

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**SU ANGIOGENEZE IR HIPOKSIJA SUSIJUSIŲ GENŲ DNR METILINIMO  
TYRIMAI PRIEŠINĖS LIAUKOS NAVIKUOSE**

Magistrantė AGNIEŠKA MACKOIT

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovė  
prof. dr. (HP) Sonata Jarmalaitė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

dokt. Kristina Daniūnaitė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2016 m., Vilnius

## Turinys

Tekste naudojami sutrumpinimai .....	3
<b>1. ĮVADAS.....</b>	<b>4</b>
1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai.....	5
<b>2. LITERATŪROS APŽVALGA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Priešinės liaukos vėžys, diagnostika ir paplitimas pasaulyje.....	6
2.2 Priešinės liaukos vėžio molekuliniai mechanizmai .....	8
2.3 DNR metilinimas ir jo reikšmė onkogenezei .....	10
2.4 Hipoksijos indukuota angiogenezė ir PLV patogenezė.....	13
2.5 Su angiogeneze ir hipoksija susijusių atrinktų genų charakteristikos .....	14
2.5.1 <i>ADAMTS12</i> genas .....	15
2.5.2 <i>FILIP1L</i> genas.....	15
2.5.3 <i>EPAS1</i> genas .....	17
<b>3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Ligoniai ir mėginiai .....	20
3.2 Reagentai, buferiai ir tirpalai.....	21
3.3 Įranga.....	22
3.4 Tyrimo metodai .....	22
3.4.1 DNR išskyrimas iš priešinės liaukos audinių .....	22
3.4.2 Bisulfitinė DNR modifikacija .....	23
3.4.3 Pradmenų kūrimas.....	24
3.4.4 Metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (MSP).....	25
3.5 Statistinė duomenų analizė.....	28
<b>4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>29</b>
4.1 MSP sąlygų optimizavimas.....	29
4.2 Tirtų genų metilinimo dažniai PLV ir GPH ligonių mėginiuose .....	30
4.3 Genų metilinimo sąsajos su ligonių klinikinėmis charakteristikomis .....	31
4.4 Rezultatų apibendrinimas .....	35
4.5 Rekomendacijos .....	36
<b>5. IŠVADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>38</b>
<b>7. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>39</b>
<b>8. PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE .....</b>	<b>45</b>
<b>PADĖKA .....</b>	<b>46</b>

## Tekste naudojami sutrumpinimai

*ADAMTS12* – genas, koduojantis 1 tipo trombospondino 12 motyvą turinčią metalopeptidazę

*AR* – androgenų receptorių koduojantis genas

CpG – citozinas, p - fosfodiesterinė jungtis, G - guanozinas

DNMT – DNR metiltransferazės

*EPAS1* – genas, koduojantis endotelinį PAS domeną turintį baltymą 1

*FILIP1L* – genas, koduojantis su 1 tipo filaminu A sąveikaujantį baltymą

GPH – gerybinė prostatos hiperplazija

*GSTP1* – genas, koduojantis glutationo S-transferazę  $\pi$  1

MSP – metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (angl. *methylation specific PCR*)

NSG – naviką slopinantis genas

PAA – poliakrilamidas

PHD – prolilhidroksilazės

PLV – priešinės liaukos vėžys

PSA – prostatos serumo antigenas

*PTEN* – naviką slopinantis genas, koduojantis fosfatazės ir tenzino homologą

pVHL – naviką slopinantis baltymas *von Hippel-Lindau*

RCC – inkstų ląstelių karcinoma (angl. *renal cell carcinoma*)

SAM-S – S-adenozilmetioninas

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. *vascular endothelial growth factor*)

## 1. ĮVADAS

Priešinės liaukos vėžys (PLV) yra piktybinis navikas, augantis priešinės liaukos periferinėje zonoje. Pagal sergamumą onkologinėmis ligomis, ši vėžio forma užima ketvirtą vietą pasaulyje, o daugelyje Vakarų Europos šalių išlieka antra tarp dažniausiai pasitaikančių vėžio lokalizacijų ir antra pagal mirštamumą vyrų populiacijoje [1]. Lietuvoje PLV yra aktuali sveikatos problema. Remiantis Lietuvos vėžio registro duomenimis, kiekvienais metais nustatoma apie 3000 naujų PLV atvejų [2, 12].

Piktybinių navikų formavimuisi ir augimui būtinas veiksnys - naujų kraujagyslinių tinklų susidarymas (angiogenezė), ypač standžiųjų audinių navikams, kurių diametras didesnis nei 1-2 mm. Tokių navikų fenotipą lemia sutrikusi angiogeninių ir antiangiogeninių veiksnių pusiausvyra. Iki šiol nėra gerai žinoma, dėl kokios priežasties ir kokių molekulinų mechanizmų stimuliacijos navikinės ląstelės išskiria tirpius angiogenetinius veiksnius, bet pastebėta, kad tokių veiksnių raiška padidėja navikinėse ląstelėse esant deguonies stygiui (hipoksijai), šiuo keliu skatinama neovaskuliarizacija. Kaip ir kitose vėžio formose, angiogenezė yra pripažinta pagrindiniu procesu, lemiančiu PLV vystymąsi [3, 4]. Angiogenozės atsiradimui turi įtakos ne tik genetinės, bet ir epigenetinės pažaidos, pvz., genų promotorinių sekų DNR metilinimas, kuris gali visiškai užslopinti genų raišką ir jų aktyvumą.

Šiuo metu plačiai taikomas vėžio biocheminis žymuo ankstyvosios PLV diagnostikos programose yra prostatos specifinio antigeno (PSA) koncentracijos kraujo serume nustatymas. Tačiau šis žymuo turi trūkumų, vienas iš jų yra žemas specifiskumas PLV. Todėl labai svarbu rasti naujus patikimus diagnostinius biožymenis, kurie būtų informatyvūs, tiksliai diagnozuotų vėžinius pakitimus ir identifikuotų ankstyvas ligos stadijas. Epigenetinių žymenų įdiegimas į klinikinę praktiką galėtų pagerinti ne tik PLV ankstyvą diagnostiką, bet ir leistų numatyti ligos progresavimą ir parinkti tinkamiausią gydymo būdą.

Šiame darbe, norint nustatyti potencialius molekulinis žymenis PLV diagnostikai, buvo atlikta DNR metilinimo analizė genų, susijusių su angiogeneze (*FILIP1L* ir *ADAMTS12*) ir atsaku į hipoksiją (*EPAS1*), reguliacinėse srityse. Nustatyti metilinimo pokyčiai buvo susieti su priešinės liaukos vėžio klinikiniais-patologiniais rodikliais bei ligonių amžiumi. Genai parinkti iš VU GMF ŽGTC atliktos visuminės epigenetinės priešinės liaukos navikinių ir histologiškai nepakitusių audinių analizės, atliktos DNR metilinimo mikrogardelėmis.

Šis tyrimas yra Lietuvos mokslo tarybos finansuoto projekto LIG-14/2012 dalis.

## 1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai

**Darbo tikslas** – ištirti su angiogeneze ir hipoksija susijusių genų *ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPAS1*, identifikuotų visuminės analizės metodu, promotorių DNR metilinimo būklę priešinės liaukos navikuose ir įvertinti šių molekulinį žymenų diagnostinę bei prognozinę vertę.

### **Uždaviniai:**

1. Nustatyti genų *ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPAS1* DNR metilinimo dažnį priešinės liaukos navikuose ir histologiškai nepakitusiuose priešinės liaukos audiniuose bei gerybinės prostatos hiperplazijos audiniuose.
2. Gautus rezultatus susieti su priešinės liaukos vėžio klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis ir ligonių amžiumi.
3. Įvertinti genų metilinimo, kaip diagnostinio ir prognostinio žymens, potencialą.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1 Priešinės liaukos vėžys, diagnostika ir paplitimas pasaulyje

Priešinė liauka - tai pridėtinė vyriškoji liauka, kurią sudaro raumeninis ir liaukinis (30-50 pūslelinių liaukų) audiniai. Jos veikla yra reguliuojama per nervinės-endokrininės sistemos ašį. Veikdama kartu su posmegenine liauka, ji užtikrina normalų lytinių ląstelių vystymąsi ir subrendimą. Priešinės liaukos ontogenezeje dalyvauja dviejų tipų ląstelės, epitelio ir stromos, kurios glaudžiai sąveikauja ir veikia parakriniškai, t.y. stromos ląstelėse vyksta augimo veiksnių gamyba ir išskyrimas, o jų taikiniai, specifiniai androgenų receptoriai, yra išsidėstę epitelinių ląstelių membranose. Vėžio atveju epitelinės ląstelės pasižymi autonomiškumu (nepriklausomas augimas nuo stromos ląstelių) dėl augimo veiksnių, kurie veikia ląsteles autokriniškai, šiuo keliu skatina ląsteles ekspresuoti ne tik augimo veiksnius, bet ir jiems specifinius receptorius [5-8].

Priešinės liaukos vėžys (PLV) yra dažniausiai registruojama piktybinė vyrų onkologinė liga. Daugeliu atvejų PLV vystosi periferinėje priešinės liaukos zonoje iš liaukinio audinio, sudarydama priešinės liaukos adenokarcinomos darinį; retais atvejais pasireiškia anaplastinė karcinoma. Navikas vystosi lėtai ir ankstyviesiems PLV onkogenezės etapams nėra būdingi jokie požymiai ir ligos simptomai, tačiau vėlesnėse stadijose naviko dydis turi įtakos šlaplės veiklai. PLV pasižymi molekulinį pokyčių heterogeniškumu, susijusiu su naviko diferenciacijos laipsniu ir ligos stadija, todėl sunku nustatyti jo bendrą gebėjimą progresuoti į agresyvesnę formą. Pažengus ligos stadijai navikas gali metastazuoti į aplinkinius limfmazgius, taip pat kaulus, storąją žarną bei kitus organus [9, 10].

Iki šiol nėra žinomos tikslios PLV vystymosi priežastys, tačiau išskiriama keletas rizikos veiksnių, kurie gali turėti įtakos PLV formavimuisi. Pastebėta ryški tendencija, kad susirgimo rizika didėja su amžiumi, ypač tarp vyresnių nei 50 metų vyrų. Kitas svarbus veiksnys yra šeimos anamnezė ir paveldimumas. Rizika susirgti padidėja iki dviejų kartų ar daugiau, jei pirmos eilės giminaičiai sirgo šia liga arba kai moteriškos lyties giminaičiai sirgo krūties vėžiu. Pagal naujausius tyrimus, nustatytas ryšys tarp gausaus riebalų ir kalcio vartojimo, seleno trūkumo maisto racione ir rizikos susirgti PLV [5, 9, 11].

Remiantis GLOBOCAN duomenimis, 2012 m. pasaulyje buvo diagnozuota apie 1,09 mln. naujų PLV atvejų ir apie 0,31 mln. vyrų mirė nuo šio susirgimo. Išsivysčiusiose šalyse PLV patenka į dažniausių vyrų onkologinių ligų sąrašą, įskaitant storosios žarnos, šlapimo pūslės ir plaučių vėžį. Bendroje sergamumo struktūroje PLV yra ketvirtas tarp labiausiai paplitusių vėžio formų. Didžiausi sergamumo rodikliai nustatyti Australijoje, Šiaurės

Amerikoje bei Šiaurės ir Vakarų Europoje. Mažiausi sergamumo rodikliai išlieka Azijos šalyse ir Centrinėje Afrikoje [1].

Lietuvos vėžio registro duomenimis, 2007 m. Lietuvoje nuo PLV mirė 582 ligoniai (37 atvejai 100 000 vyrų), o sergamumas siekė iki 231,4 atvejų 100 000 vyrų. Vien 2011 metais buvo užregistruota 2715 naujų PLV atvejų. Per pastarąjį dešimtmetį šis skaičius intensyviai didėja, ypač dėl paskutiniaisiais metais plačiai taikomo prostatos specifinio antigeno (PSA) tikrinimo. PLV išlieka dažniausia vyrų onkologinė liga Lietuvoje [12, 13].

Ankstyvųjų PLV diagnostikos programų pagrindinis tikslas – pagerinti ankstyvųjų vėžinių pakitimų nustatymą, siekiant sumažinti mirtingumo rodiklius. Tačiau patikros programų vykdymas, bei naujų gydymo algoritmų įdiegimas nepadidina tikslios PLV diagnozės tikimybės sergantiems pacientams ir ji išlieka tik apie 30% [10]. PLV diagnostika remiasi pataloginiais rodikliais, kaip naviko dydis, histologinis tipas, priešinės liaukos masė bei PSA koncentracijos kraujo serume nustatymas. Šie rodikliai suteikia svarbių įžvalgų apie biologinį naviko aktyvumą, bet jų patikimumas labai mažas, todėl daugumai pacientų liga nustatoma klaidingai. Medicinos įstaigose galutiniam išvados suformulavimui atliekama PSA testas ir priešinės liaukos audinių biopsijos tyrimai, siekiant tiksliai įvertinti pataloginius pokyčius audiniuose ir patvirtinti PLV diagnozę [14, 15].

PSA yra baltymas, kurį gamina priešinės liaukos epitelinės ląstelės, ir šio baltymo koncentracijos padidėjimas kraujyje yra ankstyvasis PLV žymuo. Normos atveju kiekvienas vyras turi tam tikrą koncentraciją PSA kraujo serume, kuri didėja su amžiumi. PSA testas remiasi padidėjusia baltymo koncentracija  $\geq 4$  ng/ml serume ankstyvųjų onkogenozės procesų metu dėl spartesnės baltymo gamybos ir išskyrimo. Tačiau šis testas turi tam tikrą trūkumą, iš kurių svarbiausiais yra žemas jautrumas bei specifiškumas PLV, nes baltymo koncentracija padidėja bet kokios kilmės priešinės liaukos uždegimų ir išvešėjimų metu. Padidėjusi baltymo koncentracija nustatoma daugiau negu 65% atvejų vyresnio amžiaus pacientuose. Svarbu paminėti, kad daugelis ligonių, sergančių PLV, gali neturėti būdingos padidėjusios PSA koncentracijos [16-19, 23].

Kitas diagnostinis tyrimas – priešinės liaukos audinių biopsijos analizė. Biopsijos mėginių analizėje įvertinamos vėžinių ląstelių biocheminės savybės ir struktūros ypatumai, pagal kuriuos galima numatyti, kaip greitai navikas gali išplisti į kaimyninius audinius. PLV audinys charakterizuojamas polinkiu į heterogeniškumą ir daugiažidiniškumą, kurie klasifikuojami patologų pagal *Gleasono* gradavimo sistemą. *Gleason* diferenciacijos laipsnis grindžiamas dviejų dažniausių naviko židinių laipsnių suma ir teoriškai gali svyruoti nuo 2 iki 10. Vėžiniams priskirtini pakitimai yra vertinami ne mažiau nei 6 *Gleasono* laipsniais.

Agresyviausią naviką, kurio ląstelės mažiausiai diferencijuotos, apibūdina aukščiausi *Gleasono* diferenciacijos laipsniai [9].

