Biomarcatori emergenti per la diagnosi e la valutazione prognostica del carcinoma della prostata*

Girish Sardana[1,2], Barry Dowell[3], Eleftherios P. Diamandis[1,2,4]
[1]Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada
[2]Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada
[3]Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA
[4]Department of Clinical Biochemistry, University Health Network and Toronto Medical Laboratories, Toronto, Ontario, Canada

Traduzione a cura di Alberto Dolci

ABSTRACT

Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. Early detection of prostate cancer (CaP), the most prevalent cancer and the second-leading cause of death in men, has proved difficult, and current detection methods are inadequate. Prostate-specific antigen (PSA) testing is a significant advance for early diagnosis of patients with CaP. PSA is produced almost exclusively in the prostate, and abnormalities of this organ are frequently associated with increased serum concentrations. Because of PSA's lack of specificity for CaP, however, many patients undergo unnecessary biopsies or treatments for benign or latent tumors, respectively. Thus, a more specific method of CaP detection is required to augment or replace screening with PSA. The focus recently has been on creating cost-effective assays for circulating protein biomarkers in the blood, but because of the heterogeneity of CaP, it has become clear that this effort will be a formidable challenge. Each marker will require proper validation to ensure clinical utility. Although much work has been done on variations of the PSA test (i.e., velocity, density, free vs. bound, proisoforms) with limited usefulness, there are many emerging markers at various stages of development that show some promise for CaP diagnosis. These markers include kallikrein-related peptidase 2 (KLK2), early prostate cancer antigen (EPCA), PCA3, hepsin, prostate stem cell antigen, and α-methylacyl-CoA racemase (AMACR). We review biomarkers under investigation for the early diagnosis and management of prostate cancer. It is hoped that the use of panels of markers can improve CaP diagnosis and prognosis and help predict the therapeutic response in CaP patients.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della prostata (CaP) è la neoplasia maligna con la più alta prevalenza nell'uomo e la seconda causa di morte per cancro in America del Nord. Durante la vita, un uomo su sei corre il rischio di vedersi diagnosticato un CaP e la probabilità di morire di CaP è del 3,4% (1). Attualmente, la maggior parte delle diagnosi è posta in pazienti asintomatici, in uno stadio precoce della malattia. A causa di questa modificazione dello stadio del tumore alla diagnosi, i classici approcci utilizzati per definire la prognosi del paziente, come le tabelle di Partin e i nomogrammi di Kattan, non sono più efficaci come in passato. Dalla diagnosi precoce l'attenzione si è ora focalizzata sulla definizione del significato clinico di questi tumori scoperti in stadio precoce. Uno degli obiettivi è trovare la maniera di distinguere i tumori clinicamente rilevanti, che hanno la capacità di metastatizzare. In linea generale, il 30% dei tumori rimossi mediante prostatectomia radicale va considerato clinicamente non significativo, e molto probabilmente non avrebbe richiesto un trattamento così invasivo. La maggior parte dei casi diagnosticati è costituita da una forma latente, non aggressiva di CaP; pertanto, è importante che questi pazienti non siano sottoposti ad un inutile trattamento radicale. Attraverso la diagnosi precoce e la selezione di un trattamento appropriato, si potrebbe acquisire il controllo del CaP; tuttavia, un livello diagnostico così raffinato non è ancora stato raggiunto.

Generalmente, il biomarcatore utilizzato per la diagnosi di CaP è l'antigene prostatico-specifico (PSA), considerato il miglior marcatore tumorale disponibile, anche se non privo di difetti. In origine, il PSA è stato utilizzato per il monitoraggio dei pazienti con CaP e solo successivamente la sua determinazione è stata utilizzata per lo screening. La scoperta del PSA e la sua introdu-

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2008;54:1951-60 su permesso dell'Editore.*
Copyright originale © 2008 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.

zione nella pratica clinica nei primi anni '90 hanno avuto un impatto decisivo sulla diagnosi precoce del CaP e hanno indotto un aumento dell'incidenza documentata del tumore (2). Il PSA è generalmente utilizzato come marcatore diagnostico, ma al valore di PSA si riconosce ora anche di rappresentare il grado relativo di rischio di CaP. Il limite superiore di riferimento stabilito a 4 µg/L non permette di rilevare un gran numero di CaP e il "Prostate Cancer Prevention Trial" ha concluso che non esiste una concentrazione di PSA in grado di escludere il cancro (3). E' stato dimostrato che la determinazione del PSA totale è utile come strumento prognostico, in quanto elevati valori preoperatori si associano con uno stadio avanzato della malattia e con una prognosi severa. Attualmente la controversia sull'impiego di questo marcatore è ancora aperta, perché non è chiaro se l'utilizzo del PSA come esame di screening abbia portato al declino della mortalità da CaP. Due importantissimi studi prospettici randomizzati, lo "European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer" e il "Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial", descriveranno se l'uso del PSA nello screening del CaP ne riduce la mortalità[1]. Anche la correlazione tra PSA e grado di malignità del tumore non è chiara. È stato dimostrato che la quantità di PSA nel tessuto tumorale si riduce all'aumentare del grado di Gleason (4), benchè la sua concentrazione nel siero aumenti a causa della disgregazione della membrana basale che circonda le cellule epiteliali della prostata e dell'architettura generale del tessuto prostatico. Il PSA non è specifico per il CaP e può essere impiegato come marcatore di iperplasia prostatica benigna (BPH) e di aumento del volume prostatico. L'analisi della accuratezza diagnostica del PSA ne ha dimostrato l'inadeguatezza: il suo valore predittivo positivo è del 37%, i pazienti nella zona grigia (4–10 µg/L) hanno una probabilità del 25% di avere un CaP occulto (5) e il 15% degli uomini con concentrazioni di PSA <4 µg/L presentano un CaP (6). I limiti del PSA come marcatore del CaP hanno creato il bisogno di nuovi marcatori per prevenire il sovratrattamento dei tumori indolenti. Oltre ai marcatori diagnostici, sono necessari marcatori prognostici e di efficacia terapeutica che fungano da "endpoint" surrogati nel predire la severità della malattia, nella scelta dei trattamenti e nel monitoraggio della risposta alle terapie. Per supportare la validazione delle molecole candidate sono state prodotte alcune linee guida per lo sviluppo di un biomarcatore (7, 8). Questa rassegna è focalizzata su nuovi biomarcatori che paiono particolarmente promettenti per la diagnosi precoce e il trattamento del CaP (Tabella 1).

