

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Raimonda  
KUBILIŪTĖ

# Šviesių ląstelių inkstų karcinomos diagnostiniai ir prognostiniai DNR metilinimo žymenys

**DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

---

VILNIUS 2021

Daktaro disertacija rengta 2016-2020 metais Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje, Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus Universitete. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir Vilniaus universitetas.

**Mokslinė vadovė – Prof. dr. Sonata Jarmalaitė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Gynimo taryba:

**Pirmininkė – Prof. dr. Rūta Navakauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

**Nariai:**

**Doc. dr. Albertas Daukša** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina, M 001)

**Prof. dr. Artūras Petronis** (Toronto universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010)

**Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

**Prof. dr. Donatas Žvingila** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. gruodžio mėn. 22 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4420; el. paštas [info@gmc.vu.lt](mailto:info@gmc.vu.lt).

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Raimonda  
KUBILIŪTĖ

# Diagnostic and prognostic DNA methylation biomarkers of renal clear cell carcinoma

**SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biology (N 010)

---

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016 and 2020 at the Human Genome Research Laboratory, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania and the scholarship from Vilnius University.

**Academic supervisor – Prof. dr. Sonata Jarmalaitė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. dr. Rūta Navakauskienė** (Vilnius University, Natural sciences, Biology, N 010).

**Members:**

**Assoc. Prof. dr. Albertas Daukša** (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine, M 001)

**Prof. dr. Artūras Petronis** (University of Toronto, Natural Sciences, Biology, N 010)

**Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

**Prof. dr. Donatas Žvingila** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 pm on 22<sup>th</sup> of December 2021 in Room R401 of Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Sauletekio Ave. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania, Tel. +370 5 223 4420; e-mail: [info@gmc.vu.lt](mailto:info@gmc.vu.lt).

The text of this dissertation can be accessed at Vilnius University Library, as well as on the website of Vilnius University: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## PADĖKA

Visų pirma norėčiau išreikšti nuoširdžią padėką savo mokslinei vadovei Prof. Sonatai Jarmalaitei, už tą pokalbį prieš penkis metus, pakeitusį mano gyvenimo planus, dėl kurių visai nesigailiu ir esu be galo dėkinga! Ačiū Jums už suteiktą galimybę atlikti doktorantūros studijas Jūsų vadovaujamoje laboratorijoje, už tikėjimą ir pasitikėjimą tuo, ką darau, už suteiktą laisvę ir savarankiškumą vykdant mokslinius tyrimus bei vertingas pastabas ir palaikymą sunkiausiomis akimirkomis! Atskiras nuoširdus ačiū Prof. Rimantui Daugelavičiui, kurio dėka ir atradau šią laboratoriją.

Dėkoju Kristinai Stuopelytei (Šnipaitienei) už tai, kad buvo drauge ir vedė mane už rankos pačioje doktorantūros pradžioje, už atvirus ir palaikančius pokalbius bei sukurtus linksmus prisiminimus. Dėkoju Kristinai Žukauskaitei už didžiulę ne tik fizinę pagalbą vykdant tyrimus, bet ir suteiktą papildomą motyvaciją, kai jos labiausiai trūko, už sugrąžintą tikėjimą ir kantrybę, vertingas ir linksmas mokslines diskusijas. Nuoširdus ačiū dr. Rasai Sabaliauskaitei ir Algirdui Žalimui už šiltus pokalbius, palaikymą ir geranorišką pagalbą. Dėkoju dr. Kristinai Daniūnaitei, bei buvusiems studentams: Aušrai Šumskaitėi, Mark Bavirš, Rūtai Matuliavičiūtėi ir Eugenijui Ganža vienaip ar kitaip prisidėjusiems prie vykdytų tyrimų.

Už įskiepytą meilę biologijai iš visos širdies norėčiau padėkoti savo biologijos mokytojai Vidutei Tamošaitienei, kuriai, deja, ši kelionė su klastinga liga baigėsi per anksti...

Atskirai norėčiau padėkoti visiems NVI ir VULSK gydytojams, prisidėjusiems prie mėginių ir klinikinių duomenų rinkimo, ypač prof. dr. Feliksui Jankevičiui, dr. Albertui Uliui ir Algirdui Žalimui. Nuoširdus ačiū ligoniams ir jų artimiesiems už sutikimą dalyvauti moksliniuose tyrimuose.

Nepaprastai dėkoju Benui, kuris nuo pačios doktorantūros pradžios man suteikė besąlygišką palaikymą, visada buvo šalia, drauge liūdėjo ir džiaugėsi, tikėjo ir padrąsindavo judėti tolyn!

Didžiausia mano padėka tėvams už jų besąlygišką meilę, tikėjimą manimi ir kantrybę.

## TURINYS

SUTRUMPINIMAI.....	7
ĮVADAS.....	8
MĖGINIAI IR METODAI.....	13
REZULTATAI.....	23
REZULTATŲ APTARIMAS.....	42
IŠVADOS.....	53
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	54
KONFERENCIJŲ PRANEŠIMAI.....	55
SUMMARY.....	57
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	59
PRIEDAI.....	65
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ.....	67

## SUTRUMPINIMAI

<i>ADAMTS19</i>	ADAM metalopeptidazę koduojantis genas.
AK	Asimptotinė kontrolė
AUC	Plotas po ROC kreive (angl. <i>Area under the ROC curve</i> )
BI	Bendras išgyvenamumas
<i>BMP7</i>	Kaulų morfogeninį baltymą 7 koduojantis genas
ccRCC	Šviesių ląstelių inkstų karcinoma (angl. <i>clear cell renal cell carcinoma</i> )
PI	Pasikliautinas intervalas
CpG	Citozino-guanino dinukleotidai
DJ	Diagnostinis jautrumas
DS	Diagnostinis specifiškumas
ECM	Ekstraląstelinis matriksas
EMT	Epitelinė-mezenchiminė tranzicija
<i>FBN2</i>	Fibriliną 2 koduojantis gene
<i>FLRT2</i>	Fibronektinu-leucinu praturtintą transmembraninį baltymą koduojantis gene
GO	Genų ontologija
GSEA	Genų rinkinių praturtinimo analizė
HR	Rizikos santykis (angl. <i>Hazard ratio</i> )
M	Metilinta geno reguliacinių sričių būseną
MSP	Metilinimui jautri PGR
NIA	Histologiškai nepakitę inkstų audiniai
<i>PCDH8</i>	Protokadheriną 8 koduojantis genas
pT	Patologinė naviko stadija
qMSP	Kiekybinė MSP
ROC	Sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. <i>receiver operating characteristic curve</i> )
RT-qPGR	Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR
<i>SFRP1</i>	WNT signalinio kelio inhibitorių koduojantis genas
<i>SIM1</i>	bHLH tipo transkripcijos veiksnį koduojantis genas
<i>TAC1</i>	Tachikininą 1 koduojantis genas
<i>TFAP2B</i>	Transkripcijos veiksnį AP-2 $\beta$ koduojantis genas
TGF- $\beta$	Transformuojantis augimo veiksnys beta
N	Nemetilinta geno reguliacinių sričių būseną
WHO/ISUP	Pasaulio sveikatos organizacijos/Tarptautinė urologinės patologijos draugija
WNT	Su ląstelės diferenciacija susijęs atsako kelias
<i>ZNF677</i>	Cinko pirštų transkripcijos veiksnį koduojantis genas

## IVADAS

Inkstų vėžys – keturiolikta pagal sergamumą neoplastinė liga, esanti tarp dešimties dažniausių vyrų vėžinių susirgimų. Lietuvoje sergamumas inkstų vėžiu yra didžiausias pasaulyje ir užima penktą vietą pagal mirtingumą [pagal Tarptautinę vėžio tyrimų agentūrą <https://gco.iarc.fr/>]. Šviesių ląstelių inkstų karcinoma (angl. *clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*) yra labiausiai paplitęs inkstų vėžio potipis, pasižymintis didžiausiu mirtingumu tarp visų urogenitalinės kilmės navikų [1-3].

Nors dauguma ccRCC atvejų nustatoma ankstyvoje stadijoje, bent penktadaliui pacientų diagnozės metu aptinkamos metastazės, ženkliai sumažinančios pacientų išgyvenamumą [4]. Pagrindinė to priežastis yra asimptotinė ligos eiga. Inkstų vėžio simptomai, tokie kaip skausmas šone, kraujas šlapime ir apčiuopiamas darinys abdominalinėje srityje yra reti (nustatomi 6-10% atvejų) ir siejami jau su pažengusiomis ligos stadijomis [5,6]. Tuo tarpu dauguma ligos atvejų nustatoma atsitiktinai, dėl šiuo metu plačiai kasdienėje praktikoje atliekamų vaizdinimo (ultragarso, kompiuterinės tomografijos ar magnetinio rezonanso) tyrimų dėl įvairių nespecifinių simptomų [1,7]. Neišplitusio vėžio atveju dažniausiai taikomas gydymas – chirurginis naviko pašalinimas, atliekant dalinę ar radikalią nefrektomiją dažniausiai be biopsijos, dėl to pasitaiko perdėto gydymo atvejų, kai dėl gerybinio, pavojaus nekeliančio naviko pašalinamas visas inkstas. Galimybė greta vaizdinimo rezultatų naudoti organizmo skysčiuose aptinkamus molekulinis biožymenis padėtų išvengti šių atvejų, pagerintų ankstyvą inkstų vėžio diagnostiką, palengvintų pacientų stebėseną ir ligos eigos prognozavimą.

Potencialūs molekulinis biožymenų šaltiniai yra navikinis audinys, pvz. biopsija ar naviko rezektatas, ir organizmo skysčiai, pvz. kraujas ar šlapimas. Tačiau biopsijos yra mažiau tinkamos dėl pavojingos ir skausmingos procedūros, subjektyvaus patologų vertinimo, reprezentatyvaus ir pakankamos kokybės audinio poreikio ir griežtų dažno mėginių paėmimo apribojimų. Du pastarieji kriterijai ypač



svarbūs ccRCC atveju, kadangi šiems navikams būdingas aukštas heterogeniškumas, kuris dažnai lieka nepastebėtas tiriant pavienes biopsijas [8-11], kas apsunkina naujų žymenų validavimą. Tuo tarpu organizmo skysčiuose, ypač šlapime, gali būti aptinkamas platesnis spektras (epi)genetinių pakitimų iš įvairių naviko židinių ir net mikrometastatinių vietų. Be to, dėl surinkimo paprastumo, šlapimo mėginiai gali būti dažnai paimami tyrimams, kas leidžia ypač anksti aptikti naviką ir sekti ligos progresavimą realiu laiku.

Neseniai atlikti tyrimai parodė, jog kloninė ccRCC navikų ekspansija yra lėtas procesas ir įvykus pirminiam genetiniam pakitimui, kliniškai navikas gali likti nepastebimas iki 50 metų [8]. Nors pradiniuose kancerizacijos etapuose histologiniai pokyčiai neaptinkami, šiuose audiniuose jau pradeda kauptis įvairūs DNR metilinimo pakitimai [12], kas leidžia juos pritaikyti ankstyvai ligos diagnostikai. DNR metilinimas yra plačiausiai išstudijuotas epigenetinis fenomenas, reguliuojantis genų raišką ir siejamas su įvairiais inkstų vėžio klinikiniais potipiais [13]. Be to, inkstų vėžio atveju genetiniai pokyčiai yra gana reti, tuo tarpu DNR metilinimo pakitimai yra kur kas dažnesni [14] ir gali būti lengvai aptinkami kūno skysčiuose palyginti nebrangiais ir paprastais PGR metodais. Taigi, DNR metilinimo pokyčiai gali pasitarnauti kaip neinvaziniai molekuliniai biožymenys, kurie gali būti panaudojami kaip priemonė gydytojams greitam ir tiksliam ligos aptikimui, stebėsenai ar net gydymo pritaikymui.

Nepaisant aukštų mirtingumo nuo inkstų vėžio rodiklių ir DNR metilinimo perspektyvumo, šiuo metu klinikoje nėra jokių diagnostinių ar prognostinių inkstų vėžiui specifinių molekulių biožymenų. Priešingai, DNR metilimu paremti testai kitiems urogenitaliniams (pvz. prostatos, šlapimo pūslės) navikams komerciškai prieinami jau ilgą laiką [15]. Iki šiol paskelbta tik nedaugelis tyrimų, kuriuose buvo analizuotas DNR metilinimas inkstų vėžiu sergančių pacientų šlapimo mėginiuose [16-22]. Dauguma šių studijų buvo atliktos labai mažose ir heterogeniškose (įtraukiant įvairius inkstų vėžio potipius) kohortose bei tiriant pavienius naviką

slopinančius genus, kurių metilinimas aptinkamas daugelyje vėžio tipų, todėl jų pritaikomumas klinikinei praktikai labai ribotas. Naujų žymenų atrinkimas ir pritaikymas klinikoje yra sudėtingas ir daugiapakopis procesas, reikalaujantis reprezentatyvaus ir didelio ištirtų pacientų kiekio bei validavimo etapų. Tačiau DNR metilinimas yra perspektyvus ir daug žadantis naujų inkstų vėžio biožymenų šaltinis ir yra vertas šių pastangų.

Šio tyrimo **tikslas** buvo nustatyti skirtingai metilintus genus šviesių ląstelių inkstų karcinomos audiniuose, įvertinti jų diagnostinę ir prognostinę reikšmę bei galimybę panaudoti kaip neinvazinius, ligojų šlapime aptinkamus molekulinis biožymenis.

Šiam tikslui išskelti **uždaviniai**:

1. Ištirti visuminį DNR metilinimo ir genų raiškos profilį navikiniuose ir poriniuose histologiškai nepakitusiuose inkstų audiniuose, siekiant nustatyti ccRCC specifinius DNR metilinimo pakitimus ir išreguliuotus molekulinis atsako kelius.
2. Nustatyti dešimties baltymus koduojančių genų (*ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI* ir *SFRP1*) reguliacinių sričių DNR metilinimo skirtumus navikiniuose ir histologiškai nepakitusiuose inkstų audiniuose ir įvertinti jų diagnostinę bei prognostinę reikšmę;
3. Ištirti šešių atrinktų genų (*ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2*) iRNR raišką navikiniuose ir histologiškai nepakitusiuose inkstų audiniuose, įvertinti sąsają su DNR metilinimo būseną ir pacientų klinikiniais-patologiniais rodikliais.
4. Validuoti atrinktų genų (*ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2*) DNR metilinimo pokyčius pacientų, kuriems nustatytas ccRCC ir asimptomatinių kontrolių (sveikų asmenų) šlapimo mėginiuose bei įvertinti šių žymenų pritaikomumą neinvaziniam ligos aptikimui ir prognozavimui.

## **Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė**

Šio tyrimo metu pirmą kartą Lietuvos ccRCC ligonių imtyje buvo tiriamas DNR metilinimas ir genų raiška, tiek visą genomą apimančiais, tiek ir konkrečių genų-taikinių analizės metodais. Gauti rezultatai pagilino supratimą apie DNR metilinimo vadmenį inkstų vėžio vystymesi ir išreguliuotus signalinius kelius.

Visą genomą apimanti DNR metilinimo profilio analizė mikrogardelių metodu leido identifikuoti potencialius inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenis, turinčius vidutinį ir aukštą diagnostinį ir prognostinį potencialą. Be to, nustatyti DNR metilinimo pokyčiai reguliacinėse baltymus koduojančių genų srityse buvo aptikti ir ligonių šlapimo mėginiuose. Taigi, gauti rezultatai atskleidė atrinktų genų kaip neinvazinių ligos biožymenų potencialą, kurie gali būti panaudoti tolimesniam šlapimu pagrįsto inkstų vėžio testo kūrimui.

Daugumos atrinktų genų (*ZNF677*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI*) DNR metilinimas tiek ccRCC audiniuose tiek šlapimo mėginiuose buvo tiriamas pirmą kartą ir parodė daug žadančius rezultatus dėl jų sąsajos su bent vienu klinikiniu-patologiniu pacientų rodikliu. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, perspektyviausias yra transkripcijos veiksnį (cinko piršto baltymą 677 (*ZNF677*)) koduojantis genas dėl jo DNR metilinimo sąsajos su sumažėjusia geno raiška, daugybe klinikinių-patologinių rodiklių bei bendru pacientų išgyvenamumu. Be to, *ZNF677* kombinacijoje su ląstelės adhezijos baltymą Protokadheriną 8 (*PCDH8*) koduojančiu genu pasižymėjo vidutine diagnostine ir ypač aukšta prognostine savybėmis tiriant ligonių šlapimo mėginius. Nors tolimesni validavimo etapai yra būtini siekiant patvirtinti šiuos rezultatus, gauti duomenys yra daug žadantys ir tikėtina, paskatins tolimesnį naujo molekulinio testo, skirto inkstų vėžio aptikimui ir stebėsenai, vystymą.

## **Ginamieji teiginiai:**

1. DNR metilinimo ir genų raiškos pokyčiai navikiniuose inkstų audiniuose yra gausūs ir pažeidžia įvairius biologinius ir

- molekulinius procesus, tiesiogiai susijusius su vėžio vystymusi ir progresavimu.
2. Baltymus koduojančių genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIM1* ir *SFRP1* reguliacinių sričių metilinimas yra inkstų vėžiui specifinis. Šešių genų kombinacija (*ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* & *SFRP1*) dėl aukšto jautrumo ir specifiškumo gali būti naudojama kaip įrankis ligos diagnozavimui.
  3. Tirtų genų, ypač *ZNF677* ir *PCDH8* metilinimas reikšmingai susietas su svarbiausiais inkstų vėžio prognostiniais rodikliais (naviko dydžiu, stadija, laipsniu ir nekroze) ir yra potencialūs prognostiniai ccRCC biožymenys. Metilinta genų *ZNF677* ir *FBN2* taip pat įvairių dviejų-keturių genų kombinacijų būseną ccRCC audiniuose reikšmingai siejasi su trumpesniu bendru ccRCC ligonių išgyvenamumu ir gali būti pritaikoma kaip įrankis ligos prognozavimui.
  4. Metilinta geno *ZNF677* būseną ccRCC audiniuose yra tiesiogiai susijusi su sumažėjusia raiška, kuri savo ruožtu siejasi su daugeliu nepalankių klinikinių patologiinių rodiklių ir trumpesniu bendru ligonių išgyvenamumu, todėl *ZNF677* yra itin perspektyvus ccRCC biožymuo.
  5. Baltymus koduojančių genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimo lygis yra aukštesnis pacientų, kuriems diagnozuotas ccRCC šlapimo mėginiuose, lyginant su sveikų asmenų mėginiais. Genų *ZNF677* & *PCDH8* kombinacija su ar be *FBN2* ar *FLRT2* pasižymi aukštu jautrumu bei specifiškumu ccRCC navikams ir gali būti pritaikoma neinvaziniam ligos aptikimui;
  6. Metilinta genų rinkinio *ZNF677* & *PCDH8* būseną yra stiprus nepriklausomas prognostinis ccRCC ligonių bendro išgyvenamumo rodiklis ir galėtų būti pritaikomas neinvaziniam ligos prognozavimui.

# MĖGINIAI IR METODAI

## Ligoniai ir mėginiai

Šiam tyrimui atlikti buvo gautas Lietuvos Bioetikos Komiteto leidimas (Nr. 158200-18/12-1077-585). Visi į tyrimą įtraukti asmenys pasirašė informuoto asmens sutikimo formą.

