

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rasa

Sabaliauskaitė

**ŽMOGAUS PRIEŠINĖS LIAUKOS VĖŽIO MOLEKULINIŲ ŽYMENU
TYRIMAI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007–2012 metais, Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedroje bendradarbiaujant su „UAB Fermentas“ Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centru (MTEPC).

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Mokslinė konsultantė:

prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

TURINYS.....	3
SANTRUMPOS.....	6
ĮVADAS.....	8
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1. Priešinės liaukos vėžio simptomai, diagnozavimas ir paplitimas pasaulyje.....	14
2. Priešinės liaukos vėžio rizikos veiksniai (etiologija).....	16
3. Molekuliniai priešinės liaukos žymenys.....	20
3.1. <i>TMPRSS2:ETS</i> genų sulietiniai transkriptai priešinės liaukos mėginiuose.....	20
3.1.1. Transmembraninės serino proteazės sandara ir funkcija.....	21
3.1.2. ETS transkripcijos veiksnių šeimos genai.....	22
3.1.3. <i>TMPRSS2:ETS</i> genų sulietinių transkriptų susidarymas.....	24
3.2. Telomerazės įtaka vėžinių ląstelių atsiradimui.....	25
3.3. Serino proteazės inhibitoriaus Kazal 1 įtaka vėžinių ląstelių atsiradimui.....	26
3.4. <i>GSTP1</i> , <i>RARB</i> , <i>RASSF1</i> ir <i>ZAC</i> genų raiškos įtaka vėžinėms ląstelėms atsirasti.....	27
3.5. Mažų nekoduojančių RNR susidarymas ir įtaka priešinės liaukos vėžiui išsivystyti.....	30
3.6. XMRV viruso struktūra.....	34
II. TYRIMO OBJEKTAI, METODAI IR MEDŽIAGOS.....	37
1. Tiriamosios grupės klinikiniai rodikliai ir amžius.....	37
2. Sulietinių transkriptų <i>TMPRSS2:ERG</i> ir <i>TMPRSS2:ETVI</i> aptikimas priešinės liaukos mėginiuose.....	40
2.1. Suminės RNR išskyrimas iš priešinės liaukos mėginių.....	40
2.2. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė.....	42
2.3. Atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (AT-PGR).....	42
2.4. AT-PGR produktų elektroforezė agarozės gelyje.....	44
2.5. Genų raiškos nustatymas kiekybiniu PGR (kPGR).....	44

2.6.	<i>TPRSS2:ETS</i> sulietinių transkriptų sekoskaita.....	45
2.7.	kPGR metodu gautų duomenų analizė.....	46
3.	<i>TPRSS2:ERG</i> genų sulietinių transkriptų ir <i>TERT</i> geno raiškos aptikimas šlapimo nuosėdose.....	46
4.	Genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	47
5.	MikroRNR raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	49
6.	MikroRNR raiškos analizė VCaP ir LNCaP ląstelių linijose.....	51
6.1.	VCaP ir LNCaP linijų ląstelių auginimas.....	52
6.2.	VCaP ir LNCaP ląstelių transfekcija siRNR.....	53
6.3.	Suminės RNR išskyrimas iš VCaP ir LNCaP ląstelių, kDNR sintezė ir kPGR.....	54
7.	Viruso XMRV sekų nustatymas priešinės liaukos mėginiuose.....	56
7.1.	XMRV viruso RNR tyrimai priešinės liaukos mėginiuose.....	56
7.2.	XMRV viruso DNR tyrimai.....	57
III.	REZULTATAI.....	58
1.	Genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	58
1.1.	<i>TPRSS2:ERG</i> ir <i>TPRSS2:ETV1</i> genų sulietinių transkriptų paieška ir jų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	58
1.2.	<i>TERT</i> geno raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	65
1.3.	<i>TPRSS2:ERG</i> ir <i>TERT</i> transkriptų analizė ligonių šlapimo nuosėdose.....	67
1.4.	Daugiažidininio priešinės liaukos vėžio mėginių tyrimai.....	69
1.5.	<i>ERG</i> ir <i>SPINK1</i> genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	70
1.6.	Naviką slopinančių genų, <i>GSTP1</i> , <i>RARB</i> ir <i>RASSF1</i> , raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	72
1.7.	<i>ZAC</i> geno raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose.....	74
1.8.	Sąsajos su klinikiniais rodikliais ir ligos atkryčiu.....	76
2.	Priešinės liaukos mėginių ir ląstelių linijų mikroRNR raiškos tyrimai.....	79

2.1.	MikroRNR raiškos priešinės liaukos navikuose analize mikrogardelių metodu ir jų tinkamumo patikrinimas kPGR metodu.....	80
2.2.	<i>ERG</i> geno raiškos nutildymas VCaP ląstelių linijoje.....	85
2.3.	Pasirinktų mikroRNR raiškos nustatymas transfekuotoje VCaP ląstelių linijoje.....	87
2.4.	<i>hsa-miR-149</i> mikroRNR raiškos nustatymas transfekuotoje LNCaP ląstelių linijoje.....	89
3.	XMRV sekų paieška priešinės liaukos mėginiuose.....	92
IV.	REZULTATŲ APTARIMAS.....	96
1.	<i>TMPRSS2:ERG, TERT, ERG, SPINK1, GSTP1, RARB, RASSF1</i> ir <i>ZAC</i> genų raiškos reikšmė priešinės liaukos vėžio vystymuisi.....	96
2.	Klinikinių rodiklių, pacientų amžiaus ir ištirtųjų molekulinų žymenų tarpusavio sąsajos.....	102
3.	MikroRNR raiška priešinės liaukos mėginiuose.....	104
4.	XMRV viruso sekų sąsaja su priešinės liaukos vėžio išsivystymu.....	105
	APIBENDRINIMAS.....	107
	IŠVADOS.....	110
	MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	111
	PADĖKA.....	113
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	114
	PRIEDAI.....	123

SANTRUMPOS

a. r. – aminorūgštis

AR – androgenų receptorių koduojantis genas

AT-PGR – atvirkštinės transkriptazės nulemta PGR reakcija

DHT – dihidrotestosteronas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksinukleotidų mišinys

env – XMRV apvalkalo baltymą koduojantis genas

ERG – *v-ets* eritroblastozės E26 viruso onkogeno homologas

ETS – transkripcijos veiksnių šeima

ETVI – ETS variantas 1

FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija

gag – XMRV šerdies baltymą koduojantis genas

GAPDH – glicerolaldehido 3 fosfato dehidrogenazė

GSTP1 – glutationo S transferazė π 1

kDNR – kopijinė DNR

kPGR – kiekybinė PGR, arba tikro laiko PGR

mikroRNR – mažos nekoduojančios RNR (20–23 nt)

mRNR – informacinė RNR

nt – nukleotidas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PL – priešinė liauka

pol – XMRV polimerazės baltymą koduojantis genas

pre-miR – 70 nt dydžio mikroRNR pirmtakas

pri-miR – pirminis mikroRNR transkriptas

PSA – prostatos serumo antigenas

RARB – retinoinės rūgšties receptoriaus β

RASSF1 – Ras sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos genas 1

RNR – ribonukleorūgštis

siRNR – egzogeninė 20–25 nt ilgio nekoduojanti RNR (angl. *small interfering RNA* arba *short interfering RNA*)

SPINK1 – serino proteazės inhibitorius Kazal 1

TERT – telomerazės baltymo katalizinį subvienetą koduojantis genas

TMPRSS2 – II tipo transmembraninė serino proteazė

TR – telomerazės baltymo specifinį subvienetą koduojantis genas

UV – ultravioletiniai spinduliai

ZAC/PLAG1 – cinko pirštelio transkripcijos veiksnys

XMRV – *Xenotropic Murine Leukemia Virus-related virus* (gamaretrovirusas)

ĮVADAS

Priešinės liaukos (PL) vėžys – dažniausia vyrų onkologinė liga, kuri pasižymi dideliu mirtingumu, ligos eigos bei molekulinį pokyčių heterogeniškumu. Po operacijos vieni ligoniai ilgai gyvena be ligos simptomų, o kitiems liga greitai progresuoja. Pagrindinė priežastis, lemianti sunkią ligos eigą ir didelį mirtingumą, yra atsako į lyties hormonų signalus sutrikimas ir išsivystęs nejautrumas hormonų terapijai. Tai lemia dažną metastazavimą į kaulų sistemą ir ribotą jautrumą sisteminei chemoterapijai. Nepaisant Lietuvoje aktyviai veikiančios PL vėžio ankstyvos diagnostikos programos, pusei ligonių liga vis dar diagnozuojama pažengusios stadijos. Šiuo metu priešinės liaukos specifinis antigenas (PSA) yra plačiausiai taikomas žymuo, kurį įdiegus pagerėjo PL vėžio diagnostika. Didelė PSA koncentracija nustatoma ne tik sergant PL vėžiu, bet ir uždegimo sukeltomis PL ligomis. Siekiant padidinti PL vėžiu sergančių ligonių išgyvenamumą, ieškoma naujų molekulinį PL vėžio žymenų, galinčių padėti prognozuoti ligos eigą ir parinkti tinkamą gydymą. Molekuliniai vėžio žymenys – tai genų mutacijos ir epimutacijos, genų ir mikroRNR raiškos pakitimai, funkciškai ar struktūriškai pakitę baltymai bei kitokios navikiniuose ar ikinavikiniuose audiniuose aptinkamos pažaidos, kurių nerandama sveikose ląstelėse. Prognozinę vertę turi tik tie molekuliniai žymenys, kurių raiška koreliuoja su ligos klinicine eiga bei ilgesne išgyvenamumo trukme, kai nėra ligos atkryčio. Perspektyviausi yra nauji PL vėžio molekuliniai žymenys – chromosomų persitvarkymai, kurie aktyvina ETS šeimos onkogenus. S. A. Tomlins ir kiti mokslininkai, 2005 metais pritaikę bioinformatinį mikrogardelių duomenų vertinimo metodą, nustatė, kad PL navikams dažnai būdinga padidėjusi *ERG* ir *ETV1* genų raiška. Šie genai priklauso ETS transkripcijos veiksnių šeimai, kurių baltymai priskiriami prie potencialių onkobaltymų, pasižyminčių didele homologija virusiniam onkobaltymui *v-ets*. ETS yra didžiausia transkripcijos veiksnių šeima, kuriai priklauso 29 žmogaus, 28 pelės, 10 *Caenorhabditis elegans* ir 9 drozofilos genai. Potencialūs onkogenai dėl chromosomų persitvarkymų yra perkeliama prie aktyviai transkribuojamų genų promotorių ir taip aktyvinama

onkobaltymų raiška. ETS veiksniai ypač reikšmingi epitelio ir endotelio audinių, kraujodaros, nervų ir endokrininės sistemų vystymuisi ir dalyvauja dalijantis ir migruojant ląstelėms. Žinduolių ląstelėse ETS baltymai aktyvina augimo veiksnių raišką, taip pat dalyvauja Ras onkogeno signaliniame kelyje. *TMPRSS2:ERG* genų susijungimas nustatomas PL adenokarcinomose ir intraepitelinės neoplazijos (PIN) audiniuose (apie 20 %), bet neaptinkamas atrofavusiuose ar normaliuose PL audiniuose. Toks genų susijungimas būdingas ne tik hormonams jautrioms metastazėms, bet ir hormonams nejautriose metastazėse. Dar 1977 metais buvo nustatyta, kad onkologinėmis ligomis sergančių ligonių organizmo skysčiuose (kraujo serume, šlapime ir seilėse) gali būti aptinkama laisvai cirkuliuojančių nukleorūgščių (DNR ir RNR). Vėžinių ląstelių DNR, RNR ar mikroRNR į organizmo skysčius patenka žuvus pavienėms naviko ląstelėms. Ši DNR ar RNR yra suskaidyta į fragmentus, mažos koncentracijos, todėl genetiniai pakitimai joje gali būti tiriami tik ypač jautriais metodais. K. P. Porkka ir kiti mokslininkai 2007 metais, pritaikę bioinformatinį mikrogardelių duomenų vertinimo metodą, nustatė, kad PL navikui yra būdinga specifinių mikroRNR raiška, kuri neretai koreliuoja su klinikiniais rodikliais ir ligos prognoze. Epigenetinės pažaidos PL vėžinėse ląstelėse aptinkamos dažniau nei genų mutacijos, be to, jos pasireiškia ankstyvose stadijose. Padidėjęs DNR metilinimas (hipermetilinimas) reguliacinių genų promotoriuose inaktyvina genų raišką ir taip blokuoja jų funkcijas. Daugelyje PL navikų (iki 90 %) nustatomas geno, koduojančio fermentą glutationo S transferazę π 1 (*GSTP1*) ir saugančio ląstelę nuo kancerogenų poveikio, promotoriaus hipermetilinimas. PL navikui charakterizuoti ir ligos eigai nustatyti svarbu žinoti pakitusių genų ir mikroRNR raišką. Šiuo metu nėra gerų žymenų, kurie padėtų efektyviai prognozuoti PL vystymąsi galbūt, mūsų pasirinkti žymenys (*TMPRSS2:ERG*, *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC*) padės nustatyti vėžio tipą, prognozuoti ligos vystymosi eigą ir parinkti optimalias paciento gydymo strategijas.

DARBO TIKSLAS

Ištirti ir įvertinti priešinės liaukos navikų potencialius molekulinis žymenis: nustatyti onkogenų ir naviką slopinančių genų raišką, mikroRNR raiškos profilį ir XMRV viruso (*Xenotropic Murine Leukemia Virus-related virus*) sekų dažnį tirtuose priešinės liaukos mėginiuose, įvertinti tirtų molekulinų žymenų tarpusavio sąsajas bei jų ryšį su klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi.

PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI

1. Priešinės liaukos mėginiuose, šlapimo nuosėdose ir daugiažidiniinių navikų mėginiuose nustatyti *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto raiškos dažnį ir intensyvumą. Įvertinti *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto raiškos sąsajas su klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi.
2. Priešinės liaukos mėginiuose ištirti genų *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* raišką kPGR metodu, įvertinti sąsajas su klinikiniais ir molekuliniiais rodikliais bei pacientų amžiumi.
3. Mikrogardelių metodu ištirti mikroRNR raiškos profilį *TMPRSS2:ERG* sulietiniam transkriptui teigiamuose ir neigiamuose navikuose. Atrinktų mikroRNR raiškos pokyčius patvirtinti kPGR metodu. Įvertinti pasirinktų mikroRNR raiškos sąsajas su klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi.
4. Priešinės liaukos mėginiuose atlikti XMRV viruso (*Xenotropic Murine Leukemia Virus-related virus*) sekų paiešką.

DARBO NAUJUMAS

Lietuvos vyrų populiacijos PL navikų mėginiuose iki šiol nebuvo atlikta molekulių žymenų analizė taikant naujausius molekulinis metodus: kiekybinį PGR ir (ar) mikrogardeles. Darbo metu gauti vertingi genų raiškos PL mėginiuose rezultatai. Naviko DNR ir RNR molekulinė analizė, genetinių pažeidimų ir (ar) pakitimų įvairovė gali suteikti informacijos apie vėžio jautrumą gydymui bei padėti prognozuoti ligos progresavimo tikimybę.

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

PL vėžio vystymasis vis dar prognozuojamas remiantis įprastine klinikinių žymenų sistema (PSA), o gydymui tik pavieniais atvejais skiriami vaistai, kurie specifiskai veikia ligą sukėlusį genetinį pakitimą. Mes bandėme kuo išsamiau atlikti PL mėginių molekulinę analizę: ištirti *TMPRSS2:ERG*, *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* genų raišką, aptikti pakitusią mikroRNR raišką PL mėginiuose, kurie tarpusavyje skyrėsi *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimu. Mūsų gauti rezultatai patikimai įrodo, kad *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas ir *TERT* raiška mėginyje siejasi su didesne ligos atsinaujinimo tikimybe. *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimas PL mėginyje turi įtakos mikroRNR raiškai – nustatyta sumažėjusi *hsa-miR-149* mikroRNR raiška PL mėginiuose. Mes atlikome *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* geno raiškos analizę šlapimo nuosėdose. Šlapimo nuosėdų analizė gali būti papildoma priemonė ligos diagnozei, neatsisakant įprastinių diagnostikos metodų. Atliktais tyrimais metu mes siekėme prisidėti prie molekulių žymenų sistemos, naujos kartos prevencijos ir gydymo strategijos kūrimo.

GINTI PRISTATOMI TEIGINIAI

1. *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas dažnai aptinkamas priešinės liaukos navikuose ir įtakoja kitų genų ir mikroRNR raišką
2. *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* žymenys prognozuoja blogesnę ligos eigą ir trumpesnį laikotarpį be ligos atkryčio.
3. Daugiažidiniams priešinės liaukos navikams būdinga *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto genetinė įvairovė ir skirtinga geno raiška.
4. Lietuvos vyrų populiacijos priešinės liaukos mėginiuose aptinkamos XMRV viruso sekos, jų aptikimo dažnis atitinka pasaulines tendencijas. XMRV virusas nėra priešinės liaukos vėžio išsivystymo priežastis.

DARBO APROBAVIMAS

Darbo tema paskelbti trys moksliniai straipsniai, iš kurių vienas – žurnale, įrašytame į Mokslinės informacijos instituto sąrašą (ISI).

Darbo rezultatai pristatyti mokslo visuomenei keturiose tarptautinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje.

DARBO APIMTIS

Darbą sudaro: Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Metodai, Rezultatai, Rezultatų aptarimas, Išvados, Mokslinių darbų sąrašas, Padėka, Literatūros sąrašas ir Priedai.

Darbo apimtis – 130 puslapių, kuriuose pateikiami 42 paveikslai ir 12 lentelių. Prieduose yra vienas paveikslas ir 9 lentelės.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1. Priešinės liaukos naviko simptomai, diagnozavimas ir paplitimas pasaulyje

- Priešinė liauka. Vyro lyties organai yra skirstomi į vidinius ir išorinius. Vidiniams lyties organams priklauso priešinė liauka (arba prostata), kuri yra kaštono dydžio, vidutinis jos svoris 20 gramų. PL yra mažajame dubenyje po šlapimo pūsle. PL sudaro raumeninis ir liaukinis audiniai. Raumeninis audinys sudaro didžiąją PL dalį, liaukinį audinį sudaro šakotos liaukos, kurių gaminamos išskyros įeina į spermą sudėtį (Abate-Shen ir kt., 2000; Anusevičienė ir kt., 2002).

- Simptomai. PL vėžys, kitaip nei kiti navikai, gali ilgus metus būti PL nesukeldamas jokių simptomų. Pagrindinis simptomas esant PL vėžiui yra sunkus ir skausmingas šlapinimasis. Taip pat gali būti dažnas norėjimas šlapintis, nors šlapimo pūslė yra tuščia, atsiranda kraujo šlapime. Kai vėžys yra išplitęs į kitus audinius, dažnai jaučiamas kaulų skausmas, silpnumas, prarandamas svoris, išsivysto anemija ir inkstų nepakankamumas.

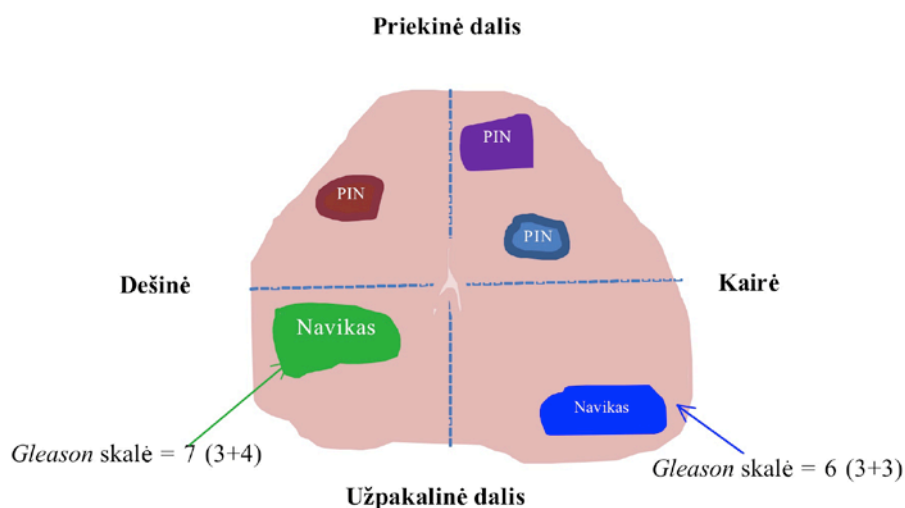
- Paplitimas pasaulyje ir Lietuvoje. PL vėžys yra antra pagal dažnumą vėžio forma po odos vėžio bei antra pagal mirtingumą po plaučių vėžio vyrų populiacijoje (Ahmed, 2010). PL vėžys pasižymi dideliu heterogeniškumu, diagnozavus šią ligą vieni pacientai miršta praėjus 2–3 metams, kiti išgyvena 10–20 metų, o kartais ir daugiau (Taylor ir kt., 2010). Pacientų, kuriems aptinkamos metastazės, išgyvenamumas yra nuo devynių mėnesių iki vienerių metų (Ahmed, 2010). Lietuvoje PL vėžys yra dažniausiai diagnozuojama vyrų onkologinė liga. Išankstiniais 2010 metų Lietuvos vėžio registro duomenimis, Lietuvoje užfiksuoti 2237 nauji PL vėžio atvejai: 18,6 % I stadijos, 38,1 % II stadijos, 21,8 % III stadijos ir 5,1 % IV stadijos PL vėžio atvejų, o 16,4 % atvejų stadija dar nenustatyta.

- Diagnozavimas. Priešinės liaukos specifinis antigenas (PSA) yra geriausias PL vėžio žymuo kraujyje, nors PSA specifiškumas labai mažas (Perry ir kt., 2006). PSA lygis gali padidėti esant uždegimui, šlapimo takų infekcijai, kartais vyriui senstant. Apie 15 % PL vėžio atvejų aptinkamas labai žemas PSA lygis (Makarov ir kt., 2009). Padidėjęs PSA kiekis kraujyje leidžia tik įtarti PL vėžį, o norint jį diagnozuoti būtini papildomi tyrimai, pvz., biopsija – PL vėžio aptikimas tokiu būdu yra gana sudėtingas procesas (De Marzo ir kt., 2003), arba PL tyrimas ultragarsu pro tiesiąją žarną. Tik 25–30 % atvejų, kuriems atlikta biopsija remiantis PSA testu, yra teigiami (Ahmed, 2010). Gydomo metu PSA pasižymi prognozinė verte: esant žemam PSA lygiui (iki 1,0 ng/ml) – mažesnė tikimybė ligai atsikartoti; esant aukštam PSA lygiui (daugiau kaip 4 ng/ml, Lietuvoje – 3 ng/ml) – didesnė tikimybė (Chodak 2006).

- Priešinės liaukos mėginio diferenciacija pagal *Gleason* skalę ir vėžio stadiją. Dėl PL vėžio heterogeniškumo dažniausiai naudojama *Gleason* sistema. Ši vertinimo sistema grindžiama dviejų skaičių suma, kuri gali svyruoti nuo 2 iki 10, kai 2 žymi mažiausiai agresyvų, o 10 – agresyviausią naviką. Suma susidaro iš dviejų skaičių, kurie pažymi du dominuojančius naviko diferenciacijos laukus: diferenciacijos laipsniai nuo 1 (labiausiai diferencijuotas) iki 5 (mažiausiai diferencijuotas). Remiantis diferenciacija pagal *Gleason* skalę yra skiriamas gydymas (De Marzo ir kt., 2003). Patologai identifikuodami PL vėžį prie *Gleason* skalės taip pat nurodo ir vėžio stadiją. pT2 reiškia, kad vėžys aptinkamas tik PL: pT2a – vėžys apima pusę skilties arba net mažesnę jos dalį, pT2b – vėžys apima daugiau nei pusę skilties, bet nėra išplitęs į abi skiltis, pT2c – vėžys apima abi skiltis. pT3 reiškia, kad vėžys išplitęs: pT3a – vėžys išplitęs už PL ribų, pT3b – vėžys aptinkamas sėklinėse pūslelėse. pT4 reiškia, kad vėžys aptinkamas šlapimo pūslelyje ir (arba) tiesiojoje žarnoje.

- Priešinės liaukos vėžio formos: šeiminis (paveldimas) ir nešeiminis (nepaveldimas). Paveldimas PL vėžys sudaro nedidelę grupę diagnozuojamų

atvejų – 10 %, dažniausiai siejama su ankstyva ligos eiga (Abate-Shen ir kt., 2000). Šis skaičius išauga iki 40 %, kai liga diagnozuojama iki 55 metų. Asmenims, kurių tėvui ar broliui PL vėžys buvo diagnozuotas iki 60 metų, tikimybė susirgti PL vėžiu yra 2,5 karto didesnė ir liga yra nustatoma šešeriais metais anksčiau negu nešeiminės kilmės navikai (Li ir kt., 2004). PL vėžys yra heterogeniškas, jam būdingi keli navikiniai židiniai (daugiažidininis vėžys) su skirtingais molekuliniais pakitimais bei skirtingomis diferenciacijos pagal *Gleason* skalėmis (Rostad ir kt., 2009) (**1 pav.**). Daugiažidininis PL vėžys yra dažniausia PL vėžio forma (80–90 %), ir tikimybė juo susirgti didėja su amžiumi (Menendez-Arias, 2011).



1 pav. Priešinės liaukos daugiažidinių navikų išsidėstymo schema. PIN – priešinės liaukos intraepitelinė neoplazija

2. Priešinės liaukos vėžio rizikos veiksniai (etiologija)

Skiriami keli PL vėžio rizikos veiksniai: amžius, rasė, aplinkos veiksniai, endogeniniai veiksniai, genetiniai veiksniai, infekcijos ir uždegimai. Kiekvieną aptarsime plačiau.

- Reikšmingiausias rizikos veiksnys yra amžius (Abate-Shen ir kt., 2000). Dauguma PL navikų auga lėtai, todėl jaunesniems vyrams nesukelia jokių problemų. Ilgėjant gyvenimo trukmei, daugėja vyresnio amžiaus asmenų, kuriems ši liga gali būti diagnozuota. Remiantis tuo galima teigti, kad PL vėžys yra vyresnių žmonių liga, apie 80 % pacientų, kuriems diagnozuojama ši liga, yra 65 metų amžiaus ar vyresni. Ligos amžiaus vidurkis yra apie 70 metų. Jaunesniems nei 40 metų pacientams PL vėžys diagnozuojamas retai – vienam iš 12 000 asmenų, ir dažniausiai yra paveldimas (Li ir kt., 2004).

- Antras pagal reikšmingumą rizikos veiksnys yra rasė. Didžiausia rizika susirgti PL vėžiu Jungtinėse Amerikos Valstijose gyvenantiems afroamerikiečiams ir baltaodžiams, o mažiausia rizika – azijiečiams (Li ir kt., 2004). Mirtingumas nuo PL vėžio yra du kartus didesnis afroamerikiečių negu europiečių (Magi-Galluzzi ir kt., 2011). Palyginus kinų ir kitų populiacijų vyrų PL rodiklius, pastebėta, kad kinams būdingas mažesnis androgenų raiškos lygis ir ilgesnė CAG nukleotidų pasikartojimo seka androgeno gene. Šie skirtumai gali lemti mažesnę PL vėžio rizikos lygį kinų vyrų populiacijoje (Bastus ir kt., 2010).

- Rizikos veiksnys gali būti ir aplinka (mityba ir gyvenimo būdas). Tiriant azijiečius nustatyta, kad raudonos mėsos vartojimas ir nutukimas didina tikimybę susirgti PL vėžiu, o soja, žuvis ir žalioji arbata – mažina (Müller ir kt., 2006). Svarbus veiksnys, kad liga nesivystytų ir nebūtų atkryčio, yra daržovių vartojimas. Antioksidantai vitaminas E ir selenas mažina riziką susirgti PL vėžiu (Nelson ir kt., 2003; Chodak 2006). Asmenys, kurie laikosi aktyvios gyvensenos, taip pat pasižymi mažesne tikimybe susirgti PL vėžiu.

- Endogeniniai veiksniai (hormonai bei androgenai) irgi priklauso rizikos veiksniams. Viena iš pagrindinių PL vėžio atsiradimo priežasčių yra atsako į lyties hormonų signalus sutrikimas, o PL vėžio metastazavimui – susiformavęs nejautrumas hormonų terapijai (Li ir kt., 2004). Nenavikinis (normalus) PL augimas ir vystymasis bei naviko formavimasis yra priklausomi nuo androgenų

(Waltering ir kt., 2010). Progresuojančio PL vėžio žymeniu yra laikomas fenotipas, kuris yra nepriklausomas nuo androgenų (Lin ir kt., 1999). Nenavikinėje PL androgenų receptorių (AR) raiška aptinkama epitelinėse ir stromos ląstelėse. Epitelinėse ląstelėse AR atsakingi už jų diferenciaciją, o stromos ląstelių AR veikia epitelinių ląstelių proliferaciją. Androgenų signalinis kelias reguliuoja daugumos fermentų sintezę, atsakingų už steroidų kilmę bei ląstelės ciklą (Waltering ir kt., 2010). AR jungiasi prie genų taikinių, kurie yra susiję su *ERG* susijusiais genais (Rickman ir kt., 2010). Esant padėjusiai *ERG* raiškai, dažniausiai aptinkamas ir padidėjęs *AR* transkriptų, kurie skatina vėžinių ląstelių proliferaciją, kiekis (Yu ir kt., 2010).

- Pastaraisiais metais daug dėmesio telkiama į genetinius veiksnius. Diagnozuojant PL vėžį navikinės ląstelės jau yra sukaupusios daugybę somatinių mutacijų, genų delecijų bei amplifikacijų, chromosominių persitvarkymų ir DNR metilinimo pasikeitimų (Nelson ir kt., 2003). Vienas iš pagrindinių vėžio tyrimų tikslų yra nustatyti pakitusius genus, kurie yra esminiai vėžiui atsirasti ir vystytis, bei sukurti efektyviausius gydymo būdus. Dauguma jų aptikta chromosomų persitvarkymo metu: 1) promotorius arba stiprintuvo elementas (angl. *enhancer*) atsitiktinai prijungiamas prie protoonkogeno, 2) persitvarkymo metu suliejami du genai, nuo jų mRNR transliacijos metu gaunamas sulietinis baltymas, kuris pasižymi nauju arba pakitusiu aktyvumu (Tomlins ir kt., 2005). PL navikiniame mėginyje dažnai aptinkami chromosomų pakitimai: papildomas 7p, 7q, 8q ir Xq chromosomų sričių įgijimas ir (arba) 8p, 10q, 13q ir 16q chromosomų sričių praradimas (Nelson ir kt., 2003; De Marzo ir kt., 2003). Šiuo metu yra suskaičiuojama per 350 genų susiliejimų, kurie atsiranda dėl chromosomų aberacijų. Dėmesys yra telkiamas į *TMPRSS2:ETS* sulietinius transkriptus, aptinkamus navikiniuose PL mėginiuose. Visa tai aptarsime plačiau 3.1 skyrelyje. Pakitęs telomerazės aktyvumas gali būti vienas iš veiksnių, lemiančių PL vėžio atsiradimą ir jo piktybėjimą (Latil ir kt., 2000), tai aptarsime plačiau 3.2 skyrelyje. PL vėžiui yra būdingi ne tik genetiniai, bet ir epigenetiniai pokyčiai, pavyzdžiui, citozino

metilinimas, chromatino struktūros ir jo organizacijos pokytis (Kwabi-Addo ir kt., 2010), tai aptarsime plačiau 3.4 skyrelyje. J. Lu ir kiti mokslininkai 2005 metais atliko 217 skirtingų navikų tipų mikroRNR analizę ir parodė, kad mikroRNR yra labai informatyvios molekulės vėžio vystymosi eigai ir jo diferenciacijai nustatyti (Gandellini ir kt., 2009), tai aptarsime plačiau 3.5 skyrelyje.

- Rizikos veiksniais priskiriama infekcijos ir uždegimai. Patogeniniai organizmai yra atsakingi už infekcijos ir uždegimo atsiradimą PL. Uždegimą gali sukelti lytiniu būdu plintantys mikroorganizmai: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* ir *Treponema pallidum*, bei nelytiniu būdu perduodamos bakterijos: *Propionibacterium acnes* ir Gram neigiamos bakterijos *Escherichia coli* (De Marzo ir kt., 2007). Žinoma keletas genų, kurių raiškos pakitimas gali turėti įtakos infekcijai atsirasti (*MSR1*, *MIC-1*, *TLR4* ir *RNASEL*), kai jie mutuoja, padidėja tikimybė susirgti PL vėžiu (Silverman ir kt., 2010). Asmenims su viena mutavusio geno *RNASEL* kopija yra 50 % didesnė tikimybė susirgti PL vėžiu (Menendez-Arias, 2011). Nepertraukiamas RNaseL aktyvumas sukelia mitochondrijų nulemtą apoptozę, kuri yra susilpninama, kai RNaseL yra pakitusi (Silverman ir kt., 2010). Uždegimą gali sukelti ir cheminis pažeidimas – šlapimo refliuksas. Šlapime aptinkama daug cheminių komponentų, kurie gali būti toksiški PL. Virusai taip pat gali sukelti uždegimą. Žinomi keli virusai, kurie aptinkami PL: žmogaus papilomos virusas (HPV), *Herpes simplex* 2 tipo viruso (HSV2), citomegalovirusas (CMV) ir žmogaus *herpes* 8 tipo viruso (HHV8) (De Marzo ir kt., 2007). Retrovirusai, kaip vėžį sukeliantys veiksniai, pirmiausiai buvo rasti gyvūnuose, ir tik 2006 metais gauti pirmieji įrodymai, kad gamaretrovirusas infekuoja žmogų (Klein ir kt., 2011). Gamaretrovirusas (XMRV) yra vienas iš tokių virusų, kuris galėtų lemti PL vėžį ir lėtinio nuovargio sindromą (Silverman ir kt., 2010), tai aptarsime plačiau 3.6 skyrelyje.

3. Molekuliniai priešinės liaukos žymenys

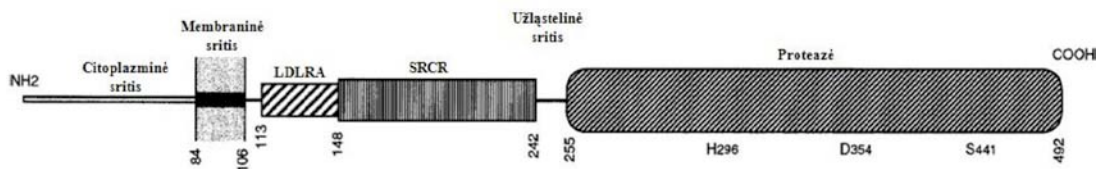
Mes plačiau ištyrėme kelis naujus ar mažai tyrinėtus molekulinis PL žymenis: 1) *TMPRSS2:ETS* sulietinius transkriptus, skatinančius vėžinių ląstelių proliferaciją; 2) telomerazės raiškos pakitimus; 3) genus, kurie dalyvauja valdant ląstelės dalijimąsi: *RARB* ir *RASSF1*; 4) genus kontroliuojančius apoptozę ir DNR integralumą: *GSTP1* ir *ZAC*; 5) pakitusią mikroRNR raišką. Juos aptarsime plačiau.

3.1. *TMPRSS2:ETS* genų sulietiniai transkriptai priešinės liaukos mėginiuose

Žmogaus 21 chromosoma yra viena mažiausių chromosomų, jos ilgasis petys yra apie 40 Mb, turintis apytiksliai 400 genų. Trumpasis petys – 10–15 Mb, jis pasižymi didele homologija su kitomis keturiomis akrocentrinėmis žmogaus chromosomomis (Paoloni-Giacobino ir kt., 1997). J. J. Tu ir kiti mokslininkai 2007 metais parodė, kad *TMPRSS2* ir *ETS* genų, aptinkamų žmogaus 21 chromosomoje, susiliejinimas gali įvykti dėl subalansuotos ar nesubalansuotos translokacijos arba delecijos (trumpajame 21 chromosomos petyje). *TMPRSS2:ETS* sulietiniai transkriptai atsiranda *ETS* transkripcijos veiksmui (*ERG*, *ETV1*, *ETV4* ar *ETV5*) prisijungiant vieną iš trijų (*TMPRSS2*, *SLC45A3* ir *NDRG1*) androgenais reguliuojamų genų 5' srities promotoriaus sekų. Apie 50 % PL navikų turi bent vieną tokį sulietinį transkriptą (Rickamr ir kt., 2010). Genų susiliejinimas dėl delecijos dažniau įvyksta afroamerikiečių populiacijose negu europiečių ar japonų. Kai kurie mokslininkai teigia, kad toks genų susiliejinimas rodo daug agresyvesnį PL vėžį (Magi-Galluzzi ir kt., 2011).

