

VILNIUS UNIVERSITY

Kristina
STUOPELYTĖ

Analysis of RNA in bodily fluids for prostate cancer diagnosis and outcome prediction

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2014 and 2019 at Human Genome Research Laboratory, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University.

The research was supported by Research Council of Lithuania (RCL), EU structural funds, and scholarships from RCL and VU were granted for academic accomplishments.

Academic supervisor – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defense Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural sciences, Biology, N 010).

Members:

Prof. Dr. Steven Bova (Tampere University, Finland, Medicine and Health Sciences, Medicine, M 001);

Assoc. Prof. Dr. Veronika Dedonytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010);

Assoc. Prof. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010);

Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 pm on 29th of May, 2020 in Room R401 of Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Sauletekio Ave. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania, Tel. +370 5 223 4420; e-mail: info@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at Vilnius University Library, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Kristina
STUOPELYTĖ

Organizmo skysčių RNR tyrimai prostatos vėžio diagnostikai ir ligos eigos prognozavimui

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2014–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje.

Moksliniai tyrimai buvo remiami Lietuvos mokslo tarybos ir ES struktūrinės paramos fondų lėšomis. Taip pat gautos LMT ir VU stipendijos už akademinį pasiekimą.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Rūta Navakauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Nariai:

Prof. dr. Steven Bova (Tampėres universitetas, Suomija, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina, M 001);

Doc. dr. Veronika Dedonytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010);

Doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010);

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. gegužės mėn. 29 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4420; el. paštas info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

CONTENTS

ABBREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
MATERIAL AND METHODS.....	13
RESULTS.....	21
CONCLUSIONS	34
SUMMARY IN LITHUANIAN	36
IŠVADOS.....	50
LIST OF PUBLICATIONS.....	52
PRESENTATIONS AT CONFERENCES	53
PADĖKA.....	55
<i>CURRICULUM VITAE</i>	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS	57

ABBREVIATIONS

AA – abiraterone acetate
ABI – Applied Biosystems
AC – asymptomatic controls
ADT – androgen deprivation therapy
AR or AR-FL – full length androgen receptor
ARE – androgen response elements
AR-V – androgen receptor variant
AUC – area under the ROC curve
BCR – biochemical recurrence
bp – base pair
BPH – benign prostatic hyperplasia
cDNA – copy/complementary DNA
CI – confidence interval
CRPC – castration resistant prostate cancer
Cq – cycle of quantification (former Ct)
Ct – threshold cycle
CTC – circulating tumor cells
dNTP – deoxynucleotide triphosphate
FC – fold change
G – Gleason
HR – hazard ratio
ISUP – International Society of Urological Pathology
miRNA – microRNA
nt – nucleotide
OS – overall survival
PFS – progression-free survival
PSA – prostate specific antigen
PCa – prostate cancer
pT – pathological stage
ROC curve – receiver operating characteristic curve
RP – radical prostatectomy
rpm – revolutions per minute
RT – reverse transcription/transcriptase
RT-qPCR – quantitative reverse transcription PCR
TLDA – TaqMan Low Density Array
TMPRSS2-ERG – fusion transcript of *TMPRSS2* and *ERG* genes formed by translocation/deletion
TFS – Thermo Fisher Scientific

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most prevalent oncologic disease in Lithuania and world-wide, especially in western countries [Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019]. Despite the fact that older men and men at other risk groups are screened for prostate specific antigen (PSA), and new diagnostic tests are being developed, the morbidity and mortality of PCa remains very high in elderly men. Current methods used in PCa diagnostics, such as PSA test, digital rectal examination, systemic biopsy, etc., are quite sensitive but lack specificity, due to high rates of false-positive PCa cases detected. Although local PCa treatment is quite effective and aggressive disease develops for a minority of patients, clinically significant PCa cases are associated with worse prognosis and shorter survival. Castration resistant prostate cancer (CRPC) remains incurable and is the leading cause of death from PCa. New drugs have improved survival and quality of life in patients with CRPC over the past decade [Berg et al., 2017]: new taxanes docetaxel and cabazitaxel, radionuclide Ra-223, immunotherapy drug sipuleucel-T and next-generation antiandrogens, such as androgen receptor inhibitors enzalutamide and apalutamide and androgen synthesis inhibitor abiraterone acetate [Nuhn et al., 2019]. However, due to the heterogeneous nature of CRPC, approximately 20-40% of patients are already resistant to these new drugs [de Bono et al., 2011; Ryan et al., 2013].

The development of cancer affects all processes in the cell, including the regulation of miRNA expression. miRNAs are short non-coding ~22 nt long RNAs playing an important role in the physiological processes of most eukaryotes. Depending on the complementarity level between miRNA regulatory region and target, gene expression is silenced in two main ways: by blocking the protein translation or by inducing mRNA degradation [Willard and Koochekpour, 2012]. The regulation of gene expression by miRNAs

is important for cellular processes, as abnormalities lead to the development of various heart, nervous system, inflammatory, autoimmune diseases and cancers, including PCa [Naeini and Ardekani, 2009]. In cancer research, terms such as oncomiR and tumor suppressor miRNA have been known for a long time, but due to the importance of miRNA expression context (tissue, organ, stage, etc.) unambiguous miRNA separation is not possible [Tong and Nemunaitis, 2008]. The growing body of evidence has shown that miRNA expression profiles differ not only between cancerous and noncancerous tissues but also between different cancer types and subtypes [Naeini and Ardekani, 2009; Di Leva and Croce, 2013; Silva-Sanos et al. 2014]. miRNA expression also differs between early and late stage cancers and depends on the disease aggressiveness [Brase et al., 2011; Shen et al., 2012]. Comparison of cancerous and noncancerous prostate tissues results in the identification of a specific miRNA expression profile that changes with the development of the disease. An important discovery was made when miRNAs were detected in body fluids such as blood [Selth et al., 2012; Cheng et al., 2013; Huang et al., 2015], urine [Corcoran et al., 2014], seminal fluid [Guzel et al., 2015]. Urine being a completely non-invasively collected material, urine-circulating miRNAs may become sensitive, noninvasive tools for PCa diagnostic, prognostic, and predictive purposes [Balacescu et al., 2017]. However, to date there are no published miRNA studies in CRPC urine.

Studies show that the androgen receptor (AR) signaling pathway remains active in CRPC and plays an important role in its development and progression. One reactivation mechanism could be AR splicing variants (AR-Vs) which lack a ligand binding domain and are constitutively active. Since the discovery, AR-V have been associated with primary and acquired resistance to antiandrogen drugs [Dehm et al., 2008; Guo et al., 2009; Hu et al., 2009; Sun et al., 2010]. Currently, there are more than 20 AR-Vs known

[Paliouras et al., 2016], but due to the highest prevalence AR-V7 is the most widely studied AR-V [Scher et al., 2017]. Detection of AR-V7 in fluid biopsy has significantly increased the number of clinical trials and commercial tests. However, for a better understanding of CRPC carcinogenesis and heterogeneity a broader spectrum of comprehensive AR-V studies is still lacking [Antonarakis et al., 2014; Steinestel et al., 2015; Antonarakis et al., 2017].

The aim of this study was to select prostate cancer-specific miRNA and androgen receptor variants as biomarkers for analysis in urine and blood and to assess their diagnostic, prognostic value and ability to predict response to treatment.

Objectives:

1. To analyze miRNA expression profile in cancerous and noncancerous prostate specimens, to validate selected targets in a larger cohort and to evaluate the correlations with clinical-pathological parameters.
2. To analyze the selected miRNAs (miR-148a, -365, -375, and -429) in urine collected from patients with PCa, benign prostatic hyperplasia (BPH) and asymptomatic controls (AC) and evaluate the diagnostic potential.
3. To analyze the selected miRNAs (miR-19a /19b, -21) in urine collected from PCa and BPH patients and to evaluate the diagnostic and prognostic potential.
4. To analyze the selected miRNAs (miR-148a, -365, -375, and -429) in urine collected from castration resistant PCa (CRPC) patients, to compare with urine from indolent PCa cases and controls and to evaluate the prognostic potential as well as the suitability to predict the sensitivity to abiraterone acetate (AA) treatment.
5. To investigate the expression of androgen receptor (AR-FL) and AR variants (AR-Vs: AR-V1, -V3, and -V7) in cancerous and

noncancerous prostate specimens and to evaluate the association with clinical-pathological characteristics as well as the prognostic potential.

6. To analyze AR-FL and AR-V transcripts in blood collected from CRPC patients and controls and to evaluate the prognostic potential.

Scientific novelty and practical value of the study

In this study, for the first time in Lithuania, miRNA expression profile was evaluated in prostate specimens and dozens of miRNAs were found deregulated in tumor tissue. After the associations with clinical-pathological variables of PCa were analysed, miRNAs showing the most significant associations were selected for the investigation in numerous urine samples collected from PCa patients and controls. The study showed that miRNA analysis in noninvasively collected urine samples would allow to specifically diagnose PCa at early stages and to predict the biochemical recurrent disease. There is a lack of sensitive and specific biomarkers to distinguish clinically relevant PCa cases and avoid overtreatment. Therefore, urinary miRNAs that correlate with the clinical-pathological characteristics of PCa and outperform the specificity of PSA test could be applied in PCa diagnostics.

The most PCa-specific miRNAs were selected for the analysis in urine collected from castration resistant prostate cancer (CRPC) patients for the first time. Changes in miRNA level detected in urine samples collected before the initiation of treatment with abiraterone acetate (AA) were associated with shorter progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). CRPC is an incurable disease; therefore the medications can only prolong the survival. Over time, all patients become resistant to the prescribed medications, while a large proportion of patients have primary resistance. For these reasons it is very important to choose the most appropriate treatment for each individual case and to refine the treatment regimens.

In this study, the expression of androgen receptor (AR-FL) and AR variants (AR-Vs) was evaluated in prostate specimens of Lithuanian patients with CRPC. After significant associations with the more aggressive course of the disease were found in tissue analysis, AR transcripts were analyzed in CRPC patients blood collected before and during AA treatment. For the first time, whole blood-circulating AR-V1 and AR-V3 were tested, and higher levels of transcripts were associated with shorter PFS and OS. The AR signaling pathway not only remains active in the development of CRPC, but plays a key role. The AR-V analysis is useful for a better understanding of CRPC heterogeneity and the biological resistance mechanisms, and may help to improve the prescribing the existing and developing new drugs.

Statements to be defended

1. miR-148a, -365, -375, and -429 are PCa-specific and /or have significant associations with clinical-pathological parameters of PCa and could therefore be used to refine the diagnosis of PCa.
2. The combination of urinary miR-148a and miR-375 is a sensitive molecular tool for noninvasive diagnosis of PCa, while the combination of miR-19b and miR-19a/b specifically predicts biochemical recurrence.
3. The combination of urinary miR-375 and -429 specifically distinguishes CRPC from PCa and controls.
4. In patients treated with abiraterone acetate (AA), urinary miR-148 predicts progression-free survival, while the combination of miR-148a and miR-375 predicts overall survival.
5. Increased expression of AR-V1 and -V7 in cancerous prostate tissues is characteristic to aggressive course of PCa, and AR-V7 expression predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy.

6. Higher level of AR-FL and -V1 transcripts in AA-treated CRPC patients blood predicts progression-free survival and overall survival.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples

Specimens for **miRNA analysis** (tissue and/or urine) were collected prospectively from 237 PSA-screened and biopsy-proven PCa patients who subsequently underwent radical prostatectomy (RP) at the Urology Department of Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics from January 2008 to January 2014. For comparison, urine specimens from 23 benign prostatic hyperplasia (BPH) patients and 62 asymptomatic control (AC) men with PSA level ≤ 3 ng/mL were collected. The study was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (2007-11-23 No. 50 and 2011-09-07 No. 6B-11-275), and all patients gave informed consent for participation. The research was a part of a large-scale PCa biomarker study started at 2008 and conducted according to standardized protocols of sample collection and processing reported previously [Sabaliauskaite et al, 2012; Daniunaite et al, 2014]. Cancerous ($\geq 70\%$ of tumor cells) and non-cancerous (0%) prostatectomy tissues were sampled by expert histopathologist as reported [Sabaliauskaite et al, 2012; Daniunaite et al, 2014] and prepared for molecular analysis. BCR following RP was defined by two consecutive PSA values of ≥ 0.2 ng/mL and rising. The fusion transcript *TMPRSS2-ERG* status of the tumors was known from our previous studies [Sabaliauskaite et al, 2012; Demidenko et al, 2015].

For circulating miRNA extraction, urine from two independent cohorts was used. Detailed data of all the study groups are provided in Table 1.

1. Preoperative catheterized urine was available from the first cohort (PCa1, N=143) and BPH cases (N=23). The mean follow-up period of PCa1 cohort was 2.7 years, and the follow-up data were collected for 91.6% (131/143) cases.

