



VILNIAUS UNIVERSITETO
MEDICINOS FAKULTETO
ŽMOGAUS IR MEDICININĖS GENETIKOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

*GLIOBLASTOMOS MOLEKULINIŲ ŽYMENŲ PAIEŠKA MODERNIUOSE
LĄSTELIŲ KULTŪRŲ MODELIUOSE IR PACIENTŲ BIOLOGINĖJE
MEDŽIAGOJE*

Magistrantė
ILONA TROCKAJA

(parašas)

Darbo vadovas
prof. KĘSTUTIS SUŽIEDĖLIS
Konsultantas
dr. RYTĖ RINKEVIČIENĖ

(parašas)

(parašas)

VU MF Žmogaus ir medicininės
genetikos katedros vedėjas
prof. (HP) dr. ALGIRDAS UTKUS

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Galvos smegenų navikų klasifikavimas	7
1.2 Glioblastoma	7
1.3 Glioblastomos molekuliniai žymenys ir jų taikymas	9
1.4 MikroRNR biogenezė ir funkcija gliomagenezės procese bei potencialus pritaikymas	11
1.5 Eksperimentiniai <i>in vitro</i> glioblastomos tyrimo modeliai	14
1.6 Glioblastomos U-87 ląstelių linijos visuminė genų ir miRNR raiškos analizė	15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	17
2.1 MEDŽIAGOS	17
2.1.1 Tirpalai ir reagentų rinkiniai	17
2.1.2 Prietaisai ir priemonės	17
2.2 METODAI	18
2.2.1 Tyrimo objektas	18
2.2.2 Glioblastomos U-87 ląstelių linijos	18
2.2.3 Sferoidų auginimas	19
2.2.4 RNR skyrimas	20
2.2.4.1 Visuminės RNR, praturtintos trumpomis nekoduojančiomis RNR skyrimas iš 2D ir 3D kultivuotų ląstelių	20
2.2.4.2 RNR skyrimas iš azote šaldyto, navikinio audinio	21
2.2.4.3 RNR skyrimas iš formaline fiksuotų, į parafiną įlietų audinių	21
2.2.5 RNR kokybės įvertinimas	22
2.2.6 Genų raiškos tyrimas	23
2.2.6.1 Kopijinės DNR sintezė	23
2.2.6.2 AT- kPGR	23
2.2.7 MikroRNR raiškos tyrimas	24
2.2.7.1 Kopijinės DNR sintezė	24
2.2.7.2 AT- kPGR	25
2.2.8 AT- kPGR reakcijų efektyvumo įvertinimas	27
2.2.9 Statistinė duomenų analizė	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1 Genų raiškos įvertinimas glioblastomos U-87 ląstelių linijos 3D modelinėje sistemoje, panaudojant AT- kPGR	29
3.2 Genų raiškos skirtumų glioblastomos audinyje įvertinimas	30
3.3 MikroRNR raiškos įvertinimas glioblastomos U-87 ląstelių linijos 3D modelinėje sistemoje, panaudojant AT- kPGR	33
3.4 MikroRNR raiškos skirtumų glioblastomos audinyje įvertinimas	34
3.6 MikroRNR raiškos pokyčių tarp glioblastomos ir sveiko smegenų audinio įvertinimas	36
3.7 Tiriamų miRNR ir genų raiškos sąsajų su glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu įvertinimas	38
IŠVADOS	41
SANTRAUKA	42
SUMMARY	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS	44
PRIEDAI	48

SANTRUMPOS

2D – dvidimensinė, monosluoksnį formuojanti ląstelių kultūra
3D - tridimensinė (erdvinė) ląstelių kultūra
AMOs – priešprasmiai miRNR oligonukleotidai
AT- kPGR - atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazės grandininė reakcija
CCL20 - chemokino C-C motyvo ligandą 20 koduojantis genas
CDH4 - kadheriną 4 koduojantis genas
CLDN22 - klaudiną 22 koduojantis genas
CNS - centrinė nervų sistema
COL1A2 - I tipo kolageno alfa-2 grandinę koduojantis genas
DMSO - dimetilsulfoksidas
EMT - epitelinis-mezenchiminis virsmas
EDTA - etileno diamino tetra-acto rūgštis
FBS - veršiuko embriono serumas
FFPI - formaline fiksuotas parafine įlietas audinys
FGF5 - fibroblastų augimo veiksnį 5 koduojantis genas
FGF7 - fibroblastų augimo veiksnį 7 koduojantis genas
GAPDH - gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazę koduojantis genas
GBM - daugiaformė glioblastoma
HK2 - heksokinazę 2 koduojantis genas
HMGCS1 - 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA sintazę 1 koduojantis genas
HMMR - hialurono sužadinamą, judrumo receptorių koduojantis genas
HPRT - hipoksantino-guanino fosforibozilo transferazę koduojantis genas
IDH - izocitrato dehidrogenazę koduojantis genas
IL1B - interleukiną 1 beta koduojantis genas
IL1RAP - interleukino 1 receptorių jungiantį baltymą koduojantis genas
IL1RI - interleukino 1 I tipo receptorių koduojantis genas
ITGAV - integrino alfa 5 subvienetą koduojantis genas
ITGB3 - integrino 3 beta subvienetą koduojantis genas
kDNR - kopijinė DNR

KEGG - Kioto genų ir genomų enciklopedija
MEM - „*Minimum Essential Media*“ mitybinė terpė
MGMT - O⁶-metilguanino-DNR metiltransferazę koduojantis genas
miRNR - mažoji nekoduojanti ribonukleorūgštis
MRAS - raumenų RAS onkogeno homologą koduojantis genas
NKS - naujos kartos sekoskaita
PBS - fosfatinis buferinis tirpalas
PGR - polimerazės grandininė reakcija
PNPO - piridoksino 5'-fosfato oksidazę koduojantis genas
POLR3G - RNR polimerazės III G subvienetą koduojantis genas
PSO - Pasaulinė sveikatos organizacija
PTEN - fosfatazės ir tenzino homologas
PTGS2 - prostaglandinų-endoperoksido sintazę 2 koduojantis genas
SPTLC3 - serino palmitoiltransferazės 3 subvienetą koduojantis genas
TRAIL - su naviko nekrozės veiksniu susijęs, apoptozę indukuojantis ligandas
UTR - netransliuojama sritis
U87 - glioblastomos ląstelių linija
VEGF - kraujagyslių endotelio augimo veiksnys

ĮVADAS

Daugiaformė glioblastoma (GBM) – blogiausia prognoze pasižymintis smegenų navikas, kuriam nepaisant kombinuoto (chirurginio, chemoterapinio, radioterapinio) gydymo, būdingas ypač trumpas sergančiųjų išgyvenamumas – nuo kelių mėnesių iki kelerių metų, kuomet vidutinis išgyvenamumas tesiekia 12-15 mėnesių. Siekiant prailginti pacientų išgyvenamą yra atliekama daugybė mokslinių tyrimų, naudojant įvairius šios vėžio formos eksperimentinius modelius. Jais siekiama išsiaiškinti vėžinio susirgimo etiologiją, patogenezę, suprasti molekulinis mechanizmus ir genetinius pakitimus nulemiančius ligos vystymąsi bei surasti kliniškai svarbių molekulinų žymenų, reikšmingų diagnozuojant ir prognozuojant GBM.

Anksčiau dauguma vėžinių *in vitro* tyrimų rėmėsi pasitelkiant vėžines ląstelių linijas, auginamas kaip dvidimensines (2D), monosluoksnį formuojančias kultūras, kurios puikiai atspindėjo greitą, nekontroliuojamą vėžinių ląstelių fenotipą. Tačiau įprastinės 2D kultūros prastai atspindi naviko mikroaplinkos įtaką, klinikinių navikų sudėtingumą ir heterogeniškumą, todėl vėžiniuose tyrimuose vis dažniau pradėta taikyti tridimensinius (3D) ląstelių kultūrų modelius, kurie pasižymi ląstelių organizacija ir architektūra artimesne *in vivo* navikams.

Šio tyrimo metu, pasitelkiant genų ir miRNR, susijusių su naviko vystymosi procesais, raiškos tyrimą skirtinguose ląstelių kultūrų modeliuose bei glioblastomos biologiniuose mėginiuose, siekiama atrasti naujų GBM molekulinų žymenų, svarbių vėžio formavimuisi.

- **Darbo tikslas:** nustatyti pasirinktų genų ir miRNR raiškos skirtumus glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotuose ląstelių kultūrose bei glioblastomos biologiniuose mėginiuose ir įvertinti šiuos skirtumus, kaip potencialius molekulinis vėžio žymenis.

Darbo uždaviniai:

- AT- kPGR metodu patvirtinti laboratorijoje turimus visuminės genų ir miRNR raiškos duomenis, įvertinant raiškos pokyčius tarp glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuočių ląstelių kultūrų;
- palyginti pasirinktų genų ir miRNR raišką glioblastomos audinyje bei glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotuose ląstelių kultūrose;
- nustatyti miRNR raiškos pokyčius tarp glioblastomos ir sveiko smegenų audinio bei įvertinti glioblastomos formavimuisi svarbias miRNR;
- įvertinti genų ir miRNR raiškos sąsajas su glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu;

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Galvos smegenų navikų klasifikavimas

Pasaulinė sveikatos organizacija (PSO) suskirstė centrinės nervų sistemos (CNS) navikus į 4 tipus (PSO I-IV) pagal jų piktybiškumo laipsnį. Toks klasifikavimas turi vertės prognozuojant biologinį neoplazmos pasireiškimą bei įtakoja gydymo pasirinkimą, ypač sprendžiant spindulinės ir chemoterapijos taikymo sąlygas. I-ojo laipsnio gliomoms priskiriami mažo proliferacinio aktyvumo navikai, kurie nesunkiai pašalinami chirurginiu būdu. II-ojo laipsnio navikai po chirurginio pašalinimo linkę atsinaujinti bei progresuoti į aukštesnio laipsnio gliomas. Navikai pasižymintys ryškiais histologiniais pakitimais (branduolio atipija, mitozinis aktyvumas) priskiriami III laipsnio gliomoms, tuo tarpu tie, kurie linkę į nekrozę (pavyzdžiui, daugiaformė glioblastoma (angl. *glioblastoma multiforme* (GBM)) priklauso IV-ajam laipsniui ir yra siejami su blogiausia prognoze (Louis *et al.*, 2007).

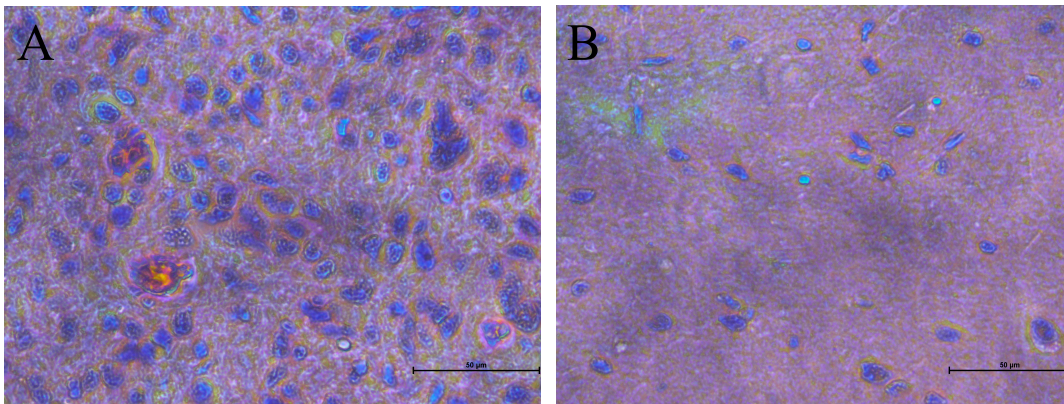
2016 m. PSO CNS navikų klasifikacija buvo atnaujinta, remiantis ne tik navikinio audinio histologijos ypatumais, bet ir būdingais molekuliniais žymenimis. Gliomų tipai išskirstyti į dar tikslesnes kategorijas, manoma, leis taikyti efektyvesnės terapijos būdus bei tiksliau klasifikuoti klinikinius ir eksperimentinius tyrimus. Tikimasi, jog šimtmetį gyvavusią, histologiniais duomenimis besiremiančią smegenų navikų diagnostiką, ateityje pakeis molekulinį žymenų įdiegimas į klinikinius tyrimus (Louis *et al.*, 2016).

1.2 Glioblastoma

Glioblastoma - CNS navikas, pasižymintis blogiausia prognoze. Tai piktybiškiausia (IV laipsnio) smegenų naviko forma, kuri gydoma chemoterapijos, radioterapijos arba chirurginės intervencijos būdu, tačiau šios gydymo priemonės tik sušvelnina ligos simptomus, o vidutinė išgyvenimo trukmė po diagnozės nustatymo tesiekia 12-15 mėnesių (Purow ir Schiff, 2009). Glioblastomos paprastai yra skirstomos į pirmines arba *de novo*, kurios dažniausiai atsiranda iš normalių glijos ląstelių ir antrines – besivystančias progresuojant žemesnio laipsnio (pagal PSO) gliomoms. Dauguma GBM

yra pirminės, o jomis sergantys pacientai yra vyresnio amžiaus. Be to, jiems būdinga prastesnė ligos eiga, lyginant su pacientais, sergančiais antrinėmis GBM. Liga diagnozuojama vidutiniškai 3,2 iš 100 000 gyventojų, šiek tiek dažniau vyrams nei moterims (1,6:1), o vidutinis sergančiųjų amžius siekia 64 metus, nors gali išsivystyti bet kuriame amžiuje, įskaitant vaikystę (Davis, 2016).

Pagrindiniai GBM bruožai yra ryškus mitozinis aktyvumas, kraujagyslių proliferacija, didelis ląstelingumas bei nekrozės plotai (1 pav.).



1 pav. FFPĮ mėginio (dažytas hematoksilino-eozino (HE) metodu) vaizdas matomas inversiniu mikroskopu: A- GBM audinys; B- sveikas smegenų audinys.

Nekrozė yra glioblastomos skiriamasis požymis ir būna dviejų tipų: 1) plati centrinės naviko dalies nekrozė, kurios priežastis yra nepakankama naviko mityba, ji matoma atliekant kompiuterinės tomografijos ir branduolių magnetinio rezonanso tyrimus ir būdinga pirminėms glioblastomoms; 2) smulkių netaisyklingų nekrozės židinių su pseudopalisadinėmis struktūromis aplink juos, randama tiek pirminėse, tiek antrinėse glioblastomose. Nekrozė kartu su išreikšta kraujagyslių proliferacija yra vienas iš svarbiausių blogos prognozės veiksnių (Gudinavičienė *et al.*, 2004).

Standartinis GBM gydymas apima kuo radikalesnę chirurginį pašalinimą ir po jo sekančią spindulinę terapiją, derinamą su adjuvantiniu gydymu, pavyzdžiui, vaistiniu preparatu – temozolamidu, kuris yra gerai toleruojamas (pasižymi ribotu šalutiniu poveikiu) bei prailginą pacientų išgyvenamumo trukmę. Tačiau ir šis, aukšiniu standartu

pripažintas, gydymo būdas nepadedą pasiekti išgyvenamumo lygio, būdingo kitų navikų atvejais (Thon *et al.*, 2013).

Šio tipo naviko atveju metastazės nėra dažnos - paprastai GBM didėja skverbiantis į aplinkinį smegenų audinį, pažeidžiant svarbiausias smegenų sritis. Dėl šios invazinės kilmės, yra neįmanoma pašalinti visų piktybinių ląstelių chirurginės intervencijos būdu, todėl molekulinis GBM fenotipavimas išlieka daugiausiai vilčių teikiančia kryptimi, vystant taikinių terapijas (Davis, 2016).

