

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas



JEVGENIJ GANŽA

Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotoriaus DNR metilinimo tyrimai inkstų navikuose

Genetikos bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biomokslų institute

Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje

Darbo vadovės:

j. asist. Kristina Stuopelytė

prof. dr. (HP) Sonata Jarmalaitė

Vilnius, 2019

Turinys

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS.....	4
I. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1. Inkstų vėžys.....	5
1.1.1. Inkstų vėžio epidemiologija	5
1.1.2. Inkstų vėžio rizikos veiksniai	6
1.1.3. Inkstų vėžio histologiniai tipai.....	7
1.1.4. Patologinės inkstų vėžio charakteristikos	9
1.1.5. Molekuliniai inkstų vėžio patogeneizės mechanizmai.....	12
1.2. DNR metilinimas.....	14
1.2.1. DNR metilinimo mechanizmas.....	14
1.2.2. Biologinė DNR metilinimo reikšmė	15
1.2.3. DNR metilinimas ir vėžys.....	16
1.2.4. Inkstų vėžio DNR metilinimo tyrimai	17
1.3. Tirtų genų charakteristikos	20
1.3.1. <i>FBN2</i> genas	20
1.3.2. <i>SIM1</i> genas.....	21
1.3.3. <i>TAC1</i> genas.....	22
II. MĖGINIAI IR METODAI.....	23
2.1. Ligoniai ir mėginiai	23
2.2. Metodai.....	24
2.2.1. DNR skyrimas	24
2.2.2. DNR bisulfitinė modifikacija.....	25
2.2.3. Metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (PGR)	26
2.2.4. Elektroforezė agarozės gelyje	28
2.2.5. Statistinė analizė	29
III. REZULTATAI.....	30
3.1. <i>FBN2</i>, <i>SIM1</i> ir <i>TAC1</i> promotorių hipermetilinimas navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose	30
3.2. Genų <i>FBN2</i>, <i>SIM1</i> ir <i>TAC1</i> promotorių hipermetilinimo sąsajos su demografiniais rodikliais	31
3.2.1. Sąsaja su lytimi.....	31
3.2.2. Sąsaja su amžiumi	31
3.3. Genų <i>FBN2</i>, <i>SIM1</i> ir <i>TAC1</i> promotorių hipermetilinimo sąsajos su klinikiniais rodikliais	32
3.3.1. Sąsaja su naviko stadija.....	32
3.3.2. Sąsaja su naviko dydžiu.....	33
3.3.3. Sąsaja su Fuhrmano laipsniu	33
3.3.4. Sąsaja su diferenciacijos laipsniu	34
3.3.5. Sąsaja su intravaskulinės invazijos statusu	35
3.3.6. Sąsaja su nekrozės statusu.....	35
IV. REZULTATŲ APTARIMAS	36
IŠVADOS.....	39
SUMMARY	40
SANTRAUKA	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS	42

SANTRUMPOS

chILK – chromofobinė inkstų ląstelių karcinoma

DNMT – DNR metiltransferazė

ECM – užląstelinis matriksas

FBN2 – fibrilinas 2

ILK – inkstų ląstelių karcinoma

MAT – metionino adenziltransferazė

MMP – matricos metaloproteinazė

MS – metabolinis sindromas

MSP – metilnimui jautri polimerazės grandininė reakcija

PGR – polimerazės grandininė reakcija

pILK – papiliarinė inkstų ląstelių karcinoma

SAH – S-adenozilo homocisteinas

SIM1 – Single-Minded Homolog 1

šILK – šviesių inkstų ląstelių karcinoma

TAC1 – tachikinino prekursorius 1

THF – tetrahidrofoliatas

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys

VHL – Von Hippel-Lindau sindromas ir iš jo pavadinimo kilęs naviko augimą slopinantis *VHL* genas

IVADAS

Inkstų vėžys (arba inkstų ląstelių karcinoma, ILK) sudaro maždaug 2-3 % visų suaugusiųjų vėžio atvejų, jam būdingas didžiausias mirtingumas tarp visų neoplastinių šlapimo takų sistemos ligų. Lietuva užima trečią vietą pasaulyje pagal sergamumą ir antrą vietą pagal mirtingumą (po Baltarusijos) nuo šios ligos. Pagrindinė tokio mirtingumo nuo inkstų vėžio priežastis – vėlyva ligos diagnostika. Atliekant rutininius klinikinius tyrimus, atsitiktinai nustatoma daugiau kaip pusė inkstų vėžio atvejų, iš kurių apie 30 % atvejų yra jau pažengusiose stadijose. Nustatius inkstų vėžį ankstyvose stadijose, tikimybė jį išgydyti siekia 80 %, tačiau esant vėlyvai stadijai, pacientų išgyvenamumas yra mažesnis nei 8 %. Siekiant diagnozuoti ligą pirminėse jos vystymosi stadijose, reikalingi nauji molekuliniai biožymenys, kurie ne tik palengvintų inkstų vėžio diagnostiką, bet būtų jautresni bei specifiskesni, nei šiuo metu klinikinėje vėžio diagnostikoje taikomi metodai.

Įvairūs epigenetiniai veiksniai, tokie kaip DNR metilinimas, trumposios ir ilgosios nekoduojančios RNR, histonų modifikacijos, reguliuoja genų raišką, nevykstant DNR sekos pakitimams. Plačiausiai tyrinėjamas epigenetinis reiškinys yra DNR metilinimas, kuris žinduoliuose vyksta prie citozino bazės 5-ojo anglies atomo prijungiant metilo grupę. Navikinėse ląstelėse promotorių regionų metilinimas dažniausiai aptinkamas naviko augimą slopinančiuose genuose, tokiuose kaip *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1*, atsakinguose už ląstelių proliferacijos, migracijos ir t.t. slopinimą. Epigenetiniai pokyčiai vyksta vos pradedant navikui vystytis, todėl šių genų metilinimo tyrimas galėtų būti naudojamas ankstyvai vėžio diagnostikai ar ligos eigos prognozavimui.

Darbo tikslas: Nustatyti genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotoriaus DNR metilinimo būklę inkstų navikiniuose audiniuose.

Uždaviniai:

1. Ištirti *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* geno promotorių metilinimo būklę inkstų navikų mėginiuose metilnimui jautrios PGR (MSP) metodu;
2. Įvertinti tirtų genų metilinimo dažnio sąsają su ligonių demografiniais ir klinikopatologiniais rodikliais.

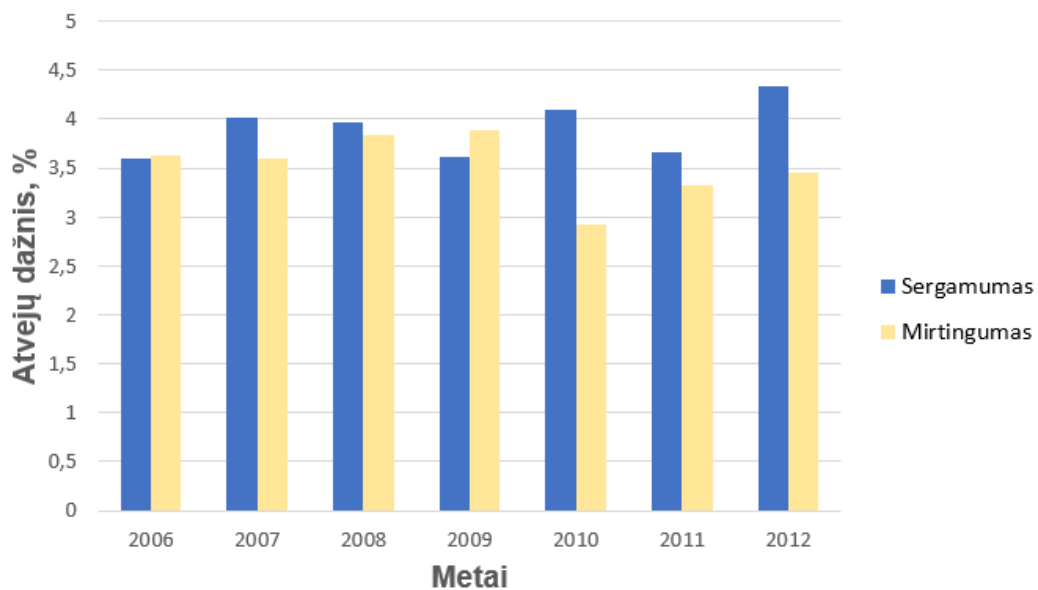
I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Inkstų vėžys

1.1.1. Inkstų vėžio epidemiologija

Inkstų ląstelių karcinoma (ILK) yra daugiausiai mirčių sukelianti neoplastinė šlapimo takų sistemos liga. Ši vėžio forma apima heterogenišką navikų grupę, kuri, remiantis morfologijos ir histologijos ypatumais, skirstoma į šviesių ląstelių karcinomą (šILK), papiliarinius (pILK), chromofobinius navikus (chILK), onkocitomas (OCT), surenkamųjų arba Bellini kanalėlių navikus ir kt. (Shuch ir kt., 2015). ŠILK, pILK ir chILK yra dažniausiai nustatomi inkstų vėžio subtipai, kurie sudaro 85-90 % visų piktybinių inkstų navikų (Shuch ir kt., 2015). ILK atvejų skaičius didėja kasmet ir yra dažniau nustatomas vyresnio (50-70 m.) amžiaus vyrams. ILK dažniausiai nustatoma atsitiktinai, tačiau yra žinomos kai kurios šeiminės ligos formos, susijusios su Von Hippel-Lindau (VHL) sindromu (Shenoy ir kt., 2015).

ILK yra šeštasis pagal dažnumą vėžys vyrams ir dešimtas moterims ir tai atitinkamai sudaro 5 % ir 3 % visų pasaulyje nustatomų onkologinių susirgimų (Znaor ir kt., 2015). Visų tipų ILK susirgimų skaičius kasmet didėja (Siegel ir kt., 2018) ir nors ankstyva diagnozė žymiai padidina ligonių šansus išsigydyti, tačiau diagnozės metu daugiau nei 30 % ligonių, nustatoma jau metastazavusi liga. Remiantis „GLOBOCAN 2018“ projekto duomenimis, sergamumo ILK dažnis Lietuvoje yra 14,8 atvejų 100 tūkst. gyventojų ir užima trečiąją vietą Europoje, o mirtingumas nuo inkstų vėžio užima antrąją vietą (5,1 atvejo 100 tūkst. gyventojų) (Bray ir kt., 2018). 2012 metų Lietuvos Nacionalinio vėžio instituto duomenimis inkstų vėžys buvo septintas pagal sergamumą (4 %) ir devintas pagal mirtingumą (3 %) tarp visų vyrų ir moterų amžiaus grupių (1.1 pav).



1.1 pav. Inkstų vėžio sergamumo ir mirtingumo rodikliai Lietuvoje 2006-2012 metais.

Diagramoje vaizduojama inkstų vėžio sergamumo ir mirtingumo dalis procentais nuo visų atitinkamais metais užregistruotų susirgimų ir mirčių nuo skirtingų vėžio tipų (parengta pagal Nacionalinio vėžio instituto vėžio registrą, internetinė prieiga: <http://www.nvi.lt/vezio-registras/>).

1.1.2. Inkstų vėžio rizikos veiksniai

Svarbiausi inkstų vėžio rizikos veiksniai yra: rūkymas, viršsvoris, diabetas, hipertenzija ir antihipertenzinių preparatų naudojimas, šlapimo trakto infekcijos, kancerogenų įtaka, inkstų transplantacija. Prie profesinių rizikos veiksnių priskiriamas asbestas, herbicidai, benzinas. Gimdžiusioms moterims rizika susirgti ILK yra 40-90 % didesnė, palyginus su negimdžiusiomis, ir didėja su kiekvienu nėštumu (Kabat ir kt., 2007). Svarbi ir genetinė predispozicija –VHL sindromas, paveldimas papildinis inkstų vėžys (Ljungberg ir kt., 2011)

Rūkymas – viena iš svarbiausių inkstų vėžio atsiradimo priežasčių. Tarptautinės vėžio tyrimo agentūros (angl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) duomenimis, palyginus su nerūkančiais, rūkančiųjų rizika susirgti inkstų vėžiu vyrams siekia 50 %, o moterims 20 % (Hunt ir kt., 2005). Manoma, kad rūkymas riziką susirgti inkstų vėžiu didina dėl lėtinės audinių hipoksijos, kurią inkstų audiniams sukelia anglies monoksidas (Sharifi ir

Farrar, 2006), taip pat yra tyrimų, įrodančių, kad pažeidžiama limfocitų DNR (Clague ir kt., 2009).

Įvairūs tyrimai visame pasaulyje rodo, kad **viršsvorį** turintiems asmenims nustatoma padidėjusi ILK susirgimo rizika, kuri Jungtinėse Amerikos Valstijose siekia daugiau nei 40 %, o Europoje apie 30 % (Calle ir Kaaks, 2004). Yra keletas hipotezių, aiškinančių viršsvorio įtaką inkstų vėžio atsiradimui. Rizika gali didėti dėl lėtinės audinių hipoksijos, atsparumo insulinui ir kompensacinės hiperinsulinemijos, pakitusios endokrininės aplinkos ir adipokinių gamybos, viršsvorio sukulto uždegiminio atsako, lipidų peroksidacijos ir oksidacinio streso (Klinghoffer ir kt., 2009). Be to, viršsvoris yra vienas iš **metabolinio sindromo** (MS), glaudžiai siejamo su ILK išsivystymo rizika, požymių (Zhang ir kt., 2014).

Hipertenzija kaip ir viršsvoris yra priskiriamas prie MS kriterijų ir skatina inkstų vėžio vystymąsi (Maitland ir kt., 2009). Biologiniai mechanizmai, kuriais grindžiamas ryšys tarp hipertenzijos ir ILK, išlieka neaiškūs, tačiau egzistuoja hipotezė, kad jie apima lėtinę inkstų hipoksiją ir lipidų peroksidaciją, formuojantis reaktyviems deguonies junginiams (Sharifi ir Farrar, 2006).

Su metaboliniu sindromu (viršsvoriu ir hipertenzija) siejamas ir **II tipo cukrinis diabetas** (Mittal ir Singh, 2010). Yra žinoma, kad cukrinis diabetas yra susijęs su padidėjusia kelių vėžių rizika, tačiau tiesioginis ryšys su ILK kol kas nėra įrodytas.

Riziką susirgti inkstų vėžiu taip pat didina **inkstų transplantacija**. Yra žinoma, kad imunosupresiniai preparatai gali sukelti DNR pažeidimus ir trikdyti DNR reparacijos mechanizmams. Be to, kai kurie vėžio atvejai buvo susiję su virusinėmis infekcijomis, kurios pasireiškia po transplantacijos. Galiausiai imuninė sistema, kuri paprastai užkerta kelią piktybinių navikų augimui ir vystymuisi, gali sutrikti po imuninę sistemą slopinančių vaistų vartojimo (Kasiske ir kt., 2004).

