

ANNEXURES

I. Primers for gene expression study

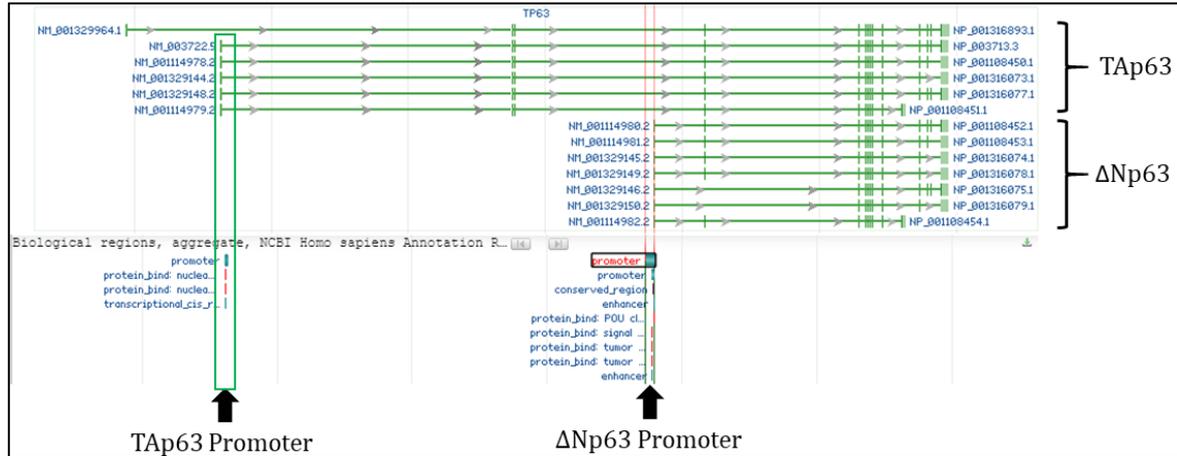
| Sr no | Gene | Sequence (5'-3') | | Product size (BP) | Accession Number |
|-------|---|------------------|-----------------------------|-------------------|------------------|
| 1 | <i>LGR4</i> | FW | GAAGAGCTACAATTGGCGGG | 242 | NM_018490.2 |
| | | RW | CTGTTGTCATCCAGCCACAG | | |
| 2 | β - <i>CATENIN</i> | FW | GCGCCATTTTAAGCCTCTCG | 183 | NM_001904.3 |
| | | RW | AAATACCCTCAGGGGAACAGG | | |
| 3 | <i>NKX3.1</i> | FW | CACGTCCTTCCTCATCCAGG | 158 | NM_001256339 |
| | | RW | GACCCCAAGTGCCTTTCTGG | | |
| 4 | <i>CMYC</i> | FW | TACAACACCCGAGCAAGGAC | 162 | NM_002467.4 |
| | | RW | GAGGCTGCTGGTTTCCACT | | |
| 5 | <i>ΔNP63α</i> | FW | GTACCTGGAAAACAATGCCAG | 162 | NM_001329149.1 |
| | | RW | TGCGCGTGGTCTGTGTTA | | |
| 6 | <i>OCT4</i> | FW | GCTTTGAGCTCCCTCTGGG | 250 | NM_001285986.1 |
| | | RW | TTCTGCTTTGCATATCTCCTGAA | | |
| 7 | <i>SOX2</i> | FW | ATCAGCATGTATCTCCCCGG | 240 | NM_003106.3 |
| | | RW | TACCGGGTTTTCTCCATGCT | | |
| 8 | <i>NANOG</i> | FW | CAGCTGTGTGTAATGATAGATTT | 142 | NM_024865.4 |
| | | RW | CAACTGGCCGAAGAATAGCAATGGTGT | | |
| 9 | <i>KLF4</i> | FW | CGTTGACTTTGGGGTTCAGG | 230 | NM_004235.4 |
| | | RW | AAGTCGCTTCATGTGGGAGA | | |
| 10 | <i>PSA (KLK3)</i> | FW | CCTGCTCGTGGGTCATTCTG | 190 | NM_001030047.1 |
| | | RW | TTGTAGACAGGTCGGTGGGA | | |
| 11 | <i>NOTCH1</i> | FW | ATGCAGAACAACAGGGAGGA | 191 | NM_017617.3 |
| | | RW | ACCAGGTTGTAATCGTCCAG | | |