1.3 Glioblastomos molekuliniai žymenys ir jų taikymas

Auglių klasifikacija nuolatos kinta, atrandant skirtingiems navikams būdingus, diagnostinės ir prognostinės vertės turinčius molekulinis žymenis. Molekulinis žymenų profilis gali turėti ypatingos svarbos klinikiams sprendimams.

Dar iki naujos klasifikacijos įvedimo, kai kuriais atvejais buvo įvertinami molekuliniai žymenys. Vienas tokių žymenų yra *MGMT* (angl. *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*) genas. Tai vienas iš dažniausiai aktyvinamų onkogenų žmogaus piktybinės glioblastomos atvejais. *MGMT* geno koduojamas baltymas dalyvauja DNR pažeidimų taisyme. Šio geno promotoriaus metilinimo tyrimas gali būti panaudojamas, renkantis glioblastomos gydymą. Žinant, kad *MGMT* genas atsakingas už DNR reparaciją ir kad navikinėse ląstelėse šis genas yra metilintas – nutildytas, naudojami alkilinantys junginiai (pvz.: vaistinis preparatas temozolomidas) (Jacinto *et al.*, 2007). Šie vaistai stipriai pažeidžia navikinių ląstelių genetinę informaciją, tuo pačiu sumažina jų proliferaciją, gyvybines funkcijas bei prailgina paciento išgyvenimo trukmę (Hegi *et al.*, 2004).

IDH1/2 (angl. *isocitrate dehydrogenase (IDH1, IDH2)*) geno mutacijos jau seniai žinomas GBM prognostinis žymuo. Pagal 2016 m. atnaujintą PSO klasifikaciją glioblastomos skirstomos į pirmines ir antrines, atsižvelgiant į mutacijas *IDH* gene, atitinkamai: glioblastoma *IDH*-laukinio tipo ir glioblastoma *IDH*-mutacija (Louis *et al.*, 2016). Nustatyta, kad daugiau nei 80% antrinių glioblastomų ir mažiau nei 5% pirminių turi mutacijas *IDH1* gene. Šios mutacijos atlieka svarbų vaidmenį gliomagenezėje, naviko biologijoje bei pasižymi klinicine ir prognostine svarba. Nustatyta, kad pacientų,

kurių genome yra įvykusi *IDH* mutacija, ligos eigos prognozė yra geresnė. Tai paaiškinama tuo, kad *IDH1/2* genai koduoja svarbius ląstelės metabolizmo fermentus, o mutacijos šiuose genuose skatina reakcijas, kurių metu gaminamas ląstelėms žalingas metabolitas - 2-hidroksiglutaratas. Tuo tarpu, vertinant jo lygį gliomomis sergančių pacientų organizme yra stebimas atsako į gydymą efektyvumas (Szopa *et al.*, 2017).

Navikui būdinga pastovi hipoksija aktyvina pagrindinį angionezės mediatorių - kraujagyslių endotelio augimo veiksnį (angl. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)). GBM pasižymi padidėjusia VEGF raiška, dėl ko yra skatinama kraujagyslių proliferaciją ir naviko augimas. Vienas iš būdų paveikti VEGF receptorių ir slopinti jų perduodamus signalus yra monokloninių antikūnų taikymas. Monokloninis antikūnas *Avastin* (*bevacizumab*) yra patvirtintas terapinis preparatas, kurio taikinyje VEGF receptoriai. Pakartotinos *Avastin* injekcijos blokuoja VEGF signalus, tokiu būdu sutrikdomas naviko maitinimas ir jo dydis mažėja (Carlsson *et al.*, 2014).

Vėžį slopinantys genai yra svarbiausi DNR pažaidų taisymo, ląstelės proliferacijos ir apoptozės reguliatoriai. Šių genų mutacijos yra būdingos visų tipų navikams, taip pat ir glioblastomai. p53 (angl. *tumor protein 53*) veikia kaip svarbiausias ląstelės piktybėjimą slopinantis veiksnys, nes nuo jo priklauso apoptozė. p53 koduojančio geno (*TP53*) mutacijos vienos iš dažniausiai randamų gliomose. 30% pirminių ir 65% antrinių glioblastomų atvejais aptinkama neveikli šio geno būsena. Nemažiau svarbus vėžį slopinantis PTEN (angl. *phosphatase and tensin homolog*), reguliuojantis gliomų augimą ir invaziją, o jį koduojančio geno mutacijos aptinkamos 40-50% gliomų atvejais. GBM atveju, viena iš perspektyvių vystomų terapinių kryptų yra genų terapija, kuri gliomų ląstelėse pirmą kartą buvo pritaikyta perkeltant vėžį slopinantį *TP53*. Funkcionalaus geno atkūrimas paskatino ląstelių apoptozę *in vitro* bei slopino naviko vystymąsi *in vivo* (Kwiatkowska *et al.*, 2013).

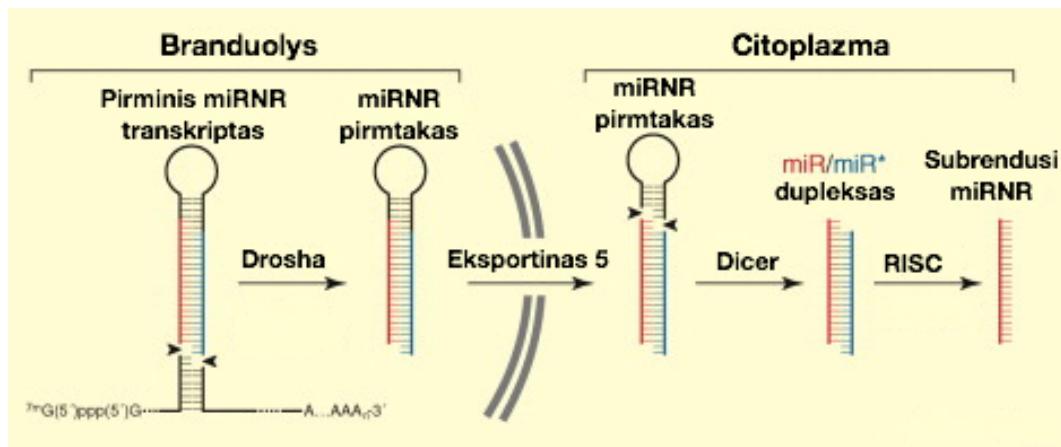
GBM vystymasis susijęs su daugybinėmis reguliavimo klaidomis ląstelės ciklo G1/S kontrolės taškuose ir daugelio genetinių pokyčių atsiradimu gliomos ląstelėse: heterozigotiškumo praradimu 10 chromosomoje, *EGFR* (angl. *epidermal growth factor receptor*), *FGFR2* (angl. *fibroblast growth factor receptor 2*), *IRS2* (angl. *insulin receptor substrate 2*) ir *AKT3* (angl. *AKT serine/threonine kinase 3*) genų amplifikacija bei *PTEN*, *TP53*, *PARK2* (angl. *Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), *PTPRD* (angl.

protein tyrosine phosphatase) ir *NF1* (angl. *neurofibromin 1*) genų mutacijomis (Urbańska *et al.*, 2014). Visi šie paminėti molekuliniai žymenys dabar įtraukti į naująją klasifikaciją siekiant tiksliau diferencijuoti žemesnio piktybiškumo smegenų navikus.

Tobulėjant molekuliniais metodams nuolatos vyksta naujų žymenų paieška. Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas nekoduojančioms RNR molekulėms, ypač miRNR. miRNR yra laikomi naujais kandidatiniiais molekuliniais žymenimis daugelio ligų atveju dėl savo stabilumo ir nesudėtingo nustatymo biologiniuose skysčiuose bei audiniuose.

1.4 MikroRNR biogeneze ir funkcijos gliomagenezės procese bei potencialus pritaikymas

MikroRNR (miRNR) – trumpos nekoduojančios 18-25 nukleotidų ilgio RNR molekulės, dalyvaujančios potranskripciniame genų reguliavime. Jų funkcijos susijusios su daugeliu biologinių procesų, tokių kaip: ląstelių proliferacija, diferenciacija, apoptozė, atsakas į stresą bei patologinės būklės, pavyzdžiui, vėžys. miRNR reguliuoja genų raišką dalyvaudamos genų translacijos slopinimo bei informacinės RNR (iRNR) degradavimo procesuose. miRNR biogeneze apima dvi pakopas (2 pav.).



2 pav. miRNR biogeneze (redaguota pagal: Tomari ir Zamore, 2005).

Pirmoji vyksta branduolyje, kai segtuko formos struktūras formuojantis pirminis miRNR transkriptas (angl. *pri-miRNA*) yra skaldomas ribonukleazės Drosha. Antroji dalis vyksta eksportinui 5 (angl. *exportin V*) pernešus po skaldymo susiformavusį miRNR

pirmąją (angl. *pre-miRNA*) iš branduolio į citoplazmą, kur jis toliau skaldomas Dicer tipo nukleazėmis. Po skaldymo susidaro maždaug 20-25 nukleotidų dvigrandė RNR, kuriai išsivyniojus, viena jos grandinė degraduojama, o kita toliau formuoja subrendusią miRNR. Subrendusi miRNR įsiterpia į RISC kompleksą (angl. *RNA induced silencing complex*), kuris atpažįsta komplementarias iRNR sekas 3' - UTR (angl. *untranslated region*) srityse. Šis miRNR prisijungimas lemia tikslinės iRNR nestabilumą arba translacijos slopinimą, todėl sumažėjus koduojamo baltymo raiškai yra paveikiami įvairūs ląsteliniai procesai (Barciszewska, 2016).

Mokslininkai vis daugiau dėmesio skiria miRNR svarbai vėžio vystymuisi ir progresijai. Tai labai svarbūs pagrindinių naviko patogenezės kelių reguliatoriai. Pastebėta, kad miRNR raiška dažnai skiriasi lyginant navikinį audinį su sveiku. miRNR raiškos pokyčiai smegenų navikuose gali įvykti dėl chromosominių persitvarkymų, epigenetinių sutrikimų bei mutacijų jų biogenezės keliuose. Nustatyta, kad šios RNR atlieka svarbų vaidmenį, susijusį su glioblastomos progresija, invazyvumu, naviko augimu bei atsaku į gydymą (Barciszewska, 2016).

Viena miRNR gali prisijungti ir atvirkščiai reguliuoti skirtingus iRNR taikinius, tuo tarpu viena iRNR gali būti sinergistiškai reguliuojama daugelio miRNR. Nustatyta, kad miRNR reguliuoja daugiau nei vieną trečiąją dalį žmogaus genų, o miRNR genų buvimas lūžiose genomo srityse pateikia išsamius įrodymus apie jų vaidmenį naviko formavime. Sutrikusi šių RNR raiška ir jų kiekio pokyčiai gali turėti vėžį slopinantį arba stiprinantį poveikį. Pavyzdžiui, miRNR perteklius, kurios taikinyje yra vėžį slopinantis genas, lemia mažesnę šio apsauginio veiksnio efektyvumą tuo tarpu miRNR, kuri prisijungia protoonkogeną, sumažėjęs kiekis lemia per didelį onkogeninio baltymo efektyvumą. Toks vėžį slopinančių ir stiprinančių genų aktyvumo disbalansas lemia piktybinio naviko vystymąsi (Luo *et al.*, 2015).

Viena iš pirmųjų tirtų miRNR, kurios padidėjusi raiška nustatyta GBM audinyje buvo miR-10b. Nustatyta tiesinė priklausomybė tarp miR-10b raiškos ir gliomų piktybiškumo laipsnio (pagal PSO). miR-10b reguliuoja GBM invazyvumą, angiogenezę ir ląstelių apoptozę, o ši daugybinio poveikio priežastis yra ta, kad daugelis vėžį slopinančių genų, įskaitant ir *TP53* yra miR-10b taikiniai. Tuo tarpu, miR-21 iki šiol yra viena iš dažniausiai tiriamų miRNR. Nustatyta, kad jos raiškos slopinimas padidina GBM

ląstelių apoptozę ir jautrumą spindulinei terapijai bei chemoterapijai. Dėl šios priežasties miR-21 tyrimas yra itin populiarus, vystant taikinių terapijas (Sasayama *et al.*, 2016).

Per pastaruosius du dešimtmečius yra įrodyta Akt signalinio kelio ir jo molekulinio antagonisto PTEN svarba gliomagenezės procese. Nustatyta, kad miR-26a neigiamai reguliuoja *PTEN* raišką, o šio geno mutacijos lemia jo koduojamo baltymo fermentinio aktyvumo sumažėjimą, todėl naviko vystymosi metu yra skatinama ląstelių proliferacija bei slopinama apoptozė (Huse *et al.*, 2009). Taip pat nustatyta, kad miR-26a (pagal *DIANA TOOLS* duomenų bazę) neigiamai reguliuoja *POLR3G* geną (angl. *RNA Polymerase III subunit G*), o jo koduojamo baltymo raiška pasižymi vėžinės bei embrioninės kamieninės ląstelės, dėl ko yra skatinama jų proliferaciją (Wong *et al.*, 2011). miR-26b - viena iš labiausiai su atsaku į hipoksiją susijusių miRNR, tuo tarpu hipoksija yra vienas iš svarbiausių naviko mikroaplinkos veiksnių. Daugelis tyrimų patvirtina, jog šios miRNR raiška reikšmingai sumažėja gliomos ląstelėse, lyginant su sveiku smegenų audiniu. miR-26b tiesioginis taikynys yra *EphA2* (angl. *ephrin type-A receptor 2*), o padidėjusi šio geno raiška yra susijusi su navikinių ląstelių augimu, migracija, invazija ir angiogeneze, todėl šiuo atveju miR-26 yra priskiriama vėžį slopinančių miRNR grupei ir galėtų būti sėkmingai naudojama taikinių terapijos tikslais (Wu *et al.*, 2011). Pagal *DIANA TOOLS* duomenų bazę *POLR3G* taip pat yra miR-26b taikynys.

Atsižvelgiant į miRNR raiškos pokyčius vėžio atveju, aktyviai plėtojama kryptis - miRNR taikymas priešvėžinėms terapijoms vystyti. Pagrindiniai būdai, leidžiantys reguliuoti miRNR raišką vėžinėse ląstelėse *in vitro* yra onkogeninės miRNR nutildymas ir vėžį slopinančios miRNR aktyvinimas. Pirmuoju atveju yra taikomi priešprasmiai miRNR nukleotidai (angl. *antisense miRNA nucleotides* (AMOs)), o antruoju atveju sintetiniai oligonukleotidai, imituojantys subrendusią miRNR.

AMOs yra sintetiniai oligonukleotidai, komplementarūs tikslinei miRNR. Jungimasis su miRNR blokuoja jos sąveiką su iRNR bei veiksmingai nutildo onkogeninę miRNR (Rolle, 2015). Norint atstatyti arba padidinti prarastą vėžį slopinančio veiksnio aktyvumą yra naudojamos sintetinės miRNR, turinčios identišką seką jų natūraliai egzistuojantiems ekvivalentams. Nustatyta, kad miR-203 raiška glioblastomos audinyje yra reikšmingai sumažėjusi, lyginant su sveiku smegenų audiniu. Pastebėta, kad perkėlus

sintetinę miR-203 į žmogaus U251 GBM ląsteles, žymiai sumažėja fosfolipazės D2 raiška. GBM atveju, fosfolipazė D2 yra onkogeninės miR-213 taikyns. Tokiu būdu buvo veiksmingai slopinama U251 ląstelių proliferacija ir invazija (Shea *et al.*, 2016).

