

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РОЗЕНБЕРГ ЄВГЕНІЯ ЕДУАРДІВНА

УДК 577.218, 616-006, 616.65

ДИСЕРТАЦІЯ

ДИФЕРЕНЦІЙНО ЕКСПРЕСОВАНІ ГЕНИ ТА ГЕНЕТИЧНІ Й
ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ У ПУХЛИНАХ ПРОСТАТИ ЛЮДИНИ

03.00.03 - молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Розенберг Є.Е.

Науковий керівник: Кашуба Володимир Іванович, д. б. н., професор

Київ - 2018

АНОТАЦІЯ

Розенберг Є.Е. Диференційно експресовані гени та генетичні й епігенетичні зміни у пухлинах простати людини. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2018.

Рак передміхурової залози (РПЗ) входить до п'ятірки першопричин онкологічної смертності серед чоловіків у світі станом на 2012 рік за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я. В Україні, як і в цілому в світі, ці показники також є досить високими. Згідно даних Національного канцер-реєстру України в 2015 році захворюваність на РПЗ становила 6898 випадків, смертність — 3149 відповідно. РПЗ займає друге місце за частотою захворюваності та третє місце за частотою смертності в Україні (10,5% та 8,5% відповідно).

З одного боку, виникнення РПЗ так само, як і інших видів раку, супроводжується багатьма генетичними та епігенетичними змінами. Так, показано низку ділянок хромосом, зміни в яких найчастіше виникають при розвитку РПЗ та є асоційованими з ризиком виникнення цього захворювання. Однією з таких ділянок є 8q24, яка часто ампліфікується в пухлинах передміхурової залози. Вона містить онкоген *MYC*, ампліфікація якого корелює з прогресуванням та рецидивами пухлин передміхурової залози. Гіпометилування ДНК було визначено як на ранніх, так і на пізніх стадіях розвитку РПЗ. В той же час, гіперметилування промоторів генів є однією з найбільш досліджених епігенетичних змін при РПЗ.

З іншого боку, РПЗ характеризується високим рівнем як генетичної, так і епігенетичної гетерогенності, що створює проблему для ранньої діагностики пухлин передміхурової залози. Запропонована молекулярна класифікація підтипів РПЗ на основі досліджень генетичних, епігенетичних та транскриптомних змін наразі охоплює 74% випадків досліджених зразків РПЗ.

В той же час, при прогресуванні РПЗ відбувається інгібування генів-супресорів пухлинного росту та активація протоонкогенів. На сьогодні серед залучених до РПЗ протоонкогенів суттєве значення мають гени родини *ETS* у складі злитих генів *TMPRSS2:ETS* та ген *MYC*, підвищені рівні експресії яких асоціюються з прогресуванням пухлинного процесу РПЗ. Серед виявлених генів-супресорів, пов'язаних з виникненням РПЗ, відзначено втрату гетерозиготності гена *PTEN* у первинних пухлинах передміхурової залози, гена *RB* в метастазах та резистентному до кастрації РПЗ.

Значний рівень гетерогенності РПЗ спричиняє певні труднощі в діагностиці цієї форми раку та персоніфікованому лікуванні хворих. Відомо, що від 10% до 30% пухлин передміхурової залози здатні прогресувати до агресивного метастазуючого типу, який характеризується резистентністю до андрогенів. Механізми набуття резистентності до андрогенів лишаються ще недостатньо охарактеризованими. До того ж, клінічна ефективність гормональної терапії, яка застосовується для лікування хворих з гормоночутливими пухлинами передміхурової залози є варіабельною серед пацієнтів із РПЗ, а для гормонорезистентних пухлин терапії фактично не існує. Це ставить питання про необхідність подальшого дослідження, яке спрямоване на виявлення молекулярних підтипів пухлин передміхурової залози.

Незважаючи на достатньо широкий спектр досліджень РПЗ, що дозволило виявити певні фактори та механізми розвитку цього захворювання, залишається невирішеною низка питань, наприклад щодо переходу деяких пухлин до гормонорезистентного типу. Отже дослідження генетичних та епігенетичних змін, а також експресії генів в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози надасть можливість розширити існуючі знання механізмів прогресування РПЗ. Також це допоможе виявити потенційні асоційовані із РПЗ гени, що можуть бути використані для виявлення та розрізнення доброякісних та злоякісних процесів передміхурової залози.

Робота присвячена виявленню генетичних, епігенетичних змін, а також змін експресії генів у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози для пошуку пухлино-асоційованих генів, які можуть бути використані

для диференціації процесів пухлинного розвитку при РПЗ.

В роботі були використані молекулярно-біологічні (культивування клітинних ліній, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією, гібридизація на NotI-мікрочипах, бісульфитне секвенування) біоінформаційні та статистичні методи.

Дослідження генетичних та епігенетичних змін проводили за допомогою гібридизації на NotI-мікрочипах на 33 клінічних зразках пухлин передміхурової залози, серед яких було 15 доброякісних гіперплазій та 18 зразків аденокарцином, чотири з яких належали до метастазуючого типу. Чотири зразки умовно-нормальних тканин передміхурової залози використовували в якості контролю. Валідацію знайдених на мікрочипах генетичних та епігенетичних змін проводили для обраних вибірково генів/локусів за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції та бісульфитного секвенування відповідно. Вивчення змін експресії генів проводили методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції, з використанням експресійних мікрочипів. на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різним потенціалом до метастазування у дослідних тварин, а також із різною чутливістю до андрогенів. Так, були використані гормоночутлива клітинна лінія LNCaP із низьким потенціалом до метастазування, а також гормонорезистентні DU145 та PC3 клітинні лінії із середнім та високим потенціалом до метастазування. В якості контролю слугувала клітинна лінія нормального епітелію передміхурової залози PNT2. Перевірку окремих потенційно-асоційованих генів зі змінами експресії проводили на 16 зразках доброякісних гіперплазій та 37 зразках аденокарцином передміхурової залози, з яких 29 зразків аденокарцином мали парні умовно-нормальні тканини.

У модельних клітинних лініях аденокарцином порівняно до лінії нормальних клітин було досліджено профілі експресії на рівні мРНК 65, пов'язаних з онкогенезом, генів (експресійний мікрочип 1). Зміни експресії більше ніж в чотири рази було виявлено: для 29 генів у клітинній лінії LNCaP, для 20 генів – у DU145 та для 16 генів – у PC3. З яких 27 - знижують, 5 - підвищують та два - виявляють перемінний рівень експресії. Серед генів зі

змiнами рiвнiв експресiї було вiдбранi такi, експресiя яких в гормонорезистентних клiтинних лiнiях з бiльш високим потенцiалом до iнвазивностi та метастазування (DU145, PC3) вiдрiзняється вiд експресiї в гормоночутливiй клiтиннiй лiнiї з меншим потенцiалом до метастазування (LNCaP). Вiдбiр проводили з максимальним залученням генiв з рiзних сигнальних шляхiв, щоб отримати комплексну iнформацiю про процеси, що вiдбуваються у пухлинах передмiхурової залози. Загалом було вiдбрано 14 диференцiйно експресованих генiв (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*, *SERPINE2b*, *P16*, *CCNE1*, *IL1B*, *IL6*, *EFNA5*, *TAGLN*, *GLCE*, *IL1RL1*, *HOXA13*) мiж лiнiями LNCaP та DU145 i PC3, якi є потенцiйно асоцiйованими iз агресивними метастазуючими пухлинами передмiхурової залози.

У клiтинних лiнiях LNCaP та PC3, а також лiнiях з вiдновленою експресiєю гена *GLCE*, було проведено аналіз експресiї на рiвнi мРНК 84 генiв, пов'язаних з онкогенезом (експресiйний мiкрочип 2). У клiтиннiй лiнiї PC3 порiвняно до LNCaP було виявлено змiни 36 генiв. Серед яких - десять генiв мали зниженi рiвнi експресiї та 26 — пiдвищенi рiвнi експресiї генiв. Для майбутнiх дослiджень iз подальшої перевiрки на клiнiчних зразках пухлин було вiдбрано гени з високим рiвнем змiн (бiльше 10 раз) у клiтиннiй лiнiї PC3, а також гени, якi є перспективними на нашу думку для подальших дослiджень з урахуванням даних лiтератури, представлених в базi даних PubMed. Гени вiдбирались iз рiзних сигнальних шляхiв, оскiльки у формуванні та розвитку пухлин беруть участь всi сигнальнi системи клiтини. Було вiдбрано 14 генiв зi змiнами (*BCL2*, *BCL2L1*, *PIK3R1*, *FOS*, *ITGA3*, *EPDR1*, *TGFBI*, *VEGFA*, *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*), якi є перспективними генами, потенцiйно асоцiйованими з iнвазивнiстю та метастазуванням пухлин передмiхурової залози.

У трансфiкованих клiтинних лiнiях *GLCE*-LNCaP та *GLCE*-PC3 порiвняно до нативних клiтинних лiнiй було показано 18 та 21 ген зi змiнами бiльше двох разiв. Пiсля аналізу генiв зi змiнами рiвнiв експресiї вперше виявлено вплив експресiї гена *GLCE* на експресiю генiв ангiогенезу та iнвазивностi i метастазування у клiтинних лiнiях аденокарцином

передміхурової залози.

Вперше у вибірці зразків доброякісних гіперплазій передміхурової залози (ДГПЗ), аденокарцином та умовно-нормальних тканин (УНТ) передміхурової залози українських пацієнтів визначено експресії на рівні мРНК генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFB1*, *IL1B*. Вперше на вибірці клінічних зразків з української популяції гібридизацією на NotI-мікрочипах виявлено делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *BHLHE40*, *ROPN1/KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GORASP1/TTC21A*, *FSTL1*, *ABHD5/C3orf77*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *NEK11*, *FBLN2*, *SOX2*, *MINA*, *CHCHD6*, *WNT7A*, *LOC285375*, *FGF12*, *NKIRAS1/RPL15*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *RPL32/IQSEC1*, *C3orf46/CHCHD6*, *RRP9/PARP3*, *PPM1M*, *KBTBD8*, *FGD5*, *CMTM8*, *NBEAL2*, *TMEM45A*, *LRRC3B*, *PDZRN3*, *USP19*, *EPHB1*, *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3*). Також було відзначено різниці у частотах делецій/метилування між зразками ДГПЗ та аденокарцином передміхурової залози із різною сумою за шкалою Глісона для 14 генів/локусів (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*, *CAND2*, *KY*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *MAP4*). Вперше показано наявність метилування промоторних ділянок генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1* у вибірці клінічних зразків аденокарцином передміхурової залози з української популяції.

Таким чином, у дисертаційній роботі на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози людини вивчено рівні відносної експресії 143 генів, пов'язаних з онкогенезом. Виявлені гени зі змінами рівня експресії належать до таких сигнальних шляхів як: адгезія, сигнальна трансдукція, контроль клітинного циклу, ангиогенез, інвазивність та метастазування. Для п'яти генів *FOS*, *EFNA5*, *IL1B*, *TGFB1*, *PLAU* зміни рівня експресії було підтверджено на клінічних зразках пухлин передміхурової залози. Також за допомогою NotI-мікрочипів знайдено 50 генів/локусів 3-ї хромосоми людини зі 180 досліджуваних на клінічних зразках тканин з генетичними й епігенетичними змінами більше ніж у 30% зразків.

В даній роботі було виявлено низку генів, потенційно асоційованих з доброякісними та злоякісними пухлинами передміхурової залози. Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень зі створення панелей біомаркерів для виявлення та розрізнення доброякісних та злоякісних процесів передміхурової залози.

Ключові слова: аденокарциноми передміхурової залози, доброякісні гіперплазії передміхурової залози, експресія генів, генетичні зміни, епігенетичні зміни.

Список публікацій здобувача:

1. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григорь'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Biopolym. Cell.* 2013; 29(6): 499-505. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
2. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, аналіз результатів)*
3. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів в нормальній клітинній лінії та клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86 (2): 119-128. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
4. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, et al. Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis. *Dis Markers.* 2015; 2015: 241301. *(Особистий внесок: аналіз та узагальнення результатів та підготовка статті до друку)*
5. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Relative expression of cancer-associated genes in

- prostate tumor samples. *Exp oncology*. 2017; 39 (2): 1-8. (*Особистий внесок: виділення РНК зі зразків пухлин та умовно-нормальних тканин передміхурової залози, синтез кДНК, дослідження рівнів експресії генів, статистична обробка результатів та підготовка статті до друку*)
6. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Transcriptional profiling of normal and cancer prostate cell lines. *Biopolym. Cell*. 2013; 29 (special issue): P.19. VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine; 2013 May 28-29; Kyiv, Ukraine.
 7. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Search for potential biomarkers of prostate cancer. *Матеріали X міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*; 2014 квіт. 8-11; Львів. 2014, с. 230-231.
 8. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis. *Biopolym. Cell*. 2014; 30 (special issue):14. VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
 9. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Effect of D-glucuronyl C5-epimerase expression in prostate cancer cell lines. *Ukr. Biochem. J*. 2014; 86 (5), suppl. 2: 29. *Матеріали XI Українського біохімічного конгресу*; 2014 жовт. 6-10, Київ.
 10. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Molecular subtyping of prostate tumors. *Матеріали XI міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*; 2015 квіт. 20-23; Львів. 2015, с. 396.
 11. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. *EACR Conference Series, materials of Meeting in Cancer Genomics*; 2015 28 June- 1 July; Cambridge, UK.
 12. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку

передміхурової залози. Матеріали XIII З'їзду онкологів та радіологів України. 2016 травн. 26-28; Київ. 2016, с. 114-115.

SUMMARY

Rozenberg I.E. Differentially expressed genes and genetic and epigenetic changes in human prostate tumors. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in biology, specialty 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

Prostate cancer is among the top five leading causes of mortality and the incidence rate among cancer men in the world by 2012 according to the World Health Organization. In Ukraine, as well as in the whole world, these indicators are also quite high. According to the data of the National Cancer Register of Ukraine in 2015, the incidence of prostate cancer was 6898 cases, mortality - 3149 respectively. Prostate cancer is ranked second with the incidence rate and third in terms of mortality rates in Ukraine (10.5% and 8.5% respectively).

On the one hand, the development and progression of prostate cancer, as well as other malignant tumors, is accompanied by inhibition of tumor suppressor genes and activation of protooncogenes. At present, ETS family of genes (*TMPRSS2: ETS* fusion gene) and the *MYC* gene have been shown among the protooncogenes involved in prostate cancer. The levels of expression of these genes are elevated during the development and progression of prostate tumors. Among the tumor suppressor genes that undergo changes in the development and progression of this type of cancer, the loss of the *PTEN* gene in primary prostate tumors was noted, as well as the loss of the *RB* gene in metastases and resistant to castration prostate cancer.

Previously, the search for markers and targets for the treatment of oncogenesis was focused on the search for protooncogenes, since their level of expression in tumors is usually elevated and makes it easier to detect. But due to the emergence of new methods in molecular biology tumor suppressor genes also began to be

considered as valuable therapeutic targets. Thus, for the *PTEN* gene, approaches have been developed to inhibit the PI3K / AKT / mTOR signaling pathway, which is overactive due to the inactivation of this gene.

On the other hand, prostate cancer is characterized by a high level of both genetic and epigenetic heterogeneity, which creates a problem for early diagnosis of tumors of the prostate gland. The proposed molecular classification of prostate cancer subtypes on the basis of research on genetic and epigenetic changes currently covers 74% of cases of investigated prostate cancer samples.

Despite the high level of heterogeneity of prostate cancer, the diagnosis and treatment of this disease is currently sufficiently standardized and does not allow separating the various subtypes of prostate cancer. This may lead to excessive diagnosis and treatment of prostate cancer. From 10% to 30% tumors of the prostate gland can progress to an aggressive metastatic type. However, the effectiveness of androgen deprivation used to treat these tumors is very different among patients with this disease. One of the possible reasons for a different response to androgen deprivation in patients with advanced prostate cancer was the presence of single-nucleotide polymorphisms in the steroidal metabolism genes (*CYP17A1*, *HSD3B1*), apoptosis (*CASP3*), signaling pathway of NF- κ B (*PSMD7*, *MON1B*) and some other signaling paths.

Investigation of genetic and epigenetic changes, as well as gene expression in different types of prostate tumors, will enable not only to expand existing knowledge of the mechanisms of development and progression of prostate cancer. It will also help to identify potential cancer-associated genes, which may include both proto-oncogenes and tumor suppressor genes that can help with stratification of various types of prostate tumors.

The work is devoted to the detection of genetic, epigenetic changes, as well as changes in gene expression in different types of prostate tumors for the search for cancer-associated genes that can be used to stratify various types of prostate tumors.

In this work, molecular biology (cell line cultivation, quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription, hybridization on NotI-microarrays, bisulfite sequencing), bioinformatics and statistical methods were used.

The study of genetic and epigenetic changes was performed by hybridization on NotI- microarrays in 33 clinical specimens of prostate tumors, among which there were 15 benign hyperplasia and 18 adenocarcinoma specimens, four of which belonged to the so-called "aggressive" metastatic type. Four samples of conventionally normal prostate gland tissue were used as controls. Validation of genetic and epigenetic changes found on microarrays was performed for selected genes / loci by quantitative polymerase chain reaction and bisulfite sequencing, respectively. The study of changes in gene expression was carried out by quantitative polymerase chain reaction using expression microarrays on the prostate cancer model cell lines with different potential for metastasis in experimental animals, and also with different sensitivity to androgens. Thus, the androgen-sensitive LNCaP cell line with low potential for metastases, as well as androgen-insensitive DU145 and PC3 cell lines with medium and high potential for metastasis, were used. As a control, the cell line of the normal epithelium of the prostate gland PNT2 served as a control. Testing of certain potentially associated genes with expression changes was performed on 16 samples of benign hyperplasia and 37 specimens with prostate adenocarcinoma, of which 29 adenocarcinoma specimens had paired conventionally normal tissues.

In model prostate cancer cell lines compared to normal cell line expression profiles of 65 associated with oncogenesis genes were studied at the mRNA level. Expression changes more than four times were detected in 34 genes: 29 genes in the LNCaP cell line, 20 genes in DU145 and 16 genes in PC3. Among expression-altered 27 are reduced, 5 are raised and the other two exhibit variable levels of expression. Among genes with altered expression, the following differentially expressed genes between androgen-independent cell lines with a higher potential for invasiveness and metastasis (DU145, PC3) and an androgen-dependent cell line with a lower potential for metastases (LNCaP). The selection was carried out with the maximum involvement of genes from various signaling pathways to obtain comprehensive information on the processes occurring in tumors of the prostate gland. In general, 14 differentially expressed genes (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*, *SERPINE2b*, *P16*, *CCNE1*, *IL1B*, *IL6*, *EFNA5*, *TAGLN*, *GLCE*, *IL1RL1*, *HOXA13*) between the LNCaP

and DU145 and PC3 lines were identified that are potentially associated with aggressive metastatic prostate tumors .

In LNCaP and PC3 cell lines, as well as lines with restored expression of the *GLCE* gene, an expression analysis at the mRNA level of 84 cancer-associated genes was performed. Changes in 36 genes were detected in PC3 cell line compared to LNCaP. Among these, ten genes had elevated expression levels and 26 reduced expression levels of genes. For future studies on further testing for clinical tumor samples, high-level genes (more than 10 times) in the PC3 cell line were selected, as well as genes that are promising in our opinion for further studies taking into account the literature data presented in the PubMed database. The genes were selected from various signaling pathways, since all signaling systems of the cell are involved in the formation and development of tumors. 14 genes with alterations (*BCL2*, *BCL2L1*, *PIK3R1*, *FOS*, *ITGA3*, *EPDR1*, *TGFB1*, *VEGFA*, *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*) were selected, which are promising genes potentially associated with invasive and metastasis of prostate tumors.

In the transfected cell lines *GLCE*-LNCaP and *GLCE*-PC3, 18 and 21 gene with alterations more than two times were shown in comparison to the native cell lines. After analysis of the genes with changes in expression levels, the effect of *GLCE* gene expression on expression of the angiogenesis and invasiveness and metastasis genes in the prostate adenocarcinoma cell lines was detected for the first time.

For the first time in the samples of benign prostatic hyperplasia, adenocarcinoma and conventionally normal tissues of the prostate gland of Ukrainian patients, expressions were determined at the level of the mRNA for *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFB1*, *IL1B* genes.

For the first time on a clinical samples from the Ukrainian population by hybridization on NotI-microarrays 50 genes / loci of the human chromosome three were identified with deletion/ methylation (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *BHLHE40*, *ROPN1* / *KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL*). *RBSP3*) *GORASP1* / *TTC21A* *FSTL1* *ABHD5* / *C3orf77* *IQSEC1* *CLASP2* *GNAI2* *NEK11* *FBLN2* *SOX2* *MINA* *CHCHD6* *WNT7A* *LOC285375* *FGF12* *NKIRASI* /

RPL15 CGGBP1 PPP2R3A SOX14 ZIC4 RAP2B RPL32 / IQSEC1, C3orf46 / CHCHD6, RRP9 / PARP3, PPM1M, KBTBD8, FGD5, CMTM8, NBEAL2, TMEM45A, LRRC3B, PDZRN3, USP19, EPHB1, FOXP1, MANF, GATA2, ALDH1L1, EPHB3).

Also, differences in deletion / methylation frequencies between BPH specimens and various adenocarcinoma of the prostate gland for 14 genes / loci (*LOC440944 / SETD5, OSBPL10 / ZNF860, CLCN2, PRSS42 / MYL3, VHL, BBX, LMCD1, CMTM6, FAM19A4, CAND2, KY, GATA2, ALDH1L1, MAP4*) were detected. The presence of methylation of the promoter regions of the *FGF12, GATA2* and *LMCD1* genes in samples of prostate adenocarcinoma from the Ukrainian population was first shown.

Thus, in the thesis on the model prostate cancer cell lines, the levels of relative expression of 143 genes associated with oncogenesis has been studied. Detected genes with changes in expression level are from the signaling pathways such as: adhesion, signal transduction, cell cycle control, angiogenesis, invasiveness and metastasis. For five genes *FOS, EFNA5, IL1B, TGFBI, PLAU* changes in expression levels have been confirmed in clinical specimens of prostate tumors. Also, using NotI-microarrays, 50 genes / loci of the human chromosome 3 from 180 examined on clinical specimens of tissues were found with genetic and epigenetic changes in more than 30% of samples.

In this work, a number of genes were identified that are potentially associated with different types of prostate tumors. The results can be used for further research on the creation of biomarker panels for the detection and stratification of benign and malignant prostate tumors.

Key words: prostate adenocarcinoma, benign prostatic hyperplasia, gene expression, genetic changes, epigenetic changes.

List of publications published on the topic of the dissertation:

1. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Gerashchenko GV, Grigorieva EV, Kashuba VI. Search for genes – potential markers of aggressiveness and metastasis for human prostate cancer. *Biopolym. Cell.* 2013; 29(6): 499-505.

2. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45.
3. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Comparative analysis of gene expression in normal and cancer human prostate cell lines. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86 (2): 119-128.
4. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, et al. Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis. *Dis Markers.* 2015; 2015: 241301.
5. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Relative expression of cancer-associated genes in prostate tumor samples. *Exp oncology.* 2017; 39 (2): 1-8.
6. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Transcriptional profiling of normal and cancer prostate cell lines. *Biopolym. Cell.* 2013; 29 (special issue): P.19. VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine; 2013 May 28-29; Kyiv, Ukraine.
7. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Search for potential biomarkers of prostate cancer. Abstract book the X International Scientific Conference for Students and PhD; 2014 Apr. 8-11; Lviv. 2014, P. 230-231.
8. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis. *Biopolym. Cell.* 2014; 30 (special issue):14. VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.
9. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Effect of D-glucuronyl C5-epimerase expression in prostate cancer cell lines. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86 (5), suppl. 2: 29. Abstract book XI Ukrainian Biochemical Congress; 2014 Oct. 6-10, Kyiv.
10. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Molecular subtyping of prostate tumors. Abstract book the XI

International Scientific Conference for Students and PhD; 2015 Apr. 20-23; Lviv. 2015, P. 396.

11. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. EACR Conference Series, materials of Meeting in Cancer Genomics; 2015 28 June- 1 July; Cambridge, UK.
12. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Lytvynenko RA, Vitruk YuV, Stakhovsky EA. Expression of cancer-associated genes in prostate tumor samples. Abstract book XIII Congress of Oncologists and Radiologists of Ukraine; 2016 May 26-28; Kyiv. 2016, P. 114-115.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Злоякісні та доброякісні пухлини передміхурової залози	26
1.1.1. Класифікація пухлин передміхурової залози	
1.1.2. Пухлино-асоційовані гени: гени – супресори росту пухлин та онкогени у пухлинах передміхурової залози	29
1.1.2.1. <i>GLCE</i> – ген потенційно-асоційований із пухлинами передміхурової залози	33
1.2. Генетичні та епігенетичні зміни у пухлинах передміхурової залози	34
1.2.1. Генетичні зміни при раку передміхурової залози	34
1.2.2. Епігенетичні зміни при раку передміхурової залози	37
1.2.3. Роль генів 3-ї хромосоми в онкогенезі злоякісних пухлин передміхурової залози	40
1.3. Підходи до пошуку та вивчення експресії потенційних пухлино-асоційованих генів.....	42
1.3.1. Методи скринінгу потенційних пухлино-асоційованих генів.....	42
1.3.2. Клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози як модель вивчення пухлин передміхурової залози	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1. Хімічні реактиви та реагенти	48
2.2. Біологічні матеріали.....	48
2.2.1. Клітинні лінії	48
2.2.2. Зразки тканин пухлин передміхурової залози	48
2.2.3. Бактеріальні клітини для клонування ДНК.....	51
2.3. Культивування клітинних ліній.....	51
2.4. Виділення тотальної РНК.....	51
2.5. Електрофорез РНК в агарозному гелі	53
2.6. Синтез першого ланцюга кДНК	53
2.6.1. Обробка ДНКазою I.....	53

2.6.2. Синтез першого ланцюга кДНК	54
2.7. Кількісна ПЛР для визначення рівнів відносної експресії генів	54
2.8. Трансфекція клітин LNCaP та PC3 плазмідною ДНК	58
2.9. Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція	59
2.10. Імуноцитохімія.....	59
2.11. Виділення геномної ДНК із тканин передміхурової залози людини	60
2.12. NotI-мікрочипи	60
2.12.1. Приготування проб ДНК.....	60
2.12.1.1. NotI обробка ДНК	60
2.12.1.2. Лігування з NotI-лінкером	61
2.12.1.3. Осаджування ПЕГ	61
2.12.1.4. Обробка Sau3AI.....	61
2.12.1.5. Імобілізація на кульках.....	61
2.12.1.6. Лігування з Sau3AI-лінкером.....	62
2.12.1.7. Ампліфікація ДНК.....	62
2.12.1.8. Осаджування продукту ПЛР	63
2.12.1.9. Мічення ДНК за допомогою ПЛР	63
2.12.1.10. Осаджування продукту ПЛР	63
2.12.2. Приготування та гібридизація NotI-мікрочипів	64
2.13. Визначення статусу метилювання геномної ДНК	64
2.13.1. Бісульфитна обробка ДНК	64
2.13.2. Бісульфитне секвенування.....	65
2.13.2.1. ПЛР для ампліфікації фрагментів ДНК перед секвенуванням	65
2.13.2.2. Лігування продуктів ПЛР	66
2.13.2.3. Трансформація компетентних клітин <i>E. coli</i> штам JM107.....	66
2.13.2.4. Культивування бактерій <i>E.coli</i> штам JM107.....	67
2.13.2.5. Виділення плазмідної ДНК	67
2.13.2.6. Секвенування ДНК.....	68
2.14. Статистична обробка даних.....	68
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	70

3.1. Визначення диференційно експресованих генів у клітинних лініях передміхурової залози з різною чутливістю до андрогенів	70
3.2. Зміни експресії генів в гормонорезистентній клітинній лінії PC3	86
3.3 Визначення впливу ектопічної експресії гена <i>GLCE</i> на експресію генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів.....	97
3.4. Визначення рівнів відносної експресії генів <i>EFNA5</i> , <i>TAGLN</i> , <i>FOS</i> , <i>PLAU</i> , <i>EPDR1</i> , <i>TGFB1</i> , <i>IL1B</i> у клінічних зразках аденокарцином передміхурової залози	100
3.5. Генетичні та епігенетичні зміни генів 3-ї хромосоми людини при диференціюванні доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози.....	108
3.5.1. Визначення генетичних/епігенетичних змін 3-ї хромосоми людини в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози з використанням NotI-мікрочипів	108
3.5.2 Визначення експресії генів <i>BHLHE40</i> , <i>BCL6</i> , <i>ITGA9</i>	113
3.5.3 Визначення статусу метилювання генів <i>FGF12</i> , <i>GATA2</i> , <i>LMCD1</i> , <i>TESSP2</i>	115
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ...	120
ВИСНОВКИ.....	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТОК А	200
ДОДАТОК Б	203
ДОДАТОК В	207
ДОДАТОК Д	211
ДОДАТОК Е	215

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат

ЕДТА – етилен-діамін трихлороцтова кислота

ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід

к-ЗТ-ПЛР – кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

ОНП – одонуклеотидний поліморфізм

ПЕГ - поліетиленгліколь

ПСА – простатоспецифічний антиген

РПЗ – рак передміхурової залози

Співавт. - співавтори

УНТ – умовно-нормальні тканини

DEPC-H₂O – вода, оброблена диетилпірокарбонатом (ДЕПК)

SDS – натрію додецил сульфат

SSC - сольовий розчин натрію цитрату

ВСТУП

Актуальність теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я рак передміхурової залози (РПЗ) займає друге місце по частоті захворюваності та п'яте місце по смертності у чоловіків у світі станом на 2012 рік (1). Згідно даних канцер – реєстру Національного інституту раку України в 2015 році загальна кількість випадків захворювання на РПЗ становила 6898, загальна кількість померлих — 3149 випадків. РПЗ займає друге місце за частотою захворюваності та третє місце за частотою смертності в Україні (10,5% та 8,5% відповідно) (2).

З одного боку, виникнення РПЗ так само, як і інших видів раку, супроводжується багатьма генетичними та епігенетичними змінами. Так, показано низку ділянок хромосом, зміни в яких найчастіше виникають при розвитку РПЗ та є асоційованими з ризиком виникнення цього захворювання (3). Однією з таких ділянок є 8q24, яка часто ампліфікується в пухлинах передміхурової залози. Вона містить онкоген *MYC*, ампліфікація якого корелює з прогресуванням та рецидивами пухлин передміхурової залози (4). Гіпометилування ДНК було визначено як на ранніх (5), так і на пізніх стадіях розвитку РПЗ (6). В той же час, гіперметилування промоторів генів є однією з найбільш досліджених епігенетичних змін при РПЗ (7).

З іншого боку, РПЗ характеризується високим рівнем як генетичної (8), так і епігенетичної гетерогенності (9), що створює проблему для ранньої діагностики пухлин передміхурової залози. Запропонована молекулярна класифікація підтипів РПЗ на основі досліджень генетичних, епігенетичних та транскриптомних змін наразі охоплює 74% випадків досліджених зразків РПЗ (10).

В той же час, при прогресуванні РПЗ відбувається інгібування генів-супресорів пухлинного росту та активізація протоонкогенів (11). На сьогодні серед залучених до РПЗ протоонкогенів суттєве значення мають гени родини *ETS* у складі злитих генів *TMPRSS2:ETS* та ген *MYC* (12), підвищені рівні експресії яких асоціюються з прогресуванням пухлинного процесу РПЗ (5,6).

Серед виявлених генів-супресорів, пов'язаних з виникненням РПЗ, відзначено втрату гетерозиготності гена *PTEN* у первинних пухлинах передміхурової залози (15), гена *RB* в метастазах та резистентному до кастрації РПЗ (16).

Значний рівень гетерогенності РПЗ спричиняє певні труднощі в діагностиці цієї форми раку та персоніфікованому лікуванні хворих (18,19). Відомо, що від 10% (19) до 30% (20) пухлин передміхурової залози здатні прогресувати до агресивного метастазуючого типу, який характеризується резистентністю до андрогенів (21). Механізми набуття резистентності до андрогенів лишаються ще недостатньо охарактеризованими. До того ж, клінічна ефективність гормональної терапії, яка застосовується для лікування хворих з гормоночутливими пухлинами передміхурової залози є варіабельною серед пацієнтів із РПЗ (19), а для гормонорезистентних пухлин терапії фактично не існує. Це ставить питання про необхідність подальшого дослідження, яке спрямоване на виявлення молекулярних підтипів пухлин передміхурової залози.

Незважаючи на достатньо широкий спектр досліджень РПЗ, що дозволило виявити певні фактори та механізми розвитку цього захворювання, залишається невирішеною низка питань, наприклад щодо переходу деяких пухлин до гормонорезистентного типу. Отже дослідження генетичних та епігенетичних змін, а також експресії генів в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози надасть можливість розширити існуючі знання механізмів прогресування РПЗ. Також це допоможе виявити потенційні асоційовані із РПЗ гени, що можуть бути використані для диференційної діагностики доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози, та включені у панель маркерів для ранньої діагностики, контролю перебігу захворювання та персоніфікованої терапії.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділа Молекулярної онкогенетики Інституту Молекулярної біології і генетики НАН України “Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітеліального походження” (державний реєстраційний номер № 0110U000691,

2011-2015 рр.), «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модульних системах» (державний реєстраційний номер № 0115U003742, 2016-2020 рр.), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій». Проект «Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітеліального походження» (державний реєстраційний номер №0110U000691, 2009-2014 рр. та № 41/146 2015 р.), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру “Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології” - “Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації” (№ F46.1/011, 2011-2012 рр.) та за підтримки гранту Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації № 0111U005988.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи був пошук генів, які беруть участь у процесах виникнення та прогресування РПЗ.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Пошук диференційно експресованих генів у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози для виявлення нових генів, асоційованих з пухлинами передміхурової залози.

2. Виявлення змін експресії генів, асоційованих з інвазивністю та метастазуванням пухлин, у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози.

3. Визначення експресії генів, виявлених в модельних клітинних лініях аденокарцином, на клінічних зразках пухлин.

4. Виявлення генетичних та епігенетичних змін у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози за допомогою NotI-мікрочипів.

5. Валідація виявлених за даними NotI-мікрочипів змін іншими молекулярно-біологічними методами.

Об’єкт дослідження – розвиток пухлин передміхурової залози людини.

Предмет дослідження – генетичні та епігенетичні зміни, асоційовані з пухлинами передміхурової залози людини.

Методи дослідження: молекулярно-біологічні (культивування клітинних ліній, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (к-ЗТ-ПЛР), гібридизація на NotI-мікрочипах, бісульфітне секвенування) біоінформаційні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. На модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 з різною чутливістю до андрогенів, відносно лінії умовно нормального епітелію PNT2, досліджено експресії 65 генів на рівні мРНК. Виявлено 14 диференційно експресованих генів між гормоночутливою лінією LNCaP та гормонорезистентними лініями DU145 та PC3. Вивчено на рівні мРНК експресії 84 генів, асоційованих з онкогенезом, між лінією PC3 та LNCaP. Показано 36 генів зі змінами між лінією з високим потенціалом до інвазивності та метастазування (PC3) порівняно до лінії з низьким відповідним потенціалом (LNCaP). Вперше виявлено вплив експресії гена *GLCE* на експресію генів ангиогенезу та інвазивності і метастазування у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози. Вперше у вибірці зразків доброякісних гіперплазій передміхурової залози (ДГПЗ), аденокарцином та умовно-нормальних тканин (УНТ) передміхурової залози українських пацієнтів визначено експресії на рівні мРНК генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFB1*, *IL1B*. Вперше на вибірці клінічних зразків з української популяції гібридизацією на NotI-мікрочипах виявлено делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми у різних типах пухлин передміхурової залози. Також вперше виявлено значущі різниці у частотах делецій/метилування між зразками ДГПЗ та різними стадіями аденокарцином передміхурової залози для 14 генів/локусів. Вперше показано наявність метилування промоторних ділянок генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1* у вибірці клінічних зразків аденокарцином передміхурової залози з української популяції.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати роботи підтверджують перспективність технології NotI-мікрочипів для скринінгу геному з метою пошуку потенційних пухлино-асоційованих генів для ранньої діагностики аденокарцином передміхурової

залози. В даній роботі було виявлено низку генів, потенційно асоційованих з різними типами пухлин передміхурової залози. Ці диференційно експресовані гени можуть бути використані для створення наборів маркерів для виявлення та розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози, контролю перебігу захворювання, а також для персоніфікованої медицини.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальної роботи, обробка та аналіз отриманих результатів було проведено особисто здобувачем. Так, автором проведено виділення тотальної РНК з клітинних ліній карцином передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 та лінії умовно нормальних клітин епітелію передміхурової залози людини PNT2, а також частини зразків ДГПЗ, аденокарцином та УНТ передміхурової залози. Крім того, виконано дизайн праймерів та визначення рівнів відносної експресії пухлино-асоційованих генів методом к-ЗТ-ПЛР в клітинних лініях та клінічних зразках пухлин передміхурової залози та УНТ, статистичну обробку результатів. Виділення тотальної РНК з частини клінічних зразків пухлин було проведено спільно з с.н.с., к.б.н. Геращенко Г.В. Виділення геномної ДНК зі зразків біопсій передміхурової залози було проведено спільно з с.н.с., к.б.н. Гордіюком В.В. Підготовка зразків геномної ДНК до гібридизації, гібридизація на NotI-мікрочипі, сканування, а також бісульфітна обробка ДНК, клонування та секвенування проведено спільно з к.б.н. Кондратовим О.Г. Обробка отриманих результатів гібридизації проведена спільно з Дмитрієвим А.А. (Інститут молекулярної біології ім. В.О. Енгельгардта РАН, Москва, Росія). Планування дослідження, обговорення результатів та написання статей було здійснено під керівництвом завідувача відділом молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України д.б.н., проф. Кашуби В.І., та с.н.с. відділу молекулярної онкогенетики к.б.н. Геращенко Г.В.

Здобувач висловлює подяку завідувачу відділу молекулярної онкогенетики д.б.н., проф. Кашубі В.І. та с.н.с. відділу молекулярної онкогенетики к.б.н. Геращенко Г.В. за корисні поради під час планування експериментів та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на поточних семінарах відділу Молекулярної онкогенетики Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАН України та міжнародних і вітчизняних конференціях: VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2013), VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2014), X міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2014), XI міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2015), EACR Conference in Cancer Genomics (Cambridge, United Kingdom, 2015), XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, Україна, 2016), конференції «Інтегральні патогенетичні підходи в діагностиці та терапії раку» (Київ, Україна, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 праць, з них п'ять статей у фахових наукових журналах, які входять до міжнародної бази даних SCOPUS, та тези семи доповідей у збірниках матеріалів з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації - 217 сторінок. Робота містить 19 рисунків, 17 таблиць. Список використаної літератури охоплює 404 найменування, з них кирилицею - 3, латиницею - 401.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Злоякісні та доброякісні пухлини передміхурової залози

1.1.1. **Класифікація пухлин передміхурової залози.** Передміхурова залоза – це залоза зовнішньої секреції, що є складовою чоловічої статеві системи. За формою вона подібна до каштана. Передміхурова залоза розміщується нижче сечового міхура, крізь її товщу проходить простатична частина сечовивідного каналу. Залоза має три головні зони, які відрізняються гістологічно: периферичну, центральну та перехідну. Зовні передміхурова залоза покрита капсулою, що складається зі щільної сполучної тканини з елементами гладко-м'язових волокон. До складу залози входять клітини трьох типів: залозисті епітеліальні, гладко-м'язові та фібробласти (22).

В залежності від форми, характеру розташування секреторних структур у пухлині та по співвідношенню епітеліального та сполучно-тканинного компонентів виділяють наступні форми пухлин передміхурової залози: 1) епітеліальні, 2) нейроендокринні, 3) мезенхимальні, 4) гематолімфоїдні, 5) змішані.

У клінічному відношенні всі пухлини поділяють на доброякісні та злоякісні пухлини передміхурової залози. Найбільш поширеним типом доброякісних новоутворень передміхурової залози є ДГПЗ, яка розвивається з епітеліальних клітин. Найчастіше ДГПЗ розвивається з перехідної зони та періутерального відділу передміхурової залози.

За міжнародною класифікацією ВООЗ виділяють наступні типи доброякісних пухлин передміхурової залози:

1. мезенхимальні пухлини: а) лейоміома, б) гемангіома, в) гранулярні клітини; *2. змішані пухлини:* а) цистаденома.

Серед злоякісних пухлин передміхурової залози виділяють наступні типи:

1. епітеліальні пухлини: а) секреторні неоплазми: - ацинарна аденокарцинома

(атрофічна, псевдогіперпластична, мікрокістозна, піниста, колоїдна, перснеподібна, з плеоморфних гігантських клітин, саркоматоїдна),
 - аденокарцинома протоків (криброзна, папілярна, солідна); б) уротеліальна карцинома; в) плоскоклітинні неоплазми: - плоскоклітинна аденокарцинома, плоскоклітинна карцинома; г) базальноклітинна карцинома; 2. *нейроендокринні пухлини*: а) аденокарцинома з нейроендокринною диференціацією; б) високо диференційована нейроендокринна пухлина; в) дрібноклітинна нейроендокринна карцинома; д) крупноклітинна нейроендокринна карцинома; 3. *мезенхимальні пухлини*: а) стромальна саркома; б) лейоміосаркома; в) рабдоміосаркома; г) ангіосаркома; д) синовіальна саркома; е) остеосаркома; е) злоякісна солітарна фіброзна пухлина. 4. *гематолімфоїдні пухлини*: а) дифузна В-крупноклітинна лімфома; б) хронічна лімфоцитарна лейкемія/дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома; в) фолікулярна лімфома; г) лімфома з клітин мантійної зони; д) гостра мієлоїдна лейкемія; е) В-лімфобластична лейкемія/лімфома. 5. *змішані пухлини*: а) нефробластома; б) рабдоїдна пухлина; в) пухлини статевих клітин; г) світлоклітинна аденокарцинома; д) меланома; е) нейробластома (23,24).

Окремим підтипом епітеліальних пухлин є простатична інтраепітеліальна неоплазія I та III стадій. Простатична інтраепітеліальна неоплазія III стадії вважається перехідним етапом від доброякісних до злоякісних пухлин передміхурової залози (25,26).

Згідно з класифікації наведеної вище, злоякісні пухлини передміхурової залози людини виявляють значну фенотипічну гетерогенність, втім, найбільш поширеним серед типів РПЗ є ацинарна аденокарцинома (більше 95%), у той час як інші типи — такі як аденокарцинома протоків, персневидна і колоїдна аденокарциноми виявляють достатньо рідко (27).

В залежності від розмірів пухлини, проникнення її у лімфовузли та появи метастазів існує класифікація TNM (Tumor, Node, Metastase) Американського комітету раку. Згідно з нею пухлини поділяють за: 1) T- розмірами первинної пухлини; 2) N – наявністю метастазів у лімфовузли; 3) M – наявністю віддалених метастазів (28).

Метастази при РПЗ розповсюджуються гематогенним та лімфогенним шляхами у кісткову тканину (29–31) (в більшості випадків, у кістки хребта та тазу), легені (32), печінку (33), пахові та здухвинні лімфовузли (34).

Разом з іншими параметрами для характеристики морфологічних змін тканин при РПЗ та кількісної оцінки ступеня диференціювання пухлини використовується також шкала Глісона (або сума Глісона), що базується на мікроскопічному дослідженні пофарбованих гематоксиліном та еозином гістологічних препаратів біопсій передміхурової залози (35). Сума Глісона складається із суми двох варіантів, які найбільш часто зустрічаються у досліджуваних зразках, причому важливим є перший компонент суми (36). Перший зразок, що включається до суми, презентує найбільш характерний ступінь диференціювання пухлини (більше 50%), другий зразок - менш характерну ступінь (менше 50 %, але не менше 5%). Шкала Глісона включає п'ять різних ступенів, яким відповідають різне диференціювання пухлин передміхурової залози. Так, перший ступінь відповідає високо диференційованим пухлинам передміхурової залози, а п'ятий ступінь – пухлинам без чіткої структури, яку можна визначити. Гістологічна ступінь G1 характеризує високо диференційовані тканини з чіткими межами пухлини, округлою формою залоз та без стромы між протоками залоз, із сумою за шкалою Глісона, яка менша чи дорівнює шести. Ступінь G2 відповідає помірно диференційованим пухлинам з менш чіткими межами пухлини, округлою і подовженою формою залоз та із сумою за шкалою Глісона, яка дорівнює $3+4=7$. Ступінь G3 відповідає помірно диференційованим пухлинам із розмитими межами, оскільки РПЗ представлений пухлинними клітинами різного диференціювання, із сумою за шкалою Глісона, яка дорівнює $4+3=7$. Ступінь G4 відповідає низько диференційованим пухлинам з інфільтративним ростом та злиттям залоз, здавлених стромою, із сумою за шкалою Глісона, яка дорівнює: $4+4=8$, $3+5=8$; $5+3=8$. Ступінь G5 відповідає низько диференційованим пухлинам, межі яких не визначаються та форму залоз важко визначити, із сумою за шкалою Глісона, що дорівнює 9–10 (23). Чим вища сума за шкалою Глісона, тим більшою є імовірність інвазії та метастазів, а також більш

негативним є прогноз виживаності пацієнта (37).