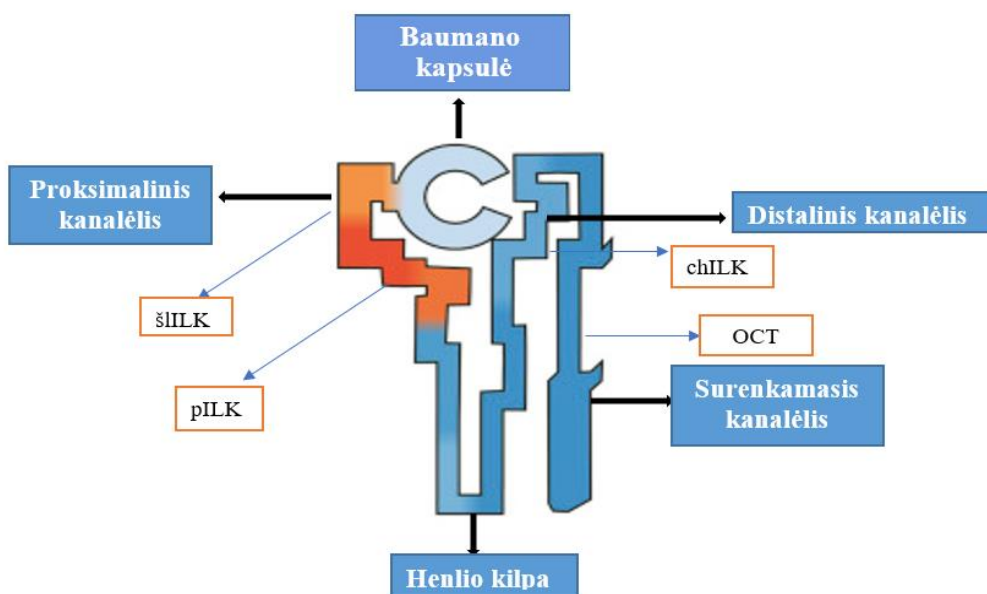
1.1.3. Inkstų vėžio histologiniai tipai

Inkstų anatomija. Inkstas paprastai yra pupelės formos ir sveria apie 135-150 g. Šis organas yra 10-12 cm ilgio, 5-7 cm pločio ir 2-3 cm storio. Inkstai yra suskirstyti į žievę ir šerdį. Funkcinis inkstų vienetas yra nefronas, kurį sudaro glomerulė ir Baumano kapsulė, inksto žievėje esantis proksimalinis kanalėlis, Henlio kilpa, distalinis spiralinis kanalėlis ir galiausiai surinkimo kanalėlis, kuris atsiveria į inkstų papilę (Chalouhy ir kt., 2017).

Pagrindinė inkstų funkcija – šlapimo gamyba ir organizmui nereikalingų bei žalingų medžiagų šalinimas. Kiekvieną minutę į inkstus patenka 1300 ml kraujo, iš kurio 1299 ml

išteka iš inkstų atgal į kraujotaką, o 1 ml pasišalina šlapimo pavidalu. Inkstai yra pagrindinis organas, palaikantis organizmo homeostazę ir padedantis kontroliuoti kraujospūdį. Jie palaiko elektrolitų, rūgščių-bazių ir skysčių pusiausvyrą kraujyje. Inkstai iš organizmo pašalina azoto atliekas (kreatinina, karbamidą, amoniaką) ir grąžina į kraują svarbiausias medžiagas, būtinas normaliam organizmo funkcionavimui. Inkstai gamina hormoną eritropoetina, kuris stimuliuoja raudonųjų kraujo kūnelių ir fermentų gamybą (parengta pagal healthpages.org, internetinė prieiga : <https://www.healthpages.org/anatomy-function/kidney/>).

Tarptautinė sveikatos organizacija (angl. *World Health Organisation*, WHO) išskiria keletą inkstų navikų subtipų: šviesių ląstelių inkstų karcinoma (šILK), papiliarinė ILK (pILK), chromofobinė ILK (chILK), surenkamųjų kanalėlių karcinoma (SKK), onkocitoma (OCT), inkstų medulinė karcinoma, MiT šeimos translokacijos ILK, sukcinato dehidrogenazės deficito ILK, tubulocistinė ILK, su įgyta cistine liga siejama ILK, šviesių ląstelių papiliarinė ILK, neklasifikuota ILK, papiliarinė adenoma ir onkocitoma bei nepiktybinis cistinis inkstų navikas. Tačiau pagrindiniai inkstų vėžio subtipai yra šILK, pILK, chILK ir OCT (1.2 pav.) (Lindgren ir kt., 2017).



1.2 pav. Skirtingų inkstų ląstelių karcinomos (ILK) subtipų atsiradimo vietos nefrone.

chILK – chromofobinė inkstų ląstelių karcinoma; OCT – onkocitoma; pILK – papiliarinė inkstų ląstelių karcinoma; šILK – šviesių inkstų ląstelių karcinoma (pritaikyta pagal Lindgren ir kt., 2017).

Šviesių ląstelių ILK (šILK) yra dažniausiai nustatomas inkstų vėžio histologinis subtipas (Muglia ir kt., 2015). Dauguma (95 %) šILK atsiranda atsitiktinai, o likę 5 % yra

susiję su paveldimais sindromais (VHL sindromu, tuberkuline skleroze). ŠIILK yra kilusi iš proksimalinio vingiuotojo kanalėlio epitelio (inkstų žievės) ląstelių. Mikroskopiškai šIILK ląstelės išsiskiria skaidria citoplazma dėl didelių lipidų ir glikogeno sandėlių (Kaelin, 2008).

Papiliarinė ILK (pILK) atsiranda ir vystosi proksimaliniame kanalėlyje (Shen ir kt., 2005). Šis tipas taip pat formuojasi atsitiktinai arba gali būti paveldimas. Remiantis histologija ir lokalizacija, pILK skiriama į du potipius: bazofilinį ir eozinofilinį (Yoshimitsu ir kt., 2006). Bazofilinio potipio (pirmas potipis) pILK sudaro vieną bazofilinių ląstelių sluoksnį aplink bazalinę membraną. Šiose mažose ląstelėse yra gana nedidelis citoplazmos kiekis ir padidėję branduoliai. Eozinofilinio potipio (antras potipis) pILK apibūdinama ląstelėmis, sąveikaujančiomis su papilėmis bei turinčiomis labai granuliuotą eozinofilinę citoplazmą (Yoshimitsu ir kt., 2006).

Chromofobinė ILK (chILK) yra mažiau agresyvus inkstų vėžio subtipas negu šIILK (Lopez-Beltran ir kt., 2009), kuris pradeda formuotis distaliniame kanalėlyje (Shen, 2005). ChILK ląstelėms būdinga šviesi citoplazma, itin ryški membrana ir netaisyklingos formos branduoliai (Badowska-Kozakiewicz ir kt., 2016). Metastazės pasitaiko tik 7 % atvejų. Mikroskopiškai šie navikai išsiskiria didelėmis šviesiomis ląstelėmis su aiškiai matomu endoplazminiu tinklu ir išsidėsčiusiomis aplink branduolį vakuolėmis (Lopez-Beltran ir kt., 2006).

Inkstų onkocitoma (OCT) yra antra dažniausia nepiktybinė inkstų neoplazma. Tai retas nepiktybinis inkstų epitelio navikas, sudarantis 3-9 % visų pirminių inkstų navikų. Onkocitoma vystosi iš surenkamojo kanalėlio ląstelių, o jos citologiniai požymiai sutampa su kitų subtipų ILK požymiais. Šiuos navikus sudaro didelės granuliuotos ląstelės, kurioms būdinga eozinofilinė citoplazma, daug mitochondrijų bei palaikantis kraujagyslių sluoksnis. Branduoliai maži, apvalūs ir vienodi (Biswas ir kt., 2014). Onkocitomos paprastai yra vienalytės, dažniausiai besimptomės, tad aptinkamos atsitiktinai. Tačiau kai kuriems ligoniams galimas skausmas šone, hematurija (kraujas šlapime) bei apčiuopiama masė (Wobker ir kt., 2017).

1.1.4. Patologinės inkstų vėžio charakteristikos

Fuhrmano laipsnis. Fuhrmano klasifikavimo schemą apibūdina 4 branduolio savybės: branduolio dydis, forma, chromatino būseną bei branduolėlio dydis. Sistemą apibrėžia skalė nuo 1 iki 4 (1.1 lentelė). Navikui, kuriam būdinga geriausia prognozė, priskiriamas 1 laipsnis, o blogiausia – 4 laipsnis. Fuhrmano laipsnis yra glaudžiai susijęs su ligos vystymosi stadija (Kruk ir kt., 2016).

1.1. lentelė. Fuhrmano klasifikavimo kriterijai (parengta pagal Williamson, 2018)

Fuhrmano laipsnis	Navikinių ląstelių branduolių morfologija	Nustatymo dažnis
1	Maži, apvalūs, vienodi branduoliai (10 µm), nepastebimi branduolėliai, ląstelės atrodo kaip limfocitai	Labai retai
2	Šiek tiek netaisyklingos formos branduoliai (branduolio skersmuo 15 µm), branduolėlius galima įžvelgti tik 40× padidiniu, laisvas chromatinas	40 % navikų
3	Netaisyklingos formos branduoliai (20 µm skersmens), branduolėliai matomi tik 10× padidiniu, laisvas chromatinas	30-40 % navikų
4	Keisti, daugybiniai, pleomorfiniai branduoliai, matomi makrobranduolėliai	15 % navikų

TNM sistema. Pagal Amerikos jungtinį vėžio komitetą (angl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) ir Tarptautinę vėžio kontrolės sąjungą (angl. *Union for International Cancer Control*, UICC) navikų stadijai nustatyti turi būti naudojama naviko-limfmazgio-metastazės (angl. *Tumor-Node-Metastases*, TNM) klasifikavimo sistema. 1.2 lentelėje pateiktas inkstų navikų stadijų nustatymas pagal šią sistemą.

1.2 lentelė. Inkstų vėžio TNM sistema (parengta pagal Dunnick, 2016)

Stadija	Stadijų grupės (TNM)	Požymiai
0	TX	Pirminis navikas negali būti įvertintas
	T0	Nėra pirminio naviko požymių
1	T1, N0, M0	Navikas ne didesnis kaip 7 cm pagal didžiausią išmatavimą, yra inksto ribose, neišplitęs: T1a – ≤ 4 cm; T1b – >4 cm bet ≤ 7 cm Nėra plitimosi į limfmazgius (N0) ar tolimus organus (M0).
2	T2, N0, M0	Navikas didesnis kaip 7 cm pagal didžiausią išmatavimą, yra inksto ribose, neišplitęs: T2a – >7 cm bet ≤ 10 cm T2b – >10 cm Nėra plitimo į limfmazgius (N0) ar tolimus organus (M0).
3	T3, N1, M0	Navikas išplitęs į pagrindines venas arba perinefrinius audinius, bet ne į ipsilateralinę antinksčių dalį ir ne į inkstų kapsulę: T3a – navikas išplitęs į inkstų veną arba jos segmentines šakas arba į periferinius ir (arba) inkstų sinusinius riebalus bet ne į inkstų kapsulę; T3b – navikas išplitęs į tuščiąją veną žemiau diafragmos; T3c – navikas labai išplitęs į tuščiąją veną virš diafragmos arba į tuščiosios venos sienelę; Navikas yra išplitęs į limfmazgius (N1), tačiau nėra plitimo į tolimus organus (M0).
4	T4, N1, M1	Navikas išplitęs už inkstų kapsulės ribų (įskaitant gretimą plėtimąsi į ipsilateralinę antinksčių dalį). Navikas yra išplitęs į tolimus limfmazgius (N1) ir į tolimus organus (M1).

Diferenciacijos laipsnis. Chirurginės patologijos srityje ląstelių diferenciacijos samprata yra labai konkreti. Šalia akivaizdaus uždavinio – nustatyti, ar navikas yra piktybinis ar gerybinis – patologas taip pat įvertina navikų diferenciacijos laipsnį G (angl. *grade*):

G1 – aukštas diferenciacijos laipsnis (geros diferenciacijos navikas): neoplazija yra morfologiškai panaši į normalų organą, formuojamos neoplastinės organoidinės struktūros. Dažniausiai aukštas diferenciacijos laipsnis pasižymi geresne prognoze negu mažesni diferenciacijos laipsnį turinčios navikinės ląstelės.

G2 ir G3 – vidutiniškas ir žemas diferenciacijos laipsnis (vidutinės ir mažos diferenciacijos navikas, atitinkamai); ląstelės palaipsniui praranda struktūrinę organizaciją (Jögi ir kt., 2012).

1.1.5. Molekuliniai inkstų vėžio patogeneizės mechanizmai

Genetiniai pokyčiai. ILK gali būti atsitiktinė arba paveldima. **Paveldimos** ILK formos yra: VHL (Gossage ir kt., 2015) ir Birt-Hogg-Dubé sindromai (Perdeaux ir Solly, 2013), paveldima pILK (Dharmawardana ir kt., 2004) ir leiomiomatozė (Shuch ir kt., 2013) bei tuberkulinė sklerozė (Sooriakumaran ir Anderson, 2013).

Ir atsitiktinė, ir paveldima ILK paprastai yra susijusi su trečios chromosomos trumpojo peties struktūriniais pokyčiais. Šioje genomo vietoje yra gerai žinomas naviko augimą slopinantis **genas VHL**, kurio somatinės mutacijos ar epigenetiniai pokyčiai nustatomi daugiau kaip 90 % šlILK atvejų (Gossage ir kt., 2015). Baltymas pVHL yra svarbus ląstelinio deguonies jutiklis, kuris, esant pakankamam deguonies kiekiui, nukreipia hipoksiją skatinančius veiksnius į proteosomas, kur vyksta jų ardymas (Moore ir kt., 2011). Manoma, kad hipoksijos genų (*HIF1* ir *HIF2*) raiškos indukcija yra svarbi šlILK vystymosi varomoji jėga (Kaelin, 2008). Esant neaktyviam *VHL*, hipoksijos indukcijos veiksnys HIF-1 nenukreipiamas į proteosomas suardymui, tad dėl hipoksijos sąlygų imitacijos ląstelėje HIF skatina kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF) raišką (Lim ir kt., 2007). VEGF transkripcijos veiksnių šeimai priklausantys VEGF-A, -C ir jų receptoriai yra pagrindiniai angiogeneizės reguliatoriai. Laukinio tipo *VHL* praradimas ar nuslopinimas aktyvina VEGF signalinę grandinę ir transformuojantį augimo veiksnį α (TGF- α), o tai skatina inkstų vėžio vystymąsi (Lim ir kt., 2007).

Somatinių *VHL* mutacijų kiekis šlILK atveju siekia iki 90 % (Sato ir kt., 2013). Iš šlILK nustatytų somatinių *VHL* mutacijų 55 % yra rėmelio poslinkio arba stop (angl. *nonsense*) tipo, o aminorūgštį keičiančios (angl. *missense*) mutacijos sudaro apie 30 % (COSMIC, 2014). Rėmelio poslinkio ir stop mutacijos lemia pVHL funkcijos praradimą, tuo

tarpu aminorūgšties pokytį lemiančios *VHL* mutacijos gali pasireikšti skirtingai, nes atskiros mutacijos turi skirtingą poveikį pVHL vientisumui ir hipoksijos baltymų stabilizacijai (Rechsteiner ir kt., 2011). Taip pat daug mutacijų nustatoma ir nekoduojančiuose *VHL* regionuose (Gossage ir kt., 2014).

Sekvenuojant inkstų navikus buvo nustatytos ir kitų genų, pvz., chromatinio pertvarkymo veiksnių *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* ir *KDM5C*, mutacijos ir susietos su ILK patogeneze (Ibragimova ir kt., 2013). *PBRM1* genas, koduojantis SWI/SNF chromatinio pertvarkymo komplekso BAF180 subvienetą, įgauna taškinę mutaciją 40 % visų šlILK atvejų. Tai yra antras pagal dažnumą mutavęs genas po *VHL* šio subtipo navikuose. *KDM5C* ir jo homologas *KDM6A* koduoja fermentus, kaip ir *PBRM1* dalyvaujančius chromatinio pertvarkymo procesuose. Šiuose genuose nustatomos taškinės mutacijos 3 % visų šlILK atvejų (Dalgliesh ir kt., 2010). *BAP1* yra naviko augimą slopinantis genas, sąveikaujantis su BRCA1 baltymu ir reguliuojantis ląstelės ciklą bei dalijimąsi. Mutacijos šiame gene nustatomos 8-14 % šlILK atvejų (Pena-Llopis ir kt., 2012).

