

VILNIAUS UNIVERSITETAS

KRISTINA DANIŪNAITĖ

PROSTATOS VĖŽIO DIAGNOSTINIAI IR PROGNOSTINIAI
DNR METILINIMO ŽYMENYS

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, Biologija (01 B)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute (buvusiame Gamtos mokslų fakultete) 2012–2016 m.

Mokslinė vadovė:

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biologijos mokslų krypties taryboje:

Pirmininkė:

prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Nariai:

prof. dr. Elona Juozaitytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

prof. dr. Tapio Visakorpi (Tampere universiteto Prostatos vėžio tyrimų centras, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

dr. Mindaugas Stoškus (Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Disertacija bus ginama viešame Biologijos mokslų krypties tarybos posėdyje 2017 m. birželio mėn. 29 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, R102 auditorijoje (Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva).

Disertacijos santrauka išsiųsta 2017 m. gegužės mėn. 25 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY

KRISTINA DANIŪNAITĖ

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC DNA METHYLATION BIOMARKERS
OF PROSTATE CANCER

Summary of doctoral dissertation
Biomedical Sciences, Biology (01 B)

Vilnius, 2017

The work presented in this doctoral dissertation was carried out at the Institute of Biosciences (former Faculty of Natural Sciences), Life Sciences Center, Vilnius University, during 2012–2016 m.

Scientific supervisor:

prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01 B).

The doctoral dissertation will be defended at Vilnius University Academic Board of Examiners in Biology:

Chair:

prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01 B).

Members:

prof. dr. Elona Juozaitytė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B);

prof. dr. Tapio Visakorpi (University of Tampere, Prostate Cancer Research Center, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B);

prof. dr. Donatas Žvingila (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01 B);

dr. Mindaugas Stoškus (Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Biomedical Sciences, Biology – 01 B).

The doctoral dissertation will be defended at the open meeting held by the Academic Board of Examiners in Biology on 29th of June, 2017, at 14 p.m., at Life Sciences Center, Vilnius University. Address: Saulėtekio Ave. 7 (auditorium R102), LT-10257, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 25th of May, 2017.

The doctoral dissertation is available for review at the Library of Vilnius University and Vilnius University website: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

IVADAS

Prostatos vėžys (PV) yra vienas iš dažniausių vyrų vėžinių susirgimų ir pasižymi aukštais mirtingumo rodikliais [1]. Per kelis pastaruosius dešimtmečius vykusį mokslinį pažangą gerokai praplėtė žinias apie prostatos kancerogenezės molekulinis mechanizmus, o progresas klinikinėje srityje žymiai pagerino ligonių gydymą.

Pastaruoju metu plačiai vykdomi genomio masto tyrimai suteikė naujų žinių apie PV epigenomą, įskaitant DNR metilinimo ir mikroRNR (miRNR) raiškos profilius [2-4]. Be to, kad šiais tyrimais buvo patvirtinta jau anksčiau nustatytų molekulinė pokyčių svarba PV vystymuisi, įvairūs naujai atrasti genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai buvo pasiūlyti ne tik kaip diagnostiniai įrankiai, bet ir kaip žymenys agresyviai ligos eigai prognozuoti [3,5]. Vis dėlto daugelyje tokių viso genomo tyrimų didžiausias dėmesys buvo skiriamas vėžinių ir normalių audinių molekulinio profilio palyginimui, o ne bandymams stratifikuoti vėžį į tipus pagal ligos agresyvumą. Todėl reikalingi tolimesni tyrimai genomo mastu, kuriais būtų siekiama pagilinti žinias apie genetinius ir epigenetinius skirtumus tarp latentinio ir agresyvios eigos PV.

Per pastarąjį dešimtmetį gerokai išaugęs supratimas apie genetinius pokyčius, aptinkamus PV, paskatino žymenų sistemų kūrimą, siekiant palengvinti ligos diagnozavimą ir efektyviausios gydymo schemos parinkimą, taip pat siekiant užtikrinti, kad būtų išvengta pacientui nebūtinų klinikinių procedūrų. Tačiau daugeliu tokių testų tiriamos panašios (ar tos pačios) molekulinės ypatybės, todėl yra vertinamos tik kelios persidengiančios PV klinikinės išraiškos, o pilnas fenotipinis šios labai heterogeniškos ligos spektras nėra pakankamai apimamas [6]. Molekuliniam lygmenyje PV įvairovė daug kartų parodyta įvairiais tyrimais, kuriuose įvardijami naujai nustatyti PV žymenys, tačiau tik nedidelė jų dalis yra validuoti atliekant tyrimus nepriklausomose imtyse [3,5]. Turint omeny skirtingus PV sergamumo ir mirtingumo rodiklius pasaulio mastu, iškyla poreikis nuodugniai iširti PV molekulinį profilį, taikant šiuolaikinius genetinės analizės metodus, siekiant atskleisti dažniausius genetinius ir epigenetinius pokyčius, kurie galėtų būti pritaikyti PV diagnostikai ir prognozei.

DNR metilinimas, kaip genų raiškos slopinimo mechanizmas, yra ankstyvas įvykis vėžio vystymesi ir yra intensyviai tyrinėjamas PV atveju. Tačiau išskyrus kelias pastarųjų metų publikacijas, aprašančias PV epigenomo analizę, daugelis ankstesnių tyrimų buvo orientuoti į pavienių, iš anksto pagal tam tikrus kriterijus pasirinktų genų analizę ir/ arba atlikti palyginti nedidelėse mėginių imtyse (apžvelgta [7]). Tiriama PV, yra nustatyta daugiau kaip 100 genų, kurių promotoriaus sričių metilinimas susijęs su geno raiškos nuslopimu. Daugiausia tyrinėtas ir geriausiai žinomas glutationo S-transferazę π 1 koduojančio geno (*GSTP1*) metilinimas (apžvelgta [7]). Daugelio kitų genų tyrimų duomenys nėra vienareikšmiai. DNR metilinimo pokyčiai yra daug žadantis PV žymenų šaltinis, tačiau būtini nuoseklūs šių žymenų paieškos ir validacijos tyrimai klinikinėse mėginių imtyse, siekiant identifikuoti perspektyviausius žymenys pritaikymui praktikoje.

Šio tyrimo **tikslas** buvo identifikuoti skirtingai metilintus genus PV mėginiuose ir nustatyti jų diagnostinę ir prognostinę vertę potencialiam pritaikymui klinikinėje praktikoje.

Tyrimo tikslui pasiekti buvo išskelti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti naviką slopinančių genų (NSG) *RARB*, *GSTP1*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1*, *p16^{INK4a}/CDKN2A* ir *p14^{ARF}/CDKN2A* promotoriaus metilinimo dažnius PV audiniuose bei įvertinti šių žymenų diagnostinį ir prognostinį potencialą.

2. Įvertinti galimybę aptikti genų *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* promotoriaus metilinimą PV sergančių ligonių šlapime ir nustatyti šių žymenų diagnostinę ir prognostinę vertę.
3. Ištirti visuminį DNR metilinimo profilį PV ir poriniuose nepakitusiuose prostatos audiniuose, siekiant nustatyti vėžiui specifinius ir biocheminei ligos progresijai (BCP) specifinius epigenominius pokyčius bei pakitusius molekulinio atsako kelius.
4. Įvertinti 10-ies baltymus koduojančių genų (*PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, *NAALAD2*, *KCTD8*, *EPAS1*, *NEK9* ir *CD44*), atrinktų iš visuminės DNR metilinimo analizės, promotoriaus metilinimo būklės skirtumus, nustatyti jų diagnostinę ir prognostinę vertę bei tinkamumą neinvaziniam tyrimui šlapime.
5. Ištirti 5-ių miRNR motininių genų (*MIR155HG/BIC*, *COPZ2*, *MIR137HG*, *MIR31HG* ir *GIPR*), atrinktų iš visuminės DNR metilinimo analizės, promotoriaus metilinimo būklės skirtumus ir nustatyti šių žymenų diagnostinę ir prognostinę vertę.
6. Ištirti miRNR taikinių (*DNMT1*, *KDM1A* ir *KDM5B*) raišką ir įvertinti sąsajas su miRNR motininių genų promotoriaus metilimu ir *TMPRSS2-ERG* raiška.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Šio tyrimo metu pirmą kartą Lietuvos PV ligonių imtyje buvo tiriamas DNR metilinimas, taikant tiek genomino masto, tiek ir konkrečių genų-taikinių analizės metodus. Tyrimui naudojant klinikinius mėginius (audinius ir šlapimą), atlikta analizė leido pagilinti iki šiol turėtas žinias apie lokalizuotą PV epigenetiniame lygmenyje. NSG, plačiai tiriamų įvairios lokalizacijos navikuose, promotoriaus metilinimas buvo analizuojamas Lietuvos PV imtyje ir susietas su klinikiniais-patologiniais rodikliais. Kadangi šie genai yra dažnai įtraukiami į įvairias, šiuo metu aktyviai kuriamas, molekulinę žymenų testines sistemas, šio tyrimo metu gauti rezultatai galėtų padėti pasirenkant labiausiai tinkamus žymenis konkrečiame klinikiniam kontekste.

Visuminis DNR metilinimo profiliavimas mikrogardelėmis, pirmą kartą atliktas Lietuvos imtyje, leido identifikuoti naujų potencialių žymenų rinkinį, kurie savo diagnostine ir/ ar prognostine verte galėtų net pranokti šiuo metu prieinamus testus. Taip pat parodyta, kad šių naujai identifikuotų genų promotoriaus metilinimas gali būti sėkmingai aptinkamas PV ligonių šlapime, kas rodo jų potencialias pritaikymo galimybes neinvaziniams tyrimams. Be to, pirmą kartą parodyta, kad geno *RASSF1* metilinimas galėtų būti prognostinis PV žymuo ligonių šlapime.

Pastebėti dažni metilinimo skirtumai miRNR koduojančių motininių genų srityse, atliekant mikrogardelėmis gautų duomenų analizę, paskatino išsamesnius tokių genų tyrimus. Iki šiol miRNR diagnostinis ir prognostinis potencialas daugiausia tyrinėtas miRNR raiškos lygmenyje. Šiame darbe parodyta, kad miRNR motininių genų promotoriaus metilinimo būklė turi nepriklausomą prognostinę vertę kaip išgyvenamumo be BCP žymuo. Be to, mir-155 motininio geno metilinimas PV mėginiuose buvo pirmą kartą susietas su šios miRNR raiškos nutildymu. Tai taip pat pirmas tyrimas, parodęs, kad lizino demetilazę 5B koduojančio geno (*KDM5B*) raiškos padidėjimas yra susijęs su mir-155 ir mir-137 motininių genų promotoriaus metilimu.

Atsižvelgiant į tai, kad kol kas žinoma tik labai ribotas PV žymenų skaičius, kurie potencialiai galėtų būti naudingi klinikinėje praktikoje, šio tyrimo metu gauti rezultatai

yra naujoviški ir daug žadantys. Tai pagrindžia ir faktas, kad miRNR motininių genų metilinimas kol kas daugiausia tirtas PV ląstelių linijose. Be to, remiantis šio tyrimo rezultatais, buvo pasiūlytas mir-137 motininio geno (*MIR137HG*) metilinimo vaidmuo, kaip papildomas reguliacinis lygmuo, formuojantis transmembraninę serino proteazę 2 koduojančio (*TMPRSS2*) ir su ETS transkripcijos veiksmu susijusio (*ERG*) genų susiliejimui (*TMPRSS2-ERG*). Nors yra reikalinga papildoma validacija, tyrimo metu gauti rezultatai yra perspektyvūs. Baltymus koduojantys ir miRNR motininiai genai, kuriuose naujai identifikuoti metilinimo skirtumai PV mėginiuose, galėtų būti patrauklūs taikiniai epigenetinei terapijai.

Ginamieji teiginiai

1. Genų *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* promotoriaus metilinimas yra pakankamą jautrumą ir vidutinį specifiškumą turintis molekulinis įrankis PV detekcijai ligonių prostatos audiniuose ir šlapime.
2. *RASSF1* metilinimas yra reikšmingas PV ligonių išgyvenamumo be BCP prognostinis žymuo, kuris, kartu su naviko stadija pT, galėtų būti naudojamas kaip neinvazinis įrankis ligonių, kuriems diagnozuotas *Gleason 6* navikas, stebėsenai.
3. Metilinimo pokyčiai baltymus koduojančiuose ir miRNR motininiuose genuose yra gausūs PV audiniuose ir pažeidžia specifinius biologinius ir molekulinis procesus, siejamus su vėžio vystymusi ir progresija.
4. Baltymus kodujančių genų *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* promotoriaus metilinimas yra labai jautrus ir specifiškas PV ir galėtų būti pritaikytas kaip diagnostinis įrankis.
5. Genų *PRKCB*, *CCDC181* ir *NAALAD2* promotoriaus metilinimas turi nepriklausomą prognostinę vertę PV ligonių išgyvenamumo be BCP trukmei ir galėtų padidinti patologinių rodiklių prognostinį potencialą.
6. Mir-155, mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimas yra specifiškas PV ir galėtų būti pritaikytas kaip diagnostinis žymuo.
7. Mir-155, mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimas turi nepriklausomą vertę prognozuojant PV ligonių išgyvenamumo be BCP trukmę ir galėtų padidinti patologinių rodiklių prognostinį potencialą.
8. Mir-137 motininio geno metilinimas galėtų būti priežastinis pokytis, lemiantis *TMPRSS2-ERG* susiliejimo formavimąsi PV audiniuose per padidėjusią *KDM1A* raišką.

Disertacijos apimtis ir struktūra

Disertacija yra parašyta anglų kalba. Ją iš viso sudaro 172 psl., iš kurių 30 psl. skirta priedams. Pagrindiniai skyriai: santrumpos, įvadas, literatūros apžvalga (39 psl.), mėginiai ir metodai (14 psl.), rezultatai (29 psl.), rezultatų aptarimas (16 psl.), išvados, pritaikomumas praktikoje, publikacijos ir prezentacijos, finansinė parama, *Curriculum vitae*, padėka, literatūros sąrašas (20 psl.). Disertacijoje pateikta 9 lentelės ir 36 paveikslai. Priedus sudaro 19 lentelių ir 9 paveikslai.

MĖGINIAI IR METODAI

Ligoniai ir mėginiai

Tyrimui atlikti buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (2007-11-23 Nr. 50; su pratęsimu 2011-09-07 Nr. 6B-11) ir visi į tyrimą įtraukti asmenys pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Šis darbas buvo plačios apimties PV žymenų tyrimo dalis ir mėginių rinkimo ir apdorojimo procedūros buvo vykdomos pagal standartizuotus protokolus, kaip nurodyta anksčiau [8-10].

Į šį tyrimą iš viso įtraukta 311 PV ir 35 gerybine prostatos hiperplazija (GPH) sergantys asmenys. Audinių mėginiai buvo surinkti iš 248 PV sergančių ligonių ir iš 17 GPH ligonių operacinės medžiagos, kurie gydyti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (buvusių Santariškių klinikų) Urologijos centre 2008–2014 m. Audinių pavyzdžiai buvo paimti ir vėžinių ląstelių kiekis procentais juose įvertintas Valstybiniame patologijos centre. Histologiškai nepakitę prostatos audiniai (NPA) surinkti iš 72 PV ligonių, įskaitant 35 šalia naviko esančius NPA. Šlapimas (~30 mL) surinktas prostatektomijos metu iš 253 PV ir 32 GPH ligonių. Į tyrimą neįtraukti ligoniai, kuriems prieš operaciją taikyta radioterapija, chemoterapija ar hormonų terapija.

Gleason balais navikų mėginiai buvo įvertinti, laikantis Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (angl. *International Society of Urological Pathology*, ISUP) 2005 m. rekomendacijų [11], ir ISUP laipsnių grupės buvo apibrėžtos pagal ISUP 2014 m. rekomendacijas [12]. Laikantis EAU-ESTRO-SIOG 2016 m. prostatos vėžio diagnostikos ir gydymo gairių¹, BCP buvo apibrėžta, kaip dviejų iš eilės prostatos specifinio antigeno (PSA) koncentracijų serume padidėjimas iki >0.2 ng/mL ir tolimesnis augimas [13]. Ligonų stebėsenos duomenys buvo atnaujinti 2016 m. kovo mėn. Iš visų į tyrimą įtrauktų asmenų, 90% (280 iš 311) turėjo išsamius stebėsenos duomenis (vidutinė ligonio stebėsenos trukmė 3,8±1,9 m.). Pirmojo tyrimų etapo duomenų analizė buvo atliekama, naudojant 2013 m. liepos mėn. stebėsenos duomenis.

Klinikiniai-patologiniai ir molekuliniai (*TMPRSS2-ERG*) ligonių rodikliai pagal tirtas grupes yra pateikti 1 lentelėje.

Mėginių paruošimas nukleorūgščių grynimui

Šaldyti prostatos audinių mėginiai (iki ~60 mg) buvo mechaniškai homogenizuoti, naudojant tissueTUBE TT1 mėgintuvėlius ir cryoPREP™ CP02 Impactor homogenizatorių (Covaris, Voburnas, JAV). Formalinu fiksuoti ir parafine impregnuoti (angl. *formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) ~4 mm³ audinių blokai buvo smulkiai supjaustomi ir deparafinizuojami tris kartus veikiant su 500 µL 100% ksileno (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija) 10 min 55 °C. Po to tris kartus pilama po 500 µL ≥96% etanolio (Carl Roth) ir inkubuojama 10 min 55 °C. Etanolio likučiai išgarinti 37 °C.

Šviežiai paimti šlapimo mėginiai buvo centrifuguojami 1000 rpm 15 min 4 °C (Hettich® Universal 320R Centrifuge, DJB Labcare, Bakingemšyras, Jungtinė Karalystė), surinktos nuosėdos du kartus praplautos 1× PBS ir resuspenduotos nedideliame kiekyje buferio saugojimui (-70 °C). Prieš lizės etapą, paruošti šlapimo mėginiai buvo papildomai praplauti 1× PBS.

¹ EAU – Europos urologų asociacija (angl. *European Association of Urology*), ESTRO – Europos radioterapijos ir onkologijos draugija (angl. *European Society for Therapeutic Radiology and Radiation Oncology*), SIOG – Tarptautinė geriatrinės onkologijos draugija (angl. *International Society of Geriatric Oncology*).

1 lentelė. Ligonų klinikiniai-patologiniai ir molekuliniai rodikliai.

Rodiklis	Visi atvejai			Metilinimo analizė FFPE audiniuose ¹		Metilinimo analizė šaldytuose audiniuose			Metilinimo analizė šlapime ¹		Genų raiškos analizė ²		miRNR raiškos analizė	
	PV ³ (N = 311)	NPA (N = 72)	GPH ⁴ (N = 35)	PV (N = 149)	Navikui gretimi NPA (N = 37)	PV (N = 129)	NPA (N = 35)	GPH (N = 17)	PV (N = 253)	GPH (N = 32)	PV (N = 81)	NPA (N = 25)	PV (N = 41)	NPA (N = 12)
Naviko stadija, N														
≤pT2	234	-	-	114	-	84	-	-	196	-	51	-	28	-
≥pT3	77	-	-	35	-	45	-	-	57	-	30	-	13	-
ISUP laipsnių grupė (<i>Gleason</i> balas), N														
I (3 + 3)	132	-	-	74	-	32	-	-	123	-	13	-	13	-
II (3 + 4)	119	-	-	50	-	70	-	-	89	-	48	-	22	-
III (4 + 3)	26	-	-	12	-	19	-	-	12	-	14	-	3	-
II ar III (7)	11	-	-	5	-	0	-	-	11	-	0	-	0	-
IV (8)	6	-	-	4	-	3	-	-	4	-	2	-	2	-
V (9)	5	-	-	2	-	3	-	-	2	-	3	-	0	-
Nežinoma	12	-	-	2	-	2	-	-	12	-	1	-	1	-
Vėžinių ląstelių kiekis audinio mėginyje, N														
90-100%	69	-	-	-	-	63	-	-	-	-	48	-	19	-
70-89%	30	-	-	-	-	30	-	-	-	-	24	-	5	-
50-69%	36	-	-	-	-	36	-	-	-	-	8	-	12	-
30-49%	5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	5	-
1-3%	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	0	-	0
0%	-	37	-	-	-	-	32	-	-	-	-	25	-	12
Nevertinta	149 ⁵	37 ⁵	-	149 ⁵	37 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCP statusas, N														
Yra (vidutinė trukmė iki BCP, mėn.)	66 (21) ⁶	23 (20) ⁶	-	36 (22)	12 (23)	32 (18)	12 (17)	-	52 (20)	-	30 (19)	7 (20)	11 (23)	2 (8)
Nėra (vidutinė stebėsenos trukmė, mėn.)	216 (44)	48 (54)	-	99 (43)	24 (46)	86 (39)	23 (57)	-	176 (39)	-	49 (42)	17 (58)	29 (50)	10 (48)
Nežinoma	29	1	-	14	1	11	0	-	25	-	2	1	1	0

1 lentelė. Tęsinys.

Rodiklis	Visi atvejai			Metilinimo analizė FFPE audiniuose ¹		Metilinimo analizė šaldytuose audiniuose			Metilinimo analizė šlapime ¹		Genų raiškos analizė ²		miRNR raiškos analizė	
	PV ³ (N = 311)	NPA (N = 72)	GPH ⁴ (N = 35)	PV (N = 149)	Navikui gretimi NPA (N = 37)	PV (N = 129)	NPA (N = 35)	GPH (N = 17)	PV (N = 253)	GPH (N = 32)	PV (N = 81)	NPA (N = 25)	PV (N = 41)	NPA (N = 12)
PSA, ng/mL														
Vidurkis±SN (intervalas)	9,0±9,4 [0,1; 84,2]	8,0±6,8 [2,5; 44,0]	8,9±12,2 [0,8; 69,8]	8,8±8,6 [0,9; 69,8]	7,6±4,9 [3,0; 24,0]	10,9±11,6 [2,5; 84,2]	9,3±8,5 [2,5; 44,0]	7,3±6,6 [0,8; 28,1]	8,7±9,4 [0,1; 84,2]	7,3±6,6 [0,8; 28,1]	10,8±9,4 [2,5; 44,0]	10,0±9,5 [2,5; 44,0]	11,6±14,7 [2,8; 84,2]	4,6±1,6 [2,6; 7,9]
Nežinoma	7	1	2	3	0	2	0	0	6	0	2	1	1	0
Prostatos masė, g														
Vidurkis±SN (intervalas)	52±25 [16; 197]	50±19 [16; 104]	-	54±25 [23; 186]	47±15 [26; 95]	48±17 [16; 123]	51±21 [16; 104]	-	53±26 [16; 197]	-	48±17 [16; 123]	48±20 [16; 104]	52±19,8 [26; 126]	58±27 [28; 104]
Nežinoma	4	1	-	1	1	0	0	-	3	-	0	0	1	0
TMPRSS2-ERG sulietinis transkriptas, N														
Yra	118	-	-	46	-	77	-	-	83	-	46	-	24	-
Nėra	71	-	-	36	-	44	-	-	55	-	26	-	17	-
Nežinoma	122	-	-	67	-	8	-	-	115	-	9	-	0	-
Amžius, m.														
Vidurkis±SN (intervalas)	62±7 [41; 82]	61±7 [46; 77]	72±8 [58; 83]	62±7 [43; 77]	61±6 [48; 77]	61±8 [41; 82]	62±7 [46; 74]	70±8 [59; 80]	62±7 [42; 82]	72±8 [58; 83]	61±8 [41; 82]	61±6 [48; 74]	62±8 [48; 73]	63±4 [57; 70]

BCP – biocheminė ligos progresija, FFPE – formalinu fiksuoti ir parafine impregnuoti mėginiai, PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija, PSA – prostatos specifinis antigenas, SN – standartinis nuokrypis.

¹Išgyvenamumo be BCP duomenys atnaujinti 2013 m. liepos mėn.

²Genų raiška taip pat buvo tiriama GPH audiniuose, įtrauktuose į „Metilinimo analizės šaldytuose audiniuose“ grupę.

³Audinių mėginiai iš viso buvo surinkti iš 248 ligonių.

⁴Audinių mėginiai iš viso buvo surinkti iš 17 ligonių.

⁵Vėžinių ląstelių kiekis FFPE audiniuose nebuvo vertinamas. Kai kuriais atvejais buvo turimi ir FFPE, ir šaldyti to paties ligonio audinių mėginiai.

⁶Dviem atvejais išgyvenamumo duomenys yra nepilni.

DNR gryninimas

Visiems mėginiams buvo taikomas tas pats DNR skyrimo protokolas, imant iki ~30 mg šaldyto homogenizuoto audinio, visą deparafinizuotą mėginį ir visą paruošto šlapimo mėginio tūrį. Mėginiai buvo veikiami proteinaze K (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva) ir 500 µL lizės buferio, skirto audiniams (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween-20; viskas iš Carl Roth) ar šlapimo mėginiams (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS, Carl Roth; 75 mM NaCl, Sigma-Aldrich, Sent Luisas, JAV), iki 18 h 55 °C. DNR gryninimui taikytas standartinis fenolio-chloroformo protokolas ir precipitacija etanoliumi. Visų mėginių koncentracija ir grynumas įvertinti NanoDrop™ 2000 spektrofotometru (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, JAV). Visuminei metilinimo analizei atrinktų mėginių kokybę papildomai patikrinta elektroforetiškai.

