

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas



RŪTA MALECKAITĖ

Metalotioneinių ir histonus modifikuojančių genų raiškos tyrimai prostatos navikuose

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biomokslų instituto

Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje

Darbo vadovės:

Doc. Dr. Kristina Daniūnaitė

Prof. (HP) Sonata Jarmalaitė

Vilnius, 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Prostatos vėžys ir jo diagnostiniai žymenys.....	8
1.2. Prostatos vėžio klinikinės-patologinės charakteristikos.....	10
1.3. Šiuolaikinis prostatos vėžio gydymas	12
1.4. Epigenetika ir vėžys	14
1.5. Genų raiškos tyrimai prostatos navikuose.....	16
1.6. Metalotioneinų genų šeima	17
1.6.1. Metalotioneinų šeimos genų raiška vėžio atveju.....	18
1.7. Histonus modifikuojančius baltymus koduojantys genai.....	19
1.7.1. Histonų metiltransferazės	19
1.7.2. Histonų demetilazės	20
1.7.3. Histonų acetiltransferazės ir deacetilazės.....	20
1.7.4. Histonus modifikuojančių genų raiškos tyrimai vėžinių (prostatos) susirgimų atvejais	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	23
2.1. Ligoniai ir mėginiai	23
2.2. Reagentai	24
2.3. RNR išskyrimas iš prostatos audinių	25
2.4. Elektroforezė agarozės gelyje	26
2.5. Komplementarios DNR sintezė ir kiekybinė PGR.....	26
2.6. Statistinė analizė.....	28
3. REZULTATAI	29
3.1. Metalotioneinų genų raiškos analizė TCGA PRAD imtyje	29
3.1.1. Genų raiškos palyginimas PV ir NPA mėginiuose.....	29
3.1.2. Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais	29

3.1.3.	Sąsajos su biochemine PV progresija.....	32
3.2.	Metalotioneinų genų raiškos tyrimai PV sergančių ligonių mėginiuose.....	33
3.2.1.	Genų raiškos analizė PV, NPA ir GPH audiniuose	33
3.2.2.	Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais	34
3.2.3.	Sąsajos su biochemine PV progresija.....	36
3.3.	Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos analizė TCGA PRAD imtyje.....	38
3.3.1.	Genų raiškos palyginimas PV ir NPA mėginiuose	38
3.3.2.	Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais	38
3.3.3.	Sąsajos su biochemine PV progresija.....	41
3.4.	Histonų modifikacijoje dalyvaujančių genų raiškos tyrimai PV sergančių ligonių mėginiuose.....	42
3.4.1.	Genų raiškos analizė PV, NPA ir GPH audiniuose	42
3.4.2.	Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais	43
3.4.3.	Sąsajos su biochemine PV progresija.....	45
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	47
4.1.	<i>MTIE</i> , <i>MTIG</i> ir <i>MTIM</i> genų raiška prostatos navikuose	47
4.2.	Histonus modifikuojančių genų raiška prostatos navikuose	48
	IŠVADOS.....	50
	SANTRAUKA	51
	SUMMARY	53
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	55
	PRIEDAI	60

SANTRUMPOS

ADT – androgenų terapija (angl. Androgen Deprivation Therapy)

APC – adenomatozinės polipozės genas (angl. Adenomatous Polyposis Coli gene)

AR-V7 – androgenų receptoriaus 7 variantas (angl. Androgen Receptor Splice Variant 7)

AS – aktyvus stebėjimas (angl. Active Surveillance)

DRE – tiesiosios žarnos tyrimas (angl. Digital Rectal Examination)

ERG – specifinės etiroblastų transformacijos šeimos transkripcijos faktoriaus genas (angl. transcription factor of erythroblast transformation-specific family gene)

fPSA – laisvo PSA molekulinė forma (angl. free PSA)

GPH – gerybinė prostatos hiperplazija

GSTP1 – glutationo S-transferazės Pi 1 genas (angl. Glutathione S-Transferase Pi 1 gene)

HAT – histonų acetiltransferazė (angl. histone acetyltransferase)

HDAC – histonų deacetilazė (angl. histone deacetylase)

hK2 – žmogaus kalikreino baltymas 2 (angl. human Kallikrein-2)

HPRT1 – hipoksantino fosforiboziltransferazės 1 genas (angl. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase gene)

ISUP – tarptautinė urologinės patologijos draugija (angl. International Society of Urological Pathology)

KDM3A – lizino demetilazės 3A genas (angl. lysine demethylase 3A gene)

KDM4C – lizino demetilazės 4C genas (angl. lysine demethylase 4C gene)

KDM5D – lizino demetilazės 5D genas (angl. lysine demethylase 5D gene)

kDNR – komplementari DNR

KMT5A – lizino metiltransferazės 5A genas (angl. lysine methyltransferase 5A gene)

kPGR – kiekybinė PGR (angl. quantitative PCR)

mCRPC – metastazuojantis kastracijai atsparus prostatos vėžys (angl. metastatic castration-resistant prostate cancer)

miRNR – mikroRNR

mRNR – informacinė RNR

MT – metalotioneinai

MT1E – metalotioneinų šeimos 1E genas (angl. metallothionein 1E gene)

MT1G – metalotioneinų šeimos 1G genas (angl. metallothionein 1G gene)

MT1M – metalotioneinų šeimos 1M genas (angl. metallothionein 1M gene)

NPA – nenavikinis prostatos audinys

p2PSA – prototipinės PSA (proPSA) forma

PAP – prostatos rūgšties fosfatazė (angl. Prostate Acid Phosphatase)

PB – prostatos brachiterapija (angl. Prostate Brachytherapy)

PCA3 – prostatos vėžio antigenas 3 (angl. Prostate Cancer Antigen 3)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija (angl. Polymerase Chain Reaction)

PHF8 – PHD pirštelių baltymo 8 genas (angl. PHD finger protein 8 gene)

PHI – prostatos sveikumo indeksas (angl. Prostate Health Index)

PSA – prostatos specifinis antigenas (angl. Prostate Specific Antigen)

PV – prostatos vėžys/navikas

RASSF1 – Ras domeno šeimos genas (angl. Ras Association Domain Family Member 1 gene)

RP – radikali prostatektomija (angl. Radical Prostatectomy)

RT – išorinė spindulinė terapija/radioterapija (angl. External Beam Radiation Therapy)

TCGA PRAD – Vėžio genomo atlaso prostatos adenokarcinomos imtis (angl. The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma)

tPSA – visų formų PSA kiekis kraujo serume (angl. total PSA)

TRUS – transrektalinė ultragarsinė analizė (angl. Transrectal Ultrasonography)

UV – ultravioletinė spinduliuotė

IVADAS

Prostatos vėžys (PV) – dažniausiai vyrams nustatomas onkologinis susirgimas, kurio mirtingumas Lietuvoje užima antrą vietą visose amžiaus grupėse (NVI vėžio registras, 2012). Sergant lokalizuotu PV prognozuotina gyvenimo trukmė yra ilga, tačiau šis vėžys gali virsti kastracijai atspariu PV, todėl kovoje su šiomis ligomis yra reikalingi ne tik diagnostiniai, bet ir prognostiniai žymenys. Remiantis epigenetiniais pokyčiais buvo sukurti vaistai prieš skirtingų tipų navikus, kurių dažniausi taikiniai yra genomo epimutacijos. Šie vaistai yra DNR metilinimo inhibitoriai, histonų modifikatorių inhibitoriai ir mažos molekulės, kurios taikosi į chromatiną remodeliuojančius baltymus (Costa, 2010). Epigenetikos mokslo pasiekimai naudojami ligų gydyme, todėl tokio tipo žymenų vertė diagnozuojant prostatos vėžį ir prognozuojant ligos progresiją yra neabejotina.

Metalotioneinai – maži, cisteinu turtingi mažos molekulinės masės vidiniai ląstelės baltymai, kurie dalyvauja daugybėje fiziologinių procesų, pavyzdžiui, saugo metalų jonus ląstelės viduje, perneša juos ir dalyvauja medžiagų apykaitoje per homeostazės mechanizmą. Jie gali apsaugoti ląstelę nuo UV ir jonizuojančios spinduliuotės, citotoksinių alkilinančių medžiagų tokių kaip chemoterapiniai vaistai, ir inhibuoti apoptozę. Ne vienas tyrimas parodė, kad metalotioneinų genų raiška kinta įvairių žmogaus navikų atveju (Gumulec et al., 2014).

Histonus modifikuojantys genai koduoja fermentus, kurie katalizuoja kovalentinių modifikacijų pridėjimą/pašalinimą prie histoninių ir nehistoninių baltymų molekulių. Chromatino atžvilgiu tokios modifikacijos reguliuoja genų raišką ir kitas genomines funkcijas (Marmorstein, Zhou, 2014). Kadangi šie fermentai atlieka įvairias funkcijas kitų genų transkripcinio aktyvumo valdyme, visiškai nestebina faktas, kad nenormali histonus modifikuojančių genų raiška yra nustatyta įvairiuose vėžiniuose susirgimuose.

Šio **darbo tikslas** – ištirti atrinktų metalotioneinų šeimos ir histonus modifikuojančių genų raišką prostatos vėžiu sergančių ligonių mėginiuose ir nustatyti šių žymenų diagnostinę ir prognostinę vertę.

Tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

1. Įvertinti metalotioneinų *MTIE*, *MTIG* ir *MTIM* genų raišką prostatos navikiniuose, nenavikiniuose ir gerybinės prostatos hiperplazijos audiniuose ir susieti su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais.
2. Įvertinti metalotioneinų *MTIE*, *MTIG* ir *MTIM* genų raišką skirtingo agresyvumo prostatos navikiniuose audiniuose ir susieti su ligos progresija.

3. Įvertinti histonus modifikuojančių genų *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* raišką prostatos navikiniuose, nenaivikiniuose ir gerybinės prostatos hiperplazijos audiniuose ir susieti su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais.
4. Įvertinti histonus modifikuojančių genų *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* raišką skirtingo agresyvumo prostatos navikiniuose audiniuose ir susieti su ligos progresija.

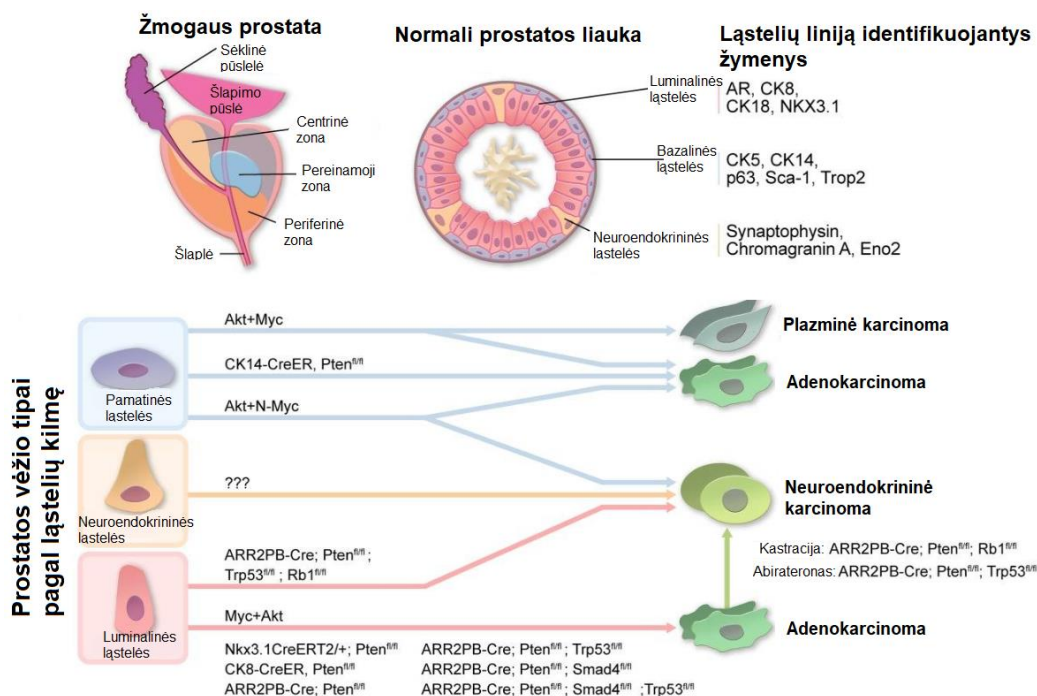
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Prostatos vėžys ir jo diagnostiniai žymenys

Prostatos vėžys – heterogeniška ir labai paplitusi liga vyrų tarpe visame pasaulyje. Remiantis 2020 metų vėžio statistika JAV, šiemet prostatos vėžio diagnozę šioje šalyje išgirs 192 tūkst. vyrų – ši liga pagal naujų atvejų skaičių lenkia net plaučių ir bronchų vėžį. Skaičiuojama, kad JAV šiemet nuo prostatos vėžio mirs 33 tūkst. vyrų – perpus mažiau nei nuo plaučių ir bronchų vėžio (72,5 tūkst. vyrų) (Siegel et al., 2020).

Lietuvos vėžio registro duomenimis (2012), sergamumas prostatos vėžiu yra didžiausias vyrų grupėse nuo 30 iki 75 ir daugiau metų. 2012 metais užfiksuota, kad naujų I-os stadijos prostatos vėžio atvejų nustatyta 567 (21,8 %), II – 855 (32,8 %), III – 520 (20,0 %), IV – 104 (4,0 %), bet nenurodytos stadijos atvejų buvo net 560 (21,5 %).

Prostatos liauka yra tiesiai po šlapimo pūsle ir ląsteliniu lygiu yra sudaryta iš trijų tipų pilnai diferencijuotų epitelinių ląstelių – luminalinių, pagrindo (bazalinių) ir neuroendokrinių ląstelių. Pagal kilmę iš šių ląstelių yra skiriami prostatos vėžio tipai: bazalinės ir luminalinės ląstelės duoda pradžią prostatos plazminėms karcinomoms ir/ar adenokarcinomoms (dažniausiai diagnozuojamas prostatos vėžio tipas), o luminalinės kilmės adenokarcinomos gali virsti ir neuroendokrinių karcinomomis (1.1 pav.). Tiesa, kol kas nėra aišku, ar neuroendokrinių ląstelės gali tiesiogiai duoti pradžią neuroendokrinių karcinomų susidarymui (Wang, Lei, 2018).



1.1 pav. Žmogaus prostatos sandara, ją sudarantys ląstelių tipai ir vėžio tipai (Wang, Lei, 2018)

Dėl itin didelio sergamumo šiuo vėžiu egzistuoja nuolatinis poreikis atrasti naujus biožymenis, kurie gali anksti nustatyti ligą, parodyti terapinį atsaką į gydymą, sumažinti klaidingai teigiamų atsakymų riziką, atskirti prostatos vėžio tipus, atrinkti ligonius pagal skirtingas gydymo galimybes bei padidinti išgyvenimo tikimybę. Jau yra identifikuota nemažai prostatos biožymenų, tačiau tik keli iš jų yra patvirtinti JAV Maisto ir vaistų administracijos (angl. Food and Drug Administration, FDA) arba Klinikinės laboratorijos tobulinimo pataisomis (angl. Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA) (Kohaar et al., 2019). Pagrindiniai biožymenys, patentuoti skirtingų kompanijų ir įtraukti į šiuo metu prieinamus testus, nurodyti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Patvirtinti kraujo, šlapimo ir audinių biožymenys prostatos vėžio diagnostikai, prognostikai ir predikcijai (Kohaar et al., 2019)

Molekulinio testo pavadinimas	Molekuliniai biožymenys
Kraujo serumas	
Prostatos specifinis antigenas (tPSA)	PSA
PHI	Bendras PSA, fPSA, p2PSA
4K	Bendras PSA, fPSA, nepažeistas PSA, hK2
Šlapimas	
PCA3	<i>PCA3</i>
ExoDX prostata	Egzosominė RNR (<i>PCA3</i> , <i>ERG</i>)
MiPS	<i>PCA3</i> ir <i>TMPRSS2-ERG</i> mRNR
SelectMDX	<i>HOXC6</i> , <i>DLX1</i>
Prostatos audinys	
ConfirmMDx	DNR hipermetilinimas (<i>GSTP1</i> , <i>APC</i> , <i>RASSF1</i>)
Prolaris	mRNR raiška, 31 genas (ląstelės ciklas)
Oncotype Dx	mRNR raiška, 17 genų
Decipher	mRNR raiška, 22 genai (ląstelės proliferacija, migracija, naviko judrumas, androgenų signaliniai keliai ir imuninės sistemos išvengimas)
Promark	Baltymų žymenų testas (8 baltymai)

Labiausiai patikimi ir dažniausiai naudojami biožymenys yra PSA, PHI ir *PCA3*, todėl apie juos yra pateikiama išsamesnė informacija:

- PSA – tai 33 kDa dydžio serino proteazė, koduojama *KLK3* geno 19-toje chromosomoje. Šis baltymas yra gaminamas ir sekretuojamas prostatos epitelinėse ląstelėse. 1994 m. kraujo serumo PSA testas buvo patvirtintas prostatos vėžio

diagnostikai jį atliekant kartu su tiesiosios žarnos tyrimu (angl., Digital Rectal Examination, DRE). Deja, bet PSA testas nėra toks specifinis prostatos vėžiui, kaip buvo manyta anksčiau, nes PSA kiekis kraujyje gali pakilti dėl prostatito ir gerybinės prostatos hiperplazijos – šios ligos nėra vėžinio pobūdžio.

- tPSA – visų formų PSA kiekis kraujo serume (angl. total PSA)
- fPSA – laisvo PSA molekulinė forma (angl. free PSA) (Kohaar et al., 2019).
- p2PSA – viena iš septynių prototipinės PSA (proPSA) formų, kuri yra pati stabiliausia laisvo PSA (fPSA) molekulinė forma (Vukovic et al., 2017).
- hK2 – žmogaus kalikreino baltymas 2 (angl. human Kallikrein-2), priklausantis kalikreino baltymų šeimai. Parodyta, kad jis gali būti naudojamas kaip predikcinis prostatos vėžio progresijos žymuo bei yra tikslesnis už PSA (Guerrico et al., 2017).
- PHI – prostatos sveikumo indeksas (angl. Prostate Health Index), nuspėjantis prostatos vėžio riziką ir atskiriantis PV nuo GPH atvejų (Vukovic et al., 2017).
- *PCA3* – prostatos vėžio antigenas 3 (angl. Prostate Cancer Antigen 3). Šio geno raiška yra stipriai padidėjusi prostatos ląstelėse. Dažniausiai jo testas atliekamas vyrams virš 50 metų, kuriems nustatytas pakilęs PSA kiekis kraujyje ir ankstesnės biopsijos rezultatas buvo neigiamas (Kohaar et al., 2019).

1.2. Prostatos vėžio klinikinės-patologinės charakteristikos

Klinikinės-patologinės charakteristikos yra šios: ligonių amžius, prostatos masė, naviko diferenciacijos laipsniai, PSA kiekis kraujyje ir navikų suskirstymas pagal TNM sistemą.

Prostatos masė yra dažnai nustatoma pagal PSA ir fPSA lygius kraujyje, tačiau dabar jau yra įrodyta, kad toks matavimas nėra tikslus. Šiuo metu standartu laikomas transrektalinės ultragarsinės analizės (angl. Transrectal Ultrasonography, TRUS) metodas prostatos masei išmatuoti ir prostatos masė gali būti naudojama kaip predikcinis rodiklis atsakui į gydymą (Jung et al., 2019).

Naviko diferenciacija ilgą laiką buvo aprašoma naudojantis Gleason'o sistema, tačiau ji buvo nuolat tobulinama dėl atrastų trūkumų. Šie laipsniai parodo, kaip stipriai vėžinės ląstelės panašios/nepanašios į normalias ląsteles. Galiausiai, 2014 metais tarptautinė urologinės patologijos draugija (angl. International Society of Urological Pathology, ISUP) nusprendė galutinai pertvarkyti šią sistemą. Naujoji sistema pasižymi pranašumais, nes tiksliau aprašoma pati naviko diferenciacija, sistema tapo paprastesne ir pirmos grupės navikams skiriamas tinkamesnis gydymas (ankstesnėje sistemoje to paties balo navikai galėjo būti gydomi per stipriai, skiriant skirtingus ir neteisingus vaistus; (Epstein et al., 2016). Naujosios sistemos

aprašymas pateiktas 1.2 lentelėje. Naviką priskiriant diferenciacijos grupei sudedami du laipsniai, nes prostatos navikai pasižymi heterogeniškumu ir navikas nėra vienodas visoje savo srityje.

1.2 lentelė. Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (ISUP) naviko diferenciacijos sistema (Epstein et al., 2016)

ISUP grupė	Gleason diferenciacijos balas	2014 m. ISUP grupės aprašymas
1	3 + 3 = 6	Matomos tik individualios, gerai susiformavusios liaukos
2	3 + 4 = 7	Vyrauja gerai susiformavusios liaukos, nedidelė dalis liaukų yra prastai susiformavusios, susiliejusios, briaunotos
3	4 + 3 = 7	Vyrauja prastai susiformavusios, susiliejusios, briaunotos liaukos, nedidelė dalis liaukų yra gerai susiformavusios
4	Suma 8	Tik prastai susiformavusios, susiliejusios, briaunotos liaukos/ gerai susiformavusios liaukos su šalia esančiu audiniu be liaukų/ audinys be liaukų su šalia esančiu audiniu su gerai susiformavusiomis liaukomis
5	Suma 9–10	Susiformavusios liaukos nėra matomos arba yra nekrozuotos, susiliejusios, briaunotos

PSA yra plačiai naudojamas prostatos navikų biožymuo. Nors normalios prostatos ląstelės taip pat gamina PSA, bet prostatos vėžio audiniai gali išskirti iki 10 kartų didesnę PSA kiekį nei normalus ar gerybinės prostatos hiperplazijos audinys. Manoma, kad PSA išskyrimas susijęs su prostatos membranos sutrikdymu formuojantis navikui. Bendras PSA lygis kraujo serume turi siekti iki 4,0 ng/ml ir tai dažnai laikoma viršutine normos riba, tačiau, kaip minėta anksčiau, tai nėra pakankamai tikslu, todėl papildomai naudojami kiti diagnostiniai testai ir tik tada pacientas nukreipiamas tolimesnei biopsijai (Pron, 2015).