Epigenetiniai pokyčiai. Epigenetiniame lygmenyje ILK nėra gerai ištyrinėta – tik daugiau kaip 200 genų promotorių nustatytas metilinimas ir apie 120 miRNR raiška rasta pakitusi. Dauguma dažnai metilintų genų ir pakitusios raiškos miRNR veikia ILK ląstelių invazyvumą (*CST6* (Morris ir kt., 2010)), ląstelės ciklo kontrolę (*CDKN2A* (*p14(ARF)/p16(INK4a)*) (Hauser ir kt., 2013; Ricketts ir kt., 2014), *RASSF1A* (Onay ir kt., 2009)), apoptozę (*DAPK1*, *APAF1* (Ahmad ir kt., 2012)) ir ląstelių metabolizmą (*GSTP1* (Hauser ir kt., 2013)), *CDO1* (Schouten ir kt., 2016)). Be to, epigenetiniai pokyčiai, atsirandantys ILK atveju, veikia kelis svarbius signalinius kelius, susijusius su ląstelinio deguonies jutimu (*VHL/HIF*), signalo perdavimu (*WNT/β-katenino*) ir epitelinė-mezenchimine tranzicija (EMT; transformuojančio augimo veiksnio β (*TGFβ*) ir epitelio kadherino arba *CDH1* (Banumathy ir Cairns, 2010)). Sąveikaudami tarpusavyje, šie keliai formuoja tinklą, kurio komponentai yra epigenetiškai išreguliuojami ir prisideda prie ILK vėžio vystymosi (Shenoy ir kt., 2016). Kol kas pakitusi epigenetinė reguliacija nustatoma rečiau nei genų mutacijos (Joosten ir kt., 2018). Pavyzdžiui, *VHL* promotoriaus metilinimas pasireiškia tik iki 30 % visų šlILK atvejų (Young ir kt., 2009), o *PBRM1*, *BAP1*, *KDM6A* ir kitų chromatiną modifikuojančių genų promotorių hipermetilinimas šlILK navikuose neaptinkamas arba aptinkamas retai (Ibragimova ir kt., 2013), dėl to DNR metilinimo tyrimui reikalingi nauji biožymenys. Minėtuose ląsteliniuose procesuose dalyvauja tokie genai kaip *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1*, tad jų promotorių metilinimo tyrimas galėtų tapti jautriu ir specifisku molekulinio biožymeniu ankstyvai ILK diagnostikai.

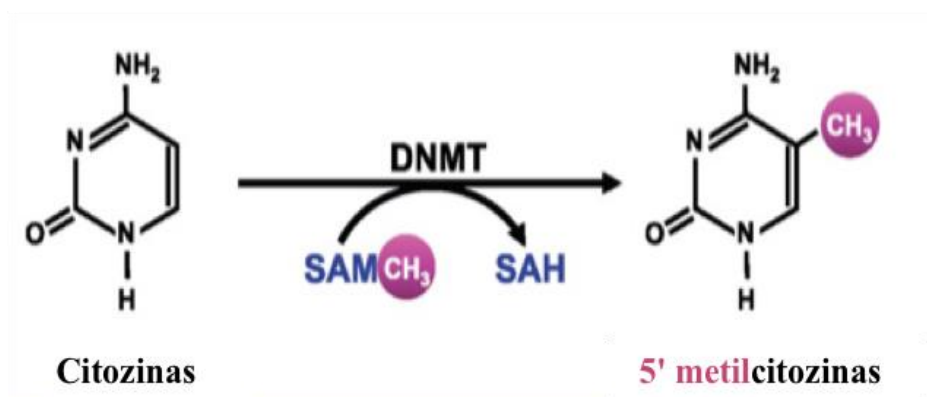
1.2. DNR metilinimas

Epigenetiniai mechanizmai, tokie kaip DNR ir histonų modifikacijos, mažos bei ilgos nekoduojančios RNR, lemia paveldimus genų raiškos pokyčius be jokių juos koduojančios DNR sekos pakitimų (Egger ir kt., 2004). Žinduoliuose daugiausiai vyksta citozino metilinimas, esantis 5` guanozino pusėje (5-metilcitozinas; 5 mC) (Patil ir kt., 2014).

1.2.1. DNR metilinimo mechanizmas

Citozino metilinimas vyksta po DNR sintezės. Metilo grupė, gauta iš šios grupės donoro S-adenosilmetionino (SAM), yra perkeliama ant citozino 5-to anglies atomo (1.3. pav.). Fermentinę reakciją vykdo fermentų šeima, vadinama DNR metiltransferazėmis (DNMT). Žinduoliuose vyksta trijų *DNMT* genų raiška: *DNMT1*, *DNMT3A* ir *DNMT3B*, kurių pagrindinė funkcija yra DNR metilinimas. Šie baltymai yra labai konservatyvūs, tad jiems būdinga panaši aminorūgščių seka (Hamidi ir kt., 2015). *DNMT1* – pagrindinis žinduolių DNR metilinimo fermentas – yra atsakingas už hemi-metilintų vietų poreplikacinę modifikaciją iki pilno metilinimo (palaikomasis metilinimas), tuo tarpu *DNMT3A* ir *DNMT3B* daugiausia dalyvauja naujų sričių (*de novo*) metilime (Laird, 2003).

Metilo grupės donoras SAM susidaro prijungiant ATP prie metionino, veikiant fermentui metionino adenziltransferazei (MAT). Po metilo grupės perkėlimo reakcijos SAM sudaro biproduktą S-adenozilo homocisteiną (SAH), kuris veikia kaip stiprus DNMT inhibitorius (Grillo ir Colombatto, 2008). SAH vėliau yra skaidomas veikiant SAH hidrolazei (SAHH), sudarant homocisteiną, kuris vėl gali būti metilinamas (Grillo ir Colombatto, 2008).

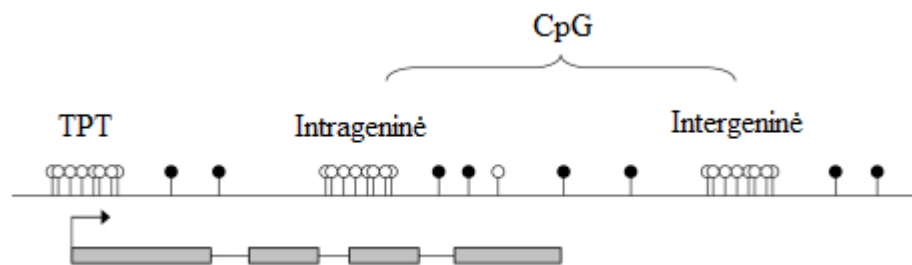


1.3 pav. Citozino metilinimo mechanizmas. DNMT – DNR metiltransferazė, SAM – S-adenosilmetioninas, SAH – S-adenosilhomocisteinas (pritaikyta pagal Zakhari, 2013)

1.2.2. Biologinė DNR metilinimo reikšmė

Genominiai DNR metilinimo modeliai yra labai svarbūs X chromosomos inaktyvacijai, transkripcijos reguliacijai, genomo stabilumui ir genų imprintingui (Smith ir Meissner, 2013). Pirminės DNR metilinimo funkcijos yra paveldimas retrotranspozonų transkripcijos nuslopinimas, monoalelinė imprintintų genų raiška ir atrankus genų promotorių atidengimas transkripcijos veiksniams (Bestor ir kt., 2015). Tačiau dabartiniai tyrimai atskleidžia, kad DNR metilinimas yra svarbus genų kūno palaikymui, intrageninio promotoriaus naudojimui (Maunakea ir kt., 2010), enhanserių modeliavimui (Agirre ir kt., 2015) ir alternatyviam splaisingui (Yearim ir kt., 2015).

CpG salų metilinimas. Žinduolių CpG salos (angl. *CpG islands*) yra trumpos, tarpinės DNR sekos, kurios skiriasi nuo įprasto genomo modelio CG turtingais regionais. Dauguma CpG salų yra transkripcijos iniciacijos taškai, įskaitant ir tuos, kurie yra labai nutolę nuo anotuotų genų promotorių (Deaton ir Bird, 2011). Dauguma CpG salų yra randamos beveik pusėje žinduolių genomo genų proksimalinio promotoriaus zonoje (arba geno pradžioje), tiesiogiai susijusioje su genų nutildymu. Normaliose ląstelėse jos dažniausiai nemetilintos (Allis ir Jenuwein, 2016). Stipri atvirkštinė koreliacija tarp DNR promotoriaus metilinimo ir transkripcijos padėjo suprasti, kad DNR metilinimas yra susijęs su genų promotorių ir pasikartojančių sekų slopinimu (Siegfried ir kt., 1999).



1.4 pav. CpG salų išsidėstymas genome. CpG salos gali būti išsidėsčiusios anotuotuose transkripcijos pradžios taškuose (TPT), genų kūnuose (intrageninės CpG) arba tarp anotuotų genų (intergeninės CpG). Balti rutuliukai – nemetilintos, juodi rutuliukai – metilintos CpG salos (pritaikyta pagal Deaton ir Bird, 2011)

Metilinimas ne CpG kontekste dažniausiai sutinkamas embrioninėse ir pluripotentinėse ląstelėse (Ziller ir kt., 2011). Ryškiausi žinduolių genomo metilinimo pokyčiai vyksta pirminėse gemalo ląstelėse prieš implantaciją (Smallwood ir kt., 2011). Viso genomo mastu vykstantis DNR demetilinimas yra svarbus norint sukurti pluripotentiškas

struktūras ankstyvuose embriono vystymosi etapuose ir ištrinti tėvų kilmės imprintus besivystančiose pirminėse gemalo ląstelėse (Feng ir kt., 2010). Iš pradžių buvo manoma, kad diferencijuotos ląstelės nemetilinamos, tačiau dabar, nustatius metilinimą ne CpG kontekste beveik visuose žmogaus audiniuose, atrasti reikšmingi audiniams saviti skirtumai (Schultz ir kt., 2015). Pavyzdžiui, smegenyse metilinimas ne CpG kontekste yra labai svarbus, nes ši modifikacija atsiranda bręstant neuronams ir išlieka visą gyvenimą (Guo ir kt., 2014).

1.2.3 DNR metilinimas ir vėžys

Netikslus epigenetinis reguliavimas, įskaitant kintantį DNR metilinimą, apibūdina daugybę ligų, įskaitant ir vėžį (Portela ir Esteller, 2010). Palyginus su normaliomis ląstelėmis, vėžinių ląstelių epigenome nustatomi reikšmingi DNR metilinimo pokyčiai, taip pat histonų modifikacijos (Rodriguez-Paredes ir Esteller 2011).

Pirmoji nustatyta vėžiui specifinė epigenetinė anomalija buvo **hipometilinimas** – genomo mastu sumažėjęs CpG metilinimas. Palyginus su normaliomis ląstelėmis, vėžinėse ląstelėse nustatomas apie 20-60 % mažesnis 5 mC lygis. Globalus DNR metilinimo praradimas vyksta daugelyje genominių regionų, tokių kaip pasikartojantys elementai ir retrotranspozonai, dėl kurių vyksta judriųjų elementų ir endoparazitinių sekų (pvz., LINE šeimos nario L1) aktyvavimas. Tai skatina genominių nestabilumą (Howard ir kt., 2008) ir naviko formavimąsi (Gaudet ir kt., 2003). Hipometilinus tam tikrus promotorius, indukuojami onkogenai ir skatinamas imprintingo žymių praradimas ir kitose DNR vietose.

Promotorių sričių **hipermetilinimas** yra dažniausias epigenetinis pokytis navikuose. Jis randamas beveik visuose vėžio tipuose ir yra susijęs su genų raiškos slopinimu (1.5. pav.) (Baylin ir Herman, 2000). Naviko genomas patiria evoliucinį spaudimą, dėl kurio, hipermetilinant promotorių, nutildomi naviko augimą slopinantys genai. Gera žinoma naviko augimą slopinantis genas *RB1* (angl. *retinoblastoma 1*) buvo pirmasis nustatytas tokiu būdu išveiklintas genas (Ohtani-Fujita ir kt., 1993).

DNR metilinimas vaidina svarbų vaidmenį daugybės su vėžiu susijusių genų raiškos slopinime, taip paveikiant daug gyvybiškai svarbių ląstelių procesų, įskaitant ląstelės ciklo kontrolę, apoptozę, signalo perdavimą, ląstelių adheziją ir angiogenezę (Suzuki ir kt., 2012).

Nustatyta, kad maždaug pusė klasikinių naviko augimą slopinančių genų, kurie mutuoja šeiminio vėžio sindromų atveju, yra nutildomi promotoriaus hipermetilinimo būdu (Feinberg ir Tycko, 2004). Randama vis daugiau genų, susijusių su ląstelės ciklo kontrole, DNR reparacija, naviko invazyvumu ir atsaku į augimo veiksnius, kurie vystantis vėžiui

NORMALI LĄSTELĖ

VĖŽINĖ LĄSTELĖ

Legend:

- Egzonai
- Pasikartojančios sekos
- Nemetilinti citozinai
- Metilinti citozinai

Chromatino modifikacijos. Metilo grupių buvimas tam tikruose DNR regionuose priklauso nuo DNR metiltransferazių DNMT1, DNMT3A ir DNMT3B, kurių raiška vėžio atveju dažniausiai randama išaugusi (Lin ir Wang, 2014). Šie fermentai ir kiti prie metilintų CpG prisijungiantys baltymai, tokie kaip MBD2, MBD3 (angl. Methyl-CpG Binding Domain Protein 2, 3) ir MeCP2 (angl. Methyl-CpG Binding Protein 2), nukreipia histonų deacetilazes ir kitus histonus modifikuojančius baltymus prie metilinto promotoriaus. Trečio ir ketvirto histonų deacetilimas skatina chromatino sutankėjimą ir genų raiškos slopinimą (Ropero ir Esteller, 2007).

Pirmaisiais genominiu mastu atliktais ILK DNR metilinimo tyrimais (Morris ir kt., 2011) buvo nustatytas tarp gretimų gerybinių ir piktybinių inkstų audinių besiskiriantis DNR metilinimo profilis, su padidėjusiu metiliniu agresyvesniuose vėžio atvejuose (Kreighton ir kt., 2013). Papildomi ILK tyrimai nustatė, kad DNR metilinimas yra galimas rizikos veiksnys

ir vaidina svarbų vaidmenį naviko vystymesi. Pavyzdžiui, retrospektyviniu beveik 900 inkstų vėžio atvejų tyrimu nustatytas genomo mastu sumažėjęs DNR metilinimas (Mendoza-Perez ir kt., 2016). Kitais tyrimais, kaip dažniausiai randamas ILK epigenetinis pokytis, buvo nustatytas regioninis hipermetilinimas. Taip pat nustatyta, kad inkstų vėžio audiniuose DNR hipermetilinimas yra plačiai paplitęs ne tik genų, bet ir inkstams specifinių enhanserių regionuose, ir kad šie pokyčiai lemia hipoksijos signalinių kelių išreguliavimą (Hu ir kt., 2014). Išsamus ILK atliktų DNR metilinimo tyrimų sąrašas pateiktas 1.4 lentelėje.