2. Initial voided urine was collected before the surgery from the second cohort (PCa2, (N=72) and AC cases (N=62). PCa2 had shorter mean follow-up period (1.0 year), and follow-up data were missing for a set (18 out of 72) of the cases. ASC cases were age-matched (mean 63.3 years) to both the PCa groups.

Urine samples from both PCa cohorts and controls were processed using the same protocol: 30 ml of urine was centrifuged at 1000 rpm for 15 min at 4 °C and up to 1.5 ml of lower fraction was collected. PBS-washed and suspended urine specimens were stored at -70 °C until use.

Table 1. Clinical-pathological characteristics of patients with prostate cancer (PCa), benign prostatic hyperplasia (BPH) and asymptomatic controls (AC)

Variable		Tissue, 72		Urine, 300			
		PCa, 56	NPT, 16	PCa1, 143	PCa2, 72	BPH, 23	AC, 62
Age	mean±SEM, yrs	61.6 ±0.9	62.0±0.6	61.4 ±0.6	61.7 ±0.9	74.2 ±1.4	63.3 ±1.2
	range, yrs	48-73	53-70	42-74	41-73	59-83	30-81
G	6; n (%)	20 (35.7)	-	75 (52.4)	15 (20.8)	-	-
	≥7; n (%)	36 (64.3)	-	68 (47.6)	56 (77.8)	-	-
	Unk.; n (%)	-	-	-	1 (1.4)	-	-
Sub-stratified G	≤(3+4); n (%)	49 (87.5)	-	118 (82.5)	53 (73.6)	-	-
	≥(4+3); n (%)	7 (12.5)	-	10 (7.0)	18 (25.0)	-	-
	Unk.; n (%)	-	-	15 (10.5)	1 (1.4)	-	-
pT	≤2; n (%)	38 (67.9)	-	112 (78.3)	55 (76.4)	-	-
	3; n (%)	18 (32.1)	-	31 (21.7)	16 (22.2)	-	-
	Unk.; n (%)	-	-	-	1 (1.4)	-	-
BCR	Yes; n (%)	18 (32.1)	-	26 (18.2)	9 (12.5)	-	-
	No; n (%)	37 (66.1)	-	105 (73.4)	45 (62.5)	-	-
	Unk.; n (%)	1 (1.8)	-	12 (8.4)	18 (25.0)	-	-
Serum PSA	mean±SEM, ng/ml	10.8±4.5	6.6±1.8	9.7±1.0	8.5±0.9	7.8±1.3	-
	range, ng/ml	2.8-84.2	2.6-17.0	0.1-84.2	2.3-38.0	0.8-28.1	-
	Unk.; n (%)	2 (3.6)	-	3 (2.1)	-	2 (8.7)	-
T-E	Yes; n (%)	37 (66.1)	-	56 (39.2)	16 (22.2)	-	-
	No; n (%)	19 (33.9)	-	41 (28.7)	10 (13.9)	-	-
	Unk.; n (%)	-	-	46 (32.2)	46 (63.9)	-	-
Surg. M.	Pos.; n (%)	22 (39.3)	-	-	-	-	-
	Neg.; n (%)	34 (60.7)	-	-	-	-	-
	Unk.; n (%)	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: BCR – biochemical recurrence; G – Gleason score; NPT – non-cancerous prostate tissue; pT – pathological stage; Surg. M. – status of surgical margins; T-E – *TMPRSS2-ERG* fusion gene status; Unk – unknown.

Analysis of **AR transcripts expression in prostate tissues** was done with specimens selected from abovementioned PCa1 and PCa2 cohorts. We analyzed 100 cancerous and 12 noncancerous tissue samples in prostatectomy specimens from 112 men. Data for prostate-specific antigen progression-free survival were available for 98 patients. Within median follow-up of 30.5 months, 27 out of 98 patients (27.6%) developed biochemical recurrence (BCR). For analysis of **AR transcripts in blood** and miRNA analysis in urine, blood and urine samples were collected from castration resistant prostate cancer (CRPC) patients. Samples were collected prospectively between February 2017 and November 2018 from 102 metastatic CRPC patients treated in the National Cancer Institute, Vilnius, with treatment scheme that included abiraterone acetate (AA) as a first or second line selection. 2.5 mL of blood (PAXgene Blood RNA Tubes) and urine samples were collected at initiation of the treatment (AA-0) and every 6th month afterwards or at the time of disease progression (AA-1/2). Disease progression was defined when any two of three criteria were fulfilled: PSA progression, radiologic progression and/or clinical deterioration. For comparison, blood samples from 14 age-matched asymptomatic men were collected (age median 63.0 years). All patients gave informed consent for participation and the National Bioethics Committee approval (No. 158200-17-874-411) was obtained.

Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were defined as the time from the initiation of the AA treatment until documented evidence of the disease progression or death from any cause, with follow-up available for 98/102 (96.1%) cases (the treatment outcome of 4 patients was unknown). Based on PFS, all patients were stratified into treatment response groups: extended response (>8 months; ER), medium (3-8 months; MR) and short (<3 months; SR). Eleven patients who started AA treatment but decided to discontinue and died within a few months were assigned to the SR

group. Detailed clinical-pathological characteristics of CRPC patients are summarized in Table 2.

Table 2. Clinico-pathological characteristics of patients with castration resistant prostate cancer in blood sample study

Parameter	Value
CRPC patients, N	102
Median age at PCa diagnosis, yr (IQR)	67.9 (11.1)
Median age at CRPC diagnosis, yr (IQR)	75.4 (11.4)
ISUP grade group (biopsy)	
≤2; N (%)	57 (55.9)
3; N (%)	11 (10.8)
≥4; N (%)	25 (24.5)
Unknown; N (%)	9 (8.8)
Clinical T stage, cT	
≤2; N (%)	33 (32.4)
≥3; N (%)	65 (63.7)
Unknown; N (%)	4 (3.9)
Radical treatment	
Yes; N (%)	41 (40.2)
No; N (%)	59 (57.8)
Unknown; N (%)	2 (2.0)
Median response to first-line ADT, mo (IQR)	40.0 (73.5)
Bone metastasis prior AA treatment	
Yes; N (%)	87 (85.3)
No; N (%)	15 (14.7)
Visceral metastasis prior AA treatment	
Yes; N (%)	10 (9.8)
No; N (%)	92 (90.2)
Lymph node metastasis prior AA treatment	
Regional; N (%)	31 (30.4)
Non-regional; N (%)	21 (20.6)
Both; N (%)	16 (15.7)
None; N (%)	66 (64.7)
Volume of metastases prior AA treatment ^a	
Low; N (%)	38 (37.3)
High; N (%)	64 (62.7)

Table 2. Continued.

Parameter	Value
Median PSA before treatment with AA, ng/mL (IQR)	39.4 (80.0)
AA treatment	
1 st line; N (%)	88 (86.3)
2 nd line, after DTX; N (%)	14 (13.7)
Median PFS, mo (IQR)	8.9 (7.3)
Deceased	
Yes; N (%)	56 (54.9)
No; N (%)	45 (44.1)
Median OS, mo (IQR)	16.6 (14.6)

AA – abiraterone acetate; ADT – androgen deprivation therapy; CRPC – castration-resistant prostate cancer; DTX – docetaxel; IQR – interquartile range; ISUP – International Society of Urological Pathology; PCa – prostate cancer; PFS – progression-free survival; PSA – prostate-specific antigen.

^a High volume was defined as the presence of visceral metastases and/or ≥ 4 bone lesions with ≥ 1 beyond the vertebral bodies and pelvis and/or lymph node metastases above the diaphragm.

RNA expression analysis

Total RNA from prostate tissue was extracted by using mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, TFS) and TRIzol reagent (TFS), from urine – by using miRNeasy Mini Kit (Qiagen), and from blood – by using PAXgene Blood miRNA Kit (PreAnalytiX, QIAGEN/BD Company) and following manufacturers' instructions. RNA quality was evaluated by using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, AT) and stored at -80 °C temperature until use.

Extracted RNA was reverse transcribed into cDNA using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI, TFS), while for AR transcript expression analysis in tissue Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (TFS) was used, and SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™

Taq DNA Polymerase (Invitrogen, TFS) was applied for AR transcript analysis in blood. In all cases, manufacturers' recommendations were followed.

For the global miRNA expression profiling, total RNA was hybridized onto Human miRNA 8×60 K format microarrays (Agilent Technologies, AT) based on miRBase Release 16.0 by using miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (AT) and by following manufacturer's protocol.

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to evaluate miRNA and AR transcripts expression in tissue and abundance in urine and blood. For miRNA screening and validation, Human MicroRNA A+B TaqMan Low Density Arrays (TLDA) cards Set v.3.0 and Custom made TLDA arrays were used, respectively (ABI, TFS). For the analysis of AR transcripts in prostate tissue, primers were chosen from publications, while Custom TaqMan Gene Expression Assays were used for synthetic gene KLK3-IC and AR transcript variants AR-V1, -V3, and -V7 analysis in blood (ABI, TFS). TaqMan Human MiRNA Assays were used for miR-148a, -365, -375, and -429 abundance evaluation in urine (000470, 001020, 000564, and 001024, respectively (ABI, TFS). In all cases, manufacturers' protocols were followed.

Statistical analysis

Global miRNA expression analysis by microarrays was performed on GeneSpring GX v13.0 (Agilent Technologies) software. For the comparison of two groups, the unpaired t-test was applied. A difference was considered statistically significant when P value was ≤ 0.050 and a fold change (FC) value was ≥ 1.5 . In urine and blood analysis, variation in RNA isolation efficiency was eliminated by scaling all the values to the spike-in control (cel-miR-39 and KLK3-IC, respectively). For gene expression analysis, obtained Ct values were normalized by using the $\Delta\Delta C_t$ method: for miRNA analysis, global normalization was applied, while reference genes were used

for AR transcripts in tissue (*HPRT1*) and in blood (*TBP* and *GUSB*). Values were next adapted to relative quantities and log₂ normalized for the statistical comparisons. Gene expression analysis was performed on GenEx (MultiD analyses). The level of urinary miRNA and AR-FL in blood was dichotomized into high and low according to median value, while the level of AR-Vs – according to the highest Ct value detected in controls. Transcript expression (in the tissue study) and transcript level (in the urine and blood study) between the patients' groups were compared by using the two-sided Student's t-test. Spearman's and Pearson's correlation coefficients was calculated to evaluate correlations by using STATISTICA v.8.0 software. The sensitivity and specificity of diagnostic tests were evaluated using Receiver Operating Characteristic (ROC) curves, and the area under the ROC curve (AUC) was calculated to evaluate how well diagnostic groups are distinguished. To combine biomarkers, logistic regression analysis was applied. The univariate and multivariable Cox proportional hazards regression analysis (with backward variable selection) was used to assess significant predictors of PFS and OS, and hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated by using MedCalc v18.6 software. Kaplan-Meier curves were depicted and the Log-rank (Mantel-Cox) test was applied by using GraphPad Prism v5.3 to support the survival analyses. P value ≤ 0.050 was considered statistically significant. Graphs were depicted with GraphPad Prism v5.3, Online Chart Tool, and Venn Diagram Plotter v1.5.

RESULTS

miRNAs for PCa diagnostics

miRNA expression profile was evaluated in 54 PCa specimens (42 cancerous and 12 noncancerous) [Stuopelyte et al., 2016a]. Out of 754 available miRNAs, 412 (54.6%) met the preanalysis criteria and were included in the main statistical analysis. After comparing cancerous and noncancerous prostate specimens, the expression of 113 miRNAs was significantly ($P<0.05$) deregulated: 55 miRNAs were upregulated and 58 downregulated. Dozens of deregulated miRNAs were detected when miRNA expression was compared between groups, distributed according to clinical-pathological PCa characteristics: BCR, pathological tumor stage and differentiation, *TMPRSS2-ERG (T-E)* fusion transcript status, diagnostic PSA, and, surgical margins).

Eighteen miRNAs were selected for validation in 62 PCa specimens (52 cancerous and 12 noncancerous). Eleven were significantly deregulated in cancerous *vs.* noncancerous tissues: the expression of miR-93*, 183*, -92a, -106b, -19b, -19a-, 148a, -375, -17, and -340 was upregulated and miR-31 – downregulated. Additionally, 7 miRNAs were added from mentioned clinical-pathological comparisons: miR-365 and miR-505* were associated with BCR, while let-7b, miR-20a, -21, -195, and -429 – with *T-E* fusion transcript.