II. Primers for ChIP study

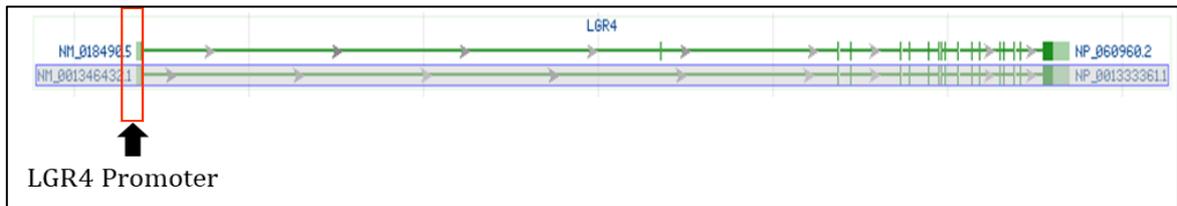
| Sr no | Gene | Sequence (5'-3') | | Product size (bp) | Accession Number |
|-------|----------|------------------|--------------------------|-------------------|------------------|
| 1 | hdNP63-1 | FW | CATAGATGCATCACGTGCA | 259 | NC_000003.12 |
| | | RW | CAGGTAGCTTATTTTGTAAATTGC | | |
| 2 | hdNP63-2 | FW | GCCTTCTAGGCAGTGCTCAT | 183 | NC_000003.12 |
| | | RW | TGACGTGGTCATTGGCTGAT | | |
| 3 | hdNP63-3 | FW | CGGGACCGGTGGTTAACTT | 110 | NC_000003.12 |
| | | RW | GGAGAGAGTACGCAAATCCACT | | |
| 4 | hdNP63-4 | FW | CTTTAGCTATCAGGCAGTGGGT | 165 | NC_000003.12 |
| | | RW | AATCTCCCCAAACAAACCGC | | |
| 5 | hdNP63-5 | FW | GCGGTTTGTGGGGAGATTT | 244 | NC_000003.12 |
| | | RW | GGCGGGACTCTTCTTTTACC | | |

| | | | | | |
|---|---------|----|----------------------|-----|--------------|
| 6 | hLGR4-1 | FW | CTGGCTTCTCAGCCGTAGTC | 250 | NC_000011.10 |
| | | RW | CCTCTCCAGTGCCTCACTTC | | |
| 7 | hLGR4-2 | FW | CCTTTGGAACAGCGGAGAGT | 240 | NC_000011.10 |
| | | RW | TGTCTGGCAGGTTGTGGATT | | |
| 8 | hLGR4-3 | FW | TTCGATGATGATGTTGGGCA | 142 | NC_000011.10 |
| | | RW | CTCACTGCAGGGCTGAAAGA | | |

ΔNP63 Promoter region



LGR4 Promoter Region



III. Primers for miRNA study

| Sr No | miRNA | Primer Sequence (5'-3') | |
|-------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| 1 | h-miR34a-5p | Fw | GCAGTGTCTTAGCTGGTTG |
| 2 | h-miR21-5p | Fw | GCTAGCTTATCAGACTGATGTTGA |
| 3 | h-miR142-3p | Fw | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA |
| 4 | h-miR34b-5p | Fw | TAGGCAGTGTCCATTAGCTGATT |
| 5 | h-miR27a-3p | Fw | TTCACAGTGGCTAAGTTCCG |
| 6 | h-miR199a-3p | Fw | ACAGTAGTCTGCACATTGGTTAAAA |
| 7 | h-let7f-5p | Fw | GCTGAGGTAGTAGATTGTATAGTT |
| 8 | h-let7d-5p | Fw | GAGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT |
| 9 | h-miR34c-5p | Fw | AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTG |
| 10 | h-miR203a-5p | Fw | GTGGTTCTTAACAGTTCAACAGTT |