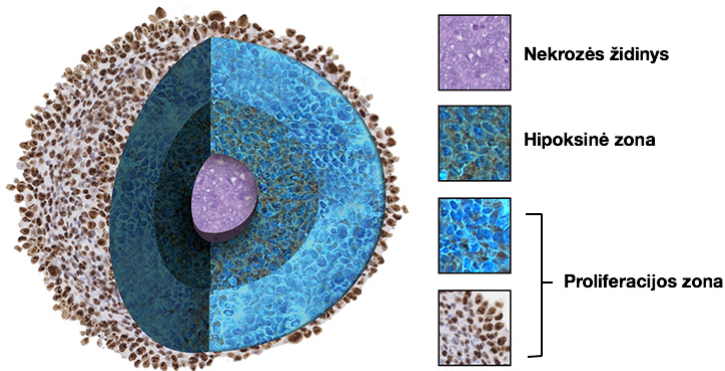
Atsižvelgiant į visas naujas besivystančių terapijų galimybes, ateityje galima tikėtis efektyvesnių būdų pagerinti glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumą ir gyvenimo kokybę, todėl genų ir nekoduojančių RNR, lemiančių naviko vystymąsi nustatymas, galėtų tapti naudingais diagnostiniais ir prognostiniais GBM molekuliniais žymenimis.

1.6 Eksperimentiniai *in vitro* glioblastomos tyrimo modeliai

Tiriant molekulinis pokyčius ląstelėms piktybėjant, nemažiau svarbu pasirinkti modelinę sistemą, kuri geriausiai atspindėtų naviko ląstelėse *in vivo* vykstančius procesus. Tam tikslui dažniausiai naudojamos monosluoksnio dvidimensinės (2D) ląstelių kultūros, tačiau pastebėta, kad šios modelinės sistemos turi trūkumų – nepasižymi audiniams būdingu kompleksiskumu ir prastai atkartoja procesus, vykstančius naviko mikroaplinkoje. Tridimensinis (erdvinis, 3D) ląstelių linijų auginimas yra laikomas tipiniu modeliu atliekant vėžinius tyrimus, o ypatingai atliekant *in vitro* priešvėžinių vaistų atranką. 3D ląstelių kultūros turi keletą svarbių *in vivo* navikų savybių, tokių kaip: ląstelių tarpusavio sąveikos, hipoksija, vaisto įsisavinimas, atsakas ir atsparumas bei tarpląstelinio užpildo gamyba ir paskirstymas.

Yra keletas skirtingų 3D kultūrų modelių, kurie paprastai skirstomi į skysčio ir karkasinius 3D modelius. Karkasinės platformos 3D kultūroms yra gaminamos iš sintetinių ar natūraliai išskirtų polimerų, kurie suteikia paramą ląstelėms augant bei atkartoja augimą tarpląstelinėmis sąlygomis. Naviko sferoidai yra viena iš labiausiai paplitusių ir universalių metodikų 3D ląstelių kultūroms auginti be karkaso. Sferoidai susiformuoja savarankiškai arba priverstinai, pradėdant nuo pavienių ląstelių suspensijos. Lyginant su ląstelių monosluoksniu auginamu ant plokščio paviršiaus, sferoidų modelis panašesnis į sudėtingą audinių ir organų visumą, kurioje kiekviena ląstelė sąveikauja su gretimomis ląstelėmis, formuojantis įvairioms jungtims.

Priklausomai nuo tyrėjo tikslų ir taikomo metodo, yra įmanoma gauti skirtingo matmens sferoidus. Dideli sferoidai (nuo 500 μm skersmens) pasižymi unikalia savybe - cheminiu (deguonies, maisto medžiagų ir metabolitų) gradientu. Jiems būdinga išorinė proliferacijos zona, vidinė - inertiškoji zona, kuriai būdinga deguonies, maistinių medžiagų ir metabolitų stoka ir nekrozės židiny (3 pav.). Tokia struktūra atspindi *in vivo* navikų heterogeniškumą (Zanoni *et al.*, 2016).



3 pav. Sferoido modelis (redaguota pagal: <http://dx.doi.org/10.5772/65387>).

1.7 Glioblastomos U-87 ląstelių linijos visuminė genų ir miRNR raiškos analizė

NVI Molekulinės onkologijos laboratorijoje vykdant naujų potencialių žymenų paiešką, mikrogardelių pagalba buvo atlikta glioblastomos U-87 ląstelių linijos transkriptomine analizė (nepublikuoti laboratorijos duomenys).

Tyrimė buvo naudota iRNR, skirta iš 6 dienas 2D ir 3D sąlygomis augusių U-87 ląstelių. Išanalizavus viso genomo genų raiškos pokyčius keičiantis glioblastomos U-87 ląstelių auginimo sąlygoms iš 2D į 3D, nustatyti 642 genai, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) keitėsi $\geq 1,5$ karto. Iš jų 484 genų raiška didėjo, o 158 – mažėjo.

Taip pat, iš 2D ir 3D sąlygomis augintų ląstelių buvo išskirta miRNR ir atlikus naujos kartos sekoskaitą buvo įvertinti miRNR raiškos pokyčiai. Nustatytos 40 miRNR, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) keitėsi $\geq 1,5$ karto. Iš jų 25-kių miRNR raiška didėjo, o 15-kos – mažėjo.

Atlikus visų duomenų KEGG (angl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) signalinių kelių praturtinimo analizę nustatyta, kad keičiantis ląstelių augimo sąlygoms iš 2D į 3D labiausiai kito šie signaliniai keliai: metabolizmo, ląstelių tarpusavio sąveikos, vėžiniai keliai bei imuninio atsako keliai ($p \leq 0,05$). Įvertinus genų raiškos pokyčius bei tarpusavio sąveikas tolimesniems tyrimams buvo atrinkta po keletą genų iš kiekvieno kelio, kurių raiška keitėsi labiausiai (1 lentelė).

1 lentelė. Tolimesniems tyrimams atrinkti genai, kurių raiška kito keičiantis glioblastomos U-87 ląstelių augimo sąlygoms.

Metaboliniai keliai	Pokytis, kartais	Ląstelių sąveikos	Pokytis, kartais	Vėžio keliai-taikiniai	Pokytis, kartais	Imuninis atsakas	Pokytis, kartais
<i>HMGCS1</i>	+8,4	<i>COL1A2</i>	+1,8	<i>FGF5</i>	-2,3	<i>CCL20</i>	+6,2
<i>POLR3G</i>	-1,6	<i>ITGAV</i>	+1,8	<i>FGF7</i>	+2,5	<i>IL1B</i>	+3,9
<i>PTGS2</i>	+5	<i>ITGB3</i>	+1,8			<i>ILR1</i>	+1,9
						<i>IL1RAP</i>	+2,2

Naudojantis *DIANA TOOLS* įrankio pagalba ir atlikus miRNR taikinių praturtinimo analizę, atrinktos tokios miRNR, kurių taikiniai buvo tarp visuminės genų raiškos analizės metu nustatytų kintančių 642 genų ir kurių raiška kito priešingai nei genų raiška. Papildomai įvertinus nuskaitytų miRNR skaičių atrinktos šios miRNR (2 lentelė). Kadangi kiekviena miRNR turi keletą genų-taikinių, atrinktų miRNR taikiniai pasiskirstė po visus labiausiai kintančius signalinius kelius.

2 lentelė. Tolimesniems tyrimams atrinktos miRNR, kurių raiška kito keičiantis glioblastomos U-87 ląstelių augimo sąlygoms ir jų taikiniai.

miRNR	Pokytis, kartais	Genai taikiniai
hsa-miR-26a-5p	+1,88	<i>POLR3G, CDH4, Mras</i>
hsa-miR-26b-5p	+1,52	<i>POLR3G, CDH4, Mras</i>
hsa-miR-30b-5p	+1,52	<i>SPTLC3</i>
hsa-miR-143-3p	+2,24	<i>PNPO</i>
hsa-miR-361-5p	+1,5	<i>POLR3G, CLDN22, HMMR, FGF5</i>
hsa-miR-484	-1,80	<i>HK2</i>

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 MEDŽIAGOS

2.1.1 Tirpalai ir reagentų rinkiniai

2.1 lentelė. Darbo metu naudoti tirpalai ir reagentų rinkiniai.

Pavadinimas	Gamintojas
„Minimum Essential Media“ mitybinė terpė	<i>Thermo Scientific</i>
FBS	<i>Gibco</i>
PBS tirpalas	<i>Lonza</i>
DMSO tirpalas	<i>Sigma-Aldrich</i>
EDTA tirpalas	<i>Lonza</i>
Tripsinas	<i>Lonza</i>
Ksilenas	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
„mirVANA miRNA Isolation Kit“	<i>Ambion</i>
„The AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit“	<i>QIAGEN</i>
„RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit“	<i>Thermo Scientific</i>
„Agilent RNA6000 Nano Assay“	<i>Agilent Technologies</i>
„RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“	<i>Thermo Scientific</i>
„Luminaris HiGreen qPCR Master Mix“	<i>Thermo Scientific</i>

2.1.2 Prietaisai ir priemonės

2.2 lentelė. Darbo metu naudoti prietaisai ir priemonės.

Prietaisas/Priemonė	Pavadinimas, gamintojas
Laminarinio oro srauto boksas	<i>Labgard NU-440, Nuairé</i>
CO ₂ inkubatorius	<i>Autoflow NU-5510, Nuairé</i>
Inversinis mikroskopas	<i>Eclipse TS100, Nikon</i>
Šaldomoji dėžutė	<i>NALGENE</i>
Purtyklė	<i>Combispin FLV - 2400N, Biosan</i>
Purtyklė	<i>C1301 Spectrafuge Mini Centrifuge, Labnet</i>
Spektrofotometras	<i>NanoDrop 2000, Thermo Scientific</i>
Kapiliarinės elektroforezės sistema	<i>Agilent Bio-analyzer 2100, Agilent Technologies</i>
Termomaišytuvas	<i>Thermomixer comfort, Eppendorf</i>
Termocikleris	<i>Labcycler, Sensoquest</i>
Termocikleris	<i>Mastercycler ep gradient S, Eppendorf</i>
Centrifuga	<i>Centrifuge 5810 R, Eppendorf</i>
Centrifuga	<i>Centrifuge 5424, Eppendorf</i>

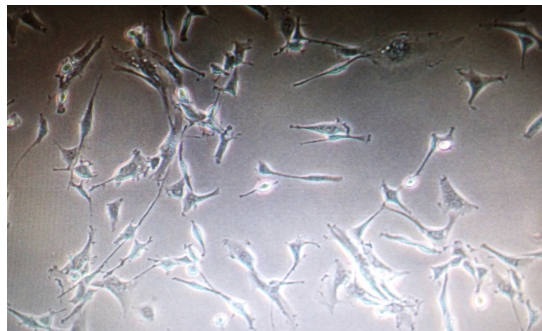
2.2 METODAI

2.2.1 Tyrimo objektas

Darbe tiriama glioblastomos ląstelių linija U-87. U-87 ląstelės - žmogaus glioblastomos, astrocitomos kilmės adherentinės epitelinės ląstelės. Eksperimentui augintos 2D ir 3D sąlygomis kultivuotos glioblastomos U87 ląstelių kultūros. 3D ląstelių kultūrai auginti pasirinktas plačiausiai taikomas - naviko sferoido modelis. Genų raiškai tirti naudoti azote šaldyti glioblastomos audiniai, tuo tarpu miRNR raiškai tirti naudoti FFPI (angl. *formalin-fixed, parafin-embedded*) glioblastomos mėginiai. Pacientų medžiaga rinkta gavus bioetikos komiteto leidimą (nr. 158200-2014/03).

2.2.2 Glioblastomos U-87 ląstelių auginimas

Ląstelės auginamos MEM terpėje, turinčioje 2 mM glutamino, 100 UI/ml penicilino ir 0.1 mg/ml streptomicino bei praturtintoje 10 % veršiuko embriono serumu (FBS). Prieš užsėjant, -150°C temperatūroje užšaldytos glioblastomos U87 ląstelės atšildomos $+37^{\circ}\text{C}$ vandens vonelėje. Atšildytos ląstelės perkeliamos į mėgintuvėlį, užpilamos 5 ml paruoštos kambario temperatūros terpės ir centrifuguojamos 5 min 500 g greičiu, kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, ant ląstelių užpilama 5 ml naujos MEM terpės ir resuspenduojama. Ląstelių suspensija padalinama į du 25 cm^2 plastikinius flakonus, į kiekvieną įpilama po 2,5 ml tos pačios terpės ir paliekama, $+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 termostate. Jau antra antrą dieną ląstelės įgauna joms būdingą morfologiją (2.1 pav.).



2.1 pav. Glioblastomos U-87 linijos 2D kultivuotos ląstelės.

Ląstelių auginimo terpė keičiama kas dvi dienas: terpė iš plastikinių flakonų nupilama, ląstelės praplaunamos 5 ml sterilaus PBS tirpalu ir užpilamos šviežia MEM terpe. Kai flakono dugno padengimas ląstelėmis pasiekia 80 % ir daugiau, ląsteles reikia persėti praskiedžiant jas santykiu nuo 1:2 iki 1:5. Tokiu atveju terpė nupilama, ląstelės praplaunamos 3-4 ml sterilaus PBS. PBS nusiurbiamas ir užpilama 1ml 0,25 % tripsino/0,05 % EDTA tirpalo. Inkubuojama 2-5 min., +37°C, 5% CO2 termostate. Tripsinas inaktyvuojamas užpilant trigubu kiekiu t.y 4 ml MEM/FBS terpės. Ląstelių suspensija surenkama į mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min 500 g greičiu, kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 5 ml terpės ir praskiedžiamos reikiamu santykiu.

Prireikus, ląstelių šaldymo procedūra yra panaši į ląstelių persėjimą, išskyrus paskutinį žingsnį. Nucentrifuguotos ląstelės resuspenduojamos 1 ml FBS. Į šaldymo mėgintuvėlį įpilama 500 µl FBS su 10% DMSO, o ant FBS/DMSO užpilama po 500 µl suspenduotų ląstelių. Mėgintuvėliai patalpinami į specialią šaldymo dėžutę, su kambario temperatūros izopropanoliu, kurioje temperatūra krenta laipsniškai, apie -1 °C /min. Šaldymo dėžutė patalpinama kelioms valandoms į šaldiklį, kuriame palaikoma -70°C temperatūra, po to mėgintuvėliai perkeliama į šaldiklį, kuriame palaikoma -150° C.

2.2.3 Sferoidų auginimas

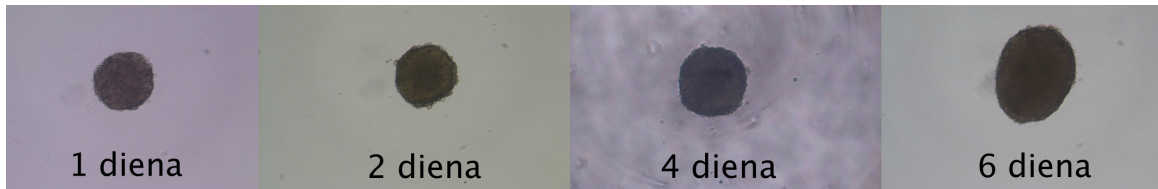
Sferoidų auginimui 96 „U formos“ šulinėlių plokštelė padengiama 1% „low melting“ agaroze. Ląstelės atkeliamos nuo flakono dugno kaip aprašyta anksčiau. Po tripsino inaktyvavimo iš tirpalo vidurio paimama 10 µl ląstelių suspensijos ir praskiedžiama terpe iki 50 µl. Gerai suspenduojama ir vėl iš vidurio paimama dar 10 µl, kurie perkeliama į „FastRead 102“ kameros kišenėlę. Įvertinus skiedimus, pagal formulę suskaičiuojama, koks ląstelių kiekis yra 1 ml:

$$\text{ląstelių kiekis/ml} = \text{suskaičiuotų ląstelių plokštelėje vidurkis} \times 10^4 \times \text{skiedimas}$$

Likusi 5 ml ląstelių suspensija nucentrifuguojama ir resuspenduojama 1 ml terpės. Atlikus skaičiavimus, reikiamas kiekis ląstelių perkeliama į plokštelės šulinėlius (6000 ląstelių/200 µl terpės), o plokštelė nucentrifuguojama 10 min 1000 g greičiu, kambario

temperatūroje. Tokiu būdu, kiekviename šulinėlyje priverstinai suformuojami ląstelių klasteriai iš ~6000 ląstelių, kurie formuos sferoidus.