FORME DERIVATE DAL PSA

E' ormai chiaro che l'efficacia diagnostica del PSA ha bisogno di essere migliorata. Un approccio utilizzato è stato quello delle misure derivate dal PSA, inclusi l'aumento nel tempo del PSA ("PSA velocity"), il rapporto tra la concentrazione di PSA e il volume prostatico ("PSA density") e la definizione di intervalli di riferimento stratificati per età. Inoltre, i miglioramenti nella determinazione del PSA e delle proteine correlate hanno permesso di calcolare la percentuale del PSA libero (fPSA), che rappresenta il rapporto tra PSA libero e PSA totale. Uno studio recente, in particolare, ha dimostrato l'efficacia della percentuale di fPSA nel predire lo stadio avanzato del CaP (9). Altre forme comprendono il PSA complessato, che è una misura di quanto PSA nel siero sia legato alla α_2-macroglobulina, all'inibitore della α_1-proteasi o alla α_1-antichimotripsina, e le differenti isoforme derivate dal clivaggio del PSA, come [–2]proPSA e bPSA. Sono state scritte molte rassegne sul PSA, per cui le sue forme derivate non vengono discusse in questa rassegna (10).

PEPTIDASI 2 CORRELATA ALLA CALLICREINA

Nell'uomo la peptidasi 2 correlata alla callicreina (KLK2, precedentemente nota come hK2) è una serin-proteasi appartenente alla stessa famiglia genica del PSA. Dati ricavati da tessuti di CaP hanno dimostrato che KLK2 aumenta durante la progressione del CaP e che pertanto può essere utilizzata come biomarcatore del CaP. Studi condotti sul siero hanno mostrato un miglioramento nella diagnosi del CaP quando la KLK2 era utilizzata in combinazione con il PSA totale (11) e il fPSA (12), specificatamente per quanto riguarda l'estensione extracapsulare e la dimensione del tumore (13). Inoltre, KLK2 si è dimostrata un fattore prognostico migliore del PSA nella definizione del rischio di recidiva biochimica nei pazienti con valori di PSA $\leq$10 µg/L (14). Ulteriori studi di validazione sono, tuttavia, necessari per delucidare completamente il suo potenziale prognostico.

ANTIGENE DI MEMBRANA SPECIFICO DELLA PROSTATA

L'antigene di membrana specifico della prostata (PSMA) è una glicoproteina di membrana prodotta nelle cellule epiteliali di soggetti sani e di pazienti con CaP. La produzione di PSMA è aumentata nelle cellule epiteliali di tessuto prostatico carcinomatoso. La Cytogen ha sviluppato un esame commerciale di "imaging" basato sul PSMA (ProstaScint) che utilizza l'anticorpo 7E11 anti-PSMA coniugato con indio marcato in un saggio radioimmunoscintigrafico (15). Infine, il PSMA è stato studiato come target terapeutico mediante l'uso di anticorpi coniugati con radioisotopi o tossine o mediante l'attivazione di cellule dendritiche contro il PSMA (16). L'uso di PSMA non è ancora stato introdotto nella pratica clinica

[1] *I due studi in questione sono stati pubblicati contemporaneamente nel marzo 2009 (Andriole GL et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. N Engl J Med 2009;360:1310-9 & Schröder FH et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. N Engl J Med 2009;360:1320-8). Purtroppo i risultati non sono stati dirimenti, perchè, mentre nel primo la mortalità non differiva tra soggetti sottoposti e non a screening con PSA, nel secondo lo screening con PSA riduceva sì la mortalità per CaP del 20%, ma si associava ad un rischio troppo elevato di falsi positivi (NdT).*

Tabella 1
Lista dei biomarcatori candidati per il carcinoma della prostata e loro possibile utilità clinica

Biomarcatore	Possibile utilità clinica	Bibliografia
Peptidasi 2 correlata alla callicreina	Marcatore diagnostico e prognostico predittivo di estensione extracapsulare, massa tumorale e recidiva biochimica	(11-14)
Antigene di membrana specifico della prostata	Marcatore per l'immunoscintigrafia e target terapeutico	(15, 16)
Callicreina 11	Marcatore sierico precoce di CaP	(17, 18)
Antigene 3 del carcinoma prostatico	Marcatore urinario per la rilevazione del CaP	(19-23)
Antigeni precoci del carcinoma prostatico	Rilevazione immunoistochimica del CaP; nel siero diagnosi differenziale tra CaP localizzato e metastatico	(24-27)
α-Metilacil-CoA racemasi (AMACR)	Aumentata presenza di autoanticorpi anti-AMACR nel CaP; rilevazione immunoistochimica come fattore prognostico di recidiva biochimica e morte	(28-33)
Attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA)/Recettore dell'uPA	Aumentate concentrazioni tissutali e sieriche predittive di recidiva biochimica e metastatizzazione	(34-37)
Fattore di crescita insulino-simile (IGF)/Proteina legante l'IGF (IGFBP)	IGF-1 lievemente aumentata nel siero di pazienti con CaP; concentrazione di IGFBP inversamente correlata con la progressione del CaP.	(38-40)
TMPRSS2:ERG/ETV1	Aumenta nelle urine di pazienti con CaP e PIN in confronto ai pazienti con BPH; gene di fusione presente nel tessuto di CaP rilevato mediante FISH	(41-44)
TGF-β_1	Concentrazioni sieriche e immunoistochimiche aumentate nella progressione del CaP e nella recidiva biochimica	(45-47)
EZH2	L'espressione genica nel tessuto di CaP predice la progressione del tumore	(48, 49)
Glutatione S-transferasi pi 1	Rilevazione dell'ipermetilazione del gene promotore nelle urine per valutare la necessità della biopsia	(50, 51)
Proteina secretoria prostatica 94	Marcatore predittivo del grado di Gleason, dello stato del margine chirurgico e della recidiva biochimica dopo chirurgia locale	(52)
Proteina secretoria 3 ricca in cisteina	Aumentata colorazione immunoistochimica nei tessuti prostatici di uomini con un PIN ad alto grado; predittore indipendente di recidiva del CaP	(53, 54)
Cromogranina A	Monitoraggio dei pazienti con CaP con differenziazione neuroendocrina androgeno-indipendente in stadio avanzato	(55, 56)
Peptide rilasciante la progastrina	Monitoraggio dei pazienti con CaP metastatico con fenotipo neuroendocrino e androgeno-indipendente	(57, 58)
Caderina E	Espressione immunoistochimica ridotta nel CaP correlata con lo stadio e la ridotta sopravvivenza	(59, 60)
Annessina A3	Ridotta produzione nei tessuti di CaP rilevata in immunoistochimica; marcatore prognostico	(61)
Antigene delle cellule staminali prostatiche	Marcatore immunoistochimico associato con il grado di Gleason e lo stadio del tumore; target terapeutico	(62, 63)
Epsina	Rilevazione immunoistochimica nel PIN e nel CaP a differenza che nella BPH	(64, 65)
Interleuchina 6	Concentrazioni sieriche elevate nel CaP in stadio avanzato	(66-68)

