

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

GRETA MEIDUTĖ

**Kiekybinė histonus modifikuojančių genų ir jų potencialių reguliacinių miRNR
analizė prostatos navikuose**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovė
doc. dr. Kristina Daniūnaitė

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	3
SANRAUKA	4
SUMMARY	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Prostatos anatomija, histologija ir patologija	7
1.2 PV klinikinės–patologinės charakteristikos	9
1.3 PV progresavimas	12
1.4 PV gydymas	14
1.5 PV molekuliniai žymenys	15
1.6 Histonų metilinimas	19
1.7 Histonų metilinimas ir PV	20
1.8 Histonų metilinimo reguliatoriai ir epigenetinė terapija	21
1.9 MiRNR ir jos biogenezė	25
1.10 MiRNR ir vėžys	27
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1 Ligoniai ir mėginiai	29
2.2 RNR skyrimas	29
2.3 Komplementarios DNR sintezė	30
2.4 Kiekybinė PGR	30
2.5 MiRNR atrinkimas	31
2.6 Statistinė analizė	32
3. REZULTATAI	33
3.1. HM genų raiškos analizė	33
3.1.1 Genų raiškos palyginimas PV ir kontroliniuose mėginiuose	33
3.1.2 Genų raiškos palyginimas su ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais	34
3.1.3 Genų raiškos sąsajos su <i>TMPRSS2-ERG</i> transkripto raiška	36
3.1.4 Genų raiškos sąsajos su biochemine ligos progresija	37
3.2 HM genų reguliacinių miRNR paieška ir analizė	43
3.2.1 HM genus potencialiai reguliuojančių miRNR paieška	43
3.2.2 HM genų ir miRNR raiškos sąsajos	44
3.2.3 MiRNR raiškos palyginimas tarp skirtingų prostatos audinių tipų ir BLP statuso	45
4. REZULTATŲ APTARIMAS	47
IŠVADOS	55
ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS	56
PADĖKA	57
LITERATŪROS SĄRAŠAS	58
PRIEDAI	71

SANTRUMPOS

ADT – androgenų slopinimo terapija (angl. *androgen deprivation therapy*)

AR – androgenų receptorius (angl. *androgen receptor full length*)

ARE – androgenų atsako elementai (angl. *androgen response elements*)

AT-kPGR – atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR (angl. *reverse transcription quantitative PCR*)

BLP – biocheminė ligos progresija (angl. *biochemical disease recurrence*, BCR)

DRE – digitalinis rektalinis tyrimas (angl. *digital rectal exam*)

EMT – epitelio – mezenchimos tranzicija

GPH – gerybinė prostatos hiperplazija (angl. *benign prostatic hyperplasia*, BPH)

HDM – histonų demetilazės

HM genai – histonų metilinimą reguliuojantys genai / metilinimo reguliatoriai

HMT – histonų metiltransferazės

HPRT1 – hipoksantino fosforiboziltransferazės 1 genas (angl. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene 1*)

KAPV – kastracijai atsparus prostatos vėžys (angl. *castration resistant prostate cancer*)

KDM3A – lizino demetilazės 3A genas (angl. *lysine demethylase 3A gene*)

KDM4B – lizino demetilazės 4B genas (angl. *lysine demethylase 4B gene*)

KDM5A – lizino demetilazės 5A genas (angl. *lysine demethylase 5A gene*)

KDM5D – lizino demetilazės 5D genas (angl. *lysine demethylase 5D gene*)

KDM7B – lizino demetilazės 7B genas (angl. *lysine demethylase 7B gene*)

kDNR – komplementari DNR

KMT1E – lizino metiltransferazės 1E genas (angl. *lysine methyltransferase 1E gene*)

KMT5A – lizino metiltransferazės 5A genas (angl. *lysine methyltransferase 5A gene*)

NPA – histologiškai nepakitęs (nevėžinis) prostatos audinys (angl. NPT)

PSA – prostatos specifinis antigenas (angl. *prostate-specific antigen*)

PV – prostatos vėžys

TNM – prostatos vėžio klasifikacijos sistema pagal naviko dydį (angl. *tumor*), sritinių limfmazgių pažeidimą (angl. *node*) ir tolimąsias metastazes (angl. *metastasis*; *Tumor-Node-Metastasis System*)

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Greta Meidutė

**Kiekybinė histonus modifikuojančių genų ir jų potencialių reguliacinių miRNR analizė
prostato navikuose**

Magistro baigiamasis darbas

SANRAUKA

Prostato vėžys (PV) yra heterogeniška liga histologiniu ir molekulinu požiūriu, o tai lemia sunkiai nuspėjamą ligos progresavimą. Todėl svarbu atskirti neagresyvius ir lėtai augančius navikus nuo greitai progresuojančių PV atvejų optimalaus gydymo parinkimui. PV ląstelėse dažnai nustatomi histonų metilinimo pokyčiai, kuriuos lemia sutrikusi histonų metilinimą reguliuojančių (HM) genų raiška. Šie genai galėtų būti pritaikyti kaip biologiniai žymenys tikslesniam PV prognozės vertinimui.

Taikant atvirkštinės transkripcijos kiekybinės PGR metodą, ištirta 7 HM genų (*KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A*) raiška PV (N = 64), nevėžinio prostato audinio (NPA; N = 25) ir gerybinės prostato hiperplazijos (GPH; N = 16) mėginiuose. *In silico* būdu identifikavus potencialias jų reguliacines mikroRNR, įvertinta pasirinktų šešių (miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p ir miR-618) raiška. Gauti duomenys palyginti su ligonių klinikinėmis–patologinėmis charakteristikomis.

KDM5A ir *KMT1E* raiška PV buvo mažesnė nei NPA, o *KDM3A*, *KDM4B*, *KMT1E* ir *KMT5A* atveju skyrėsi nuo GPH (visi $p < 0,0500$). Žemesnė *KDM5A*, *KDM5D* ir *KDM7B* raiška buvo susijusi su vėlesne naviko stadija (pT3), *KDM5A*, *KDM5D* ir *KMT1E* atveju – su labiau dediferencijuotu naviku, o aukštesnė *KDM5D* raiška – su *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto statusu (visi $p < 0,0500$). *KDM5A*, *KMT5A* ir *KMT1E* raiška buvo susijusi su trumpesniu išgyvenamumu iki biocheminės ligos progresijos (BLP; visi $p < 0,0500$). Vienmačiuose ir daugiamačiuose Cox modeliuose *KDM5A* ir *KMT1E* turėjo prognostinę vertę tiek analizuojant bendroje PV imtyje, tiek ir atskirai pT2 stadijos, ISUP 2 grupės ir / ar *TMPRSS2-ERG* turinčių navikų subgrupėse (visi $p > 0,0500$). Šių genų, kaip prognostinių žymenų, jautrumas ir specifiškumas bendroje imtyje atitinkamai siekė 65,79% ir 70,89% (abu $p \leq 0,0001$). Iš identifikuotų šešių potencialių reguliacinių miRNR tik miR-7-5p lygis neigiamai koreliavo su *KMT5A* raiška ($p = 0,0435$).

Apibendrinant, šis tyrimas parodė HM genų raiškos sąsajas su PV ir galimą jų pritaikymą diagnostikai pagerinti, o *KDM5A* ir *KMT1E* genai išsiskyrė kaip nepriklausomi BLP žymenys, analizuojant tiek bendroje imtyje, tiek atskirose navikų subgrupėse.

Greta Meidutė

**Quantitative Analysis of Histone Modifying Genes and Their Potential Regulatory
MicroRNAs in Prostate Tumors**

Master thesis

SUMMARY

Prostate cancer (PCa) is a histologically and molecularly heterogeneous disease, which leads to unpredictable disease progression. Therefore, it is important to distinguish non-aggressive and slow-growing tumors from rapidly progressing PCa cases for optimal treatment selection. Altered histone methylation is often detected in PCa due to impaired expression of histone methylation-regulating (HM) genes. Their dysregulation might be used for more accurate assessment of PCa prognosis.

In this study, the expression of 7 HM genes (*KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* and *KMT5A*) in PCa (N = 64), non-cancerous prostate tissue (NPT; N = 25) and benign prostatic hyperplasia (BPH; N = 16) samples was evaluated by quantitative PCR. Potential regulatory microRNAs were identified using *in silico* analysis, the expression of the selected six (miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p and miR-618) was evaluated. Expression of HM genes and miRNAs was associated with the clinical-pathological patients' characteristics.

KDM5A and *KMT1E* expression was lower in PCa than in NPT, while *KDM3A*, *KDM4B*, *KMT1E* and *KMT5A* levels also differed from BPH (all $p < 0.0500$). Lower expression of *KDM5A*, *KDM5D* and *KDM7B* was associated with later tumor stage (pT3), for *KDM5A*, *KDM5D* and *KMT1E* – with more dedifferentiated tumor tissue, and higher expression of *KDM5D* – with *TMPRSS2-ERG* fusion transcript status (all $p < 0.0500$). Expression of *KDM5A*, *KMT5A* and *KMT1E* was associated with shorter survival to biochemical disease recurrence (all $p < 0.0500$). In univariate and multivariate Cox models, *KDM5A* and *KMT1E* had prognostic value when analyzed in both the total PCa cohort and subgroups of pT2 stage, ISUP group 2 and / or *TMPRSS2-ERG* positive tumors (all $p > 0.0500$). The sensitivity and specificity of these genes, as prognostic markers, in the total PCa cohort were 65.79% and 70.89%, respectively (both $p \leq 0.0001$). From the six identified potential regulatory miRNAs, only miR-7-5p level negatively correlated with *KMT5A* expression ($p = 0.0435$).

In conclusion, in this study, associations of HM gene expression with PCa and their potential utility to improve PCa diagnosis were identified. *KDM5A* and *KMT1E* genes stood out as independent predictors of BCR in the overall PCa group and in specific tumor subgroups.

ĮVADAS

Prostatos vėžio (PV) diagnozę kiekvienais metais išgiršta milijonai vyrų. Ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse PV yra vienas iš labiausiai paplitusių piktybinių navikų, o šios ligos prognozė labai skiriasi priklausomai nuo vyro amžiaus, etninės kilmės, šeiminės ligos istorijos ar genetinių veiksnių įtakos (Rebello et al., 2021). Tobulėjančios vėžio diagnostikos priemonės lėmė vis labiau didėjančią nustatomų PV atvejų skaičių. Tačiau tai kelia didelį susirūpinimą dėl pacientų gerovės, nes dalis PV atvejų gali būti neagresyvūs ir lėtai augantys navikai, kurie gali kliniškai niekada nepasireikšti. Kiti atvejai gali pasižymėti agresyvumu ir greitu progresavimu iki metastazuojančios ligos. Ankstyvas PV diagnozavimas ir gebėjimas prognozuoti ligos eigą yra vienas iš svarbiausių šiuolaikinės medicinos uždavinių (Jain et al., 2023).

PV yra heterogeniška liga ne tik histologiniu, bet ir molekulinio pagrindu. Epigenetinės chromatinio modifikacijos yra vienos iš pagrindinių veiksnių, palaikančių ląstelės homeostazę. Dėl sutrikusios šias modifikacijas valdančių genų, pvz., už histonų metilinimą atsakingų lizino metiltransferazių ar demetilazių, raiškos pakinta ląstelės epigenetinio kodo reguliavimas, o tai gali lemti globalius genų raiškos pokyčius, kurie prisideda prie PV progresavimo. Kadangi histonų metilinimą reguliuojančių (HM) genų raiškos pokyčiai yra susiję su padidėjusia PV išsivystymo rizika, manoma, kad jie galėtų būti panaudojami kaip biologiniai žymenys PV diagnozės nustatymui ir tolimesnės ligos prognozės numatymui. O dėl savo grįžtamojo pobūdžio epigenetinės chromatinio modifikacijos yra patrauklus taikiny personalizuotos vėžio terapijos kūrimui (Graça et al., 2016).

Šio darbo tikslas – ištirti pasirinktų septynių HM genų raiškos skirtumus PV ir kontroliniuose mėginiuose, įvertinti jų pritaikomumą PV diagnostikai ir progresijos numatymui bei nustatyti potencialiai šiuos genus reguliuojančias miRNR.

Tikslui pasiekti buvo išskelti šie uždaviniai:

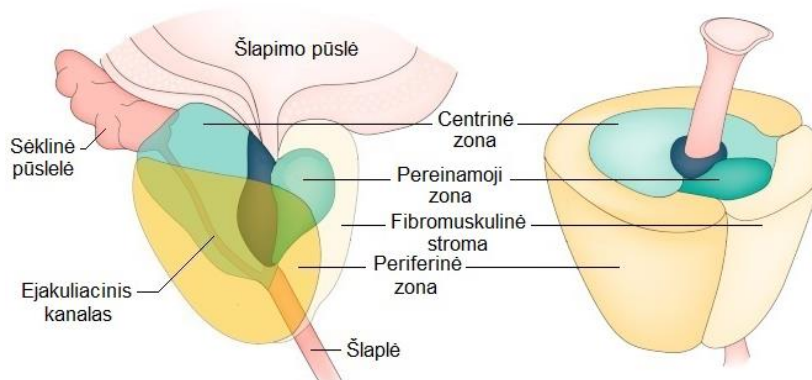
1. Ištirti pasirinktų HM genų – *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* – raiškos skirtumus tarp PV, histologiškai nepakitusių prostatos audinių (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) bei įvertinti jų diagnostinį potencialą.
2. Palyginti HM genų raišką su PV ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais ir *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkriptu buvimu.
3. Nustatyti HM genų raiškos prognostinę vertę, ištiriant sąsajas su biochemine ligos progresija (BLP).
4. Identifikuoti HM genų potencialias reguliacines miRNR *in silico* ir susieti jų raišką su reguliuojamų HM genų–taikinių raiška.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Prostatos anatomija, histologija ir patologija

Prostata, arba priešinė liauka, yra vyrų reprodukcinės sistemos liauka, esanti po šlapimo pūsle, prieš tiesiąją žarną, per ją praeina šlapimtakis. Pagrindinė prostatos funkcija – gaminti sekretą, kuris palaiko spermos gyvybingumą ir sudaro palankią terpę spermatozoidams judėti. Prostata taip pat atlieka svarbų vaidmenį gaminant hormonus ir padeda reguliuoti šlapimo tekėjimą (Verze et al., 2016).

Žmogaus prostatos liauka yra anatomiškai heterogeniškas organas, kurį sudaro centrinė, pereinamoji ir periferinė liaukinės sritys bei fibromuskulinės stromos sritys (**1.1 pav.**; McNeal, 1981). Šios sritys skiriasi savo embriologine kilme ir audinio sudėtimi, todėl gali būti atskirtos pagal jų histologiją, anatomiją, biologines funkcijas ir polinkį į patologinius pakitimus. Liaukos pagrindą sudaro centrinė zona, kuri apima ejakuliacinius kanalus. Centrinėje zonoje navikai aptinkami rečiausiai. Periferinė zona yra didžiausia prostatos sritis ir pagrindinė PV atsiradimo vieta. GPH dažniausiai išsivysto pereinamojoje zonoje, kuri apgaubia vidurinę šlaplės dalį. Prostatą apgaubia jungiamojo audinio kapsulė, sudaryta iš lygiųjų raumenų skaidulų (Lee et al., 2011).



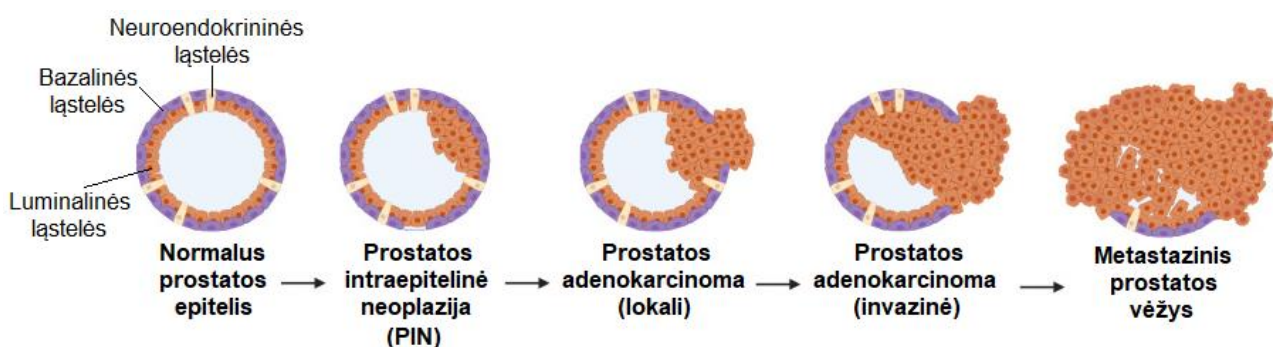
1.1 pav. Žmogaus prostatos anatominė sandara (adaptuota pagal Rebello et al., 2021)

Histologiškai prostatos epitelį sudaro trijų tipų ląstelės: bazalinės, luminalinės ir neuroendokrininės (**1.2 pav.**), kurios ir sukelia vėžinius susirgimus vidurinio ar vėlyvojo amžiaus tarpsnyje. Kiekvienas prostatą sudarančių ląstelių tipas apibrėžiamas pagal ląstelių formą, ląstelėse vykstančių žymenų raišką, paviršiaus antigenus ir padėtį liaukoje (Henry et al., 2018). Luminalinės ląstelės yra sekrecinės, nuo androgenų priklausomos ląstelės, kurios išskiria prostatos specifinį antigeną (PSA) ir serino proteazę. Jos pasižymi androgenų receptorių (AR), paviršiaus baltymų CD24/26, citokeratinų CK8/18 raiška. Bazalinėse ląstelėse vyksta paviršiaus transkripcijos faktoriaus p63, CD44 ir CK5/14 žymenų raiška, tačiau jose beveik neaptinkama AR ir PSA raiška. Tarp bazalinių ir luminalinių ląstelių prostatos epitelyje pasklidusios neuroendokrininės ląstelės (NE),

kuriose nevyksta AR ir PSA raiška (Rybak et al., 2014). NE ląstelės pasižymi endokriniųjų žymenų chromogranino A, CD56, sinaptofizino ir neuronams specifinės enolazės raiška (Teh et al., 2022).

Dažniausiai vyresniame amžiuje pasitaikančios prostatos ligos yra GPH ir PV. Šie prostatos susirgimai glaudžiai susiję su prostatos anatomija ir histologija. GPH yra nevėžinis prostatos ląstelių išvešėjimas, kuris dažniausiai pasireiškia vyresnio amžiaus vyrams. GPH būdinga prostatos pereinamojoje zonoje esančių stromos ir epitelio ląstelių proliferacija, tai sukelia prostatos padidėjimą. Dėl padidėjusios prostatos pasireiškia įvairūs apatinių šlapimo takų simptomai: šlapimo nelaikymas, nesugebėjimas visiškai ištuštinti šlapimo pūslės ar padidėjęs šlapinimosi dažnis naktį (Chughtai et al., 2016). Iš GPH negali išsivystyti PV, nes šios ligos atsiranda skirtingose prostatos zonose. Tikslios GPH išsivystymo priežastys vis dar neaiškios, tačiau nustatyta, kad šios ligos atsiradimui turi įtakos uždegiminiai atsako keliai ir su amžiumi susiję hormonų pusiausvyros pokyčiai (Madersbacher et al., 2019).

PV vystymosi ir progresavimo metu prostatos liaukoje vyksta įvairūs nenormalūs histologiniai pokyčiai, kuriuos sukelia mutacijos ar pažeidimai molekuliniam lygyje. Prostatos kancerogenezę gali sukelti uždegimas, oksidacinis stresas, sutrikęs hormonų reguliavimas, chromosomų mutacijos, genetinės ir (arba) epigenetinės modifikacijos (Shen & Abate-Shen, 2010). PV vystymosi schema pateikta **1.2 pav.**



1.2 pav. Prostatos vėžio (PV) vystymosi stadijos (adaptuota pagal Canesin, 2021)

PV vystymasis yra daugiapakopis procesas, kuris prasideda kaip prostatos intraepitelinė neoplazija (PIN), kuriai būdinga luminalinio epitelio hiperplazija, citoplazminė hiperchromazija, padidėję branduoliai ir branduolėliai, bazalinių ląstelių sumažėjimas, tačiau jos visiškai nedingsta, todėl išlaikoma nepažeista bazinė membrana (Rybak et al., 2014; Shen & Abate-Shen, 2010). PIN pažeidimai, kaip ir PV, randami prostatos periferinėje zonoje. PIN nuo invazinės karcinomos skiriasi tuo, kad turi nepažeistą bazinę membraną, todėl ląstelės neįsiveržia į stromą. PIN pažeidimai nesukelia PSA lygio padidėjimo, todėl šią patologiją galima aptikti tik biopsijos mėginiuose, o ne tiriant serumą (Abate-Shen & Shen, 2000).

Aptikus PIN darinius prostatoje padidėja rizika vėliau susirgti PV. Vėžio progresavimo metu plečiasi luminalinės sritys ir prarandamos bazalinės ląstelės, todėl fenotipiškai 95% PV atvejų dažniausiai klasifikuojami kaip luminalinio tipo navikas (Shen & Abate-Shen, 2010). Adenokarcinoma pirmiausia būna latentinė, o vėliau progresuoja iki klinikinės stadijos, kuriai būdingas bazalinių ląstelių praradimas ir stiprus luminalinis fenotipas. Šiame etape naviko augimas priklauso nuo androgenų signalo (Testa et al., 2019).

Galiausiai naviko vystymosi metu suardomas prostatos bazalinių ląstelių sluoksnis ir vėžinės ląstelės pradeda plisti limfine ir kraujotakos sistemomis į nutolusius organus: kaulus, limfmazgius, plaučius, smegenis. Taip išsivysto metastazuojantis PV (Wang et al., 2018).

1.2 PV klinikinės–patologinės charakteristikos

PV diagnozuoti naudojamas PSA tyrimas ir prostatos apčiuopa per tiesinę žarną (angl. *digital rectal examination*, DRE; Ilic et al., 2018). Nustačius aukštesnę PSA koncentraciją ir / ar netipiškus prostatos darinius, imama biopsija ir vertinamas PV išplitimas bei audinio diferenciacija. Biopsija yra invazinis PV diagnostikos tyrimas, kuomet iš prostatos paimami labai maži audinio gabalėliai. Biopsijos paėmimo metu galima netiksliai pataikyti į sveiką audinį, todėl vėžys gali būti diagnozuojamas netiksliai arba iš viso nediagnozuojamas. Todėl svarbu pagerinti pacientų, kuriems reikalinga biopsija, atranką, nes tai padėtų parinkti tikslesnę gydymo strategiją bei pagerintų pacientų gyvenimo kokybę (Shariat & Roehrborn, 2008).

Pagrindinis rodiklis, kuriuo remiantis įtariamas PV, yra PSA kiekis kraujyje. PSA yra serino proteazė, koduojama *KLK3* geno 19 chromosomoje. Šio geno raiška reguliuojama AR atsako keliu. PSA baltymas gaminamas ir sekretuojamas normalių ir vėžinių prostatos epitelio ląstelių ir yra svarbus normaliam prostatos funkcionavimui (Kohaar et al., 2019). PV ląstelės negamina daugiau PSA nei gerybinės ląstelės; iš tikrųjų jos linkusios gaminti mažiau. Tačiau piktybinės ląstelės lengviau leidžia PSA pereiti per ląstelės sienelę į aplinkinį tarpląstelinį skystį ir galiausiai pasiekti kraują. Taip yra todėl, kad navikuose trūksta bazalinio sluoksnio, kuris apribotų PSA patekimą už ląstelės ribų (David & Leslie, 2023). PSA daugiausia yra spermoje, tačiau nedidelis kiekis yra ir kraujyje. Normalus PSA kiekis kraujyje yra iki 3–4 ng/ml, nustačius PSA kiekio padidėjimą (4–10 ng/ml) įtariamas patologijos vystymasis (Kohaar et al., 2019). PSA testas nėra 100% tikslus, kadangi gali parodyti klaidingai teigiamus arba klaidingai neigiamus rezultatus. PSA yra specifinis organui, o ne PV. PSA kiekį kraujyje gali padidinti ir kitos su prostata susijusios ligos, pvz., GPH ar prostatitas. Remiantis PSA testu taip pat sunku pasakyti, ar vėžys yra linkęs progresuoti ir reikalaujantis intensyvaus gydymo (Ilic et al., 2018).

PV stadija vertinama remiantis TNM klasifikacija, kuri apima: naviko dydžio (angl. *tumor*, T), išplitimo į limfmazgius (angl. *lymph nodes*, N) ir metastazių (angl. *metastasis*, M) įvertinimą. Išskiriamos klinikinė (cTNM) arba patloginė (pTNM) TNM stadijos. Klinikinė stadija cTNM nustatoma remiantis fizine apžiūra, laboratoriniais duomenimis ir vaizdiniais tyrimais prieš pradedant gydymą. Patloginė stadija pTNM nustatoma atlikus chirurginį ligos tyrimą ar histologinį audinių tyrimą, todėl tiksliausiai apibūdina ligą (Espina, 2017). PV TNM klasifikacija pateikta **1.1 lentelėje**.

1.1 lentelė. PV TNM klasifikacija (Buyyounouski et al., 2017)

T – Naviko dydis	
T0	Naviko nėra
T1	Kliniškai neaptinkamas, neapčiuopiamas navikas, tačiau aptiktas ištyrus biopsijos mėginį, kuriame vėžinės ląstelės sudaro: a – ≤5 % tiriamo audinio; b – >5 % tiriamo audinio; c – navikas nustatytas prostatos biopsijos metu dėl padidėjusio PSA
T2	Apčiuopiamas ir už prostatos neišplitęs navikas: a – navikas apima pusę (ar mažiau) vienos skilties; b – navikas apima daugiau negu pusę vienos skilties, bet ne abi skiltis; c – navikas apima abi skiltis
T3	Navikas išplitęs už prostatos ribų: a – navikas išplitęs už prostatos kapsulės (vienoje ar abiejose pusėse), įskaitant išplitimą į šlapimo pūslės kaklelį; b – navikas išplitęs į vieną ar abi sėklines pūsleles
T4	Navikas išplitęs į kitas gretimas struktūras (ne į sėklines pūsleles): išorinį rauką, tiesiąją žarną, tarpvietės raumenis ir (ar) pilvo sieną
N – sritiniai limfmazgiai	
N0	Nepažeisti
N1	Pažeisti
M – tolimosios metastazės	
M0	Metastazių nėra
M1	Metastazės nustatytos: a – nutolusiuose limfmazgiuose; b – kauluose; c – kitoje kūno dalyje

T – naviko dydis ir išplitimas į aplinkinius audinius (angl. *tumor*), N – sritinių limfmazgių pažeidimas (angl. *node*); M – tolimosios metastazės (angl. *metastasis*), PSA – prostatos specifinis antigenas

Gleason balų sistema apibūdina PV audinio diferenciacijos lygį. Ši sistema sukurta 1966 m. Donaldo F. Gleasono ir buvo laikoma pirminiu PV prognostiniu parametru (Delahunt et al., 2012). *Gleason* balų sistemos aprašymas pateiktas **1.2 lentelėje**. 2014 m. tarptautinė urologinės patologijos draugija (angl. *International Society of Urological Pathology*, ISUP) pasiūlė šios sistemos modifikaciją, kuria remiantis tiksliau aprašoma naviko diferenciacija. Tai padeda skirti tinkamesnį gydymą žemo laipsnio navikams, sumažinant nereikalingų procedūrų skaičių progresuoti nelinkusio PV atveju. Naviko audinio įvertį sudaro dviejų laipsnių (nuo 1 iki 5) suma. Pagal šią sistemą mažesnis

laipsnis skiriamas normaliai atrodančioms ląstelėms, o didesnis laipsnis – dediferencijuotoms ląstelėms. Pirminis laipsnis skiriamas ląstelėms, kurios dažniausiai aptinkamos navike, apibūdinti, o antrinis laipsnis – kitoms dažniausiai aptinkamoms ląstelėms navike. Šių dviejų laipsnių suma sudaro *Gleason* balą ir pagal ją priskiriama ISUP grupė (Epstein et al., 2016).

1.2 lentelė. Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (ISUP) prostatos naviko diferenciacijos sistema (Epstein et al., 2016)

<i>Gleason</i> diferenciacijos balas	ISUP grupė	2014 m. ISUP grupės aprašymas
≤6	1	Matomos tik individualios ir gerai susiformavusios liaukos
3 + 4 = 7	2	Dominuoja gerai susiformavusios liaukos, tačiau aptinkama ir prastai susiformavusių, susiliejusių liaukų
4 + 3 = 7	3	Dominuoja prastai susiformavusios, susiliejusios liaukos, aptinkama nedidelė dalis gerai susiformavusių liaukų
8	4	Dominuoja tik prastai susiformavusios, susiliejusios liaukos / gerai susiformavusios liaukos su šalia esančiu audiniu be liaukų / audinys be liaukų su šalia esančiu audiniu su gerai susiformavusiomis liaukomis
9 ar 10	5	Susiformavusios liaukos neaptinkamos arba nekrotizuotos

Remiantis TNM, *Gleason* balu / ISUP grupe ir PSA verte išskiriamos keturios PV stadijos (**1.3 lentelė**). Kuo labiau pažengęs vėžys, tuo didesnis stadijos skaičius priskiriamas. Po romėniško skaičiaus naudojamos raidės pateikia daugiau informacijos apie priskiriamą stadiją. Naviko stadijos nustatymas ir charakterizavimas yra labai svarbūs klinikinės onkologijos praktikai, nes šios klasifikacijos yra pacientų priežiūros atskaitos taškas (Buyyounouski et al., 2017).