Ще однією характеристикою, яку використовують для оцінки розвитку РПЗ є рівень ПСА в сироватці крові. ПСА – це глікопротеїн, що виробляється секреторним епітелієм передміхурової залози та необхідний для розрідження еякуляту (38). В лабораторній практиці використовується визначення концентрацій вільного та загального ПСА у крові, а також їхнє співвідношення. У чоловіків до 49 років верхня межа нормальної концентрації ПСА у крові складає 2,5 нг/мл, для чоловіків до 59 років – 3,5 нг/мл, для чоловіків до 69 років – 4,5 нг/мл а для чоловіків старше 69 років – 6,5 нг/мл (39).

Таким чином, для визначення клінічної стадії РПЗ беруть до уваги ступінь розвитку пухлини за класифікацією TNM, шкалою Глісона та показники ПСА (28), втім це не дозволяє точно розділяти пацієнтів на групи з неагресивними латентними та агресивними, здатними до утворення метастазів, пухлинами (40). До того ж існуюча класифікація не передбачає диференціювання пацієнтів з різною відповіддю до терапії андрогенами (41).

Отже, існує потреба у виявленні молекулярних маркерів, які б дозволили проводити таке розрізнення.

1.1.2. Пухлино-асоційовані гени: гени – супресори росту пухлин та онкогени у пухлинах передміхурової залози. Формування злоякісних новоутворень супроводжується багатьма змінами, як на хромосомному рівні, так і на рівні окремих генів. Процес онкогенеза характеризується неконтрольованим поділом клітин, що може виникати внаслідок порушення систем контролю проліферації клітин, систем репарації ДНК та інших важливих сигнальних шляхів. Початково існувала теорія, за якою виникнення злоякісних пухлин пов'язували тільки з домінантною активацією протоонкогенів (42,43). Проте з часом з'явилися дані, що не узгоджувалися з цією теорією. Н. Harris показав, що злиття пухлинних та нормальних клітин веде до отримання гібридів, які не були онкогенними (44). Було введено поняття генів – супресорів пухлинного росту. Підтвердження наявності цих генів виникло з впровадженням методу мікроклітинного перенесення окремих

хромосом. Так, було показано, що при перенесенні 11-ї хромосоми людини з нормальних фібробластів у клітини HeLa чи клітини пухлин Вільмса спостерігалось пригнічення їхньої здатності до формування пухлин у голих мишей (45).

Гени - супресори росту пухлин – це гени, які беруть участь у різноманітних функціях клітини: контролі клітинного циклу, репарації пошкодженої ДНК, диференціації та міграції клітин, та в нормі лімітують поділ клітин. Втім, при інактивзації чи втраті цих генів стає можливим розвиток пухлин (46). Серед генів – супресорів росту пухлин є як «універсальні», які інактивовані чи делетовані у більшості типів злоякісних пухлин (*TP53* (пухлинний протеїн p53) (47), *RB1* (транскрипційний корепресор RB) (48)), так і специфічні – найбільш характерні для окремих локалізацій злоякісних пухлин (*APC* (регулятор сигналіngu WNT) – рак кишківника (49), *TRAF3* (асоційований з рецептором TNF фактор три) – лімфоми (50)).

Для пухлин передміхурової залози характерні зміни наступних генів – супресорів росту пухлин: *PTEN*, *TP53*, *RB1*, *NKX3.1*, *GSTP1*, *WWOX* та інші. Деякі з цих генів більш детально описані в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

Гени-супресори пухлин та кандидати в супресори росту пухлин при РПЗ

Ген	Продукт	Локалізація	Функції	Дані літератури
1	2	3	4	5
<i>GSTP1</i>	глутатіон - S-трансфераза Р один	11q13	Детоксикація за рахунок кон'югації гідрофобних та електрофільних компонентів із залишком глутатіону (51).	Інактивация гена <i>GSTP1</i> вважається одним з початкових етапів ініціації РПЗ (52).
<i>NKX3.1</i>	НКЗ гомеобокс один	8p21.2	Транскрипційний фактор, що є специфічним негативним регулятором росту клітин передміхурової	Втрата експресії протеїна НКХ3.1 корелює з прогресуванням РПЗ (відсутність експресії в 5% ДГПЗ та в 78% метастазів РПЗ) (53).

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5
			залози (54)	
<i>PTEN</i>	гомолог фосфатази та тензина	10q23.3	Фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат 3-фосфатаза, яка негативно регулює клітинні рівні фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату та функціонує як супресор росту пухлин, негативно регулюючи АКТ/РКВ сигнальний шлях (55).	Втрата протеїну <i>PTEN</i> асоційована з підвищеним ризиком виникнення летальної прогресії РПЗ (56); геномна делеція <i>PTEN</i> в локалізованому РПЗ вказує на високу вірогідність капсулярної інвазії та гірший прогноз виживаності пацієнтів (57).
<i>RB1</i>	ретинобластома один	13q14.2	Негативна регуляція клітинного циклу за рахунок репресії E2F-опосередкованої транскрипції (58), (59); стабілізація гетерохроматину (60).	Втрата протеїна Rb спостерігається в 7% первинних високо-стадійних ацинарних пухлин передміхурової залози (10 з 150 зразків) та до 90% - в дрібноклітинних карциномах передміхурової залози (26 з 29 зразків) (61); ген <i>RB1</i> є інактивованим в 5% первинних пухлин передміхурової залози та до 37% в метастазуючих пухлинах передміхурової залози (62).
<i>TP53</i>	пухлинний протеїн p53	17p13	Протеїн p53 забезпечує контроль за поділом та ростом клітин, здійснює арешт поділу клітин з генетичними пошкодженнями та	Збільшена експресія протеїна p53 дикого типу веде до арешту клітинного циклу в клітинних лініях LNCaP, DU145 та інгібування

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5
			здатен викликати їх апоптоз (63).	проліферації (64); делеції гену <i>TP53</i> було знайдено в 14,8% пухлин передміхурової залози (з 11,152 зразків) (65).

Незважаючи на відкриту велику кількість генів – супресорів росту пухлин, пошук нових генів є актуальним, беручи до уваги постійну еволюцію пухлин та появу нових субтипів для окремих локалізацій пухлин. А також через те, що гени, які є супресорами росту пухлин, можуть набувати мутацій, які призводять до онкогенних властивостей білкових продуктів цих генів. Так, відомі мутації гену *TP53*, які підвищують онкогенний та метастатичний потенціал пухлин, надають клітинам пухлин хімічної резистентності (66).

На противагу генам – супресорам росту пухлин існують онкогени, які здатні стимулювати ріст пухлинних клітин у разі підвищення рівнів їхньої експресії.

Нормальні клітини містять так звані протоонкогени, які можуть переходити в онкогени внаслідок точкових мутацій чи хромосомних транслокацій (67).

Серед онкогенів, які виявлені у пухлинах передміхурової залози виділяють наступні: *MYC*, *ERBB2*, *BCL2*, *AR* та ін. Деякі з них охарактеризовані в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2.

Онкогени при раку передміхурової залози

Ген	Продукт	Локалізація	Функції	Дані літератури
1	2	3	4	5
<i>MYC</i>	гомолог v-муспташиного вірусного	8q24.21	Транскрипційний фактор, є одним з ключових регуляторів проліферації та трансформації клітин	Підвищені рівні ядерної експресії протеїна <i>MYC</i> асоційовані з прогресуванням РПЗ

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4	5
	онкогену		(68).	(69); ампліфікація регіону 8q, в який входить ген <i>MYC</i> зустрічається приблизно в 30% пухлин РПЗ (70).
<i>ERBB2</i>	erb-b2 рецептор тирозинових кіназ два	17q12	Член родини рецепторів тирозинових кіназ епідермального фактору росту (EGF), який бере участь в регулюванні апоптозу, міграції, диференціації та росту клітин (71).	У пацієнтів з середнім та високим рівнями експресії протеїна <i>ERBB2</i> виявлено підвищений відносний ризик смертності від рецидивів пухлин передміхурової залози (72); ектопічна експресія <i>ERBB2</i> в клітинах LNCaP C-33 корелює з проліферацією клітин (73).
<i>BCL2</i>	регулятор апоптоза <i>BCL2</i>	18q21.3	Протеїн внутрішньої мембрани мітохондрій, який здатен інгібувати апоптоз (74).	Підвищена експресія протеїна <i>BCL2</i> сприяє переходу до гормонорезистентного типу у клітинах LNCaP (75).

При РПЗ як і при інших типах злоякісних пухлин активація протоонкогенів та інгібування генів, супресорів дисфункціональний вплив яких може викликати трансформацію клітин. Отже, для більш змістовного розуміння механізмів появи та прогресування РПЗ необхідно проводити пошук та подальше вивчення усіх пухлино-асоційованих генів, серед яких можуть бути протоонкогени чи гени-супресори росту пухлин.

1.1.2.1. ***GLCE*** – ген потенційно-асоційований із пухлинами передміхурової залози. Ген *GLCE* був обраний для вивчення в нашій роботі після аналізу даних літератури. Він кодує епімеразу глюкуронової кислоти, яка є одним із важливих ензимів біосинтезу гепарансульфатів (76). Гепаран-

сульфати є протеогліканами, які є складовими компонентами міжклітинного матриксу (77). Як відомо, під час онкогенної трансформації клітин міжклітинний матрикс зазнає суттєвих змін (78).

Протеїн *GLCE* відповідає за епімеризацію D-глюкуронової кислоти до L-ідурунової кислоти (79). L-ідурунова кислота потрібна для гнучкості ланцюгів гепарансульфата та забезпечення взаємодій між гепарансульфат-протеогліканами та лігандами клітинних поверхонь, зокрема рецепторами факторів росту (80,81). Така взаємодія протеогліканів із рецепторами факторів росту, а також інтегринами здатна регулювати процеси клітинної поляризації, міграції, проліферації клітин в нормальному та трансформованому станах (82,83).

У первинних пухлинах передміхурової залози була знайдена аберантна експресія гена *GLCE*. Так, рівні його експресії були знижені в 53% досліджуваних зразків аденокарцином передміхурової залози та підвищені в 21% зразків. Крім цього, групою дослідників було показано диференційні рівні метилювання промотора гена *GLCE* у клітинних лініях аденокарцином з різною чутливістю до андрогенів (84). Втім, для пухлин молочної залози та легень ген *GLCE* є потенційним геном-супресором росту, оскільки він виявляє антипроліферативні та пухлиносупресорні властивості у цих типах пухлин (85,86). До того ж було показано зниження рівня експресії цього гена у клінічних зразках злоякісних пухлин молочної залози та легень (86–88).

Отже, наявні дані літератури вказують на неоднозначність впливу цього гену на клітини пухлин не тільки різних локалізацій, але і в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози, що потребує детального вивчення.

1.2. Генетичні та епігенетичні зміни у пухлинах передміхурової залози

1.2.1. Генетичні зміни при раку передміхурової залози. Виникнення РПЗ так само, як і інших видів раку, супроводжується багатьма генетичними змінами. Втім, серед інших видів злоякісних пухлин він відрізняється значною

гетерогенністю, яка негативно впливає на прогнозування перебігу захворювання. За допомогою методів порівняльної геномної гібридизації було виявлено ряд ділянок хромосом, зміни в яких найчастіше виникають при розвитку РПЗ, та є асоційованими з ризиком виникнення цього захворювання. Однією з таких ділянок є 8q24, яка часто є ампліфікованою в пухлинах передміхурової залози. Вона містить онкоген *MYC*, ампліфікація якого корелює з прогресуванням та рецидивами пухлин передміхурової залози (4). Інші ділянки в яких однонуклеотидні поліморфізми (ОНП) асоційовані з ризиком розвитку РПЗ це: 1p36 (локус *CAPB*) (89); 1q24-25 (локус *HPC1*, ген *RNASEL*) (90); 2p15 (91) (ген *EHBP1* (92)); 3p12.1 (93); 6q25.3 (*SLC22A3*) (94); 7p15.1 (*JAZF1*) (95); 10q11.23 (96) (ген *MSMB* (97)); 10q26.13 (98) (ген *CTBP2* (99)); 17p (локус *HPC2*, ген *ELAC2*) (100); 17q12 (ген *HNF1B*) (101); 19q13.33 (ген *KLK3*) (94); 22q13 (102); Xp11.22 (103) (ген *NUDT10* (104)); Xq27-28 (локус *HPCX*) (105), а також деякі інші ділянки. Було також відмічено підвищення копійності плечей хромосом: 2p, 3q, 7q, 8q, 9q, 17q, 20q та Xq (106), та делеції плечей хромосом 2q, 5q (106), 6q (107), 8p (108), 10q (109), 12p, 13q (108), 16q (109), 17p, 17q, 18q, 21q, а також 22q (110), гіперплоїдія, анеуплоїдія сьомої та 17-ї хромосом (111).

У нормальному функціонуванні передміхурової залози, а також при розвитку РПЗ важливу роль відіграють андрогени, та відповідно рецептор андрогенів (*AR*). Мутації гена *AR*, які успадковуються, зустрічаються рідко, натомість поліморфізми гена *AR* та інших генів, які відповідають за біосинтез та метаболізм андрогенів є досить поширеними у пацієнтів із РПЗ. Наприклад, перший екзон гена *AR* містить поліморфні повтори триплетів CAG та GGC. Довжина повторів триплету CAG впливає на чутливість передміхурової залози до андрогенів, а також на чутливість РПЗ до гормонів (112). Ген *SRD5A2* кодує стероїдну п'ять- α -редуктазу. Поліморфний варіант V97L цього гена асоційований зі зниженням продукції дигідротестостерона *in vitro* та *in vivo*, а також - зі зниженням ризику розвитку РПЗ. Він поширений серед китайців, які відносяться до популяцій з найменшим ризиком виникнення РПЗ (113). В той час варіант A49T цього гена є асоційованим з високим ризиком виникнення

РПЗ та поширений серед афро-американців та іспанців (114). Окрім варіабельності генів *AR* та *SRD5A2* також були знайдені поліморфізми у генах, що беруть участь у біосинтезі андрогенів та їхньому метаболізмі: *CYP3A*, *CYP11A1*, *CYP19A*, *HSD17B* та ін. Втім зв'язок цих поліморфізмів із ризиком виникнення РПЗ в різних популяціях досить відрізняється та не дає змоги однозначно оцінювати ці результати (115).

При формуванні пухлин передміхурової залози відбуваються також мутації в соматичних клітинах, які можуть призводити до інактивації генів-супресорів росту пухлин чи активації протоонкогенів. Одним з таких генів є ген-супресор росту пухлин *PTEN*, мутації якого частіше виникають в агресивних метастазуючих пухлинах передміхурової залози, ніж в локалізованих пухлинах (116). Мутації в 7-му та 8-му екзонах гена *TP53* вважаються факторами прогресування РПЗ (117). Мутації в соматичних клітинах також були знайдені для таких генів: *SPOP* (118), *KRAS* (*KRAS* протоонкоген, ГТФ-аза) (119,120), *FOXA1* (транскрипційний фактор сімейства «Forkhead») (121), *EGFR* (рецептор епідермального фактору росту) (122), та ін.

При формуванні пухлин часто виникають різні хромосомні зміни: транслокації, інверсії, делеції та ін. Результатом таких аберацій може бути поява хімерного злитого гена з новою чи зміненою активністю або зміна рівня експресії структурно нормального гена. Першою хромосомною транслокацією знайденою у клітинній лінії LNCaP, отриманої з аденокарциноми передміхурової залози, була транслокація t (6;16), в результаті чого утворився злитий ген *TPC:HPR* (123). Були відкриті й інші злиті гени у пухлинах передміхурової залози, зокрема *TMPRSS2:ERG* на 21-й хромосомі (ген *TMPRSS2* кодує трансмембранну протеазу серину два, а ген *ERG* – гомолог онкогена v-ets віруса E26 пташиного еритробластозу). Цей злитий ген зустрічається приблизно в 50% локалізованих пухлин РПЗ (124). Окрім цього злиття генів також відкриті злиття гена *TMPRSS2* з іншими членами *ETS* родини транскрипційних факторів: *ETV1* (7p21), *ETV4* (17q21), *ETV5* (3q27) (125–127), а також злиття членів цієї родини з іншими генами - *SLC45A3*, *ERVK2* (2-й член групи К ендеогенних ретровірусів), *HNRPA2B1* (гетерогенний

ядерний рибонуклеопротейн A2/B1), (128). До того ж, окрім злиття із генами родини *ETS* було знайдено злиті гени *SLC45A3: BRAF* та *ESRP1: RAF1*. Втім, частота виникнення цих злитих генів є досить низькою (до 5%) (129).

Зважаючи на широкий спектр досліджень РПЗ, вже відкрито певні гени, порушення в яких асоціюють із спадковим чи спорадичним типом виникнення РПЗ. Зокрема, для спадкового РПЗ це гени та локуси: локус *CAPB* (локус РПЗ та раку мозку) (89), локус *HPC1* (ген *RNASEL*) (90), локус *PCAP* (локус схильності до РПЗ) (130), *HPCX* (ген РПЗ асоційований з X хромосою) (131), а також багато інших. Для спорадичного типу виникнення РПЗ це гени: *AR*, *CDKN1B*, *EZH2*, *KLK3*, *GSTP1*, *MYC*, *NKX3.1*, *TP53*, *PTEN* та ін. (132). Не зважаючи на велику кількість досліджених генетичних змін при РПЗ, пошук нових змін є важливим для більш детального опису та розуміння механізмів розвитку цього захворювання.

1.2.2. Епігенетичні зміни при раку передміхурової залози. В організмі крім генетичних змін, які виникають при ініціації та розвитку пухлин, відбуваються ще й епігенетичні зміни, які теж впливають на формування та прогресування пухлин. Ці зміни регулюють функції генів, розвиток та диференціацію клітин без змінення послідовності самої ДНК. Виділяють такі основні епігенетичні зміни: метилювання ДНК, пост-трансляційні модифікації гістонів та включення у структуру хроматину альтернативних варіантів гістонів, експресія мікроРНК та довгих некодуючих РНК та ін.

Метилювання ДНК проходить по основах цитозину з утворенням 5-метилцитозину, які знаходяться біля основ гуаніну (CG-динуклеотиди). В геномі людини частота розташування CG-динуклеотидів неоднакова - так виділяють зони найбільшої їхньої щільності - так звані CpG-острівці (133). Зазвичай, вони є асоційованими з промоторами генів. Метилювання цитозинів в цих острівцях є важливим для нормального функціонування організму, оскільки забезпечує інактивацію другої X-хромосоми, геномний імпринтинг, захист від внутрішньогеномних повторів Alu, LINE та ін. (134). В той же час при онкогенезі гіперметилювання CG-динуклеотидів у промоторах генів -

супресорів росту пухлин призводить до їхнього інгібування, а гіпометилування у промоторах онкогенів – до активації.

Гіпометилування ДНК було знайдено як на ранніх (5), так і на пізніх стадіях розвитку РПЗ (135). В той же час, гіперметилування промоторів генів є однією з найбільш досліджених епігенетичних змін при РПЗ (7). Багато генів з гіперметилуванням є потенційними біомаркерами для виявлення та прогнозу перебігу цього захворювання. Так, наприклад, ген *GSTP1* є гіперметильованим в 82% зразків тканин та біопсій РПЗ і є перспективним біомаркером для ранньої детекції РПЗ (136). Окрім цього гена відомі також й інші, в яких гіперметилування промоторів асоційовано з прогнозуванням перебігу чи діагностикою РПЗ: *APC* (137), *PITX2* (парно-подібний гомеодомен 2) (138), *RPRM* (репрімо, кандидат в TP53-залежні медіатори аресту G2 фази циклу) (139), p16 (циклін-залежний інгібітор кіназ 2A), *MGMT* (O-6-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза) (140), *RASSF1A* (домен 1 RAS-асоційованої родини) (141), *CD44* (молекула CD44) (142) та ін.

Крім метилування у клітинах також може проходити процес окиснення 5-метилцитозину з утворенням 5-гідроксі-метилцитозину, тобто деметилування ДНК. Ця реакція проходить за участі протеїнів TET (гени *TET1-3*) (143). Було показано, що рівні 5-гідроксі-метилцитозину значно знижені при різних типах раку, в тому числі і РПЗ (6).

Ще одним видом епігенетичних змін, що відбуваються при РПЗ, є аберантна експресія мікроРНК. МікроРНК – це клас маленьких некодуєчих РНК розміром 18-25 нуклеотидів, які приєднуються до специфічних послідовностей на 3'-нетрансльованій ділянці мРНК та інгібують їх. Експресія самих мікроРНК може змінюватися при онкогенезі через генетичні чи епігенетичні зміни. Так, було знайдено мікроРНК, які мають підвищені: наприклад, мікроРНК-106a (144), мікроРНК-182 (145), родина мікроРНК-200 (146), мікроРНК-32 (147) чи знижені рівні експресії: наприклад, родина мікроРНК-143/145 (148), мікроРНК-100, мікроРНК-125b (149), мікроРНК-221, мікроРНК-222 (148,150,151). Змінені рівні експресії цих мікроРНК можуть бути важливими маркерами для детекції та прогноза РПЗ, втім це потребує

подальших досліджень.

При РПЗ зміненою може бути експресія не тільки мікроРНК, але й довгих некодуєчих РНК розміром більше 200 нуклеотидів. Найбільш охарактеризованою довгою некодуєчою РНК при РПЗ є *PCAZ* (асоційована з РПЗ 3). Вона має підвищений рівень експресії в 95% зразків тканин РПЗ порівняно з нормальними тканинами передміхурової залози та є високоспецифічною для РПЗ (152). Відомі також й інші довгі некодуєчі РНК, які відносять до онкогенних (*PCGEM1* – простатоспецифічний транскрипт *PCGEM1*, *PRNCR1* – асоційована з РПЗ некодуєча РНК (153), *HOTAIR* (154), *PCAT-1* - простатоспецифічний транскрипт 1 (155) та ін.) чи до таких, що мають супресорні властивості у розвитку РПЗ (*GAS5* – специфічна РНК аресту росту 5 (156), *PTENP1* – псевдоген 1 фосфатази та гомологу тензину (157), *MEG3* – РНК, що експресується по материнській лінії, 3 (158)).

Як було зазначено вище, ще одним важливим видом епігенетичних змін є модифікації гістонів – ацетилювання, метилювання, фосфорилювання, сумоїлювання та убіквітинуювання (159). Вони впливають на ДНК опосередковано, змінюючи афінність різних протеїнів, асоційованих із хроматином, що потім впливає на конформацію хроматину та можливість транскрибування певних ділянок ДНК. Однією з основних модифікацій гістонів, що були виявлені при РПЗ, є триметилювання залишку лізину 27 в гістоні H3 (H3K27-me3), яке проходить за участі метилтрансферази *EZH2*, що вважається онкогенним фактором при РПЗ (160). Іншими пост-трансляційними змінами, знайденими при РПЗ, є: підвищення рівня метилювання 4-го залишку лізину в гістоні H3 (H3K4me1) (161), підвищення рівня ацетилювання 18-го залишку лізину в гістоні H3 (H3K18Ac) (162), а також 20-го залишку лізину в гістоні H4 (H4K20me1, H4K20me2, H4K20me3) (163) та ін.

Втім, не тільки пост-трансляційні модифікації гістонів можуть впливати на конформацію хроматину. Можливі також заміни канонічних гістонів на їхні альтернативні варіанти, що може призводити до структурних змін, а також змін експресії генів (164). Єдиним відомим на цей час варіантом гістону, який пов'язаний з РПЗ є H2A.Z (165). При РПЗ ацетильований варіант гістону H2A.Z

є асоційованим з активацією онкогенів, а його деацетилювання, навпаки – з інгібуванням генів, супресорів росту пухлин, що було показано на клітинних лініях РПЗ та потребує подальшої перевірки на клінічних зразках пухлин передміхурової залози (166).

1.2.3. Роль генів 3-ї хромосоми в онкогенезі злоякісних пухлин передміхурової залози. Третя хромосома людини, і зокрема її коротке плече (3p), виділяється серед інших хромосом наявністю великого числа генів - супресорів росту пухлин, які зазнають генетичних чи епігенетичних змін при онкогенезі (167–170). Зміни 3-ї хромосоми разом із загальною хромосомною нестабільністю можуть призводити до формування злоякісних пухлин різних локалізацій (171,172) і, зокрема, пухлин передміхурової залози (173). Серед порушень 3-ї хромосоми в пухлинах передміхурової залози спостерігається як підвищення (для 3q25-26 ділянки) (174), так і зменшення кількості копій (для 3p13 ділянки) певних хромосомних ділянок (175). Ампліфікація ділянки 3q25-26 була знайдена в 50% пухлин передміхурової залози (у вибірці з n=10) (174). Одним з генів цієї ділянки є ген *TLOC1/SEC62* (гомолог *SEC62*). Було знайдено, що число копій гена *TLOC1/SEC62* було підвищено у пацієнтів з нижчим ризиком прогресування РПЗ після радикальної простатектомії (176). Серед ампліфікованих генів ділянки 3q25-27 також були відмічені гени *MDS1* (локус комплексу *MDS1* та *EVI1*), *SLC2A2* (2-й член 2-го сімейства переносників розчинених речовин) та *SOX2* (*SRY*-бокс 2) (174). Було показано, що ОНП треонін-110-ізолейцин гена *SLC2A2* є асоційованим зі зниженням ризику виникнення РПЗ (177). На клітинній лінії аденокарциноми передміхурової залози LAPC-4, яка є чутливою до андрогенів, було показано, що ектопічна експресія *SOX2* здатна ініціювати появу резистентної до кастрації форми РПЗ (178).

На противагу ампліфікації довгого плеча 3-ї хромосоми, її коротке плече, а саме ділянка 3p13 зазнає делеції, яка елімінує декілька генів – потенційних супресорів росту пухлин *FOXP1* (фактор сімейства «forkhead» Р один), *RYBP* (*RING1* та *YY1* зв'язуючий протеїн) та *SHQ1* (фактор збірки

рибонуклеопротейнів H/ACA-бокса) (62,175). На клітинній лінії LNCaP було показано, що FOXP1 є андроген-чутливим протеїном та негативно регулює сигналінг AR (179). Ген *RYBP* вважається потенційним геном - супресором росту пухлин. Так, було знайдено зниження рівня експресії протеїна RYBP у тканинах раку печінки та легень порівняно з УНТ (180). Делеція 3p13-p14.1 асоційована з *TMPRSS2-ERG* позитивними пухлинами передміхурової залози, що робить її однією з молекулярних характеристик для субтипів пухлин РПЗ (70).

Окрім делеції 3p13-p14.1, також було знайдено метилювання генів *RARRES1* (рецептор ретиноевої кислоти 1) та *LXN* (латексин), які розташовані у ділянці 3q25 (181). Ген *RARRES1* був показаний як супресор інвазивності у клітинній лінії аденокарциноми передміхурової залози PC3M, яка проявляє високий потенціал до метастазування у дослідних тварин (182). Гіперметилювання промоторів генів *LXN* та *RARRES1* асоціюють з погіршенням прогнозу для пацієнтів з РПЗ та біохімічним рецидивом (183).

Гіперметилювання промотора було також знайдено для гену *RASSF1A* (протеїн один із сімейства, асоційованих з Ras доменом), який розташований у ділянці 3p21.3 (184,185). Він є геном - супресором росту пухлин, та інгібований у різних видах раку: легень (186), світлоклітинній карциномі нирки (187). При реекспресії протеїна RASSF1A у клітинній лінії аденокарциноми передміхурової залози LNCaP було показано його здатність інгібувати ріст клітин (185).

Ще одним геном 3-ї хромосоми, який зазнає змін при РПЗ є ген *LTF* (лактотрансферин), локалізований в ділянці 3p21.31. Так, у зразках тканин РПЗ було знайдено зниження рівнів експресії мРНК цього гена, а також зниження рівнів протеїну у тканинах та сироватці крові. Зниження рівнів мРНК корелювало зі зменшенням виживаності пацієнтів із цим захворюванням. Знайдене метилювання промотора гена *LTF* у клітинній лінії LNCaP розкриває можливий механізм зниження експресії та може вказувати на супресорну роль цього гена у прогресування РПЗ (188).

Ген *FHIT* (кодує гістидинову триаду ламкості) (3p14.2) є геном -

супресором росту пухлин. Зниження експресії протеїна FHTT було знайдено у зразках тканин РПЗ в порівнянні з УНТ передміхурової залози, що робить цей ген можливою мішенню для терапії (189).

Ген *THRB* (кодує рецептор бета тиреотропного гормону) (3p24.2), також є геном - супресором росту пухлин. У ДНК з периферичної крові пацієнтів із РПЗ було знайдено вищі рівні втрати гетерозиготності гена *THRB* (22%) в порівнянні з пацієнтами з ДГПЗ (190).

Таким чином, згідно даних літератури третя хромосома людини відіграє важливу роль в розвитку РПЗ та потребує детального вивчення.

1.3. Підходи до пошуку та вивчення експресії потенційних пухлино-асоційованих генів

1.3.1. Методи скринінгу потенційних пухлино-асоційованих генів.

Розкриття механізмів розвитку та прогресування РПЗ включає в себе пошук потенційних пухлино-асоційованих генів. Для цього необхідно проводити широкомасштабний скринінг геному, транскриптому, протеому тощо. Все це стало можливим завдяки розвитку сучасних технологій і появі нових методів.

Одним з методів скринінгу хромосомних аберацій є метод порівняльної геномної гібридизації. ДНК зразка та контролю мітять різними флюорофорами, потім мічені ДНК денатурують, щоб отримати одноланцюгові матриці та гібридизують. Це дозволяє виявити одночасно зміни, як то - делеції чи дуплікації на всіх хромосомах. За допомогою цього методу було відкрито багато хромосомних ділянок, які зазнають змін при РПЗ. Наприклад, ампліфікація ділянки 8q24 (4), делеції ділянок 6q та 13q (191). Втім роздільна здатність цього методу не дозволяє детектувати аберації менше 5-10 мільонів пар основ. Для вирішення цієї проблеми були створені більш чутливі мікрочипи, які базуються на цьому методі, але з модифікаціями. Так, ДНК метафазних хромосом замінена на клоновані фрагменти ДНК, що дозволяє підвищити роздільну здатність детекції (до 5-10 тисяч пар основ), а також точно визначити розташування послідовності фрагмента на хромосомі (192). Цей

метод також широко застосовується для визначення копійності хромосомних ділянок. За допомогою цього методу були показані мікрodelеції в ділянках 1q42.12-q42.3, 20q13.32-13.33, 22q13.31 та ін. (193).

Not-I мікрочипи, які використовувались в цій роботі, також базуються на методі порівняльної геномної гібридизації, але дозволяють використовувати для гібридизації не весь геном, а окремі специфічні ділянки. Так, було показано, що промотори генів містять CpG-острівці, а сайт рестрикції Not-I рестриктази (GCGGCCGC) часто знаходиться в цих острівцях, тому є асоційованим з оточуючими його генами/локусами (194). Якщо в CpG-острівці є 5-метилцитозин, тобто відбулося метилювання гена, то рестриктаза не розрізає цей сайт, проте теж саме відбувається і в разі делеції. Отже, Not-I мікрочипи дозволяють одночасно ідентифікувати генетичні (делеції/ампліфікації) та епігенетичні (метилювання/деметилювання) зміни. Цей метод, розроблений за участі співробітників нашого відділу, вже використовувався для визначення генетичних/епігенетичних змін у різних локалізаціях пухлин (рак легень (195), нирки (196), матки (197) та ін.) та дозволив ідентифікувати нові потенційні гени – супресори росту пухлин.

РПЗ є генетичним захворюванням, яке по-різному впливає на регуляцію генів на різних стадіях свого розвитку. Тому не менш важливими за ДНК-мікрочипи є експресійні мікрочипи, які дозволяють вивчати фрагменти ДНК, комплементарні кодуючим послідовностям генів (кДНК). Порівнюючи між собою профілі експресії генів нормальних тканин та зразків пухлин можна визначити диференційно експресовані гени, які можуть характеризувати певний тип пухлин. Пошук диференційно експресованих генів є підходом, який може бути використаним для виявлення можливих біомаркерів. За допомогою цього методу були запропоновані специфічні профілі експресії для УНТ, ДГПЗ, локалізованого та метастазуючого РПЗ (198). В роботі Warwick B.G. (199) було проаналізовано профілі експресії генів у *TMPRSS2-ERG* позитивних та негативних пухлинах передміхурової залози, та виявлено 15 генів із диференційною експресією, серед яких найбільш зміненим був рівень експресії гена *ERG*. Stephenson A. J. із колегами вивчали експресію генів у пухлинах

передміхурової залози з рецидивом та без рецидиву РПЗ та показали, що комбінування даних експресії генів з клінічними даними покращує точність передбачення можливого біохімічного рецидиву РПЗ (200).

З появою методу секвенування нового покоління став можливим пошук нових хромосомних аберацій та підтвердження наявності вже відкритих. Його широко застосовують для дослідження ДНК, РНК, а також для вивчення метилювання ДНК, модифікацій гістонів тощо.

Секвенування ДНК використовують для визначення точкових мутацій, делецій, інсерцій тощо. Воно може бути повногеномним чи таргетним (включаючи екзонне секвенування). Використовуючі таргетне секвенування були знайдені мутації генів *SPOP* (протеїн ВТВ/POZ типу «спекл»), *MEN1* (менін 1), *NBPF10* (10-й член родини точкового розриву нейробластом) та ін. (201). Екзонне секвенування ДНК зі зразків біопсій метастазуючого РПЗ виявило нові геномні аберації у генах *RSPO1* (R-спондін 1), *BRAF/RAF1* (B-Raf протоонкоген, серин/треонін кіназа; епітеліальний протеїн 1, регулюючий сплайсинг та Raf-1 протоонкоген, серин/треонін кіназа відповідно), *CTNNB1* (катенін бета 1) (202).

Секвенування РНК дозволяє вивчати кодуючі та некодуючі ділянки для виявлення злитих генів чи альтернативних форм сплайсингу. Завдяки секвенуванню транскриптому було знайдено багато нових злитих генів при РПЗ: *SLC45A3:BRAF* (*SLC45A3* - 3-ій член 45-го сімейства переносників розчинених речовин), *ESRP1:RAF1* (*ESRP1* - епітеліальний протеїн 1, регулюючий сплайсинг) (129), *TMEM79:SMG5* (трансмембранний протеїн 79 та нонсенс опосередкований фактор розпаду мРНК відповідно) та ін. (203). Окрім злитих генів було виявлено некодуючу РНК *PCAT-1*, яка є транскрипційним репресором при РПЗ (155), а також мікро-РНК: мікро-РНК 16, мікро-РНК 34а та ін., які асоційовані з метастатичним РПЗ (204).

Ще однією сферою застосування секвенування нового покоління є так зване ChIP-секвенування на основі імунопреципітації хроматину, яке дозволяє аналізувати взаємодії ДНК-протеїн та знаходити сайти зв'язування транскрипційних факторів і модифіковані варіанти гістонів (205). За допомогою

цього методу були вивчені сайти зв'язування генів *AR* та *ERG* (206). Також було колокалізовано NKX3-1 та *AR* і запропоновано регуляторну мережу між NKX3-1, *AR* та сигнальним шляхом ГТФаз при РПЗ (207).

Окрім зазначених вище напрямків досліджень, що використовують секвенування, його також використовують для вивчення статусу метилювання ДНК. Базуючись на вже існуючих методах епігенетики розроблені наступні типи секвенування: з імунопреципітацією, залежною від метилювання (MeDIP-Seq), метилому цитозину (MethylC-Seq), бісульфітне із низькою репрезентативністю (RRBS-Seq), метилзв'язуючих протеїнів (MBP-Seq) та ін. (208). Методом секвенування MethylPlex було вивчено статус метилювання у тканинах РПЗ та виявлено групи із різним статусом метилювання (209).

Методи секвенування нового покоління відкривають широкі перспективи для глобального вивчення змін, що виникають при РПЗ, але ставлять перед дослідниками нові задачі по аналізу даних та створенню біоінформатичних підходів.

1.3.2. Клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози як модель для вивчення пухлин передміхурової залози. РПЗ є дуже гетерогенним злюкисним новоутворенням, яке потребує стратифікації пацієнтів за окремими субтипами пухлин для прогнозування перебігу та визначення правильного методу лікування. На даний момент головною клінічною проблемою є неспроможність існуючих тестів розрізняти латентні та агресивні пухлини у пацієнтів із РПЗ з низьким ступенем за шкалою Глісона. До того ж, відомо, що тільки малий відсоток високодиференційованих злюкисних пухлин передміхурової залози може швидко прогресувати та потребувати термінового лікування (210). Відсутність прогностичної інформації такого характеру призвела до “надмірного лікування” пацієнтів, яким було б достатньо тільки консервативного нагляду (211). Тому значна частина сьогочасних досліджень присвячена саме пошуку маркерів, які дозволили б діагностувати агресивні випадки пухлин. В якості досліджуваних об'єктів використовують зразки хірургічно видалених тканин, клітинні лінії, експериментальних тварин.

Використання тварин є обмеженим, оскільки потребує значних матеріальних витрат на їх утримання, до того ж, необхідно враховувати етичні аспекти роботи. В той же час, тварини є незамінними для вивчення комплексної клітинної взаємодії та реакції організму на пухлину (212).

Зважаючи на менші витрати з веденням клітинних ліній та їхню більшу гнучкість у створенні моделей різноманітних типів РПЗ, вони лишаються найбільш популярними об'єктами для досліджень фундаментальних механізмів виникнення та прогресування РПЗ.

Класичними клітинними лініями для вивчення пухлин передміхурової залози є LNCaP, DU145 та PC3. На даний момент вже створено багато похідних та нових клітинних ліній (всього близько 200), проте найбільш популярними лишаються вищезгадані (213). Оскільки в цій роботі використовували саме класичні клітинні лінії, розглянемо їх більш детально.

LNCaP — клітинна лінія людської аденокарциноми передміхурової залози, отримана з надключичного лімфатичного вузла з метастазами (214). Клітини LNCaP ростуть *in vitro* до $8 \cdot 10^5$ клітин/см², час подвоєння 60 годин. Вони є високорезистентними до інтерферону фібробластів людини, виявляють анеуплоїдію (модальне число хромосом від 76 до 91) та мають декілька маркерних хромосом. У клітинах культури присутні специфічні рецептори андрогенів як в цитоплазмі, так і в ядрі. Рецептори естрогенів присутні в цитозолі. Модель є гормонально чутливою. Відомо також, що ці клітини експресують специфічні маркери, характерні для люмінальних клітин (ПСА, цитокератин 8 (ЦК8)) та не експресують маркери базальних клітин. Зазвичай, цю лінію використовують для дослідження чутливої до андрогенів аденокарциноми передміхурової залози (215).

Клітинна лінія DU145 виявляє середній потенціал до метастазування у мишей і була отримана з метастазів РПЗ людини у мозок (216). Час подвоєння клітин становить 34 години. Модальне число хромосом складає 64. Ця клітинна лінія має три довгі акроцентричні маркерні хромосоми (217). Клітинна лінія DU145 експресує маркери епітеліальних клітин ЦК8, цитокератин 18. Вона є гормонорезистентною, експресує на нижчому рівні, ніж клітинна лінія LNCaP,

рецептор андрогенів та не експресує ПСА (218).

РС3 – клітинна лінія аденокарциноми передміхурової залози людини, яка була отримана із розвиненого метастазуючого, гормонорезистентного РПЗ. Ця клітинна лінія має знижену п'ять-альфа-редуктазну активність, не експресує ПСА та простатоспецифічний мембранний антиген (219). Клітини експресують нейроендокринні маркери, такі як хромогранін А та нейронспецифічну енолазу, інтегральний глікопротеїн CD44, так само як і клітини дрібноклітинної (нейроендокринної) карциноми передміхурової залози, що робить цю лінію гарним об'єктом дослідження агресивного гормонорезистентного РПЗ (215).

Окрім клітинних ліній РПЗ були створені іморталізовані клітинні лінії нормального епітелію передміхурової залози: 267B1, 272E1, 272A9, PNT1, PWR-1E та ін. (220). Однією з таких клітинних ліній є PNT2, яка була використана в цій роботі. Охарактеризуємо її більш детально.

PNT2 — клітинна лінія нормального епітелію передміхурової залози людини, яка була іморталізована за допомогою плазмиди поліома-вірусу мавпи (Simian vacuolating virus 40) SV40. Ця клітинна лінія експресує маркери люмінальних клітин ЦК8, цитокератин 18, та не експресує маркер базальних клітин цитокератин 14. Також ця лінія не проявляє онкогенних властивостей при ін'єкції мишам (221). Таким чином, ця клітинна лінія може використовуватися як модель нормальних диференційованих люмінальних клітин епітелію передміхурової залози людини.

Клітинні лінії залишаються «золотим стандартом» для досліджень РПЗ *in vitro*. Описані вище клітинні лінії були обрані в цій роботі в якості модельних об'єктів для вивчення особливостей переходу пухлин передміхурової залози до гормонорезистентного типу.

Таким чином, детальне вивчення генетичних, епігенетичних змін та змін експресії генів є важливим для повного розуміння процесів утворення та прогресії пухлин передміхурової залози. Це також може сприяти виявленню потенційних генів, асоційованих із пухлинами передміхурової залози, а також різними стадіями їх розвитку, які можуть бути перспективними маркерами як РПЗ в цілому, так і окремих стадій розвитку.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Хімічні реактиви та реагенти

В даній роботі використовували наступні реактиви фірми “Thermo Scientific”, США: суміш для кількісної полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (к-ЗТ-ПЛР) SYBR Green Master mix, фарба для електрофорезу РНК 2xRNA Loading Dye, ДНКаз I, оліго(dT)-праймери, зворотня транскриптаза RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, інгібітор РНКаз RiboLock, лігаза та буфери для лігування, плазмідний вектор для клонування pTZ57R/T. Також використовували лізуючий розчин TRI Reagent фірми “Sigma-Aldrich”, США; рестриктази NotI, Sau3AI, лігаза та буфери для рестрикції та лігування фірми “NEB“, Велика Британія., плазмідні вектори для клонування epi-pCEP4 та pCEP4 фірми “Invitrogen, LifeTechnologies” США. Праймери та проби для к-ЗТ-ПЛР, а також для звичайної ПЛР були синтезовані на фірмі “Invitrogen, LifeTechnologies”, США.

2.2. Біологічні матеріали

2.2.1. Клітинні лінії. Клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини LNCaP, PC3, DU145 були отримані з Каролінського інституту (м. Стокгольм, Швеція). Клітинна лінія нормальних епітеліальних клітин PNT2 була отримана з Європейської колекції клітинних культур (м. Солсбері, Великобританія).

2.2.2. Зразки тканин пухлин передміхурової залози. В роботі було використано зразки біопсій та хірургічно видаленого матеріалу пухлин передміхурової залози (аденокарциноми, ДГПЗ), а також умовно нормальних тканин передміхурової залози із запаленням. Зразки було отримано з Інституту

урології, НАМН України та Національного Інституту рака, НАН України. Для дослідження за допомогою NotI-мікрочипу було використано біопсійні зразки: 15 зразків ДГПЗ, 18 зразків аденокарцином, 4 з яких належали до так званого “агресивного” метастазуючого типу, а також 4 зразки УНТ передміхурової залози. Для дослідження за допомогою к-ЗТ-ПЛР було використано 16 зразків ДГПЗ, 37 зразків аденокарцином, з яких 29 мали парні УНТ. Одразу після видалення зразки заморожували в рідкому азоті із подальшим зберіганням у низькотемпературній холодильній камері за температури -70°C . Зразки від пацієнтів було отримано згідно з принципами Хельсинської декларації та інструкціями Етичного Комітету Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Клініко-патологічні характеристики зразків наведено в таблицях 2.1, 2.2.

Таблиця 2.1.

Клініко-патологічні характеристики зразків пухлин та умовно нормальних тканин передміхурової залози, використаних для гібридизації на NotI-мікрочипі

Доброякісні гіперплазії		Аденокарциноми					Умовно нормальні тканини	
№	Вік	№	Вік	TNM	Стадія	Глісон	№	Вік
0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	63	1	65	T ₁ N _x M ₀	I	4	1	65
2	60	2	63	T ₁ N _x M ₀	I	5	2	60
3	65	3	62	T ₂ N ₀ M ₀	II	5	3	58
4	72	4	63	T ₂ N ₀ M ₀	II	7	4	61
5	68	5	71	T ₂ N ₀ M ₀	II	5		
6	63	6	72	T ₂ N ₀ M ₀	II	7		
7	63	7	66	T ₂ N _x M ₀	II	6		
8	64	8	61	T ₂ N _x M ₀	II	6		
9	67	9	65	T ₂ N _x M ₀	II	5		
10	70	10	70	T ₃ N ₀ M ₀	III	5		
11	69	11	62	T ₃ N ₀ M ₀	III	5		
12	64	12	66	T ₃ N ₀ M ₀	III	7		
13	69	13	64	T ₃ N _x M ₀	III	6		
14	80	14	70	T ₃ N ₁ M ₀	IV	6		
15	72	15	71	T ₃ N ₁ M ₀	IV	9		
		16	68	T ₃ N ₁ M ₁	IV	7		

Продовження таблиці 2.1

0	1	2	3	4	5	6	7	8
		17	78	T ₃ N ₀ M ₀	III	8		
		18	75	T ₃ N _x M ₀	IV	8		

Таблиця 2.2.