Į šį tyrimą iš viso įtraukta 123 pacientai, kuriems buvo diagnozuotas inkstų vėžio ccRCC potipis ir atlikta dalinė ar radikali nefrektomija Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Urologijos centre 2013-2016 metais. Histologiškai nepakitę inkstų audiniai buvo surinkti iš 51 paciento ir naudojami kaip kontrolinė grupė. Iš šios inkstų audinių kolekcijos, 11 ccRCC ir porinių histologiškai nepakitusių inkstų audinių (NIA) buvo naudojami visuminiam DNR metilinimo profiliui nustatyti iš kurių 4-iems ccRCC ir poriniams NIA buvo įvertintas ir genų raiškos profilis. Pasirinktų genų DNR metilinimo pokyčių validavimui buvo panaudoti visi 123 ccRCC ir 45 NIA. Visi inkstų audiniai buvo surinkti ir histologiškai įvertinti Valstybiniame patologijos centre. Teigiami chirurginiai kraštai (neradikalus naviko pašalinimas) buvo nustatyti 11 pacientų. Navikai buvo kategorizuojami pagal patloginę stadiją ir histologinį potipį. Branduolio diferenciacijos laipsnis nustatytas pagal Fuhrman [23] ir Pasaulio Sveikatos Organizacijos (angl. *World Health Organization* (WHO))/Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (angl. *International Society of Urological Pathology* (ISUP)) [24] vertinimo sistemas. Bendro išgyvenamumo duomenys buvo prieinami 87% visų pacientų (107/123); ligonių stebėsenos mediana – 59 mėnesiai (diapazonas 1-79 mėnesiai). Stebėsenos duomenys visiems pacientams buvo atnaujinti 2020 metų vasario mėnesį.

Šlapimo nuosėdų mėginiai buvo surinkti iš visų 123 ligonių bei 92 sveikų asmenų (asimptominė kontrolė (AK)).

Visi surinkti demografiniai bei klinikiniai-patologiniai tirtų asmenų rodikliai pateikti **1 lentelėje**.

**1 lentelė.** Demografiniai ir klinikiniai-patologiniai į tyrimą įtrauktų asmenų rodikliai.

Rodikliai	Visuminė DNR metilinimo analizė		Visuminė genų raiškos analizė		DNR metilinimo analizė MSP (audiniai) ir qMSP (šlapimas) metodais			Kaplano-Mejerio ir Kokso išgyvenamumo analizė	
	ccRCC (N=11)	NIA (N=11)	ccRCC (N=4)	NIA (N=4)	*ccRCC (audiniai + šlapimas) (N=123)	*NIA (audiniai) (N=45)	AK (šlapimas) (N=92)	**Išgyvenę ligoniniai (N=86)	**Mirties atvejai (N=21)
<b>Amžius, metai</b>									
Vidurkis ±SN, [intervalas]	61±4 [55; 66]	61±4 [55; 66]	62±4 [57; 66]	62±4 [57; 66]	63±12 [21; 85]	63±15 [21; 85]	60±9 [27; 82]	61±12 [21; 84]	72±9 [50; 85]
<b>Lytis</b>									
Vyrai	6 (55%)	6 (55%)	3 (75%)	3 (75%)	64 (52%)	20 (44%)	49 (53%)	40 (47%)	15 (71%)
Moterys	5 (45%)	5 (45%)	1 (25%)	1 (25%)	59 (48%)	25 (56%)	43 (47%)	46 (53%)	6 (29%)
<b>Patologinė stadija</b>									
pT1	4 (36%)	-	-	-	52 (42%)	-	-	44 (51%)	4 (19%)
pT2	-	-	-	-	5 (4%)	-	-	5 (6%)	-
pT3	4 (36%)	-	1 (25%)	-	61 (50%)	-	-	36 (42%)	15 (71%)
pT4	3 (28%)	-	3 (75%)	-	5 (4%)	-	-	1 (1%)	2 (10%)
<b>Naviko dydis, mm</b>									
Vidurkis ±SN, [intervalas]	48±29 [20; 95]	-	80±23 [45; 95]	-	57±29 [20; 180]	-	-	51±27 [20; 180]	64±29 [25; 130]
<b>Fuhrman laipsnis</b>									
1	-	-	-	-	4 (3%)	-	-	-	-
2	4 (36%)	-	-	-	46 (37%)	-	-	3 (3%)	8 (38%)
3	6 (55%)	-	3 (75%)	-	64 (52%)	-	-	35 (41%)	10 (48%)
4	1 (9%)	-	1 (25%)	-	6 (5%)	-	-	45 (53%)	3 (14%)
Nežinoma	-	-	-	-	3 (3%)	-	-	3 (3%)	-

**1 lentelė. Tęsinys.**

Rodikliai	Visuminė DNR metilinimo analizė		Visuminė genų raiškos analizė		DNR metilinimo analizė MSP (audiniai) ir qMSP (šlapimas) metodais			Kaplano-Mejerio ir Kokso išgyvenamumo analizė	
	ccRCC (N=11)	NIA (N=11)	ccRCC (N=4)	NIA (N=4)	*ccRCC (audiniai + šlapimas) (N=123)	*NIA (audiniai) (N=45)	AK (šlapimas) (N=92)	**Išgyvenę ligoniniai (N=86)	**Mirties atvejai (N=21)
WHO/ISUP laipsnis									
1	-	-	-	-	6 (5%)	-	-	4 (5%)	-
2	6 (55%)	-	-	-	71 (58%)	-	-	57 (66%)	9 (43%)
3	5 (45%)	-	4 (100%)	-	46 (37%)	-	-	25 (29%)	12 (57%)
Intravascular invazion									
Nėra	6 (55%)	-	1 (25%)	-	83 (67%)	-	-	66 (77%)	12 (57%)
Yra	5 (45%)	-	3 (75%)	-	40 (33%)	-	-	20 (23%)	9 (43%)
Naviko invazija į riebalus									
Nėra	7 (64%)	-	2 (50%)	-	73 (59%)	-	-	59 (69%)	7 (33%)
Yra	4 (36%)	-	2 (50%)	-	50 (41%)	-	-	27 (31%)	14 (67%)
Naviko nekrozė									
Nėra	8 (72%)	-	2 (50%)	-	94 (76%)	-	-	73 (85%)	10 (48%)
Yra	3 (28%)	-	2 (50%)	-	29 (24%)	-	-	13 (15%)	11 (52%)

ccRCC – šviesių ląstelių inkstų karcinoma (angl. *clear cell renal cell carcinoma*); NIA – nepakitę inkstų audiniai; AK – asimptominė kontrolė; SN – standartinis nuokrypis; MSP – metilinimui jautri PGR (angl. *Methylation specific PCR*); qMSP – kiekybinė MSP (angl. *quantitative MSP*). WHO/ISUP – Pasaulio sveikatos organizacijos/Tarptautinė urologinės patologijos draugija.

\*Genų raiška taip pat buvo tiriama ccRCC ir NIA audiniuose, įtrauktuose į DNR metilinimo analizę;

\*\*Išgyvenamumo duomenys atnaujinti 2020 metais vasario mėnesį.

## DNR gryninimas ir modifikacija bisulfitu

Homogenizuoti inkstų audiniai ir šlapimo nuosėdų mėginiai 55 °C temperatūroje iki 18 valandų veikiami su 10-25 µL proteinazės K (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva) ir 500 µL lizės buferio, susidedančio iš 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween-20 (audiniams) arba 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS, 75 mM NaCl (šlapimo nuosėdoms) (visi reagentai iš Carl Roth, Karlsrūjė, Vokietija). Tolimesnis DNR skyrimas vykdytas pagal standartinį fenolio-chloroformo ir išsodinimo etanolio protokolą. Išskirtos DNR koncentracija ir grynumas matuojami spektrofotometriškai, naudojant NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, JAV) prietaisą. Visuminei metilinimo analizei atrinktų mėginių DNR integralumas papildomai tikrinamas elektroforetiškai.

Konkrečių genų-taikinių metilinimo analizei, iki 400 ng išgrynintos DNR modifikuojama bisulfitu, naudojant *EZ DNA Methylation™ Kit* (Zymo Research, Irvinas, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Skirtingai nuo pateikto protokolo, pirminis DNR inkubacijos etapas atliekamas prie 42 °C (vietoje siūlomų 37 °C).

## RNR gryninimas

Visuminė RNR iš homogenizuotų inkstų audinių išskirta naudojant reagentų rinkinį *mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Foster Sitis, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Aprašant trumpai, ~30 mg homogenizuoto audinio veikama 500 µL *Lysis/Binding* buferiu 10 min ant ledo. Po inkubacijos pridedama 50 µL miRNA homogenato, mėginiai dar 10 min laikomi lede. Visuminė RNR gryninama su 500 µL fenolio-chloroformo. Išgrynintos RNR eliacijai naudota 100 µL rinkinio sudėtyje esančio 95°C išskyrimo buferio.



Išskirtos RNR koncentracija ir grynumas matuoti spektrofotometriškai naudojant NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, JAV) prietaisą. Visuminei mRNR raiškos analizei atrinktų mėginių RNR integralumas papildomai tikrinamas elektroforetiškai.

### Visuminė DNR metilinimo analizė

DNR metilinimo mikrogardelės. Visuminei DNR metilinimo analizei buvo atrinkta 11 ccRCC ir porinių NIA. Šis tyrimo etapas atliktas naudojant dvispalves žmogaus DNR metilinimo mikrogardelės *Human DNA Methylation 1×244K Microarrays* ir laikantis gamintojo protokolo G4170-90012 v2.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, JAV). Gauti duomenys viešai prieinami GEO duomenų bazėje (GSE166734; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Aprašant trumpai, 5 µg išgrynintos DNR skiedžiama su 1×PBS ir sonikuojama į 150-1000 bp dydžio fragmentus, naudojant *Covaris M220 focused-ultrasonicator*™ (Voburnas, Masačusetas, JAV) prietaisą. Metilintos DNR imunoprecipitacijai (IP), 200 µL (~4 µg) sonikuotos DNR sumaišoma su 50 µL magnetinių dalelių (DynaBeads Pan Mouse IgG, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Karlsbadas, JAV), pažymėtų su 5-metilcitozinu (5-mC) besijungiančiais monokloniniais antikūnais 33D3 (Diagenode) ir 250 µL 2×IP buferio. Mėginiai švelniai maišomi 18 valandų, 4 °C temperatūroje mėgintuvėlių rotatoriuje *Stuart tube rotator SB3* (Cole-Parmer, Vernonhilsas, JAV). Tiek imunoprecipituota DNR (IP-DNR), tiek referentinė DNR (Ref-DNR) gryninama fenoliu-chloroformu (CarlRoth) naudojant *MaXtract* didelio tankio geliu užpildytus mėgintuvėlius (Qiagen, Valensija, JAV). Po gryninimo, IP-DNR ir Ref-DNR žymimos fluorescuojančiais dažais atitinkamai Cianinu 5 ir Cianinu 3, naudojant *SureTag DNA Labeling Kit* reagentų rinkinį ir gamintojo protokolą (Agilent Technologies). Mėginių išėiga ir dažų specifinis aktyvumas įvertinamas spektrofotometriškai. To paties

mėginio IP-DNR ir Ref-DNR sumaišoma ir hibridizuojama ant *Human DNA Methylation 1×244K* mikrogardelės (dizaino nr. 023795). Hibridizacija vykdoma hibridizacijos krosnyje (Agilent Technologies) 40 valandų esant 65°C temperatūrai. Pasibaigus hibridizacijai, mikrogardelės plaunamos atitinkamų buferių sistemoje ir nedelsiant skenuojamos *Agilent G4900DA SureScan* mikrogardelių skeneriu (Agilent Technologies). Iš gautų *TIFF* formato failų, skaitiniai fluorescencijos (DNR metilinimo) įverčiai išgauti naudojant *Feature Extraction software v10.7.3.1* (Agilent Technologies) programą.

Duomenų apdorojimas ir analizė. Visi skaičiavimai toliau vykdomi naudojant GeneSpring GX v14.9 (Agilent Technologies) programinę įrangą. Visi mikrogardelių duomenys normalizuoti naudojant tą pačią procedūrą. Prisotinti, netolygūs atskirų zondų signalai ir jų išskirtys, taip pat zondai, kurie nebuvo detektuoti bent viename iš mėginių, buvo pašalinti iš tolimesnės analizės. Skaičiavimams buvo naudojami logaritmuoti IP-DNA/Ref-DNA santykio duomenys, atspindintys metilintos ir nemetilintos DNR kiekį mėginyje. Konkrečių zondų anotacijos gautos iš *SureDesign* platformos (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>). Įvairių grupių palyginimui DNR metilinimo skirtumas kartais (angl. *fold change (FC)*) buvo apskaičiuojamas naudojant porinį arba neporinį t-testą. Gautas reikšmingumo lygmuo (P reikšmė) buvo koreguojamas naudojant griežtą daugybinio testavimo *Benjamini-Hochberg* (FDR) korekciją. Tuo atveju, kai jokių patikimų reikšmių nenustatoma, ši korekcija netaikoma. Šiame tyrime *Benjamini-Hochberg* (FDR) korekcija buvo pritaikyta tik ccRCC vs. NIA lyginimo grupėje. Rezultatai laikyti reikšmingais, kai  $FC \geq 1,5$  ir  $P < 0,050$ .

## Genų raiškos profilio analizė

Visuminė genų raiškos analizė atlikta 4-iuose ccRCC ir poriniuose NIA mėginiuose, kurie buvo naudojami ir visuminei DNR metilinimo analizei. Šis tyrimo etapas atliktas naudojant vienspalvės žmogaus genų raiškos mikrogardeles *SurePrint G3 Human Gene Expression (v2) 8×60 K* (dizaino nr. 072363) ir laikantis gamintojo protokolo G4140-90040 Version 6.9.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, JAV). Gauti duomenys viešai prieinami GEO duomenų bazėje (GSE168845; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Aprašant trumpai, kiekvieno mėginio 100 ng išskirtos RNR ruošama pagal *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.5* ir *Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color* protokolus (Agilent Technologies). Paruošti mėginiai hibridizuojami ant *Human Gene Expression (v2) 8×60 K* mikrogardelės hibridizacijos krosnyje (Agilent Technologies) 17 valandų esant 65°C temperatūrai. Pasibaigus hibridizacijai, mikrogardelės plaunamos naudojant *Gene Expression Wash Buffer Kit* buferių sistemą ir nedelsiant skanuojamos Agilent G4900DA SureScan mikrogardelių skeneriu (Agilent Technologies). Iš gautų *TIFF* formato failų, skaitiniai fluorescencijos įverčiai išgauti naudojant *Feature Extraction software v10.7.3.1* (Agilent Technologies) programą.

Visi skaičiavimai toliau vykdomi naudojant GeneSpring GX v12.6 (Agilent Technologies) programinę įrangą. Prisotinti, netolygūs atskirų zondų signalai ir jų išskirtys buvo pašalinti iš tolimesnės analizės. Konkrečių zondų anotacijos gautos iš SureDesign platformos (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>). Navikinių ccRCC ir NIA mėginių genų raiškos profilis buvo palygintas apskaičiuojant FC reikšmes poriniu t-testu be daugybinio testavimo Benjamini-Hochberg (FDR) korekcijos. Genų raiškos skirtumai laikyti patikimais, kai  $FC \geq 2,0$  ir  $P < 0,050$ .

## Molekulinių atsako kelių analizė

Genų ontologijos (GO) ir atsako kelių analizė atlikta internetiniu genų rinkinių praturtinimo (angl. *Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*) įrankiu, naudojančiu MSigDB v5.2 duomenų bazėje (<http://software.broadinstitute.org/gsea>) esančias genų rinkinių kolekcijas. Rezultatai laikyti reikšmingais, kai FDR q reikšmės buvo < 0,050.

### Genų-taikinių analizė kokybiniu metilinizimui jautrios PGR metodu

Kiekybinei atrinktų genų DNR metilinizimo analizei metilinizimui jautrios PGR (angl. *methylation-specific PCR (MSP)*) metodu buvo naudojama bisulfitu modifikuota DNR. Pradmenys metilintai ir nemetilintai DNR sekoms sukurti naudojant *Methyl Primer Express® v1.0* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Karlsbadas, JAV) programą. Pradmenys sukurti taip, kad persidengtų su mikrogardelių metodu nustatytais hipermetilintais zondais ar būtų šalia jų. Pradmenų sekos užsakytos iš Metabion (Martinsried, Vokietija). MSP reakcijos mišinio (iš viso 25 µL) sudėtis: 1× PCR Gold buferio, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM kiekvieno dNTP, 1,25 U AmpliTaq Gold® 360 DNR polimerazės (Applied Biosystems™, Thermo Scientific™), 1 µL of 360 GC stipriklio (angl. *enhancer*), 1 µM kiekvieno iš pradmenų, ir ~10 ng bisulfitu modifikuotos DNR. Termociklinimo programą sudarė 35-38 ciklai, pradmenų prijungimas vykdytas prie 58-65°C temperatūros. Kiekvienos reakcijos metu naudota teigiama (metilinta), neigiama (nemetilinta) ir taršos (angl. *no-template control (NTC)*) kontrolės. MSP metu susidarę produktai analizuoti 3% agarozės gelyje, paruoštame naudojant 1× TAE buferį ir etidžio bromidą (Carl Roth).

## Genų-taikinių analizė kiekybiniu metilinizavimu jautrios PGR metodu

Pradmenys ir zondai kiekybinei MSP (angl. *quantitative MSP* (*QMSP*)) analizei sukurti naudojant *Methyl Primer Express*® v1.0 (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, JAV) programą ir užsakyti iš Metabion (Martinsried, Vokietija). Visi pradmenys ir zondai sukurti taip, kad perdengtų bent dalį MSP pradmenų sekos. Pradinio DNR kiekio normalizavimui naudota *ACTB* (aktinas-β) endogeninė kontrolė. Kiekvienas mėginys su atskiram genui skirtais pradmenimis tirtas trijuose atskiruose šulinėliuose. Reakcijos mišinio (iš viso 20 μL) sudėtis: 1×*TaqMan*® *Universal Master Mix II, no UNG* (Applied Biosystems™), 300 nM kiekvieno pradmens, 50 nM zondo ir ~10 ng bisulfitu modifikuotos DNR. Termociklinimo programą sudarė 50 ciklų: 95 °C, 15 s ir 60 °C 60 s. Į kiekvieną reakciją įtraukta teigiama (metilinta) ir NTC kontrolės. Amplifikacija vykdyta naudojant *ViiA7 qPCR* (Applied Biosystems™) sistemą. Rezultatai apdoroti naudojant *QuantStudio Real-Time PCR Software* (Thermo Scientific) programinę įrangą. Genų-taikinių metilinizavimo lygis procentais apskaičiuotas naudojant  $\Delta\Delta C_q$  algoritimą.

## Genų-taikinių raiškos analizė kiekybinės PGR metodu

Siekiant atlikti genų raiškos analizę kiekybiniu PGR metodu, pradžioje panaudojus iki 100 ng išskirtos visuminės RNR buvo susintetinta komplementari DNR (kDNR) naudojant *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) reagentų rinkinį ir gamintojo protokolą.