Kas dvi dienas pakeičiama 50% terpės. Sferoidai auginami 6 dienas, kol tampa reikiamo dydžio (nuo 500 µm skersmens) ir pasižymi unikalia savybe - cheminiu (deguonies, maisto medžiagų ir metabolitų) gradientu (2.2 pav.).



2.2 pav. Sferoido vaizdas 1, 2, 4 ir 6 augimo dienomis.

2.2.4 RNR skyrimas

2.2.4.1 Visuminės RNR, praturtintos trumpomis nekoduojančiomis RNR skyrimas iš 2D ir 3D kultivuotų ląstelių

Visuminė RNR, praturtinta trumpomis nekoduojančiomis RNR, gryninama naudojantis „*mirVANA miRNA Isolation Kit*“ (*Ambion*) rinkiniu. Sferoidai surenkami į 15 ml mėgintuvėlį ir centrifuguojami 2 min 500 g greičiu. Veikiant tripsinu yra atkeliamos 2D ląstelės ir centrifuguojamos 5 min 500 g greičiu. Maksimaliai pašalinus terpę ląstelės lizuojamos užpilant 600 µl lizės buferio ir homogenizuojamos švirškštu naudojant 21G dydžio adatą (*Roth*). Įpilama 60 µl „*Homogenate Additive*“ tirpalo ir paliekama 10 min leduose. Paskui užpilama 600 µl fenolio-chloroformo tirpalo, smarkiai supurtoma ir nucentrifuguojama 7 min 12 000 g greičiu. Atsiskyrusi vandeningoji fazė perkeliama į švarų mėgintuvėlį ir užpilama 96 % etanolio (1, 25 fazės tūrio). Lizato-etanolio mišinys perkeliamas ant kolonėlės ir centrifuguojamas 15 s 10 000 g greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas, o kolonėlė praplaunama 700 µl miRNA „*Wash Solution 1*“ ir centrifuguojama 10 s 12 000 g greičiu. Toliau 2 kartus praplaunama 500 µl „*Wash Solution 2/3*“ tirpalu, kaskart nucentrifuguojant po 10 s 12 000 g greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas, o membrana išdžiovinama, centrifuguojant 3 min 12 000 g greičiu.

Kolonėlė perkeliama į švarų mėgintuvėlį, o ant membranos vidurio užpilama 50 µl iki 95 °C pakaitinto eliucijos buferio bei praėjus 1 minutei nucentrifuguojama 30 s 12 000 g greičiu. Išskirta RNR, praturtinta trumpomis nekoduojančiomis RNR saugoma -70 °C temperatūroje.

2.2.4.2 RNR skyrimas iš azote šaldyto, navikinio audinio

Azote šaldyto, navikinio audinio RNR išskirta naudojantis „*The AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit*“ (QIAGEN) rinkiniu. Azote užšaldytas glioblastomos mėginys mechaniškai sutrinamas naudojant skystu azotu atšaldytą piestelę ir grūstuvėlę, neatšildant perkeliamas į 2 ml mėgintuvėlį ir užpilamas 350 µl „*RLT*“ buferio. Mėginys homogenizuojamas švirksčiu naudojant 21G adatą (*Roth*). Lizatas centrifuguojamas 3 min maksimaliu greičiu. Supernatantas nusiurbiamas ir perkeliamas ant „*AllPrep DNA spin*“ kolonėlės. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 30 s 8000 g greičiu. RNR skyrimui toliau naudojamas pratekėjęs tirpalas. Ant šio tirpalo užpilama 250 µl 96% etanolio, gerai sumaišoma ir perkeliama ant „*RNeasy spin*“ kolonėlės. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 15 s 8000 g greičiu. Kolonėlė patalpinama į švarų mėgintuvėlį, užpilama 700 µl „*RWI*“ buferio ir 500 µl „*RPE*“ buferio kas kartą nucentrifugavus tokiu pačiu režimu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas, vėl užpilama 500 µl „*RPE*“ buferio ir centrifuguojama 2 min 8000 g greičiu. Kolonėlė perkeliama į švarų mėgintuvėlį ir papildomai centrifuguojama 1 min maksimaliu greičiu. Nucentrifugavus kolonėlė patalpinama į 1,5 ml mėgintuvėlį, ant kolonėlės membranos vidurio užpilama 30 µl vandens be nukleazių ir centrifuguojama 1 min 8000 g greičiu. Išskirta RNR saugoma -70 °C temperatūroje.

2.2.4.3 RNR skyrimas iš formaline fiksuotų, į parafiną įlietų audinių

RNR skiriama naudojant „*RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*“ (*Thermo Scientific*) rinkinį. Parafino mėginys skalpeliu surenkamas į 1,5 ml mėgintuvėlį, užpilama 1 ml ksileno ir smarkiai supurtoma. Mėginys inkubuojamas 3 min +50°C ir centrifuguojamas 2 min maksimaliu greičiu kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą ir užpylus 1 ml 96% etanolio, mėgintuvėlis supurtomas ir centrifuguojamas

2 min tokiu pačiu režimu. Supernatantas atsargiai pašalinamas, nuosėdos džiovinamos kambario temperatūroje 15-45 min. Ant sausų nuosėdų užpilama 100 µl „*Digestion*“ buferio ir įdedama 4 µl proteazės. Mėginys inkubuojamas 15 min +50°C ir 15 min +80°C. Po inkubacijos mėginys užpilamas 395 µl tirpalo, kurį sudaro 120 µl „*Isolation Additive*“ ir 275 µl 96% etanolio, švelniai sumaišoma. Tirpalas perkeliamas ant kolonėlės membranos ir centrifuguojama 30 s 10 000 g greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas, o kolonėlės membrana yra praplaunama skirtingais buferiais: 700 µl „*Wash 1*“ ir 500 µl „*Wash 2/3*“, kaskart nucentrifuguojant po 30 s 10 000 g greičiu. Membrana užpilama 60 µl „*DNase*“ mišinio, kurį sudaro 6 µl „*10X DNase Buffer*“, 4 µl „*DNase*“ tirpalo ir 50 µl vandens be nukleazių. Mėgintuvėlis inkubuojamas 30 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos vėl praplaunama 700 µl „*Wash 1*“ ir du kartus po 500 µl „*Wash 2/3*“ buferiais, kaskart nucentrifuguojant po 30 s 10 000 g greičiu. Mėgintuvėlis papildomai nucentrifuguojamas 1 min 10 000 g greičiu. Perkėlus kolonėlę į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį, RNR atplaunama nuo membranos su 60 µl eliacijos buferiu, inkubuojant 1 min kambario temperatūroje ir nucentrifuguojant 1 min maksimaliu greičiu. Išskirta RNR saugoma -20 °C temperatūroje.

2.2.5 RNR kokybės įvertinimas

Išskirtos RNR koncentracija ir grynumas įvertinti naudojant „*NanoDrop 2000*“ (*Thermo Scientific*) spektrofotometrą, pagal aparato naudojimo instrukcijoje pateiktą protokolą. RNR grynumas nustatomas vertinant absorbcijų ties 260 nm ir 280 nm bangų ilgiais santykį (A260/A280). Vertinant RNR grynumą 260/280 santykis literatūroje pateikiamas intervalu 1,8-2,0 ir laikomas tinkamu atlikti genų raiškos tyrimus. Nukrypimai nuo šių reikšmių dažniausiai parodo baltyminių užterštumą. Vertinant sugertį ties 230 nm bangos ilgiu, galimas ir fenolinio užterštumo įvertinimas: 260/230 santykis turėtų būti apie 2,0-2,2 (Becker *et al.*, 2010). Taikant AT- kPGR metodą nemažiau svarbus RNR mėginių integralumas. RNR mėginių kokybė nustatyta naudojant „*Agilent RNA6000 Nano Assay*“ rinkinį ir „*Agilent Bio-analyzer 2100*“ kapiliarinės elektroforezės sistemą (*Agilent Technologies*), pagal aparato naudojimo instrukcijoje pateiktą protokolą.

RNR kokybė įvertinta atsižvelgiant į RIN vertę, kuri varijuoja nuo 1 iki 10 ir atitinkamai nurodo visiškai degradavusią RNR arba vientisą (Die ir Roman, 2012).

2.2.6 Genų raiškos tyrimas

2.2.6.1 Kopijinės DNR sintezė

Kopijinės DNR sintezė iš RNR atlikta naudojantis „*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ (*Thermo Scientific*) rinkiniu. Reakcijai naudojama 1 µg RNR išskirtos iš 2D, 3D ląstelių kultūrų ir azote šaldytos pacientų biologinės medžiagos. Į RNR mėginius įdedama 1 µl atsitiktinių heksamerinių pradmenų ir užpilama vandens be nukleazių iki 12,5 µl tūrio. Į mėginius įpilama 7,5 µl reakcijos mišinio, kurį sudaro: 4 µl 5x buferinio tirpalo, 0,5 µl 40 U/µl ribonukleazių slopiklio, 2 µl 10mM dNTP mišinio bei 1 µl 200 U/µl „*RevertAid RT*“ atvirkštinės transkriptazės. Visi reagentų tirpalai ir mišiniai iki pat reakcijos laikomi šaldomuose stoveliuose. Reakcija vyksta termocikleryje pagal programą: 10 min +25°C, 60 min +42°C ir 10 min +70°C. Susintetinta kDNR saugoma – 20°C temperatūroje iki panaudojimo.

2.2.6.2 AT- kPGR

Santykinei genų raiškai tirti buvo taikytas atvirkštinės transkripcijos kiekybinis PGR metodas. Reakcijos atliktos naudojantis „*Luminaris HiGreen qPCR Master Mix*“ (*Thermo Scientific*) rinkiniu. Vidinei kontrolei naudojami *GAPDH* ir *HPRT* atskaitos genai, kurių raiška ląstelėse yra pastovi. Naidotų pradmenų sekos pateiktos PRIEDŲ 1 lentelėje.

Darbo eiga genų raiškai tirti:

1. Darbo vieta kruopščiai dezinfekuojama.
2. Prieš naudojimą reagentai atitirpinami leduose ir gerai išmaišomi purtykle.
3. Paruošiami reakcijos mišiniai (2.3 lentelė), kurie po 9 µl išpilstomi į atskirus plokštelės šulinėlius.

4. Į šulinėlius įnešama po 1 µl 10x kDNR tirpalo. Kiekvienas kDNR mėginys įnešamas į tris šulinėlius, reakcijos atsikartojamumui stebėti. Kiekvienam genui paliekami trys šulinėliai, į kuriuos vietoje kDNR pilamas vanduo – tai neigiama kontrolė.
5. Ant paruoštos plokštelės užklijuojama skaidri lipni plėvelė, jos kraštai prispaudžiami, apsaugant mėginius nuo išgaravimo kaitinimo metu.
6. Plokštelė centrifuguojama 2 min 2000 g greičiu.
7. Plokštelė įstatoma į PGR termociklerį, nustatoma temperatūrinė programa (2.4 lentelė) ir paleidžiamas aparatas.

2.3 lentelė. AT- kPGR mišinio sudedamosios dalys ir kiekiai 96 šulinėlių plokštelei

Komponentai	Kiekis 1 reakcijai, µl
Universalus mišinys 2X	5
Tiesioginis pradmuo, 10 µM/µl	0, 3
Atvirkštinis pradmuo, 10 µM/µl	0, 3
H ₂ O	3, 4
kDNR	1
Viso:	10

2.4 lentelė. AT- kPGR programos sąlygos

Etapai	Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95	10 min	1
Denatūracija	95	15 s	40
Pradmenų prisijungimas	60	30 s	
Sintezė	72	30 s	

2.2.7 MikroRNR raiškos tyrimas

2.2.7.1 Kopijinės DNR sintezė

miRNR atvirkštinė transkripcija atlikta naudojantis „*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ (*Thermo Scientific*) rinkiniu. kDNR sintezės reakcijai naudojama 200 ng RNR išskirtos iš 2D, 3D kultūrų ląstelių ir FFPĮ mėginių. Į RNR mėginius įdedama 1 µl

200 U/ μ l „*RevertAid RT*“ atvirkštinės transkriptazės ir užpilama vandens be nukleazių iki 12,5 μ l tūrio. Į mėginius įpilama 7,5 μ l reakcijos mišinio, kurį sudaro: 4 μ l 5x buferinio tirpalo, 1,5 μ l vandens be nukleazių, 0,8 μ l 10mM dNTP mišinio, 0,8 μ l tiriamos miRNR pradmens bei 0,4 μ l 40 U/ μ l ribonukleazių slopiklio. Naudoti pradmenys pateikti PRIEDŲ 2 lentelėje. Visi reagentų tirpalai ir mišiniai iki pat reakcijos laikomi šaldomuose stoveliuose. Reakcija vyksta termocikleryje pagal programą: 10 min +25°C, 60 min +37°C ir 10 min +70°C. Susintetinta kDNR saugoma –20°C temperatūroje iki panaudojimo.

2.2.7.2 AT- kPGR

miRNR raiškai tirti taikytas atvirkštinės transkripcijos kiekybinis PGR metodas. Reakcijos atliktos naudojantis „*Luminaris HiGreen qPCR Master Mix*“ (*Thermo Scientific*) rinkiniu, pagal laboratorijoje atidirbtą protokolą. Vidinei kontrolei buvo naudojamos atskaitos miRNR - RNU48 ir U6.

Darbo eiga miRNR raiškai tirti:

1. Darbo vieta kruopščiai dezinfekuojama.
2. Prieš naudojimą reagentai atitirpinami leduose ir gerai išmaišomi purtykle.
3. Pradmenims praskiesti (5x) paruošiama 10 mėgintuvėlių. Į 9 mėgintuvėlius įpilama po 8 μ l vandens be nukleazių ir po 2 μ l atitinkamo miRNR pradmens. Į 10-tąjį mėgintuvėlį įpilama 72 μ l vandens be nukleazių ir 18 μ l universalus „43 down“ pradmens. Mėgintuvėliai supurtomi ir trumpai nucentrifuguojami. Naudotų pradmenų sekos pateiktos PRIEDŲ 3 lentelėje.
4. Paruošiami dar 9 švarūs mėgintuvėliai, į kuriuos įpilama po 220 μ l vandens be nukleazių. Į kiekvieną tokį mėgintuvėlį įpilama 9 μ l 5x skiesto atitinkamo pradmens tirpalo ir 9 μ l universalus „43 down“ pradmens tirpalo. Mėgintuvėliai supurtomi ir trumpai nucentrifuguojami.
5. Paruošiama dar 18 švarių mėgintuvėlių (9 iš jų skirti 2D kultivuotų ląstelių kDNR mišiniui, o likusieji - 3D kultivuotų ląstelių arba biologinės pacientų medžiagos kDNR mišiniui).

6. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 32 µl atitinkamos miRNR pradmenų mišinio (4 žingsnis) ir po 8 µl 4x skiestos kDNR. Šiame žingsnyje pagaminami 9 mėgintuvėliai, kuriuose yra po 40 µl 2D kultivuotų ląstelių kDNR ir pradmenų mišinio bei 9 mėgintuvėliai, kuriuose yra po 40 µl 3D kultivuotų ląstelių arba biologinės pacientų medžiagos kDNR ir pradmenų mišinio. Mėgintuvėliai supurtomi ir trumpai nucentrifuguojami.
7. Pagaminti mišiniai yra išpilstomi į tris šulinėlius po 10 µl su 10 µl „*Luminaris HiGreen qPCR Master Mix*“ universaliu mišiniu.
8. Kiekvienai miRNR paliekami trys šulinėliai į kuriuos įpilama po 10 µl „*Luminaris HiGreen qPCR Master Mix*“ universalus mišinio, 7,5 µl atitinkamos miRNR pradmens mišinio (4 žingsnis) ir 2,5 µl vandens be nukleazijų.
9. Ant paruoštos plokštelės užkljuojama skaidri lipni plėvelė, jos kraštai prispaudžiami, apsaugant mėginius nuo išgaravimo kaitinimo metu.
10. Plokštelė centrifuguojama 2 min 2000 g greičiu ir įstatoma į PGR termociklerį. Nustatoma temperatūrinė programa (2.4 lentelė) ir paleidžiamas aparatas.

kDNR amplifikacija matuojama pagal *SYBR Green I* dažo fluorescencijos lygį, registruojamos kiekvieno mėginio slenkstinio ciklo C_T vertės. Slenkstinis ciklas – tai PGR reakcijos ciklas, kuriame mėginys pasiekia reikšmingą fluorescencijos intensyvumą. Santykiniai genų ir miRNR raiškos pokyčiai apskaičiuojami $\Delta\Delta C_T$ metodu (Livak *et al.*, 2001) pagal formules:

$$n = 2^{-\Delta\Delta C_T};$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T(P) - C_T(K))_{tiriamoji\ geno/miRNR} - (C_T(P) - C_T(K))_{atskaitos\ geno/miRNR},$$

kur n - raiškos pokytis (kartais); $C_T(K)$ - kontrolinio mėginio slenkstinio ciklo vertė; $C_T(P)$ - tiriamojo mėginio slenkstinio ciklo vertė.

Taikant $\Delta\Delta C_T$ metodą, C_T vertės normalizuojamos ne tik pagal atskaitos geną ar miRNR, bet ir pagal kontrolinį mėginį. Tiriant genų raišką vidinei kontrolei buvo naudojami *GAPDH* ir *HPRT* atskaitos genai, tuo tarpu tiriant miRNR raišką, atskaitos miRNR pasirinktos RNU48 ir U6.

2.2.8 AT- kPGR reakcijų efektyvumo įvertinimas

$\Delta\Delta C_T$ analizės metodas taikomas kai tiriamųjų ir atskaitos genų/miRNR amplifikacijos efektyvumai yra aukšti, todėl prieš naudojant šį metodą yra būtina nustatyti reakcijų efektyvumus kiekvieno tiriamojo geno ir miRNR pradmenų porai. Pradmenų poros efektyvumas nustatomas vertinant AT- kPGR metu pagausintos kDNR kiekį remiantis standartine kreive, kuri kuriama kiekvienai pradmenų porai iš AT- kPGR metu surinktų ir išanalizuotų duomenų. Standartinė kreivė grafiškai vaizduoja tiesinę priklausomybę tarp kiekybinio ciklo C_T verčių ir pradinių standartinių kDNR mėginių koncentracijų. Kiekvienos pradmenų poros reakcijos efektyvumas (E) įvertinamas pagal standartinės kreivės nuokrypio kampą (angl. *slope*) ir apskaičiuojamas pagal formulę:

$$E = (10^{\frac{-1}{\text{nuokrypio kampas}}})$$

Pradmenų reakcijos efektyvumas (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$E \% = (E-1) \times 100 \%$$

Idealiu atveju po kiekvieno amplifikacijos ciklo visas reakcijos produkto kiekis dvigubėja, nuokrypio kampo reikšmė yra lygi $-3,32$, o reakcijos efektyvumas yra 100%.

Standartinės kreivės koreliacijos koeficiento r reikšmė parodo kaip gerai eksperimentiniai duomenys atitinka regresijos tiesę, kitaip, ar yra tiesinė priklausomybė. Duomenų tiesiškumas parodo ar amplifikacijos efektyvumas yra vienodas skirtingiems pradiniais kDNR kiekiams (Kasnauskienė, 2014). Taigi optimizuotos reakcijos požymiai yra: 1) $r > |-0,99|$ arba $R^2 > 0,98$; 2) amplifikacijos efektyvumas 90-105%; 3) atsikartojamumas tarp reakcijų (BioRad Laboratories, 2006).

Darbo eiga:

1. Vertinant genų raiškos kPGR reakcijų efektyvumą reakcijos mišinio paruošimas analogiškas AT- kPGR mišiniui (žr. 2.2.6.2), tuo tarpu vertinant miRNR raiškos kPGR reakcijų efektyvumą mišinio paruošimas analogiškas AT- kPGR mišiniui (žr. 2.2.7.2). Kiekvieno tiriamojo ir atskaitos geno ar miRNR pradmenų porai paruošiami atskiri mišiniai ir išpilstomi po 9 μl (žr. 2.2.6.2) arba 8 μl (žr. 2.2.7.2).

2. Paruošiami 5 arba 4 (dėl per mažos pradinės kDNR koncentracijos) dešimtkartiniai kDNR skiedimai:
3. Praskiesti kDNR mišiniai supilstomi po 1 μ l, vertinant tiriamų genų pradmenų efektyvumą ir po 2 μ l, vertinant tiriamų miRNR pradmenų efektyvumą. Kiekvienam serijiniam skiedimui skiriami 2 pakartojimai. Kiekvienam tiriamajam ir atskaitos genui ar miRNR reakcijos mišiniui ruošiama neigiama kontrolė, kur vietoje kDNR pilama vandens be nukleazių.

2.2.9 Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „*GenEx 6.1*“ (*bioMCC*, 2016) ir „*Prism 6*“ (*GraphPad Software*, 2015) programas. Raiškos skirtumams tarp dviejų grupių palyginti taikyti neparametriniai *Mann-Whitney* ir *Wilcoxon* kriterijai. Tiesinio ryšio stiprumui nustatyti taikytas *Spearman* koreliacijos metodas. Kai apskaičiuota p reikšmė mažesnė už kritinį lygmenį ($p < 0,05$), tai skirtumai tarp dviejų grupių laikomi statistiškai reikšmingais.

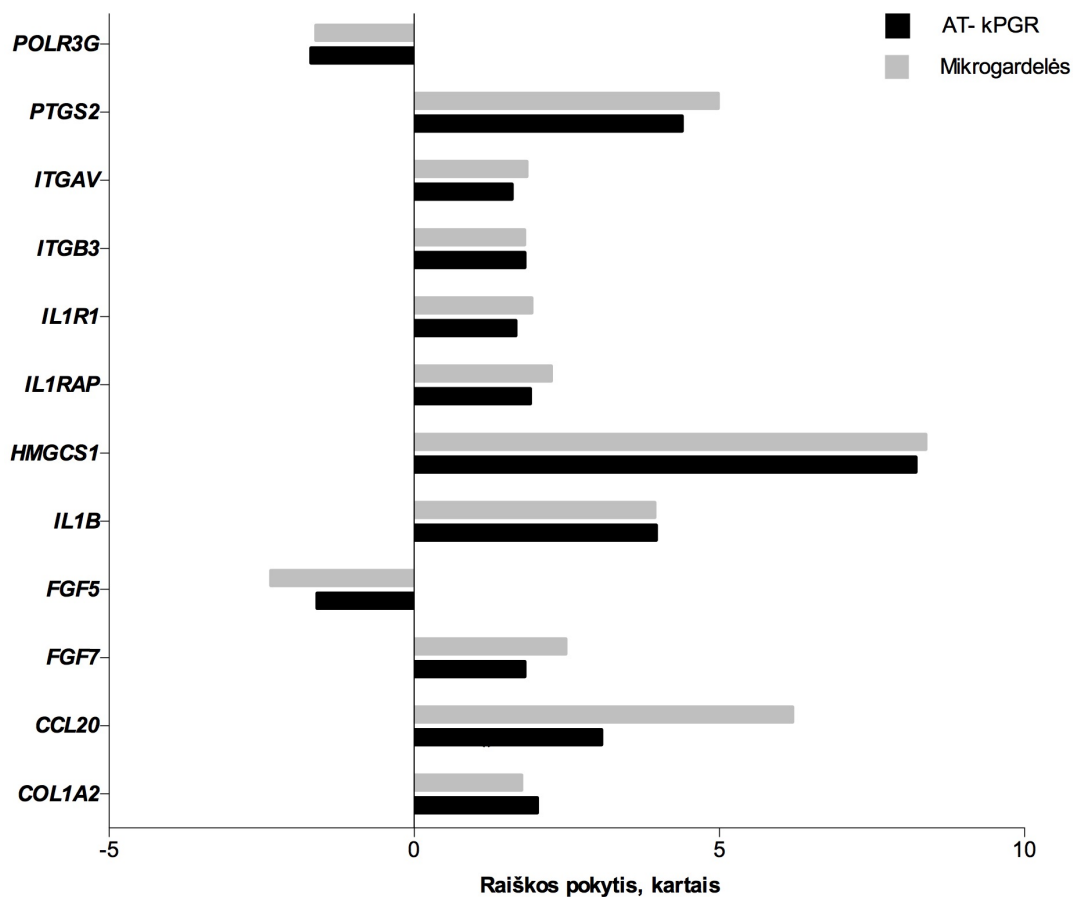
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Genų raiškos įvertinimas glioblastomos U-87 ląstelių linijos 3D modelinėje sistemoje, panaudojant AT- kPGR

Siekiant pavirtinti laboratorijoje turimus rezultatus, gautus atliekant visuminę glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotų ląstelių genų raiškos analizę, U-87 ląstelės buvo auginamos 2D ir 3D sąlygomis 6 dienas, kaip ir atliekant visuminę genų raiškos analizę. Išskyrus visuminę RNR ir įvertinus jos integralumą ($RIN \geq 8$) atliktos AT- kPGR reakcijos pasirinktų genų (*CCL20*, *COL1A2*, *FGF5*, *FGF7*, *HMGCS1*, *IL1B*, *IL1R1*, *IL1RAP*, *ITGAV*, *ITGB3*, *POLR3G*, *PTGS2*) raiškai nustatyti. Genų raiškos tyrimuose buvo naudoti du atskaitos genai: *GABDH* ir *HPRT*.

Pirmame etape buvo įvertintas AT- kPGR reakcijų efektyvumas, reakcijas atliekant su penkiais dešimtkartiniais kDNR skiedimais. Pagal amplifikacijos kreives nubrėžtos standartinės kreivės, paskaičiuoti standartinių kreivių nuokrypiai (angl. *slope*) bei apskaičiuoti reakcijų efektyvumai (E). PRIEDŲ 1 paveiksle, kaip pavyzdys, pateikiamas *IL1B* geno AT- kPGR reakcijos efektyvumo įvertinimas: amplifikacijos (A) ir standartinė (B) kreivės. Visų tiriamųjų bei atskaitos genų apskaičiuoti reakcijų efektyvumai pateko į 90-103% intervalą, o koreliacijos koeficientai (R^2) visais atvejais buvo didesni nei 0,98.

AT- kPGR metodu nustatyti genų raiškos pokyčiai patvirtino pokyčius, nustatytus mikrogardelėmis: dešimties genų raiška didėjo, o dviejų – mažėjo (3.1 pav.).



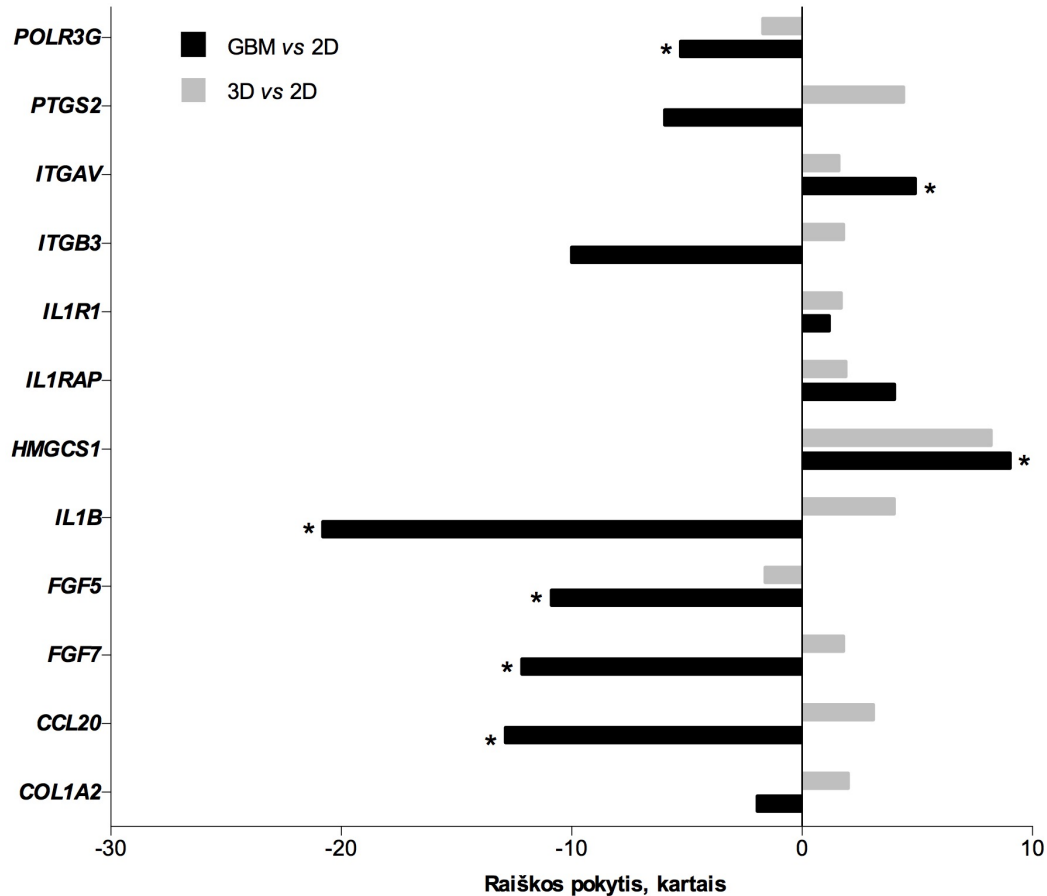
3.1 pav. Genų raiškos pokyčių, nustatytų AT- kPGR ir mikrogardelių metodais glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotose ląstelėse, palyginimas. Atskaitos genai – *GABDH* ir *HPRT*.

3.2 Genų raiškos skirtumų glioblastomos audinyje įvertinimas

Siekiant įvertinti tiriamų genų raišką glioblastomos audinyje, atliktos AT- kPGR naudojant iRNR išskirtą iš 3-jų žmogaus glioblastomos navikinių audinių. Kontrolė – iRNR skirta iš glioblastomos U-87 linijos 2D kultivuotų ląstelių, atskaitos genai – *GABDH* ir *HPRT*.

Glioblastomos audinyje nustatyta statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjusi *CCL20*, *FGF5*, *FGF7*, *IL1B* ir *POLR3G* genų raiška (atitinkamai 12,9 , 10,9 , 12,2 , 20,8 ir 5,3 karto) bei padidėjusi *HMGCS1* ir *ITGAV* genų raiška (atitinkamai 9 ir 4,9 karto). *COL1A2*, *ITGB3*, *PTGS2* genų raiškos sumažėjimas (atitinkamai 1,9 , 9,9 , 5,9 karto) ir

IL1R1, *IL1RAP* genų raiškos padidėjimas (atitinkamai 1,2 ir 4 karto) statistiškai nereikšmingas ($p > 0,05$) (3.2 pav.).



3.2 pav. Genų raiškos tyrimas glioblastomos audinyje (GBM), * $p < 0,05$, kontrolė - glioblastomos U87 linijos 2D kultivuotų ląstelių kultūra, atskaitos genai: *HPRT* ir *GABDH*.