Клініко-патологічні характеристики зразків пухлин передміхурової залози,
використаних для к-ЗТ-ПЛР

Парні аденокарциноми						Непарні аденокарциноми					
№	TNM	Стадія	Глісон	Вік	ПСА, нг/мл	№	TNM	Стадія	Глісон	Вік	ПСА, нг/мл
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	T1cNxMo	I	7	68	8,19	1	T1cNoMx	II	<7	53	9,40
2	T2aNxMo	II	7	57	9,30	2	T2NoMo	II	<7	61	8,34
3	T2aNxMo	II	>7	54	7,13	3	T2NoMo	II	<7	69	25,24
4	T2aNxMo	II	7	67	18,60	4	T2NoMo	II	<7	65	3,80
5	T2aNxMo	II	7	77	11,70	5	T2bNoMo	II	7	66	11,45
6	T2aNxM0	II	7	62	5,60	6	T2cN0M0	II	7	54	17,00
7	T2aNoMo	II	>7	76	37,80	7	T3NxMx	III	>7	64	-
8	T2bNxMo	II	7	69	13,90	8	T3aNxMo	III	7	80	-
9	T2bNxMo	II	<7	66	6,50	Доброякісні гіперплазії					
10	T2bNxMo	II	>7	65	33,00	№	Вік				
11	T2bNxMo	II	7	53	6,92	1	70				
12	T2bN0M0	II	7	55	5,03	2	77				
13	T2cNxMo	II	>7	63	20,29	3	66				
14	T2cNxMo	II	7	68	19,27	4	66				
15	T2cNxMo	II	>7	68	25,08	5	75				
16	T2cNxMo	II	7	64	19,80	6	71				
17	T2cNxMo	II	<7	54	27,30	7	73				
18	T2cNxMo	II	<7	67	29,08	8	75				
19	T2cNxMo	II	>7	58	17,00	9	67				
20	T2cNxMo	II	>7	60	90,00	10	60				
21	T2cNxMo	II	<7	56	25,20	11	66				
22	T2cNxMo	II	>7	63	13,30	12	62				
23	T2cNxMo	II	>7	56	84,20	13	60				
24	T3bNxMo	III	>7	54	106,00	14	66				
25	T3bNxMo	III	>7	48	51,00	15	66				

Продовження таблиці 2.1

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
26	T3BNxM0	III	7	61	53,00	16	69				
27	T3BNxMo	III	<7	74	23,57						
28	T3BNxMo	III	>7	63	20,90						
29	T2cN0M1	IV	>7	62	22,60						

2.2.3. Бактеріальні клітини для клонування ДНК. Клонування ДНК та її подальше виділення для секвенування проводили в бактеріальних клітинах *Escherichia coli* штам JM107. Штам було отримано від “Thermo Scientific”, США.

2.3. Культивування клітинних ліній

Всі клітинні лінії культивували в середовищі RPMI з додаванням 2 мМ L - глютаміну, 100 одиниць пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10% (об/об) ембріональної бичачої сироватки за температури 37°C в середовищі 5% CO₂. Клітини знімали за допомогою трипсину-ЕДТА: відбирали культуральне середовище та промивали клітини стерильним натрій-фосфатним буфером – 1 мл на 25 см² площі флакона. Після цього відбирали буфер та додавали 0,1-0,25% трипсину з ЕДТА в натрій-фосфатному буфері. Після відкріплення клітин додавали середовище з сироваткою для інактивації трипсину, переносили клітини до центрифужної пробірки та центрифугували 5 хв. при 300 g. Повністю відбирали супернатант.

2.4. Виділення тотальної РНК

Виділення тотальної РНК з клітинних ліній. Тотальну РНК виділяли для різних експериментів з використанням декількох наборів реагентів. Зокрема, для подальшого дослідження за допомогою власного експресійного мікрочипу тотальну РНК з клітин виділяли за допомогою набору RNeasy Mini kit (Qiagen, Германія). Спочатку до клітин (кількістю до 1×10^7) додавали 350 мкл лізуючого

буферу RLT. Перемішували на струшувачі VortexGenie 2 (ScientificIndustries, США) та переносили в спеціальні центрифужні колонки (QIAshredder, Qiagen, Германія), які розміщені в пробірках. Перемішували піпетуванням та центрифугували 2 хв при 16000 g. Після цього додавали 350 мкл 70% етанолу, перемішували піпетуванням. Потім переносили 700 мкл зразка в інші центрифужні колонки (RNeasy spin column), які розміщені в пробірках, та центрифугували 15 с при 8000 g. Виливали фільтрат та додавали 700 мкл буферу RW1 і знов центрифугували 15 с при 8000 g. Виливали фільтрат та додавали 500 мкл буферу RPE. Центрифугували 15 с при 8000 g. Потім знов додавали 500 мкл буферу RPE та центрифугували 2 хв при 8000 g. Потім переносили колонку в нову пробірку, додавали 30-50 мкл води, вільної від нуклеаз, та центрифугували 1 хв при 8000 g.

Для дослідження клітинних ліній за допомогою комерційного експресійного мікрочипу РНК виділяли за допомогою набору RNAqueous Micro Kit (Applied Biosystems, США). До клітин в кількості приблизно 5×10^5 додавали 100 мкл лізуючого розчину та перемішували на струшувачі Vortex Genie 2. Потім додавали 50 мкл 100% етанолу на 100 мкл лізуючого розчину та перемішували на струшувачі Vortex Genie 2. Отриману суспензію поміщали в мікрофільтровальну касету та центрифугували 10 с при 16000 g. Після цього додавали до касети 180 мкл буфера 1 для промивки і центрифугували 10 с при 16000 g. Потім двічі додавали до касети 180 мкл буфера 2/3 для промивки і центрифугували 10 с при 16000 g. Виливали фільтрат та центрифугували 1 хв при 16000 g. Переносили фільтрувальну касету до нової пробірки та двічі додавали 10 мкл підігрітого до 75°C розчину для елюції. Потім витримували 1 хв за кімнатної температури та центрифугували 30 с при 16000 g. Якість отриманої РНК перевіряли електрофорезом за протоколом, поданим нижче.

Виділення тотальної РНК із тканин. Тотальну РНК з тканин виділяли за допомогою розчину TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США). Спочатку, 160-180 мг тканини розтирали в рідкому азоті. Після цього додавали 2 мл розчину TRI Reagent та проводили обробку ультразвуком на приладі Ultrasonic Homogeniser 4710 Series (Cole-Parmer, США) три рази по 15 с з перервами по 10 с з

амплітудою 70 мкм. Потім інкубували зразки 10 хв за кімнатної температури для повного лізису тканин. Після інкубування з лізуючим розчином TRIReagent до зразків додавали хлороформ у співвідношенні 1:5 до лізуючого розчину. Після цього проводили інкубування за температури 4°C впродовж 10 хвилин. Зразки центрифугували 15 хв при 12000 g за температури 4°C. Водну фазу переносили в нову центрифужну пробірку та додавали 700 мкл ізопропілового спирту на 1 мл розчину TRI Reagent. Зразки витримували 10 хв за температури -20°C. Потім проводили їх центрифугування 10 хв при 12000 g за температури 4°C. Отримані осаді РНК промивали розчином 75% етанолу. На 1 мл лізуючого розчину додавали 1 мл спирту та центрифугували 5 хв при 7500 g за температури 4°C. Підсушували осаді РНК за кімнатної температури та розчиняли їх у воді вільній від нуклеаз (50-70 мкл). Зберігаються отримані зразки РНК за температури -80°C. Якість отриманої РНК перевіряли електрофорезом за протоколом, поданим нижче.

2.5. Електрофорез в агарозному гелі

Якість виділених зразків РНК перевіряли електрофорезом в денатуруючих умовах. Готували 50 мл 1% розчину агарози з 0,5 г агарози, 2,5 мл 20х боратного буферу, 43,5 мл DEPC-H₂O, 4 мл формальдегіду. Зразки РНК готували наступним чином: змішували РНК у кількості 1 мкг, 5 мкл 2х RNA Loading Dye (ThermoScientific, США) та доводили загальний об'єм зразка до 10 мкл водою, вільною від нуклеаз. Зразки інкубували 10 хв за температури 65°C, охолоджували на льоду та вносили в гель. Електрофорез проводили в 1х боратному буфері 1-2 години при напрузі 60-70 В (222).

2.6. Синтез першого ланцюга кДНК

2.6.1. Обробка ДНКазою I. Всі отримані зразки РНК були оброблені ДНКазою I (Thermo Scientific, США). Відбирали 1 мкг РНК, додавали 1 мкл 10х реакційного буферу з MgCl₂, 1 мкл ДНК-ази I та доводили водою, вільною

від нуклеаз до 10 мкл. Інкубували 30 хв за температури 37°C. Потім додавали 1 мкл 50 мМ розчину ЕДТА та інкубували 10 хв за температури 65°C. Отриману РНК використовували для подальшого синтезу кДНК.

2.6.2. Синтез першого ланцюга кДНК. Для дослідження експресії генів кДНК синтезували з 2 мкг тотальної РНК використовуючи набір First Strand cDNA Synthesis kit та оліго(dT)-праймери (ThermoScientific, США) відповідно до протоколу виробника. Спочатку відповідну кількість РНК змішували з 1 мкл оліго(dT)-праймерів та доводили водою, вільною від нуклеаз, до 12 мкл та витримували 5 хв за температури 65°C. Потім охолоджували та додавали 4 мкл 5х реакційного буферу, 1 мкл інгібітору РНКаз RiboLock (20 одиниць/мкл), 2 мкл 10 мМ розчину dNTP, 1 мкл зворотної транскриптази Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 одиниць/мкл). Загальний об'єм становив 20 мкл. Розчин перемішували та центрифугували, після цього витримували 60 хв за температури 42°C. Переривали реакцію інкубуванням 5 хв за температури 70°C. Отриману кДНК використовували в подальших експериментах.

2.7. Кількісна ПЛР для визначення рівнів відносної експресії генів

Визначення рівнів відносної експресії генів в клітинних лініях аденокарцином в порівнянні з клітинною лінією нормального епітелію передміхурової залози людини. Дослідження рівнів експресії генів в різних клітинних лініях карцином передміхурової залози (LNCaP, DU145, PC3) та в лінії нормальних епітеліальних клітин передміхурової залози (PNT2) було проведено за допомогою к-ЗТ-ПЛР. Для цього було відібрано панель з 65 генів (Мікрочип 1), які належать до різних сигнальних шляхів і беруть участь в канцерогенезі та метастазуванні. Ці гени входять до наступних сигнальних шляхів: 1) Wnt: канонічний (*FAT1, WNT7A, TCF7L2, KIAA1199, SUFU*), неканонічний (*RHOA, PLCB1, MYO1B*); 2) ядерного фактора к - енхансеру легкого ланцюга активованих В клітин (NF-кВ) (*TNFRSF11B, IL1B, IL6, IL1RL1, IL33*); 3) p53 (*CCNB2, CCNE1, TSC2*); 4) системи міжклітинного матриксу та

адгезії клітин, до якої входять адгезія клітин (*CDH1, CDH2, GLCE, PLOD2, TAGLN*), β -1 - інтегрин взаємодія поверхонь клітин (*CSPG4*), сигналінг ефринів (*EFNA, FYN, MYO10*), фокальна адгезія (*THBS4, MXRA5, SPPI, ACTA2, RHOF*), сигналінг відштовхування шляхом інгібування адгезії інтегрину (*SEMA3A, PLXNA, CDK5, ACTA2, FYN*); 5) сигнальної трансдукції (*RASSF4, AGTR1, KCNJ2, KCNJ4, CAV1, PKM2, NR5A2*) та транскрипційних факторів (*HOXA13, PAX8, SOX4*); 6) інвазивності та метастазування (*SERPINE1, SERPINE2b, PLAU, S100A4, SERPINE2a*); 7) ангиогенезу (*DCN, IL8, MME, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCR2, IL8, PREX1, PLCB1*); 8) контролю клітинного циклу та репарації ДНК (*PCNA, MKI67, P16, RNASET2*), який включає також системи чутливості до апоптозу (*TERT*), шлях EGFR (*HBEGF, P27*); 9) метаболізму триптофану (*TPH1*).

Були підібрані праймери до цих генів з бази даних праймерів для кількісної ПЛР: <http://primerdepot.nci.nih.gov/> (Додаток А, Таблиця А.1). к-ЗТ-ПЛР проводили з SYBR Green PCR Master Mix (ThermoScientific, США) на ампліфікаторі iCycler iQ5 Multicolor Detection System (Bio-Rad, США) за таких умов: 95°C – 10 хв, наступні 40 циклів 95°C – 15 с, 60°C – 1 хв. Рівень експресії нормалізували по референсним генам “домашнього господарства” *GAPDH* (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) та *ACTB* (актин бета) (223). Відносний рівень експресії генів у клітинних лініях аденокарцином розраховували методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (224). Контролем слугувала клітинна лінія нормального епітелію передміхурової залози людини (PNT2).

Визначення рівнів відносної експресії генів в клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози людини із різним потенціалом до метастазування. Дослідження рівнів експресії генів в клітинних лініях карцином передміхурової залози (LNCaP, PC3) з різним потенціалом до метастазування у дослідних тварин, а також трансфікованих клітинних лініях (GLCE-LNCaP, GLCE-PC3) було проведено методом к-ЗТ-ПЛР з використанням Мікрочипу 2 (Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array PAHS-033, SABioscience, США). Він містить набір оптимізованих праймерів для к-ЗТ-ПЛР у 96-луночній підложці, а саме – до 84 генів із різних сигнальних

шляхів, які пов'язані з канцерогенезом та метастазуванням. Ці шляхи: 1) контролю клітинного циклу та репарації ДНК (*ATM, BRCA1, CCNE1, CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, CHEK2, E2F1, MDM2, RB1, S100A4, TP53*); 2) апоптозу та клітинного старіння (*APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1, CASP8, CFLAR, FAS, GZMA, HTATIP2, TERT, TNFRSF1A, TNFRSF10B, TNFRSF25*); 3) сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*AKT1, ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAP2K1, MYC, NFKB1, NFKBIA, PIK3R1, RAF1, SNCG*); 4) адгезії (*ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, MCAM, MTSS1, PNN, SYK, EPDR1*); 5) ангиогенезу (*ANGPT1, ANGPT2, COL18A1, FGFR2, IFNA1, IFNB1, IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK, TGFBI, TGFBR1, THBS1, TNF, VEGFA*); 6) інвазивності та метастазування (*MET, MMP1, MMP2, MMP9, MTA1, MTA2, NME1, NME4, PLAU, PLAUR, S100A4, SERPINB5, SERPINE1, TIMP1, TIMP3, TWIST1*).

Умови проведення, прилад та реактиви до цього експерименту співпадають з описаними вище.

З отриманих даних порогових циклів були розраховані зміни експресії за методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Кожний пороговий цикл ампліфікації (Ct) був нормалізований по середньому пороговому циклу Ct п'яти генів “домашнього господарства” (*B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB*). Після цього проводилась нормалізація рівня експресії генів в клітинній лінії PC3 на рівень експресії генів в клітинній лінії LNCaP.

Визначення рівнів відносної експресії генів в клінічних зразках тканин передміхурової залози. Дослідження рівнів експресії генів в клінічних зразках тканин передміхурової залози проводили методом к-ЗТ-ПЛР на ампліфікаторі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) з використанням Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific, США) згідно із протоколом виробника. Умови проведення: 95°C - 10 хв, наступні 40 циклів: 95°C – 15 с, 60°C - 30 с, 72°C – 30 с. Загальний об'єм реакції був 15 мкл. Праймери для к-ЗТ-ПЛР представлені в таблиці 2.3.

Отримані дані аналізували за допомогою Bio-Rad qRT-PCR Data Analysis Software (Bio-Rad). Нормалізація проводилася по референсному гену

“домашнього господарства” *TBP* (225).

Визначення експресії генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* в клінічних зразках тканин передміхурової залози проводили на ампліфікаторі 7500 Real-Time (Applied Biosystems, США) з використанням комерційних наборів праймерів та

Таблиця 2.3.

Послідовності праймерів для к-ЗТ-ПЛР у клінічних зразках тканин передміхурової залози

№	Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер	Довжина про- дукта, п.н.
0	1	2	3	4
1	<i>EFNA5</i>	5'- CTGGATGTGTGTGTTTCAGCC- 3'	5'- ATGGTAGTCACCCCTCTGGA -3'	106
2	<i>EPDR1</i>	5'- CTGCTTTCAGGACACTCATC- 3'	5'- GCTGGCATTCTTCACTCTAC- 3'	146
3	<i>FOS</i>	5'- CTACCACTCACCCGCAGACT- 3'	5'- GTGGGAATGAAGTTGGCAC T-3'	102
4	<i>IL1B</i>	5'- GAAGCTGATGGCCCTAAACA- 3'	5'- AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG -3'	110
5	<i>PLAU</i>	5'- CACACACTGCTTCATTGATTA C-3'	5'- CCACCTCAAACCTTCATCTCC- 3'	104
6	<i>TAGLN</i>	5'- AAGAATGATGGGCACTACCG -3'	5'- ACTGATGATCTGCCGAGGTC -3'	186
7	<i>TGFBI</i>	5'- CCCTGGACACCAACTATTGC- 3'	5'-CTTCCAGCCGAGGTCCTT- 3'	92
8	<i>TBP</i>	5'- TGCACAGGAGCCAAGAGTGA A-3'	5'- CACATCACAGCTCCCCACCA -3'	132

проб (Invitrogen, США) згідно із протоколом виробника. Умови проведення: 95°C - 10 хв, наступні 45 циклів: 95°C – 15 с, 60°C - 60 с. Кожний пороговий цикл ампліфікації (Ct) був нормалізований по середньому пороговому циклу Ct трьох генів “домашнього господарства” (*B2M*, *GAPDH*, *ACTB*). Загальний об'єм реакції був 20 мкл. Праймери для к-ЗТ-ПЛР представлені в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

Послідовності праймерів та проб для к-ЗТ-ПЛР у клінічних зразках тканин передміхурової залози

№	Ген	Послідовності праймерів	Довжина продукта, п.н.
0	1	2	3
1	<i>ACTB</i>	F -5'- GGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' P -5'-CTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCC -3' R-5'-AGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	108
2	<i>BCL6</i>	F -5'-CCSTATCCCTGTGAAATCTGTG -3' P -5'-ACTCTGAAGAGCCACCTGCGAATC -3' R-5'-GGTAAGGTTTCTCTCCTGTGTG-3'	91
3	<i>BHLHE40</i>	F -5'-AGACCGAGCTTTCTGCTAAC-3' P -5'-ACTGGCATAGCACGGTAGTGGTTT-3' R-5'-GCCTGAGTAGGGAACATTC-3'	134
4	<i>B2M</i>	F -5'- TGCTGTCTCCATGTTTGATGTA-3 P -5'- TAGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGT-3' R-5'-GACCAAGATGTTGATGTTGGATAAG-3'	116
5	<i>GAPDH</i>	F -5'- GACCACTTTGTCAAGCTCATTTC -3' P -5'-ATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGT-3' R-5'-CTCTCTCCTCTTGTGCTCTTG-3'	141
6	<i>ITGA9</i>	F -5'-AGGCATCGGGCAAGGTTTAT -3' P -5'-CAGAGCTGACCGAAGATCAGGCAC -3' R-5'-CCGAAGTAAGAGCCCATCTTT-3'	99

Примітки: 1. F – прямий праймер. 2. P – проба. 3. R – зворотній праймер.

2.8. Трансфекція клітин LNCaP та PC3 плазмідною ДНК

Для отримання стабільних клонів клітин, які експресують *GLCE*, використовували плазмиду ері-рСЕР4 з послідовністю *GLCE*, яку було люб'язно надано Тетяною Прудніковою (Інститут молекулярної біології та біофізики,

РФ). Клітини LNCaP та PC3 трансфікували плазмідною ДНК ері-pCER4 або плазмідною ДНК pCER4 (0,5 мкг ДНК на лунку) у 12-лункових планшетах, використовуючи Lipofectamine та Plus Reagent (Invitrogen, США) відповідно до протоколу виробника. Трансфіковані ері-LNCaP, pCER4-LNCaP та ері-PC3 pCER4-PC3 клітини культивували протягом 2-3 тижнів у середовищі RPMI, що містив гігromіцин (400 мкг / мл) для відбору стійких клонів.

2.9. Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція

Для контролю наявності експресії гена *GLCE* на рівні мРНК використовували мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію. Умови проведення: 95 ° С - 10 хв, 95 ° С - 15 с, 59 ° С - 15 с, 72 ° С - 60 с, 72 ° С - 10 хв. Гени *GLCE* та *GAPDH* ампліфікували 32 та 20 циклів, відповідно. Загальний об'єм реакції був 20 мкл.

Праймери:

GLCE-F, 5'-AAGGGAGACGAGAGGGGAACGAA-3 ';

GLCE-R, 5'-GCCACSTTTCTCATCCTGGTTC-3 ';

GAPDH-F, 5'-GGGCGCCTGGTCACAA-3 ';

GAPDH-R, 5'-AACATGGGGGCATCAGCAGA-3 '.

Ампліфіковані продукти розділяли на 1,2% агарозних гелях. Гель сканували за допомогою системи "DNA Analyzer" (Vilber Lourmat, Marne-la-Valle, Франція). Рівні експресії гена *GLCE* оцінювалися за інтенсивністю випромінювання ампліфікованих фрагментів ДНК *GLCE*, нормованих на інтенсивність випромінювання *GAPDH*, використовуючи програму TotalLab (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Великобританія).

2.10 Імуноцитохімія

Клітини вирощували на скляних покривних скельцях та фіксувалися в 4% формальдегіді. Для імунопреципітації використовували поліклональну анти-*GLCE* сироватку з кролика (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, США) (1:300).

Фарбування візуалізували за допомогою антиніл, кон'югованих з барвником Техаський червоний, проти IgGs кролика (Vector Laboratories, США) (1: 1,000, 30 хв при 37 °С). Для виявлення реакції клітини було пофарбовано контрастним барвником DAPI SlowFade Gold у середовищі DAPI (Invitrogen, США). Флюоресценцію вивчали з використанням мікроскопа Axio Imager (Carl Zeiss UK, Великобританія).

2.11. Виділення геномної ДНК із тканин передміхурової залози людини

Геномну ДНК з умовно нормальних тканин передміхурової залози та із тканин різних типів пухлин виділяли методом фенольно - хлороформної екстракції за протоколом, викладеним Т. Маніатісом (222) з модифікаціями. Тканини (30-50 мг) розтирали в рідкому азоті до отримання порошку. Потім проводили лізис в буфері, який складався з 10 мМ Tris-Cl (pH 8,0), 0,1 М ЕДТА, 0,5% SDS впродовж 20 хв за температури 4°C. До отриманого лізату додавали протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мг/мл та інкубували 3 години за температури 50°C. Потім проводили екстракцію з фенолом один раз, сумішшю фенол/хлороформ – двічі, хлороформом – один раз. Геномну ДНК осаджували 0,2 об'ємами амонія ацетату та двома об'ємами 96% етанолу. Отриману ДНК двічі промивали 70% етанолом та розчиняли у воді, обробленої DEPC.

2.12. NotI-мікрочипи

2.12.1. Приготування проб ДНК.

2.12.1.1. NotI обробка ДНК. Для NotI обробки брали 3мкг геномної ДНК, 10x буфер 3 (NEB), 100xBSA (NEB) (10мг/мл), 10 од. NotI (NEB), доводили дистильованою водою до 40 мкл. Інкубували при 37°C протягом 4-х годин, зупиняли реакцію рідким азотом і нагріванням до 65°C тричі. Контроль

продукту здійснювали в 0,8 % агарозному гелі (брали 1 мкл продукту після обробки).

2.12.1.2. Лігування з *NotI*-лінкером. Для лігування брали 39 мкл розчину ДНК після обробки *NotI*, 10x лігуючий буфер (NEB), 0,5 мкл *NotI*-anti-link, 5 од. лігази (NEB), доводили дистильованою водою до 110 мкл, інкубували при 4°C протягом ночі.

Приготування *NotI*-anti-link. Брали 10 мкл *NotAntBio**, 10 мкл *NotAntComp**, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані протягом 2 хв, охолоджували. Брали 5 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінрази T4, доводили буфером 1x TE до 100 мкл, інкубували при 37°C протягом 30 хв.

* Олігонуклеотиди:

NotAntBio 5'-Biotin-CAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC-3' 24 п.н.

NotAntComp 5'-GGCCGCGGTCCCAAAAGGGTCAGTGCTG-3' 28 п.н.

2.12.1.3. Осаджування ПЕГ. Для осаджування брали 110 мкл розчину ДНК після лігування з *NotI* -лінкером, 33 мкл 5М NaCl, 71,5 мкл 20 % ПЕГ 8000. Суміш охолоджували 1 годину на льоду, центрифугували 20 хв при 21300 gza температури 4°C, осад розчиняли в 30 мкл 1xTE. Контроль продукту здійснювали в 0,8% агарозному гелі (брали 1 мкл осаду та 10 мкл супернатанту).

2.12.1.4. Обробка *Sau3AI*. Для обробки *Sau3AI* брали 29 мкл ДНК після осаджування з ПЕГ, 10x буфер *Sau3A* (NEB), 20 од. *Sau3AI* (NEB), доводили дистильованою водою до 40 мкл, інкубували за температури 37°C протягом 3-х годин.

2.12.1.5. Імобілізація на кульках. П'ять мікролітрів суміші кульок (*Dyna beads M-280 Streptavidin "DynaI"*) відмивали три рази в 2xV&W буфері (10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 2М NaCl) і розчиняли в 50 мкл 2xV&W буфера. Потім додавали до цих кульок в 2xV&W буфері 40 мкл ДНК з

попереднього кроку 2.12.1.4. Помістили усі пробірки типу епендорф в одну велику пробірку типу фалькон на 50 мл та протягом 20-ти хвилин крутили його на ролері, потім поставили на 2 хв на магніт. Додали 50 мкл 2xV&W буфера і ресуспендували за допомогою механічного автоматичного дозатора. Поставили на 2 хв на магніт, видалили супернатант. Відмивання кульок повторили три рази в 2xV&W буфері. Потім промили кульки два рази в 50 мкл 1xV&W буфера і три рази в 50 мкл TE буфера. Розчинили кульки в 20 мкл 1xTE буфері.

2.12.1.6. Лігування з Sau3AI-лінкером. Для лігування брали 20 мкл ДНК на кульках із кроку 5, 10x буфер для лігування (NEB), 0,5 мкл SauZgt99link, 5 од. лігази (NEB), доводили дистильованою водою до 50 мкл, інкубувати за температури 4°C протягом ночі. Потім промили 3 рази в 50 мкл буфера TE, з використанням магніту. Осад розчинили в 50 мкл TE буфера.

Приготування SauZgt99link. Брали 10 мкл SauZgtBlock*, 10 мкл SauZgtComp*, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані протягом 2 хв, охолоджували на воді. Брали 20 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінрази (NEB), доводили до 100 мкл буфером 1x TE, інкубували за температури 37°C протягом 10 хвилин.

*Олігонуклеотиди:

SauZgtBlock 5'-gacccctcaaacgcgt-block-3' 15 п.н.

SauZgtComp 5'-ggcgatctatcctagagcccgtacgcgtttgag-3' 33 п.н.

2.12.1.7. Ампліфікація ДНК. Брали 1 мкл ДНК із кроку 2.9.1.6, 5x ПЛР буфер №9, 200 мкМ dNTP, 1 мкл Primer anti-univ* (20 мМ), 1 мкл Primer Zgt99* (20 мМ), 1 од. (1 мкл) Taq-полімерази (NEB), доводили дистильованою водою до 30 мкл. Контроль якості продукту здійснювали в 0,8 % агарозном гелі (наносили 3 мкл продукту ПЛР).

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Perkin-Elmer 2720 (95°C-45 с, 64°C-40 с, 72°C-2 хв 20 с) з ініціацією денатурації при 95°C протягом 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72°C протягом

4 хв.

*Праймери:

Anti-univ 5'-cagcactgacccttttgggacc-3' 22 п.н.

Zgt99 5'-ggcgatctatcctagagcccgt-3' 22 п.н.

2.12.1.8. Осаджування продукта ПЛР. Брали 27 мкл продукту ПЛР, 2,7 мкл 5М NaCl, 81 мкл 99 % етанолу, тримали 15 хв при -80°C, центрифугували 20 хв. при 21300 g, видаляли супернатант; додавали 150 мкл 70 % етанолу, центрифугували 20 хв при 21300 g, осад розчиняли в 50 мкл буфера 1xTE.

2.12.1.9. Мічення ДНК за допомогою ПЛР. Усі наступні етапи проводили без доступу світла. Брали 3мкл (200-400нг) ДНК (продукту ПЛР), 5xПЛР буфер №9, 200 мкМ dNTP (усі, крім dCTP), 80 мкМ dCTP, 1,2 мкл (1,25 нМ) dCTPСу3 (або 1,5 мкл (1,5 нМ) dCTPСу5), 1 мкл праймера anti-univ* (20 мкМ), 1 мкл праймера Zgt99* (20 мкМ), 1 од. (1 мкл) Таq-полімерази (NEB), доводили дистильованою водою до 30 мкл.

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Рerkin-Elmer 2720 (95°C-45 с, 60°C-40 с, 72°C-2 хв 20 с) з ініціацією денатурації при 95°C протягом 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72°C протягом 4 хв.

Для ДНК з нормальних тканин використовували флуоресцентний барвник Су3 (зелений), а для ДНК з пухлин – Су5 (червоний), Amersham.

2.12.1.10. Осаджування продукта ПЛР. Брали 30 мкл продукту ПЛР, 3 мкл 5М NaCl, 90 мкл 99 % етанолу, витримували 1 годину при -80°C, 20 хв центрифугували при 21300 g, видаляли супернатант. Додавали 150 мкл 70 % етанолу, інкубували 20 хв при кімнатній температурі, 20 хв центрифугували при 21300 g, сушили близько 1 хв; осад розчиняли в 20 мкл дистильованої води (зразки готові для гібридизації).

Безпосередньо перед гібридизацією об'єднували проби, які були

приготовлені з ДНК пухлин та нормальних тканин, в 50 мкл. Додавали 100 мкл 2,5х гібридизаційного буфера (5хSSC, 5х розчин Денхарта, 1 мМ пірофосфат Na, 50 мМ Трис, рН 7,5) та 100 мкл формаміду. Інкубували при 95°C протягом 5 хв, охолоджували суміш 1 хв на льоду, додавали 2,5 мкл 10 % SDS. Суміш проб вносили у гібридизаційну камеру.

2.12.2. Приготування та гібридизація NotI-мікрочипів. Мікрочипи з 180 *NotI*-зв'язувальних клонів з готової колекції клонів (226,227) виготовляли за допомогою QArray minispotter (Genetix) згідно протоколу виробника. Надруковані слайди інкубували при 80°C протягом 4 годин, далі блокували у буфері (1 % BSA, 5х SSC, 0,1% SDS) за температури 42°C протягом 3 хв., промивали у воді, кип'ятили протягом 2 хв. Гібридизацію надрукованих слайдів із міченою ДНК з пухлин і нормальних тканин було виконано за допомогою приладу Lucidea slide processor (Amersham) за температури 42°C протягом 15-ти годин згідно протоколу виробника. Промивку слайдів виконували у таких розчинах: 1) 0,2% SDS, 1х SSC; 2) 0,2% SDS, 0,1х SSC; 3) 0,1х SSC; 4) вода; 5) ізопропанол. Сканування слайдів здійснювали за допомогою сканера GenePix 4000B (Axon instrument). Аналіз результатів гібридизації мікрочипів виконували за допомогою програми GenPixProb.0, яка дозволяє провести псевдозабарвлення зображень у червоний і зелений колір та продемонструвати відмінності на молекулярному рівні великого спектра зразків пухлин щодо норми. Гібридизовані проби можуть давати сигнали декількох типів: червоний – відповідає ампліфікації (>1,5); зелений – відповідає делеції або метилуванню (0,35 - 0,75 – гомозиготна делеція чи метилування; 0,75-1,5 – гетерозиготна делеція чи метилування); жовтий – відповідає нечіткому сигналу. Також можлива відсутність сигналу в пробі (<0,35).

2.13. Визначення статусу метилування геномної ДНК

2.13.1. Бісульфітна обробка ДНК. Бісульфітна обробка ДНК проводилася з використанням набору EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research,

США) згідно з інструкцією виробника. Для обробки брали 500 нг ДНК, додавали 5 мкл буферу для розчинення M-Dilution Buffer та доводили водою, вільною від нуклеаз, до загального об'єму 50 мкл. Інкубували 15 хв за температури 37°C. Потім додавали 100 мкл реагенту для конверсії CT Conversion Reagent, перемішували та інкубували зразки 15 годин за температури 50°C у темноті. Після цього витримували зразки 10 хв на льоду та переносили в спеціальні колонки Zymo-Spin IC Column (Zymo Research, США) із додаванням 400 мкл буферу для зв'язування M-Binding buffer. Після чого центрифугували 30 с при 16000 g. Виливали фільтрат, додавали 100 мкл буферу для промивки M-Wash Buffer та центрифугували 30 с при 16000 g. Потім додавали 200 мкл десульфонуєчого буферу M-Desulphonation Buffer, витримували 15 хв. за кімнатної температури та центрифугували 30 с при 16000 g. Після цього двічі промивали 200 мкл M-Wash Buffer та центрифугували 30 с при 16000 g. Після промивки переносили колонку в нову центрифужну пробірку, додавали 10 мкл буферу для елюювання M-Elution Buffer та центрифугували 30 с при 16000 g. Модифіковану ДНК використовували для подальших експериментів із клонування та секвенування.

2.13.2. Бісульфитне секвенування.

2.13.2.1. ПЛР для ампліфікації фрагментів ДНК перед секвенуванням.

Ампліфікація проводилася методом ПЛР з використанням полімерази DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США). Для цього брали 5 мкл 10x буферу DreamTaq Buffer, 5 мкл суміші 0,2 мМ дНТФ, 100 нг бісульфитно обробленої ДНК, 0,3 мкл прямого та зворотного праймерів (0,2 мкМ), 1,25 одиниць полімерази Dream Taq DNA polymerase та доводили водою, вільною від нуклеаз до 50 мкл. Перемішували та ставили в ампліфікатор Perkin-Elmer 2720 (Perkin-Elmer, США).

Послідовності праймерів:

FGF12 прямий праймер 5'-ACATTTTCTCCTTAGGACCAAGGGAAG-3' - 27 п.н.

FGF12 зворотній праймер 5'-CTGCAGCCTCCTCAAATTTTAGCACTGC-3' –

28 п.н.

Довжина продукта – 445 п.н.

Ампліфікацію проводили за наступних умов: ініціація денатурації - 95°C протягом 2 хв., денатурація - 95°C, 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 30 сек. Фінальну елонгацію проводили при 72°C протягом 4 хв.

Отриманий ПЛР продукт використовували для лігування та клонування.

2.13.2.2. Лігування продуктів ПЛР. Для лігування використовували набір реагентів InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Для лігування фрагментів у вектор pTZ57 R/T готували реакційну суміш, яка містила 3 мкл розчину вектора pTZ57 R/T (0,17 пкМ), 6 мкл 5x лігуючого буфера, 80-90 нг ПЛР продукта, 1 мкл T4 DNA Ligase. Об'єм суміші доводили водою, вільною від нуклеаз до 30 мкл. Отриману суміш інкубували 1 годину за температури 22°C. Для трансформації клітин використовували 2,5 мкл реакційної суміші.

2.13.2.3. Трансформація компетентних клітин *E.coli* штам JM107. Отримання компетентних клітин проводили з використанням набору TransformAid Bacterial Transformation kit (Thermo Scientific, США) у клітинах штам JM107 (Thermo Scientific, США). За добу перед трансформацією пересівали одну колонію *Escherichia coli* в 2 мл розчину C-medium та інкубували в термостаті з функцією перемішування Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Латвія) (160-180 об/хв.) 12-14 годин за температури 37°C. Наступного дня 150 мкл нічної культури переносили до 1,5 мл попередньо нагрітого розчину C-medium та інкубували в термостаті з перемішуванням (160-180 об/хв.) 20 хв. за температури 37°C. Потім клітини осаджували методом центрифугування при 10000 g протягом 1 хв., виливали супернатант та ресуспендували осад клітин в 300 мкл розчину T-solution та інкубували на льоді 5 хв. Після цього клітини знов осаджували методом центрифугування при 10000 g протягом 1 хв., виливали супернатант та ресуспендували осад клітин в 120 мкл розчину T-solution та інкубували на льоді

5 хв. Для трансформації до клітин в кількості 50 мкл додавали 4 мкл вектора після реакції лігування та витримували на льоді 5 хв., після чого висівали на попередньо прогріте агаризоване середовище з ампіциліном та тетрацикліном і інкубували за температури 37°C 12-14 годин.

2.13.2.4. Культивування бактерій *E.coli* штам JM107. Для синьо-білого скринінгу трансформованих клітин, що містять цільову конструкцію, трансформовані клітини *E.coli* штам JM107 культивували на агаризованому середовищі, яке містило 1,5 % агару в LB Broth (20г/л) (Sigma-Aldrich, США), 0,1 mM ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид, 20 мкг/мл X-Gal (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- β -D-галактопіранозид), 100 мкг/мл ампіциліну та 10 мкг/мл тетрацикліну. Клітини інкубували 18 годин за температури 37°C, потім відбирали поодинокі білі колонії та переносили у пробірки з рідким живильним середовищем LB Broth (20г/л) (Sigma-Aldrich, США), яке містило 100 мкг/мл ампіциліну та 10 мкг/мл тетрацикліну. Культивували клітини 18 годин за температури 37°C у термостаті з перемішуванням Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Латвія) (160-180 об/хв.).

2.13.2.5. Виділення плазмідної ДНК. Виділення плазмідної ДНК проводили за допомогою набору GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Для цього 1-1,5 мл нічної культури клітин осаджували методом центрифугування при 10000 g, 1 хв., відбирали супернатант та ресуспендували осад клітин в 250 мкл розчину Resuspension Solution, який містив РНКазу А. Потім додавали 250 мкл буфера для лізису Lysis Solution. Розчини перемішували перевертанням пробірок 4-6 разів, потім додавали 350 мкл охолодженого розчину для нейтралізації Neutralization Solution. Перемішували розчини перевертанням пробірок 4-6 разів. В результаті лізису клітин утворювався дебрис клітин, який осаджували центрифугуванням при 12000 g, 1 хв. Супернатант переносили на колонки GeneJET spin column, центрифугували при 10000 g, 30 с. Потім колонки двічі промивали 500 мкл розчину Wash Solution, 10000 g, 30 с. Кожного разу після злиття рідини колонки

додатково центрифугували 1 хв для повного видалення Wash Solution. Плазмідну ДНК змивали з колонок 30-50 мкл розчину Elution Buffer. Виділені препарати плазмідної ДНК секвенували на автоматичному секвенаторі.

2.13.2.6. Секвенування ДНК. Клоновані ПЛР продукти були секвеновані на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) з використанням набору для секвенування Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) та прямого праймера до ПЛР продукта згідно з інструкцією виробника. Послідовність ДНК аналізували за допомогою програмного забезпечення Sequencing Analysis (Applied Biosystems, США) та Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австрія). Аналіз нуклеотидних послідовностей виконували з використанням сервіса BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.14. Статистична обробка даних. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc, США), відкритого ресурсу Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (<http://www.openepi.com/>) та програми NIMAN, створеної соавторами по спільним публікаціям (228). Тести Колмогорова-Смірнова та Ліллієфорса використовували для оцінки розподілу значень відносних рівнів експресії генів *TGFB1*, *IL1B*, *FOS*, *EFNA5*, *TAGLN*, *PLAU*, *EPDR1* у зразках аденокарцином, ДГПЗ та умовно-нормальних тканин. Таблиці спряженості використовували для оцінки взаємозв'язків між рівнями відносної експресії генів між групами аденокарцином, ДГПЗ та умовно-нормальних тканин, аденокарцином із різною сумою за шкалою Глісона та рівнями ПСА у сироватці крові пацієнтів із аденокарциномами. Аналіз рівня значущості зв'язків проводили за допомогою точного тесту Фішера. Тест Вілкоксона використовували для оцінки відмінностей між аденокарциномами та парними їм умовно-нормальними тканинами. Логістичну регресію використовували для аналізу асоціацій між рівнями відносної експресії генів та клініко-патологічними показниками. Точний тест Фішера та критерій χ^2 використовували для аналізу частот метилування/делецій у групах

пухлин передміхурової залози із різними патоморфологічними характеристиками. Значення $p < 0,05$ вважалися статистично значущими для всіх видів аналізу.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Визначення диференційно експресованих генів у клітинних лініях передміхурової залози з різною чутливістю до андрогенів

Для попереднього пошуку генів, що зазнають змін в аденокарциномах передміхурової залози, було проведено скринінг відкритих баз даних. Для цього була використана база даних NCBI Geo Datasets (The Gene Expression Omnibus (GEO) (229)). Ця база даних є публічним архівом, що містить дані мікрочипів, секвенування нового покоління та інших форм високоефективних функціональних геномних досліджень. Було відібрано 65 генів, що беруть участь у канцерогенезі та метастазуванні для дослідження методом кількісної ПЛР в реальному часі. Ці гени входять до наступних сигнальних шляхів: 1) Wnt: канонічний (*FAT1*, *WNT7A*, *TCF7L2*, *KIAA1199*, *SUFU*), неканонічний (*RHOA*, *PLCB1*, *MYO1B*); 2) ядерного фактора капа - енхансеру легкого ланцюга активованих В клітин (NF-κB) (*TNFRSF11B*, *S100A4*, *IL1B*, *IL6*, *IL1RL1*, *IL33*); 3) p53 (*CCNB2*, *CCNE1*, *TSC2*); 4) системи міжклітинного матриксу та адгезії клітин, до якої входять адгезія клітин (*CDH1*, *CDH2*, *GLCE*, *PLOD2*, *TAGLN*), бета один - інтегрин взаємодія поверхонь клітин (*CSPG4*), сигналінг ефринів (*EFNA*, *FYN*, *MYO10*), фокальна адгезія (*THBS4*, *MXRA5*, *SPP1*, *ACTA2*, *RHOF*), сигналінг відштовхування шляхом інгібування адгезії інтегрину (*SEMA3A*, *PLXNA*, *CDK5*, *ACTA2*, *FYN*); 5) сигнальної трансдукції (*RASSF4*, *AGTR1*, *KCNJ2*, *KCNJ4*, *CAV1*, *PKM2*, *NR5A2*) та транскрипційних факторів (*HOXA13*, *PAX8*, *SOX4*); 6) інвазивності та метастазування (*SERPINE1*, *SERPINE2b*, *PLAU*, *S100A4*, *SERPINE2a*); 7) ангиогенезу (*DCN*, *IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*, *CXCR2*, *IL8*, *PREX1*, *PLCB1*); 8) контролю клітинного циклу та репарації ДНК (*PCNA*, *MKI67*, *P16*, *RNASET2*), який включає також системи чутливості до

апоптозу (*TERT*), шлях EGFR (*HBEGF*, *P27*); 9) метаболізму триптофану (*TPH1*). Гени, що вивчалися, належать до наступних груп: цитокіни та хемокіни (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*), інтерлейкіни та рецептори до них (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL1RL1*), транскрипційні фактори (*HOXA13*, *PAX8*, *SOX4*), ядерні рецептори (*NR5A2*), гени, що кодують протеїни мембранних каналів (*KCNJ2*, *KCNJ4*), кінази (*FYN*, *CDK5*), серпінові інгібітори пептидаз (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*) та ін.

Рівні відносної експресії цих генів визначали у трьох клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різним потенціалом до інвазивності та метастазування у дослідних тварин, а також різною чутливістю до андрогенів (LNCaP, DU145, PC3) та лінії нормального епітелію передміхурової залози людини PNT2. Значущою вважали кратність змін (fold change) рівня відносної експресії генів, яка дорівнює трьом. Референсним геном був *GAPDH*.