After validation step, as well as in previous step, the expression of miR-148a, -375, and -19a was significantly increased in cancerous prostate specimens *vs.* noncancerous ($P=0.027$, $P=0.015$, and $P=0.024$, respectively). Out of clinical-pathological characteristics, miR-429 was upregulated in *T-E* positive tumors ($P=0.008$), miR-505* in BCR cases ($P=0.048$), as well as miR-429 ($P<0.001$), -31 ($P=0.005$), -365 ($P=0.007$), and let-7 ($P=0.022$) in well differentiated tumors ($G\leq(3+4)$ and $G\leq 6$). Also miR-429 negatively correlated with PSA concentration in serum (Pearson $r = -0.6$, $P<0.0001$).

miR-148a, -365, -375, and -429 were selected for the analysis in 300 urine samples, collected from 215 PCa cases and 85 controls (BPH and AC). After comparing miRNA level in PCa1 (N = 143) *vs.* BPH (N = 23) urine, miR-375 level was statistically significant higher in urine collected from PCa patients ($P < 0.001$; FC 2.4), while the level of miR-148a was markedly lower ($P < 0.001$; FC -2.0). In PCa2 (N = 72) *vs.* AC (N = 62) comparison, analogical associations were detected for miR-148a and miR-375 and additionally urinary miR-365 level was found to be lower in PCa ($P < 0.001$; FC -1.6). In joint analysis of these two independent cohorts and controls (PCa1+2, N = 215 *vs.* BPH+AC, N = 85), the level of miR-375 remained higher, while miR-148a and miR-365 – lower in PCa urine ($P < 0.001$; FC 1.7, FC -1.7, and FC -1.2, respectively).

The diagnostic potential of miR-148a and miR-375 was evaluated by ROC analysis in abovementioned respective cohorts and controls. In PCa1 *vs.* BPH comparison, AUC values for miR-148a and miR-375 were 0.78 and 0.82, respectively (Fig. 1A and B), while in PCa2 *vs.* AC comparison AUC values for these miRNAs respectively were 0.68 and 0.80 (Fig. 1D and E). However, the highest diagnostic values were found for combinations of urinary miRNAs and reached 0.79 and 0.84, respectively (Fig. 1C and F).

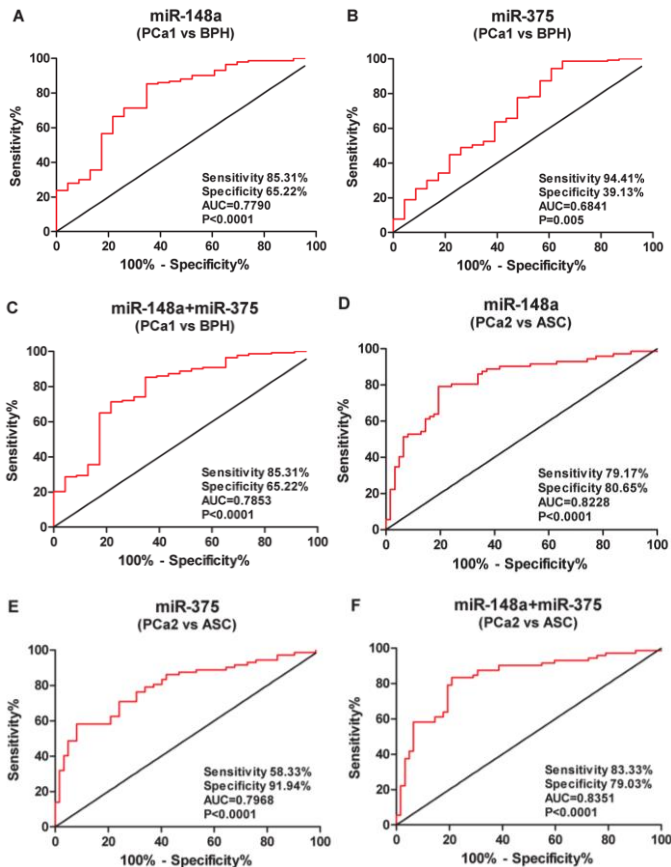


Fig. 1. ROC curve analysis of prostate cancer (PCa) biomarkers. Urinary miR-148a (A), miR-375 (B), and combination of them (C) in cohort PCa1 and in cohort PCa2 (D-F).

The diagnostic value of urinary miR-148a and miR-375 was compared to PSA test, and all miRNA characteristics were better (e.g., AU= 0.78, 0.68, and 0.51, respectively). Combining urinary miRNAs with PSA markedly improved the sensitivity (84 vs. 64%), specificity (76 vs. 52%) and AUC value of PSA (AUC=0.85 vs. 0.51) (Fig. 2A and B). The diagnostic potential was also evaluated in a “grey zone” of PSA (when serum PSA concentration is 4-10 ng/mL),

and the sensitivity, specificity and AUC reached 84%, 82 %, and 0.90, respectively (Fig. 2D).

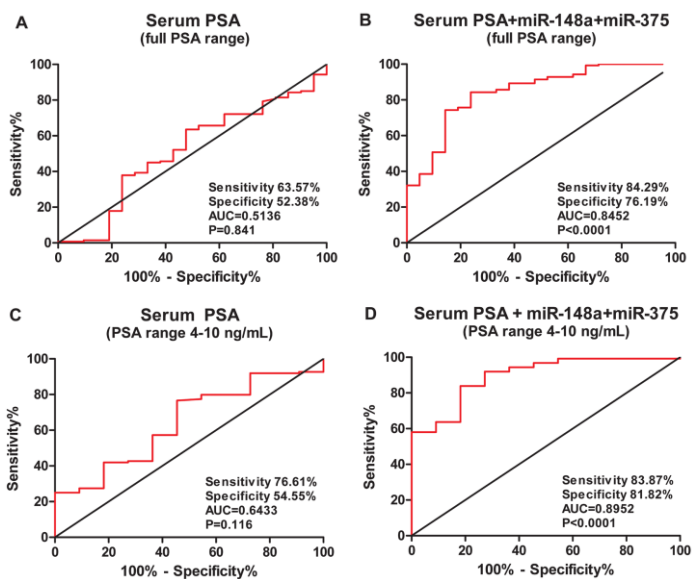


Fig. 2. ROC curve analysis of urinary miRNAs in prostate cancer (PCa) and prostate specific antigen (PSA). (A) Serum PSA and (B) combination of urinary miRNAs with PSA in (C) all PSA range and (D) in “grey zone” of PSA (4-10 ng/mL) only. Analyses were carried out in the PCA1.

In our study, several PCa-specific miRNAs were successfully detected in the urine of PCa patients and showed different abundance when compared with urine from ASCs and BPH patients. This reveals suitability of some urinary miRNAs for noninvasive and specific detection of PCa, even at the early stages of the disease. Moreover, our study indicates that combined analysis of urinary miR-375 and miR-148a can significantly improve the specificity and sensitivity of the PSA test, especially in men who fall in the intermediate PSA range of 4–10 ng/mL.

miRNAs for prognostics of biochemical recurrent disease

For the evaluation of prognostic potential in urine study, three highly expressed and PCa-specific miRNAs (miR-19a, -19b and -21) were selected from our microarray analysis and published data [Stuopelyte et al., 2016b].

miR-19a/19b and miR-21 were analyzed in catheterized urine collected from 143 PCa and 23 BPH patients during the radical prostatectomy. The level of miR-21 was found to be 1.5-fold higher in BPH cases ($P=0.010$). The combination of all miRNAs had the highest diagnostic potential ($AUC=0.738$, Fig. 3E) and improved the diagnostic value of PSA test ($AUC=0.514$ vs. 0.738 , Fig. 3F).

Kaplan-Meier survival analysis showed that lower level of urinary miR-19b ($P=0.014$, Fig. 3A) or a combination of lower level of miR-19b and higher level of miR-19a ($P=0.016$, Fig. 3B) is associated with shorter time to biochemical recurrence after radical prostatectomy.

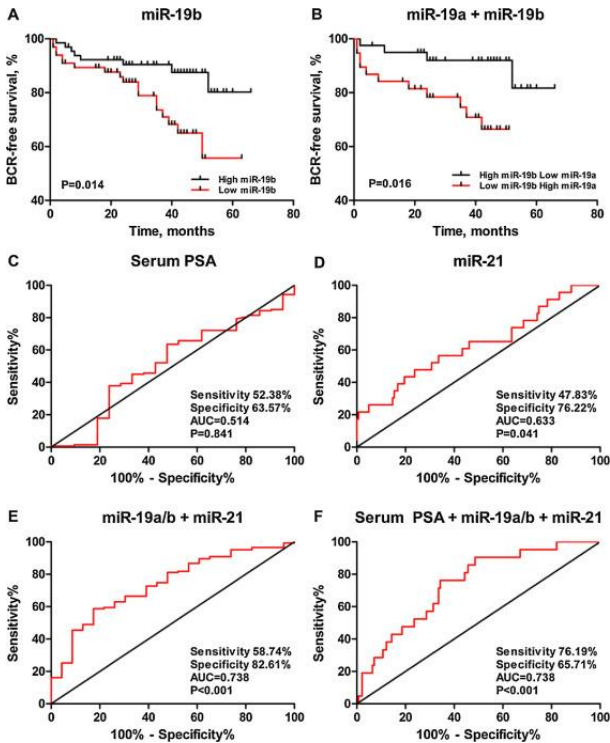


Fig. 3. Prognostic and diagnostic value of urinary miRNAs. Kaplan-Meier analysis of BCR-free survival predicted by miR-19b (A) and combined analysis of miR-19a/b (B). Receiver operating characteristic (ROC) curves show sensitivity and specificity of serum PSA (C), urine circulating miR-21 (D), combination of miR-19a/b and miR-21 (E), and all urinary miRNAs combined with PSA (F). AUC, area under the ROC curve.

In summary, miRNA expression profile markedly differs between PCa groups stratified according to clinical variables. Some miRNAs highly expressed in PCa tissues can also be detected in urine. The panel of urinary miR-21, miR-19b, and miR-19a shows a potential to serve as a tool for non-invasive diagnostics of PCa and prediction of the disease relapse. Although this panel of urinary miRNA could improve the overall diagnostic value of the PSA test, the specificity of such combined test remains quite low.

miRNAs for the response to treatment prediction

miR-148a, -365, -375, and -429 were analyzed in 51 urine samples collected from 22 CRPC patients before (AA-0) and during the treatment with AA (AA-1/2) (Stuopelyte et al., manuscript). The level of miRNAs was compared between CRPC, two cohorts of indolent PCa (PCa1 and PCa2) and controls (BPH and AC) that were described earlier. The level of urinary miRNAs differed significantly between CRPC, indolent PCa and controls ($P < 0.05$). The combination of miR-375 and miR-429 was the most CRPC-specific and had the highest diagnostic value ($P < 0.01$).

In survival analyses, continuous and median-dichotomized miRNA values were used. In Kaplan-Meier analysis, higher level of miR-365 and miR-429 and lower level of miR-148a and miR-375 was associated with shorter PFS, but the statistically significant difference was detected for miR-148a only (4.6 vs. 7.5 mo, $P=0.019$). When analyzed in combinations, the significant associations was found for a lower level of miR-148a and miR-375 and when the level of miR-148a and miR-429 was opposite. No variable was associated with PFS in univariate Cox proportional hazards regression analysis, while in multivariate analysis miR-148a was confirmed as the independent predictor for PFS ($P=0.034$).

In OS analysis, similar associations as in PFS were found, miR-148a and miR-375 was associated with a shorter survival – when both ($P=0.033$) or either ($P=0.035$) of these miRNAs were found at low level. In multivariate analysis, the combination of miR-148a and miR-375 had the highest prognostic value, but the model's statistical significance was borderline ($P=0.060$).

In summary, this pilot study presents preliminary data on predictive value of urine circulating miR-148a, -365, -375, and -429. Combinations of urinary miRNAs might be used as a tool to predict progression-free and overall survival in AA-treated CRPC patients,

but further prospective studies are needed to confirm findings in larger cohorts.

AR-Vs for the response to treatment prediction

AR-FL and AR-V were analyzed in 102 CRPC patients before (AA-0, N=102) and during (AA-1/2, N=83) AA treatment as well as from 14 age-matched healthy controls [Stuopelyte et al., 2020]. AR-FL was detected in all blood samples (N=185) whereas AR-V1, -V3, -V7, and at least one AR-V was detected in 17%, 55%, 65%, and 81% of CRPC blood samples. The level of AR-V was dichotomized into high and low according to the highest level detected in controls, and high level of at least one AR-V was found in 44 % of blood samples.

Out of 98 cases with an available follow-up, the response to treatment was short and medium (< 8 mo) for a half of patients (49/98). The lowest level of all AR transcripts was found in patients with extended response (>8 mo), in compare to which the level of AR-V1 was 10-fold higher in medium (P=0.023) and >40-fold (P<0.001) in short response group.

In univariate and multivariate Cox proportional hazards regression analysis for progression-free survival (Table 3), AR-FL was associated with shorter PFS. Kaplan-Meier analysis confirmed the detected associations between AR-FL (Fig. 4A), AR-V1 (Fig. 4B) and PFS. PFS was also shorter for the cases that had any AR transcript at higher level (Fig. 4E) and for those who had a combination of higher AR-FL and any AR-V (Fig. 4F-H). However, the highest prognostic value was retained by the combination of AR-FL and AR-V1 (6.6 vs. 19.9 mo; P < 0.0001; HR 3.0, 95 % CI 1.7-5.1) (Fig. 4F).