Šešių baltymus koduojančių genų (*ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*) ir endogeninės kontrolės geno (*HPRT1*) raiška tirta naudojant komercinius *TaqMan*® *Gene Expression Assays* pradmenų ir zondų rinkinius (atitinkamai Hs00737026\_m1, Hs00266592\_m1, Hs00159910\_m1, Hs01560931\_m1,

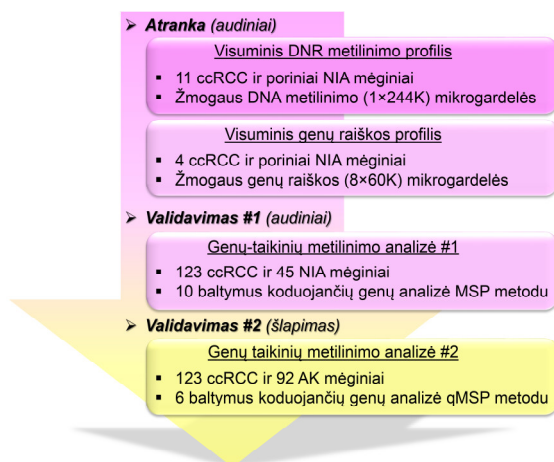
Hs00243225\_m1, Hs00544171\_s1 and Hs02800695\_m1; Applied Biosystems™). Kiekvienas mėginys su kiekvinam genui skirtais pradmenimis buvo tiriamas dviejuose atskiruose šulinėliuose. Reakcijos mišinio (iš viso 20 µL) sudėtis: 1× *TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG* (Applied Biosystems™), 0,6 µL *TaqMan® Assay* ir 2 µL kDNR. Termociklinimo programą sudarė 40 ciklų: 95 °C, 15 s ir 60 °C 60 s. Į kiekvieną reakciją įtraukta NTC kontrolė. Amplifikacija vykdyta naudojant *ViiA7 qPCR* (Applied Biosystems™) sistemą. Rezultatai apdoroti naudojant GenEx v6.0.1 programą (MultiD Analyses, Geteborgas, Švedija). Skaičiavimams naudotos santykinės (normalizuotos pagal *HPRT1*) genų raiškos vertės logaritminėje skalėje.

### Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant *STATISTICA™ v8.0* (StatSoft, Tulsa, JAV), *MedCalc® v14.0* (MedCalc Software, Ostendas, Belgija) ir *GraphPad Prism v5.03* (GraphPad Software, Lojola, JAV) programas. Parametrinių kintamųjų lyginimui naudotas dvipusis Fišerio tikslusis testas, o neparametrinių kintamųjų – Mano-Vitnio U testas. Sąsajos tarp dviejų neparametrinių kintamųjų įvertintos naudojant Spirmano ( $R_s$ ) koreliacijos koeficientą. Siekiant įvertinti atrinktų biožymenų diagnostinį potencialą, atlikta ROC (angl. *receiver operating characteristic*) kreivių analizė ir apskaičiuota AUC (angl. *area under the curve*) reikšmė. Diagnostinio testo parametrai – jautrumas ir specifiškumas apskaičiuoti iš ROC kreivių pagal Judeno indeksą (angl. *Youden's index*) – labiausiai nuo diagonalės nutolusį ROC kreivės tašką, užtikrinantį optimalų analizuojamų mėginių kategorizavimą į metilintus ir nemetilintus. Įvairių genų kombinacijų analizei buvo atlikta logistinė regresija. Ligonų bendro išgyvenamumo analizė atlikta lyginant Kaplano–Mejerio kreives logranginiu testu, bei vienmatę ir daugiamatę Kokso proporcingos rizikos analizę. Apskaičiuoti skirtumai ir koreliacijos laikytos statistiškai reikšmingomis, kai  $P < 0,050$ .

## REZULTATAI

Šiame darbe inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenų tyrimai susidėjo iš trijų etapų (**1 pav.**). Visų pirma buvo atlikta visuminė DNR metilinimo ir genų raiškos profilio analizė ccRCC ir nepakitusiuose inkstų audiniuose (NIA) [25,26]. Atsižvelgiant į gautus rezultatus ir literatūroje prieinamus duomenis apie galimai su vėžio vystymusi susijusius genus, atrinkta dešimt baltymus koduojančių genų kaip potencialių inkstų vėžio biožymenų, tolimesniam validavimui. Sekančiame etape atlikta genų-taikinių DNR metilinimo analizė metilinimui jautrios PGR metodu ccRCC ir NIA mėginiuose [25,26]. Pagal gautus metilinimo dažnius vertinta atrinktų biožymenų diagnostinė reikšmė, sąsajos su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais ir bendru išgyvenamumu. Šiame etape atrinkti šeši genai, kurie toliau analizuoti tų pačių ligonių ir sveikų asmenų (asimptomatinių kontrolių (AK)) šlapimo mėginiuose, siekiant įvertinti šių biožymenų pritaikomumą neinvazinei inkstų vėžio diagnostikai ir prognozavimui [25].

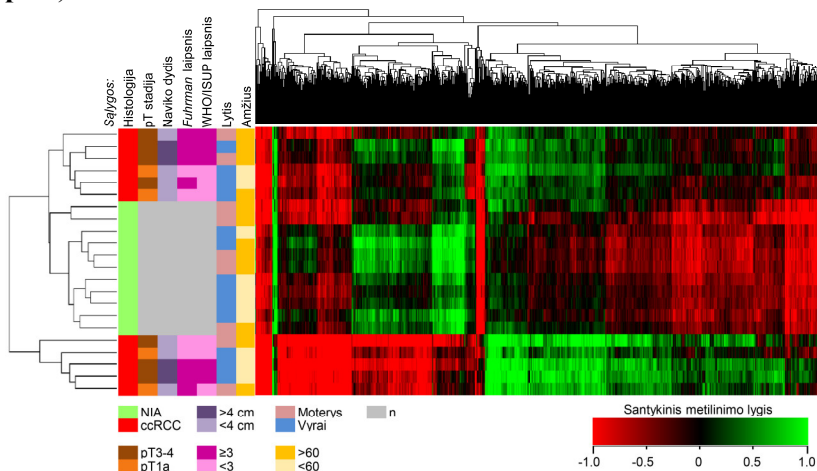


**1 pav.** Naujų neinvazinių inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenų paieškos eiga. ccRCC – šviesių ląstelių karcinoma; NIA – nepakitę inkstų audiniai; AK – asimptominė kontrolė; MSP – metilinimui jautri PGR; qMSP – kiekybinė MSP.

## DNR metilinimo ir genų raiškos profilio analizė

Siekiant nustatyti DNR metilinimo pokyčių mastą ccRCC audiniuose ir identifikuoti potencialius inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenis, atlikta visuminė DNR metilinimo profilio analizė mikrogardelių metodu 11-oje ccRCC ir porinių NIA mėginių. Tarp tirtų ccRCC mėginių, keturi buvo pT1a stadijos ir likę septyni pažengusios pT3-4 stadijos.

Palyginus ccRCC mėginių DNR metilinimo profilį su NIA, reikšmingi metilinimo skirtumai ( $FC \geq 1,5$ ;  $P \leq 0,050$ ) nustatyti 766 zonduose, atitinkančiuose 367 konkrečius genus. Tarp šių genų 175 (48%) buvo hipermetilinti ir 192 (52%) hipometilinti. Hierarchinė klasterinė analizė išskyrė du ccRCC klasterius: vienam kurių būdingas aukštas DNR metilinimo pokyčių kiekis, tuo tarpu kitame šie pokyčiai yra retesni ir jie savo DNR metilinimo profiliu panašesni į NIA (2 pav.).

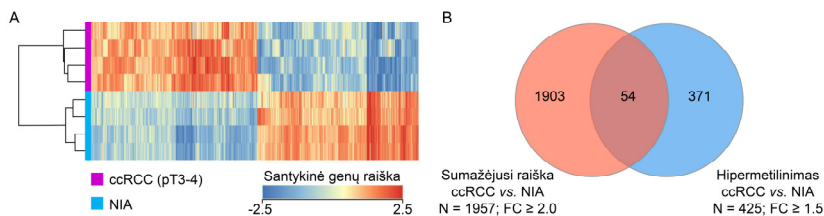


**2 pav.** DNR metilinimo profilio analizė inkstų navikiniuose (ccRCC) ir poriniuose histologiškai nepakitusiųose (NIA) audiniuose. Skirtingai ( $FC \geq 1,5$ ;  $P \leq 0,050$ ) metilintų zondų ( $N = 766$ ) hierarchinė klasterinė analizė 11-oje ccRCC ir porinių NIA mėginių. Spalvinė skalė žymi santykinį metilinimo lygį, normalizuotą pagal referentinę DNR, kur -1 žymi hipometilintą, o 1 hipermetilintą zondo būseną. n – netaikoma.



Palyginus skirtingos stadijos navikų DNR metilinimo profilius su NIA, daugiausia pokyčių nustatyta pT1a stadijos navikuose – iš viso 1940 skirtingai metilinti ( $FC \geq 1,5$ ;  $P \leq 0,050$ ) genai, iš kurių 406 (21%) hipermetilinti ir 1526 (79%) hipometilinti, įskaitant 8 persidengiančius genus, kurie pagal skirtingus zondus buvo tiek hipermetilinti, tiek hipometilinti. Pažengusių pT3-4 stadijų navikuose DNR metilinimo pokyčiai buvo retesni ir nustatyti 323 genuose, iš kurių 210 (65%) buvo hipermetilinti ir 112 (35%) hipometilinti, įskaitant vieną persidengiantį geną. Verta paminėti, jog šie DNR metilinimo pokyčių skirtumai tarp ankstyvos ir pažengusių naviko stadijų gali būti nulemti mažo lyginamųjų grupių dydžio. Kita vertus, palyginus pT3-4 stadijos navikus su pT1a, reikšmingi DNR metilinimo pokyčiai nustatyti tik aštuoniems genams.

Atlikus DNR metilinimo profilio ccRCC mėginiuose palyginimus pagal įvairius klinikinius patologinius rodiklius, nustatyti santykinai negausūs metilinimo pokyčiai. Priešingai, gausūs DNR metilinimo pokyčiai (273 genuose) nustatyti tarp vyrų ir moterų ccRCC bet ne NIA mėginių, taip pat palyginus pacientus pagal skirtingas amžiaus grupes ( $> 60$  metų vs.  $\leq 60$  metų; 278 skirtingai metilinti genai). Tačiau šie metilinimo pokyčiai nepersidengė su nustatytais skirtingai metilintais genais ccRCC vs. NIA palyginimo grupėje.



**3 pav.** Visuminis genų raiškos profilis inkstų navikiniuose (ccRCC) ir histologiškai nepakitusiuose audiniuose (NIA) ir sąsajos su DNA metiliniu. A – pakitusios raiškos genų ( $N = 3942$ ;  $FC \geq 2,0$ ;  $P < 0,050$ ) profilis ccRCC ir NIA mėginiuose; B – sumažėjusios raiškos ir hipermetilintų genų Veno diagrama.

Palyginus visuminį 4-ių ccRCC (pT3-4 stadijos) mėginių genų raiškos profilį su poriniais histologiškai nepakitusiais inkstų audiniais,

nustatyti 3942 reikšmingai pakitusios raiškos ( $FC \geq 2,0$ ;  $P \leq 0,050$ ) genai, iš kurių 1957 (50%) buvo sumažėjusios raiškos (**3 pav. A**). Palyginus su visuminiais DNR metilinimo duomenimis, nustatyti 54 genai, kurie buvo ir hipermetilinti, ir sumažėjusios raiškos (**3 pav. B**).

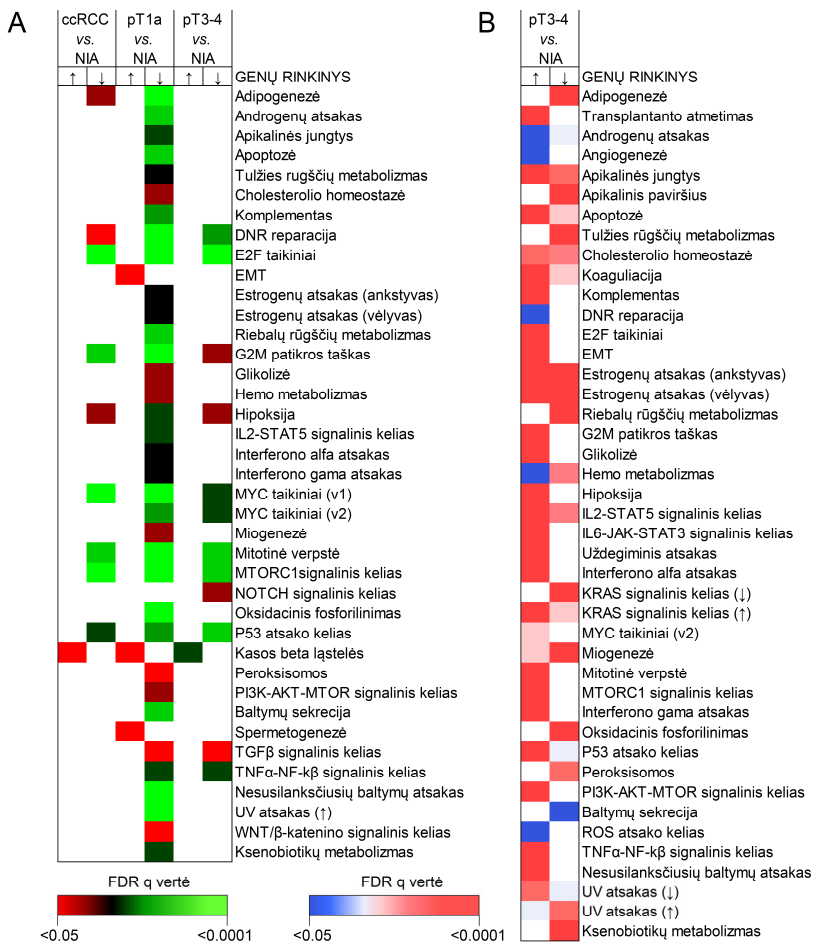
Pakitusio metilinimo ir raiškos genų funkcinių terminų praturtinimo analizė

Siekiant geriau suprasti molekulinis mechanizmus, dalyvaujančius inkstų audinių kancerogenezeje ir ccRCC progresijoje, toliau buvo atliekama genų rinkinių praturtinimo analizė (angl. *gene set enrichment analysis (GSEA)*).

Visų pirma atlikta biologinių procesų kategorijai priklausančių GO terminų analizė. Atlikus skirtingai metilintų genų analizę, nustatytas GO terminų, susijusių su ląstelių diferenciacija, epitelinio audinio vystymusi, ląstelių proliferacija, migracija, chromatinio organizacijos reguliacija, genų transkripcijos ir raiškos reguliacija praturtinimas. Tuo tarpu pakitusios raiškos genai buvo praturtinti tarp GO terminų, susijusių su inkstų vystymusi ir imuninės sistemos procesų reguliacija.

Siekiant detaliau išaiškinti molekulinis procesus, vykstančius inkstų kancerogenezės ir jos progresijos metu, buvo atlikta atsako kelių analizė. Daugiausiai pakitusio metilinimo genų buvo susieti su ląstelės ciklo reguliacijos ir DNR reparacijos atsako keliais (**4 pav. A**). Daugiausia hipermetilintų genų buvo susieta su epiteline mezenchimine tranzicija (EMT), tačiau tokie rezultatai gauti analizuojant tik pT1a stadijos mėginius. Tarp reikšmingai pakitusios raiškos genų nustatyti panašūs atsako keliai (**4 pav. B**). Papildomai, padidėjusios raiškos genai buvo labiausiai praturtinti tarp interferono gama atsako, uždegiminio atsako, G2M ląstelės ciklo patikros taško ir daugelio kitų signalinių kelių. Tuo tarpu sumažėjusios raiškos genai buvo susiję su oksidacinio fosforilavimo, riebalų rūgščių metabolizmo procesais, KRAS ir kitais atsako keliais.

Apibendrinant, GO biologinių procesų ir atsako kelių analizė rodo, jog vystantis ccRCC, išreguliuojami įvairūs molekuliniai procesai, atliekantys svarbų vaidmenį vėžio vystymesi ir progresijoje.



**4 pav.** Visuminės analizės metodais nustatytų pakitusio metilavimo ir raiškos genų rinkinių praturtinimo analizė. A – genų rinkiniai praturtinti tarp skirtingai metilintų ( $FC \geq 1,5$ ) genų; B – genų rinkiniai praturtinti tarp reikšmingai pakitusios raiškos ( $FC \geq 2,0$ ) genų. Naudoti MSigDB kolekcijos genų rinkiniai. ccRCC – šviesių ląstelių inkstų karcinoma; NIA – nepakitę inkstų audiniai; EMT – epitelinė-mezenchiminė tranzicija. ↑ – hipermetilavimas/padidėjusi raiška; ↓ – hipometilavimas/sumažėjusi raiška.

## Potencialių inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenų atranka

Atsižvelgiant į DNR metilinimo ir genų raiškos pokyčius ccRCC mėginiuose, taip pat reikšmingai hipermetilintų zondų, susijusių su tam tikru genu, kiekį, tolimesniam validavimo etapui atrinkti devyni baltymus koduojantys genai: *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7* ir *SIMI* (**2 lentelė**). Šie genai taip pat buvo pasirinkti dėl galimo jų vaidmens vėžio vystymesi (pagal GSEA analizę ir literatūroje prieinamus duomenis) ir techninio prieinamumo metilinimui jautrios PGR analizei. Genas *SFRP1* taip pat buvo įtrauktas į tolimesnę analizę kaip gerai žinomas ccRCC DNR metilinimo biožymuo.

**2 lentelė.** Potencialūs ccRCC DNR metilinimo biožymenys.

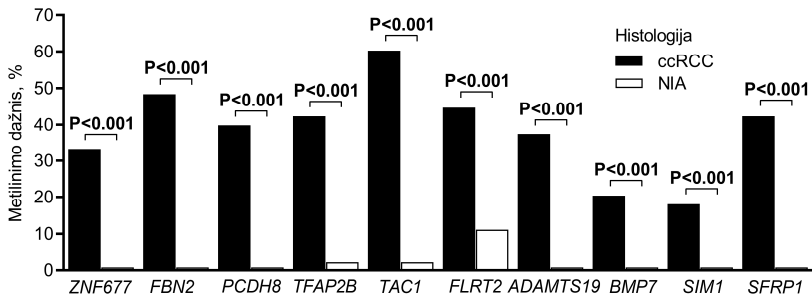
Geno simbolis	Geno pavadinimas	Geno lokacija	Pakitusio DNR metilinimo zondai, N (FC)	mRNR raiška, reguliacija (FC)
<i>ZNF677</i>	Cinko piršto baltymas 677	19q13.42 (-)	1 (1.6)	↓ (10.0)
<i>FBN2</i>	Fibrilinas 2	5q23.3 (-)	8 (1.8)	n
<i>PCDH8</i>	Protokadherinas 8	13q14.3 (-)	4 (1.7)	n
<i>TFAP2B</i>	Transkripcijos veiksnys AP-2β	6p12.3 (+)	1 (1.6)	↓ (349.5)
<i>TAC1</i>	Tachikinas 1	7q21.3 (+)	1 (1.5)	↓ (7.7)
<i>FLRT2</i>	Fibronektinu-leucinu praturtintas transmembraninis baltymas 2	14q31.3 (+)	2 (1.7)	n
<i>ADAMTS19</i>	ADAM metalopeptidazė su trombospondino 1 motyvu 19	5q23.3 (+)	4 (1.6)	↓ (2.1)
<i>BMP7</i>	Kaulų morfogeninis baltymas 7	20q13.31 (-)	2 (1.5)	↓ (7.3)
<i>SIMI</i>	SIM bHLH transkripcijos veiksnys 1	6q16.3 (-)	3 (1.7)	↓ (18.5)
<i>SFRP1</i>	Sekretuojamas su <i>frizzled</i> susijęs baltymas 1	8p11.21 (-)	n	↓ (70.4)

FC – pokytis kartais (angl. *fold change*); n – netaikoma.