1.3 lentelė. Prostatos vėžio (PV) stadijų klasifikacijos sistema (Buyyounouski et al., 2017)

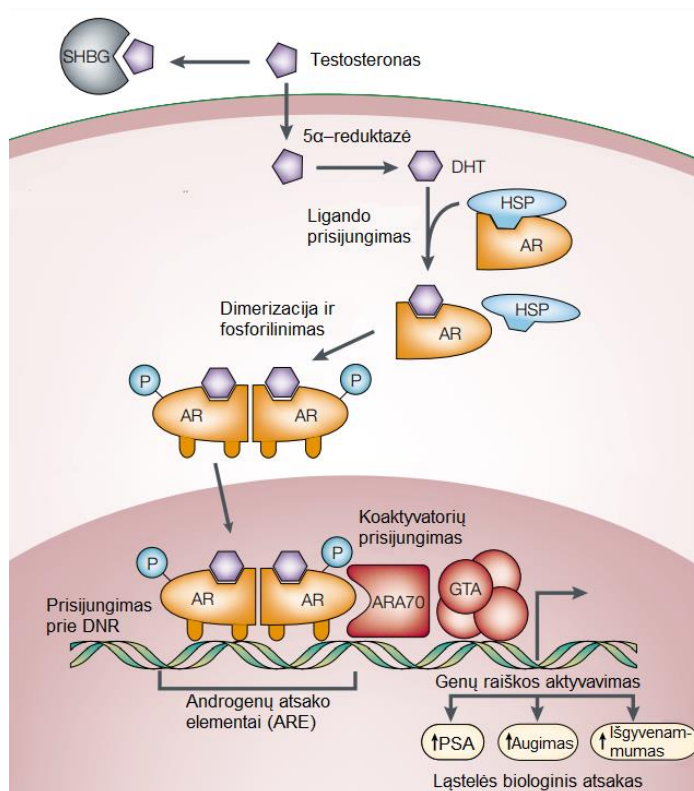
Stadija	TNM klasifikacija			PSA kiekis (ng/ml)	ISUP grupė
	T kategorija	N kategorija	M kategorija		
I	cT1a–c, cT2a, pT2	N0	M0	<10	1
IIA	cT1a–c, cT2a, pT2, cT2b–c			≥10, <20	1
IIB	T1 arba T2			<20	2
IIC	T1 arba T2				3 arba 4
IIIA	T1 arba T2			≥20	nuo 1 iki 4
IIIB	T3 arba T4			Bet koks	nuo 1 iki 4
IIIC	Bet koks T				5
IVA					Bet koks N
IVB		M1			

T – naviko dydis ir išplitimas (angl. *tumor*), N – metastazės limfmazgiuose (angl. *node*), M – tolimosios metastazės (angl. *metastasis*), ISUP – angl. *International Society of Urological Pathology*, PSA – prostatos specifinis antigenas

1.3 PV progresavimas

PV yra heterogeniška liga. Pirminis PV dažnai būna daugiažidininis, nes daugiau nei 80 % atvejų turi du ar daugiau skirtingų naviko židinių, kurie gali pasižymėti tarpusavyje unikaliomis mutacijomis. Todėl vienas pacientas gali turėti daugiau nei vieną genomiškai ir fenotipiškai besiskiriančius PV židinius, kurie gali skirtingai prisidėti prie PV progresavimo ir skirtumo tarp kliniškai reikšmingo ir mažos rizikos PV (Haffner et al., 2021).

PV vystymuisi ir progresavimui svarbus androgenų poveikis. Androgenai yra lytiniai hormonai, reguliuojantys vyriškų lytinių organų diferenciaciją ir brendimą, taip pat antrinių vyriškų bruožų vystymąsi. Vienas iš žinomiausių androgenų yra testosteronas, kuris yra pagrindinis vyrų lytinis hormonas. Testosteronas gaminamas sėklidėse, nedidelius kiekius taip pat gamina ir antinksčiai. Testosteronas yra lipofilinis hormonas, todėl gali lengvai patekti į ląsteles, kur yra verčiamas kitu androgenu, dihidrotestosteronu (DHT), veikiant 5α -reduktazei. Ląstelės citoplazmoje testosteronas ir DHT jungiasi prie AR, kuris yra priklauso branduolio receptorių šeimai. Bazinėje būsenoje AR citoplazmoje egzistuoja komplekse su karščio šoko baltymais (HSP, angl. *heat-shock proteins*). Prisijungus prie androgeno, pasikeičia šio komplekso konformacija ir sudėtis, dėl ko AR homodimerizuojasi ir kartu su ligandu yra pernešamas į branduolį. Branduolyje AR jungiasi prie androgenų atsako elementų (ARE, angl. *androgen response elements*), kurie yra įvairių tikslinių genų promotorių srityse, ir inicijuoja transkripciją (**1.3 pav.**). Androgenai reguliuoja genų, kurie atsakingi už ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, išgyvenamumą, taip pat metaboles ir sekrecijos funkcijas, raišką. Androgenais valdomas genų raiškos reguliavimas taip pat svarbus su androgenais susijusių genų, tokių kaip PSA, raiškai (Basu & Tindall, 2010).



1.3 pav. Androgenų receptoriaus (AR) veikimo mechanizmas. SHBG – lytinius hormonus sujungiantis globulinas (angl. *sex hormone-binding globulin*); DHT – dihidrotestosteronas; HSP – karščio šoko baltymais (angl. *heat-shock protein*); P – fosfato grupė; ARA70 – AR transkripcijos koaktyvatorius; GTA – transkripcijos baltymų kompleksas (adaptuota pagal Feldman & Feldman, 2001)

PV ląstelių, kaip ir normalių ląstelių, augimui yra reikalingi androgenai. Todėl AR atsako kelias yra vienas iš taikinių PV terapijoje, kurios metu slopinama androgenų sintezė ar blokuojamas androgenų prisijungimas prie AR. Tačiau dėl dažno poveikio AR atsako kelią slopinančiomis medžiagomis gyvenimo bėgyje gali atsirasti įvairūs šio reguliacinio mechanizmo sutrikimai, pvz., *AR* geno amplifikacija ar pakitusi su AR susijusių koreguliatorių raiška, kurios skatina AR atsako kelio aktyvumo palaikymą PV ląstelėse. Dėl padidėjusios AR raiškos PV ląstelės tampa jautrios net ir labai mažam androgenų kiekiui arba androgenai jų augimui tampa nebereikalingi. Su progresuojančio PV išsivystymu siejamas *AR* transkriptų variantų susidarymas alternatyvaus splaisingo metu. Vienas iš geriausiai aprašytų AR variantų AR-V7 pasižymi ligando prisijungimo domeno praradimu, tai leidžia AR atsako keliui veikti be androgenų, o AR būti nuolat aktyviems. Nepriklausomumas nuo hormonų lemia atsparumo terapijai išsivystymą ir yra susijęs su PV progresavimu iki kastracijos atsparaus PV (KAPV), kuris pacientams dažniausiai yra mirtinas (Tietz & Dehm, 2020).

1.4 PV gydymas

PV gydymas skirstomas į du etapus ir priklauso nuo to, ar vėžys yra lokalizuotas tik prostatos liaukoje ar metastazės yra išplitusios už prostatos ribų. Jei pacientui nustatomas lokalus mažos rizikos PV, pacientas nejaučia diskomforto arba paciento gyvenimo trukmė yra trumpa, tuomet jam taikoma aktyvaus stebėjimo programa, kurios metu sekamas PV progresavimas. Aktyvaus stebėjimo metu stebimas PSA lygis paciento kraujyje, taip pat gali būti atliekama magnetinio rezonanso tomografija. Gydymas pradedamas tik tada, kai nustatomi ligos progresijos požymiai. Šio metodo privalumas tas, kad nėra nereikalingai skiriamas gydymas neagresyviems, progresuoti nelinkusiems navikams, todėl mažesnės gydymo išlaidos, o paciento gyvenimo kokybė nepakinta (Costello, 2020).

PV gydyti gali būti taikoma radikali prostatektomija, kurios metu pašalinama prostatos liauka atviros ar laparoskopinės operacijos metu. Šis gydymo metodas paprastai taikomas pacientams, kurių navikas nėra išplitęs į aplinkinius audinius, todėl operacijos metu sumažėja tikimybė pažeisti gretimus organus. Tačiau po šio gydymo būdo gali atsirasti komplikacijos, pvz., šlapimo nelaikymas ar erekcijos disfunkcija, taip pat po operacijos gali prasidėti vidinis kraujavimas (Sekhoacha et al., 2022).

Spindulinės terapijos tikslas – specifiskai perduoti didelės energijos spindulių ar dalelių dozes tiesiai į PV ir naikinti vėžines ląsteles nepažeidžiant šalia esančių normalių audinių. Spinduliuotė nukreipiama į vėžines ląsteles specialiomis technikomis, pvz., taikant brachiterapiją arba išorinę spindulinę terapiją. Brachiterapijos metu radioaktyvus šaltinis įvedamas į prostatos liauką specialiomis injekcijomis. Taip šalia jo esančios vėžinės ląstelės yra naikinamos radiacijos. Išorinės spindulinės terapijos metu iš išorinio šaltinio skleidžiami stiprūs rentgeno spinduliai, specialiai nukreipti į prostatos audinius. Spindulinė terapija dažniausiai naudojama gydyti lokalių PV, taip pat susilpninti metastazavusias PV ląsteles (Gay & Michalski, 2018).

Po šių gydymo būdų pacientai turi nuolat tikrintis, ar PV neatsinaujina. Patikros metu stebimas paciento PSA kiekis kraujyje. Jei nustatoma PSA koncentracijos padidėjimas $\geq 0,2$ ng/ml, laikoma, kad pasireiškė biocheminė ligos progresija (BLP) arba biocheminis atkrytis. Tai reiškia, kad PV nebėra lokalizuotas tik prostatos liaukos srityje, bet yra atsiradę metastazių židiniai, kurie ir produkuoja PSA.

Progresavusio ir (arba) metastazavusio PV gydymui taikoma androgenų slopinimo (deprivacijos) terapija (ADT). Terapijos principas pagrįstas testosterono ir kitų vyriškų hormonų gamybos blokavimu, neleidžiančiu pastariesiems skatinti PV ląstelių augimo. Hormonų terapijos metu naudojami medikamentai, kurie slopina androgenų sintezę (pvz., abiraterono acetatas) arba blokuoja jų prisijungimą prie AR (pvz., enzalutamidas). Taip pat gali būti atliekama chirurginė kastracija – orchiektomija, kurios metu visiškai pašalinamos sėklidės, kuriose sintetinami androgenai.

Sumažinus androgenų kiekį arba sustabdžius jų patekimą į PV ląsteles, navikas tam tikrą laiką auga lėčiau (Sekhoacha et al., 2022).

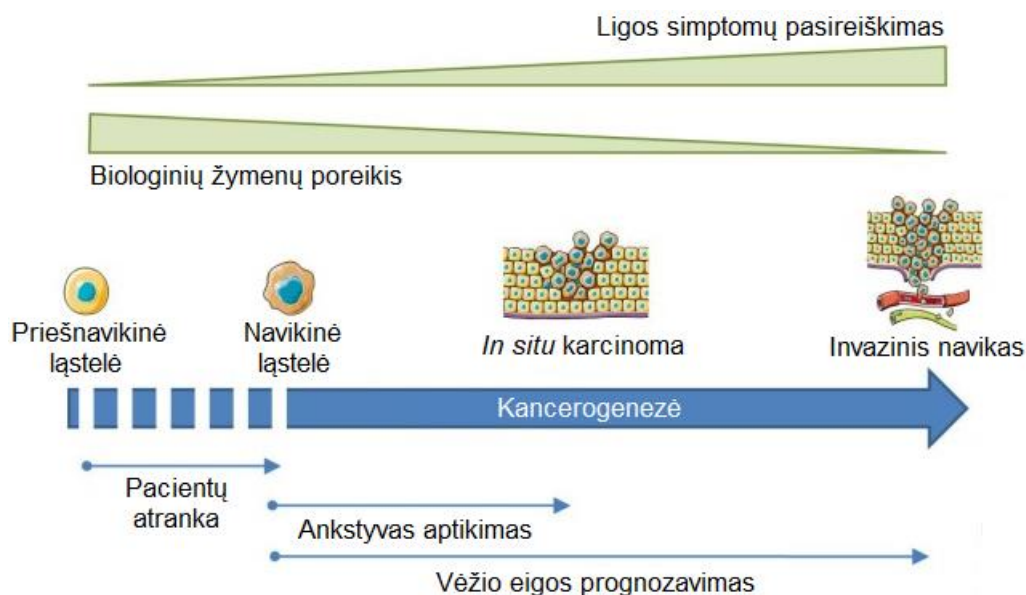
ADT yra veiksminga, kol PV ląstelių augimui svarbūs androgenai, tačiau daugumai pacientų atsiranda atsparumas šiam gydymui ir konstatuojamas KAPV išsivystymas. Tokiu atveju gydymui gali būti skiriama chemoterapija, kurios metu pasitelkiami stiprūs priešvėžiniai vaistai, kurie atakuoja vėžines ląsteles skirtingu ląstelių ciklo metu ir taip inhibuoja jų augimą sutrikdant DNR replikaciją, mitozę, baltymų sintezę ir daugelį kitų procesų. Docetakselis laikomas pirmos eilės standartiniu vaistu gydyti KAPV. Docetakselis ląsteles veikia citotoksiškai, prisijungdamas prie β -tubulino ir taip slopindamas mikrovamzdelių depolimerizaciją, kas savo ruožtu sukelia ląstelių mitozės sutrikimus ir apoptozės iniciaciją (Sekhoacha et al., 2022).

Imunoterapija yra dar vienas pažengusio PV gydymo metodas, kai naudojami vakcinų principu veikiantys preparatai, kurie skatina žmogaus imuninę sistemą veiksmingiau atpažinti ir sunaikinti vėžines ląsteles. Tokie vaistai yra pritaikyti kiekvieno paciento imuninei sistemai. Sipuleucelis–T kol kas yra vienintelis JAV Maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) patvirtintas imunoterapinis preparatas gydyti PV. Ši vakcina sukurama iš imuninių ląstelių, surenkant baltuosius kraujo kūnelius ir paveikiant juos PV ląstelių baltymu prostatos rūgšties fosfataze. Šis poveikis išmoko baltuosius kraujo kūnelius atpažinti PV ląsteles. Išmokytos ląstelės suleidžiamos atgal į paciento kūną, kur padeda kitoms imuninės sistemos ląstelėms atakuoti PV (Cha et al., 2020).

Šiuo metu galimos gydymo galimybės dažnai kombinuojamos kartu gydyti pažengusį PV ar KAPV. Tačiau toks gydymo būdas dažniausiai tik palengvina ligos simptomus ir prailgina paciento gyvenimą keliais mėnesiais. Nepaisant šiandien pritaikomų gydymo strategijų, pažengęs PV tebėra nepagydomas (Sekhoacha et al., 2022).

1.5 PV molekuliniai žymenys

Dėl PV būdingo heterogeniškumo susiduriama su sunkumais šią ligą diagnozuojant, prognozuojant jos progresiją ar parenkant optimalų gydymo būdą. Ankstyvas ligos rizikos nustatymas bei besimptomų, lokalizuotų ir neagresyvių navikų atskyrimas nuo linkusių sparčiai progresuoti yra pagrindiniai klinikiniai iššūkiai siekiant gerinti PV prevencijos programas ir gydymo strategijas (**1.4 pav.**). Todėl labai svarbu tirti ne tik diagnostinius, bet ir prognostinius biologinius žymenis, kurie informuotų apie galimą ligos progresavimą. Šiandien sukurta daugybė PV diagnozavimo ir prognozės numatymo metodų, tačiau daugumai trūksta specifiškumo, kad padėtų nustatyti tikslią ligos progresavimo eigą.



1.4 pav. Biologinių žymenų svarba prostatos vėžio vystymosi ir progresavimo metu (adaptuota pagal Delpe et al., 2013)

Šiandien PSA testas yra vis dar naudingiausia ir prieinamiausia priemonė ankstyvos stadijos PV aptikimui, rizikos stratifikavimui ir ligos stebėjimui, tačiau šio testo naudojimas yra prieštaringas. Dėl palyginti riboto specifškumo PSA tyrimas gali parodyti ir klaidingai teigiamus arba klaidingai neigiamus rezultatus, kas lemia netikslų ligos diagnozavimą ir, savo ruožtu, nereikalingai skiriamą gydymą kliniškai nereikšmingiems navikams. Todėl galutinis sprendimas priimamas tik išanalizavus biopsijos medžiagą, kas šiuo atveju yra nereikalinga invazinė procedūra, sukelianti diskomfortą pacientui. Komplikacijos, kurios gali atsirasti po biopsijos, yra infekcija, skausmas, kraujavimas, šlapimo susilaikymas ir hematurija. Todėl egzistuoja didelis poreikis atrasti neinvazinius PV žymenis, kurie padėtų įvertinti, ar reikalinga biopsija, anksčiau nustatyti ligos atsiradimą, įvertinti jos agresyvumą, tiksliau sekti ligos progresiją, atsaką į gydymą ir padėtų paskirti tinkamiausią gydymo strategiją (Duffy, 2020).

Per pastarąjį dešimtmetį rinkoje atsirado nemažai molekuliniais žymenimis, kurie tiriami pacientų kraujo serumo, šlapimo ar prostatos audinio mėginiuose, pagrįstų testų PV diagnostikai ir prognozės įvertinimui (**1.4 lentelė**), tačiau inovatyvių, naujos kartos žymenų sistemų poreikis išlieka (Visser et al., 2020).

1.4 lentelė. Molekulinių žymenų testai prostatos vėžio (PV) diagnostikai ir prognostikai kraujo, šlapimo ir audinių mėginiuose (Visser et al., 2020; Porzycki & Ciszkowicz, 2020)

Testo pavadinimas	Tiriama mėginio tipas	Tiriami biožymenys	Testo tipas
PHI	Kraujo serumas	Bendras PSA, fPSA, p2PSA izoforma	Diagnostinis
Proclarix		THBS1, CTSD, tPSA, %fPSA	Diagnostinis
4KScore		Bendras PSA, fPSA, nepažeistas PSA, hK2	Diagnostinis
ExoDX Prostate IntelliScore	Šlapimas	Egzosominė RNR (<i>SPDEF, PCA3, ERG</i>)	Diagnostinis
MiPS		<i>PCA3</i> ir <i>TMPRSS2-ERG</i> mRNR	Diagnostinis
Progensa		<i>PCA3</i> mRNR	Diagnostinis
SelectMDX		<i>HOXC6, DLX1</i> mRNR	Diagnostinis
ConfirmMDx	Prostatos audinys	DNR hipermetilinimas (<i>APC, RASSF1, GSTP1</i>)	Diagnostinis
Prolaris		mRNR raiška, 31 genas (ląstelės ciklo genai)	Prognostinis
Oncotype Dx		mRNR raiška, 17 genų (12 karcinogenų, 5 kontroliniai genai)	Prognostinis
Decipher		mRNR raiška, 22 genai	Prognostinis
Promark		Baltymų tyrimas (8 baltymai)	Prognostinis
PCMT		Mitochondrinės DNR delecijos	Diagnostinis

Nauji biologiniai žymenys, tokie kaip *TMPRSS2-ERG* sulietinis transkriptas, nekoduojanti RNR (*PCA3*) arba kalikreinas, įtrauktas į pagrindinį PHI (prostatos sveikatos indeksą) arba 4KScore testus, padidina PSA, kaip žymens, jautrumą ir specifiškumą, o tai leidžia tiksliau parinkti pacientus, kuriems reikalinga biopsija, bei sumažinama perdiagnozavimo tikimybė (Porzycki & Ciszkowicz, 2020). PHI nustatyti išmatuojamas tPSA, laisvo PSA, kuris nėra susijungęs su kitais baltymais, ir p2PSA izoformos santykis kraujyje. Pagal rezultatus apskaičiuojamas PHI balas, kuris parodo PV tikimybę. Testas rekomenduojamas vyrams, kurių PSA kiekis kraujyje yra 4–10 ng/ml, o DRE tyrimas neparodė jokių nenormalių rezultatų. PHI testas naudojamas aktyvaus stebėjimo metu, kadangi leidžia įvertinti ir PV progresavimo tikimybę (Visser et al., 2020).

4KScore testo algoritmas atsižvelgia į keturių kalikreinių (tPSA, fPSA, nepažeisto PSA ir hK2) kieki kraujo plazmoje, paciento amžių, DRE tyrimo rezultatus ir prostatos biopsijos istoriją. Šis tyrimas padeda nustatyti agresyvaus PV riziką ir ženkliai sumažina prostatos biopsijų skaičių bei su tuo susijusį perdiagnozavimą ir nereikalingą gydymą. Ši testą rekomenduojama atlikti pacientams, kuriems paskirta pirminė arba pakartotinė biopsija (Voigt et al., 2017).

Progensa testu analizuojamas *PCA3* mRNR kiekis paciento šlapimo nuosėdose. *PCA3* genas koduoja ilgą nekoduojančią mRNR molekulę, kurios raiška būna smarkiai išaugusi PV ląstelėse. *PCA3* testas savo prognostine verte ir specifiškumu yra pranašesnis už PSA testą, tačiau jo jautrumas yra mažesnis. *PCA3* tyrimas naudojamas atrinkti pacientus, turinčius didelę riziką susirgti PV.

Progenza testas taip pat naudojamas nustatyti, ar būtina pakartoti biopsiją, kai pirmos biopsijos rezultatas yra neigiamas (Auprich et al., 2011).

Kitas genas, susijęs su PV ir aptinkamas šlapime, yra *TMPRSS2-ERG* sulietinis transkriptas. *TMPRSS2-ERG* susiliejinimas aptinkamas daugiau nei 50 % PV atvejų. *TMPRSS2* genas koduoja serino proteazių šeimai priklausantį baltymą, kuris dalyvauja prostatos kancerogenezeje. Jo aktyvumas priklauso nuo susijungimo su ETS transkripcijos faktoriais, tokiais kaip *ERG*. *ERG* protoonkogenas yra pagrindinis ląstelių proliferacijos, diferenciacijos, angiogenezės, uždegimo ir apoptozės reguliatorius. Jo raiška labai svarbi normaliam organizmo vystymuisi, nes vyksta embrioninėje mezodermoje ir endotelyje, kur jis turi lemiamą vaidmenį formuojant kraujagyslių sistemą, urogenitalinį traktą ir kaulų vystymuisi. Abu šie genai – *TMPRSS2* ir *ERG* – randami 21-oje chromosomoje maždaug 3 Mb atstumu vienas nuo kito. *TMPRSS2* susiliejinimas su *ERG* gali įvykti dviem mechanizmais: genomo regionas tarp dviejų genų gali būti prarastas dėl delecijos arba tai gali būti sudėtingesnio genomo pertvarkymo rezultatas, kai chromosomoje įvyksta translokacija, kuri gali apimti ir kitas chromosomas. *TMPRSS2-ERG* neaptinkamas esant normaliai prostatai ar GPH. Androgenai gali paskatinti genų susiliejinimą inicijuodami chromatino kilpos susidarymą per AR transkripcijos kompleksą ir taip sujungdami *ERG* ir *TMPRSS2* lokusus. Kartu su dvigrandžių DNR trūkių taisymu, tai gali lemti intersticinę deleciją ir genų susiliejinimą. Gali susidaryti keli transkriptų variantai naudojant skirtingus *TMPRSS2* ir *ERG* egzonus derinius. Susidarius sulietiniam transkriptui padidėja transkripcijos faktoriaus *ERG*, kuris aptinkamas tiek ankstyvos, tiek vėlyvosios stadijos PV, raiška. Ši raiškos padidėjimą lemia nuo androgenų priklausomo *TMPRSS2* promotoriaus kontrolė. Dėl mažo jautrumo šio testo naudojimas yra nereikšmingas, tačiau tiriant *TMPRSS2-ERG* kartu su *PCA3*, testas pasižymi didesniu specifiškumu ir jautrumu (Adamo & Lodomery, 2016; Gasi Tandefelt et al., 2014; Wang et al., 2017).

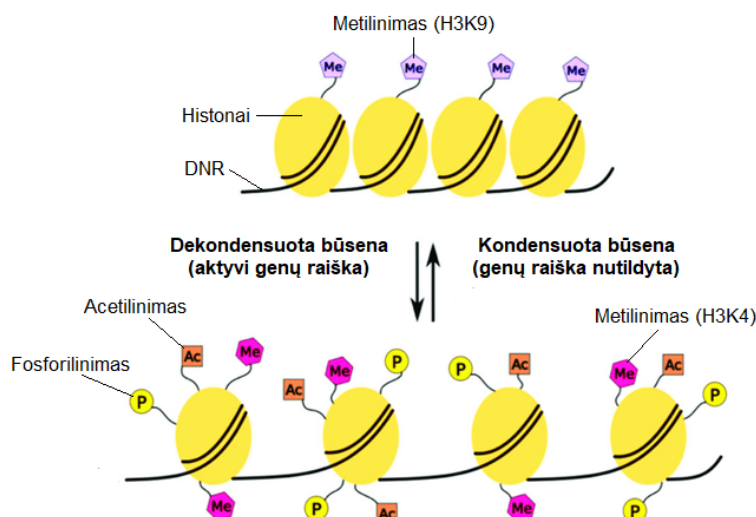
PV molekulinį žymenų paieška nėra sustojusi: daugelis naujų žymenų šiuo metu yra ikiklinikinėje tyrimų fazėje. Kaip galimi PV biologiniai žymenys tiriamos cirkuliuojančios naviko ląstelės, įvairios mikroRNR (miRNR), ilgos nekoduojančios RNR, metabolitai (sarkozinas, alaninas, glicinas ir glutamatas) ir kiti biologiniai žymenys (Szeliski et al., 2018). Šiuo metu yra prieinamas vienas mitochondrijų DNR testas, kuriuo tiriama mitochondrijų DNR variantai esant neigiamai pirminei prostatos biopsijai ir siekiant nustatyti, ar pacientui vertėtų ją atlikti pakartotinai (Kohaar et al., 2019).

Atsižvelgiant į sudėtingą nevienalytį PV pobūdį, vieno biologinio žymens tyrimas neatsako į visus rūpimus klausimus. Dėl šios priežasties būtina atlikti tolesnius naujų PV biologinių žymenų, kurie padėtų optimizuoti klinikinius sprendimus, tyrimus. Kelių biologinių žymenų naudojimas leistų

gydytojams suteikti pacientams geresnes, individualizuotas kliniškes konsultacijas bei tiksliau prognozuoti ligos eigą (Porzycki & Ciszkowicz, 2020).

1.6 Histonų metilinimas

Histonų modifikacijos yra vienas iš epigenetinės modifikacijos tipų, kaip prie histonų uodegose esančių aminorūgščių kovalentiškai prijungiamos funkcinės grupės. Histonai yra atsakingi už chromatino kompaktizavimą ląstelės branduolyje ir jo aktyvumo reguliaciją. Yra keturi pagrindiniai histonų baltymai (H2A, H2B, H3, H4), kurie evoliuciniu požiūriu yra labai konservatyvūs. Histonai susijungia į oktamerą ir kartu su DNR sudaro nukleosomą, kuri yra pagrindinis chromatino organizacijos vienetas. Histonai turi N ir C galus, prie kurių (paprastai prie N) gali būti prijungiamos potransliacinės modifikacijos: metilinimas, acetilinimas, fosforilinimas, sumoilinimas, ubikvitilininimas ir kt. (Sugiura et al., 2021). Priklausomai nuo modifikacijos tipo ir vietos kinta chromatino struktūra ir jo prieinamumas įvairiems transkripcijos veiksniams (**1.5 pav.**). Nuo to priklauso genų raiškos aktyvinimas ir slopinimas. Dauguma šių histonų modifikacijų ląstelėje yra uždedamos ląstelės diferenciacijos metu ir yra stabiliai palaikomos per kelis ląstelių dalijimosi ciklus (Sharma et al., 2010). Histonų modifikacijos, veikdamos kartu su kitais epigenetiniais veiksniais (DNR metilinimas, nekoduojančių RNR veikla, nukleosomų pertvarkymas, histonų variantų panaudojimas), palaiko normalų ląstelių funkcionavimą. Epigenetinės modifikacijos suteikia ląstelėms galimybę turėti skirtingas tapatybes turint tą pačią genetinę informaciją (Kiefer, 2007).



1.5 pav. Kovalentinės histonų modifikacijos ir chromatino struktūra (adaptuota pagal Akil et al., 2020)

Histonų metilinimo metu prie lizino ar arginino histonų N galuose pridedama viena, dvi ar trys metilo grupės. Metilo grupę, kurios donoras ląstelėse yra S-adenozil-L-metioninas, prijungia histonų

metiltransferazės (HMT). Histonų demetilazės (HDM) yra atsakingos už šių epigenetinių modifikacijų pašalinimą. Histonų metilinimo modifikacijos gali lemti genų raiškos aktyvinimą arba slopinimą, o tai priklauso nuo metilintų aminorūgščių liekanų vietos ir metilinimo laipsnio (Sugiura et al., 2021). Pavyzdžiui, H3 histono 4 padėtyje esančio lizino trimetilinimas (H3K4me3) yra būdinga transkripciniu požiūriu aktyvių genų promotorių žymė, o H3K9 ir H3K27 trimetilinimas yra susijęs su heterochromatino susidarymu (Sharma et al., 2010). Žinoma daug histonų metilinimo vietų, kurios keičia chromatino struktūrą. Histonas H3 gali būti metilintas K4, K9, K14, K27, K36, K79 padėtyse, o histonas H4 – K20 ir K59 padėtyse. Dažniausias histono H3 metilinimas K4, K36 ir K79 padėtyse yra susijęs su aktyvia genų raiška, o histono H3 metilinimas K9, K27 ir K20 padėtyse ir histono H4 metilinimas – su heterochromatinu ir genų raiškos slopinimu (Navakauskienė, 2017). Lyginant su kitomis histonų potransliacinėmis modifikacijomis, lizino metilinimas yra ilgalaikė žymė. Ji yra termodinamiškai labai stabili, išlieka per mitozę ir randama chromatino regionuose, kurie ilgą laiką nutildomi, pavyzdžiui, pericentriniame chromatine (dimetilintas H3K9, H3K9me2) ir neaktyvioje X chromosomoje (H3K27me3, H3K9me2) (Kiefer, 2007). Chromatinas taip pat gali būti divalentinis, kur kartu egzistuoja genų raišką aktyvinančios (H3K4me3) ir slopinančios (H3K27me3) modifikacijos. Šie domenai dažniausiai aptinkami embrioninėse kamieninėse ląstelėse ir su vystymusi susijusių genų promotoriuose. Manoma, kad toks divalentiškumas padidina fenotipinį plastiškumą, leidžiantį embrioninėms kamieninėms ląstelėms griežtai reguliuoti genų raišką skirtingų vystymosi procesų metu ir prireikus ją greitai aktyvinti. Diferencijuotos ląstelės praranda šį divalentiškumą ir įgauna įprastą chromatino struktūrą (Sharma et al., 2010).