Lyginant GBM audinį su glioblastomos U87 linijos 2D kultivuotų ląstelių kultūra buvo siekta įvertinti 3D (sferoido) modelinės sistemos tinkamumą eksperimentiniams glioblastomos tyrimams, palyginant raiškos skirtumų atsikartojamumą tarp modelinės sistemos ir biologinių GBM mėginių bei atrinkti potencialius genus, kuriuos būtų tikslinga tirti toliau ir jais manipuluoti 3D modelinėje sistemoje. Nustatyta, kad 6 iš 12 tirtų genų (*FGF5*, *HMGCS1*, *IL1RAP*, *IL1R1*, *ITGAV* ir *POLR3G*) patvirtino raiškos

pokyčius modelinėje sistemoje, tačiau statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tik keturiuose iš jų (*FGF5*, *HMGCS1*, *ITGAV* ir *POLR3G*) (3.2 pav.).

HMGCS1 genas, koduojantis 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA sintazę, dalyvauja lipidų metabolizmo signaliniame kelyje, kurio reguliavimas daugelio vėžio formų atvejais yra sutrikęs (Pandyra *et al.*, 2015). Tačiau šio geno svarba gliomagenezės procese dar nėra nustatyta. *FGF5* genas koduoja fibroblastų augimo veiksnių šeimai priklausantį baltymą, susijusį su naviko augimo ir invazijos procesais (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF5&keywords=FGF5>). Paprastai, *FGF5* raiška gliomose yra padidėjusi, tačiau yra atliktas tyrimas, kurio metu nustatyta sumažėjusi šio geno raiška gliomų ląstelių linijose, kuriose taip pat nustatyta sumažėjusi FGF receptoriaus splaisosominio varianto (FGFR-1) raiška. Manoma, kad šio receptoriaus variantas yra svarbus FGFR signaliniame kelyje, žmogaus gliomų atveju (Sibenaller *et al.*, 2005). *ITGAV* genas koduoja integrinų šeimai priklausantį baltymą, kuris yra susijęs su ląstelių adhezijos ir signalų perdavimo funkcijomis. Taip pat žinoma, kad *ITGAV* reguliuoja naviko progresavimą ir angiogenezę (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITGAV>). Padidėjusią *ITGAV* raišką glioblastomos audinyje patvirtina kitų autorių rezultatai: nustatyta, kad *ITGAV* raiška yra susijusi su gliomų piktybiškumo laipsniu (Franovic *et al.*, 2015). *POLR3G* geno koduojamas baltymas katalizuoja DNR transkripciją į RNR bei dalyvauja RNR polimerazės III komplekso stabilizavime (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POLR3G>). Taip pat, yra nustatyta, kad jo koduojamo baltymo raiška pasižymi vėžinės bei embrioninės kamieninės ląstelės, dėl ko yra skatinama jų proliferaciją (Wong *et al.*, 2011). Tačiau šio geno svarba gliomagenezės procese dar nėra patvirtinta.

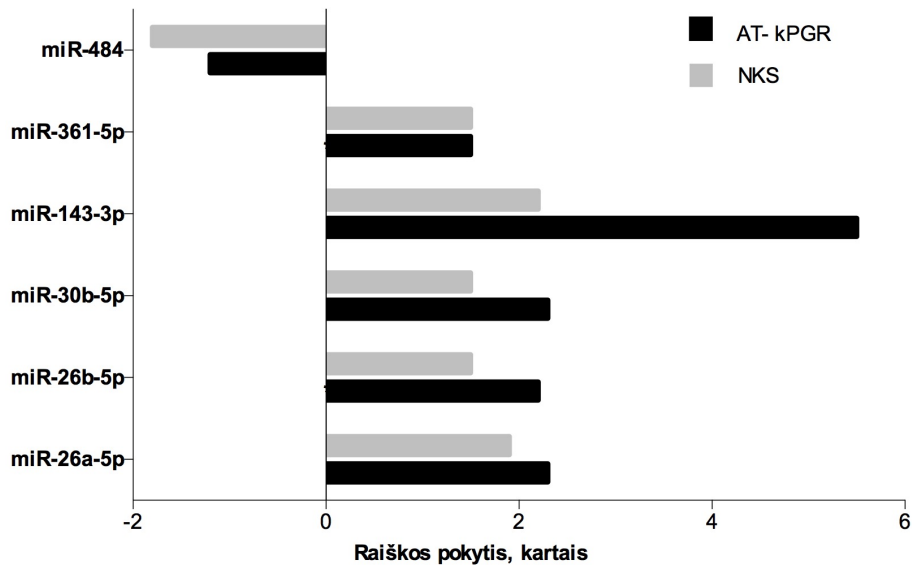
Vertinant 3D modelinės sistemos tinkamumą eksperimentiniams glioblastomos tyrimams galima teigti, jog šis modelis dalinai atspindi naviko ir jį supančios aplinkos sąveikas, tačiau svarbu pabrėžti, kad jis atitinka didžiąją dalį smegenų navikų modeliams keliamų reikalavimų, tokių kaip: modelį turi sudaryti glijos ląstelės, histologinė struktūra turi būti maksimaliai panaši į *in vivo* naviką, turi pasižymėti greitu augimu, o eksperimentai turi būti nesunkiai atkartojami. Taip pat šio modelio privalumas, jog jį yra lengva sukurti, o jo taikymas nesukelia etinių diskusijų, lyginant su gyvūnų modeliais (Candolfi *et al.*, 2007).

3.3 MikroRNR raiškos įvertinimas glioblastomos U-87 ląstelių linijos 3D modelinėje sistemoje, panaudojant AT- kPGR

Siekiant pavirtinti laboratorijoje turimus rezultatus, gautus atliekant visuminę glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotų ląstelių miRNR raiškos analizę, U-87 ląstelės buvo auginamos 2D ir 3D sąlygomis 6 dienas. Išskyrus visuminę RNR, praturtintą mažosiomis nekoduojančiomis RNR, atliktos AT- kPGR reakcijos pasirinktų miRNR (hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-484) raiškai nustatyti. miRNR raiška buvo vertinama pagal dvi atskaitos miRNR - RNU48 ir U6. Kadangi RNU48 miRNR raiška tarp skirtingų tiriamųjų mėginių buvo homogeniškesnė, rezultatų analizei miRNR raiškos pokyčiai buvo normalizuojami pagal RNU48.

Pirmame etape buvo įvertinamas AT- kPGR reakcijų efektyvumas, reakcijas atliekant su keturiais dešimtkartiniais kDNR skiedimais. Pagal amplifikacijos kreives nubrėžtos standartinės kreivės, paskaičiuoti standartinių kreivių nuokrypiai (angl. *slope*) bei apskaičiuoti reakcijų efektyvumai (E). PRIEDŲ 2 paveiksle, kaip pavyzdys, pateikiamas RNU48 miRNR AT- kPGR reakcijos efektyvumo įvertinimas: amplifikacijos (A) ir standartinė (B) kreivės. Visų tiriamųjų bei atskaitos miRNR apskaičiuoti reakcijų efektyvumai pateko į 90-98% intervalą, o koreliacijos koeficientai (R^2) visais atvejais buvo didesni nei 0,98.

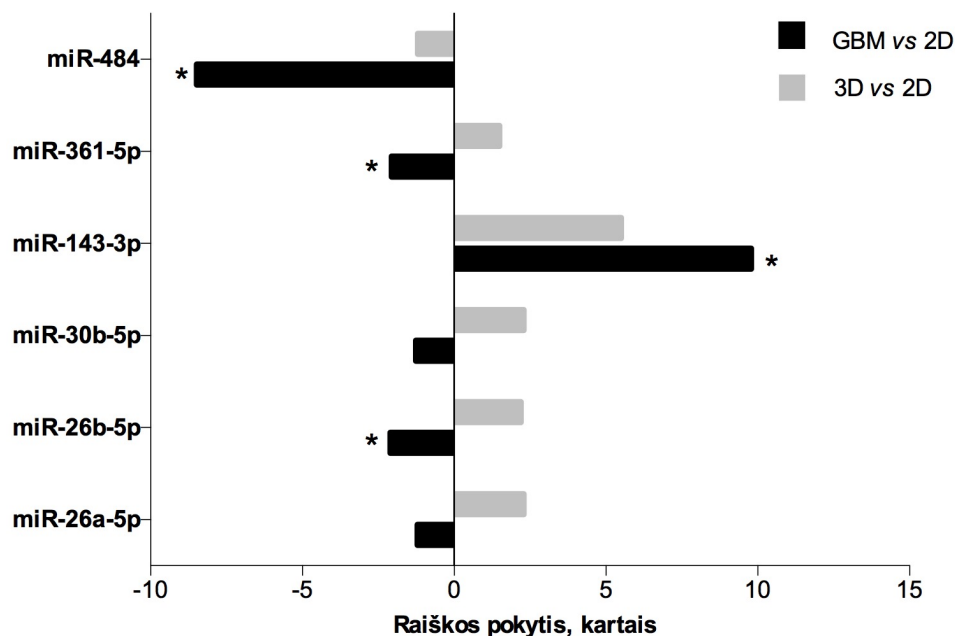
miRNR raiškos pokyčiai nustatyti NKS ir AT- kPGR metodais sutapo: penkių miRNR raiška didėjo, o vienos - mažėjo (3.3 pav.).



3.3 pav. miRNR raiškos pokyčių tarp glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotų ląstelių, įvertintų AT- kPGR ir NKS metodais, palyginimas. Atskaitos miRNR – RNU48.

3.4 MikroRNR raiškos skirtumų glioblastomos audinyje įvertinimas

Siekiant įvertinti tiriamų miRNR raišką glioblastomos audinyje, šių miRNR raiška tirta 10-je glioblastomos biologinių FFPĮ mėginių, Kontrolė - glioblastomos U87 linijos 2D kultivuotos ląstelės. Glioblastomos audinyje nustatyta statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjusi miR-26b-5p, miR-361-5p ir miR-484 raiška (atitinkamai 2,3 , 2,3 , ir 10,3 karto) bei padidėjusi miR-143-3p raiška (7,5 karto). Vertinant sumažėjusią miR-26a-5p ir miR-30b-5p raišką (atitinkamai 1,4 ir 1,5 karto) statistiškai reikšmingu skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$) (3.4 pav.).



3.4 pav. miRNR raiškos skirtumai glioblastomos audinyje (GBM), * $p < 0,05$, kontrolė – glioblastomos U87 linijos 2D kultivuotų ląstelių kultūra, atskaitos miRNR – RNU48.

Analogiškai genų raiškos tyrimui siekta įvertinti ar atsikartos miRNR raiškos skirtumai biologiniuose GBM mėginiuose, lyginant su miRNR raiškos pokyčiais modelinėje sistemoje, įvertinti modelinės sistemos tinkamumą bei atrinkti glioblastomos formavimuisi svarbias miRNR, kurias būtų tikslinga tirti toliau. Nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) dviejų miRNR (miR-143-3p, miR-484) raiškos skirtumai GBM audinyje, lyginant su 2D kultivuotų ląstelių kultūra, patvirtinantys rezultatus gautus tiriant modelinę sistemą (3.4 pav.).

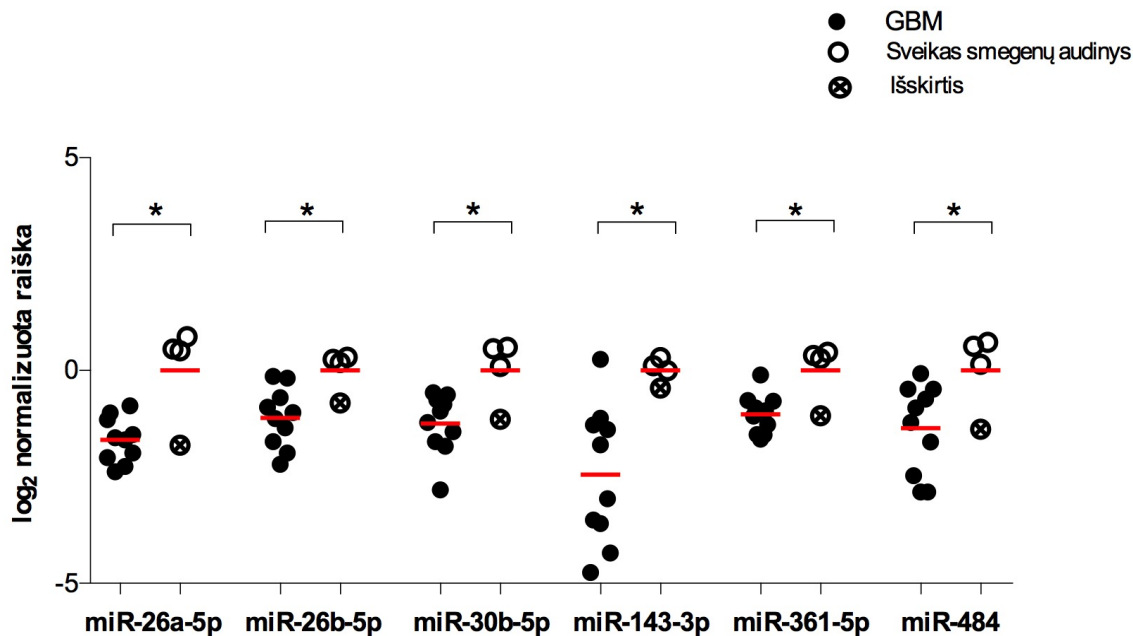
Šiuo atveju, vertinant 3D modelinės sistemos tinkamumą, nustatytas miRNR raiškos pokyčių neatitikimas su miRNR raiška GBM audinyje. Toks rezultatas tikėtinas dėl labai didelio GBM heterogeniškumo ir procesų įvairovės, todėl nei vienas eksperimentinis modelis idealiai neatspindės glioblastomos morfologinių ir biologinių savybių. Nors tridimensinis modelis iš dalies atkartoja naviko-tarpląstelinio užpildo sąveikas, tačiau pilno šių sąveikų spektro, lemiamo augimo veiksnių, tarpląstelinio užpildo baltymų ir hormonų derinio įtakos, imituoti neįmanoma (Fomchenko ir Holland, 2006).

Vis dėlto nustatyti reikšmingi dviejų miRNR (miR-143-3p ir miR-484) raiškos skirtumai, kurie sutampa su rezultatu, gautu tiriant modelinę sistemą įrodo savo svarbą GBM tyrimuose. Žymiai padidėjusią miR-143-3p raišką GBM audinyje, patvirtina kitų autorių duomenys, tiriant itin invazyvias GBM ląstelių linijas bei šviežiai pašalinto naviko, tipines invazijos sritis (perivaskulinius tarpus). Nustatyta, jog panaudojant priešprasmius miR-143-3p oligonukleotidus buvo sėkmingai nuslopintas invazyvus tirtų GBM ląstelių linijų fenotipas, pagrindžiant onkogenines miR-143-3p savybes (Koo *et al.*, 2012).

Tuo tarpu miR-484 dar nėra pakankamai iširta gliomagenezės procese, tačiau literatūroje aprašomas atvejis, kuomet padidėjusi miR-484 raiška yra siejama su ilgesne glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo trukme, pagrindžiant jos diagnostinę ir prognostinę vertę (Herman *et al.*, 2015). Įdomu, jog kitų vėžio formų atvejais, miR-484 raiška taip pat kritiškai sumažėjusi. Nustatyta, kad gimdos kaklelio vėžio atveju, miR-484 slopina ląstelių proliferaciją ir EMT. Žinant, jog EMT procesas yra be galo svarbus gliomagenezei, tikėtina, ši miRNR turi įtakos GBM naviko metastazavimui ir invazyvumui (Hu *et al.*, 2017).