Remiantis diagnostikos ir gydymo protokolu šiuo metu galiojančiu Lietuvos Respublikoje, pateikiamu Sveikatos apsaugos ministerijos internetiniame puslapyje, kliniškai (cTNM) pagal TNM (angl. Tumor, Lymph Nodes, Metastasis) sistemą klasifikuojama tik adenokarcinoma, o sarkomos ar pereinamųjų ląstelių karcinomos neklasifikuojamos. Priešinės liaukos pereinamųjų ląstelių karcinoma klasifikuojama kaip šlaplės navikas. Patologinė klasifikacija (pTNM) šiek tiek skiriasi nuo klinikinės: pT ir pN kategorijos atitinka cT ir cN kategorijas, o pM kategorija yra tik pM1 – tai reiškia, kad yra mikroskopiškai patvirtintų tolimųjų metastazių (Samalavicius et al., 2015). T (angl. Tumor, reikšmės 1–4) parodo naviko dydį ir lokalizaciją, N (angl. Lymph Nodes, reikšmės 0–1) – išplitimą į limfmazgius, o M (angl. Metastasis, reikšmės 0–1) – tolimąsias metastazes. Kliniškai prostatos vėžys yra įvertinamas pagal TNM sistemą atlikus

DRE, biopsijos tyrimus ir kompiuterinę tomografiją. Patologiškai navikas įvertinamas po RP operacijos ištyrus mėginį mikroskopu.

1.3 lentelėje nurodyta naujausia prostatos vėžio stadijų klasifikacija pagal TNM sistemą įtraukiant PSA kiekį kraujyje ir ISUP kategoriją (Buyyounouski et al., 2017).

1.3 lentelė. Prostatos vėžio stadijų klasifikacija pagal naujausią TNM sistemą (Buyyounouski et al., 2017)

T kategorija	N kategorija	M kategorija	PSA kiekis (ng/ml)	ISUP kategorija	Stadija	
T2	N0	M0	<10	1	I	
T2			≥10, <20	1	IIA	
T1-T2			<20	2	IIB	
T1-T2			<20	3	IIC	
T1-T2			<20	4	IIC	
T1-T2			≥20	1–4	IIIA	
T3-T4			Bet koks	Bet koks	1–4	IIIB
Bet koks T					N1	5
	Bet kuri	IVA				
	Bet koks N	M1		Bet kuri	IVB	

1.3. Šiuolaikinis prostatos vėžio gydymas

Šiuolaikinis prostatos vėžio gydymas gali būti suskirstytas į du etapus pagal ligos pobūdį: pirmas etapas vykdomas tada, kai vyrui diagnozuotas prostatos vėžys yra ankstyvos stadijos ir lokalizuotas tik prostatos audinyje, neišplitęs už jos ribų. Antras etapas taikomas tada, kai vėžys ima plisti už prostatos ribų dėl įgyto atsparumo kitam gydymui (gali virsti metastazuojančiu prostatos vėžiu) arba iškart nustatomas itin pažengusios stadijos navikas.

Pirminiame etape esant lokalizuotai prostatos adenokarcinomai dažniausiai taikomi keturi gydymo būdai: radikali prostatektomija (angl. Radical Prostatectomy, RP), prostatos brachiterapija (angl. Prostate Brachytherapy, PB), išorinė spindulinė terapija/radioterapija (angl. External Beam Radiation Therapy, RT) bei aktyvus stebėjimas (angl. Active Surveillance, AS) (Keyes et al., 2013).

Radikali prostatektomija. RP atliekama keliais būdais siekiant pašalinti visą prostatos liauką – šiuolaikinė medicina siūlo operacijos metu pasitelkti robotų pagalbą, taip pat operacijos atliekamos ir tradiciniais laparoskopijos arba atviros operacijos būdais. Visgi analizė rodo, kad operacijos, atliekamos robotų pagalba, yra pranašesnės prieš kitus operacijos būdus dėl mažesnės

kraujo praradimo tikimybės, transfuzijos dažnio, yra tausojami nervai, po operacijos matomas geresnis šlapimo sulaikymas ir greičiau atsistato erekcija (Du et al., 2018).

Prostatos brachiterapija. Atliekant brachiterapiją radioaktyvūs spinduliai yra nukreipiami tiesiai į vėžinį audinį tam tikru išsidėstymu. Navikas gauna itin didelę radiacijos dozę, tačiau šalia esantys audiniai yra apsaugomi ir iki minimumo sumažinamas galimas toksiškumas. Pasaulyje moderni brachiterapija buvo pradėta taikyti 1980 m. (Keyes et al., 2013).

Išorinė spindulinė terapija/radioterapija. Itin tinkama ligoniams su lokalizuotu prostatos vėžiu. Naudojant su androgenų terapija (angl. androgen deprivation therapy, ADT) tinkama vidutinės/aukštos rizikos ligoniams. Gydomo metu spinduliuojamos didelės radiacijos dozės (Keyes et al., 2013).

Aktyvus stebėjimas. Taikomas tiems ligoniams, kurie serga mažos rizikos prostatos vėžiu. Gydytas yra pradedamas tada, kai patvirtinama ligos progresija. Šis metodas skiriasi nuo „prižiūrimo laukimo“, kurio metu gydoma tada, kai liga progresuoja, bet ligoniui suteikiama tik paliatyvi globa (Sklinda et al., 2020).

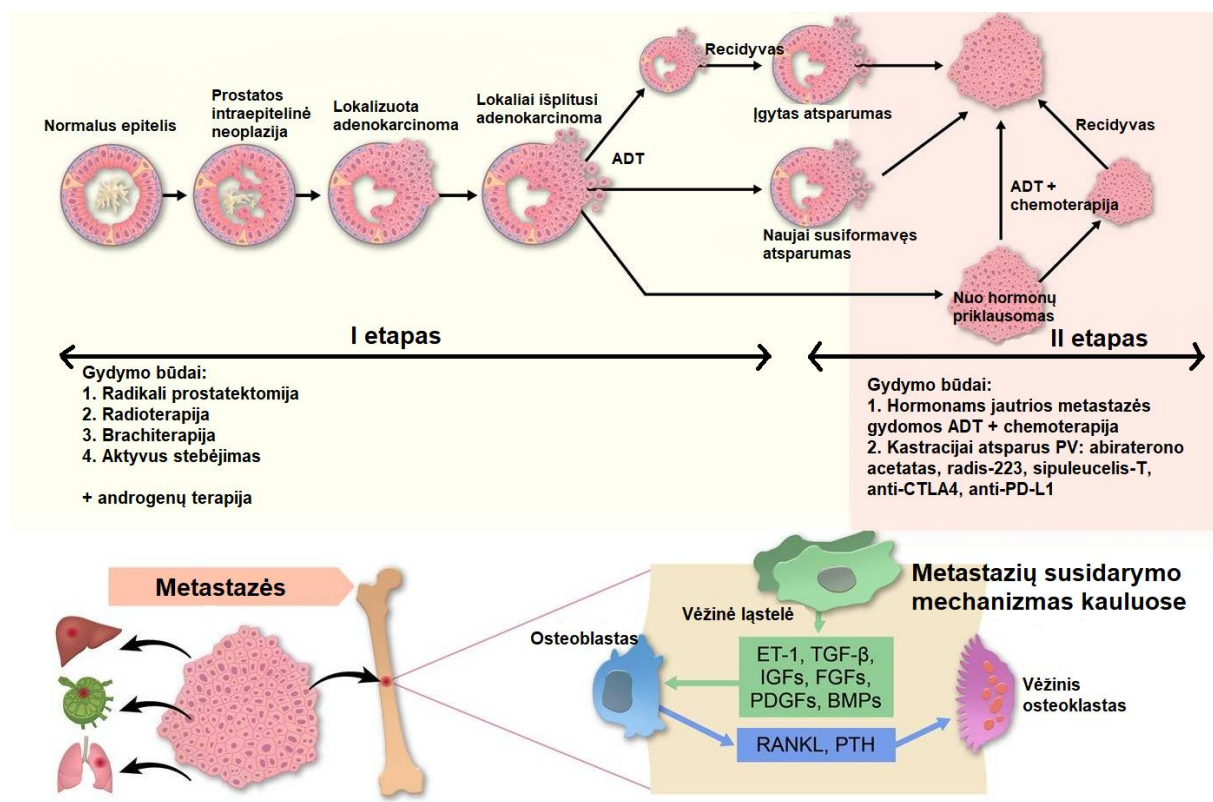
Kartu su visais šiais išvardintais metodais esant lokalizuotam prostatos vėžiui taip pat gali būti taikoma ir krioterapija, gydymas fokusuotu ultragarsu bei negrįžtama elektroporacija (Sklinda et al., 2020).

Antrame etape, kai ima kilti PSA lygis kraujyje, yra taikomas gydymas androgenų terapija (tokia terapija gali būti taikoma ir su pirmame etape išvardintais gydymo variantais), o jai nepadedant/atsiradus metastazuojančiam kastracijai atspariam prostatos vėžiui (angl. metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC) taikomas gydymas įvairiais vaistais, chemoterapija arba imunoterapija (Teo et al., 2019).

Androgenų terapija. Taikoma siekiant sumažinti androgenų kiekį vyro organizme. Ji sukelia naviko susitraukimą sendindama ir apoptuodama navikinę ląstelę. Navikinė ląstelė negaudama androgenų nebegali augti ir dalintis. Šiuo metu yra pilnai patvirtinti penki ADT vaistai, naudojami prostatos vėžio gydymui (Gamat, McNeel, 2017).

Chemoterapija ir kiti gydymo būdai. Pirmasis citotoksinis vaistas, patvirtintas gydyti metastazuojančiam prostatos vėžiui, buvo mitoksantronas, tačiau buvo įrodyta, kad jis nepadedą pratęsti gyvenimo trukmės, todėl buvo naudotas tik paliatyviam gydymui. Vėliau buvo atrastas vaistas docetakselis – mikrovamzdelius ląstelės ciklo metu inhibuojantis preparatas, kuris padėjo prailginti ligonių gydymo trukmę. Šiuo metu taip pat yra naudojami ir kiti preparatai: kabazitakselis, abiraterono acetatas (citochromo 17, kuris yra svarbiausias elementas androgenų sintezės metu, inhibitorius), enzalutamidas, radis-223 (radioizotopas) (Teo et al., 2019).

Imunoterapija. Sipuleucelis-T buvo patvirtintas prostatos vėžio gydymui 2010-aisiais. Taikant tokį imunoterapijos būdą ligonio periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės yra paruošiamos leukoforezės būdu ir tada kultivuojamos su rekombinantine prostatos rūgšties fosfataze (angl. Prostate Acid Phosphatase, PAP) ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi, kuris padeda subręsti antigenus gaminančioms ląstelėms. Šios manipuliacijos produktas gražinamas į ligonio organizmą per tris kursus intraveninėmis infuzijomis. Tikimasi, kad tokiu būdu bus sunaikintos ląstelės, kurios gamina didelius prostatos rūgšties fosfatazės kiekius. Šiuo metu yra tiriami kiti imunoterapija paremti preparatai, pavyzdžiui, anti-CTLA-4 bei anti-PD-L1 antikūnai ir jų pritaikymas prostatos vėžio gydymui (Nevedomskaya et al., 2018). Apibendrinanti schema pateikta 1.2 pav.

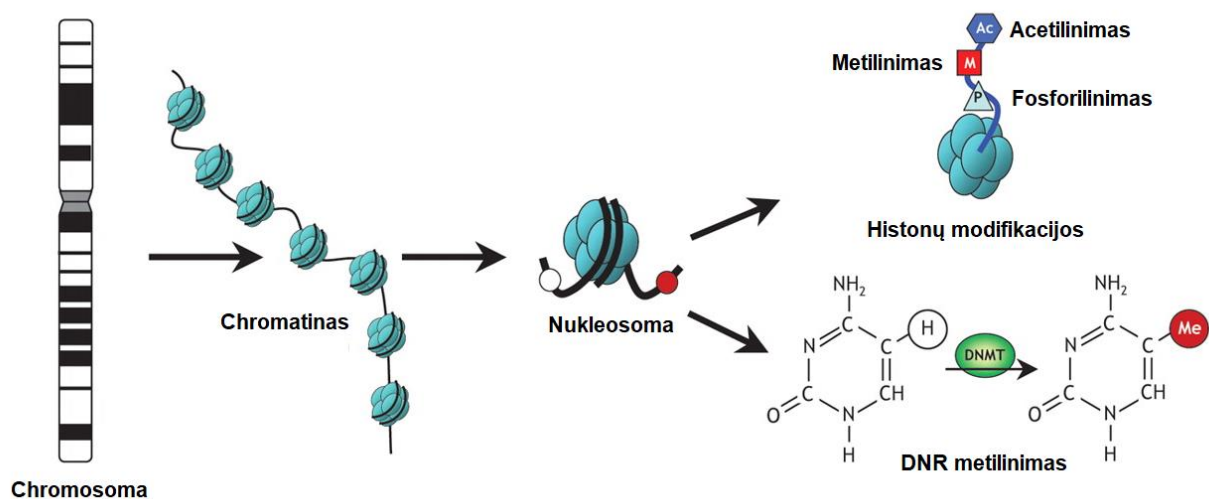


1.2 pav. Lokalizuoto ir metastazuojančio prostatos vėžio gydymo kelius apibūdinanti schema (Wang et al., 2018)

1.4. Epigenetika ir vėžys

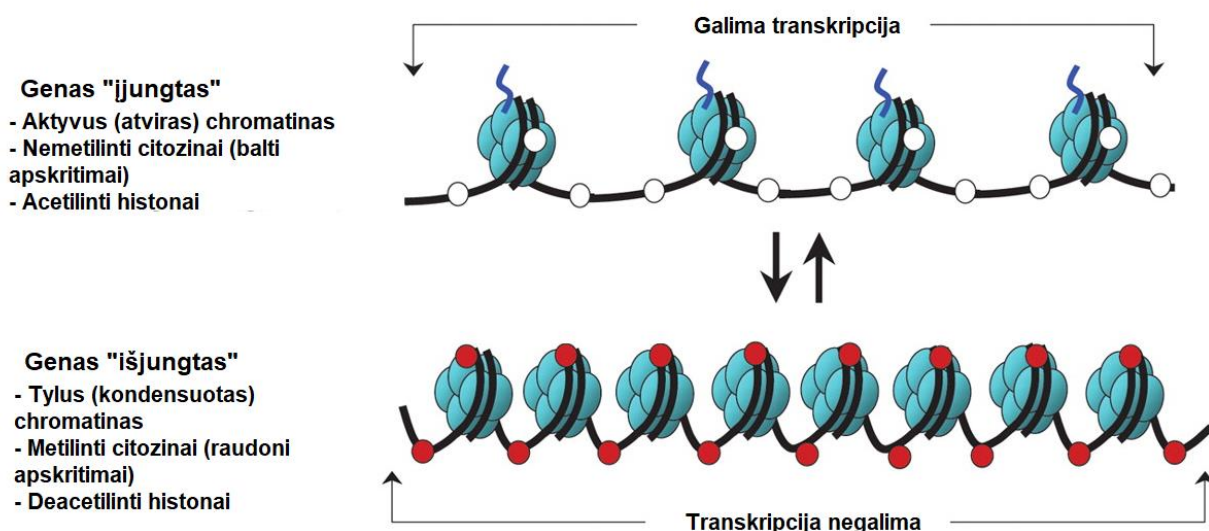
1942 m. Conrad'as Waddington'as pristatė terminą „epigenetika“, nusakantį paveldėtus fenotipo pokyčius be jokių pasikeitimų genome. Žvelgiant iš dabartinės perspektyvos, šio termino apibrėžimas tapo sudėtingesnis ir tikslesnis: epigenetika reiškia stabiliai paveldimą fenotipą, atsirandantį dėl chromosominių pokyčių nekeičiant DNR sekos. Epigenetinė reguliacija yra svarbi normaliai ląstelių fiziologinei būsenai palaikyti bei formuojantis skirtingiems ląstelių

tipams (Nebbio et al., 2018). Ji dažniausiai apima DNR metilinimo mechanizmą, būdinga stuburiniams, histonų modifikacijas bei nekoduojančias mikroRNR (1.3 pav.). Epigenetinės modifikacijos itin svarbios imprintingo procese ir X chromosomos inaktyvacijoje normalaus vystymosi metu (Wu et al., 2015).



1.3 pav. Epigenetinių modifikacijų, reguliuojančių chromatino sandarą ir genų raišką, schema (Wu et al., 2015)

Vėžinės ląstelės pasižymi sutrikusiu baltymų, kurie katalizuoja epigenetinių žymių pridėjimą bei pašalinimą histonuose arba genominėje DNR, veikimu. Tokie pokyčiai įvyksta dėl sutrikusių ląstelės mechanizmų, kuriems įtaką galėjo padaryti įvairūs kenksmingi metabolitai ir kitos medžiagos (Wang, Lei, 2018). Įvairūs endogeniniai ir egzogeniniai veiksniai gali sujaukti ląstelės vystymosi „trajektoriją“ taip pertvarkant chromatino struktūrą (1.4 pav.), kuri lemia nenormalios genų raiškos atsiradimą arba praradimą. Tokiu būdu yra įgyjami vėžinei ląstelei būdingi požymiai, nurodyti 1.5 paveiksle (Nebbio et al., 2018). Be to, nenormalūs epigenetiniai pokyčiai gali transformuoti normalias kamienines ląsteles į vėžines kamienines ląsteles, kurios nebeturi kamieninių ląstelių požymių bei svarbiausios galimybės diferencijuotis į įvairių tipų ląsteles (Toh et al., 2017) ir taip organizme prasideda pokyčiai, lemiantys neoplazijų susidarymą (Wu et al., 2015).



1.4 pav. Epigenetinių modifikacijų įtaka genų raiškai chromatino lygmenyje (Wu et al., 2015)



1.5 pav. Nenormalios chromatino būsenos lemia karcinogenezės pradžią pagal šiuos vėžio požymius (Nebbio et al., 2018)

1.5. Genų raiškos tyrimai prostatos navikuose

PV, kaip ir kiti onkologiniai susirgimai, kyla dėl genetinių ir epigenetinių faktorių pokyčių žmogaus organizme. Žinoma daug naviką slopinančių genų, kurių promotoriai yra nenormaliai metilinami ir dėl to pakinta šių genų raiška taip sutrikdydama normalų hormoninį atsaką, ląstelės ciklo kontrolę, DNR pažeidimų taisymą ir leisdama formuotis navikui. Pakitusi genų raiška gali lemti vėžio pradžią, progresiją, invazyvumą ir metastazes (Wu et al., 2015).

Šiuo metu jau yra įrodyta, kad daugybė epigenetinių pokyčių yra pasikartojantis ir universalūs prostatos vėžiui. Šie pokyčiai sustiprina prostatos vėžio ląstelėms būdingą transkripcijos profilį, kuris skatina vėžinių ląstelių atsinaujinimą, išgyvenamumą ir invaziją. Parodyta, kad epigenetinių pokyčių kaupimasis ilgai lemia genetinį bei genominių

nestabilumą. Būna atvejų, kai genai, koduojantys epigenetinius veiksnius prostatos vėžio atveju, patys yra mutavę, todėl tiek geninės mutacijos, tiek epigenetiniai pokyčiai veikdami kartu ir atskirai prisideda prie prostatos vėžio patogenezės ir progresavimo (Liao, Xu, 2019).

Prostatos vėžys dažnai yra apibūdinamas kaip vienas heterogeniškiausių žmogaus navikų. Heterogeniškumas atsispindi per genų raiškos lygmenį, kuri yra nevienoda visose naviko ląstelėse, genetiniame lygmenyje, kai tame pačiame navike yra daugybė genomo pokyčių, ir galiausiai per ligonio atsaką į įprastą gydymą, kai navikai su identiška patologija skirtingai reaguoja į chemoterapinius vaistus (Frame, Maitland, 2019). Genų raiška yra nevienalytė tiek normaliame, tiek supiktybėjusiame prostatos audinyje ir gali būti ne tik sumažėjusi, bet ir stipriai padidėjusi. Tam tikrų baltymų (pvz., poliaminų ir kalikreinių), sekretuojamų prostatos ląstelių, kurios jau nebesidalija ir yra visiškai diferencijuotos į prostatos luminalines ląsteles, raišką reguliuoja genų promotoriai, kurių aktyvumas yra tūkstančius kartų didesnis nei genų promotorių, esančių bazalinėse prostatos ląstelėse (Frame, Maitland, 2019).