Було знайдено зміни експресії 34 генів у клітинній лінії LNCaP, 40 генів – у клітинній лінії DU145 та 30 генів – у клітинній лінії PC3 у порівнянні з нормальною клітинною лінією PNT2. Результати представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Рівні відносної експресії генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози у порівнянні з нормальною клітинною лінією PNT2 із референсним геном *GAPDH*

№	Шляхи	Гени	Клітинні лінії		
			LNCaP	DU145	PC3
			Зміни рівня експресії, к.р.		
0	1	2	3	4	5
1	Wnt	<i>TCF7L2</i>	2,7	4,2	1,2
		<i>FAT1</i>	3,0	1,5	2,8
		<i>WNT7A</i>	45,3	42,0	2,2
		<i>SUFU</i>	1,3	2,5	1,1
		<i>MYO1B</i>	33,5	1,9	12,5
		<i>RHOA</i>	8,2	51,4	7,7
		<i>PLCB1</i>	111,0	1526,0	1885,9
		<i>KIAA1199</i>	1,7	576,2	122,6
2	NF-κB	<i>IL1B</i>	32,2	14,5	553,3
		<i>TNFRSF11B</i>	1377,2	33,8	12,7

Продовження таблиці 3.1

0	1	2	3	4	5
		<i>IL6</i>	1,5	4,2	36,1
		<i>IL1RL1</i>	529,1	71,6	18,8
		<i>IL33</i>	1,2	6,2	1,0
3	p53	<i>CCNB2</i>	70,2	2,2	1,6
		<i>CCNE1</i>	2,6	1,0	9,2
		<i>TSC2</i>	2,2	1,0	1,6
4	Міжклітинний	<i>ACTB</i>	1,5	1,1	1,2
	матрикс та	<i>PLOD2</i>	2,3	2,4	2,2
	клітинна адгезія	<i>THBS4</i>	12,2	5,0	12,2
		<i>SPP1</i>	83,6	8973,8	2,5
		<i>ACTA2</i>	2,8	9,5	1,4
		<i>PLXNA</i>	8,7	5,7	7,4
		<i>CDH1</i>	155,0	2,5	130,3
		<i>CDH2</i>	2,5	2030,3	4,7
		<i>GLCE</i>	4,2	4,3	1,0
		<i>CSPG4</i>	3,2	66,8	3706,9
		<i>EFNA5</i>	20,9	2,5	4,8
		<i>FYN</i>	12,3	6,1	2,0
		<i>MYO10</i>	1,4	2,0	1,5
		<i>CDK5</i>	17,5	1,1	1,2
		<i>SEMA3A</i>	1,3	71,0	4,7
		<i>PKM2</i>	1,4	2,7	1,8
		<i>RHOF</i>	2,2	2,7	1,1
		<i>AGTR1</i>	1,2	6,2	24,6
		<i>MXRA5</i>	1,5	6,2	1,0
		<i>CAVI</i>	1,2	1,5	1,4
		<i>TAGLN</i>	3,0	4,2	8,1
5	Сигнальна	<i>RASSF4</i>	8,3	5,0	2,0
	трансдукція та	<i>HOXA13</i>	1,0	1,4	9,2
	транскрипційні	<i>NR5A2</i>	8,9	2,1	23,1
	фактори	<i>PREX1</i>	429,5	297,9	2080,9
		<i>KCNJ2</i>	6,1	6,2	174,1
		<i>KCNJ4</i>	1,1	18,8	2,0
		<i>PAX8</i>	1,2	6,2	1,0
		<i>SOX4</i>	3,4	1,5	2,8
6	Інвазивність та	<i>SERPINE1</i>	5,0	351,0	3,0
	метастазування	<i>PLAU</i>	9,9	7,2	3,7
		<i>SERPINE2b</i>	4,8	398,8	3590,6
		<i>S100A4</i>	36,3	18,9	1,8
		<i>SERPINE2a</i>	5,9	7,1	1,6
7	Ангіогенез	<i>IL8</i>	2,2	5,1	7,3
		<i>MME</i>	4,0	1919,5	14,5

Продовження таблиці 3.1

0	1	2	3	4	5
		<i>CXCL1</i>	75,8	15,0	8,0
		<i>CXCL2</i>	1,8	4,7	2,5
		<i>CXCL6</i>	92,5	3,8	4,1
		<i>CXCR2</i>	4,5	2,1	21,3
		<i>DCN</i>	4,5	2,2	1,8
8	Контроль клітинного циклу та репарація	<i>PCNA</i>	3,1	1,2	1,1
		<i>MKI67</i>	2,2	1,2	1,3
		<i>HBEGF</i>	56,7	7,7	12,5
		<i>P27</i>	1,4	1,3	2,2
		<i>P16</i>	2,3	4,6	1,7
		<i>RNASET2</i>	1,1	1,0	1,9
		<i>TERT</i>	1,2	6,2	1,0
9	Метаболізму триптофану	<i>TPH1</i>	1,2	6,2	1,0

Примітки: жирним шрифтом виділено зниження рівнів відносної експресії генів, курсивом виділено відповідно – підвищення.

Більшість генів зі змінами були з сигнальних шляхів клітинної адгезії (*THBS4*, *SPP1*, *EFNA5*, *CDH1*, *CDH2*, *CSPG4*), інвазивності та метастазування (*S100A4*, *SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*) й ангиогенезу (*CXCL1*, *CXCR2*, *CXCL6*, *IL8*).

Втім для підвищення специфічності знайдених змін в різних клітинних лініях було вирішено використати два референсних гена та вважати значущою кратність змін від чотирьох разів. До того ж, дані відносної експресії 15 генів, в яких було відмічено дуже низький рівень відносної експресії, з пороговим циклом більше ніж 30 у лінії PNT2, не були вірогідними, тому не бралися до подальшого аналізу.

Таким чином, з 65 генів відібраних для дослідження, було виявлено зміни експресії більше ніж в чотири рази у 34 генів: для 29 генів у клітинній лінії LNCaP, для 20 генів – у DU145 та для 16 генів – у PC3. З яких 27 - знижують, 5 - підвищують та два - виявляють перемінний рівень експресії. Рівні відносної експресії генів представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Рівні відносної експресії генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози у порівнянні з нормальною клітинною лінією PNT2 із референсними генами *GAPDH* та *ACTB*

№	Сигнальні шляхи та системи	Гени	Клітинні лінії					
			LNCaP	DU145	PC3	LNCaP	DU145	PC3
			Підвищення експресії, к.р.			Зниження експресії, к.р.		
0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Wnt	<i>TCF7L2</i>	-	0	0	4,2	0	0
		<i>FAT1</i>	-	0	0	4,6	0	0
		<i>WNT7A*</i>	-	-	0	69,6*	44,6*	0
		<i>SUFU</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>MYO1B</i>	-	0	-	51,4	0	15,5
2	NF-κB	<i>IL1B</i>	21,0	-	445,7	-	15,4*	-
		<i>TNFRSF11B*</i>	-	-	-	11489,3*	35,9*	15,8*
		<i>IL6</i>	0	0	-	0	0	44,8
		<i>IL1RL1*</i>	-	-	15,1	1016,2*	468,2*	-
		<i>IL33</i>	0	BE	0	0	BE	0
3	p53	<i>CCNB2</i>	-	0	0	107,7	0	0
		<i>CCNE1</i>	-	0	-	4,1	0	11,5
		<i>TSC2</i>	0	0	0	0	0	0
4	Адгезія між клітинами та міжклітинним матриксом	<i>CDH1*</i>	-	0	-	1530,7*	0	3145,3*
		<i>CDH2</i>	0	BE	0	0	BE	0
		<i>GLCE</i>	-	4,3	0	4,2	-	0
		<i>CSPG4*</i>	-	-	-	4,9	71,0*	6864,8*
		<i>EFNA5</i>	-	0	-	32,2	0	6,0
		<i>FYN</i>	-	-	0	18,8	6,4	0
		<i>MYO10</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>CDK5</i>	-	0	0	27,0	0	0

Продовження таблиці 3.2

0	1	2	3	4	5	6	7	8
		<i>SEMA3A*</i>	0	-	0	0	75,5*	0
		<i>PKM2</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>RHOF</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>AGTR1</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE
		<i>MXRA5</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE
		<i>CAV1</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>PLOD2</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>TAGLN</i>	-	0	-	4,5	0	10,0
5	Сигнальна	<i>RASSF4</i>	0	-	-	12,8	5,3	0
	трансдукція та	<i>HOXA13</i>	-	0	7,4	0	0	0
	транскрипційні	<i>NR5A2 *</i>	-	0	-	13,6	0	28,6*
	фактори	<i>SOX4</i>	-	0	0	5,2	0	0
6	Інвазивність та	<i>SERPINE1*</i>	-	-	0	7,7	373,3*	0
	метастазування	<i>PLAU</i>	-	-	0	15,2	7,7	0
		<i>SERPINE2b*</i>	-	-	BE	7,3	424,0*	BE
		<i>SI00A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
		<i>SERPINE2a</i>	-	-	0	9,1	7,6	0
7	Ангіогенез	<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	-	-
		<i>MME</i>	-	-	-	6,1	4179,2	18,0
		<i>CXCL1</i>	-	-	-	116,3	16,0	10,0
		<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	-	0
		<i>CXCL6*</i>	-	-	0	142,0*	4,1*	0
8	Контроль клітинного	<i>PCNA</i>	-	0	0	4,7	0	0
	циклу та репарація	<i>MKI67</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>HBEGF*</i>	-	-	-	413,9*	28,1*	15,5*
		<i>P27</i>	0	0	0	0	0	0

Продовження таблиці 3.2

0	1	2	3	4	5	6	7	8
		<i>P16</i>	0	4,3	0	0	-	0
		<i>RNASET2</i>	0	0	0	0	0	0

Примітки: 1. Жирним шрифтом виділено достовірні зміни рівнів відносної експресії генів. 2. «0» – зміни експресії менше ніж у чотири рази. 3. «*» – слабоекспресовані гени в досліджених клітинних лініях (LNCaP, DU145, PC3) (Ct>30). 4. «BE» – відсутність експресії. 5. к.р. – кількість разів.

У класичному Wnt шляху з восьми генів, які вивчались, для чотирьох генів знайдено зниження рівнів відносної експресії (*WNT7A* – в LNCaP, DU145; *TCF7L2*, *FAT1* - в LNCaP; *MYO1B* – в LNCaP, PC3) та для одного гену змін експресії не відмічено (*SUFU*) (таблиця 3.2). Ген *WNT7A* кодує один з Wnt білків, які зв'язуючись з рецепторами на поверхні клітин стабілізують цитоплазматичний β -катенін, що може активувати транскрипційні фактори родини LEF/TCF, до яких входить *TCF7L2*. На пухлинах світлоклітинної карциноми нирок показано, що ген *WNT7A* має знижений рівень експресії (230). Ген *TCF7L2* може репресувати транскрипцію генів, контрольованих рецептором андрогенів у пухлинах молочної залози, що робить його цікавим об'єктом для досліджень і в гормоночутливих пухлинах передміхурової залози (231). Ген *FAT1* кодує трансмембранний протокадгерин. Його інактивація або делетування у деяких видах раку робить його потенційним геном-супресором росту пухлин. Було відмічено його здатність інгібувати сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну за рахунок зв'язування з β -катеніном в гліобластомах, злоякісних пухлинах товстої та прямої кишки, шиї та голови (232). Окрім канонічного шляху Wnt є шлях площинної полярності клітин (Planar Cell Polarity). Він відповідає за правильну поляризацію клітин впродовж формування тканин. Ген *MYO1B* кодує міозин один В. В роботі Makowska K.A. було виявлено підвищення рівня експресії цього гена в клітинній лінії PC3 порівняно до LNCaP. До того ж в цій роботі було показано, що інгібування протеїна MYO1B не впливає на 2D міграцію, а тільки на збільшення числа стресових фібрил (233). Отримані нами результати по зниженню рівня експресії гена *MYO1B* в клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози порівняно до лінії нормального епітелію, можливо, свідчать про різну активність цього гена впродовж розвитку РПЗ.

Спираючись на одержані в нашій роботі дані та на дані літератури, можна відмітити інгібування класичного Wnt шляху у клітинній лінії LNCaP, яка має знижений потенціал до інвазивності і метастазування у дослідних тварин (234), що проявляється у зниженні рівнів експресії генів *WNT7A* та *FAT1*.

Серед досліджуваних нами генів шляху NF-κB два гени (*TNFRSF11B* — в усіх лініях, *IL6* - в LNCaP) виявляють знижений рівень експресії, два гени експресуються по-різному (*IL1RL1* – в LNCaP, DU145 має знижений рівень експресії, у PC3 — підвищений рівень; ген *IL1B* в LNCaP, PC3 – підвищений рівень, в DU145 — знижений рівень експресії) (таблиця 3.2). Ген *TNFRSF11B* кодує протеїн остеопротегерин (член супер-родини рецепторів фактора некрозу пухлин), який є інгібітором RANKL (ліганд активаторного рецептора для NF-κB) та шляху NF-κB, і сприяє зменшенню метастазів у кістки (235). Ген *IL1RL1* кодує інтерлейкінподібний рецептор один і належить до родини Toll-подібних рецепторів. Він може існувати в двох формах: секретованій або зв'язаній із мембраною. На клітинній лінії моноцитної лейкемії показана здатність секретованої форми *IL1RL1* перешкоджати деградації IκB – кіназного комплексу, що утримує NF-κB в неактивному стані, а також зменшувати рівні цитокінів запалення, зокрема інтерлейкіну шостого (*IL6*) (236). Ген *IL1B* кодує інтерлейкін один-бета, що навпаки активує NF-κB. Алельний поліморфізм гену *IL1B* асоціюють з рецидивом пухлин передміхурової залози.

Після аналізу експресії генів цього шляху, отриманих в нашій роботі, можна відзначити диференційні зміни рівнів експресії цитокінів *IL1RL1* та *IL1B*, що разом зі зниженням рівня експресії фактора некрозу пухлин *TNFRSF11B* може свідчити про загальне розбалансування регуляції шляху NF-κB.

З досліджуваних нами генів шляху p53 виявлено зниження експресії двох генів (*CCNE1* — в LNCaP, PC3; *CCNB2* — в LNCaP), та один ген не змінює рівня експресії (*TSC2*) (Таблиця 3.2). Ген *TP53*, інгібуючи циклін E1 (*CCNE1*) та циклін B2 (*CCNB2*), спричиняє відповідно арест G1- та G2-фаз клітинного циклу. В більшості пухлин (молочної залози, шлунка, товстої кишки) знайдено підвищення експресії *CCNE1* — однієї з головних кіназ переходу до S-фази циклу (237). Експресія гену *CCNB2* також підвищена в низці пухлин (238). Зниження рівня експресії цих генів в нашій роботі є неочікуваним та потребує перевірки іншими методами.

Серед досліджуваних в нашій роботі генів клітинної адгезії сім генів з 20

виявляють знижені рівні експресії (*CDH1*, *EFNA5*, *TAGLN* - в LNCaP, PC3; *SEMA3A* - в DU145; *CSPG4* — в усіх лініях; *CDK5* — в LNCaP; *FYN* - в LNCaP, DU145), шість генів не змінюють рівні експресії (*CDH2*, *MYO10*, *PKM2*, *RHOA*, *CAVI*, *PLOD2*) та один ген має перемінні рівні експресії (*GLCE* - в LNCaP знижений рівень експресії, в DU145 – підвищений рівень) (таблиця 3.2). Ген *CDH1* кодує кадгерин один (E-кадгерин). E-кадгерин є маркером епітеліальних клітин, і його значне зниження асоціюють з ЕМП, який супроводжує розвиток пухлин та підвищення їхньої злоякісності (239). В систему клітинної адгезії входить сигнальний шлях β -одина - інтегрину, що контролює взаємодії між клітинами. До цього шляху належить хондроїтину сульфат протеоглікан чотири, який кодується геном *CSPG4*. Інгибування експресії цього гену знижує лімфоангіогенез та неоваскуляризацію в ксенографтних пухлинах передміхурової залози (240). Для клітинної адгезії також важливим є сигнальний ефринів. Рецептори ефринів – родина рецепторів тирозинових кіназ, які є важливими для клітинної міграції, відштовхування та адгезії. Ген *EFNA5*, кодує ефрин п'ятий, що є лігандом рецептора тирозинових кіназ. Знайдено зниження його експресії в хондросаркомах (241). Ген *FYN* кодує нерцепторну протеїн-тирозинкіназу src-родини, яка регулює проліферацію клітин та їх виживання, інтегринопосередкований сигнальний, клітинну рухливість та імунну відповідь. Він є потенційним геном - супресором росту пухлин передміхурової залози (242). Ген *TAGLN* кодує протеїн цитоплазми трансгелін, який стабілізує актинові філаменти, зв'язуючись з фібрилами. На клітинній лінії LNCaP показано, що *TAGLN* індукуює апоптоз за рахунок взаємодії з p53 (243).

За результатами аналізу отриманих нами даних спостерігається загальне зниження експресії генів, що кодують протеїни клітинної адгезії. Це свідчить про втрату нормальних міжклітинних взаємодій у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози.

Протилежним процесом клітинної адгезії у взаємодії клітин є акантоліз. Відповідний баланс між цими процесами є важливим для морфогенезу клітин протягом ЕМП. ЕМП — процес зміни епітеліальними клітинами свого

фенотипу на мезенхімальний, що супроводжується втратою клітинних взаємодій та епітеліальної апікально-базальної полярності, а також експресією мезенхімальних маркерів. ЕМП є важливим для нормального ембріонального розвитку організму, регенерації тканин, проте він також супроводжує процеси формування злоякісних пухлин та метастазів (240). Відома певна кількість пар «ліганд-рецептор», серед яких семафорин-плексин, які контролюють цей баланс. Ген *SEMA3A* кодує секретований семафорин III, який є потенційним геном - супресором росту пухлин та інгібує клітинну міграцію та ангиогенез. (244). Ген *CDK5* кодує циклінзалежну кіназу p35, яка впливає на полімеризацію та динаміку актину і на клітинну міграцію. Експресію активатора цієї кінази (p35) знайдено в агресивних клітинних лініях передміхурової залози та в клінічних зразках із метастазами (245). Виявлене нами зниження експресії семафорину в DU145 може свідчити про активізацію міграції та можливу втрату адгезії клітин.

З 12, досліджуваних нами, генів системи сигнальної трансдукції клітин та транскрипційних факторів один ген має підвищений рівень експресії (*HOXA13* — в PC3), три гени мають знижений рівень експресії (*RASSF4* – в LNCaP, DU145; *NR5A2* - в LNCaP, PC3; *SOX4* - в LNCaP) (таблиця 3.2). Ген *RASSF4* кодує четвертий член родини, що містить Ras - асоційований домен. Відомо, що деякі властивості Ras-протеїнів, зокрема інгібування росту, опосередковані через родину протеїнів RASSF (Ras – ефектори/супресори росту пухлин). Функція цього гену, ще повністю не вивчена, проте є дані про його можливу участь у сигнальній трансдукції, яка може запускати різні клітинні відповіді, зокрема, апоптоз (246). Зниження експресії гену *RASSF4*, знайдене нами, може свідчити про інгібування RASSF-опосередкованого апоптозу (247). Зміни експресії зазнають і гени, які кодують транскрипційні фактори. Ген *HOXA13* кодує протеїн гомеобоксу A13, який бере участь в ембріональному розвитку та формуванні структур тіла, зокрема сечостатевої та репродуктивної систем, а також кінцівок. Було показано, що виживаність пацієнтів, хворих на карциному стравоходу, нижча у разі високого рівня експресії гену *HOXA13* порівняно з

пацієнтами з низьким рівнем експресії цього гену (248). Ген *NR5A2* кодує ядерний рецептор підродини п'ять, групи А (другий член). Він бере участь в ембріональному розвитку. Рівень експресії цього гену підвищений у 45% карцином молочної залози та корелює з експресією рецептора естрогенів (249). Ген *SOX4* кодує транскрипційний фактор, який бере участь в ембріональному розвитку, а також індукує р53-опосередкований апоптоз. Його експресія в багатьох пухлинах, включаючи передміхурову залозу, підвищена (250). Проте в нашій роботі було знайдено знижений рівень експресії цього гена в клітинній лінії LNCaP, що може свідчити про зниження апоптозу, залежного від р53. Проте роль цих транскрипційних генів в формуванні пухлин передміхурової залози ще мало вивчена.

Серед генів, що асоційовані з інвазивністю та метастазуванням, які вивчалися нами, для чотирьох генів відмічено знижений рівень експресії (*PLAU*, *SERPINE1*, *SERPINE2a* - в LNCaP, DU145; *SERPINE2b* – в усіх лініях), для одного гену — підвищений рівень експресії (*S100A4* — в LNCaP, DU145) (таблиця 3.2). Ген *PLAU* кодує активатор плазміногену урокіназного типу. Ген *SERPINE1* кодує інгібітор урокінази один (PAI-1). Протеїн *SERPINE1* інгібує активність матричних металопротеїназ, що є важливим для переходу злоякісних клітин через базальну ламіну (інвазивності). За даними літератури в клітинних лініях DU145, PC3, одержаних з агресивних пухлин передміхурової залози, відбувається зниження експресії *SERPINE1* та підвищення експресії *PLAU* порівняно з лініями клітин PrEC та LNCaP (251). Ген *SERPINE2* кодує інгібітор плазміногенного активатора два та є фактором коагуляції, що інактивує тканинний активатор плазміногену (tPA) та урокіназу (252). Протеїн цього серпінового інгібітору має декілька ізоформ, зокрема *SERPINE2a* та *SERPINE2b*. В нашій роботі виявлено зниження експресії інгібіторів урокінази (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*), що може свідчити про активізацію інвазивності та метастазування. Експресія *PLAU* в LNCaP, DU145 знижена, а в лінії клітин PC3 не змінюється. (247). Ген *S100A4* кодує кальційзв'язуючий

протеїн, який регулює клітинний цикл, диференціацію та є одним з протеїнів епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП).

З досліджуваних нами генів ангіогенезу у двох генів було знайдено підвищені рівні відносної експресії (*IL8* – в DU145, PC3; *CXCL2* – в DU145), для трьох генів — знижені рівні експресії (*MME*, *CXCL1* - в усіх лініях; *CXCL6* - в LNCaP, DU145) (таблиця 3.2). Ген *IL8* кодує інтерлейкін восьмий - цитокін запалення, який є одним з важливих медіаторів переходу від гормоночутливого до гормонорезистентного РПЗ. Його інгібування спричиняє зупинку клітинного циклу та апоптоз в клітинних лініях DU145, PC3 (253). Ген *MME* кодує мембранну метало-ендопептидазу, яка бере участь у деградації фізіологічно активних пептидів (брадикінін, оксітоцин, нейротензин та ін.), що робить неможливим їхнє подальше зв'язування з рецептором андрогенів та інгібує подальший розвиток агресивних метастазуючих пухлин. За даними досліджень на лініях клітин передміхурової залози було показано відсутність експресії *MME* в клітинах PC3 та значну експресію у клітинах LNCaP (254). Проте в нашому дослідженні зниження відносного рівня експресії *MME* відбувається у всіх трьох лініях РПЗ, а найбільше зниження спостерігається в лініях, отриманих з агресивних пухлин. Гени *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6* кодують відповідні хемокіни. Ці хемокіни є проангіогенними факторами та медіаторами запалення. Підвищення їх експресії знайдено в багатьох видах пухлин, включаючи передміхурову залозу (255).

Серед досліджуваних нами генів системи клітинної проліферації та репарації для одного гену було показано підвищений рівень експресії (*P16* — в DU145), для чотирьох генів — знижені рівні (*PCNA*, *CCNB2* - в LNCaP; *CCNE1* - в LNCaP, PC3; *HBEGF* - в усіх лініях), а для двох генів не було знайдено змін рівнів експресії (*MKI67*, *RNASET2*) (таблиця 3.2). Ген *PCNA* кодує ядерний антиген проліферуючих клітин. В клітинній лінії LNCaP експресія цього гену зумовлена взаємодією з ядерним рецептором андрогенів (256). Проте в нашій роботі експресія гену *PCNA* в LNCaP знижується, що може свідчити про зниження експресії AR. Також, нами не було виявлено змін експресії гену

MKI67, який є маркером проліферації клітин, що можливо свідчить про приблизно однакову швидкість проліферації клітин у культурах. Ген *P16* - це циклінзалежний інгібітор кінази, здатний індукувати арест G1- та G2-фаз клітинного циклу. Експресія цього гену в пухлинах передміхурової залози, зазвичай, знижена (як у локалізованих, так і в метастазуючих) (257). Проте в нашому дослідженні рівень експресії *P16* підвищується в клітинній лінії DU145, одержаної з метастазуючої пухлини, що може вказувати на інгібування відповідних фаз клітинного циклу. Ген *HBEGF* кодує гепаринзв'язуючий EGF-подібний фактор росту - ліганд до рецептора тирозинових кіназ ERBB/EGFR (епідермальний рецептор ростових факторів), що регулює проліферацію та диференціацію клітин ссавців. В клітинній лінії передміхурової залози ARCaP(E) знайдено підвищення експресії *HBEGF* за рахунок активації переносника цинку (*LIV1*) (258). Можливо, виявлене нами зниження експресії в досліджуваних клітинних лініях може свідчити про інші механізми регуляції цього гену.

На підставі отриманих нами даних про рівні відносної експресії досліджуваних 65 генів (таблиця 3.2) було відібрані такі, експресія яких в гормонорезистентних клітинних лініях з більш високим потенціалом до інвазивності та метастазування (DU145, PC3) відрізняється від експресії в гормоночутливій клітинній лінії з меншим потенціалом до метастазування (LNCaP). Для гена *IL8*, наприклад, не було знайдено змін рівня його експресії в гормоночутливій лінії LNCaP, в той час як в гормонорезистентних лініях DU145, PC3 рівень його експресії підвищується. Для гена *IL1B* було відмічено зниження рівня його експресії в клітинній лінії DU145 із середнім потенціалом до метастазування у дослідних тварин, водночас було виявлено підвищені рівні експресії цього гена в клітинних лініях LNCaP та PC3, що може вказувати на диференційну регуляцію експресії гена *IL1B* впродовж розвитку РПЗ. Для генів *MME*, *SERPINE2b*, *CXCL1* різниця між рівнями експресії цих генів в гормоночутливій лінії LNCaP та гормонорезистентних лініях DU145, PC3 становила більше 10 разів.

Ці гени входять до систем ангиогенезу (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*), інвазивності та метастазування (*SERPINE2b*), адгезії (*EFNA5*, *GLCE*, *TAGLN*), контролю клітинного циклу (*P16*, *CCNE1*), сигнальних шляхів: NF-κB (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL1RL1*), а також групи транскрипційних факторів та молекул сигнальної трансдукції (*HOXA13*). Для цих генів була перевірена наявність секретованого протеїну у відкритих базах даних COMPARTMENTS (259) та NCBI Gene (260) для перевірки можливості вивчення білкових продуктів цих генів у біологічних рідинах організму. Дані по цим генам представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

Рівні відносної експресії та секреція протеїна диференційно експресованих генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози

Гени	Клітинні лінії			Секреція протеїна
	LNCaP	DU145	PC3	
	Зміни рівня експресії, к.р.			
<i>IL8</i>	0	4,8↑	5,8↑	так
<i>CXCL2</i>	0	4,5↑	0	так
<i>P16</i>	0	4,3↑	0	ні
<i>HOXA13</i>	0	0	7,4↑	ні
<i>IL1RL1</i>	0	0	15,1↑	ні
<i>IL1B</i>	21,0↑	15,4*↓	445,7↑	так
<i>GLCE</i>	4,2↓	4,3↑	0	так
<i>MME*</i>	6,1↓	4179,2*↓	18,0↓	ні
<i>IL6</i>	0	0	44,8↓	так
<i>CXCL1</i>	116,3↓	16,0↓	10↓	так
<i>SERPINE2b*</i>	7,3↓	424,0*↓	0	так
<i>CCNE1</i>	4,1↓	0	11,5↓	ні
<i>TAGLN</i>	4,5↓	0	10,0↓	ні
<i>EFNA5</i>	32,2↓	0	6,0↓	ні

Примітки: 1. «*» – слабоекспресовані гени в досліджених клітинних лініях (LNCaP, DU145, PC3) ($Ct > 30$). 2. «0» – зміни експресії менше ніж у чотири рази. 3. к.р. – кількість разів. 4. ↑ - підвищення рівня відносної експресії. 5. ↓ - зниження рівня відносної експресії.

Наявність секреції протеїну була показана для генів, які кодують інтерлейкіни (*IL6*, *IL8*, *IL1B*), хемокіни (*CXCL1*, *CXCL2*), а також інгібітор плазміногенного активатора два *SERPINE2b* та D-глюкуроніл C5-епімеразу (*GLCE*).

Таким чином, було визначено транскрипційні профілі трьох клітинних ліній аденокарцином передміхурової залози (LNCaP, DU145, PC3), а також лінії іморталізованих нормальних клітин епітелію передміхурової залози (PNT2). Виявлені нами 14 диференційно експресованих генів (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL1RL1*, *CXCL1*, *CXCL2*, *TAGLN*, *EFNA5*, *GLCE*, *SERPINE2b*, *P16*, *CCNE1*, *MME*, *HOXA13*) у клітинних лініях з різним потенціалом до інвазивності і метастазування були відібрані для подальшого аналізу на клінічних зразках тканин, як потенційні пухлино-асоційовані гени РПЗ. Ці гени можуть бути використані в подальших дослідженнях зі створення діагностичних панелей генів на рівні мРНК, а гени *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *CXCL1*, *CXCL2*, *SERPINE2b* – також і на рівні протеїну. Відібрані гени належать до наступних груп: цитокіни та хемокіни (*CXCL1*, *CXCL2*), інтерлейкіни та рецептори до них (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL1RL1*), транскрипційні фактори (*HOXA13*), серпінові інгібітори пептидаз (*SERPINE2b*) та ін.

Підсумок:

Виявлено 14 диференційно експресованих генів між гормоночутливою клітинною лінією LNCaP та гормонорезистентними лініями DU145 та PC3, відносно лінії умовно нормального епітелію PNT2, які є потенційними пухлино-асоційованими генами аденокарцином передміхурової залози. Вони входять до систем ангиогенезу (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*), інвазивності та метастазування (*SERPINE2b*), контролю клітинного циклу (*P16*, *CCNE1*), сигнальних шляхів: NF- κ B (*IL1B*, *IL6*, *IL1RL1*), адгезії (*TAGLN*, *EFNA5*, *GLCE*), а також групи транскрипційних факторів та молекул сигнальної трансдукції (*HOXA13*).

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45.
2. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів в нормальній клітинній лінії та клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86 (2): 119-128.
3. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Transcriptional profiling of normal and cancer prostate cell lines. *Biopolym. Cell.* 2013; 29 (special issue): P.19. VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine; 2013 May 28-29; Kyiv, Ukraine.
4. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Search for potential biomarkers of prostate cancer. *Матеріали Х міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*; 2014 квіт. 8-11; Львів. 2014, с. 230-231.
5. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis. *Biopolym. Cell.* 2014; 30 (special issue):14. VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.

3.2. Зміни експресії генів в гормонорезистентній клітинній лінії РСЗ

Одним з невирішених питань діагностики РПЗ є раннє виявлення метастазів та інвазивного типу пухлин. Тому було обрано дві клітинні лінії з різним потенціалом до інвазивності та метастазування: LNCaP (гормоночутлива клітинна лінія з низьким потенціалом до метастазування у дослідних тварин) та РСЗ (гормонорезистентна клітинна лінія з високим потенціалом до інвазивності та метастазування у дослідних тварин) для порівняння між собою. Для дослідження відносних рівнів експресії генів використано експресійний

мікрочип Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array («SABioscience», США), який містив праймери до 84 генів, пов'язаних з канцерогенезом з різних сигнальних шляхів. Ці шляхи: 1) 14 генів контролю клітинного циклу та репарації ДНК (*ATM, BRCA1, CCNE1, CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, CHEK2, E2F1, MDM2, RB1, S100A4, TP53*); 2) 14 генів апоптозу та клітинного старіння (*APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1, CASP8, CFLAR, FAS, GZMA, HTATIP2, TERT, TNFRSF1A, TNFRSF10B, TNFRSF25*); 3) 12 генів сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*AKT1, ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAP2K1, MYC, NFKB1, NFKBIA, PIK3R1, RAF1, SNCG*); 4) 13 генів адгезії (*ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, MCAM, MTSS1, PNN, SYK, EPDR1*); 5) 16 генів ангиогенезу (*ANGPT1, ANGPT2, COL18A1, FGFR2, IFNA1, IFNB1, IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK, TGFB1, TGFBR1, THBS1, TNF, VEGFA*); 6) 16 генів інвазивності та метастазування (*MET, MMP1, MMP2, MMP9, MTA1, MTA2, NME1, NME4, PLAU, PLAUR, S100A4, SERPINB5, SERPINE1, TIMP1, TIMP3, TWIST1*).

Було відмічено зміни 36 генів в клітинній лінії PC3 порівнюючи з LNCaP більш ніж у чотири рази. Серед яких - десять генів мали знижені рівні експресії та 26 — підвищені рівні експресії генів. Результати представлено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Рівні експресії генів у клітинній лінії PC3 порівняно з LNCaP

№	Сигнальні шляхи	Гени	Підвищення експресії (к.р.)	Зниження експресії (к.р.)
0	1	2	3	4
1	Контроль клітинного циклу та репарація ДНК	<i>ATM</i> <i>CDKN2A</i> <i>BRCA1</i> <i>CDC25A</i> <i>TP53</i>	8,6 7,0	4,9 4,3 13,4
2	Апоптоз та клітинне старіння	<i>BAX</i> <i>BCL2</i> <i>BCL2L1</i> <i>CASP8</i>	6,8 35,9 13,5 4,6	

Продовження таблиці 3.4

0	1	2	3	4
		<i>TNFRSF10B</i>	5,3	
		<i>TNFRSF1A</i>	4,1	
3	Сигнальна	<i>PIK3R1</i>	12,7	
	трансдукція та	<i>ETS2</i>		4,8
	транскрипційні	<i>FOS</i>		68,9
	фактори	<i>NFKBIA</i>		5,3
		<i>SNCG</i>		11,6
4	Адгезія	<i>ITGA1</i>	4,3	
		<i>ITGA3</i>	13,1	
		<i>ITGAV</i>	4,2	
		<i>MTSS1</i>	25,2	
		<i>ITGB1</i>	11,4	
		<i>MCAM</i>		14,1
		<i>EPDR1</i>	6,7	
5	Ангіогенез	<i>PDGFB</i>	4,5	
		<i>TGFB1</i>	11,5	
		<i>THBS1</i>	6,4	
		<i>VEGFA</i>	4,0	
6	Інвазивність	<i>MET</i>	9,7	
	та	<i>MMP1</i>	28,7	
	метастазування	<i>MTA2</i>	7,4	
		<i>NME4</i>	5,7	
		<i>PLAU</i>	28,3	
		<i>SERPINB5</i>	4,7	
		<i>SERPINE1</i>	6,0	
		<i>S100A4</i>		9,7
		<i>TWIST1</i>		4,7

Примітка. к.р. - кількість разів.

З-поміж 14 досліджених нами генів контролю клітинного циклу і репарації ДНК було знайдено два гени з підвищеним рівнем експресії (*ATM*, *CDKN2A*) та чотири гени зі зниженими рівнями експресії (*BRCA1*, *CDC25A*, *S100A4*, *TP53*) (таблиця 3.4). Ген *ATM* кодує серин-протеїнову кіназу ATM. Інактивація цього гена у клітинній лінії нормального епітелію HPr-1 AR призводить до появи злитого транскрипта *TMPRSS2:ERG*, який є маркерним для РПЗ (261). Ген *CDKN2A* кодує циклін-залежний кіназний інгібітор 2A, який є геном - супресором росту пухлин (262). Ген *BRCA1* кодує протеїн BRCA1,

асоційований з репарацією ДНК. Мутація *185delAG* в цьому гені в популяції євреїв Ашкеназі асоційована з поганим прогнозом виживаності пацієнтів із РПЗ (263). Ген *CDC25A* кодує подвійно специфічну фосфатазу. Є дані, які вказують, що рівень білкового продукту цього гена також значно підвищений в клітинних лініях РПЗ, однак на рівні мРНК відмінностей не знайдено (264). Ген *S100A4* кодує кальцій-зв'язуючий білок, підвищення рівня експресії якого асоційовано із збільшенням агресивності та метастазування при РПЗ (265). В нашому дослідженні було показано зниження рівня відносної експресії *S100A4*, що можливо, відображає відмінності саме між двома клітинними лініями РПЗ. Ген *TP53* кодує білок p53, та здатен інгібувати проліферацію пухлинних клітин. Його експресія знижена в багатьох видах пухлин (266).

Отже можна зробити висновок, що у клітинній лінії PC3 серед генів контролю клітинного циклу відбувається підвищення рівнів експресії генів, які сприяють розвитку пухлин передміхурової залози (*ATM*), а також зниження експресії генів, що здатні інгібувати зростання пухлин (*BRCA1*, *TP53*), що свідчить про агресивний характер лінії PC3.

Серед 14 проаналізованих в нашій роботі генів апоптозу та клітинного старіння для шести генів знайдено підвищення рівнів відносної експресії (*BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP8*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*) (таблиця 3.4). Серед цих генів два гени є анти - апоптичними (*BCL2*, *BCL2L1* (267)) та чотири гени про-апоптичними (*BAX* (268), *CASP8* (269), *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*). Експресія гена *BCL2* підвищена в РПЗ та сприяє переходу до його гормонорезистентного типу (75). Експресія гена *BCL2L1* у пухлинах передміхурової залози також підвищена та сприяє резистентності до ліків (270). Поліморфізм гена *CASP8* пов'язують з переходом пухлин передміхурової залози до гормонорезистентного стану (271). Ген *TNFRSF10B* кодує рецептор факторів некрозу пухлин (член десять В). Ген *TNFRSF1A* також кодує рецептор факторів некрозу пухлин (член один А). Обидва цих рецептори можуть зв'язуватись з каспазою вісім та запускати апоптоз (272).

Таким чином, в групі досліджуваних нами генів апоптозу та клітинного

старіння можна відмітити значне підвищення експресії анти-апоптичних генів на фоні меншого підвищення про-апоптичних. Це може відображати один з механізмів набуття пухлинами агресивного стану.

Наступним сигнальним шляхом, що досліджувався нами, був шлях сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів. Серед 12 генів цього шляху було знайдено підвищення рівня відносної експресії для одного гена (*PIK3R1*) та для чотирьох – знижені рівні експресії (*ETS2*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNGG*) (таблиця 3.4). Ген *PIK3R1* кодує регуляторну субодиницю альфа-фосфоінотизид-три-кінази. У пухлинах РПЗ було знайдено знижені рівні експресії цього гена, а також показана зворотня регуляція ним рецептора андрогенів (273). Втім, іншою групою дослідників було показано трансактивацію рецептора андрогенів цим протеїном (274). Ген *ETS2* кодує гомолог пташиного онкогену E26 вірусу еритробластозу *v-ets* та входить до родини транскрипційних факторів ETS. В пухлинах передміхурової залози без інвазії знайдено зниження експресії цього гена, що можна пояснити конкуруванням за транскрипційну активацію з геном *ERG*, промоторна ділянка якого знаходиться в тому ж регіоні і транскрибується в протилежному напрямку (275). Зниження рівня експресії гена *FOS*, знайдене в нашій роботі, може свідчити про інгібування апоптозу (276). Продукт гена *NFKBIA* є інгібітором сигнального шляху NF-κB і демонструє зниження експресії при розвиненому РПЗ (277), що узгоджується із нашими даними. Ген *SNGG* кодує синуклеїн гамма та має знижену експресію у клітинній лінії PC3, як і в андроген-нечутливих пухлинах передміхурової залози (278). Отже, знайдене нами зниження рівня експресії цього гена співпадає із даними літератури.

Після аналізу отриманих нами даних експресії генів групи сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів можна відмітити, що в цій групі генів відбувається зниження експресії генів, що кодують транскрипційні фактори (*ETS2*, *FOS*), а також гена *NFKBIA* важливих для інгібування росту пухлин, та підвищення експресії гена – активатора рецептора андрогенів (*PIK3R1*). Це може свідчити про активацію шляху NF-κB та інгібування процесів апоптозу в

клітинній лінії PC3.

Серед досліджуваних в нашій роботі 13 генів адгезії було відмічено підвищення рівнів відносної експресії для шести генів (*ITGA1*, *ITGA3*, *ITGB1*, *ITGAV*, *EPDR1*, *MTSSI*) та для одного гена - зниження рівня експресії (*MCAM*) (таблиця 3.4). Ген *ITGA1* кодує субодиницю альфа-один-інтегрину. На клітинній лінії карциноми яєчників A2780/C10 та мишачих моделях показано підвищення рівня експресії цього гена та його здатність посилювати ангиогенез і проліферацію клітин (279). Ген *ITGA3* кодує субодиницю альфа-3-інтегрину, яка експресується клітинною лінією PC3 (280), а ген *ITGB1* кодує субодиницю бета-один-інтегрину. Було показано, що рівень його експресії підвищений в клітинній лінії PC3 як результат дії транскрипційних факторів при РПЗ (281). Ген *ITGAV* кодує субодиницю альфа-рецептора вітронектину. На стовбурових клітинах аденокарциноми передміхурової залози встановлено здатність вітронектину стимулювати розвиток пухлин за рахунок їхньої диференціації (282). Ген *EPDR1* кодує епендимін-асоційований протеїн ссавців один. Його було ідентифіковано як надлишково експресований у клітинній лінії раку кишківника (283). Втім його роль у пухлинах передміхурової залози вивчена недостатньо. Ген *MTSSI* кодує протеїн - супресор метастазів один. На клітинних лініях DU145, PC3 була показана його здатність інгібувати зростання та міграцію клітин (284). Ген *MCAM* кодує глікопротеїн клітинної адгезії MUC18. Збільшення рівня його експресії в клітинних лініях передміхурової залози, отриманих з агресивних метастазуючих пухлин, а також у лініях меланоми, дають підстави припустити про його участь у розвитку пухлин з метастазами (285). Проте в нашому дослідженні експресія гена *MCAM* при порівнянні двох клітинних ліній РПЗ була знижена, що потребує подальшого вивчення.

Таким чином, у групі генів адгезії спостерігається підвищення експресії генів, що кодують інтегрини. Їх експресія є не лише одним з характерних показників цієї клітинної лінії, але також може свідчити про активізацію процесів проліферації та диференціації, які ними контролюються.

Серед 16 генів ангиогенезу, що досліджувалися нами, було знайдено чотири гени з підвищеними рівнями експресії (*PDGFB*, *TGFB1*, *THBS1*, *VEGFA*) (таблиця 3.4). Ген *PDGFB* кодує субодиницю В тромбоцитарного фактора росту. Підвищення рівня експресії цього гена знайдене в багатьох видах пухлин, а його делеція призводить до цілковитої втрати онкогенності стовбуровими клітинами гліоми (286). Ген *TGFB1* кодує трансформуючий фактор росту бета один. Роль цього гена в канцерогенезі є досить неоднозначною: існують дані про його інгібувальний вплив у клітинній лінії PC3 (287) та, навпаки, про підсилення росту клітин PC3 (288). Ген *THBS1* кодує тромбоспондин один, який є інгібітором ангиогенезу, проте стимулює зростання клітин андроген-нечутливої клітинної лінії PC3 (289), що підтверджується отриманими в цьому дослідженні даними. Ген *VEGFA* кодує судинний ендотеліальний фактор росту А. Трансформуючий фактор росту бета 1 посилює експресію *VEGFA*, що призводить до підвищення міграції клітин РПЗ (290).

Отже, у групі генів ангиогенезу, які нами вивчалися, спостерігається збільшення рівнів відносної експресії деяких генів, що потребує перевірки на зразках агресивних метастазуючих пухлин передміхурової залози.

Серед 16 досліджених нами генів інвазивності та метастазування було знайдено сім генів з підвищеними рівнями експресії (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINB5*, *SERPINE1*), два гени — зі зниженими рівнями (*S100A4*, *TWIST1*) (таблиця 3.4). Ген *MET* кодує протоонкоген *met*. Підвищення рівня експресії цього гена пов'язують із розвитком гормонорезистентного типу РПЗ (291). Ген *MMP1* кодує матричну металопептидазу один. Її експресія спричиняє посилення інвазивності раку шлунка (292). Ген *MTA2* кодує асоційований з метастазами протеїн MTA2. Було показано, що його підвищена експресія викликає естроген-незалежне зростання пухлин молочної залози (293). Ген *NME4* кодує мітохондріальну кіназу нуклеозидфосфату. Підвищену експресію цього гена знайдено в зразках раку шлунку та товстого кишечника (294). Функції і роль генів *PLAU* та *SERPINE1* було описано вище. Ген *SERPINB5* кодує інгібітор пептидази п'ять, який вважається геном, здатним інгібувати

зростання пухлин молочної залози та передміхурової залози, тому що він є делетованим в цих видах раку (295). Ген *TWIST1* кодує “твіст”-асоційований протеїн один, який є одним з головних протеїнів ЕМП. Було показано, що рівень його експресії підвищений у метастазуючому РПЗ (296). Зниження експресії цього гену в клітинній лінії PC3 в порівнянні з LNCaP в нашому експерименті, можливо, відображає відмінності саме між двома клітинними лініями РПЗ.

Таким чином, знайдені в нашому дослідженні незначне підвищення рівнів відносної експресії генів *SERPINE1* та *SERPINB5* в порівнянні із суттєвим підвищенням експресії *PLAU*, а також підвищення рівнів експресії генів *MET*, *MMP1* дають підставу зробити припущення про посилення інвазивності клітинної лінії PC3.

Агресивні гормонорезистентні пухлини відрізняються від гормоночутливих за ступенем інвазивності та метастазування. Безперечно, що всі знайдені нами гени зі змінами у клітинній лінії PC3 порівняно до лінії LNCaP можуть бути пов’язані із інвазивним та метастазуючим типом пухлин передміхурової залози. Для подальшої перевірки на клінічних зразках пухлин для пошуку генів, які асоційовані із агресивними метастазуючими пухлинами, було відібрано гени з високим рівнем змін (більше 10 раз) у клітинній лінії PC3, а також гени, які є перспективними на нашу думку для подальших досліджень з урахуванням даних літератури, представлених в базі даних PubMed (260). Гени відбирались із різних сигнальних шляхів, оскільки у формуванні та розвитку пухлин беруть участь всі сигнальні системи клітини.

Серед всіх генів зі зміненим рівнем експресії (36 генів) (таблиця 3.4) ми вибрали 14 генів, які представлені у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5.

Рівні експресії та секреція протеїну потенційних пухлино-асоційованих генів, пов'язаних з інвазивністю та метастазуванням

Протеїн секретується		Протеїн не секретується	
Гени	Зміни експресії, к.р.	Гени	Зміни експресії, к.р.
0	1	2	3
<i>EPDR1</i>	6,7↑	<i>BCL2</i>	35,85↑
<i>MET</i>	9,67↑	<i>BCL2L1</i>	13,49↑
<i>MMP1</i>	28,72↑	<i>FOS</i>	68,88↓
<i>PLAU</i>	28,32↑	<i>MTA2</i>	7,43↑
<i>TGFBI</i>	11,5↑	<i>NME4</i>	5,71↑
<i>SERPINE1</i>	6,04↑	<i>PIK3R1</i>	12,68↑
<i>VEGFA</i>	4,04↑	<i>ITGA3</i>	13,12↑

Примітки: 1. ↑ - підвищення рівня експресії. 2. ↓ - зниження рівня експресії. 3. к.р. - кількість разів.

Для цих генів було перевірено наявність секретованого протеїну у відкритих базах даних COMPARTMENTS (259) та NCBI Gene (260) для визначення можливості подальшого вивчення білкових продуктів цих генів у зразках біологічних рідин організму.