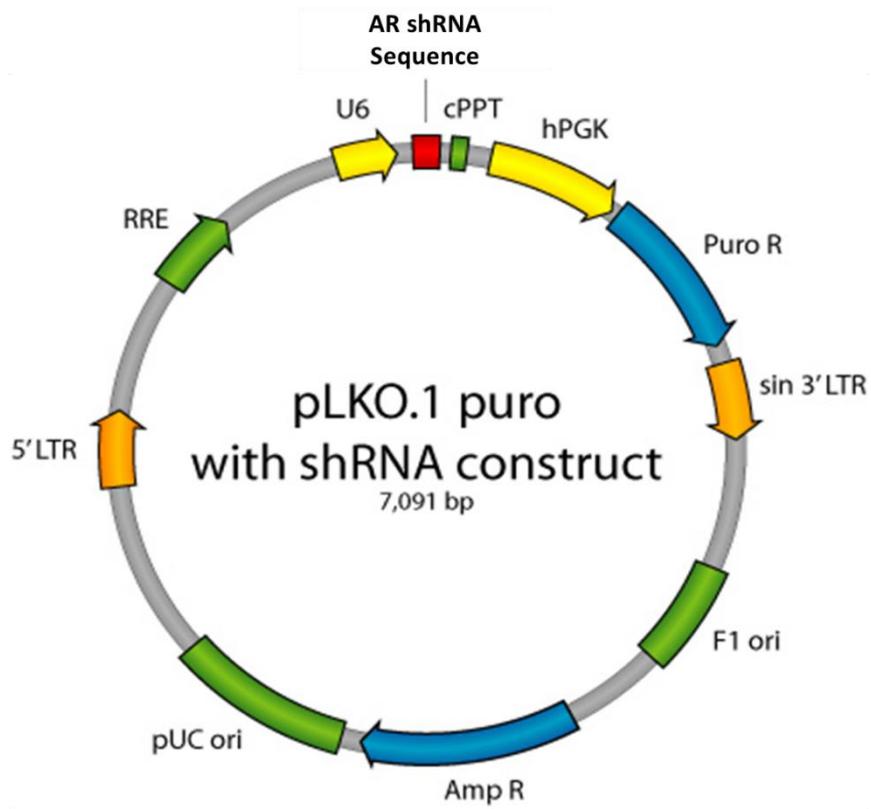
IV. Antibodies for protein expression study

| Sr. No. | Antibody | Make | Catalogue | Applications |
|---------|-------------------------------|-------------------|------------|--------------------|
| 1 | Androgen Receptor | Sigma | A9853 | WB/ICC/IHC/IP/ChIP |
| 2 | ARV7 | Prescision Ab | AG1008 | WB |
| 3 | LGR4 | Thermo Scientific | PA527177 | WB |
| 4 | Δ NP63 | CST | 67825 | WB |
| 5 | H3 (histone) | CST | 14269 | WB |
| 6 | pAR (s210/213) | Invitrogen | MA516221 | WB |
| 7 | PI3K | CST | 42578 | WB |
| 8 | Smad2/3 | CST | 8685S | WB |
| 9 | Total Akt | CST | 4691S | WB |
| 10 | pAkt(s473) | CST | 4060P | WB |
| 11 | β -Actin | BD Bioscience | 612657 | WB |
| 12 | β -Catenin | Sigma | 9AB4500545 | WB/ICC/ChIP/IP |
| 13 | E-Catherin | BD Bioscience | 610181 | WB |
| 14 | α -Smooth Muscle Actin | Sigma | F3777 | ICC |
| 15 | Vimentin | Sigma | C9080 | ICC |
| 16 | Anti-Mouse FITC | Sigma | 8771 | ICC |
| 17 | Total P63 | Sigma | P3737 | WB/ICC/FACS |
| 18 | Ki67 | Sigma | P6834 | WB |
| 19 | pSmad1/5/8 | Millipore | AB3848 | WB |
| 20 | CD133 | Millipore | MAB4399 | FACS |
| 21 | Nanog | BD Bioscience | 560259 | WB |
| 22 | CD44 | BD Bioscience | 553134 | WB |
| 23 | Oct3/4 | BD Bioscience | 560186 | WB |
| 24 | CD133-PE | Biologend | 141203 | FACS |
| 25 | IGF1 | SantaCruz | SC-74116 | WB |
| 26 | CD90 | BD Bioscience | 553012 | FACS |
| 27 | CD117 | BD Bioscience | 553869 | FACS |
| 28 | Sox2 | BD Bioscience | 245610 | WB |
| 29 | CD49f | Biologend | 313611 | FACS |
| 30 | FoxA2 | DHSB | 4C7-S | WB |