1.4 lentelė. Genai, kurių promotoriai yra metilinami inkstų vėžio atveju

Vėžio nulemti pokyčiai	Genas	Metilinimo dažnis (%)		Autorius
		ILK	Kontrolė	
Angiogenezė	<i>VHL</i>	3-42	0	Onay ir kt., 2009; Morris ir kt., 2010; Ricketts ir kt., 2014; Schouten ir kt., 2016
	<i>GREM1</i>	14-41	0-24	
	<i>TIMP3</i>	10-78	0-39	
Metabolizmas	<i>GSTP1</i>	6-18	0-7	Dulaimi ir kt., 2004; Hoque ir kt., 2004; Morris ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2014; Schouten ir kt., 2016; v Vlodrop ir kt., 2017
	<i>UCLH1</i>	7-37	-	
	<i>QPCT</i>	15-45	0-5	
	<i>FST</i>	12-20	6	
	<i>CDO1</i>	38-41	-	
Invazija	<i>CST6</i>	0-46	0-11	Morris ir kt., 2010; Morris ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2012; Ricketts ir kt., 2014; v Vlodrop ir kt., 2017
	<i>COL1A2</i>	16-41	0-45	
	<i>COL14A1</i>	7-44	5	
	<i>FBN2</i>	21-52	0	
Ląstelės ciklo reguliacija	<i>CDKN2A(P14)</i>	0-71	0-27	Hoque ir kt., 2004; Okuda ir kt., 2006; Arai ir kt., 2008; Morris ir kt., 2010; Ricketts ir kt., 2014
	<i>CDKN2A(P16)</i>	0-73	0-62	
	<i>RPRM</i>	9-44	18	
	<i>RASSF1A</i>	23-91	0-100	
Apoptozė	<i>DAPK1</i>	0-66	0-41	Christoph ir kt., 2006; Morris ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2014
	<i>APAF1</i>	41-100	9-33	
	<i>CCDC8</i>	6-35	0	
Adhezija	<i>CDH1</i>	6-83	0-87	Onay ir kt., 2009; Ellinger ir kt., 2011; Morris ir kt., 2011; Lin ir kt., 2014; Schouten ir kt., 2016; v Vlodrop ir kt., 2017
	<i>PCDH8</i>	19-68	0-7	

	<i>LAD1</i>	27-35	5	
Proliferacija	<i>DLEC1</i>	12-35	0-3	Okuda ir kt., 2006; Morris ir kt., 2008; Ellinger ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2012
	<i>PTGS2</i>	6-96	0-100	
	<i>APC</i>	5-54	0-9	
	<i>SPINT2</i>	30-47	5	
	<i>EPB4IL3</i>	19-45	-	
Transportas	<i>SLC34A2</i>	27-34	0	Ricketts ir kt., 2012; Ricketts ir kt., 2014
Transkripcijos reguliacija	<i>ZSCAN18</i>	32-55	0	Hoque ir kt., 2004; Okuda ir kt., 2006; Morris ir kt., 2010; Ricketts ir kt., 2012; Li ir kt., 2013; Ricketts ir kt., 2014
	<i>HOXB13</i>	7-44	0	
	<i>RARB</i>	2-53	0-15	
	<i>BNC1</i>	19-46	5	
	<i>OVOL1</i>	14-32	0	
	<i>KLF4</i>	44-69	0	

ILK – inkstų ląstelių karcinoma

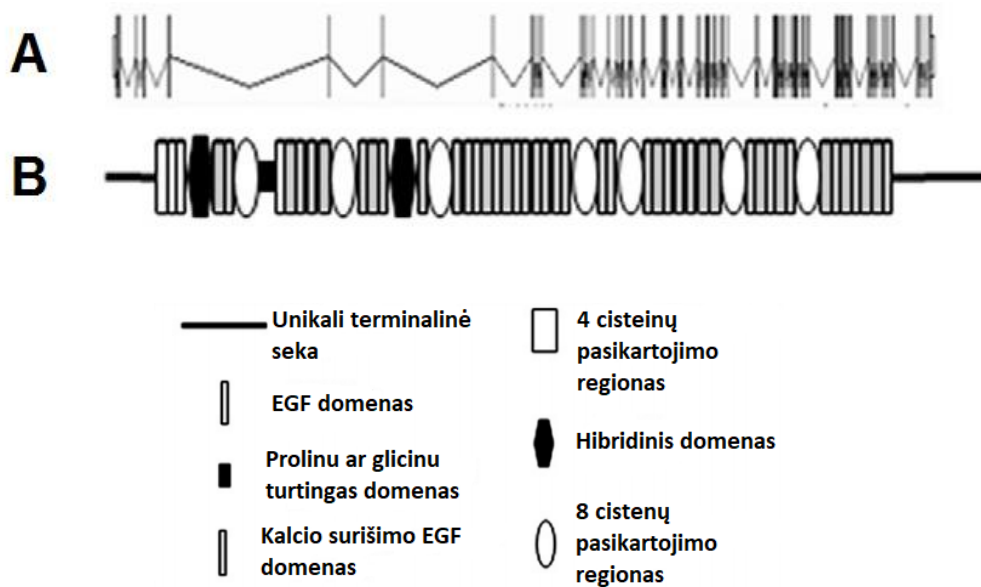
Epigenetiniai pokyčiai, ypač DNR metilinimas, yra patrauklus vėžio biožymuo dėl kelių priežasčių. DNR metilinimo pokyčiai laikui bėgant išlieka stabilūs ir gali būti analizuojami paprastais ir nebrangiais metodais. Be to, DNR metilinimo pokyčiai, priešingai nei somatinės mutacijos, dažnai nustatomi ankstyvose inkstų vėžio vystymosi stadijose. Metilinta DNR aptinkama kraujyje ir šlapime, dėl to gali būti naudojama neinvazinių vėžio žymenų kūrimui. Priešingai nei genetinis inkstų vėžio navikų heterogeniškumas (Gerlinger ir kt., 2014), skirtingose to paties naviko dalyse randami santykinai vienodi DNR metilinimo pokyčiai (Wei ir kt., 2015). Šie tyrimai rodo, kad metilomas išlieka stabilus naviko progresavimo metu, o tiriant DNR metilinimo pokyčius būtų galima išspręsti intranavikinio heterogeniškumo problemą, su kuria susiduria daugelis genetinių biožymenų (Stewart ir kt., 2016).

1.3. Tirtų genų charakteristikos

1.3.1. *FBN2* genas

FBN2 (angl. *fibrillin-2*) yra 5q23.3 lokuse esantis baltymą koduojantis genas, priklausantis užląstelinio matrikso baltymų šeimai ir dalyvaujantis mikrofibrilių susidaryme. *FBN2* produktas – baltymas fibrilinas 2 – siejamas su elastinio pluošto susidarymu keliuose audiniuose. Fibrilinai yra dideli glikoproteinai, turintys epidermio augimo veiksnio kalcio surišimo domenų pasikartojimus, taip pat 8 unikalius cisteino domenų, aptinkamus tik šioje baltymų šeimoje (1.6 pav.) (Davis ir kt., 2012). Didžiausia *FBN2* geno raiška nustatoma adipocituose, bronchų epitelio ląstelėse ir placentoje. *FBN2* raiška pirmą kartą buvo aptikta mezenchiminiuose audiniuose ir tiriant epitelio ir mezenchimos sąryšį (Yi ir kt., 2012).

FBN2 dažnai metilinamas ILK, o jo raiškos praradimas *in vitro* siejamas su padidėjusia inkstų vėžio išsivystymo rizika (Morris ir kt., 2011). TCGA KIRC (angl. *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma*) projekto duomenų analizė parodė, kad *FBN2* metilinimas yra labai paplitęs ILK epigenetinis žymuo, jo metilinimo dažnis siekė 40-53 % tirtų atvejų. Tuo tarpu *FBN2* somatinių mutacijų dažnis siekė tik 3 % (Ricketts ir kt., 2014).

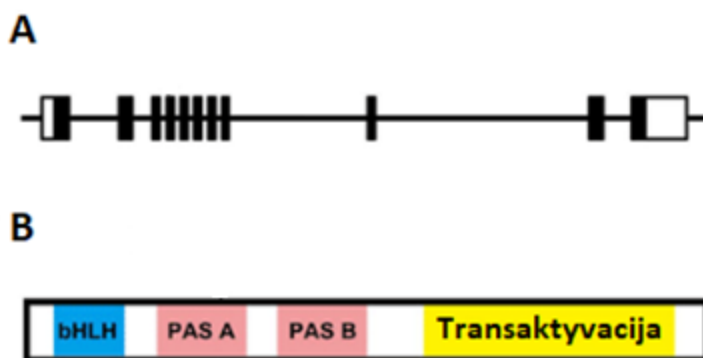


1.6 pav. Žmogaus *FBN2* geno (A) ir baltymo (B) struktūra. A: *FBN2* genui būdingi tankiai supakuoti egzonsai 3'-srityje (vertikalūs stulpeliai) ir ilgi intronai 5'-geno srityje (horizontalios V formos); B: *FBN2* baltymo struktūra; EGF – epidermio augimo veiksnys (pritaikyta pagal Davis ir kt., 2012)

1.3.2. *SIM1* genas

SIM1 (angl. *single-minded homolog 1*) genas, esantis 6q16.3 lokuse, koduoja baltymą, priklausantį pagrindinei spiralės-kilpos-spiralės (angl. *basic helix-loop-helix*, bHLH) transkripcijos veiksnių šeimai. *SIM1* yra pagrindinis bHLH transkripcijos veiksnys, susijęs su pagumburio paraventrikulinio branduolio išsivystymu ir energijos homeostazės palaikymu (Ramachandrappa ir kt., 2013). Didžiausias šio geno raiškos lygis nustatomas inkstuose. Buvo nustatyta, kad *SIM1* geba paveikti energijos homeostazę, dalyvaudamas centrinio melanokortino signaliniame kelyje (Ramachandrappa ir kt., 2013). Taip pat viename iš tyrimų buvo nustatyta, kad *SIM1* geno hipomorfizmas (mažesnio baltymo kiekio susidarymas) arba delecija gali sukelti nutukimą (Tolson ir kt., 2010), o nutukimas yra vienas iš ILK rizikos veiksnių.

Genominių tyrimų metu, kurių tikslas buvo naujų epigenetinių žymenų paieška, buvo nustatytas reikšmingas *SIM1* metilinimo padidėjimas ir jo ryšys su padidėjusia metastazių išsivystymo rizika plaučių ir krūties vėžio atvejais (Faryna ir kt., 2012; Daugard ir kt., 2016). Šie tyrimai parodo, kad *SIM1* gali būti įtrauktas į neoplastinius procesus, tačiau *SIM1* vaidmuo ILK atsiradime ir progresavime iki galo dar nėra išaiškintas (Kim ir kt., 2018).

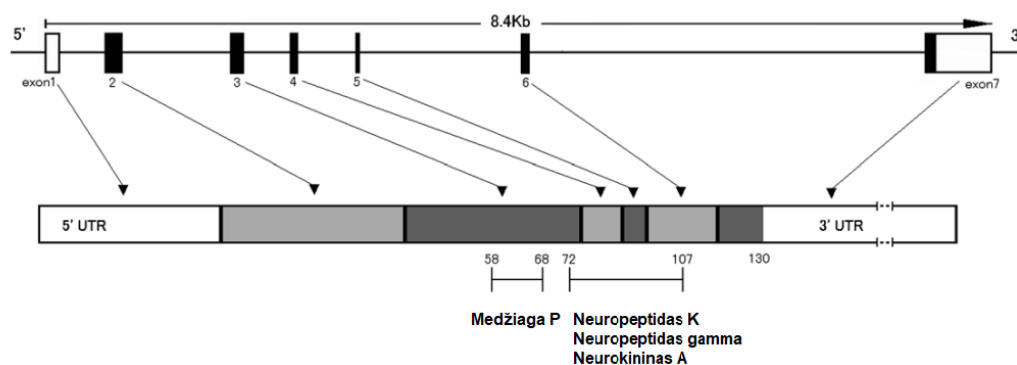


1.7 pav. Žmogaus *SIM1* geno (A) ir baltymo (B) struktūra. A: juodais langeliais vaizduojami koduojantys regionai, baltais – nekoduojantys, horizontalios linijos – intronai. B: *SIM1* baltymo struktūra; bHLH – spiralės-kilpos-spiralės domenai (pritaikyta pagal Hossain ir kt., 2016)

1.3.3. *TAC1* genas

TAC1 (angl. *tachykinin precursor 1*) yra baltymą koduojantis genas, esantis 7q21.3 lokuse ir priklausantis tachikininų šeimai. Žinduolių tachikininai yra peptidai, sudaryti iš 10-12 aminorūgščių ir turintys hidrofobinį C-galo motyvą FXGLM-NH₂. *TAC1* koduoja keturis tachikininų hormonų šeimos produktus: P medžiagą (SP), neurokininą A (NKA) ir susijusius neuropeptidus K ir gamma (NPK ir NPY, atitinkamai) (1.8 pav.). Geno produktai susidaro dėl alternatyvaus splaisingo ir potransliacinių modifikacijų. Manoma, kad šie hormonai veikia kaip neurotransmiteriai, kurie sąveikauja su nervų receptoriais ir lygiųjų raumenų ląstelėmis. SP ir NKA raiška vyksta jautriuose pirminiuose jutimo neuronuose, kurie yra išsidėstę nugaros smegenų šaknų nerviniuose mazguose. Nedidelė jų raiška nustatoma ir kitose ląstelėse (Zhang ir kt., 2000). SP dalyvauja reguliuojant širdies dažnį, kraujospūdį ir kraujagyslių išsitemimą, taip pat yra svarbi išemijos, reperfuzijos atvejais bei širdies ir kraujagyslių sistemos atsake į stresą, susijusi su angiogeneze, skausmo signalų perdavimu ir uždegimu (Mistrova ir kt., 2016). NPY yra peptidas, kurio raiška vyksta keliose kūno sistemose, tačiau didžiausia nustatoma galvos smegenyse (Yang ir kt., 2009).

Kol kas *TAC1* geno metilinimo tyrimų inkstų vėžio atveju nėra, tačiau buvo pastebėta, kad plaučių ir storosios žarnos vėžio atvejais *TAC1* geno promotorius yra metilintas ir manoma, kad jo metilinimo dažnis gali būti šių vėžio tipų išsivystymo rodiklis (Rasmussen ir kt., 2016; Hulbert ir kt., 2017). Taip pat Misawa su kolegomis (Misawa ir kt., 2018) nustatė, kad *TAC1* geno metilinimo dažnis statistiškai reikšmingai siejamas su blogu ligonių, sergančių burnos ertmės vėžiu, išgyvenamumu.