У наборі вибраних генів представлено: два гени апоптозу та клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), два гени з групи сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), два гени адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), два гени – ангиогенезу (*TGFBI*, *VEGFA*) та шість генів інвазивності та метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*). Серед цих генів сім мають секретовані протеїни - *EPDR1*, *MET*, *MMP1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *TGFBI*, *VEGFA* та можуть бути використані в подальших дослідженнях із пошуку та створення панелей маркерів метастазуючого РПЗ на рівні протеїну.

Серед виявлених нами генів зі змінами у сигнальному шляху апоптозу та клітинного старіння було обрано гени *BCL2* та *BCL2L1*. Ці гени є анти – апоптичними факторами при РПЗ (297), (270). Було показано, що ген *BCL2* може бути предиктивним маркером для терапії таксаном пацієнтів із стійким до кастрації РПЗ (298). Серед генів сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів для яких ми знайшли зміни було відібрано гени *PIK3R1* та *FOS*. Ген

PIK3R1 є цікавим для подальших досліджень у пухлинах передміхурової залози, оскільки була показана як його трансактивація при РПЗ (274), так і негативна регуляція рецептором андрогенів (273). Роль гена *FOS* при РПЗ також потребує детального вивчення, оскільки на даний момент є дані, які вказують як на його онкогенні (299), так і на пухлино-супресорні властивості (276). Серед генів адгезії із виявленими нами змінами ми відібрали гени *ITGA3* та *EPDR1*. Ген *ITGA3* є важливим при ЕМП та експресується у багатьох клітинних лініях раку молочної залози, а також клінічних зразках пухлин молочної залози з більш агресивним фенотипом (300). В базі даних PubMed наразі є небагато даних про ген *EPDR1* та його участь в онкогенезі. Отже отримання нової інформації про цей ген у пухлинах передміхурової залози є актуальним. Серед генів адгезії, для яких ми знайшли зміни, було відібрано гени *TGFBI* та *VEGFA*. Ці гени є важливими як для ангіогенезу, так і в апоптозі ендотеліальних клітин (301), (302). Було показано, що *VEGFA* - опосередкований апоптоз є необхідним для активації *TGFBI* – залежного ангіогенеза як *in vitro* так *in vivo* (303). Серед виявлених нами генів інвазивності та метастазування зі змінами ми відібрали шість (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*) генів, оскільки цей сигнальний шлях є на нашу думку найбільш показним для пошуку генів, асоційованих із інвазивністю та метастазуванням. Експресія гену *MET* є важливою для активації переходу клітин передміхурової залози до фенотипу стовбурових клітин та утворенню пухлин (304). Підвищена експресія гена *MMP1* сприяє посиленню інвазивності та метастазуванню пухлин передміхурової залози на моделях як *in vitro* так *in vivo* (305). Ген *MTA2* є одним з найважливіших генів, що регулюють організацію цитоскелету та транскрипцію впродовж утворення метастазів (306). Ген *NME4* був показаний як асоційований з поганим прогнозом для пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом (307). Стосовно його змін у пухлинах передміхурової залози нами не було виявлено даних, отже цей ген потребує подальших досліджень. Протеїнові продукти генів *PLAU* та *SERPINE1* розглядаються як перспективні маркери для диференціації пухлин передміхурової залози (308).

Таким чином, було визначено рівні відносної експресії 84 генів, пов'язаних з канцерогенезом у клітинній лінії PC3 у порівнянні до клітинної лінії LNCaP та виявлено 36 генів зі змінами. Всі знайдені нами гени зі змінами у клітинній лінії PC3 порівняно до лінії LNCaP можуть бути пов'язані із інвазивним та метастазуючим типом пухлин передміхурової залози. Проте для подальшого вивчення на клінічних зразках пухлин передміхурової залози ми відібрали 14 генів (*BCL2*, *BCL2L1*, *PIK3R1*, *FOS*, *ITGA3*, *EPDR1*, *TGFB1*, *VEGFA*, *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*). Серед яких є гени з високим рівнем змін (більше 10 раз) у клітинній лінії PC3, а також гени, які є перспективними на нашу думку для подальших досліджень з урахуванням даних літератури, представлених в базі даних PubMed. Обрані нами гени можуть розглядатися як потенційні пухлино-асоційовані гени, пов'язані з інвазивністю та метастазуванням при РПЗ, та можуть бути використані в подальших дослідженнях із пошуку та створення наборів маркерів метастазуючого РПЗ, а гени *EPDR1*, *MET*, *MMP1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *TGFB1*, *VEGFA* - також і на рівні протеїну.

Підсумок:

Детектовано 36 генів зі змінами рівня відносної експресії більше ніж в 4 рази в гормонорезистентній клітинній лінії PC3 у порівнянні з гормоночутливою клітинною лінією LNCaP, серед яких 14 генів, які належать до сигнальних шляхів: апоптозу та клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), ангиогенезу (*TGFB1*, *VEGFA*) та інвазивності та метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*) є асоційованими із інвазивністю та метастазуванням пухлин передміхурової залози.

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григорь'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування

раку простати людини. *Biopolym. Cell.* 2013; 29(6): 499-505.

2. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45.

3. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis. *Biopolym. Cell.* 2014; 30 (special issue):14. VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine.

4. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Search for potential biomarkers of prostate cancer. *Матеріали X міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*; 2014 квіт. 8-11; Львів. 2014, с. 230-231.

3.3. Визначення впливу ектопічної експресії гена *GLCE* на експресію генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів

Ген *GLCE* за даними літератури відіграє неоднозначну роль у трансформованих клітинах, зокрема у клітинних лініях та клінічних зразках пухлин передміхурової залози (84). Тому, в нашій роботі було поставлено задачу дослідити особливості впливу ектопічної експресії гена *GLCE* на експресію генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів.

Для цього було проведено трансфекцію клітин LNCaP та PC3 плазмідним вектором, який містив послідовність гена *GLCE*. Перевірку експресії гена *GLCE* на рівні мРНК у трансфєкованих та нативних клітинних лініях було проведено за допомогою мультиплексної ПЛР, а на рівні протеїну – за допомогою імуноцитохімії (рис 3.1 а, б).

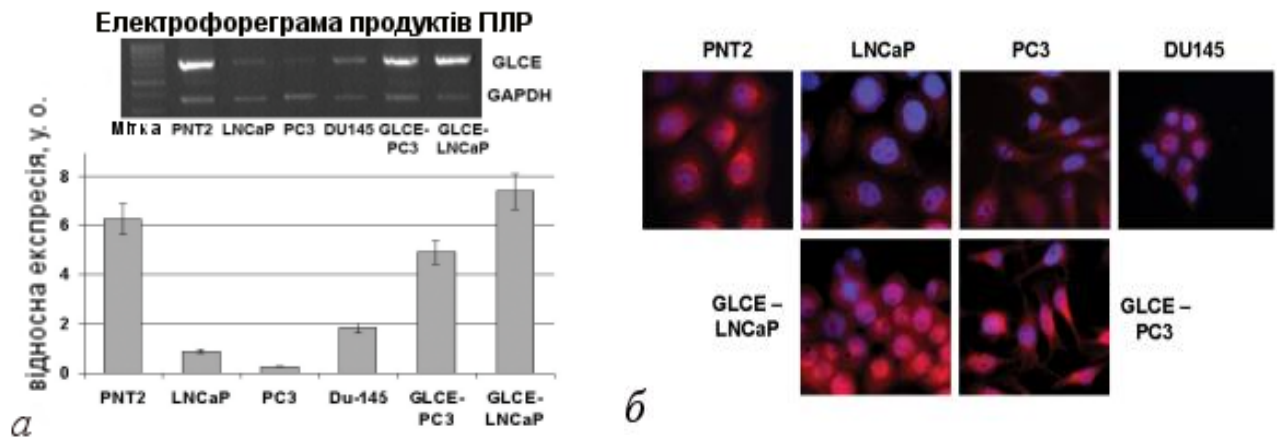


Рис. 1. Рівні експресії гена *GLCE* у клітинних лініях аденокарцином та нормального епітелію передміхурової залози: *а* - рівень відносної експресії на рівні мРНК по відношенню до референсного гена *GAPDH*; *б* - експресія на рівні протеїну. Інтенсивність флюоресценції протеїну *GLCE* нормована на флюоресценцію *GAPDH*. PNT2 – лінія нормального епітелію передміхурової залози людини; LNCaP, DU145, PC3 – клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини; GLCE-LNCaP, GLCE-PC3 – трансфіковані клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини

Після отримання стабільних клонів клітин, які експресували протеїн *GLCE* було проведено транскрипційний профайлінг трансфікованих та нативних клітинних ліній за допомогою експресійного мікрочипу Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array («SABiosciense», США), який був описаний в підрозділі 3.2.

В результаті вивчення рівнів експресії 84 генів, пов'язаних з онкогенезом було виявлено 18 та 21 ген зі змінами більше двох разів у трансфікованих клітинних лініях GLCE-LNCaP та GLCE-PC3 відповідно, порівняно до нативних клітинних ліній (рис 3.2).

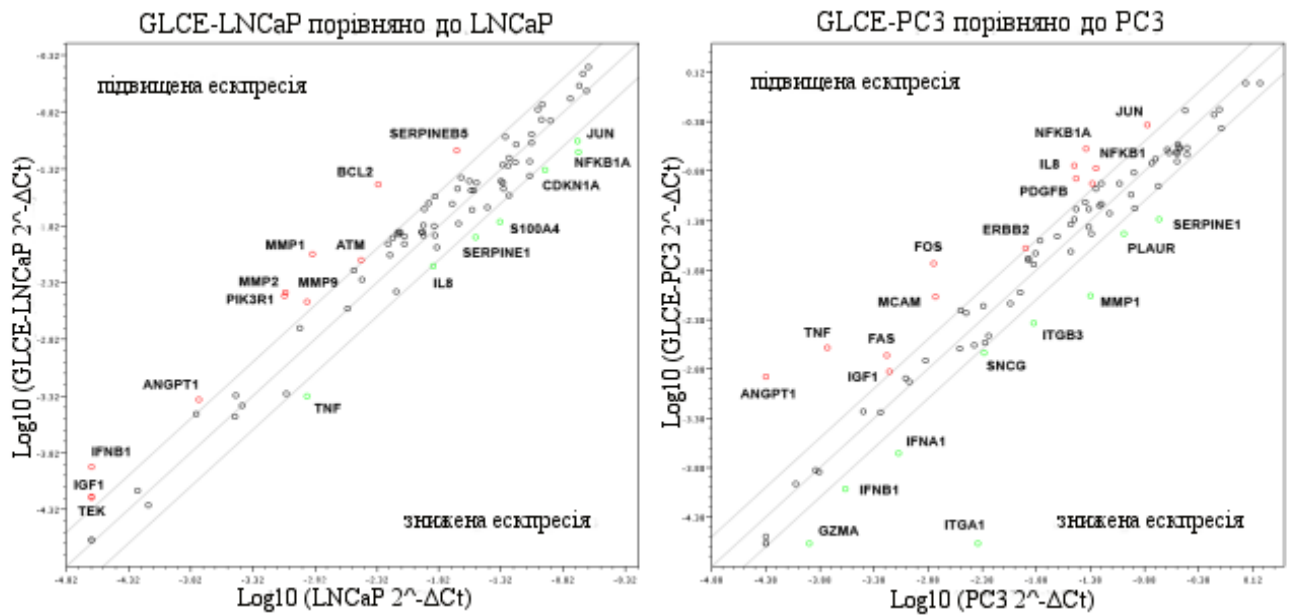


Рис 3.2 Гени зі змінами рівнів експресії у трансфікованих клітинних лініях GLCE-LNCaP та GLCE-PC3 порівняно до нативних клітинних ліній. Центральна лінія посередині показує подібний рівень експресії до нативних клітинних ліній. Дві лінії по боках від неї показують зміни рівнів експресії у два рази. Гени, які лежать вище центральної та верхньої від неї лінії мають підвищені (більше двох разів) рівні експресії, а гени, що лежать нижче центральної та нижньої від неї лінії мають знижені (більше двох разів) рівні експресії

Більшість генів зі змінами були з сигнальних шляхів ангіогенезу (*ANGPT1*, *IGF1*, *PDGFB*, *TNF*, *IL8*, *TEK*, *IFNA1*, *IFNB1*) й інвазивності та метастазування (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *SERPINE1*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE5*, *S100A4*).

Ми виявили, що ектопічна експресія гена *GLCE* по різному вплинула на експресію генів інвазивності та метастазування і генів ангіогенезу в клітинних лініях GLCE-LNCaP та GLCE-PC3. Так, в гормоночутливій клітинній лінії GLCE-LNCaP ми спостерігали підвищення рівнів експресії генів *MMP1*, *MMP2*, *MMP9* та *TEK*, а також зниження рівня експресії гена *S100A4*. У гормонорезистентній клітинній лінії GLCE-PC3 нами було виявлено зниження

рівня експресії генів *MMP1*, *PLAUR* та *SERPINE1*, й підвищення рівнів експресії генів *IL8* та *TNF*.

Отже, отримані нами результати підтверджують диференційний вплив гена *GLCE* на експресію генів у клітинних лініях із різною чутливістю до андрогенів. Основними сигнальними шляхами, які зазнають змін через цей вплив є шляхи ангіогенезу та інвазивності й метастазування.

Підсумок:

Виявлено вплив гена *GLCE* на експресію генів із сигнальних шляхів ангіогенезу та інвазивності й метастазування.

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45.

2. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Effect of D-glucuronyl C5-epimerase expression in prostate cancer cell lines. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86 (5), suppl. 2: 29. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу; 2014 жовт. 6-10, Київ.

3.4. Визначення рівнів відносної експресії генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFBI*, *IL1B* в клінічних зразках аденокарцином передміхурової залози

Для перевірки результатів, отриманих на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози серед диференційно експресованих генів, а також генів з найбільшими змінами між гормоночутливими та гормонорезистентними клітинними лініями було відібрано сім генів (*EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFBI*, *IL1B*). Гени для подальшої перевірки методом кількісного ПЛР в реальному часі на клінічних зразках були вибрані з

різних шляхів для отримання комплексної інформації стосовно процесів, що відбуваються у пухлинах передміхурової залози. Так, гени *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1* відіграють важливу роль в адгезії типів «клітина-клітина» та «клітина-міжклітинний матрикс», які зазнають змін під час прогресії пухлин до інвазивного, метастазуючого типу (309). Для гена *TAGLN* показана участь в р53 сигналінгу при РПЗ (243). Ген *FOS* кодує транскрипційний фактор, який залучений до багатьох клітинних процесів, включаючи запалення (310). Ген *IL1B* залучений до NF-κB сигнального шляху (311). Ген *PLAU* бере участь в процесах інвазивності та метастазування (312). Ген *TGFBI* може стимулювати ЕМП та ангиогенез (313).

Для визначення рівнів відносної експресії цих генів було використано 16 зразків ДГПЗ, 37 зразків аденокарцином, з яких 29 були парні, та 29 зразків УНТ передміхурової залози. У групі хворих з ДГПЗ медіана віку була 66,5 років, діапазон - 60-77 років. У групі хворих з аденокарциномою середній вік становив 63 роки, діапазон - 48-80 років.

Рівні відносної експресії генів знаходили методом кількісної ПЛР в реальному часі по відношенню до гена *TBP*. Графіки відносної експресії генів по відношенню до референсного гена, а також описової статистики до них представлені у додатках В та Д на рис. В.1. - В.7 та рис. Д.1 - Д.7. За результатами тестів Колмогорова-Смірнова та Лільєфорс було відзначено відмінний від нормального розподіл даних відносної експресії генів, виражених у відносних кількостях, для всіх семи генів у групі ДГПЗ, а також для генів *TGFBI*, *IL1B*, *PLAU*, *EFNA5* у групі аденокарцином та для шести генів, окрім *IL1B* у групі УНТ.

Слід зауважити, що для всіх генів для значень відносної експресії спостерігається велика дисперсія у всіх досліджуваних групах (наприклад, діапазон значень для гена *FOS* у групі УНТ (3,028÷285,813)). Крім цього, значення стандартних відхилень у всіх групах є досить великими, а для гена *FOS* вони є навіть більшими за значення медіани (*FOS* ген у групі аденокарцином - ME=3,383; SD=11,693).

Для аналізу можливих асоціацій між частотами зразків із різними рівнями відносної експресії генів у досліджуваних групах було створено таблиці спряженості. Для цього рівні відносної експресії генів та клінічні дані були розділені на категорії. Зміни відносної експресії генів більше двох разів вважалися значущими (314). Рівні відносної експресії було розділено на три категорії: перша – без змін (рівні відносної експресії у межах $0,41 \div 2,09$); друга – зі зниженим рівнем (рівні відносної експресії $\leq 0,4$); третя – з підвищеним рівнем (рівні відносної експресії $\geq 2,1$). Клінічні дані, а саме тип тканин передміхурової залози – відповідно на групи ДГПЗ, аденокарцином та УНТ. У рядках були частоти категорій рівнів відносної експресії генів, а у колонках – групи (таблиця 3.6).

Таблиця 3.6.

Таблиці спряженості рівнів відносної експресії генів у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ. Статистична значущість розрахована за пермутаційним точним тестом Фішера

Гени	РВЕ	Число зразків зі змінами РВЕ		
		Групи		
		ДГПЗ (n=16)	Аденокарциноми (n=37)	УНТ (n=29)
0	1	2	3	4
TGFBI	I	9	24	27
	II	6²	9³	1^{2,3}
	III	1	4³	1³
IL1B	I	6	18	11
	II	6²	5	1²
	III	4²	14	17²
FOS	I	5	1	0
	II	2	1	0
	III	9^{1,2}	35¹	29²
EFNA5	I	12	10	8
	II	1¹	10¹	3
	III	3^{1,2}	17¹	18²
TAGLN	I	9	13	12
	II	7	21	15
	III	0	3	2

Продовження таблиці 3.6.

0	1	2	3	4
PLAU	I	12	17	13
	II	1	9	5
	III	3	11	11
EPDR1	I	12	21	22
	II	3	14	6
	III	1	2	1

Примітки: 1. PBE – рівні відносної експресії генів: I – $0,41 \div 2,09$, II – $\leq 0,4$, III – $\geq 2,1$; 2. УНТ – умовно-нормальні тканини. 3. ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози. 4. ¹ – статистично значущі зміни між ДГПЗ та аденокарциномами. 5. ² – статистично значущі зміни між ДГПЗ та УНТ. 6. ³ – статистично значущі зміни між аденокарциномами та УНТ. 7. Жирним позначено кількості зразків зі змінами із статистично значущою різницею між групами.

Після аналізу частот зразків зі змінами рівнів відносної експресії, які наведені в таблиці 3.6 було знайдено чотири гени : *FOS* ($p=0,0001$), *EFNA5* ($p=0,0030$), *IL1B* ($p=0,0180$) та *TGFBI* ($p=0,0300$) зі статистично значущою різницею між кількістю зразків зі змінами рівня відносної експресії у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

Між групами ДГПЗ та аденокарцином було знайдено два гени зі значущою різницею - *FOS* ($p=0,0026$) та *EFNA5* ($p=0,0047$). Також було знайдено статистично значущу різницю між групами аденокарцином та УНТ для гена *TGFBI* ($p=0,0233$). Крім того, було отримано гени зі значущою різницею між групами ДГПЗ та УНТ - *FOS* ($p=0,0005$), *IL1B* ($p=0,0061$), *TGFBI* ($p=0,0082$) та *EFNA5* ($p=0,0084$). Зразки із підвищеними рівнями відносної експресії гену *FOS* зустрічались частіше у групі аденокарцином (35 зразків із 37) та у групі УНТ (29 зразків із 29) порівняно до групи ДГПЗ (9 зразків із 16). Для гену *EFNA5* також частіше зустрічались зразки із підвищенням рівня відносної експресії у групі аденокарцином (17 зразків із 37), а також у групі УНТ (18 зразків із 29) порівняно до групи ДГПЗ (3 зразки із 16). Для гена *IL1B* зразки із підвищеними рівнями відносної експресії цього гена зустрічались частіше у групі УНТ (17 зразків із 29), а також у групі аденокарцином (14

зразків із 37) порівняно із групою ДГПЗ (4 зразки із 16). Для гена *TGFB1*, навпаки, у групі ДГПЗ частіше зустрічалися зразки зі зниженим рівнем відносної експресії (6 зразків із 16) в порівнянні з групою умовних норм (1 із 29 зразків). До того ж, зразки зі змінами рівня відносної експресії зустрічалися частіше у групі аденокарцином (13 зразків із 37) порівняно із групою УНТ (2 зразки із 29).

Сума за шкалою Глісона широко застосовується для класифікації РПЗ. Згідно до стратифікації, яка наведена у рекомендаціях Європейської асоціації урологів, пацієнти із локалізованим або локально-прогресуючим РПЗ із сумою за шкалою Глісона більше семи знаходяться у групі підвищеного ризику біохімічного рецидиву РПЗ (315). Тому група аденокарцином була розділена на дві – із сумою за Глісоном, яка менша чи дорівнює семи ($n=23$) та більше семи ($n=14$). Для пошуку асоціацій між частотами зразків зі змінами рівнів відносної експресії генів у різних групах аденокарцином та ДГПЗ також було створено таблицю спряженості, аналогічно до таблиці 3.6 (таблиця 3.7).

Таблиця 3.7.

Таблиці спряженості рівнів відносної експресії генів у групах ДГПЗ та аденокарцином із різною сумою за шкалою Глісона. Статистична значущість розрахована за пермутаційним точним тестом Фішера

Гени	РВЕ	Число зразків зі змінами РВЕ		
		Групи		
		ДГПЗ ($n=16$)	Аденокарциноми $Gl \leq 7$ ($n=23$)	Аденокарциноми $Gl > 7$ ($n=14$)
0	1	2	3	4
<i>TGFB1</i>	I	9	14	10
	II	6	7	2
	III	1	2	2
<i>IL1B</i>	I	6	11	7
	II	6	3	2
	III	4	9	5
<i>FOS</i>	I	5	0	1
	II	2	1	0
	III	9 ¹	22 ¹	13

Продовження таблиці 3.6.

0	1	2	3	4
EFNA5	I	12	4	6
	II	1¹	8¹	2
	III	3¹	11¹	6
TAGLN	I	9	8	5
	II	7	13	8
	III	0	2	1
PLAU	I	12	9	8
	II	1	5	4
	III	3	9	2
EPDR1	I	12	13	8
	II	3	8	6
	III	1	2	0

Примітки: 1. РВЕ – рівні відносної експресії генів: I – 0,41÷2,09, II - ≤0,4, III - ≥2,1. 2. УНТ – умовно-нормальні тканини. 3. ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози. 4. G1 – сума за шкалою Глісона. 5. ¹ - статистично значущі зміни між ДГПЗ та аденокарциномами із сумою за шкалою Глісона ≤7. 6. Журним позначено кількості зразків зі змінами із статистично значущою різницею між групами.

Після аналізу частот зразків зі змінами рівнів відносної експресії, які наведені в таблиці 3.7 не було знайдено різниці між частотами зразків зі змінами рівнів відносної експресії у групах аденокарцином із різною сумою за шкалою Глісона. Втім, були знайдені гени зі статистично значущою різницею між групами аденокарцином та ДГПЗ - *FOS* (p=0,0134), *EFNA5* (p=0,0077), зокрема, між ДГПЗ та аденокарциномами із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи (*FOS*, p=0,0073, *EFNA5*, p=0,0014).

Аналіз частот зразків зі змінами рівнів відносної експресії між групами аденокарцином із різною сумою за шкалою Глісона та УНТ не показав статистично значущої різниці, тому ця таблиця спряженості не наводиться.

Оскільки РПЗ є генетично гетерогенним захворюванням і причини, які викликають цю гетерогенність, є ще не остаточно зрозумілими, важливо дослідити відмінності між тканинами пухлини та УНТ з одної залози. Тому було проведено порівняння між собою рівнів відносної експресії генів у тканинах аденокарцином та парних їм УНТ за допомогою теста Вілкоксона.

Було знайдено один ген зі статистично значущою різницею - *PLAU* ($p=0,0388$).

Нормалізовані рівні відносної експресії генів було розраховано для парних зразків аденокарцином для кожного з семи досліджених генів. Кратність змін більше двох вважалася значущою (314). Було відмічено 27,6% зразків зі зниженим рівнем експресії в аденокарциномах порівняно до УНТ та 6,9% зразків – із підвищеним рівнем експресії гена *TGFBI*, 27,6% та 17,3% відповідно – для гена *IL1B*, 13,8% і 24,1% - для гена *FOS*, 37,9% та 6,9% - для гена *EFNA5*, 34,5% і 24,1% - для гена *TAGLN*, 31,0% та 10,3% - для гена *PLAU*, а також 31,0% і 13,8% - для гена *EPDR1*. Тест Спірмена виявив також середню позитивну кореляцію між кратністю змін для шести генів між собою окрім гена *FOS* в діапазоні від 0,42 до 0,60.

Для виявлення можливих зв'язків між кратністю змін рівнів нормалізованої експресії генів у групі аденокарцином та рівнями ПСА було виконано непараметричний регресійний аналіз, який показав, що у пацієнтів із незначним підвищенням рівня ПСА (не більше 20,0 нг/мл) спостерігається підвищення рівня експресії гена *IL1B* ($OR=2,1$; $p=0,0377$).

Для виявлення можливих зв'язків між кратністю змін рівнів відносної експресії генів, виражених у відносних кількостях, у групі аденокарцином та рівнями ПСА у сироватці крові також було створено таблиці спряженості. Втім, після аналізу даних цієї таблиці спряженості й тесту Спірмена не було знайдено значущих асоціацій між частотою зразків зі змінами рівнів відносної експресії генів та різними рівнями підвищення ПСА. Тому ця таблиця не наведена в даній роботі.

Таким чином, було визначено рівні відносної експресії генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *IL1B* та *TGFBI* у клінічних зразках пухлин та УНТ передміхурової залози. Аналіз результатів виявив чотири гени (*FOS*, *EFNA5*, *IL1B*, *TGFBI*) зі статистично значущою різницею змін рівнів відносної експресії генів у групах аденокарцином, ДГПЗ та умовно-нормальних тканин. Виходячи зі співвідношення зразків із підвищеним чи зниженим рівнем відносної експресії можна зробити припущення, що гени *FOS*, *EFNA5* та *IL1B* є

активованими в аденокарциномах та УНТ порівняно до ДГПЗ, в той час як ген *TGFBI* є активованим та інгібованим в окремих зразках аденокарцином, що може пояснюватися індивідуальними особливостями пацієнтів та певних пухлин. Також можна відмітити зниження рівня експресії гена *PLAU* в окремих зразках аденокарцином порівняно з УНТ. Знайдений зв'язок змін нормалізованої експресії гена *IL1B* із змінами рівня ПСА може свідчити про діагностичний потенціал цього гена. Отже гени *EFNA5*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, для яких була знайдена статистична різниця у частотах зразків зі змінами рівнів відносної експресії у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ передміхурової залози, є асоційованими із РПЗ та потребують подальших досліджень.

Підсумки:

1. Показано для п'яти генів (*FOS*, $p=0,0001$, *EFNA5*, $p=0,0030$, *IL1B*, $p=0,0180$, *TGFBI*, $p=0,0300$, *PLAU*, $p=0,0388$) різниці у рівнях відносної експресії між групами доброякісних гіперплазій, аденокарцином та умовно-нормальних тканин передміхурової залози.

2. Методом непараметричного регресійного аналізу виявлено, що у пацієнтів із незначним підвищенням рівня ПСА (не більше 20,0 нг/мл) спостерігається підвищення рівня експресії гена *IL1B* ($OR=2,1$; $p=0,0377$).

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YuV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Relative expression of cancer-associated genes in prostate tumor samples. *Exp oncology*. 2017; 39 (2): 1-8.
2. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози. Матеріали XIII З'їзду онкологів та радіологів України. 2016 травн. 26-28; Київ. 2016, с. 114-115.

3.5. Генетичні та епігенетичні зміни генів 3-ї хромосоми людини при диференціюванні доброякісних та злоякісних пухлин передміхурової залози

3.5.1. Визначення генетичних/епігенетичних змін генів 3-ї хромосоми людини в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози з використанням NotI-мікрочипів. До чинників, які впливають на експресію генів, входять різні генетичні та епігенетичні зміни (316,317). Дослідження цих змін є важливим для розуміння механізмів, які визначають експресію генів.

Раніше у нашій лабораторії (230,318,319), а також іншими дослідниками (169,172), було показано, що третя хромосома людини може зазнавати різних генетичних та епігенетичних змін при розвитку епітеліальних пухлин у низці локалізацій. Тому однією із задач цієї роботи був пошук генетичних та епігенетичних змін третьої хромосоми людини у пухлинах передміхурової залози для виявлення потенційних пухлино-асоційованих генів. Для цього було використано метод гібридизації на NotI-мікрочипах, який дозволяє детектувати одночасно як генетичні (делеції чи ампліфікації), так і епігенетичні (метилування чи деметилування) зміни ДНК.

Було досліджено геномну ДНК з клінічних зразків біопсій передміхурової залози: 15 зразків ДГПЗ, 14 зразків аденокарцином передміхурової залози з сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, та чотири зразки з сумою за шкалою Глісона більше семи. В якості контролю використовували чотири зразки тканин передміхурової залози із запаленням. З досліджених 180 геномних локусів 3-ї хромосоми людини зміни було виявлено у 88 генах/локусах для більше ніж 10% пухлин. Найбільш частими змінами були гетерозиготні делеції чи метилування (1163 випадки) та гомозиготні делеції чи метилування (461 випадок). Менше всього було знайдено ампліфікацій чи деметилування — 24 випадки. В таблиці Е.1 додатка Е показано 50 генів/локусів із змінами більше 30% у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози. Результати гібридизації на NotI-мікрочипі для цих 50

генів/локусів представлено на рис.3.3.

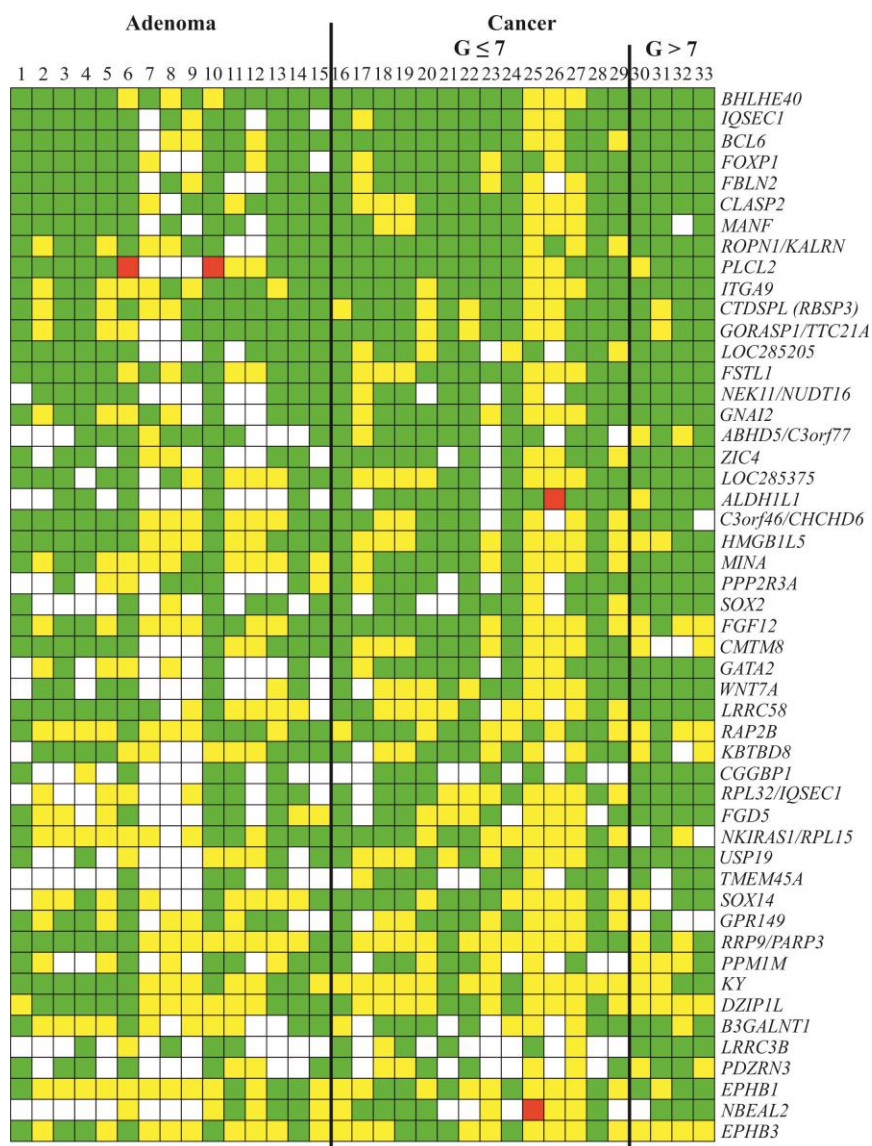


Рис. 3.3. Результати гібридизації на NotI-мікročипі для 50 генів/локусів: горизонтально — 33 зразки біопсій передміхурової залози (15 ДГПЗ, 14 аденокарцином з сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи (G) та чотири зразки аденокарцином з сумою за шкалою Глісона більше семи). Вертикально — 50 NotI-сайтів, асоційованих з генами/локусами. Зелені клітини — метилювання чи делеції (від 82 до 33%); червоні клітини — деметилювання чи ампліфікація; жовті клітини — без змін; білі клітини — відсутність сигналу

Отримані нами результати з наявності делецій/метилювання для 50

генів/локусів (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *BHLHE40*, *ROPN1/KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL* (*RBSP3*), *GORASP1/TTC21A*, *FSTL1*, *ABHD5/C3orf77*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *NEK11*, *FBLN2*, *SOX2*, *MINA*, *CHCHD6*, *WNT7A*, *LOC285375*, *FGF12*, *NKIRAS1/RPL15*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *RPL32/IQSEC1*, *C3orf46/CHCHD6*, *RRP9/PARP3*, *PPM1M*, *KBTBD8*, *FGD5*, *CMTM8*, *NBEAL2*, *TMEM45A*, *LRRC3B*, *PDZRN3*, *USP19*, *EPHB1*, *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3*) були перевірені з використанням відкритих баз даних cBioPortal (320) та MethHC (321). Для всіх генів/локусів були підтверджені виявлені нами зміни.

Необхідно відмітити, що ряд визначених генів/локусів зі змінами (наприклад, *CTDSPL*, *ALDH1L1*, *LRRC3B*, *IQSEC1*, *FOXP1*, *GNAI2*, *EPHB1*) зазнають делецій чи метилювання також в пухлинах іншого генезу: пухлинах товстого кишківника (322), недрібноклітинній карциномі легень (228), пухлинах шийки матки (323), світлоклітинній карциномі нирок (196,230) та серозному типі карцином яєчників (197).

Для виявлення можливих панелей генів, що відображають різницю між доброякісними та злоякісними пухлинами передміхурової залози, була проведена статистична обробка результатів. Було знайдено дев'ять генів зі статистично значущою різницею між частотами метилювання/делецій в аденокарциномах з високим ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона більше семи) порівняно з аденокарциномами із сумою за шкалою Глісона, яка була менше чи дорівнювала семи) і ДГПЗ (таблиця 3.8.).

Локус *LOC440944* знаходиться в ділянці 3p25.3. Було передбачено, що ця послідовність не кодує протеїн та може бути кандидатом в некодувальні РНК (NCBI Gene ID: 440944) з невідомими функціями (324). Функції гена *SETD5* ще мають бути дослідженими, втім за доменом SET він може виконувати функції метилтрансферази гістонів (325). Регуляція експресії цього гену за допомогою мікро-РНК 126-5p впливає на адгезію лейкоцитів (326). Ген *OSBPL10* (3p22.3) кодує протеїн, подібний до оксистерол-зв'язуючого протеїна десять.

Таблиця 3.8.

Зіставлення частоти метилювання/делецій у групі хворих на аденокарциноми з високим ризиком прогресування та хворих на ДГПЗ і аденокарциноми з низьким і середнім ризиком прогресування пухлинного процесу

Ген/локус	Частота метилювання/делецій, %		р-значення
	Аденокарциноми з Гл.>7	Аденокарциноми з Гл.≤7 та ДГПЗ	
0	1	2	3
<i>LOC440944/SETD5</i>	100 (4/4)	10 (3/29)	< 0,001
<i>OSBPL10/ZNF860</i>	100 (4/4)	7 (2/29)	< 0,001
<i>CLCN2</i>	100 (4/4)	7 (2/29)	< 0,001
<i>PRSS42/MYL3</i>	100 (4/4)	0 (0/29)	< 0,001
<i>VHL</i>	75 (3/4)	0 (0/29)	< 0,001
<i>BBX</i>	100 (4/4)	17 (5/29)	0,003
<i>LMCD1</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005
<i>СМТМ6</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005
<i>FAM19A4</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005

Примітка: 1. ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози. 2. Гл.- сума за шкалою Глісона.

Він входить до родини оксистерол-зв'язуючих протеїнів, які підтримують баланс холестеролу в клітині (327). Ген *ZNF860* (3p23) кодує протеїн “цинкових пальців” 860, функції якого ще мало вивчені (328). Ген *CLCN2* (3q27-q28) кодує протеїн каналів йонів хлору два. Експресія цього протеїна асоційована з ламеллоподіями та інвазивністю в гліомах (329). Ген *PRSS42* (*TESSP2*) (3p21.31) кодує серинову протеазу 42 (330) з невідомою роллю в онкогенезі. Ген *MYL3* (3p21.3-p21.2) кодує легкий ланцюг міозину три (331). Дані про участь цього гену в онкогенезі відсутні. Ген *VHL* (3p25.3) кодує протеїн однойменного синдрому Хіппеля-Ландау (332). В карциномах нирок часто відбуваються делеції цього гену, а також він здатен інгібувати розвиток пухлин (333). Ген *BBX* (3q13.1) кодує гомолог протеїна “боббі сокс” дрозофіли (*bobby sox homolog*), що є транскрипційним фактором (334). Роль його в канцерогенезі ще невідома. Ген *LMCD1* (3p26-p24) кодує LIM та збагачені цистеїном домени протеїну “цинкових пальців” (335). Цей ген є потенційним онкогеном у пухлинах печінки (336). Ген *СМТМ6* (3p22.3) кодує SKLF подібний MARVEL

трансмембранний домен 6 (337), проте його функція ще невідома. Ген *FAM19A4* (3p14.1) кодує хемокіно-подібний протеїн ТАФА4 (338). Метилування цього гена є ефективним маркером карцином шийки матки та цервікальних інтраепітеліальних неоплазій високого ступеню ризику (339).

Порівнюючи між собою зразки ДГПЗ та аденокарцином з низьким ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона, яка дорівнювала семи чи була менше семи) було знайдено шість генів зі статистично значущою різницею у частоті делецій чи метилування. Вони наведені в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9.

Зіставлення частоти метилування/делецій у хворих на ДГПЗ та аденокарциноми з низьким та середнім ризиком прогресування пухлинного процесу

Ген	Частота метилування/делецій, %		р-значення
	ДГПЗ	Аденокарциноми з Гл. ≤ 7	
<i>CAND2</i>	47 (7/15)	0 (0/14)	0,006
<i>GATA2</i>	20 (3/15)	71 (10/14)	0,009
<i>FAM19A4</i>	40 (6/15)	0 (0/14)	0,017
<i>KY</i>	60 (9/15)	14 (2/14)	0,021
<i>ALDH1L1</i>	33 (5/15)	79 (11/14)	0,025
<i>MAP4</i>	33 (5/15)	0 (0/14)	0,042

Примітка: 1. ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози.

3. Гл.- сума за шкалою Глісона.

Ген *GATA2* (3q21.3) кодує GATA зв'язуючий протеїн два, що є транскрипційним фактором (340). Було показано його участь у сигналінгу рецептора андрогенів (341). Ген *MAP4* (3p21) кодує протеїн чотири, асоційований з мікротрубочками, який стабілізує їх та контролює їхні зміни при мітозі (342).

Варто відзначити, що зміни генів *CAND2*, *KY*, *MAP4* були вперше показані в онкогенезі пухлин передміхурової залози.

Таким чином, отримані результати після гібридизації NotI-мікрочипів підтверджують істотний вплив генетичних та епігенетичних змін на

формування пухлин передміхурової залози. Вперше на вибірці клінічних зразків з української популяції показані делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми у більше ніж в 30% досліджуваних зразків.

До того ж було виявлено 14 генів/локусів із статистично значущою різницею у рівнях метилування чи делецій серед груп аденокарцином із низьким та високим ступенем ризику до прогресування та групи ДГПЗ. Подальше вивчення сигнальних шляхів, до яких залучені ці гени становить великий інтерес для розкриття механізмів переходу пухлин до гормонорезистентного типу.

3.5.2. Визначення експресії генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*. Оскільки технологія NotI-мікрочипів дозволяє виявляти як генетичні, так і епігенетичні зміни, необхідна подальша валідація отриманих результатів іншими методами. Як було зазначено вище, генетичні та епігенетичні зміни здатні впливати на рівні експресії генів. Отже, одним із варіантів валідації показаних нами змін генів третьої хромосоми є визначення рівня експресії.

Для цього було вибірково обрано три гени (*BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*) серед тих, що мали найбільший відсоток делецій/метилування, знайдені гібридизацією на NotI-мікрочипах. Так, нами було виявлено делеції/метилування гена *BHLHE40* у 80% зразків ДГПЗ, 79% зразків аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, а також у 100% зразків з групи аденокарцином із сумою за шкалою Глісона більше семи (додаток Е, таблиця Е.1). Ген *BHLHE40* кодує транскрипційний фактор родини «спіраль-петля-спіраль» (343). Цей ген є потенційним кандидатом в гени-супресори росту пухлин (344). Для гена *BCL6* ми показали наявність делецій/метилування в 73% зразків ДГПЗ, 79% зразків аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, а також у 100% зразків з групи аденокарцином із сумою за шкалою Глісона більше семи (додаток Е, таблиця Е.1). Ген *BCL6* також кодує протеїн В - клітин лімфоцитів/ лімфоми шість (345). Цей ген є протоонкогеном при різних типах

лімфом (346,347). Хоча він здатен інгібувати ріст медулобластом (348). Зважаючи на неоднозначний вплив цього гена на різні типи пухлин, важливим є вивчити роль цього гена при РПЗ. Для гена *ITGA9* нами було продемонстровано наявність делецій/метилування в 60% зразків ДГПЗ, 71% зразків аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, а також у 100% зразків з групи аденокарцином із сумою за шкалою Глісона більше семи (додаток Е, таблиця Е.1). Цей ген кодує субодиницю інтегрину дев'ять альфа (349). У пухлинах молочної залози було виявлено аберантну експресію цього гена (350).

Рівні експресії відібраних генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* визначали методом к-ЗТ-ПЛР. Для цього було використано 11 зразків аденокарцином передміхурової залози із сумою за шкалою Глісона від чотирьох до дев'яти.

Було виявлено зниження рівнів експресії усіх трьох досліджуваних генів в середньому до 3-х разів у переважній більшості зразків аденокарцином порівняно до контрольних тканин передміхурової залози (рис. 3.4).

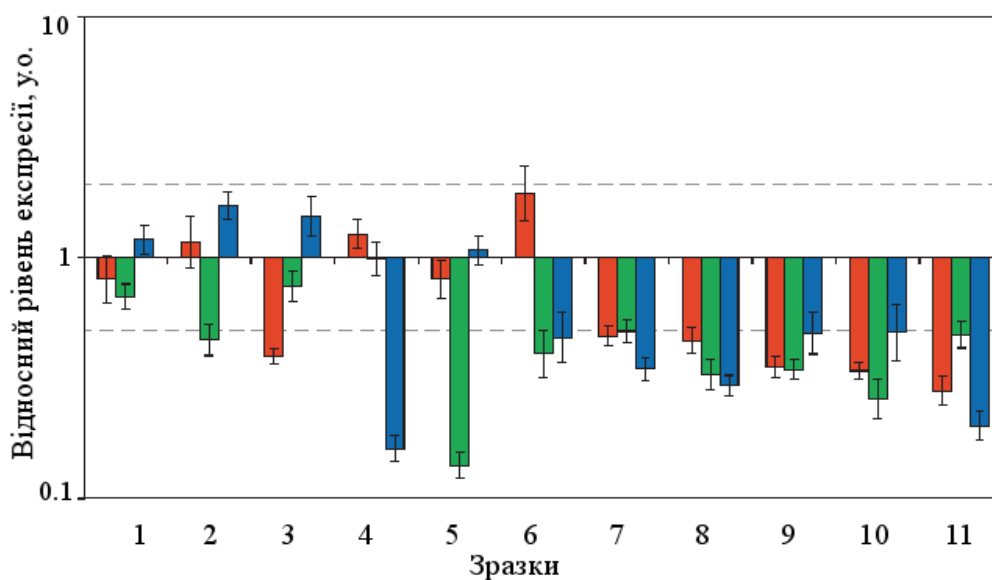


Рис 3.4 Рівні відносної експресії генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* по відношенню до референсного гена *GAPDH*. Червоним кольором показані рівні відносної експресії гена *BHLHE40*, зеленим кольором – для гена *BCL6* та синім кольором – для гена *ITGA9*. Сірим штрих-пунктиром позначено інтервал змін експресії у два рази

Так, для кожного з генів *BHLHE40* та *ITGA9* було показано зниження рівня експресії в 54,5% зразків. Для гена *BCL6* було продемонстровано зниження рівня експресії в 63,6% зразків.

Таким чином, показані нами за допомогою гібридизації на NotI-мікрочипах делеції/метилування генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* були валідовані за допомогою к-ЗТ-ПЛР. Отже NotI-мікрочипи є інформативним методом для пошуку генетичних/епігенетичних змін.