## Genų-taikinių metilinimo analizė inkstų audiniuose

Pasirinktų genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI* ir *SFRP1* reguliacinių (promotorių, stipriklių) DNR sričių metilinimo būseną kokybiniu MSP metodu tirta 123 ccRCC ir 45 NIA mėginiuose.

Visų genų metilinimo dažnis buvo statistiškai reikšmingai didesnis ccRCC audiniuose, lyginant su NIA (**5 pav.**). Genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19* ir *SFRP1* metilinta būseną nustatyta bent trečdalyje ccRCC mėginių ir jų metilinimo dažnis siekė 33,3 – 60,2%, tuo tarpu genai *BMP7* ir *SIMI* buvo kur kas rečiau metilinti (metilinimo dažnis atitinkamai 20,3% ir 18%). Genai *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI* ir *SFRP1* pasižymėjo ypač aukštu specifiskumu ccRCC audiniams, tuo tarpu nedažnas genų *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimas nustatytas ir NIA mėginiuose (2 – 11%).



**5 pav.** Atrinktų genų metilinimo dažniai inkstų audiniuose. Rezultatai gauti kokybiniu MSP metodu. ccRCC – šviesių ląstelių inkstų karcinoma; NIA – nepakitę inkstų audiniai. Reikšmingos P vertės paryškintos.

### Diagnostinė atrinktų genų reikšmė

Siekiant įvertinti pasirinktų genų gebėjimą atskirti ccRCC mėginius nuo NIA, buvo apskaičiuoti diagnostinių testų parametrai – jautrumas, specifiskumas ir AUC (angl. *area under the curve*; kuo ši

reikšmė artimesnė 1,0, tuo diagnostinis testas tikslesnis). Pavieniai biožymenys pasižymėjo aukštu specifiškumu ( $\geq 88,9\%$ ), tačiau jautrumas buvo gana žemas ir aukščiausia vertė nustatyta genui *TAC1* – 60% (**3 lentelė**). Toliau buvo analizuotos įvairios genų kombinacijos. Dviejų-penkių genų rinkiniai pasižymėjo kur kas geresnėmis diagnostinėmis savybėmis. Genų rinkinys susidedantis iš *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TAC1* & *SFRP1* su ar be *TFAP2B*, pasižymėjo geriausiomis diagnostinėmis savybėmis: jautrumas siekė 83,7–85,4%, specifiškumas – 95,8–97,8%, AUC – 0,91.

**3 lentelė.** Atrinktų genų ir jų kombinacijų reguliacinių sričių DNR metilinimo inkstų audiniuose diagnostinės savybės.

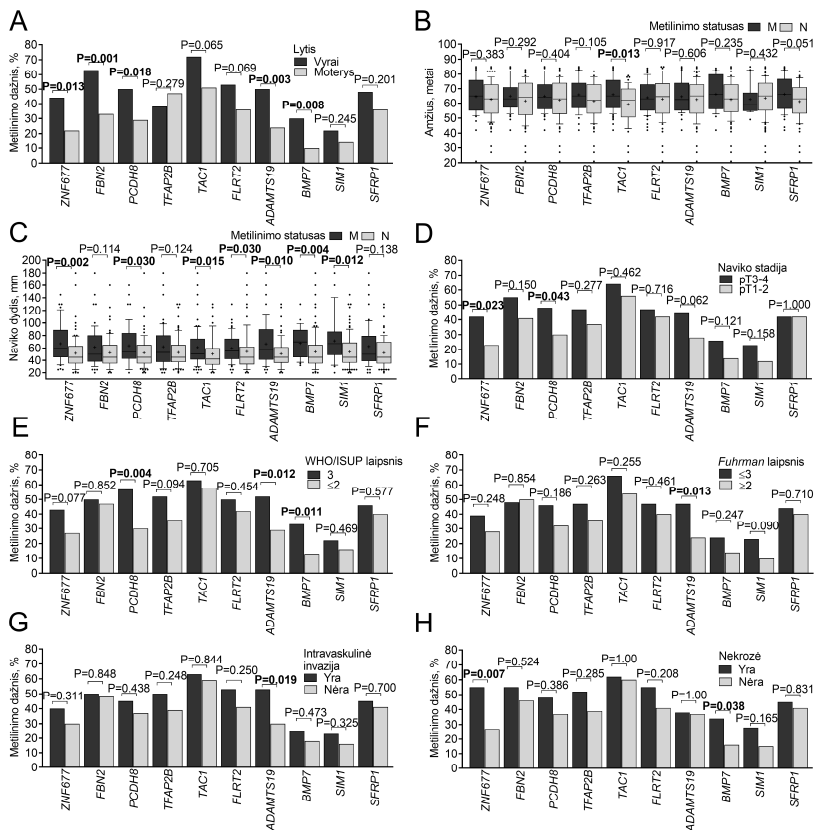
Genas/rinkinys	DJ, %	DS, %	AUC
<i>ZNF677</i>	33,3	100,0	0,67
<i>FBN2</i>	48,4	100,0	0,74
<i>PCDH8</i>	39,8	100,0	0,70
<i>TFAP2B</i>	42,3	97,8	0,70
<i>TAC1</i>	60,2	97,8	0,79
<i>FLRT2</i>	44,7	88,9	0,67
<i>ADAMTS19</i>	37,4	100,0	0,69
<i>BMP7</i>	20,3	100,0	0,60
<i>SIM1</i>	17,9	100,0	0,59
<i>SFRP1</i>	42,3	100,0	0,71
<i>FBN2</i> & <i>TAC1</i>	70,7	97,8	0,84
<i>FBN2</i> , <i>TAC1</i> & <i>SFRP1</i>	77,2	97,8	0,88
<i>ZNF677</i> , <i>FBN2</i> , <i>TAC1</i> & <i>SFRP1</i>	82,1	97,8	0,90
<i>ZNF677</i> , <i>FBN2</i> , <i>PCDH8</i> , <i>TAC1</i> & <i>SFRP1</i>	83,7	97,8	0,91
<i>ZNF677</i> , <i>FBN2</i> , <i>PCDH8</i> , <i>TAC1</i> , <i>TFAP2B</i> & <i>SFRP1</i>	85,4	95,6	0,91

DJ – diagnostinis jautrumas; DS – diagnostinis specifiškumas; AUC – plotas po kreive (angl. *area under the curve*).

Atrinktų genų metilinimo sąsajos su demografiniais ir klinikiniais-  
patologiniais rodikliais

Toliau buvo analizuojamos atrinktų genų metilinimo ccRCC audiniuose sąsajos su ligonių lytimi ir amžiumi. Aukštesnis visų genų (išskyrus *TFAP2B*) metilinimo dažnis nustatytas vyrų ccRCC mėginiuose ir genams *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *ADAMTS19* bei

*BMP7* ši sąsaja buvo statistiškai reikšminga ( $P < 0,050$ ; **6 pav. A**). Tuo tarpu metilinta *TAC1* būseną reikšmingai susieta su vyresniu pacientų amžiumi: vidurkis metilintoje ir nemetilintoje grupėse – 66 vs. 59 ( $P = 0,013$ ; **6 pav. B**).



**6 pav.** Atrinktų genų metilinimo dažnis ccRCC audiniuose pagal demografinius ir klinikišius-patologinius rodiklius. A – metilinimo dažnis pagal ligočių lytį; B – metilintos būsenos sąsaja su ligočių amžiumi ir C – naviko dydžiu. Genų metilinimo dažniai pagal naviko: D – stadiją; E – WHO/ISUP laipsnį; F – *Fuhrman* laipsnį; G – intravaskulinę invaziją; H – nekrozę. Dėžutė iliustruoja 25-75 procentilius, linija dėžutės viduje – medianą, pliusas žymi vidurkį, “ūšai” – 10-90% intervalą, taškai – išskirtis. M – metilinta, N – nemetilinta geno būsenos. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Genų reguliacinių sričių DNR metilinimo pokyčiai ccRCC audiniuose toliau buvo analizuojami pagal ligonių klinikinius-patologinius rodiklius. Metilinta genų *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7* ir *SIMI* būseną reikšmingai susieta su didesniais navikais ( $P < 0,050$ ; **6 pav. C**). Be to, visų genų (išskyrus *SFRP1*) metilinimo dažnis buvo didesnis aukštesnės patologinės stadijos navikuose, tačiau tik *ZNF677* ir *PCDH8* genams ši sąsaja buvo statistiškai reikšminga (atitinkamai  $P = 0,023$  ir  $P = 0,043$ ; **6 pav. D**). Visų genų metilinimo dažnis taip pat buvo aukštesnis didesnio WHO/ISUP laipsnio navikuose ir genams *PCDH8*, *ADAMTS19* bei *BMP7* ši tendencija buvo statistiškai reikšminga (atitinkamai  $P = 0,004$ ,  $P = 0,012$  ir  $P = 0,011$ ; **6 pav. E**). Be to, visi genai (išskyrus *FBN2*) buvo dažniau metilinti aukštesnio *Fuhrman* laipsnio navikuose, tačiau tik *ADAMTS19* atveju ši sąsaja buvo statistiškai reikšminga ( $P = 0,013$ ; **6 pav. F**), kaip ir intravaskulinės naviko invazijos atveju ( $P = 0,019$ ; **6 pav. G**). Reikšmingai aukštesnis genų *ZNF677* ir *BMP7* metilinimo dažnis taip pat susietas su naviko nekroze (atitinkamai  $P = 0,007$  ir  $P = 0,038$ ; **6 pav. H**).

Apibendrinant, atrinktų genų reguliacinių sričių metilinimas reikšmingai susijęs su daugeliu klinikinių-patologinių ligonių rodiklių ir gali būti vertingais prognostiniais ccRCC žymenimis.

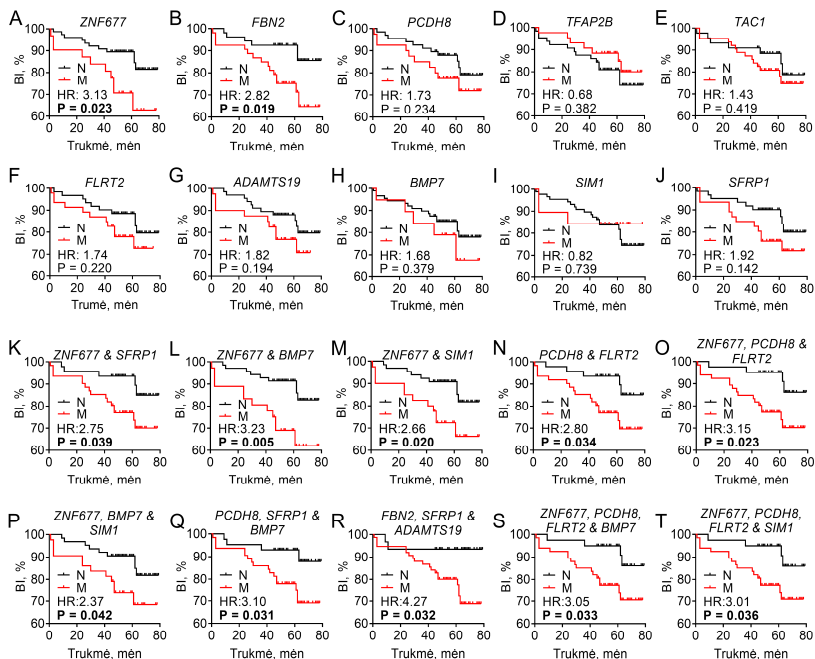
#### Prognostinė atrinktų genų metilinimo ccRCC audiniuose reikšmė

Siekiant detaliau įvertinti prognostinę atrinktų genų metilinimo ccRCC audiniuose reikšmę, toliau buvo vertinamos jų sąsajos su ligonių bendru išgyvenamumu.

Palyginus Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreives, nustatytas reikšmingai trumpesnis ligonių bendras išgyvenamumas, esant metilintai genų *ZNF677* ir *FBN2* būsenai (atitinkamai  $P = 0,023$  ir  $P = 0,019$ ; **7 pav. A, B**). Nors jokių reikšmingų sąsajų tarp kitų pavienių genų metilinimo ir ligonių bendro išgyvenamumo nenustatyta ( $P > 0.050$ ; **7 pav. C-J**), įvairių genų kombinacijų metilinta būseną



reikšmingai susieta su trumpesniu ligonių išgyvenamumu ( $P < 0.050$ ;  
7 pav. K-T).



7 pav. Atrinktų genų metilinimo ir ligonių bendro išgyvenamumo sąsajos. Kaplano-Mejerio kreivės pagal A-J – pavienių genų metilinimo būseną ir K-T – įvairių dviejų-keturių genų kombinacijų metilinimo būseną. Genų kombinacijų atveju nurodomi tik tie genų rinkiniai, kurie reikšmingai susieti su pacientų bendru išgyvenamumu ir Vienamატėje Kokso proporcingos rizikos analizėje. M/N – metilinta/nemetilinta geno ar jų rinkinio reguliacinių sričių būseną; BI – bendras išgyvenamumas; HR – rizikos santykis (angl. *Hazard Ratio*); Reikšmingos P vertės paryškintos.

Vienmačiai Kokso modeliai partvirtino metilintos genų *ZNF677* ir *FBN2* būsenos sąsają su bendru ligonių išgyvenamumu (atitinkamai:  $P = 0,029$ , rizikos santykis (angl. *Hazard Ratio* (*HR*)) – 2,61;  $P = 0,026$ , *HR* – 2,96; **P1 lentelė**). Įvairios genų kombinacijos taip pat susietos su pacientų išgyvenamumu ( $P < 0,050$ , *HR* nuo 2.39 iki 4.29; **P1 lentelė**) ir jų prognostinė reikšmė net viršijo kai kurių demografinių ir klinikinių-patologinių rodiklių vertę. Tarp pastarųjų

rodiklių reikšmingai su bendru išgyvenamumu buvo susieti: ligonių amžius ( $P < 0,001$ , HR – 1,09), lytis (vyrai vs. moterys;  $P = 0,038$ , HR – 2,73), naviko dydis ( $P = 0,036$ , HR – 1.01), naviko stadija (pT3-4 vs. pT1-2;  $P = 0,003$ , HR – 5,12), naviko WHO/ISUP laipsnis (3 vs. 1-2;  $P = 0,012$ , HR – 3,04), naviko invazija į riebalus (yra vs. nėra;  $P = 0,001$ ; HR – 4,38) ir naviko nekrozė (yra vs. nėra;  $P < 0,001$ ; HR – 4,97).

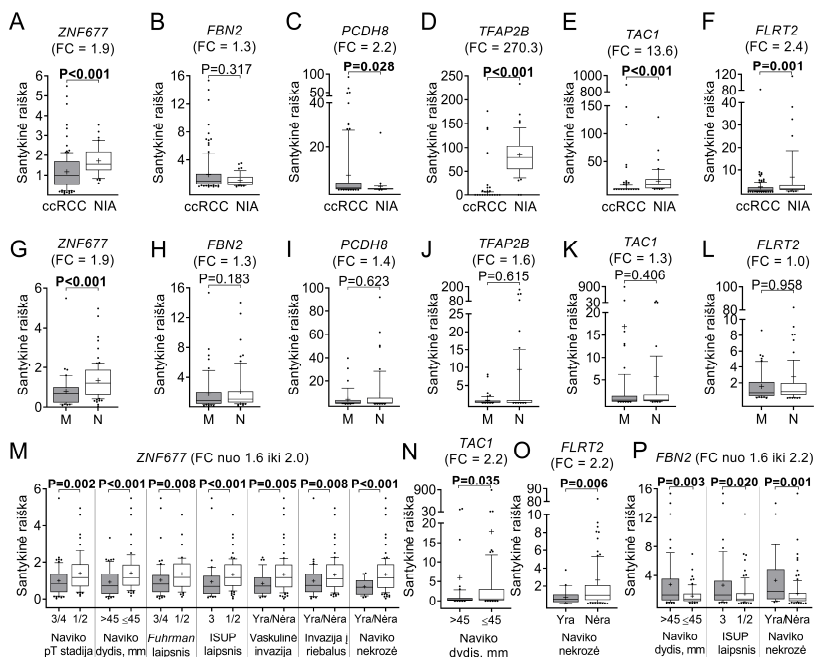
Daugiamatėje analizėje *FBN2* pasižymėjo aukštesne prognostine verte, negu *ZNF677* (**P1 lentelė**). Tarp dviejų genų rinkinių, geriausia prognostine verte pasižymėjo *ZNF677 & BMP7* (M vs. N;  $P = 0,008$ ; HR – 3,27), tarp trijų genų rinkinių – *ZNF677, PCDH8 & FLRT2* (M vs. N;  $P = 0,038$ ; HR – 3,18), tarp keturių genų rinkinių – *ZNF677, PCDH8, FLRT2 & BMP7* (M vs. N;  $P = 0,044$ ; HR – 3,08). Tačiau nei vienas iš šių molekulinį žymenų neišlaikė nepriklausomos prognostinės vertės daugiamatėje analizėje su klinikiniais-patologiniais rodikliais (**P1 lentelė**).

Atrinktų genų raiškos analizė inkstų audiniuose ir sąsajos su DNR metiliniu bei klinikiniais-patologiniais rodikliais

Atsižvelgiant į tirtų genų reguliacinių sričių metilavimo dažnį ir sąsajas su klinikiniais-patologiniais ligonių rodikliais bei bendru išgyvenamumu, šeši genai, įskaitant *ZNF677, FBN2, PCDH8, TFAP2B, TAC1* ir *FLRT2* buvo atrinkti tolimesnei raiškos analizei ccRCC ir NIA mėginiuose.

Genų *ZNF677, FBN2* ir *FLRT2* iRNR raiška buvo aptikta visuose tirtuose ccRCC ir NIA mėginiuose, tuo tarpu genų *TFAP2B, TAC1* ir *PCDH8* iRNR aptikta atitinkamai 118, 112, 91 ccRCC ir 45, 45, 26 NIA mėginiuose. Genų *ZNF677, TFAP2B, TAC1* ir *FLRT2* raiška buvo reikšmingai žemesnė ccRCC audiniuose, lyginant su NIA ( $P < 0,050$ ); priešingai, geno *PCDH8* raiška buvo didesnė ccRCC audiniuose ( $P = 0,028$ ), o *FBN2* reikšmingų raiškos pokyčių neparodė (**8 pav. A-F**). Be to, žemesnė *ZNF677* raiška ccRCC audiniuose buvo

reikšmingai susieta su metilinta promotoriaus būsena ( $P < 0,001$ ; **8 pav. G**), tuo tarpu kitiems genams tokios sąsajos nenustatytos ( $P > 0,050$ ; **8 pav. H-L**).