3.6 MikroRNR raiškos pokyčių tarp glioblastomos ir sveiko smegenų audinio įvertinimas

Nustačius miRNR raiškos pokyčius modelinėje sistemoje ir glioblastomos audiniuose, siekta įvertinti ar tie patys pokyčiai išryškės lyginant GBM audinį su sveiku smegenų audiniu. Lyginti 10 glioblastomos FFPĮ mėginiai su 4 sveiko smegenų audinio FFPĮ mėginiais (3.5 pav.). Pjūviuose ribas tarp sveiko audinio ir navikinio įvertino patologas, remdamasis histologiniais sveiko ir glioblastomos audinio požymiais. Nustatyta statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjusi miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-361-5p ir miR-484 raiška (atitinkamai 3,1 , 2,2 , 2,4 , 5,4 , 2 ir 2,6 karto).



3.5 pav. miRNR raiška glioblastomos ir sveikų smegenų audiniuose, * $p < 0,05$. Atskaitos miRNR – RNU48.

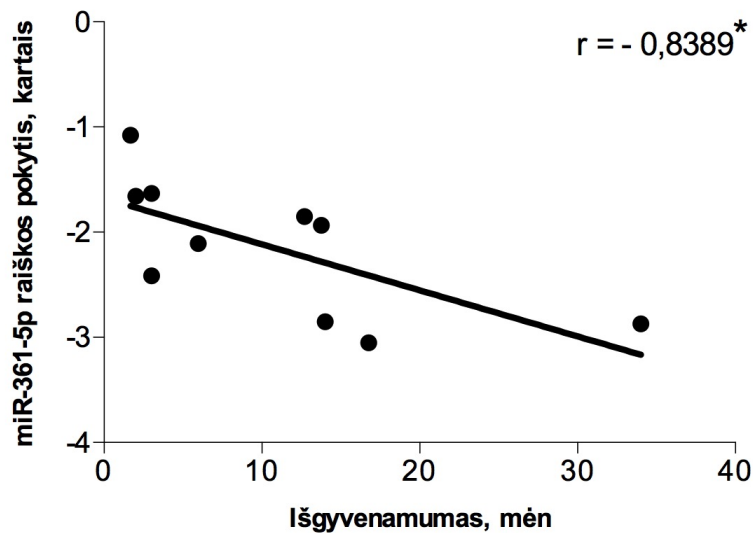
Vertinant vieno tiriamojo mėginio duomenis stebimos išskirtys, kuomet tiriant sveiką smegenų audinį, miRNR raiška prilygsta raiškai, stebimai glioblastomos audinyje. Toks rezultatas parodo, kad histologiškai sveikas audinys molekuliniam lygmenyje nėra sveikas. Tai įrodo ypatingai svarbų molekulių žymenų vaidmenį glioblastomos diagnostikoje bei klinikinių sprendimų pasirinkime. Kadangi gliomoms yra būdinga difuzinė būsena, kuomet navikinės ląstelės infiltruojasi į sveiką smegenų audinį, dažnai to neįmanoma įvertinti atliekant histologinį tyrimą bei pašalinti chirurginės intervencijos būdu. Todėl labai svarbu surasti grandis, kuriose įvykę pokyčiai yra susiję su vėžio vystymusi ir invazyvumu bei kurti naujus taikinių terapijos būdus, kovai prieš tikslines ląsteles (Davis, 2016).

Visų miRNR raiška yra sumažėjusi GBM audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu, tačiau GBM audinį, lyginant su 2D ląstelių kultūra nustatyta padidėjusi miR-143-3p raiška (3.4 pav.). Tokį rezultatą galima paaiškinti tuo, kad 2D ląstelių kultūra nėra sveiko smegenų audinio atitikmuo. Tai žmogaus glioblastomos ląstelės, kurios 2D kultivavimo sąlygomis stokoja įvairių tarpląstelių signalų vystytis ir augti. Taip pat

sumažėjusią miR-143-3p raišką GBM audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu patvirtina kitų autorių duomenys (Wang *et al.*, 2014). Remiantis šių autorių rezultatais, sužadinta miR-143-3p raiška slopina naviko angiogenezės ir augimo procesus sutrikdant *N-RAS* (angl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) transliaciją *in vivo* bei padidina vaistinio preparato temozolomido efektyvumą *in vitro*.

3.7 Tiriamų miRNR ir genų raiškos sąsajų su glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu įvertinimas

Nustačius reikšmingus miRNR raiškos pokyčius GBM audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu, siekta įvertinti ar šie pokyčiai turi prognostinės vertės glioblastoma sergantiems pacientams. Paskaičiuotos koreliacijos tarp miRNR raiškos GBM audinyje ir glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo bei nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) atvirkštinis ryšys tarp miR-361-5p raiškos ir GBM sergančių pacientų išgyvenamumo (3.6 pav.).

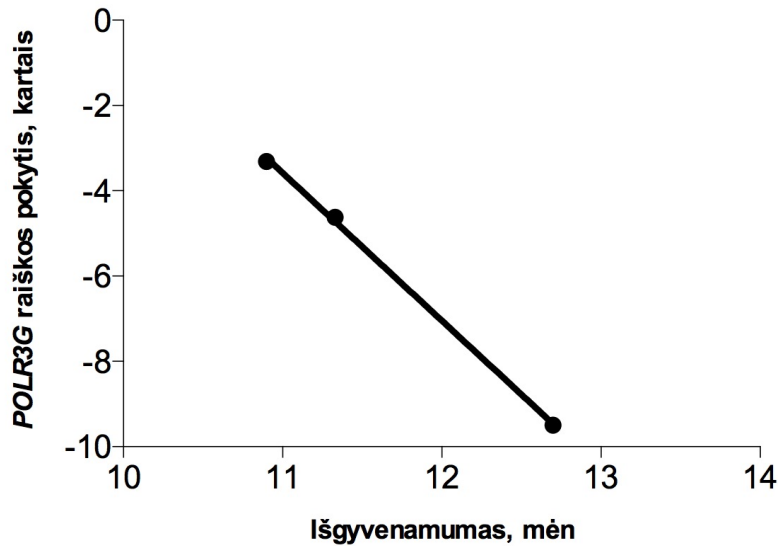


3.6 pav. Atvirkštinė priklausomybė tarp miR-361-5p raiškos ir glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo, * $p < 0,05$.

Remiantis literatūra, toks rezultatas pakankamai prieštaringas, kadangi vienu autorių (Wang *et al.*, 2014) duomenimis, sumažėjusi miR-361-5p raiška lemia padidėjusią VEGF raišką. Žinant, kad VEGF lemia naviko angiogenezę, tikėtina, kad toks veiksnys turėtų būti susijęs su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Wang *et al.* eksperimento metu, tiriant išemine širdies liga sergančius pacientus, miR-361-5p sėkmingai slopino VEGF raišką, o jos raiškos nutildymas (angl. *knock down*) ne tik atkūrė VEGF lygį ir angiogeninį endotelio pirmtakių ląstelių (angl. *endothelial progenitor cell* (EPC)) aktyvumą *in vitro*, bet ir atstatė kraujotaką išeminėse pelių galūnėse. Taip pat, remiantis šių autorių duomenimis, šie atradimai galėtų būti pritaikyti kovai su naviko angiogenezės procesu. Nustatyta, kad padidėjusi miR-361-5p raiška slopino ląstelių migravimą ir vaskulogenezę iki panašaus lygio, kuris buvo gautas veikiant EPC *Avastin* preparatu, kuris yra anti-VEGF monokloninis antikūnas ir patvirtintas terapinis vaistas kai kurių vėžio formų atvejais, įskaitant glioblastomą. Remiantis tokiais rezultatais, sintetiniai miR-361-5p oligonukleotidai galėtų tapti terapijos, nutaikytos prieš VEGF, alternatyva, kuri tikėtina būtų pigesnė, lyginant su baltymineis vaistais (pvz.: *Avastin*).

Tuo tarpu, sumažėjusią miR-361-5p raišką GBM audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu patvirtina kitų autorių tyrimo duomenys (Zhang *et al.*, 2017), tačiau eksperimento metu, taip pat nustatyta, kad padidėjusi miR-361-5p raiška reikšmingai sumažina gliomos ląstelių invaziją, migravimą ir epitelinį-mezenchiminį virsmą (EMT) bei atvirškščiai, tuo tarpu EMT yra svarbus procesas, lemiantis vėžio invazyvumą ir metastazavimą.

Remiantis *DIANA TOOLS* duomenų baze, vienas iš miR-361-5p taikinių yra *POLR3G* genas. Atlikus koreliacinę analizę tarp šio geno raiškos ir glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo, pastebėta, kad *POLR3G* geno raiška atvirškščiai koreliuoja su išgyvenamumu (3.7 pav.). Tačiau neatlikus papildomų tyrimų didesnėje imtyje, negalime daryti jokių išvadų, nors nustatyta miR-361-5p įtaka išgyvenamumui tik sustiprina šią hipotezę.



3.7 pav. Atvirkštinė priklausomybė tarp *POLR3G* geno raiškos ir glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo, $r = -1$, $p > 0,05$.

Apibendrinant galime teigti, kad ląstelės, auginamos 3D kultūroje yra potencialus modelis glioblastomos molekulinį žymenų tyrimui, kadangi genų raiška glioblastomos audinio navikinėse ląstelėse yra panaši į genų raišką 3D kultivuotoje ląstelių kultūroje. Tačiau mažas miRNR raiškos atsikartojamumas U-87 ląstelių linijoje ir glioblastomos audinyje parodo, kad miRNR raiškos reguliavimas audinyje yra kompleksiškesnis ir miRNR raiška yra labiau priklausoma nuo naviko mikroaplinkos. Tai būtina įvertinti tiriant miRNR raišką 3D modelinėje sistemoje.

Šio tyrimo metu atkleista molekulinį žymenų svarba glioblastomos diagnostikoje, kadangi histologiniai GBM audinio požymiai nebūtinai sutampa su GBM požymiais molekuliniam lygmenyje. Taip pat nustatyta svarbi miR-361-5p ir jos taikinio *POLR3G* sąsaja su glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu, kurios patikimumas turėtų būti tikrinamas didesnėje imtyje.

IŠVADOS

1. Visuminės genų raiškos ir miRNR skirtumų glioblastomos U-87 linijos 2D ir 3D kultivuotuose ląstelių kultūrose analizė leidžia pasirinkti potencialius molekulinis žymenis, kurių raiška pasižymi glioblastomos audinio ląstelės.
2. Pasirinktų genų raiškos palyginimas glioblastomos U-87 linijos 2D ir 3D kultivuotuose ląstelių kultūrose ir glioblastomos audinyje atskleidė, kad genų raiška glioblastomos audinio navikinėse ląstelėse yra panaši į genų raišką 3D kultivuojoje ląstelių kultūroje.
3. Nustatyta visų tirtų miRNR statistiškai reikšmingai mažesnė raiška glioblastomos audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu.
4. Nustatytas miR-361 bei jos taikinio *POLR3G* raiškos atvirkštinis ryšys su pacientų išgyvenamumu.

SANTRAUKA

Glioblastoma - piktybiškiausia smegenų naviko forma, gydoma chemoterapijos, radioterapijos arba chirurginės intervencijos būdu. Šios gydymo priemonės tik sušvelnina ligos simptomus, o vidutinė išgyvenimo trukmė po diagnozės nustatymo tesiekia 12-15 mėnesių. Egzistuoja daugybė eksperimentinių glioblastomos modelių, kuriais siekiama išsiaiškinti molekulinis mechanizmus, lemiančius glioblastomos vystymąsi ir invazyvumą, bei ieškoti naujų gydymo būdų.

Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti pasirinktų genų ir miRNR raiškos skirtumus glioblastomos U87 linijos 2D ir 3D kultivuotuose ląstelių kultūrose bei glioblastomos biologiniuose mėginiuose ir įvertinti šiuos skirtumus, kaip potencialius molekulinis vėžio žymenis.

Tyrimo rezultatai atskleidė U87 linijos 3D kultivuojamų ląstelių kultūros modelio tinkamumą glioblastomos molekuliniais žymenims tirti, kadangi genų raiška glioblastomos audinio navikinėse ląstelėse buvo panaši į genų raišką 3D kultivuojuose ląstelių kultūroje. AT- kPGR metodu nustatyta statistiškai reikšmingai mažesnė miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-30b-5p, miR143-3p, miR-361-5p ir miR-484 raiška glioblastomos audinyje, lyginant su sveiku smegenų audiniu. Taipogi, įvertinus genų ir miRNR sąsajas su glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumu nustatytas atvirkštinis ryšys tarp miR-361-5p bei jos taikinio *POLR3G* geno raiškos ir glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumo. Tačiau norint patvirtinti šio rezultato patikimumą, reikėtų tyrimą atlikti didesnėje imtyje.

Tyrimo metu, glioblastomos audinį lyginant su sveiku smegenų audiniu, paaiškėjo, jog histologiškai sveikas smegenų audinys molekuliniam lygmenyje gali pasižymėti navikiniam audiniui būdinga miRNR raiška. Gauti rezultatai įrodo molekulinis žymenų svarbą glioblastomos diagnostikoje ir tyrime, vystant naujus gydymo būdus, siekiant pagerinti glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumą ir gyvenimo kokybę.

SUMMARY

Glioblastoma is one of the most aggressive malignant brain tumors and despite the standard surgery, radiation and chemotherapy, affected individuals has a median survival of 12-15 months following diagnosis. In order to understand the genetic mechanisms of tumor initiation and progression lots of different model systems are employed, but there are still lots of open questions left.

The aim of this study was to evaluate the changes in the expression of gene and miRNA in glioblastoma U-87 cell line 2D and 3D cultivated cell cultures and glioblastoma tissues in order to find out the potential biomarkers, which have an important role in glioma initiation, progression and invasion.

The results demonstrated that U-87 cell line 3D cultivated cell culture is an appropriate experimental model system for cancer research, because of similar tendencies of altered gene expression, comparing with glioblastoma tissue.

RT-qPCR analysis revealed a significant decrease of miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-30b-5p, miR143-3p, miR-361-5p and miR-484 expression in glioblastoma tissue comparing with normal brain tissue. In addition, the relation between gene and miRNA expression and survival of glioblastoma patients was evaluated. Correlation analysis has shown a promising association between miR-361-5p and its target *POLR3G* gene expression and survival in glioblastoma patients. However, a significance of this result should be examined using a larger sample.

Moreover, the analysis of miRNA expression in glioblastoma tissue, comparing with normal brain tissue has demonstrated different histological and molecular features of normal brain tissue, approving the significant clinical potential of miRNA to be validated as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in glioblastoma.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. 2007; 114(2):97-109.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 13:803-20.
3. Purow B. and Schiff D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nature Reviews Neurology*. 2009; 5 p. 419–426.
4. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*. 2016; 20 (5): S2-S8.
5. Gudiniavičienė I, Pranys D, Juozaitytė E. Gliomų morfologijos ir biologijos įtaka jų prognozei. *MEDICINA*. 2004; Vol.40, No.2.
6. Thon N, Kreth S, Kreth F-W. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *OncoTargets and therapy*. 2013; 6: 1363-1372.
7. Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair*. 2007; 6. p.1155-1160.
8. Hegi M, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S. Clinical Trial Substantiates the Predictive Value of O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10 p. 1871-1874.
9. Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *BioMed Research International*. 2017; Article ID 8013575, 13 pages.
10. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine*. 2014; 6 (11): 1359-1370

11. Kwiatkowska A, Nandhu MS, Behera P, Chiocca EA, Viapiano MS. Strategies in Gene Therapy for Glioblastoma. *Cancers*. 2013; 5 (4):1271-1305.
12. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemporary Oncology*. 2014; 18 (5): 307-312.
13. Barciszewska AM. MicroRNAs as efficient biomarkers in high-grade gliomas. *Folia Neuropathol*. 2016; 54 (4): 351-359.
14. Luo JW, Wang X, Yang Y, Mao Q. Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; Vol. 19 - N. 9, 1630-1639.
15. Sasayama T, Tanaka K, Kohmura E. The Roles of MicroRNAs in Glioblastoma Biology and Biomarker. *Neurooncology- Newer Developments, Prof.Amit Agrawal (Ed.), InTech*. 2016;
16. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D *et al*. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes & Development*. 2009; 23 (11): 1327-1337.
17. Wong RC, Pollan S, Fong H, Ibrahim A, Smith EL, Ho M, Laslett AL, Donovan PJ. A novel role for an RNA polymerase III subunit POLR3G in regulating pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011; 29 (10):1517–1527.
18. Wu N, Zhao X, Liu M, et al. Role of MicroRNA-26b in Glioma Development and Its Mediated Regulation on EphA2. Maas S, ed. *PLoS ONE*. 2011; 6 (1): e16264.
19. Rolle K. miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside. *Acta Biochimica Polonica*. 2015; Vol.62, No 3: 353-365.
20. Shea A, Harish V, Afzal Z, et al. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Medicine*. 2016; 5 (8): 1917-1946.
21. Zanoni M, Piccinini F, Arienti Ch, Zamagni A, Santi S, Polico R, Bevilacqua A, Tesei A. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*. 2016; 6 Article number: 19103.