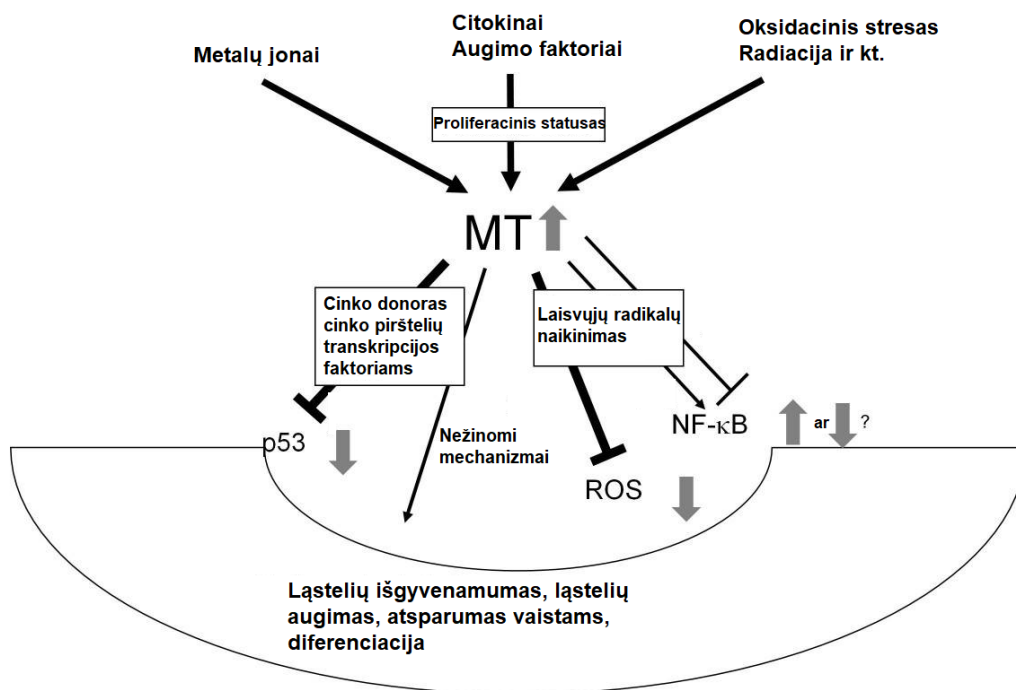
DNR metilinimo svarba, lemianti genų raiškos pokyčius, prostatos vėžio atveju yra išsamiai dokumentuota. Ši modifikacija nutildo – sumažina – daugybės klasikinių antionkogenų, įskaitant *APC*, *RASSF1*, estrogenų ir androgenų receptorių genų, ląstelių sankibos genų (*CD44* ir *CDH1*), ląstelės ciklo kontrolės genų (*CCND2*, *CDKN1B* ir *SFN*) ir apoptozės genų (*PYCARD*, *RPRM* ir *GLIPRI*) raišką. *GSTP1* geno promotoriaus hipermetilinimas ir raiškos sumažėjimas yra molekulinis prostatos vėžio požymis, nustatomas >90 % prostatos vėžio atvejų ir apie 75 % preinvazinių aukšto laipsnio prostatos intraepitelinių navikų (Perry et al., 2010).

1.6. Metalotioneinų genų šeima

Metalotioneinai (MT) yra mažos molekulinės masės, daug cisteino turintys baltymai, kurie pradeda veikti ląstelei reaguojant į aplinkos sukeltą cheminį stresą, tokį kaip metalų jonai, citokinai ir laisvieji radikalai. MT yra itin svarbūs sunkiųjų metalų detoksikacijai ir ląstelėje veikia kaip antioksidantai. Pirmiausia jie buvo izoliuoti kaip kadmį prisijungiantys mažo molekulinio svorio baltymai arklių inkstuose (Takahashi, 2012). Žmonėse dauguma MT genų yra randami išsidėstę klasteryje 16q13 chromosomoje ir koduoja virš dešimties identifikuotų funkcionalių baltymų (Takahashi, 2012).

Žinduoliuose randami keturių grupių metalotioneinai. Pirmosios ir antrosios grupės raiška vyksta visuose organuose įskaitant kepenis, o trečiosios ir ketvirtosios grupės yra raiška vyksta atitinkamai smegenų audinyje ir suragėjusiose epitelinėse ląstelėse (Sun et al., 2016). Viena metalotioneinų molekulė gali prisijungti 7 cinko atomus ir taip paveikti ląstelinio cinko kiekį. Jie taip pat prisijungia citotoksines medžiagas, tokias kaip alkilinantys faktoriai, ir taip gali padėti

įgyti atsparumą priešvėžiniams vaistams. Per didelę metalotioneinų raiška yra susijusi su atsparumu chemoterapijai karcinomos ląstelėse, nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių linijose, liežuvio vėžio suragėjusios karcinomos ląstelių linijose, skrandžio vėžio ląstelių linijose, gimdos karcinomos ląstelių linijose ir osteosarkomose (Mehrian-Shai et al., 2015). 1.6 paveiksle parodyti veiksniai, kurie indukuoja metalotioneinų genų raiškos padidėjimą ir jos poveikį kitiems ląstelėje vykstantiems procesams.



1.6 pav. Metalotioneinų genų raiškai įtaką darančių veiksnių schema (Takahashi, 2012)

1.6.1. Metalotioneinų šeimos genų raiška vėžio atveju

Normaliame prostatos audinyje yra randami beveik visi funkcionalūs MT-1 ir MT-2 grupių baltymai, tačiau yra duomenų, kad padidėjusi MT1X izoformos raiška yra dažnai nustatoma pažengusio prostatos vėžio atveju. Manoma, kad MT-1 ir MT-2 grupių izoformos gali būti susijusios su krūties, žarnyno ir prostatos vėžio proliferaciniu aktyvumu (Thirumoorthy et al., 2011). Iš mikrogardelių duomenų yra žinoma, kad *MT1H* geno raiška yra sumažėjusi keliuose žmogaus vėžiniuose susirgimuose, įskaitant prostatos, krūties, žarnyno, šlapimo pūslės vėžį, leukemiją, B-ląstelių limfomą, neuroblastomą, smulkialąstelinį plaučių vėžį ir melanomą (Han et al., 2013) Žema šio geno raiška yra susijusi su prastu prostatos vėžiu sergančių ligonių išgyvenamumu. Padidėjusi *MT2A* geno raiška gali būti panaudojama kaip chemoterapijos jautrumo žymuo skrandžio vėžiu sergantiems ligoniams. Be to, skrandžio vėžio atveju *MT2A* gali veikti kaip antionkogenas, inhibuojantis NF-κB faktorių, todėl gali būti naudojamas kaip prognostinis šios ligos biožymuo (Ling et al., 2016). Remiantis Oncomine duomenų baze

(<https://www.oncomine.org/>), prostatos navikuose *MT1B*, *MT1F*, *MT1G*, *MT1H* ir *MT1X* genų raiška yra sumažėjusi lyginant su normaliais prostatos audiniais (Hung et al., 2019).

1.7. Histonus modifikuojančius baltymus koduojantys genai

Histonus sudarantys baltymai – patys svarbiausi struktūriniai nukleosomos komponentai, fundamentalūs chromatino vienetai. Jie yra itin konservatyvūs ir jungiasi su neigiamai įkrauta DNR per įvairias elektrostazines sąveikas (Liao, Xu, 2019). Histonų modifikacija specifinėse srityse, tokiose kaip promotoriai ir enhanseriai, dažniausiai yra nekintama, nors nedidelis skaičius šių variacijų vis tiek yra dinamiškos. Histonų modifikacijos reguliuoja genų raišką ir yra svarbios žmogaus biologijoje, nors kai kurios iš jų yra susijusios su kancerogenezės procesu. Vėžinių ląstelių tyrimai parodė, kad histonų modifikacijos įvyksta atskiruose genuose ar viso branduolio genomo lygiu ankstyvosiose vėžio stadijose ir kaupiasi toliau formuojantis navikams. Histonų modifikacijos mechanizmų supratimas vėžinėse ląstelėse gali padėti gydyti onkologines ligas (Cheng et al., 2019). Vienos iš dažniausių histonų modifikacijų – metilinimas ir acetilinimas, todėl apie šias modifikacijas atliekančius fermentus yra aprašyta išsamiau tolimesniuose poskyriuose.

1.7.1. Histonų metiltransferazės

Fermentai, kurie yra atsakingi už cheminių grupių pridėjimą ant DNR ar histonų uodegų yra vadinami „rašytojais“. Histonų metiltransferazės ir atlieka vieną iš „rašytojų“ vaidmenų. Fermentinis histonų metilinimas yra atliekamas lizino metiltransferazių (KMT šeima) bei arginino metiltransferazių (PRMT šeima), o S-adenozil-L-metioninas (SAM) yra naudojamas kaip metilo grupės donoras. Lizinas histonų uodegose gali būti mono-, di- ar trimetilintas, o argininas – mono- arba dimetilintas (Morera et al., 2016).

PRMT šeimai priklauso 7 genai (PRMT 1-7), kurie koduoja baltymus, svarbius tiek ląstelių vystymosi metu, tiek diferenciacijoje, taip pat jie aktyvuoja kitų genų transkripciją. KMT genų šeimai priskiriamos 8 grupės genų (KMT 1-8). Vienas geriausiai žinomų genų – *MLL5* (*KMT2E*), kurio koduojamo fermento per didelė raiška lemia ląstelės ciklo stabdymą. Jis yra siejamas su mieloidinės leukemijos išsivystymu (Damm et al., 2011). Onkologinių ligų moksliniuose straipsniuose dažnai minimas *KMT5A* (*SETD8*) genas, kurio raiška yra itin padidėjusi šlapimo pūslės, plaučių karcinomos, chroniškos mieloidinės leukemijos, kepenų karcinomos ir kasos vėžio atvejais. Manoma, kad šio geno raiškos sutrikimai prisideda prie vėžio invazyvumo bei metastazių plitimo per susijungimą su TWIST baltymu (Milite et al., 2016).

1.7.2. Histonų demetilazės

Histonų demetilazės – molekuliniai „trintukai“, kurie nuo histonų molekulių pašalina metilo grupes. Iki 2000 m. histonų metilinimas buvo traktuojamas kaip stabili modifikacija be galimybės grįžti atgal. Šiuo metu jau yra atrasta nemažai histonų demetilazių, kurios yra skirstomos į dvi klases pagal jų sekos homologiją ir katalitinį mechanizmą. Pirma klasė yra nuo flavino-adenino dinukleotido (FAD) priklausančios aminooksidazės ir jos šalina metilo grupes nuo mono- ir dimetilintų H3K4 histonų juos oksiduodamos (LSD šeima), o antra klasė savo sudėtyje turi JumonjiC domeną ir katalizuoja demetilinimą nuo lizino liekanų kitose histonų vietose (Kaniskan et al., 2018).

Šiuo metu LSD baltymų šeimai priklauso dvi demetilazės – *LSD1* ir *LSD2*. Jos abi yra pakankamai konservatyvios. *LSD1* veikia kaip koaktyvatorius ir korepresorius, jo raiška užfiksuota prostatos audiniuose. Šių baltymų veikimui yra būtinas imino jonas jų katalitiniame centre, o demetilazės su JumonjiC domenu veikia visiškai kitaip. JumonjiC demetilazės yra oksigenazės, kurių katalitiniame centre veikia geležies jonas ir kaip substratas naudojamas α -ketoglutaratas (Hoffmann et al., 2012). Šie fermentai susiję ir su vėžinėmis ligomis, ir jų vystymusi. Pavyzdžiui, *KDM3A* yra susijęs su androgenų receptorių aktyvumo koreguliacija, svarbus nuo hormonų priklausomame transkripciniame aktyvavime. Ši demetilazė skatina androgenų receptoriaus 7 varianto (angl. Androgen Receptor Splice Variant 7, AR-V7) alternatyvų splaisingą (Fan et al., 2018). *KDM5D* genas valdo androgenų receptoriaus geną, gali veikti spermatogenezę, taip pat yra įtrauktas į transkripcinę represiją genų, kurie yra susiję su metastazių atsiradimu. Prostatos vėžio atveju šis genas gali būti prarastas, o tai lemia atsparumą docetakseliui (Li et al., 2016). Per didelė *PHF8* geno raiška skatina epitelinę-mezenchiminę tranziciją krūties vėžio atveju, taip pat skatina ląstelių migraciją ir naviko augimą (Shao et al., 2017).

1.7.3. Histonų acetiltransferazės ir deacetilazės

Histonų acetiltransferazės (angl. histone acetiltransferase, HAT) katalizuoja lizino liekanų acetilinimą – tai yra pripažįstama kaip viena svarbiausių epigenetinių modifikacijų. Skirstomos į citoplazminio A tipo ir branduolinio B tipo histonų acetiltransferazes. Branduolinio tipo HAT dar smulkiau skirstomos į penkias dideles šeimas (GNAT, CBP, MYST, transkripcijos faktorių HAT, branduolio receptorių HAT). Nustatyta, kad dėl savo sugebėjimo reguliuoti kitų genų raišką, apoptozę, ląstelės ciklo veiksmus, šie fermentai dalyvauja neurodegeneratyvinių ir onkologinių ligų susidaryme bei vystymesi (Schneider et al., 2013).

Histonų deacetilazės (angl. histone deacetylase, HDAC) veikia kaip „trintukai“ – ištrina acetilo grupės žymes, kurias „įrašė“ HAT fermentai. Remiantis pastarųjų metų tyrimais, HDAC fermentų sukeliamas nenormalus deacetilimas yra susijęs su įvairiais vėžiniais atvejais (Wang et al., 2014). HDAC genų raiškos lygis yra pakilęs hematologiniuose vėžiuose (Sanaei, Kavooosi, 2019). Žmoguje yra randama 18 HDAC šeimai priklausančių fermentų ir jie yra suklasifikuoti į keturias pagrindines grupes pagal jų homologiją su mielių HDAC. Pirmai klasei priskiriamos HDAC1, HDAC2, HDAC3 ir HDAC8, antrai – HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, HDAC6 ir HDAC10, trečiai – SIRT1-7, ketvirtai – HDAC11. Pagal buvimo vietą šios deacetilazės yra priskiriamos branduolinėms (A tipas) ir citoplazminėms (B tipas) HDAC. Visos HDAC izoformos yra aptinkamos prostatos vėžio atveju ir jų raiška yra skirtinga. HDAC5 ir HDAC8 baltymai nėra aptikti prostatos ląstelėse, o HDAC4 baltymas manoma, kad yra lokalizuotas GPH ir ankstyvo prostatos vėžio ląstelių citoplazmoje. Dažniausiai HDAC raiška prostatos vėžio atveju aptinkama epitelinėse ir stromos ląstelėse (Sanaei, Kavooosi, 2019).

1.7.4. Histonus modifikuojančių genų raiškos tyrimai vėžinių (prostatos) susirgimų atvejais

Prostatos audinyje vėžinių susirgimų atvejais įvyksta daug fermentinių pokyčių, kurie padeda arba trukdo toliau vystytis vėžinėms ląstelėms. Nemažai tų fermentų yra susiję su histonų modifikacijomis, pavyzdžiui, metiltransferazėmis, demetilazėmis, acetiltransferazėmis, deacetilazėmis. Tyrimais nustatyta, kad *KAT2A (GCN5)* geno raiška prostatos vėžio atveju skatina ląstelių proliferaciją, apoptozę, epitelinę – mezenchiminę tranziciją. Žemesnis *KAT2B (PCAF)* kiekis yra susijęs su atsparumu 5-FU chemoterapijai. *MYST1* geno raiška skatina ląstelių epitelinę – mezenchiminę tranziciją, atsparumą terapijai, agresyvų naviko augimą ir metastazių susidarymą (Cheng et al., 2019). *EZH2* geno raiška yra padidėjusi prostatos navikuose, todėl šio fermento atliekamos funkcijos taip pat dažniau įvyksta vėžiniame audinyje ir yra susijusios su metastazių atsiradimu (Dobosy et al., 2007).

Prostatos vėžio progresija yra siejama su histonus modifikuojančių genų raiškos padidėjimu, kuris lemia koduojamų fermentų kiekio padidėjimą prostatos audinyje. Pavyzdžiui, aukštas *KDM1A* geno raiškos lygis yra susijęs su padidėjusia rizika prostatos vėžiui sugrįžti po pirminio sėkmingo gydymo (Perry et al., 2010). Padidėjusi *NSD2 (KMT3F)* geno raiška taip pat sietina su prostatos vėžio virtimu metastazuojančiu kastracijai atspariu prostatos vėžiu, o šio geno delecija lemia sumažėjusią ląstelių proliferaciją įvairiose vėžinių ląstelių linijose (Husmann, Gozani, 2019). Sumažėjusi *KDM5D* geno raiška prostatos vėžio atveju iškreipia AR kelio reguliaciją ir dėl to sumažėja lagonių jautrumas gydymui docetakseliu. Ta pati hipotezė

buvo patvirtinta ir su keliomis vėžinių ląstelių linijomis. Sumažėjusi šio geno raiška sietina su prasta ligos prognoze (Komura et al., 2016).

Dėl pakitusios histonus modifikuojančių genų raiškos PV atvejais, šiuos genus inhibuojantys/skatinantys veiksniai jau yra pritaikomi terapiniais tikslais. Pavyzdžiui, HDAC raiškos padidėjimas yra dažnai nustatomas vėžio atveju, todėl HDAC inhibitoriai, tokie kaip fenilbutiratas, romidepsinas, hidroksamininės rūgštys veikia prieš navikų susidarymą. HAT inhibitoriai šiuo metu taip pat stipriai tyrinėjami klinikiniuose tyrimuose ir kol kas rezultatai yra daug žadantys – C646 smulki sintetinė molekulė inhibuoja p300 veikimą per AR inhibiciją NF- κ B signaliniame kelyje ir sukelia vėžinių ląstelių apoptozę (Graça et al., 2016).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Ligoniai ir mėginiai

Į tyrimą buvo įtraukta 130 ligonių, sergančių PV arba gerybine prostatos hiperplazija (GPH). Iš šių ligonių gauti mėginiai buvo įtraukti į metalotioneinų ir histonus modifikuojančių genų raiškos tyrimus (2.1 lentelė). Audiniai tyrimams buvo surinkti anksčiau vykdytų projektų metu (MIP-109/2010 ir LIG-14/2012). Tyrimui buvo gautas Lietuvos Bioetikos komiteto leidimas su pratęsimais.

2.1 lentelė. Į tyrimą įtrauktos tiriamosios grupės

Tiriami genai	Patologija ir mėginių tipas	Ligoniai, n	Mėginiai, n
<i>MT1E</i> , <i>MT1G</i> , <i>MT1M</i>	PV	91	77
	Nenavikiniai prostatos audiniai (NPA)		25
	GPH		17
<i>KDM3A</i> , <i>KDM5D</i> , <i>KMT5A</i> , <i>PHF8</i>	PV	114	98
	NPA		28
	GPH	16	16

PV ir GPH sergančių ligonių visos klinikinės-patologinės charakteristikos pateiktos 1-2 prieduose.

Tyrimo dalyvavę PV audiniai buvo suskirstyti ir pagal ligos agresyvumo tipą: jei biocheminė ligos progresija atsirado per ≤ 6 mėn. – tai laikoma greitai progresuojančiais navikais; per ≥ 6 mėn. – lėtai progresuojančiais navikais, visi kiti likę – neprogresuojantys navikai. Detalesnis mėginių pasiskirstymas vykdytuose tyrimuose nurodytas 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Mėginių pasiskirstymas genų raiškos tyrimuose pagal ligos agresyvumo tipą

Tiriami genai	Greitai progresavę navikai, n	Lėtai progresavę navikai, n	Neprogresavę navikai, n
<i>MT1E</i> , <i>MT1G</i> , <i>MT1M</i>	16	14	45
<i>KDM3A</i> , <i>KDM5D</i> , <i>KMT5A</i> , <i>PHF8</i>	17	19	61

2.2. Reagentai

Medžiagos ir rinkiniai, naudoti RNR išskyrimui, komplementarios DNR (kDNR) sintezei, realaus laiko (kiekybinei) PGR (kPGR) ir RNR elektroforezei agarozės gelyje, nurodyti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Naudotų reagentų ir rinkinių sąrašas

Medžiaga	Gamintojas
≥96 % etanolis (Kat. nr. 603-002-00-5)	Vilniaus degtinė, Lietuva
Agarozės milteliai, 100 g (Kat. nr. #R0491)	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
50X TAE elektroforezės buferis (Kat. nr. #B49)	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
2X realaus laiko PGR mišinys „Applied Biosystems TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG” (Kat. nr. 4440049)	Thermo Fisher Scientific, JAV
RNR skyrimo rinkinys „Ambion <i>mirVana</i> ™ miRNA Isolation Kit, with phenol“ (Kat. nr. AM1560), kurį sudaro: <ul style="list-style-type: none">○ miRNR Wash Solution 1, 30 ml koncentratas;○ Wash Solution 2/3, 50 ml koncentratas;○ Lizės/prisijungimo buferis, 100 ml;○ miRNR Homogenate Additive, 10 ml;○ Rūgštinis fenolis/chloroformas, 100ml;○ Eliucijos buferis, 5 ml;○ Surinkimo mėgintuvėliai, 80 vnt.;○ Filtrinės kolonėlės, 40 vnt.	Thermo Fisher Scientific, JAV
kDNR sintezės rinkinys „Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor“ (Kat. nr. 4374966), kurį sudaro: <ul style="list-style-type: none">○ 10X atvirkštinės transkriptazės (RT) buferis, 1 ml;○ 10X RT atsitiktinių pradmenų mišinys, 1 ml;○ 25X dNTP mišinys, 100mM, 0,2 ml;	Thermo Fisher Scientific, Lietuva

<ul style="list-style-type: none"> ○ MultiScribe™ atvirkštinė transkriptazė (RTase), 50 U/μl, 0,2 ml; ○ RNazių inhibitorius, 20U/μl, 2 x 0,1 ml. 	
2X RNR užnešimo dažas (Kat. nr. #R0641)	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
RNR ilgio žymuo “RiboRuler High Range RNA Ladder” (Kat. nr. #SM1821)	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Genų raiškos pradmenų rinkiniai „Applied Biosystems TagMan™ Gene Expression Assays“ (Kat. nr. 4331182): <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>HPRT1</i> (Hs02800695_m1) ○ <i>MT1E</i> (Hs01582977_gH) ○ <i>MT1G</i> (Hs01584215_g1) ○ <i>MT1M</i> (Hs00828387_g1) ○ <i>KDM3A</i> (Hs00218331_m1) ○ <i>KDM5D</i> (Hs00190491_m1) ○ <i>KMT5A</i> (Hs01029948_m1) ○ <i>PHF8</i> (Hs00697293_m1) 	Thermo Fisher Scientific, Lietuva

2.3. RNR išskyrimas iš prostatos audinių

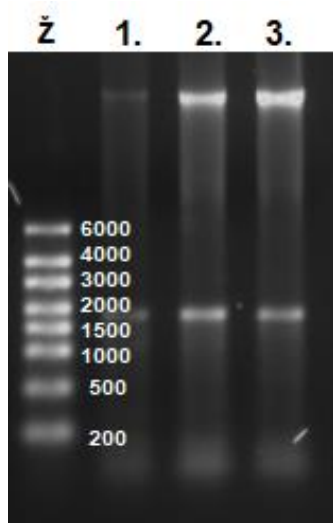
Prostatos audiniai buvo mechaniškai homogenizuoti naudojant specialius mėgintuvėlius tissueTUBEs TT1 cryoPREP™ CP02 Impactor prietaisu (Covaris, Inc.). Visuminė RNR buvo išskirta „mirVana™ miRNA Isolation kit“ rinkiniu pagal gamintojo protokolą. Į 20 – 50 mg mėginio pilama 500 μl lizės buferio, gerai išmaišoma ir inkubuojama lede. Pilama 50 μl miRNA Homogenate Additive, gerai išmaišoma ir inkubuojama lede iki 10 min., po to pilama 500 μl rūgštinio fenolio/chloroformo, maišoma purtykle (MS3 basic, IKA) apie 30-60 sek., centrifuguojama 5 min. 10000 g kambario temperatūroje (centrifuga Eppendorf 5424). Viršutinė fazė atsargiai perkeliama į naują mėgintuvėlį, pilama 625 μl 96 % etanolio, gerai išmaišoma. Į kolonėlę su surenkamuoju mėgintuvėliu perkeliama 700 μl mėginio, centrifuguojama 15 sek. 10000 g, filtratas išpilamas, o į kolonėlę perkeliamas likęs mėginio tūris, procedūra pakartojama. Į kolonėlę pilama 700 μl miRNA Wash Solution 1, centrifuguojama 10-15 sek. 10000 g, filtratas pašalinamas. Pilama 500 μl Wash Solution 2/3, centrifuguojama 10-15 sek. 10000 g, filtratas pašalinamas. Pakartotinai pilama 500 μl Wash Solution 2/3, centrifuguojama 10-15 sek. 10000 g,

filtratas pašalinamas. Kolonėlė perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, pilama 100 µl 95 °C eluicijos buferio, centrifuguojama 20-30 sek. 10000 g.