**8 pav.** Atrinktų genų raiškos analizė inkstų audiniuose. A–F – santykinė (pagal endogeninę kontrolę *HPRT1* normalizuota) genų raiška ccRCC ir NIA mėginiuose; G–L – genų raiškos ccRCC audiniuose sąsaja su reguliacinių sričių metilinimo būsena; M–P – genų raiškos ccRCC audiniuose sąsaja su klinikiniais-patologiniais ligonių rodikliais. Dėžutė iliustruoja 25-75 procentilius, linija dėžutės viduje – medianą, pliusas žymi vidurkį, “ūsai” – 10-90% intervalą, taškai – išskirtis. ccRCC – šviesių ląstelių inkstų karcinoma; NIA – nepakitę inkstų audiniai; pT – patloginė naviko stadija; FC – raiškos pokytis kartais (angl. *fold change*); M – metilinta, N – nemetilinta geno būsenos. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Toliau buvo vertinamos atrinktų genų raiškos ccRCC audiniuose sąsajos su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais. Nustatyta, jog sumažėjusi geno *ZNF677* raiška reikšmingai siejasi su daugybe klinikinį-patologinių rodiklių, įskaitant aukštesnę naviko stadiją,

Fuhrman ir WHO/ISUP laipsnius, didesnius ( $> 45$  mm) navikus, intravaskulinę bei riebalų invaziją taip pat naviko nekrozę ( $P < 0,050$ ; **8 pav. M**). Žemesnė genų *TAC1* ir *FLRT2* raiška buvo susieta atitinkamai su didesniais ( $> 45$  mm) navikais ir naviko nekroze (atitinkamai  $P = 0,035$  ir  $P = 0,006$ ; **8 pav. N, O**). Priešingai, didesnė geno *FBN2* raiška ccRCC audiniuose reikšmingai siejosi su didesniais ( $> 45$  mm) navikais, aukštesniu WHO/ISUP laipsniu ir naviko nekroze (atitinkamai  $P = 0,003$ ,  $P = 0,020$ , ir  $P = 0,001$ ; **8 pav. P**). Be to Kaplano-Mejerio išgyvenamumo analizė atskleidė reikšmingą sumažėjusios *ZNF677* raiškos sąsają su trumpesniu ccRCC ligonių bendru išgyvenamumu ( $P = 0,021$ ; duomenys nerodomi).

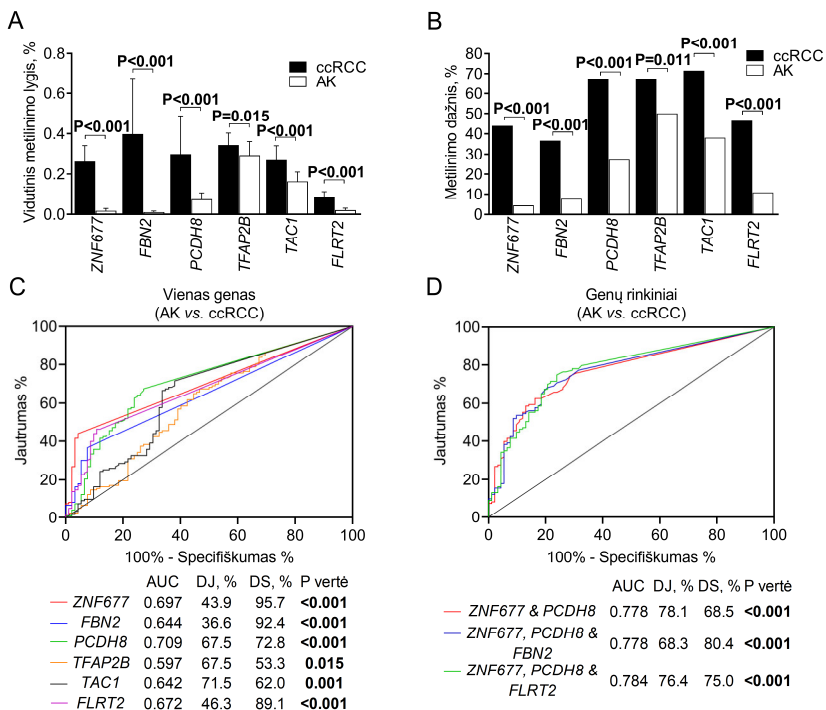
### Genų-taikinių metilinimo analizė šlapimo nuosėdose

Kiekybinė genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* metilinimo analizė ccRCC ligonių ( $N = 123$ ) ir asimptominių kontrolių (AK;  $N = 92$ ) šlapimo nuosėdose buvo analizuota qMSP metodu. Kokybiniam duomenų interpretavimui atlikta ROC kreivių analizė iš kurios, pagal Judeno indeksą, nustatyta ribinė metilinimo intensyvumo vertė, pagal kurią mėginiai skirstyti į metilintus ir nemetilintus.

Visų tirtų genų metilinimo intensyvumas ir dažnis buvo reikšmingai aukštesni ccRCC ligonių šlapimo nuosėdose, lyginant su AK ( $P < 0,050$ ; **9 pav. A, B**). Palyginus atsitiktinai atrinktų 20-ies ligonių DNR metilinimo intensyvumą navikiniuose audiniuose ir šlapimo nuosėdose, reikšmingų sąsajų nebuvo nustatyta (duomenys nerodomi). Kaip ir tikėtasi, nustatytas reikšmingai žemesnis visų genų DNR metilinimo intensyvumas ccRCC audiniuose, lyginant su tų pačių ligonių šlapimo nuosėdomis (duomenys nerodomi).

### Atrinktų biožymenų reikšmė neinvazinei ccRCC diagnostikai

Diagnostinės atrinktų biožymenų metilinimo šlapimo nuosėdose savybės vertintos atliekant ROC analizę.



**9 pav.** Atrinktų genų reguliacinių sričių DNR metilimo analizė šlapimo nuosėdose. A – genų metilimo intensyvumas ir B – dažnis ccRCC ligonių ir AK šlapimo nuosėdose. C – pavienių genų ir D – dviejų-trijų genų kombinacijų ROC kreivių analizė, atspindinti biožymenų diagnostinį potencialą. ccRCC – šviesių ląstelių inkstų karcinoma; AK – asimptominė kontrolė; ROC – (angl. *Receiver Operating Characteristic*) grafikas, nurodantis sąryšį tarp jautrumo ir specifiškumo; AUC – plotas po kreive (angl. *area under the curve*); DJ – diagnostinis jautrumas; DS – diagnostinis specifiškumas. Reikšmingos P vertės paryškintos.

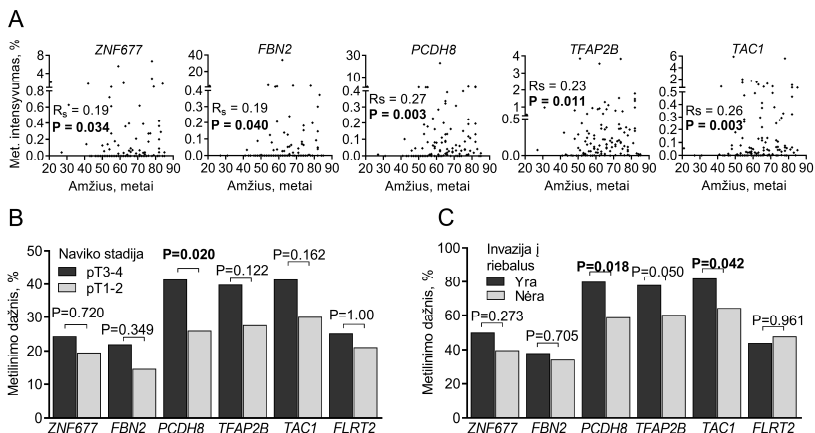
Visų genų atveju nustatytas plotas po kreive (angl. *area under the ROC curve (AUC)*) siekė 0,60 ar buvo didesnis (**9 pav. C**). Aukščiausia diagnostine verte pasižymėjo genas *PCDH8*, kurio AUC siekė 0,71, jautrumas – 67,5% ir specifiškumas – 72,8%. Kaip ir tikėtasi, įvairios genų kombinacijos pasižymėjo geresnėmis diagnostinėmis charakteristikomis. Tarp įvairių genų kombinacijų didžiausia diagnostine verte (AUC = 0.78) pasižymėjo trys genų

rinkiniais: *ZNF677* & *PCDH8* (jautrumas – 78%, specifiškumas – 69%), *ZNF677*, *PCDH8* & *FBN2* (jautrumas – 68%, specifiškumas – 80%) ir *ZNF677*, *PCDH8* & *FLRT2* (jautrumas – 78%, specifiškumas – 75%) (visi  $P < 0,050$ ; **9 pav. D**).

### Atrinktų genų metilinimo šlapimo nuosėdose sąsajos su demografiniais ir klinikiniais-patologiniais rodikliai

Toliau buvo analizuojamos sąsajos tarp genų reguliacinių sričių DNR metilinimo pokyčių ccRCC ligočių šlapimo nuosėdose ir demografinių bei klinikinių-patologinių rodiklių.

Priešingai nei buvo nustatyta tiriant ccRCC audinius, analizuojant šlapimo nuosėdas nenustatyta jokių sąsajų tarp genų metilinimo intensyvumo/dažnio ir ligočių lyties ( $P > 0.050$ ; duomenys nerodomi). Tačiau visų genų (išskyrus *FLRT2*) atveju nustatyta teigiama koreliacija tarp metilinimo intensyvumo ir ligočių amžiaus ( $P < 0,050$ ; **10 pav. A**), tačiau tokia sąsaja AK grupėje nenustatyta (duomenys nerodomi).

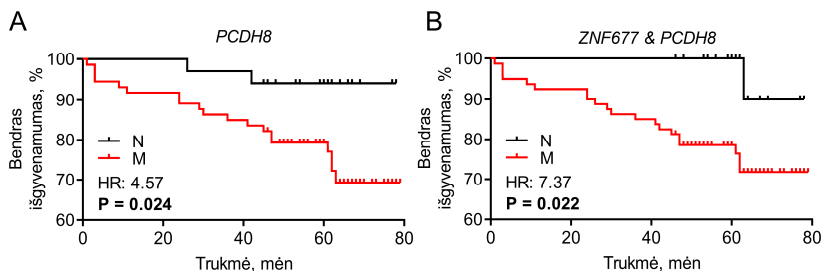


**10 pav.** Atrinktų genų metilinimo ccRCC ligočių šlapimo nuosėdose sąsajos su demografiniais ir klinikiniais-patologiniais rodikliais. A – sąsaja tarp genų metilinimo intensyvumo ir ligočių amžiaus. B – metilinimo dažnio sąsaja su naviko patologine stadija. C – metilinimo intensyvumo sąsaja su naviko invazija į riebalus. Met. – metilinimo. Reikšmingos  $P$  vertės paryškintos.

Analizuojant genų metilinimo sąsają su klinikiniais-patologiniais rodikliais, aukštesnis visų genų metilinimo dažnis šlapimo nuosėdose nustatytas esant pT3-4 stadijos navikams, lyginant su pT1-2 stadija ir genui *PCDH8* ši sąsaja buvo statistiškai reikšminga ( $P = 0,002$ ; **10 pav. B**). Be to, reikšmingai aukštesni genų *PCDH8* ir *TAC1* metilinimo dažniai nustatyti esant lokaliai pažengusiems ccRCC navikams, kuriems būdinga invazija į riebalus (atitinkamai  $P = 0,018$  ir  $0,042$ ; **10 pav. C**). Tačiau jokių kitų patikimų sąsajų tarp genų metilinimo dažnio ar intensyvumo ir ligonių klinikinių-patologinių rodiklių nenustatyta (duomenys nerodomi).

#### Atrinktų biožymenų reikšmė neinvaziniam ccRCC prognozavimui

Siekiant įvertinti prognostinę atrinktų genų metilinimo ccRCC ligonių šlapimo nuosėdose reikšmę, toliau buvo vertinamos jų sąsajos su ligonių bendru išgyvenamumu.



**11 pav.** Genų metilinimo šlapimo nuosėdose ir ligonių bendro išgyvenamumo sąsajos. Kaplano-Mejerio kreivės pagal A – pavienio geno *PCDH8* ir B – genų *ZNF677 & PCDH8* rinkinio metilinimo būseną. M/N – metilinta/nemetilinta geno ar jų rinkinio reguliacinių sričių būseną; HR – rizikos santykis (angl. *Hazard Ratio*); Reikšmingos P vertės paryškintos.

Visų genų atveju nustatytas aukštesnis metilinimo dažnis ligonių mirties atveju, lyginant su išgyvenusiais pacientais, tačiau tik genui *PCDH8* ši sąsaja buvo statistiškai reikšminga ( $P = 0,005$ ; duomenys nerodomi). Palyginus Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreives,

nustatytas reikšmingai trumpesnis ligonių bendras išgyvenamumas, esant metilintai geno *PCDH8* būsenai ( $P = 0,024$ ; **11 pav. A**). Nors nei vienas kitas pavienis genas neparodė reikšmingų sąsajų su ligonių išgyvenamumu (duomenys nerodomi), nustatytas žymus geno *PCDH8* prognostinės reikšmės padidėjimas kombinacijoje su *ZNF677* ( $P = 0,022$ ; **11 pav. B**).

**4 lentelė.** Molekulinių ir klinikinių-patologinių rodiklių vienmačiai ir daugiamačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai.

VIENMATĖ ANALIZĖ			
Kintamieji	HR [95% PI]	P-reikšmė	Modelio P-reikšmė
<i>PCDH8</i> (M vs. N)	4,58 [1,07 - 19,54]	<b>0,041</b>	<b>0,013</b>
<i>ZNF677</i> & <i>PCDH8</i> (M vs. N)	7,38 [1,00 - 54,46]	0,051	<b>0,008</b>
Amžius, metai (kiek.)	1,09 [1,04 - 1,14]	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Lytis (vyrai vs. moterys)	2,73 [1,06 - 7,08]	<b>0,038</b>	<b>0,029</b>
Stadija (pT3-4 vs. pT1-2)	5,12 [1,73 - 15,16]	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
Naviko dydis (kiek.)	1,01 [1,00 - 1,02]	<b>0,036</b>	0,063
WHO/ISUP laipsnis (3 vs. $\leq 2$ )	3,04 [1,28 - 7,21]	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>
Nekrozė (yra vs. nėra)	4,97 [2,11 - 11,71]	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
DAUGIAMATĖ ANALIZĖ			
I MODELIS			
<i>PCDH8</i> (M vs. N)	5,70 [1,16 - 28,12]	<b>0,033</b>	<b>&lt;0,001</b>
Amžius, metai (kiek.)	1,10 [1,04 - 1,16]	<b>0,001</b>	
Lytis (vyrai vs. moterys)	2,72 [0,99 - 7,45]	0,053	
Stadija (pT3-4 vs. pT1-2)	1,76 [0,51 - 6,08]	0,372	
Naviko dydis (kiek.)	1,02 [1,00 - 1,03]	<b>0,044</b>	
WHO/ISUP laipsnis (3 vs. $\leq 2$ )	0,69 [0,22 - 2,18]	0,527	
Nekrozė (yra vs. nėra)	4,73 [1,45 - 15,46]	<b>0,010</b>	
II MODELIS			
<i>ZNF677</i> & <i>PCDH8</i> (M vs. N)	12,47 [1,47 - 105,58]	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>
Amžius, metai (kiek.)	1,10 [1,04 - 1,16]	<b>&lt;0,001</b>	
Lytis (vyrai vs. moterys)	3,42 [1,26 - 9,30]	<b>0,016</b>	
Stadija (pT3-4 vs. pT1-2)	1,93 [0,58 - 6,43]	0,285	
Naviko dydis (kiek.)	1,01 [1,00 - 1,03]	0,123	
WHO/ISUP laipsnis (3 vs. $\leq 2$ )	0,92 [0,31 - 2,70]	0,874	
Nekrozė (yra vs. nėra)	4,67 [1,64 - 13,26]	<b>0,004</b>	

M/N – metilinta/nemetilinta geno ar genų rinkinio būseną; kiek. – kiekybinis kintamasis pT – pataloginė naviko stadija; WHO/ISUP – Pasaulio sveikatos organizacijos/Tarptautinė urologinė patologijos draugija; HR – rizikos santykis (angl. Hazard Ratio); PI – pasikliautinis intervalas. Reikšmingos P vertės paryškintos.



Vienmatė Kokso proporcingos rizikos analizė patvirtino pavienio geno *PCDH8* ir kombinacijos *ZNF677 & PCDH8* metilinimo būsenos sąsają su ligonių bendru išgyvenamumu (**4 lentelė**). Atlikus daugiamatę Kokso analizę, metilinta *PCDH8* būseną buvo patvirtinta kaip nepriklausomas prognostinis ligonių bendro išgyvenamumo rodiklis ( $P = 0,033$ , HR – 5,70), atlikus koregavimą pagal svarbiausius ccRCC prognostinius rodiklius, įskaitant ligonių amžių, lytį, naviko dydį, stadiją, laipsnį ir nekrozę (**4 lentelė**). Be to, geno *PCDH8* nepriklausoma prognostinė reikšmė žymiai išauga kombinacijoje su *ZNF677* ( $P = 0,021$ , HR – 12,47; **4 lentelė**). Gauti rezultatai parodo galimybę vystyti molekulinį testą, skirtą prognozuoti ccRCC progresavimą, remiantis vien tik DNR metilinimo biožymenimis.

Apibendrinant, identifikuoti nauji potencialūs ccRCC biožymenys, ypač *ZNF677* ir *PCDH8* rodo daug žadančius rezultatus neinvaziniam ccRCC diagnozavimui ir prognozavimui. Tačiau tolimesnis šių žymenų ištyrimas didesnėse nepriklausomose ligonių kohortose su išsamiais stebėsenos duomenimis, yra būtinas, siekiant patvirtinti jų klinikinę vertę.

## REZULTATŲ APITARIMAS

Šviesių ląstelių inkstų karcinoma (angl. *clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*), kylanti iš nefrono epitelinių ląstelių, yra labiausiai paplitęs inkstų vėžio potipis, pasižymintis didžiausiu agresyvumu ir mirtingumu tarp visų urogenitalinės sistemos navikų [1-3]. Daugiausia ccRCC atvejų nustatoma ankstyvoje stadijoje, tačiau daugiau kaip ketvirčiui šių pacientų liga progresuoja ir bent penktadaliui pacientų diagnozės metu nustatoma jau metastazavusi liga [4]. Pagrindinė to priežastis – asimptotinė ligos eiga, kas lemia, kad daugumai pacientų inkstų vėžys nustatomas atsitiktinai, dėl plačiai naudojamo radiologinio vaizdinimo įvairiems nespecifiniams pacientų simptomams tirti [1,7]. Lokalizuotų ccRCC navikų atveju dažniausiai taikomas gydymas – chirurginis naviko pašalinimas. Tačiau nei viena iš vaizdinimo priemonių negali atskirti gerybinių inkstų pakitimų nuo neoplastinių ir to pasekmė yra perdėto gydymo rizika [27-30]. Taigi, reikalingi nauji molekuliniai biožymenys, leidžiantys ne tik aptikti ligą ankstyvoje stadijoje, bet ir prognozuoti jos eigą.