Pagrindiniai tikslios PLV diagnostikos apribojimai yra mažas audinio dydis bei polinkis į heterogeniškumą. Atskiri naviko židiniai, kurie audinyje išsidėsto greta, skiriasi ne tik pagal histologinį tipą, bet ir genetiniame lygmenyje, o tai turi reikšmingą įtaką ligos progresavimui. Šie apribojimai apsunkina ne tik genų, kurių pažeidimas siejasi su priešinės liaukos molekuliniais onkogenezės mechanizmais, bet ir molekulinį kelių, kurie inicijuoja ir skatina PLV progresavimą, paiešką. Šiuo metu daugelio mokslininkų iššūkis yra surasti jautrius naviko biožymenis, kad būtų galima prognozuoti tolimesnę ligos patogenezę, taip pat pagerinti ankstyvųjų PLV stadijų diagnostiką [18].

## 2.2 Priešinės liaukos vėžio molekuliniai mechanizmai

Iki šiol nėra tiksliai žinoma, dėl kokių molekulinį mechanizmų vystosi PLV, tačiau manoma, kad genetinių ir epigenetinių veiksnių kompleksas yra itin svarbus PLV formavimuisi ir progresavimui. Tai sudėtingas daugiapakopis procesas, kuriame gali dalyvauti daug skirtingų genų, ypač naviką slopinantys genai (NSG), taip pat kaupiasi kitų svarbių reguliacinių genų pažeidimas ar įvyksta jų epigenetinis nutildymas bei pasireiškia chromosomų aberacijos [5, 6].

**Chromosomų aberacijos.** Vienas iš pagrindinių sutrikimų, lemiančių PLV formavimąsi, yra chromosomų struktūros pakitimai. Išskiriami du su chromosomų aberacijomis susiję mechanizmai: intarpai ir tam tikras genų reguliacines sritis ir alelių arba chromosomų regionų iškritos, kurios lemia silpnesnę geno raišką arba raiškos praradimą [19, 20].

Šiuo metu žinoma, kad dažniausios chromosomų iškritos pasireiškia 5q, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q ir 17p ir 18q, bei intarpai 7 p/q, 8q, 9p ir Xq chromosomų regionuose, kurios būtinos PLV genezėje [19]. Pastebėta, kad chromosomų persitvarkymai 21q regione aptinkami dažniau negu 50% visų priešinės liaukos navikų atvejų [20]. Viena iš dažniausių pažeidimų yra 8 chromosomos trumpojo peties praradimas, kuris pasireiškia 60-80% priešinės liaukos pirminių navikų ir daugiau negu 90% priešinės liaukos intraepitelinių neoplazmų atvejų. Tai rodo, kad NSG praradimas, lokalizuoto 8p chromosomoje, yra svarbus momentas PLV iniciacijoje ir šio geno inaktyvinimas aptinkamas ankstyvosiose ligos stadijose. Remiantis daugelio tyrimų rezultatais, nustatyta, kad 8p12-21 regiono iškritos yra ankstyvi priešinės liaukos kancerogenezės etapai, o 8p22 iškrita sparčiai paplitusi vėlesniųjų stadijų navikuose. Kai PLV progresuoja į hormonams atsparų vėžį ir/arba išplita į limfmazgius ar tolimesnius



organus, chromosomų aberacijos pradeda labiau kauptis ir atsiranda papildomos pasikartojančios aberacijos. Hormonams atspariam vėžiui dažniausiai nustatomos iškritos yra 8p, 13q, 10q, 16q, ir intarpai 8q, 7p/q ir Xq regionuose. Metastazuojančiam navikui būdingos tos pačios pažaidos, išskyrus intarpą į Xq chromosomą [19, 21].

Kitas mechanizmas – **genų mutacijos**. Daugelis mokslinių tyrimų atskleidė visą eilę genų, kurių pažaidos yra reikšmingos įvairiose PLV stadijose. Tai apima: *ELAC2*, *MSR1* ir *RNASEL* genus, kurių mutacijos būdingos šeiminiam PLV; *AR*, *ATBF1*, *EPHB2*, *KLF6*, *p53*, *PTEN* ir *RAS* somatinės mutacijos nustatomos sporadiniuose PLV atvejuose; *AR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CYP17*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *PON1*, *SRD5A2* ir *VDR* – genetiniai variantai, susiję su paveldimu arba sporadiniu PLV; *ANXA7*, *KLF5*, *NKX3-1*, *CDKN1B* ir *MYC* kopijų skaičiaus pokyčiai, turintys įtakos geno funkcijai, yra nustatomi įvairios stadijos priešinės liaukos karcinomose. Detalesni šių genų molekuliniai ir genetiniai tyrimai yra svarbus žingsnis siekiant pagerinti PLV diagnostiką [22].

**Epigenetiniai mechanizmai**, kaip DNR metilinimas ir histonų modifikacijos, yra svarbūs daugelyje molekulinų ir ląstelių pokyčių, kurie siejasi su PLV formavimusi. Remiantis literatūros duomenimis, priešinės liaukos navikuose dominuoja DNR reparacinių genų pvz., glutationo-S transferazės  $\pi$  geno, *GSTP1*; su hormoniniu atsaku susijusių genų pvz., androgenų, *AR*, ir estrogenų, *ER*, receptorių koduojantys genai; ląstelės ciklą kontroliuojančių genų pvz., *CDKN2A*; naviką slopinančių genų pvz., *VHL*, *RBI*, *APC*; apoptozę reguliuojančių genų pvz., su ląstelės mirtimi susijusios proteinkinazės genas, *DAPK*; bei su invazija ir metastazėmis susijusių genų pvz., kadherinų genai, *CD44*, *TIMP*, hipermetilinimas [23, 24].

**NSG pažaidos** yra trečiasis mechanizmas, svarbus formuojantis PLV. NSG kontroliuoja ląstelių dalijimosi ciklą ir palaiko DNR vientisumą, todėl jų vaidmuo ląstelių biologiniuose procesuose yra labai reikšmingas. Pagrindinės pažaidos, inaktyvinančios NSG, yra taškinės mutacijos, iškritos ir pakitęs jų metilinimo profilis. Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad NSG promotorinių sekų CpG salų hipermetilinimas sumažina genų raišką ir jų koduojamų baltymų kiekį ląstelėse, todėl jie nepajėgia nuslopinti navikinių ląstelių dauginimosi ir jos pradeda intensyviai proliferuoti, o tai padidina šių ląstelių išlikimo galimybę. Mokslininkai įvardijo pagrindinius NSG genus, kurių pažaidos svarbios PLV genezėje [25, 26]. Svarbiausius NSG genus aptarsime plačiau.

Pagrindinis NSG atstovas yra *TP53*. Šio geno koduojamas baltymas p53 yra pagrindinis ląstelės ciklo reguliatorius, kuris apsaugo nuo tolimesnio ląstelės dalijimosi, t.y. sustabdo ląstelės ciklą patikros taškuose (ang. *check points*), esant DNR pažaidoms. Esant šio geno mutacijoms, pakitusios ląstelės nekontroliuojamai dauginasi dėl sutrikusių apoptozės

mechanizmų, vystosi vėžys. Buvo atlikta keletas mokslinių tyrimų, kurių rezultatai parodė, kad p53 mutacijos pasireiškia apie 20-40% vėlesniųjų stadijų priešinės liaukos navikų, tačiau anktyvosiose stadijose jų beveik neaptinkama [27].

PLV vystymasis priklauso nuo androgenų įtakos. Androgenų receptorių priklauso steroidų ir skydliaukės hormonų receptorių šeimai, o jo koduojamo geno (*AR*) sekos analizė PLV mėginiuose parodė, kad daugelis navikų turi šio geno taškinių mutacijų [28, 29]. Tokios mutacijos paplitusios 887 kodone (ACT-GCT, Treoninas-Alaninas), išsidėsčiusiame hormoną prisijungiančiame domene. Ši mutacija leidžia *AR* surišti estrogeninius steroidus, tačiau sumažėja afiniškumas androgenams. Toks neįprastas prisijungimas gali sukelti kaimyninių genų transkripciją, taip sutrikdyti trapią augimo veiksnių pusiausvyrą priešinėje liaukoje ir skatinti vėžio vystymąsi [10].

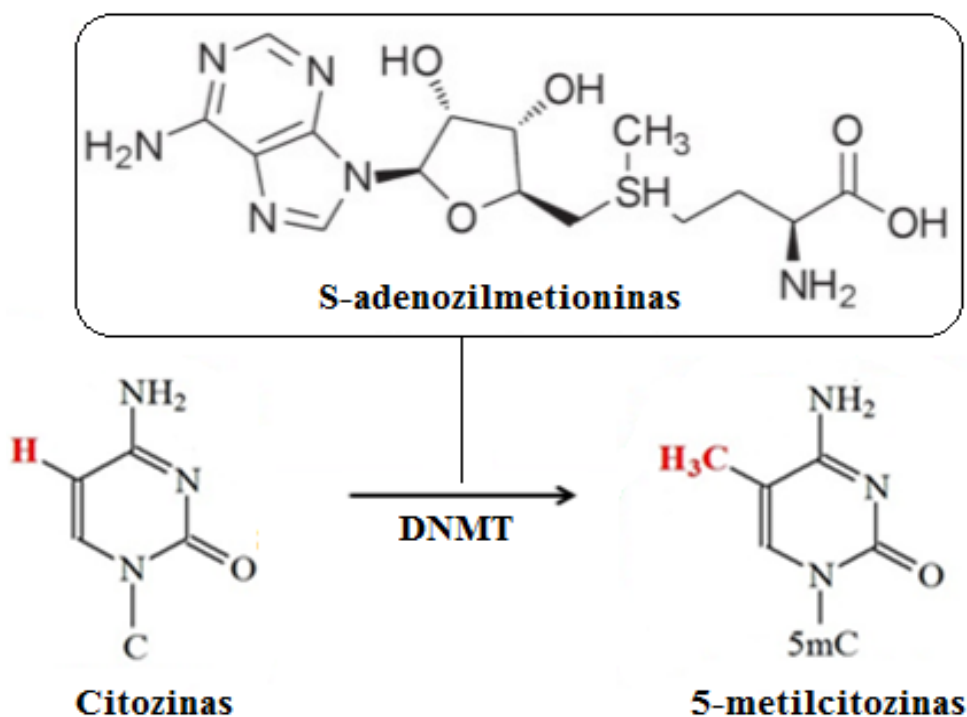
Kitas genas, kuris irgi dažnai mutavęs žmogaus navikinėse ląstelėse, yra *GSTP1*. Glutathiono S-transferazės katalizuoja glutathiono konjugaciją su kenksmingomis, elektrofilinėmis molekulėmis, taip apsaugant ląsteles nuo kancerogeninių veiksnių. Buvo pasiūlyta, kad *GSTP1* promotoriaus hipermetilinimas gali būti naudojamas kaip PLV diagnostinis žymuo, nes hipermetilinimo dažnis siekė iki 95% PLV atvejų [30].

Nustatyta, kad *PTEN* dažnai prarandamas priešinės liaukos navikinėse ląstelių linijose. Jis patiria homozigotines iškritas apytiksliai 10% pirminių priešinės liaukos navikų ir būdingas PLV, kuris linkęs metastazuoti. Remiantis imunohistocheminiais duomenimis, nustatyta silpnesnė *PTEN* baltymo raiška pirminiuose navikuose. *PTEN* yra NSG, koduojantis lipidų fosfatazė, kurios pagrindinis substratas yra fosfatidil-(3,4,5)-trifosfatas (*PIP-3*), todėl *PTEN* funkcijos praradimas aktyvina PKB/AKT kinazės aktyvumą, kuri savo ruožtu sumažina ląstelių jautrumą apoptozei [5, 30].

### **2.3 DNR metilinimas ir jo reikšmė onkogenezei**

Epigenetinės modifikacijos, atsakingos už genų raiškos reguliaciją, nėra susijusios su tiesioginiais pokyčiais DNR sekoje ir gali būti tiek grįžtamos, tiek paveldimos. Priklausomai nuo epigenetinių žymių, genai vystymosi eigoje gali būti aktyviai nurašomi, arba nutildomi [31]. Vienas iš geriausiai ištirtų epigenetinių molekulinį mechanizmų, lemiančių genų raiškos pokyčius, yra DNR metilinimas. Gausybė mokslinių tyrimų per pastaruosius dešimt metų atskleidė daug svarbios informacijos apie metilinimą ir jo reikšmę sudėtinguose ląsteliniuose procesuose, įskaitant ląstelių diferenciaciją, chromosomų stabilumo užtikrinimą, genominių imprintingą, X chromosomos inaktyvinimo reguliaciją bei vėžio išsivystymą [32, 33].

Metilinimo mechanizmą sudaro du esminiai komponentai – tai DNR metiltransferazės (DNMT), kurios modifikuoja nukleorūgštis, ir specifiniai baltymai, sąveikaujantys su metilintomis citozino ir guanino (CpG) sankauptomis (dar vad. CpG salomis) bei dalyvaujantys šių žymių nuskaityme. DNMT skirstomos į *de novo* metilinančias (DNMT3A ir DNMT3B) ir metilinimą palaikančias (DNMT1) metiltransferazes. Intensityvi DNMT1 raiška būdinga diferencijuotose ląstelėse DNR replikacijos metu, o jų pagrindinis taikinytis yra pusiau metilinti CpG dinukleotidai. Tuo tarpu DNMT3A ir DNMT3B gausi raiška nustatyta embrioninėse kamieninėse ląstelėse. Visos DNMT vykdo kovalentinę modifikaciją, kurios metu citozinas prisijungia metilo (-CH<sub>3</sub>) grupę prie 5' anglies atomo ir virsta į 5-metilcitoziną (2.3.1 pav.). Metilo grupės donoru daugumai DNMT tarnauja S-adenozilmetioninas [34-36, 40].



**2.3.1 pav.** DNR metiltransferazių katalizuojama metilinimo reakcija, kurios metu citozinas virsta 5-metilcitozinu [pagal 36 ir 37].

Genų transkripcija gali būti tiesiogiai slopinama per promotorinių sekų ar pirmųjų egzonų metilinimą, užkertant kelią transkripcijai aktyvinančių veiksnių sąveikai [34], arba netiesiogiai, dalyvaujant metil-CpG baltymams, kurie jungiasi prie metilintų citozinų ir padidina chromatinio kompaktizacijos laipsnį, pertvarkant jį į transkripciškai uždara konformaciją [38]. Buvo nustatyta asociacija tarp didesnio metilinimo lygio promotoriuose ir silpnos genų raiškos ar jų funkcijos praradimo [39].

Metilinimo žymės žinduolių genome paplitusios DNR regionuose, pasižyminčiuose dideliu CpG dinukleotidų kiekiu, vad. CpG salomis. Šias salas sudaro apie 200 bazių porų dydžio regionai, kurių sudėtyje yra daugiau kaip 55% GC [26]. Žmogaus genome apie 65% genų promotorių turi CpG salas, iš kurių didžioji dalis yra nemetilinta visuose vystymosi etapuose ir visuose audinių tipuose [32, 40]. Normaliose ląstelėse dauguma CpG dinukleotidų metilinti, o CpG salos, išsidėsčiusios 5' genų reguliacinėse sekose, nemetilintos [25]. Citozinai greita transkripcijos starto paprastai nemetilinti, kad būtų mažiau jautrūs mutacijoms, o CpG regionai, išsidėstę toliau arba kartotinėse sekose, paprastai yra metilinti. Nuo CpG salų metilinimo apsaugo specifinės DNR sekos ir baltymai, sąveikaujantys su reguliacinėmis sekomis, šiuo būdu yra užkertamas kelias metilinimo plitimui į geno promotoriaus regioną. Vėžinėse ląstelėse, priešingai, atsiranda tam tikrų židinių hipermetilinimas ir globalus genomo hipometilinimas, įskaitant intragenines CpG salas ir kartotines sekas [31, 33, 41]. DNR metilinimo pakitimas turi įtakos ne tik onkologinių ligų atsiradimui, bet taip pat dalyvauja audinių senėjimo procesuose. Tai įrodo, kad šios epigenetinės modifikacijos sklandžios veiklos palaikymas molekuliniam lygmenyje užtikrina normalų ląstelės funkcionavimą ir proliferaciją [42].