Išskirta RNR saugoma -20 °C arba iš karto tiriama. RNR koncentracija ir grynumas buvo spektrofotometriškai įvertinti NanoDrop 2000 aparatu (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

2.4. Elektroforezė agarozės gelyje

RNR buvo paruošta analizei agarozės gelyje: 1 µl mėginio (arba RNR ilgio žymens) sumaišomas su 1 µl 2X RNR užnešimo dažo, pakaitinama 70 °C 10 min., vėsinama ledo vonelėje 3 min. Į 1,5 % agarozės gelį, paruoštą su 1X TAE buferiu, užnešama po 1,9 µl mėginio/ilgio žymens, sumaišyto su dažu. Elektroforezė vykdoma 1 val., esant 100 V įtampai (srovės šaltinis PowerPac Basic, Bio-Rad). Rezultatai buvo vizualizuojami naudojant etidžio bromidą, gelis fotografuotas UV šviesoje GelDoc-It 310 (UVP) sistema, naudojant VisionWorksLS Analysis Software (UVP) programą (2.1 pav.).



2.1 pav. RNR analizės vizualizacija elektroforezės būdu agarozės gelyje. Ž – RNR ilgio žymuo, 1-3 – prostatos navikų RNR mėginiai.

2.5. Komplementarios DNR sintezė ir kiekybinė PGR

Komplementarios DNR sintezei buvo paimta 250 ng išskirtos RNR, ji tolimesniam tyrimui paruošta pagal gamintojo protokolą. Paruošiamas atvirkštinės transkriptazės mišinys, sudėtis vienam mėginiui nurodyta 2.4 lentelėje. Vienam mėginiui paruošti paimama 10 µl mišinio ir sumaišoma su 250 ng RNR. Mėginiai trumpai centrifuguojami, atliekama atvirkštinė transkripcija termocikleryje Mastercycler pro (Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Temperatūrinis režimas nurodytas 2.5 lentelėje.

2.4 lentelė. Komplementarios DNR sintezės mišinys vienam mėginiui

Komponentai	Galutinis kiekis/koncentracija
Benukleazis H ₂ O	iki 20 µl
10X atvirkštinės transkriptazės (RT) buferis	1X
25X dNTP mišinys, 100 mM	1X
10X RT atsitiktinių pradmenų mišinys	1X
MultiScribe™ atvirkštinė transkriptazė (RTase), 50 U/µl	0,02 U/µl
RNazių inhibitorius, 20 U/µl	1 µl
RNR	250 ng

2.5 lentelė. Komplementarios DNR sintezės reakcijos sąlygos

Temperatūra	Trukmė
25 °C	10 min.
37 °C	120 min.
85 °C	5 min.
4 °C	∞

Genų raiškos tyrimui kPGR metodu paruošiami mišiniai, atskiri kiekvienam tiriamam genui (*HPRT1*, *MT1E*, *MT1G*, *MT1M*, *KMT5A*, *KDM3A*, *KDM5D* ir *PHF8*), kurie tarpusavyje skiriasi pradmenimis; mišiniai vienam mėginiui nurodyti 2.6 lentelėje. *HPRT1* genas naudotas kaip endogeninė kontrolė bendram genų raiškos normalizavimui. Į kiekvieną eksperimentą įtraukiama taršos kontrolė kiekvieno analizuojamo geno atveju.

2.6 lentelė. Kiekybinės PGR mišinio sudėtis vienam mėginiui

Komponentai	Galutinis kiekis/koncentracija
H ₂ O	iki 20 µl
2X Applied Biosystems TagMan™ Universal Master Mix, no UNG	1X
20X Applied Biosystems TagMan™ Assay	0,4 µl
kDNR	2 µl

Reakcija vykdoma 96 šulinėlių twin.tec Eppendorf PGR plokštelėse (Kat. nr. 951020346), kiekvienas mėginys tiriamas atliekant du arba tris (atitinkamai *KMT5A*, *KDM3A*, *KDM5D* ir *PHF8*; *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M*) PGR pakartojimus, o PGR plokštelės uždengiamos specialia PGR plėvele „Eppendorf PCR Film“ (Kat. nr. 0030127781). Centrifuguojama 2 min. 4000 g greičiu (Heraeus Megafuge 40, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Amplifikacija vykdoma realaus

laiko termociklieriu Mx3005P™ (Agilent Technologies, Santa Clara, JAV). Temperatūrinis režimas nurodytas 2.7 lentelėje.

2.7 lentelė. Kiekybinės PGR temperatūrinės sąlygos

Temperatūra	Trukmė	Ciklai
95 °C	10 min.	1
95 °C	15 sek.	40
60 °C	1 min.	

Duomenys buvo apdorojami MxPro QPCR 4.10 (Stratagene, JAV, 2007) ir GenEx 7 (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden) programomis. Santykinės genų raiškos reikšmės linijinėje skalėje buvo panaudotos statistinei analizei.

2.6. Statistinė analizė

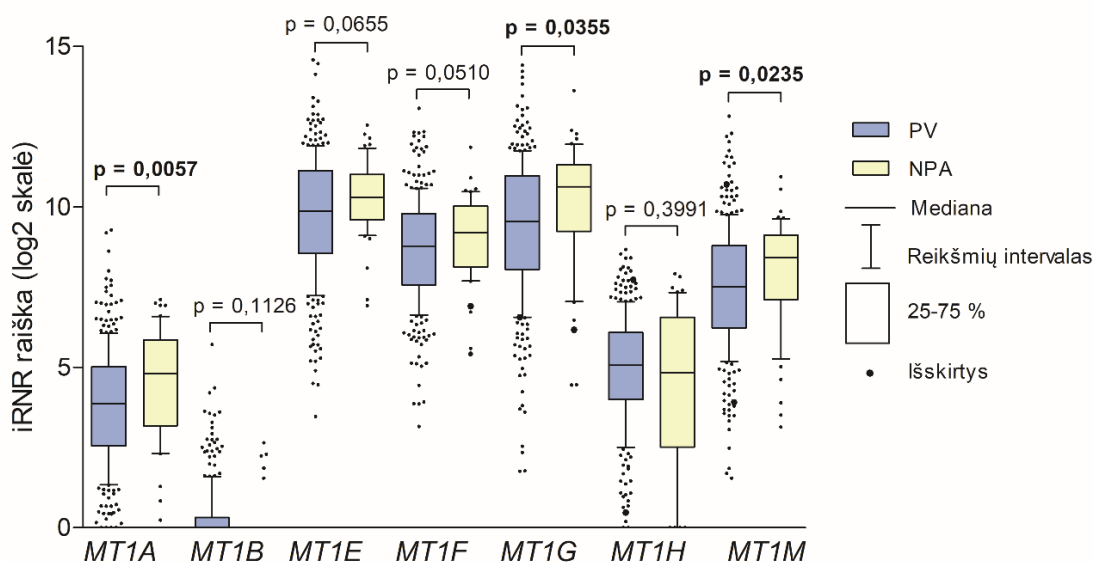
Remiantis bioinformatiniais metodais Vėžio genomo atlaso projekto (angl. The Cancer Genome Atlas, TCGA) prostatos adenokarcinomos (angl. prostate adenocarcinoma, PRAD) imtyje buvo išanalizuota metalotioneinų ir histonus modifikuojančių genų šeimoms priskiriamų genų raiška. Iš viso išanalizuoti 333 PV ir 52 NPA mėginių duomenys, ieškota sąsajų su duomenų bazėje pateiktais ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais. Taikyti t-testai, Manno-Vitnio U testas, skaičiuotas Spearman'o koreliacijos koeficientas. Duomenys analizei gauti iš duomenų bazių internete firebrowse.org (www.firebrowse.org) ir cbiportal.org (www.cbiportal.org) (Cerami et al., 2012). Buvo atlikta *MT1E*, *MT1G*, *MT1M*, *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A*, *PHF8* ir kitų epigenetinėje chromatinio reguliacijoje dalyvaujančių genų raiškos analizė ir ieškota sąsajų su ligonių klinikiniais-patologiniais rodikliais ir biochemine ligos progresija. Atliktas Manno-Vitnio U testas, taip pat skaičiuotas Spearman'o koreliacijos koeficientas. Biocheminės ligos progresijos duomenys vertinti atliekant Kaplano-Meierio analizę. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,0500$. Skaičiavimams ir rezultatų grafikams kurti naudotos Microsoft Office Excel 365 (Microsoft Corporation, JAV), Statistica 12.0 (StatSoft, JAV) ir GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, JAV) programos, veikiančios demonstracine versija.

3. REZULTATAI

3.1. Metalotioneinų genų raiškos analizė TCGA PRAD imtyje

3.1.1. Genų raiškos palyginimas PV ir NPA mėginiuose

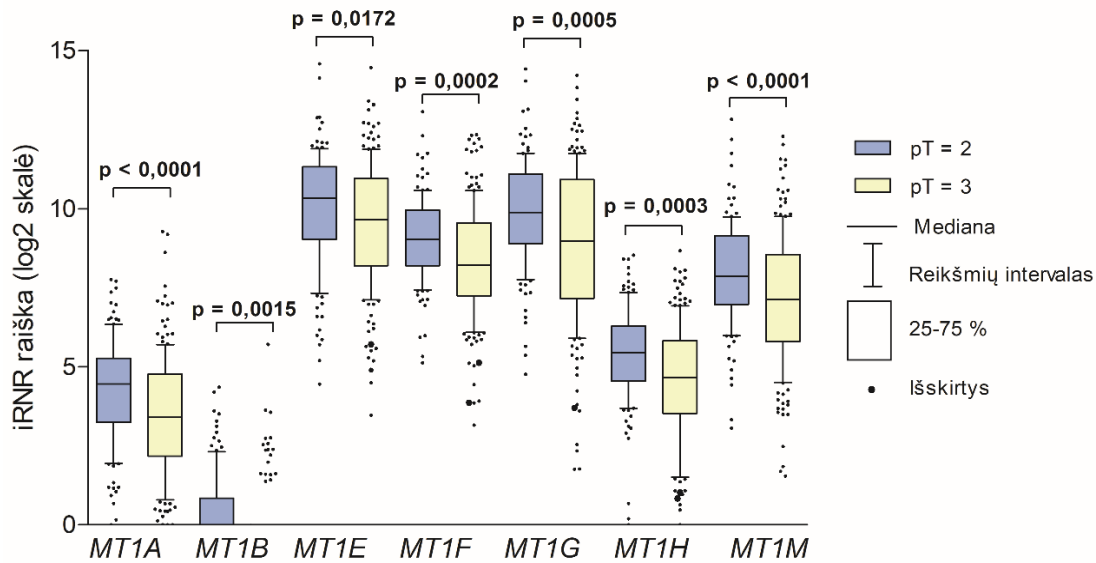
Remiantis duomenų bazėse esančia informacija, metalotioneinų genų *MT1A*, *MT1B*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1G*, *MT1H* ir *MT1M* raiška buvo išanalizuota TCGA PRAD imties PV (n = 333) ir NPA (n = 52) mėginiuose. Analizei naudoti trečio lygio RNR sekoskaitos duomenys iš duomenų bazės. Šioje imtyje nustatyta mažesnė *MT1A*, *MT1G* ir *MT1M* raiška PV mėginiuose lyginant su NPA (atitinkamai p = 0,0057, p = 0,0355 ir p = 0,0235), *MT1E* ir *MT1F* genų atveju stebėta tik analogiška tendencija (abu p > 0,0500; 3.1 pav.).



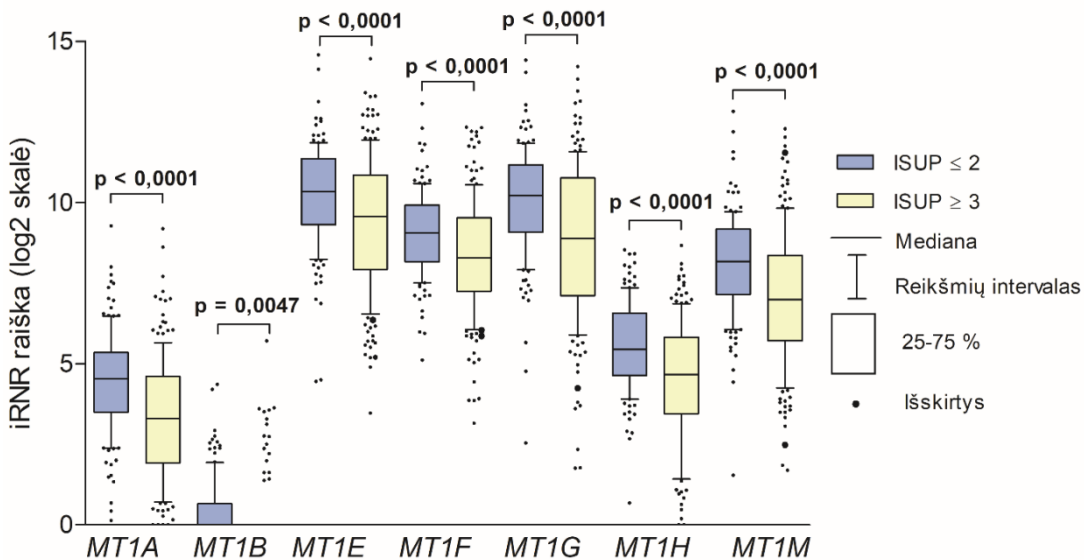
3.1 pav. Metalotioneinų genų raiškos skirtumai navikiniuose (PV) ir nenavikiniuose (NPA) audiniuose Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

3.1.2. Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais

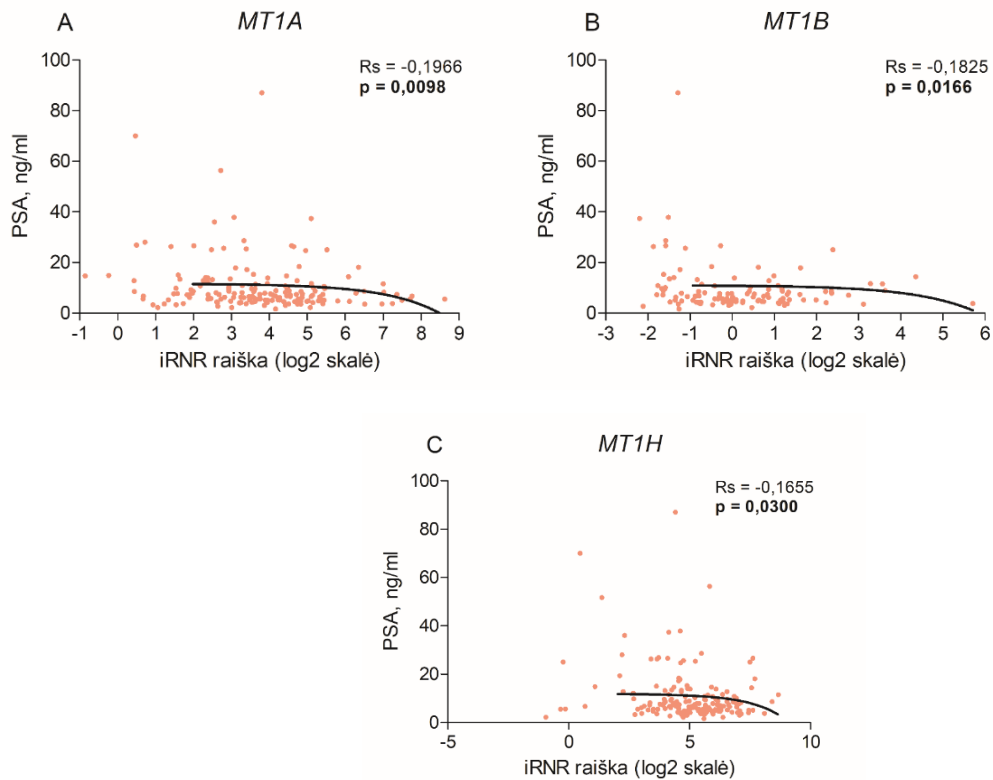
Suskirsčius navikus pagal stadiją ir ISUP kategoriją, buvo gauta, kad abiem atvejais didesnė *MT1A*, *MT1B*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1G*, *MT1H* ir *MT1M* genų raiška būdinga žemesnės naviko stadijos (pT = 2) ir žemesnės ISUP grupės (ISUP ≤ 2) navikams, palyginus su šių kriterijų aukštesnėmis kategorijomis (visais atvejais p < 0,0500; 3.2 ir 3.3 pav.). Be to, mažesnė *MT1A*, *MT1B* ir *MT1H* raiška koreliavo su aukštesne PSA koncentracija (atitinkamai p = 0,0098, p = 0,0166, p = 0,0300 ; 3.4 pav.).



3.2 pav. Metalotioneinų genų raiška pagal naviko stadiją pT Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

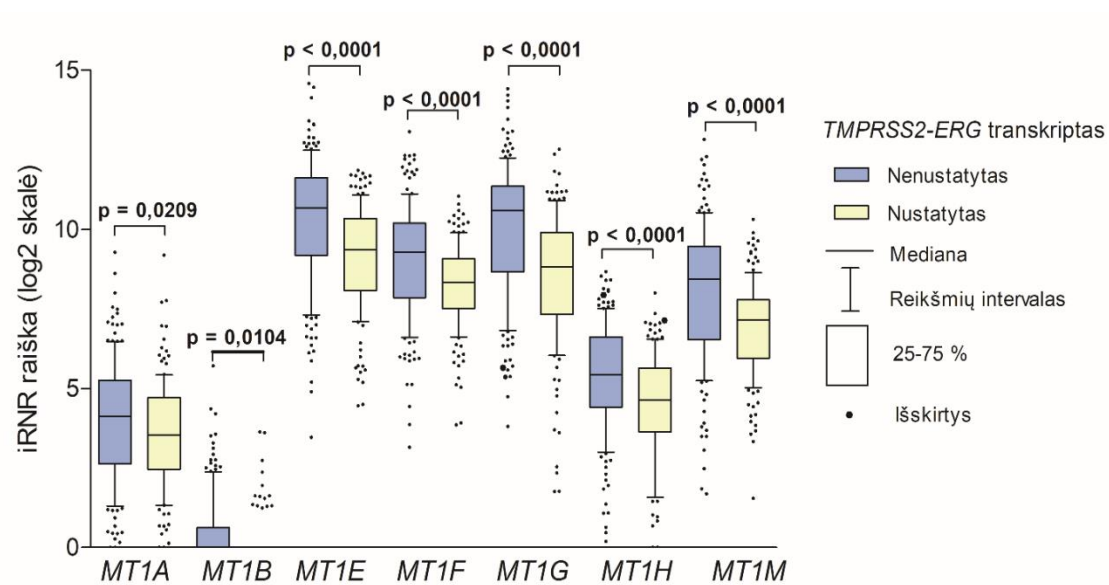


3.3 pav. Metalotioneinų genų raiška pagal ISUP grupę Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje



3.4 pav. *MT1A*, *MT1B* ir *MT1H* genų raiškos koreliacijos su prostatos specifinio antigeno (PSA) kiekiu kraujyje Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

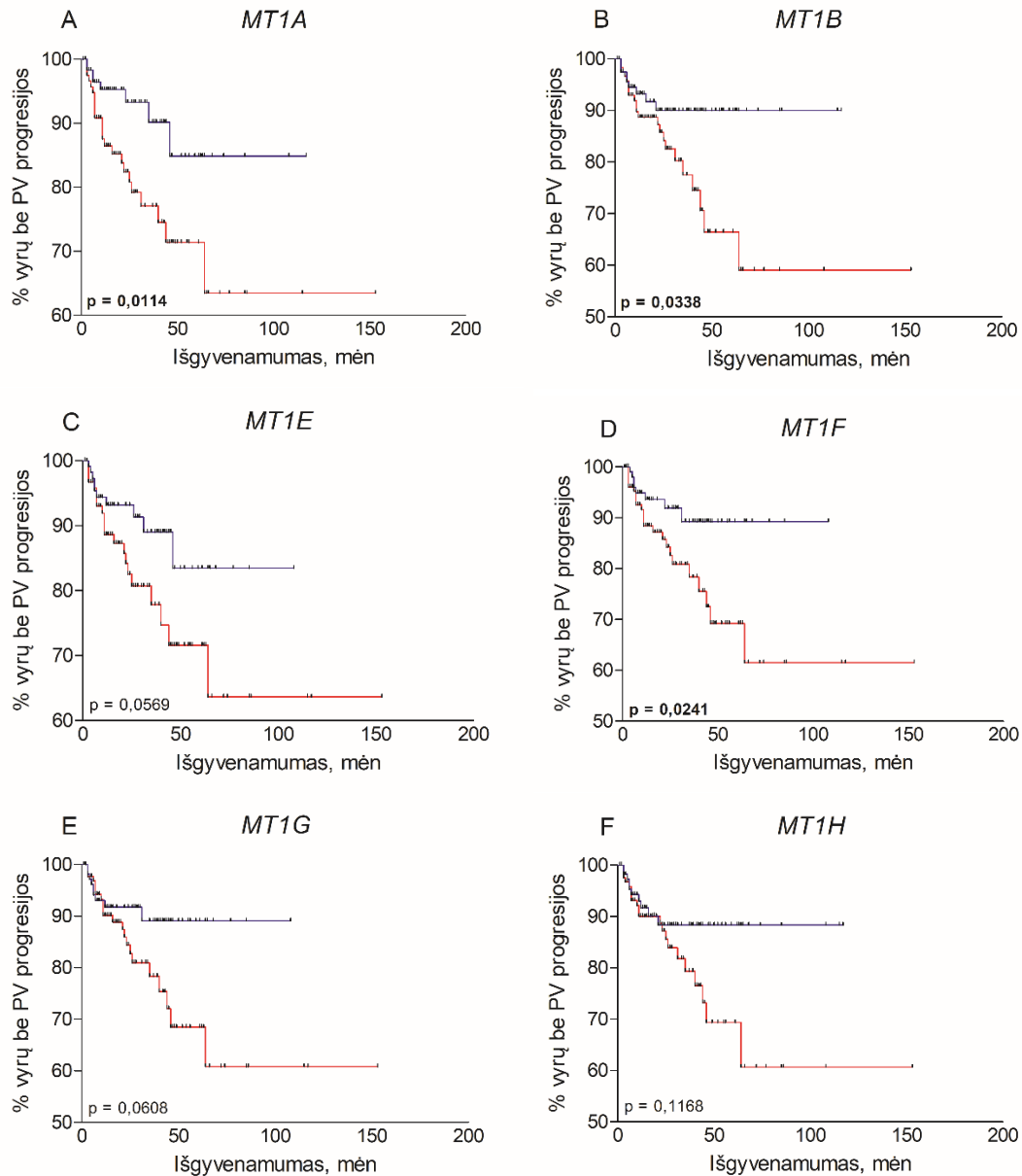
TCGA PRAD imtyje visų analizuotų metalotioneinų genų raiška buvo aukštesnė navikuose, kuriuose nustatytas sulietinis *TMPRSS2-ERG* transkriptas, palyginus su navikais, kuriuose šis transkriptas nedetektuotas (visi $p < 0,0500$; 3.5 pav.).