CaP, carcinoma della prostata; PIN, neoplasia prostatica intraepiteliale; BPH, iperplasia prostatica benigna; FISH, ibridazione fluorescente in situ; TGF-β_1, transforming growth factor β1; EZH2, enhancer of zeste homolog 2 (Drosofila).

e il suo ruolo come strumento diagnostico e terapeutico è ancora in evoluzione.

ALTRE CALLICREINE TISSUTALI

Fino a poco tempo fa, KLK3 (peptidasi 3 correlata alla callicreina; in precedenza conosciuta come PSA), KLK2 e KLK1 (callicreina 1; conosciuta anche come callicreina pancreatico-renale 1) erano gli unici geni identificati nel locus della callicreina umana sul cromosoma 19. Oggi si sa che il locus ha le dimensione di 300 kb e consiste di 15 geni che mostrano una omologia e una similarità di sequenza significative sia a livello di DNA che di proteina. Oltre alla KLK2, altre callicreine si sono dimostrate utili come biomarcatori del CaP e di altre patologie (17). Otto callicreine sono prodotte in concentrazione relativamente elevata nel tessuto prostatico: le callicreine 2–4, 10–13 e la callicreina 15. Di queste, la callicreina 11 è un promettente biomarcatore sierico per il CaP. L'uso della callicreina 11 in combinazione con il PSA totale e la percentuale di fPSA ha dimostrato qualche miglioramento nella capacità di predire il CaP (18).

ANTIGENE 3 DEL CARCINOMA PROSTATICO

Conosciuto anche come DD3, il "prostate cancer antigen 3" (PCA3) è un RNA non codificante prodotto quasi esclusivamente nella prostata e altamente sovraespresso nel tessuto di CaP, comprese le metastasi, rispetto al tessuto di BPH (19). Numerosi saggi sono in grado di determinare RNA messaggero del PCA3 (PCA3 mRNA) nel sedimento urinario. L'unico disponibile commercialmente è APTIMA (Gen-Probe), che utilizza la tecnica dell'amplificazione mediata dalla trascrizione (20). Viene ricavato un punteggio ("PCA3 score") normalizzando la concentrazione di PCA3 mRNA alla concentrazione di PSA. Un recente ampio studio multicentrico, condotto su pazienti sottoposti a biopsia, che includeva l'analisi del PCA3 nelle urine raccolte dopo massaggio prostatico, ha utilizzato il cut-off di 58 per il "PCA3 score" e ha ricavato un'area sotto la curva ROC (AUC) di 0,66 contro un'AUC di 0,57 del PSA (21). In uno studio condotto su 233 pazienti sottoposti a biopsie ripetute dopo una biopsia risultata negativa, il "PCA3 score" ha mostrato un AUC di 0,68 e una sensibilità e una specificità rispettivamente del 58% e del 72% (22). Questo esame può essere potenzialmente utile per migliorare la specificità diagnostica del PSA. L'associazione di PCA3 con altri tre biomarcatori genetici urinari (GOLPH2, SPINK1 e il gene di fusione TMPRSS2:ERG) ha migliorato la sensibilità e la specificità diagnostiche del solo PCA3 (23).

ANTIGENI PRECOCI DEL CARCINOMA PROSTATICO

E' stato dimostrato che modificazioni delle proteine della matrice nucleare sono associate alla carcinogenesi. L'antigene precoce del carcinoma prostatico (EPCA) è una proteina della matrice nucleare, che è stata inizialmente rilevata nel proteoma di tessuto prostatico di ratto, dimostrandosi un promettente marcatore diagnostico di CaP. Studi immunoistochimici con autoanticorpi anti-EPCA hanno mostrato una colorazione più intensa su biopsie di tessuto di CaP rispetto a campioni di tessuto non canceroso (24). In aree non cancerose adiacenti al tessuto tumorale e nel 86% del tessuto di CaP si è anche osservato un "field effect" (presenza di cellule epiteliali morfologicamente normali, ma con alterazioni genetiche e molecolari che preludono alla loro trasformazione in cellule tumorali, NdT). L'EPCA ha aiutato ad identificare pazienti a rischio la cui biopsia era risultata negativa. Un saggio recentemente sviluppato per la determinazione dell'EPCA nel sangue mostrava, in una piccola coorte di 12 pazienti con CaP e 34 soggetti sani, 92% di sensibilità e 94% di specificità (25). Un altro studio, che misurava la proteina EPCA-2 nel siero, mostrava una specificità del 92%, con una sensibilità del 94%, nell'identificazione del CaP e trovava che la EPCA-2 era in grado di differenziare il CaP localizzato dal CaP metastatico con un'AUC di 0,89 (26). Si aspettano ulteriori ampi studi indipendenti per confermare questi promettenti dati; per questi marcatori sono state, tuttavia, messe in rilievo carenze metodologiche che sollevano delle perplessità sulla loro reale validità (27).

α-METILACIL-CoA RACEMASI

L'α-metilacil-CoA racemasi (AMACR) è un'enzima coinvolto nel metabolismo ossidativo e nella sintesi degli acidi grassi a catena ramificata presenti nei prodotti caseari e nella carne rossa. Oltre ad essere largamente prodotto nel tessuto tumorale di CaP, questo enzima è codificato da un gene localizzato in una regione (5p13.3) che contiene dei poliformismi associati con il CaP. Una meta-analisi dei dati di "microarray" ha dimostrato con un elevato grado di confidenza che AMACR è sovraregolato nel CaP (28). In uno studio multicentrico, la colorazione immunoistochimica dell'AMACR ha permesso di distinguere il tessuto prostatico benigno da quello tumorale maligno con una sensibilità del 97% e una specificità del 92% (29). Inoltre, è stato dimostrato che la ridotta produzione di AMACR ha valore prognostico nel predire la recidiva biochimica e la morte da CaP (30). Le concentrazioni circolanti di AMACR mRNA sono state misurate nel siero e nelle urine mediante analisi in "polymerase chain reaction" (PCR) retrotrascrizionale (31). Come proteina, la concentrazione di AMACR nel siero è bassa ma, con tecniche di "western blotting", è stata rilevata nelle urine (32). Nell'intervallo di PSA compreso tra 4 e 10 µg/L, aumentate concentrazioni di autoanticorpi anti-AMACR erano in grado di distinguere i pazienti con CaP dai soggetti sani. Questo esame dimostrava una sensibilità del 62% e una specificità del 72% (33). Studi aggiuntivi sono in corso per definire completamente le potenzialità di AMACR come biomarcatore nel CaP.