1.7 Histonų metilinimas ir PV

Žmogaus vėžio ląstelėse, be daugybės genetinių pakitimų, stebimos ir epigenetinės anomalijos. Viena iš tokių – histonų metilinimo profilio pakitimai – dažniausiai atsiranda dėl sutrikusios šią modifikaciją reguliuojančių veiksnių, HMT ir HDM, raiškos. Manoma, kad histonų metilinimo reguliatoriai (HM) atlieka svarbų vaidmenį vėžio vystymosi metu, nes nuo šių veiksnių priklauso chromatino struktūros palaikymas ir valdymas. Nenormalios histonų modifikacijos koreliuoja su sutrikusia įvairių genų raiška vėžio progresavimo metu. Nenormalios histonų modifikacijos gali sukelti onkogenų aktyvumą arba naviką slopinančių genų slopinimą. Genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai sąveikauja visuose vėžio vystymosi etapuose, kartu skatindami vėžio progresavimą (Sugiura et al., 2021).

Pirmieji histonų metilinimo reguliatorių tyrimai parodė, kad LSD1 (KDM1A), pirmoji identifikuota KDM, gali pašalinti tiek aktyvinančias, tiek slopinančias metilinimo žymes (H3K4me1/2 ir H3K9me1/2) priklausomai nuo kartu komplekse esančių kitų baltymų, veikdama kaip

korepresorius arba koaktyvatorius. Vėliau aptiktos kelios kitos histono lizino demetilazės, įskaitant Jumonji C domeno baltymus (Sharma et al., 2010). Padidėjusi *KDM1A* raiška yra susijusi su agresyvios eigos PV navikais, taigi ir prastu pacientų išgyvenimu ir PV atsinaujinimu. Taip pat buvo tyrinėjama *KDM5* demetilazių šeima. Nustatyta, kad *KDM5B (JARID1B)* raiška yra padidėjusi PV audiniuose, o genas taip pat veikia kaip AR koaktyvatorius. *KDM5C (JARID1C)* raiškos padidėjimas yra susijęs su prasta PV sergančių pacientų prognoze, o *KDM5C* indikuoja nesėkmingą terapiją (predikcinis PV žymuo). *KDM5D (JARID1D)* slopina PV ląstelių progresavimą. Jo raiška sumažėjusi metastazavusio PV atveju (Upadhyay et al., 2021).

HMT šeimoje plačiai ištirta *EZH2 (KMT6A)* geno koduojama metiltransferazė, kuri katalizuoja lizino trimetilinimą (H3K27me3). H3K27me3 žymė yra susijusi su transkripcijos slopinimu, todėl padidėjęs jos lygis PV siejamas su naviką slopinančių genų, pvz., *DAB2IP*, slopinimu (Shen & Abate-Shen, 2010). *EZH2* padidėjusi raiška dažnai stebima sergant įvairiomis vėžio formomis, įskaitant PV, todėl šis genas gali būti perspektyvus terapinis PV taikinytis. Šiuo metu vyksta keli klinikiniai *EZH2* inhibitorių tyrimai (Sugiura et al., 2021). KAPV atveju *EZH2* gali veikti kaip transkripcijos faktorių, pvz., AR, koaktyvatorius. AR aktyvavimui reikalingas *EZH2* fosforilinimas ir nepažeistas metiltransferazės domenai. Todėl *EZH2* tiriamas kaip galimas terapinis KAPV taikinytis (Conteduca et al., 2021).

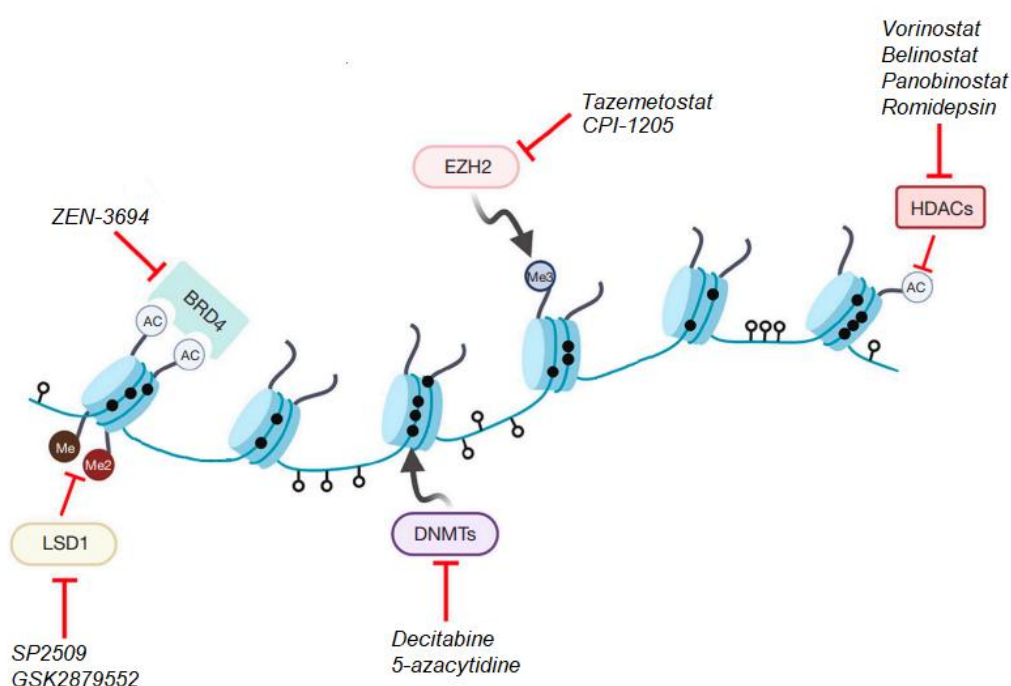
Sekoskaitos tyrimų rezultatai leido nustatyti ir kitus chromatinio pokyčius, vykstančius kancerogenezės metu. Nustatytos histonų metilinimo vietos, kurios susijusios su PV atsiradimu ir progresavimu. H3K4me1, H3K9me2 ir H3K9me3 žymių lygis sumažėja PV mėginiuose lyginant su nepiktybiniais audiniais. Tai sukelia nenormalų genų nutildymą. H3K27me3 genominiis pasiskirstymas PV ląstelių linijose ir mėginiuose keičiasi PV progresavimo metu. Metastazavus PV, naviką slopinančių genų promotorių regionuose taip pat dažnai aptinkama H3K27me3 modifikacija, palyginti su lokaliu PV ir normaliais prostatos audiniais. Tai lemia ląstelių proliferacijos padidėjimą. Padidėjęs H3K27me3 žymių skaičius metastazavusiame PV žinomas dėl padidėjusios *EZH2* raiškos. (Sugiura et al., 2021).

Visi šie epigenetiniai pokyčiai neveikia po vieną, o dažnai sąveikauja tarpusavyje ir kartu su genetinėmis pokyčiais. Dėl šios priežasties sudėtinga visapusiškai išaiškinti onkogeninę transformaciją.

1.8 Histonų metilinimo reguliatoriai ir epigenetinė terapija

Dėl epigenetinio kodo reguliavimo sutrikimų, įskaitant DNR metilinimo pokyčius, histonų modifikacijas ir nukleosomų remodeliavimą, atsiranda nenormalūs genų raiškos pokyčiai, kurie prisideda prie PV atsiradimo ir toliau kaupiasi ligos progresavimo metu. Epigenetinės modifikacijos

yra atsakingos už naviką slopinančių genų nutildymą, onkogeninių veiksnių aktyvavimą ir atsparumo terapijai valdymą, todėl tapo perspektyviais PV gydymo taikiniais. Epigenetinių modifikacijų sąsaja su PV progresavimu ir grįžtamas epigenetinių aberacijų pobūdis suteikia naujų išvalgų, kaip šios modifikacijos ir jas reguliuojantys baltymai gali būti panaudoti PV prognozei bei rizikos vertinimui. Epigenetinių modifikacijų reguliatoriai tapo svarbūs kuriant epigenetinės terapijos vaistus pacientams, sergantiems PV bei kitos lokalizacijos onkologinėmis ligomis (Conteduca et al., 2021). Epigenetinė terapija yra perspektyvi onkologijos strategija, pagrįsta transformuotų ląstelių grįžimu į normalios diferenciacijos būseną su normaliu epigenomu, naudojant įvairius cheminius ir biologinius veiksmus (Navakauskienė, 2017). Įvairūs junginiai tiriami ir naudojami kaip epigenetinės terapijos vaistai (1.6 pav.).



1.6 pav. Prostatos vėžio (PV) epigenetinės terapijos junginiai ir jų taikiniai. AC – histonų acetilinimo modifikacija, BRD4 – *bromodomain containing 4* baltymas, DNMTs – DNR metiltransferazės, EZH2 – *enhancer of zeste homolog 2* baltymas, HDACs – histonų deacetilazės, LSD1 – *lysine-specific demethylase 1* baltymas, Me – histonų metilinimo modifikacija (adaptuota pagal Conteduca et al., 2021)

Šiuo metu yra keturi FDA patvirtinti histonų deacetilazių inhibitoriai (*vorinostat*, *belinostat*, *panobinostat* ir *romidepsin*), skirti limfomai ir melanomai gydyti, o šios klasės vaistai taip pat buvo tiriami kaip terapiniai vaistai PV sergantiems pacientams (Conteduca et al., 2021). FDA patvirtino du DNR metiltransferazių inhibitorius: azacitidiną ir decitabiną. Šie vaistai skirti sergantiems ūmine mieloidine leukemija ir mielodiplastiniu sindromu. Azacitidiną FDA ir Europos vaistų agentūra (ang. *European Medicines Agency*, EMA) taip pat patvirtino lėtinės mielomonocitinės leukemijos gydymui

(Gnyszka et al., 2013). Tazemetostatas yra EZH2 inhibitorius, patvirtintas folikulinei limfomai gydyti. Šis junginys taip pat vertintas klinikiniame tyrime, kuriame dalyvavo pacientai, sergantys metastaziniu KAPV kartu su AR blokada. Klinikiniuose tyrimuose kartu su AR signalo inhibitoriais arba imunoterapija taip pat tiriamas EZH2 inhibitorius CPI-1205 (Conteduca et al., 2021).

Bromodomenas yra baltymų domenai, kuris atpažįsta ant histonų uodegų randamas acetilintas lizino liekanas, o tai rodo, kad šis baltymų domenai svarbus histonų kodo reguliavimui. Todėl taip pat tiriami junginiai, kurių taikinyje yra BET šeimos baltymai (angl. *bromodomain and extraterminal protein family*). ZEN3694 yra šių baltymų inhibitorius, kurio naudingumas vertinamas pacientams, sergantiems metastaziniu KAPV, kuriems pasireiškė ligos progresija po ankstesnio abiraterono acetato ir (arba) enzalutamido vartojimo. Klinikiniuose bandymuose taip pat tiriami keli LSD1 inhibitoriai: SP2509 ir GSK2879552 (Conteduca et al., 2021).

Kadangi HM reguliatoriai gali pasižymėti skirtingu poveikiu priklausomai nuo reguliuojamos modifikacijos vietos, tai kelia daug iššūkių naujų epigenetinės terapijos junginių paieškai. Tačiau jau dabar atlikti tyrimai rodo, kad dauguma HM reguliatorių yra susiję su įvairių lokalizacijų navikais, o taip pat ir PV.

Histono demetilazė KDM3A (dar žinoma kaip JMJD1A) atlieka pagrindinį vaidmenį spermatogenezėje, lyties nustatyme, kamieninių ląstelių atsinaujinime ir vėžio vystymosi metu pašalindama mono- ir dimetilo grupes nuo H3K9. H3K9me1 ir H3K9me2 žymės yra susijusios su heterochromatinu, todėl veikia kaip represinė epigenetinė modifikacija, o KDM3A reguliuoja genų raišką pašalindama šias žymes *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis, bet pirmenybę teikia dimetilintoms liekanoms (Tang et al., 2020a). Sutrikusi *KDM3A* geno raiška pastebėta daugelio vėžio tipų atveju, įskaitant krūties, storosios žarnos, plaučių, kepenų vėžį, limfomą. Padidėjęs KDM3A lygis yra susijęs su blogesne vėžio prognoze, o šio geno nutildymas sutrikdo naviko formavimąsi (Yoo et al., 2020). KDM3A labai svarbus PV vystymosi metu, nes gali veikti kaip AR koaktyvatorius, kuris dažnai aptinkamas ant ARE sekos, reguliuojantis genų raišką per demetilinimą (Wilson et al., 2017). Be to, KDM3A reguliuoja AR alternatyvų splaisingą, skatindamas AR-V7 susidarymą, o pastarasis yra vienas iš pagrindinių genetinių pokyčių, lemiančių PV atsparumo ADT išsivystymą (Fan et al., 2018).

KDM4B (*JMJD2B*) koduojama demetilazė pasižymi H3K9me2/3 (represinė žymė) ir H3K36me2/3 (aktyvi žymė) demetilinimo aktyvumu. Naujausiais duomenimis, ši demetilazė geba pašalinti ir represinę H4K20me3 žymę (Xiang et al., 2020). *KDM4B* reguliuoja įvairių genų, kurie svarbūs kamieninių ląstelių atsinaujinimui ir diferenciacijai bei įvairių organų vystymuisi, raišką. *KDM4B* skatina mezenchiminių kamieninių ląstelių, kurios yra svarbios lytinių organų, kaulų, kepenų ir vidinės ausies formavimuisi, diferenciaciją. Sutrikusi šio geno raiška siejama ir su įvairiomis žmogaus ligomis, įskaitant ir vėžinius susirgimus. Taigi, nors šis genas gali būti

potencialus biologinis žymuo vėžinėms ligoms, gydymo strategijų, kurios nutaikytos į šio geno raiškos pokyčius, kūrimas kelia daug iššūkių. Tyrimais su nustatyta, kad *KDM4B* išjungimas pelėms sukelia osteoporozę ir sunkų nutukimą. *KDM4B* taip pat labai svarbus DNR pažaidų taisymui. Nors *KDM4B* praradimas sustiprina radioterapijos poveikį, tačiau tai lemia ir padidėjusį DNR pažaidų dažnį normaliuose audiniuose. *KDM4B* svarbus PV progresavimui dėl atsparumo ADT išsivystymo ir tolimesnio ligos progresavimo iki KAPV. Dėl padidėjusios *KDM4B* raiškos padidėja ir AR–V7 lygis (Wang et al., 2022). O *KDM4B* raiškos inhibicija lemia AR–V7 kiekio sumažėjimą, taip slopinant PV ląstelių augimą (Duan et al., 2019).

KDM5A (JARIDIA) koduojama demetilazė pašalina H3K4me2/3 žymes. *KDM5A* svarbus įvairiems fiziologiniams ir patologiniams procesams, pvz., ląstelių judrumui, kamieniškumui ir epitelio–mezenchimos tranzicijai (EMT), aktyvuojant arba slopinant transkripciją nuo demetilazės priklausomu arba nepriklausomu būdu tiek palaikant homeostazę, tiek ir ligos atveju. *KDM5A* taip pat svarbus ląstelių ciklo vyksmui, ląstelių senėjimui, cirkadinio ritmo palaikymui (Yang et al., 2021). *KDM5A* raiškos pokyčiai svarbūs PV vystymosi metu, kadangi nustatyta, kad *KDM5A* yra labai svarbus lėtinio vaisto poveikio metu vaistams atsparių PV ląstelių susidarymui (Yan et al., 2011).

KDM5D (JARID1D) koduojamas fermentas demetiline H3K4me2 ar H3K4me3 žymes, o tai susiję su tam tikrų genų, kurie svarbūs ląstelių gebėjimu plisti, raiškos nuslopinimu. *KDM5D* slopina PV ląstelių invaziją *in vitro* ir *in vivo*, bet ne proliferaciją ar migraciją. *KDM5D* aktyvumas yra būtinas daugelio su invazija siejamų genų raiškos reguliacijai. *KDM5D* raiška dažnai sumažėjusi metastazavusiame PV, o tai savo ruožtu siejama su bloga PV ligonių prognoze. Tyrimais nustatyta, kad *KDM5D* delecija nustatoma 52 % vėžinių ligų atveju (Li et al., 2016a; Jangravi et al., 2016). Ikklinikinių tyrimų duomenys rodo, kad *KDM5D* yra susijęs su efektyviu atsaku į chemoterapiją docetakseliu. *Knockdown* tyrimais nustatyta, kad *KDM5D* sąveikauja su AR branduolyje ir reguliuoja jo transkripcijos aktyvumą demetilinant aktyvios transkripcijos žymę H3K4me3. *KDM5D* raiškos sumažėjimas sutrikdo AR aktyvumo reguliavimą, todėl išsivysto atsparumas docetakseliui (Komura et al., 2016).

KDM7B (PHF8) koduojama demetilazė pasižymi represinių H3K9me1, H3K9me2, H3K27me2 ir H4K20me1 chromatino žymių demetilinimu (Ma et al., 2015). *KDM7B* veikia kaip transkripcijos koaktyvatorius, dalyvaujantis ląstelės ciklo užtikrinime, tačiau jo fiziologinis vaidmuo vis dar menkai išaiškintas. *KDM7B* reguliuoja genų, dalyvaujančių ląstelių adhezijoje ir citoskeleto organizavime, raišką. Dėl *KDM7B* trūkumo gali pasireikšti ląstelės ciklo vėlavimas, netvarkingas aktino citoskeleto susidarymas, sutrikti ląstelių adhezija (Asensio-Juan et al., 2012). *KDM7B* valdomas histonų metilinimas svarbus neuronų diferenciacijoje, smegenų ir kaukolės, veido vystymesi. Tyrimai rodo, kad padidėjusi *KDM7B* raiška susijusi su PV, stemplės plokščialąstelinės

karcinomos, plaučių ir krūties vėžio progresavimu. Padidėjusi *KDM7B* raiška prisideda prie ląstelių proliferacijos reguliuodama su ląstelės ciklu susijusius genus, tačiau neaišku, kaip *KDM7B* reguliuoja ląstelių migraciją. Šios demetilazės aktyvumas svarbus *MYC* valdomai ląstelių proliferacijai ir su *EMT* susijusių genų aktyvavimui (Shao et al., 2017).

KMT1E (*SETDB1*) geno koduojama metiltransferazė trimetilina H3K9, o tai lemia heterochromatino atsiradimą, genų nutildymą ir transkripcijos slopinimą (Chen et al., 2017). *KMT1E* svarbus centrinės nervų sistemos ląstelių linijų embriologinei diferenciacijai, X chromosomos inaktyvinimui, embrionų vystymuisi, endogeninių retrovirusų slopinimui ir T pagalbinių ląstelių diferenciacijos kontrolei (Strepkos et al., 2021). Nenormaliai padidėjusi *KMT1E* raiška siejama su kancerogeneze, įskaitant PV, melanomą, plaučių, krūties, kiaušidžių vėžį, gliomą (Chen et al., 2017). Nutildžius *KMT1E*, slopinamas PV ląstelių augimas, migracija ir invazija (Sun et al., 2014). Parodyta, kad PV atveju *KMT1E* gali skatinti kaulų metastazių išsivystymą dalyvaudamas *WNT* kelyje (Li et al., 2016b).

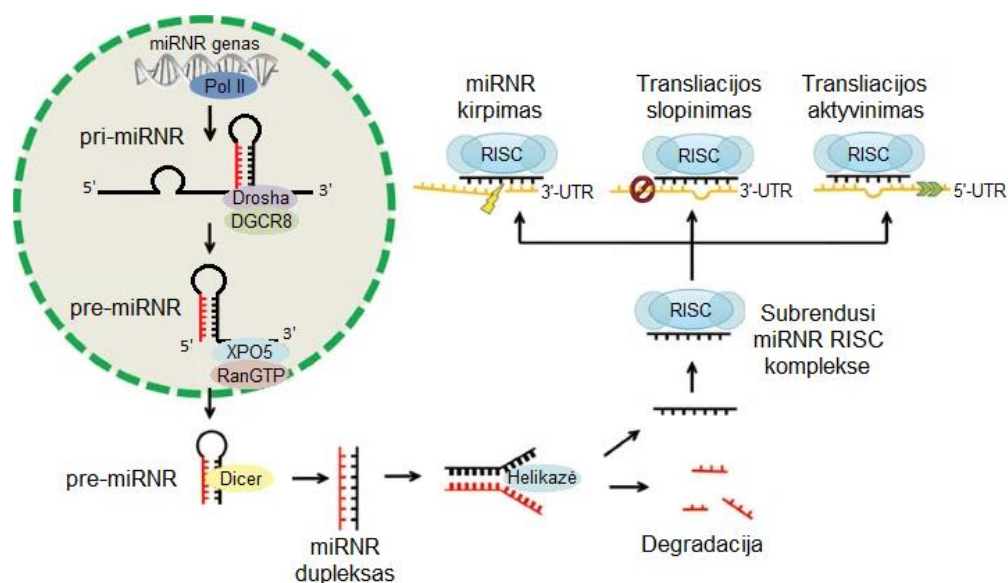
KMT5A (*SETD8*) genas koduoja metiltransferazę, kuri atlieka H4K20 monometilinimą. *KMT5A* metiltransferazės aktyvumas yra susijęs su daugeliu esminių ląstelės procesų, įskaitant DNR replikaciją, reparaciją, genomo stabilumo palaikymą ir ląstelės ciklo reguliavimą. *KMT5A* dalyvauja tiek transkripcijos aktyvinime, tiek ir slopinime (Milite et al., 2016). Šio fermento vaidmuo svarbus reguliuojant chromosomų stabilumą mitozės metu, nes jo praradimas sukelia apoptozę ir ląstelės ciklo sustojimą S ir G2/M fazėse (Driskell et al., 2012). Sutrikusi *KMT5A* raiška nustatyta įvairios lokalizacijos navikuose, todėl manoma, kad šis genas gali dalyvauti naviko vystymesi ir progresavime (Malik et al., 2015). *KMT5A* yra susijęs su vėžinių ląstelių invaziškumu ir metastazėmis dėl sąveikos su transkripcijos faktoriumi *TWIST*, kuris yra pagrindinis *EMT* reguliatorius. *KMT5A* taip pat veikia kaip epigenetinis reguliatorius *TWIST* reguliuojamų baltymų E-kadherino ir N-kadherino promotoriuose (Yang et al., 2012). Tyrimais parodyta ir *KMT5A* sąveika su AR: H4K20me1 ir *KMT5A* dažnai randami AR reguliuojamų genų promotoriuose. Dėl *KMT5A* raiškos nutildymo sumažėja H4K20me1 lygis PSA koduojančio geno promotoriuje, o *KMT5A* raiškos lygis koreliuoja su *PSA* mRNR lygiu PV ląstelių linijose. Todėl šio geno / baltymo raiška gali būti perspektyvus terapinis taikynys PV gydymui, kuriame AR vaidina pagrindinį reguliacinį vaidmenį (Yao et al., 2014).

1.9 MiRNR ir jos biogenezė

MiRNR – tai klasė trumpų, ~20–22 nt ilgio, nekoduojančių RNR, kurios atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant genų raišką. Jos geba prisijungti prie taikinio mRNR, tokiu būdu slopindamos baltymo transliaciją. Maždaug pusė visų šiuo metu nustatytų miRNR yra intrageninės ir dažniausiai

koduojamos kitų, baltymus koduojančių genų intronuose, rečiau miRNR genai randami baltymus koduojančių genų egzonuose. Manoma, kad tokių miRNR raiškos reguliavimas priklauso nuo motininio geno promotoriaus. Intergeninės miRNR aptinkamos tarpgeniniuose regionuose, todėl reguliuojamos nuo savo promotoriaus ir jų transkripcija vyksta nepriklausomai (O'Brien et al., 2018).

Kanoninė miRNR biogenezė susideda iš kelių etapų, kurie vyksta ląstelės branduolyje ir citoplazmoje (**1.7 pav.**). Pirmiausia RNR polimerazė II nurašo pirminę miRNR (pri-miRNR) nuo geno. Pri-miRNR yra smeigtuko formą turintis transkriptas. Šią struktūrą atpažįsta Drosha ir DGCR8 baltymai, kurie susijungia ir skelia susidariusį transkriptą. Taip susidaro tarpinis miRNR brendimo produktas – miRNR pirmtakas (pre-miRNR). Prie šio komplekso prisijungia Exportin-5 (XPO5)/RanGTP baltymų kompleksas, kuris perneša pri-miRNR iš branduolio į citoplazmą tolesniam brendimui. Citoplazmoje esanti endoribonuklezė Dicer nuskelia smeigtuko galvutę. Taip susidaro miRNR dubleksas. MiRNR grandinės kryptingumas lemia subrendusios miRNR formos pavadinimą. 5p grandinė susidaro iš pre-miRNR plaukų segtuko 5' galo, o 3p grandinė – iš 3' galo. Abiejų kryptių grandinės, gautos iš subrendusio miRNR gali sąveikauti su argonautų (AGO) baltymų šeima. Subrendusi viengrandė miRNR susijungia su AGO baltymais ir susidaro genų raišką slopinantis kompleksas RISC (**1.7 pav.**). Likusi komplementari miRNR seka ląstelėje degraduojama AGO2 baltymų (O'Brien et al., 2018).



1.7 pav. MiRNR biogenezė. Pol II – RNR polimerazė II; Drosha – ribonuklezė III (angl. *Ribonuclease III*); DGCR8 – DGCR8 mikroprocesoriaus komplekso subvienetas (angl. *DGCR8 Microprocessor Complex Subunit*); XPO5 – Eksportinas 5; RanGTP – RAS superšeimai priklausanti mažoji GTPazė (angl. *member of the RAS superfamily of small GTPases*); Dicer – endoribonuklezė; RISC – RNR-indukuojamas nutildymo kompleksas (angl. *RNA-induced silencing complex*); UTR – netransliuojamas regionas (angl. *untranslated region*; adaptuota pagal Li & Yang, 2013)

MiRNR reguluoja genų raišką skirtingais mechanizmais (**1.7 pav.**). Vienas iš jų yra mRNR skilimas, kai taikinio mRNR yra perkerpama į dvi dalis, ir kitas – translacijos slopinimas, kai miRNR prisijungia prie taikinio mRNR 3'–UTR netransliuojamo regiono ir neleidžia prisijungti kitiems baltymams, kad prasidėtų baltymo translacija. Nors dauguma tyrimų orientuoti į miRNR slopinimo funkciją, tačiau miRNR gali ir aktyvinti genų raišką, kai prisijungia prie mRNR 5'–UTR netransliuojamo regiono, kur konkuruoja su transkripciją slopinančiais baltymais. Manoma, kad šis procesas vyksta specifinėmis sąlygomis ląstelėje, pvz., aminorūgščių bado metu (O'Brien et al., 2018). MiRNR aktyvumui svarbi 2–8 nt reguliacinė seka (angl. *seed region*), kuri komplementariai gali prisijungti prie taikinio sekos. Kuo didesnis atitikimas, tuo didesnė tikimybė, kad RNR transkriptas bus paveiktas miRNR.

MiRNR yra atsakingos už epigenetinius pokyčius dėl jų gebėjimo reguliuoti genų raišką potranskripciniame lygmenyje. MiRNR ir kiti epigenetiniai veiksniai gali reguliuoti vienas kitą arba veikti bendrai reguliuojant kitus biologinius procesus. MiRNR raiška nutildoma DNR metilinimo būdu, o histonų modifikacijos taip pat gali reguliuoti miRNR raišką daugelio ląstelių tipų ar ligų atveju. Kita vertus, miRNR gali tiesiogiai reguliuoti epigenetinius veiksnius, tokius kaip DNR metiltransferazės ar histono deacetilazės, taip reguliuodamos chromatino struktūrą (Bianchi et al., 2017).

1.10 MiRNR ir vėžys

MiRNR vaidina svarbų vaidmenį reguliuojant daugelį biologinių procesų, svarbių normaliam vystymuisi, įskaitant ląstelių proliferaciją, apoptozę ir diferenciaciją. Žmogaus genome nustatytų miRNR ir galimų tikslinių genų kiekis sparčiai auga, o tai rodo svarbų miRNR vaidmenį palaikant normalų genų raiškos profilį. Kaip ir kitų genų, miRNR motininių genų raišką galima reguliuoti epigenetiniais mechanizmais. Pačios miRNR taip pat gali reguliuoti epigenetinius mechanizmus ląstelės viduje, reguliuodamos genų, atsakingų už DNR metilinimą ar histonų modifikacijas (*EZH2*) raišką (Sharma et al., 2010). Todėl sutrikęs miRNR reguliavimas yra susijęs su įvairiomis žmogaus ligomis, ypač su vėžiu, nes miRNR gali veikti kaip onkogenai ir naviko slopikliai (O'Brien et al., 2018). Onkogeninės miRNR (*oncomiR*) skatina vėžio ląstelių dauginimąsi, slopindamos naviko slopinančių genų raišką. Naviką slopinančios miRNR (*miRsupps*) slopina vėžio progresavimą reguliuodamos onkogenų raišką potranskripciniame lygmenyje. MiRNR veikla priklauso nuo audinio tipo, todėl vieno tipo miRNR gali būti ir onkogeninės, ir naviką slopinančiomis skirtingų tipų navikuose (Li & Yang, 2013). Tačiau ne visada aišku, ar pakitęs miRNR raiškos profilis yra tiesioginė vėžio priežastis ar netiesioginis ląstelių fenotipo pokyčių poveikis. Be to, viena miRNR gali reguliuoti kelis taikinius.