DILUTIONS

| | |
|---------|--------|
| WB | 1:1000 |
| FACS | 1:100 |
| ICC | 1:40 |
| ChIP/IP | 1-2ug |

V. AR shRNA Construct



VI. Patient informed consent



PROSTATE DISORDERS – QUESTIONNAIRE

Department of Biochemistry
Faculty of Science
The M.S University of Baroda
Vadodara- 390002

Date:

Serial Code:

Invigilator:

Personal Details:

| | |
|----------|------------------|
| Name: | Age: _____ years |
| Address: | Education: |
| Phone: | Native: |
| | |

Diet: Vegetarian/ Non-vegetarian/ Omnitarian

Additive Habits: Tobacco/ Smoking/ Alcohol/ Others: _____

Occupation: _____

Q- Are you exposed to a pollutant(s) at your work place or at your place of residence? Yes/No

If yes, nature of pollutant: Land/ Water/ Air/ Others: _____

History of Any Major Illness:

Q- Are you suffering from any lifestyle disorder(s)? Yes/No

If yes, nature of disorders: Diabetes/ Obesity/ Cholesterol disorder/ Cardiac disorder/
other: _____

Symptoms associated: _____

Duration of disorder: _____

Q- What made you suspect that you have a prostatic disorder?

Q- Anyone in your family ever detected with a prostatic disorder? Yes/No

If yes, first / second / third degree relative. Relation: _____

Prostatic Disorder(s):

Diagnosis (tick):

[] Free PSA Level: _____ ng/ml and Total PSA Level: _____ ng/ml (blood/ serum)

[] Testosterone: _____ ng/ml (blood/ serum)

[] Digital rectal examination (DRE) [] Trans rectal ultrasound (TRUS)

[] Prostate needle biopsy [] Others: _____

Suspected Prostatic Disorder (tick):

- Prostatitis (if yes, State: acute / chronic)
 - Benign prostatic hyperplasia (if yes, state: mild / moderate / severe)
 - Prostatic cancer (if yes, state: Benign/ Metastatic _____
 - Prostate Intra-epithelial Neoplasia (PIN) Grade: I / II / III
 - Gleason grading stage: 1/2/3/4/5, Gleason score: ____+____= _____)
 - TNM Staging: _____
- Any other associated symptoms? Yes/No (If yes, symptoms _____)

Treatment (tick):

- Antiandrogenic drugs (if yes, which: _____)
 - Any other drug (if yes, nature: _____, which: _____)
 - Transurethral resection of the prostate (TURP)
 - Laser removal of the diseased portion Complete removal of the whole prostate gland
- Post treatment recovery: excellent / good / poor / no response
- Post treatment side effects / symptoms (if any): _____
- General comment: _____

POST EXAMINATION RESULTS OF THE SAMPLE: (If Available)

- SOD activity: _____ enzyme required for 50% inhibition Pyrogallol autoxidation
- Catalase activity: _____ mmoles of H₂O₂ decomposed/ min/g Tissue
- Protein level: ____ μg/ g tissue
- ACP level: ____ μ moles PNP formed/min/l tissue
- LPO level: ____ nmoles of MDA formed/mg Protein
- GPx activity: ____ Δ log (GSH)/min/mg protein
- GSH level: ____ mg/g tissue
- Vitamin E: ____ μg/g tissue or μg/ml serum
- Vitamin C: ____ μg/ml or μg/g tissue serum
- Cd level: ____ μg/ g tissue
- Zn level: ____ μg/ g tissue
- Pd level: ____ μg/ g tissue

I, have understood the aim of this study and willing to donate my prostate tissue and 3 ml blood sample for research purpose.