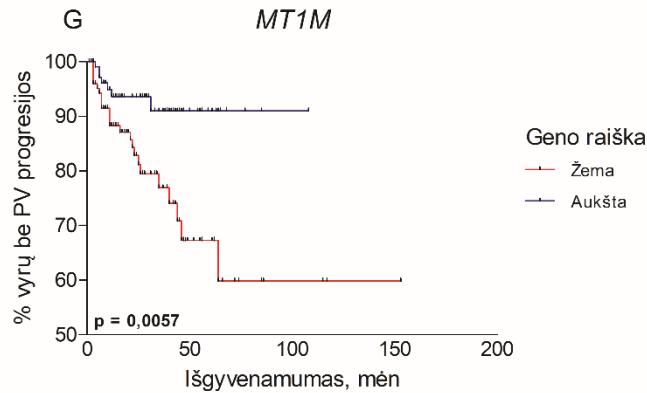


3.5 pav. Metalotioneinų genų raiškos skirtumai grupėse, kai nustatytas arba nenustatytas *TMPRSS2-ERG* transkriptas Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

3.1.3. Sąsajos su biochemine PV progresija

Kaplano-Meierio išgyvenamumo kreivių analizė parodė, kad esant santykinai mažesniai už medianą *MT1A*, *MT1B*, *MT1F* ir *MT1M* raiškos lygiui, PV ligonių išgyvenamumas be biocheminės ligos progresijos yra trumpesnis nei esant aukštesnei šių genų raiškai (visi $p < 0,0500$; 3.6 pav.). *MT1E*, *MT1G* ir *MT1H* genų atveju nustatytos tokios pačios tendencijos, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai patikimi (visi $p > 0,0500$; 3.6 pav.).



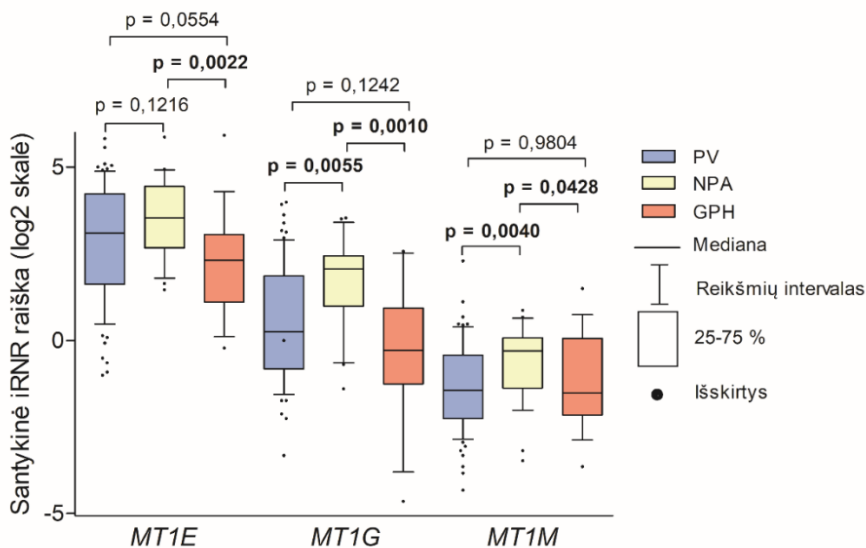


3.6 pav. Išgyvenamumo be biocheminės prostatos vėžio progresijos palyginimas pagal metalotioneinų genų raiškos lygį Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje. A – *MT1A*, B – *MT1B*, C – *MT1E*, D – *MT1F*, E – *MT1G*, F – *MT1H*, G – *MT1M*. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal medianą. Statistiškai reikšmingos p vertės paryškintos.

3.2. Metalotioneinų genų raiškos tyrimai PV sergančių ligonių mėginiuose

3.2.1. Genų raiškos analizė PV, NPA ir GPH audiniuose

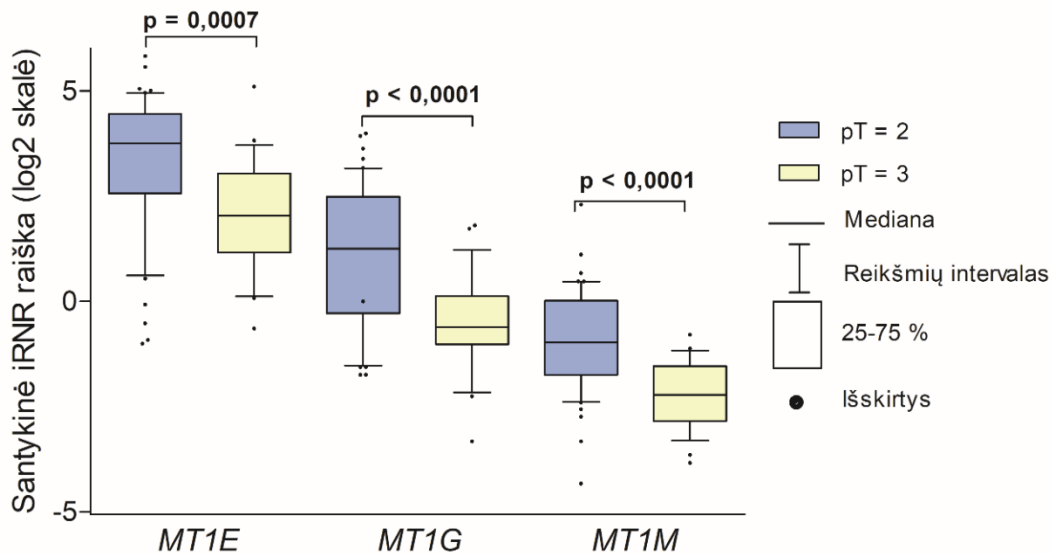
Remiantis TCGA PRAD imties analize bei atsižvelgiant į ankstesnių tyrimų metu gautus rezultatus (Demidenko et al., 2017; Maleckaite et al., 2019), *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiška kPGR metodu buvo ištirta 77 PV, 25 NPA ir 17 GPH mėginių. *MT1G* ir *MT1M* raiška PV mėginiuose buvo mažesnė lyginant su NPA (atitinkamai $p = 0,055$, $p = 0,0040$), tačiau reikšmingai nesiskyrė nuo GPH (visi $p > 0,0500$). GPH mėginiuose visų trijų genų raiška buvo mažesnė lyginant su NPA (visi $p < 0,0500$; 3.7 pav.).



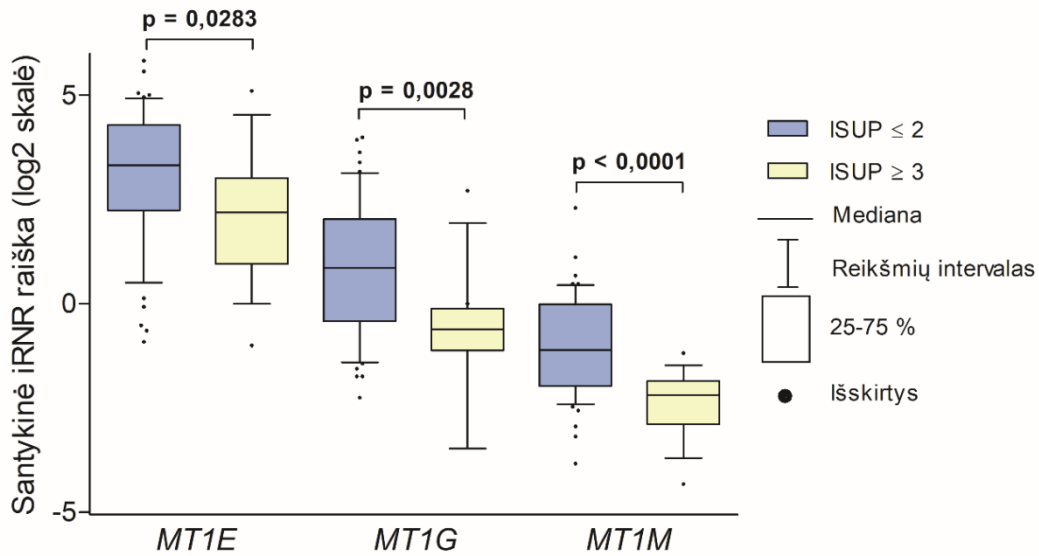
3.7 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos skirtumai navikiniuose (PV), nenavikiniuose (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) audiniuose

3.2.2. Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais

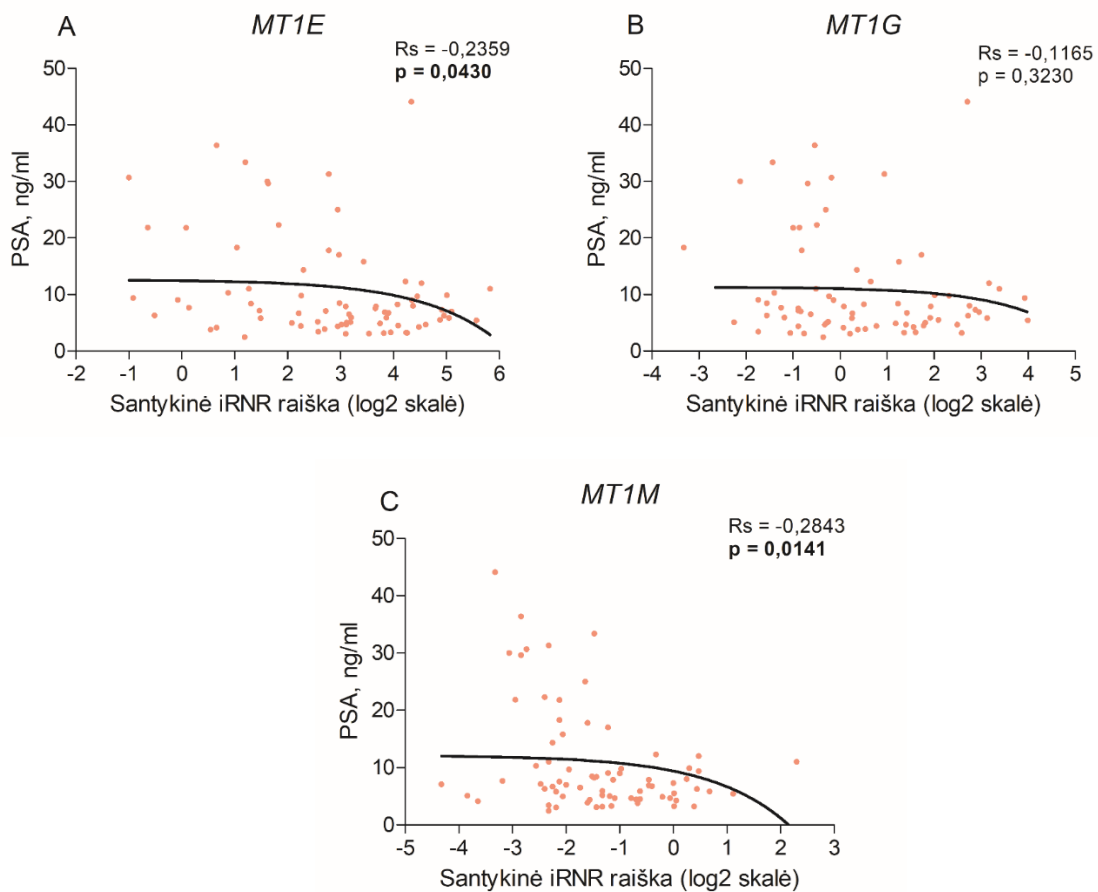
Palyginus *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos duomenis pagal naviko stadiją, buvo nustatyta, kad visų trijų genų raiška buvo aukštesnė pT2 stadijos navikuose lyginant su pT3 stadijos navikais (atitinkamai $p = 0,0007$, $p < 0,0001$ ir $p < 0,0001$; 3.8 pav.). Panašios tendencijos buvo nustatytos ir navikus suskirsčius pagal ISUP grupes. Visų trijų genų raiška buvo aukštesnė $ISUP \leq 2$ navikuose lyginant su $ISUP \geq 3$ navikais (atitinkamai $p = 0,0283$, $p = 0,0028$ ir $p < 0,0001$; 3.9 pav.). Be to, mažesnė *MT1E* ir *MT1M* raiška koreliavo su aukštesne PSA koncentracija (atitinkamai $p = 0,0430$, $p = 0,0141$; 3.10 pav.).



3.8 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiška pagal naviko stadiją pT

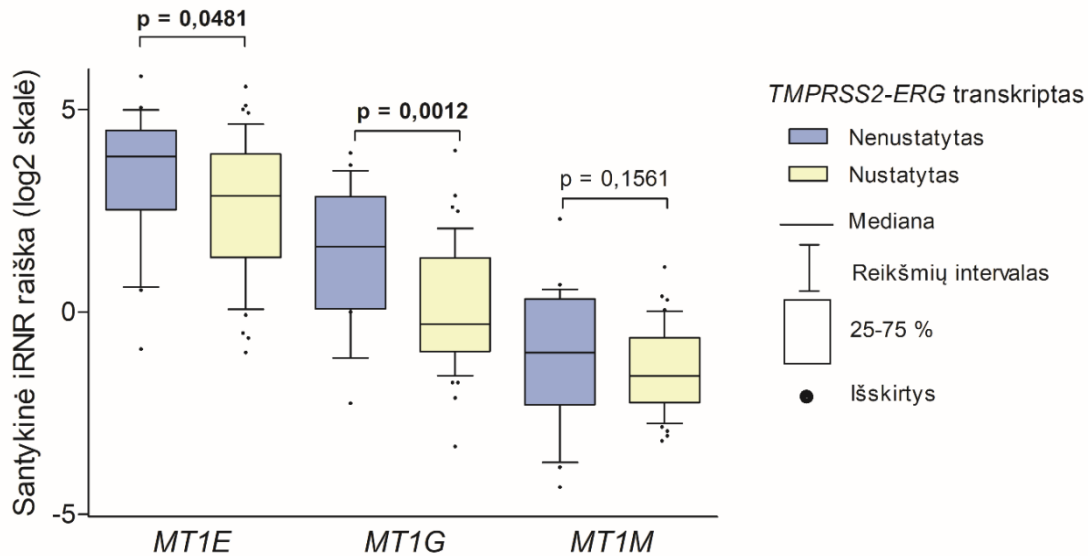


3.9 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiška pagal ISUP grupę



3.10 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos koreliacijos prostatos navikuose su prostatos specifinio antigeno (PAS) kiekiu ligonių kraujyje

Visų tirtų genų didesnė raiška užfiksuota PV mėginiuose, kuriuose *TMPRSS2-ERG* transkriptas nebuvo nustatytas, tačiau tik *MT1E* ir *MT1G* atvejais šie skirtumai buvo statistiškai patikimi (atitinkamai $p = 0,0481$ ir $p = 0,0012$; 3.11 pav.).

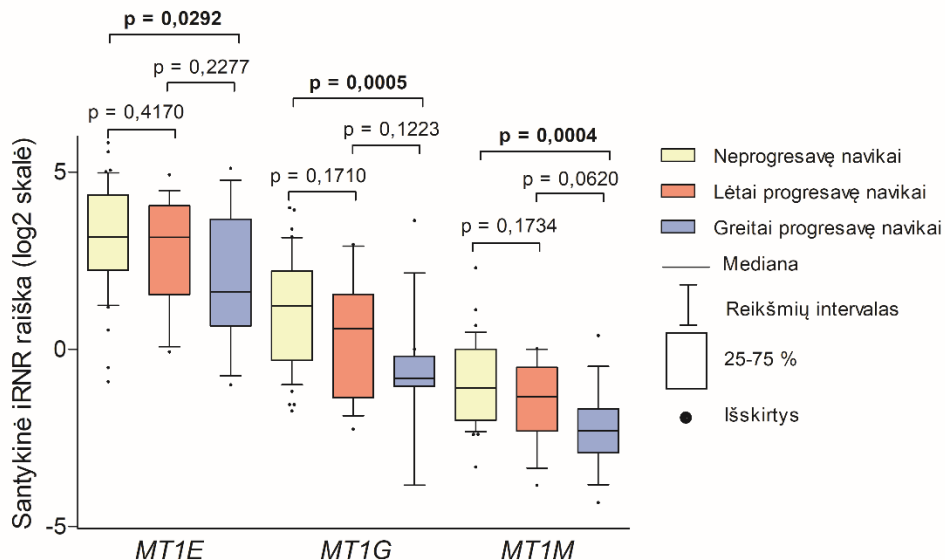


3.11 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos skirtumai navikuose, kuriuose buvo nustatytas arba nenustatytas *TMPRSS2-ERG* transkriptas

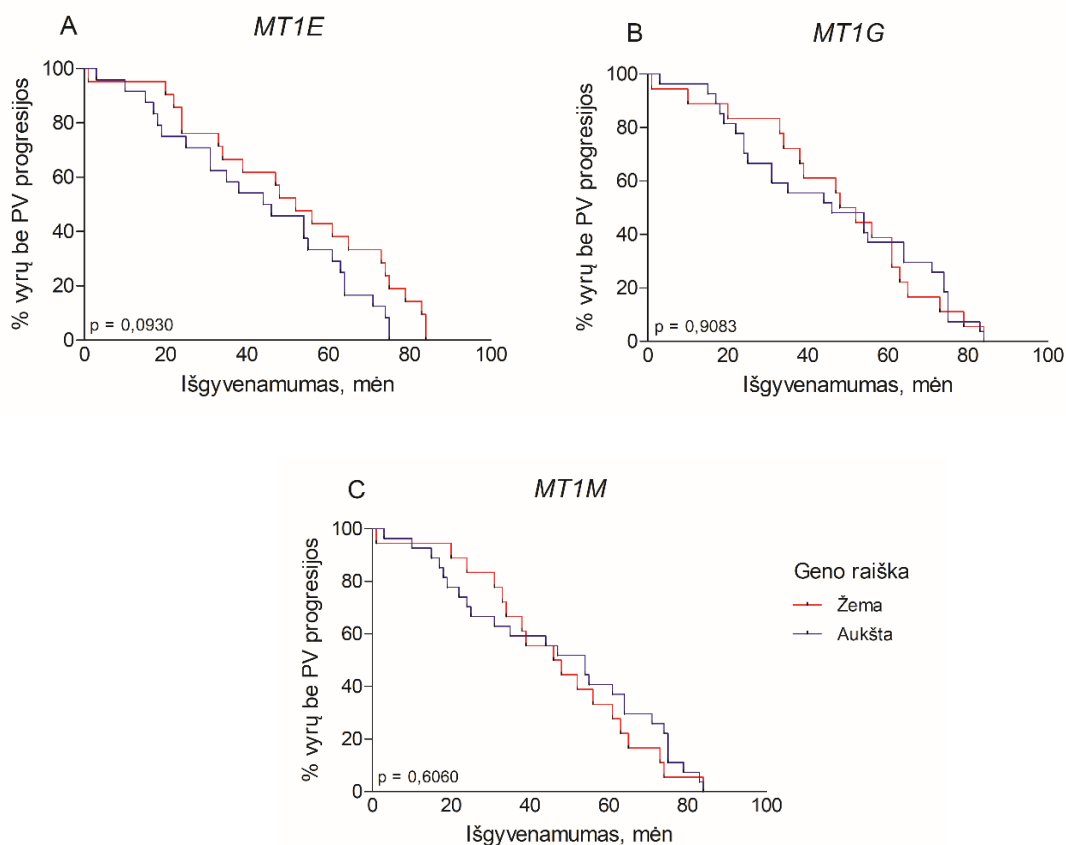
Sąsajų tarp *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos ir ligonių amžiaus bei prostatos masės nebuvo nustatyta.