Navikinėse ląstelėse dažnesnis įvykis yra apoptozė, reparaciją ir ląstelės ciklą reguliuojančių genų, ypač NSG, pakitęs CpG salų metilinimas nei genetinės mutacijos. Tiek pavienių genų, tiek genų rinkinių metilinimo būsenos pokyčiai skatina nekontroliuojamą ląstelių augimą ir vėžio vystymąsi. Daugelis parametru (genų lokalizacija, promotoriaus seka, transkripcijos aktyvumas, raidos programa ir t.t.) svarbūs, norint apibrėžti, kuris promotorius taps hipermetilinimo taikiniu onkogenezės metu [31].

Iki šiol dauguma mokslinių tyrimų sutelkia savo dėmesį į NSG metilinimo būseną navikiniuose audiniuose. Nustatyta, kad nuo 5 iki 10% promotorių yra hipermetilinti navikinėse ląstelėse, skatinant pasroviui esančių genų nutildymą. Daugeliu atvejų tai NSG, taip sudarant palankias sąlygas onkogenezės procesams [40]. Tokie epigenetiniai pakitimai suteikia vėžinėms ląstelėms augimo pranašumą, didina jų genetinį nestabilumą (leidžiant įgyti papildomų naudingų genetinių pakitimų) ir taip pat skatina jas metastazuoti į kitus audinius [34].

Mokslininkai ištyrė 1184 CpG salų metilinimo laipsnį 98 navikiniuose mėginiuose, naudojant restrikcijos žymę genomo nuskaityme. Tyrimo rezultatai parodė, kad CpG salų *de novo* metilinimas yra sparčiai paplitęs vėžinėse ląstelėse. Šio tyrimo duomenimis, metilinimo laipsnis skyrėsi tarp atskirų navikų ir navikų tipų, vidutiniškai 608 CpG salų buvo nenormaliai hipermetilintos [43]. Kadangi CpG salų hipermetilinimas yra santykinai retas

reiškinys normaliose ląstelėse, tai galėtų reikšti ankstyvą ląstelės transformaciją į navikinę ląstelę [44].

Globalus hipometilinimas atsiranda ankstyvoje onkogenezeje, dėl to padidėja ląstelių polinkis į genomo nestabilumą ir tolimesnius genetinius pokyčius, o genų specifinis metilinimo žymių praradimas pasireiškia vėliau, leidžiant naviko ląstelėms prisitaikyti prie savo mikroaplinkos ir skatinant metastazavimą. Hipometilinimas pasireiškia dėl metilinimo praradimo kartotinėse sekose. Genomo metilinimo praradimas yra dažnas ir ankstyvas įvykis vėžinėse ląstelėse ir koreliuoja su ligos sunkumu ir potencialu metastazuoti daugelyje navikų tipų [31, 34].

Naujausi tyrimai atskleidė didelę genų promotorinių sekų metilinimo, kaip potencialaus diagnostinio biožymens įvairių onkologinių ligų diagnostikoje, reikšmę. Išsami CpG salų metilinimo analizė gali suteikti naujų žinių apie epigenetinius įvykius, reguliuojančius genų raiškos mechanizmus ir turinčius įtakos sudėtingų ligų išsivystymui, įskaitant vėžį. Nustačius metilinimo pakitimus molekuliniam lygmenyje, galima diagnozuoti ankstyvus vėžinius pakitimus, numatyti ligos tolimesnę eigą, bei atsaką į gydymą [45].

#### **2.4 Hipoksijos indukuota angiogenezė ir PLV patogenezė**

Esant deguonies stokai arba hipoksinei mikroaplinkai, audiniuose indukuojami genai, susiję su angiogeneze, pH reguliacija, eritropoeze, glikolize, gliukozės transporto ir apoptozės mechanizmais. Tai didelė grupė genų, kuriai priklauso kraujagyslių endotelio augimo faktorius (VEGF), karboanhidrazės IX, eritropoetinas (EPO), endoglinas ir kiti. Viena iš svarbiausių molekulinio atsako sistemų, kad būtų kompensuotas deguonies stygius ir audiniai aprūpinti būtinomis medžiagomis, yra naujų kraujagyslių formavimasis ir su angiogeneze susijusių genų raiška [46].

Angiogenezė yra griežtai reguliuojamas aktyvus procesas, kuris gali būti stimuliuojamas tiek normos, tiek patologijos atvejais. Fiziologinė angiogenezė būdinga vaisiaus ir augimo periodu, o patologinė yra sukeliama navikų, miokardo infarkto, insulto, lėtinio uždegimo, diabetinės retinopatijos ir kitų patologinių būklių [46, 49].

Besivystant navikams, jie privalo užtikrinti savo augimą, pastovų mitybinių medžiagų ir deguonies tiekimą ir atsikratyti kenksmingų medžiagų apykaitos produktų, todėl yra skatinamas naujų kraujagyslių atsiradimas. Navikinės ląstelės gamina didelį spektrą augimo veiksnių, kurie pasižymi parakrininiu veikimu, taip naujos kraujagyslės palaiko ne tik normalių kaimyninių audinių, bet ir piktybinių navikų augimą [46-48].

Naviko angiogenezė inicijuojama per pusiausvyros sutrikimą tarp angiogeninių augimo faktorių ir angiogenezę inhibuojančių veiksnių, šiuo keliu pasireiškia proangiogeninis fenotipas, kuris būdingas ankstyvųjų stadijų navikams. Atsakas į hipoksiją navikinėse ląstelėse keičia jų metabolizmo intensyvumą, pagerina prisitaikomumą ir padidina angiogeninį potencialą, skatinant kritinių angiogenezės veiksnių ir citokinų gamybą [47, 49]. Tarp tokių veiksnių yra VEGF šeimos baltymai, kurie yra pagrindiniai tarpininkai fiziologinės ir patologinės angiogenezės procesuose, dėl savo gebėjimo stimuliuoti beveik kiekvieną angiogenezės etapą. Vienas iš jos atstovų – VEGF-A baltymas, sąveikaujantis su tirozino kinazės receptoriais VEGFR-1 (Flt-1) ir VEGFR-2 (KDR, Flk-1), iš kurių pastarasis yra pagrindinis angiogenezės skatintojas. Taip pat pastebimas reikšmingas fibroblastų augimo faktoriaus (bFGF) padidėjimas. Per šių veiksnių reguliaciją angiogenezė aplink naviką „perjungia“ iš ramybės į kraujagyslių eksponentinio augimo fazę [48, 50].

Angiogenezė yra būtina sąlyga, kad galėtų įvykti didesnių už 1-3 mm<sup>3</sup> standžiųjų navikų, įskaitant ir PLV, augimas ir progresavimas [47]. Padidėjęs VEGF kiekis nustatomas esant piktybiniam PLV, palyginus su gerybinės prostatos hiperplazijos audiniais (GPH). VEGF raiška žmogaus priešinės liaukos stromos ląstelėse gali būti skatinama androgenų, tokiu būdu remiant hipotezę, kad androgenų deprivacija turi įtakos priešinės liaukos navikams per angiogenezės slopinimą [48, 50]. Imunohistocheminiai tyrimai parodė, kad žmogaus PLV ląstelėse VEGF teigiamai koreliuoja su kraujagyslių tankiu [51].

Hipoksija, pasireiškianti navikuose, yra siejama su agresyvia ligos eiga, metastazėmis, bloga prognoze, ligos atkryčiu po operacijų ir padidėjusiu atsparumu spindulinei terapijai. Geresnis angiogenezę lydinčių mechanizmų supratimas, galėtų suteikti naujų reikšmingų įžvalgų antiangiogeninių veiksnių plėtroje, standžiųjų navikų valdyme ir sąlygoti naują vėžio gydymo kryptį [48, 49].

## **2.5 Su angiogeneze ir hipoksija susijusių atrinktų genų charakteristikos**

Šiame darbe buvo ištirti keli mažai tyrinėti molekuliniai priešinės liaukos vėžio biožymenys: 1) *ADAMTS12*, svarbus slopinant angiogenezės procesus 2) *FILIP1L*, antiangiogenetinio aktyvumo reguliatorius endotelinėse ląstelėse; 3) *EPAS1*, indukuojamas hipoksinės aplinkos, reguliuoja VEGF raišką. Kiekvieno iš šių genų genetines ir epigenetines charakteristikas aptarsime plačiau.

### 2.5.1 *ADAMTS12* genas

*ADAMTS* (metaloproteinazės su trombospondino 1 tipo motyvais) genų šeimos koduojami proteolitiniai užląsteliniai fermentai dalyvauja kolageno brendimo, organogenezės, angiogenezės ir uždegimo procesuose. Vienas iš plačiausiai tiriamų šios šeimos atstovų yra *ADAMTS12* genas, kuris yra 5 chromosomos ilgajame petyje 35 regione ir koduoja daugiadomenį baltymą, kurio molekulinė masė siekia 177,5 kDa [52, 53].

Nors *ADAMTS* šeima buvo plačiai tiriama dėl jų katalitinių funkcijų, pastaraisiais metais vis daugiau tyrimų yra susiję su šių genų pažaidomis ir jų vaidmeniu kancerogenezėje per angiogenezės skatinimą. Buvo įrodyta, kad daugelis *ADAMTS* fermentų neigiamai reguliuoja angiogenezę, todėl jie priskiriami prie endogeninių angiogenezės inhibitorių arba NSG grupės. Pažymėtina, kad ne visi *ADAMTS* atstovai reguliuoja vėžio vystymąsi per įtaką angiogenezei [52].

*ADAMTS12* koduojamas baltymas tiesiogiai slopina onkogenezę, blokuodamas nuo RAS-priklausomą ERK signalinį kelią vėžinėse ląstelėse, bei netiesiogiai slopina angiogenezę per papildomą 1 tipo trombospondino TSR domeną savo struktūroje. *ADAMTS12* proteazė pasižymi priešnavikine savybe, kuri gali sumažinti proliferacinį navikinių ląstelių potencialą. Ši funkcija navikinėse ląstelėse yra prarandama hipermetilinimo metu, tačiau transkripciškai aktyvinama stromos ląstelėse, kaip normalaus audinio atsakas į vėžinių ląstelių progresavimą [54].

Moncada-Pazos ir kt. [55] atliko šio geno metilinimo analizę normalių ir vėžinių mėginių grupėse. Mokslininkai pastebėjo, kad *ADAMTS12* epigenetiškai užtildytas gaubtinės žarnos ir tiesiosios žarnos vėžinių ląstelių linijose dėl intensyvaus promotoriaus hipermetilinimo. Panašūs tyrimai, atlikti ir su kitais šios šeimos atstovais (*ADAMTS8*, *ADAMTS9* ir *ADAMTS18*), parodė, kad šie genai pasižymi NSG savybėmis, t.y. pakitęs jų metilinimas nustatytas skirtingos kilmės navikuose [52].

### 2.5.2 *FILIP1L* genas

*FILIP1L* genas yra 3 chromosomos ilgajame petyje, 12.1 regione, ir jo dydis siekia 284373 bp. Geną sudaro 6 egzonai, 5 intronai ir jis koduoja 10 galimų transkriptų. Genas koduoja su 1 tipo filaminu A sąveikaujantį baltymą, kurį sudaro 1135 aminorūgštys ir jis funkcionuoja kaip antiangiogenetinio aktyvumo reguliatorius endotelinėse ląstelėse, taip pat

kaip svarbus tarpininkas ląstelių proliferacijoje ir migracijoje. Padidėjusi geno raiška nustatyta vaskuliarizacijos metu standžiuosiuose navikuose bei endotelio ląstelėse, kuriose slopina ląstelių proliferaciją, migraciją ir inicijuoja apoptozės mechanizmus [53, 56].

Sveikų storosios žarnos audinių imunohistocheminės analizės metu buvo aptiktas didelis *FILIP1L* transkriptų kiekis kraujagyslėse ir raumenų gleivinėje, o gaubtinės žarnos atveju - ne tik kraujagyslėse, bet ir stromos ląstelėse. Taip pat pastebėta, kad *FILIP1L* ortologai randami žinduoliuose, kuriems būdingas išvystytas kraujagyslių tinklas [56].

*FILIP1L* yra vienas iš devynių genų, kurių funkcija siejasi su piktybiškumo slopinimu kiaušidžių vėžinėse ląstelių linijose [57]. Burton ir kt. [58] ištyrė ir patvirtino, kad tiek *FILIP1L* iRNR, tiek jo baltyminio produkto raiška sumažėja kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, lyginant su įprastomis kiaušidžių epitelinėmis ląstelėmis. CpG sala, persidengianti su *FILIP1L* geno promotoriumi, buvo stipriai metilinta kiaušidžių navikinėse ląstelėse. Taip pat parodyta, kad DNR metilinimas – tai pagrindinė epigenetinė pažaida, dėl kurios sumažėja *FILIP1L* raiška kiaušidžių vėžio atveju [58].

*FILIP1L* genui būdingos 3 izoformos, kurios skiriasi raiškos ypatumais priklausomai nuo vystymosi etapų. Desotelle ir kt. [59] ištyrė šio geno raišką priešinės liaukos ląstelėse, senstančiose epitelinėse ląstelėse ir priešinės liaukos navikuose. Mokslininkai nustatė, kad geno raiška yra indukuojama senėjimo metu, o PLV atvejuose ryškiai sumažėja transkriptomo ir proteomo lygiuose. Pastebėta, kad *FILIP1L* promotoriuje esanti CpG sala dažniausiai yra hipermetilinama priešinės liaukos navikiniuose mėginiuose. Be to, *FILIP1L* CpG sekų hipermetilinimas gan dažnas pokytis, būdingas maždaug 90% PLV. 2 izoforma siejama su senėjimo procesais ir jos raiškos nuslopinimas gali rodyti ankstyvą biologinį įvykį PLV vystymesi, todėl gali tarnauti kaip svarbus PLV žymuo [59].

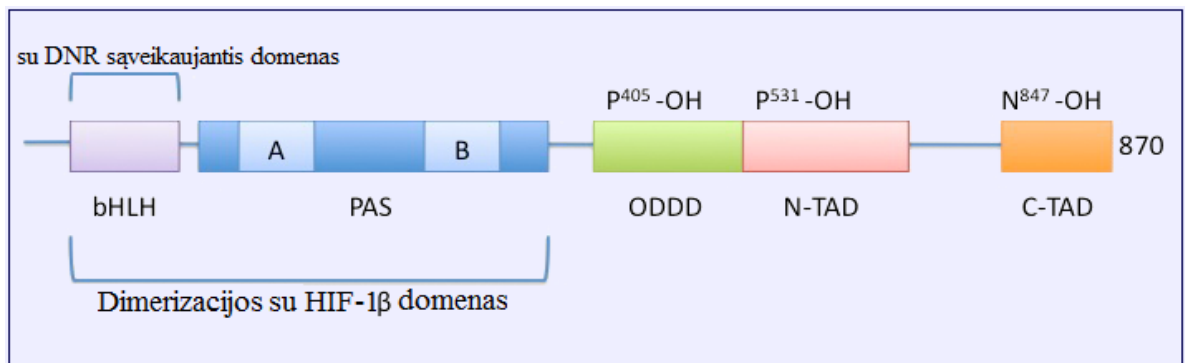
Kwon ir kt. [60] atliko panašų tyrimą krūties, storosios žarnos, plaučių ir kasos navikuose. Tiek iRNR, tiek *FILIP1L* baltymų raiška buvo nuslopinta šiose vėžinėse ląstelėse, lyginant su jų raiška normaliose epitelio ląstelėse. Kaip ir kiaušidžių vėžio atveju, *FILIP1L* sekų metilinimas yra svarbus reiškinys šiuose navikiniuose audiniuose ir *FILIP1L* promotoriaus metilinimo būsenai neigiamai koreliuoja su *FILIP1L* raiška. Šie rezultatai rodo, kad sumažėjusi *FILIP1L* raiška dėl DNR metilinimo yra susijusi su įvairių vėžio tipų fenotipais [58, 60].