1.8 pav. Žmogaus *TAC1* geno struktūra. Vertikalios juodos juostos vaizduoja egzonus; atvirose langeliuose nurodomi 5' ir 3' netransliuojami regionai; horizontali linija tarp egzonų vaizduoja intronus. Po schema nurodyti *TAC1* geno produktai (pritaikyta pagal Marui ir kt., 2007)

II. MĖGINIAI IR METODAI

2.1. Ligoniai ir mėginiai

Tyrimui naudoti inkstų navikiniai ir nenavikiniai mėginiai buvo surinkti iš inkstų vėžiu sergančių ligonių, kurie 2013-2016 m. buvo operuojami Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose. Mėginiai surinkti vykdant projektą „Inkstų vėžio biožymenų vertės tyrimas ligos prognozei bei atsakui į terapiją“ ir gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą. Iš viso buvo ištirti 126 navikiniai ir 35 nenavikiniai mėginiai, kurių demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos pateikiamos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tirtų mėginių demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos

Charakteristika	Inkstų vėžys N=126	Nenavikiniai mėginiai, N=35
Amžius , vidurkis $\pm$ SN (metais)	63,1 $\pm$ 12,5	66 $\pm$ 13,5
Lytis:		
Vyrai, N (%)	68 (54,0)	15 (42,9)
Moterys, N (%)	58 (46,0)	20 (57,1)
Naviko dydis , vidurkis $\pm$ SN (mm)	56,7 $\pm$ 29,0	-
Naviko stadija:		
pT1, N (%)	52 (41,0)	-
pT2, N (%)	6 (5,0)	-
pT3, N (%)	62 (49,0)	-
pT4, N (%)	6 (5,0)	-
Diferenciacijos laipsnis:		
G $\leq$ 2, N (%)	78 (61,9)	-
G3, N (%)	48 (39,1)	-
Furhman laipsnis:		
$\leq$ 2, N (%)	51 (40,5)	-
$\geq$ 3, N (%)	75 (59,5)	-
Intravaskulinė invazija:		
Taip, N (%)	41 (32,5)	-
Ne, N (%)	85 (67,5)	-
Nekrozė:		
Taip, N (%)	30 (23,8)	-
Ne, N (%)	96 (76,2)	-

SN – standartinis nuokrypis

2.2. Metodai

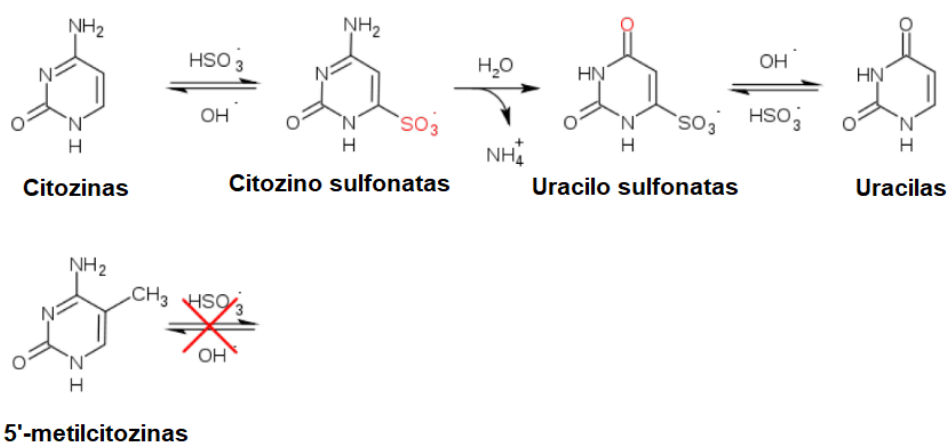
2.2.1. DNR skyrimas

Į du 1,5 mL talpos mėgintuvėlius pilama po 500 µL lizės buferio (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 % Tween-20 (*Thermo Fisher Scientific Baltics, TFSB*)), dedamas nedidelis kiekis šaldyto, į miltelius susmulkinto audinio ir gerai išmaišoma stipriai supurtant. Mėginiai inkubuojami ~1 h 55 °C temperatūroje termobloke (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*), purtant 400 rpm greičiu. Po inkubacijos į mėgintuvėlius dedama po 20-25 µL proteinazės K (20 mg/mL) (*Thermo Fisher Scientific Baltics, TFSB*). Mėginiai gerai išmaišomi ir ~16 h inkubuojami 55 °C temperatūroje termobloke, purtant 400 rpm. Praėjus inkubacijai, patikrinama, ar visi mėginiai lizavosi. Jeigu mėginio dalelės vis dar matomos, papildomai dedama 5 µL proteinazės K, gerai išmaišoma ir dar ~30 min inkubuojama termobloke. Kai visi mėginiai lizuoja, į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 500 µL fenolio/chloroformo/izoamilo alkoholio (25:24:1) (*Thermo Fisher Scientific Baltics, TFSB*) mišinio. Mėginiai 10 min vartomi rankose ir centrifuguojami 10 min 14000 rpm greičiu (*Centrifuge 5424, Eppendorf*). Susidaręs viršutinis vandeninis sluoksnis atsargiai nusiurbiamas, stengiantis nepriliesti viduryje susidariusio baltymų sluoksnio, ir perkeliamas į naujus mėgintuvėlius. Kartojamas valymas fenolio/chloroformo/izoamilo alkoholio mišiniu. Po antro valymo į mėgintuvėlius dedama po 500 µL chloroformo (*Roth*) ir 10 min vartoma rankose, tada centrifuguojama 10 min 14000 rpm. Susidariusi viršutinė frakcija perkeliama į naujus mėgintuvėlius ir DNR precipitacijai dedama po 40 µL 5 M amonio acetato (*Fluka*), 1 mL 96 % etanolio ir 1,5 µL glikogeno (0,01 mg/mL) (*TFSB*), gerai išmaišoma ir inkubuojama -20 °C temperatūroje 2 h. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 25 min 14000 rpm greičiu. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos praplaunamos 500 µL 70 % etanoliu, gerai išmaišoma ir centrifuguojama 25 min 14000 rpm. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos džiovinamos koncentratoriuje (*Concentrator plus, Eppendorf*) 10 min 45 °C temperatūroje. Ant išdžiūvusių nuosėdų (DNR), pilama po 20 µL sterilaus vandens ir 1 h tirpinama kambario temperatūroje. Porinių mėgintuvėlių DNR apjunginama, gerai išmaišoma, trumpai centrifuguojama ir laikoma kambario temperatūroje dar iki 1 h. DNR koncentracija ir švarumas matuojami *NanoDrop 2000* spektrofotometru (*Thermo Scientific*). Mėginiai laikomi -20 °C temperatūroje, ilgesniam saugojimui perkeliama į -80 °C temperatūrą.

2.2.2. DNR bisulfitinė modifikacija

DNR bisulfitinė modifikacija vykdoma *EZ DNA Methylation™ Kit* (Zymo Research) rinkiniu. Šios reakcijos metu DNR grandinėje esantys metilinti citozinai lieka nepakitę, o nemetilinti yra verčiami uracilu (2.1 pav.). Prieš modifikaciją paruošiamas *CT Conversion* reagentas: į mėgintuvėlį su reagentu pilama 750 µL vandens ir 210 µL *M-Dilution* buferio, stipriai supurtoma ir 10 min intensyviai vartoma rankose.

400 ng DNR sumaišoma su 45 µL vandens. Į paruoštą DNR mėginį įpilama 5 µL *M-Dilution* buferio, išmaišoma ir 15 min inkubuojama 42 °C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijai pilamas prieš tai paruoštas *CT Conversion* reagentas (100 µL), supurtoma ir 16 h inkubuojama 50 °C temperatūroje. Reakcija nutraukiama mėginius 10 min palaikant 4 °C temperatūroje. Nudruskinimas atliekamas naudojant *Zymo-Spin™ IC Column* kolonėles, jas įstatant į surinkimo mėgintuvėlius ir pilant po 400 µL *M-Binding* buferio. Įnešama modifikuota DNR, kolonėlės uždaromos ir kelis kartus švelniai pavartomos rankose. Kolonėlės centrifuguojamos 30 s $\geq 10000 \times g$, filtratas pašalinamas. Atliekant plovimą, į kolonėlės įpilama po 100 µL *M-Wash* buferio ir centrifuguojama 30 s didžiausiu leistinu greičiu. Tada į kolonėles įpilama po 200 µL *M-Desulphonation* buferio, jos paliekamos kambario temperatūroje 15-20 min ir taip pat centrifuguojama 30 s didžiausiu leistinu greičiu. Po to plaunama 200 µL *M-Wash* buferio ir centrifuguojama 30 s, procedūra kartojama. Kolonėlė statoma į naują 1,5 mL mėgintuvėlį ir per du kartus, užpylus po 40 µL *M-Elution* buferio bei nucentrifugavus $\geq 10000 \times g$, surenkama modifikuota DNR.



2.1 pav. DNR modifikacija natrio bisulfitu

2.2.3. Metilnimui jautri polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Metilnimui jautrios PGR (angl. *Methylation-Specific PCR*, MSP) metu modifikuota DNR yra pagausinama naudojant dviejų tipų pradmenis – metilintai (angl. *methylated*, M) ir nemetilintai (angl. *unmethylated*, U) sekai atrankių pradmenų poras (*Metabion*). Reakcijai atlikti naudojami *Phusion U Hot Start DNA Polymerase kit* ir *AmpliTaq DNA Polymerase kit* (*Thermo Fisher Scientific Baltics, TFSB*) reagentų rinkiniai.

Visi reikalingi reagentai (išskyrus DNR polimerazę) bei mėginiai atšildomi kambario temperatūroje ~ 30 min. Atšilę reagentai gerai išmaišomi ir trumpai centrifuguojami. Kiekvienam tiriamam mėginiui paruošiama po du 0,2 mL talpos mėgintuvėlius (vienas M, kitas U reakcijai). M ir U reakcijoms reagentų mišiniai ruošiami atskiruose 1,5 mL talpos mėgintuvėliuose, besiskiriančiuose tik naudojamais pradmenimis. Neigiamai ir teigiamai kontrolei buvo naudojama modifikuota leukocitų DNR, kuri teigiamai kontrolei prieš tai buvo *in vitro* metilinta. Reakcija su *TAC1* genu yra renkama šaldančiame stovelyje. Reakcijos komponentai pateikti 2.2 ir 2.3 lentelėse.

2.2 lentelė. *FBN2* ir *SIM1* genų MSP reakcijos mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui

Komponentas	Reakcijos tūris X µL
H ₂ O	14,35
5× <i>HF</i> buferis	4
16 mM dNTP	0,25
100 µM pradmenys (p + ap*)	0,1 + 0,1
<i>Phusion</i> DNR polimerazė (5 U/µL)	0,2
Modifikuota DNR (konc. 10 ng/µL)	1

*p – prasminis pradmuo; ap – antiprasminis pradmuo

2.3 lentelė. *TAC1* geno MSP reakcijos mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui

Komponentas	Reakcijos tūris X µL
H ₂ O	15
10× <i>PGR</i> buferis	2,5
25 mM MgCl ₂	2,5
16 mM dNTP	2,5
100 µM pradmenys (p + ap*)	0,125 + 0,125
Enhanseris	1
<i>AmpliTaq</i> DNR polimerazė (5 U/µL)	0,25
Modifikuota DNR (konc. 10 ng/µL)	1

*p – prasminis pradmuo; ap – antiprasminis pradmuo

Paruošti reakcijos mišiniai gerai išmaišomi, išpilstomi po 19 µL (*FBN2* ir *SIM1* genų atveju) ir po 24 µL (*TAC1* geno atveju) į paruoštus 0,2 mL talpos mėgintuvėlius ir dedama po 1 µL modifikuotos DNR. Paruošti mėginiai gerai išmaišomi ir centrifuguojami 1 min 13000 rpm. Po centrifugavimo neturi likti oro burbulų.

Mėginiai nedelsiant perkeliama į termociklerį (*Mastercycler® pro*, *Eppendorf*). *PGR* sąlygos pateiktos 2.4 lentelėje. Pasibaigus termociklerio programai, mėginiai centrifuguojami 1 min 13000 rpm ir vykdoma elektroforezė.

2.4 lentelė. Tirtų genų MSP reakcijų programos

Etapas	Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
Polimerazės aktyvinimas	95	5 min	1
DNR grandinių atskyrimas	95	45 s	35/ 34/ 34 ²
Pradmenų prijungimas	60/ 62/ M-65; U-63 ¹	20 s	
Pradmenų ilginimas	72	45 s	
Galutinis ilginimas	72	7 min	1
Saugojimas	4	∞	-

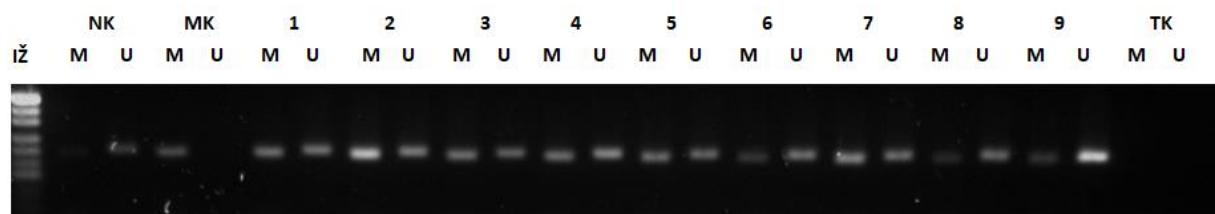
¹ *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1*, atitinkamai; reakcija su *TAC1* genu vykdoma naudojant temperatūros gradientą

² *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1*, atitinkamai

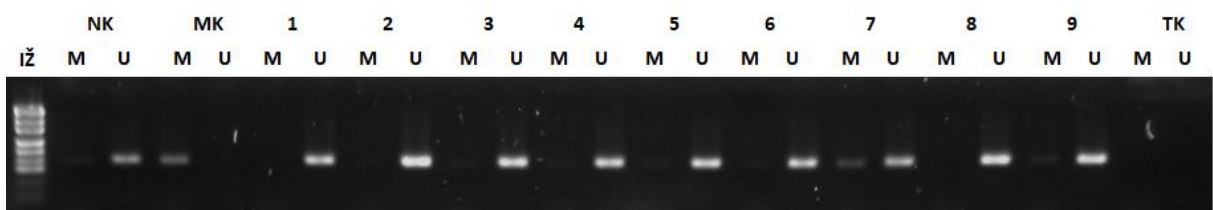
2.2.4. Elektroforezė agarozės gelyje

MSP reakcijos produktai analizuojami 3 % agarozės gelyje. Gelis ruošiamas iš 3,6 g agarozės (*TFSB*) ir 120 mL 1× TAE buferio (*Roth*). Agarozės milteliai gerai išmaišomi ir kaitinami mikrobangų krosnelėje kol išsilydo. Laukiama, kol išsilydžiusi agarozė šiek tiek atvės ir dedama 7 µL etidžio bromido (*Roth*), gerai išmaišoma ir pilama į paruoštą (su įstatytomis gelio šukomis) elektroforezės rėmelį. Geliui sustingus (po 45 min), gelio šukos pašalinamos, rėmelis su geliu statomas į elektroforezės vonelę ir pilama 1× TAE buferio, kol visas gelis yra apsemiamas. Į vonelę su buferiu dedama dar 7 µL etidžio bromido ir gerai išmaišoma. 6 µL MSP reakcijos produkto maišoma su ~1 µL 6X *TriTrack* dažo (*TFSB*) ir nešama į šulinėlį. Užpylus visus mėginius, į pirmą šulinėlį dedama 2 µL pUC19 (*TFSB*) DNR ilgio žymens. Elektroforezė vykdoma 45 min 90 V elektros lauke. Gelis analizuojamas gelių dokumentacijos sistema (*GelDoc-It™ 310 Imaging System; UVP*). Tirtų genų elektroforezės gelių nuotraukų pavyzdžiai pateikti 2.2 pav.

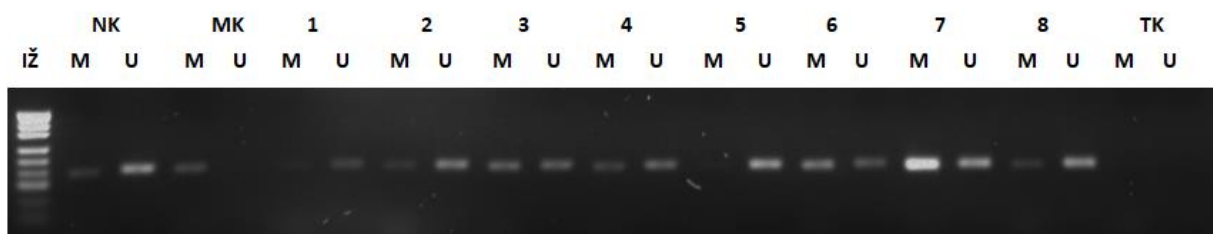
A



B



C



2.2 pav. Agarozės gelyje išfrakcionuoti tirtų genų *FBN2* (A), *SIM1* (B) ir *TAC1* (C) PGR reakcijos produktai. M – reakcija su metilintai, U – nemetilintai sekai skirtais pradmenimis; NK – nemetilinta kontrolė; MK – metilinta kontrolė; 1-9 – tirti mėginiai; TK – taršos kontrolė; IŽ – DNR ilgio žymuo

2.2.5. Statistinė analizė

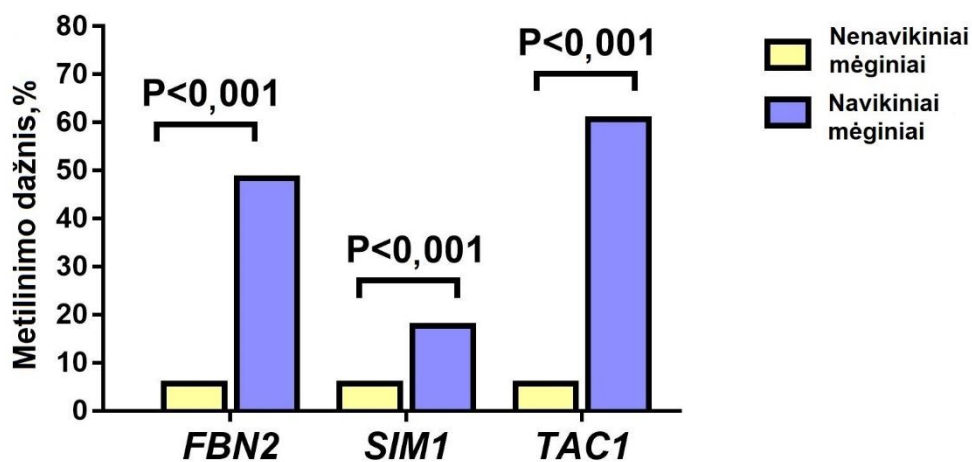
Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių metilinimo būseną įvertinus kokybiškai MSP metodu, visų genų metilinimo lygis buvo apskaičiuotas metilintų navikinių mėginių dalį padalinus iš visų navikinių mėginių skaičiaus ir išreikšus procentais. Siekiant įvertinti tinkamumą diagnostikai, buvo apskaičiuoti genų jautrumo ir specifiškumo rodikliai: jautrumas = metilinti navikiniai mėginiai/visi navikiniai mėginiai $\times 100\%$; specifiškumas = metilinti nenavikiniai mėginiai/visi nenavikiniai mėginiai $\times 100\%$. Kokybinės metilinimo dažnio sąsajos su ligonių demografiniais ir klinikopatologiniais rodikliais tikrintos tiksliau Fišerio testu (angl. *Fishers's exact test*). Kiekybiniai kintamieji buvo lyginami Mann-Whitney testu (angl. *Mann-Whitney U test*). Statistiškai reikšmingu skirtumu buvo laikomos vertės, kai $P \leq 0,050$.