Nekoduojančios RNR ligų atveju paprastai pasižymi audiniui ir stadijai specifine raiška. MiRNR ypatingos tuo, kad jas dažnai galima rasti įvairiuose organizmo skysčiuose, pvz., kraujas, šlapimas, sperma. Taip pat nustatyta, kad miRNR pasižymi skirtinga raiška tarp navikinio ir normalaus audinių ir yra naudingos navikų klasifikavimui pagal kilmės liniją, diferenciacijos stadiją ir naviko agresyvumą (Alarcón-Zendejas et al., 2022). Nustatyta daugybė miRNR, kurių raiška padidėjusi įvairių vėžinių ligų atveju. MiR-21 yra viena dažniausių miRNR, kurios padidėjusi raiška nustatoma įvairaus tipo navikuose. Ši miRNR reguliuoja daugelio genų, susijusių su mikrokraujagyslių proliferacija ir naviko invaziškumu, raišką. Padidėjusi jos raiška susijusi su sumažėjusiu išgyvenimu be BLP ir turi prognostinę reikšmę BLP rizikai PV sergantiems pacientams po radikalių prostatektomijų (Li et al., 2012). MiR-221/miR-222 raiška padidėja sergant PV. Šių miRNR veikimas padidina ląstelių proliferaciją, invaziją, ląstelių išgyvenimą, padidina ląstelių klonogeniškumą ir indukuoja naviko vystymąsi *in vivo*. MiR-221/miR-222 taikinytis yra naviką slopinantis genas *p27^{Kip1}*. Todėl teigiama, kad padidėjusi miR-221/miR-222 raiška prisideda prie onkogenozės ir PV progresavimo per *p27^{Kip1}* raiškos slopinimą (Galardi et al., 2007). Padidėjusi miR-18a raiška nustatoma PV sergančių pacientų periferiniame kraujyje, palyginti su GPH sergančiais pacientais ir sveikais asmenimis. Didesnis miR-18a raiškos lygis susijęs su PV progresavimu (Al-Kafaji et al., 2016). Let-7 miRNR šeimos narių raiška dažnai sumažėjusi lokalizuoto PV atveju. Tyrimai rodo, kad let-7 pasižymi naviką slopinančia funkcija ir reguliuoja onkogenų, susijusių su ląstelės ciklo progresavimu, proliferacija, migracija, diferenciacija ir EMT, raišką. Let-7 miRNR praradimas susijęs su PV progresavimu (Kong et al., 2012).

MiRNR dalyvavimas PV vystyme ir progresavime yra labai svarbus, todėl būtina suprasti tikslų šių molekulių vaidmenį PV vystymosi eigoje. Kadangi miRNR atsakingos už genų raiškos pokyčius normaliuose ir vėžiniuose audiniuose, miRNR ir genų sąveikos nustatymas gali būti naudojamas kaip perspektyvi terapijos priemonė.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

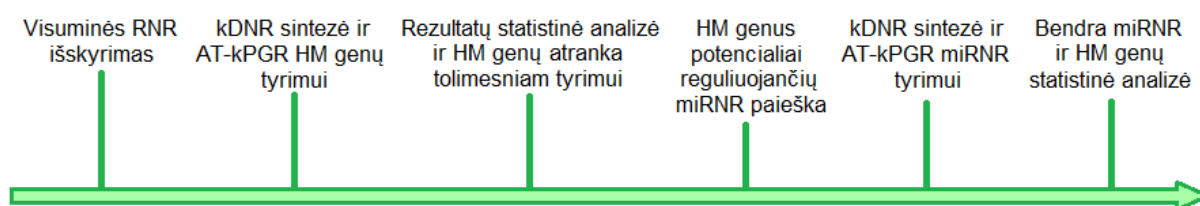
2.1 Ligoniai ir mėginiai

Mėginiai šiam tyrimui buvo surinkti 2008–2014 m. ankstesnių projektų vykdymo metu (C–03/2009 ir LIG–14/2012). Iš viso buvo iširta 186 prostatos audinio mėginiai, kurie buvo įtraukti į HM genų raiškos tyrimą ir dalis mėginių – į miRNR raiškos tyrimą (**2.1 lentelė**). Tyrimams atlikti buvo gautas bioetikos komiteto leidimas (2007-11-23 Nr. 50) su pratęsimais. Į tyrimą įtrauktų ligonių klinikinės–patologinės charakteristikos yra pateiktos **1 priede**. Apibendrinta tyrimo eiga pateikta **2.1 pav.**

2.1 lentelė. Į tyrimą įtrauktos tiriamosios grupės ir mėginių skaičius

Audinio tipas	Ištirtų mėginių imtis, N	
	Genų raiška	MiRNR raiška
PV	123	36
NPA	47	16
GPH	16	–
Viso	186	52

PV – prostatos vėžys, NPA – nevėžinis prostatos audinys, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija.



2.1 pav. Tyrimo eiga. AT-kPGR – atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR; kDNR – komplementari DNR; HM genai – histonų metilinimą reguliuojantys genai

2.2 RNR skyrimas

Šaldyti prostatos audinio mėginiai buvo mechaniškai homogenizuoti naudojant tissueTUBE^s TT1 mėgintuvėlius (Covaris, JAV) ir cryoPREP™ CP02 Impactor homogenizatorių (Covaris). Visuminė RNR buvo išskirta naudojant „mirVana™ miRNA Isolation kit“ rinkinį (Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Lietuva) pagal modifikuotą gamintojo protokolą (Daniunaite et al., 2017). Išskirtos RNR koncentracija ir grynumas įvertinta bekiuvečiu spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), išmatavus šviesos sugertį ties 260/280, 260/230 ir 320 nm bangų ilgiais. Išskirtos RNR integralumas buvo tiriamas elektroforezės būdu 1,0–1,5% agarozės gelyje, 1X TAE buferyje (Thermo Fisher Scientific) su atsitiktinai parinktais mėginiais. Išskirta RNR saugoma –20 °C arba iš karto tirama.

2.3 Komplementarios DNR sintezė

Histonų metilinimo reguliatorių komplementarios DNR (kDNR) sintezė buvo atliekama *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) rinkiniu pagal gamintojo protokolą. Reakcijai naudota 250 ng išskirtos RNR. Temperatūrinis režimas: 25 °C – 10 min., 37 °C – 120 min., 85 °C – 5 min, 4 °C – ∞.

MiRNR raiškos tyrimui kDNR sintezė buvo atliekama *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems™) rinkiniu pagal gamintojo protokolą atlikus tam tikras modifikacijas. Reakcijai naudota 200 ng išskirtos RNR. Prieš kDNR sintezę į mėginį buvo dedama 50 pM sintetinės egzogeninės ath-miR159a su fosforilintu 5' galu (Metabion, Vokietija). MiRNR kDNR sintetinta visoms mėginyje esančioms miRNR kartu. MiRNR kDNR sintezė sudaryta iš keturių etapų, kurių temperatūriniai režimai: poliadenilavimo reakcija (37 °C – 45 min, 65 °C – 10 min, 4 °C – ∞), adapterio prijungimo reakcija (16 °C – 60 min.), atvirkštinės transkripcijos reakcija (42 °C – 15 min, 85 °C – 5 min, 4 °C – ∞), gautos kDNR pirminės amplifikacijos reakcija (95 °C – 5 min, 14 ciklų po 95 °C – 3 s ir 60 °C – 30 s, 99 °C – 10 min, 4 °C – ∞).

Atvirkštinė transkripcija atlikta termocikleryje MasterCycler EP Gradient S (Eppendorf, Thermo Fisher Scientific). kDNR mėginiai iš karto tirti toliau arba trumpai saugoti –20 °C.

2.4 Kiekybinė PGR

Histonų metilinimo reguliatorių raiškos tyrimui atvirkštinės transkripcijos kiekybinės PGR (AT-kPGR) metodu atlikti buvo ruošiami 8 reakcijos mišiniai su 8 skirtingais TaqMan® (Applied Biosystems™) zondų ir pradmenų rinkiniais, kurių numeriai Hs00218331_m1, Hs00943636_m1, Hs00231908_m1, Hs00190491_m1, Hs00697293_m1, Hs00180850_m1, Hs01029949_m1 ir Hs02800695_m1 atitinkamai genams *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E*, *KMT5A* ir *HPRT1*. Reakcijos mišinį (20 µl) sudarė 2x TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems™), 20x TaqMan® zondų ir pradmenų rinkinio ir 2 µl kDNR reakcijos produkto. Amplifikacija vykdyta 96 šulinėlių plokštelėse Eppendorf™ twin.tec™ Real-Time 96-Well PCR Platesc (Eppendorf, Vokietija), PGR plokštelės uždengiamos PGR plėvele Eppendorf™ Masterclear™ Real-time PCR Film (Eppendorf). Kiekvienas genas tirtas atliekant du pakartojimus. Į kiekvieną reakciją įtrauktos vandens taršos kontrolės kiekvienam taikiniui. Užpildyta plokštelė centrifuguojama 4000 g 2 min. (centrifuga Heraeus Megafuge 40, Thermo Fisher Scientific). Amplifikacija atlikta kiekybinės PGR sistema Mx3005P (Agilent Technologies, JAV). Temperatūrinis režimas: 95 °C – 10 min., 40 ciklų po 95 °C – 15 sek. ir 60 °C – 1 min.

Pirminiai duomenys surinkti ir apdoroti MxPro v4.10 programa (Agilent Technologies). Fluorescencijos signalas normalizuotas pagal pasyvios fluorescencijos dažą ROX (*2x TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG* sudėtyje). Amplifikacijos bazinė linija (angl. *baseline*) ir slenkstinė riba (angl. *threshold*) nustatytos automatiškai. *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* raiška normalizuota pagal endogeninės kontrolės geną *HPRT1* ir konvertuota į santykinius dydžius tiesinėje skalėje naudojant GenEx7 v7.0 (MultiD Analyses, Švedija) programą.

MiRNR raiškos tyrimui AT-kPGR atlikti buvo ruošiami 7 reakcijos mišiniai su 7 skirtingais TaqMan® (Applied Biosystems™) zondų ir pradmenų rinkiniais, kurių numeriai 483061_mir, 478214_mir, 477917_mir, 477940_mir, 478094_mir, 479101_mir ir 478411_mir atitinkamai miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-618 ir ath-miR159a. Reakcijos mišinį (20 µl) sudarė *TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX)* (Applied Biosystems™), 1 µM ROX iš *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial* rinkinio (Thermo Fisher Scientific), *20x TaqMan®* zondų ir pradmenų rinkinio ir 5 µl 10 kartų autoklavuotu distiliuotu vandeniu skiesto kDNR reakcijos produkto. Amplifikacija vykdyta 96 šulinėlių plokštelėse *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL* (Applied Biosystems™), PGR plokštelės uždengiamos PGR plėvele *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems™). Kiekviena miRNR tirta atliekant du pakartojimus. Į kiekvieną reakciją įtrauktos vandens taršos kontrolės kiekvienam taikiniui. Užpildyta plokštelė centrifuguojama 4000 rpm 2 min (centrifuga Universal 320, Hettich Zentrifugen, Vokietija). Amplifikacija atlikta realaus laiko PGR sistema StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Temperatūrinis režimas: 95 °C – 2 min., 50 ciklų po 95 °C – 3 sek. ir 60 °C – 30 sek.

Pirminiai duomenys surinkti ir apdoroti Stepone Software v2.3 programa (Applied Biosystems™). Fluorescencijos signalas normalizuotas pagal pasyvios fluorescencijos dažą ROX. Amplifikacijos bazinė linija nustatyta automatiškai, slenkstinė riba nustatyta pagal gamintojo rekomendacijas (0,2). MiR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p ir miR-618 kiekiai normalizuoti pagal egzogeninę kontrolinę ath-miR159a ir konvertuoti į santykinius dydžius tiesinėje skalėje naudojant GenEx7 v7.0 programą.

2.5 MiRNR atrinkimas

Išanalizavus genų raiškos duomenis, buvo pasirinkti 5 genai (*KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E*, *KMT5A*), kurie rodė reikšmingus raiškos skirtumus tarp tiriamųjų grupių ir sąsajas su BLP. Pasitelkus *in silico* analizę buvo atlikta spėjimų ir / ar eksperimentiškai patvirtintų histonų metilinimą reguliuojančių genų reguliacinių miRNR paieška septyniuose atviros prieigos šaltiniuose: miRTarBase (Huang et al., 2022), miRDB (Chen & Wang, 2020), DIANA tools TarBase v.8

(Karagkouni et al., 2018), mirWalk (Sticht et al., 2018), starBase v2.0 (Li et al., 2014), miRTargetLink 2.0 (Kern et al., 2021) ir TargetScanHuman 8.0 (McGeary et al., 2019). Vykdam tiriamųjų miRNR atranką iš visų miRNR buvo pašalintos tos, kurios pasižymėjo žemu patikimumo kriterijumi, t.y. jų sąveika su potencialiu taikiniu pagrįsta menkai arba visai netirta eksperimentiniais metodais. Tolimesnei analizei pasirinktos šešios miRNR (miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-618), kurios galimai reguliuoja tiriamus genus pagal ≥ 3 duomenų bazes. MiRNR paieška atlikta 2022 metų vasario–gegužės mėn.

2.6 Statistinė analizė

Histonų metilinimo reguliatorių raiškos sąsajos su ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais įvertintos *Mann-Whitney U* testu ir apskaičiuojant *Spearman* koreliacijos koeficientą. *Kaplan-Meier* kreivių analizė atlikta genų raišką diferencijuojant pagal medianą, grupių palyginimui naudotas *Log-rank (Mantel-Cox)* testas. Išgyvenamumui be progresijos įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) santykinės rizikos įvertinimas buvo atliktas *Cox* regresijos metodu (angl. *Cox proportional hazards regression*), taikant visų kintamųjų įtraukimo į modelį vienu metu (angl. *enter*) ir laipsnišką kintamųjų įtraukimo į modelį (angl. *forward*) algoritmus. Apskaičiuota santykinė rizika (HR, angl. *hazard ratio*) ir 95 % pasikliautinieji intervalai (CI, angl. *confidence interval*). Biologinių žymenų tinkamumas diagnostikai buvo įvertintas atlikus ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizę. Buvo apskaičiuotas jautrumas, specifiskumas ir ploto po kreive įvertis AUC (angl. *area under the ROC curve*).

MiRNR sąsajų su histonų metilinimo reguliatoriais tyrimui buvo panaudoti ankstesnio tyrimo metu gauti miRNR raiškos duomenys (Stuopelyte et al., 2016) tiriant tos pačios PV imties mėginius, naudojant TaqMan® mažo tankio gardeles Human MicroRNA A+B v3.0 (Applied Biosystems™). Šio tyrimo metu ištirtų miRNR raiškos sąsajos su pasirinktų genų raiška įvertintos apskaičiuojant *Spearman* koreliacijos koeficientą. Eksperimentiškai ištirtų miRNR raiškos skirtumai tarp skirtingos patologijos mėginių ir sąsajos su ligonių biocheminiais rodikliais įvertintos *Mann-Whitney U* testu.

Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,0500$. Skaičiavimams atlikti ir rezultatams pateikti naudotos Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, JAV), GraphPad Prism 7 (demonstracinė versija; GraphPad Software, JAV) ir MedCalc v14.8.1 (demonstracinė versija; MedCalc Software, Belgija) programos. Tyrimo schemai ir miRNR reguliaciniam tinklui sudaryti ir pateikti naudota programa Krita (Krita Foundation, Nyderlandai).

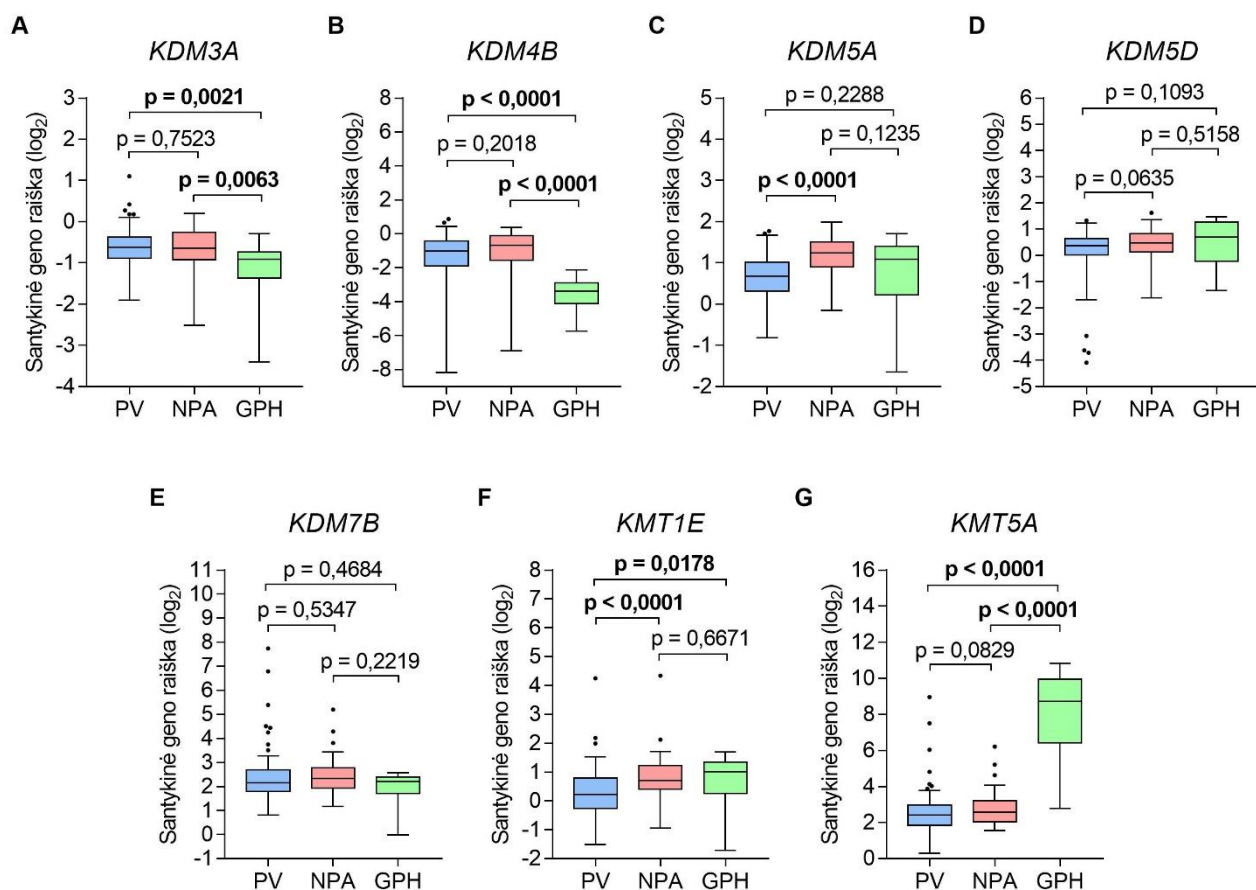
3. REZULTATAI

Siekiant įvertinti histonų metilinimo reguliacijoje dalyvaujančių genų galimą diagnostinį ir prognostinį potencialą PV atveju, remiantis literatūros duomenimis, genų raiškos analizei buvo pasirinkti 7 genai: *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A*. Tyrimo metu buvo analizuojami šių genų raiškos skirtumai PV ir kontroliniuose mėginiuose (NPA ir GPH) bei įvertintas tirtų genų, kaip žymenų, pritaikomumas diagnostikai. Nustatytos sąsajos su ligonių klinikinėmis–patologinėmis charakteristikomis. Siekiant įvertinti HM genų raiškos skirtumų, kaip prognostinių žymenų, potencialą, toliau buvo analizuojama jų sąsajos su BLP. Atlikus *in silico* analizę, nustatytos reguliacinės miRNR ir keleto pasirinktų raiška (miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-618) įvertinta eksperimentiškai.

3.1. HM genų raiškos analizė

3.1.1 Genų raiškos palyginimas PV ir kontroliniuose mėginiuose

KDM3A, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiška buvo kiekybiškai įvertinta PV (N = 123), NPA (N = 47) ir GPH (N = 16) audiniuose AT-kPGR metodu. Gauti rezultatai parodė, kad *KDM5A* ir *KMT1E* genų atveju raiška PV buvo mažesnė nei NPA, o pastarojo geno atveju – ir palyginus su GPH (visi $p < 0,0500$; **3.1 pav.**). *KDM3A* ir *KDM4B* raiška buvo mažiausia GPH mėginiuose, o *KMT5A* atveju nustatytas priešingas skirtumas (visi $p < 0,0500$). *KDM5D* ir *KDM7B* genų raiškos skirtumai tarp PV, NPA ir GPH audinių nenustatyti (**3.1 pav.**).



3.1 pav. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos palyginimas prostatos navikuose (PV) ir kontroliniuose mėginiuose. A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. NPA – nevėžinis prostatos audinys, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos p vertės paryškintos.

3.1.2 Genų raiškos palyginimas su ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais

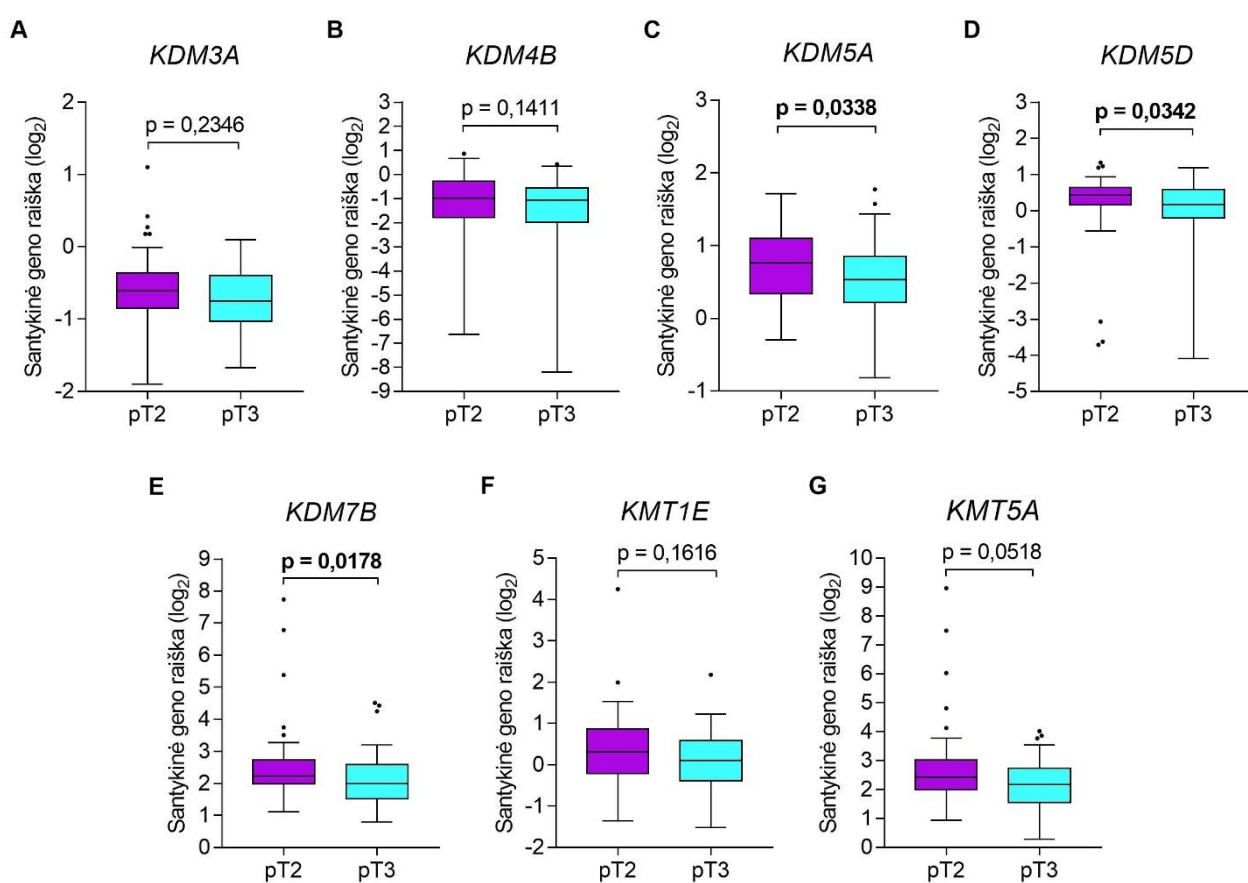
KDM3A, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiška buvo susieta su ligonių amžiumi, prostatos mase ir PSA kiekiu kraujyje, tačiau reikšmingų sąsajų nenustatyta nei vieno geno atveju (visi $p > 0,0500$, **3.1 lentelė**).

Palyginus tirtų HM genų raišką tarp pT2 ir pT3 stadijos navikų buvo nustatyta, kad *KDM5A*, *KDM5D* ir *KDM7B* raiška buvo mažesnė pT3 stadijos atvejuose palyginus su pT2 (atitinkamai $p = 0,0338$, $p = 0,0342$ ir $p = 0,0178$; **3.2 pav.**). Kitų genų atveju taip pat stebėta mažesnės raiškos tendencija esant vėlesnei naviko stadijai, tačiau skirtumai nebuvo reikšmingi (visi $p > 0,0500$; **3.2 pav.**).

3.1 lentelė. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos sąsajos su prostatos vėžiu sergančių ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais

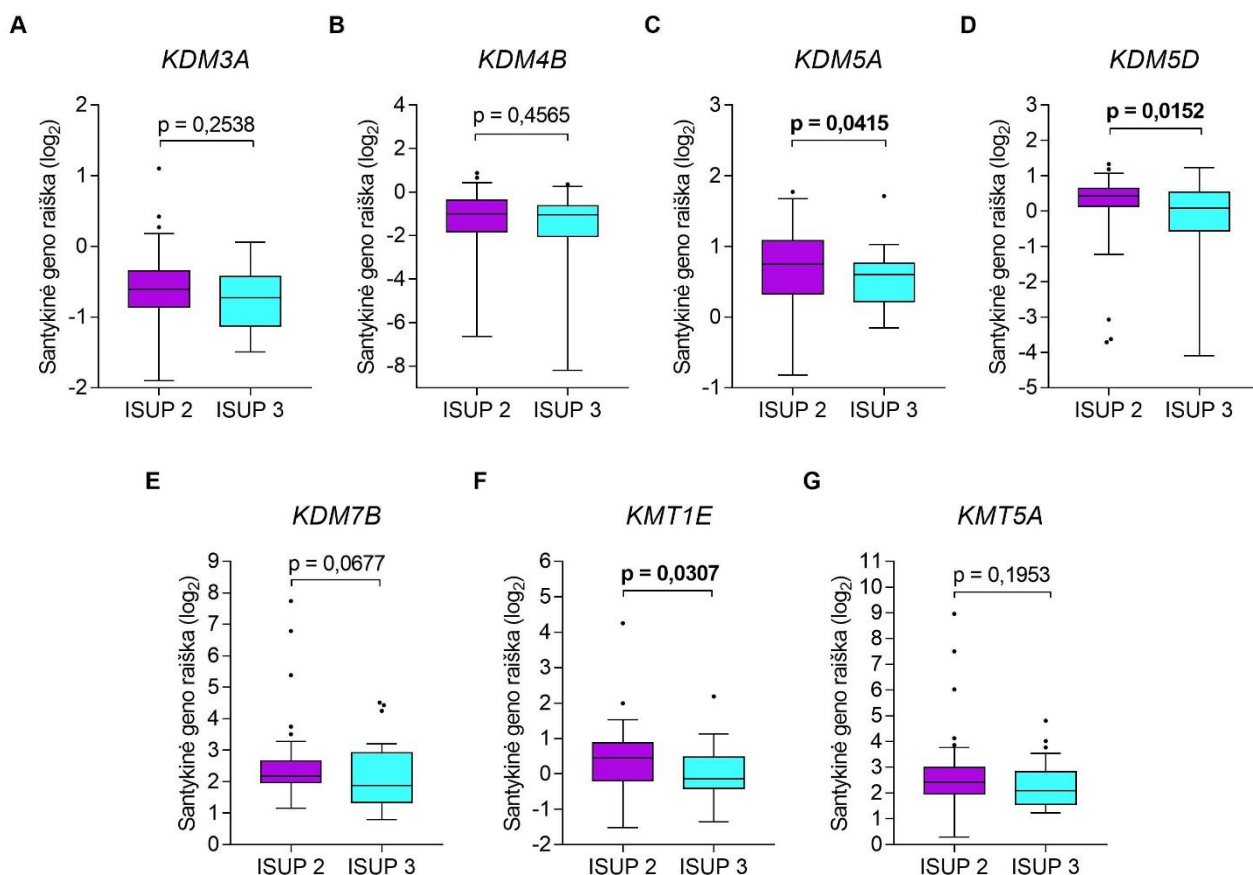
Genas	Amžius (m.)		Prostatos masė (g)		PSA (ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p
<i>KDM3A</i>	0,07	0,4644	-0,08	0,3879	0,02	0,8176
<i>KDM4B</i>	0	0,9888	-0,01	0,9097	0,01	0,9342
<i>KDM5A</i>	0	0,9781	-0,03	0,7183	-0,11	0,2372
<i>KDM5D</i>	-0,05	0,5989	-0,09	0,3124	-0,14	0,1389
<i>KDM7B</i>	0,08	0,3958	-0,01	0,9263	-0,07	0,4267
<i>KMT1E</i>	0	0,9932	-0,13	0,1426	-0,1	0,1655
<i>KMT5A</i>	0,04	0,6642	-0,05	0,5521	-0,12	0,2054

r – Spearman koreliacijos koeficientas.



3.2 pav. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos palyginimas tarp antros (pT2) ir trečios (pT3) stadijos navikų. A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūsai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Palyginus tirtų genų raiškos lygį tarp ISUP 2 ir ISUP 3 grupės navikų nustatyta, kad *KDM5A*, *KDM5D*, *KMT1E* genų raiška buvo reikšmingai mažesnė pastarosios grupės navikuose (atitinkamai $p = 0,0415$, $p = 0,0152$ ir $p = 0,0307$; **3.3 pav.**). Analogiškos tendencijos buvo stebimos ir kitų genų atveju, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi (visi $p > 0,0500$).