### 2.5.3 EPAS1 genas

Endotelinio PAS domeną turinčio baltymo 1, dar žinomo kaip hipoksijos indukuojamas veiksnys  $2\alpha$  (*HIF2 $\alpha$* ), genas (*EPAS1*) koduoja transkripcijos veiksnį, kurio raiška padidėja ląstelėms patyrus deguonies stygių, o daugiausia transkriptų pastebima stipriai vaskuliarizuotuose audiniuose. Šio geno baltyminis produktas reguliuoja kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) raišką ir gali būti susijęs su neovaskuliarizacijos procesais [61, 62]. *EPAS1* genas, esantis 2p21-p16 regione, sudarytas iš 17 egzonų bei koduoja vieną pagrindinį 5184 bazių porų dydžio transkriptą [53, 63].

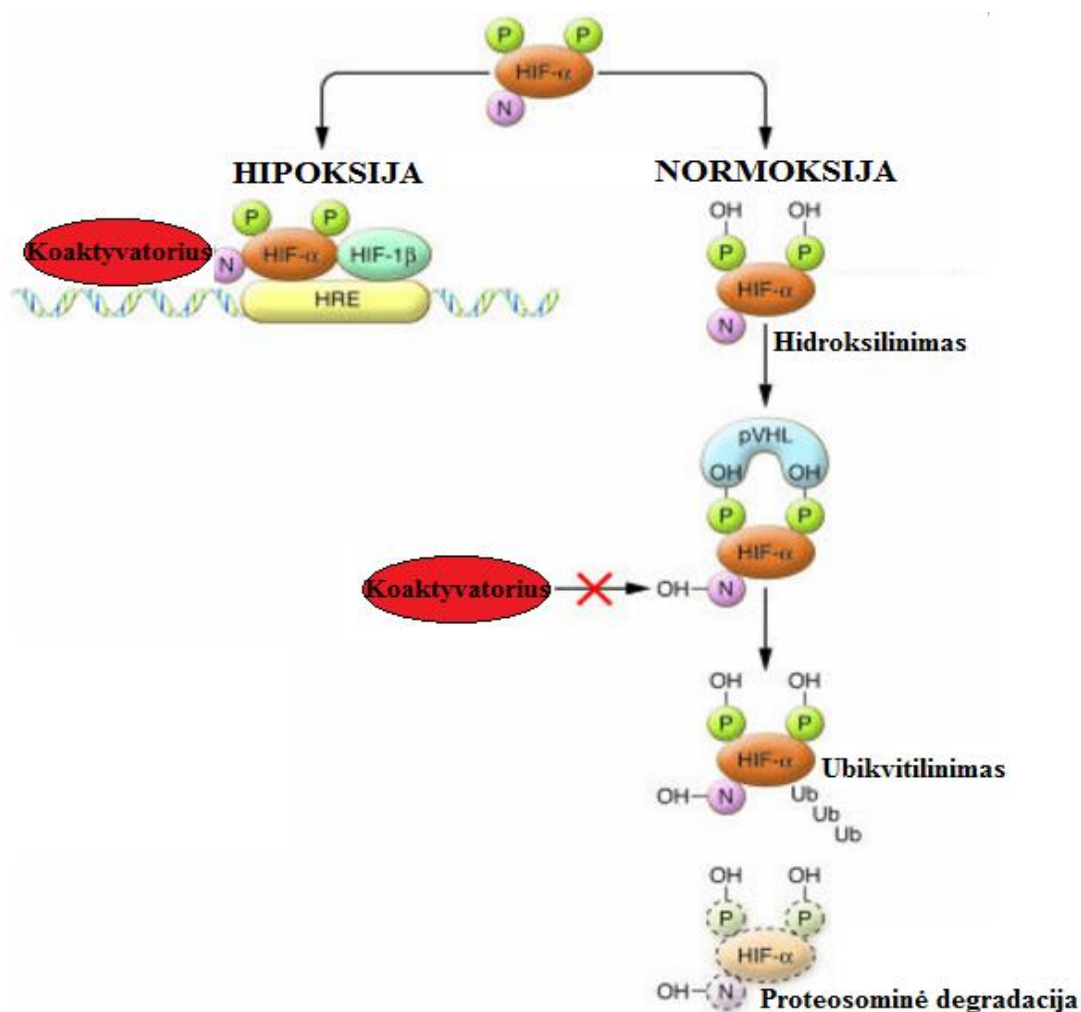
EPAS1 (*HIF-2 $\alpha$* ) baltymas priklauso pagrindinei spiralės-kilpos-spiralės PAS baltymų šeimai ir struktūriškai yra susijęs su *HIF-1 $\alpha$*  ir *HIF-3 $\alpha$*  subvienetais. EPAS1 baltymą sudaro 870 aminorūgštys ir jį formuoja 6 domenai: pagrindinis spiralės-kilpos-spiralės, du PER-ARNT-SIM (A ir B), nuo deguonies priklausomas degradacijos (ODDD) ir du transkripcijos-aktyvacijos (N-TAD ir CTAD) domenai. Normoksijos sąlygomis dvi proliino (P<sub>405</sub> ir P<sub>531</sub> atitinkamai ODD ir N-TAD domenuose) ir viena asparagino (N<sub>847</sub> C-TAD domene) liekanos patiria hidroksilinimą, katalizuojant specifinėms prolihdroksilazėms (PHD), šiuo keliu užtikrinamas stabilumas ir reguliuojamas *HIF-2 $\alpha$*  baltymo aktyvumas (2.5.3.1 pav.). PHD fermentai priklauso nuo 2-oksoglutatarato-priklausomų dioksigenazių šeimai ir jų aktyvumui, kaip kofaktorius, būtinas O<sub>2</sub> [61, 64, 65].



2.5.3.1 pav. EPAS1/*HIF-2 $\alpha$*  baltymo struktūra ir specifiniai domenai [pagal 65].

Įprastomis deguonies sąlygomis (normoksija), esant pakankamai geležies jonų ir 2-oksoglutatarato aplinkoje, PHD hidroksilina proliino liekanas ir skatina *HIF-1 $\alpha$*  ir *HIF-2 $\alpha$*  asociaciją su *von Hippel-Lindau* naviką slopinančiais baltymais (pVHL). Tokie baltymai su hidroksilintomis proliino liekanomis išvengia sąveikos su koaktyvatoriais ir yra atpažįstami E3 ubikvitino ligazių (pVHL veikia kaip atpažinimo sritis šiuose kompleksuose), poliubikvitilinami ir vėliau proteolizuojami. Esant mažesniai deguonies parcialiniam slėgiui

kraujyje arba hipoksijai, HIF-2 $\alpha$  ir HIF inhibuojančio veiksnio hidroksilinimas ir degradacija 26S proteosomose nevyksta. HIF-2 $\alpha$  subvienetas yra perkeliamas į branduolį, kur jis formuoja transkripcijos kompleksą kartu su juo sąveikaujančiu ARNT baltymu, koaktyvatoriumi ir papildomais kofaktoriais kaip p300 ir CBP. Toks molekulių kompleksas prisijungia prie šerdinės DNR sekos 5'-[AG]CGTG-3', kitaip dar vadinamos hipoksijos atsako elementu (HRE), esančiu tikslinių genų promotoriuose, ir inicijuoja daugelio genų transkripciją (2.5.3.2 pav.) [65-68].



**2.5.3.2 pav.** HIF - $\alpha$  likimas priklausomai nuo deguonies slėgio kraujyje [pagal 68].  
N - asparaginas; P - prolinas; OH - hidroksi grupė; Ub - ubikvitinas.

Šis sudėtingas veikimo mechanizmas yra atsakingas už tikslinių genų raiškos aktyvinimą, susijusių su kancerogeninių ląstelių procesų įvairove, įskaitant tokius procesus kaip angiogenezė, invaziškumas, metastazavimas, eritropoezė, tokiu būdu palaikant audinių aprūpinimą deguonimi [69]. Keletas pastarųjų studijų nustatė intensyvią HIF-2 $\alpha$  raišką standžiuose navikuose, ypač gaubtinės ir tiesiosios žarnos (Yoshimura ir kt.), priešinės

liaukos (Boddy ir kt.), nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžio (Koukourakis ir kt.) bei mazginės piktybinės melanomos (Giatromanolaki ir kt.) ir endometriumo adenokarcinomos (Sivridis ir kt.) atvejais. Tai patvirtina galimą asociaciją tarp *EPAS1* perteklinės raiškos ir tam tikrų naviko tipų vystymosi, kurių progresavimui būtina angiogenezė [65].

Inkstų ląstelių karcinoma (RCC), kuriai yra būdinga gausi neovaskuliarizacija, pasižymi pertekline VEGF raiška, tiek iRNR, tiek baltyminiame lygiuose. Xia ir kt. [70] nagrinėjo, ar *EPAS1* gali sukelti endogeninę VEGF raišką žmogaus vaisiaus inkstų ląstelių linijoje po stabilios *EPAS1* kopijinės DNR transfekcijos. Mokslininkai nustatė, kad RCC audinių mėginiuose *EPAS1* ir *VEGF* raiška buvo gerokai padidėjusi, palyginus su normaliais gretimų inkstų audiniais. Šie rezultatai rodo, kad endogeninė VEGF gali būti reguliuojama transkripciškai *EPAS1* ir *EPAS1* gali būti susijęs su angiogeneze RCC ląstelėse [70].

Hipoksinės sąlygos tiesiosios žarnos vėžio kancerogenezės stadijose gali skatinti agresyvių navikų vystymąsi. Molekulinės analizės metu nustatyta, kad *EPAS1* iRNR raiška buvo gerokai sumažėjusi pirminės storosios žarnos adenokarcinomos mėginiuose lyginant su 120 histopatologiniais nenavikiniais audiniais. Bisulfitinės DNR sekoskaitos analizė atskleidė žymiai dažnesnį DNR metilinimą *EPAS1* geno reguliacinėse sekose navikiniuose audiniuose bei HCT116 storosios ir tiesiosios žarnos vėžio ląstelių linijoje (normoksijos ir hipoksijos sąlygomis) nei nenavikiniuose audiniuose. Tyrimai rodo, kad HIF1 $\alpha$  ir *EPAS1* svarba atsake į hipoksiją gali skirtis tarp naviko tipų ir įvairių navikų stadijų. *EPAS1* geno metilinimas turi prognostinę vertę gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio vystymesi, tačiau jo klinikinė reikšmė turi būti patvirtinta atlikus išsamesnę šio geno analizę ir papildomus tyrimus, taip pat reiktų įvertinti metilinimo reikšmę ir kituose vėžio tipuose [61].

### 3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

#### 3.1 Ligoniai ir mėginiai

Magistro baigiamasis darbas rengtas VU Gamtos mokslų fakultete, Žmogaus genomo tyrimų centre. Atliktas tyrimas yra projekto LIG-14/2012 dalis.

Į tiriamąją grupę buvo įtraukta 164 PLV ir 17 GPH atvejų. Iš viso PLV mėginių imtį sudarė 129 priešinės liaukos navikai ir 35 histologiškai nepakitę (nenavikiniai) priešinės liaukos audiniai. PLV ligoniai buvo suskirstyti į grupes pagal biocheminę ligos atkrytį: 29 atvejams buvo diagnozuota biocheminė ligos progresija po prostatektomijos, 88 atvejai be progresijos ir 12 atvejų duomenys nežinomi. Tirtų PLV grupės ligonių amžiaus vidurkis buvo 60 metų (amžiaus intervalas nuo 41 iki 82 metų), o GPH grupės 70 metų (amžiaus intervalas nuo 59 iki 80 metų). Patologo nustatytos PLV klinikinės ligonių charakteristikos bei ligonių amžius pateikta 3.1.1 lentelėje.

**3.1.1 lentelė.** Tirtų navikinių mėginių klinikinės charakteristikos ir ligonių amžius

	Navikiniai atvejai		
	Progresavę (n = 29)	Neprogresavę (n = 88)	Progresijos duomenų neturintys atvejai (n = 12)
<b>Amžius, metai</b>			
≤62	16	53	7
>62	13	35	5
<b>pT kategorija</b>			
≤2	11	66	8
≥3	18	22	4
<b>Gleason diferenciacijos laipsnis</b>			
6	3	26	3
≥7	26	62	9
<b>Priešinės liaukos masė, g (vidurkis)</b>	51	47	44
<b>PSA, ng/ml</b>			
≤10	14	66	10
>10	15	20	2

### 3.2 Reagentai, buferiai ir tirpalai

DNR skyrimui iš audinių ir grynimui, DNR bisulfitinei modifikacijai, metilnimui jautriai PGR (MSP) ir elektroforezei agarozės ir poliakrilamidiniame geliuose naudoti reagentai nurodyti 3.2.1 lentelėje.

**3.2.1 lentelė.** Naudotų reagentų sąrašas ir gamintojai

Reagentai:	Gamintojai:
<p><b><u>DNR skyrimas</u></b></p> <p>Lizės buferis, kurį sudaro:            5 mM Tris-HCl, pH 8.5;            1mM EDTA;            Tween-20;            Proteinazė K (1 mg/ml);            Fenolio/ chloroformo/ izoamilo alkoholio mišinys (25:24:1);            5 M amonio acetatas;            96% ir 70% etanolio tirpalas</p>	<p><i>Roth</i>   <i>Thermo Fisher Scientific</i>   <i>Sigma</i>   <i>Thermo Fisher Scientific</i>   <i>Roth</i>   <i>Sigma</i></p>
<p><b><u>Bisulfitinė DNR modifikacija</u></b></p> <p><i>EZ DNA Methylation Kit</i> rinkinys, kurį sudaro:            Citozino modifikavimo reagentas „<i>CT conversion reagent</i>“;            Surišimo buferis „<i>M - Binding buffer</i>“;            Skiedimo buferis „<i>M - dilution buffer</i>“;            Plovimo buferis „<i>M - Wash buffer</i>“;            Desulfoninimo buferis „<i>M - Desulfonation buffer</i>“            Tirpinimo buferis „<i>M - elution buffer</i>“            Zymo-Spin™ silikagelio kolonėlė su surenkamuoju mėgintuvėliu</p>	<p><i>Zymo Research</i></p>
<p><b><u>MSP ir elektroforezė:</u></b></p> <p>10 x PGR buferis;            25 Mm MgCl<sub>2</sub>;            16 mmol/L dNTP;            Karšto starto DNR polimerazė – <i>Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase</i>;</p>	<p><i>Thermo Fisher Scientific</i>  <i>Thermo Fisher Scientific</i>  <i>Thermo Fisher Scientific</i>  <i>Thermo Fisher Scientific</i></p>

Agarozė	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Akrilamidas	<i>Sigma Aldrich</i>
N,N'-metilbisakrilamidas	<i>Sigma Aldrich</i>
Amonio persulfatas	<i>Sigma Aldrich</i>
TEMED – N,N,N,N'-tetrametiletildiaminas	<i>Roth</i>
DNR ilgio žymuo pUC DNA/MspI (Hpa II)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
DNR masės standartas „ <i>GeneRuler 50 bp DNA Ladder</i> “	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Pradmenys (100 µM)	<i>Metabion</i>

### 3.3 Įranga

Mokslo tiriamojo darbo metu naudota įranga: DNR grynumo įvertinimui buvo naudotas spektrofotometras *NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Baltics)*, atrinktų genų-taikinių amplifikacija buvo vykdyta *Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf)* termocikleryje.