3.1.1. Transmembraninės serino proteazės sandara ir funkcija

TMPRSS2 genas aptinkamas 21q22.3 chromosomos srityje (arčiau telomeros), jis koduoja II tipo transmembraninę serino proteazę (Hooper ir kt., 2001). 1997 metais pirmą kartą klonuotas *TMPRSS2* genas, kurio promotorius yra valdomas androgenų (Perner ir kt., 2007). *TMPRSS2* genas sudarytas iš 14 egzonų (Tu ir kt., 2007), nuo jo transkribuojamas 3,8 kb transkriptas (Afar ir kt., 2001), kuris koduoja 492 a. r. baltymą (Kim ir kt., 2006). *TMPRSS2* baltymo pagrindiniai domenai yra serino peptidazės domenas, dviejų tipų receptoriaus domenai (SRCR ir LDL) ir transmembraninis domenas (Paoloni-Giacobino ir kt., 1997) (**2 pav.**).



2 pav. *TMPRSS2* baltymo struktūra (pagal Paoloni-Giacobino ir kt., 1997, su pakeitimais)

TMPRSS2 baltymas aptinkamas ląstelės membranoje ir gali būti receptoriumi kitiems baltymams. *TMPRSS2* baltymo užląstelinis COOH galas turi proteazės domeną, kuris 45–55 % a. r. panašus į kitus serino proteazės šeimos baltymus (Paoloni-Giacobino ir kt., 1997). Serino proteazė yra svarbi fiziologiniams ir patologiniams žmogaus organizmo procesams: baltymų katabolizmui, kraujo krešėjimui, ląstelių augimui ir jų migracijai, morfogenezei, uždegimui ir vėžio atsiradimui, jo vystymuisi ir metastazių radimuisi (Vaarala ir kt., 2001). *TMPRSS2* geno raiška, nors ir nėra didelė, aptinkama daugelyje audinių: skrandyje, seilių ir pieno liaukose, kepenyse, inkstuose, kasoje, plaučiuose, trachėjoje, širdyje, placentoje, užkrūčio liaukoje, embriono smegenyse, fetaliniuose inkstų ir plaučių audiniuose (Paoloni-

Giacobino ir kt., 1997; Vaarala ir kt., 2001). Nors šio geno stipri raiška aptinkama embriono smegenyse, jos nerasta suaugusio žmogaus smegenyse (Paoloni-Giacobino ir kt., 1997). kPGR tyrimai parodė, kad *TMPRSS2* geno raiška navikiniuose PL mėginiuose yra didesnė nei normaliuose audiniuose ir stiprėja didėjant diferenciacijai pagal *Gleason* skalę bei naviko stadiją (Clark ir kt., 2009; Mwamukonda ir kt., 2010).

3.1.2. ETS transkripcijos veiksnių šeimos genai

ETS veiksniai tai *trans*- veikimu pasižymintys fosfobaltymai, kurie svarbūs ląstelių migracijai ir proliferacijai (Gutierrez-Hartman ir kt., 2007). ETS transkripcijos veiksnio šeimai priklauso 29 žmogaus genai (Clark ir kt., 2009). Visi ETS transkripcijos veiksniai turi konservatyvų 80 a. r. Ets DNR rišantį domeną, kuris jungiasi prie DNR per 5'-GGA(A/T)-3' nukleotidinę sritį (Clark ir kt., 2009). ETS šeimos baltymai turi daugiau kaip 200 genų taikinių. Žinduolių ląstelėse jų taikiniai dažniausiai yra augimo veiksniai (Gutierrez-Hartman ir kt., 2007). Navikiniuose PL mėginiuose, kuriuose aptinkami ETS raiškos pokyčiai, randama fenotipinių ir molekulinų pokyčių, palyginti su navikiniais PL mėginiais, kuriuose ETS raiškos pokyčių nėra (Svensson ir kt., 2010). Šiuo metu yra žinoma 14 genų (*TMPRSS2*, *SLC45A3*, *HERV-K*, *KLK2*, *CANT1*, *FOXP1*, *HERVK17*, *EST14*, *FLJ35294*, *C15orf21*, *HNRPA2B1*, *DDX5*, *ACSL3* ir *NDRG1*), kurie yra 5' srities „donorai“ keturiems ETS transkripcijos šeimos genams: *ERG*, *ETV1*, *ETV4* ir *ETV5*. *TMPRSS:ETS* genų susiliejimas gali būti viena iš genetinio nestabilumo priežasčių. S. A. Tomlins ir kiti mokslininkai 2005 metais parodė, kad bent dviejų ETS šeimos genų – *ERG* ir *ETV1* raiška yra smarkiai padidėjusi PL navikiniuose mėginiuose (Clark ir kt., 2009).

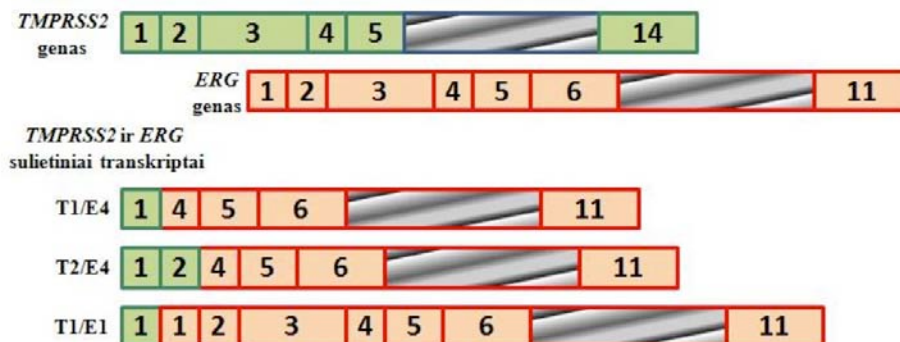
- *ERG* (*v-ets* eritroblastozės E26 viruso onkogeno homologas) genas aptinkamas 21q22.3 chromosomos srityje, išsidėsčiusioje arčiau centromeros (Svensson ir kt., 2010). *ERG* genas yra sudarytas iš 11 egzonų, jo funkciniai

domenai aptinkami penktajame ir šeštajame egzonuose, o ATG kodonas yra ketvirtajame egzone (Tu ir kt., 2007). Transkribuojamo *ERG* geno aptinkama mažiausiai devynios splaisingo formos, kurios turi daugybę transkripcijos pradėties vietų. Alternatyvaus splaisingo metu gaunami bent penki žinomi funkcionalūs baltymai. *ERG* baltymai gali sudaryti homodimerus arba heterodimerus su kitais *ERG*, alternatyvaus splaisingo metu susidariusiais baltymais arba kitais ETS šeimos baltymais (Clark ir kt., 2009). Manoma, kad *ERG* onkogenas dalyvauja PL epitelio ląstelių proliferacijoje bei aktyvina *C-MYC* geną (Mohamed ir kt., 2011). Padėjusi *ERG* raiška padidina ląstelių gebėjimą susijungti *in vitro* (Tomlins ir kt., 2008a; Yu ir kt., 2010). Daugiau kaip 90% padidėjusios *ERG* geno raiškos PL navikuose yra susijusi su *TMPRSS2:ERG* buvimu mėginiuose, kuriuos kontroliuoja nuo androgenų priklausomi reguliaciniai elementai (Tomlins ir kt., 2008a).

- S. A. Tomlins kartu su kitais mokslininkais 2005 metais, mikrogardelių metodu analizuodami PL ląstelių linijų RNR, aptiko padidėjusią *ETV1* geno raišką, 2006 metais – *ETV4* geno, o 2008 metais – *ETV5* geno. *ETV1* aptinkamas 7p21.2 chromosomos srityje, *ETV4* – 17q21, o *ETV5* – 3q28. *ETV1* genas yra sudarytas iš 14 egzonų, koduojančių 477 a. r. baltymą, kurio susijungimo su DNR domenais aptinkamas paskutiniame egzone (Miyagi ir kt., 2010). Navikinių PL mėginių mikrogardelių tyrimais aptikta *ETV1* geno raiška yra nuo 6% iki 16%, bet tik 1% visų atliktų analizių rodo esant *TMPRSS2:ETV1* sulietinį transkriptą (Tomlins ir kt., 2007). Šiuo metu yra žinoma mažiausiai 10 alternatyvių *ETV1* susiliejimo partnerių (Gasi ir kt., 2011). Unikali *ETV1* geno savybė ta, kad navikiniuose PL audiniuose transkriptas aptinkamas ne tik kaip sulietinis, bet ir viso ilgio. *ETV1*, *ETV4* ir *ETV5* baltymai turi N-galinę sritį, joje yra konservatyvus a.r. domenai, kurio stokoja *ERG* baltymas. Mėginiai, kuriuose yra padidėjusi *ETV1* geno raiška, skiriasi nuo mėginių, kuriuose aptinkama padidėjusi sulietinio transkripto raiška (Gasi ir kt., 2011).

3.1.3. *TMPRSS2:ETS* genų sulietinių transkriptų susidarymas

TMPRSS2:ETS sulietiniai transkriptai skirtingose tirtose grupėse aptinkami nuo 15 % iki 77,8 %. Dažniausiai genų susilieėjimas įvyksta dėl delecijos tarp *TMPRSS2* ir *ERG* genų, kuri yra apie 3 Mb (Mehra ir kt., 2007a). S. Perner ir kiti mokslininkai, 2007 metais ištyrę 237 PL navikinius mėginius, nustatė, kad 30 % *TMPRSS2:ERG* susilieėjimas įvyko dėl delecijos, o 18,5 % – dėl translokacijos. J. Clark ir kiti mokslininkai 2007 metais pirmieji nuosekliai ištyrė sulietinių transkriptų įvairovę navikiniuose PL mėginiuose. Iš viso rasta 14 skirtingų *TMPRSS2:ERG* transkriptų, kuriuose tarpusavyje įvairiai susilieję *TMPRSS2* 1, 2 ir 3 egzoni su *ERG* 2, 3, 4, 5 ar 6 egzonais. Dažniausiai navikiniuose PL mėginiuose aptinkami sulietiniai transkriptai *TMPRSS2* geno 1 egzono ir *ERG* geno 4 egzono (T1/E4) bei T2/E4 susijungimas (Clark ir kt., 2009) (3 pav.).



3 pav. *TMPRSS2* ir *ERG* genų ir sulietinių transkriptų egzonų išsidėstymo schema; skaičiai 1–14 *TMPRSS2* ir 1–11 *ERG* genuose žymi egzonus

T1/E4 ir T2/E4 sulietiniai transkriptai gali koegzistuoti toje pačioje ląstelėje. Šie variantai ląstelėje atsiranda dėl alternatyvaus splaisingo, esant tam pačiam egzonų susilieėjimui (Clark ir kt., 2007). Manoma, kad dauguma *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų nieko nekoduoja (Clark ir kt., 2009). *TMPRSS2:ERG* genų susilieėjimas gali paleisti mechanizmą, kuris sukelia

padidėjusią *AR* geno raišką bei mutacijų atsiradimą pažengusiame navike (Yu ir kt., 2010). Eksperimentais parodyta, kad gydymas androgenais gali aktyvinti genų susijungimą nenavikinėse ląstelėse. Ilgas gydymas dihidrotestosteronu (DHT) ir jo vartojimas per didelėmis dozėmis gali sukelti tarpusavio genų *TMPRSS2:ERG* susiliejimą (Bastus ir kt., 2010).

Navikinės ląstelės pasižymi didesniu gebėjimu patekti į biologinius skysčius, palyginti su normaliomis ląstelėmis dėl susilpnėjusių ląstelių bei ląstelės užląstelinio matrikso ryšių. Šlapimo nuosėdose PL epitelinių ląstelių aptinkamas didesnis kiekis, palyginti su asmenimis, kuriems nėra diagnozuotas vėžys (Botchkina ir kt., 2005). Ateityje *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas galėtų tapti efektyviu neinvaziniu biožymeniu PL vėžiui diagnozuoti (Miyagi ir kt., 2010). B. Laxman ir kiti mokslininkai 2006 metais vieni pirmųjų įrodė, kad esant sulietiniams transkriptams šlapime gaunamas teigiamas FISH rezultatas ir navikiniuose PL mėginiuose, o nesant sulietinių transkriptų šlapime – neigiamas (Laxman ir kt., 2006). Šlapimo nuosėdose aptinkama įvairaus tipo genų susiliejimo variantų, nors jų aptikimo dažnis yra mažesnis negu audiniuose (Nguyen ir kt., 2010; Rice ir kt., 2010).

3.2. Telomerazės įtaka vėžinių ląstelių atsiradimui

Telomerazė yra unikali atvirkštinė transkriptazė, kuri yra atsakinga už ląstelės chromosominių galų (telomerų) pastovaus ilgio išlaikymą ir chromosomų stabilumą. Telomeros sudarytos iš konservatyvių (TTAGGG)_n nukleotidinių pasikartojimų, kurie yra nuo 5 kb iki 15 kb ilgio chromosomų galuose (Liu ir kt., 2001; Bettendorf ir kt., 2003). Jei nėra telomerazės, chromosomų telomerų galai trumpėja kiekvieno ląstelės ciklo dalijimosi metu, ir yra prarandama nuo 50 bp iki 200 bp telomerinių pasikartojimų, kol pasiekama kritinė riba, kuri sukelia ląstelės mirtį (Bettendorf ir kt., 2003; Wyatt ir kt., 2010). Aktyvi telomerazė aptinkama embriono ir kamieninėse ląstelėse, bet dažniausiai – somatinėse ląstelėse (Wyatt ir kt., 2010). Aktyvi

telomerazė aptinkama iki 90 % visų tirtų navikinių ląstelių (Liu ir kt., 2001). Ji sudaryta iš katalizinio baltymo subvieneto TERT, telomerazės RNR (TR) ir specialių papildomų baltymų (Wyatt ir kt., 2010). Už telomerinį aktyvumą yra atsakingas TERT katalizinis subvienetas, kuris atlieka atvirkštinę transkripciją nuo nedidelės RNR matricos srities, esančios TR (Latil ir kt., 2000; Wyatt ir kt., 2010). *TERT* genas aptinkamas 5p15.33, o *TR* – 3q26.2 chromosomos srityje. Aptikus *TR* geno raišką ląstelėje, negalima teigti, kad joje yra aktyvi telomerazė, bet TR baltymas yra būtinas aktyvios telomerazės veiklos komponentas (Boltze ir kt., 2003). Telomerazės aktyvumas gali būti naudojamas kaip biožymuo vėžiui diagnozuoti, nes daugelio tipų navikuose aktyvi telomerazė aptinkama anksti (Botchkina ir kt., 2005).

3.3. Serino proteazės inhibitoriaus Kazal 1 įtaka vėžinių ląstelių atsiradimui

SPINK1 yra serino proteazės inhibitorius Kazal 1, kuris dar yra žinomas kaip su vėžiu susijęs tripsino inhibitoriaus genas (*TATI*) arba kasos išskiriamo tripsino inhibitoriaus genas (*PSTI*). *SPINK1* genas aptinkamas 5q32 chromosomos srityje. Jo gaminamas baltymas yra nedidelis, jis transliuojamas nuo 240 nukleotidų geno į 56 a. r. baltymą (Tomlins ir kt., 2008b). Jis buvo aptiktas kasoje kaip tripsinų autoaktyvacijos inhibitorius (Lu ir kt., 2008). *SPINK1* geno raiška esant normaliomis sąlygomis neaptinkama už kasos ribų, nors padidėjusi jo raiška gali būti esant kasos, gaubtinės ir tiesiosios žarnos bei inkstų karcinomoms, todėl jis naudojamas kaip prognozinis žymuo šioms ligoms diagnozuoti (Paju ir kt., 2007; Lu ir kt., 2008; Tomlins ir kt., 2008b), jo raiška didėja, kuo didesnė PL vėžio stadija (Paju ir kt., 2007). Skrandžio vėžiui būdinga padidėjusi tripsinų raiška, atliekanti vėžio slopiklio vaidmenį (Paju ir kt., 2007). *SPINK1* baltymas veikia kaip apoptozės inhibitorius (Lu ir kt., 2008). Manoma, kad *SPINK1* baltymas gali būti svarbus navikinių ląstelių gebėjimui prisijungti prie kitų ląstelių ar net metastazių atsiradimui (Bjartell ir kt., 2005). S. A. Tomlins ir kiti mokslininkai (2008b) pirmieji parodė, kad

padidėjusi *SPINK1* geno raiška aptinkama PL navikinėse ląstelėse 56 iš 376 (14,9 %), o nenavikinėse – 4 iš 136 (2,9 %) atvejų. Taip pat jie įrodė, kad raiškos padidėjimas yra susijęs su *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimu ląstelėje. K. Leinonen ir kiti mokslininkai (2010) parodė, kad padidėjusi *SPINK1* geno raiška siejama su bloga prognoze tų pacientų, kurie buvo gydomi prostatektomija (chirurginiu būdu pašalinant PL) ir hormoniniais preparatais.

3.4. *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* genų raiškos įtaka vėžinėms ląstelėms atsirasti

Epigenetinis genų inaktyvinimas įvyksta anksti – transkripciniame lygmenyje, kai metilinamos genų promotorių sritys, kuriose gausu pasikartojančių CpG sekų (Kwabi-Addo ir kt., 2010; Ahmed, 2010). CpG hipermetilinimas įvyksta vėžio slopiklio geno promotoriaus srityje arba genuose, kurie normaliomis sąlygomis yra nemetilinami (Ahmed, 2010). Genų promotorių hipermetilinimas gali būti naudojamas kaip biožymuo navikinėms ląstelėms aptikti klinikiniuose mėginiuose ar kūno skysčiuose, ankstyvai ligos diagnozei ir ligos rizikai įvertinti (Ahmed, 2010; Kwabi-Addo ir kt., 2010). PL navikinėse ląstelėse dažniausiai metilinami genai, kurie atsakingi už DNR reparaciją (*GSTP1*, *MGMT*), ląstelių adheziją (*CD44*, *EDNRB*, *APC*, *LGALS3*), ląstelių augimą, išsiskverbimą ir metastazių susidarymą (*TIMP2*, *TIMP3*, *LGALS3*), apoptozę (*DAPK*, *ZAC/PLAG1*), ląstelių ciklo kontrolę (*CDKN2A*, *CDKN1A*, *ZAC/PLAG1*), signalų transdukciją (*RASSF1*) ir atsaką į hormonus (*AR*, *ER*, *RARB*) (Ahmed, 2010).

- Priešinės liaukos vėžio genų epigenetiniai pokyčiai įvyksta pačioje vėžio formavimosi pradžioje (Kwabi-Addo ir kt., 2010). *GSTP1* promotoriaus hipermetilinimas aptinkamas net iki 90 % navikinių PL mėginių, todėl *GSTP1* geno hipermetilinimas galėtų būti reikšmingas ligos biožymuo (Ahmed, 2010). Glutathiono S transferazės (GST) šeimos baltymai yra atsakingi už ląstelės

apsaugą nuo DNR pažeidimų, kurios sukelia vėžį. Glutathiono S transferazės 1 (*GSTP1*) genas aptinkamas 11q13.2 chromosomos srityje (Ahmed, 2010). *GSTP1* geno metilinimas įvyksta anksti, net iki 60 % geno yra metilinta PIN (priešinės liaukos intraepitelinės neoplazijos) stadijoje (Tomlins ir kt., 2006). *GSTP1* promotoriaus hipermetilinimas yra naudojamas kaip biožymuo PL vėžiui diagnozuoti kūno skysčiuose – šlapime arba spermoje (De Marzo ir kt., 2003).

- Dauguma vėžio tipų, ne išimtis ir PL, yra atsparūs retinoinės rūgšties augimo inhibitoriams, nes prarandama *RARB* geno raiška (Li ir kt., 2004). Retinoinės rūgšties receptorių (*RAR*) priklauso branduolio receptorių superšeimai, kurią tiesiogiai reguliuoja *trans*- veikimu pasižymintys transkripcijos veiksniai (Widschwendter ir kt., 2001; Alvarez ir kt., 2007). Jie reguliuoja kelis svarbius biologinius procesus: ląstelių augimą, jų atsiskyrimą ir apoptozę. Yra žinomi trys *RAR* potipiai, kuriuos koduoja genai: *RARA*, *RARB* ir *RARG*. *In situ* hibridizacijos būdu parodyta, kad *RARA* geno raiška dažniausiai aptinkama visuose audiniuose, *RARB* – širdyje, plaučiuose ir blužnyje, o *RARG* – odoje (Alvarez ir kt., 2007). Branduolio receptorių *RARB* aktyvina transkripcijos veksnų ligandai ir steroidinių hormonų receptorių pošeimių nariai (Widschwendter ir kt., 2001; Alvarez ir kt., 2007). *RARB* genas aptinkamas 3p24 chromosomos srityje (Alvarez ir kt., 2007). Sumažėjusi šio geno raiška dėl geno promotorinės sekos metilinimo yra aptinkama iki 80 % PL vėžio atvejų ir šio pokyčio padidėjimas siejamas su didėjančia naviko stadija (Woodson ir kt., 2004).

- 2000 metais R. H. Dammann ir kiti mokslininkai klonavo 3p21.3 chromosomos sritį, kurioje aptinkamas *RASSF1* genas, koduojantis vėžio slopinklį (Donninger ir kt., 2007; Oceandy ir kt., 2009; Richter ir kt., 2009). Jis priklauso Ras GTPazės baltymų superšeimai, ir šių baltymų molekulių dalyvauja įvairiuose procesuose: tai ląstelės proliferacija, diferenciacija, mirtis ir apoptozė, kuri įjungama užląsteliniiais signalais (van der Weyden ir kt., 2007; Ahmed, 2010). Su Ras susijusių domenų šeimai priklauso dešimt genų,

nuo *RASSF1* iki *RASSF10*, taip pat ir įvairios jų izoformos (Richter ir kt., 2009). *RASSF1* genas yra 11 kb dydžio, sudarytas iš aštuonių egzonų, nuo kurių gaunami septyni skirtingi transkriptai (*RASSF1A-RASSF1H*) dėl dviejų skirtingų promotorių ir alternatyvaus splaisingo (Donninger ir kt., 2007; van der Weyden ir kt., 2007; Richter ir kt., 2009). Nuo pirmojo promotoriaus (P1) yra gaunami *RASSF1A*, *RASSF1D*, *RASSF1E*, *RASSF1F*, *RASSF1G* transkriptai, o nuo antrojo (P2) – *RASSF1B* ir *RASSF1C* transkriptai (Donninger ir kt., 2007). Visos *RASSF1* izoformos, kurios yra transkribuojamos nuo P1, prarandamos įvairiuose navikuose (van der Weyden ir kt., 2007). *RASSF1A* izoformai yra būdingi visi vėžio slopiklio bruožai (Oceandy ir kt., 2009). *RASSF1A* baltymas (340 a. r.) stokoja įprasto, baltymams būdingo aktyvumo, bet veikia kaip inkaras kitiems signaliniams baltymų kompleksams (Donninger ir kt., 2007). Padidėjusi *RASSF1A* geno raiška stabdo ląstelės ciklą skirtingose stadijose (Richter ir kt., 2009). PL navikiniuose mėginiuose *RASSF1A* metilinimas aptinkamas daugiau kaip 70 % visų tirtų atvejų, tačiau šio geno metilinimas sveikuose audiniuose yra labai retas (Pfeifer ir kt., 2005).

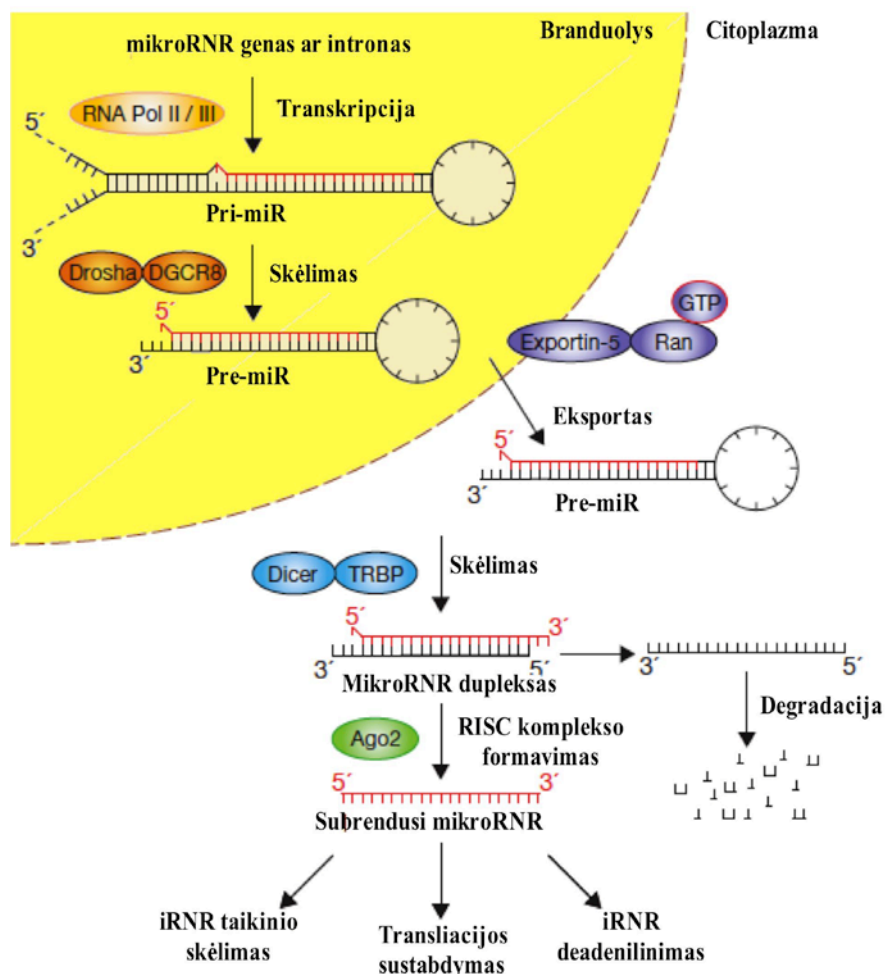
- *ZAC* genas dar yra žinomas kaip *PLAGL1* arba *Lot-1* (Valleley ir kt., 2007), jis yra 6q24-q25 chromosomos srityje. Standžiųjų navikų ši sritis dažnai prarandama. Stipri *ZAC* geno raiška aptikta hormonų gaminančiose ląstelėse, tačiau įvairiuose navikuose jis yra „nutildytas“ metilinimo būdu (Theodoropoulou ir kt., 2010). *ZAC* genas sudarytas iš devynių egzonų, turi du aktyvius promotorius (P1 ir P2), nuo kurių sintetinami skirtingi transkriptai. Promotoriai vienas nuo kito yra nutolę per 55 kb. Ilgasis transkriptas, turintis septynis cinko pirštelius, gaunamas nuo P1 promotoriaus, o trumpasis, turintis penkis cinko pirštelius, nuo P2 promotoriaus. P2 promotorius yra aktyvus visuose diferencijuotuose audiniuose (Valleley ir kt., 2007). Abu baltymai pasižymi proliferaciją slopinančiomis savybėmis. Ilgojo transkripto baltymas efektyvus sukeliant apoptozę, o trumpojo transkripto baltymas pasižymi didesniu gebėjimu sustabdyti ląstelės ciklą (Valleley ir kt., 2007). Dauguma

ZAC baltymo reguliuojamų baltymų dalyvauja ląstelės augimo, diferenciacijos ir homeostazės procesuose, taip pat svarbūs vystymuisi ir specifinei ląstelių veiklai užtikrinti (Theodoropoulou ir kt., 2010). ZAC kartu su *p53* gali sukelti apoptozę ir sustabdyti ląstelės ciklą G1 stadiją (Valleley ir kt., 2007).

3.5. Mažų nekoduojančių RNR susidarymas ir jų įtaka priešinės liaukos vėžiui išsivystyti

Pastaraisiais metais daug dėmesio yra skiriama mažoms nekoduojančiosioms RNR (Hessels ir kt., 2007). 1993 metais aptikta pirmoji mikroRNR *lin-4*, o 2000 metais buvo identifikuota antroji mikroRNR *let-7* *C. elegans*. Jas inaktyvinant epitelinės ląstelės prarasdavo gebėjimą normaliai diferencijuotis (Lu ir kt., 2005). MikroRNR – mažos viengrandinės, baltymo nekoduojančios RNR, kurios reguliuoja mRNR geno taikinio raišką, turi įtakos mRNR stabilumui bei transliacijos efektyvumui. Manoma, kad apie 30 % genų raiškos reguliuojama būtent mikroRNR. Kiekviena mikroRNR gali reguliuoti iki 200 genų taikinių, viena mikroRNR gali kontroliuoti biologinius ir patologinius signalinius kelius, keičiant taikinių raišką arba jų funkciją (Pang ir kt., 2010). 2005 metais J. Lu ir kiti mokslininkai parodė, kad suminė mikroRNR raiška yra gerokai didesnė normaliose ląstelėse negu navikinėse. Mechanizmas, kurio metu mikroRNR kiekis navikinėse ląstelėse sumažėja, kol kas nežinomas (Lu ir kt., 2005). MikroRNR raiška yra specifinė audiniams. Eksperimentais parodyta, kad mikroRNR pasižymi dideliu stabilumu formalinu fiksuotuose mėginiuose (Mitchell ir kt., 2008). Dauguma transkripcijos veiksnių, kurie reguliuoja mRNR transkripciją, taip pat reguliuoja ir mikroRNR biogenezę. Normaliose ląstelėse mikroRNR reguliuoja jų augimą, proliferaciją, diferenciaciją ir apoptozę (O'Day ir kt., 2010). Neseniai atlikti tyrimai parodė, kad skirtingų vėžio tipų mikroRNR raiška ir jos kiekis skiriasi, skirtumai randami net to paties vėžio skirtingose stadijose (deVere White ir kt., 2009).

- MikroRNR genai evoliucijos požiūriu yra labai konservatyvūs, jie aptinkami baltymus koduojančių genų intronuose ar egzonuose (70 %) arba tarpgeninėse srityse (30 %). MikroRNR veikimas yra nukreiptas į geną šeimininką, manoma, kad jų transkripcija vyksta kartu su genų šeimininkų transkripcija (Saini ir kt., 2010). MikroRNR genai RNR polimerazės II arba RNR polimerazės III transkribuojami į pirminį mikroRNR transkriptą (pri-miR). Kiekviena mikroRNR, aptinkama toje pačioje genų sandraidoje, gali būti transkribuojama ir reguliuojama nepriklausomai nuo kitų mikroRNR (Winter ir kt., 2009). Pirminiame transkripte (pri-miR) aptinkamos viena ar daugiau kaip 70 nukleotidų dydžio plaukų segtuko struktūros – mikroRNR pirmtakai (pre-miR) (Farazi ir kt., 2011), kurių sudėtyje yra 33 bp kilpos, turinčios terminalinę kilpą ir dvi viengrandines kraštines sritis, kurios išsidėsčiusios abiejose pusėse aplink segtuką. pri-miR endonukleaziškai skelia branduolio mikroprocesoriaus kompleksas, kurį sudaro RNazės III baltymas Drosha ir DGCR8 baltymas (Winter ir kt., 2009) (**4 pav.**).



4 pav. MikroRNR formavimosi kelias (pagal Winter ir kt., 2009, su pakeitimais)

Du Drosha RNazės domenai skelia pri-miR segtuko 5' ir 3' galuose, kai DGCR8 tiesiogiai sąveikauja su pri-miR (Winter ir kt., 2009; Farazi ir kt., 2011). pre-miR perneša į citoplazmą eksportinas 5 (XPO5) (Winter ir kt., 2009; Farazi ir kt., 2011), kuris pre-miR atpažįsta nepriklausomai nuo sekos ar kilpos struktūros. RISC (citoplazmoje esanti efektorinė mašina) įkrovimo kompleksas (RLC) yra sudarytas iš RNazės Dicer, dvigrandę RNR rišančio baltymo TRBP, PACT bei šerdinio komponento baltymo Argonauto-2 (Ago2). Šiame komplekse esanti Dicer RNazė III atskelia stiebą nuo pre-miR ir suformuoja 22 nukleotidų miRNR dupleksą su išsikišusiais 3' galais (Winter ir kt., 2009). Subrendusi mikroRNR yra 20–23 nukleotidų dydžio (Farazi ir kt.,

2011), ji jungiasi prie mRNR taikinio visa arba ne visa. MikroRNR 5' galo 1–8 nukleotidų rišimosi seka komplementariai jungiasi prie geno taikinio 3' ar 5' netransliuojamos srities, taip destabilizuojama mRNR, o tai sukelia tiesioginį taikinio skėlimą arba jo transkripcinį nutildymą (deVere White ir kt., 2009). MikroRNR savo geną taikinį veikia per Ago baltymus, kurie turi du RNR rišančius ir vieną RNazės H domeną. Ago2 baltymas išlaiko aktyvų RNazės H domeną, kuris gali tiesiogiai skelti taikinį. Dauguma transkripcijos veiksnių reguliuoja audiniams specifinių ar vėžiui specifinių mikroRNR raišką (Farazi ir kt., 2011).

- MikroRNR ateityje bus galima naudoti kaip biožymenis, nes jos pasižymi dideliu stabilumu ne tik audiniuose, bet ir biologiniuose skysčiuose. Laisvai cirkuliuojanti mikroRNR aptinkama pacientų plazmoje ir šlapime (Gandellini ir kt., 2009; Schaefer ir kt., 2010). Apie 50 % mikroRNR genų randama su vėžiu susijusiuose genomo regionuose, todėl mikroRNR gali veikti kaip onkogenas arba kaip vėžio slopiklis (Pang ir kt., 2010). Ląstelių mikroRNR pokytį lemia daug veiksnių: mikroRNR geno kopijų praradimas arba jų kiekio padidėjimas, mikroRNR pirmtako mutacijos, mikroRNR geno promotoriaus hipermetilinimas arba histonų deacetilinimas bei pakitęs mikroRNR brendimas (deVere White ir kt., 2009; Pang ir kt., 2010; Saini ir kt., 2010). MikroRNR reguliuoja vėžio formavimosi būdus: diferenciaciją, apoptozę, proliferaciją, kurie svarbūs ligai atsinaujinti ir (ar) metastazėms atsirasti (Farazi ir kt., 2011). Redukcija arba delecija naviką slopinančios mikroRNR ir (ar) amplifikacija arba padidėjusi onkogeninės mikroRNR raiška gali sukelti vėžio atsiradimą (O'Day ir kt., 2010). Žinduolių genome aptinkama vienintelė *DICER1* geno kopija, tai rodo jos svarbą mikroRNR biogenezėje (Winter ir kt., 2009), net 27 % įvairių vėžio tipų būdinga hemizigotinė *DICER1* geno delecija (Farazi ir kt., 2011).

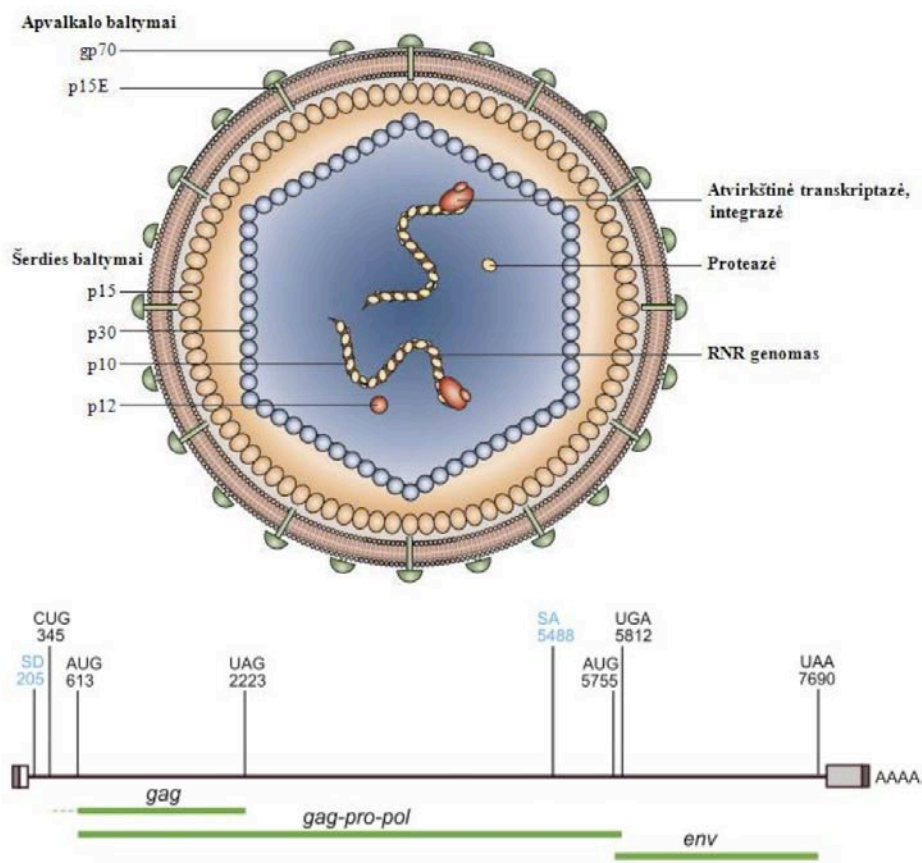
- K. P. Porkka ir kiti mokslininkai 2007 metais vieni pirmųjų parodė, kad PL vėžiui yra būdingos specifinės mikroRNR. Iš mokslinės literatūros yra žinomos onkogeninės PL mikroRNR: *hsa-miR-221/-222*, *hsa-miR-21* ir *hsa-*

miR-125b, bei vėžį slopinančios mikroRNR: *hsa-miR-101*, *hsa-miR-126**, *hsa-miR-146a*, *hsa-miR-330*, *hsa-miR-34* sanaupa ir *hsa-miR-200* šeima. Šiuo metu yra žinomos tik kelios mikroRNR, kurios atsakingos už pradėtą, progresiją ir metastazių atsiradimą PL. *hsa-miR-21* veikia kaip onkogeninis reguliatorius, valdantis naviko augimą, jo invaziją ir metastazių susidarymą (Pang ir kt., 2010). *hsa-miR-125b* pasižymi apoptozę slopinančiu poveikiu ir proliferacijos aktyvumu, ji gali būti naudojama kaip terapinis taikyns gydant PL naviką (Shi ir kt., 2011). Agresyviose PL naviko ląstelėse aptinkama padidėjusi *hsa-miR-221* ir *hsa-miR-222* raiška. E2F1, Bak1 ir p27^{Kip1} yra augimo veiksnio inhibitoriai, kurie yra tiesioginiai *hsa-miR-20a*, *hsa-miR-125b* ir *hsa-miR-221/222* taikiniai (Shi ir kt., 2008). C. H. Lawrie ir kiti mokslininkai 2008 metais pirmieji parodė, kad mikroRNR gali būti aptinkama žmogaus kūno skysčiuose. Cirkuliuojančios mikroRNR *hsa-miR-141* kiekis padidėja metastaziniuose PL mėginiuose, palyginti su sveikomis kontrolinėmis ląstelėmis (Brase ir kt., 2011).