Table 3. Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression analyses for progression-free and overall survival.

PROGRESSION-FREE SURVIVAL									
Covariate		Univariate analysis		Multivariate analyses (backward)					
				Separately		Altogether			
		HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value		
Cont.	AR-FL	1.46 (1.12–1.90)	0.006	1.41 (1.08–1.86)	0.012	1.55 (1.07–2.23)	0.020		
	AR-V1	1.05 (1.01–1.08)	0.022	1.04 (1.00–1.08)	0.053				
	AR-V3	1.00 (0.97–1.03)	0.950						
	AR-V7	1.01 (0.97–1.04)	0.752						
Dichot.	AR-FL	2.37 (1.37–4.09)	0.002	2.37 (1.37–4.09)	0.002				
	AR-V1	1.37 (0.99–1.92)	0.062						
	AR-V3	1.46 (0.66–3.23)	0.351						
	AR-V7	1.06 (0.59–1.91)	0.838						
Clinico-pathological	PSA prior AA (cont., ng/mL)	1.00 (1.00–1.00)	0.033			1.83 (0.95–3.53)	0.072		
	ISUP grade group (≤ 3 vs ≥ 4)	2.05 (1.11–3.77)	0.022						
	Metastasis prior AA treatment (yes/no):								
	Bone	1.90 (0.86–4.19)	0.115						
	Visceral	1.76 (0.75–4.12)	0.194						
	Regional lymph nodes	0.83 (0.46–1.51)	0.553						
	Non-regional lymph nodes	0.72 (0.36–1.43)	0.355						
	Volume of metastases (h/l)	1.39 (0.80–2.41)	0.244						
	Radical treatment (yes/no)	0.81 (0.47–1.38)	0.437						
	Positive response to ADT (mo.)	0.99 (0.99–1.00)	0.121					1.00 (1.00–1.00)	0.012
	AA for 2 nd line treatment after DTX (yes/no)	1.80 (0.93–3.50)	0.083					2.94 (1.48–5.84)	0.002

Table 3. Continued.

OVERALL SURVIVAL								
Covariate		Univariate analysis		Multivariate analyses (backward)				
		HR (95% CI)	P-value	Separately		Altogether		
				HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value	
Cont.	AR-FL	1.58 (1.22–2.04)	< 0.001	1.58 (1.22–2.05)	< 0.001	2.27 (1.21–4.24)	0.011	
	AR-V1	1.04 (1.01–1.08)	0.016	1.04 (1.00–1.08)	0.016			
	AR-V3	1.04 (1.01–1.07)	0.011					
	AR-V	1.02 (0.99–1.05)	0.256					
Dichot.	AR-FL	2.82 (1.61–4.94)	< 0.001	2.74 (1.56–4.80)	< 0.001	1.00 (1.00–1.00)	0.004	
	AR-V1	1.40 (1.04–1.90)	0.028	1.35 (1.00–1.83)	0.053			
	AR-V3	2.61 (1.40–4.88)	0.003					
	AR-V7	1.50 (0.86–2.63)	0.157					
Clinico-pathological	PSA prior AA (ng/mL)	1.00 (1.00–1.00)	< 0.001	1.00 (1.00–1.00)	< 0.0001	0.56 (0.30–1.05)	0.074	
	ISUP grade group (≤ 3 vs. ≥ 4)	1.89 (1.08–3.31)	0.027					
	Metastasis prior AA treatment (yes/no):							
	Bone	2.27 (0.91–5.68)	0.080					
	Visceral	1.43 (0.65–3.14)	0.381					
	Regional lymph nodes	1.20 (0.68–2.09)	0.531					
	Non-regional lymph nodes	0.74 (0.37–1.46)	0.389					
	Volume of metastases (h/l)	1.57 (0.89–2.77)	0.125					
	Radical treatment (yes/no)	0.48 (0.27–0.85)	0.013					
	Positive response to ADT (mo.)	1.00 (0.99–1.00)	0.210					
AA for 2 nd line treatment after DTX (yes/no)	1.00 (0.47–2.12)	0.996						

AA – abiraterone acetate; ADT – androgen deprivation therapy; AR-FL – full length androgen receptor; AR-V – AR variant; cont. – continuous variable, not categorized into high/low; dichot. – dichotomous variable, categorized into high/low; DTX – docetaxel; h/l – high/low; HR – hazard ratio; ISUP – International Society of Urological Pathology. Bold values denote statistical significance at the $P \leq 0.050$ level.

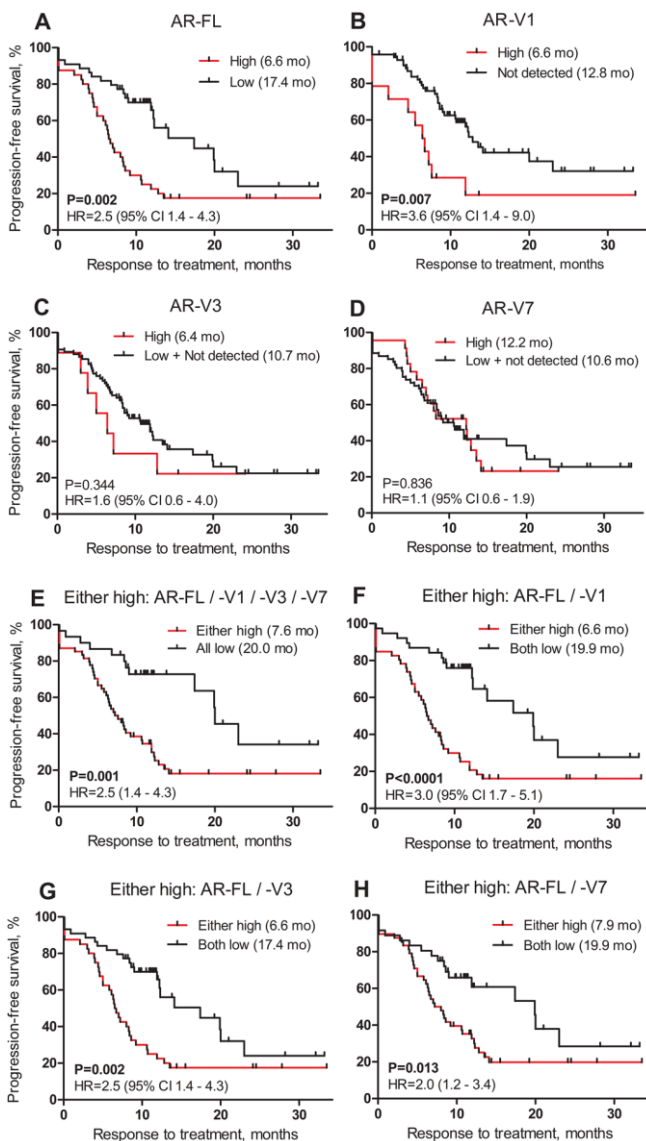


Fig. 4. Progression-free survival according to full length androgen receptor (AR-FL) (A), AR variants AR-V1 (B), -V3 (C), -V7 (D), and their combinations (E-H) in blood samples, collected from castration resistant prostate cancer patients before the treatment with abiraterone acetate.

In univariate Cox analysis for OS (Table 3), all AR transcripts apart for AR-V7 were associated with shorter OS. In multivariate analysis, AR-FL and AR-V1 were independent predictors for OS. Kaplan-Meier analysis confirmed the detected associations of individual AR-FL (Fig. 5A), AR-V1 (Fig. 5B), and AR-V3 (Fig. 5C). However, more significant associations were detected when AR transcripts were analyzed in combinations (Fig. 5E-H), from which, similarly as in PFS analysis, the combination of AR-FL and AR-V1 had the strongest prognostic value (13.2 mo *vs.* not reached; $P < 0.0001$; HR 3.7, 95 % CI 2.2-6.2) (Fig. 5F).

This is the first report of a thorough analysis of full-length AR and AR-V1, -V3, and -V7 in prostate tissues and whole blood from prospectively collected CRPC cases treated with AA. The data suggests that AR transcripts can be used for patients' selection for AA treatment, and the whole blood-based assay might be more technically eligible and acceptable for AR-Vs detection in clinical settings.

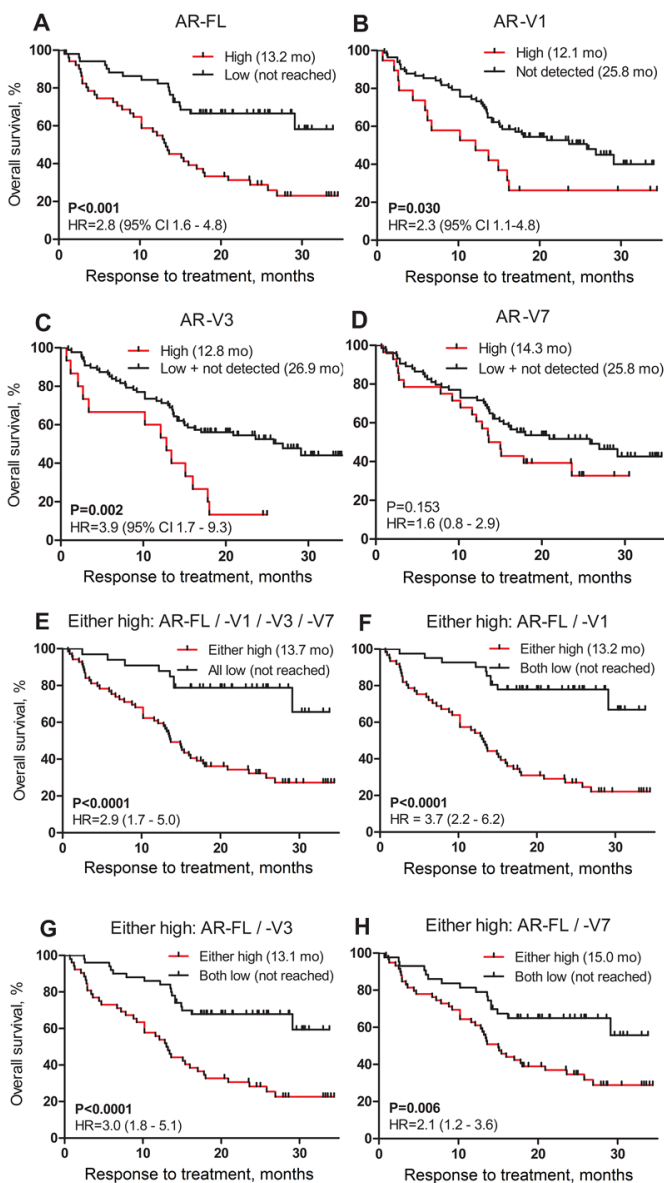


Fig. 5. Overall survival according to full length androgen receptor (AR-FL) (A), AR variants AR-V1 (B), -V3 (C), -V7 (D), and their combinations (E-H) in blood samples, collected from castration resistant prostate cancer patients before the treatment with abiraterone acetate.

CONCLUSIONS

1. The expression of miR-375 and miR-148a is upregulated in PCa tissues ($P = 0.015$ and $P = 0.027$, respectively), while miR-429 – in *TMPRSS2-ERG* expressing tumors ($P = 0.008$). Also the expression of miR-429 ($P < 0.001$) and miR-365 ($P = 0.007$) is increased in well-differentiated tumors ($G \leq (3+4)$ and $G \leq 6$).
2. The level of miR-375 is statistically significantly higher and miR-148a – lower in urine of PCa patients in compare to urine collected from BPH and AC controls ($P < 0.001$). The diagnostic value of miR-148a and miR-375 combination is higher than individual miRNAs and outperforms the diagnostic value of PSA test ($AUC = 0.85$ vs. 0.51), especially when PSA concentration is 4-10 ng/mL ($AUC = 0.90$).
3. The diagnostic value of combined miR-19a/19b and miR-21 is higher than individual miRNA analysis and outperforms PSA test ($AUC = 0.74$ vs. 0.51). Lower level of miR-19b alone and the combination of lower level of miR-19b and higher level of miR-19a in urine predicts shorter biochemical progression ($P = 0.014$ and $P = 0.016$, respectively) in PCa.
4. The level of miR-148a, -365, -375, and -429 differs significantly in urine collected from CRPC, local PCa and controls ($P < 0.05$), and the combination of miR-375 and miR-429 is more specific for CRPC in compare to individual miRNA analysis ($P < 0.01$). Lower level of urinary miR-148a is associated with shorter PFS for AA treated patients, while OS is impacted by the level of both or any of miR-148a and miR-375 ($P = 0.033$ and $P = 0.035$, respectively).
5. The expression of AR-V1 and AR-V7 is significantly higher in cancerous prostatic specimens ($P = 0.025$ and $P = 0.027$, respectively), whereas AR-V7 is upregulated in cases who experienced biochemical progression ($P = 0.010$) and predicts

shorter PFS after radical prostatectomy (61 mo *vs.* not reached, $P = 0.050$).

