway-analyysi	25
4.4 Gleasonin luokittelu eturauhassyövän alityypeille.....	31
5. YHTEENVETO.....	38
LÄHTEET	39
LIITTE A: GENEETTISEN DATAN TILASTOLLINEN ANALYYSI, RSTUDIO	41

KUVALUETTELO

Kuva 1 Eturauhasen sijainti [6], muokattu 10.11.2020.....	6
Kuva 2 Eturauhassyövän alityypin osuus syöpätapauksissa. [10]	10
Kuva 3 Pathway analyysin avulla löydetyt geenien väliset vuorovaikutukset [9]	12
Kuva 4 Rauhasrakenteiden erilaistumisaste Gleasonin ryhmien perusteella [4].....	15
Kuva 5 Eturauhassyövän alityyppejä edustavat potilaat [1].....	22
Kuva 6 Syövän pathway-analyysi.....	26
Kuva 7 Tarkempi kuvaus syövän pathway-analyysistä.....	27
Kuva 8 Eturauhassyövän pathway-analyysi.....	29
Kuva 9 RAP1 pathway.....	30
Kuva 10 Gleasonin summat alityypeittäin.....	32
Kuva 11 Gleasonin ryhmien osuudet alityypeittäin [1].....	33

LYHENTEET JA MERKINNÄT

AR	Androgeeni reseptori säätelee eturauhasen solujen normaalia kasvua.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymeraasiketjureaktio
PSA	Prostataspesifinen antigeeni, eturauhasessa erittyvä proteiini
RNA	Ribonukleiinihappo,
TCGA	The Cancer Genome Atlas, National Cancer Instituten ylläpitämä datatietokanta

1. JOHDANTO

Eturauhassyöpä on Suomessa yksi miesten yleisimmistä, pahanlaatuisista syöpäsairauksista, johon sairastuu vuosittain tuhansia potilaita, joista suurin osa on yli 70-vuotiaita [18]. Eturauhassyöpään sairastuminen alle 40-vuotiaana on harvinaisempaa. Eturauhassyöpä on syöpätautina moniulotteinen. Geneettisten ominaisuuksien perusteella eturauhassyöpä luokitellaan alityyppeihin, jotka eroavat RNA-tasolla ja joissa syöpään johtavat mekanismit toimivat eri tavoin. Geneettisten alityyppien lisäksi syövän diagnosoinnissa käytetään syövän erilaistumista kuvaavaa Gleasonin luokittelua ja Gleasonin summaa. Gleasonin summan perusteella eturauhassyövän kasvaimet voidaan jakaa viiteen ryhmään histologisen erilaistumisen perusteella eli sen perusteella, miten hyvin kasvain ja sen ympäröivät solut ovat erilaistuneet ja kuinka paljon solut eroavat eturauhasessa hyvin erilaistuneista, terveistä kudoksista ja rauhasrakenteista. Pienimpiä Gleasonin summia saavat eturauhassyövät, joissa syöpäkasvain on suhteellisen hyvin erilaistunut ja kasvain on hyvälaatuinen. Korkeimpia Gleasonin summia saavat kasvaimet ovat aggressiivisia ja ne leviävät nopeasti. Toteamisvaiheessa korkeimpia Gleasonin summia saanut kasvain on todennäköisesti jo levinnyt muualle potilaan elimistöön.

Yleisyytensä lisäksi eturauhassyöpä on yliagnostoitu tauti, mikä tarkoittaa, että osa eturauhassyöpää sairastavista potilaista saa aktiivista hoitoa syöpään, vaikka potilas ei hoitoa tarvitsisi. Suurimmassa osassa tautitapauksissa eturauhassyöpä on rauhallinen ja syöpä etenee hitaasti, minkä seurauksena on todennäköistä, että ikäännytynyt potilas menehtyy muun kuin eturauhassyövän vuoksi. Aktiivisissa syöpähoidoissa hoitoa pyritään kohdentamaan mahdollisimman hyvin kasvaimen, mutta etenkin pitkien hoitojen seurauksena kasvainta ympäröivät kudokset voivat vaurioitua ja aiheuttaa jopa toiminnanmuutoksia eturauhasta ympäröivissä elimissä, kuten virtsarakossa.

Työn alussa, luvussa 2 kerrotaan, mitä ovat geenit ja mikä on RNA, sekä miten ne liittyvät syöpään muun muassa solujen jakautumisen ja erilaistumisen kautta. Tämän lisäksi luvussa kerrotaan, mikä on eturauhassyöpä ja kuvataan, mitä ovat eturauhassyövän geneettiset alityypit ja miten pathway-analyysin avulla voidaan tutkia alityyppejä erottavia geenejä sekä miten tilastollisella testauksella voidaan määrittää erottavista geeneistä ekspressoituneimmat geenit. Lopuksi kerrotaan, mitä pathway-analyysin avulla saadaan

selville syövän geneettisistä ominaisuuksista sekä miten pathway-analyysillä voidaan tutkia alityyppien geneettisiä ominaisuuksia.

Kolmannessa luvussa kuvataan, miten eturauhassyövän tutkimusdatasta saadaan määriteltyä ekspressoituneimmat geenit tilastollisen testauksen ja p-arvon perusteella sekä määritettyä eturauhassyövän geneettisiä alityyppejä erottelevat geenit. Työn kokeellisessa osassa määritetään tilastollisella testauksella geeniryhmille p-arvot, joiden perusteella voidaan sulkea pois geeniryhmän vähiten ekspressoituneita geenejä, jotka ovat pathway-analyysin kannalta vähemmän merkittäviä. Alityyppejä erottavista geeneistä ekspressoituneimmille ajetaan pathway-analyysi, joka kertoo, miten geenit vuorovaikuttavat pathwayssa sekä miten eturauhassyövän alityyppien geneettisiä eroja voidaan vertailla pathway-analyysin perusteella. Tilastollinen testaus suoritetaan Rstudio-ohjelmalla luomalla limma-funktio, joka määrittää tilastollisesti tutkimusdatassa olevasta geenijoukosta ekspressoituneimmat geenit. Tutkimusartikkelista ladatusta datasta erotellaan geenit alityyppien mukaan ja määritetään geenit, jotka erottavat eturauhassyövän ETS-positiivisia ja -negatiivisia alityyppejä. Rstudioon ohjelmoitavaa limma-funktiota käyttämällä saadaan selville geneettisen datan ekspressoituneimmat geenit. Ekspressoituneimpien geenien joukosta voidaan erotella geneettisiä alityyppejä erottelevat geenit ja vertailla geenien avulla alityyppien geneettisiä ominaisuuksia. Luvussa on kuvattu, mistä tutkimusdata on saatu ja miten geenidataa lähdetään käsittelemään, jotta tilastollisella testauksella saadaan määritettyä kasvainnäytteistä ekspressoituneimmat geenit pathway-analyysia varten.

Neljännessä luvussa esitetään tulokset ja pohditaan, miten geneettiset alityypit eroavat toisistaan RNA- ja geneettisellä tasolla. Tulosten perusteella tutkitaan, miten eturauhassyövän alityyppejä erottelevat geenit vaikuttavat eturauhassyöpään liittyviin, geenien välisiin signalointireitteihin, käyttämällä DAVID-työkalua. Lisäksi luvussa selvitetään eturauhassyövän geneettisten alityyppien eroja RNA-tasolla sekä analysoidaan saatuja tuloksia alityypin määrittämisessä. Luvun lopuksi selvitetään, miten eturauhassyövän alityypit vaikuttaa kasvaimesta määritettyyn Gleasonin summaan ja kasvaimen luokitteluun erilaistumisasteen perusteella. Näytteille määritettyjen Gleasonin summia vertailemalla voidaan arvioida syövän aggressiivisuutta verrattuna eri alityypin kasvainnäytteisiin.

2. ETURAUHASSYÖVÄN GENEETTISET ALITYYPIT JA GLEASONIN SUMMA

2.1 Geneettinen perimä ja RNA

Ihminen koostuu lukuisista erilaisista soluista, jotka muodostavat kudoksia. Kudokista muodostuu elimiä ja elimet muodostavat elmistöjä. Ihmisessä on suuri määrä erilaisia soluja, joten elimistössä solujen jakautumisen, erilaistumisen ja solun tuhoutumisen tulee olla hyvin säädeltyjä ja hallittuja tapahtumia. Jotta solujen välinen vuorovaikutus toimisi ja lukuisat erilaistuneet solut muodostaisivat toimivan kokonaisuuden, jokaisessa solussa on oltava oma toimintaohjeensa. Toimintaohjeen perusteella solut erilaistuvat ja vuorovaikuttavat ympäröivän soluväliaineen ja toisten solujen kanssa. Solussa olevaa yksittäistä toimintaohjetta kutsutaan geeniksi. Geeni on pieni osa DNA-ketjua ja siinä on ihmisen perimä. Jokaisessa solussa geenit määräävät, miten solu erilaistuu, minkälaisen kudoksen se muodostaa tai mitä tehtäviä solulla on. [3]

Geenit muodostavat deoksiribonukleinihappoketjun eli DNA-ketjun joka sisältää yksilön geneettisen perimän ja informaation. Kaksijuosteinen DNA-ketju koostuu sokeri-, fosfaatti- ja emäsosasta. DNA:n emäsosat ovat adeniini (A), guaniini (G), tyymiini (T) ja sytosiini (C). DNA:n kaksoisjuosteet ovat komplementaarisia, mikä tarkoittaa sitä, että DNA-juosteessa jokaisella emäksellä on oma vastinemäksensä: adeniini pariutuu tyymiinin kanssa (A-T) ja guaniini sytosiinin kanssa (G-C). [3]

DNA:ssa olevan geneettisen tiedon perusteella solussa valmistetaan proteiinisynteesillä soluille proteiineja, joita käytetään solussa useissa tarkoituksissa. Proteiinisynteesissä DNA:n mallijuostetta koodataan ja siitä muodostuu proteiinisynteesin alussa ribonukleinihappo- eli RNA-ketju [3]. RNA on yksijuosteinen molekyyli, joka koostuu DNA-ketjun tavoin fosfaatti-, sokeri- ja emäsosasta. Toisin kuin DNA:ssa, RNA-ketjun sokerina toimii riboosi ja emäksinä DNA:n emästen tavoin adeniini (A), guaniini (G) ja sytosiini (C), mutta RNA:ssa neljäntenä emäksenä on urasiili (U) [3]. RNA- ja DNA-ketjujen emäkset ovat komplementaarisia, mikä tarkoittaa, että emäkset pariutuvat emäsparisäännön mukaan vain tietyn emäksen kanssa: adeniini sitoutuu urasiiliin (A-U) ja guaniini sytosiiniin (G-C) [3]. RNA-molekyylillä on katalyyttisiä ja toiminnallisia ominaisuuksia solujen proteiinisynteesissä [3]. Reaktioketju alkaa solun tumassa aina uudelleen, kun solussa tarvitaan uusia proteiineja [11]. Elimistössä proteiineilla on useita tehtäviä, kuten toiminta viestiproteiineina, entsyymeinä, rakenneproteiineina ja solujen puolustustautumisessa vierasaineita vastaan [3].

Tutkittaessa näytteen geneettisiä ominaisuuksia, tarvitaan geneettistä informaatiota eli DNA:ta sisältävä näyte. Näytemäärän ollessa pieni, näytteen sisältämää geneettistä informaatiota voidaan monistaa PCR-analyysin avulla (eng. *Polymerase Chain Reaction*). PCR-analyysissä ketjureaktiolla monistetaan näytteessä olevaa DNA:ta useita kertoja ja sitä käytetään, kun halutaan kopioida tutkittavasta näytteestä lyhyttä DNA-kappaletta. PCR-menetelmässä näytteessä olevassa kaksijuosteisesta DNA:sta erotetaan kaksoisjuosteesta yksittäinen juoste, joka halutaan kopioida, ja jokainen sykli käsittää kolme vaihetta. Aluksi kaksijuosteisesta DNA-kappaleesta erotetaan yksittäiset DNA-juosteet. Yksittäisistä DNA-juosteista erotetaan primerit, jotta komplementaariset ketjut voidaan yhdistää jälleen kahdeksi DNA-ketjun säikeeksi. Valmistettu seos inkuboidaan DNA-polymeraasin kanssa ja kuumennetaan uudelleen, jotta saadaan erotettua uudet syntetisoidut DNA-juosteet. Sykleissä uudet, polymeraasin avulla syntetisoidut DNA-molekyylit toimivat malleina seuraavan kierroksen DNA:n replikaatiossa eli DNA:n kahdentumisessa. PCR-menetelmän etu on, että tutkittavat geenit voidaan kopioida pienestä näytteestä ilman, että koko DNA-kirjasto käy läpi, tarvittavien geenien löytämiseksi. PCR:ää voidaan hyödyntää myös silloin, kun pienestä näytemäärästä halutaan saada geneettistä informaatiota. PCR-menetelmän avulla pienestäkin näytteestä voidaan kopioida DNA:ta niin, että geneettistä informaatiota on tutkimusta varten tarpeeksi. [3]

2.2 Geneettiset mutaatiot ja syöpä

Solujen jakautuminen on hyvin säädelty tapahtuma, mutta toisinaan RNA:ta koodatessa tapahtuu virheitä, kuten virhe geenin kopioimisessa tai vaurio tai mutaatio koodattavassa geenissä esimerkiksi ionisoivan säteilyn seurauksena. Solujen jakautumisessa ja geenien koodauksessa tapahtuville virheille on mekanismeja, jotka estävät virheiden monistumisen proteiinisynteessissä tai solunjakautumisessa. Geenien koodauksessa ja proteiinisynteessin aikana soluissa on korjausmekanismit, joten yksittäiset virheet geeneissä eivät välttämättä tarkoita suuria vaurioita tai muutoksia proteiinisynteessissä tai solun jakautumisessa. Yksi solujen mekanismeista on virheellisen solun hallittu tuhoaminen, apoptoosi (eng. apoptosis), jossa solu tuhoetaan entsyymaattisesti ja hyvin kontrolloidusti siten, ettei solun tuhoaminen vaurioita solua ympäröivää kudosta tai muita soluja. [17]

Kun mutaatio tai vaurio tapahtuu geenissä, jonka perusteella tehdään solujen signalointiin tai jakautumiseen vaikuttavaa proteiinia, tai mutaation aiheuttama geenin muutos on niin laaja, että se vaikuttaa proteiinituotantoon merkittävästi, proteiinisynteessin koodauksessa virhettä ei välttämättä pystytä korjaamaan [17]. Kun

muutosta ei pystytä korjaamaan, mutaatioiden seurauksena proteiinisynteesissä tapahtuvat muutokset voivat muuttaa solujen rakennetta ja toiminnallisuutta niin, ettei solit vastaanota solunsisäisiä tai solun ulkopuolelta tulevia signaaleja, vaan solu alkaa toimia ympäröivistä soluista poikkeavalla tavalla [17]. Sen lisäksi, että solun vastaanottamat signaalit ohjaavat solun lisääntymistä, erilaistumista ja liikkumista, signaalit ohjaavat vaurioituneet tai poikkeavat solut tarvittaessa hallittuun ja ohjelmoituun solukuolemaan, apoptoosiin [17]. Kun poikkeavasti toimiva solu ei vastaanota solun signaaleja solun ulko- tai sisäpuolelta eikä solu ohjautu kuolemaan, vaurioitunut tai poikkeava solu voi alkaa jakautua ilman rajoituksia ja jakautuneen solun tytärsoluilla on solua vastaavia ominaisuuksia [17]. Ympäristöstään poikkeavasti erilaistunutta solua, joka ei vastaanota viestejä solun sisä- tai ulkopuolelta ja jonka kasvua ja lisääntymistä ei hallita, kutsutaan syöpäsoluksi [3].

Syöpä on tauti tai oireyhtymä, jossa solut kasvavat ja jakautuvat hallitsemattomasti vuorovaikuttamatta ympäröiviin soluihin. Solujen hallitsemattoman kasvun ja rajoittamattoman jakaantumisen lisäksi syövässä jakautuneiden solujen ominaisuudet muuttuvat, jolloin syöpäsolut voivat tunkeutua ympäröivään kudokseen ja alkaa muodostaa erilaistumattoman soluryppään, kasvaimen, jonka ominaisuudet poikkeavat ympäröivän kudoksen rakenteesta ja toiminnasta. Syöpä on monimutkainen ja lääketieteellisesti haastava tauti, sillä syöpäsolut voivat kasvaimen sisällä kasvattaa verisuonia niin, että solut pääsevät liikkumaan muualle elimistöön ja muodostavat etäpesäkkeitä. Verisuonten avulla kasvaimen solut saavat selviytymisen kannalta tärkeää happea ja ravinteita verenkierron mukana. Etäpesäkkeet voivat liikkua elimistön eri osiin verenkierron mukana ja kasvaa, jakautua ja erilaistua. Jos syöpäkasvain on muodostanut etäpesäkkeitä ja niitä havaitaan runsaasti esimerkiksi aivoissa tai keuhkoissa, syövän hoitaminen esimerkiksi sädehoidolla on hyvin haastavaa, niin että syöpäsolut saadaan tuhottua mutta kasvainta ympäröiviä kudoksia vahingoitettaisiin mahdollisimman vähän [8].