Bisulfitinė konversija

DNR (~400 ng) bisulfitinė konversija buvo atliekama rankiniu būdu pagal laboratorijos protokolą [14] ar naudojant EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, Irvinas, JAV) pagal gamintojo instrukcijas (išskyrus tai, kad pradinė inkubacija atliekama 42 °C 15 min). Modifikuota DNR buvo ištirpinta 40 µL sterilaus vandens ir iš karto tiriama ar saugoma -20 °C.

Visuminė DNR metilinimo analizė

DNR metilinimo mikrogardelės. Visuminei DNR metilinimo analizei buvo atrinkti 9 PV ir poriniai NPA audiniai. Tyrimas atliktas naudojant dvispalves Human DNA Methylation 1×244K (HD) mikrogardelės ir laikantis gamintojo protokolo G4170-90012 v2.1 (Agilent Technologies, Santa Klara, JAV). Duomenys deponuoti GEO duomenų bazėje (GSE89243; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Trumpai, 5 µg išgrynintos DNR buvo sonikuojama iki 150-900 bp fragmentų Bioruptor® sistema su aušinimo elementu (Diagenode, Lježas, Belgija), taikant aukšto intensyvumo režimą. Metilintos DNR imunoprecipitacijai (IP-DNR) naudota 5-metilcitozino (5-mC) monokloniniu antikūnu 33D3 (Diagenode) padengtos magnetinės dalelės (DynaBeads Pan Mouse IgG, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Karlsbadas, JAV). Imunoprecipitacija vykdyta 4 °C 18 h mėgintuvėlių vartyklėje (Cole-Parmer, Vernonhilsas, JAV). IP-DNR ir referentinė DNR (Ref-DNR) buvo gryninama fenolio-chloroformo mišiniu (Carl Roth), naudojant MaXtrack didelio tankio geliu užpildytus mėgintuvėlius (Qiagen, Valensija, JAV). IP-DNR ir Ref-DNR žymėjimas atliktas naudojant SureTag DNR žymėjimo rinkinį pagal gamintojo protokolą (Agilent Technologies). Mėginiai buvo hibridizuojami ant mikrogardelių (dizaino nr. 023795) 67 °C 40 h hibridizacijos krosnyje (Agilent Technologies). Iškart po hibridizacijos mikrogardelės buvo plaunamos buferių sistemoje ir skenuojamos Agilent G4900DA SureScan mikrogardelių skeneriu (Agilent Technologies).

Duomenų apdorojimas ir analizė. Visi mikrogardelių duomenys buvo normalizuoti pagal tą patį algoritmą. Prisotinti, netolygūs ar nutolę zondu signalai buvo pašalinti prieš atliekant tolimesnę analizę. Skaičiavimams buvo naudojami normalizuoti logaritmuoti fluorescencijos intensyvumo santykiai (Cy5/Cy3), parodantys IP-DNR/Ref-DNR kiekį. Zondu anotacijos pagal mikrogardelių dizaino identifikatorių paimtos iš SureDesign platformos (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>) ir atnaujintos pagal genomo

surinkimo versiją GRCh38, naudojantis UCSC genomine naršykle (<https://genome.ucsc.edu>). Zondai, kurių fluorescencija nenustatyta $\geq 30\%$ mėginių, buvo pašalinti. Prieš lyginant konkrečias grupes, papildomai buvo filtruojami zondai, paliekant tik tuos, kurie detektuoti visuose bent vienos grupės mėginiuose.

Tie patys mikrogardelių duomenys buvo naudojami miRNR motininių genų analizei. MiRNR anotacijos buvo paimtos iš miRBase duomenų bazės, 21 leidimo (<http://www.mirbase.org>). Apie 1% atsitiktinai atrinktų anotacijų buvo patikrinta rankiniu būdu. Zondai, nesusiję su miRNR, buvo pašalinti, o likusieji buvo filtruojami paliekant tik tuos, kurie detektuoti $>30\%$ mėginių.

Metilinimo skirtumas buvo apskaičiuojamas kartais (angl. *fold change*, FC) ir atitinkamai buvo naudojama porinis ar neporinis t-testas. Pagal griežtus rezultatų filtravimo parametrus ($FC \geq 1,5$ ir koreguota P vertė $<0,0500$), nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingai besiskiriančių zondų, todėl buvo taikytas negriežtas filtravimas ($FC \geq 1,2$ ar $FC \geq 1,5$, lyginant skirtingas grupes, ir nekoreguota P vertė $<0,0500$). Skaičiavimams ir rezultatų vizualizacijai naudotas GeneSpring™ GX v13.1.1 programinis paketas (Agilent Technologies).

Molekulinių atsako kelių analizė. Genų ontologijos (GO) analizė buvo atlikta BiNGO v3.0.3 įskiepiu [15] atviro kodo platformoje Cytoscape v3.2.1 [16]. Tik biologinio proceso kategorijai priklausantys GO terminai buvo įtraukti į analizę. Duomenų įvesčiai naudoti oficialūs genų simboliai, patvirtinti HUGO² genų nomenklatūros komiteto (HGNC; www.genenames.org). Lyginant nustatytų skirtingai metilintų genų grupes, GO terminai buvo gauti naudojantis BiNGO ir tikrinami hipergeometriniu testu, taikant Benjamini-Hochberg (FDR) korekciją daugybiniam testavimui ($q < 0,01$).

Genų rinkinių praturtinimo analizė (angl. *gene set enrichment analysis*, GSEA) buvo atlikta internetiniu GSEA įrankiu ir naudojant MSigDB v5.2 duomenų bazėje (<http://software.broadinstitute.org/gsea>) esančią pagrindinių genų rinkinių kolekciją [17]. Rezultatai laikyti reikšmingais, kai $q < 0,05$. Vizualizacijai naudota Qlucore Omics Explorer v3.3 programa (bandomoji licencija; Qlucore, Lundas, Švedija).

Kokybinė metilinimui jautri PGR

Bisulfitu konvertuoja DNR buvo naudojama konkrečių genų analizei metilinimui jautrios PGR metodu (MSP). Pradmenys buvo parinkti iš ankstesnių publikacijų [18-23] ar sukurti Methyl Primer Express v1.0 programa (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Reakcijos mišinio sudėtis pateikta 2 lentelėje. Termociklinimo programą sudarė 35-39 ciklai, pradmenų prijungimas vykdytas esant 55-67 °C. Į kiekvieną reakciją buvo įtraukiama teigiama metilinta (MK), teigiama nemetilinta (NK) kontrolės ir reakcijos mišinio be matricos (angl. *no-template control*, NTC) šulinėliai. Produktai analizuoti 3% agarozės gelyje, paruoštame naudojant 1× TAE buferį (Thermo Scientific™).

Kiekybinė metilinimui jautri PGR

Pradmenų ir hidrolizės zondų sekos kiekybinei MSP reakcijai buvo parinktos iš publikacijų [19,24-26] arba sukurtos programomis Methyl Primer Express® v1.0 ar MethPrimer v1.0 (<http://www.urogene.org/methprimer/index.html>). Endogeninės

² HUGO – Žmogaus genomo organizacija (angl. *Human Genome Organisation*).

kontrolės genas (*ACTB*) buvo naudojamas pradinio DNR kiekio normalizavimui. Kiekvienas genas buvo tiriamas atskirai, trijuose šulinėliuose. Genų *RARB*, *GSTP1*, *RASSF1* ir *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12* tyrimui naudota Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X), ROX atskirai (Thermo Scientific™) ir TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems™) reagentai. Reakcijos mišinio sudėtis pateikta 3 lentelėje. Amplifikacija vykdyta Mx3005P sistema (Agilent Technologies). Termociklinimo programą sudarė 10 min 95 °C, 50 ciklų po 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C. Rezultatai apdoroti MxPro v4.0 programa (Agilent Technologies). Į kiekvieną reakciją buvo įtraukiamos MK ir NTC kontrolės. Metilintos DNR kiekis procentais (angl. *percentage of methylated reference*, PMR) apskaičiuotas pagal $\Delta\Delta Cq$ algoritimą [27].

2 lentelė. Kokybinės metilinimui jautrios PGR reakcijos mišinio sudėtis vienam mėginiui.

Reakcijos komponentas	Galutinė koncentracija/ kiekis	
	Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase rinkinys (Thermo Scientific™)	AmpliAq Gold® DNA Polymerase rinkinys (Applied Biosystems™)
10x PGR buferis	1x	1x
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM
16 mM dNTP mišinys	0,4 mM kiekvieno	0,4 mM kiekvieno
100 μM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys	1 μM kiekvieno	0,5 μM kiekvieno
Karšto starto Taq DNR polimerazė	0.05 U/μL	0,05 U/μL
360 GC priedas	–	1 μL
Bisulfitu konvertuota DNR	10-20 ng	10-20 ng
Sterilus vanduo	Iki 25 μL	Iki 25 μL

3 lentelė. Kiekybinės metilinimui jautrios PGR reakcijos mišinio sudėtis vienam šulinėliui.

Reakcijos komponentas	Galutinė koncentracija/ kiekis	
	Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X), ROX atskirai (Thermo Scientific™)	TaqMan® Universal Master Mix II rinkinys be UNG (Applied Biosystems™)
2x reakcijos mišinys	1x	1x
10 μM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys	0,3 μM kiekvieno	0,3 μM kiekvieno
100 μM hidrolizės zondas	50 nM	50 nM
5 μM ROX	30 nM	[yra 2x reakcijos mišinio sudėtyje]
Bisulfitu konvertuota DNR	~10 ng	~10 ng
Sterilus vanduo	Iki 20 μL	Iki 20 μL

RNR gryninimas

Visuminė RNR (įskaitant miRNR frakciją) buvo gryninama mirVana™ miRNA Isolation rinkiniu (Ambion®, Thermo Fisher Scientific) pagal anksčiau aprašytą protokolą [8,9]. Trumpai, RNR gryninta iš ~30 mg homogenizuoto audinio mėginio, eliucijai naudota 100 μL rinkinio sudėtyje esančio eliucijos buferio. Išskirtos RNR koncentracija įvertinta NanoDrop™ 2000 spektrofotometru. RNR integralumo įverčiai (angl. *RNA integrity number*, RIN), nustatyti 2100 Bioanalyzer sistema ir naudojant RNA 6000 Nano rinkinį (Agilent Technologies), buvo $\geq 7,0$ (vidutiniškai 8,3; nuo 7,0 iki 9,7). Mėginiai saugoti -80 °C iki tolimesnio tyrimo.

Genų raiškos analizė kiekybinės PGR metodu

Komplementarios DNR (kDNR) sintezei naudota 250 ng RNR. Atvirkštinė transkripcija (AT) vykdyta High-Capacity cDNA Reverse Transcription rinkiniu su RNazių inhibitoriumi pagal gamintojo protokolą (Applied Biosystems™).

Penkių baltymus koduojančių (*PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *NAALAD2*, *ZMIZ1*), trijų miRNR taikinių (*DNMT1*, *KDM1A*, *KDM5B*) ir endogeninės kontrolės (*HPRT1*) geno raiška įvertinta kiekybinės PGR metodu, naudojant komercinius TaqMan® zondų ir pradmenų rinkinius (atitinkamai Hs00176998_m1, Hs00221792_m1, Hs00229594_m1, Hs01119919_m1, Hs00277476_m1, Hs00945900_g1, Hs01002741_m1, Hs00981910_m1, and Hs02800695_m1; Applied Biosystems™). Reakcijos mišinį (20 µL) sudarė 10 µL TaqMan® Universal Master Mix II be UNG mišinio, 0,6 µL pradmenų ir 2 µL kDNR produkto. Amplifikacija vykdyta Mx3005P sistema, trijuose šuliniuose kiekvienam genui. Programą sudarė 10 min 95 °C, 40 ciklų po 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C. Į kiekvieną reakciją įtrauktos NTC kontrolės kiekvienam genui. Duomenų analizė vykdyta GenEx v6.0.1 programa (MultiD Analyses, Geteborgas, Švedija). Skaičiavimams naudotos santykinės genų raiškos vertės tiesinėje skalėje.

MiRNR raiškos analizė

Neapdoroti miRNR raiškos duomenys buvo paimti iš ankstesnio tyrimo, kuriame buvo tirti tos pačios PV imties mėginiai, naudojant TaqMan® mažo tankio gardeles Human MicroRNA A+B v3.0 (Applied Biosystems™) [8]. Duomenys peranalizuoti GenEx v6.0.1 programa. Trūkstamos amplifikacijos ciklo (Cq) vertės prilygintos 40. MiR-155-5p, miR-152-3p, miR-137 ir miR-31-5p raiška buvo normalizuota pagal RNU44 ir RNU48, kaip rekomenduojama gamintojo, ir konvertuota į santykinės vertės tiesinėje skalėje.

Vėžio genomo atlaso projekto prostatos vėžio kohorta

Viešai prieinami Vėžio genomo atlaso projekto (angl. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA) prostatos vėžio imties (PRAD) duomenys naudoti Lietuvos imtyje nustatytų reikšmingų sąsajų patvirtinimui. Analizei naudoti klinikinių-patologinių rodiklių duomenys, pateikti TCGA PRAD publikacijoje [2]. Visuminio DNR metilinimo profiliavimo, genų ir miRNR raiškos 3-io lygmens duomenys paimti iš cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) ir methHC (<http://methhc.mbc.nctu.edu.tw>) duomenų portalų 2016 m. liepos mėn. Iš viso į analizę įtraukta 333 PV ir 19 NPA mėginių.

Statistinė analizė

Statistiniai skaičiavimai atlikti STATISTICA™ v8.0 (StatSoft, Tulsa, JAV) ir GraphPad Prism v5.03 programomis (GraphPad Software, Lojola, JAV). Dvipusis Fišerio tikslusis ar Kruskalio-Voliso testai taikyti kategorinių kintamųjų lyginimui, o Stjudento t testas ar Mano-Vitnio U testas – tolydžiųjų kintamųjų lyginimui. Asociacijos tarp dviejų kiekybinių kintamųjų įvertintos apskaičiuojant Pirsono (R_p) ir/ ar Spirmeno (R_s) koreliacijos koeficientus. Genų ir miRNR raiškos bei TCGA duomenims analizuoti buvo taikomi parametriniai testai. Išgyvenamumo analizė atlikta lyginant Kaplano-Mejerio kreives logranginiu testu bei vertinant Kokso proporcingos rizikos modelius. Atliekant daugiamatę analizę, į modelius buvo įtraukiama ≤ 4 kovarianntės. Skirtumai ir asociacijos laikyti statistiškai reikšmingais, kai $P < 0,0500$.

REZULTATAI

Prostatos vėžio DNR metilinimo žymenų tyrimai buvo vykdomi dviem etapais. Pirmojo etapo metu keletas NSG, kurių metilinimo pokyčiai ankstesnių, kitų autorių tyrimų metu nustatyti įvairiuose navikuose, buvo atrinkti promotoriaus metilinimo analizei PV audiniuose. Didžiausią potencialą turėję genai, kaip neinvaziniai žymenys, toliau analizuoti PV ligonių šlapime. Nors gauti rezultatai buvo perspektyvūs, palyginti žemas šių žymenų metilinimo dažnis ir specifiškumas PV Lietuvos imtyje paskatino naujų žymenų, turinčių geresnius rodiklius, paiešką. Todėl antrasis tyrimų etapas buvo orientuotas į naujų žymenų, turinčių aukštesnius rodiklius, identifikavimą ir validaciją, įvertinant diagnostinį ir prognostinį šių žymenų potencialą. Visi šiame tyrime analizuoti genai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Šiame tyrime analizuotų genų sąrašas.

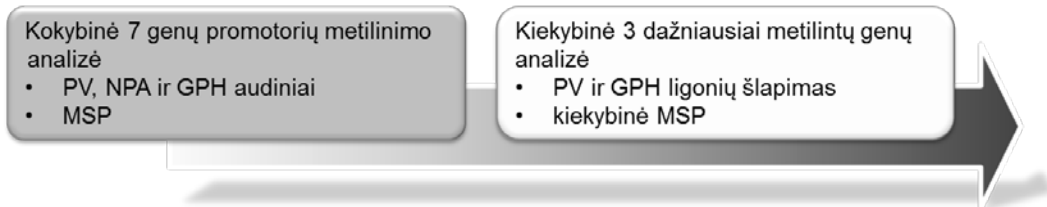
Nr.	Geno simbolis	Geno pavadinimas	Genominės koordinatės GRCh38.p7 (grandinė)	Tyrimas
1	<i>RARB</i>	Retinoinės rūgšties receptorius β	Chr3:24829323..25597932 (+)	Metilinimas
2	<i>GSTP1</i>	Glutationo S transferazė π 1	Chr11:67583595..67586653 (+)	Metilinimas
3	<i>RASSF1</i>	Ras asociacijos domeną turintis genas1	Chr3:50329786..50340936 (-)	Metilinimas
4	<i>MGMT</i>	O-6-metilguanino DNR metiltransferazė	Chr10:129467184..129770983 (+)	Metilinimas
5	<i>DAPK1</i>	Su ląstelės mirtimi susijusi baltymų kinazė 1	Chr9:87497228..87708634 (+)	Metilinimas
6	<i>p14^{ARF}/ CDKN2A*</i>	Nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitorius 2A (4 transkriptas, koduojantis p14arf baltymą)	Chr9:21967752..21995043 (-)	Metilinimas
7	<i>p16^{INK4a}/ CDKN2A*</i>	Nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitorius 2A (1 transkriptas, koduojantis p16ink4a baltymą)	Chr9:21967752..21995043 (-)	Metilinimas
8	<i>ACTB</i>	β aktinas	Chr7: 5527148..5530601 (-)	Metilinimas (EK)
9	<i>PRKCB</i>	Proteinkinazė β	Chr16:23835979..24220611 (+)	Metilinimas, genų raiška
10	<i>CCDC181/ C1orf114</i>	Susivijusios spiralės domeną turintis 181	Chr1:169394870..169462221 (-)	Metilinimas, genų raiška
11	<i>ADAMTS12</i>	ADAM metalopeptidazė su trombospondino 1 tipo 12 motyvu	Chr5:33523535..33892180 (-)	Metilinimas, genų raiška
12	<i>ZMIZ1</i>	Cinko pirštų, MIZ tipo, motyvą turintis 1	Chr10:79068994..79316528 (+)	Metilinimas, genų raiška
13	<i>NAALAD2</i>	N-acetilinta α susijusi rūgštinė dipeptidazė 2	Chr11:90131694..90193577 (+)	Metilinimas, genų raiška
14	<i>HPRT1</i>	Hipoksantino fosforiboziltransferazė 1	ChrX: 134460145..134500668 (+)	Genų raiška (EK)
15	<i>FILIP1L</i>	Panašus į su filaminu A sąveikaujantį baltymą	Chr3:99833144..100114513 (-)	Metilinimas
16	<i>KCTD8</i>	Kalio kanalo tetramerizacijos domeną turintis 8	Chr4:44173903..44448885 (-)	Metilinimas
17	<i>EPAS1</i>	Endotelio PAS domeną turintis baltymas 1	Chr2:46297402..46386703 (+)	Metilinimas
18	<i>NEK9</i>	Su NIMA susijusi kinazė 9	Chr14:75082115..75127075 (-)	Metilinimas
19	<i>CD44</i>	CD44 molekulė (indų kraujo grupė)	Chr11:35138870..35232402 (+)	Metilinimas
20	<i>MIR137HG</i>	<i>MIR137</i> motininis genas	Chr1:97988000..98049693 (-)	Metilinimas, miRNR raiška
21	<i>MIR155HG/ BIC/ MIRHG2</i>	<i>MIR155</i> motininis genas	Chr21:25562145..25575168 (+)	Metilinimas, miRNR raiška
22	<i>COPZ2</i>	Koatomero baltymų komplekso subvienetas ζ 2	Chr17:48026167..48048091 (-)	Metilinimas, miRNR raiška
23	<i>GIPR/ PGQTL2</i>	Skrandžio inhibitorinio polipeptido receptorius	Chr19:45668187..45683724 (+)	Metilinimas
24	<i>MIR31HG</i>	<i>MIR31</i> motininis genas	Chr9:21454268..21559698 (-)	Metilinimas, miRNR raiška
25	<i>DNMT1</i>	DNR metiltransferazė 1	Chr19:10133344..10195135 (-)	Genų raiška
26	<i>KDM1A/ LSD1</i>	Lizino demetilazė 1A	Chr1:23019443..23083691 (+)	Genų raiška
27	<i>KDM5B/ JARID1B</i>	Lizino demetilazė 5B	Chr1:202725185..202809470 (-)	Genų raiška

EK – endogeninė kontrolė.

*1 ir 4 transkriptai, koduojantys p16INK4a ir p14ARF baltymus, turi skirtingus pirmus egzonus ir skirtingus transliacijos pradžios kodonus, kas lemia visiškai skirtingus atviro skaitymo rėmelius.

NAVIKĄ SLOPINANČIŲ GENŲ DNR METILINIMO ANALIZĖ

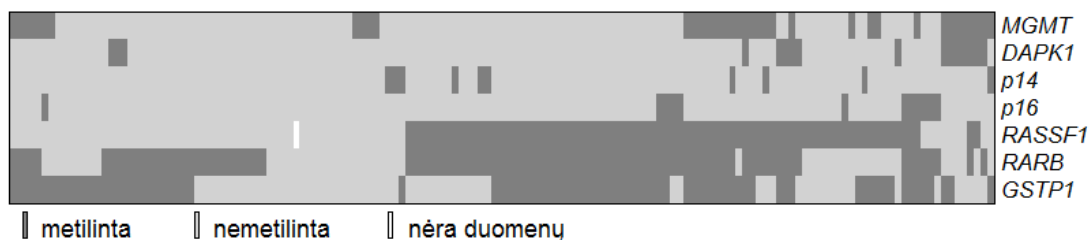
Pirmojo tyrimų etapo metu vykdyta 7-ių NSG promotorių DNR metilinimo analizė (*RARB*, *GSTP1*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1*, *p16* ir *p14*) FFPE audinių grupėje (PV ir šalia naviko esančių NPA). Šaldyti GPH audiniai buvo įtraukti į tyrimą kaip papildoma kontrolinė grupė. Trys dažniausiai navikuose metilinti genai, t.y. *RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*, buvo kiekybiškai tiriami PV ir GPH ligonių šlapime (1 pav.).



1 pav. Naviką slopinančių genų, kaip prostatos vėžio (PV) žymenų, analizės etapų schema. NPA – nepakitę prostatos audiniai, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija, MSP – metilimumui jautri PGR.

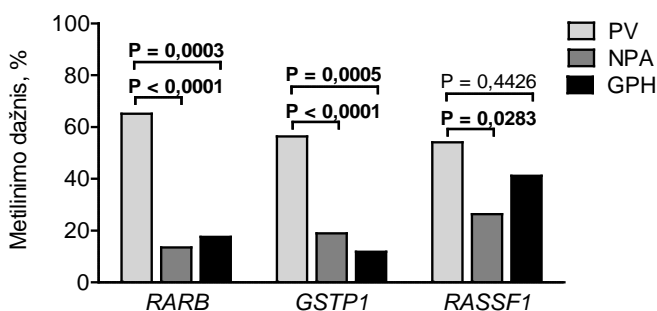
Naviką slopinančių genų DNR metilinimo analizė prostatos audiniuose

Pirmiausia, TSG metilinimas buvo tiriamas PV mėginiuose (2 pav.). Didžiausias metilinimo dažnis nustatytas *RARB* (97 iš 149; 65,1%), *GSTP1* (84 iš 149; 56,4%) bei *RASSF1* (80 iš 148; 54,1%) ir palyginus rečiau *MGMT* (38 iš 149; 25,5%), *DAPK1* (16 iš 149; 10,7%), *p16* (12 iš 149; 8,1%) ir *p14* (10 iš 149; 6,7%) promotorių srityse. Bent vieno geno metilinimas nustatytas 90,6% PV mėginių (135 iš 149).



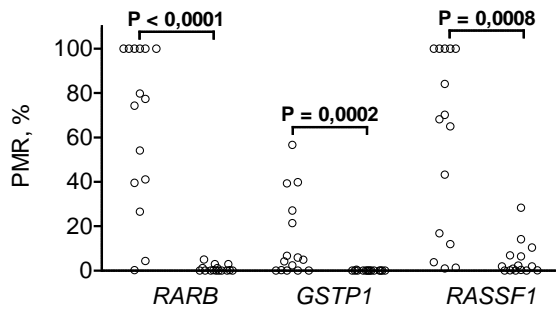
2 pav. *RARB*, *GSTP1*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1*, *p16* ir *p14* metilinimo profilis PV mėginiuose.

RARB ir *GSTP1* metilinimo dažniai NPA ir GPH buvo mažesni, lyginant su PV (visi $P < 0,0500$), o *RASSF1* atveju reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp dažnių PV ir NPA grupėse ($P = 0,0283$; 3 pav.). Tyrimo jautrumas pagal *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* buvo 85,2% (127 iš 149), o specifiškumas siekė 62,2% (23 iš 37) ir 47,1% (8 iš 17) atitinkamai pagal NPA ir GPH. Be to, kiekybinė šių trijų genų analizė atsitiktinai atrinktuose 15 PV ir 15 GPH mėginių parodė aukštesnius metilinimo lygius PV (visi $P < 0,0500$; 4 pav. A).