3.2.3. Sąsajos su biochemine PV progresija

Analizuojant genų raišką PV audiniuose, tiriamieji buvo suskirstyti į tris grupes pagal biocheminę ligos progresiją: neprogresavę navikai, lėtai progresavę navikai (ligos biocheminė progresija pasireiškė vėliau nei per 6 mėn.) ir greitai progresavę navikai (ligos biocheminė progresija pasireiškė ne vėliau kaip per 6 mėn.). Palyginus *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raišką tarp šių grupių, stebėta genų raiškos mažėjimo tendencija didėjant vėžio agresyvumui. Statistiškai patikimi raiškos skirtumai nustatyti tarp neprogresavusių ir greitai progresavusių navikų grupių (atitinkamai $p = 0,0292$, $p = 0,0005$ ir $p = 0,0004$), o tarp lėtai progresavusių ir neprogresavusių bei tarp lėtai ir greitai progresavusių navikų grupių nei vieno iš tirtų genų raiška nesiskyrė (visi $p > 0,0500$; 3.12 pav.). Atlikus Kaplano-Meierio kreivių analizę, sąsajų tarp tirtų genų raiškos lygio ir laiko iki biocheminės ligos progresijos nenustatyta (visi $p > 0,0500$; 3.13 pav.).



3.12 pav. *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos skirtumai neprogresavusiuose, lėtai progresavusiuose ir greitai progresavusiuose navikuose

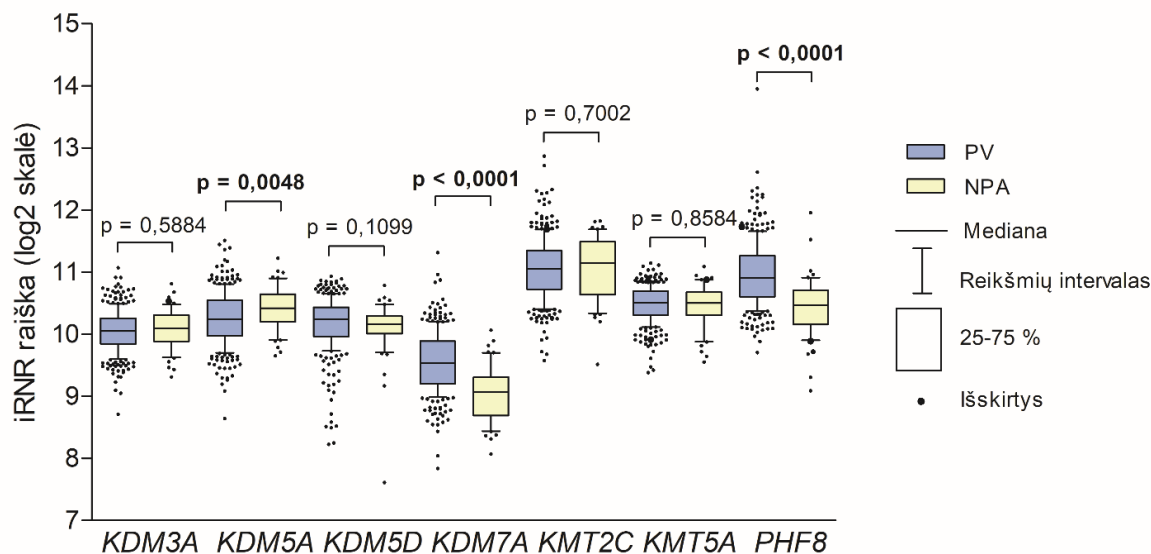


3.13 pav. Išgyvenamumo be biocheminės prostatos vėžio progresijos palyginimas pagal metalotioneinų genų raiškos lygį. A – *MT1E*, B – *MT1G*, C – *MT1M*. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal medianą

3.3. Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos analizė TCGA PRAD imtyje

3.3.1. Genų raiškos palyginimas PV ir NPA mėginiuose

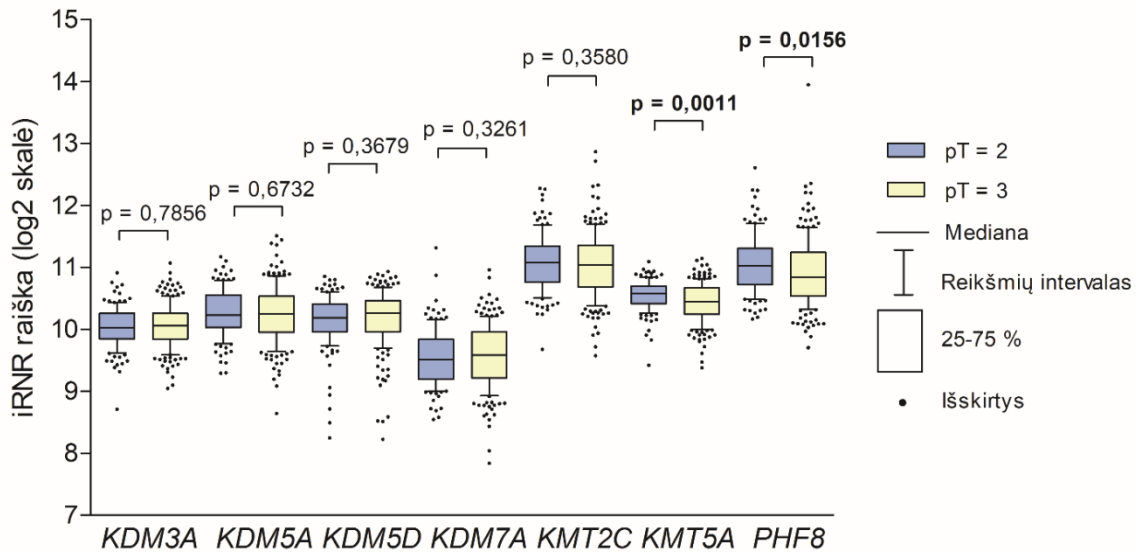
Remiantis duomenų bazėse esančia informacija, histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos analizė buvo atlikta TCGA PRAD imties PV (n = 333) ir NPA (n = 52) mėginiuose. Aukštesnė *KDM7A* ir *PHF8* genų raiška buvo PV mėginiuose lyginant su NPA (atitinkamai $p < 0,0001$ ir $p < 0,0001$), o *KDM5A* geno atveju – priešingai – NPA mėginiuose lyginant su PV ($p = 0,0048$; 3.14 pav.). Kitų 4 analizuotų genų atvejais statistiškai patikimų genų raiškos skirtumų tarp PV ir NPA audinių nustatyta nebuvo (visi $p > 0,0500$, 3.14 pav.).



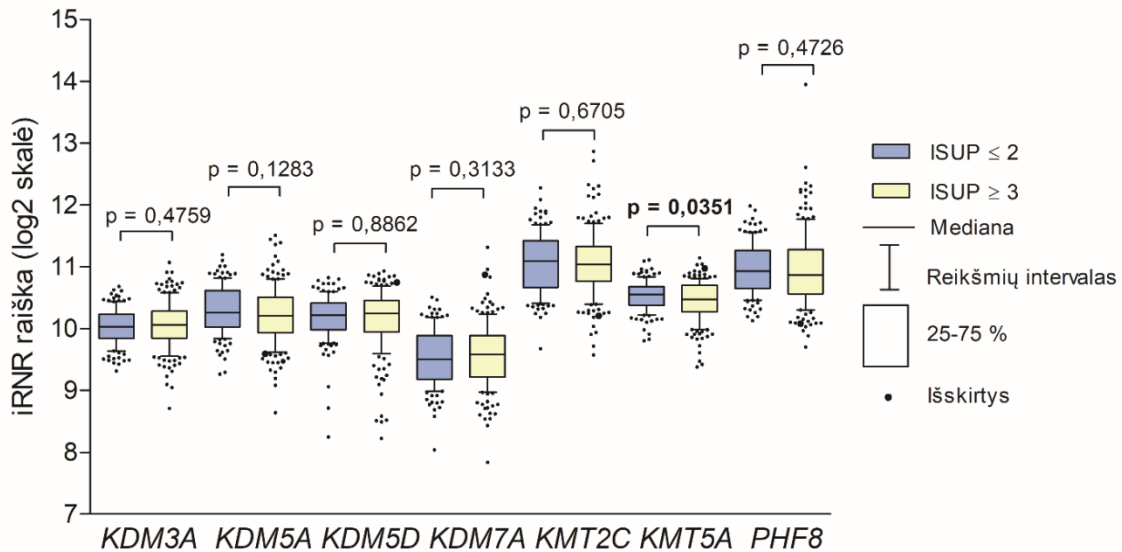
3.14 pav. Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos skirtumai navikiniuose (PV) ir nenavikiniuose (NPA) audiniuose Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

3.3.2. Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais

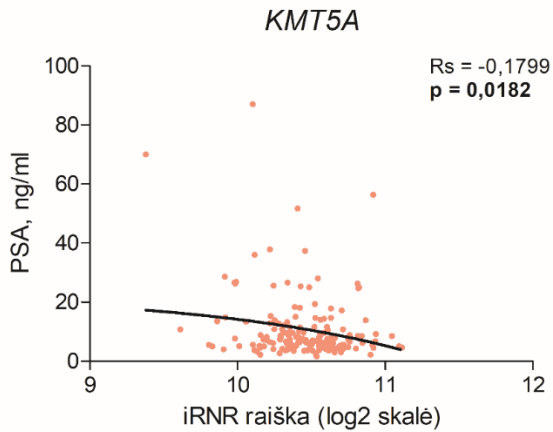
Suskirsčius navikus pagal stadiją ir ISUP grupę, buvo gauta, kad pirmuoju atveju *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška pT2 stadijos navikuose buvo statistiškai patikimai aukštesnė lyginant su pT3 stadijos navikais (atitinkamai $p = 0,0011$ ir $p = 0,0156$; 3.15 pav.). Antruoju atveju *KMT5A* geno raiška buvo patikimai aukštesnė ISUP ≤ 2 navikuose lyginant su ISUP ≥ 3 ($p = 0,0351$; 3.16 pav.). Mažesnė *KMT5A* geno raiška koreliavo su aukštesne PSA koncentracija ($p = 0,0182$, 3.17 pav.).



3.15 pav. Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiška pagal naviko stadiją pT Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

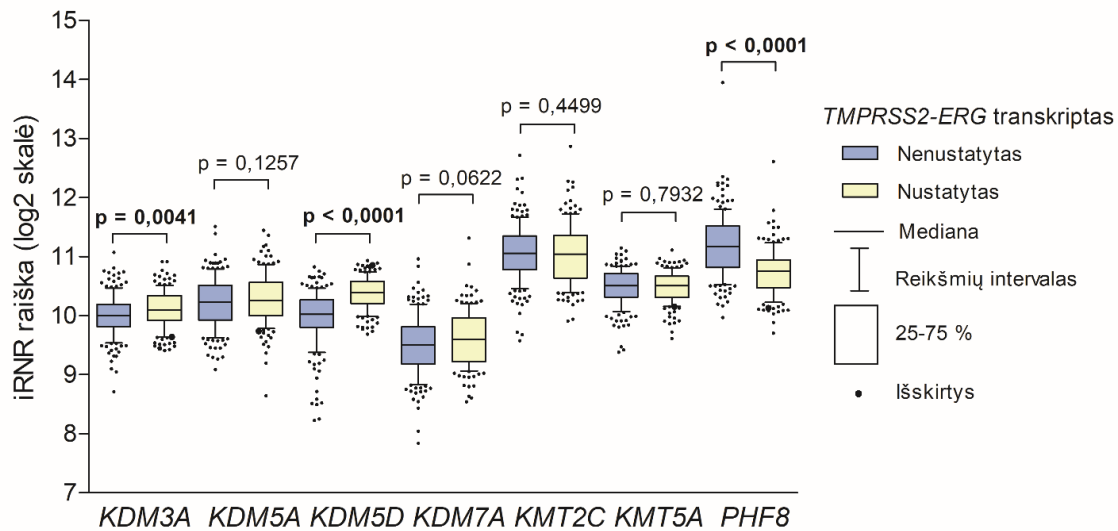


3.16 pav. Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiška pagal ISUP grupę Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje



3.17 pav. *KMT5A* geno raiškos koreliacija su prostatos specifinio antigeno (PSA) kiekiu kraujyje Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

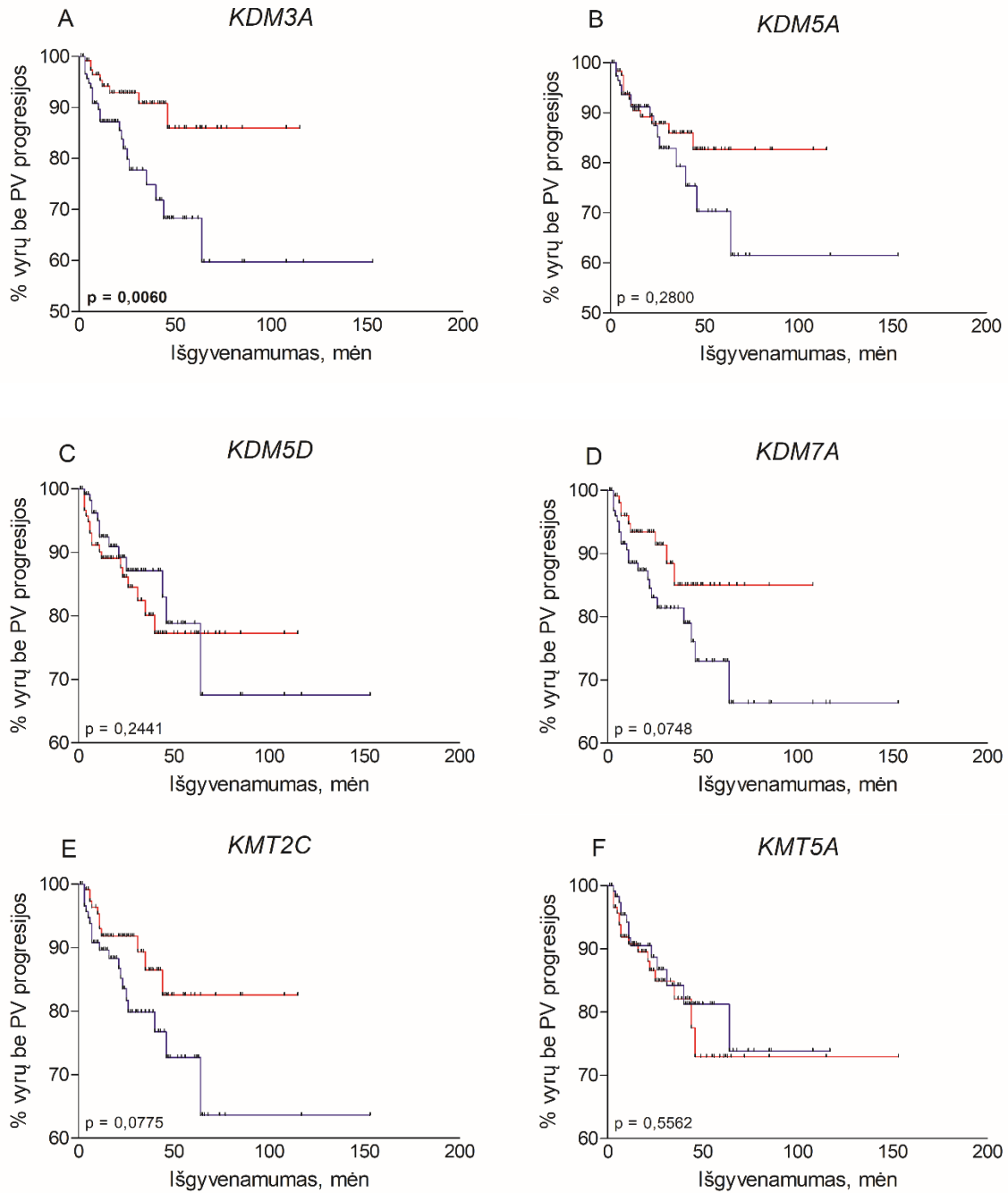
PV būdingas transkriptas *TMPRSS2-ERG* buvo aptiktas maždaug pusėje visų tirtų navikų. Didesne *KDM3A* ir *KDM5D* genų raiška pasižymėjo tie navikai, kuriuose šis transkriptas buvo nustatytas, lyginant su navikais, kuriuose šio transkripto aptikta nebuvo (atitinkamai $p = 0,0041$ ir $p < 0,0001$), o *PHF8* geno atveju sąsaja buvo priešinga ($p < 0,0001$; 3.18 pav.). Kitų nagrinėtų genų raiškos skirtumų tarp šių grupių nustatyta nebuvo (visi $p > 0,0500$, 3.18 pav.).

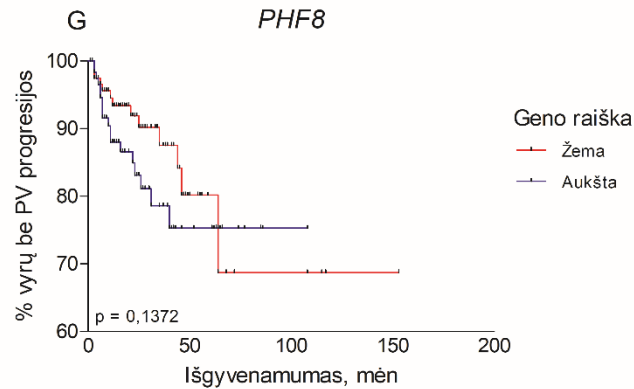


3.18 pav. Histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos skirtumai grupėse, kai nustatytas arba nenustatytas sulietinis *TMPRSS2-ERG* transkriptas Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje

3.3.3. Sąsajos su biochemine PV progresija

Kaplan-Meierio išgyvenamumo kreivių analizė parodė, kad esant santykinai aukštesniam už medianą *KDM3A* raiškos lygiui, PV ligonių išgyvenamumas be biocheminės ligos progresijos yra trumpesnis nei esant žemesnei šio geno raiškai ($p = 0,0060$; 3.19 pav.). Kitų analizuotų genų atveju nustatytos panašios tendencijos, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai patikimi (visi $p > 0,0500$; 3.19 pav.).



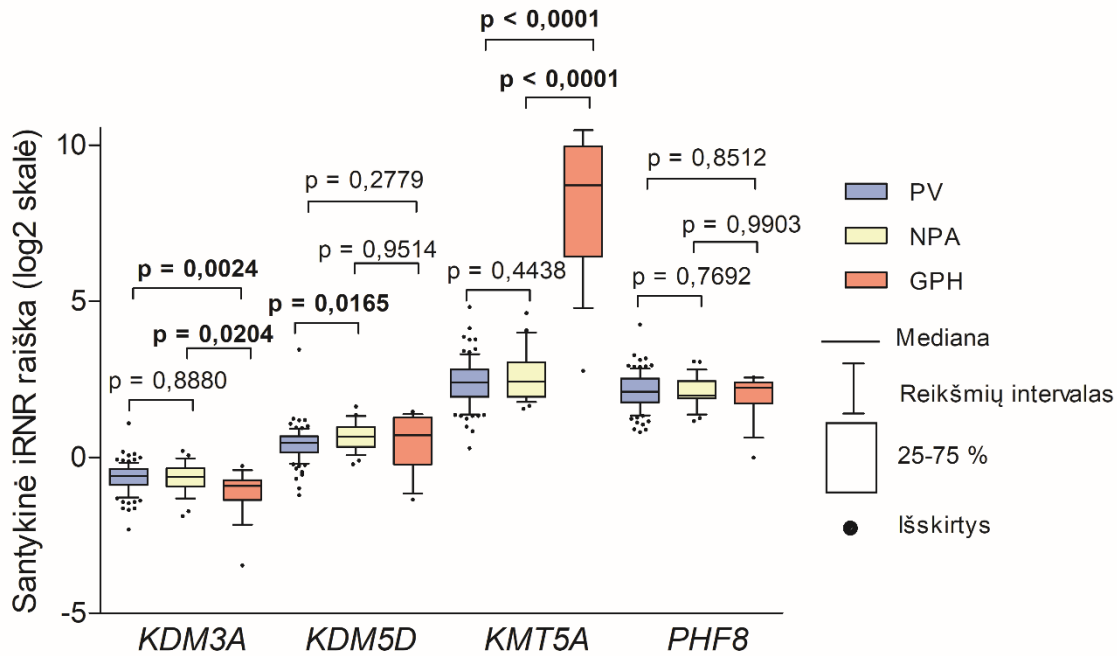


3.19 pav. Išgyvenamumo be biocheminės prostatos vėžio progresijos palyginimas pagal histonų metilinimą reguliuojančių genų raiškos lygį Vėžio genomo atlaso (TCGA) prostatos adenokarcinomos (PRAD) imtyje. A – *KDM3A*, B – *KDM5A*, C – *KDM5D*, D – *KDM7A*, E – *KMT2C*, F – *KMT5A*, G – *PHF8*. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal medianą. Statistiškai reikšmingos p reikšmės paryškintos

3.4. Histonų modifikacijoje dalyvaujančių genų raiškos tyrimai PV sergančių ligonių mėginiuose

3.4.1. Genų raiškos analizė PV, NPA ir GPH audiniuose

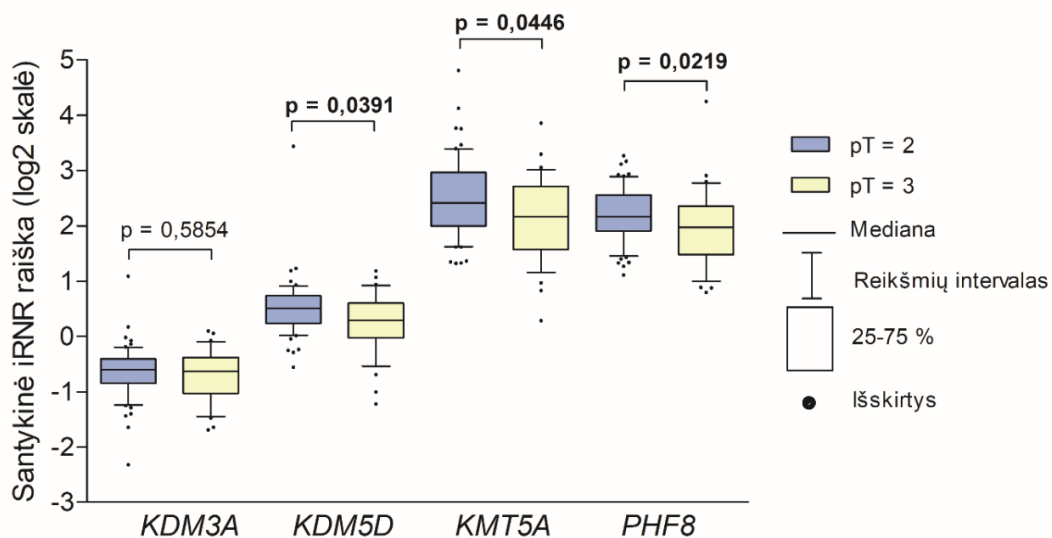
Remiantis TCGA PRAD imties analize, *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška buvo ištirta 98 PV, 28 NPA ir 16 BPH mėginių. *KDM3A* raiška GPH mėginiuose buvo žemesnė nei PV ir NPA (atitinkamai $p = 0,0024$ ir $p = 0,0204$), o *KDM5D* raiška PV buvo žemesnė lyginant su NPA ($p = 0,0165$). *KMT5A* geno raiška buvo žymiai aukštesnė GPH mėginiuose lyginant su PV ir NPA mėginiais ($p < 0,0001$). *PHF8* geno atveju skirtumų tarp šių grupių nebuvo (visi $p > 0,0500$; 3.20 pav.).