3.5.3. Визначення статусу метилування генів *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*, *TESSP2*. Для валідації результатів, отриманих гібридизацією на NotI-мікрочипах було вибірково обрано чотири гени з делеціями/ метилуванням, для перевірки методом бісульфітного секвенування: *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*, *TESSP2*. За нашими даними ген *FGF12* зазнає метилування чи делеції від 25% у групі аденокарцином із сумою за шкалою Глісона більше семи до 64% у групі аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи (додаток Е, таблиця Е.1). Ген *FGF12* кодує фактор росту фібробластів 12 та входить до родини факторів росту фібробластів (FGF), яка залучена до контролю багатьох процесів: ембріональний розвиток, зростання клітин, а також інвазивність та зростання пухлинних клітин. Було показано, що *FGF12* є метильованим у пухлинах молочної залози та товстої кишки (351). Втім, з іншого боку, було також виявлено підвищені рівні його експресії в плоскоклітинній карциномі легені (352). Для гена *GATA2* в нашому дослідженні було знайдено метилування чи делеції від 20% у групі ДГПЗ до 100% у групі аденокарцином із сумою за шкалою Глісона більше семи (додаток Е, таблиця Е.1). До того ж нами було виявлено, що різниця у частотах метилування/делецій цього гена між групою аденокарцином з сумою за шкалою Глісона більше семи та групах ДГПЗ і аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, є статистично значущою (таблиця 3.9). Ген *GATA2* відіграє важливу роль у прогресуванні РПЗ до метастазуючого, стійкого до кастрації типу. Втім, за даними літератури при

розвитку РПЗ відбувається підвищення рівня експресії цього гена (353). Для гена *LMCD1* в нашій роботі були знайдені статистично значущі відмінності у частотах метилювання/делеції між групою аденокарцином з сумою за шкалою Глісона більше семи та групами ДГПЗ і аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи (таблиця 3.8). Залученість цього гена до онкогенезу передміхурової залози в нашій роботі показана вперше, отже потребує валідації. Таким чином, вивчення генів *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1* у пухлинах передміхурової залози потребує подальших досліджень для встановлення їх ролі у формуванні та розвитку РПЗ.

Для гена *TESSP2* в нашій роботі частота метилювання чи делецій у була низькою – 12%. Отже, цей ген було використано в якості негативного контролю метилювання/делецій.

Було відібрано 12 зразків аденокарцином передміхурової залози ($n = 12$, сума за шкалою Глісона в діапазоні від чотирьох до дев'яти) з генетичними чи епігенетичними змінами. На рис. 3.5. представлені результати для зразка з сумою за шкалою Глісона, що дорівнює дев'яти.

Ампліфікований та клонований регіон промотора гена *FGF12* містив 34 CG-динуклеотидні пари, включаючи два сайти рестрикції NotI. Метилювання NotI-сайта було знайдено в шести з 11 досліджуваних клонів (55%) та асоційовано з переважним метилюванням секвенованого регіону. Інші 11 секвенованих зразків показали від 40 до 80% метилювання NotI-сайта. Високий ступінь метилювання зразків (30-70%) був знайдений також для генів *GATA2* та *LMCD1*. В той час як для гена *TESSP2* було майже не знайдено метилювання (менше 10%).



Рис. 3.5 Результати бісульфітного секвенування гену *FGF12* у зразку аденокарциноми передміхурової залози з сумою за шкалою Глісона, що дорівнює дев'яти: *a* - зображено промоторний регіон гену *FGF12*, що було ампліфіковано та клоновано. Пару праймерів відмічено жирним шрифтом з курсивом. Тридцять чотири пари CG-динуклеотидів помічено сірим кольором, сайт рестрикції *NotI* підкреслено; *б* - сірим кольором позначено метильовані CG-динуклеотиди; білим — неметильовані CG-динуклеотиди; хрестиками позначено відсутність даних в 11 клонах. CG-динуклеотиди, в яких знаходиться сайт рестрикції *NotI* (сім та вісім) підкреслено та виділено жирним

Отримані результати підтверджують дані гібридизації на *NotI*-мікрочипі та вказують на епігенетичну регуляцію експресії генів *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*.

Таким чином, було досліджено генетичні та епігенетичні зміни 180 генів/локусів 3-ї хромосоми людини у зразках пухлин передміхурової залози

різних гістологічних типів. Наявність змін було показано для 88 генів/локусів для більше ніж 10% пухлин. Вперше на вибірці клінічних зразків з української популяції показані делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *BHLHE40*, *ROPNI/KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GORASP1/TTC21A*, *FSTL1*, *ABHD5/C3orf77*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *NEK11*, *FBLN2*, *SOX2*, *MINA*, *CHCHD6*, *WNT7A*, *LOC285375*, *FGF12*, *NKIRAS1/RPL15*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *RPL32/IQSEC1*, *C3orf46/CHCHD6*, *RRP9/PARP3*, *PPM1M*, *KBTBD8*, *FGD5*, *CMTM8*, *NBEAL2*, *TMEM45A*, *LRRC3B*, *PDZRN3*, *USP19*, *EPHB1*, *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3*) у більше ніж в 30% досліджуваних зразків.

Виділено ряд генів зі статистично значущими відмінностями між різними за агресивністю групами пухлин передміхурової залози, які є потенційними пухлино-асоційованими генами та потребують перевірки на розширеній вибірці. Так, було виявлено статистично значущі відмінності у частотах метилування/делецій між групою аденокарцином з сумою за шкалою Глісона більше семи та групах ДГПЗ і аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, для дев'яти генів/локусів (*LOC440944/ SETD5*, *OSBPL10/ ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS2/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*). До того ж було показано статистично значущі відмінності у частотах метилування/делецій між групою ДГПЗ та аденокарцином з низьким ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи) для шести генів (*FAM19A4*, *GATA2*, *CAND2*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*). Результати гібридизації на *NotI*-мікрочипі вибірково підтверджено за допомогою бісульфитного секвенування для генів *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*.

Підсумки:

1. За допомогою гібридизації на *NotI*-мікрочипах виявлено 1163 випадки гетерозиготних та 461 випадки гомозиготних делецій/метилування, а також ампліфікації/деметилування (24 випадки), серед яких 50 генів/локусів із

делеціями/метилуванням у більше ніж в 30% досліджуваних зразків.

2. Виявлено 14 генів/локусів зі статистично значущою різницею ($p < 0,05$) у частоті метилування/делецій серед різних типів пухлин передміхурової залози (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *VBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*, *CAND2*, *GATA2*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*), які можуть бути використані для створення панелей діагностичних біомаркерів для розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин, чи як мішені для терапії різних типів пухлин передміхурової залози.

3. Дані NotI-мікрочипів підтверджені методами к-3T-ПЛІР та бісульфітного секвенування: виявлено зниження рівнів експресії генів *BHLHE40*, *ITGA9*, *BCL6* у досліджуваних зразках аденокарцином, а також наявність метилування CG – динуклеотидів NotI-сайта у промоторі генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1*.

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, et al. Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis. *Dis Markers*. 2015; 2015: 241301.
2. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Molecular subtyping of prostate tumors. *Матеріали XI міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*; 2015 квіт. 20-23; Львів. 2015, с. 396.
3. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. *EACR Conference Series, materials of Meeting in Cancer Genomics*; 2015 28 June- 1 July; Cambridge, UK.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рак передміхурової залози є однією з найпоширеніших нозологічних форм раку у чоловіків у світі. До того ж він є однією з головних причин смертності у чоловіків зі злоякісними пухлинами (1,2). Зазвичай, його діагностують у чоловіків старше 50 років і збільшення кількості діагностованих випадків корелює з віком пацієнтів (354,355). Окрім віку чоловіків найбільш суттєвим фактором ризику РПЗ є сімейна історія, пов'язана із цим захворюванням (356,357). Тобто виділено ряд генів та локусів, мутації яких при успадкуванні можуть викликати розвиток РПЗ (358). За даними публікацій Муссі L.A. зі співавт. (359) та Hjelmborg J.V. зі співавт. (360) спадковий тип РПЗ у скандинавській популяції складає 58%. Але мутації вже відомих генів, що є характерними для спадкового РПЗ, пояснюють близько 30% випадків успадкованого РПЗ (361). Зважаючи на досить високий вплив генетичного фактора на виникнення РПЗ та неповну інформацію про всі генетичні чинники цього захворювання, важливим є вивчення генетичних змін та пошук нових пухлино-асоційованих генів, задіяних у формуванні та розвитку пухлин передміхурової залози.

До того ж за даними геномних досліджень для РПЗ було знайдено значно меншу кількість мутацій у соматичних клітинах ніж для інших видів раку, що порушує питання про важливість епігенетичної регуляції при виникненні та прогресії РПЗ (118). Зміни у рівнях метилювання були знайдені в інтраепітеліальних неоплазіях передміхурової залози та доброякісних гіперплазіях передміхурової залози, а також в умовно-нормальних, прилеглих до пухлини, тканинах, що підтверджує важливість дослідження епігеному для пошуку маркерів ранньої та диференційної діагностики пухлин передміхурової

залози (9). Групою дослідників з вивчення геному раку (TCGA) було виявлено, що молекулярні підтипи пухлин передміхурової залози, які базуються на різних мутаціях, мають різні рівні метилювання (10). Все це вказує на важливість вивчення епігенетичних змін, а саме метилювання у пухлинах передміхурової залози.

Одним з завдань нашої роботи було виявлення генетичних та епігенетичних змін у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози за допомогою NotI-мікрочипів. Об'єктом дослідження генетичних та епігенетичних змін в цій роботі було обрано третю хромосому людини, оскільки за даними, які були раніше отримані в нашому відділі (362), а також іншими дослідниками (181,183) припускається, що порушення 3-ї хромосоми людини пов'язані з процесами виникнення епітеліальних пухлин, і в тому числі РПЗ.

Метод гібридизації на Not-I мікрочипах дозволяє детектувати як генетичні (делеції чи ампліфікації), так і епігенетичні (метилювання чи деметилювання) зміни. За допомогою цього метода на клінічних зразках пухлин передміхурової залози нами було виявлено зміни у 88 генах/ локусах третьої хромосоми людини. Отримані нами результати з наявності делецій/метилювання для 50 генів/локусів (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *BHLHE40*, *ROPN1/KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GORASP1/TTC21A*, *FSTL1*, *ABHD5/C3orf77*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *NEK11*, *FBLN2*, *SOX2*, *MINA*, *CHCHD6*, *WNT7A*, *LOC285375*, *FGF12*, *NKIRAS1/RPL15*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *RPL32/IQSEC1*, *C3orf46/CHCHD6*, *RRP9/PARP3*, *PPM1M*, *KBTBD8*, *FGD5*, *CMTM8*, *NBEAL2*, *TMEM45A*, *LRRC3B*, *PDZRN3*, *USP19*, *EPHB1*, *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3*) були перевірені з використанням відкритих баз даних cBioPortal (320) та MethHC (321). Для всіх генів/локусів були підтверджені виявлені нами зміни. Розглянемо деякі з цих генів/локусів.

Такаяма К. зі співавт. показали зниження рівня експресії протеїна FOXP1 у клінічних зразках РПЗ порівняно до нормальних тканин

передміхурової залози та виявили кореляцію між зниженням рівня *FOXP1* із погіршенням прогнозу виживаності таких пацієнтів (363). Taylor B.S. зі співавт. виявили делецію ділянки 3p14, до якої входить ген *FOXP1*. Ця делеція була асоційована зі злитим транскриптом *TMPRSS2-ERG* (62).

В нашій роботі було виявлено наявність делецій/метилування гена *FOXP1* у зразках ДГПЗ та аденокарцином передміхурової залози із різною сумою за шкалою Глісона (додаток Е, таблиця Е.1).

Отже, наші дані та дані Taylor B.S та Takayama K. підтверджують, що ген *FOXP1* є потенційним супресором росту пухлин передміхурової залози та може бути маркером при розвитку РПЗ.

Залученість гена *MANF* до онкогенезу передміхурової залози була показана Shridhar R. зі співавт. (364). Вони виявили мутацію $ATG_{50} \rightarrow AGG$ цього гена в різних видах пухлин, в тому числі і зразках РПЗ. Показані нами метилування/делеції гена *MANF* у клінічних зразках пухлин передміхурової залози показані вперше на вибірці зразків пацієнтів з української популяції (додаток Е, таблиця Е.1). Можливо, що ці результати та результати повідомлення Shridhar R. вказують на те, що ген *MANF* бере участь у формуванні пухлин передміхурової залози. Хоча наскільки важлива його роль у цьому процесі потребує подальших досліджень.

Для гена *GATA2* Vidal S. зі співавт. показали його участь у прогресуванні РПЗ до агресивного метастазуючого типу (365). У резистентних до доксетакселу клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози DU145-DR та 22Rv1-DR було виявлено підвищені рівні експресії цього гена як на рівні мРНК так і на рівні білка порівняно до менш агресивних клітинних ліній DU145 та 22Rv1. До того ж, було виявлено підвищення рівня експресії протеїна *GATA2* в агресивних зразках РПЗ порівняно до первинного локалізованого раку.

Наші дані по наявності метилування/делецій гена *GATA2* у зразках пухлин передміхурової залози (додаток Е, таблиця Е.1), можливо, відображають гетерогенність пухлин передміхурової залози, коли існують

субпопуляції пухлинних клітин з різними характеристиками. До того ж, ми проводили вивчення генетичних/епігенетичних змін у зразках пухлин порівняно до умовно-нормальних зразків із запаленням, в той час як в роботі (365) було використано порівняння до первинних пухлин передміхурової залози.

Таким чином, ген *GATA2* може бути диференційно регульованим порівняно до нормальних тканин передміхурової залози та тканин аденокарцином.

Результати дослідження Krupenko S. A. зі співавт. показали, що ген *ALDH1L1* є потенційним геном, супресором росту пухлин (366). Так, на клітинній лінії аденокарциноми передміхурової залози PPC-1 з високим потенціалом до метастазування, було показано здатність цього гена інгібувати проліферацію клітин. До того ж було виявлено метилювання промоторної ділянки гена *ALDH1L1* у клітинних лініях A549, HepG2 та HCT116 (367).

Знайдені в нашій роботі генетичні/епігенетичні зміни гена *ALDH1L1*, які представлені делеціями чи метилюванням (додаток Е, таблиця Е.1), узгоджуються із даними літератури та підтверджують пухлино-супресорні властивості цього гена. Зниження експресії цього гена за рахунок можливого метилювання є одним з механізмом, що як ми припускаємо, стимулює онкогенез пухлин передміхурової залози.

Для гена *EPHB3* Astin J. W. зі співавт. виявили, що підвищення рівня його експресії у клітинній лінії PC3 є необхідним для міграції епітеліальних клітин у напрямку фіброblastів та клітин строми (368).

Показані нами зміни (метилювання чи делеції) цього гена у зразках пухлин передміхурової залози (додаток Е, таблиця Е.1) раніше не були встановлені в українській популяції.

Наші дані з наявності генетичних/епігенетичних змін у різних типах пухлин передміхурової залози підтверджують участь генів 3-ї хромосоми у РПЗ. Це зумовлює необхідність її подальшого вивчення для розкриття ролі цієї хромосоми у формуванні та прогресуванні РПЗ.

Субтипуння пухлин передміхурової залози РПЗ є вкрай важливим, оскільки цей тип раку найчастіше має мультифокальне походження та гетерогенний характер, що дуже ускладнює його діагностування та прогноз (369,370). Більша частина пухлин передміхурової залози є латентними та не дають метастазів. Хоча близько 10% пухлин після проведення андрогенної депривації можуть ставати агресивними та утворювати метастази (40). Набуття агресивності пухлинами передміхурової залози проходить за участю сигнального шляху рецептора андрогенів. В результаті вони переходять від гормоночутливого до гормонорезистентного типу. Останній характеризується високим ступенем малігнізації (371).

Для раннього виявлення таких пухлин, а також вибору правильної тактики лікування необхідно знайти відповідні маркери. Після аналізу частот делецій чи метилювання, які були детектовані за допомогою Not-I мікрочипів, нами було виявлено дев'ять генів/локусів (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*) зі статистично достовірною різницею у цих частотах між групами аденокарцином з великим ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона більше семи) і групою зразків, що об'єднує аденокарциноми з низьким та середнім ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона менше або дорівнює семи) та ДГПЗ (таблиця 3.8). Також було виявлено шість генів/локусів (*CAND2*, *GATA2*, *FAM19A4*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*) зі статистично достовірною різницею у частотах делецій/метилювання між групою ДГПЗ та аденокарцином з низьким ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона, яка дорівнює або менше семи) (таблиця 3.9). Всі ці гени/локуси можуть бути потенційними маркерами для диференційної діагностики різних стадій прогресування пухлин передміхурової залози та потребують подальших досліджень іншими методами.

Taylor B.S. зі співавт. у своїй роботі використовуючи метод порівняльної геномної гібридизації виявили різні підгрупи серед зразків пухлин пердміхурової залози, які відрізнялися за частотами кількості копій генів (70). Було виділено шість кластерів, серед яких перші чотири мали невелике число

змін кількості копій генів (порівняно до інших кластерів) та відповідали первинним пухлинам передміхурової залози. Останні два кластери мали значне число змін кількості копій генів та відповідали більшості досліджуваних метастазуючих зразків РПЗ. Втім, для кожного серед цих кластерів було показано окремий вплив на прогноз виживаності пацієнтів. Наприклад, серед перших чотирьох кластерів найбільш позитивний прогноз мав другий, а серед останніх двох п'ятий мав найбільш негативний прогноз для пацієнтів.

Завдяки новітнім технологіям з використанням секвенування наступного покоління стало можливим виявлення нових молекулярних підтипів РПЗ. Так, групою вчених з Cancer Genome Atlas Research Network було охарактеризовано сім молекулярних підтипів РПЗ, які засновані на утворенні певних злитих транскриптів (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FLI1*) або мутацій певних генів (*SPOP*, *FOXA1*, *IDH1*) (10). В той же час для 26% досліджуваних зразків не було знайдено вказаних вище ключових порушень в геномах РПЗ, за якими їх можна було віднести до якогось з певних молекулярних підтипів.

Цією ж групою після вивчення метилювання ДНК також було виявлено чотири підтипи РПЗ, які відрізняються за ступенем метилювання. При накладанні цих груп на молекулярні підтипи було відмічено що всередині молекулярних підтипів є своє розділення за рівнем метилювання. Так, приблизно дві третини із групи аденокарцином, які були позитивні на злитий транскрипт із *ERG*, мали середній рівень метилювання та входили в третій підтип по метилюванню. В той час як одна третина *ERG* позитивних зразків аденокарцином була гіперметилюваною та входила до першого підтипу (10).

Таким чином, значний рівень генетичної та епігенетичної гетерогенності пухлин передміхурової залози потребує всеохоплюючого дослідження із встановлення всіх можливих молекулярних підтипів пухлин. Виявлені в нашій роботі гени зі статистично значущою різницею у рівнях метилювання/делецій між різними групами пухлин передміхурової залози можуть бути використані для подібного субтипуювання.

Ще одним з підходів для вирішення проблеми пошуку маркерів розвитку

РПЗ та стратифікації пухлин передміхурової залози є вивчення відмінностей у рівнях експресії генів між їх агресивними (гормонорезистентними) та неагресивними (гормоночутливими) типами. Одним з напрямків таких досліджень є використання модельних клітинних ліній РПЗ.

В нашій роботі було виконано транскрипційний профайлінг клітинних ліній аденокарцином передміхурової залози із різним потенціалом до інвазивності та метастазування (LNCaP — гормоночутлива клітинна лінія, DU145, PC3 — гормонорезистентні клітинні лінії), а також клітинної лінії нормального епітелію передміхурової залози дорослої людини PNT2. Використання модельної клітинної лінії нормального епітелію є важливим для вивчення не тільки прогресії РПЗ, але і його утворення. Нами було виявлено зміни рівнів експресії 29 генів у клітинній лінії LNCaP, 20 генів – у DU145 та для 16 генів – у PC3, що вказує на їх можливу залученість до процесів онкогенеза передміхурової залози (таблиця 3.2).

Серед генів зі змінами рівнів експресії ми відмітили зниження рівня відносної експресії гена *WNT7A* у клітинних лініях LNCaP та DU145 порівняно до лінії PNT2. Це узгоджується із нашими даними про знайдені делеції/метилування у клінічних зразках передміхурової залози, отриманих за допомогою гібридизації на NotI-мікрочипах (додаток E, таблиця E.1). Це дає змогу зробити припущення про інгібування експресії цього гену при РПЗ. Ген *WNT7A* за даними літератури має як підвищені рівні відносної експресії в пухлинах яєчників (372), матки (373), так і знижені рівні експресії в пухлинах світлоклітинної карциноми нирок (230), карциномі легень (374) та підшлункової залози (375). Даних про зміни цього гена у пухлинах передміхурової залози ми не знайшли.

Отже, отримані нами дані зі зниження рівня експресії гена *WNT7A* у клітинних лініях, а також виявлені делеції/метилування у клінічних зразках пухлин передміхурової залози можуть вказувати на залученість цього гена до формування та прогресії РПЗ.

Проаналізувавши гени зі змінами рівнів відносної експресії (таблиця 3.2)

між гормоночутливими та гормонорезистентними клітинними лініями нами було відмічено, що одними з основних показників, що піддаються впливу протягом переходу від неагресивних до агресивних типів РПЗ, змодельованому на клітинних лініях, є клітинна адгезія, інвазивність та метастазування.

Singh A. P. зі співавт. провели транскрипційний профайлінг гормоночутливої клітинної лінії LNCaP-C33 та гормонорезистентної клітинної лінії LNCaP-C81. Знайдені гени зі змінами рівнів експресії у клітинній лінії LNCaP-C81 порівняно з лінією LNCaP-C33 після аналізу було віднесено до сигнальних шляхів, пов'язаних з апоптозом, а також із такими, що стимулюють зростання пухлин (376).

Li T.-H. та співавт. дослідили рівні експресії генів у клітинних лініях LNCaP із додаванням дигідротестостерону та без нього, а також із блокуванням AR для виявлення додаткових сигнальних шляхів, які можуть брати участь у переході до андроген-нечутливого типу РПЗ. Було виявлено 302 гени, які регулюються як депривацією андрогенів, так і інгібуванням протеїну AR. Також були виявлено унікальні групи генів, що регулюються окремими зазначеними вище механізмами. Хоча точних механізмів сигналіngu встановлено не було, дослідники наголошують на залученні інших сигнальних шляхів, окрім сигнального шляху AR (377).

Оскільки нашим завданням був пошук диференційно експресованих генів серед всіх генів зі змінами у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози порівняно до лінії нормального епітелію (таблиця 3.2) ми відібрали такі, експресія яких в андроген-нечутливих клітинних лініях з більш високим потенціалом до інвазивності та метастазування у дослідних тварин (DU145, PC3) відрізняється від експресії в гормоночутливій клітинній лінії з меншим потенціалом до метастазування (LNCaP). Відбір проводили з максимальним залученням генів з різних сигнальних шляхів, щоб отримати комплексну інформацію про процеси, що відбуваються у пухлинах передміхурової залози. Всього було відібрано 14 диференційно експресованих генів (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL1RL1*, *CXCL1*, *CXCL2*, *P16*, *CCNE1*, *HOXA13*, *MME*, *SERPINE2b*, *TAGLN*,

EFNA5, *GLCE*) (таблиця 3.3) між гормоночутливою та гормонорезистентними клітинними лініями, як потенційні асоційовані із РПЗ гени. Вони можуть бути використані для подальшої розробки діагностичних панелей інвазивних та метастазуючих пухлин передміхурової залози.

Дослідження механізмів розвитку РПЗ включає в себе не тільки широкомасштабний скринінг змін, але і більш детальне вивчення впливу окремих генів на процеси онкогенезу.

Для цієї мети було обрано ген *GLCE* для встановлення його впливу на експресію генів, пов'язаних з онкогенезом, у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів. На модельних клітинних лініях LNCaP та PC3 нами показано, що ектопічна експресія цього гена призводить до змін експресії генів ангиогенезу, а також розбалансуванню експресії генів інвазивності та метастазування (рис 3.2). Причому зміни експресії відбувалися в залежності від типу клітинних ліній. Така різниця, можливо, відображає різні механізми регуляції, які опосередковує ген *GLCE* в різних типах пухлин передміхурової залози. Підтвердженням цього можуть бути дані Prudnikova T.Y. зі співавт. (84). Так, вони встановили гетерогенні рівні експресії цього гена як у клітинних лініях, так і в клінічних зразках пухлин передміхурової залози.

Виявлений нами вплив ектопічної експресії гена *GLCE* на експресію генів ангиогенезу та інвазивності і метастазування підтверджує гіпотезу про зв'язок генів адгезії з процесами ангиогенезу (378), а також інвазивністю і метастазуванням пухлин (379).

Calaluce R. зі співавт. в своїй роботі вивчали вплив гена *LAMB3A*, який кодує ізоформу ланцюга бета-три А ламініну п'ятого. Ламінін п'ятий формує філаменти, які є важливими компонентами гемідесмосом, що забезпечують зв'язок між епітеліальними клітинами та клітинами строми (380). Вони показали, що трансфекція клітинної лінії LNCaP вектором, що містить послідовність гена *LAMB3A*, викликає підвищення міграції клітин. До того ж такі клітини викликали утворення більших пухлин на мишачих моделях (381).

Механізми переходу РПЗ до андроген-нечутливого типу на даний момент є ще недостатньо вивченими, одним з завдань нашої роботи було вивчення рівнів експресії генів між гормоночутливою клітинною лінією LNCaP та гормонорезистентною клітинною лінією PC3 для пошуку генів, асоційованих з інвазивністю та метастазуванням пухлин передміхурової залози людини.

Ми виявили 36 генів зі змінами рівнів відносної експресії у клітинній лінії PC3 порівняно до LNCaP (таблиця 3.4). Їх аналіз дозволив відзначити зниження експресії генів, що здатні інгібувати зростання пухлин (*TP53*, *BRCA1*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNCG*).

Інгібування генів, супресорів пухлинного росту є одним з головних механізмів в утворенні пухлин. Довгий час ці гени не розглядалися в якості терапевтичних мішеней, втім, на даний момент завдяки появі нових методів вони також можуть бути цінними для терапії пухлин (382).

До того ж, серед генів, які відповідають за апоптоз та клітинне старіння нами було виявлено підвищення експресії як анти-апоптичних генів (*BCL2*, *BCL2L1*) так і про-апоптотичних генів (*BAX*, *CASP8*). Також відмічено порушення регуляції системи ангіогенеза: підвищення експресії як про-ангіогенних (*VEGFA*) так і анти-ангіогенних (*THBS1*) генів, а також генів інвазивності (*MET*, *MMP1*).

Вищезазначені дані, а також знайдене в нашій роботі зниження рівнів експресії генів (*S100A4*, *TWIST1*), які опосередковують метастази, відображають загальне розбалансування процесів в гормонорезистентних пухлинах передміхурової залози.

Balaji K. зі співавт. проводили порівняння гормоночутливої клітинної лінії LNCaP з гормонорезистентною лінією C4-2 за допомогою кДНК мікрочипів та виявили 4480 генів зі змінами рівня експресії серед досліджуваних 7075 (383). Серед виявлених ними генів з найбільш підвищеними рівнями експресії (більше п'яти разів) були, наприклад, *DPP4* (дипептидил пептидаза чотири), та *ANGPT1* (ангіопоетин один). Серед генів з найбільш зниженими рівнями експресії (більше п'яти разів) були: *USP9Y*

(убіквітин специфічна протеаза дев'ять, зв'язана з Y хромосоною), *PRKD1* (протеїнова кіназа D1). Дипептидил пептидаза чотири бере участь у взаємодіях клітина-міжклітинний матрикс, а також в метаболізмі цитокінів та факторів росту (384). Ангіопоетин є антагоністом ангіогенних факторів (385). Убіквітин специфічна протеаза дев'ять, зв'язана з Y хромосоною, була виявлена у складі злитого транскрипту з *TTTTY15* (специфічний для сім'яників транскрипт 15, зв'язаний з Y хромосоною) в популяції китайців. Наявність цього злитого транскрипту є прогностичним маркером РПЗ у зразках біопсій пацієнтів (386).

Отже, при прогресуванні до андроген-нечутливого РПЗ змінюють рівні експресії багато генів з різних сигнальних шляхів, одними з яких є клітинна адгезія, а також ангіогенез. А широкомасштабне дослідження рівнів експресії між гормоночутливими та гормонорезистентними пухлинами передміхурової залози надає можливість одночасного виявлення цих генів та є незамінним для пошуку пухлино-асоційованих генів, які можуть бути маркерами розвитку РПЗ.

Зважаючи на складність досліджуваних процесів сигналіngu, дані, отримані на клітинних лініях, потребують перевірки на клінічних зразках пухлин. Тому із попередньо знайдених диференційно експресованих генів (таблиця 3.2) та генів з найбільшими змінами між гормоночутливими та гормонорезистентними клітинними лініями (таблиця 3.5) було відібрано сім (*TGFB1, IL1B, FOS, EFNA5, TAGLN, PLAUI, EPDR1*) генів із різних сигнальних шляхів, які вважаються нами найбільш перспективними для подальшого дослідження з урахуванням результатів досліджень, представлених в базі даних PubMed (260).

Рівні відносної експресії цих генів було досліджено методом к-ЗТ-ПЛР у клінічних зразках ДГПЗ, аденокарцином та УНТ передміхурової залози. Було відмічено високі рівні дисперсії для значень рівнів відносної експресії генів в усіх досліджуваних групах, що можливо відображає високу гетерогенність не тільки РПЗ але також і ДГПЗ, та УНТ. Це може означати диференційне регулювання досліджуваних генів не тільки при різних патологічних станах, але і у різних індивідів. Також це може бути пояснено через різні

співвідношення епітеліальних клітин та клітин строми у зразках тканин, а також розвитком раку в індивідуальних зразках умовно-нормальних тканин, що впливає на рівні експресії цих генів у досліджуваних зразках.

Для підвищення точності визначення рівнів експресії генів, яка спричинена гетерогенністю співвідношень різних типів клітин Chen X. зі співавт. запропонували аналіз даних експресії методом кластерної-кореляції (387). Розроблений алгоритм аналізу дозволяє вивчати зразки пухлин із різними типами клітин. З використанням цього метода було ідентифіковано 324 гена, які є асоційованими з біохімічним рецидивом пухлин передміхурової залози. Серед цих генів 68 були пухлино-асоційованими, а 256 генів були асоційовані зі стромою. З цього набору цією групою також було розроблено класифікатор, який складався з семи генів (*PRAGD*, *PQBP1*, *HIST1H2BC*, *ALDH1A2*, *TRIM22*, *RBPMS*, *HSPB8*). При додаванні до цього класифікатора суми за шкалою Глісона точність цього тесту підвищилася з 71% до 83%.

Тому в експериментах із дослідження експресії важливо використовувати гістологічно перевірені тканини.

Після аналізу частот зразків зі змінами рівнів експресії генів, виражених у відносних кількостях по відношенню до референсного гена *TBP* нами було знайдено статистично значущу різницю у частотах зразків зі змінами між групами ДГПЗ, аденокарцином та УНТ для генів *FOS*, *EFNA5*, *IL1B* та *TGFBI* (таблиці 3.6, 3.7). Так, було відмічено, що в групі аденокарцином порівняно до групи ДГПЗ достовірно частіше зустрічалися зразки із підвищеним рівнем відносної експресії гена *FOS*. Схожу тенденцію спостерігали і для групи УНТ порівняно з ДГПЗ. До того ж було знайдено, що в групі аденокарцином із сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, порівняно до групи ДГПЗ, також достовірно частіше зустрічалися зразки із підвищеним рівнем відносної експресії гена *FOS*. Це дає змогу припустити, що цей ген активується в аденокарциномах на ранніх стадіях розвитку РПЗ. Ці результати не підтверджують дані, отримані на клітинних лініях (таблиця 3.4). Втім, підвищення рівня відносної експресії є більш очікуваним для цього гена,

оскільки як було зазначено вище, він кодує протоонкоген *FOS*, що є субодиницею фактора транскрипції AP-1 (299). Підвищення рівнів цього гена було знайдене у пухлинах яєчника та остеосаркомах (388,389). В той же час, ген *FOS* здатен інгібувати проліферацію клітин карциноми сечового міхура (390) та викликає апоптоз у клітинній лінії передміхурової залози PC3 (276). Отже роль цього гена в онкогенезі є неоднозначною та потребує подальших досліджень. Тенденція змін рівнів відносних кількостей для цього гена, яку було виявлено в нашій роботі у групі УНТ може бути викликана впливом пухлини на оточуючі тканини залози, а також сумішшю як нормальних так і пухлинних клітин у тканинах зразків УНТ.

Ефект «малігнізації краю», коли пухлина впливає на оточуючі її нормальні тканини був показаний для різних типів пухлин, включаючи пухлини легені (391), прямої кишки (392), молочної залози (393) та шкіри (394). Ранні генетичні чи епігенетичні зміни у тканинах пухлини можуть привести до клональної експансії пренеопластичних дочірніх клітин в певній ділянці пухлини. Подальші геномні зміни в деяких з цих клітин можуть сприяти до розвитку злоякісного фенотипу. Імовірно, популяція дочірніх клітин з ранніми генетичними змінами (без гістопатології) залишається в органі та спричиняє ефект «малігнізації краю» (395).

Naaland С.М. зі співавт. було виявлено 11 генів, рівні експресії яких були підвищені як у пухлинних клітинах, так і в прилеглих гістологічно нормальних клітинах передміхурової залози порівняно до нормальних клітин передміхурової залози. Одним з цих генів був *FOS* (396).

Отже, отримані в нашій роботі схожі тенденції з підвищення рівнів відносної експресії гена *FOS* для аденокарцином та УНТ підтверджують ефект «малігнізації краю» у пухлинах передміхурової залози.

В групі аденокарцином порівняно до групи ДГПЗ нами також було відмічено, що достовірно частіше зустрічалися зразки із підвищеним рівнем відносної експресії гена *EFNA5*. Такі ж зміни спостерігали і для групи УНТ порівняно з ДГПЗ. До того ж було знайдено, що в групі аденокарцином із

сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи, порівняно до групи ДГПЗ, також достовірно частіше зустрічалися зразки зі змінами рівня відносної експресії гена *EFNA5*. В нашій роботі ми показали зниження рівнів відносної експресії цього гена в клітинних лініях аденокарцином LNCaP та PC3 порівняно до лінії нормального епітелію (таблиця 3.2). Отже, отримані результати із порівняння частот зразків зі змінами експресії цього гена не підтверджують результати одержані на клітинних лініях. Хоча, при нормуванні у парних зразках аденокарцином-УНТ було отримано тенденцію зі зниженням рівня нормалізованої відносної експресії в 37,9% зразків аденокарцином. Втім, ці зміни не були достовірними.

Ген *EFNA5* є членом родини ефринів, що відіграють значну роль в клітинній адгезії (397). Групою Li J.J. було показано, що цей ген діє як супресор росту клітин гліоми, негативно регулюючи рецептор епідермального фактора росту (398). Залученість гена *EFNA5* до онкогенезу передміхурової залози, а саме інтрона POP8 була показана в роботі Romanuk T.L. зі співавт. Вони виявили знижений рівень експресії цього гену в гормонорезистентних клітинних лініях PC3 та DU145 порівняно до гормоночутливих ліній LNCaP, MDA-PCa-2B та 22Rv1 (399).

Отримані нами дані на клінічних зразках пухлин передміхурової залози можуть свідчити про активацію *EFNA5* асоційованого сигнального шляху в аденокарциномах, що призводить до подальших аберацій в клітинній адгезії (таблиці 3.6, 3.7).

В групі УНТ порівняно до групи ДГПЗ ми виявили, що достовірно частіше зустрічалися зразки із підвищеними рівнями відносної експресії гена *IL1B*. Така ж тенденція спостерігалася і в групі аденокарцином порівняно до ДГПЗ, але вона не була достовірною. На клітинних лініях в цій роботі було виявлено підвищення рівня відносної експресії цього гена в лініях LNCaP та PC3, та зниження в лінії DU145 порівняно до лінії нормального епітелію (таблиця 3.2). Отже, отримані результати на клінічних зразках тканин частково підтверджують дані, отримані для клітинних ліній, а саме - для лінії DU145.

Виявлена тенденція підвищених рівнів відносної експресії цього гена в УНТ може бути пояснена так само, як і у випадку гена *FOS*, впливом тканин пухлини на оточуючі нормальні тканини залози та підтверджує високий рівень генетичних та епігенетичних змін у клітинах передміхурової залози пацієнтів із РПЗ.

Ген *IL1B* кодує один із прозапальних інтерлейкінів, який, зазвичай, підвищений в виділеннях з передміхурової залози у хворих на хронічний простатит (400). Для цього гена в нашій роботі було також знайдено пряму кореляцію між підвищенням рівня відносної нормалізованої експресії цього гена в парних зразках аденокарцином із незначним підвищенням рівня ПСА в сироватці крові (не більше 20 нг/мл) пацієнтів. Оскільки такі рівні ПСА характерні для пацієнтів із локалізованим добре диференційованим РПЗ (315), то можливим поясненням може бути те, що запалення важливе тільки для ініціації цього захворювання, втім може залишатися і на пізніх стадіях розвитку. Отримані в нашій роботі результати можуть також вказувати на активацію сигнального шляху NF- κ B як в аденокарциномах, так і в УНТ, оскільки *IL1B* є активатором цього шляху (401).

У групі ДГПЗ порівняно до групи УНТ ми показали, що достовірно частіше зустрічалися зразки зі зниженим рівнем відносної експресії гена *TGFBI*. У групі аденокарцином достовірно частіше зустрічалися зразки зі змінами рівня відносної експресії (підвищені та знижені) порівняно до групи УНТ. В той же час в досліді на клітинних лініях в цій роботі було виявлено підвищення рівня відносної експресії цього гена в клітинній лінії PC3 порівняно до LNCaP (таблиця 3.4). Ген *TGFBI* грає протилежні ролі на різних стадіях розвитку пухлин передміхурової залози: діє як інгібітор росту в нормальних тканинах та на ранніх стадіях раку (402), але виступає в якості активатора процесів пухлинної трансформації на пізніх стадіях РПЗ (403).

Отже, отримані нами результати на клінічних зразках відображають можливе інгібування цього гена на початкових стадіях розвитку пухлин передміхурової залози.

Для гена *PLAU* в нашій роботі було знайдено достовірне зниження рівня відносної нормалізованої експресії в аденокарциномах порівняно до УНТ. Це підтверджує результати отримані на клітинних лініях LNCaP та PC3 порівняно до нормального епітелію передміхурової залози (таблиця 3.2). Втім, при порівнянні між собою рівнів експресії цього гена у клітинних лініях PC3 та LNCaP нами було виявлено підвищення рівня експресії у клітинній лінії PC3 (таблиця 3.2). Враховуючи отримані нами результати ген *PLAU* знає диференційної регуляції протягом розвитку пухлин передміхурової залози. Так, він є активованим на пізніх стадіях онкогенеза про що свідчать виявлені нами підвищені рівні експресії в клітинній лінії PC3 порівняно до LNCaP. Ці клітинні лінії є відповідно моделями для високоінвазивного та початкового РПЗ. В той час як на ранніх стадіях рівні гена *PLAU* є зниженими по відношенню до умовно-нормальних клітин передміхурової залози.

Нами було знайдено пряму кореляцію між рівнями експресій шести генів між собою, окрім гена *FOS*. Найбільший коефіцієнт кореляції $r=0,604$ було виявлено між генами *EFNA5* та *PLAU*. Ці гени задіяні в процесах клітинної адгезії та інвазивності відповідно. Адгезія між клітинами та між клітинами та міжклітинним матриксом зазнають змін протягом пухлинної трансформації, яка включає в себе підвищену здатність до міграції клітин, інвазивність та ангиогенез (404). Знайдена асоціація між змінами рівнів експресій цих генів відображає зв'язок між цими процесами та потребує подальшого вивчення цих генів для розкриття механізмів їх можливої взаємодії.

Отже, отримані на клінічних зразках тканин результати частково підтверджують дані, отримані на модельних клітинних лініях. В нашій роботі виявлені статистично значущі відмінності у частотах зразків зі змінами між групами аденокарцином передміхурової залози та ДГПЗ, а також між аденокарциномами та УНТ для п'яти генів (*EFNA5*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*). Це вказує на можливу залученість цих генів до розвитку РПЗ людини.

Підсумовуючи отримані в нашій роботі результати можна зазначити, що було виявлено ряд генів зі змінами рівнів експресії (всього 48) між чутливими

та нечутливими до андрогенів модельними клітинними лініями аденокарцином передміхурової залози. Для п'яти генів (*EFNA5*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*) зміни експресії було підтверджено у клінічних зразках пухлин. До того ж, було виявлено проонкогенні властивості гена *GLCE* на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози.

Крім того, було встановлено, що частоти делецій/метилування 14 генів/локусів (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*, *CAND2*, *GATA2*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*) відрізняються між групами ДГПЗ та аденокарцином із високим та низьким ризиком прогресування, отже потенційно можуть бути асоційованими із різними стадіями розвитку РПЗ.

Таким чином, наші дослідження продемонстрували генетичні, епігенетичні зміни, а також зміни експресії генів у модельних клітинних лініях та клінічних зразках пухлин передміхурової залози. Встановлені зміни підтверджують високий ступінь гетерогенності пухлин передміхурової залози та складні механізми регуляції цих пухлин. Така гетерогенність зумовлює не тільки проблеми для створення персоналізованої терапії хворих на РПЗ, але й ускладнює екстраполяцію результатів, отриманих на модельних об'єктах.

Втім, виявлені нами пухлино-асоційовані гени можуть бути потенційними маркерами розвитку та прогресії РПЗ. Доцільно в майбутньому оцінити їх в якості маркерів РПЗ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози людини вивчено рівні відносної експресії 143 генів, пов'язаних з онкогенезом, серед яких 70 генів мають зміни експресії. Ці гени належать до таких сигнальних шляхів та систем як: адгезія, сигнальна трансдукція, контроль клітинного циклу, ангиогенез, інвазивність та метастазування. Для п'яти генів *FOS*, *EFNA5*, *IL1B*, *TGFB1*, *PLAU* зміни рівня експресії було підтверджено на клінічних зразках пухлин передміхурової залози. У 30% хворих на РПЗ виявлено генетичні та епігенетичні зміни 50 генів/локусів 3-ї хромосоми зі 180 досліджених.

1. Виявлено 14 диференційно експресованих генів між гормоночутливою клітинною лінією LNCaP та гормонорезистентними лініями DU145 та PC3, відносно лінії умовно нормального епітелію PNT2, які є потенційними пухлино-асоційованими генами аденокарцином передміхурової залози. Вони входять до систем ангиогенезу (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*), інвазивності та метастазування (*SERPINE2b*), контролю клітинного циклу (*P16*, *CCNE1*), сигнальних шляхів: NF- κ B (*IL1B*, *IL6*, *IL1RL1*), адгезії (*TAGLN*, *EFNA5*, *GLCE*), а також групи транскрипційних факторів та молекул сигнальної трансдукції (*HOXA13*).

2. Детектовано 36 генів зі змінами рівня відносної експресії більше ніж в 4 рази в гормонорезистентній клітинній лінії PC3 у порівнянні з гормоночутливою клітинною лінією LNCaP, серед яких 14 генів, які належать до сигнальних шляхів: апоптозу та клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), ангиогенезу (*TGFB1*, *VEGFA*) та інвазивності та метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*) є асоційованими із інвазивністю та метастазуванням пухлин передміхурової залози.

3. Показано для п'яти генів (*FOS*, $p=0,0001$, *EFNA5*, $p=0,0030$, *IL1B*, $p=0,0180$, *TGFB1*, $p=0,0300$, *PLAU*, $p=0,0388$) різниці у рівнях відносної

експресії між групами доброякісних гіперплазій, аденокарцином та умовно-нормальних тканин передміхурової залози.

4. Методом непараметричного регресійного аналізу виявлено, що у пацієнтів із незначним підвищенням рівня ПСА (не більше 20,0 нг/мл) спостерігається підвищення рівня експресії гена *IL1B* (OR=2,1; p=0,0377).

5. За допомогою гібридизації на NotI-мікрочипах виявлено 1163 випадки гетерозиготних та 461 випадки гомозиготних делецій/метилування, а також ампліфікації/деметилування (24 випадки), серед яких 50 генів/локусів із делеціями/метилуванням у більше ніж в 30% досліджуваних зразків.

6. Виявлено 14 генів/локусів зі статистично значущою різницею (p<0,05) у частоті метилування/делецій серед різних типів пухлин передміхурової залози (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*, *CAND2*, *GATA2*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*), які можуть бути використані для створення панелей діагностичних біомаркерів для розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин, чи як мішені для терапії різних типів пухлин передміхурової залози.

7. Дані NotI-мікрочипів підтверджені методами к-3T-ПЛІР та бісульфітного секвенування: виявлено зниження рівнів експресії генів *BHLHE40*, *ITGA9*, *BCL6* у досліджуваних зразках аденокарцином, а також наявність метилування CG – динуклеотидів NotI-сайта у промоторі генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. [Internet]. Lyon, France. 2012 [cited 2015 Dec 17].

Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

2. Федоренко ЗП, Михайлович ЮЙ, Гулак ЛО, Горох ЄЛ, Ришов АЮ, Сумкіна ОВ. Рак в Україні, 2015-2016. Бюлетень національного канцер-реєстру України [Internet]. 2017 [cited 2016 Jan 19];18:61.