3.6. XMRV viruso struktūra

Šiuo metu yra žinomi šeši virusai, kurie yra atsakingi už žmogaus navikų atsiradimą, o tai sudaro 20–25 % visų aptinkamų vėžio atvejų (Silverman ir kt., 2010). PL navikai, kuriuose randamas XMRV, pasižymi agresyvia ligos eiga (Oakes ir kt., 2010). XMRV yra gamaretrovirusas, kuris priklauso *Gammaretrovirus* rūšiai, o ši – *Orthoretrovirinae* genčiai, pastaroji – *Retroviridae* pošeimiui. Šiam virusui būdingas labai didelis sekų panašumas į pelių leukemijos (MuLV) viruso sekas, todėl yra manoma, kad XMRV virusas kilo politropinių ir ksenotropinių MuLV virusų rekombinacijos metu (Klein ir kt., 2011). XMRV virionai gali būti nuo sferinės iki pleomorfinės formos, nuo 80 nm iki 100 nm skersmens. Genomas yra viengrandė RNR, sudaryta iš 8300 nukleotidų (Silverman ir kt., 2010; Menendez-Arias, 2011; Klein ir kt., 2011). XMRV genomas sudarytas iš *gag*, *pol* ir *env* genų, bet jame nerandama

papildomų ar reguliacinių sekų (Silverman ir kt., 2010; Klein ir kt., 2011). XMRV genome yra trys dideli skaitymo rėmeliai *gag*, *pol* ir *env*, nuo kurių transkribuojamas vienas ilgas transkriptas, kuris vėliau transliuojamas į virusinius šerdies (gag), proteazės (pro), atvirkštinės transkriptazės (rt) ir integrazės (int) baltymus (Silverman ir kt., 2010; Menendez-Arias, 2011). Virusinė dalelė yra sudaryta iš bilipidinio dvisluoksnio apvalkalo, į kuri įsiterpę šerdies baltymai: *gag* geno baltymas, *env* geno koduojami apvalkalo baltymai, trys *pol* geno baltymai bei du RNR genomai (Silverman ir kt., 2010) (5 pav.).



5 pav. XMRV viruso genomo ir mRNR struktūra (pagal Urisman ir kt., 2006; Silverman ir kt., 2010, su pakeitimais)

Gag baltymas sudarytas iš 536 a. r. ir pasižymi panašumu į ksenotropinio viruso, rasto pelės 9 chromosomoje, baltymą. Pol baltymas yra sudarytas iš 197 a. r., 97 % panašus į MLV DG-75 baltymo seką ir 96 % panašus į pelės ksenotropinio viruso baltymą. Gag ir Pol baltymų mRNR nuskaityta nuo to paties skaitymo rėmelio. Env baltymą koduoja atskiras skaitymo rėmelis, ir jis yra sudarytas iš 645 a. r. (Menendez-Arias, 2011). RNase L stabdo XMRV viruso dvigubėjimą ląstelių kultūroje (Stoye ir kt., 2010). Manoma, kad XMRV viruso prisijungimo vieta prie ląstelės yra receptorius XPR1 (Stoye ir kt., 2010; Menendez-Arias, 2011). Tai 696 a. r. baltymas, turintis daugybę plazminę membraną veriančių domenų (Menendez-Arias, 2011). PL audiniuose XMRV įsiterpimo vietos siejamos su fragiliomis chromosomos vietomis, mikroRNR sankauptomis ir su vėžiu susijusiais genais (Silverman ir kt., 2010; Menendez-Arias, 2011). Manoma, kad XMRV virusas įsiterpia šalia promotoriaus arba netoli ląstelės protoonkogeno slopiklio srities ir taip sukelia geno aktyvaciją, arba viruso įsiterpimas gali sukelti pakitusio vėžio slopiklio baltymo atsiradimą (Silverman ir kt., 2010). Naudojant gyvūnų modelius parodyta, kad viruso dvigubėjimas vyksta blužnyje, plaučiuose, limfiniuose mazguose bei priešinės liaukos audiniuose (Klein ir kt., 2011). XMRV virusas 10 kartų stipriau dvigubėja pirminėse PL epitelio ląstelėse negu stromos ląstelėse (Menendez-Arias, 2011). Buvo manoma, kad XMRV viruso aptikimas audiniuose gali būti naudojamas kaip žymuo daug agresyvesnei PL naviko formai nustatyti (Silverman ir kt., 2010).

II. TYRIMO OBJEKTAI, METODAI IR MEDŽIAGOS

1. Tiriamosios grupės klinikiniai rodikliai ir amžius

PL vėžio žymenų tyrime dalyvavo 179 pacientai. PL vėžys pacientams diagnozuotas nustatius PSA lygį ir atlikus PL biopsijos testą. Visi tyrimo dalyviai raštiškai patvirtino sutikimą, leidžiantį jų biologinius mėginius perduoti mokslininkams. Sudarytas protokolas patvirtintas Lietuvos bioetikos komiteto. Tiriamąją grupę sudarė asmenys, kuriems diagnozuotas pT2-pT3 stadijos PL vėžys, tokių pacientų mėginiai gauti radikaliu prostatektomijos metu pašalinus PL. Mėginiai rinkti nuo 2008 iki 2010 metų. Navikiniai PL židiniai, kurie aptinkami PL apčiuopos būdu, išpjaujami ir iš karto perkeliama į skystą azotą. Dvidešimt viename mėginyje patologas pirminės apžiūros metu naviko neaptiko, tokie mėginiai buvo naudojami kaip sveiko PL audinio kontrolė, toliau juos vadinsime nenavikiniais. PL vėžys yra daugiažidininės kilmės, todėl iš 10 pacientų buvo paimta po du navikinius mėginius. Tiriamosios grupės recidyvo trukmė skaičiuota nuo chirurginio naviko pašalinimo datos iki ligos atsinaujinimo datos. Pakartotinis PSA testas, kuris skirtas ligos atsinaujinimui aptikti, atliktas tik 158 pacientams, kadangi 21 pacientas pakeitė gyvenamąją vietą, jų duomenų gauti nepavyko. Recidyvas diagnozuojamas jei atliekant pakartotinį testą PSA aptinkama nuo 0,2 ng/ml ir daugiau. Išgyvenamumas skaičiuojamas kaip laikotarpis, praėjęs nuo chirurginio naviko pašalinimo datos iki paciento mirties datos. Pagrindiniai tiriamosios grupės klinikiniai rodikliai ir amžius pateikiami 1 lentelėje. Pacientų, kuriems atlikti mikroRNR tyrimai, klinikiniai rodikliai ir pacientų amžius pateikiami 2 lentelėje.

1 lentelė. Tiriamosios grupės klinikiniai rodikliai ir amžius

Požymiai	Visa grupė n (%)	Paimti daugiažidinių navikų mėginiai n (%)	Paimti nenavikiniai mėginiai ¹ n (%)	Rasti XMRV teigiami mėginiai n (%)
Amžiaus metais vidurkis su vidutine standartine paklaida	61,3 ± 0,59	63,2 ± 1,58	62,4 ± 1,25	63,4 ± 2,34
Stadija				
pT2	116 (73 %)	7 (70 %)	14 (66,67 %)	7 (77,78 %)
2a	16 (13,8 %)	7 (100 %)	2 (14,3 %)	-
2c	100 (86,2 %)	-	12 (85,7 %)	7 (77,78 %)
pT3	42 (27 %)	3 (30 %)	7 (33,33 %)	2 (22,22 %)
3a	30 (71,4 %)	2 (66,67 %)	5 (71,4 %)	2 (22,22 %)
3b	12 (28,6 %)	1 (33,33 %)	2 (28,6 %)	-
Diferenciacija pagal <i>Gleason</i> skalę				
6	100 (63,3 %)	14 (70 %)	18 (85,7 %)	6 (66,67 %)
7	58 (36,7 %)	6 (30 %)	3 (14,3 %)	3 (33,33 %)
PSA vidurkis, ng/ml	9,43 ± 0,86	6,0 ± 0,78	7,3 ± 0,98	16,73 ± 2,93
Priešinės liaukos svorio vidurkis, g	49,83 ± 1,74	47,5 ± 7,47	55,9 ± 5,05	54,37 ± 10,1
Naviko tūrio vidurkis, mm³	13,66 ± 0,76	19,8 ± 4,58	-	14,11 ± 3,20
Pacientų kūno masės indeksas²	28,01 ± 0,32	29,33 ± 2,53	28,32 ± 0,87	27,99 ± 1,3
Ligos atsinaujinimas				
Yra	20 (14,5 %)	1 (10 %)	5 (25 %)	3 (33,33 %)
Nėra	118 (85,5 %)	9 (90 %)	15 (75 %)	6 (66,67 %)
Iš viso	158	10 + 10	21	9

¹ – mėginiai, kuriuose patologas pirminės apžiūros metu naviko neaptiko; ² – kūno masės indeksas, apskaičiuotas remiantis formule: KMI = kūno masė (kg) / ūgio (m²)

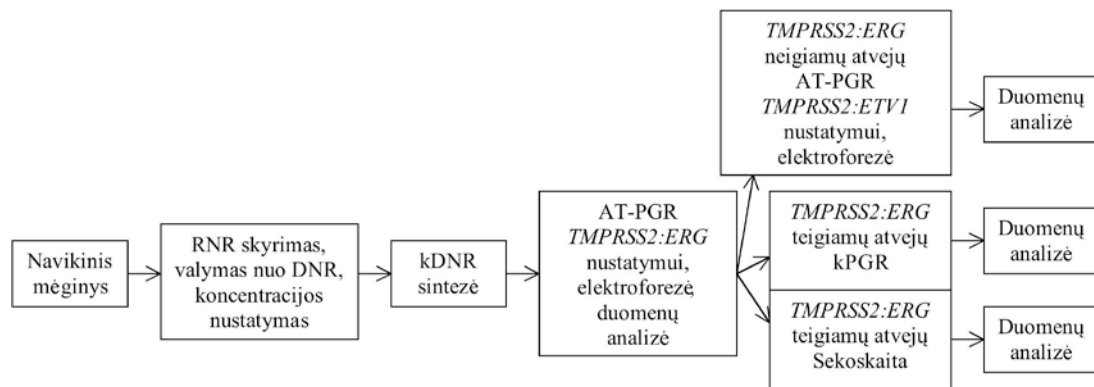
2 lentelė. Tiriamosios grupės, kuriai atlikta mikroRNR raiškos analizė, klinikiniai rodikliai ir amžius

Požymiai	Reikšmės n (%)
Amžiaus metais vidurkis su vidutine standartine paklaida <i>TMPRSS2:ERG</i>	61,87 ± 0,62
Yra	50 (47,62 %)
Nėra	55 (52,38 %)
Stadija	
pT2	80 (76,2 %)
2a	12 (15 %)
2c	68 (85 %)
pT3	25 (23,8 %)
3a	17 (68 %)
3b	8 (32 %)
Diferenciacija pagal Gleason skalę	
6	73 (69,52 %)
7	32 (30,48 %)
PSA vidurkis, ng/ml	8,85 ± 1,01
Priešinės liaukos svorio vidurkis, g	50,26 ± 2,22
Naviko tūrio vidurkis, mm³	12,5 ± 1
Ligos atsinaujinimas	
Yra	17 (17,53 %)
Nėra	80 (82,47 %)
Iš viso	105

Tyrimo metu rinkti ne tik PL mėginiai, bet ir šlapimo nuosėdos. Pacientų šlapimas surinktas radikaliu prostatektomijos metu kateizuojant šlapimo pūslę. Šlapimo nuosėdos surinktos šlapimą nucentrifugavus šaldomoje 4 °C centrifugoje 15 min. 1000 rpm greičiu. Gautos šlapimo nuosėdos laikomos skystajame azote. Iš viso surinkti 179 šlapimo nuosėdų mėginiai.

2. Sulietinių transkriptų *TMPRSS2:ERG* ir *TMPRSS2:ETV1* aptikimas priešinės liaukos mėginiuose

Tyrimas grindžiamas AT-PGR metodu, kuriuo metu produktas nuo sulietinio transkripto yra gaunamas (jeigu jo raiška vyko į PL mėginį patekusiose ląstelėse) arba negaunamas (jei raiška nevyksta). Aptikus sulietinį transkriptą, analizuota jo raiška kPGR metodu. Šio tyrimo schema vaizduojama 6 paveiksle, o tyrimui naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema.



6 pav. *TMPRSS2:ERG* ir (arba) *TMPRSS2:ETV1* sulietinių transkriptų aptikimo priešinės liaukos mėginiuose schema

2.1. Suminės RNR išskyrimas iš priešinės liaukos mėginių

Tiriamasis mėginys, naudojant skystąjį azotą, yra sutrintas iki miltelių. Apie 30 mg miltelių perkelta į atšaldytą 1,5 ml mėgintuvėlį be nukleazių ir užpilta 600 µl tirpalo D, kuris susideda iš: 4 M guanidino tiocianato (SIGMA-ALDRICH®), 25 mM natrio citrato (pH 7,0) (MERCK CHEMICALS), 0,1M β-merkaptoetanolio (Bio-Rad) ir 0,5 % sarkozilo (SERVA Electrophoresis). Užpiltas toks pats tūris fenolio ir chloroformo (1 : 1) mišinio. Vieną minutę intensyviai plakta, lede laikyta 5 min., centrifuguota 5 min. šaltoje 4 °C temperatūros stalinėje centrifugoje (Eppendorf 5417R) 10000–12000 x g

greičiu. Viršutinė frakcija nusiurbta, užpilta 1/10 tūrio 5 M natrio acetato (pH 4,7) (Fermentas Thermo Scientific) ir vienas tūris rūgštaus fenolio ir chloroformo mišinio (ROTH®). Intensyviai plakta 10 sek., centrifuguota 15 min. šaltoje 4 °C temperatūros stalinėje centrifugoje 10000–12000 x g greičiu. Viršutinė frakcija perkelta į naują mėgintuvėlį be nukleazių, užpiltas toks pats tūris izopropanolio (ROTH®) ir laikyta -20 °C temperatūroje ne mažiau kaip 30 min. Praėjus nustatytam laikui, centrifuguota maksimaliu greičiu šaltoje 4 °C temperatūros stalinėje centrifugoje 15 min. (Chomczynski ir Sacchi 1987). Išskirta suminė RNR, tirpinta nuo 40 µl iki 100 µl vandens be nukleazių, laikyta -70 °C temperatūros kelvinatoriuje (Thermo Fisher).

Chomczynski-Sacchi metodu išskirtoje suminėje RNR yra gausu genomines DNR sekų, dėl kurių gali būti gautas klaidingai teigiamas (angl. *false positive*) rezultatas. Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gautas produktas yra nuo mRNR, reikia pašalinti DNR, o tai atlikta veikiant DNase I. Viskas atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Gauta suminė RNR laikyta - 70 °C temperatūros kelvinatoriuje (Thermo Fisher).

Paveikus suminę RNR DNase I, reikia įsitikinti išvalytos suminės RNR vientisumu ir kokybe. Kokybiškos suminės RNR 28S RNR juostelė yra dvigubai didesnė nei 18S RNR. RNR kokybei nustatyti kiekvienam atvejui yra ruošiami du mėginiai: vienas – prieš veikimą DNase I, o kitas – po veikimo DNase I. Taip patikrinama, ar suminė RNR nedegradavo veikiamą DNase I. Agarozės geliui paruošti ir elektroforezei naudojamas 50X TAE (Fermentas Thermo Scientific) elektroforezės buferinis tirpalas ir 0,05 mg/ml etidžio bromido tirpalas (ROTH®) bei TopVision™ agarozė (Fermentas Thermo Scientific). RNR elektroforezei yra ruošiamas 1 % agarozės gelis, elektros lauko stiprumas 5 V/cm. Suminės RNR mėginiai ruošiami sumaišant su mėginį nešančiu dažu – 2X RNA Loading Dye, (Fermentas Thermo Scientific) ir inkubuojami 10 min. 70 °C temperatūros oriniame termostate (Thermomixer comfort, Eppendorf) (Sambrook ir Russell 2001). Po elektroforezės gelis

analizuotas apšvietus UV spinduliais ir fotografuotas naudojant gelių vaizdinimo sistemą (UVP GelDoc-It™ Imaging System, UVP).

Norint susintetinti kokybišką kopijinę DNR (kDNR), reikia žinoti tikslią suminės RNR koncentraciją, to negalima padaryti įvertinant kokybinę suminės RNR vertę. Tiksliai suminei RNR ir DNR koncentracijai nustatyti naudotas spektrofotometras Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific). RNR ir DNR koncentracija matuojama laikantis prietaiso gamintojo pateiktų instrukcijų.

2.2. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

Kopijinės DNR sintezei naudota išvalyta ir DNaze I paveikta PL mėginių suminė RNR. Mėgintuvėliai su RNR visuose etapuose laikyti ledu vonioje arba šaldomame stovelyje. kDNR sintezei buvo naudojami keli rinkiniai: RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas Thermo Scientific). kDNR sintezė atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gauti fragmentai yra nuo sulietinio transkripto, kiekvienam analizuojamajam atvejui visuomet sintetunami du atskiri mėgintuvėliai kopijinės DNR: į vieną mėgintuvėlį dedama atvirkštinė transkriptazė, o į kitą – ne, tai papildoma kontrolė (AT-PGR metu paėmus kDNR iš šio mėgintuvėlio, amplifikacija neturėtų vykti, jei mėginyje nėra genominės DNR sekų). Visais atvejais susintetinta kopijinė DNR laikyta -70 °C temperatūros kelvinatoriuje (Thermo Scientific), o vėliau naudota tolesniems eksperimentams.

2.3. Atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (AT-PGR)

Genų sekų susiliejimui nustatyti naudoti *TMPRSS2* ir *ERG* genų pradmenys, kurie pasirinkti remiantis S. A. Tomlins ir kitų mokslininkų 2005 metų straipsniu (priedų 4 lentelė). Susiliejimas tarp *TMPRSS2* ir *ERG* genų

dažniausiai įvyksta dėl 3 Mbp delecijos arba dėl subalansuotos ar nesubalansuotos chromosominės translokacijos tarp šių genų. *TMPRSS2* geno pradmuo jungiasi priešais geno promotorinę sritį, o *ERG* geno – jungiasi ties ketvirto egzono pabaiga. Pradmenys sumodeliuoti taip, kad apimtų *TMPRSS2* geno 1 ir 2 egzonus bei *ERG* geno 1, 2, 3 ir 4 egzonus, tarp kurių, mokslinės literatūros duomenimis, dažniausiai ir įvyksta susiliejimas. Susintetinus kDNR, AT-PGR metodu ieškotas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas. Viskas atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. DNR amplifikacija atliekama Mastercycler® Gradient (Eppendorf) pagal pateiktas sąlygas:

94 °C – 4 min. (denatūracija)

94 °C – 1 min. (denatūracija)

58 °C – 45 sek. (jungimas)

72 °C – 45 sek. (pailginimas)

} kartojama 35 kartus

72 °C – 10 min. (fragmentų pailginimo užbaigimas)

Pastovios raiškos genas *GAPDH* (pradmenų seka pateikta priedų 4 lentelėje) naudotas RNR kokybei nustatyti, atliekant tyrimus AT-PGR metodu ir kaip rezultatus normalizuojantis genas, atliekant tyrimus kPGR metodu. Išanalizavus AT-PGR metodu gautus duomenis ir neaptikus *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, naudotas kitas AT-PGR metodas, kuriuo ieškota sulietinio transkripto, atsiradusio dėl chromosominės translokacijos, – *TMPRSS2:ETVI*. Pradmenys pasirinkti remiantis S. A. Tomlins ir kitų mokslininkų 2005 metų straipsniu. *ETVI* geno pradmuo jungiasi ties *ETVI* geno 4 egzono pabaiga, o *TMPRSS2* – naudojamas tas pats pradmuo, kaip ir *TMPRSS2:ERG* sulietiniam transkriptui aptikti, pradmenys pateikti priedų 4 lentelėje.

2.4. AT-PGR produktų elektroforezė agarozės gelyje

AT-PGR metodu gautiems produktams analizuoti ruošiamas 2 % agarozės gelis. Agarozės geliui paruošti ir elektroforezei naudojamas 50X TAE (Fermentas Thermo Scientific) elektroforezės buferinis tirpalas ir 0,05 mg/ml etidžio bromido tirpalas (ROTH®) bei TopVision™ agarozė (Fermentas Thermo Scientific), elektros lauko stiprumas 5 V/cm. Mėginiai ruošiami sumaišant su mėginį nešančiu dažu – 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Fermentas Thermo Scientific). Gelis analizuotas apšvietus UV spinduliais ir fotografuotas naudojant gelių vaizdinimo sistemą (UVP GelDoc-It™ Imaging System, UVP). AT-PGR metodu gauti rezultatai įvertinami vizualiai (yra ar nėra produkto).

2.5. Genų raiškos nustatymas kiekybiniu PGR (kPGR)

AT-PGR metodu nustačius sulietinį transkriptą, atliktas *TMPRSS2:ERG* ir *GAPDH* genų raiškos tyrimas. kPGR reakcijos mišinys pilstytas tokia tvarka: 2X Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Thermo Scientific), 10 μM specifinių pradmenų, kurių galutinė koncentracija 300 nM (priedų 7 lentelėje), uracil DNR glikozilazė (galutinė koncentracija iki 0,01 v) (Fermentas Thermo Scientific) ir vandens be nukleazių, kuris sudaro likusį reikiamą laisvą reakcijos tūrį. Reakcijos mišinys išpilstomas po 23 μl ir įpilama 2 μl kDNR. Genų raiškos analizė atlikta su keliais kiekybinio PGR aparatais – ABI PRISM 7000, ABI PRISM 7500 ir StepOnePlus (Applied Biosystems™) pagal pateiktas sąlygas:

50 °C – 2 min. (užterštumo pašalinimas, skaldant PGR produktus, turinčius dUTP, esančius uracil DNR glikozilazės reakcijos mišinyje)

95 °C – 10 min. (denatūracija, polimerazės aktyvacija)

95 °C – 15 sek. (denatūracija)

60 °C – 60 sek. (jungimas ir pailginimas)

} kartojama 40 kartų

+ lydymosi kreivė (dimerų ar nespecifinių produktų susidarymui nustatyti)

kPGR metodu gautiems duomenims apdoroti naudotas rezultatus normalizuojantis pastovios raiškos genas – *GAPDH*. Gautos Δct reikšmės, kurios yra skirtumas tarp *TMPRSS2:ERG* ir *GAPDH* genų ct reikšmių, padalintos į dvi grupes remiantis gautų duomenų mediana. kPGR metodu gauti rezultatai (logaritmuoti \log_2) buvo naudojami statistinei analizei atlikti.

2.6. *TMPRSS2:ETS* sulietinių transkriptų sekoskaita

Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gauti fragmentai yra *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto produktai, fragmentai klonuoti į plazmides ir sekvenuoti. Klonavimas vykdytas naudojant InsTAclone™ PCR Cloning Kit rinkinį (Fermentas Thermo Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Atlikus PGR reakciją nuo bakterijų kolonijų, atsirinktos kolonijos, kuriose aptikta tiriamą fragmentą turinti plazmidė.

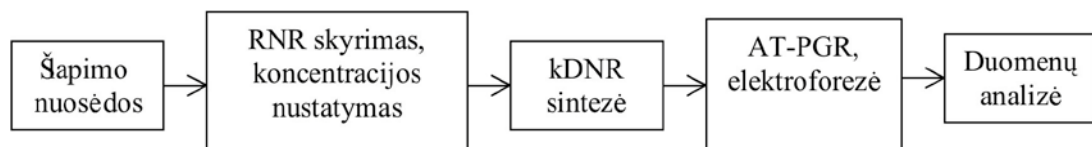
TMPRSS2:ERG arba *TMPRSS2:ETVI* sulietinio transkripto seką turinčios plazmidinės DNR skyrimas atliktas naudojant GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Thermo Scientific) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Išskyrus plazmidinę DNR, atlikta jos kiekybinė ir kokybinė analizė. DNR kokybei nustatyti ruoštas 0,7 % agarozės gelis, procedūra atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies, 2.1 skyrelyje. DNR koncentracija nustatyta taip, kaip aprašyta tame pačiame 2.1 skyrelyje. Atlikta išskirtų plazmidžių sekoskaita, pradmenys pateikti priedų 5 lentelėje.

2.7. kPGR metodu gautų duomenų analizė

Statistinė analizė atlikta remiantis „Excel“, „GraphPad Prism version 5.00“ programomis bei SAS 9.2 programų paketu. Bendra klinikinių rodiklių, pacientų amžiaus ir molekulinė PL vėžio žymenų analizė atlikta taikant neporinį t-testą (arba *Mann-Whitney* U-testą), o koreliacijos įvertintos Spearmano testu. Atkryčiui įvertinti naudotas *Mantel-Cox* testas ir *Cox* proporcinė pavojų regresijos (angl. *Cox proportional hazards regression*) modelis, kuris aprašomas rizikos santykiu (angl. *hazard ratio*, HR) ir rizikos santykio pasiklovimo ribomis (angl. *Hazard Ratio Confidence Limits*, 95 % CI). Rezultatai yra statistiškai patikimi tuomet, kai $p < 0,05$.

3. *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų ir *TERT* geno raiškos aptikimas šlapimo nuosėdose

Tyrimas remiasi AT-PGR metodu, kuriuo gaunamas arba negaunamas produktas nuo sulietinio transkripto. Šio tyrimo schema pavaizduota 7 paveiksle, o tyrimui metu naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema.



7 pav. *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* geno raiškos šlapimo nuosėdose aptikimo schema

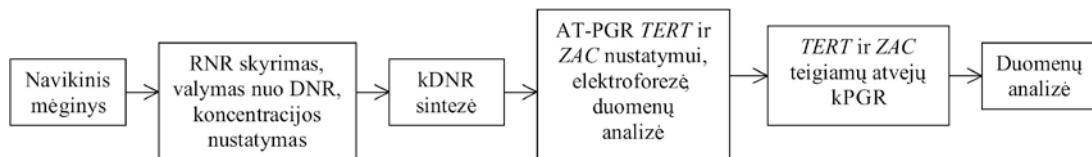
Suminei RNR išskirti iš šlapimo nuosėdų modifikuotas *Chomczynski-Sacchi* metodas yra netinkamas, nes šlapimo nuosėdose aptinkamas labai mažas RNR kiekis, todėl tyrimui metu naudoti keli komerciniai rinkiniai: Total

RNR Isolation NucleoSpin® RNA II (MACHEREY-NAGEL) ir RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Suminė RNR išskirta pagal gamintojo rekomendacijas ir ji saugota -70°C temperatūros kelvinatoriuje (Thermo Fisher).

Iš šlapimo nuosėdų išskirtos suminės RNR koncentracija nustatyta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.1 skyrelyje. Daugeliui mėginių gauta labai maža RNR koncentracija. kDNR sintezei neimti mėginiai, kurių RNR koncentracija buvo mažesnė nei $1\text{ ng}/\mu\text{l}$. kDNR sintezė atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.2 skyrelyje. Nepriklausomai nuo to, kuris kDNR sintezės rinkinys buvo naudotas suminei RNR išskirti, visuomet dėtas maksimaliai leidžiamas tūris šlapimo nuosėdų suminės RNR. AT-PGR metodas nuo kDNR atliktas taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.3 skyrelyje, tik padidintas reakcijos ciklų skaičius iki 40 kartų. AT-PGR elektroforezė atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.4 skyrelyje, o *TERT* geno raiškos tyrimas – kaip aprašyta metodinės dalies 4 skyrelyje.

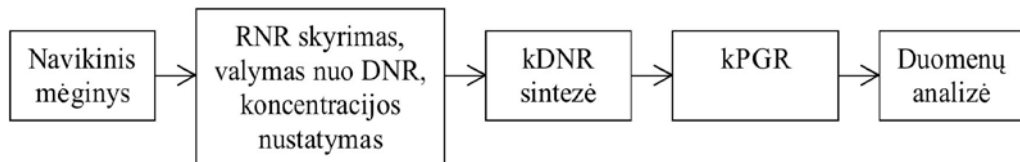
4. Genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

TERT geno raiškai nustatyti kokybiniais ir kiekybiniais metodais naudoti pradmenys, kurie pasirinkti remiantis C. Boltze ir kitų mokslininkų 2003 metų straipsniu (priedų 4 lentelė). Šio tyrimo schema pavaizduota 8 paveiksle, o tyrimo metu naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema. *TERT* ir *ZAC* genų tyrimų metu naudoti metodai ir medžiagos yra tokie patys, kaip aprašyti metodinės dalies 2.3, 2.4, 2.5 ir 2.7 skyreliuose. *TERT* ir *ZAC* kokybinės raiškos rezultatai (AT-PGR) grupuojami remiantis produkto švytėjimo intensyvumu agarozės gelyje (vizualiai): teigiamas – produktas aptiktas, neigiamas – produkto neaptikta.



8 pav. *TERT* ir *ZAC* genų raiškos priešinės liaukos mėginiuose tyrimo schema

ERG, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* genų bei *ZAC* geno transkriptų, kurie gauti nuo skirtingų promotorių (*ZAC1p* ir *ZAC2p*), kiekybinė raiška PL mėginiuose nustatyta kPGR metodu. Tyrimo schema vaizduojama 9 paveiksle.

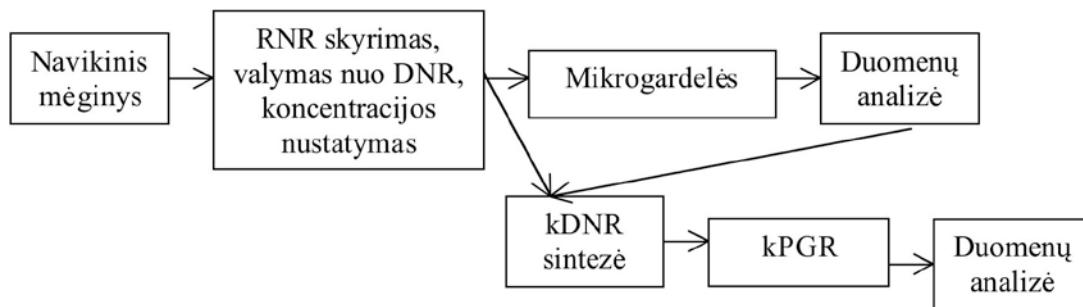


9 pav. *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* genų bei *ZAC* geno transkriptų, kurie gauti nuo skirtingų promotorių (*ZAC1p* ir *ZAC2p*), kiekybinės raiškos priešinės liaukos mėginiuose tyrimo schema

ERG, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1*, *ZAC1p* ir *ZAC2p* tyrimų metu naudoti metodai ir medžiagos yra tokie patys, kaip aprašyti metodinės dalies, 2.5 ir 2.7 skyreliuose. *ERG* raiškai nustatyti naudoti pradmenys, kurie pasirinkti remiantis S. A. Tomlins ir kitų mokslininkų 2008a metų straipsniu, o *SPINK1* raiškai nustatyti naudoti pradmenys, kurie pasirinkti remiantis tos pačios mokslininkų grupės 2008b metų straipsniu. *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* genų raiškai nustatyti naudoti pradmenys, kurie pasirinkti remiantis P. Zambrano ir kitų mokslininkų 2005 metų straipsniu, o *ZAC*, *ZAC1p* ir *ZAC2p* raiškai nustatyti – pradmenys, kurie pasirinkti remiantis E. M. Valleley ir kitų mokslininkų 2007 metų straipsniu. Naudotų pradmenų sekos pateikiamos priedų 4 lentelėje.

5. MikroRNR raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

MikroRNR raiška PL mėginiuose, kurie tarpusavyje skyrėsi pagal tai, ar juose buvo *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, ar jo nebuvo, tirta remiantis mikrogardelių duomenų analize ir mikroRNR tinkamumo patikrinimu kPGR metodu. Šio tyrimo schema pavaizduota 10 paveiksle, o tyrimo metu naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema.



10 pav. MikroRNR raiškos priešinės liaukos mėginiuose tyrimo schema

Norint išanalizuoti mikroRNR raišką PL mėginiuose, kurie tarpusavyje skyrėsi sulietinių transkriptų buvimu, pirmiausiai išskirta suminė RNR, kaip aprašyta metodinės dalies 2.1 skyrelyje.

MikroRNR raiškai nustatyti reikalingi rinkiniai: miRNA Complete Labeling and Hyb Kit, microRNA Spike-In Kit ir Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies). MikroRNR raiška nustatyta pagal gamintojo rekomendacijas. Gauti duomenys analizuoti naudojantis GeneSpring GX 11.0.2 versijos programa.

PL mėginių suminė RNR praskiesta iki 25 ng/μl. MikroRNR kopijinei DNR gauti naudotas TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) rinkinys, viskas atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Susintetinta mikroRNR kDNR praskiesta santykiu 1 : 15, tokia mikroRNR kDNR toliau naudota atliekant kPGR. MikroRNR raiškai nustatyti kPGR

mišinys pilstytas tokia tvarka: 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), TaqMan Assay tiriamosios mikroRNR (Applied Biosystems™) ir vandens be nukleazių, kuris sudaro likusį reikiamą laisvą tūrį. Reakcijos mišinys išpilstomas po 18 µl ir įpilta 2 µl skiestos (1 : 15) mikroRNR kDNR. Kiekybinė PGR atlikta CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) aparatu pagal pateiktas sąlygas:

95 °C – 10 min. (denatūracija, polimerazės aktyvacija)

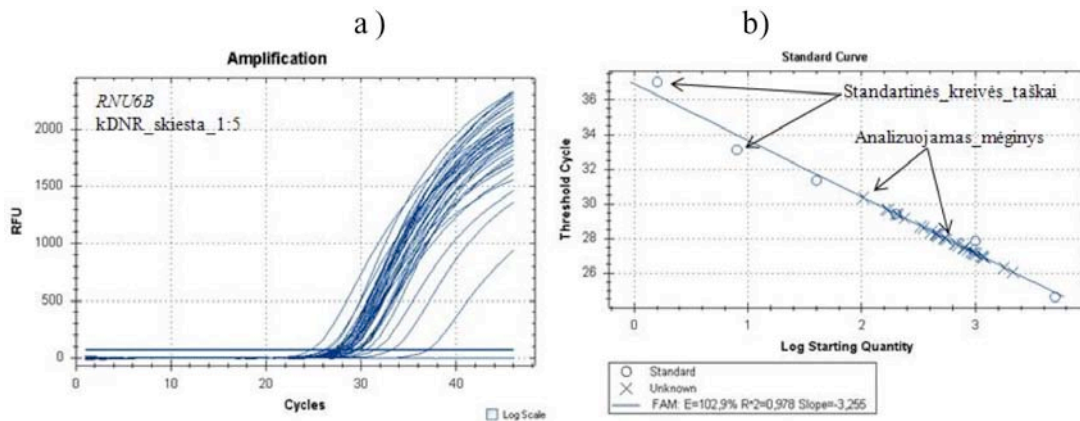
95 °C – 15 sek. (denatūracija)

60 °C – 60 sek. (jungimas ir pailginimas)

} kartojama 40 kartų

Prieš atliekant tinkamumo patikrinimą kPGR metodu būtina pasirinkti suminę RNR, kuri bus naudojama kiekvienos analizuojamos mikroRNR standartinei kreivei sudaryti. Standartinei kreivei sudaryti gali būti naudojama ląstelių linijų suminė RNR (VCaP, 22Rv1, LAPC4, LNCaP, DU-145 ir PC-3) arba komercinė normalios PL suminė RNR (NP) (Human Prostate Total RNA, Ambion). Remiantis kPGR metodu gautais duomenimis, standartinei kreivei sudaryti ir mikroRNR tinkamumui patikrinti geriausiai tinka komercinė normalios PL suminė RNR. Tik *hsa-miR-33b* mikroRNR standartinei kreivei sudaryti geriausiai tinka LAPC4 ląstelių linijos suminė RNR.

kPGR metodu tirta mikrogardelių analizei pasirinktų mikroRNR raiška: *hsa-miR-206*, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370*, *hsa-miR-149*, *hsa-miR-33b* ir *RNU6B*, *RNU44* bei *RNU24* – kaip kPGR normalizuojanti mikroRNR. Normalizuojančių mikroRNR atranka atliekama eksperimentiniu būdu atsižvelgiant į kPGR metodo efektyvumą, mėginių patekimą į standartinės kreivės ribas, analizuojamų mėginių mažiausią barstymosi intervalą. Atlikus preliminarią duomenų analizę, pasirinkta patikimiausia normalizuojanti mikroRNR – *RNU6B* (**11 pav.**).