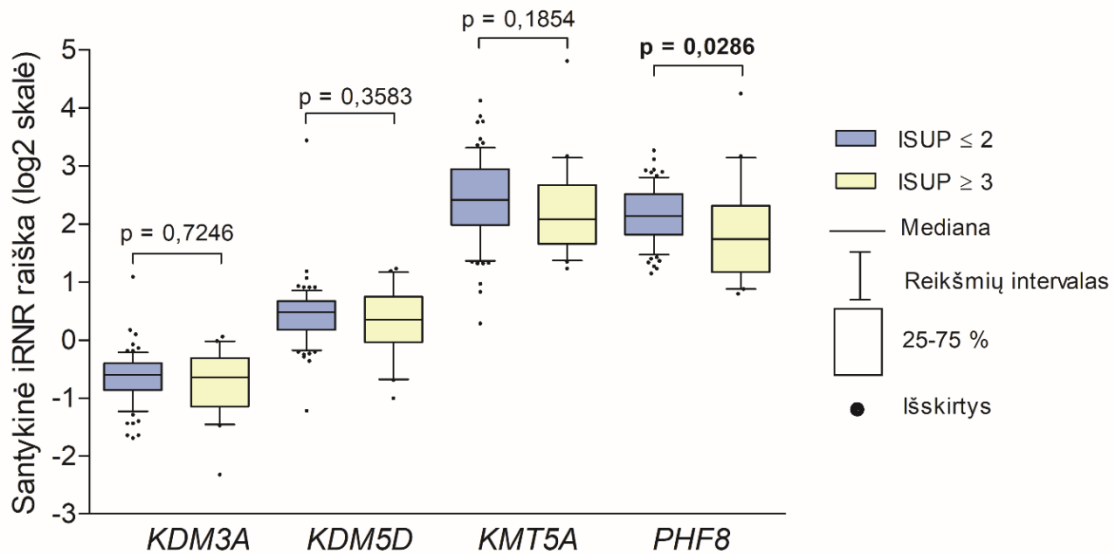
3.20 pav. *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiškos skirtumai navikiniuose (PV), nenavikiniuose (NPA) ir gerybinės prostatos hiperplazijos (GPH) audiniuose

3.4.2. Sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais

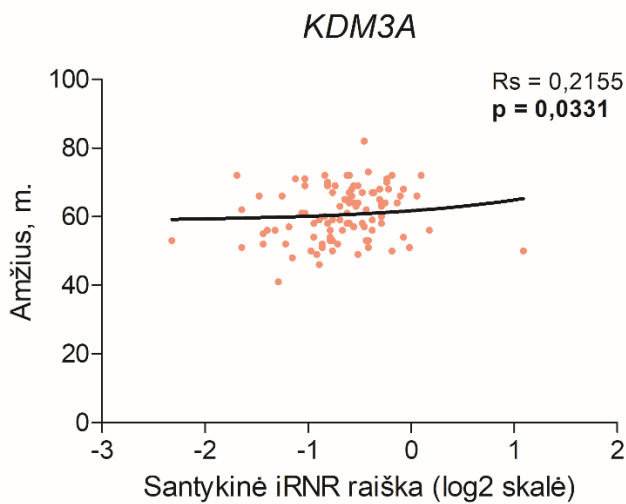
Palyginus genų raišką tarp pT2 ir pT3 navikų stadijų, buvo nustatyta, kad aukštesnė *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška yra būdinga žemesnės stadijos navikams (atitinkamai $p = 0,0391$, $p = 0,0446$ ir $p = 0,0219$; 3.21 pav.), o *PHF8* geno atveju – ir žemesnės ISUP grupės atveju ($p = 0,0286$, 3.22 pav.). Didesnė *KDM3A* geno raiška koreliavo su vyresniu ligonių amžiumi ($p = 0,0331$; 3.23 pav.).



3.21 pav. *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška pagal naviko stadiją pT



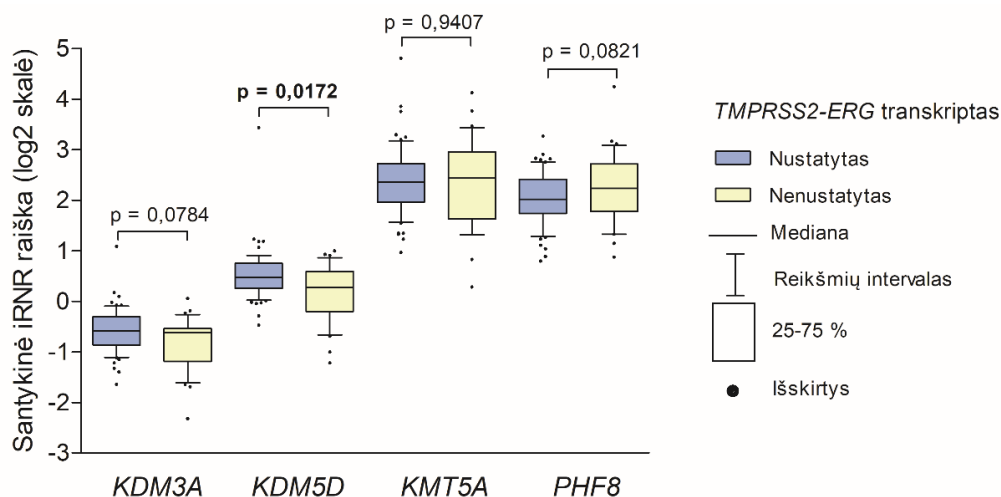
3.22 pav. *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška pagal ISUP grupę



3.23 pav. *KDM3A* geno raiškos koreliacija prostatos navikuose su ligonių amžiumi ligos nustatymo metu

PV atveju didesne *KDM5D* geno raiška pasižymėjo tie navikai, kuriuose nustatytas sulietinis *TMPRSS2-ERG* transkriptas. lyginant su navikais, kuriuose šis transkriptas nebuvo detektuotas ($p = 0,0172$; 3.24 pav.).

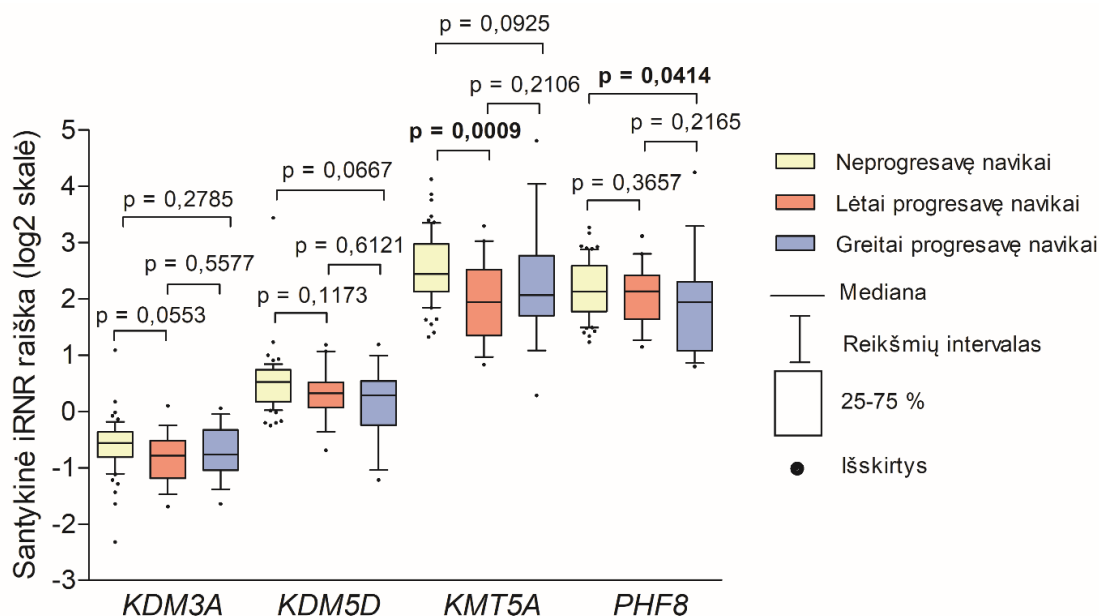
Sąsajų tarp tirtų genų raiškos ir PSA kiekio kraujyje ar prostatos masės nustatyta nebuvo.



3.24 pav. *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiškos skirtumai grupėse, kai nustatytas arba nenustatytas *TMPRSS2-ERG* transkriptas

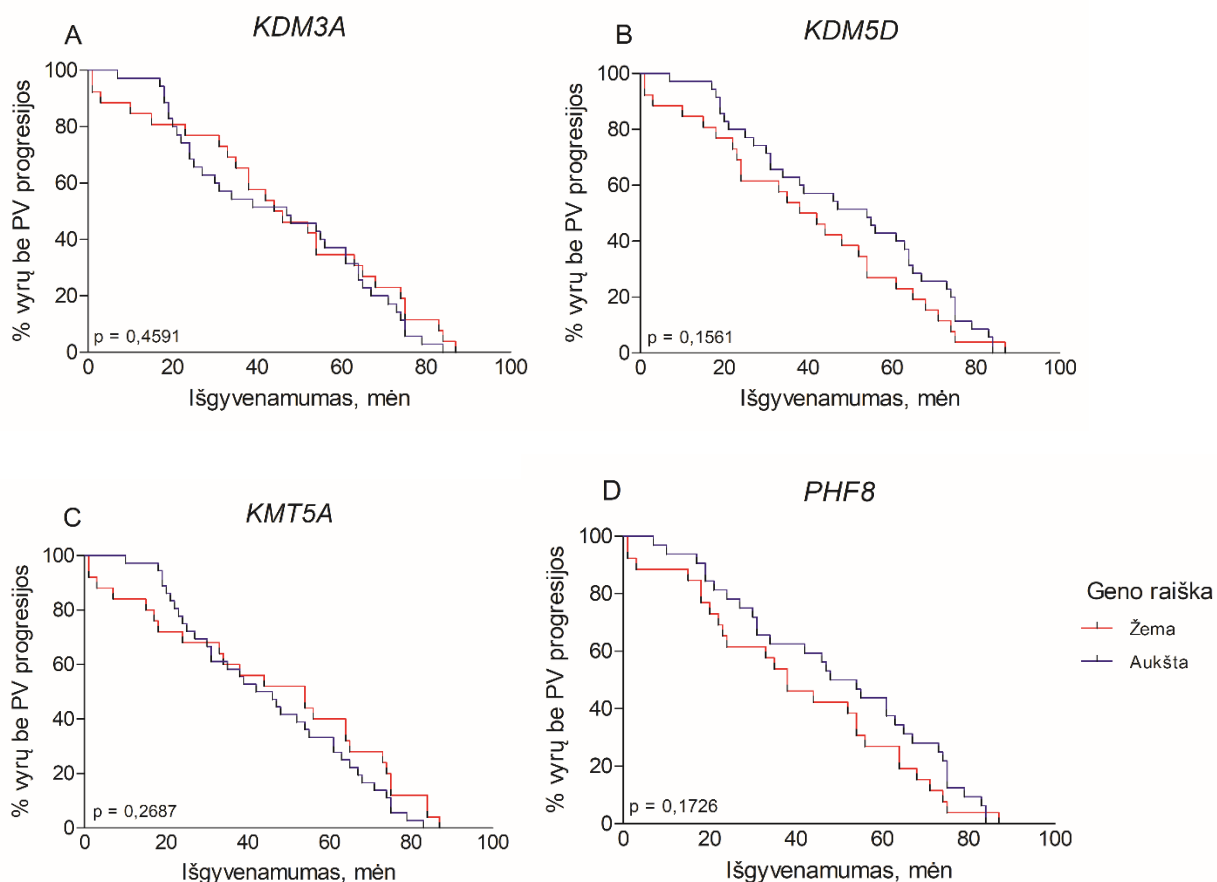
3.4.3. Sąsajos su biochemine PV progresija

Analizuojant genų raišką PV audiniuose tiriamieji buvo suskirstyti į tris grupes pagal biocheminę ligos progresiją: neprogresavę navikai, lėtai progresavę navikai (ligos biocheminė progresija pasireiškė vėliau nei per 6 mėn.) ir greitai progresavę navikai (ligos biocheminė progresija pasireiškė ne vėliau kaip per 6 mėn.). Palyginus *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raišką tarp šių grupių, nustatyta, kad didesnė *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška yra neprogresavusiuose navikuose atitinkamai lyginant su lėtai progresavusiais ir greitai progresavusiais navikais (atitinkamai $p = 0,0009$, $p = 0,0414$, 3.25 pav.). Kitų genų atvejais skirtumų tarp šių grupių nustatyta nebuvo (visi $p > 0,0500$, 3.25 pav.).



3.25 pav. *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiškos skirtumai neprogresavusiuose, lėtai progresavusiuose ir greitai progresavusiuose navikuose

Kaplano-Meierio kreivių analizė parodė, kad liga panašiai progresuoja arba neprogresuoja ligoniams tiek su santykinai aukšta, tiek su žema *KDM3A*, *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška (kategorizuota pagal medianą; visi $p > 0,0500$; 3.26 pav.).



3.26 pav. Išgyvenamumo be biocheminės prostatos vėžio progresijos palyginimas pagal histonų metilinime dalyvaujančių genų raiškos lygį. A – *KDM3A*, B – *KDM5D*, C – *KMT5A*, D – *PHF8*. Genų raiška kategorizuota į aukštą ir žemą pagal medianą

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Prostatos vėžys – globali šiuolaikinės visuomenės problema, kurią stengiamasi išspręsti ne vienerius metus. Genų raiškos tyrimai prisideda prie diagnostinių ir prognostinių biožymenų nustatymo bei leidžia suprasti šio vėžio biologiją molekulinio lygiu, kuriame veikia tiek metalotioneinai, tiek histonus modifikuojantys genai.

4.1. *MTIE*, *MTIG* ir *MTIM* genų raiška prostatos navikuose

Pastaruosiu metu atsiranda vis naujesnių duomenų apie metalotioneinų genų įtaką karcinogenezės procesui. Metalotioneinai prostatos navikuose pradėti tirti ganėtinai anksti, todėl jau turima duomenų iš kelių šaltinių apie šių genų raiškos pokyčius prostatos navikuose.

Remiantis Oncomine duomenų bazės duomenimis, *MTIE*, *MTIG* ir *MTIM* genų raiška prostatos navikuose yra sumažėjusi lyginant su normaliais prostatos audiniais (Prueitt et al., 2008). Tokios pačios tendencijos buvo pastebėtos ir dabar vykdyto tyrimo metu, tačiau *MTIE* geno atveju tiek TCGA PRAD, tiek šio tyrimo imtyse toks geno raiškos sumažėjimas nebuvo statistiškai patikimas (atitinkamai $p = 0,0655$ ir $p = 0,1216$). Butler et al., (2012) atliktas tyrimas parodė, kad *MTIG* geno promotoriaus hipermetilinimo dažnis tiesiogiai koreliavo su limfmazgių metastazių atsiradimu 178-iuose papiliariniu skyd liaukės vėžiu sergančiuose ligoniuose. Tai gali patvirtinti hipotezę, kad *MTIG* geno raiška yra valdoma per promotoriaus metilinimo mechanizmą ir didesnis hipermetilinimo dažnis lemia mažesnę *MTIG* raišką vėlesnės stadijos navikuose (kas ir buvo parodyta šiuo tyrimu, $p < 0,0001$), kai yra didesnė tikimybė išsivysti limfmazgių metastazėms. Taip pat buvo parodyta, kad metalotioneinų genų raiška yra sumažėjusi tarpvietės ląstelėse prostatos vėžio atveju (tai dažnai pasitaikantis mechanizmas, kai prostatos vėžys sugeba lokaliai išplisti už prostatos ribų) lyginant su sveikomis tarpvietės ląstelėmis prostatos vėžiu sergančių ligonių audiniuose. Gali būti, kad plintant tokiam vėžiui itin pakinta metalų jonų metabolizmas (už kurį yra atsakingi metalotioneinai ir jų raiška) vėžinėse ląstelėse ir tai lemia pakitusią ligos eigą (Zhang et al., 2019).

Lyginant analizuotos TCGA PRAD imties duomenis su šio tyrimo metu tirta imtimi buvo nustatyta nemažai panašumų, kurie leidžia daryti prielaidą, kad Lietuvos vyrų populiacijoje vyraujantis prostatos vėžys nesiskiria nuo pasaulinių tendencijų. Abiejose imtyse didesnė *MTIE*, *MTIG* ir *MTIM* genų raiška nustatyta ankstesnės stadijos ($pT = 2$) ir žemesnės ISUP kategorijos ($ISUP \leq 2$) navikuose, taip pat navikuose, kuriuose *TMPRSS2-ERG* transkripto aptikta nebuvo. Nustatytos neigiamos koreliacijos su PSA kiekiu kraujyje, tačiau skirtingai nei TCGA PRAD imtyje, *MTIE* ir *MTIM* atvejais tai buvo statistiškai patikima (atitinkamai $p = 0,0430$ ir $p = 0,0141$). TCGA PRAD imtyje buvo nustatyta, kad *MTIM* geno raiška galėtų būti naudojama

kaip prognostinis ligos biožymuo, nes žema šio geno raiška statistiškai patikimai siejasi su greita biochemine ligos progresija ($p = 0,0057$), tačiau tokių tendencijų šio tyrimo imtyje nustatyta nebuvo ($p = 0,6060$).

4.2. Histonus modifikuojančių genų raiška prostatos navikuose

Histonų modifikacijas atliekantys genai koordinuoja kitų genų raiškos programas, todėl dažnu atveju nenormali tokių genų raiška yra nustatyta įvairiuose vėžiniuose susirgimuose (Guo et al., 2018).

Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad *KDM5D* raiška prostatos navikuose buvo sumažėjusi lyginant su sveikais audiniais ($p = 0,0165$), o *KDM3A* geno raiška buvo padidėjusi prostatos navikuose lyginant su gerybinės prostatos hiperplazijos audiniais ($p = 0,0024$). (Krieg et al., 2010) tyrimas rodo, kad sumažėjusi šio geno raiška inkstų vėžio ir žarnyno karcinomos ląstelių linijose sumažino naviko augimą, todėl galima daryti išvadą, kad padidėjusi *KDM3A* geno raiška prostatos navikuose atlieka svarbią rolę naviko augime ir formavimesi.

Palyginus TCGA PRAD imties duomenis su šio tyrimo imtimi buvo nustatyta, kad *KDM5D* geno raiška abiejuose tyrimuose prostatos navikuose ir nenavikiniuose audiniuose kardinaliai skiriasi – TCGA PRAD imtyje šio geno raiška yra aukštesnė prostatos navikuose ($p = 0,1099$), o šiame tyrime – nenavikiniuose audiniuose ($p = 0,0165$). *KDM3A* ir *KMT5A* genų atvejais abiejose imtyse nustatyti skirtumai tarp navikinių ir nenavikinių audinių buvo statistiškai nepatikimi, o *PHF8* geno atveju – TCGA PRAD imtyje šio geno raiška buvo aukštesnė navikiniuose audiniuose ($p < 0,0001$), tačiau dabar vykdyto tyrimo atveju pastebėtos tokios pačios tendencijos, bet jos buvo statistiškai nepatikimos ($p = 0,7692$). Navikus suskirsčius pagal jų stadiją TCGA PRAD imtyje buvo nustatyta, kad *KDM3A*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška yra aukštesnė antros stadijos navikuose (atitinkamai $p = 0,3679$, $p = 0,0011$ ir $p = 0,0156$) kaip ir šio tyrimo atveju (atitinkamai $p = 0,0391$, $p = 0,0446$, $p = 0,0219$), bet *KDM3A* geno raiška yra aukštesnė trečios stadijos navikuose ($p = 0,7856$) priešingai nei dabar tirtuose audiniuose ($p = 0,5854$). Šio tyrimo metu buvo nustatyta didesnė *PHF8* geno raiška ISUP ≤ 2 kategorijos navikuose, tačiau TCGA PRAD imtyje toks pats skirtumas tarp ISUP kategorijų nebuvo statistiškai patikimas ($p = 0,4726$). Abiejose imtyse nustatyta, kad *KMT5A* geno raiška yra statistiškai patikimai aukštesnė ISUP ≤ 2 navikuose, o TCGA PRAD imtyje tai buvo ir statistiškai patikima ($p = 0,0351$). Abiejose imtyse *KDM5D* geno raiška buvo statistiškai patikimai aukštesnė navikuose, kuriuose *TMPRSS2-ERG* transkriptas buvo nustatytas (TCGA PRAD $p < 0,0001$, šis tyrimas – $p = 0,0172$). TCGA PRAD imtyje buvo nustatyta statistiškai

patikima neigiama koreliacija tarp *KMT5A* geno raiškos ir PSA kiekio kraujyje ($R_s = -0,1799$; $p = 0,0182$), bet šio tyrimo metu tokios sąsajos aptikta nebuvo. TCGA PRAD imtyje buvo nustatyta, kad *KDM3A* geno raiška prostatos navikuose galėtų būti naudojama kaip prognostinis žymuo (nes aukšta šio geno raiška siejasi su greitesne biochemine ligos progresija, $p = 0,0060$), tačiau šio tyrimo imtyje tokia tendencija patvirtinta nebuvo ($p = 0,4591$) kaip ir kitų tirtų genų atvejais.