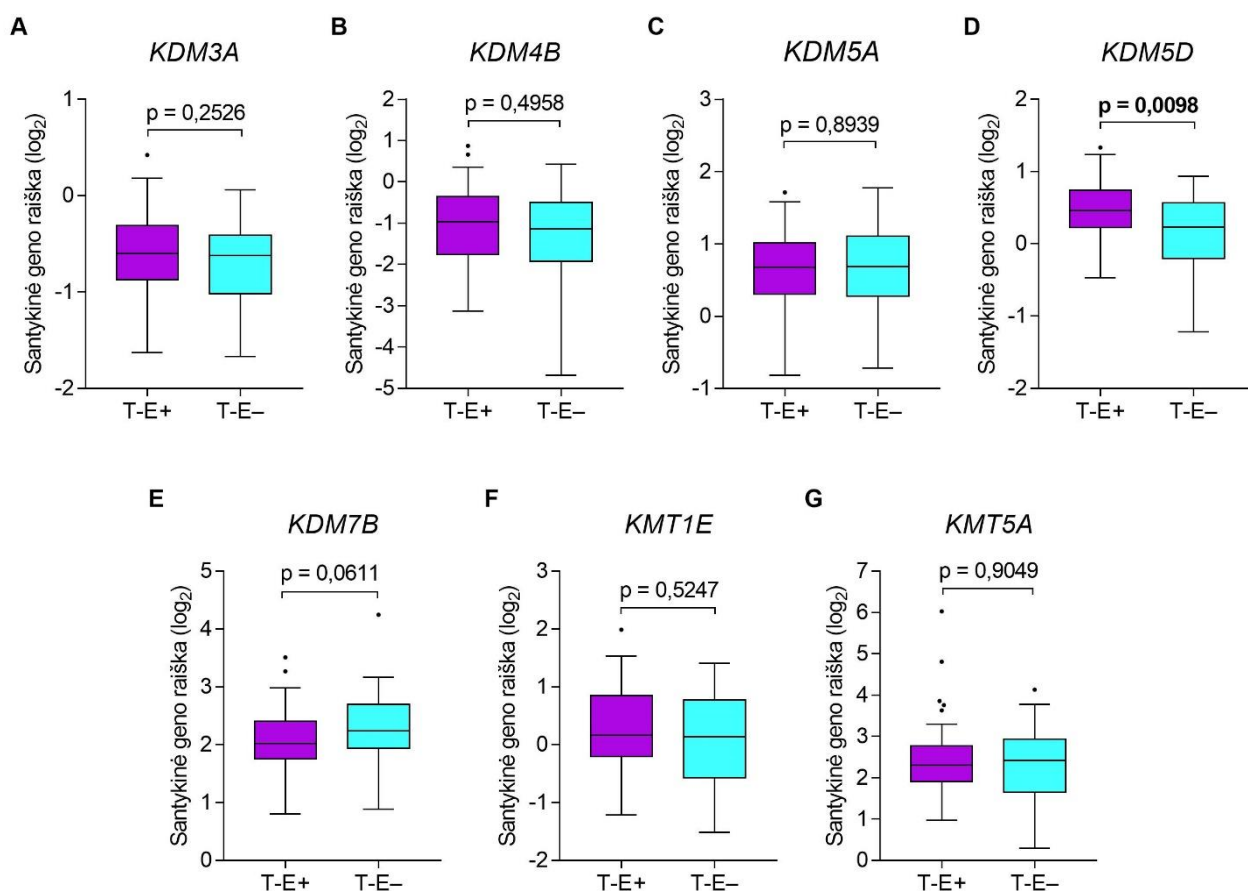


3.3 pav. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos palyginimas tarp antros (ISUP 2) ir trečios (ISUP 3) grupės navikų. A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – mediana, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos p vertės paryškintos.

3.1.3 Genų raiškos sąsajos su *TMPRSS2-ERG* transkripto raiška

Tos pačios PV imties ankstesnių tyrimų metu buvo įvertintas *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto raiškos statusas (Sabaliauskaite et al., 2012; Demidenko et al., 2017). Šio tyrimo metu buvo siekta palyginti, ar tirtų genų raiškos lygis susijęs su šio sulietinio transkripto buvimu PV audiniuose. Atlikta analizė parodė, kad *KDM5D* geno raiška PV audiniuose buvo didesnė, kai buvo aptiktas ir *TMPRSS2-ERG*, palyginus su atvejais, kai šio transkripto nebuvo rasta ($p = 0,0098$).

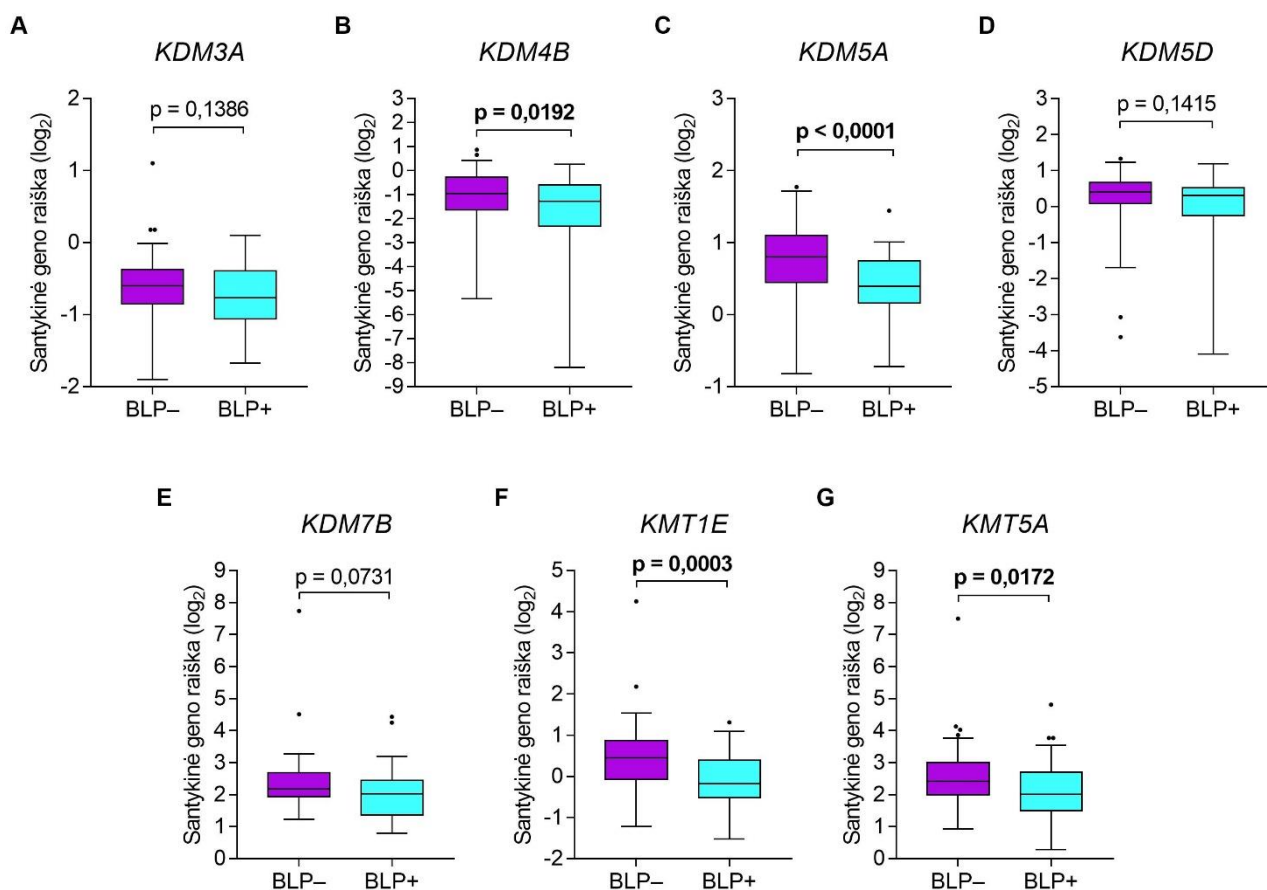
Priešinga tendencija stebėta *KDM7B* atveju, tačiau sąsaja nebuvo statistiškai reikšminga ($p = 0,0611$; 3.4 pav.).



3.4 pav. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos palyginimas pagal sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* raiškos statusą. A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. T-E+/- – *TMPRSS2-ERG* raiška nustatyta / nenustatyta. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos p vertės paryškintos.

3.1.4 Genų raiškos sąsajos su biochemine ligos progresija

Tyrimo metu siekta nustatyti, ar tirtų genų raiška yra susijusi su BLP. Pirmiausia buvo analizuojamos genų raiškos sąsajos su BLP statusu. *KDM4B*, *KDM5A*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiška buvo mažesnė esant BLP nei ligai neprogresavus (atitinkamai $p = 0,0192$, $p < 0,0001$, $p = 0,0003$, $p = 0,0172$; 3.5 pav.).



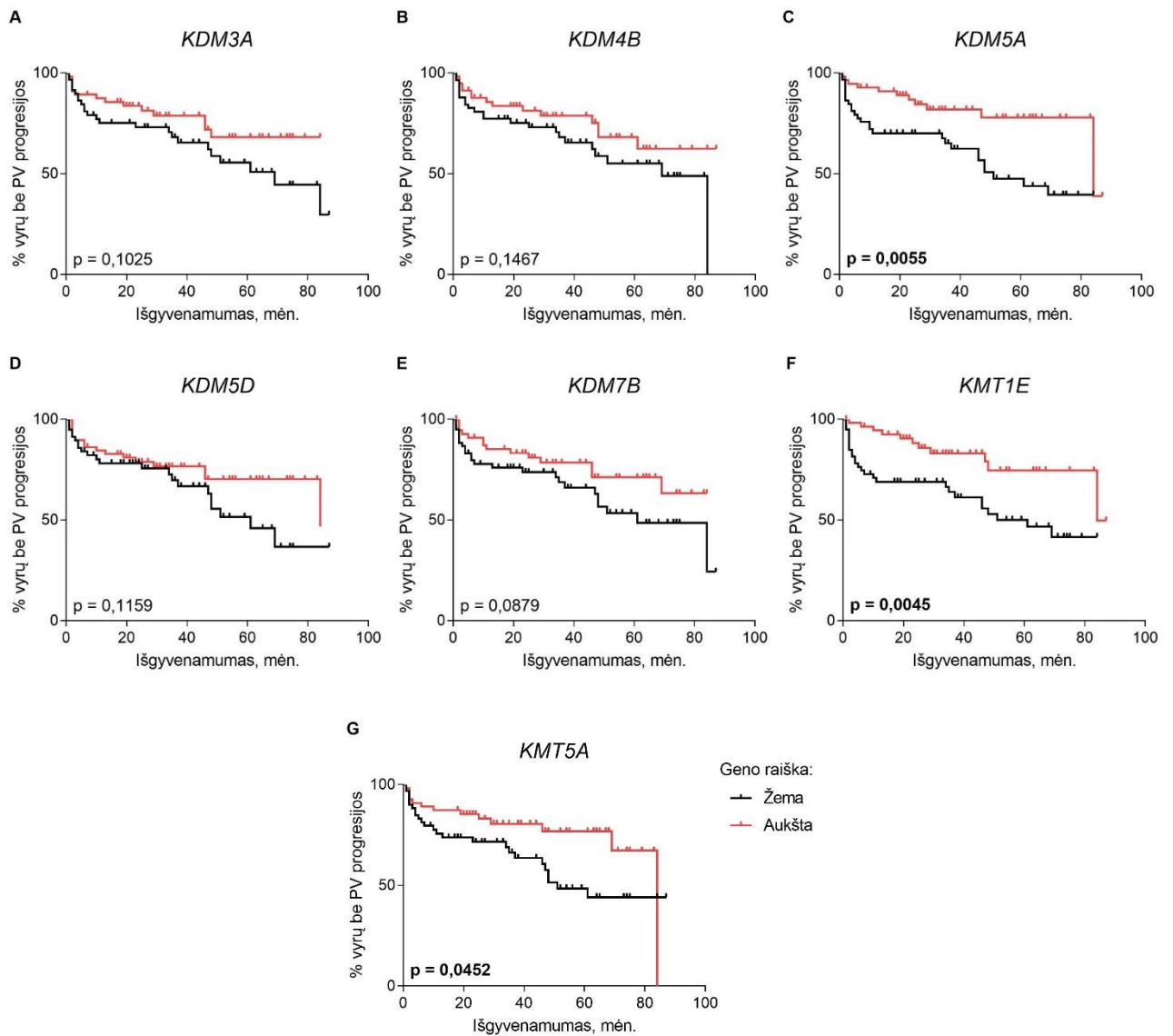
3.5 pav. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos skirtumai, kai pacientui pasireiškė ir nepasireiškė biocheminė ligos progresija (BLP+/-). A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Kaplan-Meier išgyvenamumo kreivių analizė pilnoje mėginių imtyje patvirtino *KDM5A*, *KMT1E* ir *KMT5A* žemesnio raiškos lygio ryšį su trumpesniu PV ligonių išgyvenamumu be BLP (atitinkamai $p = 0,0055$, $p = 0,0045$ ir $p = 0,0452$; **3.6 pav.**).

Atlikus pavienių kintamųjų *Cox* analizę pilnoje mėginių imtyje mažesnė *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D* ir *KMT1E* genų raiška statistiškai reikšmingai siejosi su didesne rizika greičiau pasireikšti BLP (visi $p < 0,0500$). Klinikinių–patologinių kintamųjų analizė parodė, kad aukštesnis PSA lygis, vėlesnė naviko pT stadija ir ISUP grupė buvo susiję su trumpesniu išgyvenamumu be BLP (visi $p < 0,0500$; **2 priedas**).

Daugiamatėje *Cox* analizėje derinant skirtingas histonų metilinimą reguliuojančių genų kombinacijas su klinikiniais–patologiniais rodikliais, *KDM5A* ir *KMT1E* genų raiška kartu su pT ir ISUP grupėmis sudarė reikšmingus modelius BLP prognozuoti (visų modelių $p < 0,0001$). Taikant

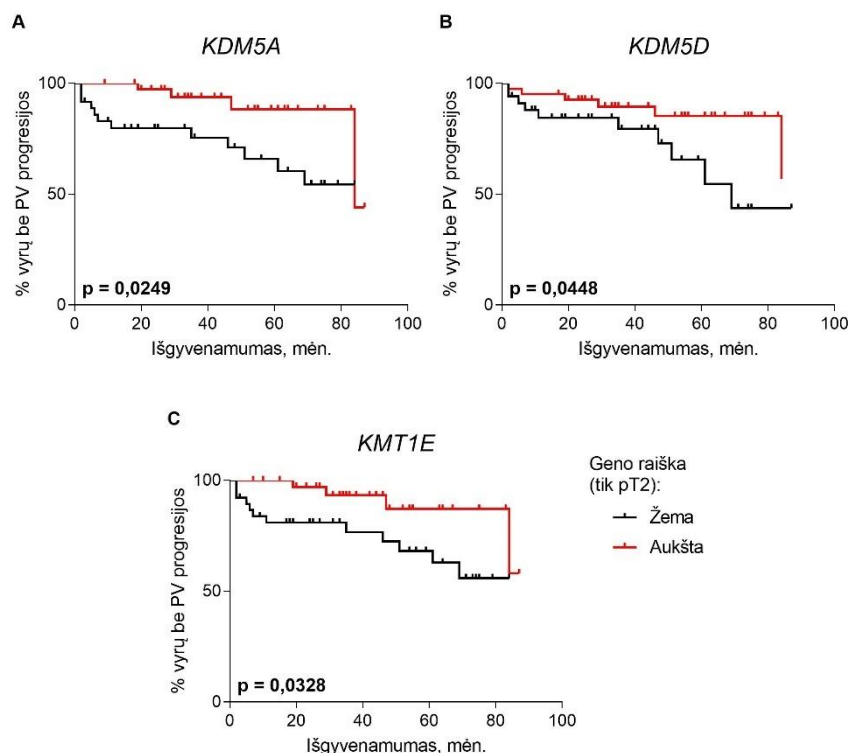
Forward kintamųjų įvedimo algoritmą, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D* ir *KMT1E* genų raiškos kombinacijos kartu su PSA lygiu kraujyje sudarė statistiškai reikšmingus modelius, kurie pranoko PSA, kaip pavienio rodiklio, prognostinę vertę (modelių $p = 0,0085$, $p = 0,0001$, $p = 0,0243$, $p = 0,0002$ ir PSA $p = 0,0214$). Kombinuojant genų raišką su *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto statusu, modeliai su *KDM5A* ir *KMT1E* genais taip pat rodė prognostinę vertę (modelių $p = 0,0041$ ir $p = 0,0030$; **2 priedas**).



3.6 pav. Prostatos vėžio (PV) biocheminės progresijos sąsaja su tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiška. A–G atitinkamai *KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal apskaičiuotą atitinkamo geno raiškos medianą. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Siekiant geriau įvertinti HM genų prognostinį potencialą, jų raiškos skirtumų sąsajos su BLP buvo analizuojamos ankstyvos stadijos (pT2) ir sąlyginai menkai dediferencijuotuose (ISUP2) navikų

subgrupėse. Kaip ir bendroje imtyje, pT2 stadijos navikuose mažesnė *KDM5A* ir *KMT1E* raiška buvo susijusi su trumpesniu išgyvenamumu be BLP ($p = 0,0249$ ir $p = 0,0328$). Be to, analogiškas rezultatas gautas ir *KDM5D* atveju ($p = 0,0448$; **3.7 pav.**).



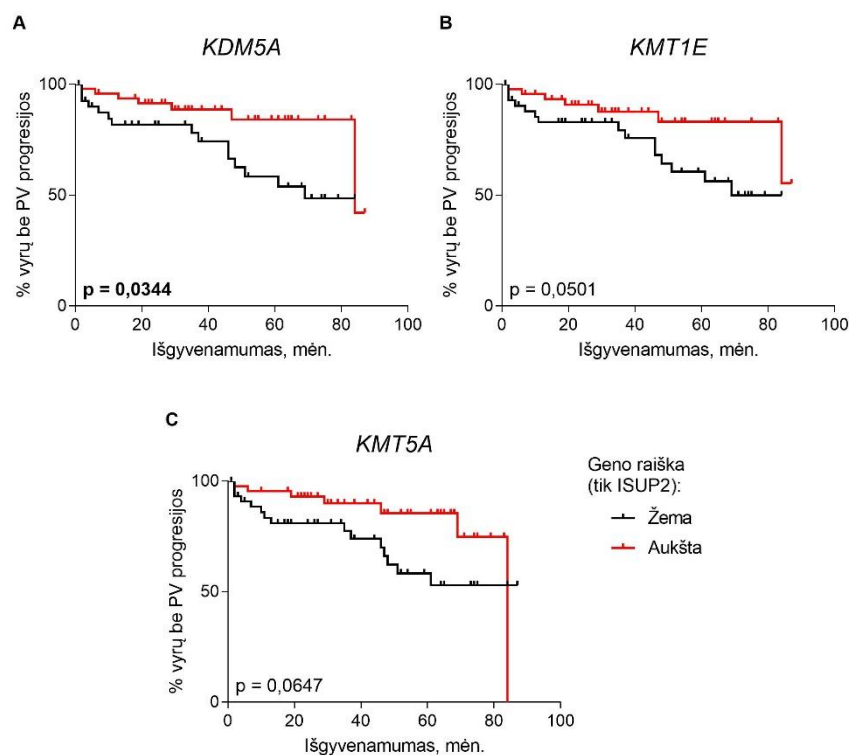
3.7 pav. Prostatos vėžio (PV) biocheminės progresijos sąsajos su tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiška pT2 stadijos mėginių grupėje. A–C atitinkamai *KDM5A*, *KDM5D* ir *KMT1E* genų raiškos palyginimas. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal apskaičiuotą atitinkamo geno raiškos medianą. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Pavienių kintamųjų *Cox* analizė pT2 stadijos mėginiuose patvirtino *KDM5A* ir *KMT1E* genų prognostinę vertę (atitinkamai $p = 0,0201$ ir $p = 0,0429$), tačiau *KDM5D* atveju ryšys su trukme iki BLP nebuvo nustatytas ($p > 0,0500$). Nors mažesnė *KDM3A* geno raiška *Kaplan-Meier* analizėje neparodė sąsajos su BLP, vienmačiame *Cox* modelyje šis genas turėjo prognostinę vertę ($p = 0,0183$). ($p = 0,0021$; **3 priedas**).

Daugiamatėje analizėje ISUP grupė kartu su *KDM3A* arba *KDM5A* genais sudarė statistiškai reikšmingus modelius laikui iki BLP prognozuoti (atitinkamai $p = 0,0003$ ir $p = 0,0012$). Be to, *KDM3A*, *KDM5A* ir *KMT1E* pasižymėjo nepriklausoma prognostine verte modeliuose su PSA ar / ir *TMPRSS2-ERG* sulietiniu transkriptu (visų modelių $p < 0,0500$; **3 priedas**).

Analizuojant tik ISUP 2 grupės navikų mėginius, *Kaplan-Meier* kreivių palyginimas parodė, kad mažesnė *KDM5A* geno raiška buvo susijusi su BLP ($p = 0,0344$), o *KMT1E* ir *KMT5A* atveju

stebėta tik analogiška tendencija (abu $p > 0,0500$; **3.8 pav.**). Kitų genų reikšmingos raiškos sąsajos su ligonių išgyvenamumo laiku iki BLP nenustatytos (nepateikiama).



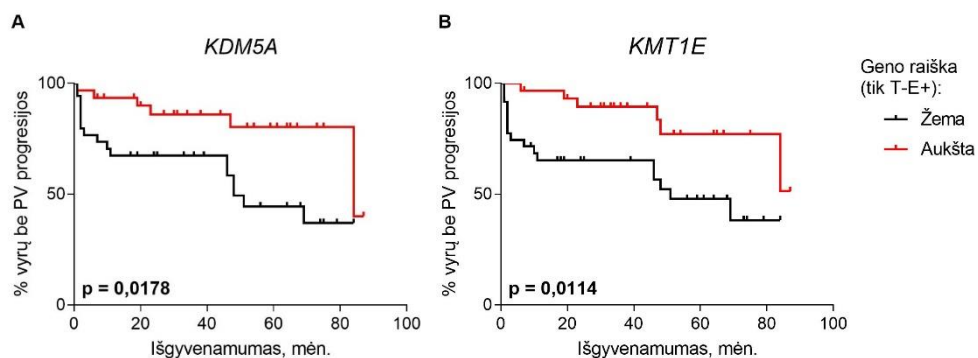
3.8 pav. Prostatos vėžio (PV) biocheminės progresijos sąsajos su tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiška ISUP 2 stadijos mėginių grupėje. A–C atitinkamai *KDM5A*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos palyginimas. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal apskaičiuotą atitinkamo geno raiškos medianą. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Vienmatė kintamųjų *Cox* analizė patvirtino *KDM5A* geno raiškos prognostinę vertę ($p = 0,0136$). Be to, sąsajos su trukme iki BLP taip pat nustatytos ir *KMT1E* bei *KMT5A* genų atveju (atitinkamai $p = 0,0385$ ir $p = 0,0258$). Įvairūs daugiamačiai modeliai su šiais genais ir pT ar / ir PSA taip pat buvo statistiškai reikšmingi (**4 priedas**).

Kadangi PV vystymosi metu dažnai susidaro *TMPRSS2-ERG* sulietinis transkriptas, todėl nuspręsta patikrinti, ar histonų metilinimo reguliatorių raiška yra susijusi su BLP navikuose, kuriuose buvo aptiktas šis transkriptas. *Kaplan-Meier* analizė parodė, kad šioje navikų grupėje žema *KDM5A* ir *KMT1E* raiška susijusi su BLP (atitinkamai $p = 0,0178$ ir $p = 0,0114$; **3.9 pav.**).

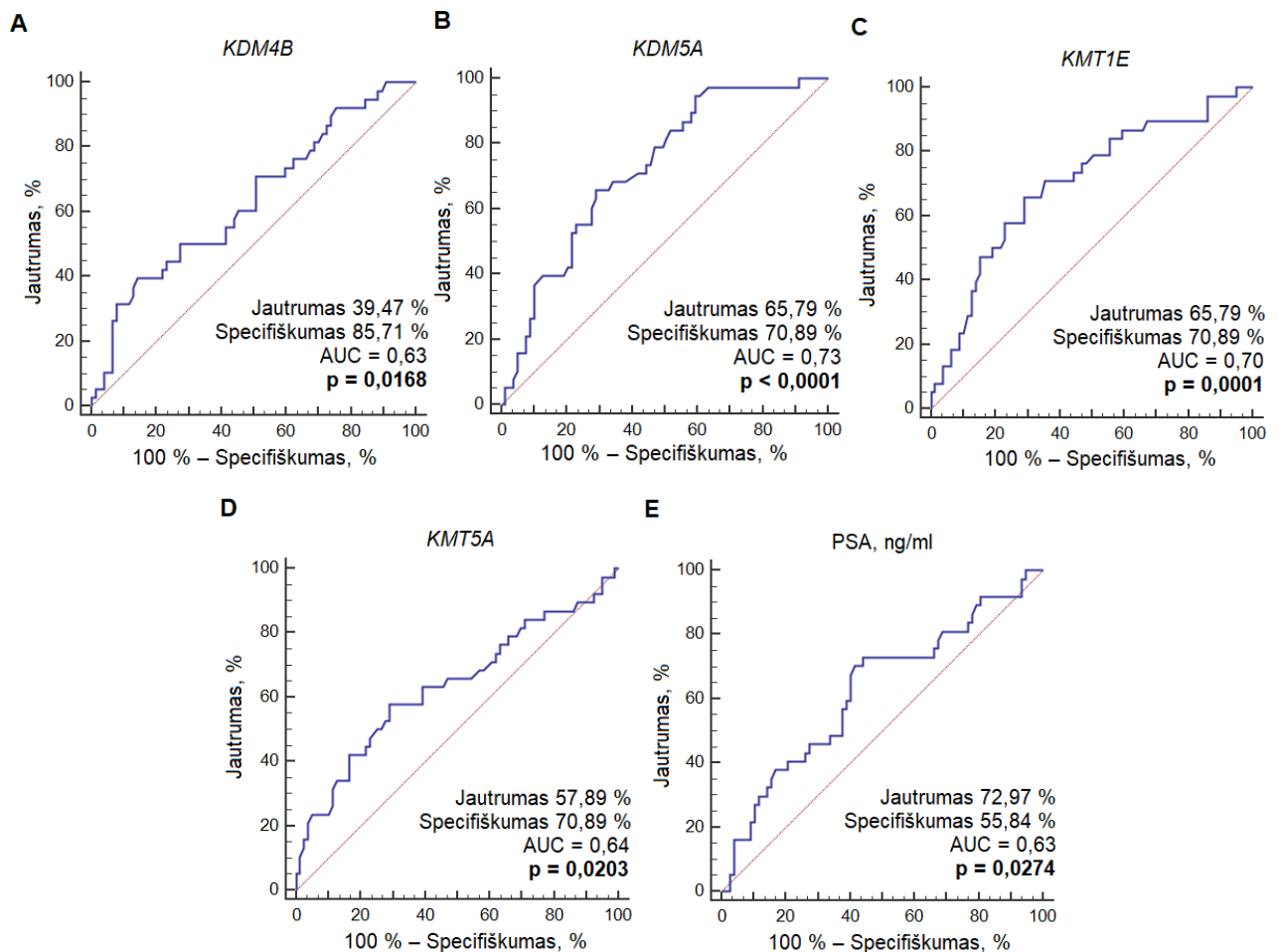
Pavienu kintamųjų *Cox* analizė *TMPRSS2-ERG* sulietinį transkriptą turinčių navikų grupėje patvirtino *KDM5A* ir *KMT1E* genų prognostinę vertę (abu $p < 0,0500$). Vėlesnė pT stadija ir ISUP grupė taip pat siejosi su didesne rizika greičiau pasireikšti BLP (abu $p = 0,0003$). Kaip ir bendroje mėginių imtyje, taip pat ir šioje subgrupėje nustatyta statistiškai reikšminga PSA, kaip nepriklausomo

rodiklio, vertė ($p < 0,0001$). Daugiamatėje analizėje *KDM5A* ir *KMT1E* genų deriniai su pT, ISUP ir PSA sudarė reikšmingus modelius laikui iki BLP prognozuoti (visi modelių $p < 0,0500$; **5 priedas**).



3.9 pav. Prostatos vėžio (PV) biocheminės progresijos sąsajos su tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiška mėginiuose, kuriuose buvo nustatytas *TMPRSS2-ERG* (T-E+) sulietinis transkriptas. A–B atitinkamai *KDM5A* ir *KMT1E* genų raiškos palyginimas. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal apskaičiuotą atitinkamo geno raiškos medianą. Reikšmingos p vertės paryškintos.

Siekiant įvertinti HM genų raiškos skirtumą, kaip prognostinių žymenų, jautrumą ir specifiškumą BLP prognozavimui, buvo atlikta ROC analizė. *KDM5A* ir *KMT1E* genų atveju jautrumas ir specifiškumas atitinkamai siekė 65,79% ir 70,89 %, o AUC rodiklis – 0,73 (**3.10 pav**).



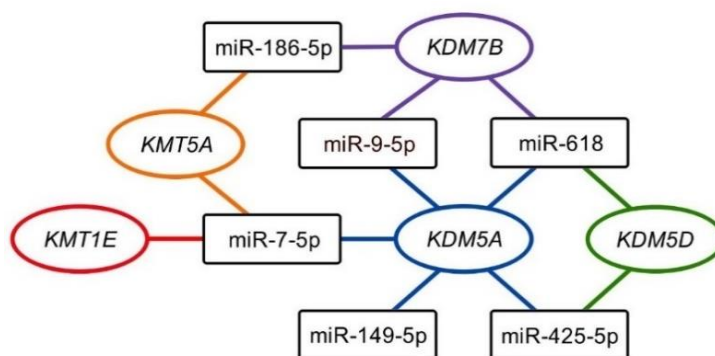
3.10 pav. Prostatos vėžio audinyje tiriamų histonų metilimo reguliatorių ROC kreivių analizė. A–D atitinkamai *KDM4B*, *KDM5A*, *KMT1E* ir *KMT5A* genų raiškos, E – prostatos specifinio antigeno (PSA) kiekio kraujyje analizė. Žymenų jautrumas ir specifiškumas vaizduojamas ROC kreivėmis; AUC – plotas po ROC kreive. Reikšmingos p vertės paryškintos.

3.2 HM genų reguliacinių miRNR paieška ir analizė

3.2.1 HM genus potencialiai reguliuojančių miRNR paieška

Išanalizavus HM genų raišką ir nustčius sąsajas su PV ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais, remiantis gautais rezultatais tolimesniame tyrimo etape dėmesys buvo labiau kreiptas į 5 genus: *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A*, kurie rodė sąsajas su BLP. Remiantis miRTarBase (Huang et al., 2022), miRDB (Chen & Wang, 2020), DIANA tools TarBase v.8 (Karagkouni et al., 2018), mirWalk (Sticht et al., 2018), starBase v2.0 (Li et al., 2014), miRTargetLink 2.0 (Kern et al., 2021), TargetScanHuman 8.0 (McGeary et al., 2019) duomenų bazėmis buvo identifikuotos šiuos genus reguliuojančios miRNR (**6 priedas**) ir identifikuotos pasikartojančios miRNR, kaip potencialūs HM genų reguliatoriai (**7 priedas**). Sąveikoms tarp

miRNR ir jų reguliuojamų HM genų–taikinių susisteminti buvo sudarytas reguliacinis tinklas (**3.11 pav.**). Kadangi skirtingus genus potencialiai reguliuojančių miRNR persidengimas tarp duomenų bazių skiriasi, todėl reguliacinio tinklo sudarymui buvo atmestos miRNR, turinčios žemą patikimumo kriterijų (sąveika su galimu taikiniu menkai pagrįsta ar visai netirta eksperimentiniais metodais) ir pasikartojančios ≤ 3 duomenų bazėse.