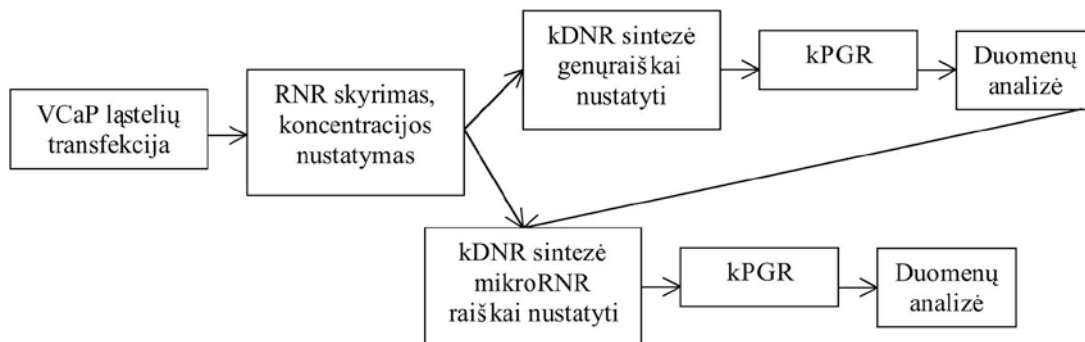


11 pav. *RNU6B* mikroRNR tinkamumo patikrinimas priešinės liaukos mėginiuose kPGR metodu: a – linijinės kreivės; b – standartinė kreivė ir į ją patenkantys priešinės liaukos mėginių mikroRNR rezultatai

Pasirinktų mikroRNR ir normalizuojančių genų pradmenų sekos pateikiamos priedų 8 lentelėje. kPGR metodu gautiems rezultatams įvertinti naudotas standartinės kreivės metodas (duomenys normalizuojami taip: mėginio mikroRNR standartinis nuokrypis dalijamas iš normalizuojančios mikroRNR standartinio nuokrypio). Reakcijos efektyvumas turi būti nuo 95 % iki 105 %. Statistinė analizė atlikta „Excel“ ir „GraphPad Prism version 5.00“ programomis, naudotas nesuporintas t-testas (arba *Mann-Whitney U*-testas). Rezultatai yra statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$.

6. MikroRNR raiškos analizė VCaP ir LNCaP ląstelių linijose

Pakitusios *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos priklausomybė nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo ir jo nebuvimo mėginiuose tirta ląstelių linijoje, kurioje *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto raiška yra pastovi. Tyrimas rėmėsi VCaP ląstelių linijos transfekcija siRNR mišiniu. Šio tyrimo schema vaizduojama 12 paveiksle, o tyrimui naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema.



12 pav. *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos priklausomybės nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo priešinės liaukos mėginiuose tyrimo schema

6.1. VCaP ir LNCaP linijų ląstelių auginimas

VCaP ląstelės yra PL vėžį gerai reprezentuojanti ląstelių linija, kuriai būdinga citokreatino 18, PSA, Rb (retinoblastomos) baltymų ir *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto padidėjusi raiška. Ląstelėms augini naudota DMEM (Lonza) auginimo terpė, joje yra FEBS (angl. *fetal bovine serum*) (Lonza) ir L-glutamino (Lonza), kurių galutinė koncentracija 10 %. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūros termostate, kuriame nuolat palaikoma 95 % oro ir 5 % CO₂ atmosfera. Visa informacija apie šią ląstelių liniją gauta iš internetinio puslapio: American Type Culture Collection (ATCC): the Global Bioresource Center (<http://www.lgcstandards-atcc.org>, 2011 balandžio 11 d.).

LNCaP ląstelės geriausiai atitinka nuo androgenų priklausomą PL naviką, kuriame aptinkama padidėjusi androgenų ir estrogenų receptorių raiška. Palyginti su VCaP ląstelėmis, LNCaP auga labai greitai ir yra gerokai smulkesnės. Auginimui naudota RPMI-1640 (Lonza) auginimo terpė, kurioje yra FEBS ir L-glutamino, jų galutinė koncentracija 10 %. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūros termostate, kuriame nuolat palaikoma 95 % oro ir 5 % CO₂ atmosfera. Visa informacija apie šią ląstelių liniją gauta iš internetinio

puslapio: ATCC: the Global Bioresource Center (<http://www.lgcstandards-atcc.org>, 2011 gegužės 24 d.).

Persėjant ląsteles iš auginimo flakono pašalinta augimo terpė, ląstelės praplautos 10 ml PBS (Lonza) tirpalu ir jis taip pat pašalintas. Užpilta 3–5 ml (priklausomai nuo ląstelių kiekio) 0,25 % tripsino tirpalo (Invitrogen). Ląstelės perkeltos į 37 °C temperatūros termostatą (BINDER CO2 incubator C) ir jame laikytos ne daugiau kaip 10 min., kol ląstelės atkimba nuo flakono dugno. Tirpalas su ląstelėmis perkeltas į 15 ml mėgintuvėlį, centrifuguota stalinėje centrifugoje (Eppendorf 5810 R) 400 x g 5 min. Pašalintas tripsinas, ląstelės švelniai suspenduotos 2 ml šviežios augimo terpės, tuomet 1 ml perkeltas į flakoną su 18 ml augimo terpės. Iki kito skiedimo ląstelės augintos 4–5 dienas, kas dvi dienas keičiant augimo terpę. LNCaP ląstelių skiedimas ir persėjimas atliktas taip pat kaip VCaP, tik kas 2–3 dienas, o ląstelės skiestos ne santykiu 1 : 1, bet 1 : 3.

6.2. VCaP ir LNCaP ląstelių transfekcija siRNR

Remiantis moksline literatūra (S. A. Tomlins ir kitų mokslininkų 2008a metų ir C. Sun ir kitų mokslininkų 2008 metų straipsniais), pasirinktos dvi siRNR (priedų 9 lentelė), kurios slopina *ERG* geno raišką. Dieną prieš ląstelių transfekciją VCaP ląstelės išsėtos į 24 šulinėlių plokštelę. Ląstelių surinkimas ir persėjimas į 24 šulinėlių plokštelę atliktas taip, kaip aprašyta metodinės dalies 6.1 skyrelyje, tik persėjimo metu ląstelės suspenduotos 10-yje ml augimo terpės. Transfekcijai reikiamas ląstelių kiekis – 70 000 ląstelių mililitre. Į kiekvieną šulinėlį įpilta po 500 µl VCaP ląstelių suspensijos, taip paruošta plokštelė perkelta į 37 °C temperatūros termostatą (BINDER CO2 incubator C) vienai parai. Lygiai taip pat paruoštos ir LNCaP ląstelės. Transfekcijai atlikti pasirinktos trys siRNR koncentracijos: 20 nM – teoriškai minimali reikiama siRNR koncentracija *ERG* genui nutildyti, 50 nM – vidutinė ir (ar) stipri siRNR koncentracija *ERG* genui nutildyti ir 100 nM – maksimali

arba per didelė siRNR reagentų koncentracija. Eksperimento metu pasirinkti trys laiko intervalai: 24, 48 ir 72 valandos. VCaP ląstelės transfekuotos ir su kontroline siRNR. Kontrolinės siRNR koncentracija yra tokia pati, kaip ir transfekuojančio siRNR mišinio. Kontrolinei siRNR parinkti tokie patys laiko intervalai. VCaP ir LNCaP ląstelių transfekcija atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelės surinktos naudojant TRIzol (Invitrogene) reagentą.

6.3. Suminės RNR išskyrimas iš VCaP ir LNCaP ląstelių, kDNR sintezė ir kPGR

TRIzol (Invitrogene) reagentu surinktos ląstelės galima saugoti -70°C temperatūros kelviniatoriuje net metus. Suminės RNR išskyrimas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas, išskirta suminė RNR buvo laikoma -70°C temperatūros kelviniatoriuje (Thermo Fisher).

kDNR sintezei siekiant nustatyti *ERG* geno raišką, naudota 500 ng/ μl suminės RNR koncentracija. *ERG* kDNR sintezei – AMV Reverse Transcriptase Kit (Finnzymes Thermo Scientific) rinkinio reagentai. Mišinys pilstytas tokia tvarka: 2 μl suminės RNR, 1 μl heksamerų (Fermentas Thermo Scientific) ir 7 μl vandens be nukleazės (Fermentas Thermo Scientific). 10 μl reakcijos mišinio įdedama į C1000™ Thermalcycler (Bio-Rad) termociklerį 10 min. 70°C temperatūroje. Toliau viskas atliekama taip, kaip pateikta 3 lentelėje.

3 lentelė. VCaP ir LNCaP ląstelių kDNR sintezei reikalingų komponentų kiekis

Reagentai	Reikiamas tūris vienai reakcijai
10 mM dNTP mix	2,5 μ l
AMV	0,5 μ l
10X RT buferinis tirpalas	2,5 μ l
40 v/ μ l RnaseI	0,5 μ l
Vanduo be nukleazių	9 μ l
Iš viso:	15 μl

Gautas reakcijos mišinys išpilstomas po 15 μ l, kDNR sintezė atliekama C1000™ Thermalcycler (Bio-Rad) aparate: 42 °C – 2 val., 70 °C – 10 min. Susintetinta kDNR praskiesta santykiu 1 : 50, taip praskiesta kopijinė DNR toliau analizuota kiekybinės PGR metodu.

ERG geno raiškai nustatyti kPGR metodu reakcijos mišinys pilstytas tokia tvarka: Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas Thermo Scientific) *ERG* geno pradmenys (priedų 10 lentelė) ir vandens be nukleazių, kuris sudaro likusį reikiamą laisvą tūrį iki 20 μ l. Reakcijos mišinys išpilstytas po 20 μ l ir įpilta 2 μ l skiestos (1 : 50) kDNR. *TBP* genas naudotas kaip kPGR rezultatus normalizuojantis genas, pradmenų sekos pateiktos priedų 10 lentelėje. Kiekybinė PGR atlikta CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) aparatu pagal pateiktas sąlygas:

95 °C – 15 min. (denatūracija, polimerazės aktyvacija)

95 °C – 15 sek. (denatūracija)

60 °C – 60 sek. (jungimas ir pailginimas)

} kartojama 40 kartų

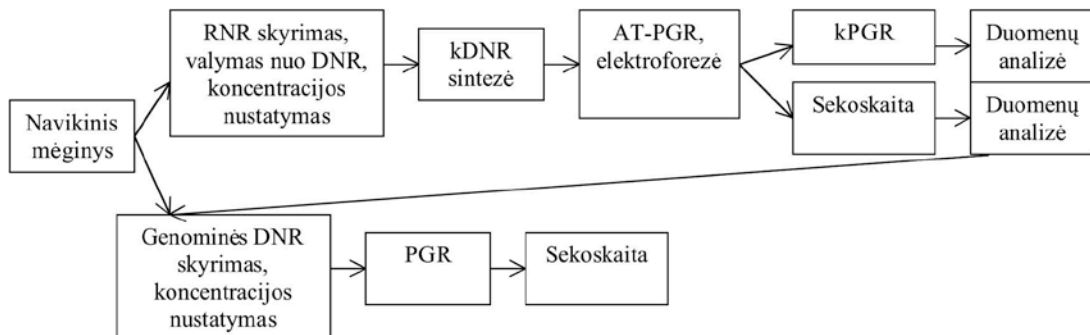
+ lydymosi kreivė (dimerų ar nespecifinių produktų susidarymui nustatyti)

kPGR metodu gautų duomenų analizė atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 5.1 skyrelyje.

Iš VCaP ir LNCaP ląstelių linijų išskirta suminė RNR, susintetinta mikroRNR kDNR ir atlikta kPGR, o gauti duomenys analizuoti standartinės kreivės metodu taip, kaip aprašyta metodinės dalies 5.1 skyrelyje.

7. Viruso XMRV sekų nustatymas priešinės liaukos mėginiuose

XMRV viruso sekų PL mėginiuose tyrimas rėmėsi AT-PGR metodu. Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gauti fragmentai yra nuo viruso XMRV, fragmentai klonuoti ir atlikta jų sekoskaita. Aptikus viruso XMRV mRNR, taip pat atliktas ir tyrimas kPGR metodu. Šio tyrimo schema vaizduojama 13 paveiksle, o tyrimo metu naudoti metodai ir medžiagos aprašyti iš eilės, remiantis tyrimo schema.



13 pav. XMRV viruso buvimo priešinės liaukos mėginiuose tyrimo schema

7.1. XMRV viruso RNR tyrimai priešinės liaukos mėginiuose

XMRV *gag* geno transkriptui aptikti naudoti pradmenys, kurie pasirinkti remiantis A. Urisman ir kitų mokslininkų 2006 metų straipsniu (priedų 11 lentelė). XMRV viruso sekų paieška PL mėginiuose atlikta taip, kaip ir *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto paieška. Suminės RNR išskyrimas, veikimas DNaze I, suminės RNR kokybinės ir kiekybinės koncentracijos nustatymas ir kDNR sintezė atlikta taip, kaip aprašyta

metodinės dalies 2.1 skyrelyje. AT-PGR metodu naudoti pradmenys pateikti priedų 11 lentelėje, o reakcija atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.3 skyrelyje, tik DNR amplifikacija atlikta 40 kartų. AT-PGR metodu gautų produktų elektroforezė, tyrimas kPGR metodu, dominančių sekų klonavimas ir jų sekoskaita atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.4, 2.5 ir 2.6 skyreliuose.

A. Urisman ir kiti mokslininkai 2006 metais virusui XMRV aptikti naudojo lizdinį PGR metodą. Norint įsitikinti, kad mūsų XMRV virusui aptikti naudotas metodas yra geras, taikytas lizdinis PGR metodas su keliais XMRV teigiamais ir XMRV neigiamais mėginiais. Viskas atlikta taip, kaip aprašyta priedų 1 protokole. Lizdinio PGR metodu gauti produktai analizuoti 2 % agaroziniame gelyje. Viskas atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.4 skyrelyje.

7.2. XMRV viruso DNR tyrimai

Genominė DNR iš PL mėginių išskirta naudojant Genomic DNA Purification Kit (Fermentas Thermo Scientific) rinkinį, viskas atlikta pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos genominės DNR koncentracija nustatyta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.1 skyrelyje, ji laikyta -20°C temperatūroje.

PGR nuo genominės DNR atlikta naudojant Long PCR Enzyme Mix (Fermentas Thermo Scientific) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. XMRV viruso genomo sekoms padauginti skirtų pradmenų sekos ir temperatūra pateiktos priedų 12 lentelėje. Po PGR atlikta elektroforezė taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.4 skyrelyje, tik naudota 1 % agarozė. Reikiamo dydžio fragmentai klonuoti į plazmides, kurios vėliau paruoštos sekoskaitai. Viskas atlikta taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.6 skyrelyje.

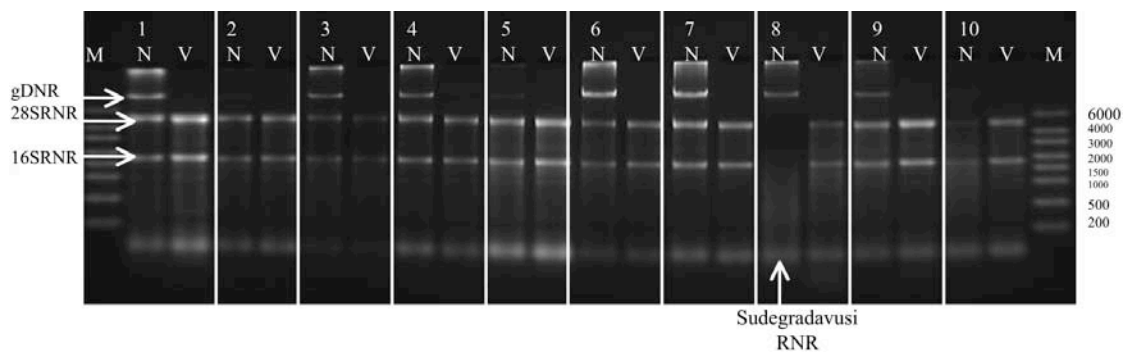
III. REZULTATAI

1. Genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

Genų (*TMPRSS2:ERG*, *TMPRSS2:ETV1*, *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC*) raiškos tyrimai PL mėginiuose atlikti „UAB Fermentas“ mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre (MTEPC).

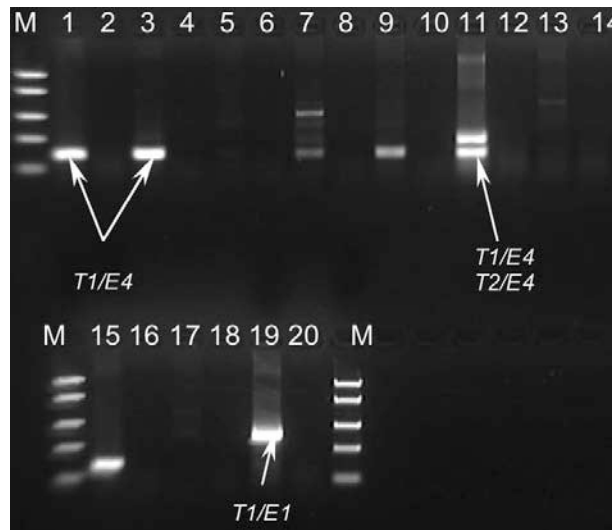
1.1. *TMPRSS2:ERG* ir *TMPRSS2:ETV1* genų sulietinių transkriptų paieška ir jų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

Tyrimo metu suminė RNR išskirta iš 189 šaldytų PL mėginių: 158 navikinių audinių ir 21 nenavikinio audinio. PL vėžys yra daugiažidininis, todėl tyrimo metu dešimčiai pacientų buvo paimta po du mėginius (20 mėginių, iš kurių 10 mėginių buvo įtraukti į bendrą tyrimo grupę). 14 paveiksle pateikiama iš šaldytų PL mėginių išskirtos suminės RNR elektroforegrama.



14 pav. Modifikuotu *Chomczynski-Sacchi* metodu išskirtos suminės RNR elektroforeograma (žr. sk. II 2.1): 1–10 – priešinės liaukos mėginiai; N – suminė RNR, neveikta DNase I (žr. sk. II 2.1); V – suminė RNR, veikta DNase I; M – RNR molekulinio svorio standartų mišinys RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

Nuo išskirtos suminės RNR susintetinta kDNR (žr. sk. II 2.2). Visų 189 PL mėginių kDNR patikrinta AT-PGR metodu (žr. sk. II 2.3). Nustatyti įvairūs *TMPRSS2:ERG* sulietiniai transkriptai, kurių pavyzdžiai pateikiami 15 paveiksle.



15 pav. AT-PGR metodu gautų *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų elektroforegrama: 1–20 – priešinės liaukos mėginiai; nelyginiai skaičiai – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; lyginiai skaičiai – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; T1/E4 – 100 bp, T1/E1 – 300 bp, T1/E4 ir T2/E4 – 100 bp ir 200 bp sulietiniai transkriptai; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

TMPRSS2:ERG sulietinio transkripto produktai yra: T1/E4 (100 bp), T1/E1 (300 bp), T1/E4 ir T2/E4 (100 bp ir 200 bp) bei T1/E4 ir T1/E1 (100 bp ir 300 bp). *TMPRSS2* ir *ERG* genų susiliejimas buvo aptiktas 93 mėginiuose iš 158 navikinio audinio mėginių. Tai sudaro 58,9 % ištirtų mėginių, o 65 mėginiuose *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas nebuvo aptiktas, tai sudaro 41,1 % ištirtų mėginių. PL mėginiuose dominuojantis sulietinis

transkriptas yra T1/E4 – 82,8 % (77/93), kaip pavienis aptiktas – 63,4 % (59/93) ištirtųjų mėginių, o kartu su T2/E4 sulietiniu transkriptu – 19,4 % (18/93) ištirtųjų mėginių. T1/E1 sulietinis transkriptas aptiktas 9,7 % (9/93) ištirtųjų mėginių, o kitokių sulietinių transkriptų variantų kombinacijos aptiktos – 7,5 % (7/93) ištirtųjų mėginių.

Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gauti fragmentai yra nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, fragmentai klonuoti į pTZ57 plazmidę (žr. sk. II 2.6). Išskyrus plazmides, atlikta jų sekoskaita. Sekoskaitą atliko „Fermentas Thermo Scientific“ darbuotoja A. Rukšėnaitė. Kiekvieno varianto nukleotidų seka palyginta su *TMPRSS2* ir *ERG* genų sekomis (GeneBank duomenų bazėje šių sekų numeriai atitinkamai: NM_005656 ir NM_004449) pasinaudojus internete esančia programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). T1/E4 fragmentai gauti susiliejus *TMPRSS2* geno pirmajam egzonui su *ERG* geno ketvirtuoju egzonu; T2/E4 – *TMPRSS2* geno antrajam egzonui su *ERG* geno ketvirtuoju egzonu; T1/E1 – *TMPRSS2* geno pirmajam egzonui su *ERG* geno pirmuoju egzonu. Gautų fragmentų sekos palygintos tarpusavyje, pasinaudojus internete esančia programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (**16, 17 ir 18 pav.**).

```

029 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
022 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
018 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
035 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
040 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
014 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
023 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
017 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
030 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
009 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
008 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCC 60
*****

```

```

029 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
022 TAATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
018 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
035 TTATCAGTTGTGAGTGAGAACAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
040 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
014 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
023 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
017 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
030 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
009 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
008 TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 105
* *****

```

16 pav. 100 bp *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto tarpusavio sekų palyginimas: žydra spalva pažymėta *TMPRSS2* ir *ERG* genų susiliejimo vieta; geltona spalva – nukleotidų neatitikimai; 008, 009, 014, 017, 018, 022, 023, 029, 030, 035 ir 040 – priešinės liaukos mėginiai; skaičiai dešinėje nurodo analizuotų nukleotidų kieki

```

008 TCAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGTCAT 60
018 TCAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGTCAT 60
023 TCAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGTCAT 60
034 TCAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGTCAT 60
*****

```

```

008 ATTGAACATTCCAGATACCTATCATTACTCGATGCTGTTGATAACAGCAAGATGGCTTTG 120
018 ATTGAACATTCCAGATACCTATCATTACTCGATGCTGTTGATAACAGCAAGATGGCTT-G 119
023 ATTGAACATTCCAGATACCTATCATTACTCGATGCTGTTGATAACAGCAAGATGGCTTTG 120
034 ATTGAACATTCCAGATACCTATCATTACTCGATGCTGTTG-GTAACAGCAAGATGGCTTTG 120
*****

```

```

008 AACTCAGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 177
018 AACTCAGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAG-GTG--TAC 173
023 AACTCAGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 177
034 AACTCAGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 177
*****

```

17 pav. 200 bp *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto tarpusavio sekų palyginimas: žydra spalva pažymėta *TMPRSS2* ir *ERG* genų susiliejimo vieta; geltona spalva – nukleotidų neatitikimai; 008, 018, 023 ir 034 – priešinės liaukos mėginiai; skaičiai dešinėje nurodo analizuotų nukleotidų kiekį

```

013 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCTGGAGCGCGGCAGGTTATT 60
021 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCTGGAGCGCGGCAGGTTATT 60
025 CAGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGGGGAGCGCCGCTGGAGCGCGGCAGGTTATT 60
*****

013 CCAGGATCTTTGGAGACCCGAGGAAAGCCGTGTTGACCAAAAGCAAGACAAATGACTCAC 120
021 CCAGGATCTTTGGAGACCCGAGGAAAGCCGTGTTGACCAAAAGCAAGACAAATGACTCAC 120
025 CCAGGATCTTTGGAGACCCGAGGAAAGCCGTGTTGGCCAAAAGCAAGACAAATGACTCAC 120
*****

013 AGAGAAAAAAGATGGCAGAACCAAGGGCAACTAAAGCCGTCAGGTTCTGAACAGCTGGTA 180
021 AGAGAAAAAAGATGGCAGAACCAAGGGCAACTAAAGCCGTCAGGTTCTGAACAGCTGGTA 180
025 AGAGAAAAAAGATGGCAGAACCAAGGGCAACTAAAGCCGTCAGGTTCTGAACAGCTGGTA 180
*****

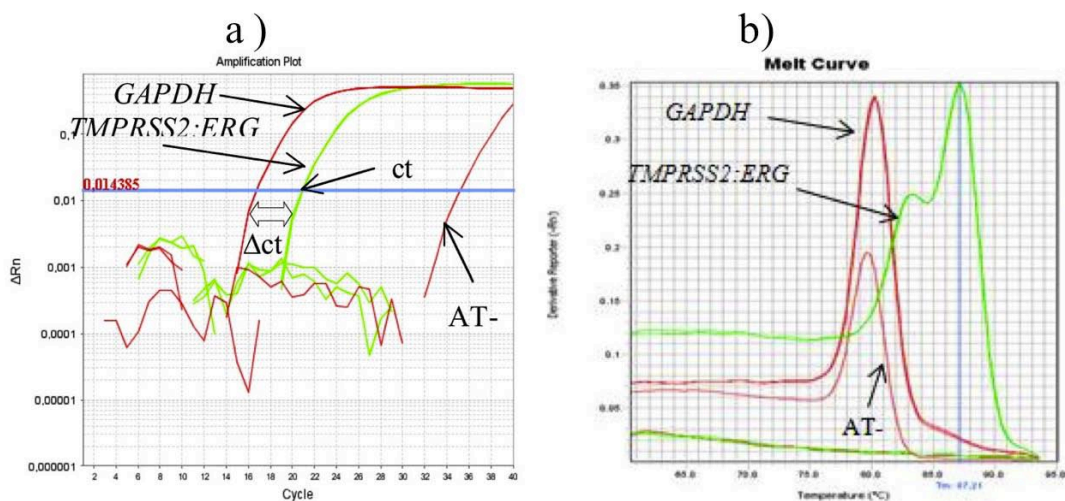
013 GATGGGCTGGCTTACTGAAGGACATGATTCAGACTGTCCCGACCCAGCAGCTCATATCA 240
021 GATGGGCTGGCTTACTGAAGGACATGATTCAGACTGTCCCGACCCAGCAGCTCATATCA 240
025 GATGGGCTGGCTTACTGAAGGACATGATTCAGACTGTCCCGACCCAGCAGCTCATATCA 240
*****

013 AGGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 293
021 AGGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 293
025 AGGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC 293
*****

```

18 pav. 300 bp *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto tarpusavio sekų palyginimas: žydra spalva pažymėta *TMPRSS2* ir *ERG* genų susiliejimo vieta; geltona spalva – nukleotidų neatitikimai; 013, 021 ir 025 – priešinės liaukos mėginiai; skaičiai dešinėje nurodo analizuotų nukleotidų kieki

TMPRSS2:ERG sulietinių transkriptų raiškai PL mėginiuose nustatyti atliktas kiekybinis PGR (kPGR) (žr. sk. II 2.5). AT-PGR metodu atrinkus PL mėginius, kuriuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, mRNR raiška patikrinta kPGR metodu (tirti 89 mėginiai, deja, 4 mėginių išanalizuoti šiuo metodu nepavyko, nes suminės RNR kiekis buvo nepakankamas). Iširtųjų PL mėginių kPGR metodu gautas reikšmės buvo nuo 2,42 iki 15,35 (**19 pav.**). Daugiausia aptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų, kurių Δct reikšmės buvo apie dešimt.



19 pav. Priešinės liaukos mėginių sulietinių transkriptų analizė kiekybiniu PGR metodu naudojant StepOnePlus aparatą: (a) logaritminės kreivės; (b) disociacinės kreivės; AT- yra kDNR mėginys, gautas sintetinant kDNR be atvirkštinės transkriptazės

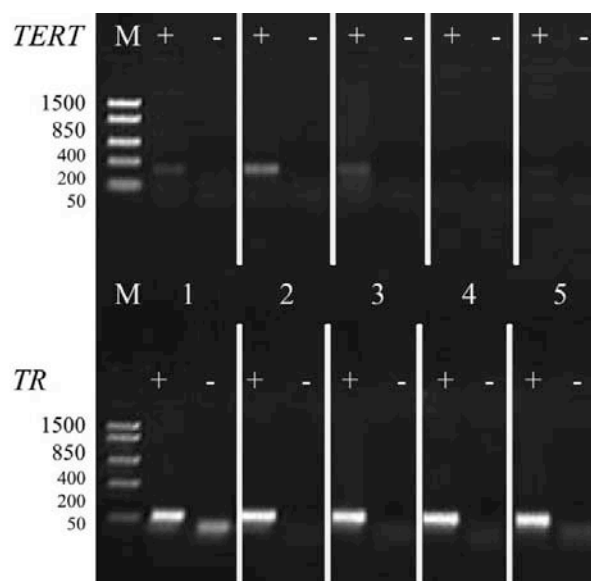
Tyrimo metu rinkti ne tik navikinio, bet ir nenavikinio audinio mėginiai. Tokių mėginių iš viso buvo 21. *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptiktas 4 mėginiuose, tai sudaro 19 % ištirtųjų mėginių, o sulietinio transkripto neaptikta 17 mėginių – 81 %. Dviejuose mėginiuose aptiktas T1/E4 sulietinis transkriptas, o kituose dviejuose – kartu su T2/E4 sulietiniu transkriptu. Trys mėginiai išanalizuoti kPGR metodu, jiems taip pat būdinga silpna (Δ ct daugiau nei 12,50) sulietinių transkriptų raiška.

PL mėginių kopijinė DNR, kurioje neaptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, panaudojus AT-PGR metodą su *TMPRSS2* ir *ETV1* genų pradmenimis, papildomai patikrinta, ar joje nėra subalansuotos ar nesubalansuotos chromosominės translokacijos tarp *TMPRSS2* ir *ETV1* genų. Iš viso ištirti 69 mėginiai, iš kurių 4 nenavikinio audinio mėginiai (likusių 17 mėginių, kuriuose neaptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, *TMPRSS2:ETV1* paieškos tyrimų atsisakyta). Translokacijos šiuose mėginiuose nerasta.

Išanalizavus visus tyrimo metu surinktus PL mėginius, *TMPRSS2* ir *ERG* genų susilieėjimas aptiktas 106 mėginiuose iš 189, tai sudaro 56,1 % visų ištirtųjų mėginių: 83 mėginiuose sulietinio transkripto nerasta, tai sudaro 43,9 % visų ištirtųjų mėginių.

1.2. *TERT* geno raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

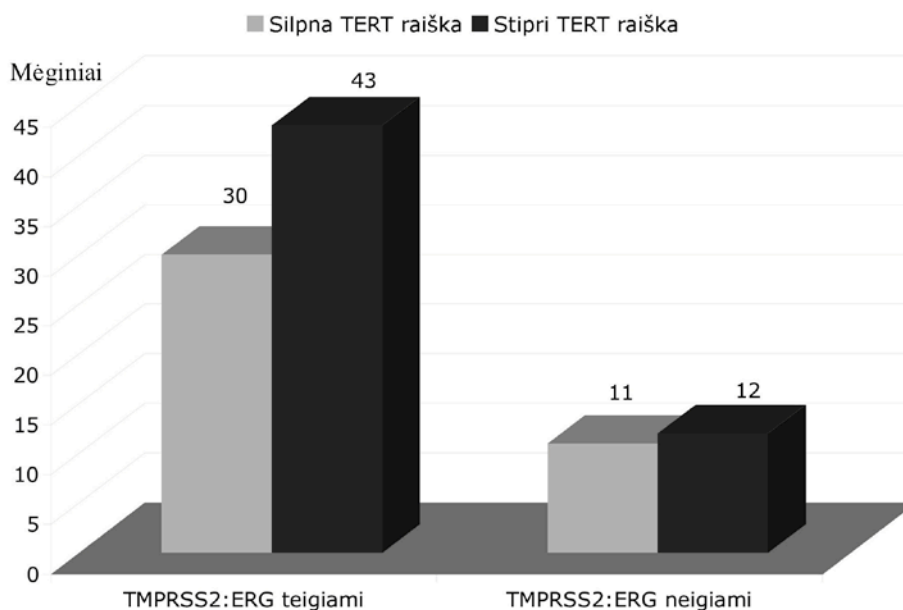
TERT geno raiška vertinta ne tik kokybiniu AT-PGR metodu, bet ir kiekybiniu kPGR metodu. AT-PGR metodu ištirta 170 PL mėginių, iš jų 158 buvo naviko mėginiai. kDNR ir RNR kokybės kontrolei įvertinti (be *GAPDH* geno) naudotas telomerazės specifinis *TR* genas. *TR* geno raiškos nebuvimas įrodo, kad PL mėginyje negali susiformuoti funkcionali telomerazė. *TR* geno raiška aptikta 98,8 % (168/170) ištirtų PL mėginių. Telomerazės transkriptų kokybiniai raiškos duomenys, gauti remiantis produkto švytėjimo intensyvumu agarozės gelyje (matomas produktas – teigiamas, nematomas – neigiamas), buvo suskirstyti į dvi grupes (žr. sk. II 2.5): *TERT* neigiami – 95 mėginiai, *TERT* teigiami – 75 mėginių (**20 pav.**). Vienuolikoje iš 12 nenavikinių PL audinių buvo *TERT* neigiami ir tik vienas mėginys – *TERT* teigiamas (8 %).



20 pav. AT-PGR metodu gautų *TERT* transkriptų elektroforegrama: 1–5 – priešinės liaukos mėginiai; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

PL mėginiai (navikiniai ir nenavikiniai) sugrupuoti pagal tai, ar mėginyje yra sulietinis transkriptas, ar jo nėra. Iš 96 *TMPRSS2:ERG* teigiamų 46-uose aptikta *TERT* raiška (47,9 %), o 50-yje – neaptikta (52,1 %). Iš 74 *TMPRSS2:ERG* neigiamų atvejų tik 26-uose aptikta *TERT* raiška (35,1 %), o 48-uose – ji nenustatyta (64,9 %). Bent vienas iš *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* transkriptų aptiktas 72 % (122/170) PL navikų.

Gavus teigiamą rezultatą AT-PGR metodu, PL mėginiai toliau analizuoti kPGR metodu. Šiuo metodu išanalizuoti 96 PL mėginiai, gautos *TERT* transkripto raiškos analizės Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 13,76 iki 19,41) aptikta 41 mėginyje (42,7 %), 2 – stipri (Δ ct nuo 8,94 iki 13,75) aptikta 55 mėginiuose (57,3 %; **21 pav.**).



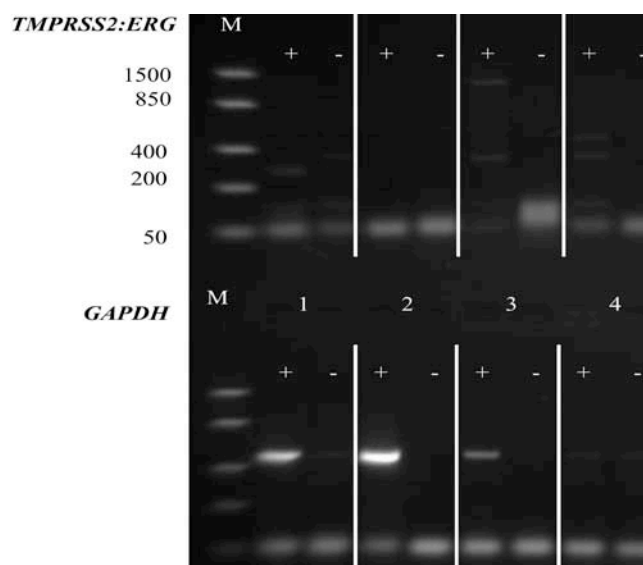
21 pav. *TERT* geno raiškos pasiskirstymas tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų mėginių

TERT geno raiška statistiškai patikimai ($p = 0,019$) skyrėsi navikiniuose ir nenavikiniuose PL mėginiuose. Taip pat gautas statistiškai patikimas *TERT* geno raiškos skirtumas ($p = 0,041$) tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų mėginių.