Įvairūs DNR metilinimo pokyčiai inkstų audiniuose nustatomi dar pirminiuose kancerogenezės etapuose ir dažnai siejami su įvairiais klinikiniais-patologiniais parametrais [12,31], todėl gali būti naudingi ne tik ankstyvai diagnostikai, bet ir prognozavimui. Be to, DNR metilinimo pokyčiai nesudėtingai aptinkami kūno skysčiuose cirkuliuojančioje DNR, todėl gali pasitarnauti kaip neinvaziniai ligos biožymenys, kurie gali būti panaudojami kaip priemonė gydytojams greitam ir tiksliam ligos aptikimui, stebėsenai ar net gydymo pritaikymui. Nepaisant iki šiol įdėtų pastangų aptikti naujus inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenis [32-36], kol kas nei vienas iš jų nėra naudojamas klinikoje, tad reikalingi tolimesni tyrimai šioje srityje.

## Naujų šviesių ląstelių inkstų karcinomos DNR metilinimo biožymenų identifikavimas

Šiame tyrime naujų diagnostinių ir/ar prognostinių šviesių ląstelių inkstų karcinomos DNR metilinimo biožymenų atrankai buvo atlikta visuminė DNR metilinimo profilio analizė ccRCC ir histologiškai nepakitusiuose inkstų audiniuose. Kaip ir ankstesnių tyrimų metu [37,38], nustatytos dvi ccRCC navikų grupės – turinčios aukštą ir žemą DNR metilinimo lygį. Lyginant ccRCC audinius su NIA, šiame tyrime nustatyti gausesni DNR metilinimo pokyčiai nei ankstesniuose darbuose [33-35]. Pakitusio metilinimo genai reikšmingai susieti su įvairiais molekuliniais atsako keliais, dalyvaujančiais vėžio vystymesi ir progresijoje. Kadangi šiame tyrime naudotų žmogaus DNR metilinimo mikrogardelių dizainas apima įvairius CpG, netsižvelgiant į jų sąsają su genų reguliacinėmis sritimis, tolimesniems biožymenų tyrimo etapams pasirinkti tie genai, kurių reikšmingai metilinti zondai lokalizuoti genų promotorių ar stipriklių srityse. Šių sričių metilinimas daro daugiausiai įtakos geno raiškos pokyčiams ir greičiausiai turi didžiausią klinikinę reikšmę [15].

Tarp didelio kiekio skirtingai metilintų genų, tolimesniam validavimo etapui atrinkti 10 baltymus koduojančių genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI* ir *SFRP1*. Genų *FBN2*, *PCDH8* ir *SFRP1* metilinimas inkstų vėžio atveju jau buvo analizuotas ankstesniuose tyrimuose [39-42], tuo tarpu likusieji genai šiame darbe tirti pirmą kartą. Visų genų metilinimas buvo ypač ccRCC audiniams specifiškas (89-100%), tuo tarpu jautrumas svyravo nuo 18% iki 60%. Genų rinkinys, susidedantis iš *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TAC1* ir *SFRP1* (su ar be *TFAP2B*) pasižymėjo aukštu tiek diagnostiniu jautrumu – 83,7–85,4%, tiek ir specifiskumu – 95,8–97,8%.

Genas *ZNF677* (angl. *zinc finger protein 677*), koduojantis transkripcijos veiksnį, priklausantį cinko pirštų baltymų šeimai, šiame tyrime nustatytas kaip vienas perspektyviausių ccRCC biožymenų. *ZNF677* gali funkcionuoti kaip naviką slopinantis genas, kadangi

padidėjusi jo raiška siejama su ląstelės proliferacijos, migracijos, invazijos slopinimu, ląstelės ciklo stabdymu ir apoptozės indukcija; tuo tarpu sumažėjusi šio geno raiška pasižymi priešingu poveikiu ląstelei [43,44]. Konkrečiai, *ZNF677* indukuoja G0-G1 ląstelės ciklo fazės stabdymą, Akt fosforilinimą ir aktyvina p53 signalinį kelią, slopindamas *CDKN3* transkripciją [44]. Geno *ZNF677* raiškos sumažėjimas dėl promotoriaus DNR metilavimo anksčiau nustatytas plaučių [43], skydliaukės [44] ir burnos [45] navikų atveju, tačiau inkstų vėžio atveju iki šiol netirtas. Šiame darbe *ZNF677* hipermetilimas nustatytas 33,3% ccRCC ligočių ir reikšmingai susietas su geno raiškos sumažėjimu. Metilinta šio geno būsena taip pat siejosi su vėžio progresavimu susijusiais klinikiniais-patologiniais rodikliais, įskaitant didesnės apimties navikus, aukštesnę naviko stadiją, laipsnį, naviko nekrozę ir trumpesnę ligočių bendrą išgyvenamumą. Taigi, gauti rezultatai patvirtina šio geno vaidmenį inkstų vėžio vystymuisi ir progresavimui.

*FBN2* (angl. *Fibrilin-2*) koduoja ekstraląstelinio matrikso glikoproteiną fibriliną 2, kuris yra pagrindinis žmogaus mikrofibrilių komponentas. Fibrilinas-2 reguliuoja transformuojančio augimo veiksnio TGF- $\beta$  (angl. *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) bioprieinamumą ląstelei, sekvestruodamas jį ekstraląsteliniame matrikse (angl. *Extracellular matrix (ECM)*) [46]. Inkstų vėžio atveju fibrilino 2 praradimas gali prisidėti prie piktybinio ląstelių fenotipo per pakitusią TGF- $\beta$  indukuojamų signalinių kelių reguliaciją, angiogenezės ir metastazių susidarymo skatinimą [39]. Konkrečiai, esant sumažėjusiam *FBN2* kiekiui, aktyvuojamas latentinis TGF- $\beta$ , kuris savo ruožtu skatina ląstelių transformaciją, proliferaciją ir migraciją, galimai per epitelinės-mezenchiminės tranzicijos (EMT) indukciją, prisidedančią prie inkstų karcinomos vystymosi [39,47]. *FBN2* hipermetilimas nustatytas 48% ccRCC ligočių ir reikšmingai susietas su trumpesniu jų bendru išgyvenamumu, tuo tarpu ankstesni tyrimai šios sąsajos neparodė [41]. Apibendrinant, *FBN2* metilimas gali būti perspektyvus ccRCC žymuo.

*PCDH8* (angl. *Protocadherin-8*) koduoja transmembraninį ląstelės baltymą, priklausantį protokadherinų baltymų šeimai, dalyvaujančiai ląstelės adhezijos, proliferacijos, diferenciacijos ir migracijos procesuose [48]. *PCDH8* vaidmuo vėžio vystymesi yra prieštaringas. Vieni tyrimai aprašo *PCDH8* kaip naviko supresorių, slopinantį ląstelių proliferaciją, migraciją ir indukuojantį apoptozę ir dėl to yra dažnai nuslopinamas promotoriaus metilinimo įvairiose karcinomose [49-51]. Tačiau kiti tyrimai parodė, jog *PCDH8* gali turėti metastazių susidarymą indukuojančių savybių ir padidėjusi jo raiška skatina ląstelių invaziją ir migraciją per įvairių ECM receptorių sąveikos keliu skatinimą [52,53]. Įdomu tai, kad šiame tyrime nustatytas tiek *PCDH8* hipermetilinimas (40% ligonių), tiek padidėjusi geno raiška, kuri nebuvo susijusi su promotoriaus metilinimo būseną; tad reikalingi išsamesni tyrimai, siekiant išaiškinti šį fenomeną. Vis dėlto, kaip ir ankstesniuose tyrimuose [40], šiame darbe *PCDH8* hipermetilinimas reikšmingai susietas su didesniais navikais, aukštesne naviko stadija ir diferenciacijos laipsniu, kas patvirtina svarbų šio geno vaidmenį ccRCC vystymesi ir progresijoje.

Genas *TFAP2B* (angl. *transcription factor AP-2 beta*) koduoja AP-2 šeimos transkripcijos veiksnį AP-2β. Ląstelėje AP-2 baltymai stimuliuoja proliferaciją ir slopina įvairių ląstelių tipų galutinę diferenciaciją. Būtent *TFAP2B* yra būtinas normaliam inkstų vystymuisi, nes dalyvauja nefrono kanalėlių epitelinių ląstelių diferenciacijoje [54,55]. *TFAP2B* tai pat dalyvauja ir inkstų navikinių ląstelių diferenciacijoje [56,57] galimai per WNT/β-katenino signalinio kelio skatinimą [58]. Šis genas gali tiek aktyvinti, tiek ir slopinti vėžio vystymąsi ir tai priklauso nuo konkretaus audinio tipo bei naviko vystymosi stadijos [59]. Branduolinė *TFAP2B* raiška siejama su mažais, lokalizuotais ir žemo piktybiškumo laipsnio inkstų navikais, galimai dėl AP-2β indukuojamos p21 raiškos, slopinančios ląstelės ciklo perėjimą iš G1 į S fazę [60]. Be to, AP-2β taip pat slopina kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriaus 2 (angl. *vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)*) raišką; tuo tarpu *TFAP2B* praradimas aktyvina VEGFR2 [61], kuris savo ruožtu

skatina angiogenezę ir ccRCC progresiją [62,63]. Šio tyrimo metu buvo nustatytas žymus *TFAP2B* raiškos sumažėjimas ccRCC audiniuose, sutampantis su ankstesniais pastebėjimais [64]. Šio geno hipermetilinimas nustatytas 42% ccRCC audinių, tačiau neturėjo tiesioginių sąsajų su geno raiška ir klinikiniais patologiniais rodikliais. Verta paminėti, jog priešingai nei kitų šiame darbe tirtų genų atveju, *TFAP2B* analizuota seka apėmė ne geno promotorių, o stipriklių jungimosi sritį, kurių metilinimas taip pat svarbus inkstų karcinomos atveju [65]. Taigi *TFAP2B* yra perspektyvus ccRCC biožymuo, tačiau reikalingi išsamesni tyrimai jo klinicinei reikšmei patvirtinti.

Genas *TAC1* (angl. *tachykinin-1*) koduoja sekretuojamą baltymą tachikininą 1, kuris yra neuropeptidų šeimos narys, dalyvaujantis ląstelės sekrecijos, judrumo ir uždegiminiuose procesuose, taip pat slopinantis normalių ląstelių proliferaciją [66]. Dėl šių savybių *TAC1* laikomas naviką slopinančiu genu. Šis genas įtrauktas į validavimo etapą dėl jo dalyvavimo imuninio atsako procesuose, per T-ląstelių brendimo skatinimą ir makrofagų pritraukimą į uždegimines vietas [67]; gausi šių ląstelių infiltracija stebima ir ccRCC navikuose, pasižyminčiuose aukštu imunogeniškumu [68,69]. Tačiau tikslus *TAC1* vaidmuo audinių kancerogenezės procesuose nėra aiškus. Geno *TAC1* hipermetilinimas nustatytas daugelyje vėžio tipų, įskaitant plaučių [70], storžarnės [71], galvos ir kaklo [72], kasos [73], stemplės [74], krūties [75] ir pasižymėjo prognostinėmis savybėmis. Šiame darbe *TAC1* ccRCC audiniuose buvo dažniausiai metilintas (60%) iš visų tirtų genų. Be to, metilinta šio geno būseną ir sumažėjusi raiška reikšmingai susieti su didesniais ccRCC navikais. Taigi, aukštas geno metilinimo dažnis ir sąsaja su naviko dydžiu rodo tiek diagnostinį, tiek prognostinį šio geno potencialą.

*FLRT2* (angl. *Fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2*) koduoja glikozilintą transmembraninį baltymą, turintį ekstraląstelinį leucinu praturtintą domeną, veikiantį ir kaip adhezijos ir kaip signalinė molekulė [76]. *FLRT2* yra ląstelių adhezijos baltymas, sąveikaujantis su ECM esančiu fibronektinu, tiek sukibdamas su juo, tiek jį atstumdamas [77], kas rodo galimą šio baltymo ryšį su naviko

metastazėmis. Krūties vėžio atveju, sumažėjusi *FLRT2* raiška dėl promotoriaus metilinio paskatino ląstelių proliferaciją ir migraciją, tuo tarpu padidėjusi raiška pasižymėjo priešingomis savybėmis [78]. Taigi *FLRT2* veikia kaip naviko supresorius. Šiame darbe sumažėjusi *FLRT2* raiška ir dažnas (45%) promotoriaus hipermetilinimas ccRCC audiniuose nustatytas pirmą kartą. Sumažėjusi *FLRT2* raiška reikšmingai susieta su naviko nekroze, tuo tarpu hipermetilinimas su didesniais navikais, kas patvirtina galimą šio geno, kaip naviko supresoriaus vaidmenį.

*ADAMTS19* (angl. *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 19*) koduoja ADAMTS sekretuojamų metaloproteinazių šeimos narį. Šie baltymai sąveikauja su įvairiais ECM komponentais ar reguliaciniais veiksniais, svarbiais ląstelių adhezijai, migracijai, proliferacijai ir angiogenezei [79]. Nors tiksliai *ADAMTS19* biologinė funkcija nenustatyta, dėl jo panašumo su *ADAMTS17* tikėtina, kad *ADAMTS19* dalyvauja fibrilino mikrofibrilių formavimesi [80]. Taigi, sumažėjusi *ADAMTS19* raiška gali būti susijusi su audinių integralumo praradimu, kas paskatina naviko progresiją. Šiame darbe *ADAMTS19* promotoriaus metilinimas nustatytas 37% tirtų ccRCC navikų ir susietas su daugeliu klinikinių pataloginių rodiklių, įskaitant naviko dydį, intravaskulinę invaziją ir aukštesnę naviko laipsnį, kas patvirtina šio geno sąsają su ccRCC vystymusi ir progresija.

*BMP7* (angl. *bone morphogenetic protein 7*) yra TGF šeimos augimo ir diferenciacijos veiksnys, besijungiantis su fibrilinu ekstraląsteliniam matrikse [81,82]. Suaugusiame organizme didžiausias *BMP7* kiekis nustatomas inkstų audinyje, kur šis baltymas galimai prisideda prie inkstų audinių struktūros palaikymo ir pasižymi antiuždegiminiu poveikiu; tuo tarpu *BMP7* praradimas sukelia inkstų pažeidimus ir neoplazmų formavimąsi [83,84]. Nustatyta, jog *BMP7* slopina nefronų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių diferenciaciją ir epitelinę mezenchiminę tranziciją, mažindamas aktyvaus TGF- $\beta$  kiekį ekstraląsteliniam matrikse [81,83,85]. Taigi, sumažėjusi *BMP7* raiška skatina vėžio vystymąsi ir progresiją galimai per EMT, svarbaus ccRCC vystymuisi, skatinimą [47]. Sumažėjusi šio

geno raiška inkstų vėžio atveju nustatyta ankstesniuose tyrimuose [85,86], tačiau iki šiol promotoriaus DNR metilinizimas nebuvo tirtas. Šiame darbe *BMP7* metilinizimas nustatytas tik penktadaliui ccRCC atvejų, tačiau reikšmingai susietas su didesniais navikais, aukštesniu naviko laipsniu ir nekroze, kas patvirtina šio geno vaidmenį ccRCC vystymesi ir progresijoje.

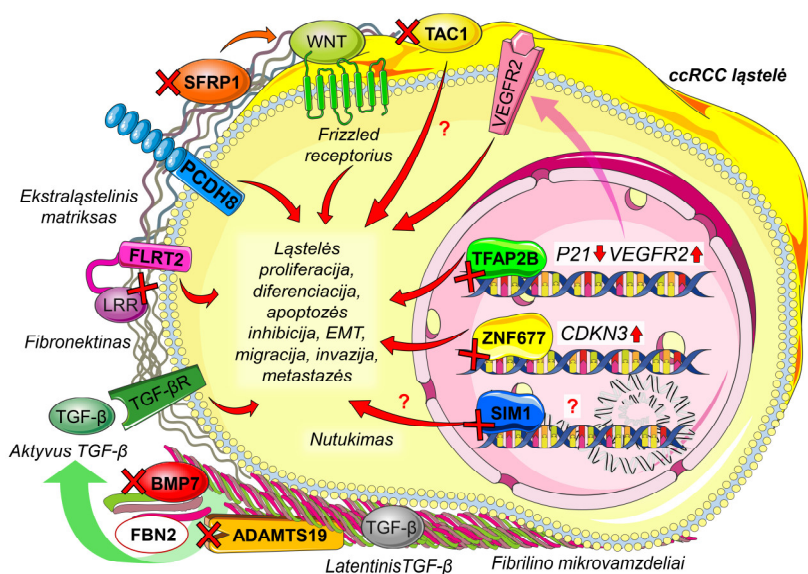
Genas *SIMI* (angl. *single-minded family bHLH transcription factor 1*) koduoja transkripcijos veiksnį, dalyvaujantį vystymosi procesuose [87], tačiau šio geno vaidmuo kancerogenezėje iki šiol nėra aiškus. Nustatytas ryšys tarp *SIM1* ir žmonių nutukimo [88] ir ankstesniuose tyrimuose su nutukimu susijusių genų metilinizimas buvo susietas su prastesnėmis inkstų vėžio prognozėmis [89]. *SIMI* geno metilinizimas aprašytas krūties [90], plaučių [91] ir gimdos kaklelio [92] vėžio atveju ir buvo susietas su metastazėmis. Šiame darbe *SIMI* buvo rečiausiai hipermetilintas (18%) genas ccRCC navikuose, tačiau metilinta jo būseną reikšmingai susieta su didesniais navikais.

*SFRP1* (angl. *Secreted frizzled-related protein 1*) yra *frizzled* baltymų šeimos narys, veikiantis kaip WNT signalinio kelio inhibitorius [93]. WNT signalinis kelias atlieka svarbų vaidmenį ccRCC vystymesi, skatindamas ląstelių proliferaciją, išgyvenimą ir invaziją [93,94]. Taigi, *SFRP1* veikia kaip naviko supresorius, kurio sumažėjusi raiška skatina ccRCC ląstelių augimą per WNT signalinio kelio aktyvinimą [93,95]. Nors visuminės DNR metilinizimo analizės metu *SFRP1* neparodė reikšmingų metilinizimo skirtumų ccRCC audiniuose, šis genas į validavimo etapą įtrauktas kaip gerai žinomas ccRCC biožymuo [93]. Šiame darbe *SFRP1* hipermetilinizimo dažnis ccRCC audiniuose siekė 42% ir buvo didesnis nei ankstesniuose tyrimuose [41,42,95], tačiau nepasižymėjo jokiais sąsajomis su klinikiniais-patologiniais rodikliais.

Apibendrinant, pasirinkti genai dalyvauja įvairiuose ląsteliniuose procesuose ir visi kartu prisideda prie padidėjusios ląstelių proliferacijos, diferenciacijos, apoptozės slopinimo, epitelinės-mezenchiminės tranzicijos, migracijos, invazijos ir metastazių susidarymo skatinimo (**12 pav.**). Tai taip pat gerai atspindi nustatyta



daugelio genų, įskaitant *ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7* ir *SIMI* metilintos būsenos sąsaja su naviko dydžiu, daugelyje tyrimų aprašytu kaip svarbiu prognostiniu ccRCC parametru [96-98]. Tačiau tik nedaugelis genų pasižymėjo reikšmingomis sąsajomis su kitais svarbiais prognostiniais ccRCC rodikliais, kaip naviko stadija (*ZNF677* ir *PCDH8*), naviko laipsnis (*PCDH8*, *ADAMTS19* ir *BMP7*), intravaskulinė invazija (*ADAMTS19*) ir naviko nekrozė (*ZNF677* ir *BMP7*). Atsižvelgiant į tai, mažai tikėtina, jog vienas genas galėtų būti pritaikytas klinikoje ir pakeistų visus klinikinius-patologinius parametrus. Taigi, siekiant pagerinti diagnostinių ir/ar prognostinių testų tikslumą, rekomenduojama naudoti genų rinkinius, kaip tai buvo pritaikyta prostatos ir šlapimo pūslės vėžiui sukurtiems DNR metilinimo testams [15].