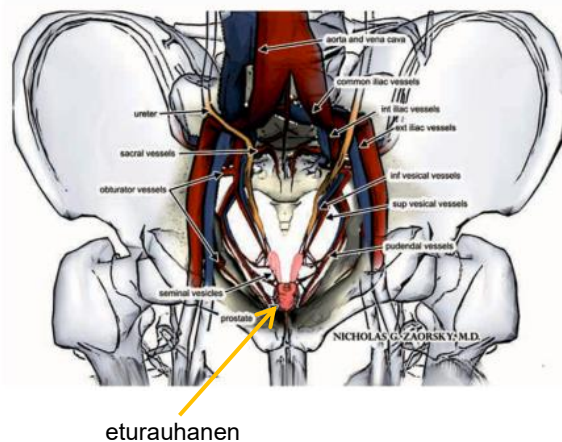
Solun geneettisistä mutaatioista voidaan erottaa erilaiset mutaatioita aiheuttavat tekijät. Geenin toimintaa ajavassa mutaatioissa (eng. driver mutation) havaitaan syöpägeenin (eng. oncogene) toiminnan aktiivisuuden lisääntyminen. Geenin liiallinen ekspressoituminen voi aiheuttaa esimerkiksi solujen kasvutekijöiden liiallisen ilmenemisen, minkä seurauksena soluja jakautuu liikaa. Geenin toiminnallisuuden häviämisessä (eng. loss of function) mutaation seurauksena geenin pohjalta valmistettu proteiini ei toimi oikein. Geenin toiminnallisuuden häviämisessä solussa oleva geeni, joka hillitsee esimerkiksi solun kasvutekijöiden toimintaa tai hallitsee poikkeavien solujen ohjattua solukuolemaa, ei toimi normaalisti eikä geenin pohjalta tehty proteiini toimi

vaaditulla tavalla, minkä seurauksena solujen kasvua ja erilaistumista rajoittavat tekijät eivät säätele solujen toimintaa. [3]

Mutaation seurauksena solun kasvua ja erilaistumista rajoittavat tekijät voivat lakata toimimasta, minkä seurauksena esimerkiksi tietty kasvutekijä voi aktivoitua, minkä seurauksena solu voi alkaa jakautua ja erilaistua hallitsemattomasti [3]. Sekä geenin perusteella luodun proteiinin toiminnallisuuden muutoksen seurauksena että toiminnallisuuden häiriön seurauksena proteiinin toiminta häiriintyy, mikä voi aiheuttaa muutoksia normaalissa solujen toiminnassa [3]. Kun solujen jakautumista ei kontrolloida tai poikkeuksellisesti erilaistuneita soluja ei ohjata apoptoosiin, seurauksena voi muodostua kudoksen normaaleista soluista poikkeavien solujen muodostama kasvain [5].

2.3 Eturauhanen ja eturauhassyöpä

Eturauhanen on pieni rauhanen, joka sijaitsee miehen elimistössä peräsuolen ja virtsarakon välissä. Rauhasen läpi kulkee virtsaputki, jonka kautta virtsa ja siemenneste poistuvat elimistöstä [2]. Eturauhanen on esitetty Kuva 1.



Kuva 1. Eturauhasen sijainti [6], muokattu 10.11.2020.

Eturauhanen voidaan jakaa anatomisiin vyöhykkeisiin, joiden avulla voidaan tutkia eturauhasta ja sen toiminnallisuutta [2]. Eturauhasen kudoksen rakenne on riippuvainen eturauhasen epiteelisolujen ja tukikudoksen välisistä vuorovaikutuksista [17]. Solujen välisten vuorovaikutusten muuttuessa esimerkiksi ulkoisen ärsyksen seurauksena solun geneeissä voi tapahtua mutaatio, mikä voi muuttaa solujen ominaisuuksia ja toiminnallisuutta. Kuten kuvasta nähdään, eturauhanen sijaitsee lähellä peräsuolta ja virtsarakkoa, joten muutokset, kuten esimerkiksi rauhasen kasvu, voivat vaikuttaa rauhasen lähetyillä olevien elinten toimintaan.

Eturauhanen ei itsessään ole välttämätön miehen peruselintoiminnoille, mutta rauhanen ja sen toiminta on välttämätön muun muassa lisääntymisen kannalta, sillä eturauhasessa sijaitsee lisääntymisen kannalta tärkeitä rakkularauhasia, jotka tuottavat yli puolet miehen tuottaman siemennesteen nestemäisestä osasta. Tämän lisäksi rauhanen tuottaa aineita, jotka ovat välttämättömiä siittiöiden liikkumisen ja selviytymisen kannalta. [2]

Eturauhassyöpä on Suomessa yleisin ja maailmanlaajuisesti toiseksi yleisin miesten syöpä [1]. Tauti saa alkunsa yleensä eturauhasen uloimmalta eli perifeeriseltä vyöhykkeeltä, joka sijaitsee eturauhasessa lähimpänä peräsuolta [2]. Eturauhassyöpä, kuten useat muut syövät, puhkeaa yleensä siten, että rauhasen uloimman vyöhykkeen solut erilaistuvat poikkeavasti verrattuna normaaleihin eturauhasen soluihin ja erilaistumattomat solut alkavat jakautua hallitsemattomasti [12]. Eturauhassyöpä on siis tauti, jossa taudin taustalla on eturauhasen tavallisesta solurakenteesta poikkeavat solut ja solujen itsenäinen kasvu ja lisääntynyt jakautuminen [17]. Taudille tyypillistä on, että erilaistumattomat solut muodostavat kasvaimen eturauhaseen tai sen ympärille. Eturauhassyövän puhkeamiseen vaikuttavat solujen geenimutaatiot, joissa solujen lisääntymistä, erilaistumista ja apoptoosia kontrolloivien geenien rakenne muuttuu niin, että geenin pohjalta luotu proteiini ei toimi vaaditulla tavalla [17].

Eräänä eturauhassyövän aiheuttajana on androgeeni reseptori (eng. Androgen Receptor, AR), joka säätelee eturauhasen normaalia kasvua. Androgeeni reseptori hallitsee eturauhassyövässä solujen selviytymismekanismeja, kuten solujen ajautumista apoptoosiin, sekä ohjaa syöpäsolujen kriittistä kasvua [1]. Lisäksi AR-hormoni ohjaa ETS-transkriptiofaktorin tuottoa ja liian suurina määrinä se voi aiheuttaa ETS:n liiallista ilmenemistä [14]. ETS-transkriptiofaktori aiheuttaa kohdegeenin aktivoitua tai geenin toimimattomuutta [14]. ETS-faktorin aktivoivaa tai estävää toimintaa ohjaavat AR-hormonin lisäksi muut yksittäiset faktorit [14].

Kun geenimutaatio tapahtuu geneeissä, jotka rajoittavat solujen lisääntymistä, erilaistumista ja kasvamista, seurauksena eturauhasen soluista jakautuvat solut voivat kehittyä erilaistumattomina soluina, jotka eivät enää vuorovaikuta ympäröivien solujen ja soluväliaineen kanssa [17]. Erilaistumattomien, rauhasen normaaleista soluista poikkeavien solujen ryväs muodostaa kasvaimen, joka voi kasvaimen hyvän- tai pahanlaatuisuudesta ja solujen erilaistumisasteesta riippuen lähettää etäpesäkkeitä eturauhasesta muualle potilaan elimistöön. Suurimmalla osalla potilaista mutaatio tapahtuu muissa kuin sukusoluissa, minkä seurauksena eturauhassyöpään altistavat geenimutaatiot eivät suoraan periydy potilaan jälkeläisille [12]. Koska eturauhassyöpään ei suoraan liity perinnöllisyys, tiettyä syöpään altistavaa geenä ei välttämättä löydetä

geenitesteillä [12]. Tutkimusartikkelin ”**Taxonomy of Primate Prostate Cancer**” mukaan, eturauhassyövän yleisyyteen ja sairauden puhkeamiseen vaikuttavat perinnöllisten tekijöiden lisäksi esimerkiksi väestölliset tekijät, kuten elintaso ja ihmisten ikääntyminen sekä elintavat [1].

Eturauhanen sijaitsee lähellä tärkeitä sisäelimiä, kuten virtsarakkoa ja peräsuolta, minkä seurauksena syövän aiheuttamat muutokset kuten rauhasen solujen liiallinen kasvu, erilaistumattomien solujen muodostama kasvain tai syöpähoidossa rauhasen kohdistettavat hoidot voivat vaurioittaa eturauhasta ympäröiviä elimiä ja hankaloittaa potilaan elämää. Vaikka syöpäkasvain sijaitsisi paikassa, johon hoidon kohdistaminen tehokkaasti olisi mahdollista, on mahdollista, että syöpäkasvain on jo lähettänyt etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Etäpesäkkeitä on voinut kehittyä elimiin, joista niitä on haastava paikantaa. Aggressiivinen syöpä on voinut levitä muihin elimiin, kuten haimaan ja jopa aivoihin, joista kasvaimen hoitaminen tai totaalinen poistaminen esimerkiksi leikkauksella voi olla hyvin monimutkaista, ellei jopa mahdotonta niin, ettei kasvainta ympäröiviä tai sitä lähellä olevia elimiä vaurioiteta. [2]

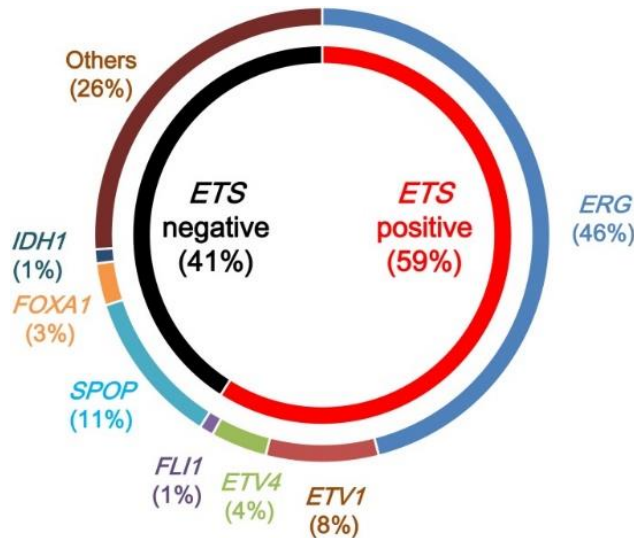
2.4 Eturauhassyövän geneettiset alityypit

Eturauhassyöpä on moniulotteinen tauti, sillä syövän aggressiivisuus ja riski leviämiseen vaihtelevat riippuen soluissa tapahtuneesta mutaatioista, missä soluissa mutaatio tapahtuu ja minkä proteiinin toimintaan mutaatio vaikuttaa. Eturauhassyövästä moniulotteisen taudin tekee se, että eturauhassyöväällä on havaittu olevan useita geneettisiä alityyppejä, joita erottavat esimerkiksi geenien pohjalta valmistettujen proteiinien toiminnallisuuden muutokset ja geenien väliset vuorovaikutukset [1]. Eturauhassyöpä voidaan jakaa geenimutaatioiden ja syövän geneettisten ominaisuuksien perusteella geneettisiin alityyppeihin. Alityypin geneettisten ominaisuuksien, kuten tiettyjen geenien ekspressoitumisen lisääntymisen perusteella voidaan arvioida alityypin ilmenemistä, taudin leviämistä ja alityypin syövän aggressiivisuutta [1]. Kun alityyppejä aiheuttavat geenimutaatiot ovat laajoja tai kohdentuvat tärkeisiin, solujen jakautumista, erilaistumista tai apoptoosia kontrolloivien geenien proteiiniin tuotantoon, syöpä voi esiintyä aggressiivisena [1].

Eturauhassyövän ja muiden syöpien kasvainnäytteitä on kerätty The Cancer Genome Atlas -datakirjastoon (lyh. TCGA) [10]. TCGA-datakirjastoon on kerätty tietoa 333 eturauhassyövän kasvainnäytteestä, joka sisältää informaatiota kasvainnäytteiden somaattisista mutaatioista, geeniyhdistelmistä, geeniekspressioista [10]. TCGA-datakirjastossa olevista eturauhassyöpänäytteistä 74% voidaan jakaa seitsemään alityyppeihin niiden geneettisten ominaisuuksien perusteella [10].

Eturauhassyövän geneettisten alityyppien välillä on eroja, joiden perusteella voidaan määrittää, mitä eturauhassyövän alityyppiä potilas ilmentää. Artikkelissa ”**Taxonomy of Primate Prostate Cancer**” on esitetty eturauhassyövän luokittelua geneettisten alityyppien perusteella [1]. Tutkimalla eturauhassyövän molekulaarisia ominaisuuksia saadaan tietoa geenimutaatioista, jotka aiheuttavat tietyn eturauhassyövän alityypin syöpää [5]. Tutkimalla alityyppien molekulaarisia ominaisuuksia, voidaan löytää tietoa syöpää aiheuttavista geenimutaatioista ja selvittää alityypin funktionaalisia ominaisuuksia, jotka vaikuttavat esimerkiksi syövän leviämiseen [5]. Geneettisestä alityypistä riippuen eturauhassyöpä voi käyttäytyä eri tavoin [1].

Eturauhassyövän geneettiset alityypit voidaan jakaa ominaisuuksiensa perusteella vielä kahteen ryhmään sen perusteella, hillitseekö vai lisääkö ETS-transkriptiofaktori (*eng.* Erythoblast Transformation Specific) kohdegeenien toimintaa tai niiden ekspressiota [10]. Transkriptiofaktorit ovat proteiinimolekyylejä, jotka toimivat transkriptiota säätelevinä molekyyleinä proteiinisynteesissä [11]. Proteiinisynteesissä ETS-transkriptiofaktorit sitoutuvat DNA:ssa promoottorien tehostaja-alueisiin, mihin RNA-polymeraasi liittyy ja aloittaa geenin transkription [11]. Transkriptiofaktoreilla, kuten ETS-faktorilla on aktivaatioalueita, jotka stimuloivat eli herättävät tai estävät kohdegeenin transkriptiota solun ulkoisten tai sisäisten signaalien perusteella [11]. ETS-positiivisilla eturauhassyövän alityypeillä ETS-faktori lisää tiettyjen geenien toimintaa. ETS-negatiivisilla alityypeillä faktorin toiminta hillitsee tiettyjen geenien toimintaa [10]. Eturauhassyövän alityypeistä ETS-positiivisia alityyppejä ovat ERG, ETV1, ETV4 ja FLI, ETS-negatiivisia alityyppejä ovat SPOP, FOXA1 ja IDH1 [10]. Harvinaisemmat alityypit on koottu kahdeksanteen, ETS-negatiivisten alityyppien ryhmään ”Other”, muut [10]. Kuva 2. on esitetty eturauhassyövän geneettiset alityypit ja niiden jaottelu ETS-positiivisiin ja -negatiivisiin alityyppeihin.



Kuva 2. Eturauhassyövän alityypin osuus syöpätapauksissa. [10]

Kuva 2. kaaviosta nähdään, että alityypeistä yleisimmät ovat ETS-positiivisista alityypeistä ERG, johon kuuluu 46% potilaista ja ETS-negatiivisista ryhmä "Others", johon on listattu muut eturauhassyövän alityypit ja johon kuuluu 26% potilaista. Eturauhassyövän ETS-negatiivisilla alityypeistä yleisimmät, yksittäiset alityypit ovat SPOP ja FOXA1 [1]. Harvinaisimpia alityyppejä ovat ETS-positiivinen FLI1 ja ETS-negatiivinen IDH1, joista kummankin osuus on 1%. Lisäksi nähdään, että ETS-positiivisia alityyppejä on yli puolet eli 59% ja ETS-negatiivisia alityyppejä 41%.