1.3. *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* transkriptų analizė ligonių šlapimo nuosėdose

Vienas iš tyrimo biologinių objektų buvo šlapimo nuosėdų RNR. Iškeltas uždavinys – nustatyti *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų buvimą ir jų įvairovę šlapimo nuosėdose bei atitikimą randamiems to paties paciento PL mėginiuose. Suminė RNR išskirta iš 179 šaldytų šlapimo nuosėdų mėginių (žr. sk. II 3.1). Tinkamos kokybės suminė RNR gauta iš 139 mėginių, kitų 40 mėginių suminės RNR koncentracija buvo per maža. Panaudojus AT-PGR metodą (žr. sk. II 3.1), 74 iš 139 mėginių nebuvo aptikta *GAPDH* geno raiška, todėl šie mėginiai toliau nebuvo tiriami (**22 pav.**). Ištyrus 61 šlapimo nuosėdų

mėginių genų susiliejimas aptiktas 10 mėginių, tai sudaro 16,4 % ištirtųjų šlapimo nuosėdų mėginių. Daugiausia aptikta T1/E4 sulietinių transkriptų (9/61), tai sudaro 14,8 % ištirtųjų šlapimo nuosėdų mėginių ir tik vienas atvejis T1/E1 sulietinio transkripto – 1,6 % ištirtųjų šlapimo nuosėdų mėginių. Šlapimo nuosėdose rastos *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto izoformas atitiko PL mėginiuose aptiktas izoformas: jei šlapimo nuosėdose aptikome sulietinį transkriptą, tokia pati sulietinio transkripto izoforma aptikta to paties paciento PL mėginyje.



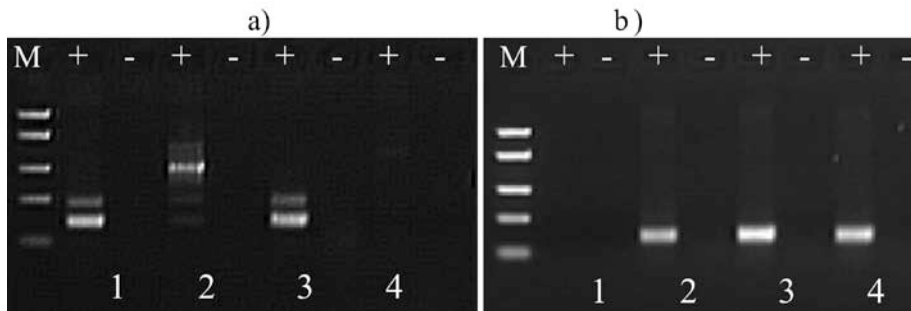
22 pav. AT-PGR metodu gautų *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų elektroforegrama: 1–4 – šlapimo nuosėdų mėginiai; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

PL vėžiu sergančių ligonių šlapimo nuosėdose atlikti ne tik *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto paieškos, bet ir *TERT* tyrimai. AT-PGR metodu *TERT* transkriptas aptiktas 11 mėginių iš 65, tai sudaro 16,9 % ištirtųjų

šlapimo nuosėdų mėginių. 31 % (19/61) ištirtųjų šlapimo nuosėdų mėginių aptiktas *TMPRSS2:ERG* ir (arba) *TERT* transkriptas.

1.4. Daugiažidininio priešinės liaukos vėžio mėginių tyrimai

Tyrimo metu renkant biologinę medžiagą, gauta keletas mėginių, kuriuose aptikti keli navikinio audinio židiniai. Daugiažidininio PL vėžio mėginiai analizuoti AT-PGR ir kPGR metodais. Iš viso išanalizuota 10 PL mėginių porų (20 mėginių). AT-PGR metodu daugiausia aptikta T1/E4 sulietinio transkripto – 85 % (17/20) PL mėginiuose, kuriuose kaip pavienis T1/E4 sulietinis transkriptas aptiktas – 55 % (11/20), o kartu su T2/E4 sulietiniu transkriptu – 30 % (6/20) mėginių. T1/E1 sulietinis transkriptas sudarė tik 5 % (1/20) ištirtųjų mėginių, o *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto neaptikta – 10 % (2/20) ištirtųjų mėginių. Kelių daugiažidininio PL navikų mėginių tarpusavio palyginimo elektroforegrama pateikta 23 paveikslėlyje.



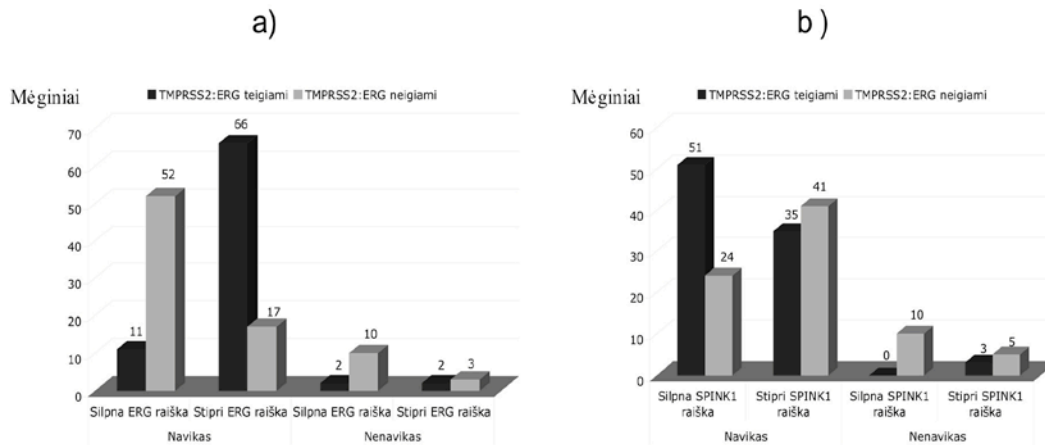
23 pav. AT-PGR metodu gautų *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų izoformų įvairovės elektroforegrama: 1–4 daugiažidininio priešinės liaukos navikų mėginiai; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific); (a) ir (b) atitinka tą patį atvejį, tik mėginiai paimti iš skirtingų priešinės liaukos vietų

Tik dviejuose poriniuose mėginiuose (20 % ištirtųjų daugiažidininio vėžio atveju) aptikta ta pati sulietinio transkripto izoforma – T1/E4, kituose mėginiuose rastos skirtingos izoformos arba *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto nerasta visai. PL mėginiuose, kuriuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, kPGR metodu sulietinių transkriptų raiška patikrinta 18 mėginių. kPGR metodu gauti duomenys suskirstyti į dvi grupes: 1 – silpna raiška (Δ ct nuo 7,51 iki 14,85) aptikta 14 mėginių (78 %), 2 – stipri raiška (Δ ct nuo 3,61 iki 7,50) aptikta 4 mėginiuose (22 %). Tarpusavyje palyginus daugiažidininio vėžio atveju Δ ct reikšmes, gautas sutapimas tik keturiuose mėginiuose. Daugiažidininio vėžio poriniuose mėginiuose gautas statistiškai patikimas skirtumas ($p < 0,0001$) tarp porinių atvejų *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto raiškos intensyvumo. Tai rodo, kad skiriasi ne tik sulietinio transkripto izoforma, bet ir jos raiška to paties paciento PL mėginiuose. Priedų 6 lentelėje pateiktas daugiažidininio vėžio atvejų tarpusavio palyginimas. Poriniuose mėginiuose atlikta *TERT* geno raiškos analizė AT-PGR metodu parodė, kad ši raiška aptikta 11 iš 20 *TERT* teigiamų mėginių (55 %), o *TERT* neigiamų – 9 (45 %). Tik vieno atvejo poriniuose židininio vėžio mėginiuose aptikti abu *TERT* teigiami mėginiai. *TERT* raiška dažniausiai (100 %; 11/11) vyko *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose mėginiuose.

1.5. *ERG* ir *SPINK1* genų raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

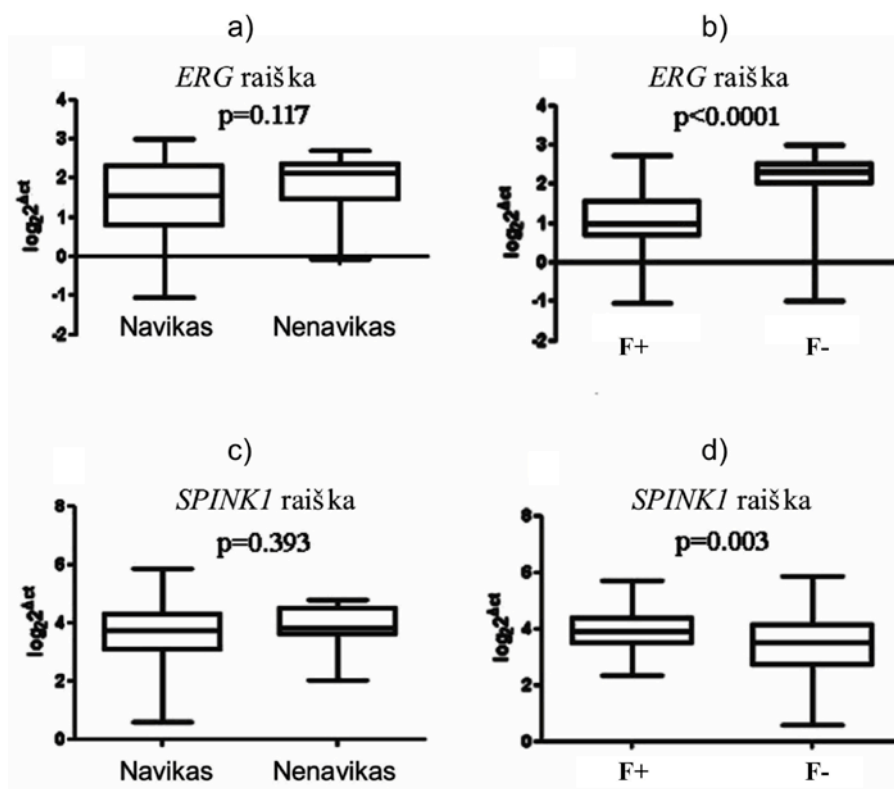
Kiekybiniu PGR metodu *ERG* geno raiška ištirta 164 PL mėginiuose, iš kurių 146 buvo navikinio PL audinio mėginiai. kPGR metodu *SPINK1* geno raiška ištirta 169 PL mėginiuose, iš kurių 151 buvo navikinio PL audinio mėginys. Gautos *ERG* geno raiškos Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 5,31 iki 10,01) aptikta 75 mėginiuose (45,7 %), 2 – stipri raiška (Δ ct nuo -3,53 iki 5,30) aptikta 88 mėginiuose (54,3 %); gautos *SPINK1* geno raiškos analizės Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 12,51 iki 19,5) aptikta 85 mėginiuose (50,3 %),

2 – stipri raiška (kt nuo 1,88 iki 12,50) aptikta 84 mėginiuose (49,7 %) (24 pav.).



24 pav. *ERG* (a) ir *SPINK1* (b) genų raiškos pasiskirstymas tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų atvejų navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose

Stipri *ERG* raiška aptikta 83 navikiniuose PL audinio mėginiuose, nenavikiniuose – 5, patikimo skirtumo nenustatyta ($p = 0,117$). Silpna *SPINK1* raiška aptikta 75 navikiniuose PL audinio mėginiuose, nenavikiniuose – 10, patikimo skirtumo nenustatyta ($p = 0,393$) (25 pav., a ir c). PL navikinių mėginių grupė (158 mėginiai), kuri išanalizuota AT-PGR metodu, suskirstyta į dvi grupes pagal *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimą ir jo nebuvimą mėginyje. Statistinės analizės duomenimis, *ERG* ir *SPINK1* raiškos skirtumai buvo patikimi (atitinkamai $p < 0,0001$ ir $p = 0,003$; 25 pav., b ir d) *TMPRSS2:ERG* teigiamuose ir neigiamuose mėginiuose.

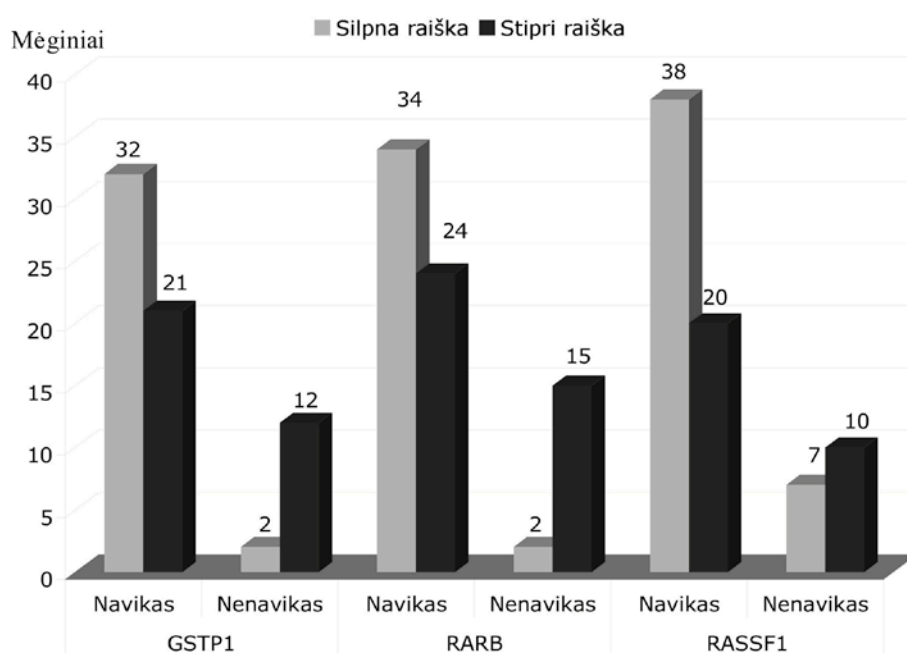


25 pav. *ERG* (a) ir *SPINK1* (c) genų raiška navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose; *ERG* (b) ir *SPINK1* (d) genų raiška *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose ir jo neturinčiuose mėginiuose; „F+“ – aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas; „F-“ – *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto neaptikta

1.6. Naviką slopinančių genų *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

Kiekybiniu PGR metodu naviką slopinančių genų raiška ištirta 78 PL mėginiuose, iš kurių 61 buvo navikinis PL audinio mėginys. *GSTP1* geno raiška ištirta 65 PL mėginiuose, iš kurių 51 buvo PL navikinio audinio mėginiai. *RARB* ir *RASSF1* genų raiška kPGR metodu ištirta 75 PL mėginiuose, iš kurių 58 buvo PL navikinio audinio mėginiai. Gautos *GSTP1* geno raiškos analizės Δct reikšmės: 1 – stipri (Δct nuo -1,48 iki 2,60) aptikta 33 mėginiuose (50,8 %), 2 – silpna Δct nuo 2,61 iki 6,72) aptikta

34 mėginiuose (49,2 %); gautos *RARB* geno raiškos analizės Δct reikšmės: 1 – stipri (Δct nuo 0,59 iki 7,00) aptikta 39 mėginiuose (52 %), 2 – silpna (Δct nuo 7,01 iki 10,54) aptikta 36 mėginiuose (48 %); gautos *RASSF1* geno raiškos analizės Δct reikšmės: 1 – stipri (Δct nuo 1,28 iki 9,00) aptikta 30 mėginių (40 %), 2 – silpna (Δct nuo 9,01 iki 13,01) aptikta 45 mėginiuose (60 %). 26 paveiksle pateiktas naviką slopinančių genų raiškos palyginimas navikiniuose ir nenavikiniuose PL mėginiuose.



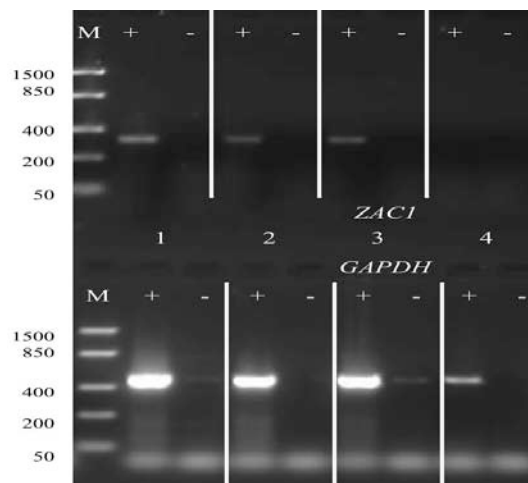
26 pav. *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* genų raiškos pasiskirstymas navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose

PL mėginius sugrupavus į navikinio ir nenavikinio audinio mėginius, gauti statistiškai patikimi skirtumai pagal *GSTP1* ir *RASSF1* genų raišką (atitinkamai $p = 0,042$ ir $p = 0,018$), bet nebuvo gauta statistiškai patikimo *RARB* geno raiškos skirtumo ($p = 0,066$). PL navikinius mėginius sugrupavus į dvi grupes pagal *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimą ir jo nebuvimą mėginyje, nebuvo gauta statistiškai patikimų *GSTP1* bei *RARB* genų raiškos

skirtumų (atitinkamai $p = 0,201$ ir $p = 0,409$) taip pat ir *RASSF1* geno raiškos skirtumo ($p = 0,789$).

1.7. ZAC geno raiškos analizė priešinės liaukos mėginiuose

ZAC geno raiška vertinta ne tik kokybiniu AT-PGR metodu, bet ir kiekybiniu PGR metodu. AT-PGR metodu ištirti 168 PL mėginiai, iš kurių 158-uose buvo navikinio audinio. AT-PGR metodu gauti ZAC geno transkriptų kokybinės raiškos duomenys buvo suskirstyti į dvi grupes: ZAC teigiami – 86 mėginiuose (51,2 %), o neigiami – 82 mėginiuose (48,8 %; **27 pav.**). PL mėginiai sugrupuoti pagal sulietinio transkripto buvimą ir jo nebuvimą mėginyje. *TMPRSS2:ERG* sulietiniam transkriptui teigiamuose mėginiuose aptikti 54 teigiami (32,1 %) ir 32 neigiami (19,0 %) ZAC mėginiai. *TMPRSS2:ERG* neigiamuose mėginiuose aptiktas vienodas kiekis – po 41 teigiamų ir neigiamų (24,4 %) ZAC mėginių.

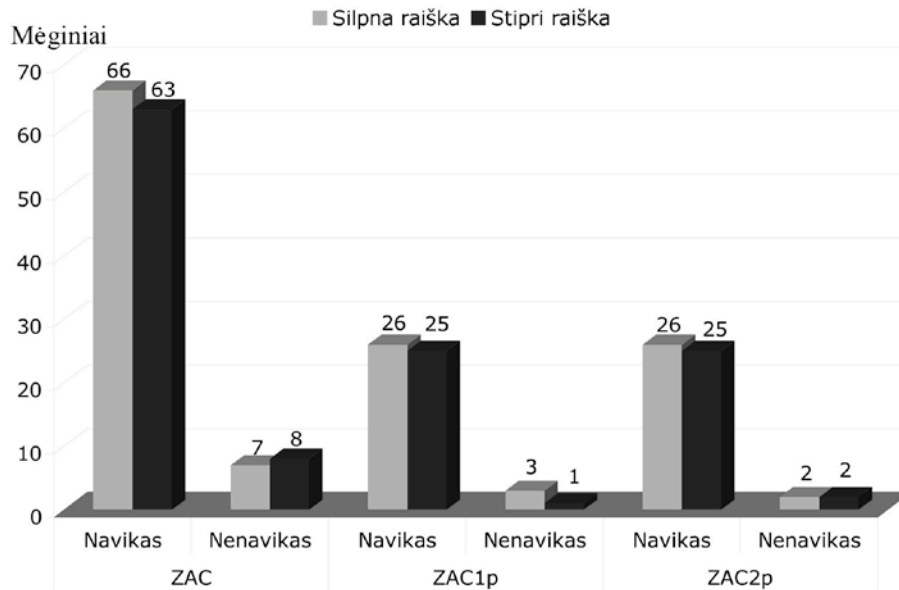


27 pav. AT-PGR metodu gautų ZAC transkriptų elektroforegrama: 1–4 – priešinės liaukos mėginiai; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

Gavus teigiamą rezultatą AT-PGR metodu, PL mėginiai toliau analizuoti kPGR metodu. Šiuo metodu ištirti 144 mėginiai, gautos ZAC transkripto raiškos analizės Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 8,60 iki 16,5) aptikta 73 mėginiuose (50,7 %), 2 – stipri (Δ ct nuo 5,69 iki 8,59) aptikta 71 mėginyje (49,3 %; **28 pav.**). PL mėginius sugrupavus į navikinio ir nenavikinio audinio mėginius, statistiškai patikimo ZAC geno raiškos skirtumo negauta ($p = 0,746$).

ZAC transkripto raiška nuo skirtingų promotorių tirta kiekybiniu PGR metodu. Iš viso išanalizuoti 55 PL mėginiai (atsirinkti remiantis AT-PGR metodu gautais duomenimis – ZAC teigiami atvejai), iš kurių 52 navikinio PL audinio mėginiai PL mėginiai.

ZAC1p ir ZAC2p žymi ZAC geno transkriptus, kurie gauti nuo skirtingų promotorinių sekų. Gautos ZAC1p geno transkripto raiškos analizės Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 10,61 iki 14,15) aptikta 28 mėginiuose (50,9 %), 2 – stipri (Δ ct nuo 4,87 iki 10,60) aptikta 27 mėginiuose (49,1 %). Gautos ZAC2p geno transkripto raiškos analizės Δ ct reikšmės: 1 – silpna (Δ ct nuo 11,41 iki 14,26) aptikta 28 mėginiuose (50,9 %), 2 – stipri (Δ ct nuo 6,14 iki 11,40) aptikta 27 mėginiuose (50,9 %). ZAC teigiamuose bei *TMPRSS2:ERG* teigiamuose ir neigiamuose mėginiuose rastas vienodas ZAC1p ir ZAC2p stiprios raiškos kiekis (atitinkamai 20 ir 19 mėginių). Analizuojant PL mėginius nustatyta vienoda ZAC geno transkripto raiška nuo abiejų promotorių, nors rasta mėginių, kuriuose ZAC geno raiška nuo antrojo promotoriaus yra didesnė negu nuo pirmojo. ZAC, ZAC1p ir ZAC2p raiškos palyginimas navikiniuose ir nenavikiniuose PL mėginiuose pateikiamas 28 paveiksle.



28 pav. ZAC, ZAC1p ir ZAC2p genų raiškos pasiskirstymas navikiniuose ir nenavikiniuose mėginiuose

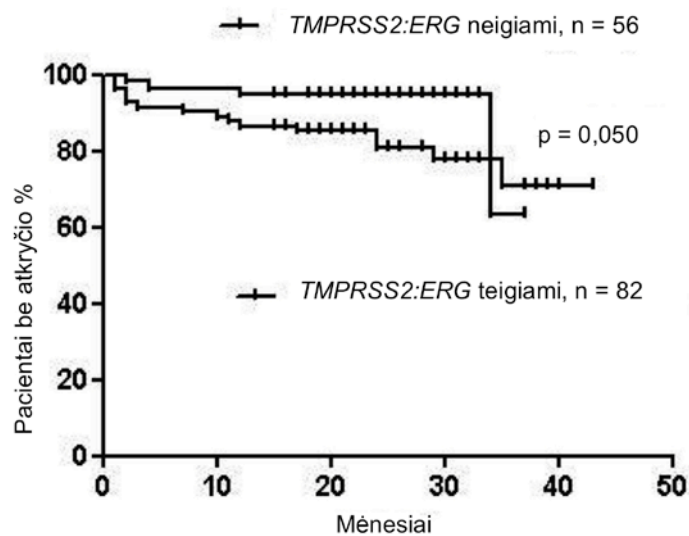
Nebuvo gauta statistiškai patikimo ZAC geno raiškos skirtumo pagal *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimą ir jo nebuvimą mėginyje ($p = 0,169$). Taip pat negauta patikimos koreliacijos su ZAC geno transkriptais, gautais nuo skirtingų promotorių (atitinkamai $p = 0,723$ ir $p = 0,354$).

1.8. Sąsajos su klinikiniais rodikliais ir atkryčiu

Atlikus Spearmano koreliacinę analizę bendroje tiriamųjų grupėje (158 PL mėginių, neįtraukiant 10 daugiažidiniųjų navikų mėginių), gautas statistiškai patikimas ryšys tarp naviko stadijos ir diferenciacijos pagal *Gleason* skalę ($p < 0,0001$; $r_s = 0,47$), PSA lygio prieš operaciją ($p < 0,0001$; $r_s = 0,32$), naviko tūrio ($p < 0,0001$; $r_s = 0,37$) bei paciento amžiaus ($p = 0,035$; $r_s = 0,17$); tarp diferenciacijos pagal *Gleason* skalę ir PSA lygio prieš operaciją ($p < 0,0001$; $r_s = 0,39$) bei naviko tūrio ($p = 0,0004$; $r_s = 0,28$). Gauti statistiškai patikimi skirtumai tarp priešoperacinio PSA lygio ir PL svorio ($p = 0,013$; $r_s = 0,21$), naviko tūrio ($p = 0,003$; $r_s = 0,39$), taip pat tarp paciento

amžiaus ir PL svorio ($p = 0,015$; $r_s = 0,19$). PL atkryčio rizika koreliavo su naviko stadija ($p < 0,0001$; $r_s = 0,37$) ir diferenciacija pagal *Gleason* skalę ($p = 0,002$; $r_s = 0,28$).

Palyginus *TMPRSS2:ERG* teigiamus ir neigiamus navikus (*Mann-Whitney*), gauti statistiškai patikimi skirtumai pagal PSA lygį prieš operaciją ($p = 0,007$) ir PL svorį ($p = 0,027$). Statistiškai patikimų skirtumų pagal kitus klinikinius rodiklius nerasta. Atlikus atkryčio rizikos statistinį vertinimą (*Mantel-Cox* testu), gauta ribinė sąsaja su sulietinio transkripto buvimu PL naviko mėginiuose ($p = 0,050$). Nesant sulietinio transkripto navike atkryčio rizika buvo mažesnė (4 iš 56), nei esant sulietiniam transkriptui (16 iš 82) (**29 pav.**).



29 pav. Pacientų ligos atkryčio priklausomybė nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo mėginyje (viršutinė kreivė *TMPRSS2:ERG* teigiami atvejai, apatinė – *TMPRSS2:ERG* neigiami atvejai)

TERT transkripto raiška (teigiami / neigiami mėginiai) nekoreliavo su klinikiniais rodikliais, bet nustatyta patikima sąsaja su *ERG* geno raiška ($p = 0,016$) – *TERT* teigiamuose navikuose *ERG* raiška buvo intensyvi. Atlikus

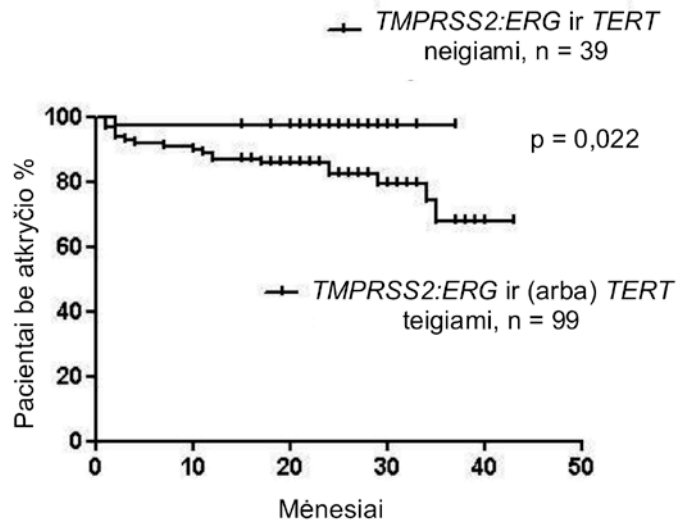
atkryčio analizę (*Mantel-Cox* testu), negauta statistiškai patikimų skirtumų tarp mėginių, kuriuose aptikta *TERT* geno raiška ir jos neaptikta ($p = 0,236$), taigi vien tik *TERT* geno raiškos buvimas neturi įtakos ligos atsinaujinimui.

ERG geno raiška koreliavo ne tik su *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto bei *TERT* transkripto buvimu mėginyje, bet ir su pacientų KMI ($p = 0,032$), nors koreliacija tarp KMI ir *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto nebuvo aptikta. Patikimų *ERG* ir *SPINK1* genų raiškos koreliacijų su kitais klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi nenustatyta.

Gautos statistiškai patikimos sąsajos tarp *RASSF1* geno raiškos ir priešoperacinio PSA lygio ($p = 0,029$) bei *GSTP1* ir naviko stadijos ($p = 0,041$). Nebuvo rasta patikimų *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* genų raiškos koreliacijų su kitais klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi.

ZAC teigiami ir neigiami mėginiai statistiškai patikimai skyrėsi pagal *TERT* ($p = 0,001$) ir *RASSF1* ($p = 0,011$) genų raišką. Statistiškai patikimų *ZAC* geno raiškos sąsajų su klinikiniais rodikliais ir pacientų amžiumi nenustatyta.

Kadangi *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimas mėginyje rodė ribinę prognozinę vertę, pabandyta įvertinti bendrą dviejų molekulinų žymenų – *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* – prognozinę vertę. Atlikus ligos progresijos veiksmų analizę (*Mantel-Cox* testu), gauti statistiškai patikimi skirtumai ($p = 0,025$) tarp mėginių, kuriuose aptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* geno raiška, bei tų mėginių, kuriuose neaptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* geno raiškos. Patikimiausi skirtumai gauti tarp mėginių, kuriuose nebuvo aptiktas nė vienas iš dviejų transkriptų, ir tų, kuriuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* ir (arba) *TERT* transkriptas ($p = 0,022$) (**30 pav.**).



30 pav. Pacientų ligos atkryčio priklausomybė nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* raiškos buvimo mėginyje

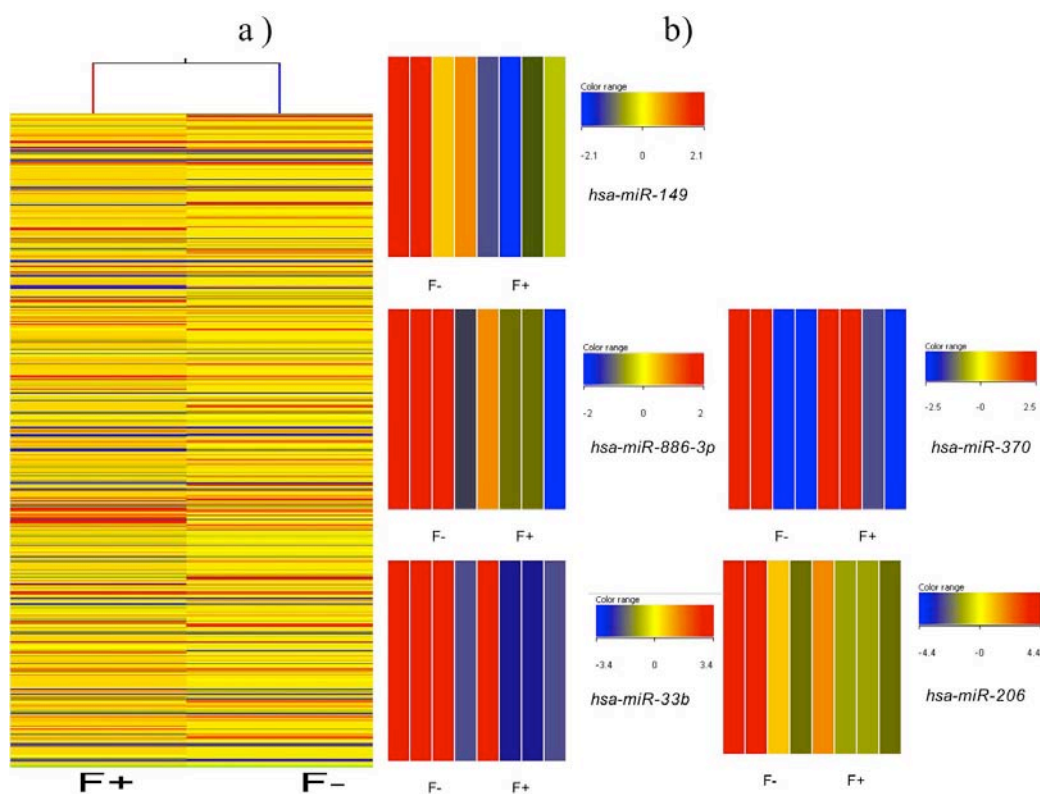
Į Cox proporcingių pavojų regresijos (angl. *Cox proportional hazards regression*) veiksmų analizę įtraukę klinikinius veiksmus, nustatėme statistiškai patikimą ligos stadijos (HR 6,55; 95 % CI, 2,60–16,54; $p < 0,0001$), diferenciacijos pagal *Gleason* skalę (HR 4,57; 95 % CI, 1,75–11,92; $p = 0,002$) bei *TMPRSS2:ERG* ir (arba) *TERT* (HR 7,33; 95 % CI, 0,98–54,99; $p = 0,053$) transkriptų įtaką ligos progresavimo rizikai.

2. Priešinės liaukos mėginių ir ląstelių linijų mikroRNR raiškos tyrimai

Priešinės liaukos mėginių ir ląstelių linijų mikroRNR raiškos tyrimai atlikti Suomijoje, Tampėrės universiteto Medicininės technologijos instituto Priešinės liaukos vėžio tyrimų laboratorijoje.

2.1. MikroRNR raiškos analizė priešinės liaukos navikuose mikrogardelių metodu ir jų tinkamumo patikrinimas kPGR metodu

Aštuoni RNR mėginiai užlieti ant mikrogardelių mikroRNR raiškai įvertinti. Keturiuose RNR mėginiuose (51, 162, 163 ir 110) anksčiau aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, o 91, 188, 53 ir 105 PL mėginiuose jo neaptikta (priedų 7 lentelė). Mikrogardelių duomenys, atlikus mikroRNR hibridizaciją (žr. sk. II 5.1), analizuoti GeneSpringGX programa (**31 pav.**). Šia programa buvo atrinkos mikroRNR, kurių raiška yra sumažėjusi mėginiuose, turinčiuose *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą. Tokius duomenis reikia patikrinti, nes: 1 – ant mikrogardelių buvo užlieti tik keturi *TMPRSS2:ERG* teigiami ir keturi neigiami mėginiai, o tai per maža imtis, kurią ištyrus rezultatais būtų galima besąlygiškai pasitikėti; 2 – mikrogardelės parodo užlietų mėginių skirtumus, kuriuos gali nulemti įvairūs veiksniai: hibridizacijos efektyvumas; mėginyje esančių navikinių ir stromos ląstelių kiekis (procentais); suminės RNR kokybė; pasirinktas duomenų analizavimo algoritmas. Todėl išanalizavus hibridizacijos metu gautus rezultatus būtina patikrinti jų tinkamumą biologiniuose pavyzdžiuose ir ląstelių linijose.

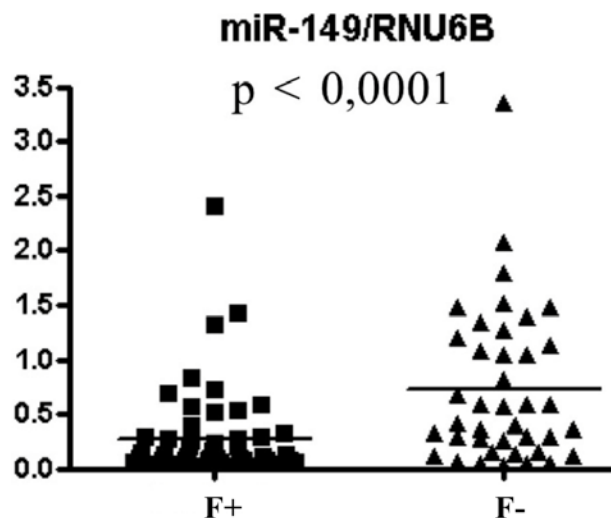


31 pav. Priešinės liaukos naviko mėginių analizė GeneSpringGX kompiuterine programa: (a) – aštuonių mėginių hierarchinis grupavimas, paremtas sulietinio transkripto buvimu ir jo nebuvimu; raudona spalva reiškia padidėjusią mikroRNR raišką, mėlyna – sumažėjusią, geltona – nepakitusią raišką; (b) – kiekvienos pasirinktos mikroRNR raiškos palyginimas kiekviename analizuotame mėginyje atskirai; „F+“ – mėginyje *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptinkamas, o „F-“ – neaptinkamas

GeneSpringGX programa gauti rezultatai buvo palyginti su Suomijoje dirbančių kolegų turima PL mėginių mikrogardelių duomenų baze. Remiantis gautais rezultatais ir turimais Suomijos kolegų duomenimis, pasirinktos penkios mikroRNR, kurių raiška sumažėjusi PL mėginiuose, turinčiuose *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą: *hsa-miR-149*, *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370* ir *hsa-miR-206*. Pasirinktų mikroRNR žymėjimas remiasi tarptautine priimta mikroRNR žymėjimo sistema (<http://www.mirbase.org/>).