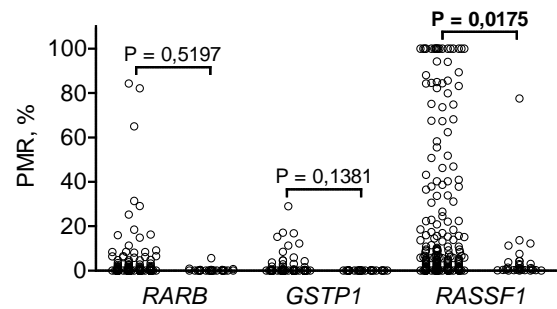
3 pav. *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* metilinimo dažniai prostatos audiniuose. PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija. Reikšmingos P vertės paryškintos.

A



Histologija	PV	GPH	PV	GPH	PV	GPH
Vidurkis/	66.49/	0.92/	13.91/	0.03/	57.70/	4.94/
SP, %	9.38	0.40	4.76	0.03	10.52	2.02

B



Histologija	PV	GPH	PV	GPH	PV	GPH
Vidurkis/	2.20/	0.28/	0.58/	0.01/	19.26/	4.78/
SP, %	0.58	0.18	0.18	0.01	1.99	2.43

4 pav. *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* metilinimo intensyvumo lygiai (PMR) prostatos vėžiui (PV) ir gerybine prostatos hiperplazija (GPH) sergančių ligonių mėginiuose. A – metilinimo lygiai PV ir GPH audiniuose; B – metilinimo intensyvumas PV ir GPH ligonių šlapime. Žemiau pateikti metilinimo lygio vidurkiai su standartine vidurkio paklaida (SP). Reikšmingos P vertės paryškintos.

***RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1* metilinimo analizė šlapime**

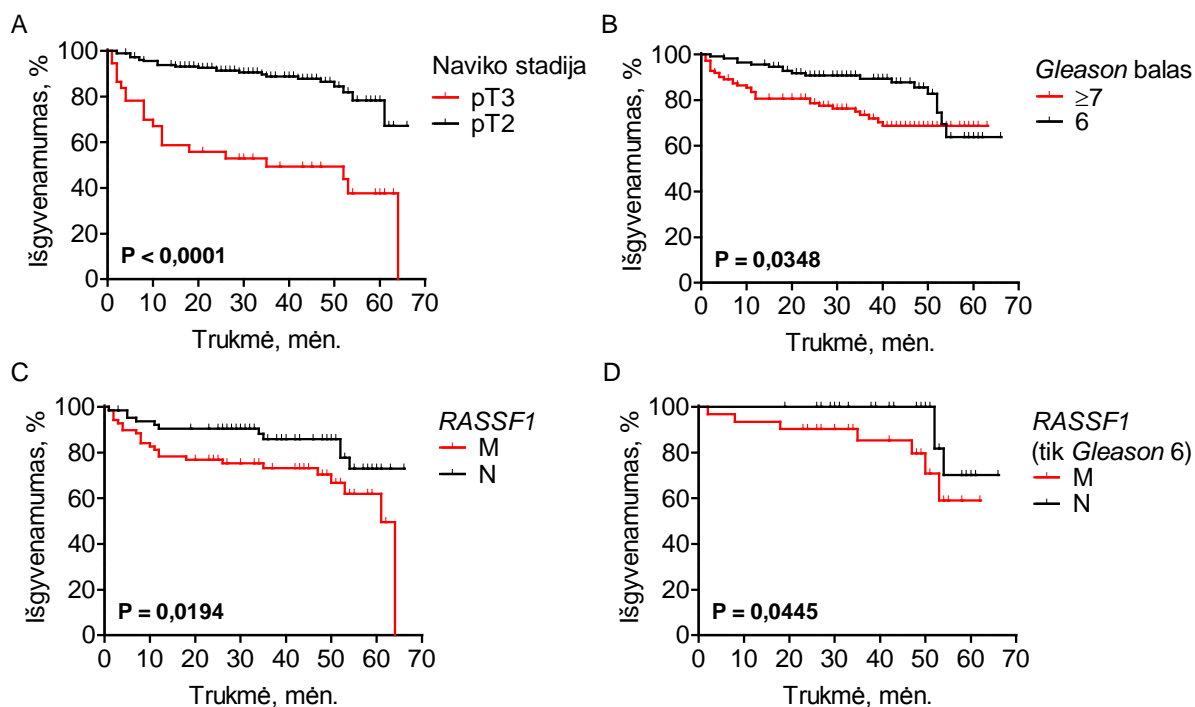
RARB, *GSTP1* ir *RASSF1* metilinimas buvo vertinamas kiekybiniu MSP metodu 253 PV ir 32 GPH ligonių šlapimo mėginiuose. PV ligonių šlapime PMR vertės buvo aukštesnės nei GPH, tačiau tik *RASSF1* atveju skirtumas buvo reikšmingas (4 pav. B). Kiekvieno geno vidutinė PMR vertė GPH ligonių šlapime buvo laikoma slenkstine, vertinant promotoriaus metilinimo būklę kokybiškai. *RASSF1* metilinimas nustatytas 44,7% (113 iš 253) PV šlapimo mėginių, o kitų genų metilinimo dažnis buvo mažesnis (29,2%, 74 iš 253 ir 11,1%, 28 iš 253 atitinkamai *RARB* ir *GSTP1*). Bent vieno iš trijų genų metilinimas nustatytas 60,1% šlapimo mėginių (152 iš 253), o tyrimo specifiškumas siekė 68,8% (22 iš 32).

Naviką slopinančių genų metilinimo sąsajos su klinikiniais-patologiniais ir molekuliniais rodikliais

PSA koncentracija buvo patikimai aukštesnė esant *RASSF1* metilinimui ($P = 0,0098$). Dažnesnis *GSTP1* metilinimas nustatytas pažengusios stadijos bei aukštesniu Gleason balu įvertintuose navikuose (atitinkamai $P = 0,0190$ ir $P = 0,0072$). PV ligonių šlapime *GSTP1* metilinimas taip pat buvo dažnesnis ($P = 0,0073$) ir intensyvesnis ($P = 0,0059$), esant Gleason ≥ 7 navikui. Reikšmingų sąsajų tarp genų metilinimo ir *TMPRSS2-ERG* raiškos ar ligonių amžiaus nenustatyta.

Naviką slopinančių genų metilinimas ir biocheminė ligos progresija

PV mėginiuose *RASSF1* buvo dažniau metilintas tais atvejais, kai ligoniui nustatyta BCP, lyginant su neprogresavusiais atvejais ($P = 0,0305$). Palyginus Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreives, nustatyta vėlesnės stadijos, aukštesnio Gleason balo ir *RASSF1* metilinimo navikuose sąsajos su BCP (visi $P < 0,0500$; 5 pav. A-C). *RASSF1* metilinimas buvo susijęs su didesniu BCP dažniu, kai ligoniui diagnozuotas Gleason 6, bet ne Gleason ≥ 7 navikas (5 pav. D). Vienmačiuose Kokso modeliuose *RASSF1* ir *DAPK1* metilinimas turėjo nepriklausomą prognostinę vertę (P1 lentelė).

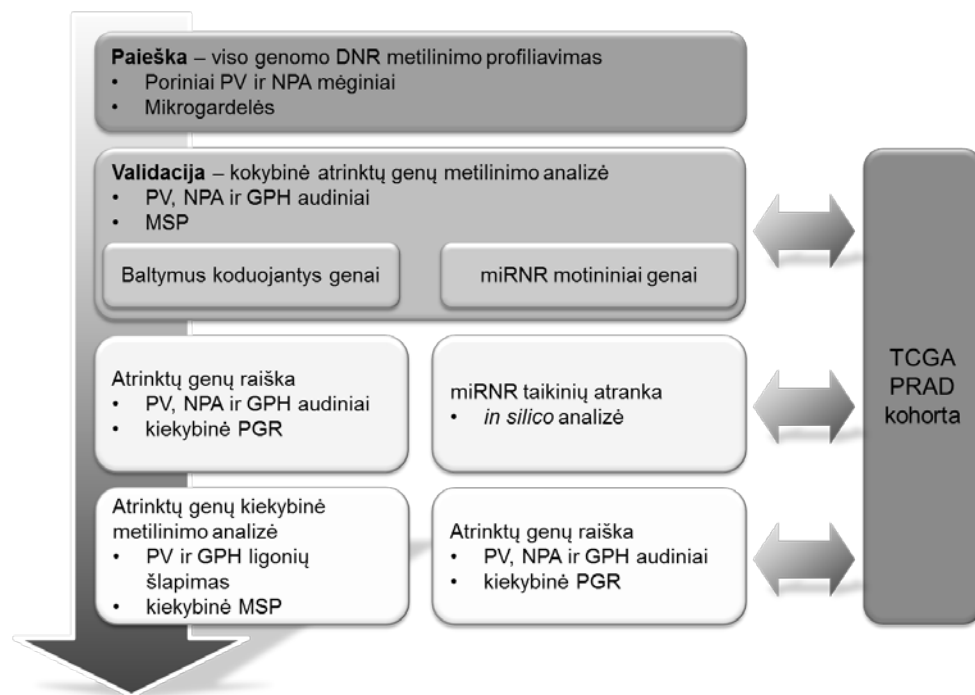


5 pav. Kaplano-Mejerio kreivės pagal naviko stadiją pT (A), *Gleason* balą (B), *RASSF1* metilinimo būklę prostatos navikuose (C) ir *RASSF1* metilinimo būklę tik *Gleason* 6 navikuose (D). M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Daugiamatėje analizėje pT buvo reikšmingas išgyvenamumo be BCP rodiklis, tačiau nei vienas iš tirtų metilinimo žymenų neturėjo nepriklausomos prognostinės vertės. Analizuojant PV ligonių, kuriems diagnozuotas *Gleason* 6 navikas, audinius ir šlapimo mėginius, *RASSF1* metilinimas ir pT sudarė daugiamatį modelį laikui iki BCP prognozuoti (P1 lentelė).

NAUJŲ PROSTATOS VĖŽIO DNR METILINIMO ŽYMENŲ IDENTIFIKAVIMAS

Antrasis tyrimų etapas buvo orientuotas į naujų PV žymenų, turinčių didesnę diagnostinę ir/ ar prognostinę vertę, paiešką ir jų validaciją. Visuminei DNR metilinimo analizei buvo atrinkta 9 ligonių, turinčių išsamią ligos istoriją, poriniai PV ir NPA mėginiai. Palyginus metilinimo profilį pagal audinio histologiją ir BCP būklę, 15 genų – 10 baltymus koduojančių ir 5 miRNR motiniai – buvo atrinkta tolimesnei metilinimo analizei. Perspektyviausių 5 baltymus koduojančių genų ir 4 miRNR raiška susieta su atitinkamų genų promotoriaus metilinimu. Trijų atrinktų baltymus koduojančių genų metilinimas buvo kiekybiškai įvertintas ligonių šlapime. Atlikta trijų miRNR, kurių motininių genų metilinimas buvo dažnas PV, taikinių analizė *in silico* ir atrinkti trys genai raiškos analizei, iš kurių kiekvienas gali būti valdomas dviejų iš atrinktų trijų miRNR. TCGA PRAD duomenys buvo naudojami gautų rezultatų validacijai nepriklausomoje antroje imtyje (6 pav.).

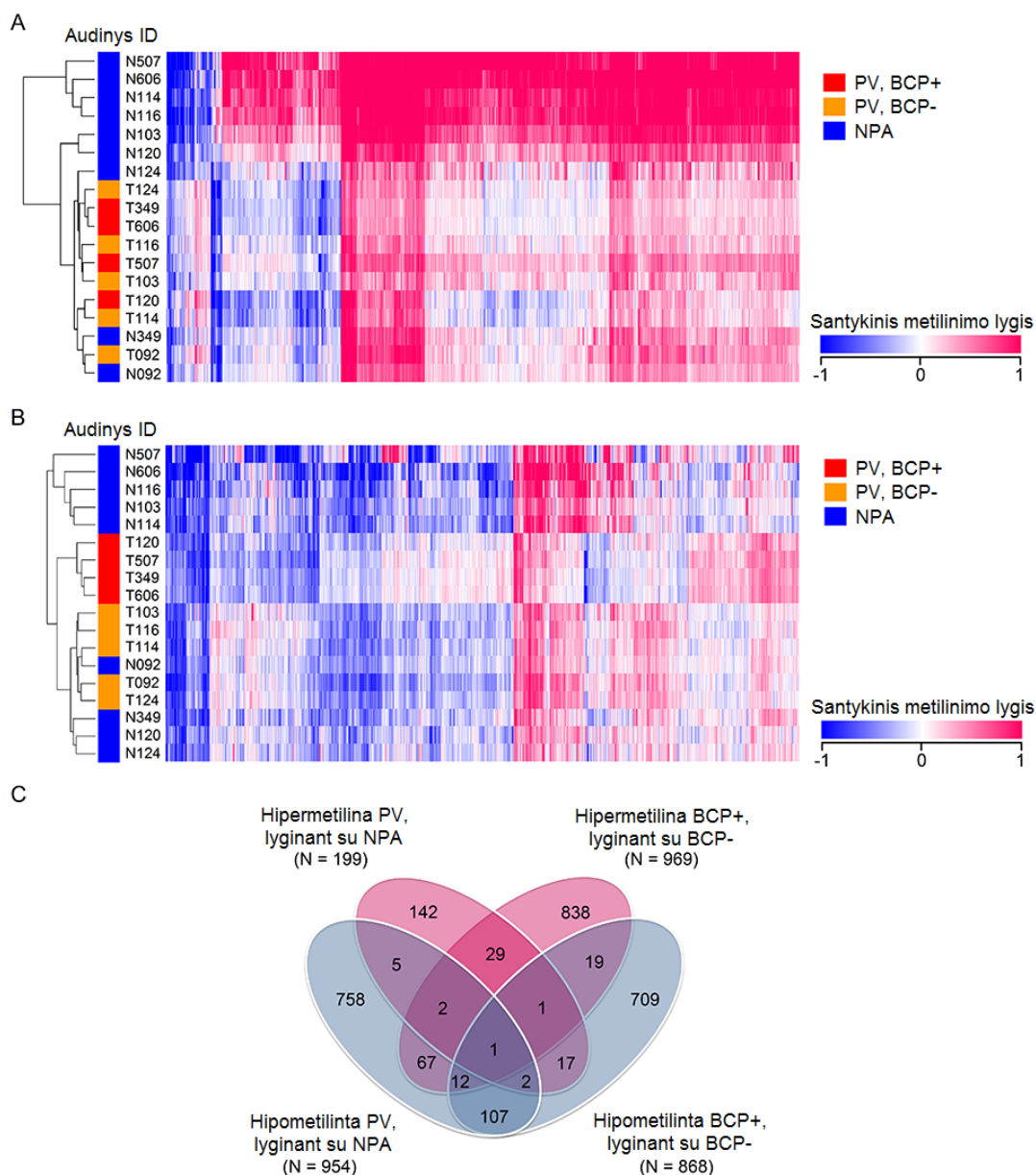


6 pav. Naujų prostatos vėžio (PV) žymenų paieškos ir validacijos etapų schema. NPA – nepakitę prostatos audiniai, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija, TCGA – Vėžio genomo atlaso projektas, PRAD – TCGA prostatos vėžio imtis, MSP – metilinimui jautri PGR.

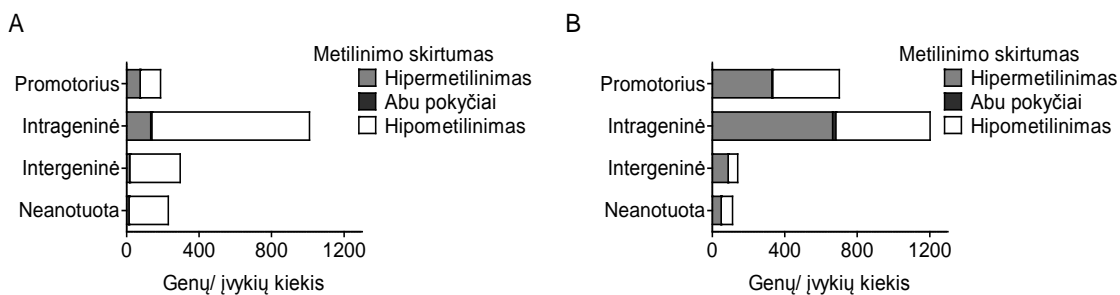
Visuminė DNR metilinimo analizė

Siekiant įvertinti epigenetinių pokyčių mastą PV, atlikta 9 PV ir NPA mėginių porų visuminė DNR metilinimo profilio analizė (7 pav.). Lyginant PV ir NPA, reikšmingi metilinimo skirtumai ($FC \geq 1,5$, $P < 0,0500$) nustatyti 1143 genuose, iš kurių 199 genai (17,4%) buvo hipermetilinti ir 954 (83,5%) hipometilinti, įskaitant 10 genų (0,9%), turėjusių abiejų tipų pokyčių (7 pav. A ir C). Intrageninėse srityse hipometilintų genų buvo žymiai daugiau nei hipermetilintų (atitinkamai 87,3% ir 13,4%) ir panaši tendencija stebėta promotoriaus srityse (atitinkamai 59,9% ir 40,1%; 8 pav. A). Palyginti mažesnės amplitudės skirtumai buvo nustatyti tarp atvejų su BCP ir be BCP, todėl reikšmingų skirtumų ($P < 0,0500$) identifikavimui taikyta $FC \geq 1,2$ (7 pav. B). Skirtingas metilinimo lygis nustatytas 1804 genuose, iš kurių 969 (53,7%) buvo hipermetilinti ir 868 (48,1%) hipometilinti, įskaitant 33 sutampančius genus (1,8%; 7 pav. C). Progresavusiuose PV atvejuose hipermetilinimas promotoriaus srityse buvo dažnesnis nei hipometilinimas (atitinkamai 53,2% ir 47,6%), o intrageninėse srityse stebėta priešinga tendencija (atitinkamai 44,8% ir 56,8%; 8 pav. B). Trisdešimt trys hipermetilinti genai ir 122 hipometilinti genai buvo nustatyti abiejuose grupių lyginimuose (t.y. PV vs. NPA, su BCP vs. be BCP; 7 pav. C). Metilinimo skirtumų rasta ir intergeninėse srityse (8 pav. A ir B).

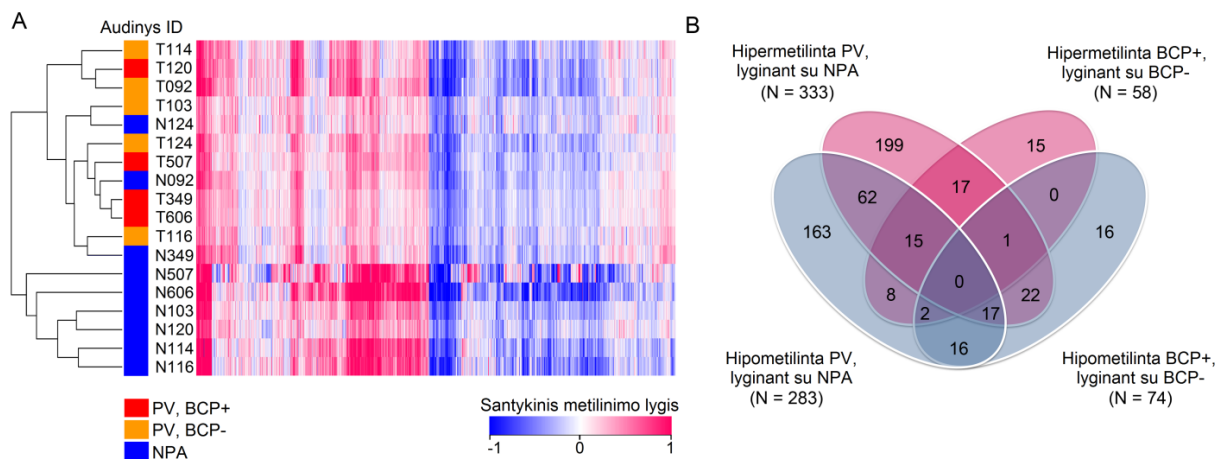
Pagal naudotų mikrogardelių dizainą 7,1% biologinių zondu (16853 iš 237203) buvo susiję su miRNR motininiais genais, kurie iš viso apėmė 88,6% miRNR genų (1248 iš 1409), persidengiančių su kitais genais (9 pav. A). Iš 978 identifikuotų miRNR motininų genų 917 (93,8%) buvo baltymus koduojantys, likusią dalį sudarė 40 (4,1%) nekoduojančių RNR genų ir 20 (2,0%) neapibrėžto tipo genų. Dauguma miRNR genų buvo lokalizuoti baltymus koduojančiuose genuose, konkrečiau – jų intronuose (80,3%, 736 iš 917).



7 pav. DNR metilinimo profilis pagal skirtingai metilintus genus tarp lyginamųjų grupių. A – metilinimo profilis, lyginant prostatos vėžio (PV) ir nepakitusių prostatos audinių (NPA) mėginius; B – metilinimo profilis, lyginant atvejus su ir be biocheminės ligos progresijos (atitinkamai BCP+ ir BCP-); C – Veno diagrama, parodanti besiskyrusių pagal metilinimą genų skaičių lyginamosiose grupėse. ID – mėginio identifikacinis numeris.



8 pav. DNR metilinimo skirtumai pagal genomines sritis, lyginant prostatos navikus su nepakitusiaisiais prostatos audiniais (A) ir lyginant atvejus su biochemine ligos progresija (BCP) ir be BCP (B).



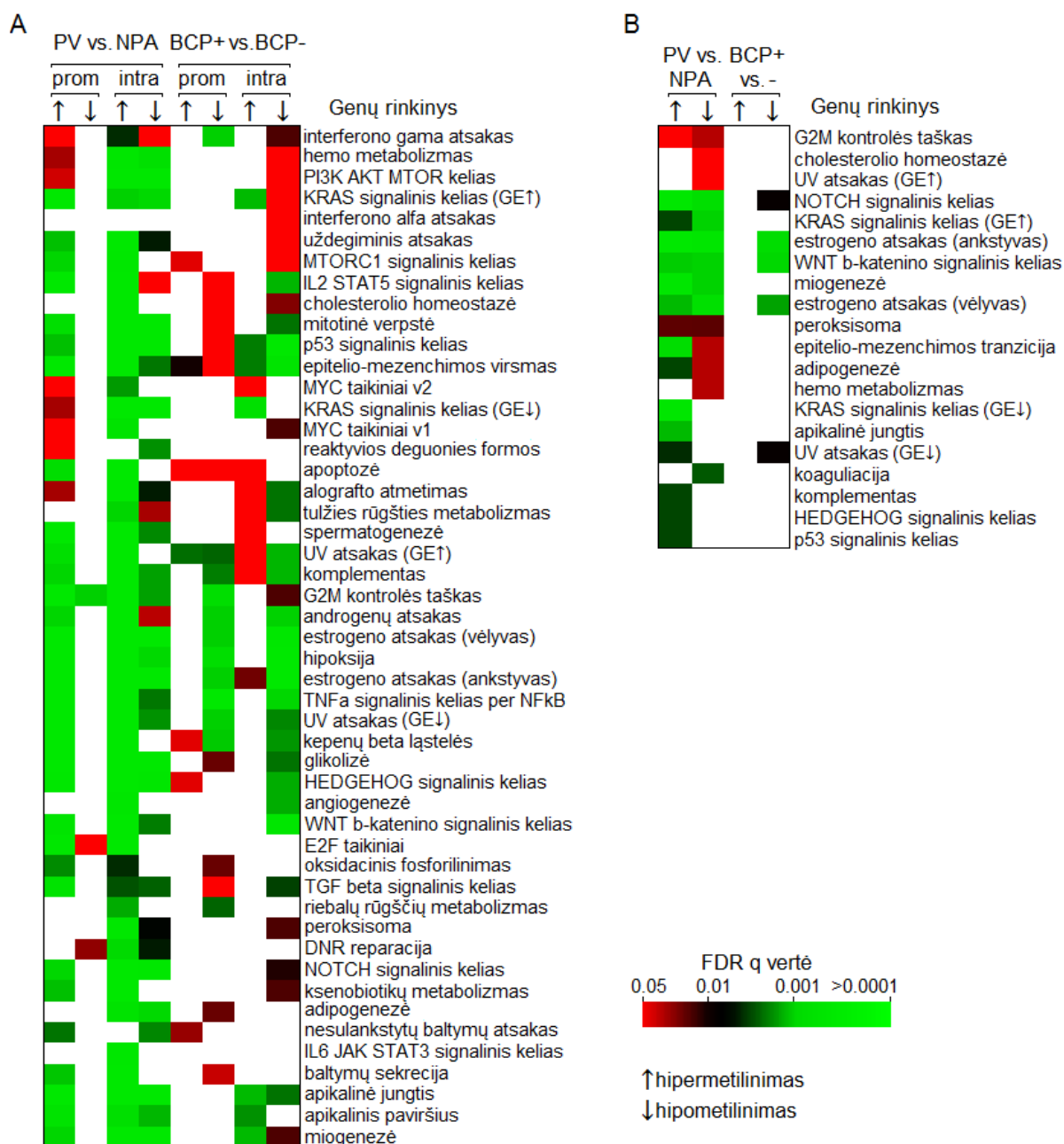
9 pav. DNR metilinimo skirtumai pagal miRNR motininius genus, identifikuotus mikrogardelių analizės metu. A – DNR metilinimo profilis pagal visus su miRNR motininiais genais susijusius zondus; B – Veno diagrama, parodanti besiskyrusių pagal metilinimą miRNR motininių genų skaičių lyginamosiose grupėse. PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, BCP+/BCP- – atvejai atitinkamai su ar be biocheminės ligos progresijos, ID – mėginio identifikacinis numeris.