Eturauhassyövän geneettiset alityypit eroavat geeni- ja genomitasolla, minkä seurauksena syöpä käyttäytyy eri tavoin riippuen alityypistä. Sen lisäksi, että alityypit eroavat toisistaan, alityypin sisällä syöpä voi ilmetä aggressiivisena tai rauhallisena tautina riippuen geneeissä tapahtuvien muutosten laajuudesta ja geeneistä, jotka laukaisevat syövän. Osalla alityypin potilaista tauti voi olla rauhallinen ja osalla potilaista alityypin tauti voi näyttäytyä aggressiivisena. Alityyppien geneettisten ominaisuuksien perusteella voidaan arvioida, onko potilaan tauti aggressiivinen vai rauhallinen. Taudin ollessa rauhallinen hoitoa ei välttämättä tarvita, sillä tauti etenee hitaasti. Eturauhassyövän useat alityypit ja alityyppien väliset erot tekevät sairaudesta monimutkaisen ja diagnosoinnin kannalta haastavan taudin. [5]

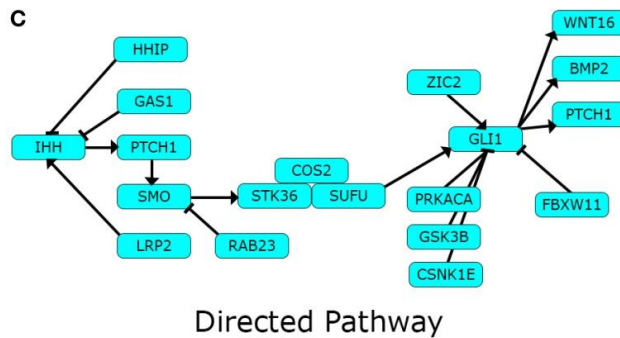
2.5 Pathway-analyysi syövän analysoinnissa

Pathway-analyysi (*eng.* pathway analysis) on bioinformatiikan menetelmä, jonka avulla analysoidaan geenijoukon perusteella geenien välisiä vuorovaikutuksia ja voidaan tutkia, miten esimerkiksi syövän seurauksena tietyn geenin lisääntynyt tai vähentynyt ilmeneminen vaikuttaa proteiinituotantoon ja sitä kautta kontrolloi esimerkiksi solujen erilaistumista tai jakautumista [11]. Pathway-analyysi on tilastollisen testauksen avulla

määritetty malli, jonka avulla geenien välisiä vuorovaikutuksia voidaan mallintaa ohjelmistoilla luotujen (*lat. de novo*) signalointireittien avulla [11]. Tutkimalla solujen välistä signalointia rakennetuilla malleilla, voidaan löytää geenien väliseen vuorovaikutukseen ja geeniekspressioon liittyviä signalointireittejä analysoitaessa esimerkiksi syöpäsairauksia [11]. Pathway-analyysiä varten geneettisestä datasta valitaan yleensä näytteen ekspressoituneimmat geenit tai geeniryhmät, joiden perusteella analyysi laaditaan [9]. Käsittelemättömässä biologisessa datassa on paljon tutkimuksen ja analyysin kannalta epäolennaista informaatiota, joten dataa ei pystytä analysoimaan sellaisenaan [9]. Datasta valitaan tutkimuksen kannalta olennaisimmat geenit, joita tutkitaan ja joille laaditaan pathway-analyysi [9].

Ennen pathway-analyysiä geenit järjestetään käyttämällä tilastollista menetelmää ja määritetään kullekin geenille p-arvo. Tilastollisessa testauksessa käytettävä hypoteesi on, että datasta satunnaisesti valitut geenit eivät kuulu tutkittavaan geenijoukkoon tietyllä riskitasolla. Nollahypoteesina H_0 on väite, että tutkittavista geneeistä kaikki saivat saman p-arvon eli ekspressoituisivat yhtä paljon. Vaihtoehtoisena hypoteesina H_0 on, että geenit ovat eri tavoin ekspressoituneita. Datan geenijoukolle määritetään tilastollisella testauksella nollahypoteesin mukaiset p-arvot. P-arvo kuvaa todennäköisyyttä, että geeni näyttäytyy ekspressoituneena kyseisessä näytteessä sattumalta. Tilastollisella testauksella saadaan erotettua geneettisestä datasta ekspressoituneimmat geenit, joita tarkastellaan pathway-analyysissä ja saadaan eliminoitua työn kannalta epäolennaisemmat, vähemmän ekspressoituneimmat geenit. Tässä työssä tilastollisessa testauksessa käytetään Studentin t-jakaumaa sen selkeyden ja yksinkertaisuuden takia. [9][11]

Tilastollisella testauksella määritellyille, geenijoukon ekspressoituneimmille geneeille määritetään pathway-analyysi. Pathway-analyysissä esitetään geenien väliset vuorovaikutukset ja havainnollistetaan geenien välisiä vuorovaikutussuhteita. Analyysissä on esitetty geenien tai geenijoukkojen nimet, sekä kuvattu, miten geenit vuorovaikuttavat keskenään. Tämän lisäksi voidaan mallintaa, mihin solujen sisäisiin ja ulkoisiin toimintoihin tietyt signalointireitit vaikuttavat. Vuorovaikutukset eri geenien välillä voivat olla positiivisia tai negatiivisia, mikä tarkoittaa, että geenit voivat aktivoida eli lisätä tai inhiboida eli estää tai vähentää kohdegeenien toimintaa. Kuva 3. on esitetty pathway-analyysi yhdelle geenijoukolle. [9]



Kuva 3. Pathway analyysin avulla löydettyjen geenien väliset vuorovaikutukset [9].

Kuva 3 esitettyssä pathway-analyysissä nuolen kärki kuvaa aktivoituvaa geeniä ja poikkiviiva inhiboituvaa geeniä. Geeni, josta nuoli lähtee toimii nuolen osoittamaa kohdegeeniä aktivoivana tai inhiboivana geeninä. Analyysissä esiintyvien, genejä aktivoivien ja inhiboivien vuorovaikutusten perusteella voidaan tutkia syövän geneettisiä mekanismeja ja arvioida, minkälaiset geneettiset muutokset aiheuttavat esimerkiksi syövän puhkeamisen. [9]

Syöpätutkimuksessa pathway-analyysillä voidaan verrata esimerkiksi syövän alityyppien geneettisiä eroja ajamalla alityyppejä erottaville geeneille pathway-analyysi [9]. Pathway-analyysin avulla voidaan analysoida tutkittavaan geenijoukon vaikutusta esimerkiksi syövän ilmenemiseen geneettisellä- ja solutasolla ja tutkia geenien välisiä vuorovaikutuksia, jotka aiheuttavat syöpää [9][11]. Syövän taustalla olevan geenimutaation tai -mutaatioiden seurauksena tapahtuvien geenien toiminnan tai aktiivisuuden muutosten perusteella pathwaysta voidaan arvioida mutaatiosta aiheutuvien muutosten laajuutta, miten mutaatiot vaikuttavat solujen toimintaan ja, toisaalta tutkia, mitkä mutaatiot aiheuttavat soluille muutoksia, jotka aiheuttavat esimerkiksi solujen hallitsematonta kasvua ja jakautumista [11].

Pathway-analyysin avulla voidaan selvittää, miten geenin mutaatio vaikuttaa proteiinisynteesiin ja geenin pohjalta luodun proteiinin toiminnallisuuteen. Tämä voi aiheuttaa kohdegeenin hiljentämisen tai geenin liiallisen ilmenemisen ja yliaktiivisuuden. Pathway-analyysin avulla voidaan tutkia, miten yllämainitut geenien toiminnan muutokset vaikuttavat esimerkiksi solujen erilaistumiseen, jakaantumiseen, apoptoosiin, sekä mahdollisesti syövän ja tietyn geneettisen syövän alityypin ilmentymiseen [11]. Koska eri geneettisten alityyppien välillä on molekulaarisia eroja, pathway-analyysin kautta molekyylitason tutkimukset auttavat ymmärtämään taudin monimuotoisuutta, eroja eturauhassyövän alityyppien välillä sekä syövän eri ilmenemismuotoja [9].

Tutkittaessa genejä ja solujen signalointireittejä pathway-analyysin avulla analyysissä havaitaan olevan muutamia puutteita, sillä nykyään käytettävät menetelmät pathway-

analyysin ajamiseen ovat riippuvaisia mitatusta datasta. Ongelmana on se, että käytettävän biologisen datan pathway-analyysi ei välttämättä anna selitystä tutkittavaan ongelmaan. Tämä tarkoittaa, että vaikka datasta saadaan hyödyllistä informaatiota liittyen biologiseen organismiin ja sen toimintaan, näytteestä saadun geneettisen datan perusteella ei välttämättä pystytä selittämään haluttua ongelmaa. [11]

Vaikka pathway-analyysissä esitettävät vuorovaikutukset ja geenien väliset signalointireitit perustuvat tutkittuun tietoon, geenien väliset vuorovaikutukset ovat siitä huolimatta kyseenalaistettavia. Tämä johtuu siitä, että geeniyhdistelmät ja vuorovaikutukset muun muassa sairauksien ilmentumisessä riippuvat tutkittavista solutyypeistä sekä tutkittavasta sairaudesta. Eri kudoksista määritettyihin pathway-analyyseihin tulee suhtautua kriittisesti, eikä määritetyn mallin perusteella voida täysin varmasti sanoa, että määritetyn pathway-analyysin mukaiset reaktiot tapahtuisivat täysin varmasti toisessa biologisessa organismissa tai esimerkiksi toisessa potilaassa samalla tavalla. Pathway-analyysissä käytetään tilastollista testausta, johon liittyy aina tietty epävarmuus. Koska pathwayt on määritetty tietyille soluotokselle, tuloksia ei voida pitää universaaleina. Eri kudoksista määritettyihin pathway-analyyseihin tulee siis suhtautua kriittisesti. [11]

2.6 Gleasonin summa eturauhassyövän diagnosoinnissa

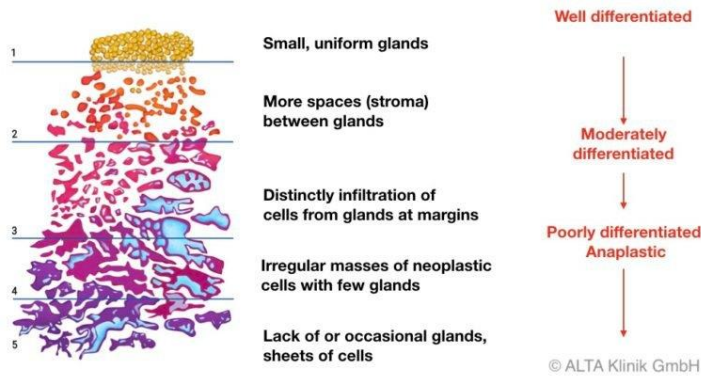
Eturauhassyövän alityyppien ja samaa alityyppiä sairastavien potilaiden välillä voi olla suuriakin eroja [1]. Osalla potilaista tauti on paikallinen ja kasvain hyvälaatuinen, jolloin syöpä voi olla lähes oireeton [1]. Osalla potilaista puolestaan eturauhassyöpä on hyvin aggressiivinen, vaikeasti hoidettava ja on mahdollisesti jo diagnosointivaiheessa lähettänyt etäpesäkkeitä muualle potilaan elimistöön [1]. Eturauhassyövän diagnosoinnissa käytetään kasvaimen erilaistumisen perusteella määritettyä Gleasonin luokitusta ja Gleasonin summaa (*eng. Gleason score*) [13]. Syöpäkasvaimesta saatavasta näytteestä patologi määrittää Gleasonin summan, jonka perusteella voidaan arvioida syövän aggressiivisuutta ja potilaan hoidon tarvetta [13].

Gleasonin summan avulla arvioidaan eturauhassyövän kasvaimen erilaistumisastetta [13]. Kasvaimen kasvutavan ja erilaistumisasteen perusteella kasvaimelle annetaan kokonaislukuarvot väliltä 1 ja 5 [13]. Arvo 1 kuvaa hyvin erilaistunutta kudostaluetta, joka vastaa lähes eturauhasen normaalia kudostaluetta, ja arvo 5 kuvaa huonoiten erilaistunutta tai erilaistumatonat kudostaluetta, joka poikkeaa merkittävästi terveestä kudostaluetesta ja voi levitä aggressiivisesti [13]. Gleasonin summa on muotoa $a+b = z$, missä **a** ja **b** kuvaavat kasvaimen huonoimmin erilaistunutta ja yleisintä kasvutapaa [13]. Gleasonin summa saa pienimmillään arvon $1+1 = 2$ ja suurimmillaan arvon $5+5 =$

10 [13]. Vaikka Gleasonin summa voi saada arvot 2 – 10, on havaittu, että matalan Gleasonin summan kasvaimilla, joilla summan arvo on alle 5, kasvaimen rauhasrakenne on yleensä hyvin erilaistunutta ja sijaitsee eturauhasem uloimmalla vyöhykkeellä [6]. Alhaisen Gleasonin summan kasvain on yleensä niin hyvälaatuinen, että se ei aiheuta haittaa rauhasen tai sitä ympäröivien elimien toiminnalle [6]. Lisäksi kasvain vastaa rakenteeltaan tervettä eturauhasen rauhasrakennetta, eikä kasvaa siksi määritetä syöväksi [6]. Kasvaimen perusteella Gleasonin luokitus rajautuu summiin 6 – 10 ja kasvaimelle annetaan arvot 3 – 5 [7]. Luku 3 kuvaa hyvin erilaistunutta ja ei-aggressiivista kudosta, ja luku 5 kuvaa huonosti erilaistunutta ja aggressiivisinta syöpäkudosta [19].

Määritettäessä eturauhassyövälle Gleasonin summaa eturauhasen kasvaimesta otetaan näyte, josta määritetään kudoksen erilaistumisaste, minkä perusteella näyte pisteytetään [19]. Gleasonin summan perusteella eturauhassyövän kasvaimet luokitellaan viiteen ryhmään. Ryhmään 1 kuuluvat eturauhassyövät, joissa kasvaimen rauhasrakenteet ovat pääosin hyvin erilaistuneita, eli kasvaimen solut ovat lähes yhtä erilaistuneita kuin eturauhasen erilaistuneet solut. Ryhmänumeron kasvaessa, solujen erilaistuminen vähenee ja sitä vähemmän kasvaimessa on hyvin erilaistuneita rauhasrakenteita [4]. Rakenteet pisteytetään Gleasonin luokituksen mukaisesti niin, että erilaistuneimmat, lähes eturauhasen normaalia rauhasrakennetta vastaavat kudoserakenteet saavat arvon 3 ja huonoimmin erilaistuneet rakenteet saavat arvon 5 [4]. Mitä suurempi on Gleasonin luokituksen ryhmänumero, sitä huonommin erilaistuneita pääosa rauhasrakenteista on ja sitä aggressiivisempi kasvain ja syöpä yleensä ovat. Kuva 4 on esitetty solujen erilaistumisasteen ja Gleasonin summan perusteella jaetut ryhmät. [4].

Gleason's Pattern Scale



Kuva 4. Rauhasrakenteiden erilaistumisaste Gleasonin ryhmien perusteella [4].

Kuva 4. nähdään, että ryhmän numeron kasvaessa hyvin erilaistuneiden rauhasrakenteiden määrä vähenee ja erilaistumattomien rauhasrakenteiden määrä kasvaa. Ryhmään 1 kuuluvassa kasvaimessa on hyvin erilaistuneita ja yhtenäisiä rauhasrakenteita, jotka vastaavat suhteellisen hyvin eturauhasen hyvin erilaistuneita rauhasrakenteita. Ryhmissä 2 ja 3 erilaistuneiden rakenteiden määrä vähenee ja rauhasrakenteiden väliin jää tyhjää tilaa. Ryhmässä 3 erilaistuneiden rauhasrakenteiden määrä on ryhmää 2 vähäisempi ja tämän lisäksi solujen välissä voi olla epäsäännöllisiä muodostumia hyvin erilaistuneiden rakenteiden väleissä. Ryhmissä 4 ja 5 erilaistuneiden rauhasrakenteiden määrä on hyvin vähäinen, ja Gleasonin summasta riippuen ryhmän kasvaimissa on pääosin huonosti erilaistuneita rauhasrakenteita, jotka poikkeavat terveen rauhasen rakenteesta. Verrattuna ryhmään 4, ryhmässä 5 kasvamen alueella on hyvin vähän tai ei lainkaan erilaistuneita rauhassoluja.

Alapuolella, Taulukko 1 on koottu Kuva 4 esitetyt ryhmät ja ryhmiä vastaavat Gleasonin summat. Gleasonin luokituksessa erilaistuneimmat rauhasrakenteet saavat arvon 3, joka kuvaa hyvin erilaistunutta rakennetta [4]. Huonoimmin erilaistuneet ja eturauhassyövän kannalta pahanlaatuisimmat kasvainrakenteet saavat Gleasonin pisteityksellä arvon 5 [4].

Taulukko 1. Syöpäkasvaimen luokitus ja Gleasonin summa [7].