6. AR-FL was detected in all 185 blood samples, while at least one AR-V – in 81 % CRPC blood samples. Higher level of AR-FL and AR-V1 in CRPC blood is independent predictor for shorter PFS ($P < 0.0001$; HR 3.0, 95 % CI 1.7-5.1) and OS ($P < 0.0001$; HR 3.7, 95 % CI 2.2-6.2).

SUMMARY IN LITHUANIAN

Prostatos vėžys (PV) – dažniausias vyrų onkologinis susirgimas Lietuvoje ir pasaulyje, ypač vakarų šalyse [Bray ir kt., 2018; Ferlay ir kt., 2019]. Nors vyresnio amžiaus ir rizikos grupėms priklausantiems asmenims atliekami prostatai specifinio antigeno (PSA) tyrimai, diegiami naujos kartos diagnostiniai testai, tačiau PV vis tiek išlieka pirmoje vietoje pagal vyresnio amžiaus vyrų sergamumą ir mirtingumą. Šiuo metu PV diagnostikai taikomi metodai, tokie kaip PSA koncentracijos kraujyje matavimas, digitalinis rektalinis tyrimas, sisteminė biopsija ir kt., yra gana jautrūs, tačiau nepakankamai specifiški – nustatoma daug klaidingai teigiamų atvejų, pvz., hiperplazijų. Nors lokalaus PV gydymas yra gana efektyvus, o agresyvus ligos vystymasis būdingas mažesnei daliai ligonių, tokie PV atvejai laikomi kliniškai reikšmingais, nes jiems būdinga bloga ligos prognozė ir trumpesnis išgyvenamumas. Kastracijai atspari prostatos vėžio (KAPV) forma kol kas tebėra nepagydoma ir yra pagrindinė mirties nuo PV priežastis. Per pastarąjį dešimtmetį KAPV sergančių ligonių išgyvenamumą ir gyvenimo kokybę pagerino nauji vaistai [Berg ir kt., 2017]: nauji taksanų grupės preparatai (docetakselis, kabazitakselis), radionuklidas Ra-223, imonoterapinis vaistas sipuleucelis-T ir naujos kartos antiandrogenai, tokie kaip androgenų receptoriaus inhibitoriai enzalutamidas ir apalutamidas bei androgenų sintezę slopinantis abiraterono acetatas [Nuhn ir kt., 2019]. Tačiau dėl heterogeniškos KAPV prigimties apie 20–40 % ligonių iškart pasireiškia pirminis atsparumas šiems naujiems vaistams [de Bono ir kt., 2011; Ryan ir kt., 2013].

Vystantis vėžiui pakinta visi ląstelėje vykstantys procesai, tarp jų ir genų raiškos bei miRNR raiškos reguliavimas. miRNR yra trumpos, nekoduojančios, apie 22 nt ilgio RNR, atliekančios svarbų vaidmenį daugumos eukariotų fiziologiniuose procesuose. Priklausomai nuo miRNR reguliacinio regiono komplementarumo taikiniui, genų raiška tildoma dviem pagrindiniais būdais: ribojama

transliacija arba skaldomas transkriptas [Willard ir Koochekpour, 2012]. miRNR vykdoma genų raiškos reguliacija svarbi visiems ląstelėje vykstantiems procesams, o nukrypimai lemia širdies, nervų sistemos vystymosi, uždegiminių, autoimuninių ligų, vėžio, įskaitant PV, vystymąsi [Naeini ir Ardekani, 2009]. Vėžio tyrimuose seniai žinomi tokie terminai, kaip naviko augimą slopinančios ir skatinančios miRNR, tačiau dėl miRNR konteksto svarbos (audinio, organo, stadijos ir kt.) vienareikšmiškas miRNR skirstymas nėra galimas [Tong ir Nemunaitis, 2008]. Gausėjant tyrimams ir juos apibendrinant, nustatyta, kad miRNR raiškos profilis skiriasi ne tik tarp sveiko ir navikinio audinio, bet ir tarp skirtingų vėžio tipų, subtipų [Naeini ir Ardekani, 2009; Di Leva ir Croce, 2013; Silva-Sanos ir kt. 2014]. Remiantis miRNR raiška, galima atskirti ankstyvos ir vėlesnės stadijos vėžį bei agresyvias jo formas [Brase ir kt., 2011; Shen ir kt., 2012]. PV atvejus palyginus su nenavikiniais audiniais, nustatomas savitas miRNR raiškos profilis, kuris kinta ligai vystantis. Svarbiu atradimu tapo miRNR nustatymas kūno skysčiuose, t. y kraujyje [Selth ir kt., 2012; Cheng ir kt., 2013; Huang ir kt., 2015], šlapime [Corcoran ir kt., 2014], sėkliniame skystyje [Guzel ir kt., 2015] ir kt.. Šlapimas dažniausiai renkamas visiškai neinvaziniu būdu, todėl šlapimo miRNR gali tapti jautriais, mažai invaziniais PV diagnostiniais, prognostiniais ir prediktyviniais žymenimis [Balacescu ir kt., 2017], tačiau kol kas nėra paskelbtų KAPV ligonių šlapime atliktų miRNR tyrimų.

Tyrimai rodo, kad androgenų receptoriaus (AR) atsako kelias išlieka aktyvus KAPV ir turi didelę reikšmę jo vystymuisi ir progresijai. Viena iš aktyvinimo priežasčių galėtų būti AR geno transkriptų variantai (AR-V), kurie neturi ligando prisijungimo domeno ir yra visada aktyvūs. Nuo pat atradimo AR-V buvo susieti su pirminiu ir įgytu atsparumu prieš AR nukreiptiems vaistams [Dehm ir kt., 2008; Guo ir kt., 2009; Hu ir kt., 2009; Sun ir kt., 2010]. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 20 AR-V [Paliouras ir kt., 2016], iš kurių dėl plačiausio paplitimo labiausiai ištyrinėtas yra tik AR-V7 [Scher ir kt., 2017]. AR-V7 nustačius skysčių biopsijoje,

reikšmingai išaugo klinikinių tyrimų ir komerciškai prieinamų testų skaičius, tačiau gilesniam KAPV kancerogenezės ir heterogeniškumo supratimui kol kas trūksta platesnės apimties ir išsamesnių AR-V tyrimų [Antonarakis ir kt., 2014; Steinestel ir kt., 2015; Antonarakis ir kt., 2017].

Darbo tikslas – atrinkti prostatos vėžiui specifines miRNR ir androgenų receptoriaus variantus tyrimui šlapime ir kraujyje bei įvertinti jų diagnostinę, prognostinę vertę ir tinkamumą atsako į gydymą vertinimui.

Uždaviniai:

1. Ištirti visuminės miRNR raiškos profilį navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos audiniuose, atsirinktus taikinius validuoti didesnėje mėginių imtyje ir įvertinti sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais.
2. Ištirti atrinktas miRNR (miR-148a, -365, -375 ir -429) prostatos vėžiu (PV), gerybine prostatos hiperplazija (GPH) sergančių ir asimptomatinių asmenų (AK) šlapime ir įvertinti šių miRNR diagnostinį potencialą.
3. Ištirti atrinktas miRNR (miR-19a/19b, -21) PV ir GPH sergančių ligonių šlapime bei įvertinti šių miRNR diagnostinį ir prognostinį potencialą.
4. Ištirti atrinktas miRNR (miR-148a, -365, -375 ir -429) kastracijai atspariu PV (KAPV) sergančių ligonių šlapime, palyginti su neagresyvaus PV ir kontrolinių asmenų duomenimis ir įvertinti šių miRNR prognostinį potencialą bei tinkamumą atsako į gydymo abiraterono acetatu vertinimui.
5. Ištirti androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V: AR-V1, -V3 ir -V7) raišką navikiniuose ir nenavikiniuose prostatos audiniuose ir įvertinti sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei prognostinį potencialą.

6. Ištirti AR-FL ir AR-V transkriptų kiekį KAPV sergančių ligonių kraujyje ir įvertinti AR transkriptų prognostinį potencialą.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Šiame tyrime pirmą kartą Lietuvoje visuminė miRNR raiška buvo įvertinta prostatos audiniuose ir nustatyta keletas dešimčių navikiniame audinyje pakitusios raiškos miRNR. Išanalizavus sąsajas su klinikiniais rodikliais, atrinktos reikšmingiausiai besiskiriančios raiškos miRNR ir pritaikytos tyrimams didelėje PV ligonių ir kontrolinių asmenų imtyje. Tyrimas parodė, kad miRNR analizė neinvaziniu būdu surinktuose šlapimo mėginiuose leistų specifiskai diagnozuoti PV ankstyvoje stadijoje ir prognozuoti biocheminį ligos atkrytį. Kol kas trūksta jautrių ir specifinių biožymenų, kuriais remiantis būtų galima atskirti kliniškai reikšmingus agresyvios eigos vėžio atvejus ir išvengti nereikalingo gydymo. Taigi su PV klinikiniais-patologiniais rodikliais koreliuojančios ir už PSA testą specifiskiau veikiančios šlapimo miRNR galėtų būti pritaikytos PV diagnostikoje.

Atrinktos specifiskiausios prostatos vėžiui miRNR pirmą kartą pasaulyje buvo ištirtos ir kastracijai atsparių prostatos vėžiu (KAPV) sergančių ligonių šlapime. Pakitęs miRNR kiekis, nustatytas prieš gydymą abiraterono acetatu (AA) surinktuose šlapimo mėginiuose, buvo susietas su trumpesniu išgyvenamumu be progresijos (PFS) ir bendruoju išgyvenamumu (OS). KAPV yra nepagydoma liga, todėl vaistais gebama tik prailginti išgyvenamumą. Ilgainiui visi ligoniai tampa atsparūs gaunamam preparatui, o didelei daliai ligonių pasireiškia ir pirminis atsparumas, dėl to labai svarbu parinkti konkrečių atveju tinkamiausią gydymą ir tikslinti gydymo schemas.

Šiame tyrime androgenų receptoriaus (AR-FL) ir AR variantų (AR-V) raiška buvo įvertinta Lietuvos KAPV ligonių prostatos audiniuose. Nustačius reikšmingas sąsajas su agresyvesne ligos eiga, AR transkriptai buvo tiriami KAPV ligonių kraujyje, paimtame prieš AA gydymą ir AA gydymo metu. Pirmą kartą pasaulyje buvo ištirti

viso kraujo AR-V1 ir AR-V3, o didesnis transkriptų kiekis buvo susietas su trumpesniu išgyvenamumu be progresijos ir bendroju išgyvenamumu. AR atsako kelias ne tik išlieka aktyvus vystantis KAPV, bet vaidina pagrindinį vaidmenį. AR-V ištyrimas ligonių kraujyje yra naudingas gilinant suvokimą apie KAPV heterogeniškumą, biologinio atsparumo mechanizmų vystymąsi ir gali padėti tinkamiau parinkti esamus ir kurti naujus vaistus.

Ginami teiginiai

1. miR-148a, -365, -375 ir -429 yra PV specifinės ir/ar reikšmingai siejasi su PV klinikiniais-patologiniais rodikliais, todėl galėtų būti panaudotos PV diagnozės patikslinimui.
2. Šlapime nustatomų miR-148a ir miR-375 derinys yra jautrus molekulinis įrankis neinvazinei PV diagnostikai, o miR-19b ir miR-19a/b derinys specifiskai prognozuoja biocheminę ligos progresiją.
3. Šlapime nustatomų miR-375 ir -429 derinys specifiskai atskiria KAPV nuo PV ir kontrolinių tiriamųjų grupių.
4. Abiraterono acetatu (AA) gydomiems ligoniams šlapime nustatoma miR-148 prognozuoja išgyvenamumą be progresijos, o miR-148a ir miR-375 derinys – bendrąjį išgyvenamumą.
5. Didesnė AR-V1 ir -V7 raiška navikiniuose audiniuose būdinga agresyvios eigos PV, be to, AR-V7 raiška prognozuoja biocheminę ligos progresiją po radiklios prostatektomijos.
6. Didesnis KAPV kraujyje nustatytas AR-FL ir -V1 transkriptų kiekis AA gydomų ligonių kraujyje prognozuoja trumpesnę išgyvenamumą be progresijos ir bendrąjį išgyvenamumą.