Lyginant PV ir NPA mėginius, reikšmingi metilinimo skirtumai ($FC \geq 1,2$; $P < 0,0500$) nustatyti 522 miRNR motininiuose genuose, iš kurių 333 buvo hipermetilinti ir 283 hipometilinti, įskaitant 94 sutampančius genus. O lyginant atvejus su BCP ir be BCP, metilinimo skirtumų rasta 129 miRNR motininiuose genuose ($FC \geq 1,2$; $P < 0,0500$), iš kurių 58 buvo hipermetilinti ir 74 hipometilinti, įskaitant 3 sutampančius (9 pav. B).

Funkcinių terminų praturtinimo analizė

Siekiant atskleisti molekulinis procesus, kurie galėtų būti nulemti genų metilinimo pokyčių, buvo atliekama biologinių procesų kategorijai priklausančių GO terminų analizė. Lyginant PV ir NPA bei atvejus su BCP ir be BCP, nustatytas GO terminų, susijusių su įvairiais vėžio vystymosi metu vykstančiais procesais, praturtinimas. Skirtingai tarp grupių metilinti genai buvo susiję su ląstelės diferenciacija, mirtimi, atsaku į hormoninį stimulą, genų raiškos reguliacija ir kitais procesais (duomenys nepateikti).

Norint detaliau išsiaiškinti molekulinis mechanizmus, vykstančius prostatos kancerogenezės ir progresijos metu, buvo atlikta GSEA. Su ląstelės ciklo reguliacija, atsaku į estrogeną susiję genų rinkiniai buvo tarp labiausiai praturtintų, lyginant PV ir NPA (10 pav. A). Reikšmingai aukštesnis metilinimo lygis buvo genų, kurių raiška sumažėja kaip atsakas į ultravioletinę spinduliuotę (UV) bei susijusių su epiteliomezenchimos tranzicija (EMT), o metilinimo lygio sumažėjimas buvo dažnas tarp genų, susijusių su mitotine verpste ar atsaku į estrogeną. Panašūs genų rinkiniai (t.y. susiję su EMT, atsaku į UV) buvo praturtinti hipermetilintų genų, lyginant atvejus su BCP ir be BCP, o tarp susijusių su hipoksija, atsaku į androgenus ar estrogeną genų buvo dažnas hipometilinimas (10 pav. A). Analizuojant skirtingai metilintus miRNR motininius genus, nustatytas reikšmingas atsako į estrogeną ir WNT signalinių kelių praturtinimas hipometilintais genais, lyginant PV ir NPA bei atvejus su BCP ir be BCP (10 pav. B).

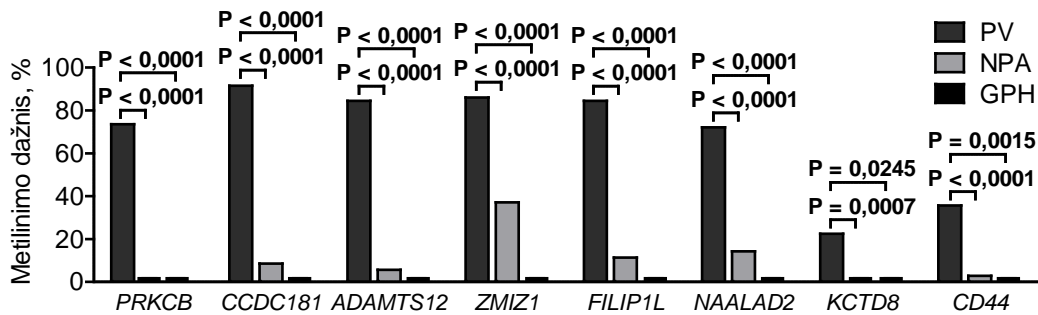


10 pav. Genų rinkinių praturtinimo analizė (GSEA). A – genų rinkiniai, praturtinti skirtingai metilintų genų tarp lyginamų grupių; B – genų rinkiniai, praturtinti skirtingai metilintų miRNR motininių genų tarp lyginamų grupių. Į analizę įtraukti genai, kurių metilinimo skirtumas tarp grupių buvo $\geq 1,2$. Naudoti MSigDB pagrindinės kolekcijos genų rinkiniai (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>). PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, BCP+/- – atvejai atitinkamai su ar be biocheminės ligos progresijos, GE↑/ GE↓ – padidėjusios/ sumažėjusios raiškos genai, prom – promotoriaus sritys, intra – intrageninės sritys.

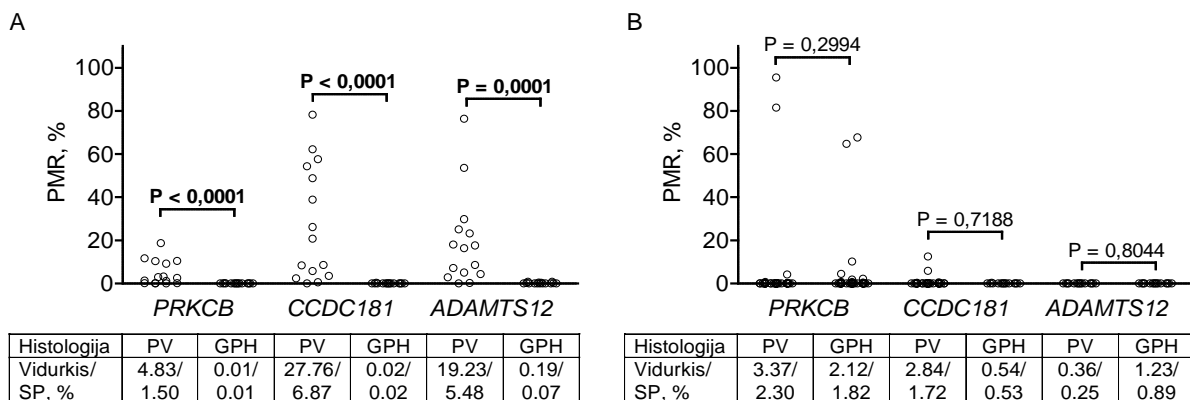
Baltymus koduojančių genų promotoriaus DNR metilinimo analizė

Remiantis nustatytais metilinimo skirtumais tarp PV ir NPA bei atvejų su BCP ir be BCP, tolimesniam tyrimui iš visuminės DNR metilinimo mikrogardelių analizės atrinkti 9 genai: *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, *NAALAD2*, *KCTD8*, *EPAS1* ir *NEK9*. Palyginimui taip pat įtrauktas genas *CD44*, remiantis ankstesnių publikacijų duomenimis [28].

Aukštesni *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, *NAALAD2*, *KCTD8* ir *CD44* promotoriaus metilinimo dažniai nustatyti PV mėginiuose (nuo 22,5% iki 91,5%), lyginant su NPA (nuo 0% iki 37,1%) ar GPH (0% visų genų atveju; visi $P < 0,0500$; 11 pav.). Jautrumas PV pagal genus *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* buvo 94,6% (122 iš 129), o specifiškumas siekė 88,6% (31 iš 35) ir 100% (17 iš 17) atitinkamai pagal NPA ir GPH. Be to, kiekybinė analizė parodė, kad šių trijų genų metilinimo lygis atsitiktinai atrinktuose PV mėginiuose buvo aukštesnis nei GPH (visi $P \leq 0,0001$; 12 pav. A). *EPAS1* ir *NEK9* promotoriaus metilinimas nenustatytas nei viename iš ištirtų 51 PV ir 15 NPA mėginių, todėl tolimesnis jų tyrimas nebuvo tęsiamas.



11 pav. Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo dažniai prostatos navikuose (PV), nepakitusiuose prostatos audiniuose (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) mėginiuose. Reikšmingos P vertės paryškintos.



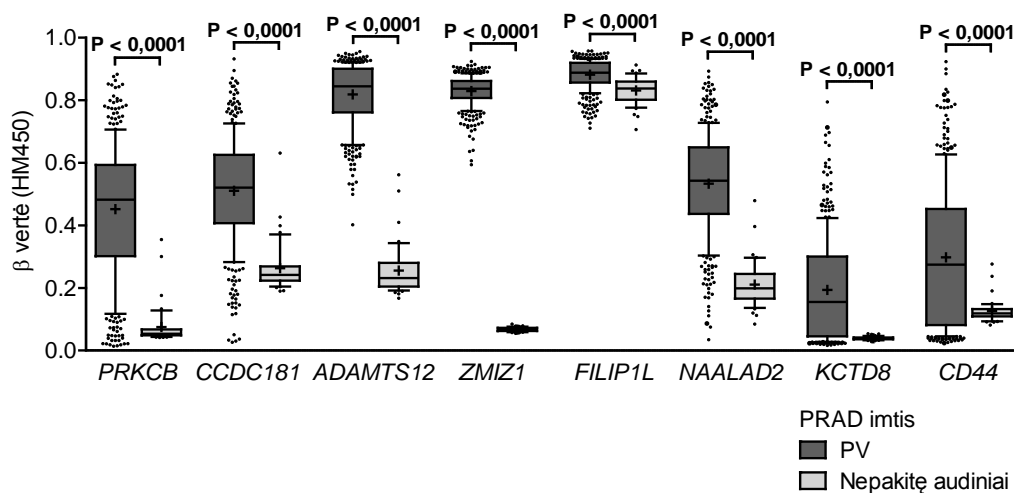
12 pav. *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* metilinimo intensyvumo lygiai (PMR) prostatos vėžiu (PV) ir gerybine prostatos hiperplazija (GPH) sergančių ligonių mėginiuose. A – metilinimo intensyvumas PV ir GPH audiniuose; B – metilinimo intensyvumas PV ir GPH ligonių šlapime. Žemiau pateikti metilinimo intensyvumo vidurkiai su standartinė vidurkio paklaida (SP). Reikšmingos P vertės paryškintos.

Atitinkamai gautiems duomenims, visų 8 genų aukštesni metilinimo lygiai buvo nustatyti PV, lyginant su NPA, TCGA PRAD imtyje (visi $P < 0,0001$; 13 pav.). *KCTD8* ir *CD44* metilinimo lygiai (atitinkamai vidutinės β vertės 0,26 ir 0,15) buvo žemesni nei kitų genų (vidutinės β vertės $\geq 0,48$). Be to, *FILIP1L* metilinimas buvo palyginti aukštas normaliuose prostatos audiniuose (vidutinė β vertė 0,84; 13 pav.).

Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais ir *TMPRSS2-ERG* raiška

Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo dažniai buvo palyginti su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais ir *TMPRSS2-ERG* raiškos buvimu.

NAALAD2 metilinimo dažnis reikšmingai didėjo esant aukštesnei ISUP laipsnių grupei ($P = 0,0291$). *ADAMTS12*, *ZMIZ1* ir *KCTD8* buvo dažniau metilinti \geq pT3 nei pT2 navikuose (visi $P < 0,0500$). *PRKCB*, *ADAMTS12*, *KCTD8* ir *CD44* metilinimo dažniai buvo aukštesni navikuose, kuriuose nustatyta *TMPRSS2-ERG* raiška (visi $P < 0,0500$). Š sąsają su prostatos mase ar ligonių amžiumi nenustatyta (neparodyta).



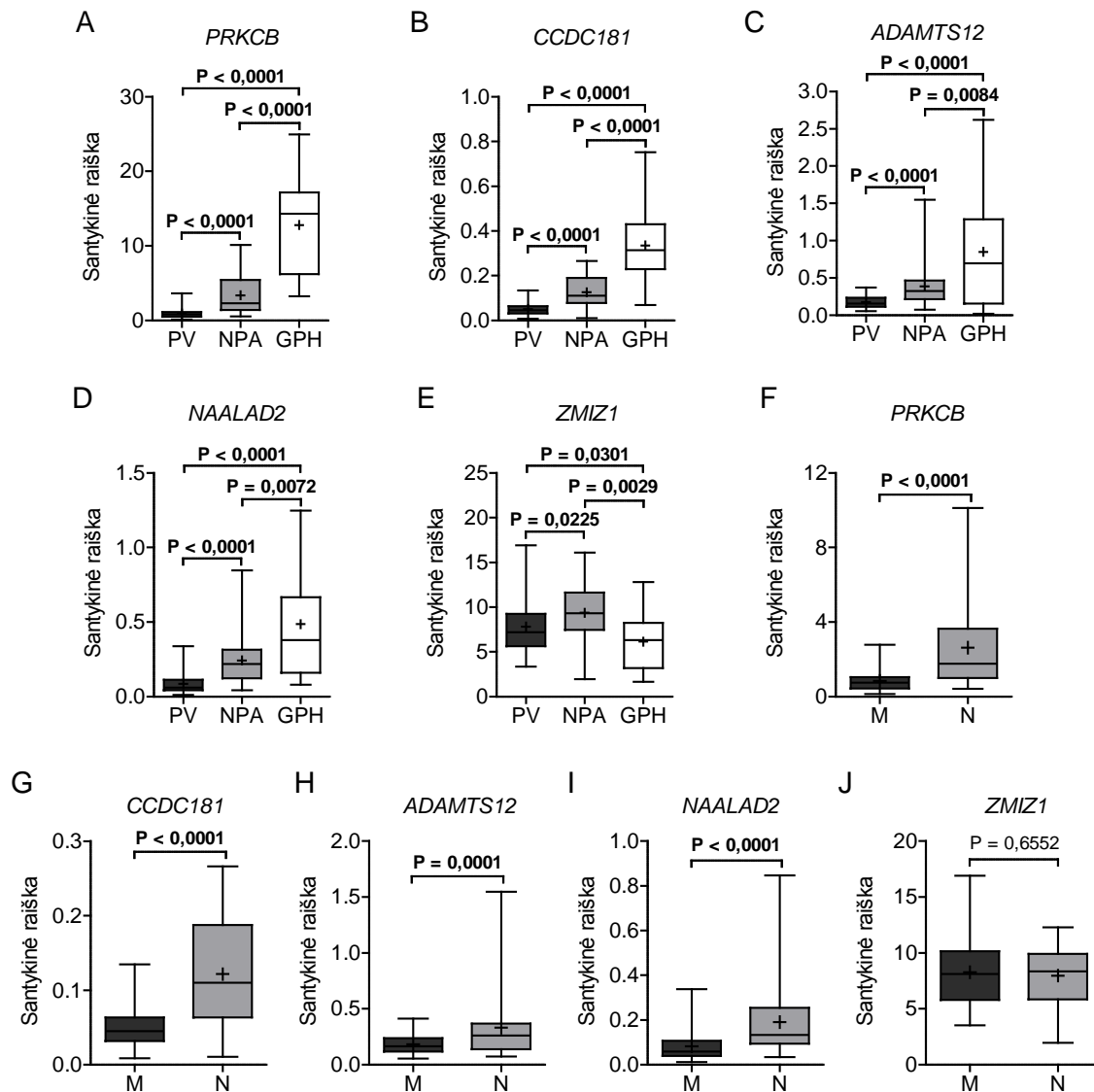
13 pav. Baltymus koduojančių genų DNR metilinimo lygiai Vėžio genomo atlaso projekto (TCGA) prostatos vėžio (PV) imtyje (PRAD) [2]. Trečio lygmens DNR metilinimo duomenys, gauti Illumina HumanMethylation450K (HM450) naujos kartos sekvenavimo sistema, buvo panaudoti analizei. Dėžutė iliustruoja 25-75 percentilius, vidurinė linija – medianą, pliuso ženklas – vidurkį, „ūšai“ – 10-90% intervalą, nukrypę duomenys vaizduojami taškais. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Baltymus koduojančių genų raiška bei sąsajos su promotoriaus metiliniu ir klinikiniais-patologiniais rodikliais

Remiantis promotoriaus metilinimo dažniais bei atsižvelgiant į sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto buvimu, toliau buvo analizuojama *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *NAALAD2* ir *ZMIZ1* genų raiška. *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* raiška navikuose buvo žemesnė nei NPA ar GPH mėginiuose (visi $P < 0,0500$; 14 pav. A-D). *ZMIZ1* raiška PV audiniuose buvo žemesnė nei NPA, bet aukštesnė nei GPH (visi $P < 0,0500$; 14 pav. E). Žemesnė *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* raiška PV ligonių audiniuose koreliavo su šių genų promotoriaus metiliniu (visi $P \leq 0,0001$; 14 pav. F-I), tačiau tokia sąsaja nebuvo nustatyta *ZMIZ1* atveju ($P > 0,0500$; 14 pav. J).

Atitinkamai, TCGA PRAD imtyje mažesnė *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* raiška nustatyta navikuose, lyginant su normaliais audiniais (visi $P < 0,0500$), bet analogiška sąsaja *ZMIZ1* atveju nebuvo patvirtinta ($P > 0,0500$). Be to, žemesnis *PRKCB*, *CCDC181* ir *ZMIZ1* raiškos lygis koreliavo su aukštesniu metilinimo intensyvumu (visi $P < 0,0500$), tačiau *ADAMTS12* ir *NAALAD2* atveju toks ryšys nenustatytas ($P > 0,0500$; neparodyta).

Lietuvos imtyje mažesnė *CCDC181* ir *NAALAD2* raiška buvo susijusi su aukštesne ISUP laipsnių grupe (abu $P < 0,0500$). Aukštesnė *CCDC181* raiška nustatyta navikuose, kuriuose vyko ir *TMPRSS2-ERG* raiška ($P = 0,0136$). Š sąsają tarp tirtų genų raiškos ir naviko stadijos pT, PSA koncentracijos ar prostatos masės nebuvo, tačiau *NAALAD2* raiška teigiamai koreliavo su ligonių amžiumi ($P = 0,0153$; neparodyta).



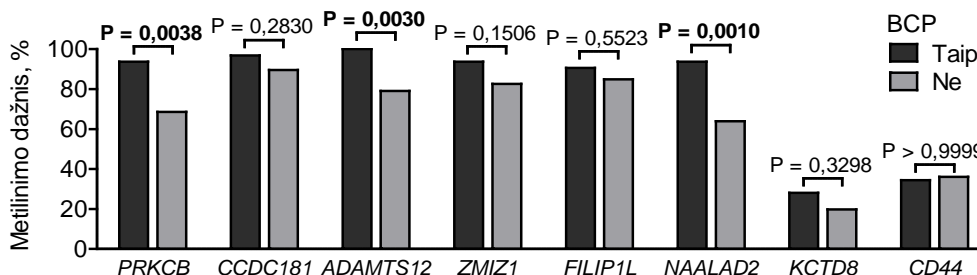
14 pav. Baltymus koduojančių genų santykiniai raiškos lygiai prostatos audiniuose. A-E – genų raiška prostatos vėžio (PV), nepakitusių prostatos audinių (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) audiniuose; F-J – genų raiška PV sergančių ligonių audiniuose pagal metilintą/ nemetilintą atitinkamų genų promotoriaus būklę (atitinkamai M/ N). Dėžutė iliustruoja 25-75 percentilius, vidurio linija – medianą, pliuso ženklas – vidurkį, „ūšai“ rodo intervalą. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo kiekybinė analizė šlapime

PRKCB, *CCDC181* ir *ADAMTS12* buvo atrinkti kiekybinei metilinimo analizei šlapime. Visų trijų genų metilinimas sėkmingai nustatytas PV šlapime (N = 54) ir buvo žemesnio lygio ar visai nedetektuojamas GPH atveju (N = 17), tačiau skirtumai nebuvo reikšmingi (visi $P > 0,0500$; 12 pav. B). Kaip ir analizuojant žinomus naviką slopinančius genus, vidutinės PMR vertės GPH grupėje buvo laikomos ribinėmis, vertinant šių genų metilinimą šlapime kokybiškai. *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* metilinimas atitinkamai buvo nustatytas 5,6% (3 iš 54), 14,8% (8 iš 54) ir 3,7% (2 iš 54) PV šlapimo mėginių. Bendras šio tyrimo jautrumas buvo 14,8% (8 iš 54), o specifiškumas siekė 88,2% (15 iš 17). Sąsajų tarp genų metilinimo intensyvumo ar dažnio šlapime ir ligonių klinikinių-patologinių rodiklių nenustatyta (neparodyta).

Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo prognostinė vertė

Siekiant nustatyti naujai identifikuotų genų, kurių promotoriaus metilinimas specifinis vėžiui, prognostinę vertę, buvo atlikta PV ligonių išgyvenamumo be BCP analizė. *PRKCB*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* buvo dažniau metilinti esant BCP (visi $P < 0,0100$; 15 pav.).



15 pav. Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo dažniai prostatos navikuose pagal biocheminės ligos progresijos (BCP) būklę. Reikšmingos P vertės paryškintos.

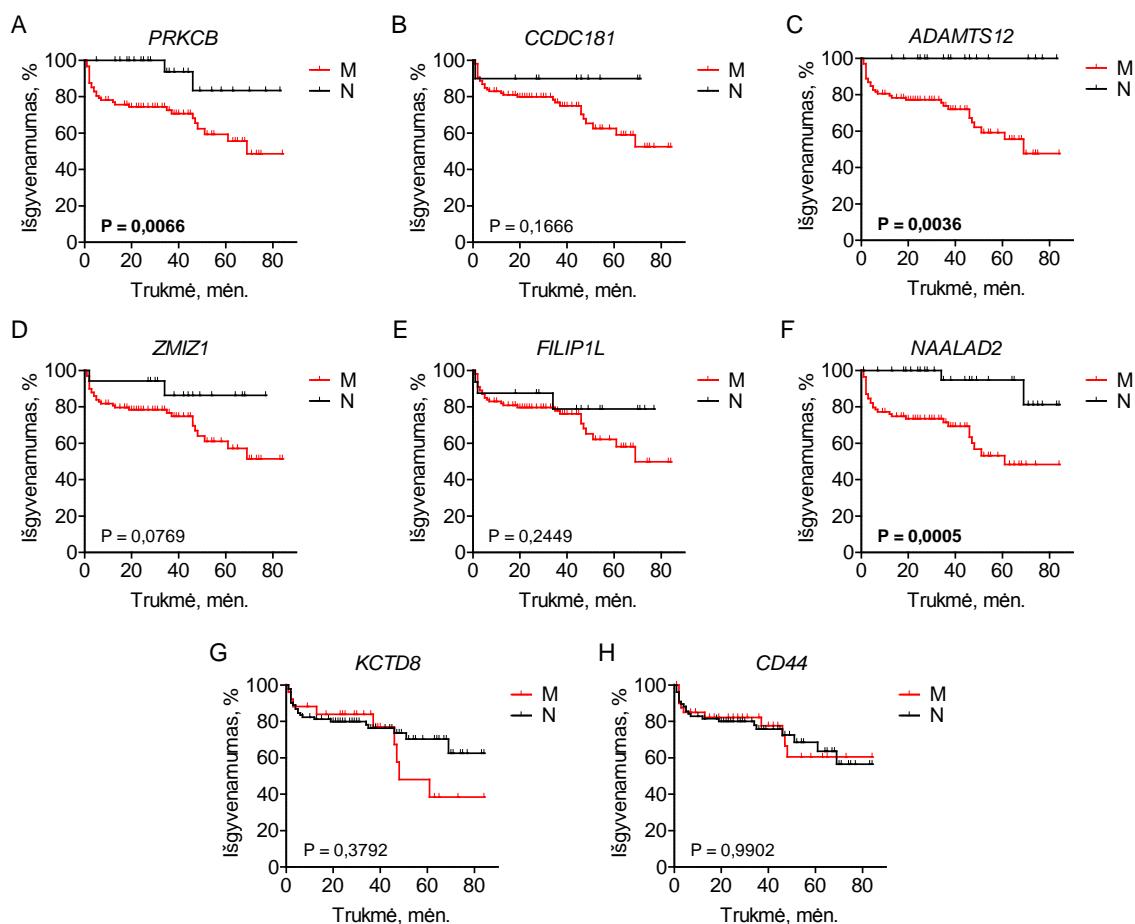
Kaplano-Mejerio kreivių palyginimas parodė ankstyvesnę ligos progresiją, esant *PRKCB*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* genų promotoriaus metilinimui (visi $P < 0,0100$), kitų genų sąsajos su išgyvenamumu be BCP nenustatytos (16 pav.). Šių trijų genų nepriklausoma prognostinė vertė buvo pagrįsta vienmačiais ir daugiamačiais Kokso modeliais, tačiau tik *NAALAD2* rodė prognostinį potencialą ir geno raiškos lygmenyje (visų modelių $P < 0,0500$). Be to, *PRKCB*, *CCDC181* ir *NAALAD2* promotoriaus metilinimas turėjo nepriklausomą prognostinę vertę modeliuose su *TMPRSS2-ERG* būkle (visų modelių $P < 0,0500$). *PRKCB* ir *NAALAD2* metilinimas modeliuose su pT (abiejų modelių $P < 0,0001$) pranoko patologinio rodiklio vienmačiame modelyje prognostinę vertę. *NAALAD2* atveju analogiška asociacija nustatyta su ISUP laipsnių grupe ($P < 0,0001$; P2 ir P3 lentelės).

Kiekybinė genų *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* metilinimo analizė PV ligonių šlapime sąsają su BCP neparodė (neparodyta).