Ryhmä	Gleasonin pisteitys	Gleasonin summa	Uusiutumiseriski
1	3+3	6	Matala
2	3+4	7	Kohtalainen
3	4+3	7	Kohtalainen
4	4+4, 3+5, 5+3	8	Korkea
5	4+5, 5+4, 5+5	9–10	korkea

Ryhmään 1 kuuluvat eturauhassyövät, joilla Gleasonin summa saa arvon 6. Kasvaimet ovat rakenteeltaan hyvin erilaistuneita, rauhasrakenteet ovat lähes terveen eturauhasen rakenteiden kaltaisia, ja syöpäkasvain kasvaa hitaasti [13]. Ryhmään kuuluvat eturauhassyövän kasvaimet luokitellaan yleensä hyvälaatuisiksi, eikä syöpää sairastavat potilaat välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa [7]. Ryhmän eturauhassyöpä etenee yleensä niin hitaasti, ettei se ehdi vahingoittaa potilasta tämän elinaikana, sillä todennäköisesti potilas kuolee muuhun sairauteen ennen eturauhassyövän aiheuttamaa kuolemaa [12]. Ryhmään 1 kuuluvat eturauhassyövät ovat matalan riskin syöpiä, mikä tarkoittaa, että jos potilaan syöpää hoidetaan esimerkiksi leikkauksella, hoidon jälkeen riski syövän uusiutumiselle on pieni [7].

Ryhmään 2 kuuluvat eturauhassyövät, joiden Gleasonin summa saa arvon 7 [13]. Ryhmään 2 kuuluvassa eturauhassyövässä kasvaimen rauhasrakenteet ovat pääosin hyvin erilaistuneita, ja suurin osa rauhasrakenteista saa arvon 3. Erilaistuneiden rakenteiden seassa on huonosti erilaistuneita rauhasrakenteita, jotka poikkeavat rauhasen normaaleista rakenteista ja saavat arvon 4 [13]. Vaikka suurin osa rauhasrakenteista on hyvin erilaistuneita, hitaasti kasvavia rakenteita, seassa on erilaistumattomampia rakenteita, joten on riski, että erilaistumattomammat solut alkavat myöhemmin kasvaa nopeammin ja syöpä muuttua aggressiivisemmaksi, mikäli syöpää ei hoideta [16][7]. Kasvaimen sijainnista ja aggressiivisuudesta riippuen, eturauhassyöpää voidaan hoitaa tai seurata [12][16]. Jos kasvain ei aiheuta oireita ja kasvu pysyy rauhallisena, syöpä ei välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa. Kasvaimen ollessa pahanlaatuisempi tai aiheuttaessa oireita potilaalle se voidaan hoitaa. Ryhmän 2 eturauhassyövät ovat kohtalaisen riskin syöpiä, mikä tarkoittaa, että riski syövän uusiutumiselle hoidon jälkeen on keskikorkea ja korkeampi kuin ryhmään 1 kuuluvalla eturauhassyövällä [19].

Ryhmällä 3 Gleasonin summan arvo on ryhmän 2 tavoin 7. Erona on se, että ryhmään 3 kuuluvissa eturauhassyövässä yleisin kasvaimen kasvutapa saa arvon 4 ja toiseksi yleisin arvon 3 [13]. Ryhmän 3 eturauhassyövässä suurin osa rauhasrakenteesta on huonosti erilaistunutta ja seassa on erilaistuneempia rakenteita [13]. Ryhmän 3 eturauhassyöpä on aggressiivisempi ja syöpäsolujen kasvu on nopeampaa kuin ryhmään 2 kuuluvalla eturauhassyövällä, joten syöpä voi levitä nopeasti [7]. Tästä syystä ryhmän 3 eturauhassyövät vaativat yleensä hoitoa [4]. Hoidosta huolimatta, ryhmään 3 kuuluvalla eturauhassyövällä on kohtalainen riski uusiutua hoitojen jälkeen [4]. Riski syövän uusiutumiselle on korkeampi kuin ryhmän 2 eturauhassyöväillä mutta matalampi kuin ryhmien 4 ja 5 eturauhassyöväillä [19].

Ryhmään 4 kuuluvat eturauhassyövät, joilla Gleasonin summa saa arvon 8 [13]. Ryhmän syöpäkasvaimissa on erittäin huonosti erilaistuneita rauhasrakenteita, joilla erilaistumista kuvaava arvo on 4 tai 5 [13]. Erilaistumattomien rauhasrakenteiden seassa voi olla hyvin erilaistuneita rakenteita, mutta pääosin rakenteet ovat erilaistumattomia ja poikkeavat normaalista rauhasrakenteesta [13]. Ryhmään kuuluvissa eturauhassyöväissä syöpä on yleensä aggressiivinen ja tauti luokitellaan korkean riskin syöväksi, missä kasvaimen solut voivat jakautua ja kasvaa hyvin nopeasti sekä levitä aggressiivisesti eturauhasta ympäröiviin kudoksirakenteisiin [16][7]. Aggressiivisen tästä taudista tekee myös se, että taudin riski uusiutua hoitojen jälkeen on korkea [16][4]. Ryhmän 4 syövässä solujen jakautuminen ja leviäminen on nopeaa, joten syöpää tutkittaessa ja sitä diagnosoitaessa on todennäköistä, että aggressiivisesti leviävä syöpä on jo diagnostivaiheessa levinnyt ja syöpäkasvain on levinnyt ympäröiviin kudoksiin ja levinnyt etäpesäkkeinä potilaan muihin elimiin [22].

Korkeimmat Gleasonin summat eli arvot 9 ja 10 kuuluvat ryhmään 5 [13]. Ryhmään 5 kuuluvissa eturauhassyöväissä solut ovat erilaistumattomia eikä erilaistumattomien rauhasrakenteiden seassa ole lainkaan erilaistuneita rauhasrakenteita [13]. Ryhmän eturauhassyövän kasvaimen saamat arvot 4 ja 5 vastaavat huonosti erilaistunutta kudoksirakennetta [7]. Erilaistumattomien rauhasrakenteiden seassa voi olla jopa nekroosia eli hallitsemattomasti kuolevia soluja [13]. Korkeimpia Gleasonin summia saavat kasvaimet voivat kasvaa ja levitä hyvin nopeasti, mikä tekee syöpätaudista hyvin aggressiivisen [13][4]. Ryhmään kuuluvat eturauhassyövät vaativat välitöntä hoitoa, mutta ongelmana on, että yleensä syövän toteamisvaiheessa syöpäkasvain on leittänyt etäpesäkkeitä potilaan elimistöön, joita voi olla vaikea tai jopa mahdotonta hoitaa [4]. Syövästä aggressiivisen tekee myös se, että jopa onnistuneiden syöpähoitojen jälkeen syövän uusitumisriski on korkea [4].

Gleasonin summa perustuu eturauhassyövän kasvainnäytteen erilaistuneiden rauhasrakenteiden luokitteluun, ja summan avulla voidaan arvioida syövän aggressiivisuutta ja syövän mahdollista leviämisenustetta [6]. Gleasonin summa antaa vain arvioita rauhasrakenteiden erilaistumisesta, mutta luokittelun avulla pystytään arvioimaan eturauhassyövän aggressiivisuutta, mikä auttaa hyvälaatuisempien syöpäkasvainten kohdalla vähentämään tarpeettomia hoitoja [6]. Useimmilla potilailla, joilla kasvaimelle määritetty Gleasonin summa saa arvon 6 eli syöpä kuuluu ryhmään 1, tauti on yleensä hyvälaatuinen ja tauti rauhallinen, eli syöpä ei välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa, sillä potilas todennäköisesti menehtyy muun syyn kuin eturauhassyövän takia [6]. Tämän seurauksena voidaan vähentää rauhallista tautia sairastavien potilaiden

tarpeetonta hoitoa ja ylimääräisiä toimenpiteitä, mikäli tauti ei aiheuta oireita ja haittaa potilaalle [13].

Gleasonin summa ja summaa vastaava luottelu vastaa suhteellisen hyvin syövän kliinisiä ominaisuuksia [6]. Gleasonin summan avulla eturauhassyövän kasvaimet pystytään luokittelemaan paremmin. Luokittelun avulla voidaan osin välttää hidasta tautia sairastavien potilaiden tarpeetonta hoitoa, joka voi vaikuttaa ennemmin negatiivisesti potilaan tilaan kuin auttaa syövän hoidossa [13]. Oikeilla hoitovalinnoilla ja pystytään vähentämään tarpeettomista syövän hoidoista aiheutuvia haittavaikutuksia potilaalle, kuten eturauhasta ympäröivien elimien vahingoittaminen syöpähoidon seurauksena [13]. Toisaalta vähentämällä tarpeettomia hoitoja terveydenhoidon resursseja pystyttäisiin kohdentamaan siten, että aggressiivisempaa syöpää sairastavat potilaat saisivat tarvittavaa hoitoa [13].

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työn tarkoituksena on tutkia eturauhassyövän geneettisten alityyppien eroja RNA-tasolla ja tutkia alityyppejä vastaavien kasvainnäytteiden Gleasonin summia. Työssä käytetään data-aineistoa artikkelista ”The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer”. Data-aineistossa on esitetty 333 potilaan kasvainnäytteet eri eturauhassyövän alityypeistä ja koottu kasvaimista löydetty alityyppien mutatoituneet geenit, joita tutkimalla voidaan verrata alityyppejä RNA-tasolla geneettisellä tasolla [1]. Datatiedostosta työn kannalta olennaisimmat tiedot ovat kunkin potilaan alityyppi ja alityyppiin vaikuttavat geenit sekä alityyppiä vastaava Gleasonin summa.

Tutkimusmenetelmien osalta työ voidaan jakaa kahteen osaan. Ensimmäisessä osassa määritetään tilastollisella testauksella kasvainnäytteiden geneistä alityyppien ekspressoituneimmat geenit. Toisessa osassa erotellaan eturauhassyövän geneettisiä alityyppejä erottelevat geenit ja ajetaan geeneille pathway-analyysi.

3.1 Ekspressoituneimmat geenit tilastollisella testauksella

Ekspressoituneimpien geenien määrittämien tehdään tilastollisella testauksella käyttäen R-pohjaista Rstudiota. Tutkittava datatiedosto ladataan *National Cancer Institutien* datatietokannasta The Cancer Genome Atlas (TCGA). Tietokannasta ladataan eturauhassyöpää koskeva datatiedosto TCGA-PRAD Rstudioon tilastollista testausta varten. Rstudiolla tehdyssä ohjelmassa ladataan R:n kautta tarvittavat aliohjelmat ja funktiot, joita käytetään geneettisen datan muokkaamiseen ja analysointiin. Bioconductor on avoin bioinformatiikan ohjelmisto, jonka avulla pystytään lataamaan ja käsittelemään R-pohjaista dataa erilaisten funktioiden ja aliohjelmien avulla. R:n ohjelmistokirjastosta haetaan TCGAbiolinks -datakirjasto, jonka avulla saadaan ladattua tarvittavat Bioconductorin komeennot. TCGAbiolinks -datakirjaston lisäksi ohjelmaan ladataan aliohjelmiä. Tilastolliseen testaukseen käytetty R-pohjainen ohjelma on esitetty liitteessä A. Datatiedosto ladataan R-tiedostona verkosta, minkä jälkeen tiedosto tallennetaan Rstudioon muuttujaksi *tcga_data*. Datatiedostosta valitaan eturauhassyöpää koskeva datatiedosto ”TCGA-PRAD”.

Tilastollisessa testauksessa tarkoituksena on määrittellä eturauhassyöpää koskevasta geenidatasta alityyppien ekspressoituneimmat geenit tilastollisella testauksella. Geenien eli ekspressoituneen RNA-datan normalisointi suoritetaan käyttämällä *limma*-funktioita [15]. Ohjelmaan luodaan funktio *limma_pipeline*, jonka avulla määritetään t-testin

perusteella geneettisestä datasta 200 ekspressoituneinta geeniä eturauhassyövän kasvainnäytteistä. Limma-funktiolla määritetään datan geeneille p-arvot, joiden perusteella ohjelma erottaa pienimpiä p-arvoja vastaavat geenit [15]. Vertailuryhmänä käytetään Solid Tissue Normal -ryhmää eli näytteitä, jotka vastaavat lähes normaalia rauhasrakennetta. Ohjelman määrittämistä geeneistä saadaan luotua taulukko, jossa nähdään geeni ja geeniä vastaava p-arvo. Ohjelman avulla selvitettiin siis näytejoukosta 200 ekspressoituneinta geeniä ja luotiin niistä taulukko. Ohjelma on esitetty liitteessä A.

3.2 Alityyppejä erottelevat geenit

Jotta saadaan koottua eturauhassyövän geneettisiä alityyppejä erottavia geenejä, ladataan työn pohjalla olevasta tutkimusartikkelista "The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer" datatiedosto exceliin, jossa on esitetty tutkittujen eturauhassyöpöpotilaiden kasvainnäytteet, kunkin potilaan edustama alityyppi sekä Gleasonin summa ja lisäksi kasvainnäytteessä olevat mutatoituneet geenit. Datatiedostosta hyödynnetään taulukkoa "Table S1B. Mutations", jossa on esitetty kasvaimessa havaitut geenit. Työn kannalta keskeistä tietoa ovat paitsi sarakkeen Hugo_Symbol geenit, myös Tumor_sample_barcode -sarake, jossa on esitetty kasvainnäytteiden nimet.

Tutkimusartikkelista ladatusta datasta excelissä saatiin R-studiossa ohjelman perusteella erotettua limma-funktiolla saadut 200 ekspressoituneinta geeniä. Exceliin ladatun datatiedoston perusteella luodaan taulukko, johon kootaan kasvainnäytteet ja niistä löydetyt geenit ja erotetaan limma-funktion avulla saadut geenit. Primary Solid Tumor -näytteistä ekspressoituneista geeneistä löydettiin 88. Geenit jaettiin alityyppien perusteella ryhmiin, jotta voidaan tarkastella syövän geneettisten alityyppejä erottavia geenejä ekspressoituneimpien geenien joukossa.

Tutkimusdatasta tallennetaan geenien nimet "Hugo_Symbol" -sarakeessa sekä kasvainnäytteiden nimet sarakeessa "Tumor_Sample_Barcode". Taulukkoon luodaan vielä sarake Subtype, johon merkitään kunkin kasvainnäytteen edustama alityyppi, johon geeni kuuluu. Rstudiossa limma-funktion perusteella saaduista 200 ekspressoituneimmasta geeneistä exceliin ladatussa tutkimusdatasta on 88, ja tietojen perusteella luodaan taulukko, jossa on esitetty kasvaimen nimi, alityyppi ja kasvaimessa olevat, ekspressoituneimpien geenien joukossa olevat geenit. Excelissä taulukoituna on limman perusteella p-arvon mukaan ekspressoituneimmat geenit ja toisessa taulukossa geenit ja niitä vastaavat alityypit.

Taulukosta erotellaan ETS-positiiviset eturauhassyövän alityypit eli ERG, ETV1, ETV4 sekä FLI1 ja erotellaan alityyppejä erottavat geenit. Alityyppejä erottelevat geenit kootaan taulukoksi. Sama toistetaan ETS-negatiivisille alityypeille SPOP, FOXA1, IDH1 sekä ryhmään Other kootuille harvinaisemmille eturauhassyövän alityypeille.

3.3 Geenien pathway-analyysi

Edellisessä vaiheessa tilastollisella testauksella saaduista ekspressoituneimmista geeneistä eroteltiin ETS-positiivisia ja -negatiivisia alityyppejä erottavat geenit. Geenit kootaan taulukkoon, jotta alityyppejä erottaville geeneille voidaan tehdä pathway-analyysi. Eri alityyppejä erottavista geeneistä saadaan tehtyä listat, jotka saadaan syötettyä pathway-analyysin ajavaan ohjelmaan. Pathway-analyysi tehdään käyttämällä DAVID-tietokantaa, joka on saatavilla verkossa. DAVID-datakantaan syötetään käytettävä geenilista, ja listan perusteella DAVID antaa listan geenejä vastaavia kaavioita, joista valitaan työn kannalta merkittävien eli "KEGG_PATHWAY", jossa geenijoukko on määritetty pathway-analyysit. Pathway-analyyseistä valitaan työn kannalta merkittävimmät eli pathway, jotka liittyvät eturauhassyövässä esiintyviin geneetteihin vuorovaikutuksiin. Pathwayn perusteella voidaan tutkia alityyppejä erottavien geenien vaikutusta eturauhassyöpään. Lisäksi voidaan tutkia, miten pathwayssa geenimutaatiot vaikuttavat geenien välisiin vuorovaikutuksiin aiheuttaen solusignaaloinnin häiriintymistä ja solujen jakautumisen, erilaistumisen tai liikkumiseen muutoksia, jotka aiheuttavat eturauhassyövän puhkeamisen.