MSP pradmenų kūrimui buvo naudojama *Methyl Primer Express v. 1.0 (Applied Biosystems)* programa; MSP reakcijos produktai buvo vizualizuojami *Vision Works®LS Analysis Software* sistema (UVP).

### 3.4 Tyrimo metodai

#### 3.4.1 DNR išskyrimas iš priešinės liaukos audinių

DNR tyrimui buvo išskirta iš skystame azote užšaldytų audinio mėginių, kurie buvo mechaniškai homogenizuoti į miltelius. Protokolas parengtas VU GMF Žmogaus genomo tyrimų centre.

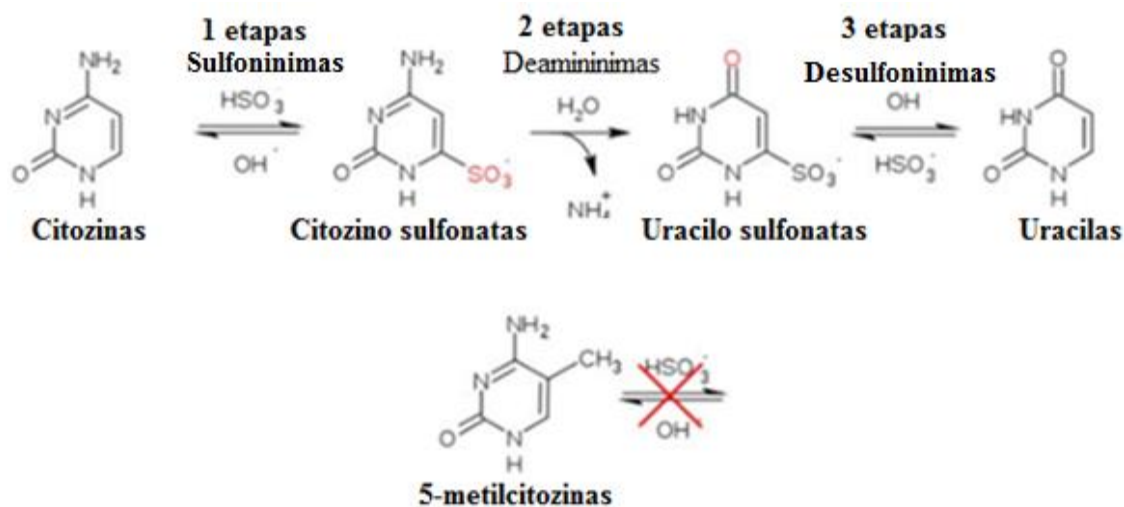
1. DNR skiriama iš ~10-30 mg sutrinto audinio, kuris buvo užšaldytas skystame azote ir sutrintas grūstuvėlėje.
2. Audiniui lizuoti pilama 500 µl lizės buferio (5mM Tris-HCl, pH 8.5; 1mM EDTA; 0,5% Tween-20) ir inkubuojama 1-2 val. 55 °C termostate, purtant 350-450 rpm.
3. Pilama 25 µl proteinazės K (1 mg/ml). Mėginiai inkubuojami per 16-20 val. 55 °C termostate.
4. Pilama 500 µl fenolio/ chloroformo/ izoamilio alkoholio mišinio (25:24:1). Maišoma 10 min horizontaliai purtant rankose.

5. Mėginiai centrifuguojami 10 min 14000 rpm. Viršutinis sluoksnius perkeliama į naują mėgintuvėlį.
6. Etapas su fenolio/ chloroformo/ izoamilo alkoholio mišiniu pakartojamas.
7. Ant perkeltos supernatanto pilama 500 μl chloroformo, 10 min maišoma, tada centrifuguojama 10 min 14000 rpm. Supernatantas perkeliama į naują mėgintuvėlį.
8. Įpilama 40 μl 5M amonio acetato, 1 ml šalto (-20 °C) 96% etanolio ir 1,5 μl glikogeno. Mėginiai precipituoja 2-3 val., -20 °C, tada centrifuguojami 25min, 14000 rpm. Supernatantas pašalinamas, paliekant nuosėdas. Nuosėdos praplaunamos 500 μl šalto (-20 °C) 70% etanolio, centrifuguojama 25 min, 14000 rpm.
9. Pašalinamas supernatantas, likučiai išgarinami laikant mėginius 37 °C. DNR ištirpinama 40 μl sterilaus vandens.
10. Matuojama išskirtos DNR koncentracija ir įvertinamas grynumas *NanoDrop 2000 UV-Vis* bekiuvečiu spektrofotometru ties 260/280 nm ir 260/230 nm bangomis.

### 3.4.2 Bisulfitinė DNR modifikacija

Bisulfitinė DNR modifikacija atliekama naudojant *EZ DNA Methylation* rinkinį ir remiantis modifikuotu gamintojo protokolu.

Bisulfitinė DNR modifikacija vyksta 3 etapais: sulfoninimas, deamininimas ir desulfoninimas. Metodas remiasi tuo, kad metilinti citozinai modifikacijos metu išlieka nepakitę, o citozinai be metilo grupės konvertuojami į uracilus (3.4.2.1 pav.). Taikant polimerazės grandininę reakciją (PGR) analizuojamo geno sekos fragmento amplifikacijai, uracilai amplifikuojami kaip timinai, tuo tarpu metilinti citozinai – kaip citozinai.



**3.4.2.1 pav.** Citozino bisulfitinimo reakcija, kurios metu nemetilintas citozinas yra paverčiamas uracilu, o 5-metilcitozinas išlieka nepakitęs [pagal 71].

1. Paruošiama 400 ng DNR 45 µl vandens. Pilama 5 µl *M-Dilution* buferio ir gerai išmaišoma. DNR denatūracija vykdoma 15 min, 42 °C.
2. Paruošiamas *CT Conversion* reagentas: pilama 750 µl vandens ir 210 µl *M-Dilution* buferio, ištirpinama. Į mėginius pilama po 100 µl *CT Conversion* reagento, gerai išmaišoma ir inkubuojama 50 °C 16 val.
3. Pasibaigus inkubacijai, mėginiai atvėsunami 4 °C 10 min. Į paruoštas kolonėles su surenkamaisiais mėgintuvėliais pilama po 400 µl *M-Binding* buferio.
4. Į kolonėles perkeliama mėginiai. Gerai išmaišoma apverčiant kolonėlę 5-10 kartų. Tada centrifuguojama 30 s maksimaliu greičiu. Po centrifugavimo filtratas pašalinamas.
5. Pilama 100 µl *M-Wash* buferio ir centrifuguojama 30 s maksimaliu greičiu. Pilama 200 µl *M-Desulphonation* buferio. Inkubuojama kambario temperatūroje 15-20 min. Centrifuguojama 30 s maksimaliu greičiu.
6. Pilama 200 µl *M-Wash* buferio ir centrifuguojama 30 s maksimaliu greičiu.
7. Plovimas *M-Wash* buferiu pakartojamas. Tada kolonėlės perkeliama į naujus 1,5 ml mėgintuvėlius.
8. Į kolonėles pilama po 40 µl *M-Elution* buferio arba sterilaus vandens ir centrifuguojama 30 s maksimaliu greičiu. Modifikuota DNR laikoma -20 °C.

### 3.4.3 Pradmenų kūrimas

Pradmenų kūrimui analizuojamoms atsirinktų genų sekoms buvo naudojama *Methyl Primer Express v. 1.0* programa. Analizuojamos sekos pradmenims atrinktos remiantis metilinimo mikrogardelių zondu lokalizacija genų sekose bei CpG salų išsidėstymu pasitelkiant Ensembl ir NCBI duomenų bazes.

Metilinimo įvertinimui naudojami pradmenys turi atitikti keletą standartinių reikalavimų: turi gebėti suformuoti stabilų duplexą su taikinio sritimi ir nesijungti su kitais pradmenimis ar nespecifinėmis sritimis; turi būti pakankamas kiekis C ne CpG dinukleotiduose; norint atskirti modifikuotą M ir U sekas, pradmenys turi turėti bent vieną CpG, optimalu – 6-7 CpG pradmenų poroje, o CpG turi būti kuo arčiau 3' galo, kad būtų pasiektas kiek įmanoma didesnis pradmenų specifiškumas; pradmenų poros M ir U sekai turi apimti tuos pačius CpG, tačiau pradmenų ilgiai ir lokalizacija gali nežymiai skirtis; M ir U pradmenų lydymosi temperatūra turi būti panaši; dėl sekos supaprastėjimo po modifikacijos sumažėja lydymosi temperatūra, todėl reikia ilgesnių pradmenų nei standartinei PGR.



Genų sekos (promotorinės, reguliacinės ir pirmieji egzoniai) buvo lokalizuotos ir parsisiųstos iš NCBI duomenų bazės. Programa konvertuoja įkeltas genų sekas, kurias gaunamos po DNR modifikacijos natrio bisulfitu ir pateikia potencialius pradmenis metilintoms ir nemetilintoms genų sekoms. Potencialūs pradmenys patikrinami ir įvertinami pagal jų specifiskumą taikiniui, vieno nukleotido polimorfizmų nebuvimą pradmenų sekose, taip pat remiasi panašiomis pradmenų lydymosi temperatūromis. Tam tikslui buvo naudoti tokie bioinformaciniai įrankiai kaip *Sequence manipulation suite*, *BiQ Analyzer*, taip pat *Bisearch* ir *Multiple Primer Analyzer* [Bioinformaciniai įrankiai: 1-4].

### 3.4.4 Metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (MSP)

Metilinimui jautri polimerazės grandininė reakcija (MSP) yra vienas iš jautriausių metodų taikomų įvertinti genų promotorinių sekų metilinimo būklę. Tiriamos sekos pagausinamos dviejų tipų pradmenų poromis: metilintai (M pradmenys) ir nemetilintai (U pradmenys) geno promotoriaus sekai.

Kiekvienam DNR mėginiui paruošiama po du 0,2 ml mėgintuvėlius. Ruošiami du MSP reakcijos mišiniai, kurių komponentai vienodi, išskyrus tik pradmenis. M ir U reakcijų mišiniai ruošiami bendrai visiems mėginiams dviejuose 1,5 ml mėgintuvėliuose. Reakcijos mišinio sudėtis (25 µl) ir komponentų kiekiai pateikti 3.4.4.1 lentelėje.

**3.4.4.1 lentelė.** MSP reakcijos mišinio sudėtis

Komponentai ir jų pradinės koncentracijos	Galutinė koncentracija/kiekis
dH <sub>2</sub> O	–
10x PGR buferis	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
16 mmol/L dNTP	0,4 mM
100 µM pradmenys (p+prp)	po 2 µM
5U Polimerazė	1,25U
modifikuota DNR	40 µg/ml iki modifikavimo

\* p – prasminiai, prp – priešprasminiai pradmenys

Pirmiausia į 0,2 mL mėgintuvėlius išpilstomas reakcijos mišinys, tuomet dedama modifikuota DNR. Neigiamai metilinimo pradmenų amplifikacijos kontrolei buvo naudojama leukocitų DNR, teigiamai – *in vitro* metilinta DNR ir H<sub>2</sub>O kontrolė, galimam PGR produktų užterštumui įvertinti.

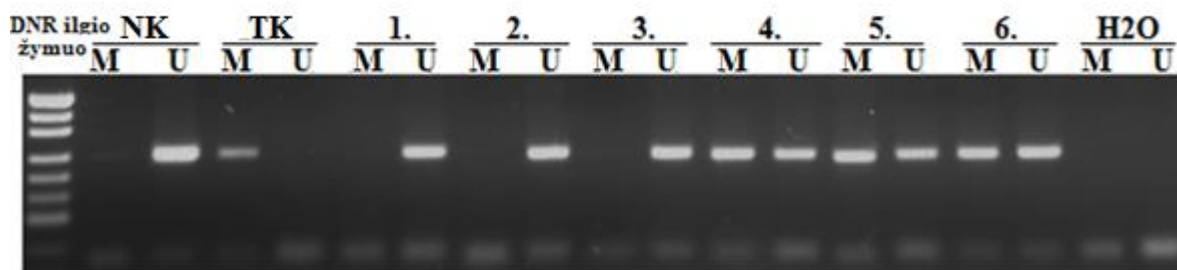
PGR reakcijai naudojama karšto starto polimerazė (*Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*). Mėgintuvėliai centrifuguojami 13000 rpm 1 min. Amplifikacija vykdoma *Eppendorf Mastercycler Gradient* termocikleriu. Apačioje parodyti termociklerio programos optimalūs parametrai *ADAMTS12*, *EPAS1* ir *FILIP1L* genų promotorinėms sekoms pagausinti (3.4.4.2 lentelė).

**3.4.4.2 lentelė.** PGR programa *ADAMTS12*, *EPAS1* ir *FILIP1L* genų metilinimo analizei

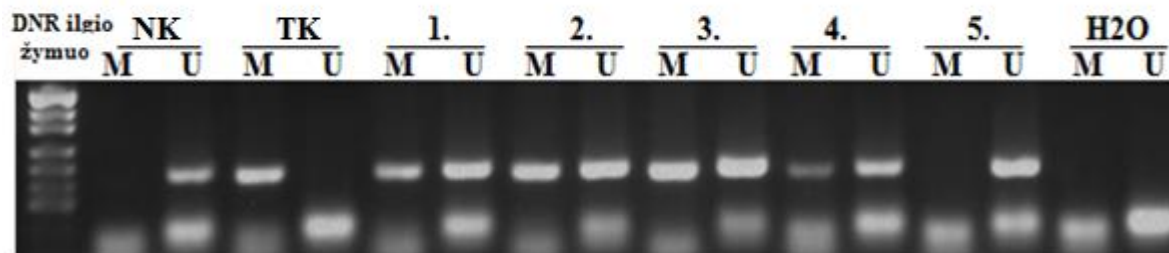
Genai:					
<i>ADAMTS12</i>		<i>EPAS1</i>		<i>FILIP1L</i>	
95 °C – 10 min		95 °C – 10 min		95 °C – 10 min	
95 °C – 45 s	<b>35 ciklai</b>	95 °C – 45 s	<b>37 ciklai</b>	95 °C – 45 s	<b>36 ciklai</b>
<b>62 °C – 45 s</b>		<b>56 °C – 45 s</b>		<b>57 °C – 45 s</b>	
72 °C – 45 s		72 °C – 45 s		72 °C – 45 s	
72 °C – 10 min		72 °C – 10 min		72 °C – 10 min	
4 °C – ∞		4 °C – ∞		4 °C – ∞	

Po amplifikavimo mėgintuvėliai centrifuguojami 1 min 13000 rpm. Reakcijos produktai analizuojami vykdant elektroforezę 3% agarozės gelyje, naudojant DNR ilgio žymenį pUC19 DNA/ MspI (HpaII) ir vizualizuojami naudojant Vision Works<sup>®</sup>LS Analysis Software dokumentavimo programą. Tiriamųjų *ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPAS1* genų MSP reakcijos elektroforezės pavyzdžiai pateikiami apačioje (3.4.4.1 pav.).