Visi skaičiavimai buvo atlikti naudojant *GraphPad Prism 7*, *STATISTICA 8* ir *Microsoft Excel 2016*. Grafikai braižyti naudojant *GraphPad Prism 7* programą.

III. REZULTATAI

3.1. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių hipermetilinimas navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose

Navikinių mėginių hipermetilinimo dažnis *FBN2* atveju siekė 48,4 % (61/126), *SIM1* – 17,6 % (22/126) ir *TAC1* atveju – 60,6 % (77/126). Visų tirtų genų navikinių mėginių hipermetilinimo dažnis buvo statistiškai reikšmingai didesnis ($P < 0,001$) už nenavikinių mėginių hipermetilinimo dažnį, kuris visais atvejais buvo vienodas – 5,7 % (2/35) (3.1 pav.)



3.1 pav. Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio palyginimas tarp navikinių ir nenavikinių mėginių.

Siekinat įvertinti tirtų genų tinkamumą ILK biožymenų kūrimui, kiekvienam iš genų buvo apskaičiuoti jautrumas (gauti metilinti navikiniai mėginiai/visi navikiniai mėginiai $\times 100\%$) bei specifiškumas (gauti metilinti nenavikiniai mėginiai/visi nenavikiniai mėginiai $\times 100\%$). Visų žymenų specifiškumas siekė 94 % ir buvo žymiai didesnis už jautrumą (3.1 lentelė).

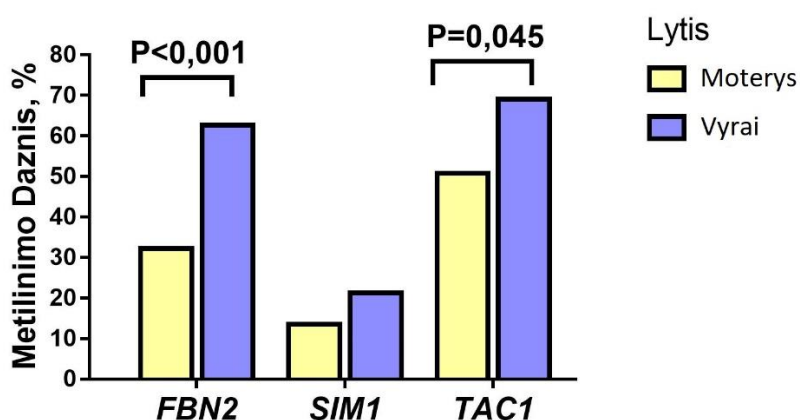
3.1 lentelė. Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* jautrumas ir specifiškumas

Genas	Jautrumas (%)	Specifiškumas (%)
<i>FBN2</i>	49	94
<i>SIM1</i>	17	94
<i>TAC1</i>	61	94

3.2 Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių hipermetilinimo sąsajos su demografiniais rodikliais

3.2.1 Sąsaja su lytimi

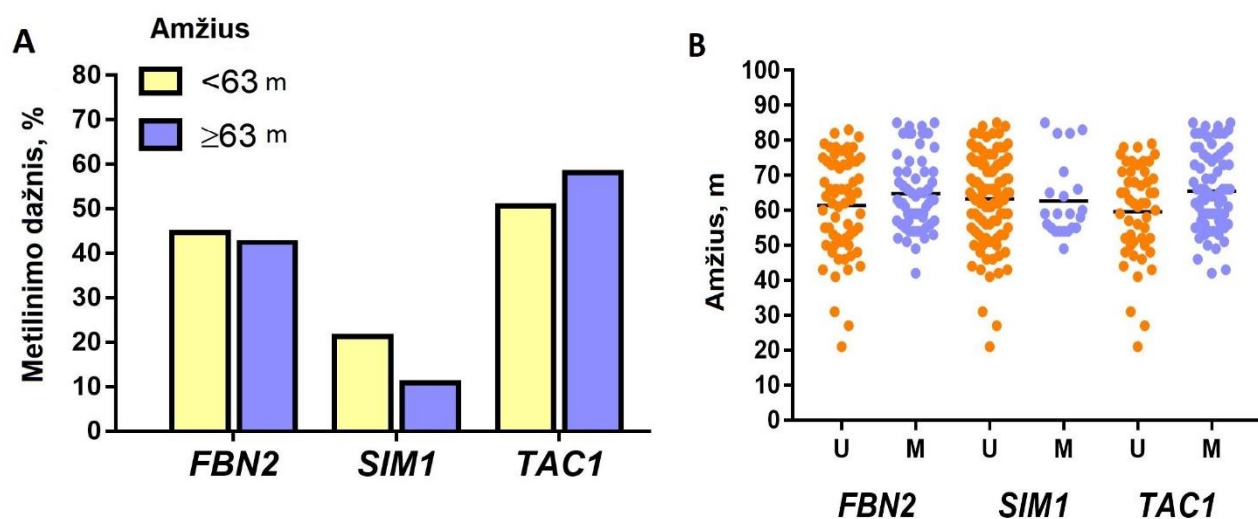
Palyginus tirtų genų promotorių hipermetilinimo dažnius tarp vyrų (N = 68) ir moterų (N = 58), buvo nustatyta, kad hipermetilinimo dažnis visų genų atveju yra didesnis vyrų navikuose. Statistiškai reikšmingas skirtumas buvo rastas *FBN2* (62,6 vs. 32,2 %, $P < 0,001$) ir *SIM1* (21,2 vs. 13,5 %, $P = 0,045$) genų atvejais (3.2 pav).



3.2 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsaja su lytimi

3.2.2 Sąsaja su amžiumi

FBN2, *SIM1* ir *TAC1* genų promotorių metilinimo dažnis buvo palygintas tarp dviejų ligonių amžiaus grupių, suskirstytų pagal medianą: < 63 metų ir ≥ 63 metų (amžiaus intervalas 21-85 m.). Šiek tiek didesnis metilinimo dažnis buvo nustatytas jaunesnių negu 63 metų pacientų amžiaus grupėje *FBN2* ir *SIM1* genų atvejais, tačiau didesnis *TAC1* geno metilinimo dažnis buvo būdingas vyresniems pacientams (3.3 A pav). Taip pat buvo atlikta kiekybinė tirtų genų hipermetilinimo priklausomybės nuo amžiaus analizė (3.3 B pav), tačiau statistiškai patikimų sąsajų tarp metilinimo dažnio ir amžiaus nebuvo rasta nei kokybinėje, nei kiekybinėje analizėje.

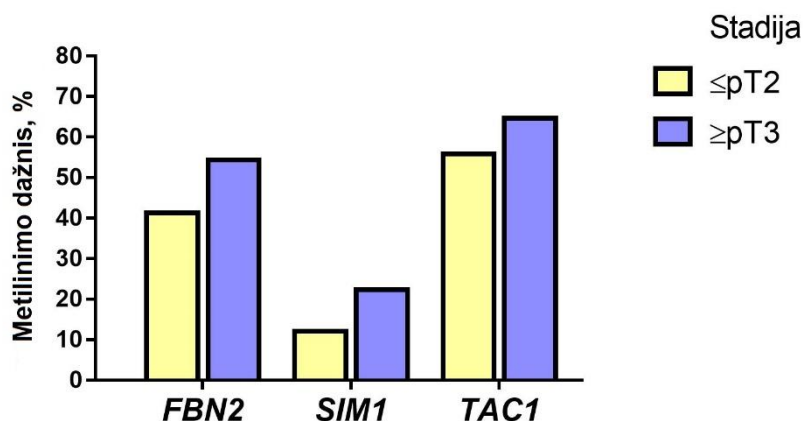


3.3 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsaja su amžiumi. A – kokybinė tirtų genų metilinimo dažnio analizė, ligonius pagal amžių suskirsčius į dvi grupes pagal medianą. B – kiekybinė analizė, kur taškais vaizduojami atitinkamo amžiaus ligonių metilinti ir nemetilinti mėginiai

3.3 Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių hipermetilinimo sąsajos su klinikiniais rodikliais

3.3.1. Sąsaja su naviko stadija

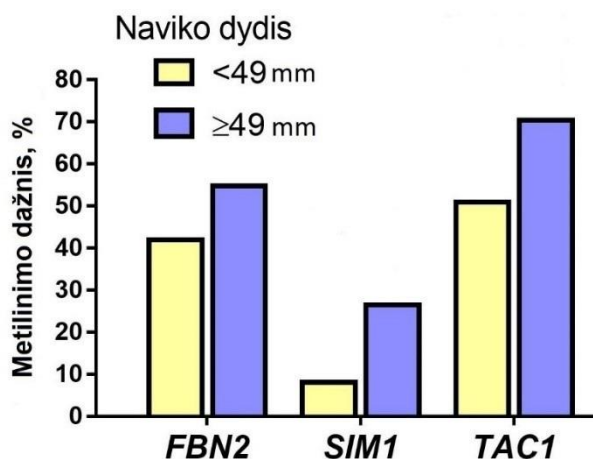
Įvertinus genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsają su ILK stadija, hipermetilinimo dažnis buvo šiek tiek didesnis aukštesnės stadijos navikuose (54,4 vs. 41,3 %, 22,3 vs. 12,06 % ir 64,7 vs. 55,9 %, atitinkamai) (3.4 pav.), tačiau statistiškai reikšmingų sąsajų nebuvo rasta.



3.4 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnis pagal naviko stadiją

3.3.2. Sąsaja su naviko dydžiu

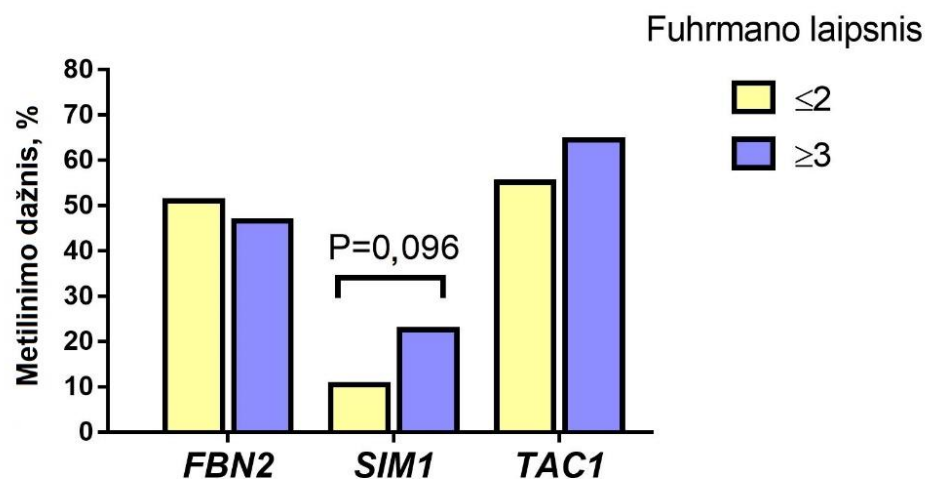
Suskirsčius navikus pagal naviko dydžio medianą į < 49 ir ≥ 49 mm navikų grupes (intervalas 20-180 mm), hipermetilinimo dažnis buvo didesnis didesniuose navikuose (3.5 pav.).



3.5 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsaja su naviko dydžiu.

3.3.3. Sąsaja su Fuhrmano laipsniu

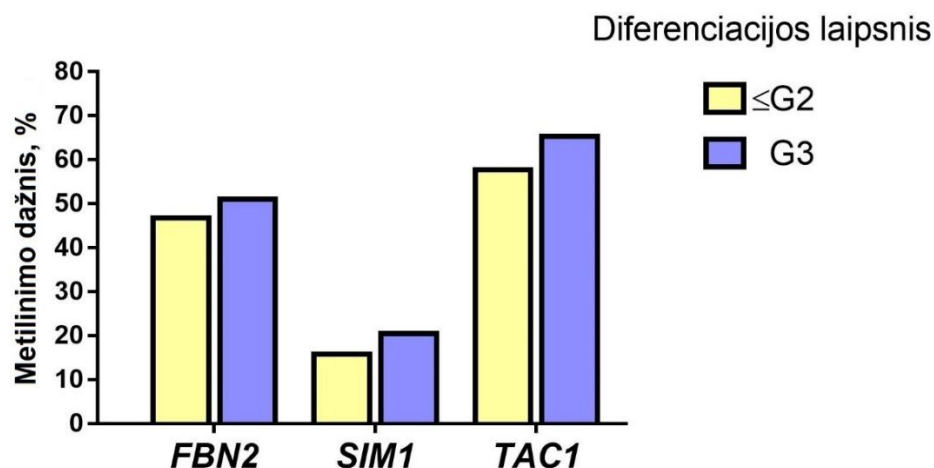
Įvertinus tirtų genų hipermetilinimo dažnio sąsają su Fuhrmano laipsniu, didesnis hipermetilinimo dažnis buvo nustatytas ≥ 3 Fuhrmano laipsnį turinčiuose mėginiuose *SIM1* ir *TAC1* genų atveju (22,6 vs. 10,4 %, 64,4 vs. 55,1 % atitinkamai) ir ≤ 2 Fuhrmano laipsnį turinčiuose navikų mėginiuose *FBN2* geno atveju (43,6 vs. 51 %). Statistiškai patikimų sąsajų rasta nebuvo, tačiau *SIM1* geno atveju nustatyta priklausomybės tendencija ($P = 0,096$) (3.6 pav.).



3.6. pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilavimo dažnio sąsaja su Fuhrmano laipsniu

3.3.4. Sąsaja su diferenciacijos laipsniu

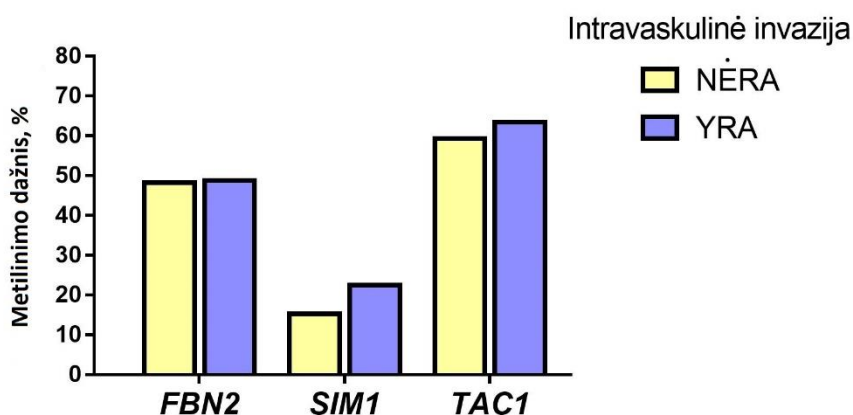
Įvertinus hipermetilavimo dažnio ryšį su diferenciacijos laipsniu, buvo pastebėta, kad visi tirti genai yra šiek tiek dažniau metilinti atvejuose, kuriems nustatytas G3 diferenciacijos laipsnis: 51 vs. 46,7 %, 20,4 vs. 15,78 %, 65,3 vs. 57,7 %, atitinkamai. Tačiau statistiškai reikšmingų sąsajų tarp naviko diferenciacijos laipsnio ir tirtų genų hipermetilavimo dažnio nustatyta nebuvo (3.7 pav.).