L'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO DI TIPO UROCHINASI E IL SUO RECETTORE

La degradazione della matrice extracellulare è stata

associata alla progressione delle neoplasie maligne ed è stato dimostrato che la cascata di attivazione del plasminogeno mediata dall'urochinasi partecipa a questo processo. Il plasminogeno è convertito nella sua forma attiva, la plasmina, attraverso l'attivazione della serinproteasi urochinasi [attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA)] e il legame con il suo recettore specifico (uPAR). Uno studio ha mostrato che le concentrazioni di uPA nella BPH e nel CaP erano più alte che nei soggetti sani, sebbene non ci fosse nessuna associazione statisticamente significativa con il CaP (34). La determinazione nel siero delle isoforme del uPAR solubile (molecola intatta e frammenti), delle isoforme del PSA (fPSA e sue sottofrazioni intatta e "nicked") e di KLK2 ha mostrato, in pazienti con concentrazioni aumentate di PSA, una migliore efficacia nel predire l'esito della biopsia, sia all'analisi statistica univariata che multivariata (35). Aumentate quantità di uPAR nel tessuto di CaP sono state associate con la presenza di metastasi osteoblastiche e con la progressione del CaP in stadio avanzato (36). Uno studio recente ha dimostrato un aumento delle concentrazioni sieriche di uPA e uPAR nel CaP con metastasi ossee (37). Questi studi riportavano che la concentrazione plasmatica preoperatoria di uPA era predittiva di recidiva biochimica e di malattia metastatica, indicando la presenza della malattia in organi distanti al momento della terapia locale. Ampi studi prospettici sono necessari per chiarire il potenziale prognostico dell'uPA e dell'uPAR in modelli preoperatori di valutazione della progressione e metastatizzazione della malattia.

FATTORI DI CRESCITA INSULINO-SIMILI E LORO PROTEINE LEGANTI

Le concentrazioni sieriche dei fattori di crescita insulino-simili (IGFs) e delle loro proteine leganti (IGFBPs) sono state associate al CaP. La famiglia dei IGFs consiste di 2 ligandi (IGF-1, IGF-2), 2 recettori (IGFR-1, IGFR-2) e 6 proteine leganti (IGFBPs 1–6). Concentrazioni aumentate di IGF-1 e ridotte di IGFBP-3 sono state correlate con un aumentato rischio di sviluppare CaP (38). In uno studio prospettico la concentrazione di IGF-1 aumentava leggermente all'aumentare del rischio di CaP, ma tale marcatore non mostrava prestazioni migliori del PSA (39); altri studi non sono riusciti a riprodurre questi risultati e non hanno trovato alcuna associazione con la progressione del CaP. È stato riportato che la principale IGFBP prodotta dalla prostata, l'IGFBP-2, è aumentata nel CaP, nonostante le concentrazioni in tumori localizzati fossero inversamente correlate con la massa tumorale e la progressione del CaP. È stato anche riportato che la concentrazione di IGFBP-3 nel siero è inversamente correlata con la presenza di metastasi ossee, mentre pazienti con CaP localizzato e soggetti sani non hanno mostrato alcuna differenza (40).

I GENI DI FUSIONE TMPRSS2:ERG E TMPRSS2:ETV1

I riarrangiamenti genici sono risultati implicati nei tumori maligni, particolarmente in quelli ematologici. Uno di questi riarrangiamenti coinvolge i geni del fattore di trascrizione ERG (oncogene v-ets omologo del virus E26 dell'eritroblastosi aviaria) (21q22.2) e ETV1 (ets variante 1) (7p21.1) e il gene che codifica per la serinproteasi TMPRSS2 (serinproteasi 2 transmembranaria, localizzato su 21q22.3), ancorata alla membrana. Con un approccio bioinformatico (COPA, "cancer outlier profile analysis") basato sull'analisi in "microarray" dell'espressione di migliaia di geni, è stato dimostrato che questo riarrangiamento è presente nel 80% dei CaPs (41). I prodotti di fusione di questi geni sono stati osservati nel 42% dei pazienti con CaP, nel 20% dei pazienti con neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN) e sporadicamente nella BPH (42). Uno studio prospettico che ha seguito 252 uomini con CaP in stadio T1a/b per 9 anni ha dimostrato che la fusione TMPRSS2:ERG, rispetto alla fusione TMPRSS2:ETV1, mostrava una migliore associazione con un grado di Gleason >7, con la malattia metastatica e con la morte per CaP (43). Utilizzando la tecnica di ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), è stato dimostrato che nel 80%–95% dei tessuti di CaP è presente un'isoforma della fusione TMPRSS2:ERG che potrebbe rappresentare un potenziale "target" terapeutico. Inoltre, l'aumentata produzione di SPINK1, una serinproteasi dimostratasi in grado di promuovere l'invasione del tumore in pazienti negativi per i riarrangiamenti ERG e ETV1, è stata recentemente associata con una prognosi sfavorevole (44).

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β_1

Il "transforming growth factor β_1" (TGF-β_1) è un fattore di crescita molto attivo, coinvolto in vari processi molecolari quali la differenziazione cellulare, la risposta immune, l'angiogenesi e la proliferazione. Studi condotti su modelli animali di CaP hanno dimostrato per il TGF-β_1 un ruolo nella progressione del CaP. Concentrazioni aumentate di TGF-β_1 nel tessuto di CaP sono state correlate con il grado di malignità e lo stadio del tumore e con metastasi linfonodali (45). Un saggio ELISA, utilizzato per determinare le concentrazioni plasmatiche preoperatorie di TGF-β_1, ha dimostrato che il TGF-β_1 è aumentato nei pazienti con CaP (46) ed è correlato con l'estensione extracapsulare, l'invasione delle vescicole seminali, la metastatizzazione e la recidiva biochimica (47). Pertanto, il TGF-β_1 potrebbe dimostrarsi utile come marcatore prognostico di CaP.