IŠVADOS

1. Metalotioneinų *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiška buvo didesnė NPA mėginiuose lyginant su PV ar GPH (visi $p < 0,0500$). Didesnė šių genų raiška nustatyta ankstesnės pT stadijos ir žemesnės ISUP grupės navikuose (visi $p < 0,0500$). Mažesnė *MT1E* ir *MT1M* raiška koreliavo su aukštesniu PSA lygiu (atitinkamai $p = 0,0430$ ir $p = 0,0141$).
2. Statistiškai patikimų *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* genų raiškos sąsajų su ligonių amžiumi, prostatos mase ir ligos progresija nustatyta nebuvo (visi $p > 0,0500$).
3. Neprogresavusiuose prostatos navikuose *MT1E*, *MT1G* ir *MT1M* raiška aukštesnė lyginant su greitai progresavusiais (≤ 6 mėn.) navikais (atitinkamai $p = 0,0292$, $p = 0,0005$ ir $p = 0,0004$), tačiau pagal Kaplan-Meierio kreivių analizę genų raiškos sąsajų su trukme iki biocheminės ligos progresijos nenustatyta (visi $p > 0,0500$).
4. *KDM3A* ir *KMT5A* genų raiškos lygis PV mėginiuose skyrėsi nuo GPH (atitinkamai $p = 0,0024$ ir $p < 0,0001$) bei tarp NPA ir GPH grupių (atitinkamai $p = 0,0204$ ir $p < 0,0001$), o *KDM5D* raiška buvo didesnė NPA lyginant su PV ($p = 0,0165$). Didesnė *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška nustatyta ankstesnės pT stadijos navikuose (atitinkamai $p = 0,0391$, $p = 0,0446$ ir $p = 0,0219$), o *PHF8* geno atveju – ir esant žemesnei ISUP grupei ($p = 0,0286$). Aukštesnė *KDM3A* raiška koreliavo su vyresniu ligonių amžiumi ($p = 0,0331$).
5. *PHF8* geno raiška buvo aukštesnė neprogresavusiuose navikuose palyginus su greitai progresavusiais ($p = 0,0414$), o *KMT5A* raiškos lygis buvo aukštesnis neprogresavusiuose navikuose palyginus su lėtai progresavusiais (>6 mėn.; $p = 0,0009$). Kaplan-Meierio kreivių analizė šių genų raiškos skirtumų sąsajų su trukme iki biocheminės ligos progresijos neparodė (visi $p > 0,0500$).

Metalotioneinų ir histonus modifikuojančių genų raiškos tyrimai prostatos navikuose

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Metalotioneinai gali apsaugoti ląstelę nuo UV spindulių bei geba inhibuoti apoptozę. Tyrimai parodė, kad metalotioneinų genų raiška kinta įvairių žmogaus navikų atveju. Tuo tarpu histonus modifikuojantys genai koduoja fermentus, kurie dalyvauja baltymų modifikacijos reakcijose ir taip yra reguliuojama kitų genų raiška bei kitos funkcijos. Prostatos vėžio atveju atliekama daugybė mokslinių tyrimų, kurie turėtų padėti išspręsti problemas gydyme ir diagnostikoje, tačiau šis onkologinis susirgimas išlieka dažniausiai nustatoma liga visų amžiaus grupių vyrų tarpe. Epigenetinių žymenų vertė diagnozuojant prostatos vėžį ir prognozuojant ligos progresiją yra neabejotina.

Šio darbo metu siekta įvertinti metalotioneinų šeimai priklausančių genų bei histonus modifikuojančių genų raišką prostatos navikuose ir nenavikiniuose audiniuose ir susieti su ligonių klinikinėmis-patologinėmis charakteristikomis. Genų raiškos tyrimas buvo atliekamas taikant kiekybinę atvirkštinės transkriptazės polimerazinę grandininę reakciją.

MT1E, *MT1G*, *MT1M* genų raiška buvo aukštesnė prostatos nenavikiniuose audiniuose negu navikuose (atitinkamai $p = 0,1216$, $p = 0,0055$ ir $p = 0,0040$) ar gerybinės hiperplazijos audiniuose ($p = 0,0022$, $p = 0,0010$ ir $p = 0,0428$) bei neprogresuojančiuose prostatos navikuose palyginus su greitai progresuojančiais ($p = 0,0292$, $p = 0,0005$ ir $p = 0,0004$). Visų šių genų raiška buvo didesnė ankstesnės stadijos ($p = 0,0007$, $p < 0,0001$ ir $p < 0,0001$) ir žemesnės ISUP kategorijos navikuose ($p = 0,0283$, $p = 0,0028$ ir $p < 0,0001$). Didesnė *MT1E* ir *MT1G* genų raiška užfiksuota navikuose, kurie neturi *TMPRSS2-ERG* transkripto ($p = 0,0481$ ir $p = 0,0012$), o *MT1E* ir *MT1M* genų raiška neigiamai koreliuoja su PSA kiekiu ligonių kraujyje ($p = 0,0430$, $p = 0,0141$). *KDM5D* raiška buvo didesnė prostatos nenavikiniuose audiniuose ($p = 0,0165$) lyginant su navikiniais. *KDM3A* geno raiška buvo aukštesnė prostatos navikuose palyginus su hiperplazijos audiniais, o *KMT5A* geno raiška – hiperplazijos audiniuose ($p = 0,0024$, $p < 0,0001$). Didesnė *KDM5D*, *KMT5A* ir *PHF8* genų raiška nustatyta ankstesnės stadijos navikuose ($p = 0,0391$, $p = 0,0446$ ir $p = 0,0219$), o *PHF8* geno atveju – ir žemesnės ISUP kategorijos navikuose ($p = 0,0286$). Didesnė *KDM5D* geno raiška yra navikuose, kurie turi *TMPRSS2-ERG*

transkriptą ($p = 0,0172$). *KDM3A* geno raiška teigiamai koreliuoja su ligonių amžiumi ($p = 0,0331$). Aukštesnė *PHF8* geno raiška nustatyta neprogresuojančiuose navikuose lyginant su greitai progresuojančiais ($p = 0,0414$), o aukštesnė *KMT5A* geno raiška pasižymi neprogresuojantys navikai palyginus su lėtai progresuojančiais ($p = 0,0009$).

Gauti rezultatai rodo, kad pakitusi metalotioneinų ir histonus modifikuojančių genų raiška gali būti naudojama kaip diagnostinis prostatos vėžio žymuo, tačiau dėl galimos prognostinės vertės kol kas kyla abejonių.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

RŪTA MALECKAITĖ

Gene Expression Analysis of Metallothionein and Histone Modifying Genes in Prostate Tumors

Master Thesis

SUMMARY

Metallothioneins could protect the cell from UV rays and have ability to inhibit apoptosis. Many studies have shown that expression of metallothionein coding genes varies in many of human tumors. Histone modifying genes encode enzymes which are involved in protein modification reactions and regulate the expression and functions of other genes. A lot of research is performed with treatment and diagnosis of prostate cancer, but this oncological disease remains most diagnosed disease among men of all ages. Achievements of epigenetics are already being used to treat many diseases, so the value of epigenetic markers in diagnosing prostate cancer and predicting disease progression is unquestionable.

The aim of this study was to evaluate the expression of metallothionein and histone modifying genes in prostate tumors and non-cancerous prostate tissues and to link them with the clinical-pathological characteristics of patients. Research of gene expression was performed using a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction.

The expression of *MTIE*, *MTIG*, *MTIM* genes was higher in non-cancerous prostate tissues than in tumors ($p = 0.1216$, $p = 0.0055$ and $p = 0.0040$, respectively) or in benign hyperplasia tissues ($p = 0.0022$, $p = 0.0010$ and $p = 0.0428$) and in non-progressive prostate tumors compared to rapidly progressing ($p = 0.0292$, $p = 0.0005$, and $p = 0.0004$). Expression of all these genes was higher in tumors of the previous stage ($p = 0.0007$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$) and lower ISUP category ($p = 0.0283$, $p = 0.0028$ and $p < 0.0001$). Higher expression of *MTIE* and *MTIG* genes was observed in tumors lacking the *TMPRSS2-ERG* transcript ($p = 0.0481$ and $p = 0.0012$). Also, expression of *MTIE* and *MTIM* genes was negatively correlated with PSA levels in patients' blood ($p = 0.0430$, $p = 0.0141$). *KDM5D* expression was higher in non-cancerous prostate tissues ($p = 0.0165$). *KDM3A* gene expression was higher in prostate tumors compared to hyperplasia tissues, and *KMT5A* gene expression was higher in hyperplasia tissues ($p = 0.0024$, $p < 0.0001$). Higher expression of *KDM5D*, *KMT5A* and *PHF8* genes was found in the tumors of the previous stage ($p = 0.0391$, $p = 0.0446$ and $p = 0.0219$), and in the

case of the *PHF8* gene - in tumors of the lower ISUP category ($p = 0.0286$). Higher expression of *KDM5D* gene is found in tumors bearing the *TMPRSS2-ERG* transcript ($p = 0.0172$) and *KDM3A* gene expression is positively correlated with patient age ($p = 0.0331$). Higher expression of *PHF8* gene was found in non-progressive tumors compared to rapidly progressing tumors ($p = 0.0414$), and higher *KMT5A* gene expression is characterized by non-progressive tumors compared to slow-progressing ones ($p = 0.0009$).

The results suggest that altered expression of metallothionein and histone-modifying genes can be used as a diagnostic marker for prostate cancer, but the potential prognostic value is still in doubt.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Internetiniai šaltiniai:

1. Firebrowse.org [internetinė svetainė]. Cambrigde (UK): Broad Institute of MIT [atnaujinta 2019, cituota 2020-04-20]. Adresas: www.firebrowse.org
2. Nacionalinis vėžio institutas, vėžio registras [internetinė svetainė]. Vilnius (Lietuva): Nacionalinis vėžio institutas; [sukurta 2015; atnaujinta 2020; cituota 2018-05-30]. Adresas: www.nvi.lt

Literatūriniai šaltiniai:

1. Butler JS, Koutelou E, Schibler AC, Dent SYR. Histone-modifying enzymes: Regulators of developmental decisions and drivers of human disease. *Epigenomics*. 2012;4:163–77.
2. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67:245–53.
3. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*. 2012;2:401–4.
4. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2019;4.
5. Costa FF. Epigenomics in cancer management. *Cancer Management and Research*. 2010;2:255–65.
6. Damm F, Oberacker T, Thol F, Surdziel E, Wagner K, Chaturvedi A, et al. Prognostic importance of histone methyltransferase MLL5 expression in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29:682–9.
7. Demidenko R, Daniunaite K, Bakavicius A, Sabaliauskaite R, Skeberdyte A, Petroska D, et al. Decreased expression of MT1E is a potential biomarker of prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2017;8:61709–18.
8. Dobosy JR, Roberts JLW, Fu VX, Jarrard DF. The Expanding Role of Epigenetics in the Development, Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *Journal of Urology*. 2007;177:822–31.

9. Du Y, Long Q, Guan B, Mu L, Tian J, Jiang Y, et al. Robot-assisted radical prostatectomy is more beneficial for prostate cancer patients: A system review and meta-analysis. *Medical Science Monitor*. 2018;24:272–87.
10. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology*. 2016;69:428–35.
11. Fan L, Zhang F, Xu S, Cui X, Hussain A, Fazli L, et al. Histone demethylase JMJD1A promotes alternative splicing of AR variant 7 (AR-V7) in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115:E4584–93.
12. Frame FM, Maitland NJ. Epigenetic control of gene expression in the normal and malignant human prostate: A rapid response which promotes therapeutic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20.
13. Gamat M, McNeel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2017;24:T297–310.
14. Graça I, Pereira-Silva E, Henrique R, Packham G, Crabb SJ, Jerónimo C. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. *Clinical Epigenetics*. 2016;8.
15. Guerrico AG, Hillman D, Karnes J, Davis B, Gaston S, Klee G. Roles of kallikrein-2 biomarkers (free-hK2 and pro-hK2) for predicting prostate cancer progression-free survival. *Journal of Circulating Biomarkers*. 2017;6.
16. Gumulec J, Raudenska M, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein - Immunohistochemical cancer biomarker: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9.
17. Guo XB, Huang B, Pan YH, Su SG, Li Y. ESCO2 inhibits tumor metastasis via transcriptionally repressing MMP2 in colorectal cancer. *Cancer Management and Research*. 2018;10:6157–66.
18. Han YC, Zheng ZL, Zuo ZH, Yu YP, Chen R, Tseng GC, et al. Metallothionein 1 h tumour suppressor activity in prostate cancer is mediated by euchromatin methyltransferase 1. *Journal of Pathology*. 2013;230:184–93.
19. Hoffmann I, Roatsch M, Schmitt ML, Carlino L, Pippel M, Sippl W, et al. The role of histone demethylases in cancer therapy. *Molecular Oncology*. 2012;6:683–703.
20. Hung KC, Huang TC, Cheng CH, Cheng YW, Lin DY, Fan JJ, et al. The expression profile and prognostic significance of metallothionein genes in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20.

21. Husmann D, Gozani O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2019;26:880–9.
22. Jung JW, Yu YD, Lee YJ, Kim JJ, Lee HM, Oh JJ, et al. Does prostate-specific antigen (PSA) mass or free PSA mass improve the accuracy of predicting total prostate volume in relation to obesity in men with biopsy-proven benign prostatic hyperplasia? *Asian Journal of Andrology*. 2019;21:86–91.
23. Kaniskan HÜ, Martini ML, Jin J. Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases. *Chemical Reviews*. 2018;118:989–1068.
24. Keyes M, Crook J, Morris WJ, Morton G, Pickles T, Usmani N, et al. Canadian prostate brachytherapy in 2012. *Journal of the Canadian Urological Association*. 2013;7:51–8.
25. Kohaar I, Petrovics G, Srivastava S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20.
26. Komura K, Jeong SH, Hinohara K, Qu F, Wang X, Hiraki M, et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113:6259–64.
27. Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S, Giaccia AJ. Regulation of the Histone Demethylase JMJD1A by Hypoxia-Inducible Factor 1 α Enhances Hypoxic Gene Expression and Tumor Growth. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;30:344–53.
28. Li N, Dhar SS, Chen TY, Kan PY, Wei Y, Kim JH, et al. JARID1D is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis. *Cancer Research*. 2016;76:831–43.
29. Liao Y, Xu K. Epigenetic regulation of prostate cancer: The theories and the clinical implications. *Asian Journal of Andrology*. 2019;21:279–90.
30. Ling X bin, Wei HW, Wang J, Kong YQ, Wu YY, Guo JL, et al. Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17.
31. Maleckaite R, Zalimas A, Bakavicius A, Jankevicius F, Jarmalaite S, Daniunaite K. DNA methylation of metallothionein genes is associated with the clinical features of renal cell carcinoma. *Oncology Reports*. 2019;41:3535–44.
32. Marmorstein R, Zhou MM. Writers and readers of histone acetylation: Structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6.

33. Mehriani-Shai R, Yalon M, Simon AJ, Eyal E, Pismenyuk T, Moshe I, et al. High metallothionein predicts poor survival in glioblastoma multiforme. *BMC Medical Genomics*. 2015;8.
34. Milite C, Feoli A, Viviano M, Rescigno D, Cianciulli A, Balzano AL, et al. The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clinical Epigenetics*. 2016;8.
35. Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigenetics*. 2016;8:16.
36. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genetics*. 2018;14.
37. Nevedomskaya E, Baumgart SJ, Haendler B. Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19.
38. Perry AS, Watson RWG, Lawler M, Hollywood D. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*. 2010;7:668–80.
39. Pron G. Prostate-Specific Antigen (PSA)-Based Population Screening for Prostate Cancer: An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*. 2015;15:1–64.
40. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate*. 2008;68:1152–64.
41. Samalavicius NE, Aleknavicius E, Plieskiene A. Ankstyvojo priešinės liaukos vėžio diagnostika ir gydymas 2015.
42. Sanaei M, Kavooosi F. Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action in Various Cancers. *Advanced Biomedical Research*. 2019;8:63.
43. Schneider A, Chatterjee S, Bousiges O, Selvi BR, Swaminathan A, Cassel R, et al. Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics. *Neurotherapeutics*. 2013;10:568–88.
44. Shao P, Liu Q, Maina PK, Cui J, Bair T, Li T, et al. Histone demethylase PHF8 promotes epithelial to mesenchymal transition and breast tumorigenesis. *Nucleic Acids Research*. 2017;45:1687–702.
45. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70:7–30.
46. Sklinda K, Mruk B, Walecki J. Active Surveillance of Prostate Cancer Using Multiparametric Magnetic Resonance Imaging: A Review of the Current Role and Future

- Perspectives. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2020;26:e920252.
47. Sun X, Niu X, Chen R, He W, Chen D, Kang R, et al. Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology*. 2016;64:488–500.
 48. Takahashi S. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*. 2012;5:41.
 49. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2019;70:479–99.
 50. Thirumorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar KT, Senthil kumar M, Ganesh GNK, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*. 2011;9:54.
 51. Toh TB, Lim JJ, Chow EKH. Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer*. 2017;16.
 52. Vukovic I, Djordjevic D, Bojanic N, Babic U, Soldatovic I. Predictive value of [-2]proPSA (p2PSA) and its derivatives for the prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0ng/mL PSA range. *International Braz J Urol*. 2017;43:48–56.
 53. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes and Development*. 2018;32:1105–40.
 54. Wang YP, Lei QY. Metabolic recoding of epigenetics in cancer. *Cancer Communications (London, England)*. 2018;38:25.
 55. Wang Z, Qin G, Zhao TC. HDAC4: Mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics*. 2014;6:139–50.
 56. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama J v. Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1238:425–66.
 57. Zhang Y, Yan L, Yao W, Chen K, Xu H, Ye Z. Integrated analysis of genetic abnormalities of the histone lysine methyltransferases in prostate cancer. *Medical Science Monitor*. 2019;25:193–239.

PRIEDAI

1 priedas. Prostatos vėžiu (n = 91) ar gerybine prostatos hiperplazija (n = 17) sergančių ligonių klinikiniai-patologiniai rodikliai *MTIE*, *MTIG*, *MTIM* genų raiškos tyrime.

Prostatos vėžys	
Amžius, m.	
Vidurkis	61,7
Mediana	63
Intervalas	41-82
Naviko stadija pT, n	
2	61
3	26
ISUP laipsnis, n	
1	22
2	49
3	13
≥4	6
Nėra duomenų	1
Prostatos masė, g	
Vidurkis	50,1
Mediana	45,5
Intervalas	16-123
Nėra duomenų	1
PSA kiekis, ng/ml	
Vidurkis	10,1
Mediana	7,0
Intervalas	2,5-44,1
Nėra duomenų	3
<i>TMPRSS2-ERG</i> transkripto buvimas	
Taip	48
Ne	25
Nėra duomenų	18
Biocheminė ligos progresija, n	
Taip	36
Ne	55
Laikas iki ligos biocheminės progresijos, mėn.	
Vidurkis	51,1
Mediana	52
Intervalas	1-84
Gerybinė prostatos hiperplazija	
Amžius, m.	
Vidurkis	70,3
Mediana	73
Intervalas	59-80
PSA kiekis, ng/ml	
Vidurkis	7,3
Mediana	5,3
Intervalas	0,79-28,05

2 priedas. Prostatos vėžiu (n = 114) gerybine prostatos hiperplazija (n = 16) sergančių ligonių klinikiniai-patologiniai rodikliai *KMT5A*, *KDM3A*, *KDM5D*, *PHF8* genų raiškos tyrime.

Prostatos vėžys	
Amžius, m.	
Vidurkis	60,9
Mediana	61
Intervalas	41-82
Naviko stadija pT, n	
2	74
3	40
ISUP laipsnis, n	
1	31
2	61
3	14
≥4	7
Nėra duomenų	1
Prostatos masė, g	
Vidurkis	48,5
Mediana	45
Intervalas	16-123
Nėra duomenų	1
PSA kiekis, ng/ml	
Vidurkis	10,3
Mediana	6,9
Intervalas	2,49-84,2
Nėra duomenų	3
<i>TMPRSS2-ERG</i> transkripto buvimas	
Taip	61
Ne	31
Nėra duomenų	22
Biocheminė ligos progresija, n	
Taip	41
Ne	72
Nėra duomenų	1
Laikas iki ligos biocheminės progresijos, mėn.	
Vidurkis	48,8
Mediana	53
Intervalas	1-92
Gerybinė prostatos hiperplazija	
Amžius, m.	
Vidurkis	70,9
Mediana	73
Intervalas	59-80
PSA kiekis, ng/ml	
Vidurkis	7,5
Mediana	6,1
Intervalas	0,79-28,05