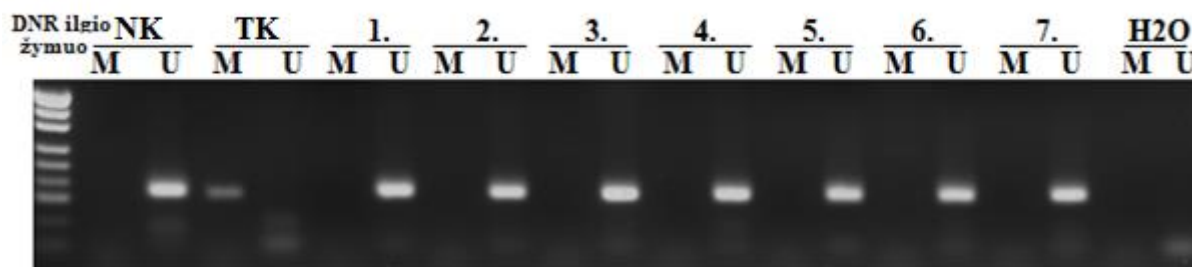
### *ADAMTS12*



### *FILIP1L*



### *EPAS1*



**3.4.4.1 pav.** Atrinktų genų taikinių metilinimo būklės analizė 3% agarozės gelyje. M – reakcija su pradmenimis metilintai sekai, U – reakcija su pradmenimis nemetilintai sekai. NK– leukocitų DNR (neigiama kontrolė), TK – *in vitro* metilinta DNR (teigiama kontrolė), 1-7 – tiriamieji mėginiai, H2O – taršos kontrolė.

Gautų rezultatų interpretacija vykdoma pagal nustatytus produktus po amplifikacijos su atitinkamais pradmenimis. Mėginys vertinamas kaip metilintas, jei įvyko amplifikacija ir susidarė produktas su M pradmenimis arba su M ir U pradmenimis. Mėginys laikomas nemetilintu, jei reakcija vyko tik su U pradmenimis.

### 3.5 Statistinė duomenų analizė

Statistinė rezultatų analizė atlikta *STATISTICA 8.0* (StatSoft, 2007) ir *OriginPro8* (OriginLab Corporation, 2007) programiniais paketais. Apskaičiuoti *ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPAS1* genų promotorinių sekų metilinimo dažniai procentais. Koreliacijai tarp dviejų dydžių įvertinti naudotas *Spearman* koreliacijos koeficientas, kategorinių duomenų palyginimui tarp grupių – *Fisher's exact t* - testas, o kiekybinių (tolydžiųjų) duomenų palyginimui tarp dviejų nepriklausomų grupių nustatyti taikytas *Mann-Whitney U* testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

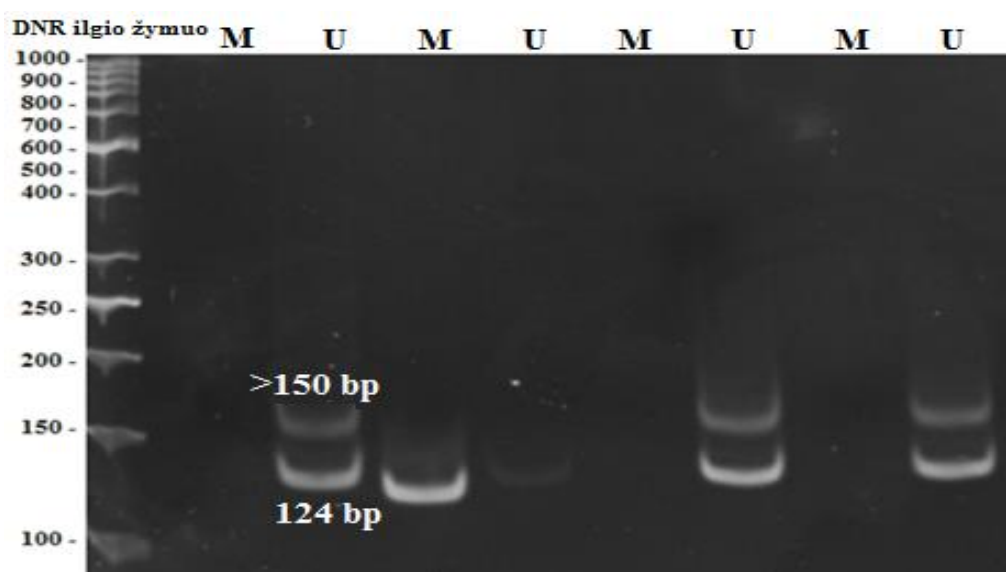
## 4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Siekiant geriau suprasti priešinės liaukos vėžio patologinius mechanizmus, šiame darbe buvo tiriami DNR metilinimo būsenos pakitimai *ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPASI* promotorinėse sekose bei susieti su priešinės liaukos vėžio klinikiniais-patologiniais rodikliais ir ligonių amžiumi. Genai parinkti iš VU GMF ŽGTC atliktos metilinimo mikrogardelių tyrimo rezultatų analizės, lyginant navikus su histologiškai nepakitusiais audiniais, pagal jų sąsają su angiogenezės (*ADAMTS12*, *FILIP1L*) ir atsako į hipoksiją (*EPASI*) procesais. Tolimesniam genų-taikinių promotorinių sekų kokybiniam metilinimo įvertinimui buvo taikomas MSP metodas.

### 4.1 MSP sąlygų optimizavimas

Tiriant DNR metilinimą PGR pagrįstu metodu, svarbu, kad M ir U pradmenys specifiskai jungtųsi prie komplementarių jiems genų promotorinių sekų. *FILIP1L* amplikonų, specifinių metilintai ir nemetilintai sekoms, ilgai yra atitinkamai 160 bp ir 162 bp, o *EPASI* – atitinkamai 118 bp ir 124 bp.

Elektroforegramoje (4.1.1 pav.) matyti, kad 7,5% PAA gelyje U takeliuose išryškėjo du *EPASI* produktai, vienas iš jų – tiriamasis amplikonas (124 bp), o kitas – nespecifinis produktas (>150 bp), todėl toliau buvo ieškoma optimalių MSP sąlygų šio geno tyrimui, kad būtų išvengta nespecifinių sintezės produktų.



4.1.1 pav. *EPASI* geno amplikonai 124 bp dydžio ir nespecifiniai MSP produktai (>150 bp) 7,5% PAA gelyje.

Tyrimo metu buvo atlikta išsamesnė abiejų genų pradmenų specifiškumo analizė ir optimizuotos tyrimo sąlygos. *FILIP1L* pradmenų prijungimo temperatūra parinkta 56 °C, amplifikacijos ciklų skaičius 38, *EPAS1* 57 °C ir 38 ciklai, o *ADAMTS12* – 62 °C ir 35 ciklai (3.4.4.2 lentelė).

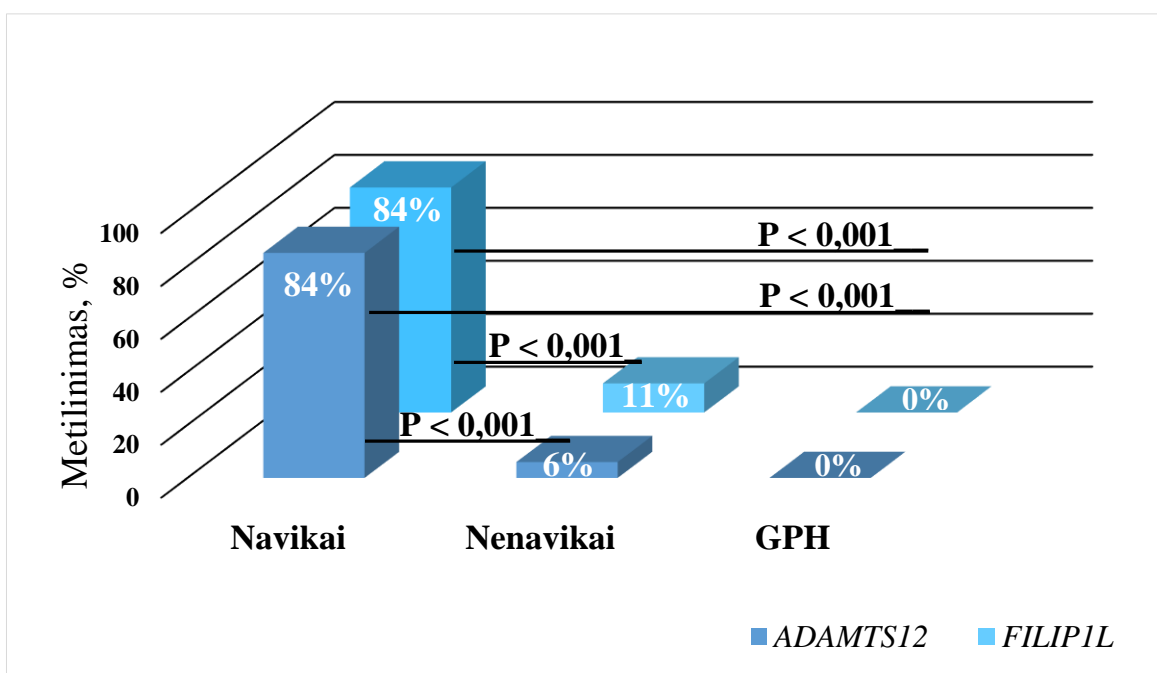
#### 4.2 Tirtų genų metilinimo dažniai PLV ir GPH ligonių mėginiuose

Geno *EPAS1* metilinimo būklė buvo ištirta 50 PLV ir 15 nenavikinių mėginių. Šis genas visuose mėginiuose buvo nemetilintas (0%, 0/50 PLV mėginių ir 0%, 0/15 nenavikinių audinių). Galima teigti, kad *EPAS1* genas išlieka svarbus tiek navikiniuose audiniuose, tiek histologiškai nepakitusiuose audiniuose, todėl jo funkcija neužslopinama ir veiklos aktyvumas nepakinta. Toliau šio geno tyrimai nebuvo tęsiami.

Atlikus *FILIP1L* geno promotoriaus sekų metilinimo tyrimus nustatyta, kad *FILIP1L* geno promotoriaus metilinimo dažnis yra 84% (109/129) PLV mėginiuose, o nenavikiniuose audiniuose – 11% (4/35). GPH grupėje *FILIP1L* promotoriaus metilinimo pokyčių nenustatyta (0%, 0/17).

Iš 129 tirtų navikinių mėginių buvo aptikti 109 geno *ADAMTS12* metilinimo atvejai (84%), o nenavikiniuose audiniuose nustatyti 2 metilinimo atvejai iš 35 mėginių (6%). Visi GPH mėginiai buvo nemetilinti (0%, 0/17).

*ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažniai pateikti 4.2.1 paveiksle.



4.2.1 pav. *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažniai navikiniuose, nenavikiniuose audiniuose ir GPH mėginių grupėse. Dalį *ADAMTS12* genų tyrimų atliko M. Lukošius

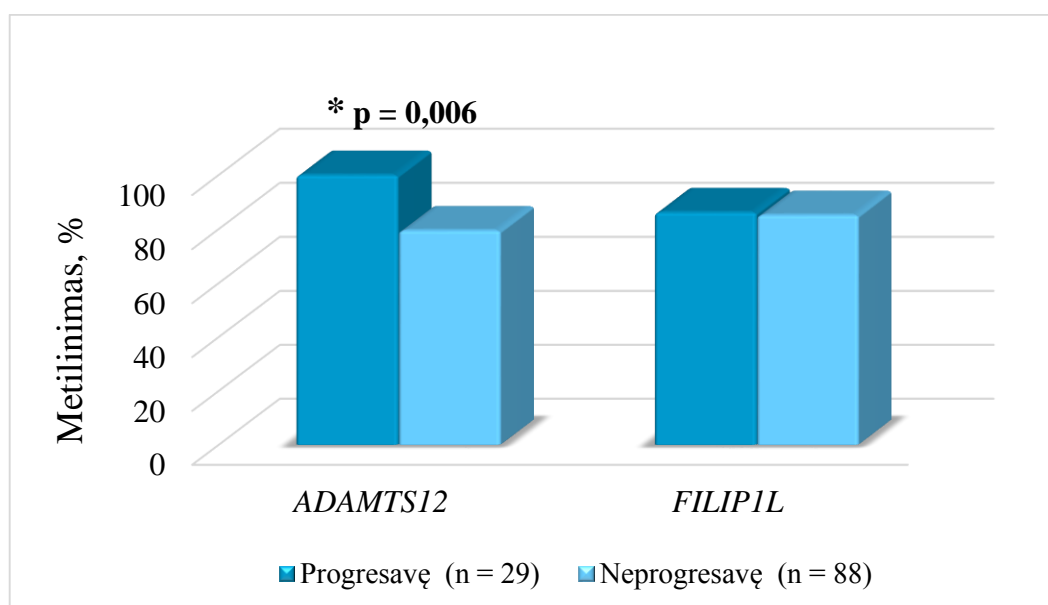
Nustatytas statistiškai reikšmingas genų *ADAMTS12* ir *FILIP1L* metilinimo dažnių skirtumas tarp navikinių ir nenavikinių mėginių ( $p < 0,001$ ), taip pat tarp navikinių ir GPH mėginių ( $p < 0,001$ ).

Siekiant įvertinti šių molekulinų žymenų diagnostinę bei prognozinę vertę, buvo apskaičiuoti jų jautrumo ir specifiškumo parametrai. Abiejų genų jautrumas siekia 84%, o specifiškumas priešinės liaukos vėžiui *ADAMTS12* ir *FILIP1L* yra atitinkamai 94% ir 89%, lyginant su nenavikais, bei 100%, lyginant su GPH. Gauti rezultatai parodo šių genų metilinimo specifiškumą navikiniam priešinės liaukos audiniui.

### 4.3 Genų metilinimo sąsajos su ligonių klinikinėmis charakteristikomis

Genų *ADAMTS12* ir *FILIP1L* metilinimo pokyčiai buvo susieti su ligonių amžiumi, PSA koncentracija prieš operaciją, naviko mase, biocheminiu ligos atkryčiu, pT stadija ir Gleason diferenciacijos laipsniu.

*ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimas buvo palygintas grupėse, suskirstytose pagal biocheminį ligos atkrytį. *ADAMTS12* geno promotoriaus sekos buvo metilintos visuose progresavusiuose atvejuose, t.y. 100%, o neprogresavusiuose sudarė 80%. *FILIP1L* geno reguliacinės sekos buvo metilintos 25 progresavusių navikų atvejų, t.y. 86%, o neprogresavusiuose sudarė 85%. Nustatytas statistiškai reikšmingas *ADAMTS12* geno promotoriaus metilinimo sąryšis su ligos atkryčiu ( $p = 0,006$ ), tačiau nenustatyta *FILIP1L* geno metilinimo ryšio su ligos progresija ( $p = 1,000$ ). Rezultatai pateikti 4.3.1 paveiksle ir 4.3.2 lentelėje.