TCGA PRAD imtyje prognostinis žymenų potencialas buvo vertinamas pagal ligonių išgyvenamumą be BCP ir pagal išgyvenamumą be jokių ligos progresijos požymių. Siekiant, kad PRAD imtis būtų kuo panašesnė į Lietuvos imtį, PV atvejai su anksčiau diagnozuotu kito tipo vėžiu, gydyti ikioperaciniu laikotarpiu, įvertinti Gleason 10 ir/ ar jau metastazavę diagnozės nustatymo metu buvo išimti iš analizės. PRAD imtyje tirtų baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimas nebuvo susijęs su BCP ar bendra ligos progresija vienmačiuose modeliuose, tačiau nustatyta sumažėjusios *PRKCB* ir *ADAMTS12* raiškos prognostinė reikšmė, vertinant išgyvenamumo be BCP trukmę (abiejų modelių $P < 0,0500$). Tarp daugiamačių modelių tik *PRKCB* ar *NAALAD2* kartu su pT bei *NAALAD2* kartu su ISUP laipsnių grupe turėjo prognostinę vertę (visų modelių $P < 0,0500$; P3 lentelė).

MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimas prostatos navikuose

Remiantis metilinimo skirtumais tarp skirtingos histologijos prostatos audinių ir lyginant atvejus su BCP ir be BCP, penkios miRNR koduojančios genomines sritys buvo atrinktos tolimesnei DNR metilinimo analizei (5 lentelė).



16 pav. Kaplano-Mejerio kreivės pagal baltymus koduojančių genų *PRKCB* (A), *CCDC181* (B), *ADAMTS12* (C), *ZMIZ1* (D), *FILIP1L* (E), *NAALAD2* (F), *KCTD8* (G), and *CD44* (H) promotoriaus metilinimo būklę prostatos navikuose. M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė. Reikšmingos P vertės paryškintos.

5 lentelė. MiRNR ir jų motininiai genai, atrinkti promotoriaus metilinimo analizei.

miRNR		Motininis genas				Metilinimo skirtumai (zondai, N)	
Subrendusi miRNR	Geno simbolis	Lokalizacija (grandinė)	Geno simbolis	Tipas	miRNR lokalizacija	PV vs. NPA	BCP+ vs. BCP-
miR-155-5p, -3p	<i>MIR155</i>	21q21.3 (+)	<i>MIR155HG/ BIC/ MIRHG2</i>	nRNR	egzonas	2	0
miR-152-5p, -3p	<i>MIR152</i>	17q21.32 (-)	<i>COPZ2</i>	mRNR	intronas	1	2
miR-137	<i>MIR137</i>	1p21.3 (-)	<i>MIR137HG</i>	nRNR	egzonas	9	0
miR-31-5p, -3p	<i>MIR31</i>	9p21.3 (-)	<i>MIR31HG</i>	nRNR	intronas	5	0
miR-642a-5p, -3p	<i>MIR642A</i>	19q13.32 (+)	<i>GIPR/ PGQTL2</i>	mRNR	intronas*	2	3
miR-642b-5p, -3p	<i>MIR642B</i>	19q13.32 (-)					

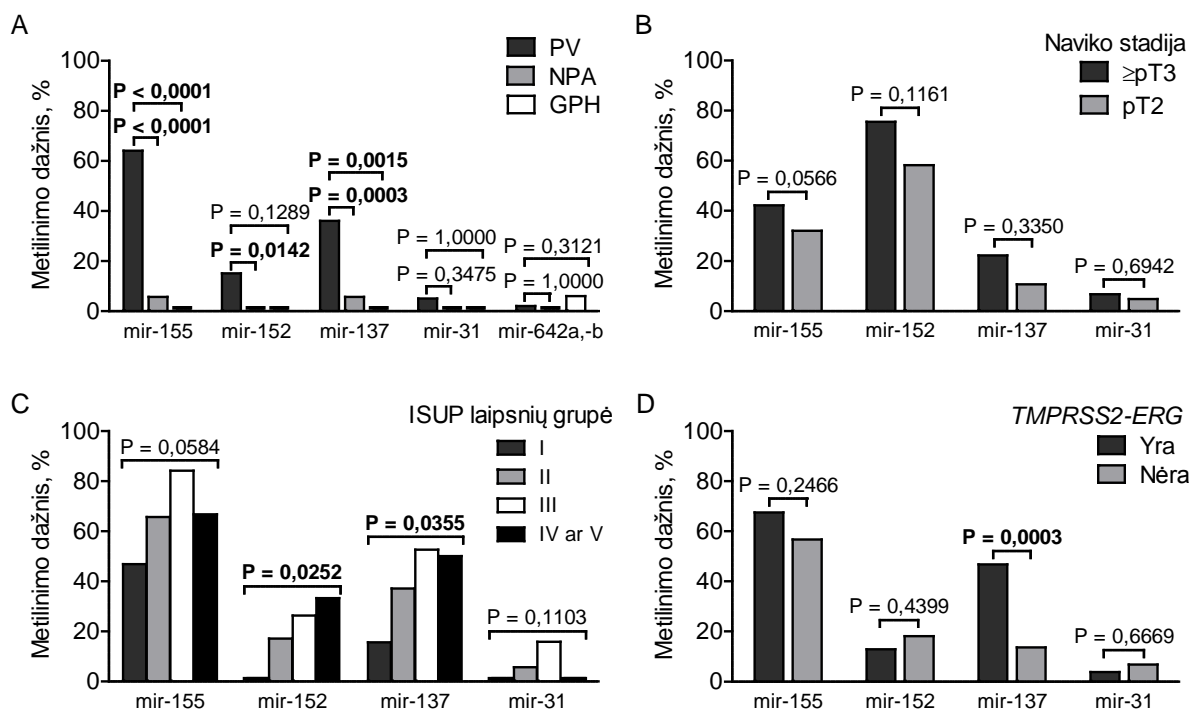
MiRNR ir genų nomenklatura pateikta pagal miRBase, leidimas 21 (www.mirbase.org) ir GeneCards® (www.genecards.org). PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, BCP+/ BCP- – atvejai atitinkamai su/ be biocheminės ligos progresijos, mRNR – baltymą koduojanti RNR (matricinė RNR), nRNR – baltymo nekoduojanti RNR.

*5'-UTR/ egzonas bioinformatiniais metodais nustatytiuose transkriptuose.

Su CpG salomis persidengiantys mir-155, mir-152 ir mir-137 motininių genų promotoriai buvo dažnai metilinti PV, lyginant su NPA ir/ ar GPH mėginiais (visi $P < 0,0500$; 17 pav. A). Mir-31 ir mir-642a, -b atveju metilinimas PV nustatytas retai, o mir-642a, -b buvo vienintelė miRNR, kurios motininio geno metilinimas aptiktas GPH (17 pav. A). TCGA PRAD imtyje visų analizuotų miRNR, t.y. mir-155, mir-152, mir-137, mir-31 ir mir-642a, -b, motininių genų promotoriaus metilinimas buvo dažnesnis PV, lyginant su normaliais audiniais (neparodyta).

MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimo sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais ir *TPRSS2-ERG* būkle

Reikšmingų sąsajų tarp miRNR motininių genų metilinimo ir naviko stadijos pT nenustatyta (17 pav. B). Mir-152 ir mir-137 motininių genų promotoriaus metilinimo dažnis didėjo, esant aukštesnei ISUP laipsnių grupei (abu $P < 0,0500$), ir panaši tendencija buvo stebima mir-155 atveju ($P > 0,0500$; 17 pav. C). Mir-137 buvo dažniau metilinta navikuose, kuriuose nustatyta *TPRSS2-ERG* raiška ($P = 0,0010$; 17 pav. D).

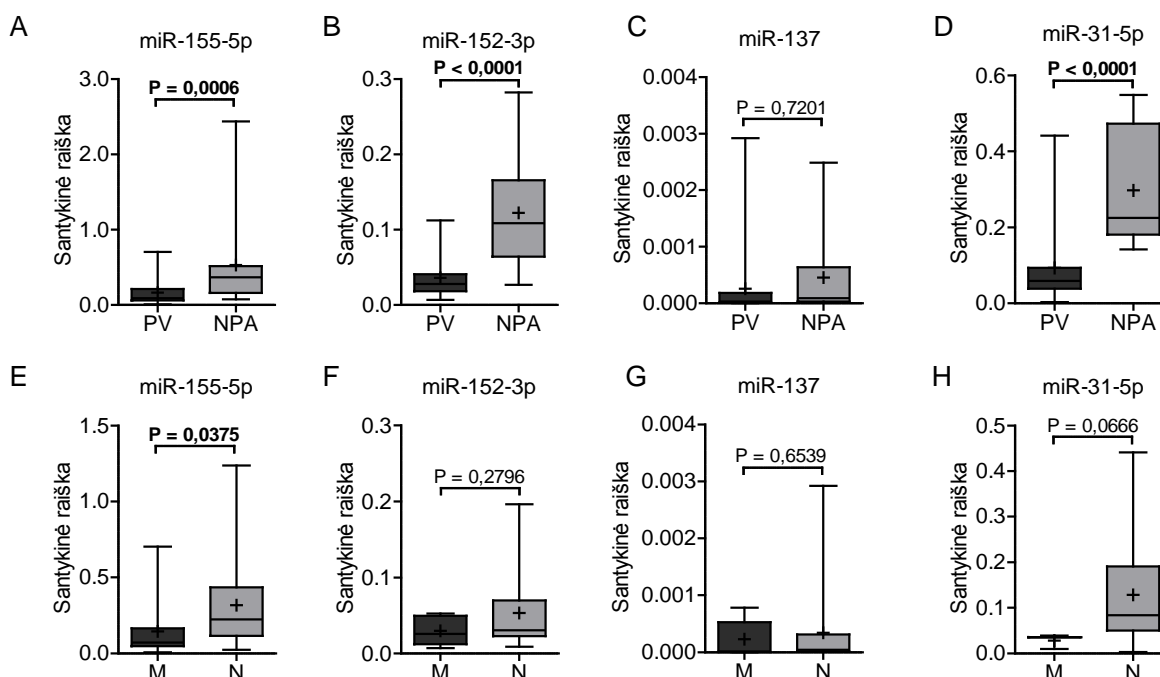


17 pav. MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimo dažniai prostatos audiniuose pagal histologiją (A), naviko stadiją (B), ISUP laipsnių grupę pagal (C) ir *TPRSS2-ERG* raišką (D). PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, GPH – gerybinė prostatos hiperplazija. Reikšmingos P vertės paryškintos.

MiRNR raiška ir sąsajos su motininių genų promotoriaus metilinimu

Siekiant susieti miRNR motininių genų promotoriaus metilinimą su atitinkamų miRNR raiškos praradimu, buvo peranalizuoti dominuojančių subrendusių miRNR (miR-155-5p, miR-152-3p, miR-137 ir miR-31-5p) raiškos duomenys iš ankstesnio tyrimo [8]. MiR-155-5p, miR-152-3p ir miR-31-5p raiška buvo mažesnė PV, lyginant su NPA (visi $P < 0,0010$), o miR-137 atveju reikšmingas skirtumas nenustatytas ($P > 0,0500$; 18 pav. A-D). Mažesnė miR-155-5p raiška buvo susijusi su motininio geno

promotoriaus metiliniu (P = 0,0375), tačiau sąsajų su kitomis miRNR nebuvo (visi P > 0,0500; 18 pav. E-H).



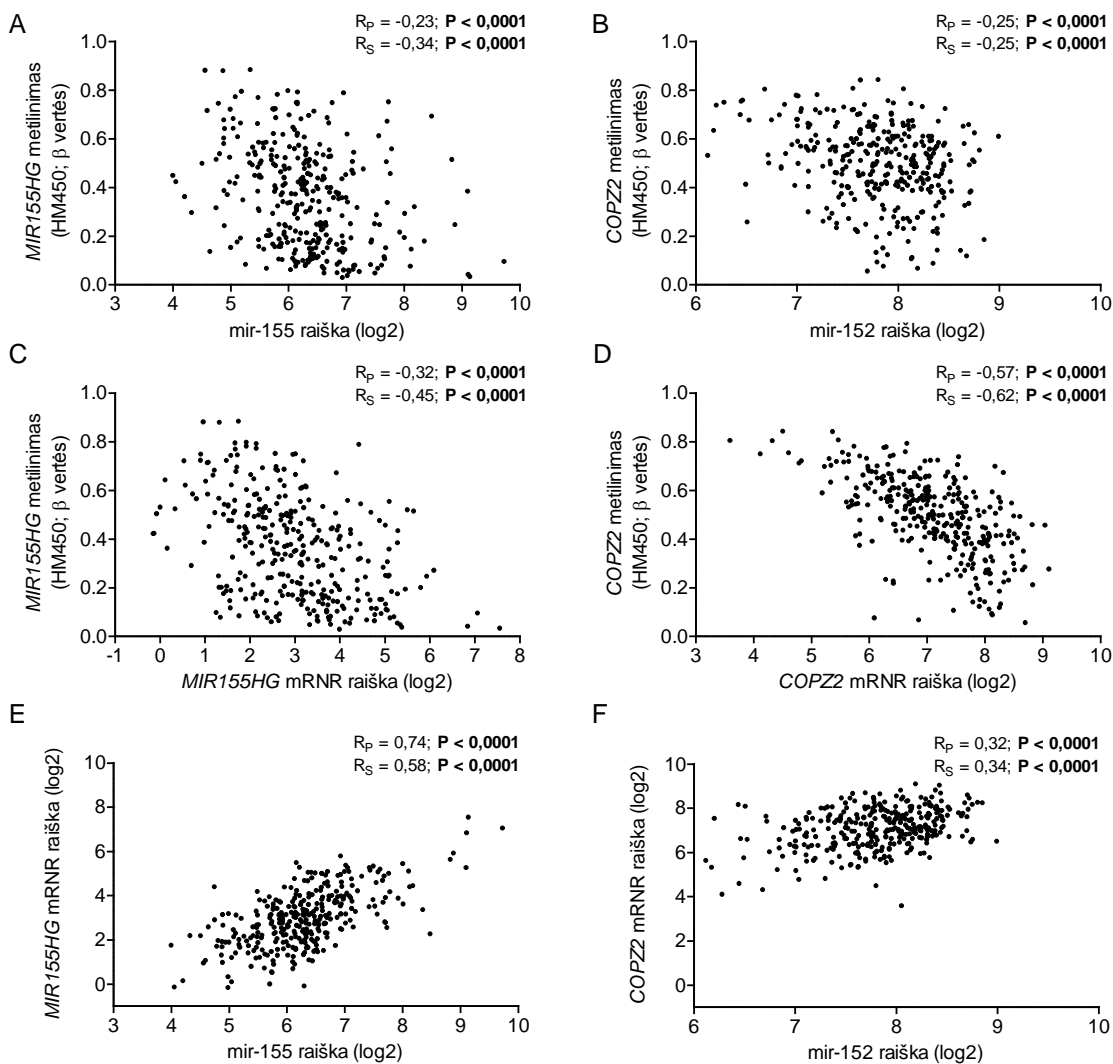
18 pav. Santykinė analizuotų miRNR raiška pagal prostatos audinio tipą (A-D) ir atitinkamų miRNR motininių genų promotoriaus metilinu būklę (E-H). PV – prostatos vėžys, NPA – nepakitę prostatos audiniai, M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė. Dėžutė iliustruoja 25-75 percentilius, vidurio linija – medianą, pliuso ženklas – vidurkį, „ūšai“ – intervalą. Reikšmingos P vertės paryškintos.

TCGA PRAD imtyje mir-155 ir mir-152 raiškos sumažėjimas koreliavo su aukštesniu motininių genų promotoriaus metiliniu lygiu (abu P < 0,0001; 19 pav. A ir B). Promotoriaus metilinu taip pat buvo susijęs su mažesne šių miRNR motininių genų mRNR raiška (abu P < 0,0001; 19 pav. C ir D). Be to, mir-155 ir mir-152 raiška teigiamai koreliavo su jų motininių genų mRNR raiška (abu P < 0,0001; 19 pav. E ir F). Sąsajų tarp mir-137 ir mir-31 raiškos ir atitinkamų motininių genų promotoriaus metiliniu lygio nebuvo nustatyta (neparodyta).

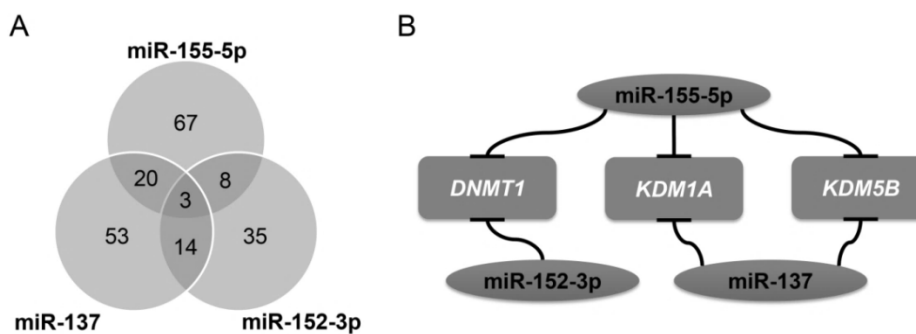
MiRNR taikinių analizė

MiRNR, kurių motininiai genai buvo dažnai metilinti PV, t.y. miR-155-5p, miR-152-3p ir miR-137, buvo atrinktos jų taikinių analizei. Spėjimų ir/ ar eksperimentiškai patvirtintų taikinių paieška atlikta pasinaudojus šešiais atviros prieigos šaltiniais (miRDB, TargetScan, miRTarBase, miRWalk, microRNA.org ir PicTar). Tarp didelio skaičiaus nustatytų taikinių atrinkti tie, kurių koduojamų produktų funkcijos yra siejamos su epigenetiniais procesais/ reiškiniiais (20 pav. A), kaip apibrėžta EpiFactors duomenų bazėje (<http://epifactors.autosome.ru>) [29]. Genų raiškos analizei atrinkti *DNMT1*, *KDM1A* ir *KDM5B* genai, iš kurių kiekvienas yra potencialiai valdomas dviejų analizuojamų miRNR (20 pav. B).

Lietuvos imtyje *DNMT1* ir *KDM5B* raiška buvo aukštesnė PV sergančių ligonių navikuose ir NPA mėginiuose, lyginant su GPH, kas parodė skirtumą tarp dviejų diagnozių (21 pav. A-C). *KDM1A* raiškos skirtumų pagal audinio tipą nenustatyta.

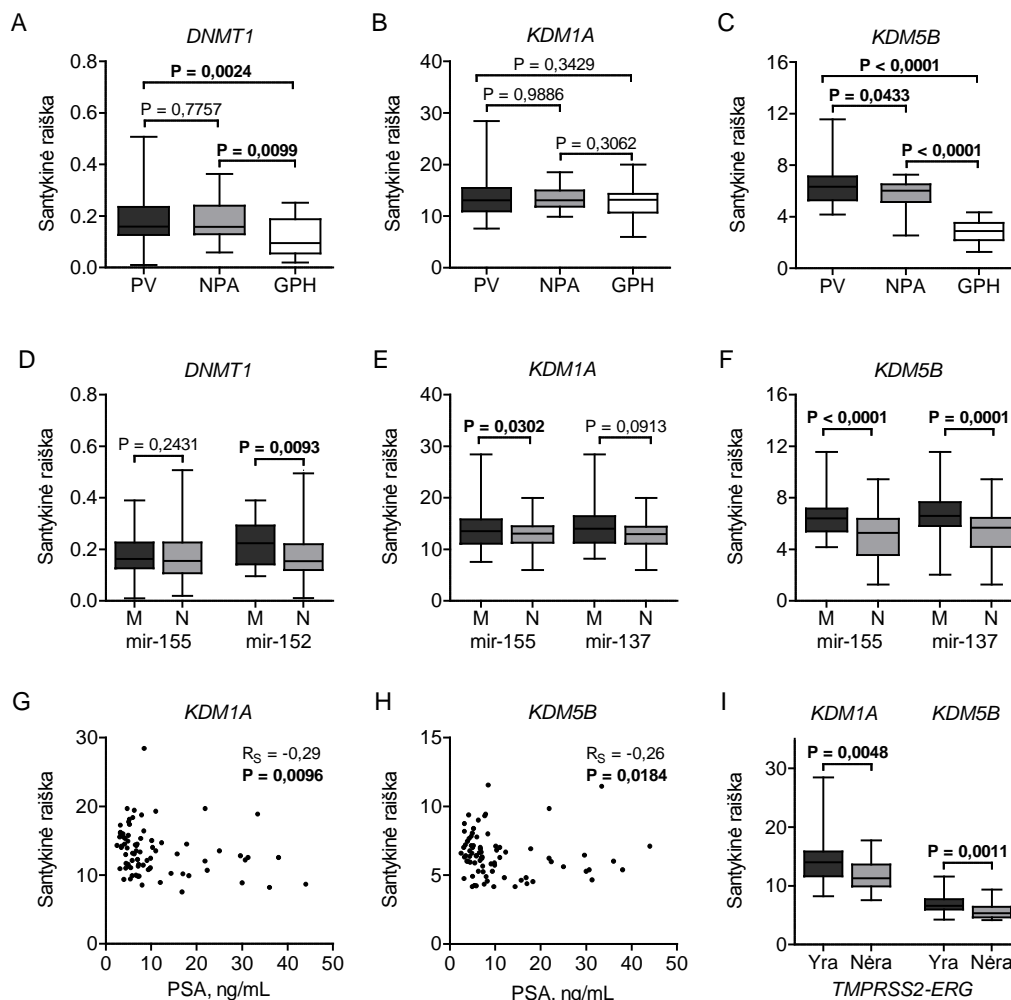


19 pav. Mir-155, mir-152 ir jų motininų genų raiška bei sąsajos su promotoriaus metilinimu Vėžio genomo atlaso projekto (TCGA) prostatos vėžio imtyje (PRAD) [2]. A ir B – miRNR motininio geno promotoriaus metilinimo koreliacija su atitinkamos miRNR raiška; C ir D – miRNR motininio geno promotoriaus metilinimo ir raiškos koreliacijos; E ir F – miRNR motinio geno raiškos ir atitinkamos miRNR raiškos koreliacijos. Duomenų analizei naudoti 3-io lygmens DNR metilinimo (Illumina HumanMethylation450K; HM450) ir RNR bei miRNR raiškos (RNR ir miRNR naujos kartos sekvenavimas) RSEM duomenys. R_p and R_s – Pirono ir Spirmeno koreliacijos koeficientai. Reikšmingos P vertės paryškintos.



20 pav. Su epigenetine reguliacija susiję miRNR taikiniai, nustatyti bent dviejose iš šešių duomenų bazių (A) ir miRNR sąveika su genų raiškos analizei atrinktais taikiniais.

Aukštesnė *KDM5B* raiška nustatyta esant metilintai mir-137 ar mir-155 motininio geno promotoriaus būklei (atitinkamai $P = 0,0001$ ir $P < 0,0001$), o aukštesnė *DNMT1* ir *KDM1A* raiška atitinkamai buvo susijusi su mir-152 ir mir-155 metiliniu (atitinkamai $P = 0,0093$ ir $P = 0,0302$; 21 pav. D-F). *KDM1A* ir *KDM5B* raiška neigiamai koreliavo su PSA koncentracija (abu $P < 0,0500$; 21 pav. G ir H). Be to, šių genų raiška buvo aukštesnė navikuose, kuriuose nustatytas ir *TMPRSS2-ERG* transkriptas (abu $P < 0,0050$; 21 pav. I).

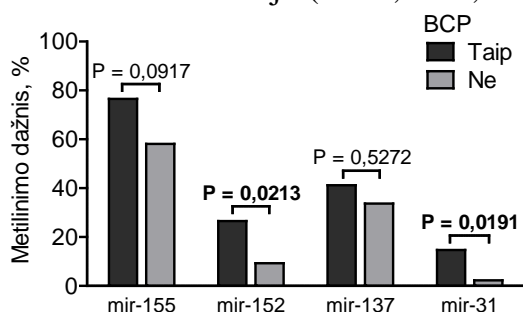


21 pav. *DNMT1*, *KDM1A* ir *KDM5B* raiška prostatos audiniuose. A-C – genų raiška prostatos navikuose (PV), nepakitusiųse prostatos audiniuose (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) mėginiuose; D-E – genų raiška pagal miRNR motininio geno promotoriaus metilinimo būklę; G ir H – koreliacijos tarp genų raiškos ir prostatos specifinio antigeno koncentracijos (PSA); I – genų raiška pagal *TMPRSS2-ERG* būklę. Dėžutė iliustruoja 25-75 percentilius, vidurio linija – medianą, „ūšai“ – intervalą. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Analizuojant TCGA PRAD duomenis, patvirtintos koreliacijos tarp *KDM5B* raiškos bei mir-155 ir mir-137 motininio geno promotoriaus metilinimo būklės (atitinkamai $P = 0,0007$ ir $P < 0,0001$) ir tarp *KDM1A* raiškos ir mir-155 metilinimo ($P < 0,0001$). Taip pat nustatyta teigiama koreliacija tarp *DNMT1* raiškos ir mir-152 motininio geno promotoriaus metilinimo lygio ($P = 0,0236$). Priešingai Lietuvos imtyje gautiems rezultatams, TCGA imtyje mir-137 motininio geno metilinimas koreliavo su *KDM1A* raiška ($P < 0,0001$), o aukštesnis mir-155 metilinimo lygis buvo susijęs su didesne *DNMT1* raiška ($P = 0,0032$; neparodyta).

MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimo prognostinė vertė

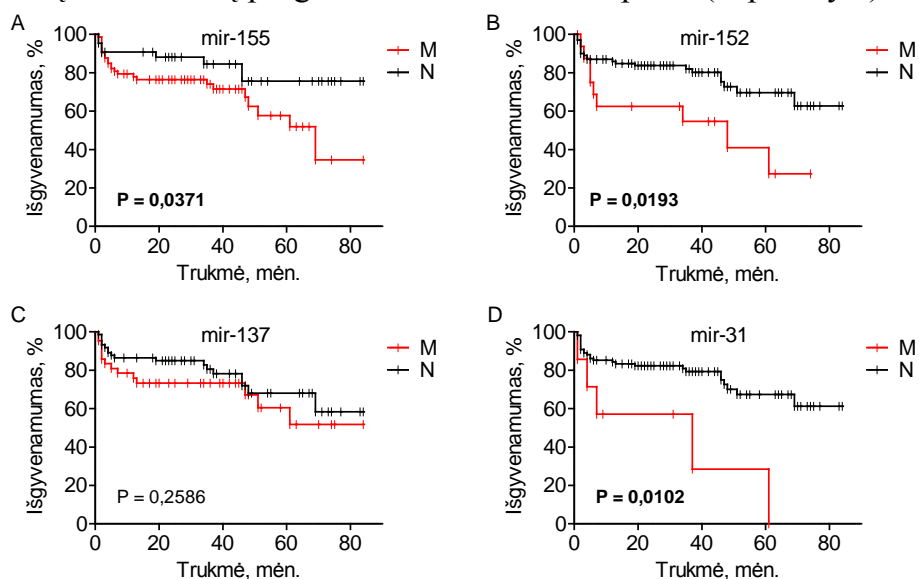
Mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimas buvo dažnesnis atvejuose su BCP nei be BCP (atitinkamai $P = 0,0213$ ir $P = 0,0191$) ir panaši tendencija stebėta mir-155 atveju ($P > 0,0500$; 22 pav.).



22 pav. MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimo dažniai prostatos navikuose pagal biocheminės ligos progresijos (BCP) statusą. Reikšmingos P vertės paryškintos.

Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreivių analizė parodė, kad mir-155, mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimas turėjo neigiamą poveikį ligonių išgyvenamumui be BCP (visi $P < 0,0500$), tačiau tokia sąsaja su mir-137 metilinimu nebuvo nustatyta ($P > 0,0500$; 23 pav. A-D). Tirtų miRNR taikinių (*DNMT1*, *KDM1A* ir *KDM5B*) raiška su BCP nebuvo susijusi (visi $P > 0,0500$; neparodyta). Mir-155, mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimo svarbą išgyvenamumui be BCP parodė ir vienmačiai Kokso modeliai (visų $P < 0,0500$; P2 lentelė). Įvairiuose daugiamačiuose modeliuose mir-155, mir-152 ir/ ar mir-31 motininių genų metilinimas turėjo nepriklausomą prognostinę vertę ir kai kuriais atvejais sustiprino klinikinių-patologinių rodiklių prognostinį potencialą (P4 lentelė).

TCGA PRAD imtyje mir-137 ir mir-31 motininių genų promotoriaus žemas metilinimo lygis buvo susijęs su bendra remisijos trukme (abu $P < 0,0500$), bet ne su išgyvenamumu be BCP (abu $P > 0,0500$; neparodyta); šie pastebėjimai pagrįsti ir vienmačiais modeliais (abu $P < 0,0500$; P4 lentelė). Be to, aukštesnė *KDM5B* raiška buvo susijusi su trumpesne trukme iki BCP, o *DNMT1* raiška – su bendra ligos progresija (abu $P < 0,0100$; P4 lentelė). MiRNR taikinių raiška daugiamačiuose modeliuose kitų kovariančių prognostinės vertės nesustiprino (neparodyta).



23 pav. Kaplano-Mejerio kreivės pagal mir-155 (A), mir-152 (B), mir-137 (C) ir mir-31 (D) motininių genų promotoriaus metilinimo būklę prostatos navikuose. M/ N – metilinta/nemetilinta promotoriaus būklė. Reikšmingos P vertės paryškintos.

REZULTATŲ APTARIMAS

Nepaisant per kelis pastaruosius dešimtmečius reikšmingai patobulėjusių vėžio diagnostikos ir gydymo priemonių, PV išlieka viena iš dažniausių onkologinių ligų ir pagrindinė vyrų mirties nuo vėžio priežastis. Ankstyva PV diagnostika, kaip ir tinkamai parinkta gydymo strategija, yra kritiškai svarbi siekiant suvaldyti ligą. Nors PSA testo naudojimas kasdieninėje praktikoje smarkiai sumažino vyrų, kuriems diagnozuojamas jau metastazavęs vėžys, skaičių, jis taip pat lėmė pernelyg agresyvaus gydymo skyrimą tiems vyrams, kurių sveikatai ir gyvybei liga pavojaus nekelia. Tai paskatino naujų molekulinį žymenų paiešką, pagal kuriuos būtų galima dar ankstyvose vėžio stadijose ligonius diferencijuoti į skirtingas rizikos grupes. Naviką slopinančių genų DNR metilinimas yra vienas iš daugiausia vilčių teikiančių tokių žymenų šaltinių.

Naviką slopinančių genų metilinimas prostatos navikuose ir ligonių šlapime

Pirmajame šio tyrimo etape buvo tiriama žinomų TSG (*RARB*, *GSTP1*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1*, *p16* ir *p14*) promotoriaus metilinimo būklė 149 PV audiniuose ir 253 PV sergančių ligonių šlapimo mėginiuose. Bent vieno geno metilinimo pokytis nustatytas 90,6% PV atvejų.

Kaip parodyta ankstesniais tyrimais [30-32], *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* buvo dažniausiai metilinti genai PV (>50%), o *MGMT*, *DAPK1*, *p16* ir *p14* metilinimo dažniai neviršijo 25%. Panašiai, kaip ir ankstesniuose tyrimuose [33], *RARB* ir *GSTP1* metilinimas NPA ar GPH audiniuose nustatytas gana retai ir lėmė palyginti aukštą (iki 85%) šių dviejų žymenų specifiškumą PV. Nors *RASSF1* metilinimo specifiškumas buvo palyginti žemas (67%) vertinant kokybiškai, kiekybinė analizė parodė reikšmingą metilinimo lygio skirtumą, lyginant su NPA ar GPH. Panašūs rezultatai gauti ir kito tyrimo metu, kai *RASSF1* ir kelių kitų genų metilinimas buvo kiekybiškai vertinamas PV, lyginant su GPH ir prostatos intraepitelinės neoplazijos (PIN) mėginiais, ir nustatytas *RASSF1* metilinimo lygio didėjimas vykstant kancerogenezei [34].

Kadangi kelių genų rinkinio metilinimas dažnai rodo aukštesnę diagnostinę ir/ ar prognostinę vertę, įvairios genų kombinacijos yra tiriamos ir PV atveju [34-36]. Šio tyrimo metu trijų genų rinkinio – *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* – jautrumas siekė 85,2%, analizuojant PV audinius, ir 60,1% ligonių šlapime. Kiti autorių darbuose 2-4 genų rinkinio metilinimas PV audiniuose siekė daugiau nei 85% [35,36] ir buvo žemesnis ($\geq 50\%$) šlapime [37,38]. Nors *GSTP1* yra dažniausiai metilintas genas PV ligonių šlapimo nuosėdose (apžvelgta [39]), mūsų tyrime didžiausias metilinimo dažnis (45%) ir intensyvumas (apie 20%) nustatytas *RASSF1* atveju. Ankstesniais tyrimais yra parodytas ir dar aukštesnis šio geno metilinimo šlapime dažnis ($\geq 73\%$) [37]. Dažnas ir palyginti intensyvus šio geno metilinimas šlapime rodo jo pritaikymo galimybes praktikoje, neinvazinėje diagnostikoje. Šio tyrimo metu *RARB* ir *GSTP1* metilinimas šlapime nustatytas rečiau, tačiau buvo specifiškas PV, kas atitinka nesenų metaanalizių duomenis [40,41]. Palyginti žemas žymenų jautrumas organizmo skysčiuose yra dažna problema [40,41] ir iš dalies gali būti paaiškintas itin besiskiriančiu vėžinių ląstelių DNR kiekiu įvairių nevėžinių ląstelių (ir jų nuolaužų) kontekste, kurių šlapime gali būti gana daug. Ir vis dėlto dėl aukšto specifiškumo tokie tyrimai galėtų būti pritaikyti ligoniui paskiriant ar keičiant gydymo strategiją, kaip minima ir kitų autorių darbuose [42].

Kaip parodyta ir ankstesnių tyrimų metu [43], vėlesnė naviko stadija ir aukštesnis Gleason balas šiame tyrime turėjo nepriklausomą prognostinę vertę. Vieno konkretaus

geno promotoriaus metilinimas retai nustatomas kaip nepriklausomas prognostinis rodiklis (apžvelgta [44]). Šio tyrimo metu nustatyta *RASSF1* metilinimo PV audiniuose sąsajos su PSA ir BCP. Ligonių, kuriems diagnozuotas *Gleason* 6 navikas, t.y. žemos ir vidutinės rizikos PV atveju, audiniuose nustatytas *RASSF1* metilinimas modelyje kartu su pT buvo reikšmingas žymuo prognozuojant BCP. Tokia sąsaja nustatyta ir analizuojant *RASSF1* metilinimą ligonių šlapime. Tai pirmas tyrimas, parodęs DNR metilinimo žymens prognostinę vertę, analizuojant PV ligonių šlapimą. Tokios sąsajos nustatymas, esant tik *Gleason* 6, bet ne aukštesnio balo navikams, galėtų būti paaiškinamas didesniu pastarųjų navikų heterogeniškumu. Tai pagrindžia ir neseniai įvestas *Gleason* 7 navikų skirstymas į 3 + 4 ir 4 + 3 grupes dėl smarkiai besiskiriančios prognozės vienu ir kitu atveju [45]. Be to, genomino masto PV tyrimų duomenys rodo, kad kiti prognostiniai veiksniai galėtų užgožti *RASSF1* metilinimo svarbą vėlesnių stadijų PV. Nors *GSTP1* metilinimas yra itin dažnai tiriamas PV, duomenys apie šio žymens prognostinę vertę vis dar išlieka prieštaringi [43]. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad nors *GSTP1* metilinimas buvo susijęs su blogesnės prognozės rodikliais, tiesioginės sąsajos su BCP nenustatyta. Genų rinkinių metilinimo tyrimas galėtų turėti didesnę prognostinę vertę, nuspėjant agresyvaus PV vystymąsi.

Šiuo metu jau yra prekiaujama DNR metilinimo žymenų pagrindu sukurtu molekulinio PV testu „ConfirmMDx for Prostate Cancer“, kurio kūrimas ir klinikinis testavimas vykdytas panašiu metu, kaip ir šiame darbe aprašyti tyrimai. Siekiant palengvinti gydymo sprendimo priėmimą po neigiamos biopsijos, testu yra vertinamas trijų NSG metilinimas, du iš kurių (*GSTP1* ir *RASSF1*) buvo įtraukti ir į šį tyrimą. Šis epigenetinis testas jau yra įtrauktas į 2016 m. EAU-ESTRO-SIOG prostatos vėžio diagnostikos ir gydymo gaires [13], o tai yra puikus DNR metilinimo tyrimų pritaikymo praktikoje pavyzdys.

Šios tyrimo dalies metu gauti rezultatai parodė, kad kelių NSG metilinimo analizė galėtų suteikti papildomos informacijos apie PV agresyvumą, o *RASSF1* promotoriaus metilinimas galėtų būti potencialiu blogesnės prognozės žymeniu žemos ir vidutinės rizikos PV sergančių ligonių audiniuose ar šlapimo nuosėdose. Reikalingi tolimesni tyrimai šio žymens prognostinio potencialo įvertinimui.

Naujų prostatos vėžio DNR metilinimo žymenų identifikavimas

Spartus naujų technologijų vystymasis sudarė galimybes vykdyti įvairių navikų genomino masto metilinimo tyrimus, kurie pirmiausia buvo orientuoti į naujų žymenų paiešką, galinčių pranokti iki šiol nustatytus savo jautrumu ir specifiškumu vėžiui. Pastarųjų metų epigenominiai tyrimai leido padaryti keletą reikšmingų išvalgų analizuojant PV epigenomą bei identifikuoti didelį skaičių naujų potencialių DNR metilinimo žymenų. Tačiau tik keletas iš jų buvo sėkmingai validuoti klinikinių mėginių imtyse, dažniausiai tik vienoje, jei iš viso buvo toliau tiriami [3].

Šiame tyrime naujų diagnostinių ir prognostinių DNR metilinimo žymenų paieška vykdyta taikant DNR metilinimo profiliavimą mikrogardelėmis nedidelėje grupėje išsamiai charakterizuotų atveju. Kaip ir ankstesniuose tyrimuose [3,46], daug reikšmingų metilinimo skirtumų nustatyta tarp PV ir NPA mėginių bei lyginant atvejus su BCP ir be BCP. Skirtumai identifikuoti įvairiuose genuose, susijusiuose su biologiniais procesais, kurie dažnai būna pakitę vystantis ir progresuojant vėžiui. Metilinimo skirtumų rasta tiek genų kūnuose ar promotoriuose, tiek ir intergeninėse srityse [47]. Be to, daugelis genų, kurių metilinimo skirtumai buvo didžiausi ir/ ar reikšmingiausi, iki šiol nėra buvę

identifikuoti kaip potencialūs PV žymenys. Panašios tendencijos stebimos ir kitų autorių darbuose [3,47]. Be skirtingo dydžio ir struktūros imčių bei taikytų analizės metodų, manytina, kad tai gali lemti PV būdingas heterogeniškumas ir daugybinių židinių formavimasis.

Remiantis gautais visuminės metilinimo analizės duomenimis, tolimesniems tyrimams buvo atrinkta 10 baltymus koduojančių genų (*PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, *NAALAD2*, *KCTD8*, *EPAS1*, *NEK9* ir *CD44*), kurių promotoriaus metilinimas buvo tiriamas 129 PV, 35 NPA ir 17 GPH mėginių. Trijų genų rinkinio – *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* – jautrumas ir specifiškumas PV siekė atitinkamai 94,6% ir $\geq 88,6\%$. Šių genų metilinimas taip pat buvo sėkmingai detektuotas ir ligonių šlapime, kas rodo šių naujų žymenų potencialą neinvazinėje diagnostikoje. Daugelis iš šių genų prostatos audiniuose tyrinėti mažai arba iš viso netirti, o jų prognostinė vertė beveik neanalizuota jokio tipo navikuose.

Iki šiol *PRKCB* promotoriaus metilinimas buvo tirtas tik plaučių navikuose, kur nustatytas metilinimo lygis siekė apie 25% [48]. Įdomu tai, kad TCGA plaučių vėžio imtyje autoriai nustatė sąsają tarp dviejų konkrečių CpG metilinimo ir šio geno raiškos sumažėjimo [48]. Panašiai šiame tyrime nustatėme mažesnę *PRKCB* raišką prostatos navikuose, kuriuose šio geno promotorius buvo metilintas. *PRKCB* metilinimas buvo aptiktas ir ligonių šlapime. Yra parodyta, kad poveikis demetilinančia medžiaga atstato šio geno raišką [49], kas įrodo, jog metilinimas yra svarbus šio geno raiškos reguliacijai. Tačiau tokie duomenys prieštarauja kitų autorių darbams, kuriais nustatytas *PRKCB* raiškos padidėjimas ir atitinkamai onkogeninis šio geno vaidmuo prostatos kancerogenezėje [50,51]. Metzger *et al.* parodė, kad *PRKCB* sąveikauja su KDM1A bei androgenų receptoriumi (AR) ir taip lemia nuo AR priklausomų genų (pvz., *KLK3*, koduojančio PSA) raišką progresuojant PV [51]. Žinant, kad *PRKCB* koduoja kelias skirtingas izoformas, promotoriaus metilinimo reikšmė šio geno raiškai ir jo koduojamų baltymų funkcijoms PV reikalauja išsamesnių tyrimų.

CCDC181 koduojamo baltymo funkcijos iki šiol nežinomos. PV specifinį šio geno promotoriaus metilinimą pirmą kartą aprašė Haldrup *et al.* ir vėliau Moller *et al.* [52,53]. Šiame tyrime *CCDC181* buvo dažniausiai metilintas (91,5%) iš 10 analizuotų genų, o specifiškumas vėžiui siekė 100%. Be to, šio geno metilinimas buvo nustatytas ir PV ligonių šlapime. Nors šioje analizėje *CCDC181* prognostinės vertės nepavyko nustatyti nei Lietuvos, nei TCGA PRAD imtyse, šio geno promotoriaus metilinimo ryšys su BCP buvo parodytas dviejose PV imtyse kitame tyrime [52].

Su angiogeneze siejamo *ADAMTS12* geno metilinimas PV anksčiau nėra tirtas. Šio tyrimo metu *ADAMTS12* metilinimas buvo dažnas navikuose (84,5%) ir pasižymėjo aukštu specifiškumu vėžiui (100%). *ADAMTS12* promotoriaus metilinimą taip pat pavyko nustatyti ir PV ligonių šlapime. Šio geno promotoriaus metilinimas ir raiškos nutildymas buvo nustatytas storosios žarnos vėžio atveju ir buvo susijęs su ligos progresija [54]. Šiame tyrime *ADAMTS12* metilinimas navikuose buvo dažnesnis tais atvejais, kai ligoniui nustatyta BCP.

NAALAD2 priklauso vadinamųjų NAALADazių genų šeimai, kuriai priklauso ir plačiai PV tyrinėjamas prostatos specifinio membraninio antigeno genas (*FOLH1/PSMA*). *NAALAD2* daugiausia yra analizuotas iš biocheminės pusės, o geno promotoriaus metilinimas iki šiol netirtas. Šio geno analizė Lietuvos PV imtyje atskleidė palyginti aukštą jautrumą (72,1%) ir specifiškumą (100%). Be to, *NAALAD2* promotoriaus metilinimas turėjo nepriklausomą vertę prognozuojant BCP ir sustiprino

patologinių rodiklių (pT, ISUP laipsnių grupės) prognostinę vertę daugiamačiuose modeliuose. Tolimesni tyrimai reikalingi, siekiant tiksliau išsiaiškinti šio žymens potencialą PV diagnostikoje ir prognozėje.

ZMIZ1 geno, koduojančio transkripcijos veiksnį (geriausiai ištirtą kaip nuo AR priklausomos raiškos reguliatorių), promotoriaus metilinimas buvo dažnas PV ir taip pat vidutiniškai dažnas NPA mėginiuose (37,1%), tačiau dažnių skirtumas buvo statistiškai patikimas. Mažesnė geno raiška koreliavo su aukštesniu promotoriaus metiliniu TCGA PRAD kohortoje, tačiau Lietuvos imtyje toks ryšys nenustatytas. Tikėtina, kad kiti epigenetiniai mechanizmai, be DNR metilinimo, galėtų lemti šio geno raiškos reguliavimą. Ankstesniais tyrimais parodyta, kad *ZMIZ1* sąveikauja su *KLK3* geno promotoriumi ir tokiu būdu galėtų būti svarbus PV progresuojant į kastracijai atsparią vėžio formą [55]. Atitinkamai, šio tyrimo metu nustatyta, kad *ZMIZ1* metilinimo būklė kartu su PSA koncentracija turėjo prognostinę vertę daugiamačiame modelyje. Iki šiol *ZMIZ1* promotoriaus metilinimas navikuose netirtas, todėl jo vaidmuo PV vystymesi ir ligai progresuojant kol kas nėra aiškus.

Kaip ir ankstesniame tyrime [56], *FILIP1L* promotorius buvo dažnai metilintas PV audiniuose (84,5%) ir pasižymėjo specifiškumu vėžiui ($\geq 88,6\%$), lyginant su NPA ir GPH. Šio geno promotoriaus, ypač siejamo su 2 izoforma, metilinimas koreliuoja su raiškos sumažėjimu įvairiuose navikuose, įskaitant PV [57]. Be to, ankstesniais tyrimais taip pat parodytas ryšys tarp šio geno metilinimo ir/ ar raiškos sumažėjimo bei invazyvaus vėžio fenotipo [57]. Šio tyrimo metu reikšmingų metilinimo sąsajų su BCP būklę ar kitais klinikiniais-patologiniais rodikliais nenustatyta, ką galėjo lemti griežtas tik nemetastatinių PV atvejų įtraukimas į imtį.

Kitų tirtų genų (*KCTD8*, *CD44*, *EPAS1* ir *NEK9*) rezultatai buvo mažiau perspektyvūs, pirmiausia dėl palyginti reto arba visiškai nenustatyto metilinimo PV audiniuose. *CD44* genas į tyrimą buvo įtrauktas palyginimui, atsižvelgiant į kitų autorių nustatytą šio geno promotoriaus metilinimo ryšį su blogesne ligos prognoze [28], tačiau Lietuvos imtyje šio žymens prognostinė vertė nenustatyta. Genai *EPAS1* ir *NEK9* buvo įtraukti į tyrimą, remiantis metilinimo skirtumais tarp progresavusio ir neprogresavusio PV, tačiau nenustačius nei vieno metilinimo atvejo pradinėje PV ir NPA imtyje šių genų tyrimas nebuvo tęsiamas. *EPAS1* metilinimas buvo nustatytas tiriant kitus navikus [58], tačiau *NEK9* atveju tokių tyrimų kol kas nėra.

MiRNR motininių genų metilinimas prostatos navikuose

Per pastarąjį dešimtmetį miRNR vaidmuo ląstelės homeostazėje ir vėžio vystymesi tapo plačiai pripažintu. Gausiai atliekami tyrimai atskleidė platų miRNR raiškos pokyčių spektrą. Nors mechanizmai, keičiantys miRNR raišką, nėra galutinai aiškūs, miRNR raiškos nuslopinimas metilinant promotoriaus sritis yra svarbus reiškinys, lemiantis pokyčius įvairių navikų, įskaitant ir PV, miRNR raiškos profiliuose [59,60].

Šio tyrimo metu buvo identifikuotas PV specifinis mir-155 motininio geno promotoriaus metilinimas, susijęs su mažesne šios miRNR raiška. Iki šiol DNR metilinimas, kaip mir-155 raiškos reguliavimo mechanizmas, yra tirtas krūties navikuose [59], dauginėje mielomoje [61] ir skrandžio vėžio ląstelių linijose [62], tačiau analizė PV audiniuose kol kas nebuvo atlikta. Dėl reguliuojamų taikinių įvairovės miR-155-5p yra laikoma daugiafunkcine, remiantis nevienareikšmiais skirtingų lokalizacijų navikų tyrimų duomenimis [63,64]. Tai galėtų būti iš dalies paaiškinama dėl skirtingos tirtų imčių sudėties ar naudotų modeliųjų sistemų.

MiR-152 yra dažnai įvairiame kontekste tirama miRNR, tačiau tik keliose publikacijose aprašyti tyrimai, kuriuose analizuota šios miRNR raiškos ir CpG salos metilinimo sąsaja [65]. Be reikšmingo metilinimo dažnio skirtumo tarp PV ir kontrolinių mėginių, mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad mir-152 motininio geno promotorius taip pat buvo dažniau metilintas aukštesnės ISUP laipsnių grupės navikuose. Be to, mir-152 metilinimas buvo patikimai susijęs su aukštesne PSA koncentracija, kas rodo potencialią klinikinę reikšmę. Su promotoriaus metiliniu susijęs miR-152 inaktyvinimas parodytas ir PV ląstelių linijose kitų autorių atliktų tyrimų metu [60]. Be to, mažesnė šios miRNR raiška buvo dažniau nustatyta afroamerikiečių nei kaukazoidų PV audiniuose [60].

Neseniai parodyta, kad mir-137 lokuso metilinimas yra reikšmingas įvykis skirtingų tipų navikuose [59,66] bei lokalizuotą ir kastracijai atsparų PV imituojančiuose ląstelių linijų modeliuose [67]. Šiame tyrime dažnesnis mir-137 motininio geno promotoriaus metilinimas nustatytas PV, palyginus su NPA ir GPH. Tačiau su promotoriaus metiliniu sietinas miR-137 raiškos nuslopinimas buvo nustatytas tik TCGA PRAD imtyje, ką tikriausiai lėmė palyginti mažesnis mėginių skaičius Lietuvos imtyje.