MĖGINIAI IR METODAI

Ligoniai ir mėginiai

PV ligonių mėginiai miRNR analizei. Prostatos audinių ir šlapimo mėginiai buvo surinkti iš 237 PV ligonių, kuriems buvo atliktas PSA testas, prostatos biopsija ir radikali prostatektomija (RP). Į tyrimą įtraukti ligoniai buvo gydyti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VULSK) Urologijos skyriuje nuo 2008 m. sausio mėn. iki 2014 sausio mėn. Palyginimui šlapimas buvo surinktas iš 23 asmenų, kuriems nustatyta gerybinė prostatos hiperplazija (GPH), ir 62 besimptomų kontrolinių asmenų – PV nesergančių vyrų, kurių serumo PSA koncentracija neviršija 3 ng/mL. Tyrimui buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (2007-11-23 Nr. 50 ir 2011-09-07 Nr. 6B-11-275), o dalyvaujantys tyrime asmenys buvo informuoti apie tyrimo eigą ir pasirašė sutikimą dalyvauti. Šis tyrimas buvo didesnės 2008 m. inicijuotos biožymenų paieškos studijos dalis, tad mėginiai rinkti ir ruošti remiantis standartizuota, anksčiau aprašyta metodika [Sabaliauskaite ir kt., 2012; Daniunaite ir kt., 2014].

Navikiniai (≥ 70 % vėžinių ląstelių, PV+) ir nenavikiniai (0 % vėžinių ląstelių, PV-) audiniai buvo atrinkti po histopatologinės analizės. Buvo vertinami tokie klinikiniai-patologiniai rodikliai kaip biocheminė ligos progresija (BCR), naviko stadija ir diferenciacijos laipsnis, *TMPRSS2-ERG* sulietinio transkripto statusas, diagnostinis PSA, operacinis kraštas.

Biocheminė ligos progresija (BCR) buvo patvirtinta, kai dviem iš eilės matavimais nustatyta $\geq 0,2$ ng/mL ir didėjanti PSA koncentracija kraujyje. Iš 56 PV+ atvejų, duomenys apie ligos eigą (angl. *follow-up*) buvo žinomi 55 atvejams (98,2 %), iš kurių BCR pasireiškė 18 (32,7 %). Sulietinio transkripto *TMPRSS2-ERG* tyrimai atlikti Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje dr. Rasos Sabaliauskaitės ir publikuoti anksčiau [Sabaliauskaite ir kt., 2012; Demidenko ir kt., 2015].

miRNR tyrimui šlapimas buvo surinktas iš dviejų nepriklausomų PV sergančių ligonių ir kontrolinių asmenų imčių:

1. Šlapimas, rinktas kateterizuojant PV ligonių šlapimo pūslę operacijos metu, lygintas su tokiu pat būdu rinktais tiriamųjų, kuriems nustatyta GPH, mėginiais: PV1 (N = 143) vs. GPH (N = 23).
2. Prieš operaciją surinkti šlapimo mėginiai lyginti su rutininiais tyrimams rinktu besimptomų kontrolinių asmenų šlapimu: PV2 (N = 72) vs. AK (N = 62).

PV sergančių ir kontrolinių asmenų šlapimo mėginiai buvo apdoroti vienodai: ~30 mL šlapimo buvo 15 min centrifuguota 1000 rpm 4 °C temperatūroje. Centrifugatas pašalintas, paliekant apie 2 mL skysčio. Nuosėdos du kartus praplautos, resuspenduotos PBS ir laikytos -80 °C temperatūroje.

KAPV ligonių mėginiai miRNR ir AR-V analizei. Kraujo ir šlapimo mėginiai buvo surinkti iš 102 kastracijai atspariu prostatos vėžiu (KAPV) sergančių ligonių 2017 m. vasario - 2018 lapkričio mėn. Abiraterono acetatas (AA) buvo paskirtas kaip pirmos eilės vaistas 88 ligoniams ir 14 ligonių – kaip antros eilės vaistas po docetakselio. Kraujas buvo renkamas į *PAXgene Blood RNA Tubes* mėgintuvėlius prieš pradedant gydymą AA (AA-0) ir ligai progresavus arba dukart kas 6 mėn., jei atsakas į gydymą yra geras. Ligos progresija buvo laikoma, jei buvo patenkinti bent 2 iš 3 kriterijų: biocheminė arba radiologinė ligos progresija ir/arba stebimas bendras klinikinės būklės pablogėjimas. Palyginimui buvo surinktas kraujas iš 14 atitinkamo amžiaus besimptomų kontrolinių asmenų (amžiaus mediana 63,0 m.). Tyrimui buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (Nr. 158200-17-874-411), o ligoniai pasirašė sutikimą dalyvauti.

Buvo vertinami tokie klinikiniai-patologiniai rodikliai kaip serumo PSA prieš gydymą, metastazių buvimas kauluose ir kūno organuose, naviko stadija, diferenciacijos laipsnis, prieš tai taikytas

gydymas (ar taikyta radikali prostatektomija, ADT atsako trukmė, kelintos eilės gydymas AA). Išgyvenamumas be progresijos (PFS) ir bendrasis išgyvenamumas (OS) buvo skaičiuojamas nuo AA gydymo pradžios iki gydytojo patvirtintos ligos progresijos arba mirties nuo bet kokios priežasties. Duomenys apie ligos progresiją buvo žinomi 96,1 % (98/102) ligonių (4 ligonių ligos eiga buvo nežinoma). Pagal PFS trukmę ligoniai buvo suskirstyti į ilgo (> 8 mėn., ER), vidutinio (3-8 mėn., MR) ir trumpo (< 3 mėn., SR) atsako į gydymą grupes.

Metodai

miRNR mikrogardelės. Visuminė miRNR raiška mikrogardelių metodu, hibridizuojant ant *Human microRNA Microarray 8 x 60K* formato mikrogardelių (*Agilent Technologies*), pagamintų pagal duomenų bazės *miRBase 16.0* versiją ir laikantis *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (*Agilent Technologies*) protokolo.

Raiškos analizė. Visuminė RNR iš prostatos audinio išgryninta naudojant *mirVana miRNA Isolation Kit* rinkinį (*Ambion, Thermo Fisher Scientific (TFS)*) ir *TRIzol* reagentą (*TFS*), iš šlapimo ir kraujo – *miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen*) ir *PAXgene Blood miRNA Kit* (*PreAnalytiX, QIAGEN/BD Company*) rinkinius, atitinkamai, laikantis gamintojų rekomendacijų. Išgrynintos RNR koncentracija ir kokybiniai parametrai buvo tikrinti naudojant spektrofotometrą *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*) ir kapiliarinės elektroforezės prietaisą *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*).

Kopijinės DNR (kDNR) sintezė miRNR analizei buvo atlikta naudojant *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems (ABI), TFS*) rinkinį, AR transkriptų raiškos tyrimui prostatos audiniuose – *Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase* (*TFS*), AR transkriptų tyrimui kraujyje – *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen, TFS*) rinkinį, kiekvienu atveju laikantis

gamintojų rekomendacijų. Susintetinta kDNR buvo iškart naudojama tolimesniems etapams arba laikoma -80 °C temperatūroje.

Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės PGR (AT-kPGR) visuminei miRNR raiškos analizei ir miRNR raiškos validavimui buvo atlikta naudojant *Human MicroRNA A+B TLDA cards Set v.3.0* ir pagal užsakymą kurtas TLDA gardeles (*ABI, TFS*). AT-kPGR AR transkriptų raiškos tyrimui buvo atliekama naudojant iš publikacijų parinktus pradmenis, o AR transkriptų (AR-FL, -V1, -V3, V7) kiekio nustatymui kraujyje buvo naudojami pagal užsakymą kurti pradmenų ir zondų mišiniai *Custom TaqMan™ Gene Expression Assays (ABI, TFS)*. miRNR analizė šlapime buvo atlikta naudojant *TaqMan Human MiRNA Assays* pradmenų ir zondų mišinius (000470, 001020, 000564 ir 001024, atitinkamai (*ABI, TFS*)). Visais atvejais buvo laikomasi gamintojo protokolų.

Statistinė analizė. Visuminė miRNR raiškos analizė mikrogardelėmis. miRNR raiškos statistinė analizė atlikta *GeneSpring GX v13.0 (Agilent Technologies)* programine įranga. Statistiniam palyginimui naudotas nepriklausomų imčių t-kriterijaus testas, skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo $\leq 0,050$, o raiškos skirtumas kartais siekė bent 1,5 karto.

Genų raiškos analizė. Genų raiška normalizuota pritaikius $\Delta\Delta C_t$ metodą pagal endogenines kontroles: miRNR audinyje ir šlapime normalizuota pagal visų miRNR raišką (angl. *global*), AR transkriptų raiška audinyje analizuota pagal *HPRT1*, o kraujyje – pagal *TBP* ir *GUSB* referentinių genų raišką. miRNR ir AR transkriptų raiška lyginta taikant nepriklausomų imčių t-kriterijaus testą (arba Stjudento, angl. *t test*) ir naudojant *GenEx 6* programinę įrangą (*MultiD analyses*). Koreliacijos buvo įvertintos naudojant *Spearman* ir *Pearson* koreliacijos koeficientus ir *STATISTICA v.8.0* programinę įrangą.

ROC kreivių analizė. Biožymenų tinkamumas diagnostikai buvo įvertintas atlikus ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizę, kur buvo apskaičiuotas ploto po kreive įvertis AUC

(angl. *area under the ROC curve*). Biožymenys apjungti atlikus regresinę analizę. Analizei naudota *GraphPad Prism v5.3* ir *MedCalc v18.6* programinė įranga.

Išgyvenamumo analizė. Išgyvenamumui be progresijos ir bendrajam išgyvenamumui įtaką darančių pavienių (angl. *univariate*) ir visų rodiklių (angl. *multivariate*) santykinės rizikos įvertinimas buvo atliktas *Cox* regresijos metodu (angl. *Cox proportional hazards regression*), taikant kintamųjų išbraukimo metodą (angl. *backward*). Apskaičiuota santykinė rizika (HR, angl. *hazard ratio*) ir 95 % pasikliautiniai intervalai (CI, angl. *confidence interval*). *Cox* analizė patvirtinta *Kaplan-Meier* išgyvenamumo kreivėmis, kur grupių palyginimui naudotas *Log-rank (Mantel-Cox)* testas. Analizės atliktos *GraphPad Prism v5.3* ir *MedCalc v18.6* programine įranga.

Visam grafiniam vaizdavimui naudota *GraphPad Prism v5.3*, išskyrus skritulinę (*Online Chart Tool*) ir *Venn* diagramą (*Venn Diagram Plotter v1.5*). Visais atvejais skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo $\leq 0,050$.

REZULTATAI

miRNR prostatos vėžio diagnostikai

Visuminė miRNR raiškos analizė buvo atlikta 42 navikiniuose ir 12 nenavikinių prostatos mėginių [Stuopelyte ir kt., 2016a]. Palyginus miRNR raišką navikiniuose ir nenavikiniuose audiniuose, statistiškai reikšmingai ($P < 0,05$) skyrėsi 113 miRNR, iš kurių 55 raiška buvo padidėjusi, o 58 sumažėjusi. Validavimui buvo atrinkta 18 miRNR, iš kurių 11 raiška buvo pakitusi navikiniuose vs. nenavikiniuose audiniuose (miR-93*, 183*, -92a, -106b, -19b, -19a-, 148a, -375, -17 ir -340 buvo padidėjusios, o miR-31 sumažėjusios raiškos), miR-365 ir miR-505* reikšmingai siejosi su biocheminiu ligos atkryčiu, o let-7b, miR-20a, -21, -195 ir -429 – su *TMPRSS2-ERG* sulietiniu transkriptu. Validavimas buvo atliktas didesnėje prostatos audinių imtyje (N = 62: 52 navikiniai ir 12 nenavikiniai

mėginiai). PV audiniuose išaugusi raiška patvirtina miR-148a, -375, ir -19a ($P = 0,027$, $P = 0,015$ ir $P = 0,024$, atitinkamai). Taip pat kaip ir visuminės raiškos tyrime, miR-429 kiekis buvo didesnis ($P = 0,008$) *TMPRSS2-ERG* teigiamuose navikuose. Geresnės diferenciacijos navikuose ($G \leq (3+4)$ ir $G \leq 6$) buvo rasta išaugusi miR-429 ($P < 0,001$) ir -365 ($P = 0,007$) raiška, be to, miR-429 raiška atvirkščiai koreliavo su PSA koncentracija serume (*Pearson* $r = -0,6$, $P < 0,0001$).