PROTEINA EZH2 (ENHANCER OF ZESTE HOMOLOG 2)

Il gene EZH2 ["enhancer of zeste homolog 2" (Drosofila)] codifica per una proteina della famiglia delle proteine "polycomb", coinvolte nella regolazione dell'espressione genica. Il profilo di espressione genica di tessuto tumorale di CaP ricavato da autopsie di soggetti deceduti per CaP metastatico ha dimostrato che la proteina EZH2 è prodotta in maggior quantità nel CaP metastatico che nel CaP localizzato e nella BPH (48). Inoltre,

è stato trovato che questo marcatore mostra un'efficacia superiore alla concentrazione preoperatoria di PSA e al grado di Gleason nel determinare la progressione del CaP. È stato anche dimostrato che l'impiego di questo marcatore in associazione con la caderina-E è in grado di predire la recidiva di CaP dopo terapia localizzata (49). Lo sviluppo di un saggio per la sua determinazione nel siero contribuirebbe alla validazione di questo biomarcatore candidato all'identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare malattia metastatica.

IPERMETILAZIONE DELLA GLUTATIONE S-TRANSFERASI π

L'ipermetilazione di geni oncosoppressori a livello delle regioni del loro promotore nei siti nucleotidici di citosina/guanina (CpG) è stata implicata nel CaP. La glutatione S-transferasi π è un enzima che protegge il DNA dal danno da radicali liberi. Una ridotta espressione del gene GSTP1 (glutatione S-transferasi pi 1) da ipermetilazione del promotore è stata dimostrata nel CaP con dati consistenti ed è stata misurata nel sedimento urinario per definire la necessità di eseguire la biopsia prostatica (50). Questo metodo è stato migliorato con l'applicazione del massaggio prostatico prima della raccolta del campione di urine (51). In questo modo sono stati studiati diversi pannelli di geni, incluso il GSTP1.

PROTEINA SECRETORIA PROSTATICA 94 E SUA PROTEINA LEGANTE

La proteina secretoria prostatica 94 (PSP94), conosciuta anche come β-microseminoproteina, è una proteina molto abbondante nello sperma, che riveste un ruolo nella regolazione della proliferazione e dell'apoptosi delle cellule. Esistono forme di PSP94 legate in un complesso molecolare con la proteina legante specifica (proteina legante la PSP94). Le concentrazioni nel siero del rapporto tra la PSP94 totale e la PSP94 libera e della proteina legante la PSP94 sono state associate, in pazienti con CaP dopo chirurgia locale, con il grado di Gleason, la recidiva biochimica e lo stato del margine chirurgico (52). Sono ancora necessari ampi studi prospettici per validare questo biomarcatore.

PROTEINA SECRETORIA 3 RICCA IN CISTEINA

La proteina secretoria 3 ricca in cisteina (CRISP-3), prodotta dall'apparato riproduttivo maschile, è coinvolta nella maturazione degli spermatozoi. Nel plasma seminale ne sono state rilevate notevoli quantità; inoltre, la colorazione del tessuto prostatico ha mostrato un'aumentata intensità della colorazione per CRISP-3 in PIN ad alto grado e in parecchi campioni di CaP (53). L'associazione tra CRISP-3 e CaP è stata valutata insieme alla PSP94 in tessuti di pazienti sottoposti a prostatectomia radicale, dimostrando che CRISP-3 è un marcatore predittivo indipendente di recidiva del CaP (54). CRISP-3 è un marcatore tissutale emergente per la definizione prognostica del CaP.

MARCATORI DI DIFFERENZIAZIONE NEUROENDOCRINA

La cromogranina A, un peptide prodotto dalle cellule neuroendocrine della prostata, è attualmente utilizzato per la diagnosi e la valutazione prognostica dei CaPs che mostrano differenziazione neuroendocrina. Aumentate concentrazioni di cromogranina A nel siero sono state correlate con la progressione del CaP androgeno-indipendente e una prognosi sfavorevole (55) ed è stato dimostrato che questi incrementi precedono l'aumento di PSA e che, in associazione con il fPSA, la loro specificità migliora (56).

Il peptide rilasciante la progastrina è un fattore di crescita rilasciato nel CaP di tipo neuroendocrino. Aumentate concentrazioni sono state rilevate nel CaP metastatico e sono state associate con la sua progressione (57). E' stato anche dimostrato che la concentrazione di peptide rilasciante la progastrina è predittiva del fenotipo androgeno-indipendente del tumore (58). Quindi, sia la cromogranina A che il peptide rilasciante la progastrina possono essere utilizzati nel monitoraggio dei pazienti con CaP ormone-refrattario in stadio avanzato che mostra differenziazione neuroendocrina.

CADERINA E

L'adesione cellula-cellula riveste un ruolo importante nell'architettura tissutale non patologica e nella carcinogenesi. La caderina E è una molecola di adesione cellulare prodotta dalle cellule epiteliali ed è stato dimostrato che la sua produzione da parte di queste cellule è predittiva della prognosi del CaP. Uno studio di immunoistochimica mostrava una ridotta produzione di caderina E nel 50% dei CaP, mentre il tessuto prostatico non tumorale mostrava una produzione uniforme (59). La produzione di caderina E è stata ulteriormente studiata e correlata con il grado di malignità, la stadiazione del tumore e la sopravvivenza. Una minore produzione di caderina E rilevabile in immunoistochimica è stata associata ad un tempo di sopravvivenza più breve nei pazienti con CaP (60).

ANNESSINA A3

L'annessina A3 (ANXA3) è una proteina legante il calcio, membro della famiglia delle annessine. È stato dimostrato che l'ANXA3 è coinvolta nell'attivazione della risposta immunologica, ma anche nel passaggio transmembrana e nella migrazione dei linfociti. L'ANXA3 è stata recentemente studiata con metodi immunoistochimici come promettente marcatore tissutale di prognosi del CaP e si è trovata una produzione inferiore nel CaP rispetto alla BPH, alla PIN e ai tessuti sani (61). L'ANXA3 era in grado di stratificare un ampio gruppo di pazienti a rischio intermedio in sottogruppi ad alto e basso rischio.