3.4 Gleasonin summa alityypeille

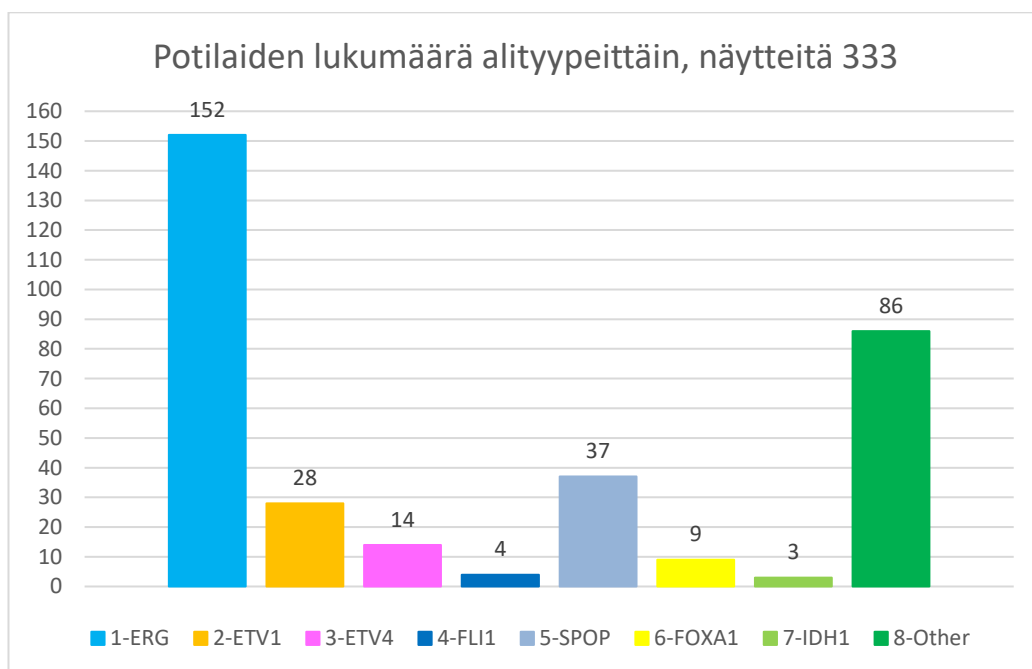
Tutkittavasta datasta saadaan exceliin ladattua taulukko "Table S1A Annotation", josta saadaan alityyppejä vastaavat Gleasonin pisteytykset ja summat sarakkeista "Gleason score" ja "Gleason group". Taulukossa Gleasonin summat on luokiteltu ryhmiin 1 – 5 luvussa 2. esitetyn Taulukko 1 mukaan. Näytteiden eturauhassyövän alityyppien ja vastaavien Gleasonin summien perusteella tehdään taulukko, jossa on esitetty syövän geneettiset alityypit ja alityyppejä vastaavat Gleasonin summat.

4. TULOKSET

Eturauhassyövän alityyppejä vastaavista geeneistä poimittiin ekspressoituneimmat geenit. Limma-funktiolla on määritetty 200 TCGA-datasta määritettyä ekspressoituneinta geeniä. Rstudioon ladatussa datassa ”Primary Solid Tumor” -näytteiden eli varsinaisten kasvainnäytteiden lisäksi limma-funktio määrittää ekspressoituneiden geenien p-arvot ”Metastatic”. Limma-funktiolla määritetään p-arvot, joiden perusteella erotetaan ekspressoituneimmat geenit. Tuloksia analysoidaan tässä luvussa.

4.1 Eturauhassyövän geneettiset alityypit

Työssä tutkitussa datassa eturauhassyövän kasvainnäytteitä oli yhteensä 333. Kuva 5 on esitetty eturauhassyöpäpotilaiden määrät alityyppien perusteella. Alityyppejä on 7. Kahdeksanteen ryhmään on koottu eturauhassyövän harvinaisemmat alityypit.



Kuva 5. Eturauhassyövän alityyppejä edustavat potilaat [1].

Kuva 5 perusteella alityyppi ERG on listatuista alityypeistä yleisin. Vähiten näytteitä kuului alityyppeihin FLI1 (4 näytettä) ja IDH1 (3 näytettä), jotka ovat harvinaisempia eturauhassyöväällä esiintyviä geneettisiä alityyppejä. Luokkaan 8, muut, kuuluu luokittelemattomia alityyppejä ja ryhmään on sijoitettu kasvainnäytteet, jotka eivät kuuluneet muihin, mainittuihin alityyppeihin. Kaavion perusteella näytteistä ETS alityypeistä on ERG:tä 152:lla potilaalla, ETV1 28 potilaalla ja ETV4 14 potilaalla. ETS

negatiivista alityyppiä SPOP on 37 potilaalla, FOXA1 havaitaan yhdeksällä potilaalla ja alityyppiä IDH1 kolmella potilaalla. Kahdeksanteen ryhmään "Other" kuuluvat erittelemättömät, eturauhassyövän harvinaisemmat alityypit, jotka on koottu yhteen viimeiseksi, ETS-negatiivisten alityyppien ryhmäksi.

4.2 Alityyppien erot RNA-tasolla

Erottelevat geenit on määritelty limma-funktion avulla saadusta geenilistasta, jossa on määritetty p-arvot ja taulukoitu ekspressoituneimmat geenit, joiden joukosta excelissä on eliminoitu tutkimusartikkeliin liittyvästä datasta geenit, joita ei ole limma-funktion taulukossa. Lopputuloksena siis lista 88 geeistä, jotka kuuluvat Rstudiolla määriteltyjen 200 ekspressoituneimman geenin joukkoon. Alityyppejä erottelevat geenit jaotellaan niin, että ETS-positiivisten alityyppien genejä on vertailtu keskenään, ja sama on tositetaan ETS-negatiivisille alityypeille. Alla olevassa Taulukko 2 on esitetty ETS-positiivisia, eli alityyppejä ERG, ETV1, ETV4 ja FLI1erottelevat geenit. Alityyppejä erottelevia genejä on yhteensä 56.

Taulukko 2. *ETS-positiivisia alityyppejä erottelevat geenit.*

	Eturauhassyövän alityyppi			
	ERG	ETV1	ETV4	FLI1
Alityyppejä erottavat geenit	ACOX2	ABHD6	ANGPT1	ITGB6
	ACTC1	CCDC8	B3GNT9	
	ALDH1A2	MCC	DAAM2	
	ANKMY2	MICALL1		
	ASB2	PDGFD		
	ASPH	TRGC1		
	ATP1A2	WIF1		
	CACHD1			
	CAV2			
	CHST2			
	COL17A1			
	CRTAC1			
	DUOX1			
	FERMT2			
	G0S2			
	GJB5			
	GSTM3			
	HPN			
	ITGA2			
	JPH4			
	KCNMA1			
	KITLG			
	KLHL14			
	LDB3			
	LPAR1			
	MAMDC2			

MECOM
MEIS2
PADI3
PLEKHA2
PRKCB
PTGS1
RCBTB2
SEC23A
SERPINB5
SH3PXD2B
SLMAP
SNAPC1
ST5
TCF7L1
TGFBR3
TRPM4
UNC5B
WWC3
ZNF516

Taulukosta nähdään, että ERG-alityypillä erottelevia geenejä on eniten, yhteensä 45. ETV1 alityyppiä erottelevia geenejä on listattu yhteensä 7, ETV4 alityyppiä erottelevia geenejä 3 ja FLI1-alityyppiä erottelevia geenejä 1. Ekspressoituneimpien geenien joukossa ERG-alityyppiä erottelevia geenejä on eniten ja FLI1-alityypin geenejä vähiten. Tutkimusartikkelin mukaan ERG-alityyppi on alityypeistä yleisin, joten on myös todennäköisempää, että variaatioita syövän mutaatioille on enemmän kuin harvinaisemmilla ETS-positiivisilla alityypeillä ETV4 ja FLI1 [1].

Kuten ETS-positiivisilla alityypeillä, limma-funktion perusteella saaduista ekspressoituneimmista geeneistä vertaillaan ETS-negatiivisia alityyppejä, SPOP, FOXA1, IDH1 ja ryhmää muut. Alityyppejä erottavat geenit on esitetty Taulukko 3.

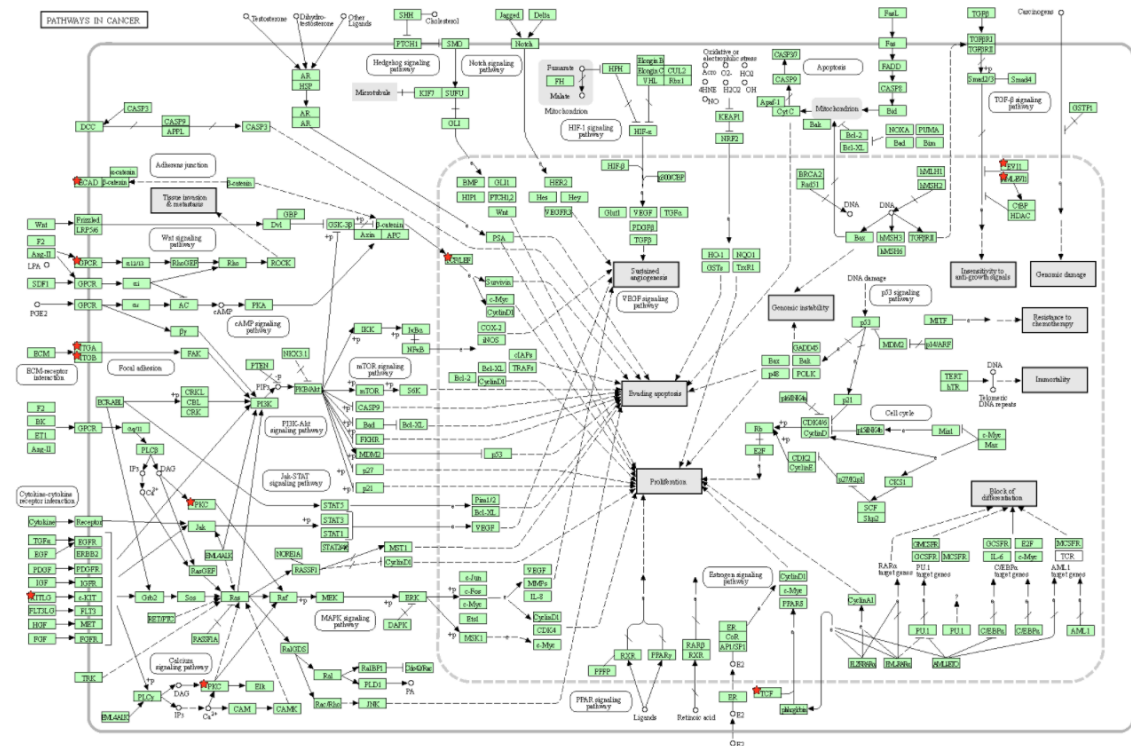
Taulukko 3. ETS-negatiivisia alityyppejä erottelevat geenit.

	Eturauhassyövän alityyppi			
	SPOP	FOXA1	IDH1	Muut
Alityyppejä erottelevat geenit	DNAJB4	GNAO1		AOX1
	GNAZ			CA14
	GPR87			CFL2
	HOXC4			DAAM2
	ITGA2			FOXQ1
	KCNAB1			ITGB6
	KCTD14			KRT23
	LGR6			MECOM
	SNAPC1			MED21
	SRD5A2			MEIS2
	ST6GALNAC4			NT5E
	STAC			PAQR8
	TGFBR3			PRICKLE2
	TRGC1			PYCR1
	TRPM4			SLC2A9
	UNC5B			ZNF516
	WIF1			

Taulukko 3 ETS-negatiivisista alityypeistä alityypillä SPOP on eniten ja muut ryhmällä toiseksi eniten erottelevia geenejä ekspressoituneimpien geenien joukossa, IDH1-alityypillä tarpeeksi ekspressoituneita geenejä ei ole lainkaan ja FOXA1-alityypillä geenejä on 1. SPOP-alityypillä geenejä on 17 ja muut -ryhmällä 16 geeniä. Verrattaessa alityyppejä ekspressoituneimpien geenien perusteella, alityypillä SPOP geenejä on eniten, minkä perusteella alityypin syöpä varioi FOXA1- ja IDH1-alityyppejä enemmän. Tämä tarkoittaa sitä, että ETS-negatiivisista alityypeistä SPOP on todennäköisempi kuin FOXA1 tai IDH1 alityyppi, jossa ekspressoituneimpien geenien joukossa alityyppejä erottavia geenejä on vähemmän. Seuraavassa luvussa on esitetty pathway-analyysi alityyppejä erottaville geenijoukoille.

4.3 Alityyppejä erottelevien geenien pathway-analyysi

ETS-positiivisia ja ETS-negatiivisia alityyppejä erottaville geneille ajetaan pathway-analyysi niin, että ETS-positiivisten alityyppien ekspressoituneimpia geenejä verrataan keskenään ja ajetaan pathway-analyysi. Sama tehdään ETS-negatiivisille alityypeille. Alapuolella, Kuva 6 on esitetty ETS-positiivisia alityyppejä erottelevista geeneistä tehty syövän pathway-analyysi, joka on tehty DAVID-työkalulla.



Kuva 6. Syövän pathway-analyysi.

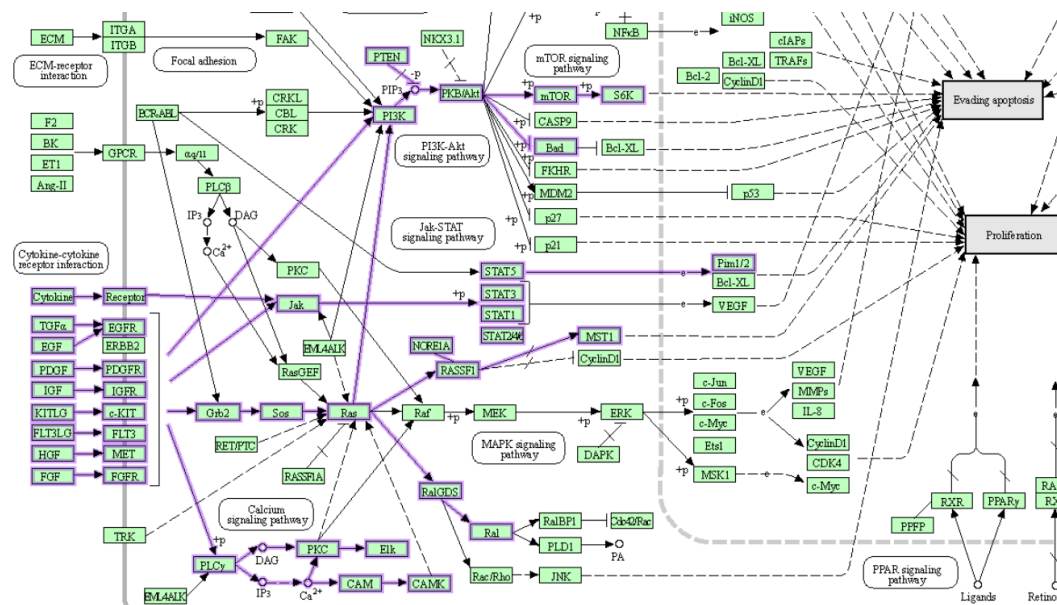
Kuva 6. pathway-analyysissä on punaisella tähdellä merkitty ohjelmaan syötetyn listan geenit, jotka kuuluvat yllä esitettyyn pathwayhin. Kuvassa merkityt geenit esiintyvät alityyppejä erottavien, ekspressoituneimpien joukossa alityyppejä ERG erottelevina geneinä. Kuvaan merkityt geenit ovat KITLG; EVI1 ja AMLEVI1, joihin kuuluu geeni MECOM; ITGA ja ITGB, joihin kuuluu geeni ITGA; GPCR, johon kuuluu LPAR1; PKC, johon kuuluu geeni PRKCB, sekä TCF/LEF, johon kuuluu geeni TCF7L1.

Kuva 6 vasemmassa yläreunassa on tähdellä merkittynä geeni GPCR, johon kuuluu geeni LPAR1. Geeni ajaa seuraavia genejä, mikä tarkoittaa, että LPAR1:n ilmetessä liikaa se aiheuttaa myös seuraavien geenien ilmenemisessä muutoksia. LPAR1-mutaation seurauksena geenin pohjalta valmistettu proteiini aiheuttaa muutoksia pathwayssa LPAR1-geeniä seuraavien geenien ilmenemisessä, minkä seurauksena ROCK-geenin ilmeneminen muuttuu. Kuva 6nähdään, että ROCK-geeni vaikuttaa syöpäsolujen tunkeutumiseen kudokseen ja etäpesäkkeen muodustumiseen.