3.11 pav. Histonų metilinimo reguliatorių ir juos potencialiai reguliuojančių miRNR reguliacinis tinklas.

3.2.2 HM genų ir miRNR raiškos sąsajos

Pirmiausia, pasirinktų genų raiškos lygis buvo susietas su ankstesnio tyrimo, kurio metu miRNR raiška dalyje tos pačios imties mėginių ($N = 54$) buvo profiliuota kPGR 384-formato gardelėmis, duomenimis (Stuopelyte et al., 2016). Koreliacijų tarp analizuotų HM genų ir jų regulaicinių miRNR raiškos nebuvo nustatyta (**3.2 lentelė**).

3.2 lentelė. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos sąsajos su miRNR raiškos lygiais.

Genas	miR-7-5p		miR-9-5p		miR-149-5p		miR-186-5p		miR-425-5p		miR-618	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>KDM5A</i>	–	–	–0,21	0,1532	0,17	0,2455	–	–	–0,13	0,3873	0	0,9815
<i>KDM5D</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–0,16	0,2852	–0,06	0,6979
<i>KDM7B</i>	–	–	0,19	0,2128	–	–	0,04	0,8064	–	–	–0,11	0,4965
<i>KMT1E</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>KMT5A</i>	–	–	–	–	–	–	–0,04	0,8064	–	–	–	–

r – Spearman koreliacijos koeficientas.

Siekiant patvirtinti rezultatus, 6–ių pasirinktų miRNR raiška buvo iširta visoje PV imtyje ir palyginta su HM raiškos duomenimis. MiR-7-5p lygis neigiamai koreliavo su *KMT5A* geno raiška ($p = 0,0435$). Patikimų koreliacijų tarp kitų miRNR ir histonų metilinimo reguliatorių nebuvo (**3.3 lentelė**).

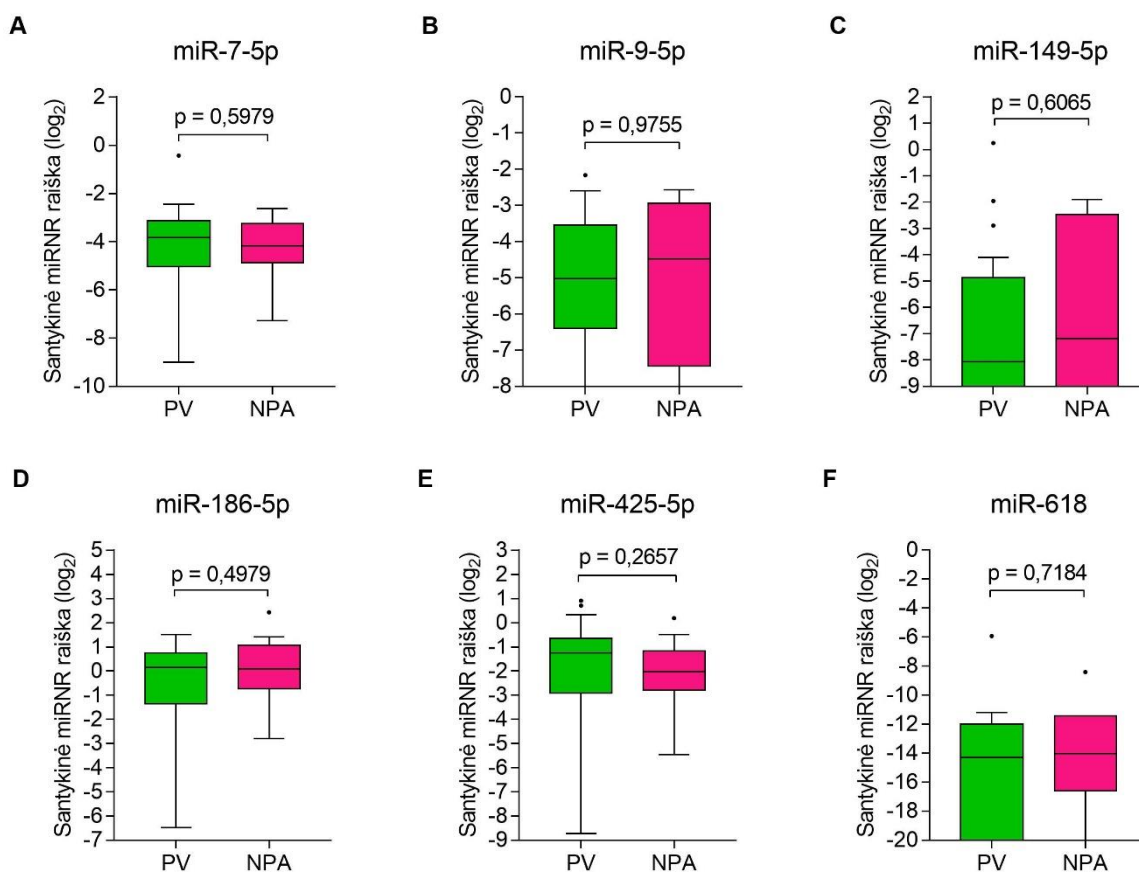
3.3 lentelė. Tirtų histonų metilinimo reguliatorių genų raiškos sąsajos su miRNR raiškos lygiais.

Genas	miR-7-5p		miR-9-5p		miR-149-5p		miR-186-5p		miR-425-5p		miR-618	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
KDM5A	-0,18	0,2237	0,04	0,8014	-0,07	0,6833	-	-	-0,23	0,0969	0,05	0,8014
KDM5D	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,14	0,3395	-0,26	0,2227
KDM7B	-	-	-0,19	0,1871	-	-	-0,13	0,3700	-	-	0,13	0,5583
KMT1E	-0,18	0,2133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KMT5A	-0,29	0,0435	-	-	-	-	-0,08	0,5909	-	-	-	-

r – Spearman koreliacijos koeficientas.

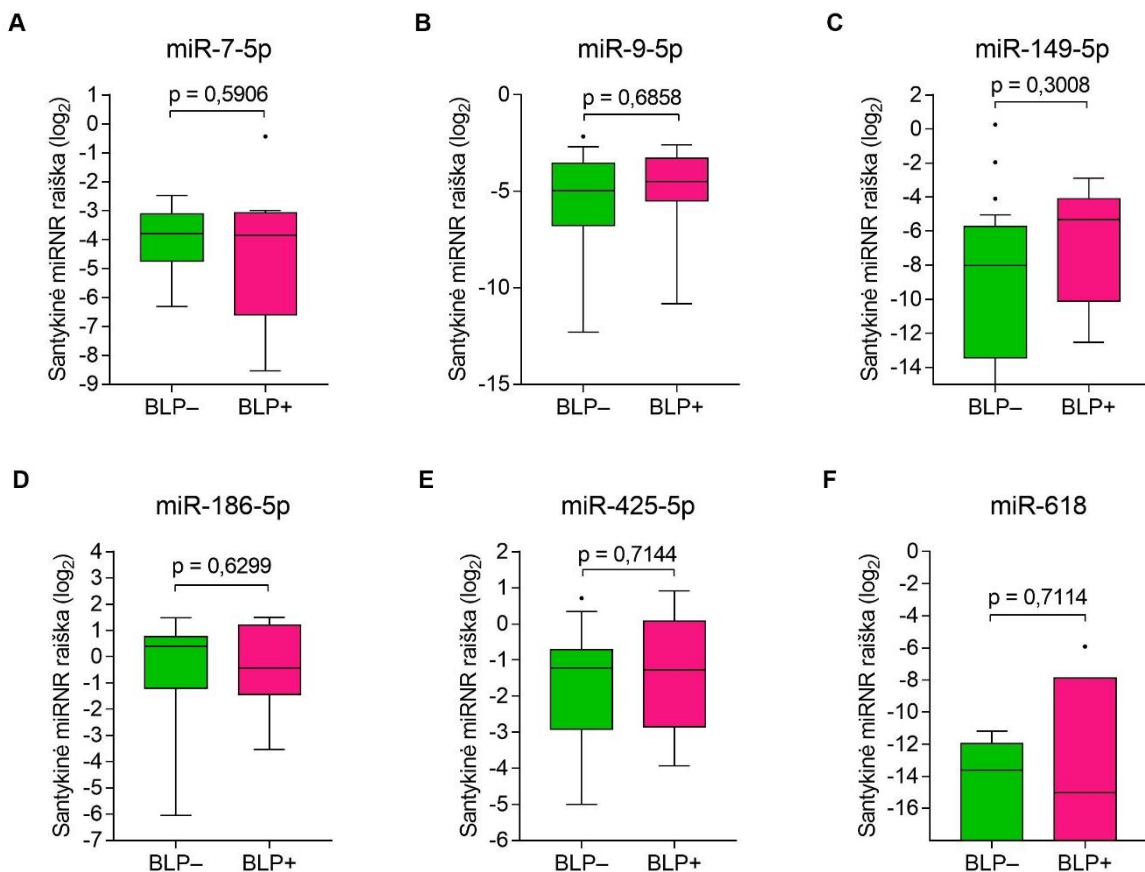
3.2.3 MiRNR raiškos palyginimas tarp skirtingų prostatos audinių tipų ir BLP statuso

Įvertinus miR-7-5p, miR-9-5p, miR-186-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p ir miR-618 kiekius pacientų prostatos audiniuose reikšmingi miRNR raiškos lygio skirtumai nenustatyti nei vienos miRNR atveju (visi $p > 0,0500$; **3.12 pav.**).



3.12 pav. Tirtų miRNR kiekių palyginimas prostatos navikuose (PV) ir nevėžiniame prostatos audinyje (NPA). A–F atitinkamai miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p ir miR-618. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais.

Palyginus miRNR kiekio skirtumus tarp pacientų, kuriems pasireiškė ir nepasireiškė BLP, reikšmingų raiškos lygio skirtumų taip pat nebuvo nustatyta nei vienos miRNR atveju (visi $p > 0,0500$; **3.13 pav.**).



3.13 pav. Tirtų miRNR lygio skirtumai, kai pacientui nepasireiškė ir pasireiškė biocheminė ligos progresija (BLP-/+). A–F atitinkamai miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p ir miR-618. Dėžutė iliustruoja 25–75 percentilius, dėžutės vidurinė linija – medianą, „ūšai“ – Tukey intervalas, nukrypę duomenys vaizduojami taškais.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

PV išlieka labiausiai paplitusi vėžio rūšis tarp vyrų visame pasaulyje. Dėl savo heterogeniškumo PV kelia daug iššūkių vertinant ligos agresyvumą. Gebėjimas atskirti lėtai progresuojančius lokalius navikus nuo ypač agresyvių ir sistemiškai išplitusių PV atvejų yra vienas iš svarbiausių faktorių tinkamiausio gydymo sprendimo priėmimui. Dauguma ankstyvu PV sergančių vyrų neturi jokių simptomų, todėl padidėjęs PSA kiekis kraujyje yra dažniausias pradinis indikacinis rodiklis. Tačiau dėl dažno PSA testo naudojimo kasdieninėje praktikoje dažniau nustatomi gyvybei pavojaus nekeliantys PV atvejai, kuriems gali būti skiriamas per stiprus gydymas. Molekulinių PV ypatybių nustatymas gali padėti įveikti šį klinikinį iššūkį skiriant tinkamesnį gydymą agresyviai ligai. Dėl šios priežasties ieškoma molekulinų žymenų tarp epigenetinių mechanizmų, tokių kaip histonų metilavimo modifikacijos ir šias modifikacijas reguliuojančių genų raiškos pokyčiai. Šio tyrimo metu įvertinti septynių HM genų (*KDM3A*, *KDM4B*, *KDM5A*, *KDM5D*, *KDM7B*, *KMT1E* ir *KMT5A*) ir šešių šiuos genus galimai reguliuojančių miRNR (miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-618) raiškos pokyčiai PV sergančių vyrų prostatos audinio mėginiuose, kurie toliau buvo susieti su ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais ir BLP.

Tang et al. (2020a) nustatė, kad *KDM3A* geno ir baltymo raiška buvo padidėjusi PV audinyje. *KDM3A* raiška taip pat buvo susijusi su aukštesniu priešoperaciniu PSA lygiu, pažengusia PV stadija ir limfmazgių metastazėmis. Šio tyrimo metu sąsajos su ligonių klinikiniais–patologiniais rodikliais nebuvo nustatytos. *KDM3A* raiškos padidėjimo mechanizmas dar nėra tiksliai nustatytas, tačiau tyrimai rodo, kad *KDM3A* raiškos padidėjimas skatina ląstelių proliferaciją, migraciją ir invaziją per EMT ar nuo jo nepriklausomą mechanizmą PV ląstelėse. *Knockdown* tyrimai parodė, kad geno inaktyvinimas sumažina PV ląstelių išgyvenamumą ir slopina ląstelių migraciją bei invaziją *in vitro* (Tang et al., 2020a). Suikki et al. (2010) aptiko sumažėjusį *KDM3A* geno raiškos lygį GPH mėginiuose palyginus su KAPV audiniu. KAPV audinyje geno raiškos lygis taip pat buvo mažesnis nei negydytame PV audinyje. Šio eksperimento metu taip pat buvo aptiktas sumažėjęs *KDM3A* raiškos lygis GPH audinyje. Pasitelkus bioinformatinę analizę Björkman et al. (2012) palygino *KDM3A* raišką tarp vėžinio ir nevėžinio audinio ir nustatė, kad *KDM3A* geno raiška yra padidėjusi PV atveju. Šio darbo metu geno raiškos skirtumai tarp PV ir NPA nebuvo nustatyti, manytina, dėl daugiausia ankstyvos stadijos PV atvejų įtraukimo į imtį. Be to, šio geno raiška nebuvo susijusi su laiku iki BLP visoje mėginių imtyje, tačiau pT2 mėginių grupėje *KDM3A* pasižymėjo prognostine verte. Prognostiniai *KDM3A* tyrimai PV audiniuose dar nėra atlikti, tačiau kelios literatūroje aprašytos Cox regresijos analizės kito tipo vėžinėse ligose parodė, kad dėl nustatytos išaugusios raiškos vėžiniuose audiniuose *KDM3A* yra galimas nepriklausomas prognostinis žymuo skrandžio (Yang et al., 2015), gimdos kaklelio (Liu et al., 2016), gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio (Liu et al.,

2019a) atvejais. Taip pat visuose šiuose tyrimuose buvo nustatyta, kad aukšta geno raiška susijusi su trumpesniu bendru pacientų išgyvenamumu. Geno raiškos tyrimai kepenų ląstelių karcinomoje parodė, kad liga progresuoja greičiau tiems pacientams, kurių audiniuose nustatyta padidėjusi *KDM3A* raiška, o *Cox* analizė patvirtino, kad šis genas yra nepriklausomas prognostinis žymuo (Yamada et al., 2012). Taigi, galima daryti prielaidą, kad *KDM3A* prognostinis potencialas išryškėtų PV progresavimo eigoje, tačiau tam pagrįsti reikalingi papildomi tyrimai. Nepaisant to, *KDM3A* funkcija tiriama įvairių lokalizacijų vėžinėse ligose, o jo gebėjimas skatinti vėžinių ląstelių proliferaciją ir sąsajos su AR signalo perdavimu rodo, kad šis genas yra galimas terapinis taikynys pažengusiam PV gydyti.

Remiantis kitų autorių duomenimis, *KDM4B* mRNR ir baltymo raiškos lygis PV audinyje yra didesnis palyginus su NPA. Aukštesnė baltymo raiška susijusi su aukštesniu priešoperaciniu PSA lygiu, klinicine T2 stadija ir *Gleason* balu. Išgyvenamumo analizė parodė, kad didesnė *KDM4B* raiška koreliuoja su trumpesniu bendru pacientų išgyvenimu (Tang et al., 2020b). Šio tyrimo metu geno raiška nerodė sąsajų su PV sergančių vyrų klinikiniais–patologiniais rodikliais. Nors nustatyta sumažėjusi raiška pacientų, kuriems pasireiškė BLP, mėginiuose, tačiau išgyvenamumo analizė sąsajų nepatvirtino. Tang et al. (2020b) tyrimo metu nustatyta padidėjusi *KDM4B* raiška enzalutamidui atspariose PV ląstelėse. *KDM4B* nutildymas sutrikdė AR reguliuojamas genų programas, o ląstelės atgavo jautrumą gydymui enzalutamidu tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Kadangi nuo *KDM4B* raiškos priklauso AR reguliuojamo c-Myc raiška, autoriai teigia, kad šio geno raiškos slopinimas gali būti vertinga strategija įveikti atsparumą naujos kartos antiandrogenų terapijai KAPV sergančiuose pacientuose. Chu et al. (2014) bioinformatinė analizė parodė, kad 8 iš 14 duomenų rinkinių nustatyta padidėjusi *KDM4B* geno raiška PV audinyje palyginus su sveiku audiniu. Dviejuose iš šių analizių buvo lyginama geno raiška ir metastazavusiame PV audinyje, kuriame *KDM4B* geno raiška buvo smarkiai išaugusi palyginus su lokalaus naviko audiniu. Liu et al. (2022) atlikta duomenų bazių analizė taip pat parodė *KDM4B* geno raiškos padidėjimą metastazavusiuose PV navikuose palyginus su lokaliu PV. Sha et al. (2020) nustatė, kad *KDM4B* veikia kaip onkogenas, kurio raiška padidėjusi KAPV audiniuose ir ląstelių linijose. *KDM4B* skatina PV ląstelių proliferaciją ir autofagiją aktyvuodamas kanoninį Wnt/ β -katenino signalo kelią. *KDM4B* nutildymas nuslopino KAPV ląstelių linijų proliferaciją. Taip pat nustatyta, kad aukštesnis *KDM4B* raiškos lygis buvo susijęs su didesniu *Gleason* balu, nors reikšmingos koreliacijos tarp *KDM4B* raiškos ir amžiaus, PSA lygio, limfmazgių pažeidimo ar naviko stadijos nebuvo nustatyta. Vieira et al. (2014) tyrė kelių KDM ir KMT raišką PV ir NPA, kad nustatytų epiregulatorius, kurių raiškos pokyčiai gali turėti didžiausią įtaką PV progresavimui. Nors atrankos tyrimai parodė, kad *KDM4B* geno raiška yra padidėjusi PV audinyje, tačiau AT-kPGR analizė didesnėje mėginių imtyje parodė, kad šio geno raiška yra

sumažėjusi PV audinyje. Šio tyrimo metu geno raiškos skirtumai tarp PV ir NPA nebuvo nustatyti, todėl galima manyti, kad šio geno onkogeninės funkcijos ir raiškos pokyčiai išryškėtų PV progresavimo eigoje. Literatūroje dar nėra pakankamai informacijos apie šio geno raiškos lygį GPH audinyje, tačiau šiame darbe aprašyto tyrimo metu nustatytas *KDM4B* raiškos lygio sumažėjimas GPH audinyje. Remiantis šio darbo metu atlikta *Cox* analize, *KDM4B* yra galimas PV prognostinis biožymuo, tačiau dėl prognostinių tyrimų trūkumo PV audiniuose sunku tiksliai vertinti gautus rezultatus, todėl galima tik palyginti *KDM4B* prognostinę vertę kitos lokalizacijos vėžinėse ligose. Li et al. (2020) aptiko padidėjusį *KDM4B* baltymo raiškos lygį gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio audiniuose palyginus su gretimais sveikais gleivinės audiniais. Pastebėta reikšminga koreliacija tarp naviko *KDM4B* raiškos lygio ir pT stadijos, aukštesnės klinikinės stadijos. *Cox* regresijos analizė parodė, kad *KDM4B* yra nepriklausomas bendro išgyvenamumo prognostinis kintamasis sergant gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio forma. Aukšta *KDM4B* raiška koreliavo su trumpesniu išgyvenimu (Li et al., 2020).

KDM5A raiška yra menkai tyrinėta PV kontekste, tačiau Du et al. (2020) nustatė, kad *KDM5A* mRNR ir baltymų raiškos lygiai vėžio audiniuose buvo didesni, palyginti su gretimais normaliais audiniais, o padidėjusi *KDM5A* raiška skatino PV ląstelių proliferaciją, migraciją ir invaziją, bet slopino ląstelių apoptozę. Remiantis *Kaplan-Meier* analize mokslininkai parodė, kad padidėjusi *KDM5A* raiška lėmė trumpesnę bendrą išgyvenamumą ir laiką iki ligos atsinaujinimo. Vieira et al. (2014) taip pat aptiko padidėjusį *KDM5A* raiškos lygį PV audinyje palyginus su sveiku prostatos audiniu. Mi et al. (2022) nustatė aukštesnį *KDM5A* mRNR lygį PV audiniuose palyginus su NPA. Panaši tendencija nustatyta ir *KDM5A* baltymo atveju taikant imunohistocheminę analizę. *Knockdown* eksperimentai parodė, kad *KDM5A* išjungimas slopino PV ląstelių proliferaciją, kolonijų susidarymą, migraciją ir invaziškumą bei sumažino endotelio ląstelių angiogenezės savybes (Mi et al., 2022). Remiantis išgyvenamumo analize nustatyta, kad didesnė *KDM5A* raiška yra susijusi su trumpesniu 5 metų išgyvenamumu, o koreliacinė analizė parodė, kad išaugusi *KDM5A* raiška susijusi su kaulų ir limfmazgių metastazių atsiradimu, padidėjusiu *Gleason* balu ir pažengusia klinicine stadija (Mi et al., 2022). Šio tyrimo metu nustatytas geno raiškos sumažėjimas PV audinyje. Kadangi tyrimai rodo, kad *KDM5A* taip pat yra susijęs su ląstelių invaziškumu ir migracija, galima manyti, kad šio geno raiška turėtų išaugti PV progresavimo metu. Viena iš prielaidų, kad gautą geno raiškos skirtumą galėjo lemti kiti epigenetiniai faktoriai, pvz., miRNR, veikiantys ankstyvoje PV stadijoje. Šio eksperimento metu nustatyta, kad sumažėjusi geno raiška lemia trumpesnę išgyvenamumą be ligos atsinaujinimo. Įdomu tai, kad mažėjanti *KDM5A* geno raiška pasižymi prognostinėmis savybėmis ne tik bendroje mėginių imtyje, bet ir ankstyvos stadijos (pT2) ir santykinai geros diferenciacijos (ISUP 2) mėginių grupėse ir audiniuose, kuriuose nustatytas *TMPRSS2-ERG*. Tai

rodo, kad *KDM5A* funkcija gali būti svarbi sveikam prostatos audiniui, o mažas raiškos lygis svarbus ankstyvose PV stadijose. Kol kas panašūs rezultatai dar nėra aprašyti kitų autorių darbuose, todėl šios hipotezės patvirtinimui bei tiksliam *KDM5A* diagnostinio ir prognostinio potencialo įvertinimui reikalingi išsamesni tyrimai ateityje.

Pastaraisiais metais *KDM5D* yra plačiai tiriamas PV audinyje. Schäfer et al. (2021) tyrė *KDM5D* raišką žmogaus audiniuose, gautuose iš pacientų, kuriems lokalizuotoje ligos stadijoje buvo atlikta radikali prostatektomija ir kurie ligai progresavus iki metastazavusio KAPV buvo gydyti docetakseliu. Tyrimo metu nustatyta, kad *KDM5D* raiška buvo didesnė tų pacientų, kuriems progresavusios ligos chemoterapinis gydymas buvo veiksmingas, naviko ląstelėse, palyginti su tais pacientais, kuriems chemoterapija nebuvo veiksminga. Didesnė *KDM5D* raiška taip pat buvo nustatyta pacientų, kuriems chemoterapija buvo veiksminga, nevėžiniuose audiniuose. Remiantis šiais rezultatais mokslininkai teigė, kad dėl pakitusios *KDM5D* raiškos sutrinka AR transkripcijos aktyvumas branduolyje, todėl PV ląstelės tampa atsparios docetakseliui (Schäfer et al., 2021). Tai rodo, kad *KDM5D* yra perspektyvus žymuo, numatantis atsaką į docetakselio chemoterapiją jau lokalizuotos ligos metu. Li et al. (2016a) palygino *KDM5D* lygius normaliuose audiniuose, pirminiuose prostatos navikuose ir metastazavusiuose prostatos navikuose. *KDM5D* baltymo kiekis metastazavusiuose prostatos navikuose buvo drastiškai sumažėjęs, o pirminiuose prostatos navikuose kiekis buvo sumažėjęs nežymiai. Naudojant viešai prieinamas duomenų bazes mokslininkai nustatė, kad *KDM5D* mRNR lygis metastazavusiame PV buvo žymiai mažesnis nei pirminiuose prostatos navikuose ir normaliuose audiniuose. Remiantis baltymų duomenimis *Kaplan-Meier* išgyvenamumo analizė atskleidė, kad mažas *KDM5D* baltymų kiekis buvo reikšmingai susijęs su prastu bendru PV ligonių išgyvenamumu. O bioinformatinė analizė parodė, kad žemas *KDM5D* mRNR lygis taip pat reiškė prastą bendrą PV sergančių pacientų išgyvenamumą dviejose skirtingose PV sergančių pacientų kohortose (Li et al., 2016a). Komura et al. (2016) taip pat atliko bioinformatinę analizę ir parodė, kad *KDM5D* geno raiška yra reikšmingai sumažėjusi KAPV sergančių pacientų audiniuose ir yra susijusi su trumpesniu pacientų išgyvenamumu lyginant su pacientais, kuriems nustatytas lokalus PV. Tyrimo metu taip pat nustatyta, kad *KDM5D* yra vienas iš AR signalo valdytojų ir yra susijęs su jautrumo docetakseliui pokyčiais. Kito tyrimo metu Komura et al. (2018) atliko dviejų genų raiškos profilių duomenų rinkinių iš radiklios prostatektomijos mėginių analizę. Nustatyta, kad sumažėjusi *KDM5D* raiška reikšmingai koreliavo su prastais klinikiniais rezultatais abiejuose duomenų rinkiniuose ir buvo susijusi su didesne mirtino PV tikimybe po prostatektomijos. *KDM5D* mRNR raiškos lygis taip pat buvo žymiai mažesnis pacientams, anksčiau gydytiems androgenų signalinio kelio inhibitoriais (abirateronu ar enzalutamidu), nei tiems, kurie anksčiau neturėjo šio gydymo. Tai rodo, kad mažėjanti *KDM5D* raiška palapsniui prarandama progresuojant į KAPV ir

prisideda prie atsparumo abirateronui ir enzalutamidui išsivystymo. Šiame darbe aprašyto tyrimo metu nebuvo nustatyti geno raiškos pokyčiai tarp skirtingos patologijos mėginių, o geno raiška nerodė jokių sąsajų su BLP. Tikėtina, kad šio geno raiškos pokyčiai atsirastų vėlyvesnės stadijos mėginiuose, priešingai nei ankstyvos stadijos mėginiuose, kurie buvo tiriami šio eksperimento metu. Literatūroje pateikta informacija rodo, kad *KDM5D* yra naviką slopinantis genas, kuris sąveikauja su AR ir slopina jo aktyvumą. *KDM5D* raiškos sumažėjimą galima susieti su geno viena genome. *KDM5D* randamas Y chromosomoje, kuri, PV vystymosi metu ir besikaupiant mutacijoms genome, gali būti visiškai arba dalinai prarandama, o kartu su ja iš šis genas (Patel et al., 2018). Dėl *KDM5D* praradimo padidėja H3K4me3 lygis genų, susijusių su metastazių išsivystymu, promotoriaus regionuose. Šios išvados rodo, kad *KDM5D* yra svarbus veiksnys PV vystymosi procese, kurio veikimo mechanizmą svarbu iširti.

Remiantis literatūros duomenimis, *KDM7B* yra būtinas neuroendokrininio PV išsivystymui. Liu et al. (2021) nustatė, kad *KDM7B* raiška yra išaugusi neuroendokrininio PV audiniuose. Funkciniai tyrimai parodė, kad *KDM7B* padidina *FOXA2* raišką, demetilindamas ir pašalindamas represines histono žymes *FOXA2* geno promotoriaus regione. *KDM7B* raiškos svarbą neuroendokrininio PV išsivystymui pagrindė ir tai, kad dėl *KDM7B* geno išmušimo pelėms neišsivystė neuroendokrininis PV. Liu et al. (2021) atlikta bioinformatinė analizė taip pat parodė, kad ~30 % neuroendokrininio PV kohortos pacientų turi *KDM7B* amplifikaciją, o tai molekulinio būdu paaiškina padidėjusį *KDM7B* raiškos lygį neuroendokrininio PV atveju. Björkman et al. (2012) tai pat ištyrė *KDM7B* geno raiškos sąsajas su PV. Bioinformatinė analizė parodė, kad *KDM7B* buvo žymiai išaugusi PV audiniuose, o ypač metastazavusiuose PV audiniuose, palyginus su gerybiniais audiniais. Remiantis baltymų raiškos analize nustatyta, kad padidėjusi *KDM7B* raiška koreliavo su aukštu *Gleason* balu ir buvo susijusi su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Ma et al. (2015) taip pat nustatė, kad *KDM7B* mRNR ir baltymo raiška buvo išaugusi PV audiniuose. Mokslininkai taip pat nustatė, kad *KDM7B* išmušimas susilpnina PV ląstelių augimą ir ląstelių transformaciją, taip pat sukelia apoptozę PV ląstelėse, padidindamas apoptotinių baltymų ir sumažindamas antiapoptotinių baltymų raišką. Tong et al. (2016) atlikto tyrimo metu pademonstravo, kad *KDM7B* baltymo raiška yra padidėjusi PV audiniuose, o ypač vėlyvos stadijos PV audiniuose palyginus su GPH. Tyrimai parodė, kad *KDM7B* raišką įvairiose PV ląstelių linijose sukelia hipoksija. HIF2 α arba HIF1 α išmušimas beveik visiškai panaikino hipoksijos sukeltą *KDM7B* raišką. Be to, *KDM7B* lygis GPH, kastracijai jautriuose ir KAPV mėginiuose buvo susijęs su diferenciacijos laipsniu, didžiausias *KDM7B* lygis buvo pastebėtas sergant KAPV. *Kaplan-Meyer* analizė parodė, kad 5 metų išgyvenamumas ir bendras išgyvenamumas buvo žymiai trumpesni pacientams, kurių audiniuose nustatyta aukšta *KDM7B* raiška. Taip pat nustatyta, kad *KDM7B* veikia kaip AR koaktyvatorius

sustiprinantis AR transkripcijos aktyvumą ir PV progresavimą. Šio tyrimo metu *KDM7B* nerodė reikšmingų sąsajų nei su BLP, nei tarp skirtingos patologijos prostatos mėginių. Todėl, remiantis literatūros šaltiniais, galima teigti, kad šio geno raiškos skirtumai atsirastų ligai progresuojant, o šio tyrimo metu per maža mėginių patloginė stadija lėmė geno raiškos skirtumų nebuvimą.