miRNR analizei šlapimo nuosėdose buvo atrinktos tik tos miRNR, kurioms ne tik buvo būdinga intensyvi raiška PV audiniuose (miR-148a, -375), bet ir buvo nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos su PV klinikiniais rodikliais (miR-365 ir -429). Iš viso atrinktos miR-148a, miR-365, miR-375 ir miR-429 ištirtos 300 šlapimo mėginių, iš kurių 215 mėginių buvo PV atvejai (PV1 šlapimas kateterizuotas, o PV2 surinktas šlapinantis) ir 85 kontrolinių asmenų mėginiai (GPH kateterizuotas, o AK surinktas šlapinantis). Ir analizuojant atskirose atitinkamose imtyse, ir apjungus, PV ligonių šlapime buvo rastas statistiškai reikšmingai padidėjęs miR-375 kiekis, o miR-148a – sumažėjęs ($P < 0,001$). Didžiausią diagnostinį potencialą turinčių šlapimo miR-148a ir miR-375 jautrumas ir specifiskumas buvo įvertintas atlikus ROC kreivių analizę. Nustatyta, kad PV1 ir PV2 grupėse miR-148a AUC įverčiai yra 0,78 ir 0,82, o miR-375 – 0,68 ir 0,80, atitinkamai. Didžiausia diagnostinė vertė buvo nustatyta šių miRNR deriniui ir PV1 bei PV2 imtyse siekė $AUC = 0,79$ ir 0,84, atitinkamai. Apjungus PSA ir miRNR žymenis, ženkliai padidintas PSA testo jautrumas (84 % vs. 64 %), specifiskumas (76 % vs. 52 %) ir diagnostinė vertė ($AUC = 0,85$ vs. 0,51). PSA diagnostinė vertė padidėjo ir analizuojant atvejus, kai serumo PSA koncentracija buvo 4-10 ng/mL: vadinamojoje PSA „pilkojoje zonoje“ PSA ir miRNR derinio jautrumas, specifiskumas buvo 84 % ir 82 %, atitinkamai, o AUC siekė 0,90.

miRNR biocheminio atkryčio prognozei

Visuminė 1347 miRNR raiškos analizė mikrogardelėmis buvo atlikta 13 PV mėginių, iš kurių 7 atvejams vėliau pasireiškė biocheminė ligos progresija [Stuopelyte ir kt., 2016b]. Tokiu būdu siekta nustatyti agresyvių fenotipą lemiančias miRNR. Palyginus navikus pagal klinikines-patologines charakteristikas, nustatyta keliasdešimt statistiškai reikšmingai besiskiriančių miRNR. Remiantis nustatytais pokyčiais, tyrimui didesnėje mėginių imtyje atrinktos 6 miRNR (miR-95, -206, -623, -885-3p, -1180 ir -3692*), iš kurių dauguma buvo susijusios su biochemine ligos progresija. Tyrimas vykdytas kiekybinės PGR metodu anksčiau aprašytoje 52 navikinių (13 iš jų tirti mikrogardelėmis) ir 12 nenavikinių mėginių imtyje. Kiekybinės PGR metodu buvo aptikta labai žema miR-206, -885-3p ir -3692* raiška, kai tuo tarpu miR-95, -623 ir -1180 raiška prostatos audiniuose buvo didesnė. miRNR raišką palyginus tarp navikinių ir nenavikinių prostatos audinių reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta. Palyginus PV atvejus tarp klinikinių-patologinių PV grupių, išsiskyrė miR-95, kurios raiška buvo didesnė visais agresyvesnę ligą rodančiais atvejais: ribinė reikšmingumo vertė ($P = 0,054$) vėl nustatyta atvejams, kuriems vėliau pasireiškė biocheminė ligos progresija, o reikšmingas padidėjimas rastas aukštesnio diferenciacijos laipsnio ($P = 0,041$) ir sulietinį *TMPRSS2-ERG* transkriptą turinčiuose navikuose ($P = 0,026$).

Kadangi atrinktų miRNR raiška buvo maža, o bandomojo miR-95 tyrimo šlapime metu buvo gauti nespecifiški rezultatai, dėl kurių miR-95 nėra tinkama tyrimui organizmo skysčiuose, tolimesniam tyrimui šlapime iš mikrogardelių analizės ir remiantis publikuotais duomenimis buvo atrinktos 3 didelės raiškos ir su PV vystymuisi siejamos miRNR: miR-19a, -19b ir -21. Palyginus PV specifinių miR-19a/b ir -21 kiekį 143 PV1 ir 23 GPH ligonių šlapime, apie 1,5 karto didesnis miR-21 kiekis buvo rastas GPH atvejuose ($P = 0,010$). Didžiausia diagnostinė vertė buvo būdinga visų miRNR deriniui ($AUC = 0,74$), o miRNR prijungus prie PSA, buvo pagerinta

PSA testo diagnostinė vertė ($AUC = 0,74$ vs. $0,51$). Atlikus *Kaplan-Meier* išgyvenamumo analizę nustatyta, kad ligoniams, kurių šlapime, surinktame operacijos metu, esant mažesniai kiekiui miR-19b ($P = 0,014$) arba mažesniai miR-19b ir didesniai kiekiui miR-19a ($P = 0,016$) biocheminė progresija po radiklios prostatektomijos pasireiškė statistiškai reikšmingai greičiau.

miRNR atsako į gydymą prognozavimui

miR-148a, -365, -375 ir -429 buvo ištirtos 51 šlapimo mėginyje, surinktame iš 22 KAPV sergančių ligonių prieš gydymą abiraterono acetatu (AA-0) ir jo eigoje – ligai progresavus arba 2 kartus kas 6 mėn. (AA-1/2) (Stuopelyte ir kt., rankraštis). Palyginus miRNR kieki KAPV su anksčiau aprašytomis neagresyvos eigos PV1 ir PV2 ir kontrolinių asmenų (GPH ir AK) imtimis, miR-429 kiekis KAPV šlapimo mėginiuose buvo didžiausias iš visų lygintų imčių. Atlikus miR-375, miR-429 ir jų derinio ROC analizę paaiškėjo, kad miR-148a ir miR-375 derinys pralenkia atskirų miRNR diagnostinę vertę. Išgyvenamumo analizė, atlikta su AA-0 mėginiais, atskleidė, kad ligonių, kurių AA-0 mėginiuose buvo nustatytas mažesnis kiekis miR-148a, PFS yra reikšmingai trumpesnis ($4,6$ vs. $7,5$ mėn., $P=0,019$). Atlikus miRNR derinių analizę nustatyta, kad trumpesnis PFS būdingas ligoniams, kurių šlapime yra mažiau miR-148a ir miR-375 bei atvirkščias kiekis miR-148a ir miR-429. Visų rodiklių *Cox* regresijos analizė patvirtino, kad remiantis miR-148a PFS galima nuspėti nepriklausomai nuo kitų kintamųjų. Atlikus OS analizę nustatyta, kad ligoniai, kurių šlapime buvo nustatytas mažesnis kiekis abiejų ar bet kurios iš miR-148a ir miR-375, OS buvo statistiškai reikšmingai trumpesnis. Visų rodiklių *Cox* regresinė analizė taip pat patvirtino, kad remiantis miR-148a ir miR-375 deriniu OS galima nuspėti geriausiai, tačiau modelio statistinė reikšmė buvo ribinė ($P=0,060$).

AR-V atsako į gydymą prognozei

Palyginus AR-FL ir AR variantų (AR-V1, -V3 ir -V7) raišką tarp 100 navikinių ir 12 nenavikinių prostatos audinių, statistiškai reikšmingi skirtumai buvo nustatyti AR-V1 ir AR-V7 atveju [Stuopelyte ir kt., 2020]. Šių transkriptų raiška buvo didesnė ir atvejuose, kuriems vėliau pasireiškė BCR, o aukštesnė AR-V7 raiška patikimai siejosi su trumpesniu išgyvenamumu be BCR.

AR-FL ir AR variantų transkriptų kiekis buvo įvertintas 199 kraujo mėginiuose, surinktuose iš 102 KAPV sergančių ligonių prieš pradėdant gydymą AA (AA-0, N=102) ir jo metu (AA-1/2, N=83) bei iš atitinkancio amžiaus sveikų kontrolinių asmenų (N=14). AR-FL buvo nustatytas visuose KAPV kraujo mėginiuose (N=185), o AR-V1, -V3 ir -V7 buvo aptikti 17 % (N=31), 55 % (N=101) ir 65 % (N=121), atitinkamai. Bent vienas AR-V nustatytas 81 % (149/185) KAPV kraujo mėginių, o didelis bent vieno AR-V transkripto kiekis buvo būdingas 44 % (82/185) KAPV mėginių. Iš 98 ligonių, kuriems atsakas į gydymą buvo žinomas, trumpas ir vidutinis atsakas buvo būdingas lygiai pusei atvejų (PFS < 8,0 mėn., 49/98, 50,0). Palyginus AR-V kiekį tarp skirtingo atsako ligonių, mažiausias AR-V transkriptų kiekis buvo nustatytas atvejams su ilgiausiu atsaku (>8 mėn.), kai tuo tarpu AR-V1 kiekis buvo 10 kartų (P=0,023) didesnis vidutinio ir >40 kartų (P<0,001) – trumpo atsako ligoniams.

Pavienių kintamųjų Cox regresinė analizė parodė, kad didesnis kiekis AR-FL reikšmingai siejasi su trumpesniu PFS (P=0,006). Iš AR-V reikšmingiausia sąsaja buvo nustatyta AR-V1. *Kapan-Meier* išgyvenamumo kreivių analizė patvirtintino didesnio kiekio AR-FL ir AR-V1 kiekio sąsają su trumpesniu PFS. Taip pat trumpesnis išgyvenamumas be progresijos buvo būdingas ir tiems atvejams, kurių kraujyje buvo nustatytas didesnis bet kurio transkripto kiekis arba daugiau AR-FL ir bet kurio iš AR-V transkripto derinys. Visgi didžiausią prognostinę reikšmę turėjo AR-FL ir AR-V1 derinys (6,6 vs. 19,9 mėn.; P < 0,0001; HR 3,0, 95 % CI 1,7-5,1). Atlikus

pavienių kintamųjų analizę OS atveju, visi AR transkriptai, išskyrus AR-V7, statistiškai reikšmingai siejosi su trumpesniu OS. Analizuojant visus kintamuosius kartu, AR-FL ir AR-V1 išliko nepriklausomi kintamieji OS prognozavimui. *Kaplan-Meier* išgyvenamumo kreivių analizė patvirtino atskirai analizuojamų AR-FL, -V1 ir -V3 prognostinę OS vertę, tačiau statistiškai reikšmingesnės sąsajos buvo gautos AR transkriptų deriniams, iš kurių stipriausia, kaip ir PFS atveju, buvo AR-FL ir AR-V1 kombinacija (13,2 mėn. vs. nepasiekta; $P < 0,0001$; HR 3,7, 95 % CI 2,2-6,2).

IŠVADOS

1. miR-375 ir miR-148a raiška yra statistiškai reikšmingai didesnė PV audiniuose ($P = 0,015$ ir $P = 0,027$, atitinkamai), o miR-429 – *TMPRSS2-ERG* teigiamuose navikuose ($P = 0,008$). Geresnės diferenciacijos navikuose ($G \leq (3+4)$ ir $G \leq 6$) nustatyta didesnė miR-429 ir miR-365 raiška ($P < 0,001$ ir $P = 0,007$, atitinkamai).
2. PV ligonių šlapime miR-375 kiekis yra reikšmingai didesnis, o miR-148a mažesnis nei kontrolinių asmenų ($P < 0,001$). miR-148a ir miR-375 derinio diagnostinė vertė yra didesnė nei analizuojant pavienes miRNR ir viršija PSA testo diagnostinę vertę (AUC = 0,85 vs. 0,51) net PSA koncentracijai esant 4-10 ng/mL (AUC = 0,90).
3. miR-19a/19b ir miR-21 derinio diagnostinė vertė yra didesnė nei analizuojant pavienes miRNR ir viršija PSA testo diagnostinę vertę (AUC = 0,74 vs. 0,51). Mažesnis miR-19b kiekis ir mažesnis miR-19b bei didesnis miR-19a kiekis PV ligonių šlapime prognozuoja greitesnę biocheminę progresiją ($P = 0,014$ ir $P = 0,016$, atitinkamai).
4. miR-148a, -365, -375 ir -429 kiekis reikšmingai skiriasi KAPV, lokalaus PV ir kontrolinių asmenų grupių šlapime ($P < 0,05$), o miR-375 ir miR-429 derinys specifiškiau atskiria KAPV ligonius

nei tiriant pavienes miRNR ($P < 0,01$). Trumpesnį išgyvenamumą be progresijos AA gydomiems ligoniams prognozuoja šlapime nustatytas mažesnis kiekis miR-148a, o bendrąjį išgyvenamumą – mažesnis kiekis abiejų arba bet kurios iš miR-148a ir miR-375 ($P = 0,033$ ir $P = 0,035$, atitinkamai).

5. AR-V1 ir AR-V7 raiška yra reikšmingai didesnė navikiniuose nei nenavikiniuose prostatos audiniuose ($P = 0,025$ ir $P = 0,027$, atitinkamai), o aukštesnė AR-V7 raiška progresavusiuose atvejuose ($P = 0,010$) siejasi su trumpesniu išgyvenamumu be biocheminės ligos progresijos (61 mėn. vs. nepasiekta mediana, $P = 0,050$).
6. AR-FL buvo nustatytas visuose 185 kraujo mėginiuose, o bent vienas AR-V – 81 % KAPV kraujo mėginių. Didesnis AR-FL ir AR-V1 transkriptų kiekis KAPV ligonių kraujyje yra nepriklausomas kintamasis, prognozuojantis trumpesnį išgyvenamumą be progresijos (HR 3,0, 95 % CI 1,7–5,1) ir bendrąjį išgyvenamumą (HR 3,7, 95 % CI 2,2–6,2), gydant AA.