Kuva 6. oikeassa yläreunassa ovat geenit EVI1 ja AMLEVI1, joihin kuuluvat geeni MECOM vaikuttavat Smad2/3-geenin toimintaan. SMAd2/3-geeni vaikuttaa kasvua hidastavien signaalien intensiteettiin. Kun MECOM:ssa tapahtuu mutaatio ja geeniä vastaavaa proteiinia ilmenee liikaa, SMAd2/3-geenin toiminta voi häiriintyä niin, että geenin ilmeneminen vähenee. Tämän seurauksena solujen kasvua hidastavan faktorin toiminta saattaa estyä niin, että solujen kasvua ei enää hillitä tarpeeksi ja solut alkavat jakautua hallitsemattomasti.

Kuva 6 vasemmassa alareunassa on merkittynä TCF sekä ylempänä TCF/LEF, johon kuuluu geeni TCF7L1. TCF7L1 vaikuttaa PPRAD-, cMyc- ja CyclinD1 -geenien toimintaan aktivoivasti eli se lisää geenien ilmenemistä. Geenit vaikuttavat solujen lisääntymiseen tällä reitillä. Lisäksi TCF/LEF-kohdassa, TCF7L1-geeni ajaa Survivin-geeniä, joka vaikuttaa apoptoosiin estävästi. Tämän lisäksi TCF7L1 vaikuttaa cMyc- ja CyclinD1 -geenien toimintaan ja siten solujen lisääntymiseen. Apoptoosiin eli ohjattuun solukuolemaan johtavat muutokset voivat aiheuttaa toiminnon häiriintymisen, mikä voi estää ohjatun solukuoleman. Toisaalta, jos geenin mutaatiot kiihdyttävät solujen lisääntymistä, soluja voi syntyä liikaa, eikä ylimääräisiä soluja päästä tuhoamaan, vaan ne syrjäyttävät osin erilaistuneita soluja.

ETS-positiivisille alityypeille tehdystä pathway-analysistä saadaan erotettua osa, jossa on esitettyä listassa olevia genejä. Alapuolella Kuva 7 on osa Kuva 6 pathwaysta sekä ERG-alityyppiä erottelevia genejä, jotka vaikuttavat apoptoosiin ja solun jakautumiseen.



Kuva 7. Tarkempi kuvaus syövän pathway-analysistä.

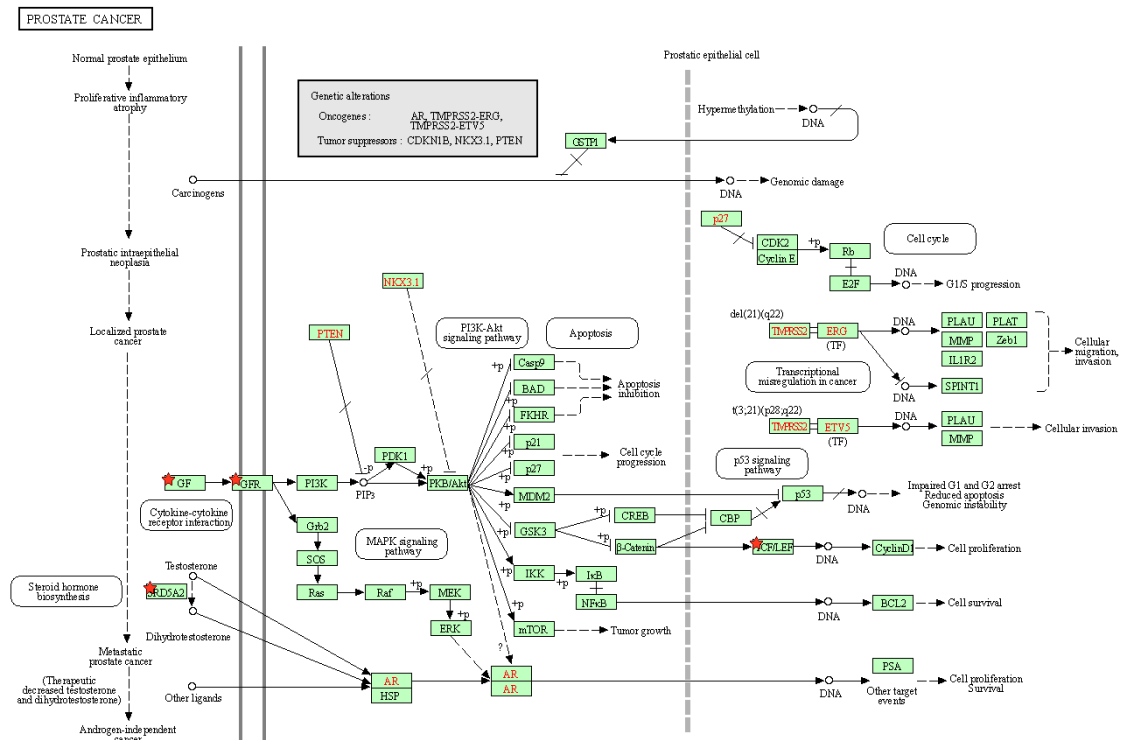
Kuva 7 on esitetty osa Kuva 6 pathwaysta, jossa osa pathwayn reitistä on merkitty violetilla. Kuva 7 vasemmalla yläreunassa olevat geenit ITGA ja ITGB ajavat FAK-geenin toimintaa, mutta reittiä ei ole merkittynä Kuva 7 värillä. Pathwayssa FAK-geeni ajaa seuraavia genejä ja vaikuttaa lopulta mTOR- ja MDM2 geenien toimintaan ja mahdollisesti toiminnan lisäämiseen. MTOR-geenin toiminta ajaa S6K-geenin ilmenemistä, ja MDM2 hillitsee p53-geenin toimintaa. Sekä p53- että S6K geeni vaikuttavat apoptoosiin eli ohjelmoidun solukuoleman mekanismiin, ja kiertävät sen. Tämä tarkoittaa, että geenien epätavallinen toiminta aiheuttaa häiriötä apoptoosissa, jopa estäen solujen ajautumisen apoptoosiin, jolloin poikkeuksellista tai vaurioitunutta solua ei tuhota eikä se kuole, vaikka pitäisi. Toisaalta PKB/Akt -geenin toiminnan muutos

voi hillitä p27- ja p21-geenien toimintaa, mikä johtaa muutoksia solujen kasvun hillitsemisessä (eng. *proliferation*) ja voivat jopa estää sen.

Kuva 7 vasemmalla on esitetty geeni KITLG, joka ajaa osana geenijoukkoa geenejä, kuten c-KIT. KITLG:n toiminnan lisääntyminen lisää GRb2-geenin ja sitä seuraavien geenien, kuten Ras-geenin toimintaa minkä seurauksena lopulta MST1-geenin toiminta lisääntyy, joka vaikuttaa solujen apoptoosin hallitsemiseen. Toisaalta Ras-geenin kautta Raf-geenin toiminta voi lisääntyä, minkä seurauksena lopulta ERK:n toiminta lisääntyy. Tämä aiheuttaa ajavan vaikutuksen joukkoon geenejä, joiden toiminnan lisääntymisellä on vaikutuksia apoptoosin hallitsemiseen, mutta myös solujen lisääntymiseen. Jos solujen lisääntymistä tai ohjattua solujen kuolemista ei hallita vaan toiminnassa tapahtuu näitä ajavia muutoksia, solujen jakautuminen lisääntyy tai toisaalta vaurioituneita tai epätavallisesti erilaistuneita soluja ei saada tuhottua.

Kuva 7 esitettyyn PKC:hen kuuluu listan geeni PRKCB. Geeni ajaa Raf-geenin toimintaa joka, kuten yllä on mainittu, ajaa MEK- ja ERK-geenejä. Nämä puolestaan vaikuttavat edelleen geeneihin, jotka lopulta vaikuttavat solujen jakautumiseen ja apoptoosiin. PRKCB-geenin mutaation seurauksena on vaikutusta apoptoosiin ja solujen lisääntymiseen yllä mainitulla tavalla. ETS-positiivisia alityyppejä erottavien geenien perusteella tehdystä pathway-analyysistä huomataan, että geenien mutaatiot ja geenin liiallinen ilmentyminen vaikuttavat esimerkiksi solujen jakautumiseen tai toisaalta hallittuun solukuolemaan apoptoosiin. Toiminnot rajoittavat osaltaan solujen määrää, ja toisaalta erilaistumattomat tai poikkeavat solut eliminoidaan. Syövän kannalta solujen liiallinen jakautuminen tai erilaistumattomien tai poikkeavien solujen tuhoamisen estyminen voi aiheuttaa kasvaimen muodostumisen. Riippuen geenistä ja geenimutaatiosta, syöpä voi muodostua aggressiiviseksi ja levitä nopeasti tai olla hitaasti etenevä ja lähes oireeton.

Kun DAVID-työkaluun syötetään ETS-negatiivisia alityyppejä erottelevia, ekspressoitunempia geenejä, listalla ei ole geenejä tarpeeksi, jotta DAVID-työkalulla saataisiin tehtyä pathway-analyysi. Seurauksena pathway-analyysiin on ETS-negatiivisten alityyppien geenien lisäksi syötetty ETS-positiivisia alityyppejä erottavat geenit. Alapuolella Kuva 8 on esitetty taulukon 2 ja taulukon 3 alityyppejä erottelevien geenien listasta pathway-analyysi eturauhassyövälle.



Kuva 8. Eturauhassyövän pathway-analyysi.

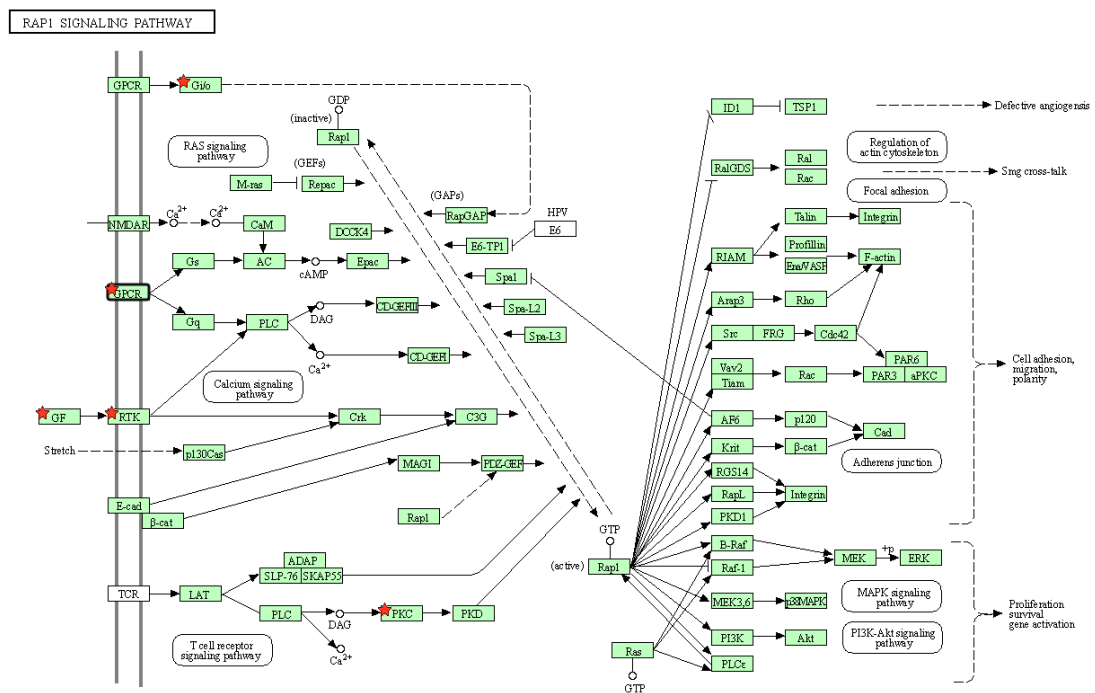
Kuva 8 eturauhassyövän pathway-analyysissä DAVID-työkaluun syötetyt geenit on merkitty punaisella tähdellä. Kuvassa geneihin GF ja GFR kuuluu alityyppiä ETV1 erottava geeni PDGFD sekä kuvassa TCF/LEF, johon kuuluu ERG-alityyppiä erottava geeni TCF7L1. Geeneistä SRD5A2 erottaa ETS-negatiivista alityyppiä SPOP. Pathway-analyysissä geeni TCF7L1 vaikuttaa DNA:han, mikä lisää CyclinD1 -proteiinin tuotantoa, joka kiihdyttää solujen lisääntymistä. Solujen lisääntymisen kiihtymisen seurauksena solujen määrä voi kasvaa, jos ylimääräisiä soluja ei pystytä tuhoamaan, ja lisääntyneet, ylimääräiset solut voivat muodostaa solurypäitä eli kasvaimia.

PDGFD-geeni, kuvassa GF ja GFR, puolestaan vaikuttaa MAPK -signalointipathwayhin sekä PI3K -proteiinin tuotantoon. MAPK-signalointireitin kautta geeni vaikuttaa AR-geenin toimintaan ja lisätä prostataspesifisen antigeenin (*lyh. PSA*) tuotantoa. Toiminto vaikuttaa puolestaan solujen lisääntymiseen ja niiden selvitymiseen. PSA-proteiinin tuotannon lisääntyminen vähentää apoptoosia, jolloin solujen määrä kudoksessa kasvaa [17]. Eturauhassyövän kohdalla tämä voi tarkoittaa sitä, että rauhasen ympärille kehittyvät ylimääräisten solujen seurauksena kasvain, joka voi olla hyvälaatuinen ja kasvaa niin hitaasti, ettei se aiheuta tarvetta syövän hoidolle.

Kolmas pathway-analyysissä esiintyvistä listan geeneistä on ETS-negatiivista alityypeistä alityyppiä SPOP erottava geeni SRD5A2, joka on esitetty Kuva 8 pathway-analyysissä SRD5A2:na. Geeni vaikuttaa AS-reseptorin tuotantoon ja lisää reseptorin tuotantoa. Toiminto vaikuttaa lopulta antigeenin PSA-tuotantoon, mistä seuraa

apoptoosin väheneminen ja solujen selvyminen, mikä yllä mainitun tavoin vaikuttaa solujen määrän lisääntymiseen [17]. Ylimääräiset, kudoksiin tai rakenteisiin kuulumattomat solut voivat alkaa muodostaa eturauhasen rakenteisiin kuulumattomia rypäitä. Kuten yllä mainitaan, solujen liiallisen määrän seurauksena voi alkaa muodostua kasvain eturauhasen läheisyyteen. Jos solut kuitenkin ovat kuitenkin hyvin erilaistuneita ja vastaavat eturauhasen ja sitä ympäröiviä solurakenteita, kasvain eturauhasen läheisyydessä ei välttämättä aiheuta rauhaselle tai sen ympäröiville elimille toiminallista haittaa. Toisaalta, mikäli kasvain kasvaa hyvin hitaasti, eikä se ole toiminnaltaan aggressiivinen, potilas ei välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa.

Taulukoissa Taulukko 2 ja Taulukko 3 oleville alityyppejä erottaville geeneille saadaan DAVID-työkalulla toinen pathway-analyysi, "RAP1 signaling pathway", jossa esiintyy ETS-positiivista alityyppiä FOXA1 erottava geeni GNAO1, sekä ETS-positiivisia alityyppejä ERG erottavat geenit KITLG, LPAR1 ja PRKCB, alityyppiä ETV1 erottava geeni PDGFD sekä alityyppiä ETV4 erottava geeni ANGPT1. RAP1 signaling pathway vaikuttaa solujen lisääntymiseen ja edistää syövän metastaasia, jos SIPA1-geeni ajaa toimintoa muulla kuin solujen lisääntymisellä [20]. Pathway-analyysi on esitetty Kuva 9.



Kuva 9. RAP1 pathway-analyysi.