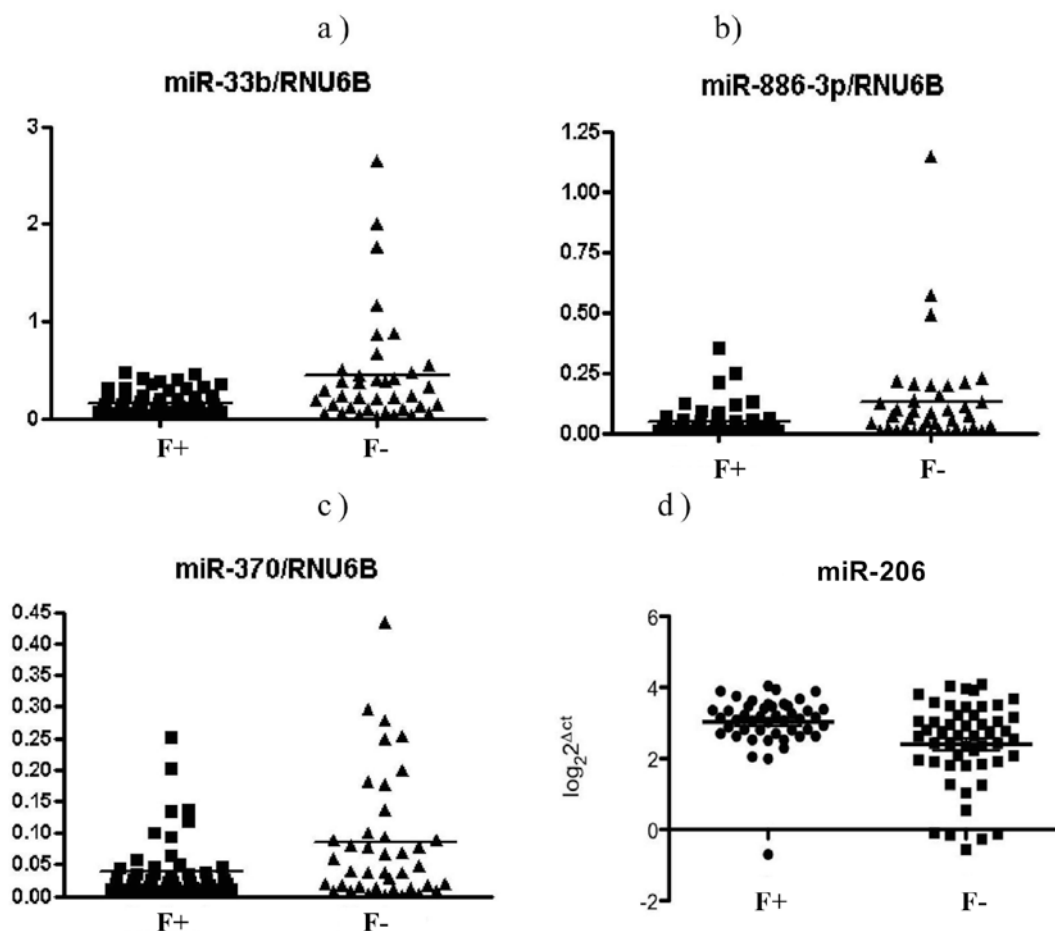
MikroRNR, kurių raiška PL mėginiuose yra padidėjusi, tolesniuose eksperimentuose nebuvo tiriama todėl, kad dauguma jų yra plačiai tyrinėtos.

MikroRNR tinkamumui patikrinti pasirinkti 105 PL mėginiai, tiriamoji grupė aprašyta metodinės dalies 1 skyriaus 2 lentelėje. Iš 105 mėginių *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptiktas 50 mėginių, o 55 mėginiuose jis neaptiktas. MikroRNR raiškai aptikti naudotas standartinės kreivės metodas. Atlikus *hsa-miR-149* mikroRNR kPGR metodu gautų duomenų analizę, nustatyti statistiškai patikimi *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos skirtumai tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų mėginių ($p < 0,0001$) (**32 pav.**). Esant sulietiniam transkriptui *hsa-miR-149* mikroRNR raiška yra sumažėjusi, palyginti su mėginiais, kuriuose *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto nerandama.



32 pav. *hsa-miR-149* mikroRNR raiška *TMPRSS2:ERG* teigiamuose ir neigiamuose mėginiuose; Y ašyje atidėti normalizuoti duomenys; „F+“ – mėginyje *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptinkamas, o „F-“ – neaptinkamas

Išanalizavus kPGR metodu gautus likusių pasirinktų mikroRNR duomenis, nustatyti statistiškai patikimi *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370* ir *hsa-miR-206* mikroRNR raiškos skirtumai tarp mėginių, kuriuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, ir tų, kuriuose sulietinio transkripto neaptikta (atitinkamai $p = 0,0048$, $p = 0,0028$, $p = 0,0373$ ir $p = 0,0432$) (**33 pav.**). Pažymėtina, kad *hsa-miR-206* raiškai nustatyti nepavyko pritaikyti standartinės kreivės metodo, nes *hsa-miR-206* mikroRNR raiška yra labai maža (kartais vos nustatoma) PL mėginiuose, todėl statistinei analizei atlikti panaudotas 2 delta ct ($2^{\Delta ct}$) metodas. Analizuojant kPGR metodo linijinių kreivių duomenis, paaiškėjo, kad mėginiuose, kuriuose nėra *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, *hsa-miR-206* mikroRNR raiška aptinkama gerokai anksčiau, palyginti su mėginiais, turinčiais sulietinį transkriptą.



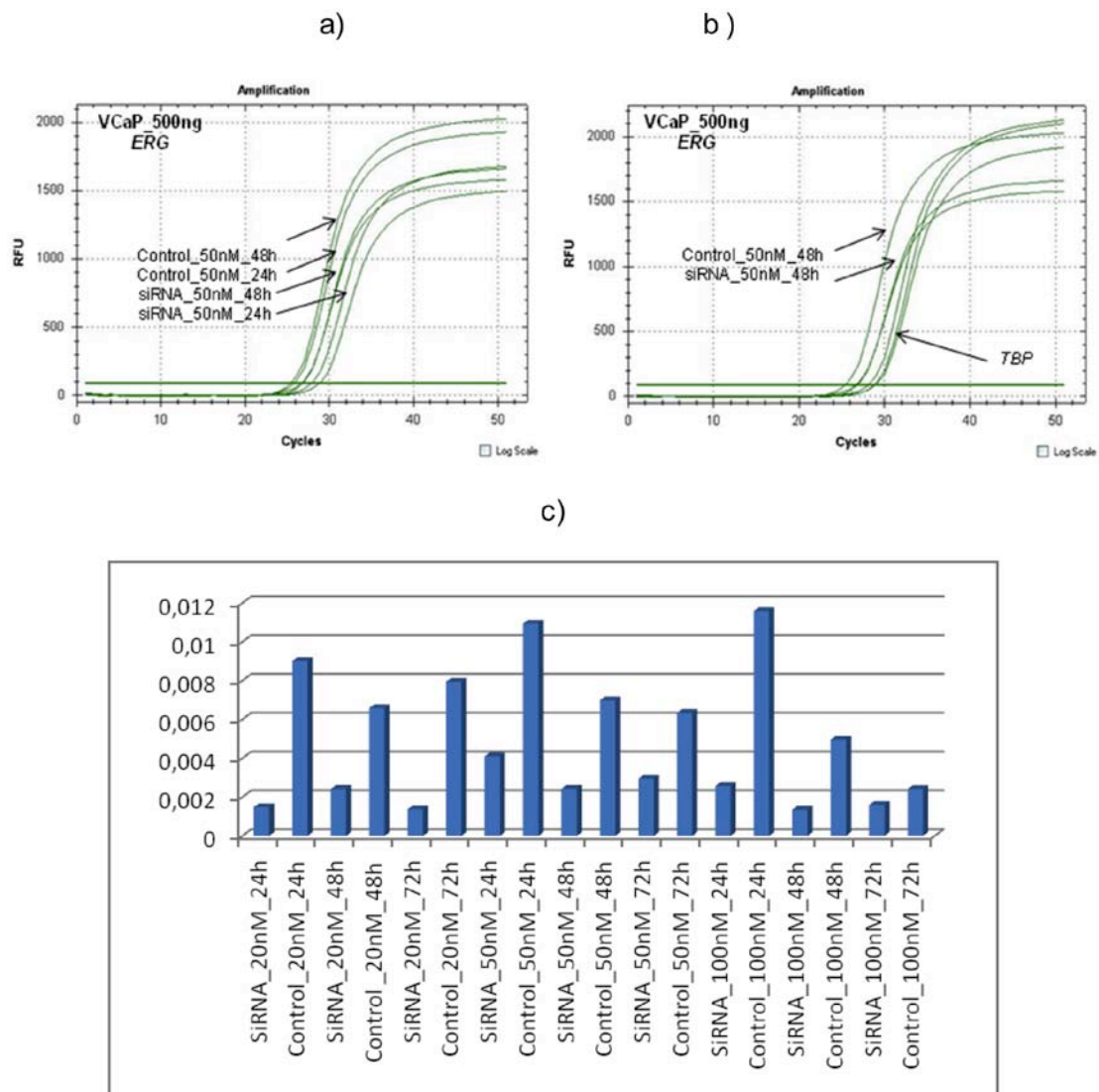
33 pav. *hsa-miR-33b* (a), *hsa-miR-886-3p* (b), *hsa-miR-370* (c) ir *hsa-miR-206* (d) mikroRNR raiška *TMPRSS2:ERG* teigiamuose ir neigiamuose mėginiuose; Y ašyje a, b ir c – standartinės kreivės metodu normalizuoti duomenys, o d – $2^{\Delta ct}$ metodu; „F+“ – mėginyje *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptinkamas, o „F-“ – neaptinkamas

Atlikus pasirinktų penkių mikroRNR raiškos ryšio su klinikiniais ir mūsų tirtais molekuliniais vėžio žymenų rodikliais rezultatų statistinę analizę, gauta keletas patikimų koreliacijų: *hsa-miR-149* mikroRNR raiška koreliavo su naviko stadija ($p = 0,05$; $r_s = -0,19$), *ERG* geno raiška ($p = 0,023$; $r_s = 0,21$) ir naviko buvimu ($p = 0,027$; $r_s = -0,22$); *hsa-miR-33b* mikroRNR raiška koreliavo su telomerazės raiška ($p = 0,041$; $r_s = -0,22$); *hsa-miR-886-3p*

mikroRNR raiška koreliavo su diferenciacija pagal *Gleason* skalę ($p = 0,041$; $r_s = -0,20$), PL svoriu ($p = 0,023$; $r_s = 0,22$) ir naviko tūriu ($p = 0,0008$; $r_s = -0,28$); *hsa-miR-370* mikroRNR raiška koreliavo su diferenciacija pagal *Gleason* skalę ($p = 0,043$; $r_s = -0,19$) ir PL svoriu ($p = 0,036$; $r_s = 0,25$), o *hsa-miR-206* mikroRNR raiška nekoreliavo su jokiais klinikiniais rodikliais ir molekulinę žymenų raiška. Nenustatyta koreliacijos tarp analizuotų mikroRNR raiškos ir ligos atsinaujinimo.

2.2. *ERG* geno raiškos nutildymas VCaP ląstelių linijoje

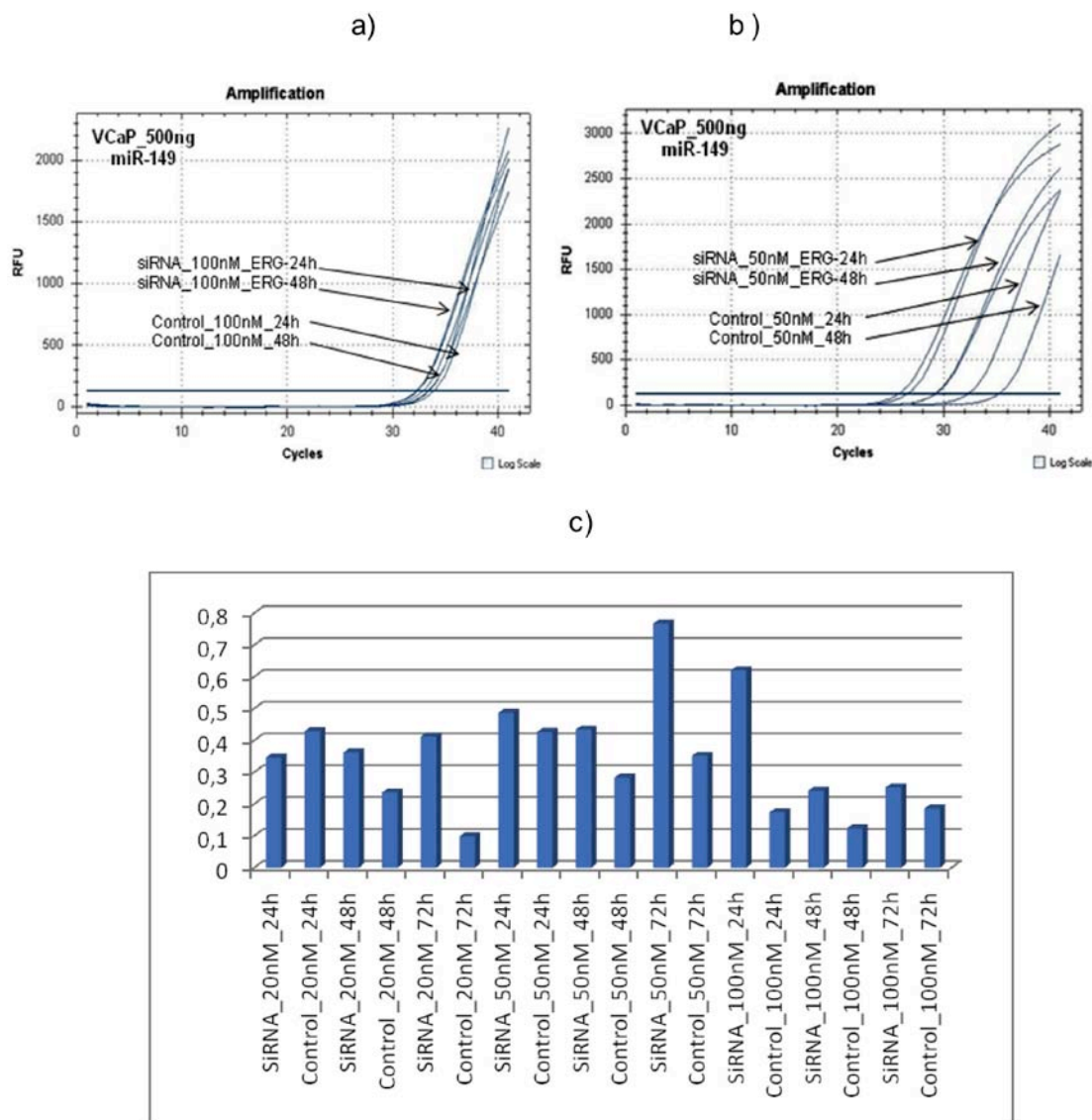
Norint išsiaiškinti, ar *hsa-miR-149* mikroRNR raiška priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo ląstelėse, siRNR mišiniu atlikta VCaP ląstelių linijos transfekcija, kurios metu nutildoma arba sumažinama *ERG* geno raiška VCaP linijos ląstelėse. Remiantis Suomijos kolegų patirtimi, VCaP ląstelių transfekcijai pasirinktas abiejų siRNR mišinys. Atlikus kPGR tyrimą, iš gautų linijinių kreivių padarytos šios išvados: 20 nM koncentracija nėra tinkama tolesniems eksperimentams, nes kPGR metodu gauti duomenys išsibarsto; 50 nM koncentracija yra tinkama tolesniems eksperimentams, duomenys nesibarsto, gerai matyti *ERG* geno raiškos sumažėjimas; 100 nM – duomenys šiek tiek barstosi, taip pat matyti *ERG* geno raiškos sumažėjimas (**34 pav., a**). Įvertinus tyrimo rezultatus, visais atvejais *ERG* geno raiška buvo slopinama (**34 pav., c**). Atrinkta tinkamiausia siRNR mišinio koncentracija – 50 nM, o *ERG* geno raiškos analizei suminė RNR turi būti surenkama praėjus 48 arba 72 valandoms po VCaP ląstelių transfekcijos siRNR mišiniu.



34 pav. *ERG* geno raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančių siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse, praėjus 24 ir 48 valandoms po transfekcijos (a); *ERG* geno raiškos palyginimas su *TBP* geno raiška 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančių siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse (b); *ERG* geno raiškos palyginimas kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančių siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse (c), Y ašyje atidėti normalizuoti duomenys

2.3. Pasirinktų mikroRNR raiškos nustatymas transfekuotose VCaP ląstelėse

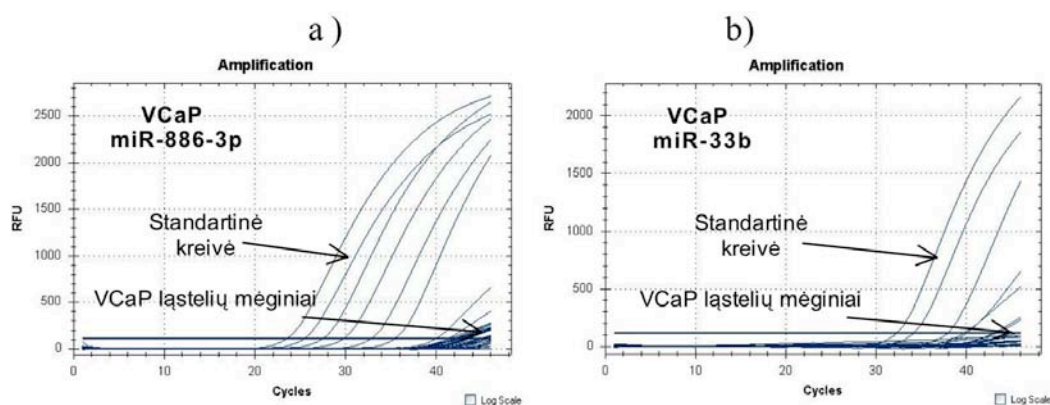
Aptikus sumažėjusią *ERG* geno raišką transfekuotose VCaP ląstelėse, atlikta *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos pokyčio analizė. Iš išskirtos suminės RNR susintetinta *hsa-miR-149* mikroRNR kDNR ir tirta kPGR metodu (žr. sk. II 6.3). Rezultatams įvertinti naudotas standartinės kreivės metodas. Visais atvejais, nuslopinus *ERG* geno raišką, gauta padidėjusi *hsa-miR-149* mikroRNR raiška (**35 pav., c**). Remiantis kPGR metodu gautomis kreivėmis ir normalizuotais duomenimis, padaryta išvada, kad labiausiai *hsa-miR-149* mikroRNR raiška padidėja praėjus 48 ir 72 valandoms po VCaP ląstelių transfekcijos, o geriausia *ERG* geną slopinančio siRNR mišinio koncentracija yra 50 nM. Esant 20 nM koncentracijai reikšmingų skirtumų nematoma, o esant 100 nM koncentracijai sumažėja mikroRNR raiška.



35 pav. *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 20 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse praėjus, 24 ir 48 valandoms po transfekcijos (a); *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse, praėjus 24 ir 48 valandoms po transfekcijos (b); *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas su kontrolinių mėginių *hsa-miR-149* mikroRNR raiška (c), kur Y ašyje atidėti normalizuoti duomenys

Aptikus padidėjusią *hsa-miR-149* mikroRNR raišką transfekuotose VCaP ląstelėse, nuspręsta patyrinėti anksčiau pasirinktų mikroRNR raiškos

pokyčius VCaP siRNR mišiniu transfekuotose ląstelėse. Iš išskirtos suminės RNR susintetinta *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-370* mikroRNR kDNR ir atliktas kPGR tyrimas (žr. sk. II 6.3). *hsa-miR-206* mikroRNR netirta remiantis anksčiau atliktais tyrimais, nes PL mėginiuose mikroRNR raiška buvo labai maža. Tyrimo metu gautos linijinės kreivės parodė, kad VCaP ląstelių linija nėra tinkama *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-370* mikroRNR raiškos pokyčių analizei atlikti, nes analizuojamų mėginių kreivės nepateko į standartinės kreivės ribas (**36 pav.**).

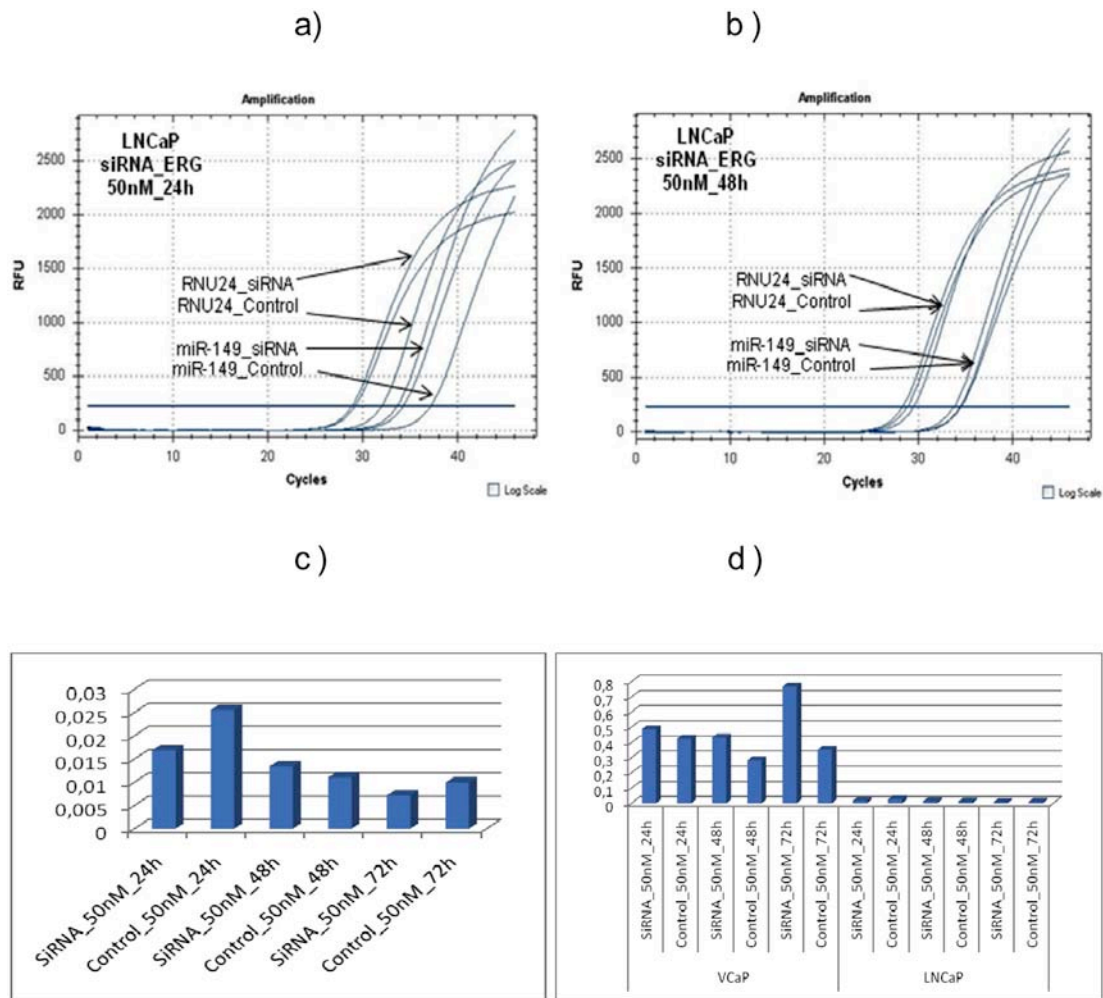


36 pav. *hsa-miR-886-3p* mikroRNR (a) ir *hsa-miR-33b* mikroRNR (b) raiška kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ląstelėse

2.4. *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos nustatymas transfekuotoje LNCaP ląstelių linijoje

Siekiant įsitikinti, kad *hsa-miR-149* mikroRNR raiška priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo ląstelėse, atliktas šios mikroRNR raiškos tyrimas su LNCaP ląstelių linija, kurioje nėra *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto. *ERG* geno raiškos pokyčio šiose ląstelėse netyrėme, nes jose neaptinkama *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto. Analizuojant kPGR metodu gautas kreives, padaryta išvada, kad 24 valandų transfekcija siRNR

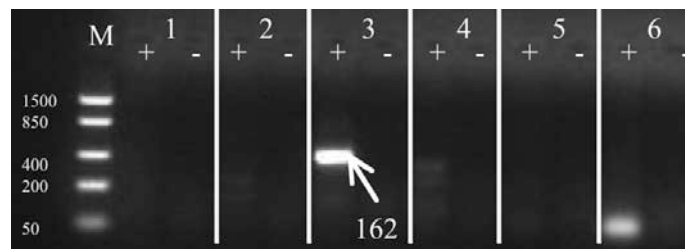
mišiniu nėra tinkama mikroRNR raiškos analizei, nes duomenys barstosi, o praėjus 48 ir 72 valandoms duomenų barstymosi nėra stebima. Kontrolinė siRNR ir *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose LNCaP ląstelėse gautos kreivės sutampa (**37 pav., b**). Atlikus *hsa-miR-149* mikroRNR duomenų normalizavimą ir gautus normalizuotus rezultatus sukėlus į grafiką, akivaizdaus *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos skirtumo nepastebėta (**37 pav., c**). *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas VCaP ir LNCaP ląstelėse pateikta 37 paveiksle (d).



37 pav. *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose LNCaP ląstelėse, praėjus 24 valandoms po transfekcijos (a); *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose LNCaP ląstelėse, praėjus 48 valandoms po transfekcijos (b); *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose LNCaP ląstelėse (c); *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos palyginimas 50 nM kontroline siRNR bei *ERG* geno raišką nutildančiu siRNR mišiniu transfekuotose VCaP ir LNCaP ląstelėse (d); (c) ir (d) Y ašyse atidėti normalizuoti duomenys

3. XMRV viruso sekų paieška priešinės liaukos mėginiuose

XMRV viruso sekų paieška atlikta Fermentas Thermo Scientific mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre. AT-PGR metodu (žr. sk. II 7.1) išanalizuoti 185 PL mėginiai (144 navikiniai, 20 daugiažidinių navikų ir 21 nenavikinis). Šios tiriamosios grupės klinikiniai rodikliai ir pacientų amžius pateikti metodinės dalies 1 skyriaus 1 lentelėje. Kelių PL mėginių, kuriuose atliktas XMRV viruso sekų paieškos tyrimas elektroforegrama pateikiama 38 paveiksle.

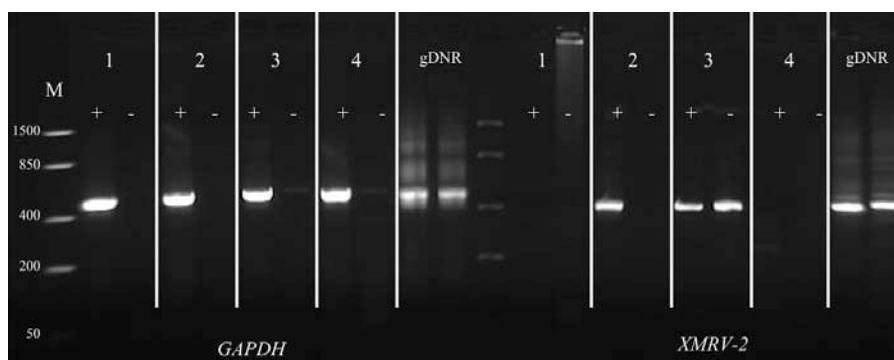


38 pav. Elektroforegrama XMRV viruso *gag* geno transkriptų, kurie gauti AT-PGR metodu: 1–6 – priešinės liaukos mėginiai; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

Norint įsitikinti, kad AT-PGR metodu gauti fragmentai yra nuo XMRV viruso sintetinės mRNR, fragmentai klonuoti į pTZ57 plazmidę (žr. sk. II 7.1). Atlikta išskirtų plazmidžių sekoskaita. Plazmidžių sekoskaitą atliko „Fermentas Thermo Scientific“ darbuotoja A. Rukšėnaitė. Gautos sekos palygintos su GeneBank EF185282.1 seka. Rastos devynios XMRV virusą atitinkančios sekos iš 185 PL mėginių, tai sudaro 4,9 %. Nusekvenuotos sekos palygintos tarpusavyje naudojant internetinę programą ClustalW2 (priedu **42 pav.**). Devynios XMRV *gag* sekos yra įkeltos į GeneBank duomenų bazę:

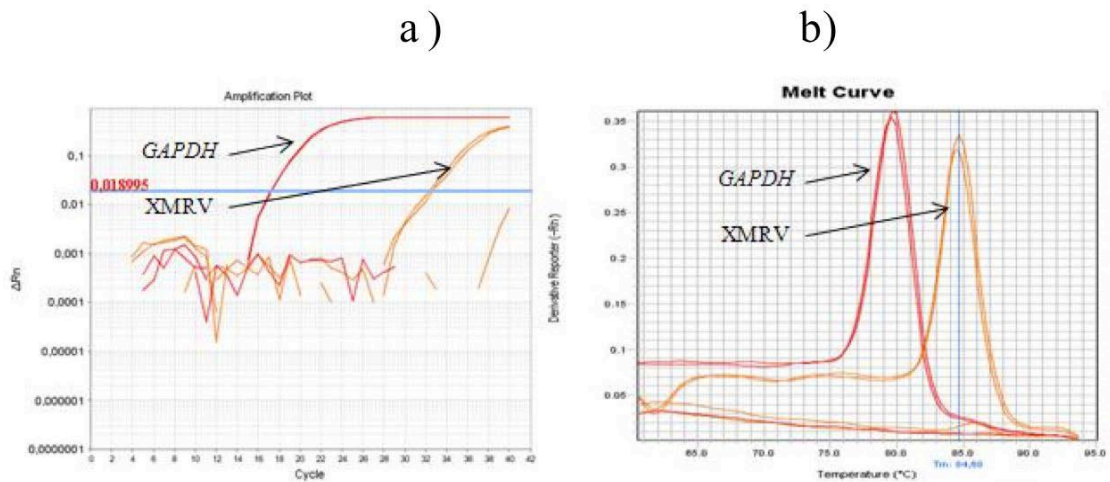
FR837936.1, FR837937.1, FR837938.1, R837939.1, FR837940.1, FR837941.1, FR837942.1, FR837943.1, FR837944.1.

A. Urisman ir kiti mokslininkai 2006 metų straipsnyje XMRV viruso sekoms aptikti PL mėginiuose naudojo lizdinę PGR. Nuspręsta atlikti tokį patį eksperimentą su mėginiais, kuriuose aptikome XMRV *gag* geno transkriptą (162 ir 183 mėginys), bei keliais kontroliniais mėginiais, kuriuose XMRV *gag* geno transkripto neaptikome (50 ir 168 mėginys) (**39 pav.**). Eksperimentui naudoti pradmenys pateikti priedų 11 lentelėje, o lizdinės PGR kokybės kontrolei įvertinti naudoti pastovios raiškos geno *GAPDH* pradmenys. Lizdinės PGR metodu gauti rezultatai atitiko tai, ką gavome ankstesnio tyrimo metu: jei AT-PGR metodu aptikome XMRV *gag* geno transkriptą, jis aptiktas ir lizdiniu PGR metodu.



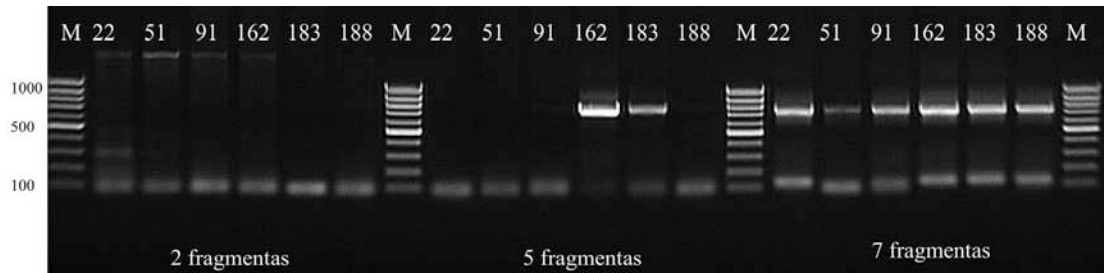
39 pav. Lizdinės PGR reakcijos, atliktos su *GAPDH* ir XMRV *gag* pradmenimis ir priešinės liaukos mėginių kDNR, elektroforegrama: 2 ir 3 – atitinkamai 162 ir 183 mėginiai su XMRV virusu, o 1 ir 4 – atitinkamai 50 ir 168 mėginiai be XMRV viruso; „+“ – mėginio RNR, veikta atvirkštine transkriptaze; „-“ – mėginio RNR, neveikta atvirkštine transkriptaze; gDNR – genomine DNR; M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

AT-PGR metodu atrinkus PL mėginius, kuriuose aptiktas XMRV viruso *gag* geno transkriptas, kPGR metodu šešiuose mėginiuose patikrinta XMRV *gag* transkripto raiška (**40 pav.**). Ištirtų PL mėginių gautos ΔCt reikšmės buvo nuo 13,64 iki 19,96. kPGR rezultatai leido numatyti, kurį mėginį bus lengviausia pagausinti PGR metodu ir nustatyti visą viruso geno seką. Stipriausia XMRV viruso *gag* geno raiška nustatyta 162 ir 183 mėginiuose.



40 pav. Priešinės liaukos mėginio analizė kiekybiniu PGR metodu, naudojant StepOnePlus aparatai: (a) logaritminės ir (b) disociacinės kreivės

GeneBank duomenų bazėje tyrimo atlikimo metu nebuvo gausu pilnai nusekvenotų gamaretrovirusų genominių sekų, todėl buvo nuspręsta atlikti bent vieno XMRV teigiamo mėginio visą viruso geno sekoskaitą. Iš šešių PL mėginių (22, 51, 91, 162, 183 ir 188) išskirta genomine DNR (žr. sk. II 7.2). Nuo XMRV viruso geno pradžios kas 600 bp arba 700 bp, remiantis GeneBank EF185282.1 seka, sukurti tarpusavyje susiklojantys pradmenys, visam XMRV viruso genomui klonuoti. Iš viso sukurta 14 susiklojančių pradmenų porų (priedų 12 lentelė), kurios panaudotos viruso geno sekoms pagausinti (žr. sk. II 7.2) (**41 pav.**).



41 pav. PGR metodu gautų XMRV viruso genominių sekų elektroforeograma: M – DNR molekulinio svorio standartų mišinys GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas Thermo Scientific)

Atliekant XMRV viruso genomo pagausinimą, iš karto nepavyko pagausinti antrojo fragmento. Remiantis AT-PGR metodu gautos nukleotidinės sekos dalimi (162 mėginio *gag* transkripto), sukurti nauji susiklojantys pradmenys antrajam XMRV viruso genomo fragmento pagausinimui – X02as5 ir X02bs3 (priedų 12 lentelė). Panaudojus naujus pradmenis, pavyko pagausinti ir iki galo sekvenuoti vieną XMRV viruso genomą – 162 mėginį. Šio viruso seka yra įkelta į GeneBank duomenų bazę – FR872816.1. Atlikus statistinę duomenų analizę nustatyta, kad nebuvo statistiškai patikimo ryšio tarp XMRV viruso sekų aptikimo PL mėginiuose ir klinikinių rodiklių, pacientų amžiaus ir mūsų tirtų molekulinį vėžio žymenų.