ANTIGENE DELLE CELLULE STAMINALI PROSTATICHE

L'antigene delle cellule staminali prostatiche (PSCA)

è una glicoproteina di membrana prodotta in maniera piuttosto specifica dalla prostata. Il PSCA è stato rilevato, in immunoistochimica, nel tessuto di CaP e il suo RNA è stato trovato nei campioni di sangue. Un'aumentata produzione di PSCA è stata correlata con un aumentato rischio di CaP, con un grado di Gleason più alto, con uno stadio superiore e con la presenza di metastasi (62). Il PSCA è stato anche studiato come "target" terapeutico (63); tuttavia, sono necessari studi di validazione più ampi per confermare l'utilità clinica di questo marcatore.

EPSINA

L'epsina, una serinproteasi di membrana identificata per la prima volta nel fegato umano a partire da librerie di cDNA, è prodotta dal tessuto prostatico in elevata concentrazione. Studi del profilo di espressione degli mRNA hanno mostrato una sovraespressione del gene dell'epsina nel 90% dei CaP (64). In uno studio, la colorazione immunoistochimica ha mostrato che l'epsina è prodotta in elevate quantità nelle lesioni da PIN ed è maggiormente prodotta dal CaP che dal BPH (65). Ulteriori studi su siero e urine sono necessari per chiarire completamente il potenziale diagnostico dell'epsina.

INTERLEUCHINA 6

L'interleuchina 6 (IL-6), una citochina secreta da vari tipi di cellule, è coinvolta nelle risposte immunitarie e di fase acuta. L'IL-6 e il suo recettore hanno mostrato un aumento di concentrazione nel CaP metastatico e androgeno-indipendente (66) e sono stati proposti come biomarcatori di progressione del CaP (67). Anche studi sull'IL-6 associata con il TGF-β_1 per la diagnosi del CaP hanno mostrato risultati promettenti (68).

DNA CIRCOLANTE ASSOCIATO AL TUMORE

La disseminazione delle cellule tumorali è un prerequisito per la metastatizzazione; quindi, una rilevazione precoce di queste cellule in circolo può risultare utile per la valutazione prognostica dei pazienti con CaP. Cellule tumorali sono state rilevate mediante tecniche di PCR a trascrizione inversa, che si sono dimostrate analiticamente sensibili e, in associazione con i marcatori specifici per il tessuto prostatico, utili ad aumentare l'accuratezza della stadiazione e a predire la recidiva di malattia (69).

AUTOANTICORPI

È noto che il sistema immunitario induce una risposta autoanticorpale verso alcuni antigeni prodotti in eccesso dai tumori. Sono state descritte risposte umorali verso la proteina 1 di interazione con l'huntingtina, i prostasomi e l'AMACR (33). Impiegando la tecnica di ingegnerizzazione molecolare del fago nota come "phage display" e i "microarrays" proteici nell'innovativo metodo definito "immunomica del cancro", Wang et al. (70) sono stati in grado di identificare autoanticorpi rivolti contro peptidi derivati dal tessuto di CaP. Gli autori hanno generato un "microarray" dei 22 peptidi esposti sul fago ingegnerizzato in grado di discriminare 68 campioni di siero di pazienti con CaP da 60 controlli, con una specificità del 88,2%, una sensibilità del 81,6% e un'AUC di 0,93, superiore a quella mostrata dal PSA (0,80). Sono in corso studi per validare ulteriormente questo strumento diagnostico in una più ampia coorte. Un recente studio dello stesso gruppo ha utilizzato un metodo simile applicando quindi un'analisi delle reti biologiche per determinare quali processi biologici perdessero la regolazione durante la progressione del CaP (71). Un interessante riscontro di questo studio è che le stesse agobiopsie possono indurre una risposta autoimmune.

NOMOGRAMMI

I nomogrammi sono strumenti grafici di analisi di più variabili che combinano aspetti clinici, come il grado di malignità e lo stadio del tumore, con i biomarcatori per mettere a disposizione dei medici un approccio al paziente standardizzato. I nomogrammi utilizzano criteri basati sulle prove di efficacia ("evidence-based") per arrivare a decisioni relative al trattamento a qualsiasi stadio della malattia. Il valore di un nomogramma deriva dalle sue caratteristiche di esecuzione e dalla sua facilità di utilizzo. Per il CaP sono stati sviluppati numerosi nomogrammi, incluso il nomogramma per la recidiva biochimica basato su TGF-β_1 e IL-6 (72) e i nomogrammi predittivi dell'esito della biopsia (73). Una recente rassegna di Karakiewicz e Hutterer riassume i nomogrammi sviluppati per il CaP (74).

STRATEGIE MULTIMARCATORE E RETI NEURALI ARTIFICIALI

La combinazione di più biomarcatori è stata ampiamente utilizzata per migliorare la loro predittività di malattia in molte, differenti condizioni patologiche. Esiste un'eterogeneità interindividuale, per cui le stesse condizioni patologiche possono mostrare caratteristiche biologiche diverse da individuo ad individuo. Perciò è molto probabile che l'utilizzo di più marcatori sia più adatto che la determinazione di un singolo marcatore a uno screening di popolazione. Recentemente, Parekh et al. (75) hanno utilizzato un pannello di 54 biomarcatori proteici che includeva adipochine, metalloproteinasi, molecole di adesione e fattori di crescita. Gli autori, utilizzando come controlli soggetti confrontabili per età, hanno determinato, in pazienti ai quali è stata successivamente posta diagnosi di CaP, la concentrazione dei biomarcatori nel siero raccolto prima della diagnosi. I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che il pannello di marcatori non era in grado di superare, in termini di efficacia, i fattori di rischio definiti per il "Prostate Cancer Prevention Trial". Le reti neurali artificiali sono state utilizzate per delineare i complessi rapporti tra variabili e identificare profili di dati caratteristici. Stephan et al. hanno utilizzato la metodologia della rete neurale artificiale per valutare l'utilità

clinica di differenti combinazioni di callicreine nella diagnosi del CaP (76).