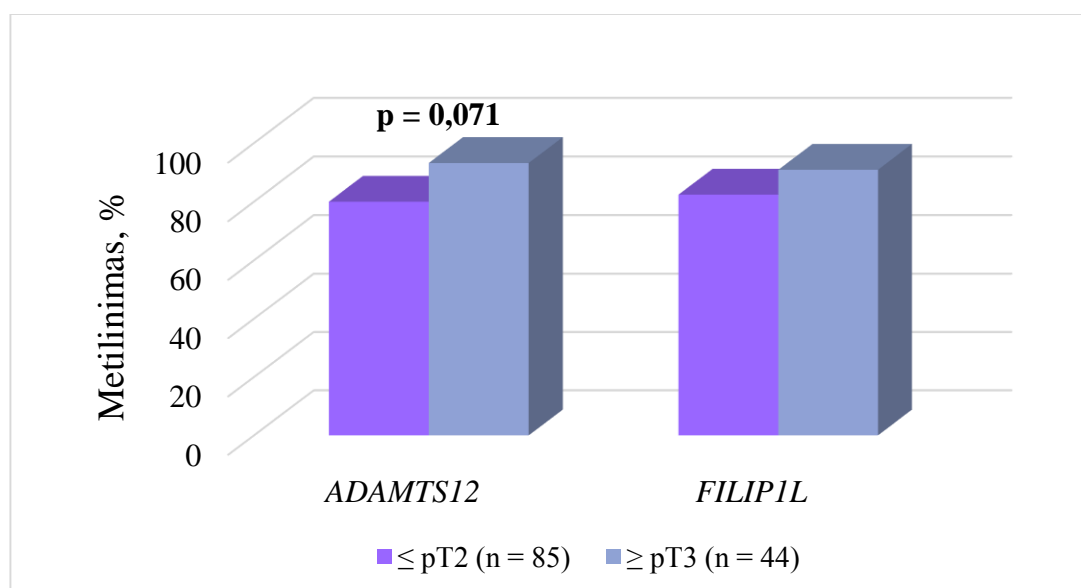
4.3.1. pav. *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis pagal biocheminį ligos atkrytį.

4.3.2 lentelė. *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis pagal biocheminį ligos atkrytį

Navikai		Metilinimo dažnis			
		<i>ADAMTS12</i>		<i>FILIP1L</i>	
		n	%	n	%
Neprogresavę	M	70	79,5	75	85,2
	U	18		13	
Progresavę	M	29	100	25	86,2
	U	0		4	
Iš viso:	M	99	84,6	100	85,5
	U	18	15,4	17	14,5

\* M- metilinti atvejai, U – nemetilinti atvejai

Genų metilinimo dažnis buvo susietas su naviko stadija pT. Pastebėta tendencija, kad *ADAMTS12* geno promotoriaus metilinimo dažnis  $\geq$  pT3 stadijos navikuose yra didesnis nei  $\leq$  pT2 (93,2% ir 80,0%;  $p = 0,071$ ). Pastebėta, kad *FILIP1L* promotoriaus sekų metilinimas dažniau aptinkamas pT3 ir aukštesnės stadijos priešinės liaukos navikuose (90,9%, 40/44), negu pT2 ir žemesnės stadijos (82,4%, 70/85), tačiau statistiškai reikšmingo ryšio nusta­tyta ( $p = 0,295$ ). Genų metilinimo dažniai priklausomai nuo pT stadijos pateikti 4.3.3 paveiksle ir 4.3.4 lentelėje.



4.3.3 pav. *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis priklausomai nuo ligos stadijos.

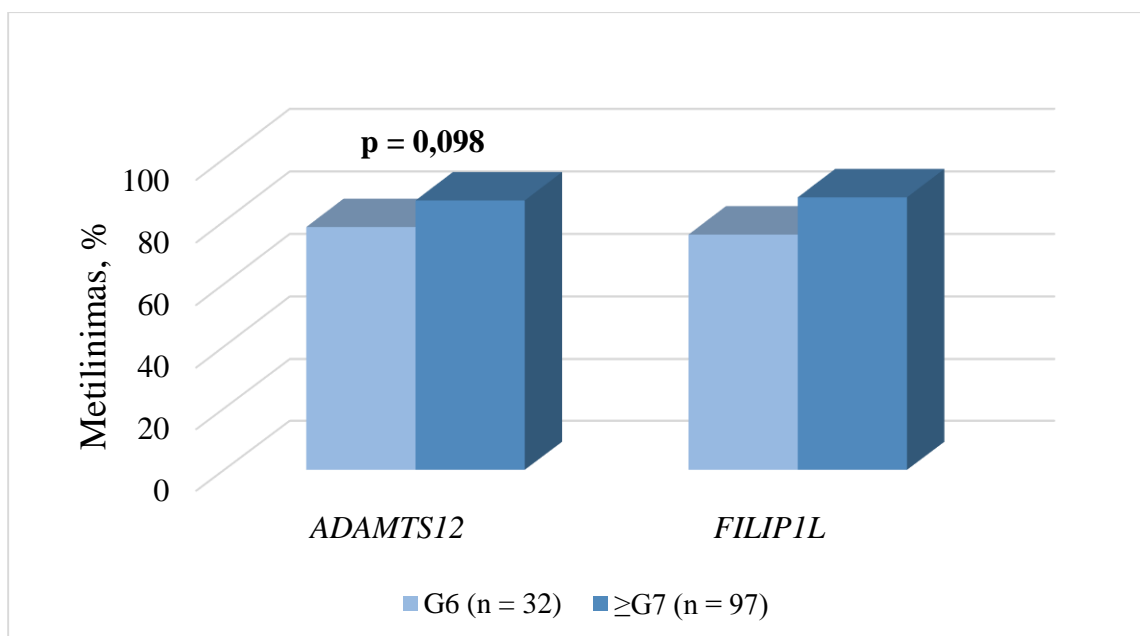


**4.3.4 lentelė.** *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis priklausomai nuo ligos stadijos

pT		Metilinimo dažnis			
		<i>ADAMTS12</i>		<i>FILIP1L</i>	
		n	%	n	%
≤ pT2	M	68	80,0	70	82,4
	U	17		15	
≥ pT3	M	41	93,2	40	90,9
	U	3		4	
Iš viso:	M	109	84,5	110	85,3
	U	20	15,5	19	14,7

\* M- metilinti atvejai, U – nemetilinti atvejai

Vertinant metilinimo sąsają su *Gleasono* diferenciacijos laipsniu, pastebėta tendencija, kad priešinės liaukos navikuose *ADAMTS12* geno promotorius yra dažniau metilinamas esant aukštesniam naviko diferenciacijos laipsniui (86,6% ir 78,1%), o p reikšmė arti statistiškai reikšmingos ( $p = 0,098$ ). *FILIP1L* geno metilinimas dažniau nustatytas esant *Gleasono* diferenciacijos laipsniui  $\geq 7$  (87,6%), negu 6 (75,0%), tačiau ši tendencija nėra statistiškai reikšminga ( $p = 0,267$ ). Rezultatai pateikti 4.3.5 paveiksle ir 4.3.6 lentelėje.



**4.3.5. pav.** *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio.

**4.3.6 lentelė.** *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo dažnis priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

<i>Gleasono</i> diferenciacijos laipsnis		Metilinimo dažnis			
		<i>ADAMTS12</i>		<i>FILIP1L</i>	
		n	%	n	%
<b>G6</b>	<b>M</b>	<b>25</b>	<b>78,1</b>	<b>24</b>	<b>75,0</b>
	U	7		8	
<b>≥ G7</b>	<b>M</b>	<b>84</b>	<b>86,6</b>	<b>85</b>	<b>87,6</b>
	U	13		12	
<b>Iš viso:</b>	<b>M</b>	<b>109</b>	<b>84,5</b>	<b>109</b>	<b>84,5</b>
	U	20	15,5	20	15,5

\* M- metilinti atvejai, U – nemetilinti atvejai

Buvo įvertintos *FILIP1L* ir *ADAMTS12* genų metilinimo sąsajos su kitomis klinikinėmis charakteristikomis (PSA koncentracija kraujyje, priešinės liaukos masė) ir ligonių amžiumi. Nustatyta, kad tiriamųjų ligonių navikinių mėginių metilintų *FILIP1L* ir *ADAMTS12* genų atvejų amžiaus vidurkis yra atitinkamai  $60,60 \pm 7,64$  ir  $60,64 \pm 7,65$  metų. Vertinant metilinimą *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genuose, metilinimo pokyčių priklausomybės nuo ligonių amžiaus nenustatyta. Nustatyta, kad tiriamųjų ligonių navikinių mėginių metilintų *FILIP1L* ir *ADAMTS12* genų atvejų PSA koncentracijos vidurkiai yra atitinkamai  $11,08 \pm 11,85$  ng/ml ir  $11,30 \pm 12,07$  ng/ml. Nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų koreliacijų tarp PSA koncentracijos kraujyje ar priešinės liaukos masės ir genų metilinimo (4.3.7 lentelė).

**4.3.7 lentelė.** Atrinktų genų metilinimo ryšys su kiekybiniais klinikiniais rodikliais ir amžiumi

	PSA, ng/ml	Priešinės liaukos masė, g	Ligonių amžius, metai
<i>FILIP1L</i>	p = 0,997	p = 1,000	p = 0,997
<i>ADAMTS12</i>	p = 0,554	p = 0,639	p = 0,232

#### 4.4 Rezultatų apibendrinimas

Siekiant įvertinti DNR metilinimo vaidmenį PLV onkogenezėje, buvo atlikta genų, susijusių su angiogeneze ir hipoksija (*ADAMTS12*, *FILIP1L* ir *EPAS1*), promotorių DNR metilinimo tyrimai PLV audiniuose. Taikant kokybinį metilinimui jautrios PGR (MSP) metodą, ištirta 129 priešinės liaukos navikų, ir 35 nenavikinių audinių ir 17 GPH mėginių.

*ADAMTS12* ir *FILIP1L* promotorinių sekų metilinimas buvo aptiktas 84% PLV mėginių kiekvieno geno, o nenavikuose atitinkamai 6% ir 11%. Šie rezultatai rodo reikšmingą metilinimo dažnio skirtumą tarp navikų ir nenavikų ar GPH ( $p < 0,001$ ) grupių. Remiantis Moncada-Pazos ir jo bendraautorių [55] publikacija, *ADAMTS12* geno metilinimas storosios žarnos navikuose aptinkamas dažniau (63,2%) negu normalaus audinio mėginiuose. Literatūroje neaptikome publikuotų tyrimų, kuriuose būtų atlikti epigenetiniai *ADAMTS12* geno tyrimai PLV audiniuose. Desotelle ir kt. [59] nustatė, kad *FILIP1L* geno promotoriaus sekų metilinimas pasireiškia 90% priešinės liaukos navikinių mėginių atveju. Mūsų tyrimo rezultatai buvo artimi t.y. *FILIP1L* promotoriaus metilinimas pasireiškė 84% visų PLV mėginių atveju.

Rawłuszko-Wieczorek ir jos bendraautoriai [61] atskleidė reikšmingą *EPAS1* geno reguliacinių sekų hipermetilinimą navikiniuose gaubtinės ir tiesiosios žarnos audiniuose, bet apie metilinimo pokyčių ypatumus kituose navikų tipuose trūksta duomenų. Šio mokslo tiriamojo darbo metu gauti MSP rezultatai parodė, kad *EPAS1* genas buvo nemetilintas visuose tirtuose priešinės liaukos navikinių ir nenavikinių audinių mėginiuose.

Remiantis klinikiniais rodikliais, tik *ADAMTS12* geno promotoriaus metilinimas buvo reikšmingai susijęs su biocheminiu ligos atkryčiu ( $p = 0,006$ ), metilinimo tendencijos taip pat pastebimos su sunkesne naviko stadija ( $p = 0,071$ ) ir aukštesniais *Gleasono* diferenciacijos laipsnio navikais ( $p = 0,098$ ).

Nenustatyta statistiškai reikšmingų sąsajų tarp *ADAMTS12* ar *FILIP1L* genų metilinimo ir klinikinių charakteristikų kaip PSA koncentracijos, priešinės liaukos masės, ar pacientų amžiaus.

Mokslininkų ir mūsų mokslo tiriamojo darbo rezultatai parodo, kad *FILIP1L* ir *ADAMTS12* genų metilinimo analizė suteikia svarbių įžvalgų onkogenezės procesuose, o šių genų metilinimas priešinės liaukos navikuose ateityje galėtų tarnauti molekuliniais PLV žymenimis. Norint pagerinti klinikinę PLV diagnostiką, reiktų pratęsti detalius tyrimus šioje srityje.

## 4.5 Rekomendacijos

Visuminė epigenomo analizė, atlikta ŽGTC, atskleidė reikšmingą *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų metilinimo skirtumą tarp priešinės liaukos navikinių ir nenavikinių mėginių. Šio mokslo tiriamojo darbo metu atlikto kokybinio tyrimo duomenys patvirtino šių genų metilinimo, kaip molekulinio žymenų, specifiškumą PLV. Norint tiksliau įvertinti šių molekulinio žymenų patikimumą ir informatyvumą priešinės liaukos kancerogenezei, reiktų papildomai atlikti kiekybinius *ADAMTS12* ir *FILIP1L* genų raiškos tyrimus, siekiant susieti promotoriaus metilinimą su geno raiškos praradimu. Geno *ADAMTS12* metilinimo, kaip prognostinio žymens, potencialas turėtų būti įvertintas, atlikus išsamius tyrimus nepriklausomose imtyse.

## 5. IŠVADOS

1. Genų *ADAMTS12* ir *FILIP1L* promotoriaus DNR metilinimo dažniai priešinės liaukos navikuose yra atitinkamai 84% ir 84% ir reikšmingai skiriasi ( $p < 0,001$ ) nuo metilinimo dažnių histologiškai nepakitusiųose (6% ir 11%) bei gerybinės hiperplazijos audiniuose (0% ir 0%). Geno *EPAS1* metilinimo pokyčių PLV nenustatyta (0%).
2. Geno *ADAMTS12* metilinimas statistiškai reikšmingai dažnesnis progresavusiuose navikuose, palyginus su neprogresavusiais PLV atvejais ( $p = 0,006$ ). Taip pat stebimas dažnesnis *ADAMTS12* metilinimas vėlyvesnės pT stadijos ( $p = 0,071$ ) ir aukštesnio *Gleason* diferenciacijos laipsnio ( $p = 0,098$ ) navikuose.
3. Genų *ADAMTS12* ir *FILIP1L* metilinimo pakitimai pasižymi geru diagnostiniu potencialu (t.y. jautrumu ir specifiškumu priešinės liaukos vėžiui), be to, geno *ADAMTS12* metilinimas prognozuoja didesnę ligos progresijos riziką.

## 6. SUMMARY

### DNA Methylation of Angiogenesis and Hypoxia-related Genes in Prostate Cancer

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men and the second leading cause of male deaths in Europe. Several recent studies have suggested an association between promoter hypermethylation of hypoxia and angiogenesis-related genes and development of various types of cancer including PCa. Identification of new potential epigenetic biomarkers could greatly enhance our ability to diagnose PCa in the early stages and to predict the course of the disease after the surgery.

The aim of our study was to investigate with qualitative method methylation profile of *ADAMTS12*, *FILIP1L* and *EPAS1* that were selected according to the DNA methylation microarrays analysis and evaluate the diagnostic and prognostic value of the selected epigenetic markers for PCa detection.