IV. REZULTATŲ APITARIMAS

1. *TMPRSS2:ERG*, *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* genų raiškos reikšmė priešinės liaukos vėžio vystymuisi

Disertacijoje mes iškėlėme hipotezę, kad *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas PL mėginiuose yra pirminės kilmės, gali veikti kaip transkripcijos veiksnys ir jo buvimas ląstelėje gali turėti įtakos kitų genų raiškai. *TMPRSS2* ir *ERG* genų susilieėjimas dažniausiai įvyksta dėl 3 Mbp delecijos tarp šių genų arba dėl subalansuotos ar nesubalansuotos chromosominės translokacijos. Tyrimo metu PL (navikiniuose ir nenavikiniuose) mėginiuose *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptiktas 106 mėginiuose (56,1 %), o 83 mėginiuose (43,9 %) jo neaptikta. Gautas sulietinio transkripto dažnis panašus į J. Wang ir kitų mokslininkų 2006 metais atliktame tyrime gautą dažnį (59 %), nors kitose publikacijose aprašytas *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto dažnis kinta nuo 15 % iki 78 % (Saramäki ir kt., 2008). Manoma, kad tai priklauso nuo mėginių surinkimo ir sulietiniams transkriptams aptikti pasirinktų metodų įvairovės: FISH, AT-PGR ir kPGR (Saramäki ir kt., 2008). F. Demichelis ir kitų mokslininkų 2007 metais atlikto tyrimo duomenimis, kPGR metodas yra daug jautresnis nei FISH. Pastaruoju metodu gali būti gaunami klaidingai teigiami rezultatai: dėl netinkamo chromosomų išsidėstymo metafazinėje plokštelėje arba netinkamo matomo vaizdo interpretacijos. F. Demichelis ir kiti mokslininkai teigia, kad *TMPRSS2:ERG* sulietiniams transkriptams aptikti būtina naudoti du metodus: FISH ir kPGR arba FISH ir AT-PGR (Demichelis ir kt., 2007). Mes pasirinkome jautrius *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų aptikimo metodus: AT-PGR ir kPGR, ir gavome *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto variantus: T1/E4 (100 bp), T1/E1 (300 bp), T1/E4 ir T2/E4 (100 bp ir 200 bp), kurie patikrinti sekoskaitos metodu. T1/E4 transkriptas gautas susiliejus *TMPRSS2* geno pirmajam egzonui su *ERG* geno ketvirtuoju egzonu, T2/E4 – *TMPRSS2* geno antrajam egzonui su *ERG* geno ketvirtuoju egzonu, T1/E1 – *TMPRSS2* geno pirmajam egzonui su *ERG* geno pirmuoju egzonu. J. Clark kartu su kitais mokslininkais parodė, kad keli sulietiniai transkriptai

gali koegzistuoti kartu toje pačioje ląstelėje. Šie variantai (izoformas) ląstelėje atsiranda dėl alternatyvaus splaisingo, esant tam pačiam egzono susiliejimui (Clark ir kt., 2007), taip gaunami T1/E4 ir T2/E4 sulietiniai transkriptai tame pačiame PL mėginyje. Mūsų aptikta transkriptų įvairovė atitinka moksliniuose straipsniuose nurodytą sulietinių transkriptų įvairovę. Dažniausiai sulietiniai transkriptai atsiranda dėl *TMPRSS2* geno pirmojo egzono susiliejimo su *ERG* geno ketvirtuoju egzonu (T1/E4) (Miyagi ir kt., 2010), tokia izoforma yra dominuojanti PL mėginiuose – 85–95 % (Rostad ir kt., 2009). Mūsų ištirtoje PL mėginių imtyje taip pat dominavo T1/E4 sulietinis transkriptas. Jis sudarė net 84,9 % (90/106) iširtųjų *TMPRSS2:ERG* teigiamų mėginių. Pavienis T1/E4 aptiktas 64,2 % (68/106) *TMPRSS2:ERG* teigiamuose mėginiuose, o T1/E4 kartu su T2/E4 – 20,8 % (22/106) mėginių.

Mėginiuose, kuriuose per ankstesnius (AT-PGR) tyrimus neaptikome *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto, atlikome *TMPRSS2:ETVI* sulietinio transkripto paiešką. Translokacijos aptikti nepavyko. Panašius rezultatus gauna dauguma tyrėjų. *TMPRSS2:ETVI* sulietinio transkripto raiška PL mėginiuose dažniausiai aptinkama pritaikius naujausią – mikrogardelių tyrimo metodą, o ne AT-PGR. Tiriant šiuo metodu, padidėjusi *ETVI* geno raiška nustatyta nuo 6 % iki 16 % navikinių mėginių (Tomlins ir kt., 2007). Iš mokslinių publikacijų žinoma, kad *TMPRSS2:ETVI* susiliejimo dažnis sudaro tik 1–2 % visų iširtų navikinių PL mėginių, nors daugiau kaip 10 % navikinių mėginių aptinkama padidėjusi *ETVI* geno raiška. Tai leidžia daryti prielaidą, kad egzistuoja alternatyvus *ETVI* geno susiliejimo partneris, o ne vien *TMPRSS2* genas (Clark ir kt., 2009). *ETVI* raiškos analizės tyrimas nebuvo įtrauktas į tyrimų planą, todėl sunku pasakyti, kokią dalį padidėjusi *ETVI* geno raiška sudaro Lietuvos vyrų populiacijoje.

Tarp navikinių PL mėginių pasitaikė keletas nenavikinio audinio mėginių. Tokiuose mėginiuose *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas aptiktas 19 %, (4/21) iširtųjų mėginių, o jo neaptikta 81 % (17/21) mėginių. Kaip ir PL navikinio audinio mėginiuose, šiuose mėginiuose dominavo T1/E4 sulietinio

transkripto izoforma. Pavienis T1/E4 sulietinis transkriptas aptiktas dviejuose mėginiuose, o kituose dviejuose mėginiuose – T1/E4 kartu su T2/E4 sulietiniu transkriptu. Sulietinių transkriptų aptikimas mėginiuose, kuriuose patologas pirminės apžiūros metu naviko neaptiko, gali rodyti, kad genų susiliejimas įvyksta ankstyvoje vėžio vystymosi stadijoje. Ir tai gali būti viena iš priežasčių PL vėžiui atsirasti. Šiuose mėginiuose buvo tiriama ir kokybinė *TERT* bei *ZAC* genų raiška: *TERT* geno raiška nevyko, o *ZAC* – buvo normali. Panašūs rezultatai gauti atlikus ir kPGR, todėl galime teigti, kad nenavikiniuose PL mėginiuose *TERT* geno raiška nevyksta, o *ZAC* geno yra normali.

Iš mokslinės literatūros žinoma, kad PL navikuose telomerazės baltymo aktyvumas aptinkamas nuo 47 % iki 92 % ištirtų mėginių (Athanassiadou ir kt., 2003). Daugumoje navikų aptinkamas telomerazės baltymo aktyvumas yra siejamas su blogesne ligos prognoze (Latil ir kt., 2000; Liu ir kt., 2001; Kamradt ir kt., 2003; A. K. Meeker 2006). Atliekant telomerazės raiškos tyrimus, analizuota *TR* ir *TERT* genų raiška. Žinoma, kad *TR* geno raiška aptinkama daugumoje ląstelių, bet *TERT* geno raiškos jose nerandama ir tokiose ląstelėse nesusidaro aktyvi telomerazė (Kamradt ir kt., 2003; Meeker 2006). Beveik visuose tirtuose mėginiuose aptikta *TR* geno raiška, o *TERT* transkriptas – 45 % (76/170) ištirtų mėginių. Šiuo metu nėra mokslinių publikacijų, kuriose būtų aprašyti PL mėginių *TERT* geno raiškos tyrimai kPGR metodu ir palyginti su mėginiais, kuriuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, kuris, remiantis moksline literatūra (Wang ir kt., 2006; Demichelis ir kt., 2007; Nam ir kt., 2007), gali lemti blogesnę ligos eigą. Šių žymenų aptikimas mėginyje užtikrina greitesnę ligos atsinaujinimą. Mūsų atlikti tyrimai pateikia kokybiškai naujus duomenis apie molekulinis PL vėžio patogenezės mechanizmus.

B. Laxman ir kiti mokslininkai 2006 metais vieni pirmųjų pradėjo ieškoti naujo perspektyvaus minimalios invazijos molekulinio žymens – *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto PL vėžiu sergančių pacientų šlapimo nuosėdose. Jie įrodė, kad esant dideliame transkriptų kiekiui šlapime gaunamas

teigiamas FISH rezultatas ir audinių mėginiuose, o jų nesant – neigiamas (Laxman ir kt., 2006). P. N. Nguyen ir kiti mokslininkai, 2010 metais tyrė šlapimo nuosėdas, jose aptikto įvairaus tipo sulietinių transkriptų variantų. Mūsų atliktame tyrime sulietiniai transkriptai, aptikti šlapimo nuosėdose, atitiko PL mėginiuose rastus sulietinių transkriptų variantus. Šlapimo nuosėdose genų susilieėjimas aptiktas 16,4 % (10/61), o neaptiktas 83,6 % (51/61) ištirtų mėginių. Kaip ir navikinio PL audinio mėginiuose, šlapimo nuosėdose dominavo T1/E4 sulietinis transkriptas, kuris sudarė 91 % (10/11) visų teigiamų mėginių. D. Hessels ir kitų mokslininkų 2007 metais atliktų tyrimų duomenimis, T1/E4 sulietinis transkriptas sudaro daugiau nei 80 % visų teigiamų mėginių šlapimo nuosėdose. Kaip ir B. Laxman (2006) bei K. R. Rice (2010), mes šlapimo nuosėdose sulietinių transkriptų aptikome gerokai mažiau negu PL mėginiuose. Nedidelį sulietinių transkriptų kiekį galėjo lemti šlapimo rinkimo metodas (be PL masažo) ir per ilgas laiko tarpas nuo šlapimo paėmimo iki šlapimo nuosėdų paruošimo. Remdamiesi atliktais eksperimentais ir mokslinės literatūros analize galime teigti, kad šlapimo nuosėdų tyrimas galėtų būti naudojamas kaip vienas iš minimalios invazijos metodų sulietiniams transkriptams aptikti.

Morfologiškai ir genetiškai įrodyta, kad PL vėžys yra daugiažidininės kilmės. R. Mehra ir kiti mokslininkai (2007b) pirmieji parodė, kad *TMPRSS2* ir *ERG* genų susilieėjimas PL mėginiuose gali būti heterogeniškas. Skirtingų naviko židinių heterogeniškumas yra aptinkamas nuo 41 % iki 67 % ištirtųjų naviko mėginių. Heterogeniškumas apibūdinamas ne tik sulietinio transkripto buvimu ar jo nebuvimu, izoformos įvairove, bet ir susilieėjimo mechanizmo tipu (Tomlins ir kt., 2009; Miyagi ir kt., 2010). Mūsų tirtuose daugiažidininė navikų mėginiuose T1/E4 sulietinis transkriptas aptiktas 85 % (17/20) ištirtų mėginių. Pavienė T1/E4 sulietinio transkripto izoforma aptikta 55 % (11/20) mėginių, o kartu su T2/E4 sulietiniu transkriptu – 30 % (6/20). Sulietinis transkriptas neaptiktas tik 10 % (2/20) PL mėginių. Tik dviejuose tarpusavyje lyginamuose mėginiuose, kurie paimti iš vieno paciento, rasta ta pati sulietinio

transkripto izoforma, o keturiuose mėginiuose kPGR metodu gauta tokia pati sulietinio transkripto raiška. Kokybinis *TERT* geno raiškos sutapimas aptiktas tik viename mėginyje. Daugiažidiniuose PL navikuose diferenciacijos pagal *Gleason* skalę nesutapimas aptiktas tik dviejuose iš dešimties tarpusavyje palygintų mėginių, o tai sudaro 20 % ištirtųjų mėginių. Iš mokslinės literatūros yra žinoma (Arora ir kt., 2004; Mehra ir kt., 2007a), kad diferenciacijos pagal *Gleason* skalę nesutapimas skirtinguose navikuose, paimtuose iš tos pačios PL, aptinkamas gerokai dažniau. Tokių rezultatų skirtumą galėjo lemti maža tirtoji grupė. Dėl mažos imties statistinių skaičiavimų šiame tyrime neatlikome. Iš mokslinės literatūros yra žinoma, kad naviko stadija, diferenciacija pagal *Gleason* skalę daugiažidiniuose navikuose nekoreliuoja su *TMPRSS2* geno pakitimais (Mehra ir kt., 2007a). Tik vienu mūsų tirtu daugiažidininio PL vėžio atveju nustatytas ligos atsinaujinimas. Vienas iš porinių šio PL vėžio mėginių buvo teigiamas *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* raiškai, antrame nustatyta silpna sulietinio transkripto raiška ir neaptikta *TERT* geno raiškos. Mes manome, kad sulietinių transkriptų susidarymas yra pirminės kilmės reiškinys, o jų įvairovė bei *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* raiškos nesutapimas tik dar kartą įrodo, kad PL navikas yra daugiažidininės heterogeniškos kilmės.

S. A. Tomlins ir kiti mokslininkai (2008a ir 2008b) parodė, kad net iki 90 % PL naviko mėginių aptinkama padidėjusi *ERG* geno raiška, o mėginiuose, kuriuose *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto raiškos nėra, aptinkama padidėjusi *SPINK1* geno raiška. S. A. Tomlins ir kiti mokslininkai (2008b) teigia, kad molekuliniai pokyčiai ar pažeidimai, kurie kol kas nėra žinomi, lemia *ETS* neigiamų PL navikų atsiradimą, kurie ir sukelia padidėjusią *SPINK1* geno raišką. Mūsų gauti rezultatai atitiko mokslinėse publikacijose paskelbtus rezultatus: esant *TMPRSS2:ERG* sulietiniam transkriptui, aptinkama padidėjusi *ERG* ir sumažėjusi *SPINK1* geno raiška, o nesant *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto – sumažėjusi *ERG* ir padidėjusi *SPINK1* geno raiška.

Sumažėjusi *GSTP1* geno raiška PL vėžiniuose mėginiuose yra vienas iš dažniausių molekulinų pokyčių, kurių sukelia geno promotoriaus

hipermetilinimas (Tomlins ir kt., 2006). *GSTP1* geno promotoriaus hipermetilinimas aptinkamas net iki 90 % piktybinių PL navikų (Ahmed, 2010), o *RARB* – iki 80 %. G. P. Pfeifer ir kiti mokslininkai 2005 metais parodė, kad vėžiniuose PL mėginiuose *RASSF1* geno promotoriaus hipermetilinimas aptinkamas daugiau kaip 70 % visų tirtų mėginių, tačiau sveikuose audiniuose promotoriaus hipermetilinimas aptinkamas labai retai (van der Weyden ir kt., 2007). Darbo metu norėjome išsiaiškinti, ar šių genų raiškai gali turėti įtakos sulietinio transkripto buvimas PL mėginyje ir ar šių genų raiškos nutildymas įvyksta ankstyvoje vėžio stadijoje. Sumažėjusi *GSTP1* geno raiška aptikta *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose mėginiuose. Sveikuose (nenavikiniuose) PL audinio mėginiuose aptikta normali *GSTP1* ir *RARB* raiška, palyginti su navikiniais mėginiais, todėl galime teigti, kad promotorių (*GSTP1* ir *RARB*) metilinimas ir genų raiškos slopinimas prasideda ankstyvoje PL vėžio stadijoje. Nebuvo gauta pastebimų *RARB* ir *RASSF1* genų raiškos skirtumų tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų mėginių imtyje. Mokslinėje literatūroje daugiausiai pateikiami *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* genų metilinimo, bet ne geno raiškos tyrimų rezultatai. Iš atliktų tyrimų galime teigti, kad *GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1* genų raiškos slopinimas būdingas pT2-pT3 PL vėžio stadijoms.

Įvairiuose navikinio audinio mėginiuose *ZAC* genas yra nutildytas hipermetilinimo būdu (Theodoropoulou ir kt., 2010). Žinoma, kad nenavikinėse ląstelėse aptinkama didelė *ZAC* geno raiška. Daugiausia *ZAC* geno tyrimų yra atlikta analizuojant jo metilinimo lygį. Vien iš kokybinės *ZAC* geno raiškos analizės duomenų galime daryti prielaidą, kad navikinio pT2-pT3 PL vėžio mėginiuose *ZAC* genas nėra visiškai nutildomas. Panašus rezultatas gautas atlikus ir kPGR. *TMPRSS2:ERG* teigiamuose mėginiuose aptikta sumažėjusi *ZAC* geno raiška, panašus rezultatas gautas ir *TMPRSS2:ERG* teigiamuose mėginiuose. Iš mokslinės literatūros (Valleley ir kt., 2007) žinoma, kad *ZAC* genas turi du funkcionalius promotorius, nuo kurių sintetunami baltymai pasižymi skirtingomis savybėmis: nuo pirmojo (*ZAC1p*)

promotoriaus gautas baltymas sukelia ląstelės apoptozę, o nuo antrojo (*ZAC2p*) – ląstelės ciklo stabdymą. Mūsų atlikto tyrimo metu aptikta vienoda *ZAC* transkriptų raiška nuo abiejų promotorių, nors buvo rasti keli mėginiai, kuriuose didesnė *ZAC* geno raiška buvo nuo antrojo promotoriaus. Palyginus iširtųjų mėginių Δ ct reikšmes, nustatyta šiek tiek didesnė *ZAC* geno raiška nuo pirmojo promotoriaus. Tokį patį rezultatą, 2007 metais atlikę tyrimą, gavo E. M. Valleley ir bendraautorai.

2. Klinikinių rodiklių, pacientų amžiaus ir iširtųjų molekulinė žymenų tarpusavio sąsajos

TMPRSS2:ERG sulietinių transkriptų raiška siejama su bloga ligos eigos prognoze pacientams, kurių navikuose nustatyta didelė *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų raiška: praėjus penkeriems metams, liga atsinaujina arba pacientai miršta nuo PL vėžio (Wang ir kt., 2006; Nam ir kt., 2007; Clark ir kt., 2009). Remiantis šiuo tyrimu, padaryta prielaida, kad sulietiniai transkriptai yra siejami su agresyvia PL vėžio forma. Mūsų tyrime *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimas PL navike prognozavo ligos atsinaujinimo riziką, bet efektas buvo ribinio statistinio patikimumo ($p = 0,05$). Šiuo metu literatūros duomenys dėl prognozinės *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto vertės yra vis dar prieštaringi: vieni mokslininkai nustato teigiamą koreliaciją tarp *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir PSA lygio prieš operaciją, vėlyvos naviko stadijos, didesnės nei 7 diferenciacijos pagal *Gleason* skalę bei pacientų amžiaus (Rostad ir kt., 2009; Miyagi ir kt., 2010), o kiti mokslininkai teigia, kad teigiama koreliacija nesieja *TMPRSS2:ERG* genų susiliejimo ir diferenciacijos pagal *Gleason* skalę ar naviko stadijos (Magi-Galluzzi ir kt., 2011). Tačiau visi daugiau ar mažiau sutinka, kad sulietinių transkriptų raiška yra susijusi su didesne (8 ir daugiau) diferenciacija pagal *Gleason* skale (Hessels ir kt., 2007; Rostad ir kt., 2009; Miyagi ir kt., 2010). Mes neradome teigiamos koreliacijos tarp *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir

diferenciacijos pagal *Gleason* skalę ($p = 0,683$) ar naviko stadijos ($p = 0,844$), tai galėtų lemti santykinai ankstyva mūsų tirtų PL navikų stadija ir maža diferenciacija pagal *Gleason* skalę. Mūsų tirtoje grupėje dominavo pT2c stadija (100 mėginių), o dominuojanti diferenciacija pagal *Gleason* skalę buvo 6 (100 mėginių). Mūsų atlikto tyrimo metu duomenimis, teigiama koreliacija siejo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimą ir PSA lygį prieš operaciją ($p = 0,007$) ir PL svorį ($p = 0,027$). Tyrimas parodė, kad jei mėginiuose yra dviejų transkriptų – *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* – raiška, liga atsinaujina greičiau ($p = 0,025$). Analogiškas ryšys ($p = 0,022$) aptiktas palyginus mėginius, kuriuose neaptikta nė vieno iš šių dviejų žymenų, su mėginiais, kuriuose aptiktas bent vienas iš jų. Tai pirmas darbas, kuriame parodom dviejų PL vėžio žymenų – *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* – bendra prognozė. Atlikę *Cox* proporcinį pavojų regresijos analizę (angl. *Cox proportional hazards regression*), nustatėme, kad ligos atsinaujinimas priklauso nuo naviko stadijos, diferenciacijos pagal *Gleason* skalę bei iš dalies nuo *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* molekulinė žymenų raiškos PL navike.

Rastas statistiškai patikimas *TERT* geno raiškos skirtumas tarp mėginių, kuriuose aptiktas sulietinis transkriptas, ir tų, kuriuose jo nerasta ($p = 0,041$), todėl galime teigti, kad transkripto buvimas mėginyje turi įtakos *TERT* geno raiškai. Gautas statistiškai patikimas *ERG* ($p < 0,0001$; $r_s = -0,61$) ir *SPINK1* ($p < 0,003$; $r_s = 0,24$) genų raiškos skirtumas tarp *TMPRSS2:ERG* teigiamų ir neigiamų mėginių. Kitų mūsų tirtų genų (*GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* bei *ZAC*) raiškai *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas neturėjo įtakos. Naujausi tyrimai (Yu ir kt., 2010) parodė, kad *ERG* baltymas gali jungtis daugelio genų promotorių srityje. Padidėjusi transkripcijos veiksnio *ERG*, taip pat *TERT* raiška gali aktyvinti kitus transkripciją reguliuojančius elementus, tokius kaip *C-MYC* ar *HDAC1* (Sun ir kt., 2008) ir savo ruožtu – onkogenų raišką ląstelėje.

Atlikę klinikinių rodiklių analizę, gavome statistiškai patikimas ($p < 0,0001$) teigiamas sąsajas tarp pataloginės stadijos ir diferenciacijos pagal

Gleason skalę, naviko tūrio bei priešoperacinio PSA lygio; taip pat tarp diferenciacijos pagal *Gleason* skalę ir priešoperacinio PSA lygio bei naviko tūrio. Šie duomenys atitiko mokslinėje literatūroje (Hessels ir kt., 2007; Rostad ir kt., 2009; Miyagi ir kt., 2010; Magi-Galluzzi ir kt., 2011) paskelbtus rezultatus. Mūsų tirtoje imtyje ligos atsinaujinimas ($p < 0,0001$) priklausė nuo naviko stadijos bei diferenciacijos pagal *Gleason* skalę.

3. MikroRNR raiška priešinės liaukos mėginiuose

K. P. Porkka ir kiti mokslininkai 2007 metais vieni pirmųjų parodė, kad PL navikams yra būdinga specifinė mikroRNR raiška. Šiuo metu mikroRNR raiškos tyrimai yra vieni pagrindinių tyrimų PL audinio mėginiuose (Shi ir kt., 2008; Pang ir kt., 2010; Brase ir kt., 2011; Shi ir kt., 2011). Mūsų atliktas mikroRNR raiškos tyrimas unikalus, nes jo metu vertinome mikroRNR raišką priklausomai nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo ar jo nebuvimo mėginiuose. Tokios mikroRNR raiškos analizės duomenų mokslinėje literatūroje kol kas nepateikta. Buvo atrinktos penkios mikroRNR, kurių raiška sumažėjusi *TMPRSS2:ERG* teigiamuose PL audinio mėginiuose: *hsa-miR-149*, *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370* ir *hsa-miR-206*. Šios mikroRNR nėra gausiai tyrinėtos, todėl trūksta duomenų apie jų raiškos profilį navikiniuose PL audinio mėginiuose. L. Jin ir kiti mokslininkai nustatė, kad *hsa-miR-149** mikroRNR trūkumas stabdo melanomos ląstelių augimą, o žmogaus melanomos metastazinių audinių mėginiuose aptinkama padidėjusi šios mikroRNR raiška. Padidėjusi *hsa-miR-149** mikroRNR raiška sukelia melanomos ląstelių atsparumą apoptozei (Jin ir kt., 2011). *hsa-miR-206* mikroRNR raiška yra sumažėjusi metastaziniuose krūties vėžio audiniuose (O'Day ir kt., 2010). O'Day ir kiti mokslininkai nustatė, kad ši mikroRNR stabdo ląstelės ciklą. Atlikus mikroRNR mikrogardelių tyrimo patikrinimą kPGR metodu biologiniuose mėginiuose, kurie tarpusavyje skyrėsi sulietinio transkripto buvimu ir nebuvimu, gauti statistiškai patikimi *hsa-miR-149*, *hsa-*

miR-33b, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370* ir *hsa-miR-206* mikroRNR raiškos skirtumai (atitinkamai $p < 0,0001$, $p = 0,0048$, $p = 0,0028$, $p = 0,0373$ ir $p = 0,0432$). Atlikus pasirinktų mikroRNR raiškos ir klinikinių rodiklių bei pacientų amžiaus sąsajų statistinę analizę, paaiškėjo, kad svarbi yra ne tik *hsa-miR-149* mikroRNR, bet ir *hsa-miR-886-3p* mikroRNR. Gauti statistiškai patikimos *hsa-miR-886-3p* mikroRNR raiškos sąsajos su naviko tūriu ($p = 0,0008$), PL svoriu ($p = 0,023$) ir diferenciacija pagal *Gleason* skalę ($p = 0,041$). Siekiant įrodyti, kad *hsa-miR-886-3p* mikroRNR yra svarbi PL vėžiui atsirasti, reikėtų atlikti papildomus tyrimus.

Aptikę statistiškai patikimus *hsa-miR-149* mikroRNR skirtumus biologiniuose mėginiuose, mes iškėlėme hipotezę, kad *hsa-miR-149* mikroRNR raiška priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo ląstelėje. Hipotezei pagrįsti atlikome tyrimą naudodami PL VCaP ląstelių liniją: VCaP ląstelėse siRNR mišiniu slopinant *TMPRSS2:ERG* raišką, gauta sumažėjusi *ERG* geno raiška ir nustatytas *hsa-miR-149* mikroRNR raiškos padidėjimas. Galime manyti, kad *hsa-miR-149* mikroRNR raiška priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo navikiniam PL audinio mėginyje.

4. XMRV viruso sekų sąsaja su priešinės liaukos vėžio išsivystymu

2006 metais buvo gauti pirmieji įrodymai, kad gamaretrovirusas gali infekuoti žmogų (Urisman ir kt., 2006). 2009 metais pasirodė straipsnių, kuriuose gamaretrovirusas yra minimas kaip vienas iš galimų PL vėžio sukėlėjų (Silverman ir kt., 2010; Menendez-Arias, 2011; Sfanos ir kt., 2012). Mūsų atlikto tyrimo metu XMRV virusinės sekos aptiktos 4,9 % (9/185) ištirtųjų mėginių, tai atitinka pasaulines tendencijas (Urisman ir kt., 2006; Robinson ir kt., 2010). Atlikę statistinę analizę neaptikome jokių patikimų sąsajų tarp viruso sekų buvimo ir klinikinių rodiklių, pacientų amžiaus ar mūsų tirtų molekulinų žymenų, nors kiti autoriai ir sieja viruso (jo sekų) aptikimą

PL navikuose su didesne diferenciacija pagal *Gleason* skalę (Robinson ir kt., 2010), o XMRV viruso aptikimo dažnį – su didesniu pacientų amžiumi (Stoye ir kt., 2010). XMRV viruso sąsajos su žmogaus ligomis (PL vėžiu ir lėtinio nuovargio sindromu) sukėlė didelį mokslininkų susidomėjimą. Nors ir buvo naudojami jautrūs tyrimo metodai, tyrimų rezultatai buvo prieštaringi. T. Paprotka ir kiti mokslininkai (2011) parodė, kad XMRV virusas susidarė rekombinacijos metu iš dviejų pelių endogeninių provirusų (PreXMRV-1 ir PreXMRV-2). Virionas, turintis PreXMRV-1 ir PreXMRV-2 genomus, infekavo žmogaus ląsteles, esančias ksenografte pelės organizme. Iš šio ksenografto vėliau gauta ląstelių linija CWR22Rv1 yra plačiai naudojama tyrimams, todėl XMRV virusas kaip laboratorinė tarša galėjo išplisti po daugelį laboratorijų (Paprotka ir kt., 2011). K. S. Sfanos ir kiti mokslininkai (2012) apibendrinami visus XMRV viruso tyrimus teigia, kad XMRV virusas yra laboratorinės kilmės ir susiformavo rekombinacijos metu. Klinikiniuose mėginiuose jis atsiranda dėl užterštumo pelės genomine DNR, plazmidine DNR arba PL ląstelių linijų DNR, pavyzdžiui, CWR22Rv1, auginimo metu. Mums pavyko pilnai pagausinti ir sekvenuoti vieną XMRV viruso genomą, išskirtą iš 162-ojo PL mėginio, kurio seka įkelta į GeneBank duomenų bazę (FR872816.1). Naudojant RIP 3.0 programą (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>) nustatyta, kad ši seka užima tarpinę padėtį tarp PreXMRV-1 ir PreXMRV-2 pelių endogeninių virusų sekų. Ištyrus mūsų naudotus reagentus (kDNR sintezei ir AT-PGR reakcijai), taršos nenustatyta, todėl galimas taršos šaltinis liko nenustatytas. Mūsų ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai įrodo, kad XMRV virusas nėra susijęs su PL vėžio išsivystymu ir gali būti traktuojamas kaip laboratorinės taršos šaltinis.

APIBENDRINIMAS

Priešinės liaukos vėžio vystymasis vis dar prognozuojamas remiantis įprastine klinikinių žymenų sistema (PSA), o gydymui tik pavieniais atvejais skiriami vaistai, kurie specifiskai veikia ligą sukėlusį genetinį pakitimą. Mes bandėme kuo išsamiau atlikti PL mėginių molekulinę analizę: ištirti *TMPRSS2:ERG*, *TERT*, *ERG*, *SPINK1*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* genų raišką, aptikti pakitusią mikroRNR raišką PL mėginiuose, kurie tarpusavyje skyrėsi *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimu.

Disertacijos tyrimų metu *TMPRSS2:ERG* sulietiniams transkriptams aptikti PL mėginiuose naudojome jautrius metodus (AT-PGR ir kPGR), parodžiusius, kad *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto mūsų tirtuose PL mėginiuose aptikimo dažnis yra 58,9 %, o dažniausia izoforma – T1/E4 (46,6 %). PL mėginiuose aptikome padidėjusią *ERG* geno raišką, kuri siejama su *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimu PL mėginyje. *TMPRSS2:ERG* sulietiniam transkriptui neigiamuose PL mėginiuose aptinkome padidėjusią *SPINK1* geno raišką, ir tai atitinka kitų tyrėjų rezultatus (Tomlins ir kt., 2008b; Leinonen ir kt., 2010). Taip pat nustatėms patikimas sąsajas tarp *ERG* ir *TERT* genų raiškos. Žinoma, kad *ERG* baltymas gali jungtis daugelio genų promotorių srityse ir taip aktyvinti kitų genų raišką (Yu ir kt., 2010), pavyzdžiui, *TERT*. Žinios apie naviką slopinančių (*GSTP1*, *RARB* ir *RASSF1*) genų ir onkogenų (*TMPRSS2:ERG* ir *TERT*) tarpusavio sąveiką PL navikuose nėra gausios. Mes nustatėme sumažėjusią naviką slopinančių genų raišką *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose mėginiuose, nors šis sumažėjimas nebuvo statistiškai patikimas. Taip pat į savo tyrimą įtraukėme mažai PL mėginiuose tyrinėtą naviką slopinantį geną *ZAC*, kurio raiška sumažėjusi *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose ir jo neturinčiuose mėginiuose. *ZAC* geno raiška nuo abiejų funkcionalių *ZAC* geno promotorių yra vienoda, gauti rezultatai atitiko kitų tyrėjų paskelbtus duomenis (Valleley ir kt., 2007).

PL vėžys yra daugiažidininės kilmės, tokiuose PL mėginiuose tyrėme *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* genų raišką bei *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto izoformų variantus ir nustatėme, kad genų raiška ir *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto izoformos yra skirtingos daugiažidininuose PL navikuose. Nė vienoje mokslinėje publikacijoje tokia analizė dar nebuvo neatlikta.

Mikrogardelių tyrimui atsirinkome penkias mikroRNR (*hsa-miR-149*, *hsa-miR-33b*, *hsa-miR-886-3p*, *hsa-miR-370* ir *hsa-miR-206*), kurių raiška yra sumažėjusi *TMPRSS2:ERG* sulietinį transkriptą turinčiuose mėginiuose. Atlikus tinkamumo patikrinimą kPGR metodu, o gautus rezultatus patvirtinus su VCaP ir LNCaP ląstelių linijomis, rasta stipri *hsa-miR-149* mikroRNR sąsaja su *TMPRSS2:ERG* sulietiniu transkriptu.

Mūsų atlikti XMRV viruso sekų tyrimo rezultatai yra palyginami su kitų tyrėjų AT-PGR ir lizdinės PGR rezultatais (Urisman ir kt., 2006; Sfanos ir kt., 2012). K. S. Sfanos ir kiti mokslininkai (2012), apibendrina visas mokslines publikacijas ir padarė išvadą, kad XMRV virusas yra laboratorinės kilmės ir nėra susijęs su tokiais žmogaus ligomis, kaip lėtinis nuovargio sindromas arba PL vėžys. Mūsų tyrimų rezultatai iš esmės atitinka šią išvadą.

Kiti tyrėjai (Wang ir kt., 2006; Demichelis ir kt., 2007; Nam ir kt., 2007) nustatė, kad PL vėžiu sergantiems pacientams, kurių mėginiuose aptiktas *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas, yra didesnė ligos progresavimo rizika, tačiau mūsų tirtoje pacientų grupėje tokios priklausomybės negavome. Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad nors vieno *TMPRSS2:ERG* arba *TERT* biožymens aptikimas PL mėginiuose ir nėra pakankamai informatyvus, tačiau abiejų biožymenų derinys rodo patikimas sąsajas su greitesniu ligos progresavimu. Šiuos biožymenis tyrėme ir neinvaziniu būdu pacientų šlapimo nuosėdose. *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto aptikimo dažnis šlapimo nuosėdose siekė 16 % ir buvo šiek tiek mažesnis, nei nurodomas kitų tyrėjų (Laxman ir kt., 2006; Hessels ir kt., 2007; Nguyen ir kt., 2010), o abiejų biožymenų aptikimo dažnis siekė 31 %. Šlapimo nuosėdose aptiktos transkriptų izoformos atitiko

variantus, kurie aptikti PL mėginiuose. Todėl šlapimo nuosėdų analizė gali būti papildoma priemonė ligos diagnozei, neatsisakant įprastinių diagnostikos metodų. Atliktų tyrimų rezultatai gali prisidėti prie PL vėžio molekulinę žymenų sistemos, naujos kartos prevencijos ir gydymo strategijų kūrimo.

IŠVADOS

1. Priešinės liaukos navikų mėginiuose ($n = 158$) aptinkamas *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto dažnis yra 58,9 %. Dažniausias *TMPRSS2:ERG* sulietinis transkriptas – T1/E4 (46,6 %). Šlapimo nuosėdose *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto aptikimo dažnis 16,4 %, dažniausiai aptinkama izoforma – T1/E4. Šlapimo nuosėdose randama *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto izoforma atitinka jo izoformą priešinės liaukos mėginyje.
2. *ERG*, *SPINK1* ir *TERT* genų raiška statistiškai patikimai ($p < 0,05$) priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo priešinės liaukos mėginyje, o *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* ir *ZAC* genams tokia priklausomybė nenustatyta.
3. Priešinės liaukos navikai, kuriuose nėra *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto ir *TERT* geno raiškos, pasižymi mažesne progresavimo rizika.
4. Daugiažidiniuose priešinės liaukos navikuose aptinkamos skirtingos *TMPRSS2:ERG* sulietinių transkriptų izoformos bei skirtingo intensyvumo *TMPRSS2:ERG* ir *TERT* raiška.
5. Mikrogardelių ir kPGR tyrimų rezultatai bei jų patvirtinimas su VCaP ir LNCaP ląstelėse įrodo, kad *hsa-miR-149* mikroRNR raiška statistiškai patikimai ($p < 0,0001$) priklauso nuo *TMPRSS2:ERG* sulietinio transkripto buvimo mėginyje.
6. XMRV viruso aptikimo dažnis priešinės liaukos mėginiuose yra mažas (4,9 %; 9/185), todėl šis virusas negali būti siejamas su priešinės liaukos navikų išsivystymu.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos, paskelbtos leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:

1. R. Sabaliauskaitė, S. Jarmalaitė, D. Petroška, D. Dasevičius, A. Laurinavičius, F. Jankevičius ir J. R. Lazutka. Combined analysis of *TMPRSS2-ERG* and *TERT* for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2012, DOI 10.1002/gcc.21963.

Mokslinės publikacijos, paskelbtos kituose leidiniuose:

1. R. Sabaliauskaitė, D. Petroška, D. Dasevičius, A. Laurinavičius, F. Jankevičius, J. R. Lazutka ir S. Jarmalaitė. Molecular analysis of multifocal prostate cancer cases. *Acta Medica Lithuanica*, 2012, 18, 4, pp: 147–155.
2. R. Sabaliauskaitė, S. Jarmalaitė, F. Jankevičius ir J. R. Lazutka. *TMPRSS2* ir *ERG* genų susijungimas – naujas priešinės liaukos vėžio žymuo. *Medicinos teorija ir praktika*, 2008, 14, 3, pp: 260–265.

Konferencijų pranešimų tezės:

1. Rasa Sabaliauskaitė, Neringa Kalinauskaitė, Sonata Jarmalaitė, Aida Laurinavičienė, Darius Dasevičius, Arvydas Laurinavičius, Juozas Lazutka ir Feliksas Jankevičius. „Molecular biomarkers of early-stage prostate cancer“: stendinis pranešimas, pristatytas „EAU 2nd North Eastern European Meeting“ ir „7th SCANBALT forum“ tarptautinėse konferencijose Vilniuje 2008 metais.
2. Rasa Sabaliauskaitė, Sonata Jarmalaitė, Neringa Kalinauskaitė, Asta Sčesnaitė, Aida Laurinavičienė, Darius Dasevičius, Arvydas

Laurinavičius, Juozas Lazutka ir Feliksas Jankevičius. „Telomerase gene expression is associated with clinical and molecular markers of poor prognosis in prostate cancer“: stendinis pranešimas, pristatytas „2nd GENICA/CANGENIN Genomic Instability Workshop“ tarptautinėje konferencijoje Atėnuose 2009 metais.