Available from: http://ncru.inf.ua/publications/BULL_16/index_e.htm

3. Aschelter AM, Giacinti S, Caporello P, Marchetti P. Genomic and epigenomic alterations in prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 4];3:128.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133437>

4. Fromont G, Godet J, Peyret A, Irani J, Celhay O, Rozet F, et al. 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy. *Hum Pathol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2016 Sep 12];44(8):1617–23.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23574779>

5. Cho N-Y, Kim JH, Moon KC, Kang GH. Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm. *Virchows Arch* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Oct 10];454(1):17–23.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19048291>

6. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* [Internet]. 2011 Aug [cited 2016 Oct 16];2(8):627–37.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896958>

7. Jerónimo C, Bastian PJ, Bjartell A, Carbone GM, Catto JWF, Clark SJ, et al. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur Urol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Oct 10];60(4):753–66.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719191>
8. Gerlinger M, Catto JW, Orntoft TF, Real FX, Zwarthoff EC, Swanton C. Intratumour Heterogeneity in Urologic Cancers: From Molecular Evidence to Clinical Implications. *Eur Urol* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Jun 20];67(4):729–37.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836153>
9. Brocks D, Assenov Y, Minner S, Bogatyrova O, Simon R, Koop C, et al. Intratumor DNA Methylation Heterogeneity Reflects Clonal Evolution in Aggressive Prostate Cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Jun 20];8(3):798–806.
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221112471400552X>
10. Cancer Genome Atlas Research Network TCGAR. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2017 May 22];163(4):1011–25.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26544944>
11. Zhu K, Liu Q, Zhou Y, Tao C, Zhao Z, Sun J, et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 20];16(Suppl 7):S8.
Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-16-S7-S8>
12. Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Jun 20];40(3):244–58.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806491>
13. Gallucci M, Merola R, Leonardo C, De Carli P, Farsetti A, Sentinelli S, et al. Genetic profile identification in clinically localized prostate carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Jun 20];27(5):502–

8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18534873>

14. Hagglof C, Hammarsten P, Stromvall K, Egevad L, Josefsson A, Stattin P, et al. TMPRSS2-ERG Expression Predicts Prostate Cancer Survival and Associates with Stromal Biomarkers. Culig Z, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Feb 5 [cited 2017 Jun 20];9(2):e86824.

Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086824>

15. Nodouzi V, Nowroozi M, Hashemi M, Javadi G, Mahdian R. Concurrent Down-Regulation of PTEN and NKX3.1 Expression in Iranian Patients with Prostate Cancer. *Int Braz J Urol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 20];41(5):898–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26689514>
16. Sharma A, Yeow W-S, Ertel A, Coleman I, Clegg N, Thangavel C, et al. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2017 Jun 20];120(12):4478–92.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099110>

17. Hodgson F, Obertová Z, Brown C, Lawrenson R. PSA testing in general practice. *J Prim Health Care* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2017 Jun 21];4(3):199–204.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946067>

18. Dani H, Loeb S. The role of prostate cancer biomarkers in undiagnosed men. *Curr Opin Urol* [Internet]. 2017 May [cited 2017 Jun 21];27(3):210–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212119>
19. Fujimoto N, Shiota M, Tomisaki I, Minato A. Gene Polymorphism-related Individual and Interracial Differences in the Outcomes of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Jun 21];15(3):337–42.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188049>

20. Climent MA, Leon-Mateos L, Gonzalez del Alba A, Perez-Valderrama B, Mandez-Vidal MJ, Mellado B, et al. Updated recommendations from the Spanish Oncology Genitourinary Group for the treatment of patients with

metastatic castration-resistant prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2015 Nov [cited 2017 Jun 21];96(2):308–18.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100652>

21. Aragon-Ching JB, Williams KM, Gulley JL. Impact of androgen-deprivation therapy on the immune system: implications for combination therapy of prostate cancer. *Front Biosci* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2017 Oct 4];12:4957–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569623>
22. Возіанов СО, Гжегоцький МР, Шуляк ОВ, Петришин ЮС, Мисаковець ОГ. Урологія [Internet]. Львів: Світ; 2003 [cited 2016 May 27]. 304 с. Available from: http://kingmed.info/knigi/Yrologia_i_nefrologia/book_174/Urologiya-Vozianov_OS-2003-djvu
23. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2016 Nov 7];70(1):106–19.

Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283816002050>

24. Франк ГА. Морфология рака предстательной железы. Практическая онкология. 2008;9(2):65–70.
25. Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* [Internet]. 1987 Mar 15 [cited 2016 May 30];59(4):788–94.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433020>

26. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* [Internet]. 1993 Aug [cited 2016 May 23];150(2 Pt 1):379–85.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8326560>

27. Grignon DJ. Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* [Internet]. 2004 Mar;17(3):316–27.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976541>

28. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against

- Cancer. TNM classification of malignant tumours. Wiley-Blackwell; 2009. 310 p.
29. Wang C, Shen Y. Study on the distribution features of bone metastases in prostate cancer. *Nucl Med Commun* [Internet]. 2012 Apr;33(4):379–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293499>
 30. Weiss RJ, Forsberg JA, Wedin R. Surgery of skeletal metastases in 306 patients with prostate cancer. *Acta Orthop* [Internet]. 2012 Feb;83(1):74–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278661/>
 31. Kayhan A, Yang C, Soylu FN, Lakadamyalı H, Sethi I, Karczmar G, et al. Dynamic contrast-enhanced MR imaging findings of bone metastasis in patients with prostate cancer. *World J Radiol* [Internet]. 2011 Oct;3(10):241–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229077>
 32. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* [Internet]. 2000 May [cited 2016 Nov 7];31(5):578–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836297>
 33. Wang H, Li B, Zhang P, Yao Y, Chang J. Clinical characteristics and prognostic factors of prostate cancer with liver metastases. *Tumor Biol* [Internet]. 2014 Jan 20 [cited 2016 Nov 7];35(1):595–601. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-013-1083-6>
 34. Komeya M, Sahoda T, Sugiura S, Sawada T, Kitami K. A case of metastatic prostate adenocarcinoma to an inguinal lymph node. *Cent Eur J Urol* [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov 7];65(2):96–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24578940>
 35. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* [Internet]. 2004 Mar 13 [cited 2016 Nov 7];17(3):292–306. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/modpathol.3800054>
 36. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, Sinnott JA, Finn S, Eisenstein AS, et al. Gleason score and lethal prostate cancer: does 3 + 4 = 4 + 3? *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Jul 20 [cited 2016 Nov 7];27(21):3459–64.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433685>

37. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagn Pathol* [Internet]. 2006 Apr 3 [cited 2016 Nov 7];1:4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759347>
38. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* [Internet]. 1985 Nov [cited 2014 Jun 19];76(5):1899–903. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=424236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Richardson TD, Oesterling JE. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am* [Internet]. 1997 May [cited 2016 Nov 7];24(2):339–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126232>
40. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Jun 14];6(2):76–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198621>
41. Kohli M, Riska SM, Mahoney DW, Chai HS, Hillman DW, Rider DN, et al. Germline predictors of androgen deprivation therapy response in advanced prostate cancer. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Jul 1];87(3):240–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386179>
42. Krontiris TG, Cooper GM. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1981 Feb [cited 2016 Apr 18];78(2):1181–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=319971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*

- [Internet]. 1981 Mar 19 [cited 2016 Apr 18];290(5803):261–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7207618>
44. Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* [Internet]. 1969 Jul 26 [cited 2016 Feb 27];223(5204):363–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5387828>
 45. Stanbridge EJ. Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1990 Jan 28 [cited 2016 Apr 18];24:615–57. Available from:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ge.24.120190.003151>
 46. Sherr CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2016 Mar 28];116(2):235–46. Available from:
<http://www.cell.com/article/S0092867403010754/fulltext>
 47. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Dec 29];2(4):466–74. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3135636&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
 48. Di Fiore R, D’Anneo A, Tesoriere G, Vento R. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2016 Apr 18];228(8):1676–87. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359405>
 49. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2016 Mar 9];120(Pt 19):3327–35. Available from:
<http://jcs.biologists.org/content/120/19/3327>
 50. Lalani AI, Luo C, Han Y, Xie P. TRAF3: a novel tumor suppressor gene in macrophages. *Macrophage* [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2016 May 10];2:e1009. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4673676&tool=pmc>

entrez&rendertype=abstract

51. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* [Internet]. 2003 Oct 20 [cited 2016 Mar 7];22(47):7369–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576844>
52. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL. The molecular pathogenesis of prostate cancer: Implications for prostate cancer prevention. *Urology* [Internet]. 2001 Apr [cited 2016 May 30];57(4):39–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429500009390>
53. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2016 May 30];60(21):6111–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085535>
54. He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, et al. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2016 May 30];43(1):69–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226374>
55. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* [Internet]. 1998 Apr 2 [cited 2016 May 23];16(13):1743–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582022>
56. Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, Gerke T, Graff RE, Morais CL, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2016 Feb [cited 2016 May 23];108(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615022>
57. Wang Y, Dai B. PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Mar 6];8(4):5430–7.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4483905&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

58. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* [Internet]. 2006 Aug 28 [cited 2015 Apr 19];25(38):5220–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936740>
59. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* [Internet]. 1995 May 5 [cited 2015 Oct 23];81(3):323–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7736585>
60. Gonzalo S, García-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AHFM, Cotter SE, et al. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2016 Apr 7];7(4):420–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750587>
61. Tan H-L, Sood A, Rahimi HA, Wang W, Gupta N, Hicks J, et al. Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2016 Apr 13];20(4):890–903. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3931005&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
62. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2010 Jul 13 [cited 2014 May 24];18(1):11–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3198787&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
63. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 23];6(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141080>
64. Ge Q, Wang C, Ruan Y, Chen Z, Liu J, Ye Z. Overexpression of p53 activated by small activating RNA suppresses the growth of human prostate cancer cells. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 23];9:231–41. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4712973&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
65. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2014 Sep 15 [cited 2016 May 23];135(6):1369–80. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523142>
 66. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 Mar 17 [cited 2016 Jun 29];25(3):304–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651012>
 67. Ruddle R. W. *Cancer Biology*. 4–th ed. New York: Oxford University press; 2007. 321-322 p.
 68. Dang C V. MYC on the path to cancer. *Cell* [Internet]. 2012 Mar 30 [cited 2016 Jun 30];149(1):22–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464321>
 69. Zeng W, Sun H, Meng F, Liu Z, Xiong J, Zhou S, et al. Nuclear C-MYC expression level is associated with disease progression and potentially predictive of two year overall survival in prostate cancer. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun 30];8(2):1878–88. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973080>
 70. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2010;18(1):11–22.
 71. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2016 Jul 5];2(2):127–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252954>
 72. Neto AS, Tobias-Machado M, Wroclawski ML, Fonseca FLA, Teixeira GK, Amarante RDM, et al. HER-2/neu Expression in Prostate Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol*. 2010;184(3):842–50.

73. Muniyan S, Chen S-J, Lin F-F, Wang Z, Mehta PP, Batra SK, et al. ErbB-2 signaling plays a critical role in regulating androgen-sensitive and castration-resistant androgen receptor-positive prostate cancer cells. *Cell Signal*. 2015;27(11):2261–71.
74. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* [Internet]. 1994 Jan [cited 2016 Aug 12];124(1–2):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294493>
75. Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Xiang J. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Jan 26];17(6):531–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.12>
76. Li J. Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. In: *Progress in molecular biology and translational science* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 30]. p. 59–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807641>
77. Princivalle M, de Agostini A. Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans: a comparative review in *Drosophila*, mouse and human. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2002 May [cited 2017 Jul 1];46(3):267–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068947>
78. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jul 1];196(4). Available from: <http://jcb.rupress.org/content/196/4/395>
79. Sheng J, Xu Y, Dulaney SB, Huang X, Liu J. Uncovering Biphasic Catalytic Mode of C₅-epimerase in Heparan Sulfate Biosynthesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2017 Jun 30];287(25):20996–1002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528493>
80. Catlow KR, Deakin JA, Wei Z, Delehedde M, Fernig DG, Gherardi E, et al. Interactions of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor with Various Glycosaminoglycans Reveal an Important Interplay between the Presence of

- Iduronate and Sulfate Density. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Feb 29 [cited 2017 Jun 30];283(9):5235–48. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156180>
81. Jia J, Maccarana M, Zhang X, Bessalov M, Lindahl U, Li J-P. Lack of Iduronic Acid in Heparan Sulfate Affects Interaction with Growth Factors and Cell Signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Jun 5 [cited 2017 Jun 30];284(23):15942–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336402>
82. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2017 Jun 30];209(2):139–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307119>
83. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tseggenidis T, Karousou E, Theocharis AD, et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Jun 30];279(7):1177–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333131>
84. Prudnikova TY, Soultzis N, Kutsenko OS, Mostovich LA, Haraldson K, Ernberg I, et al. Heterogeneity of d-glucuronyl C5-epimerase expression and epigenetic regulation in prostate cancer. *Cancer Med* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Jun 14];2(5):654–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403231>
85. Prudnikova TY, Mostovich LA, Domanitskaya N V, Pavlova T V, Kashuba VI, Zabarovsky ER, et al. Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2010 Aug 19 [cited 2017 Jul 1];10:27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723247>
86. Grigorieva E V, Prudnikova TY, Domanitskaya N V, Mostovich LA, Pavlova T V, Kashuba VI, et al. D-Glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* [Internet]. 2011 Jun 28 [cited 2017 Jul 1];105(1):74–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654676>

87. Eshchenko TY, Rykova VI, Chernakov AE, Sidorov S V, Grigorieva E V. Expression of different proteoglycans in human breast tumors. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2007 Sep [cited 2017 Jul 1];72(9):1016–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922662>
88. Grigorieva E, Eshchenko T, Rykova VI, Chernakov A, Zabarovsky E, Sidorov S V. Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Nov 5 [cited 2017 Jul 1];122(5):1172–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17985344>
89. Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL, et al. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999 Mar [cited 2016 Sep 19];64(3):776–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10053012>
90. Xu J, Genetics the IC for PC. Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2000 Mar [cited 2016 Sep 19];66(3):945–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712209>
91. Gudmundsson J, Sulem P, Rafnar T, Bergthorsson JT, Manolescu A, Gudbjartsson D, et al. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2016 Sep 15];40(3):281–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264098>
92. Kolawole SM. Genetic variants associated with metastatic prostate cancer. *Texas Med Cent Diss* [Internet]. 2012 [cited 2016 Sep 15]; Available from: <http://digitalcommons.library.tmc.edu/dissertations/AAI1515606>
93. Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Monroe KR, Stram DO, Henderson BE, et al. Generalizability of associations from prostate cancer genome-wide association studies in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009 Apr [cited 2016 Sep 15];18(4):1285–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318432>

94. Hoffmann TJ, Van Den Eeden SK, Sakoda LC, Jorgenson E, Habel LA, Graff RE, et al. A large multiethnic genome-wide association study of prostate cancer identifies novel risk variants and substantial ethnic differences. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Sep 15];5(8):878–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26034056>
95. Prokunina-Olsson L, Fu Y-P, Tang W, Jacobs KB, Hayes RB, Kraft P, et al. Refining the prostate cancer genetic association within the JAZF1 gene on chromosome 7p15.2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 May [cited 2016 Sep 15];19(5):1349–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406958>
96. Teerlink CC, Leongamornlert D, Dadaev T, Thomas A, Farnham J, Stephenson RA, et al. Genome-wide association of familial prostate cancer cases identifies evidence for a rare segregating haplotype at 8q24.21. *Hum Genet* [Internet]. 2016 Aug 4 [cited 2016 Sep 15];135(8):923–38. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-016-1690-6>
97. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA Al, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2016 Sep 15];40(3):316–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264097>
98. Jinga V, Csiki IE, Manolescu A, Iordache P, Mates IN, Radavoi D, et al. Replication study of 34 common SNPs associated with prostate cancer in the Romanian population. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Sep 15];20(4):594–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773531>
99. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2016 Sep 19];40(3):310–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264096>
100. Tavtigian S V., Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet*

- [Internet]. 2001 Feb [cited 2016 Sep 19];27(2):172–80. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175785>
101. Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Purcell LD, Gao Z, et al. Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Sep 15];40(10):1153–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758462>
 102. Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Li G, Wiley KE, et al. Sequence variants at 22q13 are associated with prostate cancer risk. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2016 Sep 15];69(1):10–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117981>
 103. Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. Early onset prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2016 Sep 15];72(2):147–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538423>
 104. Li W, Gu M. NUDT11 rs5945572 polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2015 [cited 2016 Sep 15];8(3):3474–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064238>
 105. Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, et al. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* [Internet]. 1998 Oct [cited 2016 Sep 19];20(2):175–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771711>
 106. Bova GS, Isaacs WB. Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J Urol* [Internet]. 1996 [cited 2016 Sep 15];14(5):338–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912474>
 107. Sun M, Srikantan V, Ma L, Li J, Zhang W, Petrovics G, et al. Characterization of frequently deleted 6q locus in prostate cancer. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Sep 15];25(11):597–607. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132090>
 108. Nupponen N, Visakorpi T. Molecular biology of progression of prostate cancer.

- Eur Urol [Internet]. 1999 [cited 2016 Sep 15];35(5–6):351–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325488>
109. Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, et al. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990 Nov [cited 2016 Sep 15];87(22):8751–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978938>
 110. Ichikawa T, Suzuki H, Ito H. Role of chromosomal loss in the progression of prostate cancers. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2000 Dec 20 [cited 2016 Sep 15];5(6):345–54. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/PL00012062>
 111. Nemoto R, Nakamura I, Uchida K, Harada M. Numeric chromosome aberrations in prostate cancer detected by in situ hybridization. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 1998 Jun [cited 2016 Sep 15];3(3):138–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02489905>
 112. Simanainen U, Brogley M, Gao YR, Jimenez M, Harwood DT, Handelsman DJ, et al. Length of the human androgen receptor glutamine tract determines androgen sensitivity in vivo. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011 Aug 6 [cited 2016 Sep 19];342(1–2):81–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664242>
 113. Hsing AW, Chen C, Chokkalingam AP, Gao Y-T, Dightman DA, Nguyen HT, et al. Polymorphic Markers in the SRD5A2 Gene and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers*. 2001;10(10).
 114. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, et al. Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1999 Sep 18 [cited 2016 Sep 20];354(9183):975–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501358>
 115. Mononen N, Schleutker J. Polymorphisms in Genes Involved in Androgen Pathways as Risk Factors for Prostate Cancer. *J Urol*. 2009;181(4):1541–9.
 116. Dong J-T, Li C-L, Sipe TW, Frierson HF. Mutations of PTEN/MMAC1 in Primary Prostate Cancers from Chinese Patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7(2).

117. Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, Sachs MD, Lenk S V, Rudolph BD, et al. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res* [Internet]. 2010 May [cited 2016 Sep 23];30(5):1579–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592345>
118. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J-P, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Sep 27];44(6):685–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610119>
119. Salmaninejad A, Ghadami S, Dizaji MZ, Golchehre Z, Estiar MA, Zamani MR, et al. Molecular Characterization of KRAS, BRAF, and EGFR Genes in Cases with Prostatic Adenocarcinoma; Reporting Bioinformatics Description and Recurrent Mutations. *Clin Lab* [Internet]. 2015 [cited 2016 Sep 27];61(7):749–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299074>
120. Cho N-Y, Choi M, Kim B-H, Cho Y-M, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J cancer* [Internet]. 2006 Oct 15 [cited 2016 Sep 27];119(8):1858–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721785>
121. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* [Internet]. 2012 Jul 12 [cited 2016 Sep 27];487(7406):239–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722839>
122. Fu M, Zhang W, Shan L, Song J, Shang D, Ying J, et al. Mutation status of somatic EGFR and KRAS genes in Chinese patients with prostate cancer (PCa). *Virchows Arch* [Internet]. 2014 May 5 [cited 2016 Sep 27];464(5):575–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-014-1566-x>
123. Veronese ML, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. The t(6;16)(p21;q22) chromosome translocation in the LNCaP prostate carcinoma cell line results in a tpc/hpr fusion gene. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Feb 15 [cited 2016 Sep 29];56(4):728–32. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631004>
124. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2008 Jul [cited 2016 Sep 30];8(7):497–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563191>
125. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* (80-). 2005;310(5748).
126. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2016 Sep 30];66(7):3396–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585160>
127. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2016 Sep 30];68(1):73–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172298>
128. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* [Internet]. 2007 Aug 2 [cited 2016 Sep 30];448(7153):595–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671502>
129. Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, et al. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Oct 3];16(7):793–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526349>
130. Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1998 Jun [cited 2016 Oct

- 3];62(6):1416–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585607>
131. Farnham JM, Camp NJ, Swensen J, Tavtigian S V, Albright LAC. Confirmation of the HPCX prostate cancer predisposition locus in large Utah prostate cancer pedigrees. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Feb [cited 2016 Oct 3];116(3):179–85. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592687>
132. Rubin MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2004 Mar 30 [cited 2016 Oct 3];17(3):380–8. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.3800051>
133. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Mar 19 [cited 2016 Oct 4];99(6):3740–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891299>
134. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* [Internet]. 1999 Jan [cited 2016 Oct 4];15(1):34–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087932>
135. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2016 Oct 10];68(21):8954–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974140>
136. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The Epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. *Prostate* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2016 Oct 10];72(11):1248–61. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/pros.22459>
137. Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D, Hoque MO, Carvalho AL, Costa VL, et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2016 Oct 10];13(20):6122–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947477>
138. Bañez LL, Sun L, van Leenders GJ, Wheeler TM, Bangma CH, Freedland SJ, et al. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Oct 10];184(1):149–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478579>
 139. Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T, Biermann K, Kahl P, Heukamp LC, et al. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Oct 10];71(1):161–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242387>
 140. Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Sep 20 [cited 2016 Oct 10];23(27):6569–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170165>
 141. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Catto JWF, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Mar 15 [cited 2016 Oct 10];13(6):1720–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363525>
 142. Woodson K, O'Reilly KJ, Ward DE, Walter J, Hanson J, Walk EL, et al. CD44 and PTGS2 methylation are independent prognostic markers for biochemical recurrence among prostate cancer patients with clinically localized disease. *Epigenetics* [Internet]. [cited 2016 Oct 13];1(4):183–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998819>
 143. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2016 Oct 16];324(5929):930–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372391>

144. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2016 Oct 16];68(15):6162–70. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676839>
145. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masiá E, Casanova J, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2016 Oct 16];192(1):252–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518785>
146. Hart M, Nolte E, Wach S, Szczyrba J, Taubert H, Rau TT, et al. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Oct 16];12(2):250–63. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337069>
147. Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, Waltering KK, Sahu B, Jänne OA, et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2012 Oct 11 [cited 2016 Oct 16];31(41):4460–71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266859>
148. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Oct 16];16(3):206–16. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949015>
149. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TLJ, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2016 Oct 16];67(13):6130–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616669>
150. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf H-J, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al.

- Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J cancer* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2016 Oct 16];126(5):1166–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19676045>
151. Coarfa C, Fiskus W, Eedunuri VK, Rajapakshe K, Foley C, Chew SA, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2016 May 14 [cited 2018 Feb 18];35(18):2345–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26364608>
152. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2016 Oct 17];59(23):5975–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606244>
153. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 29 [cited 2016 Oct 17];500(7464):598–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945587>
154. Zhang A, Zhao JC, Kim J, Fong K-W, Yang YA, Chakravarti D, et al. LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and Drives Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Oct 6 [cited 2016 Oct 17];13(1):209–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411689>
155. Prensner JR, Chen W, Han S, Iyer MK, Cao Q, Kothari V, et al. The long non-coding RNA PCAT-1 promotes prostate cancer cell proliferation through cMyc. *Neoplasia* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Oct 17];16(11):900–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425964>
156. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor.

- Sci Signal [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2016 Oct 17];3(107):ra8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124551>
157. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* [Internet]. 2010 Jun 24 [cited 2016 Oct 17];465(7301):1033–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577206>
158. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Oct 17];48(3):R45-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393162>
159. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* [Internet]. 2001 Aug 10 [cited 2016 Oct 17];293(5532):1074–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498575>
160. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* [Internet]. 2002 Oct 10 [cited 2016 Oct 17];419(6907):624–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374981>
161. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2016 Oct 17];70(1):61–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739128>
162. Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Oct 18];19(10):2611–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20841388>
163. Behbahani TE, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Baumann C, Gütgemann I, et al. Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis. *BMC Urol* [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2016 Oct 17];12:5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22413846>

164. Vardabasso C, Hasson D, Ratnakumar K, Chung C-Y, Duarte LF, Bernstein E. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Oct 18];71(3):379–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652611>
165. Dryhurst D, McMullen B, Fazli L, Rennie PS, Ausió J. Histone H2A.Z prepares the prostate specific antigen (PSA) gene for androgen receptor-mediated transcription and is upregulated in a model of prostate cancer progression. *Cancer Lett* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2016 Oct 18];315(1):38–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055461>
166. Valdés-Mora F, Song JZ, Statham AL, Strbenac D, Robinson MD, Nair SS, et al. Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Res* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Oct 18];22(2):307–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788347>
167. Ingvarsson S. Tumor Suppressor Genes on Human Chromosome 3 and Cancer Pathogenesis. *Cancer genomics Proteomics*. 2005;2(4):247–54.
168. Lindquist R, Forsblom A, St Å, Gahrton G. Mutagen exposures and chromosome 3 aberrations in acute myelocytic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:112–8.
169. Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Brief Funct Genomic Proteomic* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Oct 18];6(1):19–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525073>
170. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* [Internet]. 2002 Oct 7 [cited 2016 Oct 18];21(45):6915–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362274>
171. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* [Internet]. 1997 [cited 2016 Oct 19];71:27–92. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111863>
172. Bonn  ACM, Bodmer D, Schoenmakers EFPM, van Ravenswaaij CM, Hoogerbrugge N, van Kessel AG. Chromosome 3 translocations and familial renal cell cancer. *Curr Mol Med* [Internet]. 2004 Dec [cited 2016 Oct 19];4(8):849–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579032>
173. Larson GP, Ding Y, Cheng LS-C, Lundberg C, Gagalang V, Rivas G, et al. Genetic linkage of prostate cancer risk to the chromosome 3 region bearing FHIT. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Feb 1 [cited 2016 Oct 19];65(3):805–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705877>
174. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, et al. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2016 Oct 12];45(3):207–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074522>
175. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2016 Oct 13];231(1):130–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794398>
176. Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, M ller M, Schulz WA, et al. Genomic and Expression Analysis of the 3q25-q26 Amplification Unit Reveals TLOC1/SEC62 as a Probable Target Gene in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*. 2006;4(3).
177. Meyer TE, Boerwinkle E, Morrison AC, Volcik KA, Sanderson M, Coker AL, et al. Diabetes genes and prostate cancer in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 Oct 19];19(2):558–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142250>
178. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, et al. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate

- cancer. PLoS One [Internet]. 2013 [cited 2016 Oct 19];8(1):e53701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23326489>
179. Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, et al. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008 Sep 19 [cited 2014 Jun 9];374(2):388–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640093>
180. Chen D, Zhang J, Li M, Rayburn ER, Wang H, Zhang R. RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO Rep* [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 Oct 20];10(2):166–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098711>
181. Oldridge EE, Walker HF, Stower MJ, Simms MS, Mann VM, Collins AT, et al. Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of the metastasis suppressors RARRES1 and LXN. *Oncogenesis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Oct 21];2(4):e45. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/oncsis.2013.6>
182. Jing C, El-Ghany MA, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Smith P, et al. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2002 Apr 3 [cited 2016 Oct 21];94(7):482–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929948>
183. Kloth M, Goering W, Ribarska T, Arsov C, Sorensen KD, Schulz WA. The SNP rs6441224 influences transcriptional activity and prognostically relevant hypermethylation of RARRES1 in prostate cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 Sep 15 [cited 2016 Oct 21];131(6):E897–904. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27628>
184. Liu L, Yoon J-H, Dammann R, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2002 Oct 3 [cited 2016 Oct 22];21(44):6835–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360410>

185. Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, et al. The RASSF1A Tumor Suppressor Gene Is Inactivated in Prostate Tumors and Suppresses Growth of Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 2002;62(12).
186. Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res [Internet]*. 2000 Nov 1 [cited 2016 Oct 22];60(21):6116–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085536>
187. Tokinaga K, Okuda H, Nomura A, Ashida S, Furihata M, Shuin T. Hypermethylation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Japanese clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep [Internet]*. 2004 Oct [cited 2016 Oct 22];12(4):805–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375503>
188. Shaheduzzaman S, Vishwanath A, Furusato B, Cullen J, Chen Y, Bañez L, et al. Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancer progression. *Cancer Biol Ther [Internet]*. 2007 Jul [cited 2016 Oct 23];6(7):1088–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568188>
189. Fouts RL, Sandusky GE, Zhang S, Eckert GJ, Koch MO, Ulbright TM, et al. Down-regulation of fragile histidine triad expression in prostate carcinoma. *Cancer [Internet]*. 2003 Mar 15 [cited 2016 Oct 23];97(6):1447–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12627509>
190. Müller I, Urban K, Pantel K, Schwarzenbach H. Comparison of genetic alterations detected in circulating microsatellite DNA in blood plasma samples of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci [Internet]*. 2006 Sep [cited 2016 Oct 23];1075:222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108215>
191. Rökman A, Koivisto PA, Matikainen MP, Kuukasjärvi T, Poutiainen M, Helin HJ, et al. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic

- hybridization. *Prostate* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2016 Nov 3];46(3):233–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170152>
192. Ren H, Francis W, Boys A, Chueh AC, Wong N, La P, et al. BAC-based PCR fragment microarray: High-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. *Hum Mutat* [Internet]. 2005 May [cited 2016 Nov 3];25(5):476–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20164>
193. Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, Meng A, Albert M, Syed A, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2016 Nov 3];69(10):1091–100. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20959>
194. Zabarovsky ER, Gizatullin R, Podowski RM, Zabarovska V V, Xie L, Muravenko O V, et al. NotI clones in the analysis of the human genome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2014 Jun 10];28(7):1635–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
195. Dmitriev AA, Kashuba VI, Haraldson K, Senchenko VN, Pavlova T V, Kudryavtseva A V, et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics* [Internet]. 2012 May [cited 2014 Jun 10];7(5):502–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491060>
196. Dmitriev AA, Rudenko EE, Kudryavtseva A V, Krasnov GS, Gordiyuk V V, Melnikova N V, et al. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jul 6];2014:735292. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24977159>
197. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk V V, et al. NotI Microarrays: Novel Epigenetic Markers for Early Detection and Prognosis of High Grade Serous Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012

- Jan [cited 2014 Jun 10];13(10):13352–77. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3497331&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
198. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* [Internet]. 2001 Aug 23 [cited 2016 Nov 3];412(6849):822–6. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/35090585>
199. Barwick BG, Abramovitz M, Kodani M, Moreno CS, Nam R, Tang W, et al. Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts. *Br J Cancer* [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2017 Feb 23];102(3):570–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068566>
200. Stephenson AJ, Smith A, Kattan MW, Satagopan J, Reuter VE, Scardino PT, et al. Integration of gene expression profiling and clinical variables to predict prostate carcinoma recurrence after radical prostatectomy. *Cancer* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2017 Feb 23];104(2):290–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948174>
201. Manson-Bahr D, Ball R, Gundem G, Sethia K, Mills R, Rochester M, et al. Mutation detection in formalin-fixed prostate cancer biopsies taken at the time of diagnosis using next-generation DNA sequencing. *J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Nov 3];68(3):212–7. Available from:
<http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2014-202754>
202. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Mar 9];63(5):920–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981675>
203. Kannan K, Wang L, Wang J, Ittmann MM, Li W, Yen L. Recurrent chimeric RNAs enriched in human prostate cancer identified by deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 May 31 [cited 2016 Nov

- 4];108(22):9172–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571633>
204. Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O’Dwyer HM, Gleave M, et al. MicroRNAs Associated with Metastatic Prostate Cancer. Agoulnik I, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Sep 30 [cited 2016 Nov 4];6(9):e24950. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0024950>
205. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. Nature [Internet]. 2005 Jun 30 [cited 2016 Nov 4];435(7046):1262–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03672>
206. Chng KR, Chang CW, Tan SK, Yang C, Hong SZ, Sng NYW, et al. A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. EMBO J [Internet]. 2012 Jun 13 [cited 2016 Nov 4];31(12):2810–23. Available from:
<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.112>
207. Tan PY, Chang CW, Chng KR, Wansa KDSA, Sung W-K, Cheung E. Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. Mol Cell Biol [Internet]. 2012 Jan 15 [cited 2016 Nov 4];32(2):399–414. Available from:
<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.05958-11>
208. Chen J, Zhang D, Yan W, Yang D, Shen B, Chen J, et al. Translational bioinformatics for diagnostic and prognostic prediction of prostate cancer in the next-generation sequencing era. Biomed Res Int [Internet]. 2013 [cited 2016 Nov 4];2013:901578. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23957008>
209. Kim JH, Dhanasekaran SM, Prensner JR, Cao X, Robinson D, Kalyana-Sundaram S, et al. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. Genome Res [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 May 6];21(7):1028–41. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3129246&tool=pmc>

- entrez&rendertype=abstract
210. Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, DiPaola RS, et al. Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA* [Internet]. 2009 Sep 16 [cited 2016 Oct 26];302(11):1202–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755699>
 211. Klotz L. Prostate cancer overdiagnosis and overtreatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet]. 2013 Jun [cited 2016 Oct 26];20(3):204–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609043>
 212. Ittmann M, Huang J, Radaelli E, Martin P, Signoretti S, Sullivan R, et al. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2016 Oct 26];73(9):2718–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610450>
 213. SOBEL RE, SADAR MD. CELL LINES USED IN PROSTATE CANCER RESEARCH: A COMPENDIUM OF OLD AND NEW LINES—PART 1. *J Urol*. 2005;173(2):342–59.
 214. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 1983 Apr [cited 2016 Jan 21];43(4):1809–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831420>
 215. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C-Z, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 May 29];71(15):1668–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3426349&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
 216. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* [Internet]. 1978 Mar 15 [cited 2016 Jan 21];21(3):274–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910210305>

217. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate* [Internet]. 1997 Jan 1 [cited 2016 Oct 26];30(1):58–64. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018337>
218. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* [Internet]. 2006 Apr 17 [cited 2016 Jan 21];580(9):2294–300. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16580667>
219. Ghosh A, Wang X, Klein E, Heston WDW. Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Feb 1 [cited 2014 Jun 20];65(3):727–31. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705868>
220. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. *J Urol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2016 Oct 26];173(2):360–72. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643173>
221. Berthon P, Cussenot O, Hopwood L, Leduc A, Maitland N. Functional expression of sv40 in normal human prostatic epithelial and fibroblastic cells - differentiation pattern of nontumorigenic cell-lines. *Int J Oncol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2016 Feb 7];6(2):333–43. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556542>
222. T. Maniatis, E.F. Fritsch JS. *Molecular cloning : a laboratory manual* / [by] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J.Sambrook. - Version details - Trove [Internet]. 1982 [cited 2014 Jun 10]. Available from:
http://trove.nla.gov.au/work/13615226?q=+&sort=holdings+desc&_=1402416640672&versionId=40399603
223. Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg P V. Both β -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR

- in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2016 Nov 18];68(14):1555–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20815>
224. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2016 Nov 21];29(9):e45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
225. Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, et al. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2016 Jan 15];66(14):1521–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921506>
226. Zabarovsky ER, Allikmets R, Kholodnyuk I, Zabarovska VI, Paulsson N, Bannikov VM, et al. Construction of representative NotI linking libraries specific for the total human genome and for human chromosome 3. *Genomics* [Internet]. 1994 Mar 15 [cited 2016 Oct 11];20(2):312–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8020985>
227. Li J, Protopopov A, Wang F, Senchenko V, Petushkov V, Vorontsova O, et al. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Aug 6 [cited 2016 Oct 11];99(16):10724–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149436>
228. Dmitriev AA, Kashuba VI, Haraldson K, Senchenko VN, Pavlova T V., Kudryavtseva A V., et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics* [Internet]. 2012 May 27 [cited 2016 Nov 3];7(5):502–13. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/epi.19801>
229. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2016 Nov 14];30(1):207–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752295>
230. Kondratov AG, Kvasha SM, Stoliar LA, Romanenko AM, Zgonnyk YM,

- Gordiyuk V V, et al. Alterations of the WNT7A gene in clear cell renal cell carcinomas. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jun 11];7(10):e47012. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3466251&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
231. Ni M, Chen Y, Fei T, Li D, Lim E, Liu XS, et al. Amplitude modulation of androgen signaling by c-MYC. *Genes Dev* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2016 Jan 22];27(7):734–48. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3639415&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
232. Katoh M. Function and cancer genomics of FAT family genes (review). *Int J Oncol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2017 Mar 29];41(6):1913–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076869>
233. Makowska KA, Hughes RE, White KJ, Wells CM, Peckham M. Specific Myosins Control Actin Organization, Cell Morphology, and Migration in Prostate Cancer Cells. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2017 May 31];13(10):2118–25. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26670045>
234. Yokoyama NN, Shao S, Hoang BH, Mercola D, Zi X. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2017 Mar 29];2(1):27–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143959>
235. Sottnik JL, Keller ET. Understanding and targeting osteoclastic activity in prostate cancer bone metastases. *Curr Mol Med* [Internet]. 2013 May [cited 2016 Jan 25];13(4):626–39. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624036&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
236. Takezako N, Hayakawa M, Hayakawa H, Aoki S, Yanagisawa K, Endo H, et al. ST2 suppresses IL-6 production via the inhibition of IkappaB degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*

- [Internet]. 2006 Mar 10 [cited 2016 Jan 25];341(2):425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16426569>
237. Luhtala S, Staff S, Tanner M, Isola J. Cyclin E amplification, over-expression, and relapse-free survival in HER-2-positive primary breast cancer. *Tumor Biol* [Internet]. 2016 Jul 26 [cited 2017 Mar 29];37(7):9813–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810187>
238. Mo M-L, Chen Z, Li J, Li H-L, Sheng Q, Ma H-Y, et al. Use of serum circulating CCNB2 in cancer surveillance. *Int J Biol Markers* [Internet]. [cited 2017 Mar 29];25(4):236–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161946>
239. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* [Internet]. 2009 Nov 25 [cited 2017 Mar 29];139(5):871–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945376>
240. Ozerdem U. Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2016 Jan 25];66(3):294–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16245280>
241. Kalinski T, Röpke A, Sel S, Kouznetsova I, Röpke M, Roessner A. Down-regulation of ephrin-A5, a gene product of normal cartilage, in chondrosarcoma. *Hum Pathol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Jan 11];40(12):1679–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695673>
242. Sørensen KD, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjøt L, Tørring N. Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2017 Mar 29];122(3):509–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943724>
243. Zhang Z-W, Yang Z-M, Zheng Y-C, Chen Z-D. Transgelin induces apoptosis of human prostate LNCaP cells through its interaction with p53. *Asian J Androl* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Jan 16];12(2):186–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3739090&tool=pmc>

- entrez&rendertype=abstract
244. Blanc V, Nariculam J, Munson P, Freeman A, Klocker H, Masters J, et al. A role for class 3 semaphorins in prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2011 May [cited 2017 Mar 29];71(6):649–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.21281>
 245. Strock CJ, Park J-I, Nakakura EK, Bova GS, Isaacs JT, Ball DW, et al. Cyclin-Dependent Kinase 5 Activity Controls Cell Motility and Metastatic Potential of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. 2006;66(15).
 246. Eckfeld K, Hesson L, Vos MD, Bieche I, Latif F, Clark GJ. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2016 Jan 25];64(23):8688–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574778>
 247. Dluzniewski PJ, Wang M-H, Zheng SL, De Marzo AM, Drake CG, Fedor HL, et al. Variation in IL10 and other genes involved in the immune response and in oxidation and prostate cancer recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Jan 25];21(10):1774–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3467312&tool=pmc>
entrez&rendertype=abstract
 248. Shen L-Y, Chen K-N. Exploration of target genes of HOXA13 in esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2017 Mar 29];312(1):18–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893383>
 249. Chand AL, Wijayakumara DD, Knower KC, Herridge KA, Howard TL, Lazarus KA, et al. The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 and ER α Activate GREB1 Expression to Induce Breast Cancer Cell Proliferation. Marcus AI, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2017 Mar 29];7(2):e31593. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031593>
 250. Sun R, Jiang B, Qi H, Zhang X, Yang J, Duan J, et al. SOX4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2017 Mar

- 29];6(11):e1990. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583330>
251. Hagelgans A, Menschikowski M, Fuessel S, Nacke B, Arneth BM, Wirth MP, et al. Deregulated expression of urokinase and its inhibitor type 1 in prostate cancer cells: role of epigenetic mechanisms. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2016 Jan 28];94(3):458–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541763>
252. McKee CM, Xu D, Muschel RJ. Protease nexin 1: a novel regulator of prostate cancer cell growth and neo-angiogenesis. *Oncotarget* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Mar 29];1(1):1–2. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385179>
253. Singh RK, Lokeshwar BL. Depletion of intrinsic expression of Interleukin-8 in prostate cancer cells causes cell cycle arrest, spontaneous apoptosis and increases the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Mol Cancer* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Jan 25];8:57. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2729725&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
254. Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri R-M, Destouni C, et al. Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NFκB/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jun 20];11(1):13. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3121665&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
255. Killian PH, Kronschi E, Michalik KM, Barbieri O, Astigiano S, Sommerhoff CP, et al. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* [Internet]. 2012 Dec [cited 2016 Jan 25];33(12):2507–19. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042094>
256. Murthy S, Wu M, Bai VU, Hou Z, Menon M, Barrack ER, et al. Role of

- Androgen Receptor in Progression of LNCaP Prostate Cancer Cells from G1 to S Phase. Migliaccio A, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Feb 20 [cited 2017 Mar 29];8(2):e56692. Available from:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056692>
257. Lebok P, Roming M, Kluth M, Koop C, Özden C, Taskin B, et al. p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer. Oncotarget [Internet]. 2016 Nov 9 [cited 2017 Mar 29];7(49):81322–31. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27835607>
258. Lue H-W, Yang X, Wang R, Qian W, Xu RZH, Lyles R, et al. LIV-1 Promotes Prostate Cancer Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis through HB-EGF Shedding and EGFR-Mediated ERK Signaling. El-Deiry WS, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Nov 16 [cited 2017 Mar 29];6(11):e27720. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027720>
259. Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, Stolte C, O'Donoghue SI, Schneider R, et al. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. Database [Internet]. 2014 Feb 25 [cited 2017 May 31];2014(0):bau012-bau012. Available from:
<https://academic.oup.com/database/article-lookup/doi/10.1093/database/bau012>
260. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2017 May 31];45(D1):D12–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899561>
261. Chiu Y-T, Liu J, Tang K, Wong Y-C, Khanna KK, Ling M-T. Inactivation of ATM/ATR DNA damage checkpoint promotes androgen induced chromosomal instability in prostate epithelial cells. PLoS One [Internet]. 2012 [cited 2017 Mar 30];7(12):e51108. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272087>
262. Bhatia B, Multani AS, Patrawala L, Chen X, Calhoun-Davis T, Zhou J, et al. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity:

- Cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Dec 4 [cited 2017 Mar 30];122(7):1483–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059027>
263. Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchoff T, Balistreri L, Vora K, et al. Germline BRCA Mutations Denote a Clinicopathologic Subset of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2017 Jun 2];16(7):2115–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20215531>
264. Chiu Y-T, Han H-Y, Leung SC-L, Yuen H-F, Chau C-W, Guo Z, et al. CDC25A Functions as a Novel Ar Corepressor in Prostate Cancer Cells. *J Mol Biol* [Internet]. 2009 Jan 16 [cited 2017 Mar 30];385(2):446–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013180>
265. Kwon Y-W, Chang IH, Kim K Do, Kim YS, Myung S-C, Kim M-K, et al. Significance of S100A2 and S100A4 Expression in the Progression of Prostate Adenocarcinoma. *Korean J Urol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2017 Mar 30];51(7):456–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664777>
266. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 16 [cited 2017 Mar 30];408(6810):307–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099028>
267. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2017 Mar 30];5(4):a008714. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545417>
268. Tang Y-Q, Jaganath I, Manikam R, Sekaran SD. Phyllanthus Suppresses Prostate Cancer Cell, PC-3, Proliferation and Induces Apoptosis through Multiple Signalling Pathways (MAPKs, PI3K/Akt, NFκB, and Hypoxia). *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Jan 26];2013:609581. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3652183&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