PROFILI PROTEOMICI

L'analisi proteomica ad elevata capacità dei fluidi biologici, dei tessuti e delle linee cellulari è recentemente divenuta un popolare metodo per l'identificazione di nuovi biomarcatori. In particolare, la spettrometria di massa di tipo "surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight" (SELDI-TOF) è stata frequentemente applicata nella definizione del profilo molecolare di campioni biologici. Con particolare riferimento al CaP, Adam et al. (77) hanno impiegato un modello ad albero decisionale per identificare un proteoma in grado di distinguere i pazienti con CaP dai soggetti sani con una sensibilità del 83% e una specificità del 97%. Petricoin et al. (78) hanno analizzato 266 campioni di siero di pazienti con CaP e di soggetti sani raggiungendo una sensibilità del 95% ed una specificità del 78%. Qu et al. (79), analizzando in un modello ad albero decisionale amplificato i loro dati di SELDI-TOF, sono stati in grado di raggiungere una sensibilità del 97% ed una specificità del 97%. Anche altri studi hanno utilizzato i profili proteomici per la diagnosi di CaP, dimostrando ulteriormente l'utilità di questo metodo (80). Tuttavia, l'utilizzo dell'analisi proteomica è stato minuziosamente esaminato e, per validare oggettivamente questo metodo, il "National Cancer Institute" e l'"Early Detection Research Network" hanno condotto uno studio multicentrico, i cui risultati sono stati recentemente pubblicati (81). Benchè la fase 1 della validazione avesse confermato la riproducibilità analitica del metodo, la fase 2 non è stata in grado di determinare se questo metodo fosse predittivo di CaP in uno studio multicentrico caso-controllo. La causa di questo fallimento è stata attribuita ad errori sistematici di tipo preanalitico, analitico e bioinformatico, come precedentemente descritto in letteratura (82).

In conclusione, l'introduzione del PSA ha rivoluzionato la diagnosi e il monitoraggio del CaP; tuttavia, la controversia sull'utilità del PSA come esame di screening per ridurre la mortalità da CaP e sul rischio associato ad una sovradiagnosi del CaP è ancora aperta. Pertanto, sono necessari nuovi marcatori per migliorare la specificità della determinazione del PSA. L'evidenza suggerisce l'impiego di una strategia multimarcatore per caratterizzare completamente l'eterogeneità fenotipica del tumore della prostata nella popolazione maschile. L'utilizzo di più marcatori in combinazione con i dati clinici e demografici aiuterà ad identificare i pazienti a rischio di sviluppare il CaP e a valutare la loro prognosi. Le innovative piattaforme tecnologiche, già utilizzate per la scoperta dei più recenti marcatori del CaP, contribuiranno alla ricerca di nuovi marcatori; tuttavia, l'impiego di appropriati protocolli di studio e di un'appropriata analisi dei dati clinici rimangono i fattori chiave per ottenere risultati riproducibili e non inficiati da errori sistematici.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007;57:43-66.
2. McDavid K, Lee J, Fulton JP, et al. Prostate cancer incidence and mortality rates and trends in the United States and Canada. Public Health Rep 2004;119:174-86.
3. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, et al. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/mL or lower. JAMA 2005;294:66-70.
4. Aihara M, Lebovitz RM, Wheeler TM, et al. Prostate specific antigen and Gleason grade: an immunohistochemical study of prostate cancer. J Urol 1994;151:1558-64.
5. Bunting PS. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. Clin Chim Acta 2002;315:71-97.
6. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤4.0 ng per milliliter. N Engl J Med 2004;350:2239-46.
7. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. J Natl Cancer Inst 2001;93:1054-61.
8. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). J Natl Cancer Inst 2005;97:1180-4.
9. Finne P, Auvinen A, Määttänen L, et al. Diagnostic value of free prostate-specific antigen among men with a prostate-specific antigen level of <3.0 µg per liter. Eur Urol 2008;54:362-70.
10. Stephan C, Jung K, Lein M, et al. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. Eur J Cancer 2007;43:1918-26.
11. Recker F, Kwiatkowski MK, Piironen T, et al. R. Human glandular kallikrein as a tool to improve discrimination of poorly differentiated and non-organ-confined prostate cancer compared with prostate-specific antigen. Urology 2000;55:481-5.
12. Stephan C, Jung K, Nakamura T, et al. Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. Int J Urol 2006;13:238-43.
13. Haese A, Graefen M, Steuber T, et al. Total and Gleason grade 4/5 cancer volumes are major contributors of human kallikrein 2, whereas free prostate specific antigen is largely contributed by benign gland volume in serum from patients with prostate cancer or benign prostatic biopsies. J Urol 2003;170:2269-73.
14. Steuber T, Vickers AJ, Haese A, et al. Risk assessment for biochemical recurrence prior to radical prostatectomy: significant enhancement contributed by human glandular kallikrein 2 (hK2) and free prostate specific antigen (PSA) in men with moderate PSA-elevation in serum. Int J Cancer 2006;118:1234-40.
15. Elgamal AA, Holmes EH, Su SL, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA): current benefits and future value. Semin Surg Oncol 2000;18:10-6.
16. Mincheff M, Zoubak S, Makogonenko Y. Immune responses against PSMA after gene-based vaccination for immunotherapy-A: results from immunizations in animals. Cancer Gene Ther 2006;13:436-44.
17. Diamandis EP, Okui A, Mitsui S, et al. Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. Cancer Res 2002;62:295-300.
18. Stephan C, Meyer HA, Cammann H, et al. Improved prostate cancer detection with a human kallikrein 11 and percentage free PSA-based artificial neural network. Biol Chem 2006;387:801-5.
19. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, et al.

DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol 2003;44:8-15.
20. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. Clin Chem 2006;52:1089-95.
21. van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. Clin Cancer Res 2007;13:939-43.
22. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. Urology 2007;69:532-5.
23. Laxman B, Morris DS, Yu J, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. Cancer Res 2008;68:645-9.
24. Uetsuki H, Tsunemori H, Taoka R, et al. Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. J Urol 2005;174:514-8.
25. Paul B, Dhir R, Landsittel D, et al. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. Cancer Res 2005;65:4097-100.
26. Leman ES, Cannon GW, Trock BJ, et al. EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. Urology 2007;69:714-20.
27. Diamandis EP. POINT: EPCA-2: a promising new serum biomarker for prostatic carcinoma? Clin Biochem 2007;40:1437-9.
28. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, et al. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. Cancer Res 2002;62:4427-33.
29. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. Histopathology 2004;45:218-25.
30. Rubin MA, Bismar TA, Andren O, et al. Decreased alpha-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:1424-32.
31. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, et al. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. Mol Diagn Ther 2006;10:397-403.
32. Rogers CG, Yan G, Zha S, et al. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme A racemase protein. J Urol 2004;172:1501-3.
33. Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, et al. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2004;96:834-43.
34. McCabe NP, Angwafo FF 3rd, Zaher A, et al. Expression of soluble urokinase plasminogen activator receptor may be related to outcome in prostate cancer patients. Oncol Rep 2000;7:879-82.
35. Steuber T, Vickers A, Haese A, et al. Free PSA isoforms and intact and cleaved forms of urokinase plasminogen activator receptor in serum improve selection of patients for prostate cancer biopsy. Int J Cancer 2007;120:1499-504.
36. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, et al. Elevation of serum levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is associated with disease progression and prognosis in patients with prostate cancer. Prostate 1999;39:123-9.
37. Shariat SF, Roehrborn CG, McConnell JD, et al. Association of the circulating levels of the urokinase system of plasminogen activation with the presence of prostate cancer and invasion, progression, and metastasis. J Clin Oncol 2007;25:349-55.
38. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. Science 1998;279:563-6.
39. Harman SM, Metter EJ, Blackman MR, et al. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:4258-65.
40. Shariat SF, Lamb DJ, Kattan MW, et al. Association of preoperative plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 with prostate cancer invasion, progression, and metastasis. J Clin Oncol 2002;20:833-41.
41. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 2005;310:644-8.
42. Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, et al. Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. Neoplasia 2006;8:885-8.
43. Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. Oncogene 2007;26:4596-9.
44. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. Cancer Cell 2008;13:519-28.
45. Shariat SF, Menesses-Diaz A, Kim IY, et al. Tissue expression of transforming growth factor-β_1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. Urology 2004;63:1191-7.
46. Ivanovic V, Melman A, Davis-Joseph B, et al. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. Nat Med 1995;1:282-4.
47. Shariat SF, Walz J, Roehrborn CG, et al. Early postoperative plasma transforming growth factor-β_1 is a strong predictor of biochemical progression after radical prostatectomy. J Urol 2008;179:1593-7.
48. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature 2002;419:624-9.
49. Rhodes DR, Sanda MG, Otte AP, et al. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2003;95:661-8.
50. Gonzalgo ML, Nakayama M, Lee SM, et al. Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. Urology 2004;63:414-8.
51. Crocitto LE, Korns D, Kretzner L, et al. Prostate cancer molecular markers GSTP1 and hTERT in expressed prostatic secretions as predictors of biopsy results. Urology 2004;64:821-5.
52. Nam RK, Reeves JR, Toi A, et al. A novel serum marker, total prostate secretory protein of 94 amino acids, improves prostate cancer detection and helps identify high grade cancers at diagnosis. J Urol 2006;175:1291-7.
53. Bjartell A, Johansson R, Bjork T, et al. Immunohistochemical detection of cysteine-rich secretory protein 3 in tissue and in serum from men with cancer or benign enlargement of the prostate gland. Prostate 2006;66:591-603.
54. Bjartell AS, Al Ahmadie H, Serio AM, et al. Association of cysteine-rich secretory protein 3 and β-microseminoprotein with outcome after radical prostatectomy. Clin Cancer Res 2007;13:4130-8.
55. Taplin ME, George DJ, Halabi S, et al. Prognostic significance of plasma chromogranin A levels in patients with

hormone-refractory prostate cancer treated in Cancer and Leukemia Group B 9480 study. Urology 2005;66:386-91.
56. Fracalanza S, Prayer-Galetti T, Pinto F, et al. Plasma chromogranin A in patients with prostate cancer improves the diagnostic efficacy of free/total prostate-specific antigen determination. Urol Int 2005;75:57-61.
57. Yashi M, Nukui A, Kurokawa S, et al. Elevated serum progastrin-releasing peptide (31–98) level is a predictor of short response duration after hormonal therapy in metastatic prostate cancer. Prostate 2003;56:305-12.
58. Yashi M, Muraishi O, Kobayashi Y, et al. Elevated serum progastrin-releasing peptide (31–98) in metastatic and androgen-independent prostate cancer patients. Prostate 2002;51:84-97.
59. Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. Cancer Res 1992;52:5104-9.
60. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. Cancer Res 1994;54:3929-33.
61. Wozny W, Schroer K, Schwall GP, et al. Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3. Proteomics 2007;7:313-22.
62. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high Gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. Oncogene 2000;19:1288-96.
63. Gu Z, Yamashiro J, Kono E, et al. Anti-prostate stem cell antigen monoclonal antibody 1G8 induces cell death in vitro and inhibits tumor growth in vivo via a Fc-independent mechanism. Cancer Res 2005;65:9495-500.
64. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, et al. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. J Urol 2004;171:187-91.
65. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature 2001;412:822-6.
66. Shariat SF, Andrews B, Kattan MW, et al. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. Urology 2001;58:1008-15.
67. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. Clin Cancer Res 2000;6:2702-6.
68. Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, et al. Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor β_1 and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. Clin Cancer Res 2004;10:1992-9.
69. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: value for the staging of prostate cancer. Clin Cancer Res 2002;8:1794-9.
70. Wang X, Yu J, Sreekumar A, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. N Engl J Med 2005;353:1224-35.
71. Taylor BS, Pal M, Yu J, et al. Humoral response profiling reveals pathways to prostate cancer progression. Mol Cell Proteomics 2008;7:600-11.
72. Shariat SF, Walz J, Roehrborn CG, et al. External validation of a biomarker-based preoperative nomogram predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy. J Clin Oncol 2008;26:1526-31.
73. Chun FK, Briganti A, Graefen M, et al. Development and external validation of an extended repeat biopsy nomogram. J Urol 2007;177:510-5.
74. Karakiewicz PI, Hutterer GC. Predictive models and prostate cancer. Nat Clin Pract Urol 2008;5:82-92.
75. Parekh DJ, Ankerst DP, Baillargeon J, et al. Assessment of 54 biomarkers for biopsy-detectable prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:1966-72.
76. Stephan C, Xu C, Finne P, et al. Comparison of two different artificial neural networks for prostate biopsy indication in two different patient populations. Urology 2007;70:596-601.
77. Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. Cancer Res 2002;62:3609-14.
78. Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, et al. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2002;94:1576-8.
79. Qu Y, Adam BL, Yasui Y, et al. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. Clin Chem 2002;48:1835-43.
80. Ornstein DK, Rayford W, Fusaro VA, et al. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen levels between 2.5 and 15.0 ng/ml. J Urol 2004;172:1302-5.
81. McLerran D, Grizzle WE, Feng Z, et al. SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer. Clin Chem 2008;54:53-60.
82. Diamandis EP. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. Mol Cell Proteomics 2004;3:367-78.