3. Rasa Sabaliauskaitė, Sonata Jarmalaitė, Darius Dasevičius, Donatas Petroška, Arvydas Laurinavičius, Juozas Lazutka ir Feliksas Jankevičius. „*TMPPRS2-ETS* gene fusion, telomerase and *ZAC1* gene expression in early-stage prostate cancer“: stendinis pranešimas, pristatytas tarptautinėje Lietuvos biochemikų draugijos XI konferencijoje LBD-50 Toliejuose 2010 metais.
4. Rasa Sabaliauskaitė, Sonata Jarmalaitė, Juozas Lazutka ir Tapio Visakorpi. „miRNA expression analysis in early-stage prostate cancer“: stendinis pranešimas, pristatytas LMT doktorantų (DS) ataskaitinėje konferencijoje Vilniuje 2011 metais.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui prof. habil. dr. J. R. Lazutkai ir darbo konsultantei prof. dr. S. Jarmalaitei už suteiktą galimybę atlikti doktorantūros tyrimus, vertingus patarimus ir kritines pastabas, visokeriopą pagalbą, optimistinį požiūrį ir nuolatinį skatinimą. „Fermentas Thermo Scientific“ MTEPC vadovams prof. A. Janulaičiui ir dr. A. Lubiui už suteiktas darbo sąlygas, darbuotojoms B. Gagilienei ir J. Guobienei, negailėjusioms patarimų ir kritinių pastabų, taip pat visam MTEPC rinkinių gamybos laboratorijos kolektyvui už moralinį palaikymą ir sukurtą gerą darbo nuotaiką. Esu dėkinga Tamperės universiteto Medicininės technologijos instituto Priešinės liaukos vėžio tyrimų laboratorijos vadovui prof. T. Visakorpi ir doktorantui M. Scaravilli, suteikusiems galimybę atlikti mokslinius tyrimus, vertingus patarimus ir galimybę parašyti ginamąjį darbą. Ačiū Lietuvos valstybiniam mokslo fondui (grantas Nr. C03/2007) ir Lietuvos mokslinių tyrimų tarnybai (grantas Nr. MIP-75/2010) už finansinę paramą atliekant dalį tyrimų disertacijos tema.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abate-Shen C and Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes and Development*, 2000, 14, pp: 2410–2434.
- Afar DEH, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A. Catalytic cleavage of the androgen-regulated *TMPRSS2* protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Research*, 2001, 61, pp: 1686–1692.
- Ahmed H. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomark Cancer*, 2010, 18, pp: 17–33.
- Alvarez S, Germain P, Alvarez R, Rodriguez-Barrios F, Gronemeyer H, de Lera AR. Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39, pp: 1406–1415.
- Anusevičienė OV, Cibas P, Lilienė L. Žmogaus anatomija ir fiziologija. Pasaulio lietuvių kultūros, mokslo ir švietimo centras, 2002, pp: 135–138.
- Arora R, Koch MO, Eble JN, Ulbright TM, Li L, Cheng L. Heterogeneity of gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 2004, 100, pp: 2362–2366.
- Athanassiadou P, Bantis A, Gonidi M, Lioffi A, Aggelonidou E, Petrakakou E, Giannopoulos A. Telomerase Expression as a Marker in Prostate Cancer: Correlation to Clinicopathologic Predictors. *Clinical Cancer Research*, 2003, 22, pp: 613–618.
- Bastus NC, Boyd LK, Mao X, Stankiewicz E, Kudahetti SC, Oliver RTD, Berney DM, Lu YJ. Androgen-induced *TMPRSS2:ERG* fusion in non-malignant prostate epithelial cells. *Cancer Research*, 2010, 70, pp: 9544–9548.
- Bettendorf O, Heine B, Kneif S, Eltze E, Semjonow A, Herbst H, Stein H, Böcker W, Poremba Ch. Expression-Patterns of the RNA Component (hTR) and the Catalytic Subunit (hTERT) of Human Telomerase in Nonneoplastic Prostate Tissue, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Prostate Cancer. *The Prostate*, 2003, 55, pp: 99–104.
- Bjartell A, Paju A, Zhang WM, Gadaleanu V, Hansson J, Landberg G, Stenmann UH. Expression of Tumor-Associated Trypsinogens (TAT-I and TAT-2) in Prostate Cancer. *The Prostate*, 2005, 64, pp: 29–39.
- Boltze C, Mundschenk J, Unger N, Schneider-Stock R, Peters B, Mawrin C, Hoang-Vu C, Roessner A, Lehnert H. Expression Profile of the Telomeric Complex Discriminates between Benign and Malignant Pheochromocytoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003, 88, pp: 4280–4286.
- Botchkina GI, Kim RH, Botchkina IL, Kirshenbaum A, Frischer Z, Adler HL. Noninvasive Detection of Prostate Cancer by Quantitative Analysis of Telomerase Activity. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11, pp: 3243–3249.

- Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, Kuner R, Sülthmann H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 2011, 128, pp: 608–616.
- Chodak G. Prostate cancer: epidemiology, screening, and biomarkers. *Urology*, 2006, 8, pp: 53–58.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1987: 162, pp: 156–159.
- Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, Eeles R, Martin FL, Phillips DH, Crundwell M, Christmas T; Thompson A, Fisher C, Kovacs G, Cooper CS. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*, 2007, 26, pp: 2667–2673.
- Clark JP and Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*, 2009, 6, pp: 429–439.
- De Marzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet*, 2003, 361, pp: 955–964.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature*, 2007, 7, pp: 256–269.
- Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, Hoshida Y, Mosquera JM, Paawitan Y, Lee C, Adami HO, Mucci LA, Kantoff PW, Andersson SO, Chinnaiyan AM, Johansson JE, Rubin MA. *TMRPSS2:ERG* gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 2007, 26, pp: 4596–4599.
- deVere White RW, Vinall RL, Tepper CG, Shi XB. MicroRNAs and their Potential for Translation in Prostate Cancer. *Urologic Oncology*, 2009, 27, pp: 307–311.
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, 2007, 120, pp: 3163–3172.
- Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *Journal of Pathology*, 2011, 223, pp: 102–115.
- Gandellini P, Folini M and Zaffaroni N. Towards the definition of prostate cancer-related microRNAs: where are we now? *Cell Press*, 2009, 15, pp: 381–390.
- Gasi D, van der Korput HA, Douben HC, de Klein A, de Ridder CM, van Weerden WM, Trapman J. Overexpression of Full-Length ETV1 Transcripts in Clinical Prostate Cancer Due to Gene Translocation. *PLoS One*, 2011, 6, pp: 1–7.
- Gutierrez-Hartman A, Duval DL, Bradford AP. ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2007, 18, pp: 150–158.
- Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG Fusion Transcripts and Prostate Cancer

- Antigen 3 in Urinary Sediments May Improve Diagnosis of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13, pp: 5103–5109.
- Hooper JD, Clements JA, Quigleys JP, Antalis TM. Typer II transmembrane Serine Proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, pp: 857–860.
- Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Brenner CJ, Cao X, Wang X, Wu L, Li J, Hu M, Gong Y, Cheng H, Laxman B, Vellaichamy A, Shankar S, Li Y, Dhanasekaran SM, Morey R, Barrette T, Lonigro RJ, Tomlins SA, Varambally S, Qin ZS, Chinnaiyan AM. An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell*, 2010, 17, pp: 443–454.
- Jin L, Hu WL, Jiang CC, Wang JX, Han CC, Chu P, Zhang LJ, Thorne RF, Wilmott J, Scolyer RA, Hersey P, Zhang XD, Wu M. MicroRNA-149*, a p53-responsive microRNA, funtions as an oncogenic regulator in human melanoma. *PNAS*, 2011, 108, pp: 15840–15845.
- Kamradt J, Drosse C, Kalkbrenner S, Rohde V, Lensch R, Lehmann J, Fixemer T, Bonkhoff H, Stoeckle M, Wullich B. Telomerase Activity and Telomerase Subunit Gene Expression Levels Are Not Related in Prostate Cancer: A Real-Time Quantification and In Situ Hybridization Study. *Laboratory Investigation*, 2003, 83, pp: 623–633.
- Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, Nelson PS. Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26, pp: 965–975.
- Klein HG, Dodd RY, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, McCleary KK, Silverman RH, Stramer SL. Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and blood transfusion: report of the AABB interorganizational XMRV task force. *Transfusion*, 2011, 51, pp: 654–661.
- Kwabi-Addo B, Wang S, Chung W, Jelinek J, Patierno SR, Wang BD, Andrawis R, Lee NH, Apprey V, Issa JP, Ittmann M. Identification of Differentially Methylated Genes in Normal Prostate Tissues from African American an Caucasian Men. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16, pp: 3539–3547.
- Latil A, Vidaud D, Valeri A, Fournier G, Vidaud M, Lidereau R, Cussenot O, Bieche I. *htert* Expression Correlates with *MYC* over-expression in Human Prostate Cancer. *International Journal of Cancer*, 2000, 89, pp: 172–176.
- Lawrie Ch, Gal S, Dunlop HM, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CSR, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 2008, 141, pp: 672–675.
- Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, Shah RB, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Noninvasive detection

- of *TMPRSS2:ERG* fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia*, 2006, 8, pp: 885–888.
- Leinonen KA, Tolonen TT, Brancken H, Stenman UH, Tammela TLJ, Saramäki OR, Visakorpi T. Association of *SPINK1* Expression and *TMPRSS2:ERG* Fusion with Prognosis in Endocrine-Treated Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16, pp: 2845–2851.
- Li LC, Okino ST, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1704, pp: 87–102.
- Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease *TMPRSS2*. *Cancer Research*, 1999, 59, pp: 4180–4184.
- Liu BCS, LaRose I, Weinstein LJ, Ahn M, Weinstein MH, Richie JP. Expression of Telomerase Subunits in Normal and Neoplastic Prostate Epithelial Cells Isolated by Laser Capture Microdissection. *Cancer*, 2001, 92, pp: 1943–1948.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Elbert BJ, Mak RH, Ferrando AA, Downin JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. Micro RNA expression profiles classify human cancer. *Nature*, 2005, 435, pp: 834–838.
- Lu X, Lamontagne J, Lu F, Block TM. Tumor-associated protein SPINK/TATI suppresses serine protease dependent cell apoptosis. *Apoptosis*, 2008, 13, pp: 483–494.
- Magi-Galluzzi C, Tsusuki T, Elson P, Simmerman K, LaFargue Ch, Esgueva R, Klein E, Rubin MA, Zhou M. *TMPRSS2-ERG* Gene Fusion Prevalence and Class Are Significantly Different in Prostate Cancer of Caucasian, African-American and Japanese Patients. *The Prostate*, 2011, 71, pp: 489–497.
- Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *The Annual Review of Medicine*, 2009, 60, pp: 139–151.
- Meeker AK. Telomeres and telomerase in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer biology. *Urologic Oncology*, 2006, 24, pp: 122–130.
- Mehra R, Han B, Tomlins SA, Wang L, Menon A, Wasco MJ, Shen R, Montie JE, Chinnaiyan AM, Shah RB. Heterogeneity of *TMPRSS2* Gene Rearrangements in Multifocal Prostate Adenocarcinoma: Molecular Evidence for an Independent Group of Diseases. *Cancer Research*, 2007a, 67, pp: 7991–7995.
- Mehra R, Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT, Pienta KJ, Ghosh D, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Shah RB. Comprehensive assessment of *TMPRSS2* and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Modern Pathology*, 2007b, 20, pp: 538–544.
- Menendez-Arias L. Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Reviews in Medical Virology*, 2011, 21, pp: 3–17.
- Miyagi Y, Sasaki T, Fujinami K, Sano J, Senga Y, Miura T, Kameda Y, Sakuma Y, Nakamura Y, Harada M, Tsuchiya E. ETS family-associated

- gene fusions in Japanese prostate cancer: analysis of 194 radical prostatectomy samples. *Modern Pathology*, 2010, 23, pp: 1492–1498.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB and Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS*, 2008, 105, pp: 10513–10518.
- Mohamed AA, Tan SH, Sun C, Shaheduzzaman S, Hu Y, Petrovics G, Chen Y, Sesterhenn IA, Li H, Sreenath T, McLeod DG, Dobi A, Srivastava S. *ERG* oncogene modulates prostaglandin signaling in prostate cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 2011, 11, pp: 410–417.
- Müller H and Brenner H. Urine markers as possible tools for prostate cancer screening: review of performance characteristics and practicality. *Clinical Chemistry*, 2006, 52, pp: 562–573.
- Mwamukonda K, Chen Y, Ravindranath L, Furusato B, Hu Y, Sterbis J, Osborn D, Rosner I, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Petrovics G. Quantitative expression of *TMPRSS2* transcript in prostate tumor cells reflects *TMPRSS2-ERG* fusion status. *Prostate Cancer and Prostate Disease*, 2010, 13, pp: 47–51.
- Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Koltz LH, Yang LY, Stanimirovic A, Encioiu E, Neill M, Loblaw DA, Trachtenberg J, Narod SA, Seth A. Expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 2007, 97, pp: 1690–1695.
- Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Mechanisms of disease Prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 349, pp: 366–381.
- Nguyen PN, Violette P, Cham S, Tanguay S, Kassouf W, Aprikian A, Chen JZ. A Panel of *TMPRSS2:ERG* Fusion Transcript Markers for Urine-Based Prostate Cancer Detection with High Specificity and Sensitivity. *European Urology*, 2010, 3684, pp: 1–8.
- Oakes B, Tai AK, Cingöz O, Henefeld MH, Levine S, Coffin JM, Huber BT. Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology*, 2010, 7, pp: 1–10.
- Oceandy D, Cartwright EJ, Neyses L. Ras-Association Domain Family Member 1A (*RASSF1A*) – Where the Heart and Cancer Meet. *TCM*, 2009, 19, pp: 262–267.
- O'Day E and Lal A. MicroRNA and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2010, 12, pp: 1–10.
- Paju A, Hotakainen K, Cao Y, Laurila T, Gadaleanu V, Hemminki A, Stenman UH, Bjartell A. Increased Expression of Tumor-Associated Trypsin Inhibitor, *TATI*, in Prostate Cancer and in Androgen-Independent 22Rv1 Cells. *European Urology*, 2007, 52, pp: 1670–1681.

- Pang Y, Young CYF, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42, pp: 363–369.
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Peitsch MC, Rossier C, Antonarakis SE. Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA and SRCR domains and maps to 21q22.3. *Genomics*, 1997, 44, pp: 309–320.
- Paprotka T, Delviks-Frankenberry KA, Cingöz O, Martinez A, Kung HJ, Tepper CG, Hu WS, Fivash Jr MJ, Coffin JM, Pathak VK. Recombinant Origin of the Retrovirus XMRV. *Science*, 2011, 333, pp: 97–101.
- Perner S, Mosquera JM, Demicheli F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, Collins C, Bismar TA, Chinnaiyan AM, De Marzo AM, Rubin MA. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *American Journal of Surgery and Pathology*, 2007, 31, pp: 882–888.
- Perry AS, Folley R, Woodson K and Lawler M. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocrine Related Cancer*, 2006, 13, pp: 357–377.
- Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the Tumor Suppressor Gene *RASSF1A* in Human Tumors. *Biochemistry*, 2005, 70, pp: 576–583.
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TLJ, Visakorpi T. MicroRNA Expression Profiling in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 2007, 667, pp: 6130–6135.
- Rice KR, Chen Y, Ali A, Whitman EJ, Blase A, Ibrahim M, Elsamanoudi S, Brassell S, Furusato B, Stingle N, Sesterhenn IA, Petrovics G, Miick S, Rittenhouse H, Groskopf J, McLeod DG, Srivastava S. Evaluation of the ETS-Related Gene mRNA in Urine for the Detection of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16, pp: 1572–1576.
- Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1796, pp: 114–128.
- Rickam DS, Chen YB, Banerjee S, Pan Y, Yu J, Vuong T, Perner S, Lafargue CJ, Mertz KD, Setlur SR, Sircar K, Chinnaiyan AM, Bismar TA, Rubin MA, Demichelis F. ERG Cooperates with Androgen Receptor in Regulating Trefoil Factor 3 in Prostate Cancer Disease Progression. *Neoplasia*, 2010, 12, pp: 1031–1040.
- Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, Weber J, Cingoz O, Patel A, Walker MM, Kim WJ, Uiprasertkul M, Coffin JM, McClure MO. Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology*, 2010, 7, pp: 1–6.
- Rostad K, Winkel OJC, Haukaas SA, Halvorsen OJ, Øyan AM, Haese A, Budäus L, Albrecht H, Akslen LA, Schlomm T, Kalland KH. TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. *APMIS*, 2009, 117, pp: 575–582.
- Saini S, Majid S, Dahiya R. Diet, MicroRNAs and Prostate Cancer. *Pharma Research*, 2010, 27, pp: 1014–1026.

- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. Third edition. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saramäki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TJJ, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG Fusion Identifies a Subgroup of Prostate Cancers with a Favorable Prognosis. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14, pp: 3395–3400.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International Journal of Cancer*, 2010, 126, pp: 1166–1176.
- Sfanos KS, Aloia AL, De Marzo AM, Rein A. XMRV and prostate cancer – a ‘final’ perspective. *Nature Reviews Urology*, 2012, 9, pp: 111–118.
- Shi XB, Tepper CG, deVere White RW. microRNAs and prostate cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, 12, pp: 1456–1465.
- Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Kung HJ, deVere White RW. *miR-125b* Promotes Growth of Prostate Cancer Xenograft Tumor Through Targeting Pro-Apoptotic Genes. *The Prostate*, 2011, 71, pp: 538–549.
- Silverman RH, Nguyen C, Weight CJ, Klein EA. The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nature*, 2010, 7, pp: 392–402.
- Stoye JP, Silverman RH, Boucher CA, Le Grice SFJ. The Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Retrovirus Debate Continues at First International Workshop. *Retrovirology*, 2010, 7, pp: 1–10.
- Sun C, Dobi A, Mohamed A, Li H, Thangapazham RL, Furusato B, Shaheduzzman S, Tan SH, Vaidyanathan G, Whitman E, Hawksworth DJ, Chen Y, Nau M, Patel V, Vahey M, Gutkind JS, Sreenath T, Petrovics G, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene*, 2008, 27, pp: 5348–5353.
- Svensson MA, LaFargue CJ, MacDonald TY, Pflueger D, Kitabayashi N, Santa-Cruz AM, K. E. Garsha, Sathyanarayana UG, Riley JP, Yun CS, Nagy D, Kosmeder JW, Pestano GA, Tewari AK, Demichelis F, Rubin MA. Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer. *Laboratory Investigation*, 2010, 91, pp: 404–412.
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Succi ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cell Press*, 2010, 18, pp: 11–22.
- Theodoropoulou M, Stalla GK, Spengler D. ZAC1 target genes and pituitary tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 326, pp: 60–65.

- Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, Schalken JA. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *European Urology*, 2009, 56, pp: 275–286.
- Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B, Yu J, Wang L, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Roulston D, Shah RB, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*, 2007, 448, pp: 595–601.
- Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, Cao Q, Prensner JR, Rubin MA, Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM. Role of the *TMPRSS2-ERG* Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia*, 2008a, 10, pp: 177–188.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, Varambally S, Mehra R, Perner S, Demichelis F, Helgeson BE, Laxman B, Morris DS, Cao Q, Cao X, Andre O, Fall K, Johnson L, Wei JT, Shah RB, Al-Ahmadie H, Eastham JA, Eggener SE, Fine SW, Hotakainen K, Stenman UH, Tsodikov A, Gerald WL, Lilja H, Reuter VE, Kantoff PW, Scardino PT, Rubin MA, Bjartell AS, Chinnaiyan AM. The Role of SPINK1 in ETS Rearrangement Negative Prostate Cancers. *Cancer Cell*, 2008b, 13, pp: 519–528.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie AE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent Fusion of *TMPRSS2* and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*, 2005, 310, pp: 644–648.
- Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative Biology of Prostate Cancer Progression. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2006, 1, pp: 243–271.
- Tu JJ, Rohan S, Kao Jean, Kitabayashi N, Mathew S, Chen YT. Gene fusion between *TMPRSS2* and *ETS* family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Modern Pathology*, 2007, 20, pp: 921–928.
- Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL. Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q *RNASEL* Variant. *PloS*, 2006, 2, pp: 211–225.
- Vaarala MH, Povari KS, Kellokumpu S, Kyllönen AP, Vihko PT. Expression of transmembrane serine protease *TMPRSS2* in mouse and human tissues. *Journal of Pathology*, 2001, 193, pp: 134–140.
- Valleley EM, Cordery SF, Bonthron DT. Tissue-specific imprinting of the *ZAC/PLAGL1* tumor suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16, pp: 972–981.

- Van der Weyden L and David J Adams. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1776, pp: 58–85.
- Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Research*, 2006, 66, pp: 8347–8351.
- Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, Urbanucci A, Kohonen PJ, Latonen LM, Kallioniemi OP, Jenster G, Visakorpi T. Androgen Regulation of microRNAs in Prostate Cancer. *The Prostate*, 2010, 71, pp: 604–614.
- Widschwendter M, Berger J, Müller HM, Zeimet AG, Marth C. Epigenetic Downregulation of the Retinoic Acid Receptor- β 2 Gene in Breast Cancer. *Neoplasia*, 2001, 6, pp: 193–201.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregor RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 2009, 11, pp: 228–235.
- Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Philips JM, Linehan WM, Tangrea JA. Heterogeneous Gene Methylation Patterns Among Pre-Invasive and Cancerous Lesions of the Prostate: A Histopathologic Study of Whole Mount Prostate Specimens. *The Prostate*, 2004, 60, pp: 25–31.
- Wyatt HDM, West SC, Beattie TL. In *TERT* preting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38, pp: 5609–5622.
- Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo-Becerril C, Chanona-Vilchis J, Duenas-González A. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BioMed Central*, 2005, 5, pp: 1–12.

PRIEDAI

1. Lizdinės PGR atlikimo protokolas

Lizdinė (Nested PCR) PGR susideda iš dviejų PGR reakcijų. Pirmai lizdinės PGR reakcijai reikalingi komponentai pilami tokia tvarka: penkiakartinis Hot Start *Taq* reakcijos buferis (Fermentas Thermo Scientific), 100 mM dNTP mix nukleotidų mišinys (koncentracija mišinyje iki 0,5 mM) (Fermentas Thermo Scientific), specifiniai pradmenys (XMRV-1F ir XMRV-1R) (kurių koncentracija mišinyje yra 0,1–1 μ M), 25 mM MgCl₂ (koncentracija mišinyje iki 1,5 mM) (Fermentas Thermo Scientific), Hot Start *Taq* polimerazės (Fermentas Thermo Scientific) iki 1,25–2 v ir vandens be nukleazinių, kuris sudaro likusį reikiamą laisvą reakcijos tūrį. Į mėgintuvėlius išpilstomas gautas reakcijos mišinys po 24 μ l ir įpilama po 1 μ l kDNR. DNR amplifikacija atliekama Mastercycler® Gradient (Eppendorf) pagal pateiktas sąlygas:

95 °C – 4 min. (denatūracija)

94 °C – 1 min. (denatūracija)

48 °C – 45 sek. (jungimas)

72 °C – 45 sek. (pailginimas)

} kartojama 35 kartus

72 °C – 10 min. (fragmentų pailginimo užbaigimas)

Antras lizdinės PGR reakcijai yra naudojama ta pati koncentracija visų reakcijai reikalingų komponentų, tik kiti specifiniai (XMRV-2F ir XMRV-2R) pradmenys (priedų 11 lentelė) ir vietoje kDNR yra imamas 1 μ l produkto, kuris gautas pirmos lizdinės PGR metu. DNR amplifikacija atliekama Mastercycler® Gradient (Eppendorf) pagal pateiktas sąlygas:

95 °C – 4 min. (denatūracija)

94 °C – 1 min. (denatūracija)

54 °C – 45 sek. (jungimas)

72 °C – 45 sek. (pailginimas)

} kartojama 35 kartus

72 °C – 10 min. (fragmentų pailginimo užbaigimas)

Lizdinės PGR metodu gauti produktai analizuojami 2 % agarozės gelyje. Viskas atliekama taip, kaip aprašyta metodinės dalies 2.7 skyrelyje.

4 lentelė. Pradmenys, naudoti tyrimuose, atliktuose AT-PGR ir kPGR metodais

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	T _m °C	Fragmento ilgis bp	Pradmenų tiekėjas
univdir <i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	53	500 bp	Metabion
univrev <i>GAPDH</i>	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	59		
<i>TMPRSS2</i>	CAGGAGGCGGAGGCGGA	57	Priklausomai nuo genų susiliejimo	
<i>ERG</i>	GTAGGCACACGACTGG	49		
<i>ETVI</i>	CAGGCCATGAAAACCTT	41	Priklausomai nuo genų susiliejimo	
<i>TERT</i> -dir	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA	54	145 bp	
<i>TERT</i> -rev	GGATGAAGCGGAGTCTGGA	53		
<i>TR</i> -dir	CCTAACTGAGAAGGGCGTAGGC	59	273 bp	
<i>TR</i> -rev	CTAGAATGAACGGTGGAAGGCG	57		
<i>ZAC1</i> -dir	TGGCACAGCATGGTCA	46	300 bp	
<i>ZAC1</i> -rev	GTTGGGGTCGTCTGGA	49		
<i>ERG</i> -dir	CGCAGAGTTATCGTGCCAGCAGAT	59	62 bp	
<i>ERG</i> -rev	CCATATTCTTTACCGCCCACTCC	59		
<i>SPINK1</i> -dir	ACCACCATGAAGGTAAC AGGCATCTTTCTT	60	242 bp	
<i>SPINK1</i> -rev	TCAGCAAGGCCAGATTTTTGA	53		
<i>GSTP1</i> -dir	TCCGCTGCAAATACATCTCC	52	320 bp	
<i>GSTP1</i> -rev	TGTTTCCCGTTGCCATTGAT	50		
<i>RARB</i> -dir	GACTGTATGGATGTTCTGTCAG	50	146 bp	
<i>RARB</i> -rev	ATTTGTCCTGGCAGACGAAGCA	55		
<i>RASSF1</i> -dir	ACCTCTGTGGCGACTTCATCT	54	100 bp	
<i>RASSF1</i> -rev	AGGTGAACTTGCAATGCG	48		
<i>ZAC1p</i> -dir	GGCCTCGCCTGAGCT	50	131 bp	
<i>ZAC2</i> -rev	AGGCAGCAGCCACATTAGAC	54		
<i>ZAC2p</i> -dir	CCGGACTCCAGAACTTTCCAA	54	131 bp	
<i>ZAC2</i> -rev	AGGCAGCAGCCACATTAGAC	54		

5 lentelė. Pradmenys, naudoti plazmidėms pagausinti PGR metodu, esančioms bakterijų kolonijose, ir jų sekoskaitai

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	T _m °C	Pradmenų tiekėjas
M13/pUC dir (-46) 22-mer	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA	59	Fermentas Thermo Scientific
M13/pUC rev (-46) 24-mer	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	56	

6 lentelė. Daugiažidiniųjų priešinės liaukos navikų tarpusavio palyginimas: T1/E4, T1/E4 ir T2/E4 bei T1/E1 – sulietinio transkripto izoformos; wt – mėginys, kuriame neaptiktas sulietinis transkriptas; kPGR *TMPRSS2:ERG*: 1 – silpna sulietinio transkripto raiška, 2 – stipri sulietinio transkripto raiška; AT-PGR *TERT*: 1 – neaptikta geno raiška, 2 – aptikta vidutinė arba didelė geno raiška

Nr.	pT	Gleason'o skalė	1 mėginys			2 mėginys			
			<i>TMPRSS2:ERG</i> raiška		<i>TERT</i> raiška (AT-PGR)	<i>TMPRSS2:ERG</i> raiška		<i>TERT</i> raiška (AT-PGR)	
			Transkriptas	Raiška (kPGR)		Transkriptas	Raiška (kPGR)		
1.	pT3a	3+4	T1/E4 ir T2/E4	1	yra	3+3	T1/E4	1	yra
2.	pT2c	3+3	T1/E4 ir T2/E4	1	nėra	3+3	T1/E4	2	yra
3.	pT2b	3+3	T1/E4 ir T2/E4	1	nėra	3+4	T1/E4	1	yra
4.	pT3b	3+4	T1/E4	1	nėra	3+4	T1/E4	2	yra
5.	pT2b	3+3	T1/E4	1	nėra	3+3	T1/E4	1	yra
6.	pT2b	3+3	T1/E4 ir T2/E4	1	yra	3+3	wt	-	nėra
7.	pT2b	3+3	T1/E1	1	nėra	3+3	T1/E4	2	yra
8.	pT2b	3+3	T1/E4	1	nėra	3+3	T1/E4 ir T2/E4	1	yra
9.	pT2b	3+3	wt	-	nėra	3+3	T1/E4	1	yra
10.	pT3a	3+4	T1/E4	1	nėra	3+4	T1/E4 ir T2/E4	2	yra

7 lentelė. Priešinės liaukos mėginių, kurie buvo tiriami mikrogardelių metodu, molekulinį ir pataloginių duomenų palyginimas: T1/E4 – sulietinio transkripto izoforma, wt – mėginys, kuris neturi sulietinio transkripto

Nr.	Naviko stadija	Diferenciacija pagal Gleason skalę	<i>TMPRSS2:ERG</i>	Nr.	Naviko stadija	Diferenciacija pagal Gleason skalę	<i>TMPRSS2:ERG</i>
51	pT2c	6	T1/E4	163	pT2c	6	T1/E4
91	pT2c	6	wt	53	pT2c	6	wt
162	pT2c	6	T1/E4	110	pT2c	6	T1/E4
188	pT2a	7	wt	105	pT2a	7	wt

8 lentelē. Pradmenys, naudoti mikroRNR tinkamumui patikrinti

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	Pradmenų tiekējas
<i>hsa-miR-149</i>	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	Applied Biosystems™
<i>hsa-miR-33b</i>	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	
<i>hsa-miR-886-3p</i>	CGCGGGUGCUUACUGACCCUU	
<i>hsa-miR-370</i>	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	
<i>hsa-miR-206</i>	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	
<i>RNU6B</i>	CGCAAGGATGACACGCAAAT TCGTGAAGCGTTCATATTTTT	
<i>RNU24</i>	ATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGACA TTTTAAACCACCAAGATCGCTGATGCA	
<i>RNU44</i>	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTG AACATGAAGGTCTTAATTAGCTCTAACTGACT	

9 lentelē. Pradmenys, naudoti genų nutildymui atlikti

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	Pradmenų tiekējas
Human <i>ERG</i> Kit siRNA	GAUCCUACGCUAUGGAGUA	Dharmacon Thermo Scientific
Human siRNA <i>ERG</i> Custom	CGACAUCCUUCUCUCACAUUU	

10 lentelē. Pradmenys, skirti *ERG* geno raiškos nutildymui patikrinti

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	T _m °C	Pradmenų tiekējas
<i>ERGF2</i>	ACGAACGAGCGCAGAGTTAT	52	Oligomer
<i>ERGR2</i>	GTGAGCCTCTGGAAGTCGTC	56	
<i>TBPF</i>	TGCACAGGAGCCAAGCGTGAA	56	
<i>TBPR</i>	CACATCACAGCTCCCCACCA	56	

11 lentelē. Pradmenys, naudoti XMRV viruso *gag* geno transkriptui aptikti

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	T _m °C	Fragmento ilgis bp	Pradmenų tiekējas
XMRV-1F	CGCGTCTGATTTGTTTTGTT	48	612 bp	Metabion
XMRV-1R	CCGCCTCTTCTTCATTGTTC	52		
XMRV-2F	TCTCGAGATCATGGGACAGA	52	410 bp	
XMRV-2R	AGAGGGTAAGGGCAGGGTAA	54		

12 lentelē. Pradmenys, skirti XMRV genomnēms sekoms pagausinti

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5' – 3'	Tm °C	Pradmenu tiekējas
X01S5	TATACTAGTCCACCATAAGGCTTAGCACGCTAGC	64	Integrated DNA Technologies
X01S3	TATACTAGTGCGAGGATTAGATGCCGGCACAC	64	
X02S5	TATTCTAGACGGCGATCGTTTTGTCTTTGTCTC	62	
X02S3	TATTCTAGAGACATCTCCCCAGTGCTGCAAGG	64	
XMRVgag5	TATACTAGTACAATGGGACA GACCGTAACTACCCCTC	66	Metabion
X03S3	GCGACTAGTCCAATTATATA AATCAGAGGAGGAAAACG	63	Integrated DNA Technologies
X04S5	TATACTAGTGGAGATGGCCAGCTTCAGTACTG	63	
X04S3	TATACTAGTTACCTCTGCCCTACGGCGTTCTTC	64	
X05S5	GATACTAGTGGAAACGTA TCAGGAGAGAAAATAGAGG	63	
X05S3	TATACTAGTGACCCTAG AGGAACATCTGGCTCT	63	
X06S5	TATACTAGTATGGGACAGCCCCTGCAAGTGCT	64	
X06S3	TATACTAGTTCAGAAG TGGCGGCCAGCAGTAAG	64	
X07S5	GATACTAGTACTTGATC CTGCTACAGTACGTGGA	63	
X07S3	TATACTAGTGGGCATTG GATAGCCAACGGTCAG	64	
X08S5	TATACTAGTGGTAGAA GCACTGGTCAAACAACC	62	
XMRVpol3	TATACTAGTTTATATGAG GAGTGTAGAGGTTTCTAG	60	Metabion
X09S5	TATACTAGTCCGAGAGGCAGCCATGAAGGCA	64	Integrated DNA Technologies
X09S3	TATACTAGTCTACCTGT CCTGAACTCTGGGGTCT	64	
X010S5	GATACTAGTGGATCGATTGGAAGTTACATTGTGC	62	
X010S3	GCGACTAGTAATTTTCCAA GTGACATTAAGACCTGG	63	
XMRVenv5E	TATACTAGTACAATGGAA AGTCCAGCGTTCTCAAAAC	62	Metabion
X011S3	TATACTAGTTGTTTCAG TGATCACGGGATTAGGC	62	Integrated DNA Technologies
X012S5	TATACTAGTCGCCAGGTCTCAATGTAGG	62	
XMRVenv3i	TATACTAGTTTATCTTTTATA TTTAGTTTTCTTTTCAAACCTG	57	Metabion
X013S5	TATACTAGTCAAAGGT AACCTACCACTCCCCTA	62	Integrated DNA Technologies
X013S3	GCGACTAGTCCCTCTTTC TGAAACTGAATAAAATC	63	
X014S5	TATACTAGTGATCCAGAAGAAGTGAATCACGTG	62	
X014S3	TATACTAGTCGAGCTGG GTAGTCAATCACTCTG	63	
X02as5	TATTCTAGAGTCGGGAGGTAAGCTGG	60	Metabion
X02bs3	TATTCTAGACCCAACAAGCCACTCCAA	58	

188 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
162 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
261 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
22 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
237 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
242 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
183 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
51 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
91 TCTCGAGATCATGGGACAGACCGTAACTACCCCTCTGAGTTTAAACCTTGCAGCACTGGGG 60
***** ** *****

188 GGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
162 GGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
261 GGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
22 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
237 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
242 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
183 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
51 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
91 AGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACCACTGTGTGGATGTCAGGAAGAGGCGCTGGATTAC 120
***** ***** ** *****

188 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
162 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
261 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
22 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
237 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
242 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
183 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
51 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCCAACCTTCAATGTGGGATGGCCTCAGGATGGTACTTTCAA 180
91 CTTCTGTTCCGCTGAATGGCC-----TCAGGATGGTACTTTAA 159
***** ***** ** *****

188 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
162 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
261 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
22 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
237 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
242 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
183 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
51 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 240
91 TTTAAGTATTATCTCTCAGGTTAAGTCTAGAGTGTTTTGTCTGGTCCCCACGGACACCC 219
**** ***** ** *****

188 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
162 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
261 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
22 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
237 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
242 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
183 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 300
51 GGATCAGGTCCCATATATGTTACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 299
91 GGATCAGGTCCCATATATCGTCACCTGGGAGGCACCTGCCTATGACCCCCCTCCGTGGGT 279
***** ** *****

188 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
162 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
261 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
22 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
237 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
242 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
183 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 360
51 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACTTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 359
91 CAAACCGTTTGTGTCTCCTAAACCTCCCTCCCTTGCCGACAGCTCCCCTCCCGCCCCG 339
***** ***** ** *****

```

188 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
162 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
261 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
22 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
237 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
242 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
183 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 413
51 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 412
91 TCCTTCTGCGCAACCTCCGTCCCGATCTGCCCTTTACCCTGCCCTTACCCTCT 392
*****

```

42 pav. XMRV *gag* geno sekų, nustatytų skirtinguose PL mėginiuose, palyginimas tarpusavyje; pilka spalva pažymėti XMRV nukleotidų neatitikimai; 22, 51, 91, 162, 183, 188, 237, 242 ir 261 – priešinės liaukos mėginiai