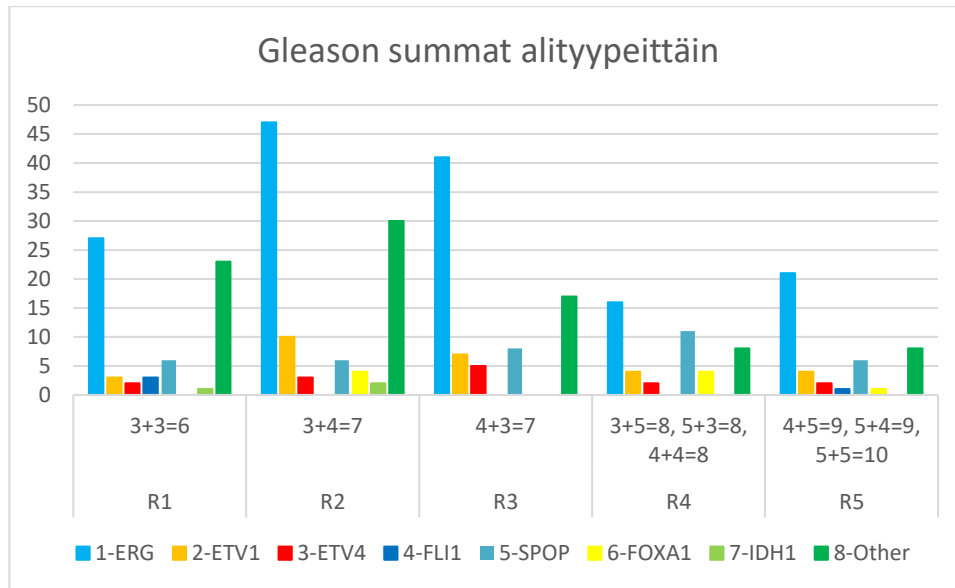
Pathway-analysissa kuvassa 9 listassa olevat geenit on merkittynä punaisilla tähdillä. Kuvassa proteiiniin Gi/o kuuluu geeni GNAO1, proteiiniin GPCR geeni LPAR1, proteiiniin GF kuuluvat geenit ANGPT1 ja KITLG sekä proteiiniin RTK geeni PDGFD.

FOXA1-alityyppiä erotteleva geeni GNAO1 vaikuttaa proteiiniin Gi/o RAS signaling pathwayssa. Geenin liiallinen ilmeneminen vaikuttaa lopulta Rap1-proteiinin toimintaan. Kuvassa 9 on esitetty Ras signaling pathway, joka vaikuttaa solujen lisääntymiseen ja erilaistumiseen, sekä geeniekspressioon ja solujen selviytymiseen. Mutaatiot pathwayhin vaikuttavissa geeneissä voivat aiheuttaa muutoksia solujen erilaistumisessa niin, ettei solu erilaistu enää oletetulla tavalla. Toiminnalliset muutokset solujen lisääntymisessä ja selviytymisessä vaikuttavat siihen, että soluja voi syntyä liian paljon. Muutokset apoptoosin säätelyssä voivat aiheuttaa sen, että solut, joiden pitäisi tuhoutua apoptoosissa, jäävät eloon ja siten jatkavat jakautumista. Eturauhassyövän näkökulmasta GNAO1-geenin vaikutus pathwayssa olevien proteiinien tuotantoon aiheuttaa muutoksia esimerkiksi solujen erilaistumiseen, minkä seurauksena erilaistumattomat solut voivat muodostaa syöpäkasvaimen.

Alityyppiä ERG erottavien geenien mutaatiot KITLG-geenissä, sekä alityyppiä ETV4 erottavassa geenissä ANGPT1, vaikuttavat proteiiniin GF. Tämän lisäksi alityyppiä erottavassa geenissä PDGFD tapahtuva mutaatio vaikuttaa proteiiniin RTK, aiheuttavat muutoksia Calcium signaling pathwayssa, Kuva 9. Pathwayhin vaikuttaa myös GPCR proteiiniin vaikuttava geeni LPAR1, joka erottaa ERG-alityyppiä. Pathway vaikuttaa solujen lisääntymiseen ja selviytymiseen sekä geenien aktivaatioon. Proteiinin GF tai RTK liiallinen ilmeneminen eturauhassyövän alityypin seurauksena aiheuttaa solujen määrän lisääntymisen ja toisaalta hillitsee apoptoosia, kuten yllä on kuvattu.

4.4 Gleasonin luokittelu eturauhassyövän alityypeille

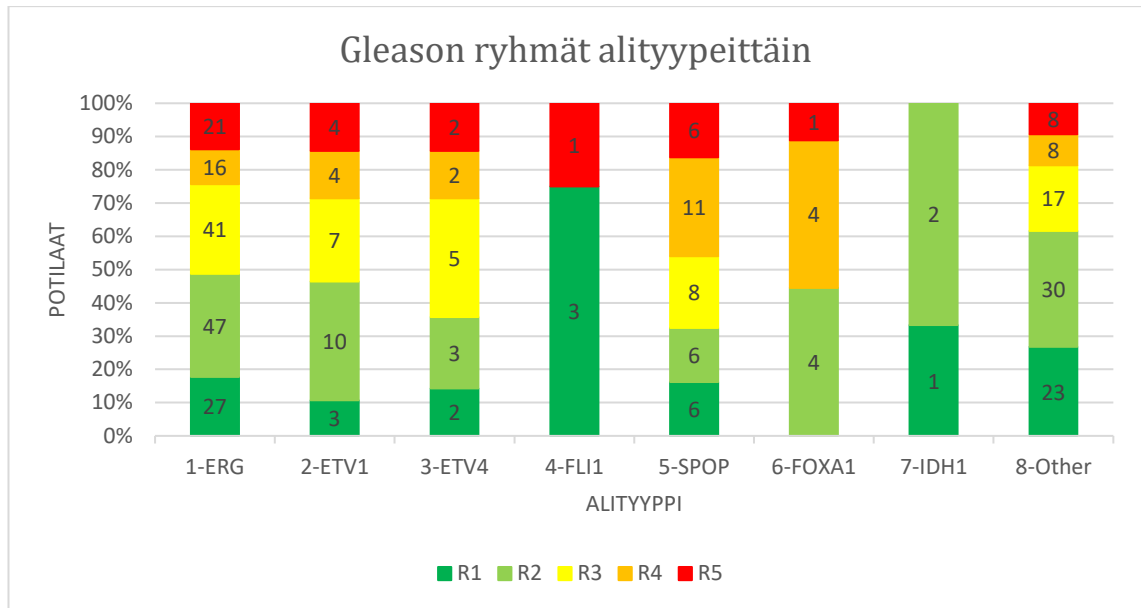
Gleasonin summa kasvaimelle määritetään siis kasvaimen erilaistuneimman ja toisaalta kasvainta ympäröivien solujen erilaistumisen mukaan. Kuten luvussa 2. mainitaan, Gleasonin summa määräytyy kahden luvun summasta, joista ensimmäinen kertoo yleisimmän kasvutavan erilaistumisasteen asteikolla 3-5 ja jälkimmäinen kertoo huonoimmin erilaistuneen biopsian tai toiseksi yleisimmän kasvutavan erilaistumisen perusteella Gleasonin luokan. Näiden kahden luvun summa muodostaa siis Gleasonin summan, minkä perusteella kasvaimet jaetaan Gleasonin luokkiin.



Kuva 10. Gleasonin summat alityypeittäin [1].

Kuva 10 on esitetty alityypit ja alityyppiä vastaavien näytteiden Gleasonin summat. Kuten Kuva 10 kaavion perusteella havaitaan, alityypeistä ERG on yleisin ja IDH4 harvinaisin. Kaaviossa Gleasonin summien perusteella potilailla, joilla havaitaan eturauhassyövän alityyppiä ERG, alityyppiä on jokaisessa ryhmässä: R1:stä R5:seen eli alityypin syövän aggressiivisuus ja vakavuus on vaihtelevaa. Alityypin syöpä voi olla hyvälaatuinen, eikä tarvitse juurikaan tai lainkaan hoitoa. Toisaalta ERG-alityypin eturauhassyöpä voi olla korkean riskin eturauhassyöpä, Gleasonin summaltaan 4+5=9 eli pahanlaatuinen ja hyvin aggressiivinen syöpä. Kuten ERG-alityyppiä, myös alityypeillä ETV4 ja SPOP potilaiden näytteissä havaitaan Gleasonin summia jokaisessa ryhmässä. Lisäksi alityyppiryhmään "Other" kuuluvista alityypeistä havaitaan Gleasonin summia ryhmistä 1-5, mutta tässä työssä ryhmä jätetään käsittelemättä sillä ryhmän alityyppejä ei ole eroteltu.

Alla Kuva 11 on esitetty tulokset prosentuaalisina osuuksina. Jokaisen alityypin potilaiden Gleason-ryhmät on esitetty kuvassa väreittäin. Ryhmiä vastaavat Gleasonin summat on esitetty luvun 2. Taulukko 1.



Kuva 11. Gleasonin ryhmien osuudet alityypeittäin [1].

Kuten Kuva 11 nähdään, prosentuaalisesti eniten aggressiivisinta syöpää eli Gleasonin summaa ryhmällä 5 on ETS-positiivisista alityypeistä alityypillä FLI1 ja vähiten ERG. ETS-negatiivisista alityypeistä ryhmän 5, Gleasonin summa on alityypillä SPOP ja harvinaisin alityypillä IDH1, jossa ryhmän 5 Gleasonin summan kasvaimia ei ole lainkaan.

ETS-positiivisille alityypille yleisimmät Gleasonin summat ovat $3+4 = 7$ ja $4+3 = 7$ eli Gleasonin summat ryhmissä R2, johon kuuluu 47 potilasta, ja R3, johon kuuluu 41 potilasta. Alityypille harvinaisimmat Gleasonin summat ovat ryhmään R4, joissa potilaita on yhteensä 16 sekä ryhmään R5 kuuluvat potilaat, joita on 21. Aggressiivisempia eli ryhmiin R4 ja R5 kuuluvia, korkean Gleasonin summan eturauhassyöpiä on vähemmän. Ryhmään R4 kuuluvia, Gleasonin summaltaan $3+5 = 8$, $4+4 = 8$ tai $5+3 = 8$ ERG-alityypin eturauhassyöpiä on 16 potilaalla ja korkeimman luokan, eli ryhmän R5 Gleasonin summan $4+5 = 9$, $5+4 = 9$ tai $5+5 = 10$, syöpiä on 21 potilaalla.

Eturauhassyövän alityypeistä ERG on yleisin, ja Kuva 11 perusteella suurimmalla osalla alityyppeistä sairastavista potilaista eturauhassyöpää vastaava Gleasonin summa on 6 tai 7. Suurin osa alityypin eturauhassyövästä on matalan tai kohtalaisen riskin eturauhassyöpiä. Ryhmän 1 eturauhassyöpä on pääosin hyvin erilaistunut, mikä tarkoittaa, että tauti etenee hitaasti eikä siten tarvitse aktiivista hoitoa. Ryhmien 2 ja 3 eturauhassyövässä solut ovat kohtalaisen erilaistuneita, mutta voivat olla aggressiivisiakin, joten potilas voi tarvita hoitoa. Suurin osa alityypin syövästä kuuluu ryhmiin R2 ja R3, mikä tarkoittaa, että potilas ei välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa mutta syöpää tulisi tarkkailla, sillä syöpä voi levitä. Kuva 11 perusteella suurimmalla osalla ERG-alityyppeistä sairastavista potilaista syöpä on lievä tai keskivaikea eikä

välttämättä aiheuta potilaalle ongelmia. Potilas ei välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa, mutta syöpä voi kuitenkin levitä nopeastikin, mikäli Gleasonin summa on korkeampi, joten syöpää tulisi tarkkailla ja mikäli kasvaimen Gleasonin summa muuttuu, aloittaa syövän hoitaminen. Alityypin kohdalla on harvinaisempaa että syöpä on aggressiivinen etenkin, jos potilaalla on terveet elämäntavat, ei tupakointia tai muita päihteitä lainkaan.

Alityyppiä ETV1 sairastavalle potilaalla on kuvan 11 kuvaajan perusteella määrällisesti eniten aggressiivista eturauhassyöpää eli Gleason summaltaan 8-10 saavat kasvaimet. Yhteensä 8 potilaalla alityypin 28 potilaasta on aggressiivinen eturauhassyöpä. Suurin osa alityyppiä sairastavista potilaista saa lievän taudin, joka ei leviä aggressiivisesti eikä välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa. Aggressiivinen eturauhassyöpä on kuitenkin toiseksi yleisin, mikä tarkoittaa että aggressiivisen syövän kohdalla syövän toteamisvaiheessa syöpä on yleensä jo levinnyt. Alityyppiä sairastaville potilaille on kuitenkin todennäköisempää saada lievän tai keskikorkean riskin syöpä, (Kuva 11 ryhmiin R1 ja R2 kuuluvat potilaat), mikä tarkoittaa että syövän pathwayssa mutaatiot tai muutokset proteiinituotannossa ovat lieviä tai suurimmaksi osaksi korjattavissa niin, ettei syövästä tule aggressiivista ja nopeasti leviävää tai muualle potilaan elimistöön etäpesäkkeitä lähettävää tautia.

Alityyppiä ETV4 sairastavilla potilailla on Kuva 11 perusteella suurin todennäköisyys saada Gleasonin summaltaan ryhmään R3 kuuluva, keskikorkean riskin eturauhassyöpä, datan perusteella 5 potilasta alityypin 14:sta potilaasta. Toisaalta mahdollisuus saada matalan tai keskisuuren riskin, eli Gleasonin summaltaan ryhmiin R1, R2 tai R3 kuuluva syöpä, on todennäköisempi kuin aggressiivinen eturauhassyöpä. Tilastollisesti riskiä saada aggressiivinen alityypin eturauhassyöpä on vaikea arvioida, sillä datan perusteella alityyppiä sairastavia potilaita on vähän ja Kuva 11 perusteella alityyppi on potilasmäärältään suhteellisen harvainen. Kuitenkin, suurimmalla osalla potilaista, jotka sairastavat alityyppiä ETV4, Gleasonin summaltaan alityypin kasvaimet kuuluvat matalan tai keskisuuren riskin eturauhassyöpiin ja riski saada aggressiivinen, ryhmään R4 tai R5 kuuluva eturauhassyöpä on pienempi. Suurin osa potilaista ei siis välttämättä tarvitse aktiivista hoitoa tai syöpää voidaan hoitaa niin, ettei syöpä välittömästi uusiudu.

Alityypin FLI1 potilaista suurimmalla osalla syöpä kuuluu Gleasonin ryhmään R1, eli eturauhassyövällä on matala riski uusiutua ja tauti on rauhallinen. Kuva 11 on esitetty FLI1-alityyppiä sairastavien potilaiden Gleasonin summat. Kuvan perusteella alityypin potilaiden syövätkä kuuluvat Gleasonin luokkiin R1 ja R5, joista suurin osa kuuluu matalan riskin luokkaan R1. Kuvan perusteella alityypin eturauhassyöpä on rauhallinen, hitaasti etenevä tai hyvin aggressiivinen ja nopeasti leviävä tauti. Tutkittavassa datassa

alityypillä ei ole havaittu Gleasonin summan keskimmäisiä ryhmiä eli kasvainten ominaisuuksia, jotka vastaisivat Gleasonin luokituksen perusteella ryhmiä R2, R3 tai R4. Suurin osa potilaista, eli ryhmään R1 kuuluvista potilaista ei tarvitsisi aktiivista hoitoa. Kuitenkin ETS-positiivisista alityypeistä potilaalla, jolla on alityypin FLI1 syöpä, on suurin riski saada aggressiivinen eturauhassyöpä. FLI1 on kuitenkin ETS-positiivista alityypeistä harvinaisin, joten mahdollisuus saada ryhmän R5, korkean Gleasonin summan eturauhassyöpä on pieni, 1 potilas 198 potilaasta. Yleensä aggressiivinen syöpä havaitaan, kun se on jo levinnyt. Jos saadaan selville potilaan sairastaman syövän alityyppi, voidaan arvioida mahdollisuutta, että syöpä kehittyy aggressiivisena, sillä osa mutaatioista tai muutoksista proteiinituotannossa, joka lopulta laukaisee syövän voidaan korjata tai ne ovat niin lieviä, että tauti on rauhallinen ja leviää hitaasti. Toisaalta jos muutokset ovat laajoja tai niitä ei pystytä korjaamaan, syöpä voi kehittyä aggressiiviseksi.

Eturauhassyövän ETS-negatiivisista alityypeistä SPOP on yksittäisenä alityyppinä yleisin. Kuva 11 kuvaajan perusteella suurin osa alityypin kasvaimista luokitellaan Gleasonin summan perusteella ryhmään R4, toiseksi eniten ryhmään R3. Eturauhassyövisistä suurin osa kuuluu siis suhteellisen korkean tai korkean riskin eturauhassyöpiin, ja suurin osa syöivistä kuuluu Gleasonin summan perusteella aggressiivisen eturauhassyövän ryhmään R4 ja R5. Tulosten perusteella, SPOP-alityyppiä sairastavalle potilaalle syöpä on todennäköisesti aggressiivinen, huonosti erilaistunut ja voi levitä nopeasti. Kun SPOP todetaan, ja jos kasvaimen perusteella määritettävä Gleasonin summa ylittää arvon 7, on mahdollista että aggressiivinen syöpä on toteamisvaiheessa jo levinnyt. Alityypin ekspressoituneimpien geenien perusteella voidaan yrittää ennen syövän puhkeamista selvittää, onko kyseessä SPOP alityyppi ja jos on, voidaan pohtia, onko mitään tehtävissä ennen kuin aggressiivinen syöpä alkaisi levitä. Kuvan 8 pathway-analysissä esiintyy SPOP-alityyppiä erottava geeni SRD5A2, joka vaikuttaa AS-reseptorin tuotantoon ja siten PSA-antigeenin tuotantoon. PSA-antigeenin tuotannon lisääntyminen ei automaattisesti tarkoita eturauhassyöpää, mutta antigeenin tuotannon lisääntyminen voi olla merkki SPOP-alityypin eturauhassyövästä.