Dar vienas genas retai tiriamas PV kontekste yra *KMT1E*. Sun et al. (2014) tyrimo metu nustatė, kad *KMT1E* raiška padidėjusi 19 iš 25 PV audinių, palyginti su gretimais normaliais audiniais. Vidutiniškai *KMT1E* raiška buvo 3,3 karto didesnė nei gretimuose normaliuose audiniuose. *KMT1E* raiška taip pat buvo žymiai didesnė nuo androgenų priklausomo ir nepriklausomo PV audiniuose palyginus su GPH. *KMT1E* išjungimas slopino ląstelių augimą, invaziją ir migraciją, sumažino kolonijų susidarymą ir sukėlė ląstelės ciklo sustabdymą (Sun et al., 2014). Šiame darbe aprašyto tyrimo metu gauti rezultatai rodo, kad šio geno raiška PV yra sumažėjusi lyginant su NPA ir GPH. Mažesnė geno raiška taip pat buvo susijusi su trumpesniu išgyvenamumu iki BLP ir ISUP 3 grupe. Svarbu pabrėžti tai, kad *KMT1E* buvo nustatytas kaip prognostinis biožymuo ankstyvesnių stadijų PV audinio mėginiuose. Taigi, tai rodo, kad šis genas yra svarbus veiksnys ankstyvo PV vystymosi metu, tačiau dėl informacijos trūkumo būtina atlikti tolimesnius *KMT1E* tyrimus PV geno funkcijos nustatymui.

KMT5A kol kas nėra tyrinėtas žmogaus audiniuose PV kontekste, todėl šio tyrimo metu gauti rezultatai palyginti su rezultatais, kurie buvo gauti tiriant kitų lokalizacijų navikus. Piao et al. (2020) atliko tyrimą su nesmulkiaūstelinio plaučių vėžio audiniais ir nustatė, kad *KMT5A* raiška susijusi su blogesne vėžio prognoze. Mokslininkai parodė, kad *KMT5A* mRNR ir baltymo raiška buvo išaugusi vėžiniuose audiniuose. O aukšta *KMT5A* raiška buvo susijusi su pT stadija, limfmazgių pažeidimu, pažengusia klinicine stadija. *Kaplan-Meyer* analizė parodė, kad *KMT5A* raiška yra susijusi su trumpesniu bendru pacientų išgyvenamumu. *Cox* regresinė analizė parodė, kad naviko dydis, pT stadija ir *KMT5A* raiška yra reikšmingi bendro išgyvenamumo prognostiniai veiksniai sergant nesmulkiaūstelinio plaučių vėžiu. Kukita et al. (2022) aptiko išaugusią *KMT5A* raiškos lygį endometriumo vėžio audiniuose palyginus su normaliais endometriumo audiniais. Mokslininkai taip pat nustatė, kad *KMT5A* išjungimas slopina ląstelių proliferaciją ir sukelia apoptozę endometriumo vėžio ląstelėse. *KMT5A* raiškos lygis buvo žymiai padidėjęs inkstų skaidriųjų ląstelių karcinomos audiniuose palyginus su normaliais gretimais audiniais, o aukšta *KMT5A* geno raiška buvo susijusi su trumpesnių bendru pacientų išgyvenamumu (Lin et al., 2019). Šio tyrimo metu nustatyta išaugusi *KMT5A* raiška GPH audinyje, tačiau ji nesiskyrė tarp PV ir NPA. Literatūros šaltiniai teigia, kad išaugusi geno raiška susijusi su blogesne vėžinėmis ligomis sergančių pacientų prognoze, tačiau šio tyrimo rezultatai rodo, kad mažesnė geno raiška lemia greitesnę ligos atsinaujinimą. Toks geno raiškos

skirtumas gali atsirasti dėl skirtingo audinio tipo, todėl reikalingi papildomi tyrimai *KMT5A* svarbai PV vystymosi metu įvertinti.

Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad *KDM5D* geno raiška yra padidėjusi PV mėginiuose, kuriuose buvo aptiktas *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto buvimas. Kol kas literatūroje nėra tyrimų, kurie parodytų sąsajas tarp šių veiksnių susidarymo ar sąveikos. Tikėtina, kad *KDM5D* aktyvumas ir *TMPRSS2-ERG* susidarymas nėra tarpusavyje susiję procesai. Kadangi literatūroje pateikti duomenys rodo, kad *KDM5D* genas, priešingai nei *ERG*, yra naviką slopinantis genas. Nuo hormonų priklausomo PV audiniuose *KDM5D* tiesiogiai sąveikauja su AR, kad susilpnintų AR tikslių genų transkripcijos aktyvumą. *KDM5D* raiškos praradimas, progresuojant iki KAPV, gali sukelti atsparumą gydymui dėl AR signalų reguliavimo sutrikimo (Komura et al., 2016). *TMPRSS2-ERG* transkripto funkcijai svarbus AR poveikis, kurio raiškos lygis nebūtų didelis aplinkoje esant *KDM5D*. Kitas galimas paaiškinimas yra susijęs su sulietinio transkripto susidarymu. Epigenetiniai reguliatoriai yra svarbūs alternatyviam splaisingui (Maor et al., 2015). *KDM5D* demetilazė demetilindama tam tikras vietas genome gali lemti, prie kurios splaisingo vietos gebės prisijungti splaisingo baltymai ir atlikti transkripto kirpimą. Šiuo atveju padėtų susidaryti *TMPRSS2-ERG* sulietiniam transkriptui. Tačiau nustatyti tiksliai šio darbo metu aptiktas sąsajas tarp *TMPRSS2-ERG* ir *KDM5D* reikalingi papildomi tyrimai.

Remiantis duomenų bazių informacija buvo nustatytos galimai šiame tyrime analizuotus genus reguliuojančios miRNR. Įvertinus tiriamųjų genų ir miRNR tarpusavio sąsajas, tik *KMT5A* ir miR-7-5p atveju nustatyta neigiama koreliacija. Ši sąsaja dar nėra aprašyta PV audinyje, tačiau remiantis *Reporter assay* ir *Western blot* metodais parodyta, kad *KMT5A* yra tikslinis miR-7 taikinyš krūties vėžio audinyje. Mokslininkai taip pat nustatė, kad miR-7 skatina *KMT5A* mRNA skaidymą ir slopina H4K20 monometilinimą (Yu et al., 2013). Tikėtina, kad ši sąveika gali pasireikšti ir PV atveju, tačiau dėl duomenų trūkumo šios hipotezės pagrindimui reikalingi papildomi tyrimai.

Nors šio tyrimo metu miRNR raiškos skirtumai tarp skirtingos patologijos prostatos audinių nenustatyti, tačiau literatūroje galima rasti informacijos ne tik apie miRNR raiškos skirtumus tarp skirtingų prostatos audinių, bet ir galimas miRNR raiškos sąsajas su atsparumo chemoterapiniams vaistams išsivystymu. Remiantis literatūros šaltiniais, miR-7 jau yra tirta PV audiniuose ir apibūdinama kaip naviką slopinanti miRNR (Morales-Martínez & Vega, 2022). Kito tyrimo metu nustatyta, kad miR-7-5p raiška buvo sumažėjusi docetakseliui jautraus PV audiniuose, palyginus su gretimais normaliais audiniais. Žymiai mažesnė miR-7-5p raiška nustatyta docetakseliui atsparaus PV audiniuose palyginus su docetakseliui jautriais PV audiniais (Gao et al., 2020). MiR-9 veikia kaip onkogeninė miRNR, kuri skatina naviko progresavimą ir metastazių atsiradimą PV audinyje. Šios miRNR raiška taip pat buvo išaugusi 3 iš 4 lazerinės mikrodisekcijos metodu gautuose PV

mėginiuose. Taigi, miR-9 siejama su vėžio ląstelių proliferacijos, invazijos ir migracijos reguliavimu. Tačiau tikslus miR-9 reguliavimo vaidmuo ir pagrindiniai mechanizmai PV audinyje nėra pilnai ištirti (Seashols-Williams et al., 2016). Ma et al. (2021) nustatė, kad miR-149-5p raiška yra sumažėjusi PV audiniuose ir ląstelių linijose. Mokslininkai taip pat parodė, kad padidėjusi šios miRNR raiška slopino PV ląstelių gyvybingumą, proliferaciją ir migraciją. Jones et al. (2018) nustatė, kad miR-186-5p atlieka onkogeninį vaidmenį PV, kadangi miR-186-5p raiška buvo padidėjusi PV sergančių pacientų serume ir metastatinio PV ląstelių linijose, palyginti su serumu iš PV nesergančių asmenų arba normaliomis prostatos epitelio ląstelėmis. Ląstelių linijų tyrimas parodė, kad miR-186-5p slopinimas sumažino PV ląstelių proliferaciją ir invaziją. Zhang et al. (2019) aptiko išaugusį miR-425-5p raiškos lygį PV audiniuose ir ląstelių linijose. Padidėjusi miR-425-5p raiška skatino PV ląstelių proliferaciją, kolonijų susidarymą, migraciją ir invaziją *in vitro*. Tačiau Liu et al. (2019b) tyrimas parodė priešingus rezultatus, kadangi šio tyrimo metu buvo aptiktas miRNR raiškos sumažėjimas PV audinyje palyginus su sveiku audiniu. Song et al (2017) nustatė, kad miR-618 raiška sumažėjusi sergant metastazavusiu KAPV. Sumažėjusi miR-618 raiška buvo susijusi su trumpesniu bendru pacientų išgyvenamumu. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad padidėjusi miR-618 raiška slopino PV ląstelių migraciją ir invaziją ir sukėlė MET (mezenchimos – epitelio tranzicija). Priešingai, miR-618 išmušimas paskatino migraciją ir invaziją bei paskatino EMT. Taip pat nustatyta, kad miR-618 nuo androgenų priklausomo PV audiniuose raiškos lygis buvo didesnis palyginus su nuo androgenų nepriklausomais PV audiniais. Tai rodo, kad miR-618 gali slopinti PV progresavimą.

Apibendrinant, literatūros šaltiniuose pateikta informacija rodo, kad su histonų metilinimo reguliavimu susijusių genų raiškos pokyčiai dažniausiai atsiranda vėlyvesnėse PV stadijose ir yra susiję su metastazių atsiradimu ar KAPV išsivystymu. Tačiau šio tyrimo metu ypač išsiskyrė *KDM5A* ir *KMT1E* genai, kurie ne tik pasižymėjo raiškos pokyčiais tarp skirtingos patologijos mėginių, BLP statuso, laiko iki ligos atsinaujinimo, tačiau išsiskyrė kaip galimi prognostiniai ir diagnostiniai biožymenys ankstyvai PV stadijai. Todėl vertėtų toliau tirti šiuos genus PV audinyje. Bioinformatinės analizės metu nustatytos HM genų sąsajos su juos potencialiai reguliuojančiomis miRNR šio tyrimo metu buvo patvirtintos tik *KMT5A* ir miR-7-5p atveju. Tiksliesniems miRNR–mRNR reguliaciniams mechanizmams ir jų vaidmeniui PV vystymesi nustatyti būtina atlikti funkcinius tyrimus.

IŠVADOS

1. *KDM5A* ir *KMT1E* raiška PV buvo mažesnė nei NPA (abu $p < 0,0001$). *KDM3A* ir *KDM4B* raiška buvo didesnė PV audinyje palyginus su GPH (atitinkamai $p = 0,0021$ ir $p < 0,0001$), o *KMT5A* ir *KMT1E* atveju skirtumas buvo priešingas (atitinkamai $p < 0,0001$ ir $p = 0,0178$). *KDM3A*, *KDM4B* ir *KMT5A* raiškos lygis skyrėsi tarp NPA ir GPH (atitinkamai $p = 0,0063$, $p < 0,0001$ ir $p < 0,0001$).
2. *KDM5A* ir *KDM5D* raiška skyrėsi tarp skirtingos pT stadijos navikų (atitinkamai $p = 0,0338$ ir $p = 0,0342$), o *KDM5A*, *KDM5D* ir *KMT1E* – tarp skirtingos ISUP grupės mėginių (atitinkamai $p = 0,0415$, $p = 0,0152$ ir $p = 0,0307$). *KDM5D* raiška taip pat buvo susijusi su *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto buvimu ($p = 0,0098$). Tirtų genų raiškos sąsajų su PSA, amžiumi ir prostatos mase nustatyta (visi $p > 0,0500$).
3. *KDM5A*, *KMT1E* ir *KMT5A* raiška buvo susijusi su BLP pasireiškimu (atitinkamai $p < 0,0001$, $p = 0,0003$ ir $p = 0,0172$) ir mažesne PV ligonių išgyvenamumu be BLP trukme (atitinkamai $p = 0,0055$, $p = 0,0045$ ir $p = 0,0452$). Vienmačiuose ir daugiamačiuose *Cox* modeliuose *KDM5A* ir *KMT1E* turėjo nepriklausomą prognostinę vertę tiek analizuojant bendroje PV imtyje, tiek ir atskirai pT2 stadijos, ISUP 2 grupės ir / ar *TMPRSS2-ERG* turinčių navikų subgrupėse (visi $p < 0,0500$). Šių genų, kaip prognostinių žymenų, jautrumas ir specifiškumas bendroje imtyje atitinkamai siekė 65,79% ir 70,89% (abu $p \leq 0,0001$).
4. Atlikus *in silico* analizę, identifikuotos šešios miRNR, potencialiai galinčios reguliuoti analizuotus HM genus: miR-7-5p, miR-9-5p, miR-149-5p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-618. *KMT5A* raiška neigiamai koreliavo su miR-7-5p ($p = 0,0435$). Kitų genų atveju sąsajų su miRNR raiška nebuvo nustatyta (visi $p > 0,0500$).

ASMENINIO INDĒLIO APRAŠYMAS

Magistro baigiamojo darbo tyrimo idėją suformulavo darbo vadovė doc. dr. K. Daniūnaitė (K.D.). Eksperimentus planavo K.D. ir doktorantė Rūta Maleckaitė, kurios pradėtą vykdyti eksperimentinę darbų dalį bakalauro metu perėmė Greta Meidutė (G.M.). G.M. atliko tyrimus laboratorijoje (kDNR sintezė, AT-kPGR), *in silico* duomenų bazių analizę miRNR atrankai, literatūros analizę, statistinę duomenų analizę ir rezultatų vizualizavimą. Išvadas bendrai suformulavo G.M. ir K.D.

Tarpiniai tyrimo rezultatai buvo pristatyti 3 konferencijose:

1. Meidutė, G., Maleckaitė, R., Daniūnaitė, K. (2021 March). Gene Expression Analysis of Histone Methylation Associated Genes in Prostate Tumors. 64th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “Open Readings 2021“, Vilnius, Lithuania. https://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2021/03/Abstract_book_2021S.pdf
2. Meidutė, G., Maleckaitė, R., Daniūnaitė, K. (2022 March). Gene Expression Analysis of Histone Demethylases and Methyltransferases in Prostate Cancer. International Conference of Life Sciences “The COINS 2022“. Vilnius, Lithuania. <https://www.thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2022.pdf>
3. Meidutė, G., Maleckaitė, R., Daniūnaitė, K. (2023 April). Expression of Selected Histone Methylation-Associated Genes is Associated with Advanced Prostate Cancer. 66th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences “Open Readings 2023“, Vilnius, Lithuania. https://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2023/05/OpenReadings23_abstract_book.pdf

PADĒKA

Padēķā ūķ tyrimo idēķā, konsultācijas, baigiamoķo darbo koreģavimā bei pastabas skiriu darbo vadovei doc. dr. Kristinai Daniūnaitei.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development*, 14(19), 2410–2434. <https://doi.org/10.1101/gad.819500>
- Adamo, P., & Lodomery, M. R. (2016). The oncogene *ERG*: A key factor in prostate cancer. *Oncogene*, 35(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.109>
- Akil, A., Jerman, L., Yassin, E., Padmajeya, S., Al-Kurbi, A., & Fakhro, K. (2020). Reading between the (Genetic) Lines: How Epigenetics is Unlocking Novel Therapies for Type 1 Diabetes. *Cells*, 9, 2403. <https://doi.org/10.3390/cells9112403>
- Alarcón-Zendejas, A. P., Scavuzzo, A., Jiménez-Ríos, M. A., Álvarez-Gómez, R. M., Montiel-Manríquez, R., Castro-Hernández, C., Jiménez-Dávila, M. A., Pérez-Montiel, D., González-Barrios, R., Jiménez-Trejo, F., Arriaga-Canon, C., & Herrera, L. A. (2022). The promising role of new molecular biomarkers in prostate cancer: From coding and non-coding genes to artificial intelligence approaches. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 25(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41391-022-00537-2>
- Al-Kafaji, G., Al-Naieb, Z. T., & Bakhiet, M. (2016). Increased oncogenic microRNA-18a expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer: A potential novel non-invasive biomarker. *Oncology Letters*, 11(2), 1201–1206. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4014>
- Asensio-Juan, E., Gallego, C., & Martínez-Balbás, M. A. (2012). The histone demethylase PHF8 is essential for cytoskeleton dynamics. *Nucleic Acids Research*, 40(19), 9429–9440. <https://doi.org/10.1093/nar/gks716>
- Auprich, M., Bjartell, A., Chun, F. K.-H., de la Taille, A., Freedland, S. J., Haese, A., Schalken, J., Stenzl, A., Tombal, B., & van der Poel, H. (2011). Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *European Urology*, 60(5), 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.08.003>
- Basu, S., & Tindall, D. J. (2010). Androgen action in prostate cancer. *Hormones & Cancer*, 1(5), 223–228. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0044-4>
- Bianchi, M., Renzini, A., Adamo, S., & Moresi, V. (2017). Coordinated Actions of MicroRNAs with other Epigenetic Factors Regulate Skeletal Muscle Development and Adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 840. <https://doi.org/10.3390/ijms18040840>
- Björkman, M., Östling, P., Härmä, V., Virtanen, J., Mpindi, J.-P., Rantala, J., Mirtti, T., Vesterinen, T., Lundin, M., Sankila, A., Rannikko, A., Kaivanto, E., Kohonen, P., Kallioniemi, O., & Nees, M. (2012). Systematic knockdown of epigenetic enzymes identifies a novel histone demethylase PHF8 overexpressed in prostate cancer with an impact on cell proliferation, migration and invasion. *Oncogene*, 31(29), 3444–3456. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.512>

- Buyyounouski, M. K., Choyke, P. L., McKenney, J. K., Sartor, O., Sandler, H. M., Amin, M. B., Kattan, M. W., & Lin, D. W. (2017). Prostate Cancer – Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 245–253. <https://doi.org/10.3322/caac.21391>
- Canesin, G. (2021). Chapter Five - The prostate cancer stem cell niche: Genetic drivers and therapeutic approaches. In S. Nilsson (Ed.), *Advances in Stem Cells and their Niches* (Vol. 5, pp. 137–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.asn.2020.09.001>
- Cha, H.-R., Lee, J. H., & Ponnazhagan, S. (2020). Revisiting Immunotherapy: A Focus on Prostate Cancer. *Cancer Research*, 80(8), 1615–1623. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2948>
- Chen, K., Zhang, F., Ding, J., Liang, Y., Zhan, Z., Zhan, Y., Chen, L., & Ding, Y. (2017). Histone Methyltransferase SETDB1 Promotes the Progression of Colorectal Cancer by Inhibiting the Expression of TP53. *Journal of Cancer*, 8(16), 3318–3330. <https://doi.org/10.7150/jca.20482>
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Chu, C.-H., Wang, L.-Y., Hsu, K.-C., Chen, C.-C., Cheng, H.-H., Wang, S.-M., Wu, C.-M., Chen, T.-J., Li, L.-T., Liu, R., Hung, C.-L., Yang, J.-M., Kung, H.-J., & Wang, W.-C. (2014). KDM4B as a Target for Prostate Cancer: Structural Analysis and Selective Inhibition by a Novel Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14), 5975–5985. <https://doi.org/10.1021/jm500249n>
- Chughtai, B., Forde, J. C., Thomas, D. D. M., Laor, L., Hossack, T., Woo, H. H., Te, A. E., & Kaplan, S. A. (2016). Benign prostatic hyperplasia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.31>
- Conteduca, V., Hess, J., Yamada, Y., Ku, S.-Y., & Beltran, H. (2021). Epigenetics in prostate cancer: Clinical implications. *Translational Andrology and Urology*, 10(7), 3104–3116. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1339>
- Costello, A. J. (2020). Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nature Reviews. Urology*, 17(3), 177–188. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-0287-y>
- Daniunaite, K., Dubikaityte, M., Gibas, P., Bakavicius, A., Rimantas Lazutka, J., Ulys, A., Jankevicius, F., & Jarmalaite, S. (2017). Clinical significance of miRNA host gene promoter methylation in prostate cancer. *Human Molecular Genetics*, 26(13), 2451–2461. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx138>
- David, M. K., & Leslie, S. W. (2023). Prostate Specific Antigen. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557495/>

- Delahunt, B., Miller, R. J., Srigley, J. R., Evans, A. J., & Samaratunga, H. (2012). Gleason grading: Past, present and future. *Histopathology*, *60*(1), 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04003.x>
- Delpu, Y., Cordelier, P., Cho, W. C., & Torrisani, J. (2013). DNA Methylation and Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 15029–15058. <https://doi.org/10.3390/ijms140715029>
- Demidenko, R., Daniunaite, K., Bakavicius, A., Sabaliauskaite, R., Skeberdyte, A., Petroska, D., Laurinavicius, A., Jankevicius, F., Lazutka, J. R., & Jarmalaite, S. (2017). Decreased expression of MT1E is a potential biomarker of prostate cancer progression. *Oncotarget*, *8*(37), 61709–61718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18683>
- Driskell, I., Oda, H., Blanco, S., Nascimento, E., Humphreys, P., & Frye, M. (2012). The histone methyltransferase Setd8 acts in concert with c-Myc and is required to maintain skin. *The EMBO Journal*, *31*(3), 616–629. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.421>
- Du, C., Lv, C., Feng, Y., & Yu, S. (2020). Activation of the KDM5A/miRNA-495/YTHDF2/m6A-MOB3B axis facilitates prostate cancer progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *39*(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01735-3>
- Duan, L., Chen, Z., Lu, J., Liang, Y., Wang, M., Roggero, C. M., Zhang, Q.-J., Gao, J., Fang, Y., Cao, J., Lu, J., Zhao, H., Dang, A., Pong, R.-C., Hernandez, E., Chang, C.-M., Hoang, D. T., Ahn, J.-M., Xiao, G., ... Liu, Z.-P. (2019). Histone lysine demethylase KDM4B regulates the alternative splicing of the androgen receptor in response to androgen deprivation. *Nucleic Acids Research*, *47*(22), 11623–11636. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1004>
- Duffy, M. J. (2020). Biomarkers for prostate cancer: Prostate-specific antigen and beyond. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *58*(3), 326–339. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0693>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., Humphrey, P. A., & Grading Committee. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American Journal of Surgical Pathology*, *40*(2), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Espina, V. (Ed.). (2017). *Molecular Profiling: Methods and Protocols* (Vol. 1606). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6>
- Fan, L., Zhang, F., Xu, S., Cui, X., Hussain, A., Fazli, L., Gleave, M., Dong, X., & Qi, J. (2018). Histone demethylase JMJD1A promotes alternative splicing of AR variant 7 (AR-V7) in

- prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20), E4584–E4593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802415115>
- Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/35094009>
- Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G. V., Ciafre, S. A., & Farace, M. G. (2007). MiR-221 and miR-222 Expression Affects the Proliferation Potential of Human Prostate Carcinoma Cell Lines by Targeting p27Kip1*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23716–23724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701805200>
- Gao, Y., Liu, J., Huan, J., & Che, F. (2020). Downregulation of circular RNA hsa_circ_0000735 boosts prostate cancer sensitivity to docetaxel via sponging miR-7. *Cancer Cell International*, 20(1), 334. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01421-6>
- Gasi Tandefelt, D., Boormans, J., Hermans, K., & Trapman, J. (2014). ETS fusion genes in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), R143-152. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0390>
- Gay, H. A., & Michalski, J. M. (2018). Radiation Therapy for Prostate Cancer. *Missouri Medicine*, 115(2), 146–150.
- Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., & Flis, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Research*, 33(8), 2989–2996.
- Graça, I., Pereira-Silva, E., Henrique, R., Packham, G., Crabb, S. J., & Jerónimo, C. (2016). Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0264-8>
- Haffner, M. C., Zwart, W., Roudier, M. P., True, L. D., Nelson, W. G., Epstein, J. I., De Marzo, A. M., Nelson, P. S., & Yegnasubramanian, S. (2021). Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nature Reviews. Urology*, 18(2), 79–92. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00400-w>
- Henry, G. H., Malewska, A., Joseph, D. B., Malladi, V. S., Lee, J., Torrealba, J., Mauck, R. J., Gahan, J. C., Raj, G. V., Roehrborn, C. G., Hon, G. C., MacConmara, M. P., Reese, J. C., Hutchinson, R. C., Vezina, C. M., & Strand, D. W. (2018). A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Reports*, 25(12), 3530-3542.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.086>
- Huang, H.-Y., Lin, Y.-C.-D., Cui, S., Huang, Y., Tang, Y., Xu, J., Bao, J., Li, Y., Wen, J., Zuo, H., Wang, W., Li, J., Ni, J., Ruan, Y., Li, L., Chen, Y., Xie, Y., Zhu, Z., Cai, X., ... Huang, H.-D. (2022). miRTarBase update 2022: An informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D222–D230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1079>

- Ilic, D., Djulbegovic, M., Jung, J. H., Hwang, E. C., Zhou, Q., Cleves, A., Agoritsas, T., & Dahm, P. (2018). Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: A systematic review and meta-analysis. *The BMJ*, *362*, k3519. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3519>
- Jain, M. A., Leslie, S. W., & Sapra, A. (2023). Prostate Cancer Screening. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556081/>
- Jangravi, Z., Najafi, M., & Shabani, M. (2016). Investigation of Histone Lysine-Specific Demethylase 5D (KDM5D) Isoform Expression in Prostate Cancer Cell Lines: A System Approach. *Iranian Biomedical Journal*, *20*(2), 117–121. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.02.007>
- Jones, D. Z., Schmidt, M. L., Suman, S., Hobbing, K. R., Barve, S. S., Gobejishvili, L., Brock, G., Klinge, C. M., Rai, S. N., Park, J., Clark, G. J., Agarwal, R., & Kidd, L. R. (2018). Micro-RNA-186-5p inhibition attenuates proliferation, anchorage independent growth and invasion in metastatic prostate cancer cells. *BMC Cancer*, *18*, 421. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4258-0>
- Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Research*, *46*(Database issue), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
- Kern, F., Aparicio-Puerta, E., Li, Y., Fehlmann, T., Kehl, T., Wagner, V., Ray, K., Ludwig, N., Lenhof, H.-P., Meese, E., & Keller, A. (2021). miRTargetLink 2.0—Interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W409–W416. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab297>
- Kiefer, J. C. (2007). Epigenetics in development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *236*(4), 1144–1156. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21094>
- Kohaar, I., Petrovics, G., & Srivastava, S. (2019). A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 1813. <https://doi.org/10.3390/ijms20081813>
- Komura, K., Jeong, S. H., Hinohara, K., Qu, F., Wang, X., Hiraki, M., Azuma, H., Lee, G.-S. M., Kantoff, P. W., & Sweeney, C. J. (2016). Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of *KDM5D* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(22), 6259–6264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600420113>

- Komura, K., Yoshikawa, Y., Shimamura, T., Chakraborty, G., Gerke, T. A., Hinohara, K., Chadalavada, K., Jeong, S. H., Armenia, J., Du, S.-Y., Mazzu, Y. Z., Taniguchi, K., Ibuki, N., Meyer, C. A., Nanjangud, G. J., Inamoto, T., Lee, G.-S. M., Mucci, L. A., Azuma, H., ... Kantoff, P. W. (2018). ATR inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(7), 2979–2995. <https://doi.org/10.1172/JCI96769>
- Kong, D., Heath, E., Chen, W., Cher, M. L., Powell, I., Heilbrun, L., Li, Y., Ali, S., Sethi, S., Hassan, O., Hwang, C., Gupta, N., Chitale, D., Sakr, W. A., Menon, M., & Sarkar, F. H. (2012). Loss of Let-7 Up-Regulates EZH2 in Prostate Cancer Consistent with the Acquisition of Cancer Stem Cell Signatures That Are Attenuated by BR-DIM. *PLoS ONE*, *7*(3), e33729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033729>
- Kukita, A., Sone, K., Kaneko, S., Kawakami, E., Oki, S., Kojima, M., Wada, M., Toyohara, Y., Takahashi, Y., Inoue, F., Tanimoto, S., Taguchi, A., Fukuda, T., Miyamoto, Y., Tanikawa, M., Mori-Uchino, M., Tsuruga, T., Iriyama, T., Matsumoto, Y., ... Osuga, Y. (2022). The Histone Methyltransferase SETD8 Regulates the Expression of Tumor Suppressor Genes via H4K20 Methylation and the p53 Signaling Pathway in Endometrial Cancer Cells. *Cancers*, *14*(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/cancers14215367>
- Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *40*(3), 565–575, viii–ix. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>
- Li, H., & Yang, B. B. (2013). Friend or foe: The role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.35>
- Li, H., Lan, J., Wang, G., Guo, K., Han, C., Li, X., Hu, J., Cao, Z., & Luo, X. (2020). KDM4B facilitates colorectal cancer growth and glucose metabolism by stimulating TRAF6-mediated AKT activation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *39*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1522-3>
- Li, J.-H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.-H., & Yang, J.-H. (2014). starBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D92–D97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
- Li, N., Dhar, S. S., Chen, T.-Y., Kan, P.-Y., Wei, Y., Kim, J.-H., Chan, C.-H., Lin, H.-K., Hung, M.-C., & Lee, M. G. (2016a). JARID1D is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis. *Cancer Research*, *76*(4), 831–843. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0906>