Total epigenome analysis of prostate tumors using DNA methylation microarrays technology allowed the identification of genes associated with angiogenesis and hypoxia *ADAMTS12*, *FILIP1L*, and *EPAS1* which are characterized by DNA methylation changes in tumors. Methylation status of regulatory and promoter sequences of selected genes was validated in 129 PCa and 30 benign prostate (NPT) samples by methylation-specific PCR (MSP). As an additional control group were used 17 benign prostate hyperplasia (BPH) samples.

*ADAMTS12* and *FILIP1L* promoter methylation was detected in 109 of 129 (84%) PCa samples for each gene. In NPT, methylation frequencies of *ADAMTS12* and *FILIP1L* were 6% (2 of 35) and 11% (4 of 35), respectively and the difference was statistically significant versus PCa ( $P < 0.001$ ) cases. No methylation changes were observed in BPH samples. *EPAS1* gene was unmethylated in all analyzed PCa and NPT samples. Methylation of *ADAMTS12* gene promoter was significantly associated with biochemical disease recurrence ( $P = 0.006$ ) and was frequently observed in higher tumor stage ( $P = 0.071$ ) and in higher *Gleason* score ( $P = 0.098$ ) cases of evaluated tumors. No statistically significant correlations were observed between *ADAMTS12* or *FILIP1L* methylation status and prostate-specific antigen (PSA) level, prostate mass, or patients' age.

Our study revealed a significant difference in methylation frequencies of the *ADAMTS12* and *FILIP1L* genes between prostate tumor and non-tumor tissues and BPH, and potential prognostic significance of *ADAMTS12* gene promoter's methylation. Quantitative genes' expression analysis will allow a more accurate assessment of sensitivity and specificity of these genes as molecular markers in PCa.

## 7. LITERATŪROS ŠARAŠAS

### **Bioinformaciniai įrankiai ir jų internetinės prieigos:**

1. *Sequence manipulation suite* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/dna\\_pattern.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_pattern.html)),
2. *BiQ Analyzer* (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/BiConverter/index.php>),
3. *Bisearch* (<http://bisearch.enzim.hu/>),
4. *Multiple Primer Analyzer* (<http://bisearch.enzim.hu/>).

### **Literatūriniai šaltiniai:**

1. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research of Cancer [cituota: 2015.01.17]. Internetinė prieiga: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. Ulys A, Veželis A, Ivanauskas A, Snicorius M. Treatment methods of prostate cancer recurrence after radiotherapy. Current treatment alternatives and our clinical experience. *Lithuanian Surgery* 2013, 12 (3), p. 138–143.
3. Nicholson B, Theodorescu D. Angiogenesis and Prostate Cancer Tumor Growth. *J Cell Biochem.* 2004; 91(1): 125–150; DOI: 10.1002/jcb.10772.
4. Russo G, Mischi M, Scheepens W, De la Rosette JJ, Wijkstra H. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU Int.* 2012; 110(11): 794–808; DOI:10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x.
5. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000; 14(19): 2410-2434.
6. Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Molecular Alterations during Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clin Chem.* 2011; 57(10): 1366-1375; DOI: 10.1373/clinchem.2011.165977.
7. Nagle RB, Cress AE. Metastasis Update: Human Prostate Carcinoma Invasion via Tubulogenesis. *Prostate Cancer* 2011; 2011:249290; DOI.org/10.1155/2011/249290.
8. 2014 *Encyclopædia Britannica* [cituota: 2016/03/22]. Internetinė prieiga: <http://www.britannica.com/science/prostate-gland>.
9. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(8): 437-448; DOI: 10.1093/molehr/gag064.
10. Russell PJ, Bennett S, Stricker P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem.* 1998; 44(4): 705-23.
11. Ogawa O. Risk Factors for Prostate Cancer. *JMAJ* 2004; 47(4): 186-191.

12. Lietuvos vėžio registras [cituota: 2016.03.29]. Internetinė prieiga: <http://www.vuoi.lt/index.php?-1414839826>.
13. Čepanauskienė R, Gurevičius R. Sergamumo prostatos vėžiu ir mirtingumo nuo jo dinamika Lietuvoje iki PAS eros ir po jos. *Visuomenės sveikata*, 2009; 1(44): 19-20.
14. 2016 American Cancer Society [cituota: 2016.04.05]. Internetinė prieiga: <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-diagnosis>.
15. Grönberg H, Adolfsson J, Aly MM, Nordström T, Wiklund P, Brandberg Y et al. Prostate cancer screening in men aged 50–69 years (STHLM3): a prospective population-based diagnostic study. *Lancet Oncol.* 2015; 16(16): 1667–1676; DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00361-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00361-7).
16. Prostate Cancer: diagnosis and treatment. Clinical Guideline 2014. 2014; 480: 14-74. [cituota: 2016.03.30]. Internetinė prieiga: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0068964/pdf/PubMedHealth\\_PMH0068964.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0068964/pdf/PubMedHealth_PMH0068964.pdf).
17. Informed Health Online. PSA tests for prostate cancer screening. [cituota: 2016.04.18]. Internetinė prieiga: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK284938/>.
18. Watson RWG, Schalken JA. Future opportunities for the diagnosis and treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004; 7: 8–13; DOI:10.1038/sj.pcan.4500742.
19. Chung LWK, Isaacs WB, Simons JW. *Prostate Cancer Biology, Genetics, and the New Therapeutics*, Second Edition. 2007 Human Press Ins. 508 p. ISBN 978-1-59745-224-3.
20. Saramaki O, Visakorpi T. Chromosomal aberrations in prostate cancer. *Front Biosci.* 2007; 12: 3287-301.
21. Wirth M, Altwein JE, Schmitz-Dräger B, Kuptz S, de Gruyter W. *Molecular Biology of Prostate Cancer*. New York 1998; 218 p. ISBN 3-11-016159-1.
22. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006; 97(3): 433-447; DOI: 10.1002/jcb.20696.
23. Park JY. Promoter Hypermethylation in Prostate Cancer. *Cancer Control.* 2010; 17(4): 245–255.
24. Majumdar S, Buckles E, Estrada J, Koochekpour S. Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. *Curr Genomics.* 2011; 12(7): 486–505; DOI: 10.2174/138920211797904061.
25. Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2013; 10: 327-335; DOI:10.1038/nrurol.2013.89.



26. Moison C, Guieysse-Peugeot AL, Arimondo PB. DNA methylation in cancer. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology; 2013. [cituota: 14.03.25]. Internetinè prieiga: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/DNAMethylationID20127.html>.
27. Foulkes WD, Cooney KA. Male Reproductive Cancers: Epidemiology, Pathology and Genetics. Springer, 2012; p. 346. ISBN 978-1-4419-0448-5; DOI 10.1007/978-1-4419-0449-2.
28. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.* 2011; 10: 20; DOI: 10.4103/1477-3163.83937.
29. Dasgupta S, Srinidhi S, Vishwanatha JK. Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J Carcinog.* 2012; 11:4; DOI: 10.4103/1477-3163.93001.
30. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI et al. Pathological and Molecular Mechanisms of Prostate Carcinogenesis: Implications for Diagnosis, Detection, Prevention, and Treatment. *J Cell Biochem.* 2004; 91:459–477.
31. Jelinek J, Issa JP. Epigenetics and cancer. *Peanuts a Biotechnical Newsletter. Epigenetics Special Edition.* 2009; 9(1): 9-11.
32. Phillips T, Lobo I. Genetic imprinting and X inactivation. *Nature Education* 2008; 1(1): 117.
33. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(12): 3927–3937; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2784.
34. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(8): 597-610.
35. Kar S, Sengupta D, Deb M, Shilpi A, Parbin S, Rath SK et al. Expression profiling of DNA methylation-mediated epigenetic gene-silencing factors in breast cancer. *Clin Epigenetics* 2014; 6(1): 20; DOI: 10.1186/1868-7083-6-20.
36. Mohammad HP, Baylin SB. Linking cell signaling and the epigenetic machinery. *Nat Biotechnol.* 2010; 28: 1033–1038; DOI: 101038/nbt1010-1033.
37. Dricu A, Purcaru SO, Buteica AS, Tache DE, Daianu O, Stoleru B et al. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. Chapter 7 DNA Methylation, Stem Cells and Cancer. 2012. ISBN 978-953-51-0881-8; DOI: 10.5772/53263.
38. Gioia J. Epigenetics. *Peanuts a Biotechnical Newsletter, Epigenetics Special Edition.* 2009, 9(1): 3-5.
39. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(6): 465-76; DOI: 10.1038/nrg2341.

40. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(1): 50–59; DOI:10.1093/hmg/ddm018.
41. Shenker N, Flanagan JM. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer.* 2012; 106(2): 248-53; DOI: 10.1038/bjc.2011.550.
42. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biology* 2015; 13:7; DOI: 10.1186/s12915-015-0118-4.
43. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000; 24(2): 132-8.
44. Laird P.W. The power and promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Cancer* 2003; 3(4): 253-266.
45. Sullivan EO, Goggins M. DNA methylation analysis in human cancer. *Methods Mol Biol.* 2013; 980: 131–156; DOI: 10.1007/978-1-62703-287-2\_7.
46. Krock BL, Skuli N, Simon NC. Hypoxia-Induced Angiogenesis Good and Evil. *Genes Cancer.* 2011; 2(12): 1117–1133; DOI: 10.1177/1947601911423654.
47. Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* 2004; 9(5) 10-17; DOI:10.1634/theoncologist.9-90005-10.
48. Sooriakumaran P, Kaba R. Angiogenesis and the tumour hypoxia response in prostate cancer: A review. *Int J Surg.* 2005; 3: 61-67.
49. Thomas H. Montani A, Montani JP. *Angiogenesis.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Internetinè prieiga: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/#s1.3>
50. Roberts E, Cossigny DAF, Quan GMY. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. *Prostate Cancer Volume 2013, Article ID 418340, p. 8.*
51. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol.* 1997; 157(6): 2329-33.
52. Kumar S, Rao N, Ge R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer Cancers (Basel). 2012; 4(4): 1252–1299; DOI: 10.3390/cancers4041252.
53. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. [cituota: 2016.02.13]. Internetinè prieiga: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ADAMTS12ID575ch5p13.html>.

54. Llamazares M, Obaya AJ, Moncada-Pazos A, Heljasvaara R, Espada J, López-Otín C et al. The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits antitumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway. *J Cell Sci.* 2007; 120: 3544-355; DOI:10.1242/jcs.005751.
55. Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Fraga MF, Vilorio CG, Capellá G, Gausachs M et al. The *ADAMTS12* metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer. *J Cell Sci.* 2009; 122(16): 2906-13; DOI: 10.1242/jcs.050468.
56. Kwon M, Hanna E, Lorang D, He M, Quick JS, Adem A, et al. Functional Characterization of Filamin A Interacting Protein 1-Like, a Novel Candidate for Antivascular Cancer Therapy. *Cancer Res.* 2009; 68(18): 7332–7341; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1087.
57. Notaridou M, Quaye L, Dafou D, Jones C, Song H et al. Common alleles in candidate susceptibility genes associated with risk and development of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 2063–74.
58. Burton ER, Gaffar A, Lee SJ, Adeshuko F, Whitney KD et al. Downregulation of Filamin A interacting protein 1-like is associated with promoter methylation and induces an invasive phenotype in ovarian cancer. *Mol Cancer Res.* 2011, 9: 1126-1138; DOI:10.1158/1541-7786.MCR-11-0162.
59. Desotelle J, Truong M, Ewald J, Weeratunga P, Yang B et al. CpG Island Hypermethylation Frequently Silences FILIP1L Isoform 2 Expression in Prostate Cancer. *J Urol* 2013, 189(1): 329-335; DOI:10.1016/j.juro.2013.02.363.
60. Kwon M, Lee JS, Reddy S, Rybak Y, Adem A, Libutti SK. Down-Regulation of Filamin A interacting protein 1-like Is Associated with Promoter Methylation and an Invasive Phenotype in Breast, Colon, Lung and Pancreatic Cancers. *PLoS ONE* 2013; 8(12): 82620; DOI: 10.1371/journal.pone.0082620.
61. Xia G, Kageyama Y, Hayashi T, Kawakami S, Yoshida M, Kihara K. Regulation of vascular endothelial growth factor transcription by endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) and possible involvement of EPAS1 in the angiogenesis of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2001; 91(8): 1429-36.
62. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004; 95(2): 146-53.
63. NCBI duomenų bazė [cituota: 2016.03.18]. Internetinė prieiga: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2034>.

64. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem.* 2002; 277(26): 23508-14.
65. Mohlin S, Hamidian A, Bexell D, Pählman S, Wigerup C. EPAS1 (Endothelial PAS Domain Protein.). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2014; 18(8); DOI: 10.4267/2042/54007.
66. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. Dynamic, Site-specific Interaction of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  with the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Cancer Res* 2001; 61(10): 4136-42.
67. Hu ChJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(24): 9361-9374; DOI: 10.1128/MCB.23.24.9361-9374.
68. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest.* 2007; 117(4): 862–865; DOI: 10.1172/JCI31750.
69. Tiburcio PD, Choi H, Huang LE. Complex role of HIF in cancer: the known, the unknown, and the unexpected. 2014; 2014(2): 59-70; DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/HP.S50651>.
70. Zhao J, Du F, Shen G, Zheng F, Xu B. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell Death Dis.* 2015; 6, e1600; DOI:10.1038/cddis.2014.565.
71. Ashwell MC, Angel R. Nutritional genomics: a practical approach by early life conditioning with dietary phosphorus. *R. Bras. Zootec* 2010; 39: 268-278.

## 8. PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

Šiame darbe pateikiami rezultatai pristatyti **4 tarptautinėse mokslinėse konferencijose**:

- “ANALYSIS OF PROSTATE CANCER EPIGENOME - IDENTIFYING NEW DNA METHYLATION MARKERS”. 58th Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences “*Open Readings 2015*” (2015 kovo 24d. – 27d.).
- “DNA METHYLATION ANALYSIS OF ANGIOGENESIS-RELATED GENES *ADAMTS12* AND *FILIP1L* IN PROSTATE CANCER“. International Conference of Natural and Life Sciences, “*The COINS 2016*“ (2016 vasario 29d. – kovo 3d.).
- “DNA METHYLATION ANALYSIS OF ANGIOGENESIS-RELATED GENES *ADAMTS12* AND *FILIP1L* IN PROSTATE CANCER“. 59th Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences “*Open Readings 2016*“ (2016 kovo 15d. – 18d.).
- “EPIGENETIC PROFILE OF HYPOXIA AND ANGIOGENESIS-RELATED GENES AND ITS PROGNOSTIC RELEVANCE IN PROSTATE CANCER PATIENTS”. “RSU International Student Conference 2016” (2016 kovo 16d.); Ryga, Latvija.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju magistrinio darbo vadovėms: prof. dr. (HP) Sonatai Jarmalaitei už pagalbą ruošiant šį darbą, padėsinimą, neišsenkančias idėjas bei mokslinį auklėjimą; doktorantei Kristinai Daniūnaitei už pastovų skatinimą ir vertingus patarimus viso mokslo tiriamojo darbo metu;

taip pat ŽGTC kolektyvui už puikią darbo atmosferą, doktorantei Kristinai Stuopelytei už neįkainojamą moralinę paramą, ir magistrantui Deividui Ražanauskui už vertingus patarimus kuriant MSP pradmenis.