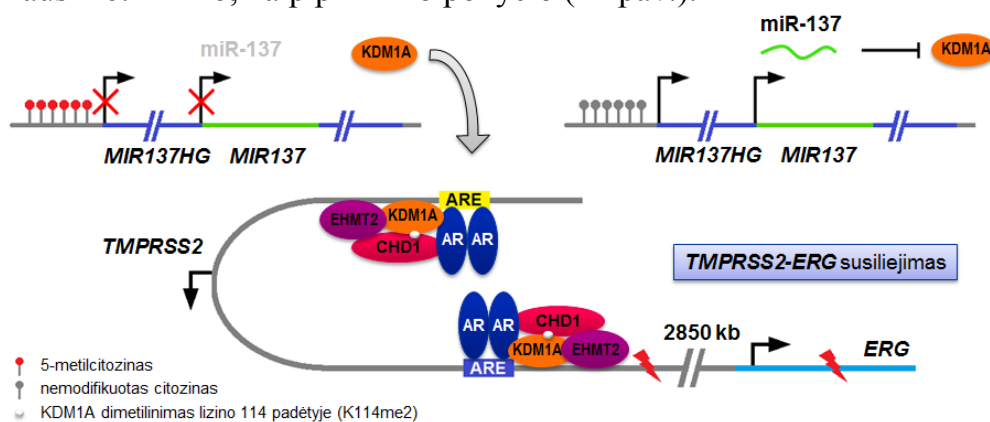
Išgyvenamumo analizė atskleidė mir-155, mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimo nepriklausomą vertę vienmačiuose ir daugiamačiuose modeliuose, prognozuojant BCP, kuri taip pat sustiprino klinikinių-patologinių rodiklių prognostinį potencialą. Mir-155 metilinimas atskirai ar kartu su mir-152 metiliniu buvo reikšmingas rodiklis prognozuojant ligonių, kurių navikuose nenustatyta *TMPRSS2-ERG* raiška, išgyvenamumą be BCP. Nepaisant žemo metilinimo dažnio navikuose, mir-31 sustiprino pT ir ISUP laipsnių grupės prognostinę vertę Lietuvos ir TCGA PRAD imtyse. Daugiausia tyrimų, kuriuose vertintas miRNR prognostinis potencialas, yra atlikta miRNR raiškos lygmenyje [68], o epigenetinio miRNR raiškos slopinimo tyrimų nėra daug [69]. Ankstesnių tyrimų duomenys rodo, kad miR-155, miR-152, miR-137 ir miR-31 bei kitų naviką slopinančių miRNR raiškos praradimas gali būti susietas su BCP ar ligos progresija PV atveju, tačiau dauguma tokių tyrimų atlikti vaistams atsparių vėžinių ląstelių linijose ir tik retai klinikiniuose mėginiuose [8,60,68].

Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad miRNR raiškos dereguliacija gali nulemti DNR metilinimo bei histonų modifikacijų profilių pokyčius (apžvelgta [70]). Todėl atlikę miRNR taikinių analizę 6-iose duomenų bazėse, pasirinkome 3 su epigenetine reguliacija susijusius genus tolimesnei analizei. *DNMT1* genas yra žinomas kaip miR-152-3p taikinytis gimdos navikuose [71] ir PV ląstelių linijose [60], o miR-155-5p atveju nustatytas tik bioinformatiniais metodais ir silpnai pagrįstas eksperimentiškai [72]. Mūsų tyrimo duomenys parodė aukštesnę *DNMT1* raišką PV ir NPA, palyginus su GPH. Atitinkamai, ankstesniuose tyrimuose *DNMT1* raiška buvo aukštesnė, esant metilintam mir-152 motininio geno promotoriui, tačiau mir-155 atveju patikimos sąsajos nebuvo. TCGA imtyje stebėta abiejų miRNR motininių genų promotoriaus metilinimo koreliacija su *DNMT1* raiška. Be epigenetinės *DNMT1* raiškos reguliacijos, neseniai parodytas tiesioginis miR-155-5p prisijungimas prie DNMT1 baltymo katalitinės srities [73]. Tai rodo miR-155-5p funkcinės analizės poreikį vėžio ląstelėse.

Lizino demetilazės atlieka svarbius vaidmenis vykstant PV progresijai, konkrečiai, perėjimui iš nuo androgenų priklausomos į nuo androgenų nepriklausomą būseną. KDM1A yra pirmoji identifikuota ir geriausiai ištirta lizino demetilazė. Sąveikaudama su AR, KDM1A pašalina H3K9me1/2 represines žymes ir taip aktyvina AR signalinį kelią [74,75]. Mūsų tyrimas neparodė *KDM1A* raiškos skirtumų tarp PV ir NPA mėginių ar pagal BCP būklę Lietuvos imtyje. Tačiau aukštesnė *KDM1A* raiška, kaip nepriklausomas

rodiklis ar modelyje su kitais, turėjo prognostinę vertę nuspėjant ligonių išgyvenamumą be BCP ir/ ar be ligos progresijos TCGA PRAD imtyje. *KDM1A* aukštesnės raiškos sąsaja su didesne PV progresijos rizika parodyta ir kitų autorių darbuose [74].

Neseniai atliktas tyrimas atskleidė kritiškai svarbų *KDM1A* vaidmenį tiek *TMPRSS2-ERG* susiformavimui, tiek ir sulietinio transkripto raiškai [76]. Atitinkamai, mes nustatėme reikšmingai didesnę *KDM1A* raišką PV navikuose, kuriuose vyko ir *TMPRSS2-ERG* raiška. *KDM1A* yra eksperimentiškai patvirtintas miR-137 taikinyš [77], o miR-155-5p atveju sąveika su šia lizino demetilaze yra tik spėjama. Šio tyrimo duomenimis, aukštesnė *KDM1A* raiška vyko navikuose su metilinta mir-155 motininio geno promotoriaus būkle tiek Lietuvos, tiek ir TCGA imtyse, tačiau analogiška sąsaja su mir-137 metiliniu nustatyta tik pastarojoje. Atsižvelgiant į kitų autorių neseniai publikuotus duomenis [76] bei šio tyrimo metu nustatytas patikimas sąsajas, manytina, jog *TMPRSS2-ERG* genų susiliejimas galėtų būti lemiamas mir-137 motininio geno promotoriaus metiliniu, kaip pirminio pokyčio (24 pav.).



24 pav. Spėjamas mir-137 motininio geno (*MIR137HG*) promotoriaus metiliniu vaidmuo *TMPRSS2-ERG* susiformavime, dalyvaujant *KDM1A* (adaptuota pagal [76]).

Padidėjusi kitos lizino demetilazės geno, *KDM5B*, raiška ir anksčiau nustatyta PV audiniuose [78]. Atitinkamai, *KDM5B* raiškos skirtumai nustatyti prostatos audiniuose ir šio tyrimo metu. Kaip ir *KDM1A* atveju, *KDM5B* raiška buvo aukštesnė navikuose, kuriuose aptiktas ir *TMPRSS2-ERG* transkriptas. Ši lizino demetilazė neseniai identifikuota kaip miR-137 taikinyš PV ląstelių linijose [67], o analogiška sąveika miR-155-5p atveju kol kas parodyta tik bioinformatiniais metodais. Mūsų žiniomis, šio tyrimo metu pirmą kartą aukštesnė *KDM5B* raiška buvo susieta su mir-137 ir mir-155 motininis genų promotoriaus metiliniu. Šios sąsajos buvo nustatytos ir TCGA imtyje, tačiau tiesioginiai eksperimentiniai įrodymai yra būtini jų patvirtinimui. Ankstesniais tyrimais parodyta, kad *KDM5B*, kaip ir *KDM1A*, sąveikauja su AR ir veikia kaip onkogenas [78], nors mechanizmas nėra iki galo suprastas. Tai rodo, kad lizino demetilazės atlieka sudėtingus vaidmenis PV, kurie turėtų būti išaiškinti ateityje.

Apibendrinant, atlikti tyrimai leido identifikuoti grupę naujų prostatos vėžio DNR metiliniu žymenų, pasižyminčių diagnostine ir/ ar prognostine verte, galinčia pralenkti ar pagerinti šiuo metu žinomų (ir taikomų) rodiklių potencialą. Tikėtina, kad per kelerius artimiausius metus rinkoje pasirodys nauji DNR metiliniu analizės pagrindu veikiantys testai, padėsiantys ne tik anksti diagnozuoti PV, bet ir kuo anksčiau numatyti ligos vystymosi eigą bei, ryšium su tuo, leisiantys paskirti labiausiai konkrečiam ligoniui tinkantį gydymą.

IŠVADOS

1. Prostatos navikuose genų *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* promotoriaus metilinimo dažniai buvo $\geq 54,1\%$, o genų *MGMT*, *DAPK1*, *p16* ir *p14* – $\leq 25,5\%$. Bendras tyrimo jautrumas pagal genų *RARB*, *GSTP1* ir *RASSF1* metilinimą buvo $85,2\%$, o specifiškumas siekė $62,2\%$ ir $47,1\%$, atitinkamai palyginus su NPA ir GPH mėginiais.
2. PV sergančių ligonių šlapime genų *RASSF1*, *RARB* ir *GSTP1* metilinimo dažniai buvo atitinkamai $44,7\%$, $29,2\%$ ir $11,1\%$. Bendras šio tyrimo jautrumas pagal tris genus siekė $60,1\%$, o specifiškumas buvo $68,8\%$, palyginus su GPH atvejais.
3. *RASSF1* ir *DAPK1* promotoriaus metilinimas prostatos navikuose turėjo nepriklausomą prognostinę vertę išgyvenamumo be BCP trukmei (abu $P < 0,0500$). Ligoniu, kuriems diagnozuotas Gleason 6 balų navikas, PV audiniuose ir šlapime *RASSF1* metilinimas buvo reikšmingas prognostinis rodiklis, analizuojant kartu su naviko stadija pT (abiejų modelių $P < 0,0010$).
4. Reikšmingi ($P < 0,0500$) metilinimo skirtumai buvo nustatyti 1143 baltymus koduojančiuose ($FC \geq 1,5$) ir 522 miRNR motininiuose genuose ($FC \geq 1,2$), palyginus PV ir NPA mėginius, bei 1804 baltymus koduojančiuose ($FC \geq 1,2$) ir 129 miRNR motininiuose genuose ($FC \geq 1,2$), palyginus progresavusius ir neprogresavusius PV atvejus. Biologiniai ir molekuliniai procesai, vykstantys vėžiui vystantis ir progresuojant, buvo dažnai praturtinti skirtingai tarp grupių metilintų genų.
5. Genų *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, *NAALAD2* metilinimo dažniai buvo $\geq 72,1\%$, o genų *KCTD8* ir *CD44* neviršijo $35,7\%$. Tik nemetilinta promotoriaus būklė (0%) nustatyta *EPAS1* ir *NEK9* atveju. Bendras jautrumas PV pagal genus *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* buvo $94,6\%$, o specifiškumas siekė $88,6\%$ ir 100% , atitinkamai lyginant pagal NPA ir GPH. Metilinta promotoriaus būklė buvo patikimai susijusi su mažesne *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* raiška PV audiniuose (visi $P \leq 0,0001$). *PRKCB*, *CCDC181* ir *ADAMTS12* metilinimas taip pat buvo aptinkamas PV ligonių šlapime.
6. *PRKCB*, *ADAMTS12* ir *NAALAD2* promotoriaus metilinimas prostatos navikuose turėjo nepriklausomą prognostinę vertę išgyvenamumo be BCP trukmei (visų modelių $P < 0,0500$). *PRKCB* ir *NAALAD2* metilinimas papildė naviko stadijos pT ir ISUP laipsnių grupės prognostinę vertę modeliuose (visi $P < 0,0001$).
7. Mir-155, mir-152 ir mir-137 motininių genų promotoriaus metilinimo dažniai PV buvo nuo $14,7\%$ iki $64,3\%$ ir reikšmingai skyrėsi nuo dažnių NPA ir/ ar GPH (visi $P < 0,0500$). Mir-31 ir mir-642a, -b motininių genų metilinimas buvo retas ($\leq 5,4\%$). Mir-155 motininio geno promotoriaus metilinimas koreliavo su mažesne miR-155-5p raiška ($P = 0,0375$), o mir-137 motininio geno metilinimas buvo dažnesnis navikuose, kuriuose nustatyta *TMPRSS2-ERG* raiška ($P = 0,0010$).
8. Mir-152 ir mir-31 motininių genų promotoriaus metilinimas turėjo nepriklausomą prognostinę potencialą ir papildė pT ir/ ar ISUP laipsnių grupės vertę, prognozuojant išgyvenamumą be BCP (visų modelių $P < 0,0500$). Tiriant navikus, kuriuose nenustatyta *TMPRSS2-ERG* raiška, mir-155 motininio geno

promotoriaus metilinimas, atskirai ar kartu su mir-152, buvo prognostinis išgyvenamumo be BCP rodiklis (abiejų modelių $P < 0,0500$).

9. Aukštesnė *KDM5B* raiška vyko PV mėginiuose, kuriuose nustatyta metilinta mir-155 ar mir-137 motininių genų promotoriaus būklė, o *KDM1A* ir *DNMT1* raiškos padidėjimas buvo susijęs atitinkamai su mir-155 ir mir-152 metilinimu (visi $P < 0,0500$). Aukštesnė *KDM1A* ir *KDM5B* raiška vyko PV mėginiuose, kuriuose nustatyta *TMPRSS2-ERG* raiška (abu $P < 0,0050$).

PUBLIKACIJOS IR PREZENTACIJOS

Publikacijos

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

1. **Daniunaite K**, Dubikaityte M, Gibas P, Lazutka JR, Bakavicius A, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Clinical significance of microRNA host gene promoter methylation in prostate cancer. *Priimtas spaudai žurnale Hum Mol Genet (Oxford Univ Press)*. doi: 10.1093/hmg/ddx138. [IF₂₀₁₅ **5.985**; IF_{5yr} 6.353]
2. **Daniunaite, K**, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Petroska D, Laurinavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F. Prognostic value of *RASSF1* promoter methylation in prostate cancer. *J Urol*. 2014;192(6):1849-1855. doi: 10.1016/j.juro.2014.06.075. [IF₂₀₁₄ **4.360**; IF_{5yr} 4.064]

Kiti straipsniai, tiesiogiai nesusiję su disertacijos tema, paskelbti žurnaluose su IF, įtrauktuose į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę:

1. Kubiliute R, Sulskyte I, **Daniunaite K**, Daugelavicius R, Jarmalaite S. Molecular features of doxorubicin-resistance development in colorectal cancer CX-1 cell line. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(5):298-306. doi: 10.1016/j.medici.2016.09.003. [IF₂₀₁₅ **0.609**; IF_{5yr} 0.700]
2. Stuopelyte K, **Daniunaite K**, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(6):707-715. doi: 10.1038/bjc.2016.233. [IF₂₀₁₅ **5.569**; IF_{5yr} 5.617]
3. Stuopelyte K, **Daniunaite K**, Jankevicius F, Jarmalaite S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(2):116-124. doi: 10.1016/j.medici.2016.02.007. [IF₂₀₁₅ **0.609**; IF_{5yr} 0.700]
4. Demidenko R, Razanauskas D, **Daniunaite K**, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:683. doi: 10.1186/s12885-015-1689-8. [IF₂₀₁₅ **3.265**; IF_{5yr} 3.642]
5. **Daniunaite K**, Serenaite I, Misgirdaite R, Gordevicius J, Unguryte A, Fleury-Cappellesso S, Bernotiene E, Jarmalaite S. Epigenetic regulation of human adipose-derived stem cells differentiation. *Mol Cell Biochem*. 2015;410(1-2):111-120. doi: 10.1007/s11010-015-2543-7. [IF₂₀₁₅ **2.613**; IF_{5yr} 2.438]
6. Serenaite I, **Daniunaite K**, Jankevicius F, Laurinavicius A, Petroska D, Lazutka JR, Jarmalaite S. Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer. *Virchows Arch*. 2015;466(1):53-59. doi: 10.1007/s00428-014-1678-3. [IF₂₀₁₅ **2.627**; IF_{5yr} 2.644]
7. Stuopelyte K, **Daniunaite K**, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Jarmalaite S. High-resolution melting-based quantitative analysis of *RASSF1* methylation in breast cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2013;49(2):78-83. [IF₂₀₁₃ **0.508**; IF_{5yr} 0.632]

Pranešimai mokslinėse konferencijose³

➤ Žodiniai pranešimai:

1. **Daniūnaitė K**, Jarmalaitė S. DNR metilinimo biožymenys prostatos vėžio diagnostikai ir ligos eigos prognozavimui. Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Vilnius, Lietuva. Gruodžio 7 d., 2016. [apdovanojimas už geriausią pranešimą]
2. Mackoit A, **Daniunaite K**, Jarmalaite S. Epigenetic profile of hypoxia and angiogenesis-related genes and its prognostic relevance in prostate cancer patients. Riga Stradins University International Student Conference. Ryga, Latvija. Kovo 16 d., 2016.
3. **Daniunaite K**, Jarmalaite S. Epigenetic alterations in prostate cancer. The 1st LUHS Medical Molecular Biology Conference: Biomarkers of Chronic Diseases. Kaunas, Lietuva. Balandžio 17 d., 2015.
4. **Daniūnaitė K**, Jankevičius F, Laurinavičius A, Lazutka JR, Jarmalaitė S. Visuminė DNR metilinimo analizė priešinės liaukos vėžiu sergančių ligonių audiniuose. Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Vilnius, Lietuva. Gruodžio 9 d., 2014. [apdovanojimas už geriausią pranešimą]
5. **Daniunaite K**, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Jankevicius F, Laurinavicius A, Lazutka JR. Frequent DNA methylation of tumor suppressor genes in urine sediments from patients with early-stage prostate cancer. Urinomics 2013 – 1st International Conference on Urine Omics. Kaparika, Portugalija. Rugsėjo 9-11 d., 2013.

➤ Stendiniai pranešimai:

1. **Daniunaite K**, Dubikaityte M, Rauluseviciute I, Mackoit A, Razanauskas D, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. Novel DNA methylation biomarkers of prostate cancer. The COST Meeting “Creating New Collaborative Research Proposals”. Groningenas, Nyderlandai. Rugsėjo 15-16 d., 2016.
2. **Daniunaite K**, Rauluseviciute I, Dubikaityte M, Mackoit A, Razanauskas D, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. Identification of novel DNA methylation biomarkers of prostate cancer. XIV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society. Druskininkai, Lietuva. Birželio 28-30 d., 2016.
3. Mackoit A, **Daniunaite K**, Jarmalaite S. DNA methylation analysis of angiogenesis-related genes *ADAMTS12* and *FILIP1L* in prostate cancer. The COINS International Conference of Life Sciences. Vilnius, Lietuva. Vasario 29 d. – Kovo 3 d., 2016.
4. Rauluseviciute I, **Daniunaite K**, Jarmalaite S. DNA methylation of genes, selected by microarray analysis, in prostate cancer. The COINS International Conference of Life Sciences. Vilnius, Lietuva. Vasario 29 d. – Kovo 3 d., 2016.
5. **Daniunaite K**, Razanauskas D, Dubikaityte M, Rauluseviciute I, Jankevicius F, Lazutka JR, Jarmalaite S. DNA methylation profile of prostate cancer. Cell Symposia: Human Genomics. Singapūras, Singapūro Respublika. Lapkričio 8-10 d., 2015.
6. Mackoit A, **Daniunaite K**, Jarmalaite S. Analysis of prostate cancer epigenome: identifying new DNA methylation markers. 58th Scientific Conference for

³ Tik tiesiogiai su disertacijos tema susiję pranešimai. Visas pranešimų sąrašas pateiktas disertacijoje.

Students of Physics and Natural Sciences: Open Readings 2015. Vilnius, Lietuva. Kovo 24-27 d., 2015.

7. **Daniunaite K**, Unguryte A, Bernotiene E, Lazutka JR, Jarmalaite S. Genome-wide DNA methylation profile of mesenchymal stem cells and cancer. XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society: 50th Anniversary of FEBS. Birštonas, Lietuva. Birželio 18-20 d., 2014.

FINANSINĖ PARAMA

Tyrimai buvo atliekami kelių Lietuvos mokslo tarybos (LMT) finansuotų projektų metu. Pradinė mėginių imtis surinkta ir dalis tyrimų protokolų parengta vykdant projektą Nr. C-03/2007-09, finansuotą Lietuvos mokslo ir studijų fondo. Dalies mėginių surinkimas finansuotas LMT projekto Nr. MIP-075/2012 lėšomis. Naviką slopinančių genų tyrimai atlikti projekto Nr. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005/KS-560000-1757 metu (European Social Fund under National Integrated Programme Biotechnology and Biopharmacy). Žymenų analizė organizmo skysčiuose (šlapime) buvo finansuota LMT projekto Nr. MIP-109. Naujų PV žymenų tyrimai finansuoti LMT projektų Nr. LIG-14/2012 ir SEN-9/2016 lėšomis. Tyrimų vykdymą LMT taip pat parėmė, skirdama stipendijas studentų moksliniams tyrimams skatinti pagal projektą Nr. VP1-3.1-SMM-01-V-02-003. Autorė yra kelis kartus gavusi paramą studentų mokslinei praktikai ir stipendiją doktorantūros studijoms (2013-2016 m.) iš LMT. Komandiruočių išlaidos dalinai padengtos COST veiklos CM1406 (konferencija Groningene, Nyderlanduose) ir LMT paramos doktorantų mokslinėms išvykoms (konferencija Singapūre, Singapūro Respublikoje) lėšomis.

PADEKA

Dėkoju savo darbo vadovei prof. Sonatai Jarmalaitei už galimybę atlikti doktorantūros studijas. Ačiū už taiklias išvalgas, ilgas diskusijas, vertingus patarimus, kritines pastabas, suteiktas galimybes pristatyti tyrimų rezultatus tarptautiniuose renginiuose ir paramą visų studijų metu.

Dėkoju prof. Juozui Rimantui Lazutkai, prof. Feliksui Jankevičiui ir visiems projektų vykdytojams, kurių pastangomis ambicingi užsibrėžti tikslai tapo įgyvendinami.

Esu dėkinga Neringai Kalinauskaitei už pagalbą žengiant pirmuosius savarankiškus žingsnius laboratorijoje. Taip pat dėkoju Monikai Dubikaitytei, Ievai Rauluševičiūtei, Deividui Ražanauskui, Agnieškai Mackoit bei visiems kitiems studentams, prisidėjusiems prie prostatos vėžio DNR metilinimo tyrimų.

Dėkoju nuolat besikeičiančiai Žmogaus genomo tyrimų grupei ir visam buvusios Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui už malonią darbo atmosferą, fizinę ir moralinę pagalbą, kai tik jos reikėjo, ir, žinoma, nepamirštamais linksmomis praleistas atokvėpio nuo darbų akimirkas.

Nuoširdžiai dėkoju visiems ligoniams ir jų artimiesiems, sutikusiems duoti mėginius moksliniams tyrimams.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė	Kristina Daniūnaitė
Bendra informacija	
Gimimo data	1987 m. gruodžio mėn. 24 d.
Pagrindinė darbovietė	Žmogaus genomo tyrimų grupė, Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas; Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva; tel. +370 5 223 4441; el. paštas: Kristina.Daniunaite@gf.vu.lt
Antra darbovietė	Genetinės diagnostikos centras, Nacionalinis vėžio institutas; Baublio g. 3b, LT-08406, Vilnius, Lietuva; tel. + 370 5 219 0184 el. paštas: Kristina.Daniunaite@nvi.lt
Asmeniniai kontaktai	Tel. +370 614 20818 el. paštas: vailaomalyn@yahoo.com
Išsilavinimas	
2012-2016	Doktorantūros studijos (Biologija, 01 B); Biomokslų institutas (buvęs Gamtos mokslų fakultetas), Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas.
2010-2012	Genetikos magistras (<i>Magna Cum Laude</i>), Genetikos studijų programa (621C40001); Biomokslų institutas (buvęs Gamtos mokslų fakultetas), Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas. [Lietuvos mokslų akademijos apdovanojimas už geriausią magistro baigiamąjį darbą]
2006-2010	Biologijos bakalauras (<i>Cum Laude</i>), Molekulinės biologijos studijų programa (61201B105); Biomokslų institutas (buvęs Gamtos mokslų fakultetas), Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas.
1994-2006	Ukmergės Jono Basanavičiaus gimnazija (buvusi Ukmergės Jono Basanavičiaus vidurinė mokykla)
Mokymo kursai ir mokyklos	
2014	„Proton System. Hands-on Training and Data Analysis“; Life Technologies; Vilnius, Lietuva
2013	„NGS Data Analysis Workshop“; Genomatix; Freizingas, Vokietija
2012	„Applications of Microarray Technology“; Agilent Technologies; Valdbronas, Vokietija
2011	Laboratorinių gyvūnų mokslo kursas; Vilniaus universitetas (FELASA C kategorijos pažymėjimas); Vilnius, Lietuva
2011	„qPCR data analysis: Biostatistics & Expression Profiling“; TATAA Biocenter; Freizingas, Vokietija
2009	„Real-Time PCR School“; Applied Biosystems; Vilnius, Lietuva
Darbo patirtis	
Nuo 2016	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Genetinės diagnostikos centre, Nacionaliniame vėžio institute
2015-2016	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Gamtos mokslų fakultete, Vytauto Didžiojo universitete
Nuo 2012	Jaunesnioji mokslo darbuotoja Biomokslų institute (buvusiame Gamtos mokslų fakultete), Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete
2011-2012	Vyresnioji specialistė buvusiame Gamtos mokslų fakultete, Vilniaus universitete
2009-2011	Laborantė buvusiame Gamtos mokslų fakultete, Vilniaus universitete
Moksliniai projektai	
Nuo 2009	Dalyvauta 7 projektų vykdyme, 1 vykdomas šiuo metu
Narystė organizacijose	
Nuo 2013	Lietuvos biochemikų draugija ir FEBS

SANTRAUKA (anglų kalba)

Despite the emerging improvements in diagnosis and treatment, prostate cancer (PCa) remains one of the most prevalent malignancies and a leading cause of death in men. Early diagnosis of PCa, as well as the selection of the most proper treatment strategy, is critical for successful management of the disease. Although the introduction of PSA test has significantly decreased the numbers of men diagnosed with already metastatic PCa, it has also resulted in the increase of overdiagnosis and/ or overtreatment of men with non-life threatening disease. This encouraged the search of new molecular tools with better performance in risk stratification. DNA methylation of tumor suppressor genes is a potential source of such biomarkers.