- Li, Q., Li, Y., Wang, Y., Cui, Z., Gong, L., Qu, Z., Zhong, Y., Zhou, J., Zhou, Y., Gao, Y., & Li, Y. (2016b). Quantitative proteomic study of human prostate cancer cells with different metastatic potentials. *International Journal of Oncology*, *48*(4), 1437–1446. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3378>
- Li, T., Li, R.-S., Li, Y.-H., Zhong, S., Chen, Y.-Y., Zhang, C.-M., Hu, M.-M., & Shen, Z.-J. (2012). MiR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *The Journal of Urology*, *187*(4), 1466–1472. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.11.082>
- Lin, Z.-Z., Ming, D.-S., Chen, Y.-B., Zhang, J.-M., Chen, H.-H., Jiang, J.-J., & Zhang, Z.-S. (2019). KMT5A promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma through reducing cadherin-1 expression. *Oncology Letters*, *17*(6), 4907–4913. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10163>
- Liu, J., Liang, T., & Zhangsun, W. (2019a). KDM3A is associated with tumor metastasis and modulates colorectal cancer cell migration and invasion. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.105>
- Liu, J., Zhu, M., Xia, X., Huang, Y., Zhang, Q., & Wang, X. (2016). Jumonji domain-containing protein 1A promotes cell growth and progression via transactivation of c-Myc expression and predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Oncotarget*, *7*(51), 85151–85162. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13208>
- Liu, J.-S., Fang, W.-K., Yang, S.-M., Wu, M.-C., Chen, T.-J., Chen, C.-M., Lin, T.-Y., Liu, K.-L., Wu, C.-M., Chen, Y.-C., Chuu, C.-P., Wang, L.-Y., Hsieh, H.-P., Kung, H.-J., & Wang, W.-C. (2022). Natural product myricetin is a pan-KDM4 inhibitor which with poly lactic-co-glycolic acid formulation effectively targets castration-resistant prostate cancer. *Journal of Biomedical Science*, *29*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00812-3>
- Liu, Q., Pang, J., Wang, L., Huang, Z., Xu, J., Yang, X., Xie, Q., Huang, Y., Tang, T., Tong, D., Liu, G., Wang, L., Zhang, D., Ma, Q., Xiao, H., Lan, W., Qin, J., & Jiang, J. (2021). Histone demethylase PHF8 drives neuroendocrine prostate cancer progression by epigenetically upregulating FOXA2. *The Journal of Pathology*, *253*(1), 106–118. <https://doi.org/10.1002/path.5557>
- Liu, S., Wang, Q., Liu, Y., & Xia, Z.-Y. (2019b). MiR-425-5p suppresses tumorigenesis and DDP resistance in human-prostate cancer by targeting GSK3 β and inactivating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Biosciences*, *44*(4), 102. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9920-4>

- Ma, J., Wei, H., Li, X., & Qu, X. (2021). Hsa-miR-149-5p Suppresses Prostate Carcinoma Malignancy by Suppressing RGS17. *Cancer Management and Research*, *13*, 2773–2783. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S281968>
- Ma, Q., Chen, Z., Jia, G., Lu, X., Xie, X., & Jin, W. (2015). The histone demethylase PHF8 promotes prostate cancer cell growth by activating the oncomiR miR-125b. *OncoTargets and Therapy*, *8*, 1979–1988. <https://doi.org/10.2147/OTT.S85443>
- Madersbacher, S., Sampson, N., & Culig, Z. (2019). Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. *Gerontology*, *65*(5), 458–464. <https://doi.org/10.1159/000496289>
- Malik, J., Getman, M., & Steiner, L. A. (2015). Histone Methyltransferase Setd8 Represses Gata2 Expression and Regulates Erythroid Maturation. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(12), 2059–2072. <https://doi.org/10.1128/MCB.01413-14>
- Maor, G. L., Yearim, A., & Ast, G. (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends in Genetics*, *31*(5), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.002>
- McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, *366*(6472), eaav1741. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, *2*(1), 35–49. <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
- Mi, Y., Zhang, L., Sun, C., Feng, Y., Sun, J., Wang, J., Yang, D., Qi, X., Wan, H., Xia, G., Wu, S., & Zhu, L. (2022). Lysine demethylase 5A promotes prostate adenocarcinoma progression by suppressing microRNA-330-3p expression and activating the COPB2/PI3K/AKT axis in an ETS1-dependent manner. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *16*(4), 579–599. <https://doi.org/10.1007/s12079-022-00671-5>
- Milite, C., Feoli, A., Viviano, M., Rescigno, D., Cianciulli, A., Balzano, A. L., Mai, A., Castellano, S., & Sbardella, G. (2016). The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clinical Epigenetics*, *8*(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0268-4>
- Morales-Martínez, M., & Vega, M. I. (2022). Role of MicroRNA-7 (MiR-7) in Cancer Physiopathology. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ijms23169091>
- Navakauskienė, R. (2017). Chapter 41—Combination Epigenetic Therapy. In T. O. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of Epigenetics (Second Edition)* (pp. 623–632). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805388-1.00041-9>

- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402>
- Patel, R., Khalifa, A. O., Isali, I., & Shukla, S. (2018). Prostate cancer susceptibility and growth linked to Y chromosome genes. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 10, 423–436.
- Piao, L., Feng, Y., Che, N., Li, M., Li, X., Jin, Y., & Xuan, Y. (2020). SETD8 is a prognostic biomarker that contributes to stem-like cell properties in non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice*, 216(12), 153258. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153258>
- Porzycki, P., & Ciszkowicz, E. (2020). Modern biomarkers in prostate cancer diagnosis. *Central European Journal of Urology*, 73(3), 300–306. <https://doi.org/10.5173/cej.2020.0067R>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Rybak, A. P., Bristow, R. G., & Kapoor, A. (2014). Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6(4), 1900–1919. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2953>
- Sabaliauskaite, R., Jarmalaite, S., Petroska, D., Dasevicius, D., Laurinavicius, A., Jankevicius, F., & Lazutka, J. R. (2012). Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 51(8), 781–791. <https://doi.org/10.1002/gcc.21963>
- Schäfer, G., Bednarova, N., Heidenreich, A., Klocker, H., & Heidegger, I. (2021). KDM5D predicts response to docetaxel chemotherapy in metastatic castration resistant prostate cancer patients. *Translational Andrology and Urology*, 10(10), 3946–3952. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1084>
- Seashols-Williams, S. J., Budd, W., Clark, G. C., Wu, Q., Daniel, R., Dragoescu, E., & Zehner, Z. E. (2016). MiR-9 Acts as an OncomiR in Prostate Cancer through Multiple Pathways That Drive Tumour Progression and Metastasis. *PLOS ONE*, 11(7), e0159601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159601>
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloun, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- Sha, J., Han, Q., Chi, C., Zhu, Y., Pan, J., Dong, B., Huang, Y., Xia, W., & Xue, W. (2020). Upregulated KDM4B promotes prostate cancer cell proliferation by activating autophagy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2129–2138. <https://doi.org/10.1002/jcp.29117>

- Shao, P., Liu, Q., Maina, P. K., Cui, J., Bair, T. B., Li, T., Umesalma, S., Zhang, W., & Qi, H. H. (2017). Histone demethylase PHF8 promotes epithelial to mesenchymal transition and breast tumorigenesis. *Nucleic Acids Research*, *45*(4), 1687–1702. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1093>
- Shariat, S. F., & Roehrborn, C. G. (2008). Using biopsy to detect prostate cancer. *Reviews in Urology*, *10*(4), 262–280.
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes & Development*, *24*(18), 1967–2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810>
- Song, X.-L., Tang, Y., Lei, X.-H., Zhao, S.-C., & Wu, Z.-Q. (2017). MiR-618 Inhibits Prostate Cancer Migration and Invasion by Targeting FOXP2. *Journal of Cancer*, *8*(13), 2501–2510. <https://doi.org/10.7150/jca.17407>
- Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS ONE*, *13*(10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
- Strepkos, D., Markouli, M., Klonou, A., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Histone Methyltransferase SETDB1: A Common Denominator of Tumorigenesis with Therapeutic Potential. *Cancer Research*, *81*(3), 525–534. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2906>
- Stuopelyte, K., Daniunaite, K., Bakavicius, A., Lazutka, J. R., Jankevicius, F., & Jarmalaite, S. (2016). The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *British Journal of Cancer*, *115*(6), 707. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.233>
- Sugiura, M., Sato, H., Kanesaka, M., Imamura, Y., Sakamoto, S., Ichikawa, T., & Kaneda, A. (2021). Epigenetic modifications in prostate cancer. *International Journal of Urology*, *28*(2), 140–149. <https://doi.org/10.1111/iju.14406>
- Suikki, H. E., Kujala, P. M., Tammela, T. L. J., van Weerden, W. M., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2010). Genetic alterations and changes in expression of histone demethylases in prostate cancer. *The Prostate*, *70*(8), 889–898. <https://doi.org/10.1002/pros.21123>
- Sun, Y., Wei, M., Ren, S.-C., Chen, R., Xu, W.-D., Wang, F.-B., Lu, J., Shen, J., Yu, Y.-W., Hou, J.-G., Xu, C.-L., Huang, J.-T., & Sun, Y.-H. (2014). Histone methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. *Asian Journal of Andrology*, *16*(2), 319–324. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122812>
- Szeliski, K., Adamowicz, J., Gastecka, A., Drewa, T., & Pokrywczyńska, M. (2018). Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. *Central European Journal of Urology*, *71*(4), 420–426. <https://doi.org/10.5173/cej.2018.1762>

- Tang, D.-E., Dai, Y., & Xu, S.-H. (2020a). Histone Demethylase JMJD1A Promotes Tumor Progression via Activating Snail in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research*, *18*(5), 698–708. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0889>
- Tang, D.-E., Dai, Y., He, J.-X., Lin, L.-W., Leng, Q.-X., Geng, X.-Y., Fu, D.-X., Jiang, H.-W., & Xu, S.-H. (2020b). Targeting the KDM4B-AR-c-Myc axis promotes sensitivity to androgen receptor-targeted therapy in advanced prostate cancer. *The Journal of Pathology*, *252*(2), 101–113. <https://doi.org/10.1002/path.5495>
- Teh, S., Inn, F. X., Rizuana, I. H., & WM, W. M. (2022). A rare case of prostate neuroendocrine tumor: A case report. *Frontiers in Oncology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.1009146>
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*, *6*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/medicines6030082>
- Tietz, K. T., & Dehm, S. M. (2020). Androgen receptor variants: RNA-based mechanisms and therapeutic targets. *Human Molecular Genetics*, *29*(R1), R19–R26. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa089>
- Tong, D., Liu, Q., Liu, G., Yuan, W., Wang, L., Guo, Y., Lan, W., Zhang, D., Dong, S., Wang, Y., Xiao, H., Mu, J., Mao, C., Wong, J., & Jiang, J. (2016). The HIF/PHF8/AR axis promotes prostate cancer progression. *Oncogenesis*, *5*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.74>
- Upadhyay, N., Tilekar, K., Hess, J. D., Pokrovsky, V. S., Aguilera, R. J., & C s, R. (2021). Benefits and pitfalls: Epigenetic modulators in prostate cancer intervention. *Current Research in Chemical Biology*, *1*, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2021.100006>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, *13*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Vieira, F. Q., Costa-Pinheiro, P., Ramalho-Carvalho, J., Pereira, A., Menezes, F. D., Antunes, L., Carneiro, I., Oliveira, J., Henrique, R., & Jerónimo, C. (2014). Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, *21*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0375>
- Visser, W. C. H., de Jong, H., Melchers, W. J. G., Mulders, P. F. A., & Schalken, J. A. (2020). Commercialized Blood-, Urinary- and Tissue-Based Biomarker Tests for Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers*, *12*(12), 3790. <https://doi.org/10.3390/cancers12123790>
- Voigt, J. D., Dong, Y., Linder, V., & Zappala, S. (2017). Use of the 4Kscore test to predict the risk of aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy: Overall cost savings and improved quality

- of care to the us healthcare system. *Reviews in Urology*, 19(1), 1–10.
<https://doi.org/10.3909/riu0753>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePino, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32(17–18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Wang, Z., Cai, H., Zhao, E., & Cui, H. (2022). The Diverse Roles of Histone Demethylase KDM4B in Normal and Cancer Development and Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.790129>
- Wang, Z., Wang, Y., Zhang, J., Hu, Q., Zhi, F., Zhang, S., Mao, D., Zhang, Y., & Liang, H. (2017). Significance of the Tmprss2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 5450–5458. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7281>
- Wilson, S., Fan, L., Sahgal, N., Qi, J., & Filipp, F. V. (2017). The histone demethylase KDM3A regulates the transcriptional program of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 8(18), 30328–30343. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15681>
- Xiang, Y., Guo, J., Li, F., & Xiong, J. (2020). Tudor domain of histone demethylase KDM4B is a reader of H4K20me3. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 52(8), 901–906.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa064>
- Yamada, D., Kobayashi, S., Yamamoto, H., Tomimaru, Y., Noda, T., Uemura, M., Wada, H., Marubashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Doki, Y., Mori, M., & Nagano, H. (2012). Role of the Hypoxia-Related Gene, JMJD1A, in Hepatocellular Carcinoma: Clinical Impact on Recurrence after Hepatic Resection. *Annals of Surgical Oncology*, 19(3), 355–364.
<https://doi.org/10.1245/s10434-011-1797-x>
- Yan, H., Chen, X., Zhang, Q., Qin, J., Li, H., Liu, C., Calhoun-Davis, T., Coletta, L. D., Klostergaard, J., Fokt, I., Skora, S., Priebe, W., Bi, Y., & Tang, D. G. (2011). Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: Depletion of CD44 cells and evidence for epigenetic mechanisms. *PloS One*, 6(9), e24397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024397>
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., & Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *The EMBO Journal*, 31(1), 110–123. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.364>
- Yang, G.-J., Zhu, M.-H., Lu, X.-J., Liu, Y.-J., Lu, J.-F., Leung, C.-H., Ma, D.-L., & Chen, J. (2021). The emerging role of KDM5A in human cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01041-1>
- Yang, H., Liu, Z., Yuan, C., Zhao, Y., Wang, L., Hu, J., Xie, D., Wang, L., & Chen, D. (2015). Elevated JMJD1A is a novel predictor for prognosis and a potential therapeutic target for gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11092–11099.

- Yao, L., Li, Y., Du, F., Han, X., Li, X., Niu, Y., Ren, S., & Sun, Y. (2014). Histone H4 Lys 20 methyltransferase SET8 promotes androgen receptor-mediated transcription activation in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 692–696. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.033>
- Yoo, J., Jeon, Y. H., Cho, H. Y., Lee, S. W., Kim, G. W., Lee, D. H., & Kwon, S. H. (2020). Advances in Histone Demethylase KDM3A as a Cancer Therapeutic Target. *Cancers*, 12(5), 1098. <https://doi.org/10.3390/cancers12051098>
- Yu, N., Huangyang, P., Yang, X., Han, X., Yan, R., Jia, H., Shang, Y., & Sun, L. (2013). MicroRNA-7 Suppresses the Invasive Potential of Breast Cancer Cells and Sensitizes Cells to DNA Damages by Targeting Histone Methyltransferase SET8. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 19633–19642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475657>
- Zhang, J.-Y., Su, X.-P., Li, Y.-N., & Guo, Y.-H. (2019). MicroRNA-425-5p promotes the development of prostate cancer via targeting forkhead box J3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(2), 547–554. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16867

PRIEDAI

1 priedas. PV sergančių ligonių klinikinės–patologinės charakteristikos

Parametras	Grupių duomenys		
	PV (N = 123)	NPA (N = 47)	GPH (N = 16)
Amžius, m.			
Vidurkis	60,9	62,3	70,88
Mediana	61	63	73
Intervalas	41–82	48–75	59–80
Prostatos masė, g			
Vidurkis	47,2	48,3	–
Intervalas	16–123	16–104	–
PSA, ng/ml			
Vidurkis	10,45	9,67	7,46
Intervalas	2,49–84,2	2,49–44,1	0,79–28,05
TMPRSS2-ERG sulietinis transkriptas, N			
Yra	68	–	–
Nėra	35	–	–
Nežinoma	20	–	–
Naviko stadija, N			
pT2	80	25	–
pT3	43	6	–
Nežinoma	–	16	–
ISUP grupė, N			
ISUP 2	95	–	–
ISUP 3	26	–	–
Nežinoma	2	–	–
Biocheminė ligos progresija (BLP), N			
Yra (vidutinė trukmė iki BLP, mėn.)	38 (34,7)	28 (35,32)	–
Nėra	79	16	–
Nežinoma	6	3	–

PV – prostatos vėžys, NPA – nevėžinis prostatos audinys, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija.

2 priedas. Išgyvenamumui be progresijos įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) rizikos įvertinimas Cox regresijos metodu. Visa mėginių imtis.

Nr.	Kintamasis	HR	(95% CI)	Rodiklio p vertė	Mod. p vertė
Pavienių rodiklių analizė (visi mėginiai)					
1	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,26	0,04–1,82	0,1765	–
2	<i>KDM4B</i> (tolyd.)	0,30	0,10–0,94	0,0393	–
3	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,33	0,17–0,64	0,0011	–
4	<i>KDM5D</i> (tolyd.)	0,43	0,20–0,93	0,0318	–
5	<i>KDM7B</i> (tolyd.)	0,98	0,89–1,08	0,6892	–
6	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,35	0,18–0,68	0,0021	–
7	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,94	0,85–1,05	0,3048	–
8	pT (2 vs. 3)	4,36	2,22–8,56	< 0,0001	–
9	ISUP (2 vs. 3)	5,75	2,90–11,39	< 0,0001	–
10	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,83	0,42–1,65	0,5990	–
11	PSA (tolyd.)	1,02	1,00–1,05	0,0214	–
12	Amžius (diskret.)	0,99	0,95–1,04	0,7709	–
13	Prostatos masė (diskret.)	1,01	0,99–1,03	0,2388	–
Kombinacijos su klinikiniais–patologiniais rodikliais (visi mėginiai)					
12	pT (2 vs. 3)	3,58	1,79–7,14	0,0003	<0,0001*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,44	0,23–0,84	0,0127	
13	pT (2 vs. 3)	3,93	2,00–7,74	0,0001	<0,0001*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,40	0,21–0,77	0,0065	
14	ISUP (2 vs. 3)	4,90	2,47–9,72	<0,0001	<0,0001*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,37	0,18–0,76	0,0069	
15	ISUP (2 vs. 3)	5,14	2,59–10,21	<0,0001	<0,0001*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,40	0,20–0,79	0,0083	
16	PSA (tolyd.)	1,03	1,01–1,07	0,0108	0,0085*
	<i>KDM4B</i> (tolyd.)	0,27	0,09–0,85	0,0253	
17	PSA (tolyd.)	1,03	1,01–1,06	0,0173	0,0001*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,30	0,15–0,58	0,0004	
18	PSA (tolyd.)	1,02	1,00–1,05	0,0262	0,0243*
	<i>KDM5D</i> (tolyd.)	0,45	0,20–0,99	0,0491	
19	PSA (tolyd.)	1,03	1,01–1,05	0,0119	0,0002*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,31	0,16–0,63	0,0011	
Kombinacijos su <i>TMPRSS2-ERG</i> buvimu (visi mėginiai)					
20	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,84	0,42–1,66	0,6080	0,0041
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,34	0,17–0,68	0,0021	
21	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,96	0,48–1,92	0,9152	0,0030
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,33	0,16–0,66	0,0020	

HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas; mod. – modelis; tolyd. – tolydus dydis, diskret. – diskretus dydis. Reikšmingos p vertės paryškintos. **Forward* kintamųjų modelio algoritmas.

3 priedas. Išgyvenamumui be progresijos įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) rizikos įvertinimas *Cox* regresijos metodu. pT2 stadijos mėginių imtis.

Nr.	Kintamasis	HR	(95% CI)	Rodiklio p vertė	Mod. p vertė
Pavienių rodiklių analizė (pT2 mėginių grupė)					
1	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,01	0–0,46	0,0183	–
2	<i>KDM4B</i> (tolyd.)	0,32	0,06–1,64	0,1731	–
3	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,27	0,09–0,81	0,0201	–
4	<i>KDM5D</i> (tolyd.)	0,34	0,09–1,22	0,0991	–
5	<i>KDM7B</i> (tolyd.)	0,74	0,52–1,06	0,1020	–
6	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,34	0,12–0,96	0,0429	–
7	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,99	0,92–1,06	0,7604	–
8	ISUP (2 vs. 3)	6,60	1,99–21,81	0,0021	–
9	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,66	0,23–1,84	0,4264	–
10	PSA (tolyd.)	1,04	0,99–1,10	0,1303	–
11	Amžius (diskret.)	1,00	0,93–1,07	0,8983	–
12	Prostatos masė (diskret.)	0,99	0,95–1,03	0,5576	–
Skirtingų genų kombinacijos (pT2 mėginių grupė)					
13	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,02	0–0,68	0,0316	0,0055*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,40	0,14–1,11	0,0803	
Kombinacijos su klinikiniais–patologiniais rodikliais (pT2 mėginių grupė)					
14	ISUP (2 vs. 3)	11,03	2,98–40,80	0,0003	0,0003*
	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0	0–0,14	0,0036	
15	ISUP (2 vs. 3)	6,70	2,00–22,50	0,0022	0,0012*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,26	0,08–0,82	0,0220	
16	ISUP (2 vs. 3)	5,41	1,60–18,25	0,0068	0,0050*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,41	0,15–1,12	0,0839	
17	PSA (tolyd.)	1,05	0,99–1,12	0,0823	0,0426*
	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,02	0–0,78	0,0383	
18	PSA (tolyd.)	1,04	0,99–1,10	0,1461	0,0119
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,20	0,06–0,73	0,0146	
19	PSA (tolyd.)	1,06	1,00–1,12	0,0682	0,0240*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,27	0,08–0,89	0,0326	
Kombinacijos su <i>TMPRSS2-ERG</i> buvimu (pT2 mėginių grupė)					
20	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,76	0,27–2,17	0,6128	0,0368
	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,01	0–0,43	0,0176	
21	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,69	0,25–1,93	0,4788	0,0449
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,29	0,10–0,88	0,0288	

HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas; mod. – modelis; tolyd. – tolydus dydis, diskret. – diskretus dydis. Reikšmingos p vertės paryškintos. **Forward* kintamųjų modelio algoritmas.

4 priedas. Išgyvenamumui be progresijos įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) rizikos įvertinimas *Cox* regresijos metodu. ISUP 2 stadijos mėginių imtis.

Nr.	Kintamasis	HR	(95% CI)	Rodiklio p vertė	Mod. p vertė
Pavienių rodiklių analizė (ISUP 2 mėginių grupė)					
1	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,13	0,01–2,17	0,1594	–
2	<i>KDM4B</i> (tolyd.)	0,33	0,08–1,39	0,1342	–
3	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,35	0,15–0,80	0,0136	–
4	<i>KDM5D</i> (tolyd.)	0,62	0,20–1,93	0,4076	–
5	<i>KDM7B</i> (tolyd.)	0,79	0,58–1,06	0,1117	–
6	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,42	0,18–0,95	0,0385	–
7	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,79	0,65–0,97	0,0258	–
8	pT (2 vs. 3)	4,15	1,72–10,01	0,0016	–
9	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,80	0,33–1,93	0,6207	–
10	PSA (tolyd.)	1,02	0,99–1,05	0,2452	–
11	Amžius (diskret.)	0,99	0,93–1,04	0,6576	–
12	Prostatos masė (diskret.)	1,01	0,98–1,03	0,5688	–
Skirtingų genų kombinacijos (ISUP 2 mėginių grupė)					
13	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,41	0,17–0,99	0,0492	0,0042*
	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,83	0,68–1,02	0,0796	
Kombinacijos su klinikiniais–patologiniais rodikliais (ISUP 2 mėginių grupė)					
14	pT (2 vs. 3)	3,40	1,38–8,42	0,0083	0,0013*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,46	0,21–1,01	0,0547	
15	pT (2 vs. 3)	3,77	1,55–9,15	0,0035	0,0015*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,48	0,22–1,05	0,0686	
16	pT (2 vs. 3)	3,43	1,40–8,41	0,0074	0,0011*
	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,84	0,69–1,01	0,0677	
17	PSA (tolyd.)	1,02	0,99–1,06	0,2265	0,0136
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,32	0,14–0,74	0,0083	
18	PSA (tolyd.)	1,02	0,99–1,06	0,2107	0,0456
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,39	0,17–0,93	0,0339	
19	PSA (tolyd.)	1,01	0,97–1,06	0,4885	0,0024
	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,71	0,56–0,91	0,0063	
Kombinacijos su <i>TMPRSS2-ERG</i> buvimu (ISUP 2 mėginių grupė)					
20	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,80	0,33–1,92	0,6146	0,0438
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,37	0,16–0,85	0,0194	
21	<i>TMPRSS2-ERG</i> (+/-)	0,86	0,35–2,07	0,7334	0,0532
	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,81	0,66–0,99	0,0395	

HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas; mod. – modelis; tolyd. – tolydus dydis, diskret. – diskretus dydis. Reikšmingos p vertės paryškintos. **Forward* kintamųjų modelio algoritmas.

5 priedas. Išgyvenamumui be progresijos įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) rizikos įvertinimas *Cox* regresijos metodu. Mėginių, kuriuose nustatytas *TMPRSS2-ERG* sulietinis transkriptas, imtis.

Nr.	Kintamasis	HR	(95% CI)	Rodiklio p vertė	Mod. p vertė
Pavienių rodiklių analizė (T-E+ mėginių grupė)					
1	<i>KDM3A</i> (tolyd.)	0,49	0,03–7,49	0,6094	–
2	<i>KDM4B</i> (tolyd.)	0,24	0,06–1,03	0,0560	–
3	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,30	0,13–0,71	0,0063	–
4	<i>KDM5D</i> (tolyd.)	0,48	0,12–1,87	0,2904	–
5	<i>KDM7B</i> (tolyd.)	0,78	0,57–1,08	0,1393	–
6	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,28	0,11–0,69	0,0058	–
7	<i>KMT5A</i> (tolyd.)	0,97	0,84–1,12	0,6976	–
8	pT (2 vs. 3)	5,30	2,17–12,94	0,0003	–
9	ISUP (2 vs. 3)	5,11	2,11–12,39	0,0003	–
10	PSA (tolyd.)	1,10	1,06–1,15	<0,0001	–
11	Amžius (diskret.)	1,00	0,95–1,06	0,9999	–
12	Prostatos masė (diskret.)	1,01	0,99–1,03	0,2507	–
Kombinacijos su klinikiniais–patologiniais rodikliais (T-E+ mėginių grupė)					
13	pT (2 vs. 3)	4,11	1,63–10,38	0,0029	0,0002*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,44	0,18–1,03	0,0610	
14	pT (2 vs. 3)	4,17	1,69–10,26	0,0020	0,0001*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,35	0,13–0,89	0,0278	
15	ISUP (2 vs. 3)	4,65	1,92–11,25	0,0007	0,0001*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,30	0,11–0,77	0,0129	
16	ISUP (2 vs. 3)	4,02	1,65–9,78	0,0022	0,0002*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,33	0,13–0,84	0,0213	
17	PSA (tolyd.)	1,09	1,04–1,14	0,0001	<0,0001*
	<i>KDM5A</i> (tolyd.)	0,26	0,10–0,71	0,0091	
18	PSA (tolyd.)	1,08	1,04–1,13	0,0002	<0,0001*
	<i>KMT1E</i> (tolyd.)	0,28	0,10–0,77	0,0146	

HR – santykinė rizika; CI – pasikliautinis intervalas; mod. – modelis; T-E+ – *TMPRSS2-ERG* sulietinis transkriptas tolyd. – tolydus dydis, diskret. – diskretus dydis. Reikšmingos p vertės paryškintos. **Forward* kintamųjų modelio algoritmas

6 priedas. Pagal skirtingas duomenų bazes nustatytas histonų metilinimo reguliatorius reguliuojančių miRNR kiekis

Duomenų bazės	<i>KDM5A</i>	<i>KDM5D</i>	<i>KDM7B</i>	<i>KMT1E</i>	<i>KMT5A</i>
miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/)	199	2	96	12	116
MiRDB (https://mirdb.org/)	276	44	237	54	132
DIANA tools TarBase v.8 (https://dianalab.e-ce.uth.gr/)	73	6	20	14	40
mirWalk (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)	2135	2185	2235	2167	1630
Starbase (http://starbase.sysu.edu.cn/)	308	17	212	79	187
miRTargetLink 2.0 (https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/)	80	2	54	23	39
TargetScanHuman 8.0 (https://www.targetscan.org/)	1833	171	1292	141	596

7 priedas. MiRNR persidengimas tarp skirtingų duomenų bazių

Šaltinis	<i>KDM5A</i>	<i>KDM5D</i>	<i>KDM7B</i>	<i>KMT1E</i>	<i>KMT5A</i>
Nustatyta pagal 7 iš 7 duomenų bazių					1
Nustatyta pagal 6 iš 7 duomenų bazių	6		1	1	8
Nustatyta pagal 5 iš 7 duomenų bazių	30		11	6	12
Nustatyta pagal 4 iš 7 duomenų bazių	113	4	56	8	38
Nustatyta pagal 3 iš 7 duomenų bazių	321	28	264	46	119
Nustatyta pagal 2 iš 7 duomenų bazių	1161	120	873	140	387
Nustatyta pagal 1 iš 7 duomenų bazių	981	2087	1323	2004	1342