LIST OF PUBLICATIONS

Scientific papers published in journals having impact factor (IF) in the Clarivate Analytics Web of Science databases:

1. 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):707–15.
2. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(2):116–24.
3. Stuopelyte K, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Haflidadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, Patel C, Danila DC, Lilja H, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Analysis of AR-FL and AR-V1 in whole blood of patients with castration resistant prostate cancer as a tool for predicting response to abiraterone acetate. *J Urol*. 2020:101097JU00000000000000803.

Scientific paper prepared for submission to journal having impact factor (IF) in the Clarivate Analytics Web of Science databases:

4. Stuopelyte K, Sestokaite A, Bakavicius A, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. A pilot study of urinary miRNAs as predictors of response to AA treatment. *Prepared manuscript*.

PRESENTATIONS AT CONFERENCES

Oral presentations:

- **Stuopelyte K.**, Daniunaite K, Jankevicius F, Jarmalaite S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. 1st COST-Epigenetic Chemical Biology Meeting; Budapest (Hungary), 2015 Sep 28-29.
- **Stuopelyte K.**, Stankevicius V, Daniunaite K, Jankevicius F, Jarmalaite S. miRNA analysis in urine sediments for the detection of prostate cancer. 7th conference of young scientists “Biofuture: natural and life science perspectives“; Vilnius (Lithuania), 2014 Dec 10.

Poster presentations:

- **Stuopelyte K.**, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Hafliadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, Patel C, Danila DC, Lilja H, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. Analysis of AR-FL and AR-V1 in whole blood of patients with castration resistant prostate cancer as a tool for predicting response to abiraterone acetate. The 26th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR); Porto (Portugal), 2019 Oct 10-12. *Thesis published: European Urology Supplements 2019;18(8):e3107. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)33352-4](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)33352-4).*
- **Stuopelyte K.**, Bakavicius A., Sabaliauskaite R., Hafliadóttir B.S., Visakorpi T., Väänänen R.M., Patel C., Danila D.C., Lilja H., Lazutka J.R., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Predicting abiraterone acetate treatment resistance from blood-circulating androgen receptor variants in castration-resistant prostate cancer. 6th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (Baltic19); Tallinn (Estonia), 2019 May 24-25. *Thesis published: European Urology Supplements 2019;18(3):e2429. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)32143-8](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32143-8).*
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Detection of Blood Circulating Androgen Receptor Variants in Castration Resistant Prostate Cancer. The 43rd FEBS 2018 Congress; Prague (Czech Republic), 2018 Jul 7-12. *Thesis published: FEBS Open Bio, 8: P.10-036-Wed. doi:10.1002/2211-5463.12453.*

- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Clinical utility of blood-circulating androgen receptor variants in castrationresistant prostate cancer patients. XVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society conference; Dubingiai (Lithuania) 2018 Jun 26-29.
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Blood-circulating Androgen Receptor Variants as Markers for Progression and Response to Treatment in Prostate Cancer Patients. 5th Baltic Meeting in conjunction with the EAU (Baltic18); Riga (Latvia) 2018 May 25-26 d. *Thesis published: European Urology Supplements 2018;17(5):e2223. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)32630-7](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)32630-7).*
- **Stuopelyte K.**, Sestokaite A., Hafliadottir B.S., Visakorpi T., Ulys A., Jankevicius F., Jarmalaite S. Blood-circulating Androgen Receptor Variants as Markers for Progression and Response to Treatment in Prostate Cancer Patients. COINS2018; Vilnius (Lithuania), 2018 Feb 28-kovo 2. *The first prize in the section of Medicine.*
- Jarmalaite S, Daniunaite K, **Stuopelyte K**, Stankevicius V, Laurinavicius A, Jankevicius F, Lazutka J. MiRNA profile of prostate tumors. 8th scientific conference of Faculty of Natural Sciences “Science in the Faculty of Natural Sciences”; Kairenai (Lithuania), 2014 Oct 3.

Results presented by other researchers:

- Šeštokaite A., **Stuopelytė K.**, Bakavičius A., Ulys A., Jankevičius F., Jarmalaitė S. Urinary miRNA analysis in castration-resistant prostate cancer patients. COINS 2019 – 14th international conference of life sciences; Vilnius (Lietuva), 2019 vasario 26–28 d.
- Hafliadóttir B, **Stuopelyte K**, Lilja H, Visakorpi T. Prostate cancer biomarkers in blood samples. BMT & MED RESEARCH DAY; Tampere (Suomija), 2017 spalio 26 d.
- Stuopelyte K, Daniunaite K, Jankevicius F, Lazutka J, Jarmalaite S. Urinary miRNAs for early detection of prostate cancer. Clinical Epigenetics International Meeting (CLEPSO); Duseldorfas (Vokietija), 2015 kovo 5–6 d.

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo mokslinei vadovei prof. Sonatai Jarmalaitei už galimybę atlikti tyrimus jos vadovaujamoje mokslinėje grupėje, už vertingas pastabas ir paskatinimą, – visa tai augino mane ne tik kaip mokslininkę, bet ir kaip žmogų. Taip pat dėkoju prof. habil. dr. Juozui Rimantui Lazutkai už mokslines ir gyvenimiškas diskusijas. Ačiū Suomijos institutuose dirbantiems mokslininkams, prof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen ir dr. Eevai Kettunen iš Suomijos profesinės sveikatos instituto Helsinkyje ir prof. Tapio Visakorpi bei dr. Benediktai Haflidadóttir iš Prostatos vėžio tyrimų centro Tampereje, kad priėmė stažuotėms ir suteikė vertingų žinių ir praktinių įgūdžių.

Dėkoju Justinai Tverkuvienei ir dr. Kristinai Daniūnaitei už globą pradedant tyrimus Žmogaus genomo tyrimų centre. Atskiras ačiū dr. Rasai Sabaliauskaitei ir Ritai Bandariavičiūtei už mokslines diskusijas, nusidriekiančias už laboratorinių stalų ribų. Dėkoju kolegėms: Raimondai, Agnei, Ievai, Kristinai, Benitai, kurios, kurdamos draugišką atmosferą laboratorijoje, nejučia tapo draugėmis ir realiame gyvenime. Ačiū visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui už draugišką darbo aplinką ir visapusišką palaikymą.

Norėčiau padėkoti visiems NVI ir VULSK gydytojams, medicinos ir aptarnaujančiam personalui, kurie prisidėjo prie vertingų mėginių rinkimo projektinėms veikloms. Ypatingai norėčiau padėkoti prof. dr. Feliksui Jankevičiui už vertingus komentarus ir pastabas, o Arnui Bakavičiui už kruopštų klinikinių duomenų rinkimą. Nuoširdus ačiū projektuose sutikusiems dalyvauti ligoniams ir jų šeimų nariams.

Ačiū Lietuvos mokslo tarybai ir ES struktūrinės paramos fondams už projektų finansavimą, LMT ir VU – už stipendijas, ačiū draugiškoms firmoms, kurios kantriai tiekė netikėtai greitai pasibaigusius reagentus.

Dėkoju mamai, močiutei, draugo šeimai ir draugams, kurie visada mane palaikė ir skatino eiti tolyn. Ir, žinoma, dėkoju būsimam vyrui Simui, kuris jau matė, ką reiškia pasakymas „ir varge“.

CURRICULUM VITAE

Contact information:

Phone: +370 60388060

E-mail: kristina.stuopelyte@gmc.vu.lt

Research area: Biomedical Sciences (biology, genetics)

Current positions:

Junior researcher at National Cancer Institute of Lithuania (NCI), Vilnius, Lithuania;

Teaching assistant at Human Genome Research Center, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University (VU), Vilnius, Lithuania

Education:

2014 – 2018. PhD candidate (Genetics) at VU

2014 – Master of Sci. (Genetics) at VU

2012 – Bachelor of Sci. (Molecular Biology) at VU

Work experience:

2018 – now. Teaching assistant at VU

2019 – now. Junior researcher at NCI Research Center

2016-2019. Biologist at NCI Research Center

2012-2018. Senior specialist at VU

Scientific publications: Published 6 scientific articles in journals having an impact factor in the Clarivate Analytics Web of Science database.

Projects: Participated in four projects as an investigator granted by local and international research funds in the field of cancer research.

Awards: Laureate of the national Student Research Competition in 2012 and 2014 from Research Academy of Lithuania. Winner of Berlin Chemie Best poster presentation at EAU Baltics in 2018 and 2019.

Internships: Trainee at Finnish Institutes: Finnish Institute of Occupational Health in Helsinki, 2015 (prof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen) and Prostate Cancer Research Center in Tampere, 2016 and 2017 (prof. Tapio Visakorpi).

Academic activities and research training: Laboratory class of Oncogenetics course for M. Sc. programme students at VU and Seminars of Functional biology of cell for B. Sc. Programme students at VU. Supervision of two bachelor and one master thesis.

Conferences: Research data was presented by oral or poster presentations in 12 international and national conferences.

Memberships: Participated in COST activity CM1406; a member of Lithuanian Biochemical Society.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 1;35(19):2149–56.
2. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 11;371(11):1028–38.
3. Balacescu O, Petrut B, Tudoran O, Feflea D, Balacescu L, Anghel A, et al. Urinary microRNAs for prostate cancer diagnosis, prognosis, and treatment response: are we there yet? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017 Nov;8(6).
4. Berg KD, Thomsen FB, Mikkelsen MK, Ingimarsdóttir IJ, Hansen RB, Kejs AM, et al. Improved survival for patients with de novo metastatic prostate cancer in the last 20 years. *Eur J Cancer*. 2017 Feb;72:20–27.
5. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011 Feb 1;128(3):608–16.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
7. Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Ché'ry L, Siddiqui J, et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. *PLoS One*. 2013 Jul 30;8(7):e69239.
8. Corcoran C, Rani S, O'Driscoll L. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate*. 2014 Sep;74(13):1320–34.
9. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Petroska D, Laurinavicius A, Lazutka JR, et al. Prognostic value of RASSF1 promoter methylation in prostate cancer. *J Urol*. 2014 Dec;192(6):1849-55.
10. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 26;364(21):1995–2005.
11. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ.. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;68(13):5469-77.

12. 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 Oct 12;15:683. doi: 10.1186/s12885-015-1689-8.
13. Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Feb;23(1):3–11.
14. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
15. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2305–13.
16. Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015 Feb 15;136(4):875–9.
17. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):16–22.
18. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2015 Jan;67(1):33–41.
19. Naeni MM, Ardekani AM. Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna J Med Biotech*. 2009 Jul;1(2):55–70
20. Nuhn P, De Bono JS, Fizazi K, Freedland SJ, Grilli M, Kantoff PW et al. Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. *Eur Urol*. 2019 Jan;75(1):88-99.
21. Paliouras M, Alvarado C, Trifiro M. Redefining Androgen Receptor Function: Clinical Implications in Understanding Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance. In: Mohan R (ed). *Prostate cancer – Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments*. IntechOpen: London, UK, 2016; pp 93–124.
22. Ryan C, Shore ND, Concepcion R. A urologic oncology roundtable discussion: how to choose among the available therapies for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Postgrad Med*. 2013 Nov;125(6):114–6.
23. Sabaliauskaite R, Jarmalaite S, Petroska D, Dasevicius D, Laurinavicius A, Jankevicius F, et al. Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for

- improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Aug;51(8):781–91.
24. Stuopelyte K, Daniūnaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S: The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016a Sep 6;115(6):707–15.
 25. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas)*. 2016b;52(2):116–24.
 26. Stuopelyte K, Sabaliauskaite R, Bakavicius A, Hafliudadóttir BS, Visakorpi T, Väänänen RM, et al. Analysis of AR-FL and AR-V1 in Whole Blood of Patients with Castration Resistant Prostate Cancer as a Tool for Predicting Response to Abiraterone Acetate. *J Urol*. 2020 Feb 18:101097JU00000000000000803.
 27. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J et al. Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017 Jun;71(6):874–82.
 28. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer*. 2012 Aug 1;131(3):652–61.
 29. Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate*. 2012 Sep 15;72(13):1469–77.
 30. Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, et al. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumor diagnosis. *Br J Cancer*. 2013 Nov 12;109(10):2646–53.
 31. Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, Schnoeller TJ, Lennerz JK, Wurm C, et al. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Apr 23;10(41):4213–23.
 32. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*. 2010 Aug;120(8):2715–30.
 33. Tong AW, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther*. 2008 Jun;15(6):341–55.
 34. Willard SS, Koochekpour S. Regulators of gene expression as biomarkers for prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2012;2(6):620–57.

Vilnius University Press
Sauletekio av. 9, LT-10222 Vilnius
E-mail info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Print run copies 20