In the first stage of the present study, we tested a panel of *RARB*, *GSTP1*, *RASSF1*, *MGMT*, *DAPK1*, *p16^{INK4a}/CDKN2A*, and *p14^{ARF}/CDKN2A* promoters for the DNA methylation status in 149 PCa tissues and 253 urine samples from PCa patients. Aberrant methylation of at least one of the genes was identified in 90.6% of PCa cases, and the most informative biomarkers were *RASSF1*, *GSTP1*, and *RARB*. Methylation analysis of this 3-gene panel in urine showed 60.1% sensitivity and 68.8% specificity for PCa. Moreover, in patients with Gleason score 6 tumors, *RASSF1* methylation together with pT were significant predictors of biochemical disease recurrence (BCR) when analyzed in tissue or urine samples.

Although the obtained results were promising, the relatively low methylation frequencies and specificity for PCa in Lithuanian cohort encouraged to search for new biomarkers with better performance. Therefore, the second stage of the study was oriented towards identification and validation of novel DNA methylation biomarkers. A set of 9 PCa paired noncancerous prostate tissue (NPT) pairs of well-characterized PCa cases were selected for the initial screening using DNA methylation microarrays. Changes in methylation of protein-coding and miRNA host genes were abundant in PCa and affected specific biological and molecular processes associated with tumor development and progression. Based on comparisons by tissue histology and BCR status, 10 protein-coding and 5 miRNA host genes were selected for validation in an expanded set of 129 PCa, 35 NPT, and 17 benign prostatic hyperplasia (BPH) samples. The prostate cancer (PRAD) dataset of The Cancer Genome Atlas project (TCGA) was utilized as an independent validation cohort.

Methylation frequencies of the protein-coding genes were $\geq 72.1\%$ for *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, *ZMIZ1*, *FILIP1L*, and *NAALAD2*, but did not exceed 35.7% for *KCTD8* and *CD44*, while only unmethylated promoter status (methylation frequency 0%) was observed for *EPAS1* and *NEK9*. The combined sensitivity for PCa of *PRKCB*, *CCDC181*, and *ADAMTS12* was 94.6%, while the specificity reached 88.6% and 100% analyzing NPT and BPH, respectively. Methylated promoter status was associated with lower expression levels of *PRKCB*, *CCDC181*, *ADAMTS12*, and *NAALAD2* in PCa (all $P \leq 0.0001$) and the similar associations were observed in TCGA data. Methylation of *PRKCB*, *CCDC181*, and *ADAMTS12* was also detectable in urine of PCa patients. Promoter methylation of *PRKCB*, *ADAMTS12*, and *NAALAD2* in PCa tissues had independent prognostic value for BCR-free survival (all models' $P < 0.0500$) and methylation of *PRKCB* and *NAALAD2* augmented the prognostic value of pT and/ or ISUP grade group (all $P < 0.0001$). However, none of the analyzed genes were predictive for BCR-free or disease-free survival in TCGA cohort.

Methylation frequencies of mir-155, mir-152, and mir-137 host gene promoters ranged from 14.7% to 64.3% in PCa and significantly differed from NPT and/ or BPH samples (all $P < 0.0500$), while methylation of mir-31 and mir-642a, -b host genes was rare ($\leq 5.4\%$). Methylated mir-155 host gene promoter status correlated with decreased miR-155-5p expression ($P = 0.0375$). Mir-137 host gene were more frequently methylated in tumors expressing *TMPRSS2-ERG* fusion transcript ($P = 0.0010$). Promoter methylation status of mir-152 and mir-31 host genes was independent prognostic factors for BCR-free survival and augmented the prognostic value of pT and/ or ISUP grade group (all models' $P < 0.0500$). Promoter methylation of mir-155 host gene alone or together with mir-152 was prognostic for BCR-free survival in combination with *TMPRSS2-ERG* fusion-negative status (both models' $P < 0.0500$). Despite the low methylation frequency in PCa, mir-31 augmented the prognostic value of pT and ISUP grade group and also significantly predicted disease-free survival in TCGA data analysis. Higher *KDM5B* expression was observed in samples with methylated mir-155 or mir-137 host gene promoters, whereas up-regulation of *KDM1A* and *DNMT1* was associated with mir-155 and mir-152 methylation status, respectively (all $P < 0.0500$). *KDM1A* and *KDM5B* were upregulated in PCa cases expressing *TMPRSS2-ERG* fusion transcript (both $P < 0.0050$). Based on recent publications and the observed associations in the present study, methylation of mir-137 host gene was hypothesized to be a causal alteration leading to the formation of *TMPRSS2-ERG* fusion in PCa through the increased *KDM1A* expression.

In the present study, for the first time aberrant DNA methylation was analyzed in the Lithuanian cohort of PCa cases using both genome-wide and candidate-gene approaches. Using clinical samples (tissues and urine), this study increased the molecular understanding of localized PCa at the epigenetic level. Genome-wide DNA methylation profiling led to identification of a set of novel putative biomarkers with diagnostic and/ or prognostic value that might even surpass currently available tools. Promoter methylation of these newly identified genes was also demonstrated to be detectable in urine of PCa patients, which shows its potential application for noninvasive testing. Although additional validation is required, the obtained results seem to be rather promising. Protein-coding and miRNA host genes with newly identified methylation differences in PCa might be attractive targets for epigenetic therapeutics.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ferlay J et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-386.
2. The Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011-1025.
3. Kristensen H et al. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling. *Oncotarget*. 2016;7(21):30760-30771.
4. Kim JH et al. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. *Genome Res*. 2011;21(7):1028-1041.
5. Mahapatra S et al. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(10):2882-2895.
6. Ross AE et al. Which, when and why? Rational use of tissue-based molecular testing in localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016;19(1):1-6.
7. Park JY. Promoter hypermethylation as a biomarker in prostate adenocarcinoma. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:607-625.
8. Stuopelyte K et al. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(6):707-715.
9. Demidenko R et al. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:683.
10. Sabaliauskaite R et al. Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):781-791.
11. Epstein JI et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2005;216:34-63.
12. Epstein JI et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-252.
13. Mottet N et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol*. 2017;71(4):618-629.
14. Jarmalaite S et al. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology*. 2008;75(3-4):145-151.
15. Maere S et al. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3448-3449.
16. Shannon P et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-2504.
17. Liberzon A et al. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425.
18. Burbee DG et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(9):691-699.
19. Costa VL et al. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer*. 2007;23(7):133.

20. Esteller M et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59(1):67-70.
21. Paz MF et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):4933-4938.
22. Esteller M et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60(1):129-133.
23. Herman JG et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-9826.
24. Jeronimo C et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology.* 2002;60(6):1131-1135.
25. Lehmann U et al. Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol.* 2002;160(2):605-612.
26. Eads CA et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001;61(8):3410-3418.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
28. Woodson K et al. CD44 and PTGS2 methylation are independent prognostic markers for biochemical recurrence among prostate cancer patients with clinically localized disease. *Epigenetics.* 2006;1(4):183-186.
29. Medvedeva YA et al. EpiFactors: a comprehensive database of human epigenetic factors and complexes. *Database (Oxford).* 2015;2015:bav067.
30. Yegnasubramanian S et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64(6):1975-1986.
31. Maruyama R et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 2002;8(2):514-519.
32. Konishi N et al. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(7):767-773.
33. Delgado-Cruzata L et al. DNA methylation changes correlate with Gleason score and tumor stage in prostate cancer. *DNA Cell Biol.* 2012;31(2):187-192.
34. Jeronimo C et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8472-8478.
35. Rosenbaum E et al. Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(23):8321-8325.
36. Ellinger J et al. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology.* 2008;71(1):161-167.
37. Payne SR et al. DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate.* 2009;69(12):1257-1269.
38. Hoque MO et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6569-6575.

39. Truong M et al. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol.* 2013;189(2):422-429.
40. Pan J et al. Association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(9):e75283.
41. Wu T et al. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;105(1):65-73.
42. Zhao F et al. Urinary DNA methylation biomarkers for noninvasive prediction of aggressive disease in patients with prostate cancer on active surveillance. *J Urol.* 2017;197(2):335-341.
43. Chao C et al. Methylation markers for prostate cancer prognosis: a systematic review. *Cancer Causes Control.* 2013;24(9):1615-1641.
44. Strand SH et al. Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):16544-16576.
45. Epstein JI et al. A contemporary prostate cancer grading system: a validated alternative to the Gleason score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-435.
46. Kobayashi Y et al. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res.* 2011;21(7):1017-1027.
47. Kron K et al. Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays. *PLoS One.* 2009;4(3):e4830.
48. Liu S et al. Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017 [in press].
49. Hagiwara K et al. PROX1 overexpression inhibits protein kinase C beta II transcription through promoter DNA methylation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(11):1024-1036.
50. Kim J et al. Centrosomal PKC β II and pericentrin are critical for human prostate cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2008;68(16):6831-6839.
51. Metzger E et al. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature.* 2010;464(7289):792-796.
52. Haldrup C et al. DNA methylation signatures for prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy of clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(26):3250-3258.
53. Moller M et al. Heterogeneous patterns of DNA methylation-based field effects in histologically normal prostate tissue from cancer patients. *Sci Rep.* 2017;7:40636.
54. Moncada-Pazos A et al. The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 16):2906-2913.
55. Li X et al. ZMIZ1 preferably enhances the transcriptional activity of androgen receptor with short polyglutamine tract. *PLoS One.* 2011;6(9):e25040.
56. Desotelle J et al. CpG island hypermethylation frequently silences FILIP1L isoform 2 expression in prostate cancer. *J Urol.* 2013;189(1):329-335.
57. Kwon M et al. Down-regulation of filamin A interacting protein 1-like is associated with promoter methylation and an invasive phenotype in breast, colon, lung and pancreatic cancers. *PLoS One.* 2013;8(12):e82620.
58. Rawluszko-Wieczorek AA et al. Prognostic potential of DNA methylation and transcript levels of HIF1A and EPAS1 in colorectal cancer. *Mol Cancer Res.* 2014;12(8):1112-1127.

59. Vrba L et al. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e54398.
60. Theodore SC et al. MicroRNA profiling of novel African American and Caucasian prostate cancer cell lines reveals a reciprocal regulatory relationship of miR-152 and DNA methyltransferase 1. *Oncotarget*. 2014;5(11):3512-3525.
61. Krzeminski P et al. Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(3):353-366.
62. Li CL et al. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncol Rep*. 2012;27(6):1960-1996.
63. Cai ZK et al. microRNA-155 promotes the proliferation of prostate cancer cells by targeting annexin 7. *Mol Med Rep*. 2015;11(1):533-538.
64. Cha YJ et al. MicroRNA alteration and putative target genes in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: STAT3 and ZEB1 are upregulated during prostate carcinogenesis. *Prostate*. 2016;76(10):937-947.
65. Sengupta D et al. DNA methylation and not H3K4 trimethylation dictates the expression status of miR-152 gene which inhibits migration of breast cancer cells via DNMT1/CDH1 loop. *Exp Cell Res*. 2016;346(2):176-187.
66. Steponaitiene R et al. Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2016;55(4):376-386.
67. Nilsson EM et al. MiR137 is an androgen regulated repressor of an extended network of transcriptional coregulators. *Oncotarget*. 2015;6(34):35710-35725.
68. Lichner Z et al. MicroRNA signature helps distinguish early from late biochemical failure in prostate cancer. *Clin Chem*. 2013;59(11):1595-1603.
69. Lin PC et al. Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2013;73(3):1232-1244.
70. Suzuki H et al. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol*. 2012;6(6):567-578.
71. Tsuruta T et al. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2011;71(20):6450-6462.
72. Wang Q et al. miR-155-5p antagonizes the apoptotic effect of bufalin in triple-negative breast cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2016;27(1):9-16.
73. Zhang G et al. Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(12):6112-6124.
74. Metzger E et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. 2005;437(7057):436-439.
75. Kahl P et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*. 2006;66(23):11341-11347.
76. Metzger E et al. Assembly of methylated KDM1A and CHD1 drives androgen receptor-dependent transcription and translocation. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(2):132-139.
77. Balaguer F et al. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(16):6609-6618.
78. Xiang Y et al. JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19226-19231.

PRIEDAI

P1 lentelė. Vienmačiai ir dvimačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai, analizuojant naviką slopinančių genų metilinimą (pirmasis tyrimų etapas).

Nr.	Kovariantė	Pavojaus rizika (95%)	Kovariantės P	Modelio P
Vienmačiai modeliai (navikai, visi atvejai)				
1	pT (3 vs. ≤2)	3,91 (2,29; 6,66)	<0,0001	<0,0001
2	<i>Gleason</i> balas (≥7 vs. 6)	2,51 (1,54; 4,10)	0,0002	0,0005
3	Prostatos masė (kiek.)	1,00 (0,99; 1,01)	0,4916	0,5050
4	PSA (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0544	0,0945
5	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	1,06 (0,50; 2,25)	0,8716	0,8709
6	Amžius (kiek.)	1,03 (0,99; 1,07)	0,1454	0,1403
7	<i>RASSF1</i> (M vs. N)	2,27 (1,12; 4,63)	0,0242	0,0194
8	<i>DAPK1</i> (M vs. N)	2,55 (1,11; 5,84)	0,0276	0,0454
9	<i>RASSF1</i> ir/ ar <i>DAPK1</i> (bent vienas M vs. abu N)	2,20 (1,06; 4,54)	0,0348	0,0268
Daugiamačiai modeliai (tik esant <i>Gleason</i> 6 navikui)				
Navikai				
10	pT (3 vs. ≤2)	15,46 (3,35; 71,23)	0,0005	0,0007*
	<i>RASSF1</i> (M vs. N)	5,81 (1,08; 31,22)	0,0415	
Šlapimas				
11	pT (3 vs. ≤2)	10,59 (2,49; 45,08)	0,0015	0,0003*
	<i>RASSF1</i> (M vs. N)	8,78 (2,53; 30,46)	0,0007	

M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė, kiek. – kiekybinis kintamasis, pT – patloginė naviko stadija, PSA – prostatos specifinis antigenas, *TMPRSS2-ERG* – sulietinio transkripto raiškos būklė. Reikšmingos P vertės paryškintos.

*Atgalinis kovariančių įvedimas.

P2 lentelė. Molekulinių ir klinikinių-patologinių rodiklių vienmačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai, analizuojant Lietuvos ir Vėžio genomo atlaso projekto (TCGA) prostatos vėžio imtis (antrasis tyrimų etapas).

Nr.	Kovariantė	Lietuvos imtis (BCP)			TCGA (BCP)	TCGA (progresija)
		Pavojaus rizika (95%)	Kovariantės P	Modelio P	Modelio P	Modelio P
Promotoriaus metilinimas						
1	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	5,45 (1,31; 22,66)	0,0203	0,0028	0,0795	0,2302
2	<i>CCDC181</i> (M vs. N/ kiek.)	3,40 (0,47; 24,67)	0,2294	0,1411	0,0702	0,7190
3	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9499	0,0003	0,0624	0,3107
4	<i>ZMIZ1</i> (M vs. N/ kiek.)	3,10 (0,75; 12,92)	0,1215	0,0670	0,6455	0,3578
5	<i>FILIP1L</i> (M vs. N/ kiek.)	1,90 (0,58; 6,24)	0,2924	0,2517	0,1497	0,0561
6	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	7,81 (1,87; 32,69)	0,0051	0,0002	0,0911	0,1695
7	<i>KCTD8</i> (M vs. N/ kiek.)	1,41 (0,65; 3,03)	0,3865	0,3990	0,9625	0,8106
8	<i>CD44</i> (M vs. N/ kiek.)	1,00 (0,48; 2,07)	0,9973	0,9957	0,1054	0,3811
9	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	2,19 (0,98; 4,91)	0,0574	0,0447	0,2564	0,3231
10	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,63 (1,22; 5,67)	0,0142	0,0236	0,4708	0,7989
11	mir-137 (M vs. N/ kiek.)	1,48 (0,74; 2,96)	0,2753	0,2806	0,0928	0,0122
12	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	3,93 (1,51; 10,23)	0,0052	0,0168	0,4990	0,0188
Genų raiška						
13	<i>PRKCB</i> (kiek.)	0,60 (0,27; 1,34)	0,2118	0,1836	0,0378	0,3147
14	<i>CCDC181</i> (kiek.)	0,00 (0,00; 28,14)	0,1329	0,1111	0,1856	0,3035
15	<i>ADAMTS12</i> (kiek.)	2,26 (0,02; 262,82)	0,7375	0,7387	0,0321	0,2170
16	<i>ZMIZ1</i> (kiek.)	0,94 (0,82; 1,09)	0,4090	0,3960	0,0548	0,0703
17	<i>NAALAD2</i> (kiek.)	0,00 (0,00; 0,17)	0,0205	0,0059	0,7077	0,9964
18	<i>DNMT1</i> (kiek.)	0,09 (0,00; 7,16)	0,2842	0,2648	0,2181	0,0033
19	<i>KDM1A</i> (kiek.)	0,95 (0,84; 1,06)	0,3664	0,3555	0,0894	0,5037
20	<i>KDM5B</i> (kiek.)	0,96 (0,75; 1,22)	0,7331	0,7309	0,0093	0,9132
Kiti rodikliai						
21	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	0,70 (0,34; 1,44)	0,3328	0,3375	n.a.	n.a.
22	pT (3 vs. 2)	4,32 (2,08; 8,94)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002
23	ISUP laipsnių grupė (5 grupės)	3,23 (2,09; 4,99)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
24	Prostatos masė (kiek.)	1,01 (1,00; 1,03)	0,1221	0,1461	n.a.	n.a.
25	PSA (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0621	0,1048	0,4881	0,4723
26	Amžius (kiek.)	1,00 (0,95; 1,05)	0,9470	0,9462	0,4655	0,6256

BCP – biocheminė ligos progresija, M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė, kiek. – kiekybinis kintamasis, pT – patologinė naviko stadija, PSA – prostatos specifinis antigenas, *TMPRSS2-ERG* – sulietinio transkripto raiškos būklė, ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, n.a. – neanalizuota. Reikšmingos P vertės paryškintos.

*Tiesioginis kovariančių įvedimas.

P3 lentelė. Baltymus koduojančių genų promotoriaus metilinimo ir kitų molekulinį ir/ ar klininių-patologinių rodiklių daugiamačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai, analizuojant Lietuvos ir Vėžio genomo atlaso projekto (TCGA) prostatos vėžio imtis (antrasis tyrimų etapas).

Nr.	Kovariantė	Lietuvos imtis (BCP)			TCGA (BCP)	TCGA (progresija)
		Pavojaus rizika (95%)	Kovariantės P	Modelio P	Modelio P	Modelio P
Promotoriaus metilinimas						
1	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	3,02 (0,73; 12,54)	0,1306	0,0003	0,1353	0,4563
	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9516			
2	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	3,22 (0,76; 13,69)	0,1157	0,0002	0,1314	0,3260
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	5,77 (1,34; 24,90)	0,0195			
3	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9528	0,0001	0,1132	0,3580
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	4,44 (1,05; 18,73)	0,0434			
4	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	2,83 (0,68; 11,80)	0,1542	0,0001	0,2001	0,5197
	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9528			
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	4,33 (1,02; 18,45)	0,0488			
Genų raiška						
5	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	5,10 (1,18; 22,08)	0,0303	0,0007	0,2267	0,3891
	<i>NAALAD2</i> (raiška, kiek.)	0,00 (0,00; 2,70)	0,0828			
Sulietinis transkriptas						
6	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	1,61 (0,80; 3,27)	0,1872	0,0113	n.a.	n.a.
	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	5,30 (1,26; 22,25)	0,0233			
7	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	1,97 (0,96; 4,04)	0,0646	0,0003	n.a.	n.a.
	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9484			
8	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	1,48 (0,73; 3,00)	0,2748	0,0003	n.a.	n.a.
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	8,57 (2,04; 35,92)	0,0035			
Klininiai-patologiniai rodikliai						
9	pT (3 vs. 2)	3,77 (1,82; 7,84)	0,0004	<0,0001*	0,0002	0,0007
	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	4,36 (1,04; 18,25)	0,0450			
10	pT (3 vs. 2)	3,85 (1,86; 7,98)	0,0003	<0,0001*	0,0001	0,0005
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	6,87 (1,63; 28,84)	0,0089			
11	ISUP laipsnių grupė (5 grupės)	2,80 (1,80; 4,35)	<0,0001	<0,0001*	<0,0001	<0,0001
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	5,51 (1,29; 23,53)	0,0219			
12	PSA (kiek.)	1,02 (1,00; 1,05)	0,0463	0,0031*	0,5813	0,6454
	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	5,34 (1,28; 22,29)	0,0221			
	<i>ZMIZ1</i> (M vs. N/ kiek.)	5,78 (0,79; 42,25)	0,0855			
13	PSA (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0996	0,0163	0,7824	0,5044
	<i>ZMIZ1</i> (M vs. N/ kiek.)	5,78 (0,79; 42,25)	0,0855			
14	Prostatos masė (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0505	0,0027	n.a.	n.a.
	<i>PRKCB</i> (M vs. N/ kiek.)	5,65 (1,35; 23,58)	0,0180			
15	Prostatos masė (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0491	0,0003	n.a.	n.a.
	<i>ADAMTS12</i> (M vs. N/ kiek.)	>1000	0,9502			
16	Prostatos masė (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0932	0,0003	n.a.	n.a.
	<i>NAALAD2</i> (M vs. N/ kiek.)	7,56 (1,80; 31,66)	0,0059			

BCP – biocheminė ligos progresija, M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė, kiek. – kiekybinis kintamasis, pT – patologinė naviko stadija, PSA – prostatos specifinis antigenas, *TMPRSS2-ERG* – sulietinio transkripto raiškos būklė, ISUP – Tarptautinė urologinės patologijos draugija, n.a. – neanalizuota. Reikšmingos P vertės paryškintos.

*Tiesioginis kovariančių įvedimas.

P4 lentelė. MiRNR motininių genų promotoriaus metilinimo ir kitų molekulinė ir/ ar pataloginių rodiklių daugiamačiai Kokso proporcingos rizikos modeliai, analizuojant Lietuvos ir Vėžio genomo atlaso projekto (TCGA) prostatos vėžio imtis (antrasis tyrimų etapas).

Nr.	Kovariantė	Lietuvos imtis (BCP)			TCGA (BCP)	TCGA (progresija)
		Pavojaus rizika (95%)	Kovariantės P	Modelio P	Modelio P	Modelio P
miRNR motininių genų metilinimas						
1	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	1,83 (0,79; 4,23)	0,1581	0,0265	0,5181	0,5917
	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,17 (0,98; 4,84)	0,0583			
2	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	1,89 (0,82; 4,35)	0,1347	0,0172	0,6854	0,0632
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	3,15 (1,18; 8,42)	0,0229			
3	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,14 (0,95; 4,83)	0,0691	0,0130	0,5551	0,0512
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	2,95 (1,07; 8,12)	0,0368			
4	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	1,67 (0,71; 3,92)	0,2417	0,0175	0,7529	0,1123
	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	1,87 (0,81; 4,29)	0,1419			
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	2,62 (0,95; 7,24)	0,0648			
Sulietinis transkriptas						
7	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	0,62 (0,30; 1,29)	0,2062	0,0333	n.a.	n.a.
	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	2,85 (1,14; 7,12)	0,0258			
8	<i>TMPRSS2-ERG</i> (taip vs. ne)	0,67 (0,32; 1,41)	0,2961	0,0151	n.a.	n.a.
	mir-155 (M vs. N/ kiek.)	2,37 (0,93; 6,06)	0,0732			
	mir-152 (M vs. N)	2,31 (1,03; 5,20)	0,0441			
Patologiniai rodikliai						
9	pT (3 vs. 2)	4,14 (1,99; 8,61)	0,0002	< 0,0001 *	0,0003	0,0008
	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,36 (1,09; 5,11)	0,0302			
10	pT (3 vs. 2)	4,30 (2,07; 8,93)	0,0001	0,0002	0,0004	0,0006*
	mir-137 (M vs. N/ kiek.)	1,43 (0,71; 2,88)	0,3148			
11	pT (3 vs. 2)	4,33 (2,09; 8,99)	0,0001	< 0,0001 *	0,0007	0,0007*
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	3,94 (1,51; 10,30)	0,0053			
12	pT (3 vs. 2)	4,47 (2,13; 9,36)	0,0001	< 0,0001	0,0013	0,0007
	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,17 (1,00; 4,71)	0,0513			
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	3,57 (1,36; 9,41)	0,0103			
13	ISUP laipsnių grupė (5 grupės)	3,30 (2,09; 5,21)	< 0,0001	< 0,0001 *	< 0,0001	< 0,0001 *
	mir-31 (M vs. N/ kiek.)	3,23 (1,24; 8,43)	0,0172			
14	PSA (kiek.)	1,02 (1,00; 1,04)	0,0371	0,0176*	0,7860	0,1818
	mir-152 (M vs. N/ kiek.)	2,74 (1,26; 5,96)	0,0115			

BCP – biocheminė ligos progresija, M/ N – metilinta/ nemetilinta promotoriaus būklė, kiek. – kiekybinis kintamasis, pT – pataloginė naviko stadija, PSA – prostatos specifinis antigenas, *TMPRSS2-ERG* – sulietinio transkripto raiškos būklė, ISUP – Tarptautinė urologinės patalogijos draugija, n.a. – neanalizuota. Reikšmingos P vertės paryškintos.

*Tiesioginis kovariančių įvedimas.