3.7 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilavimo dažnio sąsaja su diferenciacijos laipsniu

3.3.5. Sąsaja su intravaskulinės invazijos statusu

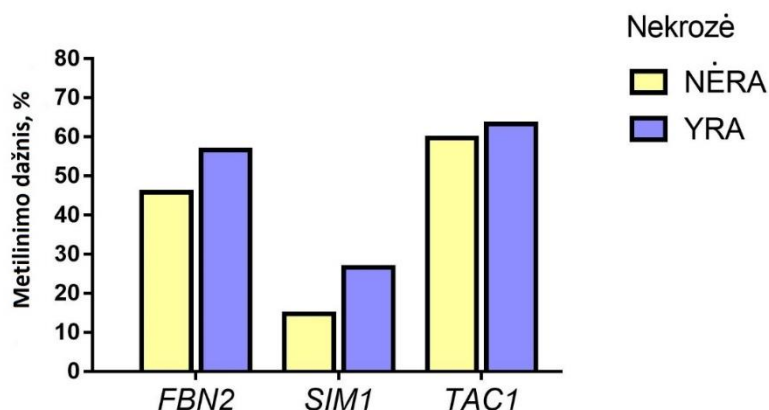
Įvertinus *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio priklausomybę nuo intravaskulinės invazijos, buvo nustatyta, kad didesnis hipermetilinimo dažnis aptinkamas atvejuose, kuriuose ji pasireiškė (48,7 vs. 48,2, 22,5 vs. 15,3, 63,4 vs. 59,3 % atitinkamai), tačiau statistiškai reikšmingų sąsajų nustatyta nebuvo.



3.8 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsaja su intravaskulinės invazijos statusu

3.3.6. Sąsaja su nekrozės statusu

Įvertinus hipermetilinimo dažnio sąsają su nekrozės statusu, didesnis *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* genų hipermetilinimo dažnis buvo nustatytas tuose atvejuose, kuriems nekrozė pasireiškė (56,6 vs. 45,8 %, 26,6 vs. 14,7 %, 63,3 vs. 59,7 %, atitinkamai) (3.8 pav.). Statistiškai reikšmingos priklausomybės tarp *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio ir nekrozės pastebėta nebuvo.



3.9 pav. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* hipermetilinimo dažnio sąsaja su nekrozės statusu

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

Inkstų vėžys yra labai paplitusi neoplastinė šlapimo takų sistemos liga, o Lietuva pagal mirtingumą nuo inkstų vėžio yra antroje vietoje pasaulyje. Šiuo metu inkstų vėžio diagnostika yra paremta ultrasonografijos ir kompiuterinės tomografijos tyrimais bei biopsija, tačiau šie metodai nėra pakankamai efektyvūs. Labai trūksta patikimų biožymenų, kuriais remiantis ligą būtų galima nustatyti ankstyvose vystymosi stadijose. DNR metilinimo pakitimai randami jau ankstyvuose naviko vystymosi etapuose, be to, gali būti aptinkami ne tik navikiniame audinyje, bet ir kraujyje, šlapime ir kt., todėl yra tinkami neinvazinei vėžio diagnostikai (Mikeska ir Craig, 2014).

Šiame tyrime buvo analizuojami *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* genų metilinimo pokyčiai inkstų navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose, siekiant nustatyti šių genų tinkamumą inkstų vėžio diagnostikai. Pirmiausia buvo nustatyta, kad tirtų genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių hipermetilinimas yra specifiskas navikiniam mėginiams – navikinių mėginių hipermetilinimo dažnis (48,4; 17,6; 60,6 %, atitinkamai) buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginus su nenavikiniais mėginiais (5,7 %, $P < 0,001$). Kitų tyrėjų atliktų visuminių genomo metilinimo tyrimų duomenimis, *FBN2* geno metilinimo dažnis ILK taip pat buvo gana didelis ir vidutiniškai siekė 37,0 % (Morris ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2012; Ricketts ir kt., 2014), o nenavikiniuose mėginiuose buvo artimas 0 %. Kadangi *SIM1* ir *TAC1* genų atveju metilinimo tyrimų su inkstų vėžiu kol kas nėra, mūsų gautas hipermetilinimo dažnis buvo palygintas su kitų lokalizacijų vėžio tyrimais ir kartu su išsamiais *FBN2* tyrimo rezultatais pateiktas 4.1 lentelėje.

4.1 lentelė. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* genų metilinimo tyrimai inkstų ląstelių karcinomos (ILK) ir kitų lokalizacijų navikuose

Genai	Mūsų gautas hipermetilini mo dažnis	Vidutinis hipermetilini mo dažnis publikacijose	
		Inkstų vėžys	Kitų lokalizacijų vėžys
<i>FBN2</i>¹	48,4 %	40,2; 52,5; 34; 21,1 % (vidutiniškai 37,0 %)	Nesmulkia ląstelinis plaučių – 49 % (MSP) Storosios žarnos – 86 % (QMSP)
<i>SIM1</i>²	17,6 %	-	Gimdos kaklelio – 36,6 % (QMSP) Krūties – 75 % (MSP, QMSP)
<i>TAC1</i>³	60,6 %	-	Storosios žarnos – 47 % (QMSP) Krūties > 40 % (MSP)

1 - Chen ir kt., 2005; Morris ir kt., 2011; Ricketts ir kt., 2012; Ricketts ir kt., 2014; Yi ir kt., 2012

2 - Kim ir kt., 2018; Xiang ir kt., 2013

3 - Jeschke ir kt., 2012; Ma ir kt., 2019

QMSP – kiekybinė metilinimui jautri PGR

Išanalizavus *FBN2* hipermetilini mo dažnio sąsajas su ligonių demografiniais rodikliais (amžiumi, lytimi), nustatyta, kad šiame tyrime *FBN2* statistiškai patikimai dažniau buvo metilintas vyrų navikuose ir šie duomenys sutampa su kitų tyrėjų gautais duomenimis (48,4 vs. 40,2 %; Ricketts ir kt., 2014). Yra žinoma, kad ILK vyrams pasireiškia apie dukart dažniau nei moterims, taip pat vyrų mirtingumas sudaro beveik du trečdalius visų mirčių nuo ILK (Ljungberg ir kt., 2011). Didesnis hipermetilini mo dažnis buvo nustatytas 3 ir aukštesnės stadijos bei aukštesnio diferenciacijos laipsnio ir didesniuose navikuose, taip pat navikuose, kuriems buvo būdinga invazija ir nekrozė. Kadangi detalios *FBN2* hipermetilini mo dažnio sąsajos su ligonių klinikopatologiniais rodikliais ILK atveju kol kas publikuotos nebuvo, panašių tendencijų galima paieškoti kitų lokalizacijų vėžio *FBN2* tyrimuose. Dažniausiai *FBN2* metilinimas nustatomas nesmulkia ląstelinio plaučių (Chen ir kt., 2005) ir storosios žarnos (Hibi ir kt., 2012) vėžio atvejais (4.1 lentelė). Nors minėtų lokalizacijų vėžio atveju *FBN2* genas yra ypač metilinas ankstyvose vystymosi stadijose (Chen ir kt., 2005; Yi ir kt., 2012), Yi su kolegomis didžiausią *FBN2* geno metilinimą nustatė 3 stadijos (91 %) navikuose ir tai atitinka mūsų tyrimo duomenis. Analizuojant *FBN2* geną nesmulkia ląsteliname plaučių vėžyje, Chen su kolegomis (Chen ir kt., 2005) nustatė sąsają su naviko dydžiu, kas atitinka ir mūsų tyrimo rezultatus. Taigi mūsų tyrimo rezultatai prisideda prie kitų atliktų *FBN2* metilinimo tyrimų ir patvirtina jo aukštą diagnostinę vertę.

Kaip jau minėta, *SIM1* geno metilinimo tyrimų su inkstų vėžiu rasta nebuvo (4.1 lentelė). *SIM1* randamas kaip ypač metilintas gimdos kaklelio (95,6 %, Kim ir kt., 2018), ir krūties vėžio atveju (75 %, Miyamoto ir kt., 2005; 92 %, Faryna ir kt., 2012), tačiau mūsų darbe metilinimo dažnis siekė tik 17,6 %. Nors metilinimo dažnis buvo nedidelis, tačiau, įvertinus hipermetilinimo dažnio ir klinikopatologinių rodiklių sąsajas, nustatytos panašios tendencijos kaip ir kitų tyrėjų darbuose. Pavyzdžiui, kaip ir mūsų darbe, *SIM1* buvo dažniau metilintas aukštesnės stadijos (Kim ir kt., 2018) ir didesnio invazyvumo navikuose (Faryna ir kt., 2012). To priežastimis gali būti besiskiriantys metodai ar ILK vystymosi ypatumai. Taip pat net 97 % mūsų tirtos imties sudarė šILK subtipo navikai, tad galutinai vertinti diagnostines *SIM1* galimybes reikėtų tik ištyrus didesnę kitų subtipų ILK imtį.

Daugiausia *TAC1* geno metilinimo tyrimų atlikta krūties ir storosios žarnos vėžyje (4.1 lentelė). Išanalizavus *TAC1* geno hipermetilinimo dažnio sąsają su ligonių demografiniais ir klinikopatologiniais rodikliais, šiame tyrime buvo nustatyta, kad *TAC1* yra labiau metilintas vyrų nei moterų navikuose, ir tai atitinka aukščiau aptartą didesnę bendrą vyrų sergamumą ILK. Šiame tyrime *TAC1* genas buvo labiau metilintas didesnės stadijos ILK navikuose, bet tai tik dalinai atitinka kitų tyrėjų duomenis (Jeschke ir kt., 2012; Rasmussen ir kt., 2018). Tiriant *TAC1* hipermetilinimą krūties vėžio atveju, Jeschke su kolegomis (Jeschke ir kt., 2012) nustatė reikšmingą tiesioginę priklausomybę tarp *TAC1* metilinimo ir naviko stadijos: kuo didesnė stadija, tuo daugiau *TAC1* genas buvo metilintas, ir tai atitinka mūsų gautus rezultatus ILK atveju. Tačiau Rasmussen tyrėjų grupės (Rasmussen ir kt., 2018) krūties vėžio tyrime didžiausias hipermetilinimo dažnis buvo rastas 2 stadijos navikuose, kas prieštarauja mūsų gautiems rezultatams, o skirtumai galėjo atsirasti dėl kito tipo naviko biologijos arba skirtingų metodų. Taip pat buvo nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos tarp *TAC1* geno hipermetilinimo dažnio ir diferenciacijos laipsnio bei intravaskulinės invazijos (Jeschke ir kt., 2012). Tai atitinka mūsų gautus rezultatus ir nors statistiškai patikimų verčių nustatyta nebuvo, tačiau įžvelgtos panašios tendencijos leidžia daryti išvadas apie *TAC1* tinkamumą ILK tyrimams.

Ištyrus genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* metilinimą ILK ir palyginus su kitų tyrėjų atliktais tyrimais, įžvelgiamos panašios tendencijos. Gausūs tyrimai kitų lokalizacijų navikuose, reikšmingų asociacijų gausa ir aukšti jautrumo ir specifiškumo rodikliai ILK parodė, kad jie būtų tinkami inkstų vėžio molekuliniai biožymenys ankstyvai ILK diagnostikai.

IŠVADOS

1. MSP metodu nustatytas *FBN2*, *SIM1*, *TAC1* genų hipermetilinimo dažnis navikiniuose mėginiuose (48,4; 17,6; 60,6 %, atitinkamai) buvo statistiškai reikšmingai didesnis už nenavikinių mėginių hipermetilinimo dažnį (5,7 %, $P < 0,001$); visų genų specifiškumas siekė 94 %.
2. *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* genų hipermetilinimas buvo didesnis vyrų navikuose, statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas *FBN2* (62,6 vs. 32,2 %, $P < 0,001$) ir *SIM1* (21,2 vs. 13,5 %, $P = 0,045$) genų atvejais.
3. Didesnis hipermetilinimo dažnis buvo nustatytas aukštesnės stadijos, didesniems, aukštesnio Fuhrmano bei diferenciacijos laipsnio navikams ir tiems atvejams, kuriems buvo būdinga invazija ir nekrozė ($P > 0,05$).

Darbą atliko: Jevgenij Ganža _____

Darbo vadovė: j. asist. Kristina Stuoopelytė _____

prof. dr. (HP) Sonata Jarmalaitė

VILNIUS UNIVERSITY

Life science center

Institute of Biosciences

JEVGENIJ GANŽA

Promoter DNA methylation analysis of *FBN2*, *SIM1* and *TAC1* genes in renal cancer

Bachelor thesis

SUMMARY

Renal cell carcinoma (RCC) is the most lethal neoplastic disease of the urinary system and represents 2-3% of all cancers in adults with clear cell RCC as predominant subtype. Lithuania is in the second place by RCC rates in Europe, followed by Estonia and Latvia. Moreover, Lithuania takes the second place by RCC mortality rate in the world. Currently, there are no widely accepted tumor markers for clinical diagnosis of RCC. Therefore identification of novel molecular biomarkers for early detection of disease is needed. DNA methylation have the ability to modulate gene expression and are the best studied epigenetic phenomena, related to the development of RCC. The alterations of DNA methylation are observed early during cancer development therefore may be the valuable tool for early cancer detection. The purpose of this study was to analyze DNA methylation at the promoter region of *FBN2*, *SIM1* and *TAC1* genes in the RCC samples.

Promoter methylation of the genes was evaluated by methylation-sensitive polymerase chain reaction (PCR) in 126 cancerous renal samples. The results showed, that the promoters of all genes were frequently methylated in the investigated tumor samples. The methylation frequency of *FBN2*, *SIM1* and *TAC1* reached 48.4, 17.6 and 60.6 %, respectively. During the investigation were found statistically reliable associations between the hypermethylation levels of the examined genes and some clinical-pathological parameters.

In conclusion, *FBN2*, *SIM1* and *TAC1* changes in methylation may be related to the kidney cancer development, however the further quantitative methylation research in liquid biopsy is needed.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

JEVGENIJ GANŽA

Genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotoriaus DNR metilinimo tyrimai inkstų navikuose

Genetikos bakalauro studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Inkstų ląstelių karcinoma (ILK) yra didžiausiu mirtingumu pasižyminti neoplastinė šlapimo takų sistemos liga, sudaranti maždaug 2-3% visų vėžio atvejų tarp suaugusiųjų. Šviesių ląstelių ILK (šILK) yra dažniausiai pasireiškiantis inkstų vėžio subtipas. Pagal sergamumą šia liga, Lietuva užima antrą vietą Europoje po Baltarusijos, trečioje vietoje yra Latvija, po kurios seka Estija. Tačiau Lietuva užima antrą vietą pagal mirtingumą nuo ILK visame pasaulyje. Iki šiol nėra patikimų žymenų ankstyvam klinikiniam inkstų vėžio diagnozavimui. Dėl to naujų molekulinų biožymenų nustatymas galėtų pagerinti ankstyvą ILK diagnostiką. DNR metilinimo pokyčiai geba keisti genų raišką ir yra plačiausiai studijuojamas epigenetinis fenomenas, siejamas su inkstų vėžio vystymusi. Šie DNR metilinimo pakitimai nustatomi jau ankstyvose vėžio vystymosi stadijose, dėl to galėtų būti patikimais diagnostiniais žymenimis. Šio darbo tikslas buvo nustatyti genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* promotorių metilinimo būseną inkstų navikuose.