Patient's signature

Date:



દર્દી માહિતી પત્રક (Patient Information Sheet)

તારીખ : / /

આપની ગોત્રી મેડિકલ હોસ્પિટલમાં થયેલ પ્રોસ્ટેટ ગ્રંથિની શસ્ત્રક્રિયા (ઓપરેશન) વિષે માહિતગાર કરવામાં આવે છે કે;

ગોત્રી મેડિકલ હોસ્પિટલ અને બાયોકેમિસ્ટ્રી વિભાગ, મહારાજા સયાજીરાવ યુનિવર્સિટી બરોડા સંયુક્ત રીતે પ્રોસ્ટેટ ગ્રંથિ ના રોગ પર અધ્યયન કરી રહી છે. આ સબબ, તમોને થયેલ પ્રોસ્ટેટ ગ્રંથિના રોગનું જીણવટ પૂર્વક અધ્યયન કરવા માટે ડૉક્ટર દ્વારા શસ્ત્રક્રિયા દરમિયાન નીકળેલા ગ્રંથિના ભાગ ને અમે અમારી લેબોરેટરીમાં લઇ જવા માંગીએ છીએ. લેબોરેટરીમાં આ ભાગ પર અમે વિવિધ પ્રકારના ટેસ્ટ/પ્રોયોગો કરીશું જેનાથી આ રોગ થવાના કારણો વિગતવાર જાણી શકાશે. વધુ અધ્યયન સબબ, શસ્ત્રક્રિયા દરમિયાન તમારા થોડા (૫ મીલીલીટર) રક્ત ની પણ જરૂરત રહેશે.

આ અધ્યયન અંતર્ગત, અમોને તમારી ખાનગી માહિતી જેવીકે ઉંમર, રહેઠાણ, મોબાઇલ નંબર, અન્ય થયેલા રોગો (ડાયાબિટીસ, બ્લડપ્રેશર વિગેરે) ની પણ જરૂરત રહેશે. તમારી આપેલી તમામ માહિતી ખાનગી રાખવામાં આવશે.

જો તમે આ વિગતો સમજી, અમોને તમારી માહિતી, રક્ત તથા શસ્ત્રક્રિયા દરમિયાન નીકળેલા ગ્રંથિ ના ભાગ આપવા સહમત હશો તો તમારી પ્રાથમિક માહિતી સાથે દર્દી સહમતી-પત્રક (Patient Consent) પર સહી કરી આપવા વિનંતી.

બાયોકેમિસ્ટ્રી વિભાગ,
મહારાજા સયાજીરાવ યુનિવર્સિટી બરોડા,
વડોદરા-૩૯૦૦૦૨, ગુજરાત
મો: ૮૧૪૧૦૮૭૬૦૭

દર્દી સહમતી-પત્રક

Code/Case: _____

Date: / /

Personal Details:

| | |
|---|-------------------------|
| નામ (Name): | ઉંમર (Age): _____ years |
| સરનામું (Address): | શિક્ષણ (Education): |
| Phone: | વતન (Native): |
| Diet: Vegetarian/ Non-vegetarian/ Omnitarian Addiction Habits: Tobacco/ Smoking/ Alcohol/ Others: _____ | |
| Occupation: _____ | |
| Q- Are you exposed to a pollutant(s) at your work place or at your place of residence? Yes/No If yes, nature of pollutant: Land/ Water/ Air/ Others: _____ | |

દર્દી માહિતી પત્રક દ્વારા આપવામા આવેલી ઉપર્યુકત તમામ માહિતીથી હું સંપૂર્ણ અવગત છું.

આ સાથે હું, _____, પુરી સભાનતા સાથે શસ્ત્રક્રિયા (ઓપરેશન) દરમિયાન નીકળેલા પ્રોસ્ટેટના ભાગ તથા રક્તને શંશોધન હેતુથી આપવા માટે સહમત છું.

OR

I have completely understood the information give from Patient Information sheet.

I, _____, give my consent with complete consciousness to provide my surgically removed prostate tissue sample and blood for research purpose.

દર્દીની સહી

(Patient Signature)

નમૂના લેનારની સહી

(Signature of Receiver)