22. Ioannis SV, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*. 2015: gkv403.
23. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010; 50 (4): 237-43.
24. Die JV, Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *J Exp Bot*. 2012; 63 (17): 6069-6077.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-8.
26. Kasnauskienė J. Viso žmogaus genomo analizės metodai. Vilnius, 2014.
27. Real-Time PCR Applications Guide. *Bio-Rad Laboratories Inc*. 2006.
28. Pandyra AA, Mullen PJ, Goard CA, Ericson E, Sharma P, Kalkat M, Yu R, Pong JT, Brown K, Hart T, Gebbia M, Lang KS, Giaever G, Nislow C, Moffat J, Penn LZ. Genome-wide RNAi analysis reveals that simultaneous inhibition of specific mevalonate pathway genes potentiates tumor cell death. *Oncotarget*. 2015; Vol. 6, No. 29.
29. Sibenaller RA, Etame AB, Ali MM, Barua M, Braun TA, Casavant TL, Ryken TC. Genetic Characterization of Commonly Used Glioma Cell Lines in the Rat Animal Model System. *Neurosurg Focus*. 2005; 19 (4).
30. Franovic A, Elliot KC, Seguin L, Camargo MF, Weis SM, Cheresch DA. Glioblastomas require integrin $\alpha\beta3$ /PAK4 signaling to escape senescence. *Cancer research*. 2015; 75 (21), 4466-4473.
31. Candolfi M, Curtin JF, Stephen Nichols W, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology*. 2007; 85 (2): 133-148.
32. Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(18): 5288–97.

33. Koo S, Martin GS, Schulz KJ, Ronck M, Toussaint LG. Serial selection for invasiveness increases expression of miR-143/miR-145 in glioblastoma cell lines. *BMC Cancer*. 2012; 12:143.
34. Herman A, Gruden K, Blejec A *et al*. Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin. Zhao J-J, ed. *PLoS ONE*. 2015; 10 (5): e0125791.
35. Hu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Liu M, Tang H. miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2017 Mar 7; 17:36.
36. Wang L, Shi Z, Jiang C, Liu X, Chen Q, Qian X, Li D, Ge X, Wang X, Liu L, You Y, Liu N, Jiang B. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma. *Oncotarget*. 2014; 5 (14): 5416-5427.
37. Wang HW, Lo HH, Chiu Y-L, et al. Dysregulated miR-361-5p/VEGF Axis in the Plasma and Endothelial Progenitor Cells of Patients with Coronary Artery Disease. Tang C-H, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9 (5): e98070.
38. Zhang X, Wei C, Li J, Liu J, Qu J. MicroRNA-361-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition of glioma cells through targeting *Twist1*. *Oncology Reports*. 2017; 37.3: 1849-1856.

PRIEDAI

1 lentelė. AT- kPGR genų raiškos tyrimui naudoti pradmenys

Genas	Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo
<i>CCL20</i>	5' AGCACTCCCAAAGAACTGGG 3'	5' CAGAGGTGGAGTAGCAGCAC 3'
<i>COL1A2</i>	5' GTTGCTGCTTGCAGTAACCTT 3'	5' AGGGCCAAGTCCAACCTCCTT 3'
<i>FGF5</i>	5' CACTGATAGGAACCTTAGAGGC 3'	5' CAGATGGAAACCGATGCCC 3'
<i>FGF7</i>	5' TCCTGCCAACTTTGCTCTACA 3'	5' CAGGGCTGGAACAGTTCACAT 3'
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	5' GAAGATGGTGATGGGATTT 3'
<i>HMGCS1</i>	5'GATGTGGGAATTGTTGCCCTT 3'	5'ATTGTCTCTGTTCCAACCTCCAG 3'
<i>HPRT</i>	5' CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA 3'	5' CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA 3'
<i>IL1B</i>	5' ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA 3'	5' GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA 3'
<i>IL1R1</i>	5' ATGAAATTGATGTTCGTCCCTGT 3'	5' ACCACGCAATAGTAATGTCCTG 3'
<i>IL1RAP</i>	5' GGGGACTAGACACCATGAGG 3'	5' ACCAGATCAGAGTAAGGCCAG 3'
<i>ITGAV</i>	5' GGCTGCATATTTTCGGATTTTCTG 3'	5' CCATTCAGCTTTGTCGTCTGG 3'
<i>ITGB3</i>	5' GTGACCTGAAGGAGAATCTGC 3'	5' CCGGAGTGCAATCCTCTGG 3'
<i>POLR3G</i>	5' GAGGACGTGCTGCTTATACCT 3'	5' CTGTTCTGCGGCATCATCGT 3'
<i>PTGS2</i>	5' ATGCTGACTATGGCTACAAAAGC 3'	5' TCGGGCAATCATCAGGCAC 3'

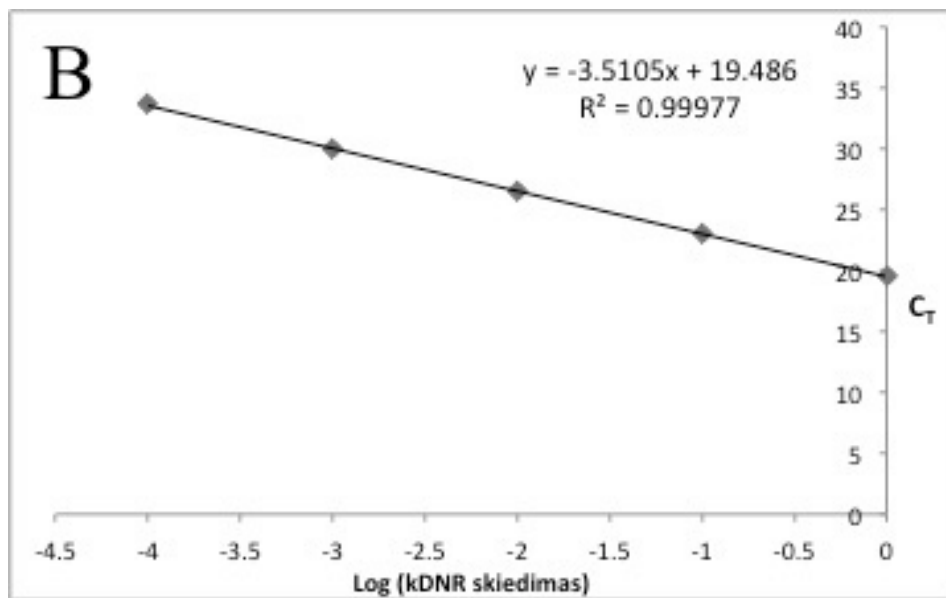
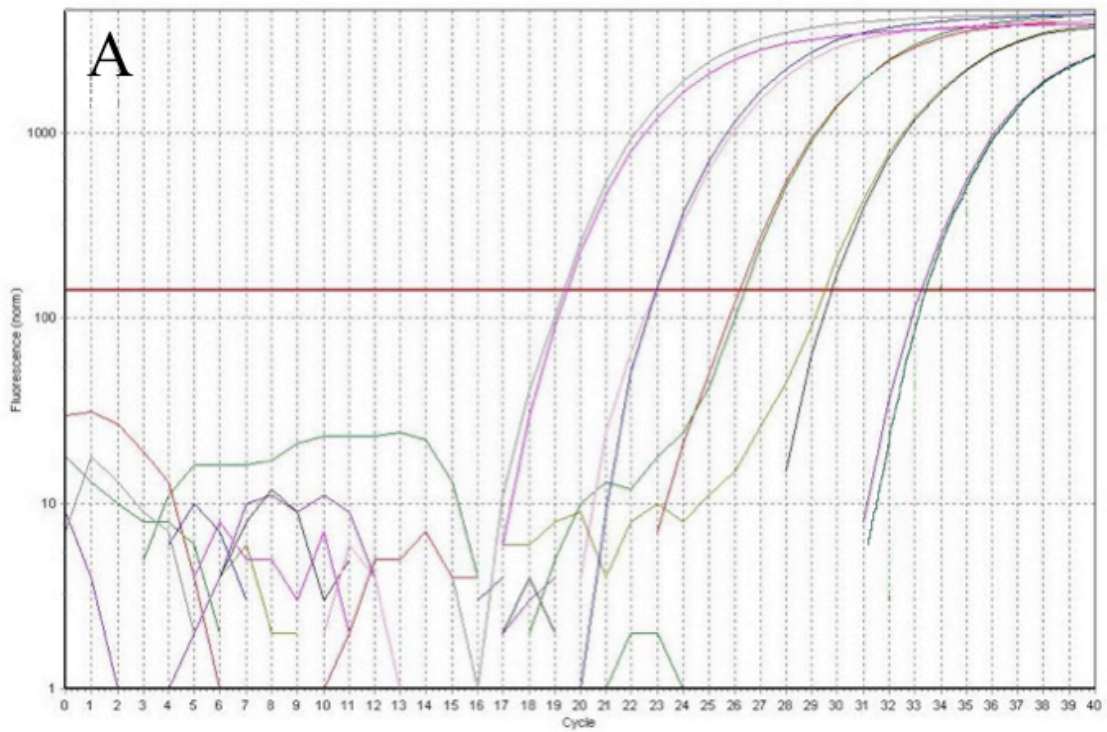
2 lentelė. miRNR kDNR sintezei naudoti pradmenys

miRNR	Pradmens seka
miR-26a-5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCCTA-3'
miR-26b-5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCTAT-3'
miR-30b-5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTGA-3'
miR-143-3p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGCTA-3'
miR-361-5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTACCC-3'
miR-484	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATCGGG-3'
RNU48	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGTCAGAGC-3'
U6	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATG-3'

3 lentelė. AT- kPGR miRNR raiškos tyrimui naudoti pradmenys

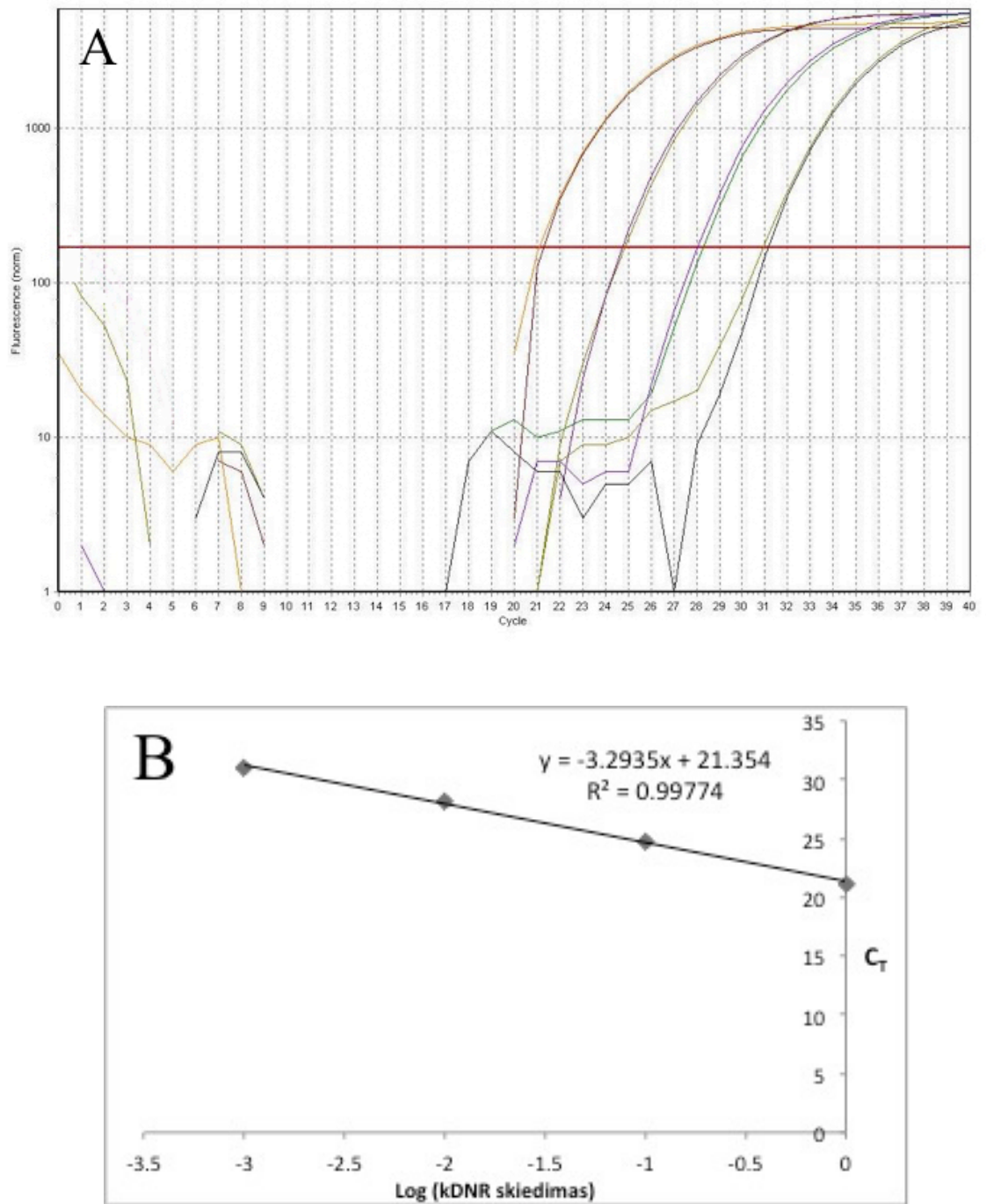
miRNR	Pradmens seka
miR-26a-5p	5'-GCGTTCAAGTAATCCAGGA-3'
miR-26b-5p	5'-GCGGTTCAAGTAATTCAGG-3'
miR-30b-5p	5'-GCGGTGTAAACATCCTACAC-3'
miR-143-3p	5'-GCCTGAGATGAAGCACTG-3'
miR-361-5p	5'-GCGTTATCAGAATCTCCAG-3'
miR-484	5'-TCAGGCTCAGTCCCCT-3'
RNU48	5'-GCGTGCCATCACCGCAGC-3'
U6	5'-GCGCGTCGTGAAGCGTTC-3'

PRIEDAI



1 pav. AT- kPGR reakcijos efektyvumo įvertinimo pavyzdys: *IL1B* geno amplifikacijos (A) ir standartinė (B) kreivės.

PRIEDAI



2 pav. AT- kPGR reakcijos efektyvumo įvertinimo pavyzdys: RNU48 miRNR amplifikacijos (A) ir standartinė (B) kreivės.