Alityyppiä FOXA1 sairastavista potilaista suurella osalla potilaiden kasvaimista kasvaimelle määritetty Gleasonin summa kuuluu luokittelussa ryhmiin R4 ja R5, joihin kuuluu puolet alityypin kasvaimista. Yleisimmät Gleasonin summat alityypillä ovat kuvan 11 perusteella R2, keskikorkean riskin eturauhassyöpää, joita on neljällä potilaalla ja ryhmän R4 korkean riskin eturauhassyöpä, joita mittaustuloksista on neljällä potilaalla. Aggressiivisimpia ryhmään R5 kuuluvaa eturauhassyöpää sairastaa tutkittavasta datasta vain yksi potilas. Alityypin eturauhassyöväällä on variaatiota sen suhteen, onko

tauti suhteellisen rauhallinen ja rauhasrakenteet erilaistuneet, vai ovatko rauhasrakenteet huonosti erilaistuneita ja syöpä aggressiivinen. Mutaatiosta ja siitä mihin pathwayhin mutatoitunut tai vaurioitunut geeni vaikuttaa, riippuu se, miten aggressiivisen syövän potilas mahdollisesti saa. Pathway-analyysin perusteella voidaan yrittää määritellä, mitkä geenit voivat aiheuttaa aggressiivisempaa tautia ja mitkä muutokset aiheuttavat vain hitaasti etenevän taudin, joka ei vaadi aktiivista hoitoa.

Kuva 11 datan perusteella alityyppi IDH1 on eturauhassyövän alityypeistä harvinaisin. Tutkimusaineiston perusteella 333 tutkittavasta potilaasta IDH1 alityyppiä sairastaa vain 3 potilasta. Alityyppi on kuvan perusteella pääasiassa matalan riskin, hyvin erilaistunut eturauhassyöpä, sillä kasvaimista määritellyt Gleasonin summat kuuluvat ryhmiin R1 ja R2, mikä tarkoittaa, että kasvaimessa on pääasiassa hyvin erilaistuneita rauhasrakenteita, jotka on esitetty Kuva 4. Tämän perusteella, suurin osa alityyppiin kuuluvista syövästä kasvaa ja leviää niin hitaasti, ettei aktiivista hoitoa tarvita. IDH1-alityyppi on eturauhassyövän alityypeistä harvinaisin, ja todennäköisyys saada korkean alityypin korkean riskin aggressiivinen eturauhassyöpä on hyvin pieni, joten pääasiassa alityypin syövä voidaan luokitella lähes oireettomiksi, jotka eivät vaadi aktiivista hoitoa.

ETS-negatiivisista alityypeistä ryhmään "Other" eli muut on koottu harvinaisempia alityyppejä, joita ei ole eritelty. Kuva 11 nähdään, että suurin osa alityypin potilaista kuuluu Gleasonin ryhmiin R1 tai R2 eli potilaalla on matalan riskin eturauhassyöpä, jossa kasvaimessa on suurin osa tai kaikki rakenteet hyvin erilaistuneita. Tauti on siis rauhallinen eikä välttämättä vaadi aktiivista hoitoa. Alityypin potilailla on epätodennäköisempää saada aggressiivinen, ryhmiin R4 tai R5 kuuluva eturauhassyöpä, mutta mahdollisuus on olemassa. Suurin osa potilaista kuitenkin saa todennäköisesti matalan riskin eturauhassyövän, joka ei vaadi aktiivista hoitoa. Verrattuna muihin ETS-negatiivisiin alityyppeihin, IDH1-alityyppiä lukuun ottamatta todennäköisyys sairastua ryhmään muut kuuluvaan aggressiiviseen eturauhassyöpään on pienempi kuin muilla ETS-negatiivisillä alityypeillä. Julkaisusta "The Molecular Taxonomy of Primary Prostate cancer" olevasta tutkimusdatasta ETS-negatiivista alityyppiä sairastavia potilaita on tutkimuksessa 135, joista yhteensä 7 potilasta muissa ETS-negatiivisissa ja 8 ryhmässä muut on Gleasonin summan perusteella ryhmään R5 kuuluvia, korkean riskin eturauhassyöpiä. Pathway-analyysissä muutokset, joita aiheuttavat mutaatiot ja pathwayssa geenien liiallinen ilmeneminen ja kohdegeenien ajaminen, ovat sellaisia, etteivät ne haittaa tai muutokset ovat niin hitaita, ettei kasvain aiheuta ongelmia potilaalle.

Verrattaessa alityyppejä erottelevia, ekspressoituneimpia geenejä taulukoissa 2 ja 3 alityypit, joissa erottelevia geenejä on enemmän ja geenejä ekspressoituneimpien

joukossa on enemmän, alityypin Gleason summa vaihtelee enemmän. Verrattaessa alityypin yleisyyttä huomataan, että erottelevia geenejä on enemmän, kun sairastavien potilaiden määrä kasvaa. ERG on datan perusteella alityypeistä yleisin, ja ekspressoituneimpien geenien joukossa alityypillä ERG on eniten ETS-positiivisia alityyppejä erottavia geenejä. Eniten ekspressoituneimpien geenien joukossa erottelevia geenejä on alityypeillä ERG, SPOP ja muut -ryhmä, jotka ovat datan perusteella yleisimmät eturauhassyövän alityypit [1].

5. YHTEENVETO

Pathway-analyysin avulla voidaan verrata, miten eturauhassyövän alityyppejä erottavat geenit vaikuttavat tiettyihin signaalointi-pathwayhin. Tulosten perusteella huomataan, että erottelevia geenejä on eniten alityypillä ERG ja vähiten alityypeillä FOXA1, FLI1 ja IDH1. Ekspressoituneimpien geenien joukosta alityypeillä, joita oli vähiten, alityyppejä erottavia geenejä ekspressoituneimpien geenien joukossa oli vähiten. Harvinaisimmilla alityypeillä IDH1, FLI1 ja FOXA1 oli vähiten alityyppejä erottavia geenejä. Mitä enemmän potilaita sairastaa tiettyä alityyppeä, sitä enemmän syövällä voi olla ekspressoituneimpien geenien joukossa vaihtelua ja variaatioita.

Kun tarkastellaan alityyppien Gleasonin summia, nähdään, että suurin osa eturauhassyöpää sairastavista potilaista kuuluu Gleasonin summan perusteella ryhmiin R2 ja R3 eli keskikorkean riskin eturauhassyöpään tai ryhmään R1 eli matalan riskin eturauhassyöpään. Eturauhassyöpä on usein yli-diagnosoitu tauti, mikä tarkoittaa, että syöpää sairastavia potilaita hoidetaan, vaikka tauti ei sitä edellyttäisi. Pienempi osa eturauhassyöpää sairastavista saa aggressiivisen taudin. Alityyppien perusteella suurempi todennäköisyys saada aggressiivinen tauti on potilailla, joilla on eturauhassyövän alityypeistä ETS-positiivinen alityyppi tai ETS-negatiivisista alityypeistä SPOP tai FOXA1.

Tulosten perusteella suurimmalla osalla potilaista eturauhassyöpä on kuitenkin rauhallinen tauti, joka leviää hitaasti eikä aiheuta ongelmia muiden elimien toiminnolle. Lisäksi, koska suurin osa potilaista kuuluu Gleasonin summan perusteella ryhmiin R1 ja R2, joissa suurin osa kasvaimen soluista on hyvin erilaistuneita ja vastaavat lähes normaaleja rauhasrakenteita, aktiivista hoitoa syövän parantamiseksi ei tarvita, mikä ehkäisee sitä, ettei potilaalle aiheudu hoidoista sivuoireita. Arvioitaessa potilaan sairastaman syövän alityyppeä ja sitä, kuinka paljon geneettiset muutokset vaikuttavat proteiinisynteesiin, ja sitä kautta solujen jakautumiseen ja toimintaan, voidaan arvioida alityypin perusteella, kuinka suuri riski on sairastua aggressiiviseen syöpään ja toisaalta, mitä voidaan päätellä kasvaimesta saatavasta Gleasonin summasta. Gleasonin summan avulla voidaan arvioida syövän aggressiivisuutta, mikä voi vähentää yli-diagnosointia ja vähentää rauhallisen syöpätaudin tarpeettomia hoitotoimenpiteitä.

LÄHTEET

- [1] A. Abeshouse, J. Ahn, R. Akbani, A. Ally, S. Amin, C. Andry , et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5; 163(4): s. 1011–1025.
- [2] Aiheena syöpä: Eturauhassyöpä, Tietoa eturauhassyövästä, verkkosivu Saatavissa (viitattu 11.3.2020): https://www.aiheenasyopa.fi/scripts/pages/fi/home/tietoa_eturauhassyovasta/tietoa_eturauhasesta/index.php
- [3] B. Alberts, *Essential cell biology*. 4th ed. Garland Science, New York, USA, 2014.
- [4] Alta Klinik, Innovation in diagnostics & therapy: Prostate, Prostate Cancer, Gleason Score, verkkosivu Saatavissa (viitattu 10.10.2020): <https://www.altaklinik.com/prostate/prostate-cancer/gleason-score/>
- [5] C. H. Bangma, C. E. Barbieri, A. Bjartell, J. W. Catto, Z. Culig, H. Grönberg, et al. The Mutational Landscape of Prostate Cancer, *European Urology*, Vol. 64, Iss. 4, October 2014, pp. 567–76.
- [6] Adam P. Dicker, N. Agarwal. *Prostate cancer: a multidisciplinary approach to diagnosis and management*. New York, New York: Demos Medical; 2016. p. 53-54, 58, 67, 388.
- [7] Docrates, Syöpäsairaala: Syöpämuodot, Eturauhassyöpä, Eturauhassyövän luokitus Gleason ja TNM, verkkosivu Saatavissa: (viitattu 10.10.2020) <https://www.docrates.com/syopamuodot/eturauhassyopa/eturauhassyovan-luokitus/>
- [8] A. Ferguson-Smith (ed.), J.M, Greally (ed.), R.A, Martienssen (ed.), *Epigenomics*. 1st ed., Springer, Dordrecht, Netherlands, 2009, 452 p.
- [9] M. A. García-Campos, J. Espinal-Enríquez, E. Hernández-Lemus. Pathway Analysis: State of the Art. *Frontiers in physiology*. 2015;6:383–. Saatavissa (viitattu 23.5.2020): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681784/>
- [10] K. Inamura, Prostatic cancers: understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*. 2018 Mar 6;9(18):14723–37.
- [11] S.D Kaffenberger, C. E. Barbieri. Molecular subtyping of Prostate Cancer. *Current Opinion in Urology* 26(3), Toukokuu 2016. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4895200/>
- [12] Kaikki syövästä: Tietoa syövästä, Syöpätaudit, Eturauhassyöpä, verkkosivu Saatavissa (viitattu 11.3.2020): <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/eturauhassyopa/>

- [13] A. Kenttämies, T. Mirtti, A. Rannikko, K. Sandeman, Eturauhassyövän diagnostiikka murroksessa, *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, No. 24, 2016, s. 2351–2358.
- [14] R. Li, H. Pei, D. Watson. Regulation of ETS function by protein-protein interactions. *Oncogene*, s. 6514-6523. January 2001. Saatavilla: <https://www.nature.com/articles/1204035>
- [15] T. Maié, F. Ticconi, Analysis of Cancer Genome Atlas in R, November 2019. Saatavilla: https://costalab.ukaachen.de/open_data/Bioinformatics_Analysis_in_R_2019/BIAR_D3/handout.html
- [16] Navigate: Prostate Cancer Decision Aid, Gleason Score Explained, verkkosivu Saatavissa (viitattu 10.10.2020): <https://news.navigateprostate.com.au/2019/07/03/what-is-the-gleason-score-for-prostate-cancer/>
- [17] Y. Niu, S. Yeh, H. Miyamoto, G. Li, S. Altuwaijri, J. Yuan, R. Han, T. Ma, H. Kuo, C. Chang. 2008, Tissue Prostate-Specific Antigen Facilitates Refractory Prostate Tumor Progression via Enhancing ARA70-Regulated Androgen Receptor Transactivation, 2008, *Cancer Research*, vol. 68, no. 17, pp. 7110-7119
- [18] TAYS, Eturauhassyöpä, 2021. Saatavilla: Etusivu > Palvelut > Syövänhoito > Eturauhassyöpä, <https://www.tays.fi/fi-fi/Palvelut/Syovanhoito/Eturauhassyopa>
- [19] Terveyskylä: Syöpätaudit, Eturauhassyöpä, Eturauhassyöpään vaikuttavat tekijät, verkkosivu Saatavissa (viitattu 10.10.2020): <https://www.terveyskyla.fi/syopatalo/sy%C3%B6p%C3%A4taudit/eturauhassy%C3%B6p%C3%A4/eturauhassy%C3%B6v%C3%A4n-ennusteeseen-vaikuttavat-tekij%C3%A4t#>
- [20] Y-L. Zhang et al. Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer biology & medicine*. 14(1), Feb. 2014.

LIITTE A: GENEETTISEN DATAN TILASTOLLINEN ANALYYSI, RSTUDIO

```
getwd()
setwd("C:/Users/Iida Kulman/Documents/R/DataDirectory/DataDirectory")

library("BiocManager")
library("TCGAbiolinks")
library("limma")
library("edgeR")
library("glmnet")
library("ggplot2")
library("factoextra")
library("FactoMineR")
library("caret")
library("SummarizedExperiment")
library("gplots")
library("survival")
library("survminer")
library("RColorBrewer")
library("gProfileR")
library("genefilter")

#----- TCGA-data-----

working_directory <- "~/tcga_prad"           # working directory

# - Inspect for PRAD availability

GDCprojects = getGDCprojects()
head(GDCprojects[c("project_id", "name")])

# Analysis of Cancer Genome Atlas in R
TCGAbiolinks:::getProjectSummary("TCGA-PRAD")

# the summary shows that TCGA provide data for 500 patients
# including clinical, expression, DNA methylation

# Downloading the clinical data
```

```

load("~/R/DataDirectory/DataDirectory/TCGA-PRAD.RData")
tcga_data = data #re-name the datafile

prjSummary <- getDataCategorySummary("TCGA-PRAD") # Project summary

# Save the data
saveRDS(object = tcga_data,
file = "tcga_prad.RDS",
compress = FALSE)

#-----data loaded from here-----
tcga_data = readRDS(file = "tcga_prad.RDS")
#-----RNASeq Normalization (limma)-----

# Defining and running limma-pipeline

limma_pipeline = function(
tcga_data,
condition_variable,
reference_group=NULL){

design_factor = colData(tcga_data)[, condition_variable, drop=T]

group = factor(design_factor)
if(!is.null(reference_group)){group = relevel(group, ref=reference_group)}

design = model.matrix(~ group)
dge = DGEList(counts=assay(tcga_data),
samples=colData(tcga_data),
genes=as.data.frame(rowData(tcga_data)))

# filtering
keep = filterByExpr(dge, design)
dge = dge[keep,, keep.lib.sizes=FALSE]
rm(keep)

# Normalization (TMM followed by voom)
dge = calcNormFactors(dge)
v = voom(dge, design, plot=TRUE)

```

```
# Fit model to data given design
fit = lmFit(v, design)
fit = eBayes(fit)

# Show 200 top genes
topGenes = topTable(fit, coef=ncol(design), number=200, sort.by="p")

return(
  list(
    voomObj=v, # normalized data
    fit=fit, # fitted model and statistics
    topGenes=topGenes # the 200 most differentially expressed genes
  )
)

# Results for limma, reference group "Solid Tissue Normal"
limma_res = limma_pipeline(
  tcga_data=tcga_data,
  condition_variable="definition",
  reference_group = "Solid Tissue Normal" # verrokkiryhmä
)

# Saving the data as file
saveRDS(object = limma_res,
  file = "limma_res.RDS",
  compress = FALSE)

#-----the data can be loaded and begin from here-----
limma_res = readRDS(file="limma_res.RDS")

# Showing 200 top genes as table
View(limma_res[["topGenes"]])

# in the table, the genes are sorted by p-value
```