**12 pav.** Spėjamas analizuotų genų metilinimo/sumažėjusios raiškos vaidmuo ccRCC vystymesi ir progresijoje.

Genų rinkinių pranašumas puikiai pavaizduotas išgyvenamumo analizėje. Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreivių analizė atskleidė

reikšmingą genų *ZNF677* ir *FBN2* metilintos būsenos sąsają su trumpesniu ligonių bendru išgyvenamumu, tačiau nei vienam kitam genui tokia sąsaja nenustatyta. Tuo tarpu įvairios dviejų-keturių genų kombinacijos buvo reikšmingai susietos su prastesniu ligonių išgyvenamumu. Daugiamatė Kokso proporcingos rizikos analizė atskleidė genų rinkinius, susidedančius iš *ZNF677* ir *BMP7* bei *ZNF677*, *PCDH8* ir *FLRT2*, kaip geriausius prognostinius įrankius, tačiau nei vienas iš jų nebuvo patvirtintas kaip nepriklausomas. Anksčiau atlikti tyrimai nustatė aukštesnę keturių genų rinkinio prognostinę vertę [99], tačiau ji nebuvo koreguota pagal naviko nekrozę, kuri yra svarbus inkstų vėžio prognostinis rodiklis. Be to, pastarajame tyrime analizuoti tik inkstų audiniai, kai tuo tarpu kūno skysčiai, ypač šlapimas, yra tinkamesni greitam ir tiksliam ligos aptikimui bei prognozavimui.

#### Atrinktų biožymenų pritaikymas neinvaziamam ccRCC diagnozavimui ir prognozavimui

Atsižvelgiant į tai, jog pasitaiko perdėto inkstų vėžio gydymo atvejų, kai inkstas pašalinamas dėl gerybinio ar mažo (iki 4 cm) pavojaus nekeliančio naviko [100], yra didelis poreikis išvystyti neinvazinius metodus ligos aptikimui ir prognozavimui, kurie galėtų suteikti gydytojams greitą, objektyvų ir tikslų atsakymą dėl tolimesnio ligonio gydymo.

Tarp dešimties baltymus koduojančių genų, tirtų inkstų audiniuose, šeši iš jų, pasižymėję aukščiausiu metilinimo dažniu ir perspektyviausiomis prognostinėmis savybėmis, įskaitant *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2*, buvo pasirinkti metilinimo analizei šlapimo nuosėdose.

Šiame darbe nustatytas reikšmingai didesnis visų tirtų genų metilinimo intensyvumas ccRCC ligonių šlapimo nuosėdose, lyginant su sveikų asmenų mėginiais. Žymenų jautrumas svyravo tarp 36,6% ir 71,5% ir buvo didesnis, nei daugumos iki šiol šlapime tirtų inkstų

vėžio DNR metilinimo žymenų (apžvelgta [101]). Geriausiomis diagnostinėmis savybėmis (AUC = 0,71, jautrumas – 68%, specifiškumas – 73%) pasižymėjo genas *PCDH8*, kurios žymiai išaugo kombinacijoje su *ZNF677* (AUC = 0.78, jautrumas – 78%, specifiškumas – 69%) ir pralenkė anksčiau aprašyto dviejų genų (*TCF21* ir *PCDH17*) rinkinio diagnostinį potencialą [19]. Trijų genų kombinacija *ZNF677*, *PCDH8* ir *FLRT2* kaip diagnostinis įrankis taip pat pasirodė daug žadanti (AUC = 0,78, jautrumas – 76%, specifiškumas – 75%). Nors keletas ankstesnių tyrimų aprašė genų rinkinius, pasižyminčius geresnėmis diagnostinėmis charakteristikomis [16,17,20], rezultatai buvo gauti analizuojant nedidelį mėginių kiekį ( $\leq 50$ ), tiriant klasikinius naviką slopinančius genus.

Genų rinkinys *ZNF677* ir *PCDH8* pasižymėjo ne tik geromis diagnostinėmis, bet ir prognostinėmis savybėmis. Išgyvenamumo analizė atskleidė, jog metilinta *PCDH8* promotrius būseną yra nepriklausomas prognostinis ccRCC biožymuo (HR – 5,7). Tačiau kombinacijoje su *ZNF677*, *PCDH8* pasižymėjo dar geresnėmis prognostinėmis savybėmis (HR – 12,5), kuri kartu su liginio amžiumi, lytimi ir naviko nekroze patvirtinta kaip stiprus nepriklausomas ccRCC liginų bendro išgyvenamumo rodiklis. Iki šiol aprašytas tik vienas tyrimas, kuriame analizuojama šlapime aptinkamo DNR metilinimo prognostinė reikšmė. Outeiro-Pinho *et al.* [21] aprašė sąsają tarp šlapime cirkuliuojančios miR-30a geno metilinimo ir ligai specifinio išgyvenamumo. Tačiau gauti rezultatai nepasitvirtino nepriklausomoje imtyje, kas gerai atspindi tokių rezultatų validavimo svarbą. Apibendrinant, šiame darbe gauti rezultatai parodo galimybę prognozuoti ccRCC progresiją atsižvelgiant tik į dviejų šlapime aptinkamų biožymenų metilinimo būseną, tačiau reikalingi tolimesni išsamūs tyrimai, siekiant perkelti šį genų rinkinį į klinikinę praktiką.

Nepaisant svarbaus šio darbo indėlio į naujų inkstų vėžio DNR metilinimo biožymenų paiešką, šis tyrimas taip pat turi keletą svarbių trūkumų. Pagrindinis trūkumas yra palyginti nedidelė tiriamųjų imtis ir nepriklausomos imties nebuvimas. Taigi, atsižvelgiant į palyginti

trumpą ligonių stebėjimo laikotarpį ir nedidelį mirčių kiekį tiriamoje grupėje, gauti išgyvenamumo rezultatai turėtų būti vertinami atsargiai. Be to, šiame darbe buvo prieinami tik bendro ligonių išgyvenamumo duomenys, kurie pasižymi žemesne prognostine verte, lyginant su išgyvenamumo be ligos duomenimis [102]. Kitas svarbus trūkumas – maža mėginių, tirtų dėl visuminio DNR metilinimo profilio imtis. Palyginus ccRCC ir NIA metilinimo profilį, nustatyti gausūs DNR hipremetilinimo pokyčiai 175 genuose, iš kurių tik mažai dalių atlikti išsamesni tyrimai. Akivaizdu, jog tarp jų yra ir daugiau genų turinčių svarbią klinikinę reikšmę ccRCC ligoniams ir tikėtina, kad jie bus tiriami ateityje. Taip pat šiame darbe nebuvo tirtas atrinktų žymenų specifiskumas būtent inkstų vėžiui, dėl to būtinas jų ištyrimas bent jau kitų urogenitalinės kilmės navikų atveju, siekiant patvirtinti juos kaip neinvazinius inkstų vėžio biožymenis. Be to, idealiu atveju DNR metilinimo biožymenų raiška turėtų būti sumažėjusi [15] tačiau tai nebuvo patvirtinta dviejų tirtų genų *FBN2* ir *PCDH8* atveju ir tik vienintelio *ZNF677* metilinimas buvo tiesiogiai susietas su geno raiškos sumažėjimu. Tad reikalingi išsamesni tyrimai, siekiant parinkti būtent tas CpG pozicijas, kurio būtų ypač kliniškai svarbios.

Nepaisant šių trūkumų, aprašytas tyrimas padarė nemažą indėlį ccRCC specifinių DNR metilinimo biožymenų paieškai Lietuvos kohortoje, kur sergamumas šiuo vėžiu yra didžiausias pasaulyje. Daugelio analizuotų genų DNR metilinimas ccRCC atveju tirtas pirmą kartą ir kai kurie iš jų pasižymėjo ypač palankiais rezultatais dėl jų sąsajos su įvairiais klinikiniais-patologiniais rodikliais ir ligonių išgyvenamumu. Genai *ZNF677* ir *PCDH8* pasižymėjo ypač aukštu potencialu neinvazinei ccRCC detekcijai ir stebėsenai. Nors naujų žymenų pritaikymas klinicinei praktikai yra sudėtingas ir daugiapakopis procesas, atsižvelgiant į asimptomatinę ligos eigą ir aukštus mirtingumo rodiklius, labai tikėtina, kad bent dalis šių genų pritrauks tyrėjų dėmesį ir paskatins tolimesnius validavimo tyrimus, priartinančius šiuos žymenis prie panaudojimo klinikinėje praktikoje.

## IŠVADOS

1. Palyginus ccRCC audinių DNR metilinimo ir genų raiškos profilį su NIA, reikšmingi metilinimo ( $FC \geq 1,5$ ) ir raiškos ( $FC \geq 2,0$ ) pokyčiai nustatyti atitinkamai 367 ir 3942 genuose iš kurių pusė buvo hipermetilinti ir sumažėjusios raiškos. Pakitusio metilinimo ir raiškos genai reikšmingai siejasi su biologiniais ir molekuliniais procesais, svarbiais vėžio vystymuisi ir progresijai.
2. Genų *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *SFRP1*, *ADAMTS19*, *BMP7* ir *SIMI* reguliacinės sritys ccRCC audiniuose metilintos statistiškai reikšmingai dažniau (18–60%) lyginant su NIA (2–11%). Šešių genų kombinacija – *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *SFRP1* pasižymi aukštu diagnostiniu jautrumu ir specifiškumu, atitinkamai 85,4%, ir 95,6%.
3. Daugelio genų (7/10) hipermetilinimas reikšmingai siejasi bent su vienu klinikiniu-patologiniu rodikliu, įskaitant naviko dydį, aukštesnę naviko stadiją, laipsnį, intravaskulinę invaziją ir nekrozę. Metilinta genų *ZNF677* ir *FBN2* bei įvairių dviejų-keturių genų kombinacijų būseną ccRCC audiniuose reikšmingai siejasi su trumpesniu bendru ligonių išgyvenamumu.
4. Genų *ZNF677*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* raiška ccRCC audiniuose yra reikšmingai žemesnė, lyginant su NIA. Žemesnė geno *ZNF677* raiška reikšmingai siejasi su metilinta promotoriaus būseną ir daugeliu klinikinių-patologinių rodiklių, bei trumpesniu bendru ligonių išgyvenamumu.
5. Genai *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* ir *FLRT2* yra statistiškai reikšmingai intensyviau ir dažniau metilinti ccRCC ligonių šlapimo nuosėdose, lyginant su sveikų asmenų mėginiais. Genų *ZNF677* ir *PCDH8* kombinacija, tiek su *FBN2* ar *FLRT2*, tiek ir be jų, pasižymi aukštu diagnostiniu jautrumu ir specifiškumu, atitinkamai 69-78% ir 69-80%.
6. Metilinta *PCDH8* būseną ccRCC ligonių šlapimo nuosėdose reikšmingai siejasi su aukštesne naviko stadija ir plitimu į riebalus bei yra nepriklausomas prognostinis ligonių bendro išgyvenamumo rodiklis (HR – 5,7) kurio prognostinė vertė žymiai išauga kombinacijoje su *ZNF677* (HR – 12,5).

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Tiesiogiai su disertacijos tema susiję straipsniai, paskelbti žurnaluose su cituojamumo rodikliu (angl. *impact factor (IF)*), įtrauktuose į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę:

1. **Kubiliute R**, Zukauskaite K, Zalimas A, Ulys A, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Zelvys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Clinical significance of novel DNA methylation biomarkers for renal clear cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021 Oct 23. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03837-7>
2. **Kubiliute R**, Zalimas A, Bakavicius A, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Clinical significance of *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIMI* and *SFRP1* promoter methylation in renal clear cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2021 Oct 5;14:4979-4990. <https://doi.org/10.2147/OTT.S330341>
3. **Kubiliute R**, Jarmalaite S. Epigenetic Biomarkers of Renal Cell Carcinoma for Liquid Biopsy Tests. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16),8846; <https://doi.org/10.3390/ijms22168846>

## PATENTINĖ PARAIŠKA

Doktorantūros metu gautų rezultatų pagrindu parengta patento paraiška Tarptautiniam patentų biurui.

**Išradėjai:** Kubiliūtė R, Jarmalaitė S

**Patento paraiškos numeris:** PCT/IB2021/052532

**Pavadinimas:** Clear cell renal cell carcinoma biomarkers and uses therefor.

## KONFERENCIJŲ PRANEŠIMAI

Tiesiogiai su disertacijos tema susijusios tezės, pristatytos žodiniiais ar stendiniais pranešimais tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Stendiniai pranešimai:

1. **Kubiliūtė R**, Žukauskaitė K, Žalimas A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. DNA methylation biomarkers of clear cell renal carcinoma. ESMO „Molecular analysis for precision oncology virtual congress“. 2020 Spalio 9-10 d. *Annals of Oncology* <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.2184>
2. **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Bakavičius A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Novel DNA Methylation Biomarkers of Clear Cell Renal Carcinoma. EAU 6th Baltic Meeting. Talinas (Estija), 2019 gegužės 24–25 d. *European Urology* [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)32209-2](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32209-2)
3. **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. DNA Methylation Biomarkers of Clear Cell Renal Carcinoma. The Coins' 19 – 14th international conference of natural and life sciences. Vilnius (Lietuva), 2019 vasario 26-28 d.
4. **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Genome-wide DNA methylation profiling in Clear Cell Renal Carcinoma. XV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society. Dubingiai (Lietuva). 2018 birželio 27-29 d.
5. **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. DNA Methylation Profile of Clear Cell Renal Carcinoma. EAU 5th Baltic Meeting. Ryga (Latvija). 2018 gegužės 25-26 d.

6. **Kubiliūtė R**, Daniūnaitė K, Žalimas A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Renal Cell Carcinoma. EAU 4th Baltic Meeting. Vilnius (Lietuva). 2017 gegužės 26-27 d.

Rezultatai, pristatyti kitų tyrėjų:

1. Jarmalaitė S, **Kubiliūtė R**, Nainys J, Zalimas A, Bakavicius A, Ulys A, Jankevicius F, Mazutis L. DNA Methylation Biomarkers of Clear Cell Renal Carcinoma. The 26th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR). Porto (Portugalija). 2019 spalio 10-12 d.
2. Žukauskaitė K, **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Jarmalaitė S. Identification of novel urinary biomarkers for clear cell renal cell carcinoma diagnosis. „Health for All“, Kaunas (Lithuania). 2020 lapkričio 19-20 d. [apdovanotas kaip geriausia prezentacija]
3. Žukauskaitė K, **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Jarmalaitė S. Analysis of novel urinary DNA-methylation-based biomarkers of clear cell renal cell carcinoma. 14th international young scientists conference „Biology: from a molecule up to the biosphere“. Charkovas (Ukraina). 2019 lapkričio 27-29 d. [apdovanotas kaip geriausia prezentacija].
4. Šumskaitė A, **Kubiliūtė R**, Žalimas A, Ulys A, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Promoter DNA Methylation Analysis of BMP7, PCDH8 and TFAP2B Genes in Clear Cell Renal Carcinoma. The Coins'19 – 14th international conference of natural and life sciences. Vilnius (Lietuva). 2019 Vasario 26-28 d.



## SUMMARY

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common subtype of kidney tumors, accounting for the majority of deaths from genitourinary cancers with the highest incidence rates in Lithuania. At least one-fifth of patients are present with metastatic disease at diagnosis, which is attributed to the typical lack of symptoms of the primary ccRCC and caused the significant health burden of that malignancy. After the introduction of widespread use of ultrasound imaging in everyday clinical practice, the majority of kidney tumors are detected at an early stage; however, it has also resulted in the increase of overtreatment of patients with non-life-threatening benign renal tumors. In addition, more than a quarter of patients will develop the distant disease even after surgical tumor excision. Thus, there is a vital need for new and highly desirable non-invasive biomarkers which alone or in combination with imaging results would provide valuable information about disease presence, aggressiveness, and prognosis. Considering this, we tried to develop a gene-specific DNA methylation tool for non-invasive and early kidney cancer diagnosis and follow-up.

Based on genome-wide DNA methylation and gene expression profiling in 11 pairs of ccRCC and noncancerous renal tissues (NRT), abundant changes in DNA methylation and gene expression were observed in ccRCC. Deregulated genes were significantly enriched among specific biological and molecular processes related to tumor development and progression. Based on comparisons by tissue histology, ten protein-coding genes, namely *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, *SIM1*, and *SFRP1*, were selected for further DNA methylation validation in 123 ccRCC and 45 NRT samples. Significantly higher methylation frequencies for all genes were found in ccRCC tissues compared to NRT (17-60% vs. 0-11%). The best diagnostic performance was demonstrated for a panel of *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1* & *SFRP1* with 85.4% of

sensitivity and 95.6% of specificity. Hypermethylation of most genes was significantly related with at least one of clinical-pathological parameter, including larger tumor size (*ZNF677*, *PCDH8*, *TAC1*, *FLRT2*, *ADAMTS19*, *BMP7*, and *SIMI*), higher stage (*ZNF677* and *PCDH8*), higher grade (*PCDH8*, *ADAMTS19*, and *BMP7*), intravascular invasion (*ADAMTS19*), and necrosis (*ZNF677* and *BMP7*). Moreover, the methylated status of *ZNF677*, *FBN2*, and various two-four gene panels was significantly related to shorter patient's overall survival (OS).

Based on methylation frequencies and with regard to correlations with clinical-pathological variables and prognostic value, six genes *ZNF677*, *FBN2*, *PCDH8*, *TFAP2B*, *TAC1*, and *FLRT2*, were selected for further methylation analysis in the urine sediments samples from 123 ccRCC patients and 92 asymptomatic (healthy) controls (ASC). Higher methylation levels of all genes were established in the urine of ccRCC cases as compared to ASC with 37-68% of sensitivities and 53-96% of specificities. The highest diagnostic power (AUC = 0.78) was established for the panel of *ZNF677* & *PCDH8*, either with or without *FBN2* or *FLRT2*, with 68-78% of sensitivities and 68-80% of specificities. Moreover, the methylated status of *PCDH8* was significantly related to the higher tumor stage and independently predicted the patient's OS with HR: 5.7, which considerably increased in combination with *ZNF677* – HR: 12.5.