Genų promotorių metilinimo būseną buvo nustatoma metilnimui jautrios PGR metodu 126-iose navikiniuose inkstų mėginiuose. Buvo nustatyta, kad visi genai buvo metilinti inkstų navikiniuose mėginiuose su rodikliais (48,4, 17,6 ir 60,6 %, atitinkamai). Taip pat tyrimo metu buvo rastos statistiškai patikimos sąsajos su ligonių klinikopatologiniais rodikliais.

Apibendrinant, genų *FBN2*, *SIM1* ir *TAC1* metilinimo pokyčiai gali būti siejami su inkstų vėžio vystymusi. Tolimesniems tyrimams yra būtina patikrinti šiuos biožymenis kiekybiniais metodais skystoje biopsijoje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Internetiniai šaltiniai

1. Cancer.sanger.ac.uk [internetinė svetainė]. COSMIC. Genes mutated in clear renal cell carcinoma. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Didžioji Britanija, 2014. Prieiga per internetą: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=kidney&ss=all&hn=carcinoma&sh=clear_cell_renal_cell_carcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n. [Žiūrėta 2019-04-18].
2. Chalouhy CE, Cheuck L, Gest TR, Hoenig DM, Ghiraldi EM. Kidney Anatomy. MedScape. 2017. [cituota 2019-04-15]; [apie 2 psl.]. Adresas : <https://emedicine.medscape.com/article/1948775-overview>
3. Healthpages.org [internetinė svetainė]. Kidney Anatomy and Function. HealthPages.org, Inc.; [cituota 2019-03-27]. Adresas : <https://www.healthpages.org/anatomy-function/kidney/>
4. nvi.lt [internetinė svetainė]. Nacionalinis vėžio institutas. [Atnaujinta 2018-12-28; cituota 2019-01-11]. Adresas : <https://www.nvi.lt/>
5. pathologyOutlines.com [internetinė svetainė]. Well differentiated neuroendocrine tumor (carcinoid). PathologyOutlines.com, Inc.; [Atnaujinta 2019-03-06; cituota 2019-04-08]. Adresas : <http://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantcarcinoid.html?mobile=off>

Literatūriniai šaltiniai

1. Agirre X. *et al.* Whole-genome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res.* 2015;25(4):478-87.
2. Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, Saini AK, Sultana S. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population. *Tumour Biol.* 2012;33:395–402.
3. Allis DC, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17:487–500.
4. Arai, E. *et al.* Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int. J. Cancer.* 2006;119:288–296. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP, Koczkodaj P, Przybylski J. Selected tumor markers in the routine diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Arch Med Sci.* 2016;12(4):856–863.
5. Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 2010;10:658–664.
6. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16(4):168-74.

7. Bestor TH, Edwards JR, Boulard M. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:6796–67999.
8. Biswas B, Wahal SP, Gulati A. Renal oncocytoma: A diagnostic dilemma on cytology. *J Cytol*. 2014;31(1):59–60.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 68:394-424.
10. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):579-91.
11. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2005;50(1):43-9.
12. Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Köllermann J, Krause H, Miller K, Schostak M, Schrader M. Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer. *Br J Cancer*. 2006;95(12):1701-7.
13. Christoph, F. et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. *Clin. Cancer Res*. 2006;12,5040–5046.
14. Clague J, Shao L, Lin J, Chang S, Zhu Y, Wang W, Wood CG, Wu X. Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):706-10.
15. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499 : 43–9.
16. Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*. 2010;463(7279):360-3.
17. Dharmawardana PG, Giubellino A, Bottaro DP. Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Curr Mol Med*. 2004;4(8):855-68.
18. Dulaimi E, de Caceres II, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE, Cairns P. Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:3972-3979.
19. Dunnick NR. Renal cell carcinoma: staging and surveillance. *Abdom Radiol (NY)*. 2016;41(6):1079-85.
20. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
21. Ellinger, J. et al. DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2011;107,664–669.

22. Faryna M, Konermann C, Aulmann S, et al. Genome-wide methylation screen in low-grade breast cancer identifies novel epigenetically altered genes as potential biomarkers for tumor diagnosis. *FASEB J*. 2012;26:4937–4950.
23. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;(4):143–153.
24. Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*. 2010;(330):622–627.
25. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*. 2008;59:267–80.
26. Gaudet F. et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003;300:489–492.
27. Gerlinger M. et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet*. 2014;46:225–233.
28. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):55–64.
29. Gossage, L. et al. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53, 38–51.
30. Grillo MA, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products. *Amin Acids*. 2008; 34(2):187–93.
31. Guo JH. et al. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2014;17(2):215–22.
32. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*. 2015;7(2):247–65.
33. Hauser S, Zahalka T, Fechner G, Muller SC, Ellinger J. Serum DNA hypermethylation in patients with kidney cancer: results of a prospective study. *Anticancer Res*. 2013;33:4651–4656.
34. Hibi K, Mizukami H, Saito M, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. FBN2 methylation is detected in the serum of colorectal cancer patients with hepatic metastasis. *Anticancer Res*. 2012;32(10):4371–4.
35. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, et al.. Quantitative Detection of Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in the Tumor, Urine, and Serum DNA of Patients with Renal Cancer. *Cancer Res*. 2004;64(15):5511–7.
36. Hossain S et al. Identification of mutations through dominant screening for obesity using C57BL/6 substrains. *Scientific Reports*. 2016;(6):32453.
37. Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*. 2008;27(3):404–8.

38. Hu CY, Mohtat D, Yu Y, Ko Y-A, Shenoy N, Bhattacharya S, et al. Kidney cancer is characterized by aberrant methylation of tissue-specific enhancers that are prognostic for overall survival. *Clin Cancer Res.* 2014;20:4349–60.
39. Hulbert A. et al.. Early Detection of Lung cancer Using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clin Cancer Res.* 2017;23(8):1998-2005.
40. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 2005;114(1):101-8.
41. Ibragimova I, Maradeo ME, Dulaimi E, Cairns P. Aberrant promoter hypermethylation of PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A and other chromatin-modifying genes is absent or rare in clear cell RCC. *Epigenetics.* 2013;8(5):486-93.
42. Jeschke J. et al. Biomarkers for detection and prognosis of breast cancer identified by a functional hypermethylation screen. *Epigenetics.* 2012;7(7):701-9
43. Jögi A, Vaapil M, Johansson M, Pålman S. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci.* 2012;117(2): 217–224.
44. Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, Melotte V, Koch A, Tjan-Heijnen VC, van Engeland M. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nat Rev Urol.* 2018;15(7):430-451.
45. Kabat GC. et al. A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *Br J Cancer.* 2007;96:845–849
46. Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2008;8:865–873.
47. Karakiewicz P. et al. Age at diagnosis is a determinant factor of renal cell carcinoma–specific survival in patients treated with nephrectomy. *Can Urol Assoc J.* 2008;2(6): 610–617.
48. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after Kidney Transplantation in the United States. *American Journal of Transplantation.* 2004;4(6):905-13.
49. Kim HJ, Kim CY, Jin J, Bae MK, Kim YH, Ju W, Kim YH, Kim SC. Aberrant single-minded homolog 1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2018;46(1) :15-21
50. Kim JH. et al. Klotho plays a critical role in clear cell renal cell carcinoma progression and clinical outcome. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016;20(3):297–304.
51. Klinghoffer Z, Yang B, Kapoor A, Pinthus JH. Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(7):975-87.
52. Kruk M, Kurek J, Osowski S, Koktysz R. Improved computer recognition of Furhman grading system in analysis of Cler-Cell Renal Carcinoma. *Computational Vision and Medical Image Processing.* 2016;5:221-227.
53. Laird PW. Early detection: The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3(4):253-66.

54. Lim DL, Ko R, Pautler SE. Current understanding of the molecular mechanisms of kidney cancer: a primer for urologists. *Can Urol Assoc J*. 2007;1(2):S13–S20.
55. Lin RK, Wang YC. Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci*. 2014;4-46.
56. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2011; 60(4):615-21.
57. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, et al. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol*. 2009;16:432-43.
58. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, et al. 2004 WHO classification of renal tumours of the adults. *Eur Urol*. 2006;49:798-805.
59. Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene*. 2012;(31):1609-1622.
60. Maitland ML, Kasza KE, Karrison T, Moshier K, Sit L, Black HR, Undevia SD, Stadler WM, Elliott WJ, Ratain MJ. Ambulatory monitoring detects sorafenib-induced blood pressure elevations on the first day of treatment. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(19):6250-7.
61. Marui *et al*. Tachykinin 1 (TAC1) gene SNPs and haplotypes with autism: A case-control study. *Brain & development*. 2007;29:510-513.
62. Maunakea K *et al*. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. 2010;466(7303):253-7.
63. Mendoza-Perez J, Gu J, Herrera LA, Tannir NM, Matin SF, Karam JA, et al. Genomic DNA hypomethylation and risk of renal cell carcinoma: a case–control study. *Clin Cancer Res*. 2016;22:2074–82.
64. Mikeska T, Craig JM. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes(Basel)*. 2014;5(3):821–864.
65. Mistrova E, Kruzliak P, Chottova-Dvorakova M. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides*. 2016;58:41-51.
66. Mittal BV, Singh AK. Hypertension in the developing world: challenges and opportunities. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(3):590.
67. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer*. 2005;116(3):407-14.
68. Mo S, Su Z, Heng B, Chen W, Lai C. TIMP3 Promoter Hypermethylation Contributes to the Risk of Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Biomed Res Clin Prac*. 2017; DOI: 10.15761/BRCP.1000152.
69. Moore LE. *et al*. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet*.. 2011; 7(10):e1002312.

70. Mori Y. *et al.* A genome-wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin, tachykinin-1, and 5 other genes in colon cancer. *Gastroenterology*. 2006;131(3):797-808.
71. Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29(14):2104-17.
72. Morris MR. *et al.* Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2011;30:1390–1401.
73. Muglia, Valdair F., Prando, Adilson. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia Brasileira*. 2015;48(3):166-174.
74. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D12–7.
75. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumour-suppressor gene. *Oncogene*. 1993;8:1063–1067.
76. Okuda H. *et al.* Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2006;25:1733–1742.
77. Onay H, Pehlivan S, Koyuncuoglu M, Kirkali Z, Ozkinay F. Multigene methylation analysis of conventional renal cell carcinoma. *Urol. Int*. 2009;83:83107–112.
78. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics*. 2014;9:823–828.
79. Pena-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavía-Jiménez A. *ir kt.* BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(7):751-9.
80. Perdeaux E, Solly J. Birt-Hogg-Dubé syndrome. *JAMA*. 2013;309(14):1460.
81. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.
82. Ramachandrappa S. *et al.* Rare variants in single-minded 1 (SIM1) are associated with severe obesity. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3042-3050.
83. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Pedersen IS, Madsen PH, Thorlacius-Ussing O. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2016;18(6):549-61.
84. Rasmussen SL. *et al.* The prognostic efficacy of cell-free DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(6):7010–7022.
85. Rechsteiner MP. *et al.* VHL gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor HIF α : identification of potential driver and passenger mutations. *Cancer Res*. 2011;71:5500–5511.
86. Ricketts CJ, Hill VK, Linehan WM. Tumor-specific hypermethylation of epigenetic biomarkers, including SFRP1, predicts for poorer survival in patients from the TCGA kidney renal clear cell carcinoma (KIRC) project. *PLoS ONE*. 2014;9:e85621.

87. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*. 2011;17(3):330-9.
88. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol*. 2007;1:19–25.
89. Sato Y. *et al*. Integrated molecular analysis of clearcell renal cell carcinoma. *Nature Genet*. 2013;45:860–867.
90. Schouten LJ, Deckers IA, van den Brandt PA, Baldewijns MM, van Engeland M. Alcohol and dietary folate intake and promoter CpG island methylation in clear- cell renal cell cancer. *Nutr. Cancer*. 2016;68:1097–1107.
91. Schultz MD. *et al*. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature*. 2015;523(7559):212-6.
92. Sharifi N, Farrar WL. Perturbations in hypoxia detection: a shared link between hereditary and sporadic tumor formation. *Med Hypotheses*. 2006;66(4):732-5.
93. Shen SS, Krishna B, Chirala R, Amato RJ, Truong LD. Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *ModPathol*. 2005;18(7):933-40.
94. Shenoy N, Pagliaro L. Sequential pathogenesis of metastatic VHL mutant clear cell renal cell carcinoma: putting it together with a translational perspective. *Ann. Oncol*. 2016;27:1685–1695.
95. Shenoy N, Vallumsetla N, Zou Y, Galeas JN, Shrivastava M, Hu C, Susztak K, Verma A. Role of DNA methylation in renal cell carcinoma. *BioMed Central*. 2015;8:88.
96. Shuch B, Ricketts CJ, Vocke CD, *et al*. Adrenal nodular hyperplasia in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Urol*. 2013;189(2):430-5.
97. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol*. 2015;67(1):85-97.
98. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:7–30.
99. Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*. 1999;22(2):203-6.
100. Smallwood SA. *et al*. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature Genet*. 2011;43:811–814.
101. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):204-20.
102. Sooriakumaran P, Anderson CJ. Everolimus for renal angiomyolipoma in tuberous sclerosis. *Lancet*. 2013;9869(381):783–785.
103. Stewart GD. *et al*. Dynamic epigenetic changes to VHL occur with sunitinib in metastatic clear cell renal cancer. *Oncotarget*. 2016;18:25241–25250.

104. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular Oncology*. 2012;(6):567-578.
105. Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics*. 2008;(9):1917-1928.
106. Tolson KP, Gemelli T, Gautron L, Elmquist JK, Zinn AR, Kublaoui BM. Postnatal Sim1 deficiency causes hyperphagic obesity and reduced Mc4r and oxytocin expression. *J. Neurosci.*, 2010;30:3803-3812.
107. van Vlodrop, I. J. H. et al. A four- gene promoter methylation marker panel consisting of GREM1, NEURL, LAD1, and NEFH predicts survival of clear cell renal cell cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 2017;23:2006–2018.
108. Wei JH. *et al.* A CpG-methylation-based assay to predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Nat. Commun*. 2015;6:8699.
109. Wobker SE, Williamson SR. Modern Pathologic Diagnosis of Renal Oncocytoma. *J Kidney Cancer VHL*. 2017;4:1–12.
110. Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, Bi S. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci*. 2009;29:179–190.
111. Yearim S, Gelfman R, Shayevitch S, Melcer O, Glaich J, Mallm P, NissimRafinia M, Cohen AH, Rippe K, Meshorer E. HP1 is involved in regulating the global impact of DNA methylation on alternative splicing. *Cell Rep*. 2015;10(7):1122-34.
112. Yi JM, Dhir M, Guzzetta A, Iacobuzio-Donahue CA, Heo K, Yang KM, Suzuki H, Toyota M, Kim HM, Ahuja N. DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. *Tumor Biol*. 2012;33:363–372.
113. Yoshimitsu K, Kakihara D, Irie H, et al. Papillary renal carcinoma: diagnostic approach by chemical shift gradient-echo and echo-planar MR imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2006;23:339-44.
114. Young AC. *et al.* Analysis of VHL gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2009;15:7582–7592.
115. Zakhari S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. *Alcohol Res*. 2013;35(1):6-16.
116. Zhang GM, Zhu Y, Ye DW. Metabolic syndrome and renal cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 2014;12:236.
117. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000;1:392–397.
118. Ziller MJ, Muller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A. Genomic distribution and intersample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet*. 2011;7(12):e1002389.
119. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol*. 2015;67(3):519-30.