To sum up, this study revealed a novel non-invasive and highly promising DNA methylation-based tool for the detection and follow-up of ccRCC patients, which potentially will attract the attention for further validation and possible application to the clinic.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Siegel RL et al. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015;65:5-29.
- [2] Chow WH et al. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2010;7:245–257.
- [3] Hsieh JJ et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17009.
- [4] Dabestani S et al. Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. *World J Urol* 2016;34:1081-1086.
- [5] Patard JJ et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2003;44(2):226-32.
- [6] Lee CT et al. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol*. 2002;7(4):135-40.
- [7] Linehan W et al. Molecular diagnosis and therapy of kidney cancer. *Annu Rev Med*. 2010;61:329–43.
- [8] Mitchell TJ et al. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell*. 2018;173(3):611-623.e17.
- [9] Gerlinger M et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet*. 2014;46(3):225-233.
- [10] Turajlic S et al. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell*. 2018;173(3):581-594.e12.
- [11] Turajlic S et al. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell*. 2018;173(3):595-610.e11.
- [12] Arai E et al. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;4(1):58-73.
- [13] Chen W et al. DNA methylation-based classification and identification of renal cell carcinoma prognosis-subgroups. *Cancer Cell Int*. 2019;19:185.
- [14] Ricketts CJ et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep*. 2018;23(1):313-326.e5.
- [15] Koch A et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):459-466.
- [16] Battagli C et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res*. 2003;63(24):8695-9.
- [17] Hoque MO et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res*. 2004;64(15):5511-7.
- [18] Costa VL et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5842-51.

- [19] Costa VL et al. TCF21 and PCDH17 methylation: An innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers. *Epigenetics*. 2011;6(9):1120-30.
- [20] Xin J et al. Clinical potential of TCF21 methylation in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016;12(2):1265-1270.
- [21] Outeiro-Pinho G et al. MicroRNA-30a-5p(me): a novel diagnostic and prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma in tissue and urine samples. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):98.
- [22] Nuzzo PV et al. Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nat Med*. 2020;26(7):1041-1043.
- [23] Fuhrman SA et al. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol*. 1982;6:655–663.
- [24] Delahunt B et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1490-504.
- [25] Kubiliute R et al. Clinical significance of novel DNA methylation biomarkers for renal clear cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021. Online ahead of print.
- [26] Kubiliute R et al. Clinical significance of ADAMTS19, BMP7, SIM1 and SFRP1 promoter methylation in renal clear cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2021;14:4979-4990.
- [27] Rossi SH et al. Imaging for the diagnosis and response assessment of renal tumours. *World J Urol*. 2018;36(12):1927-1942.
- [28] Choudhary S et al. Renal oncocytoma: CT features cannot reliably distinguish oncocytoma from other renal neoplasms *Clin Radiol*. 2009;64(5):517-22.
- [29] Hindman N et al. Angiomyolipoma with minimal fat: can it be differentiated from clear cell renal cell carcinoma by using standard MR techniques? *Radiology*. 2012;265(2):468-77.
- [30] Richard PO et al. Is Routine Renal Tumor Biopsy Associated with Lower Rates of Benign Histology following Nephrectomy for Small Renal Masses? *J Urol*. 2018;200(4):731-736.
- [31] Morris MR et al. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat. Rev. Nephrol*. 2017;13(1):47-60.
- [32] Ricketts CJ et al. Genome- wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Epigenetics*. 2012;7(3):278-90.
- [33] Ibragimova I et al. Genome-wide promoter methylome of small renal masses. *PLoS One*. 2013;8(10):e77309.
- [34] Kang HW et al. Methylation Signature for Prediction of Progression Free Survival in Surgically Treated Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2019;34(19):e144.
- [35] Kim YJ et al. ZNF492 and GPR149 methylation patterns as prognostic markers for clear cell renal cell carcinoma: Array-based DNA methylation profiling. *Oncol Rep*. 2019;42(1):453-460.
- [36] Yoo KH et al. Epigenetic inactivation of HOXA5 and MSH2 gene in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Int*. 2010;60(10):661-6.

- [37] Evelönn EA et al. DNA Methylation Associates With Survival in Non-Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1):65.
- [38] Evelönn EA et al. DNA methylation status defines clinicopathological parameters including survival for patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Tumour Biol*. 2016;37(8):10219-28.
- [39] Morris MR et al. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2011;30(12):1390-401.
- [40] Lin YL et al. Aberrant methylation of PCDH8 is a potential prognostic biomarker for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Med. Sci. Monit*. 2014;20:2380-5.
- [41] Ricketts CJ et al. Tumorspecific hypermethylation of epigenetic biomarkers, including SFRP1, predicts for poorer survival in patients from the TCGA Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (KIRC) project. *PLoS One*. 2014;9(1):e85621.
- [42] Atschekzei F et al. SFRP1 CpG island methylation locus is associated with renal cell cancer susceptibility and disease recurrence. *Epigenetics*. 2012;7(5):447-57.
- [43] Heller G et al. DNA methylation transcriptionally regulates the putative tumor cell growth suppressor ZNF677 in non-small cell lung cancers. *Oncotarget*. 2015;6(1):394-408.
- [44] Li Y et al. ZNF677 Suppresses Akt Phosphorylation and Tumorigenesis in Thyroid Cancer. *Cancer Res*. 2018;78(18):5216-5228.
- [45] Dai Y et al. Identification of hub methylated-CpG sites and associated genes in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med*. 2020;9(9):3174-3187.
- [46] van Loon K et al. Role of fibrillin-2 in the control of TGF- $\beta$  activation in tumor angiogenesis and connective tissue disorders. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(2):188354.
- [47] Pantuck AJ et al. NF-kappaB-dependent plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 2010;70(2):752-61.
- [48] Kahr I et al. Delta-protocadherins in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:169-92.
- [49] He D et al. Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2012;21(6):569-75.
- [50] Yu JS et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene*. 2008;27(34):4657-65.
- [51] Zhang D et al. Frequent silencing of protocadherin 8 by promoter methylation, a candidate tumor suppressor for human gastric cancer. *Oncol Rep*. 2012;28(5):1785-91.
- [52] Li Z et al. MicroRNA-429 functions as a regulator of epithelial-mesenchymal transition by targeting Pcdh8 during murine embryo implantation. *Hum Reprod*. 2015;30(3):507-18.

- [53] Lin Y et al. Protocadherin-8 promotes invasion and metastasis via laminin subunit  $\gamma 2$  in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(3):732-740.
- [54] Eckert D et al. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 2005;6(13):246.
- [55] Moser M et al. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev.* 1997;11(15):1938-48.
- [56] Ikram F et al. Transcription factor activating protein 2 beta (TFAP2B) mediates noradrenergic neuronal differentiation in neuroblastoma. *Mol Oncol.* 2016;10(2):344-59.
- [57] Yoldi G et al. RANK Signaling Blockade Reduces Breast Cancer Recurrence by Inducing Tumor Cell Differentiation. *Cancer Res.* 2016;76(19):5857-5869.
- [58] Wang L et al. Long non-coding RNA TP73-AS1 promotes TFAP2B-mediated proliferation, metastasis and invasion in retinoblastoma via decoying of miRNA-874-3p. *J Cell Commun Signal.* 2020;14(2):193-205.
- [59] Liang S et al. Dual role of transcription factor AP-2 in carcinogenesis. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010;39(4):430-5.
- [60] Oya M et al. Differential expression of activator protein-2 isoforms in renal cell carcinoma. *Urology.* 2004;64(1):162-7.
- [61] Wang Y et al. Protein kinase D up-regulates transcription of VEGF receptor-2 in endothelial cells by suppressing nuclear localization of the transcription factor AP2 $\beta$ . *J Biol Chem.* 2019;294(43):15759-15767.
- [62] Braga EA et al. Molecular Mechanisms in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Role of miRNAs and Hypermethylated miRNA Genes in Crucial Oncogenic Pathways and Processes. *Front Genet.* 2019;10:320.
- [63] Reuter VE et al. Differential diagnosis of renal tumours with clear cell histology. *Pathology.* 2010;42(4):374-83.
- [64] Tun HW et al. Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One.* 2010;5(5):e10696.
- [65] Hu CY et al. Kidney cancer is characterized by aberrant methylation of tissue-specific enhancers that are prognostic for overall survival. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(16):4349-60.
- [66] Rameshwar P et al. Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood.* 1996;88(1):98-106.
- [67] Steinhoff MS et al. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiological Reviews.* 2014;94(1):265-301.
- [68] Chevrier S et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell.* 2017;169(4):736-749.e18.
- [69] Diaz-Montero CM et al. The immunology of renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(12):721-735.
- [70] Wrangle J et al. Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1856-64.

- [71] Tham C et al. Postoperative serum methylation levels of TAC1 and SEPT9 are independent predictors of recurrence and survival of patients with colorectal cancer. *Cancer*. 2014;120(20):3131-41.
- [72] Misawa K et al. Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer. *Oncotarget*. 2016;7(18):26087-98.
- [73] Henriksen SD et al. Promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma staging. *Int J Cancer*. 2017;141(12):2489-2497.
- [74] Jin Z et al. Hypermethylation of tachykinin-1 is a potential biomarker in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(21):6293-300.
- [75] Jeschke J et al. Biomarkers for detection and prognosis of breast cancer identified by a functional hypermethylome screen. *Epigenetics*. 2012;7(7):701–709.
- [76] Lacy SE et al. Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins. *Genomics*. 1999;62(3):417-26.
- [77] Flintoff KA et al. FLRT2 interacts with fibronectin in the ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Cell Physiol*. 2014;229(10):1538-47.
- [78] Bae H et al. Epigenetically regulated Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 (FLRT2) shows tumor suppressor activity in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):272.
- [79] Cal S et al. ADAMTS proteases and cancer. *Matrix Biol*. 2015;44-46:77-85.
- [80] Hubmacher D et al. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily proteins and fibrillin-1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and function. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(19):3137-48.
- [81] Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(3):568-73.
- [82] Gregory KE et al. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2005;280(30):27970-80.
- [83] Wang Z et al. Protective effect of BMP-7 against aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cell injury. *Toxicol Lett*. 2010 Oct;198(3):348-57.
- [84] Gould SE et al. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002;61(1):51-60.
- [85] Basic-Jukic N et al. Bone morphogenetic protein-7 expression is down-regulated in human clear cell renal carcinoma. *J Nephrol*. 2011;24(1):91-7.
- [86] Markić D et al. Expression of bone morphogenetic protein-7, its receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer. *Coll Antropol*. 2010;34 Suppl 2:149-53.
- [87] Michaud JL et al. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 1998;12:3264–3275.

- [88] Kim MJ et al. Functional characterization of SIM1-associated enhancers. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1700-8.
- [89] Sidaway P. Kidney cancer: Methylation of obesity-related genes is associated with prognosis. *Nat Rev Urol.* 2017;14(8):452.
- [90] Faryna M et al. Genome-wide methylation screen in low-grade breast cancer identifies novel epigenetically altered genes as potential biomarkers for tumor diagnosis. *FASEB J.* 2012;26(12):4937-50.
- [91] Daugaard I et al. Identification and validation of candidate epigenetic biomarkers in lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:35807.
- [92] Kim HJ et al. Aberrant single-minded homolog 1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2018;46(1):15-21.
- [93] Mo S et al. SFRP1 Promoter Methylation and Renal Carcinoma Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Nippon Med Sch.* 2018;85(2):78-86.
- [94] Valenta T et al. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin *EMBO J.* 2012; 31(12): 2714–2736.
- [95] Morris MR et al. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(14):2104-17.
- [96] Schiavina R et al. The Prognostic Impact of Tumor Size on Cancer-Specific and Overall Survival Among Patients With Pathologic T3a Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer.* 2015;13(4):e235-e241.
- [97] Chen L et al. Influence of tumor size on oncological outcomes of pathological T3aN0M0 renal cell carcinoma treated by radical nephrectomy. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173953.
- [98] Li L et al. The critical impact of tumor size in predicting cancer special survival for T3aM0M0 renal cell carcinoma: A proposal of an alternative T3aN0M0 stage. *Cancer Med.* 2021;10(2):605-614.
- [99] van Vlodrop IJH et al. A four- gene promoter methylation marker panel consisting of GREM1, NEURL, LAD1, and NEFH predicts survival of clear cell renal cell cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2017;23(8):2006-2018.
- [100] Sohlberg EM, Metzner TJ, Leppert JT. The harms of overdiagnosis and overtreatment in patients with small renal masses: A mini-review. *Eur Urol Focus* 2019;5(6):943–945
- [101] Kubiliute R et al. Epigenetic Biomarkers of Renal Cell Carcinoma for Liquid Biopsy Tests. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8846.
- [102] Sauerbrei W et al. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged Explanation and Elaboration. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(8):803-811.



## PRIEDAI

**P1 lentelė.** Vienmačiai ir daugiamačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai, analizuojant atrinktų genų metilinią ccRCC audiniuose ir demografinius bei klinikinius-patologinius ligonių rodiklius.

Kintamieji		VIENMATĖ ANALIZĖ		DAUGIAMATĖ ANALIZĖ (atgalinė atranka)			
		P vertė	HR [95% PI]	Atskirai grupėje		Visi kartu	
		P vertė	HR [95% PI]	P vertė	HR [95% PI]	P vertė	HR [95% PI]
Vienas genas	ZNF677 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.029</b>	2.61 [1.10 - 6.17]	-			
	FBN2 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.026</b>	2.96 [1.14 - 7.66]	<b>0.026</b>	2.96 [1.15 - 7.62]		-
Du genai	ZNF677 & FBN2 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.047</b>	2.78 [1.02 - 7.58]	-			
	ZNF677 & SFRP1 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.048</b>	2.76 [1.01 - 7.51]	-			
	ZNF677 & BMP7 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.008</b>	3.28 [1.38 - 7.78]	<b>0.008</b>	3.27 [1.38 - 7.78]		-
	ZNF677 & SIM1 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.026</b>	2.69 [1.13 - 6.37]	-			
	PCDH8 & FLRT2 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.044</b>	2.82 [1.04 - 7.68]	-			
Trys genai	ZNF677, FBN2 & BMP7 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.047</b>	2.78 [1.02 - 7.58]	-			
	ZNF677, PCDH8 & FLRT2 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.038</b>	3.18 [1.07 - 9.45]	<b>0.038</b>	3.18 [1.07 - 9.45]		-
	ZNF677, BMP7 & SIM1 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.050</b>	2.39 [1.01 - 5.67]	-			
	PCDH8, SFRP1 & BMP7 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.042</b>	3.11 [1.05 - 9.18]	-			
	FBN2, SFRP1 & ADAMTS19 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.050</b>	4.29 [1.00 - 18.3]	-			
	PCDH8, FLRT2 & BMP7 ( <i>M vs. N</i> )	0.051	2.73 [1.00 - 7.44]	-			
Keturi genai	ZNF677, PCDH8, FLRT2 & BMP7 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.044</b>	3.08 [1.04 - 9.15]	<b>0.044</b>	3.08 [1.04 - 9.15]		-
	ZNF677, PCDH8 & FLRT2, SIM1 ( <i>M vs. N</i> )	<b>0.046</b>	3.03 [1.02 - 9.00]	-			

**P1 lentelė.** Tęsinys.

Kintamieji		VIENMATĖ ANALIZĖ		DAUGIAMATĖ ANALIZĖ (atgalinė atranka)			
		P vertė	HR [95% PI]	Atskirai grupėje		Visi kartu	
Klinikiniai- patologiniai rodikliai	Amžius, metai (kiek.)	<b>&lt;0.001</b>	1.09 [1.04 - 1.14]	<b>&lt;0.001</b>	1.10 [1.04 - 1.16]	<b>&lt;0.001</b>	1.10 [1.04 - 1.16]
	Lytis (vyras vs. moteris)	<b>0.038</b>	2.73 [1.06 - 7.08]		-		
	Naviko dydis (kiek.)	<b>0.036</b>	1.01 [1.00 - 1.02]	<b>0.004</b>	1.02 [1.01 - 1.03]	<b>0.004</b>	1.02 [1.01 - 1.03]
	Stadija (pT3-4 vs. pT1-2)	<b>0.003</b>	5.12 [1.72 - 15.24]		-		
	<i>Fuhrman</i> laipsnis ( $\geq 3$ vs. $\leq 2$ )	0.433	1.42 [0.59 - 3.44]		-		
	WHO/ISUP laipsnis (3 vs. $\leq 2$ )	<b>0.012</b>	3.04 [1.28 - 7.24]		-		
	Invazija į riebalus (yra vs. nėra)	<b>0.001</b>	4.83 [1.87 - 12.48]		-		
	Nekrozė (yra vs. nėra)	<b>&lt;0.001</b>	4.97 [2.10 - 11.76]	<b>&lt;0.001</b>	4.97 [2.10 - 11.8]	<b>0.010</b>	3.22 [1.32 - 7.84]

M/N – metilinta/nemetilinta geno reguliacinių sričių būseną; kiek. – kiekybinis kintamasis; WHO/ISUP – Pasaulio sveikatos organizacijos/Tarptautinė urologinės patologijos draugija; pT – patologinė naviko stadija; HR – rizikos santykis (angl. *Hazard Ratio*); PI – Pasikliautinas intervalas. Reikšmingos P vertės paryškintos.

## TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

### **Bendra informacija**

---

Vardas	Raimonda Kubiliūtė
Pavardė	
Gimimo data	1992 gegužės 26 d.
Pagrindinė darbovietė	Nacionalinis vėžio institutas, Genetinės diagnostikos laboratorija, Baublio g. 3b, LT-08406, Vilnius, Lietuva
Antra darbovietė	ThermoPharma Baltic; Sauletekio al. 7C, LT-10257 Vilnius, Lietuva
Kontaktai	Tel: +37064128534; el.paštas: kubiliute.raitonda5@gmail.com

### **Išsilavinimas**

---

2016-2020	Doktorantūros studijos (Biologija, N 010); Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva.
2014-2016	Genetikos magistras ( <i>Magna Cum Laude</i> ), Gamtos mokslų fakultetas, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva.
2010-2014	Biologijos bakalauras, Gamtos mokslų fakultetas, Vytauto didžiojo universitetas, Kaunas Lietuva.

### **Kursai**

---

2014	Laboratorinių gyvūnų mokslo kursas; Vilniaus universitetas (FELASA C kategorijos pažymėjimas); Vilnius, Lietuva
------	--

### **Darbo patirtis**

---

2020-2021	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete.
Nuo 2019	Tyrėjas ThermoPharma Baltic.

Nuo 2019	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Genetinės diagnostikos laboratorijoje, Nacionaliniame vėžio institute.
2016-2019	Biologė, Genetinės diagnostikos laboratorijoje, Nacionaliniame vėžio institute.
2015-2017	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Gamtos mokslų fakultete, Vytauto didžiojo universitete.

### **Moksliniai projektai**

---

Nuo 2015	Dalyvauta 4 projektų vykdyme, 1 vykdomas šiuo metu.
----------	---

### **Mokslinės publikacijos**

---

Nuo 2016	Paskelbtos šešiose mokslinės publikacijos žurnaluose, turinčiuose citavimo indeksą (angl. <i>Impact Factor (IF)</i> ) <i>Clarivate Analytics Web of Science</i> platformoje.
----------	--

### **Mokslinės konferencijos**

---

Nuo 2014	Moksliniai rezultatai pristatyti 11 tarptautinių ir nacionalinių konferencijų žodiniiais ir stendiniais pranešimais.
----------	--

### **Narystės**

---

Nuo 2014	Lietuvos biochemikų draugija.
Nuo 2020	Europos medicinos onkologijos draugija (ESMO)

# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

Vilnius University Press  
9 Saulėtekio Ave., Building III, LT-10222 Vilnius  
Email: [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Print run 20