269. Kominami K, Nakabayashi J, Nagai T, Tsujimura Y, Chiba K, Kimura H, et al. The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2012 [cited 2017 Mar 30];1823(10):1825–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488912001991>
270. Huerta-Yepez S, Baritaki S, Baay-Guzman G, Hernandez-Luna MA, Hernandez-Cueto A, Vega MI, et al. Contribution of either YY1 or BclXL-induced inhibition by the NO-donor DETANONOate in the reversal of drug resistance, both in vitro and in vivo. YY1 and BclXL are overexpressed in prostate cancer. *Nitric Oxide* [Internet]. 2013 Feb 28 [cited 2016 Jan 26];29:17–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246440>
271. Kesarwani P, Mandal RK, Maheshwari R, Mittal RD. Influence of caspases 8 and 9 gene promoter polymorphism on prostate cancer susceptibility and early development of hormone refractory prostate cancer. *BJU Int* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Jan 26];107(3):471–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804486>
272. Long Q, Johnson BA, Osunkoya AO, Lai Y-H, Zhou W, Abramovitz M, et al. Protein-coding and microRNA biomarkers of recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy. *Am J Pathol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2017 Mar 30];179(1):46–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703393>
273. Munkley J, Livermore KE, McClurg UL, Kalna G, Knight B, McCullagh P, et al. The PI3K regulatory subunit gene PIK3R1 is under direct control of androgens and repressed in prostate cancer cells. *Oncoscience* [Internet]. 2015 [cited 2017 Mar 30];2(9):755–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501081>
274. Zhu Q, Youn H, Tang J, Tawfik O, Dennis K, Terranova PF, et al. Phosphoinositide 3-OH kinase p85alpha and p110beta are essential for androgen receptor transactivation and tumor progression in prostate cancers. *Oncogene* [Internet]. 2008 Jul 31 [cited 2017 Mar 30];27(33):4569–79.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372911>
275. Rostad K, Mannelqvist M, Halvorsen OJ, Oyan AM, Bø TH, Stordrange L, et al. ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2017 Mar 30];30(1):19–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143509>
276. DU L, Wu W. A mimic of phosphorylated prolactin induces apoptosis by activating AP-1 and upregulating p21/waf1 in human prostate cancer PC3 cells. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 Nov [cited 2015 Dec 23];4(5):1064–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3499593&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
277. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, et al. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF- κ B signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Mar 30];79(9):1272–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067776>
278. Chen J, Jiao L, Xu C, Yu Y, Zhang Z, Chang Z, et al. Neural protein gamma-synuclein interacting with androgen receptor promotes human prostate cancer progression. *BMC Cancer* [Internet]. 2012 Dec 11 [cited 2017 Mar 30];12:593. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231703>
279. Varma RR, Hector SM, Clark K, Greco WR, Hawthorn L, Pendyala L. Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep* [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Mar 31];14(4):925–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16142353>
280. Dedhar S, Gray V, Robertson K, Saulnier R. Identification and characterization of a novel high-molecular-weight form of the integrin alpha 3 subunit. *Exp Cell Res* [Internet]. 1992 Nov [cited 2016 Jan 27];203(1):270–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1426047>
281. Tozawa K. [Activation of nuclear factor-kappa B and control of the expression

- of cell adhesion molecules in human prostate cancer cells]. *Nihon Hinyōkika Gakkai zasshi* [Internet]. 1996 Sep [cited 2016 Jan 27];87(9):1082–91. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8914390>
282. Hurt EM, Chan K, Serrat MAD, Thomas SB, Veenstra TD, Farrar WL. Identification of vitronectin as an extrinsic inducer of cancer stem cell differentiation and tumor formation. *Stem Cells* [Internet]. 2010 Mar 31 [cited 2017 Mar 31];28(3):390–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998373>
283. Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, Chtarbova S, Finke U, Hentsch S, et al. The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett* [Internet]. 2001 Apr [cited 2016 Jan 12];165(1):71–9. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383501003901>
284. Mustafa N, Martin TA, Jiang WG. Metastasis tumour suppressor-1 and the aggressiveness of prostate cancer cells. *Exp Ther Med* [Internet]. 2011 Dec 2 [cited 2017 Mar 31];2(1):157–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977484>
285. Wu GJ, Varma VA, Wu MW, Wang SW, Qu P, Yang H, et al. Expression of a human cell adhesion molecule, MUC18, in prostate cancer cell lines and tissues. *Prostate* [Internet]. 2001 Sep 15 [cited 2017 Mar 31];48(4):305–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536311>
286. Jiang Y, Boije M, Westermarck B, Uhrbom L. PDGF-B Can sustain self-renewal and tumorigenicity of experimental glioma-derived cancer-initiating cells by preventing oligodendrocyte differentiation. *Neoplasia* [Internet]. 2011 Jun [cited 2017 Mar 31];13(6):492–503. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677873>
287. Al-Azayzih A, Gao F, Goc A, Somanath PR. TGFβ1 induces apoptosis in invasive prostate cancer and bladder cancer cells via Akt-independent, p38 MAPK and JNK/SAPK-mediated activation of caspases. *Biochem Biophys Res*

- Commun [Internet]. 2012 Oct 12 [cited 2016 Jan 28];427(1):165–70. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3635477&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
288. Amatangelo MD, Goodyear S, Varma D, Stearns ME. c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer. Carcinogenesis [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Jan 28];33(10):1965–75. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3463154&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
289. Firlej V, Mathieu JRR, Gilbert C, Lemonnier L, Nakhlé J, Gallou-Kabani C, et al. Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. Cancer Res [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2016 Jan 27];71(24):7649–58. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037878>
290. Darrington E, Zhong M, Vo B-H, Khan SA. Vascular endothelial growth factor A, secreted in response to transforming growth factor- β 1 under hypoxic conditions, induces autocrine effects on migration of prostate cancer cells. Asian J Androl [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Jan 27];14(5):745–51. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3476842&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
291. Maeda A, Nakashiro K, Hara S, Sasaki T, Miwa Y, Tanji N, et al. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2006 Sep 8 [cited 2016 Jan 28];347(4):1158–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870139>
292. Bao W, Fu H-J, Jia L-T, Zhang Y, Li W, Jin B-Q, et al. HER2-mediated upregulation of MMP-1 is involved in gastric cancer cell invasion. Arch

- Biochem Biophys [Internet]. 2010 [cited 2017 Mar 31];499(1):49–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986110001761>
293. Cui Y, Niu A, Pestell R, Kumar R, Curran EM, Liu Y, et al. Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor alpha whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2016 Jan 28];20(9):2020–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4484605&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
294. Seifert M, Welter C, Mehraein Y, Seitz G. Expression of the nm23 homologues nm23-H4, nm23-H6, and nm23-H7 in human gastric and colon cancer. *J Pathol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2016 Jan 28];205(5):623–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726650>
295. Teoh SSY, Whisstock JC, Bird PI. Maspin (SERPINB5) Is an Obligate Intracellular Serpin. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Apr 2 [cited 2017 Mar 31];285(14):10862–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123984>
296. Eide T, Ramberg H, Glackin C, Tindall D, Taskén KA. TWIST1, A novel androgen-regulated gene, is a target for NKX3-1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2013 Jan 31 [cited 2017 Mar 31];13(1):4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23368843>
297. Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Xiang J. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res* [Internet]. 2007 Jun [cited 2017 Mar 30];17(6):531–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404601>
298. Yoshino T, Shiina H, Urakami S, Kikuno N, Yoneda T, Shigeno K, et al. Bcl-2 Expression as a Predictive Marker of Hormone-Refractory Prostate Cancer Treated with Taxane-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006 Oct 15 [cited 2017 Jun 10];12(20):6116–24. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062688>
299. Durchdewald M, Angel P, Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Jul 4];24(11):1451–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19760594>
300. Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, et al. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci* [Internet]. 2013 Sep [cited 2017 Jun 11];104(9):1189–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23786209>
301. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Feb 10 [cited 2017 Jun 11];23(5):1011–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585754>
302. Choi ME, Ballermann BJ. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Sep 8 [cited 2017 Jun 11];270(36):21144–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673146>
303. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol* [Internet]. 2009 May [cited 2017 Jun 11];219(2):449–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180561>
304. van Leenders GJLH, Sookhlall R, Teubel WJ, de Ridder CMA, Reneman S, Sacchetti A, et al. Activation of c-MET Induces a Stem-Like Phenotype in Human Prostate Cancer. Sarkar FH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 14 [cited 2017 Apr 5];6(11):e26753. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110593>
305. Pulukuri SMK, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor

- growth and metastasis. *Int J Oncol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Jun 11];32(4):757–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360703>
306. Covington KR, Fuqua SAW. Role of MTA2 in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2014 Dec 14 [cited 2017 Jun 11];33(4):921–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394532>
307. Kracmarova A, Cermak J, Brdicka R, Bruchova H. High expression of *ERCC1*, *FLT1*, *NME4* and *PCNA* associated with poor prognosis and advanced stages in myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2008 Jan [cited 2017 Jun 11];49(7):1297–305. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604718>
308. Böhm L, Serafin A, Akudugu J, Fernandez P, van der Merwe A, Aziz NA. uPA/PAI-1 ratios distinguish benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2013 Jul 18 [cited 2017 Jun 11];139(7):1221–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595126>
309. Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2012 Jul 24 [cited 2017 Jul 7];6(4):365–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796940>
310. Uluçkan Ö, Guinea-Viniegra J, Jimenez M, Wagner EF. Signalling in inflammatory skin disease by AP-1 (Fos/Jun). *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul 7];33(4 Suppl 92):S44-9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458100>
311. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko A V, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* [Internet]. 1997 Feb 6 [cited 2015 Nov 8];385(6616):540–4. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/385540a0>
312. Banyard J, Chung I, Miglioizzi M, Phan DT, Wilson AM, Zetter BR, et al. Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of

- metastatic prostate cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jan 18];14:387. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4046438&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
313. Han G, Lu S-L, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, et al. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 Jul [cited 2015 Dec 13];115(7):1714–23. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142114&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
314. Ikromov O, Alkamal I, Magheli A, Ratert N, Sendeski M, Miller K, et al. Functional Epigenetic Analysis of Prostate Carcinoma: A Role for Seryl-tRNA Synthetase? *J biomarkers* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 9];2014:362164. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26317032>
315. Resnick MJ, Koyama T, Fan K-H, Albertsen PC, Goodman M, Hamilton AS, et al. Long-Term Functional Outcomes after Treatment for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jan 31 [cited 2017 Jan 19];368(5):436–45. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1209978>
316. Wang D, Sad?e W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: Example ABCB1 (MDR1). *AAPS J* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2017 Jun 29];8(3):E515–20. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17025270>
317. Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* [Internet]. 1991 Sep [cited 2017 Jun 29];55(3):451–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943996>
318. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk V V, Zgonnyk YM, Gerashchenko A V, et al. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Jun 11];5(2):509–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101383>

319. Gerashchenko G V, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk V V, Zgonnyk YM, et al. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2014 Jun 10];32(2):71–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693965>
320. 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: Figure 1. *Cancer Discov* [Internet]. 2012 May [cited 2017 Oct 4];2(5):401–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588877>
321. Huang W-Y, Hsu S-D, Huang H-Y, Sun Y-M, Chou C-H, Weng S-L, et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Oct 4];43(Database issue):D856–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25398901>
322. Gerashchenko G V, Gordiyuk V V, Skrypkina IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, et al. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh* [Internet]. 2009 Jan 8 [cited 2014 Jun 10];81(4):81–7. Available from:
<http://europepmc.org/abstract/MED/20387637>
323. Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva A V, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics* [Internet]. 2013 Mar 11 [cited 2014 Jul 6];8(4). Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3674050&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
324. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Jan 21 [cited 2017 Jun 9];36(1):40–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702039>

325. Nagase T, Kikuno R, Hattori A, Kondo Y, Okumura K, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* [Internet]. 2000 Dec 31 [cited 2018 Feb 19];7(6):347–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214970>
326. Poissonnier L, Villain G, Soncin F, Mattot V. miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2018 Feb 19];102(3):436–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24562769>
327. Lehto M, Laitinen S, Chinetti G, Johansson M, Ehnholm C, Staels B, et al. The OSBP-related protein family in humans. *J Lipid Res* [Internet]. 2001 Aug [cited 2014 Jun 10];42(8):1203–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483621>
328. Muzny DM, Scherer SE, Kaul R, Wang J, Yu J, Sudbrak R, et al. The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Nature* [Internet]. 2006 Apr 27 [cited 2017 Jun 9];440(7088):1194–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641997>
329. Yang X-Y, Lai X-G, Zhang Y, Pei J-M, Yang A-G, Zhou S-S. [siRNA-mediated silencing of CIC-2 gene inhibits proliferation of human U-87 glioma cells]. *Ai Zheng* [Internet]. 2006 Jul [cited 2014 Jun 10];25(7):805–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831268>
330. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2003 Jul [cited 2017 Jun 6];4(7):544–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838346>
331. Nomura A, Tada H, Teramoto R, Konno T, Hodatsu A, Won H-H, et al. Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies a causative myosin essential light chain variant in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Jun 9];67(2):133–9.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443374>
332. Wong M, Chu Y-H, Tan HL, Bessho H, Ngeow J, Tang T, et al. Clinical and molecular characteristics of East Asian patients with von Hippel-Lindau syndrome. *Chin J Cancer* [Internet]. 2016 Aug 15 [cited 2017 Jun 9];35(1):79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27527340>
333. Bastola P, Stratton Y, Kellner E, Mikhaylova O, Yi Y, Sartor MA, et al. Folliculin contributes to VHL tumor suppressing activity in renal cancer through regulation of autophagy. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 May 27];8(7):e70030. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726479&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
334. Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, et al. Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* [Internet]. 2001 Mar [cited 2017 Jun 9];11(3):422–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230166>
335. Bessalova IN, Burmeister M. Identification of a Novel LIM Domain Gene, LMCD1, and Chromosomal Localization in Human and Mouse. *Genomics* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2017 Jun 9];63(1):69–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662546>
336. Chang C-Y, Lin S-C, Su W-H, Ho C-M, Jou Y-S. Somatic LMCD1 mutations promoted cell migration and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* [Internet]. 2012 May 24 [cited 2014 Jun 10];31(21):2640–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21996735>
337. Han W, Ding P, Xu M, Wang L, Rui M, Shi S, et al. Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation. *Genomics* [Internet]. 2003 Jun [cited 2017 Jun 9];81(6):609–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782130>
338. Tom Tang Y, Emtage P, Funk WD, Hu T, Arterburn M, Park EE., et al. TAFA:

- a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics* [Internet]. 2004 Apr [cited 2017 Jun 9];83(4):727–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028294>
339. Steenbergen RDM, Ongenaert M, Snellenberg S, Trooskens G, van der Meide WF, Pandey D, et al. Methylation-specific digital karyotyping of HPV16E6E7-expressing human keratinocytes identifies novel methylation events in cervical carcinogenesis. *J Pathol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2014 Jun 10];231(1):53–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674368>
340. Ezoe S, Matsumura I, Gale K, Satoh Y, Ishikawa J, Mizuki M, et al. GATA Transcription Factors Inhibit Cytokine-dependent Growth and Survival of a Hematopoietic Cell Line through the Inhibition of STAT3 Activity. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2017 Jun 9];280(13):13163–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673499>
341. Wu D, Sunkel B, Chen Z, Liu X, Ye Z, Li Q, et al. Three-tiered role of the pioneer factor GATA2 in promoting androgen-dependent gene expression in prostate cancer. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Mar 29];42(6):3607–22. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423874>
342. Ou Y, Zheng X, Gao Y, Shu M, Leng T, Li Y, et al. Activation of cyclic AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Mar 29];32(1):47.e21-47.e28. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24140250>
343. SEINO H, WU Y, MOROHASHI S, KAWAMOTO T, FUJIMOTO K, KATO Y, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 regulates the cisplatin-induced apoptotic pathway of human esophageal cancer cells Biomed Res [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 30];36(2):89–96. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25876658>

344. Pavlova T V., Kashuba VI, Muravenko O V., Yenamandra SP, Ivanova TA, Zabarovska VI, et al. Use of NotI microarrays in analysis of epigenetic and structural changes in epithelial tumor genomes by the example of human chromosome 3. *Mol Biol* [Internet]. 2009 Apr 26 [cited 2017 Jun 30];43(2):313–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S0026893309020137>
345. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* [Internet]. 1993 Oct 29 [cited 2017 Jun 30];262(5134):747–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235596>
346. Barrans SL, O'Connor SJM, Evans PAS, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2017 Jun 30];117(2):322–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2002.03435.x>
347. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, et al. Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* [Internet]. 1995 May 15 [cited 2017 Jun 30];85(10):2877–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742550>
348. Tiberi L, Bonnefont J, van den Ameele J, Le Bon S-D, Herpoel A, Bilheu A, et al. A BCL6/BCOR/SIRT1 Complex Triggers Neurogenesis and Suppresses Medulloblastoma by Repressing Sonic Hedgehog Signaling. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 Dec 8 [cited 2017 Jun 30];26(6):797–812. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25490446>
349. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Dec 24 [cited 2017 Jun 30];99(26):16899–903. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477932>
350. Mostovich LA, Prudnikova TY, Kondratov AG, Loginova D, Vavilov P V., Rykova VI, et al. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2011 Sep 28 [cited 2017 Jun 30];5(5):395–401. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21975548>
351. Lian Z-Q, Wang Q, Li W-P, Zhang A-Q, Wu L. Screening of significantly hypermethylated genes in breast cancer using microarray-based methylated-CpG island recovery assay and identification of their expression levels. *Int J Oncol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2014 Jun 10];41(2):629–38. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581028>
352. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung. *BMC Cancer* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jun 10];9:237. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716371&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
353. Rodriguez-Bravo V, Carceles-Cordon M, Hoshida Y, Cordon-Cardo C, Galsky MD, Domingo-Domenech J. The role of GATA2 in lethal prostate cancer aggressiveness. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2016 Nov 22 [cited 2017 May 22];14(1):38–48. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872477>
354. Prostate cancer incidence statistics | Cancer Research UK [Internet]. [cited 2017 Jun 11]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/prostate-cancer/incidence#heading-One>
355. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Jun 11];15(1):3866–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304396>

356. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 Apr 15 [cited 2017 Jun 11];89(8):3367–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565627>
357. Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet* [Internet]. 2004 Aug 15 [cited 2017 Jun 11];129C(1):65–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264274>
358. Eeles RA, Olama AA Al, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Mar 27 [cited 2017 Jun 11];45(4):385–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535732>
359. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA* [Internet]. 2016 Jan 5 [cited 2017 Jun 11];315(1):68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26746459>
360. Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, Skytthe A, Penney KL, Graff RE, et al. The Heritability of Prostate Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2017 Jun 11];23(11):2303–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812039>
361. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti D V, Schumacher F, Han Y, et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2014 Sep 14 [cited 2017 Jun 12];46(10):1103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217961>
362. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk V V, et al. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Oct 18 [cited 2016 Nov 3];13(10):13352–77. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202957>
363. Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, et al. Integrative Analysis of FOXP1 Function Reveals a Tumor-Suppressive Effect in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 May 23];28(12):2012–24. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2014-1171>
364. Shridhar R, Shridhar V, Rivard S, Siegfried JM, Pietraszkiewicz H, Ensley J, et al. Mutations in the arginine-rich protein gene, in lung, breast, and prostate cancers, and in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Dec 15 [cited 2017 May 22];56(24):5576–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971156>
365. Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Quinn SA, Rodriguez-Barrueco R, Lujambio A, Williams E, et al. A targetable GATA2-IGF2 axis confers aggressiveness in lethal prostate cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Feb 9 [cited 2017 Jun 12];27(2):223–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25670080>
366. Krupenko SA, Oleinik N V. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth Differ* [Internet]. 2002 May [cited 2017 May 24];13(5):227–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065246>
367. Oleinik N V, Krupenko NI, Krupenko SA. Epigenetic Silencing of ALDH1L1, a Metabolic Regulator of Cellular Proliferation, in Cancers. *Genes Cancer* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Jun 12];2(2):130–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779486>
368. Astin JW, Batson J, Kadir S, Charlet J, Persad RA, Gillatt D, et al. Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010 Dec 14 [cited 2017 May 22];12(12):1194–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076414>

369. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Jul 18];47(7):736–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26005866>
370. Ibeawuchi C, Schmidt H, Voss R, Titze U, Abbas M, Neumann J, et al. Genome-wide investigation of multifocal and unifocal prostate cancer-are they genetically different? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Feb 8];14(6):11816–29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709757&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
371. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* [Internet]. 2013 Dec 5 [cited 2017 Jun 14];32(49):5501–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752182>
372. Yoshioka S, King ML, Ran S, Okuda H, MacLean JA, McAsey ME, et al. WNT7A Regulates Tumor Growth and Progression in Ovarian Cancer through the WNT/ -Catenin Pathway. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2017 Feb 3];10(3):469–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232518>
373. Liu Y, Meng F, Xu Y, Yang S, Xiao M, Chen X, et al. Overexpression of Wnt7a Is Associated With Tumor Progression and Unfavorable Prognosis in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Feb 3];23(2):304–11. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00009577-201302000-00014>
374. Winn RA, Van Scoyk M, Hammond M, Rodriguez K, Crossno JT, Heasley LE, et al. Antitumorigenic effect of Wnt 7a and Fzd 9 in non-small cell lung cancer cells is mediated through ERK-5-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Sep 15

- [cited 2017 Feb 3];281(37):26943–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835228>
375. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, et al. Discovery of Novel Targets for Aberrant Methylation in Pancreatic Carcinoma Using High-Throughput Microarrays. *Cancer Res.* 2003;63(13).
376. Singh AP, Bafna S, Chaudhary K, Venkatraman G, Smith L, Eudy JD, et al. Genome-wide expression profiling reveals transcriptomic variation and perturbed gene networks in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Lett [Internet]*. 2008 Jan 18 [cited 2016 Dec 22];259(1):28–38. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977648>
377. Li T-H, Zhao H, Peng Y, Beliakoff J, Brooks JD, Sun Z. A promoting role of androgen receptor in androgen-sensitive and -insensitive prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2007 [cited 2016 Dec 22];35(8):2767–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426117>
378. Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol [Internet]*. 2009 Oct [cited 2017 Jun 14];19(5):298–309. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X09000674>
379. Bendas G, Borsig L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int J Cell Biol [Internet]*. 2012 [cited 2017 Apr 10];2012:1–10. Available from:
<http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2012/676731/>
380. Jones JCR, Hopkinson SB, Goldfinger LE. Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays [Internet]*. 1998 Dec 6 [cited 2017 Jun 14];20(6):488–94. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699461>
381. Calaluce R, Bearss DJ, Barrera J, Zhao Y, Han H, Beck SK, et al. Laminin-5 beta3A expression in LNCaP human prostate carcinoma cells increases cell migration and tumorigenicity. *Neoplasia [Internet]*. 2004 [cited 2017 Jun

- 14];6(5):468–79. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548355>
382. Morris LGT, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2017 Jun 15];121(9):1357–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557041>
383. Balaji KC, Rao PS, Smith DJ, Louis S, Smith LM, Sherman S, et al. Microarray analysis of differential gene expression in androgen independent prostate cancer using a metastatic human prostate cancer cell line model. [cited 2017 Jun 14]; Available from:
http://www.ihes.fr/~incitti/Mondor/Output/Db/Papiers/Queries/.Data/1_Interface/.Arborescence/0_Material/15283889/file.pdf
384. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1992 Jul 15 [cited 2017 Jun 15];1131(3):333–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352704>
385. Wurmbach JH, Hammerer P, Sevinc S, Huland H, Ergün S. The expression of angiopoietins and their receptor Tie-2 in human prostate carcinoma. *Anticancer Res* [Internet]. [cited 2017 Jun 15];20(6D):5217–20. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326698>
386. Zhu Y, Ren S, Jing T, Cai X, Liu Y, Wang F, et al. Clinical utility of a novel urine-based gene fusion TTTY15-USP9Y in predicting prostate biopsy outcome. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Jun 15];33(9):384.e9-384.e20. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26008593>
387. Chen X, Xu S, McClelland M, Rahmatpanah F, Sawyers A, Jia Z, et al. An Accurate Prostate Cancer Prognosticator Using a Seven-Gene Signature Plus Gleason Score and Taking Cell Type Heterogeneity into Account. Williams BO, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 28 [cited 2017 Jun 15];7(9):e45178. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045178>

388. Kang K-W, Lee M-J, Song J-A, Jeong J-Y, Kim Y-K, Lee C, et al. Overexpression of gooseoid homeobox is associated with chemoresistance and poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncol Rep* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Dec 22];32(1):189–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858567>
389. Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR, et al. C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* [Internet]. 1998 Jan [cited 2015 Dec 22];55(6):556–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778623>
390. Zhang T, Fan X, Song L, Ren L, Ma E, Zhang S, et al. c-Fos is involved in inhibition of human bladder carcinoma T24 cells by brazilin. *IUBMB Life* [Internet]. 2015 Mar [cited 2015 Dec 22];67(3):175–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25865820>
391. Grepmeier U1, Dietmaier W, Merk J, Wild PJ, Obermann EC, Pfeifer M, Hofstaedter F, Hartmann A WM. Deletions at chromosome 2q and 12p are early and frequent molecular alterations in bronchial epithelium and NSCLC of long-term smokers. - PubMed - NCBI. *Int J Oncol* [Internet]. 2005 [cited 2017 Jun 15];27(2):481–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010431>
392. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, et al. MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2005 Sep 21 [cited 2017 Jun 15];97(18):1330–8. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dji275>
393. Heaphy CM, Bisoffi M, Fordyce CA, Haaland CM, Hines WC, Joste NE, et al. Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *Int J Cancer* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2017 Jun 15];119(1):108–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21815>

394. Jonason AS1, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, Leffell DJ, Tarone RE BD. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. - PubMed - NCBI. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1996 [cited 2017 Jun 15];93(24):14025–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943054>
395. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. Cancer Cell Int [Internet]. 2007 [cited 2017 Jun 15];7:2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1838897/>
396. Haaland CM1, Heaphy CM, Butler KS, Fischer EG, Griffith JK BM. Differential gene expression in tumor adjacent histologically normal prostatic tissue indicates field cancerization. - PubMed - NCBI. Int J Oncol [Internet]. 2009 [cited 2017 Jun 15];35(3):537–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19639174>
397. Zhou R. The Eph family receptors and ligands. Pharmacol Ther [Internet]. 1998 Mar [cited 2016 Jan 11];77(3):151–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576626>
398. Li J-J, Liu D-P, Liu G-T, Xie D. EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. Oncogene [Internet]. 2009 Mar 9 [cited 2016 Jan 11];28(15):1759–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.15>
399. Romanuik TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TMK, Thomson T, et al. Novel Biomarkers for Prostate Cancer Including Noncoding Transcripts. Am J Pathol [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Jun 15];175(6):2264–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010607377>
400. Nadler RB, Koch AE, Calhoun EA, Campbel PL, Pruden DL, Bennett CL, et al. IL-1 β and TNF- α in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. J Urol [Internet]. 2000 Jul [cited 2016 Jul 24];164(1):214–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534705674976>

401. Haseeb A, Chen D, Haqqi TM. Delphinidin inhibits IL-1 β -induced activation of NF- κ B by modulating the phosphorylation of IRAK-1 Ser376 in human articular chondrocytes.
402. Guo Y, Kyprianou N. Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* [Internet]. 1998 Feb [cited 2017 Jan 19];9(2):185–93. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486855>
403. Zhang Q, Chen L, Helfand BT, Jang TL, Sharma V, Kozlowski J, et al. TGF- β Regulates DNA Methyltransferase Expression in Prostate Cancer, Correlates with Aggressive Capabilities, and Predicts Disease Recurrence. Wong C-M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Sep 30 [cited 2017 Jan 19];6(9):e25168. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025168>
404. Box C, Rogers SJ, Mendiola M, Eccles SA. Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2010 [cited 2017 May 15];20(3):128–38. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X10000465>

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григорь'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Viorolum. Cell.* 2013; 29(6): 499-505. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
2. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Zabarovsky ER, Kashuba VI, Grigorieva EV. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35 (4): 3237-45. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, аналіз результатів)*
3. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів в нормальній клітинній лінії та клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86 (2): 119-128. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
4. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, et al. Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis. *Dis Markers.* 2015; 2015: 241301. *(Особистий внесок: аналіз та узагальнення результатів та підготовка статті до друку)*
5. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Relative expression of cancer-associated genes in prostate tumor samples. *Exp oncology.* 2017; 39 (2): 1-8. *(Особистий внесок: виділення РНК зі зразків пухлин та умовно-нормальних тканин)*

передміхурової залози, синтез кДНК, дослідження рівнів експресії генів, статистична обробка результатів та підготовка статті до друку)

6. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Transcriptional profiling of normal and cancer prostate cell lines. Biopolym. Cell. 2013; 29 (special issue): P.19. VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine; 2013 May 28-29; Kyiv, Ukraine. Усна доповідь.
7. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Search for potential biomarkers of prostate cancer. Матеріали X міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2014 квіт. 8-11; Львів. 2014, с. 230-231. Стендова доповідь.
8. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis. Biopolym. Cell. 2014; 30 (special issue):14. VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 2014 May 20-21, Kyiv, Ukraine. Усна доповідь.
9. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Effect of D-glucuronyl C5-epimerase expression in prostate cancer cell lines. Ukr. Biochem. J. 2014; 86 (5), suppl. 2: 29. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу; 2014 жовт. 6-10, Київ. Усна доповідь.
10. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Molecular subtyping of prostate tumors. Матеріали XI міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2015 квіт. 20-23; Львів. 2015, с. 396. Усна доповідь.
11. Rosenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Bondarenko Yu, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. EACR Conference Series, materials of Meeting in Cancer Genomics; 2015 28 June- 1 July; Cambridge, UK. Стендова доповідь.
12. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку

передміхурової залози. Матеріали XIII З'їзду онкологів та радіологів України. 2016 травн. 26-28; Київ. 2016, с. 114-115. Усна доповідь.

ДОДАТОК Б

ПОСЛІДОВНОСТІ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ К-ЗТ-ПЛР У МОДЕЛЬНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЯХ АДЕНОКАРЦИНОМ ТА ЛІНІЇ НОРМАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Таблиця Б.1

Послідовності праймерів для к-ЗТ-ПЛР у модельних клітинних лініях аденокарцином та лінії нормального епітелію
передміхурової залози

№	Ген	Прямий праймер	Зворотній праймер	Довжина продукта, п.н.
0	1	2	3	4
1	<i>ACTA2</i>	5'-CCAGAGCCATTGTCACACAC-3'	5'-CAGCCAAGCACTGTCAGG-3'	91
2	<i>ACTB</i>	5'-CCTTGCACATGCCGGAG-3'	5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3'	112
3	<i>AGTR1</i>	5'-TTTGATCACCTGGGTCGAAT-3'	5'-TTGATCTAAAATGGCTGGGTTT-3'	114
4	<i>CAVI</i>	5'-CAAATGCCGTCAAAACTGTG-3'	5'-CGACCCTAAACACCTCAACG-3'	93
5	<i>CCNB2</i>	5'-GATTTTGCAGAGCAAGGCAT-3'	5'-TGGA AAAAGTTGGCTCCAAAG-3'	104
6	<i>CCNE1</i>	5'-CCCGGTCATCATCTTCTTTG-3'	5'-AGAAATGGCCAAAATCGACA-3'	125
7	<i>CDH1</i>	5'-GTCGAGGGAAAAATAGGCTG-3'	5'-GCCGAGAGCTACACGTTTAC-3'	117
8	<i>CDH2</i>	5'-GGCATAACCATGCCATCTT-3'	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'	123
9	<i>CDK5</i>	5'-ATTAGCAGGTTCTGGGGCTT-3'	5'-AATGGTGACCTCGATCCTGA-3'	119
10	<i>CSPG4</i>	5'-CTGCTGCCAGGAGAAGGA-3'	5'-TATGTTGGCCAGACTTGCAT-3'	143
11	<i>CXCL1</i>	5'-AACAGCCACCAGTGAGCTTC-3'	5'-GAAAGCTTGCCTCAATCCTG-3'	113
12	<i>CXCL2</i>	5'-GCTTCCTCCTTCCTTCTGGT-3'	5'-GGGCAGAAAGCTTGTCTCAA-3'	103
13	<i>CXCL6</i>	5'-GGCAATTTTATGATGCATGG-3'	5'-TTTGTCTGGACCCGGAAG-3'	110

0	1	2	3	4
14	<i>CXCR2</i>	5'-TCAAAGCTGTCACCTCCATGT-3'	5'-CTGCTCTTCTGGAGGTGTCC-3'	105
15	<i>DCN</i>	5'-CTCTGCTGATTTTGTGCCA-3'	5'-CTGTCAATGCCATCTTCGAG-3'	95
16	<i>EFNA5</i>	5'-ATGGTAGTCACCCCTCTGGA-3'	5'-CTGGATGTGTGTGTTTCAGCC-3'	106
17	<i>FAT1</i>	5'-CCTGATCGGTTGCAAAGACT-3'	5'-CCATTAGAGATGGCTCTGGC-3'	129
18	<i>FYN</i>	5'-TCCTTACATTGCACACAGCC-3'	5'-GCAGGATGCTGATCTAAACG-3'	132
19	<i>GAPDH</i>	5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'	108
20	<i>GLCE</i>	5'-TCTAGAACATCTCTGGTTTCAATTC-3'	5'-CCTTCTCTTCTCAGGGCTC-3'	117
21	<i>HBEGF</i>	5'-ATAAGCGATTTTCCACTGGG-3'	5'-ATATGTGAAGGAGCTCCGGG-3'	98
22	<i>HOXA13</i>	5'-GCGTATTCCCGTTCAAGTTC-3'	5'-CTCTGGAAGTCCACTCTGCC-3'	125
23	<i>IL1B</i>	5'-CCTGAAGCCCTTGCTGTAGT-3'	5'-AGCTGATGGCCCTAAACAGA-3'	112
24	<i>IL1RL1</i>	5'-ACACATGAGGCAGTTGGTGA-3'	5'-GTTGTGAAACTGTGGGCAGA-3'	121
25	<i>IL33</i>	5'-TATCATAAGGCCAGAGCGGA-3'	5'-GTGGAAGAACACAGCAAGCA-3'	112
26	<i>IL6</i>	5'-CATTTGTGGTTGGGTCAGG-3'	5'-AGTGAGGAACAAGCCAGAGC-3'	112
27	<i>IL8</i>	5'-AGCACTCCTTGGCAAACTG-3'	5'-CGGAAGGAACCATCTCACTG-3'	116
28	<i>KCNJ2</i>	5'-CTGGGAGCCTTGTGGTTCTA-3'	5'-ACTTCCACTCCATGTCCCC-3'	125
29	<i>KCNJ4</i>	5'-CTGTGTCCGTGCATGTCCT-3'	5'-CTTGGGATGTAGCGCCC-3'	112
30	<i>MKI67</i>	5'-GCTGGCTCCTGTTACGTA-3'	5'-CCTGTACGGCTAAAACATGGA-3'	128
31	<i>KIAA1199</i>	5'-AGAGTGAGCCAGCTGATGGT-3'	5'-ACTGTCTCGGCTACAGACCC-3'	105
32	<i>MME</i>	5'-TCCATGTTTTGGATCAGTCG-3'	5'-GTCCTGCTCCTCACCATCAT-3'	119
33	<i>MXRA5</i>	5'-AGCTCCAACCTGGTCAGTCC-3'	5'-GCATTGCTAGACACGTGGAA-3'	94
34	<i>MYO10</i>	5'-GGGTGCATAGCAGTCACCTT-3'	5'-TTCCTGTGCAGAAGGCATC-3'	102
35	<i>MYO1B</i>	5'-CATGACAAGCTTACTGGCCTC-3'	5'-TTTTATGAACTGAGCCCTCACA-3'	138
36	<i>NR5A2</i>	5'-TGTCGGTAAATGTGGTCGAG-3'	5'-CGAGTGGGCCAGGAGTAGTA-3'	111
37	<i>P16</i>	5'-GGGTCGGGTGAGAGTGG-3'	5'-CGAATAGTTACGGTTCGGAGG-3'	122
38	<i>P27</i>	5'-ACAGGATGTCCATTCCATGA-3'	5'-GGCCTCAGAAGACGTCAAAC-3'	147
39	<i>PAX8</i>	5'-AGGTCTACGATGCGCTGG-3'	5'-GATGCCTCACAACCTCCATCA-3'	111

0	1	2	3	4
40	<i>PCNA</i>	5'-CTAGCTGGTTTCGGCTTCAG-3'	5'-GGAGGCTCTAGCCTGACAAA-3'	123
41	<i>PKM2</i>	5'-CTGGGTCTGAATGAAGGCAG-3'	5'-TCCGGATCTCTTCGTCTTTG-3'	111
42	<i>PLAU</i>	5'-CCAGCTCACAATCCAGTCA-3'	5'-TGACCCACAGTGGAAAACAG-3'	100
43	<i>PLCBI</i>	5'-TACACCACTGTGATCATGCG-3'	5'-AGCCTTGTCAAAGATGCCAG-3'	122
44	<i>PLOD2</i>	5'-TTGGCTGACTGCATAAATCG-3'	5'-ACCCCTGGAATCCCTGTCT-3'	127
45	<i>PLXNA</i>	5'-GGTTTGAGAGGTCCACCAGG-3'	5'-CCGTGGCTGCCTATGACTAT-3'	93
46	<i>PREX1</i>	5'-AGGCCCTTCTCCACTGAGTC-3'	5'-CTCAACGAGATCTTGGGCAC-3'	113
47	<i>RASSF4</i>	5'-CCTCGATGATCAGAGTCCCT-3'	5'-GCTCTTAGGCCTGCTGAAAA-3'	95
48	<i>RHOF</i>	5'-GTTGTCGTAGCTGGTGGGAT-3'	5'-GGAGGTGACCCTGAACCTCT-3'	130
49	<i>RHOU</i>	5'-AGAGAGGCCTCAGCTTGTC-3'	5'-TCCCTACTGCCTTCGACAAC-3'	114
50	<i>RNASET2</i>	5'-CTCTGGCAAGGGCATCTTTA-3'	5'-GTACTTTGGCAGAAGCCTGG-3'	125
51	<i>S100A4</i>	5'-TGTTGCTGTCCAAGTTGCTC-3'	5'-AACTAAAGGAGCTGCTGACCC-3'	99
52	<i>SEMA3A</i>	5'-TGATAACTGGAGCTGTTGGC-3'	5'-GGAAGAACAATGTGCCAAGG-3'	100
53	<i>SERPINE1</i>	5'-TGGTGCTGATCTCATCCTTG-3'	5'-AGAAACCCAGCAGCAGATTC-3'	125
54	<i>SERPINE2a</i>	5'-AGGATTGAAGTGGGAGCAGA-3'	5'-CCTGGGGATCCAGCGAG-3'	115
55	<i>SERPINE2b</i>	5'-GCCATCGTCTCCAAGAAGAATA-3'	5'-ACCTCACACTGGAACACATC-3'	122
56	<i>SOX4</i>	5'-AATGTATGTTTCCCCCTCCC-3'	5'-TCGCTGTCGGGTCTCTAGTT-3'	106
57	<i>SPP1</i>	5'-AGATGGGTCAGGGTTTAGCC-3'	5'-CATCACCTGTGCCATAACCAG-3'	112
58	<i>SUFU</i>	5'-CATCTGTGGGTCCCTCTGTCA-3'	5'-GGCACGATACGTGTTCCAGT-3'	124
59	<i>TAGLN</i>	5'-GATTTTGGACTGCACTTCGC-3'	5'-GTCCGAACCCAGACACAAGT-3'	120
60	<i>TCF7L2</i>	5'-GCGTGAAGTGTTCAATTGCTG-3'	5'-GGGAGCCTCCAGAGTAGACA-3'	148
61	<i>TERT</i>	5'-CAGGATCTCCTCACGCAGAC-3'	5'-GAGCTGACGTGGAAGATGAG-3'	105
62	<i>THBS4</i>	5'-AAACCACCAAATGCACCTTC-3'	5'-AAGTTCAGCCACCATCTTCG-3'	134
63	<i>TNFRSF11B</i>	5'-GCTGATGAGAGGTTTCTTCG-3'	5'-GGGGACCACAATGAACAAGT-3'	125
64	<i>TPH1</i>	5'-TTTTTGATTTTCGGGACTCG-3'	5'-CCTTAAAGAATGAAGTTGGAGGA-3'	96
65	<i>TSC2</i>	5'-TGGCTGACCAGCATCTCATA-3'	5'-CCTCCTTGAGGATGTGAAG-3'	115

Продовження таблиці Б.1

0	1	2	3	4
66	WNT7A	5'-AGTGTGGTCCAGCACGTCTT-3'	5'-GAACTTGCACAACAACGAGG-3'	114

ДОДАТОК В

ГРАФІКИ ВІДНОСНИХ КІЛЬКОСТЕЙ ГЕНІВ *TAGLN*, *EFNA5*, *EPDR1*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1* У ГРУПАХ ДГПЗ, АДЕНОКАРЦИНОМ ТА УМОВНО-НОРМАЛЬНИХ ТКАНИН

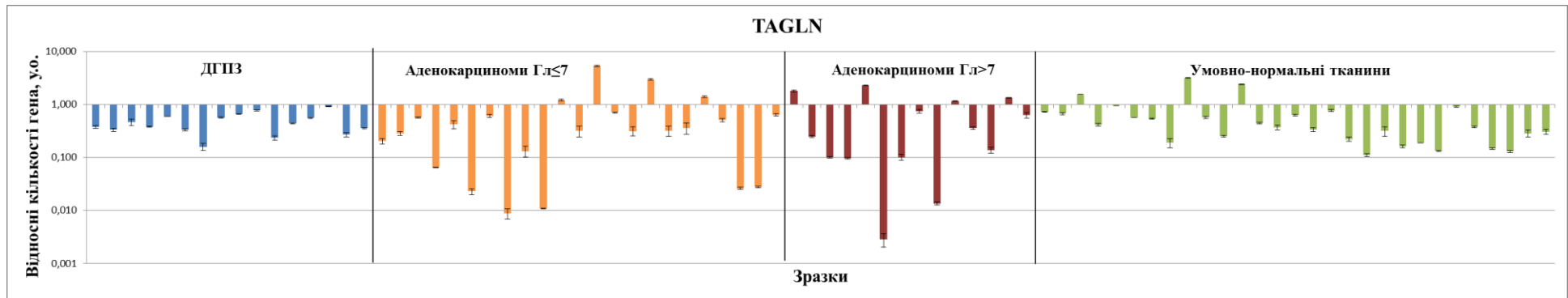


Рис. В.1. Відносні кількості гена *TAGLN* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

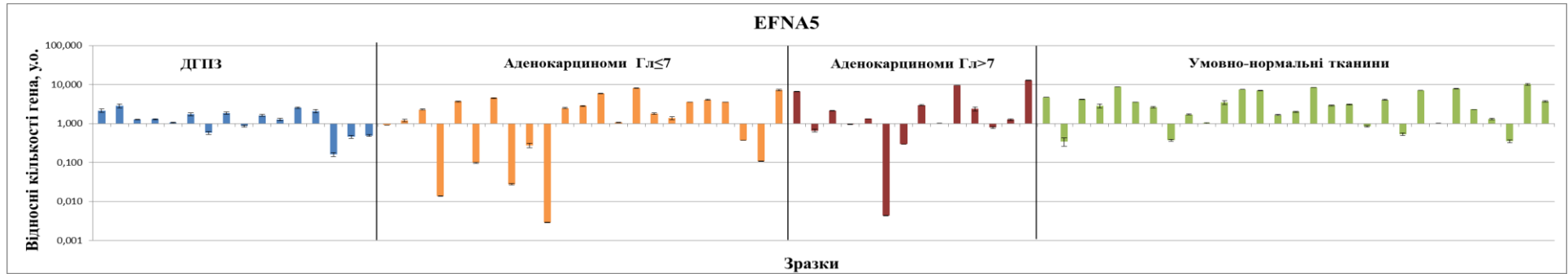


Рис. В.2. Відносні кількості гена *EFNA5* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

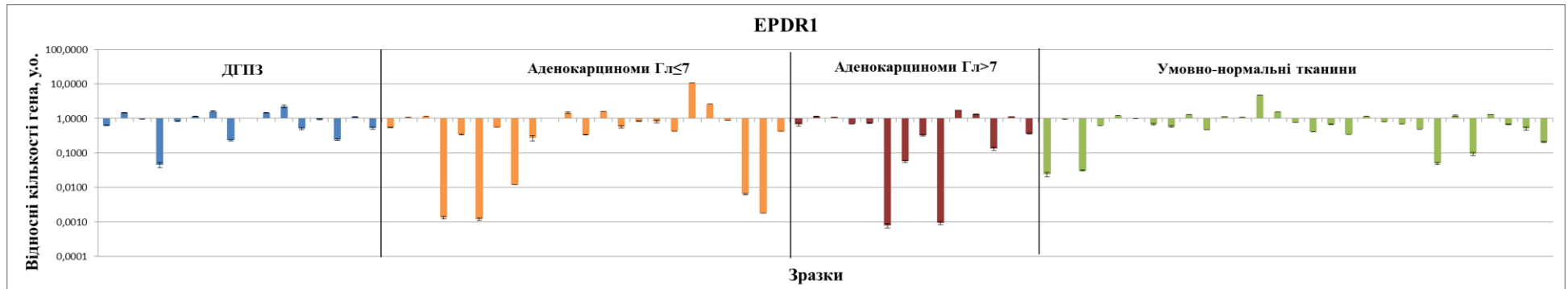


Рис. В.3. Відносні кількості гена *EPDR1* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

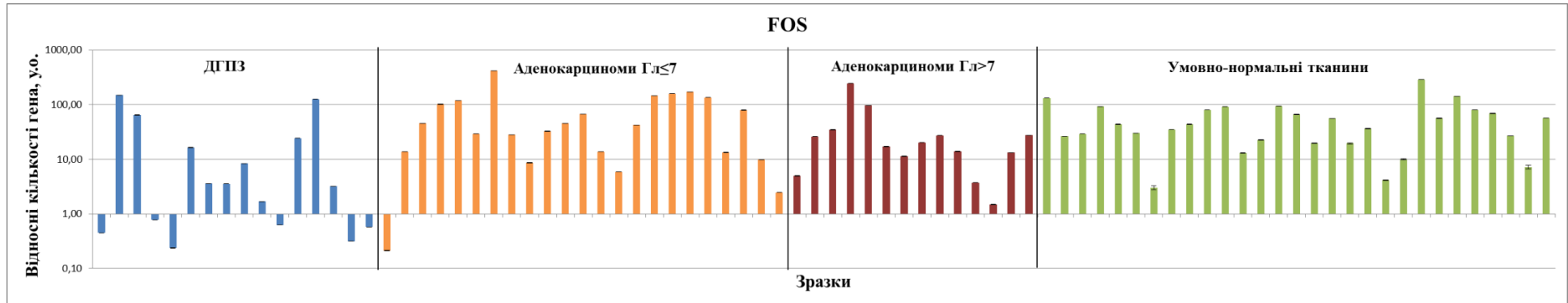


Рис. В.4. Відносні кількості гена *FOS* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ

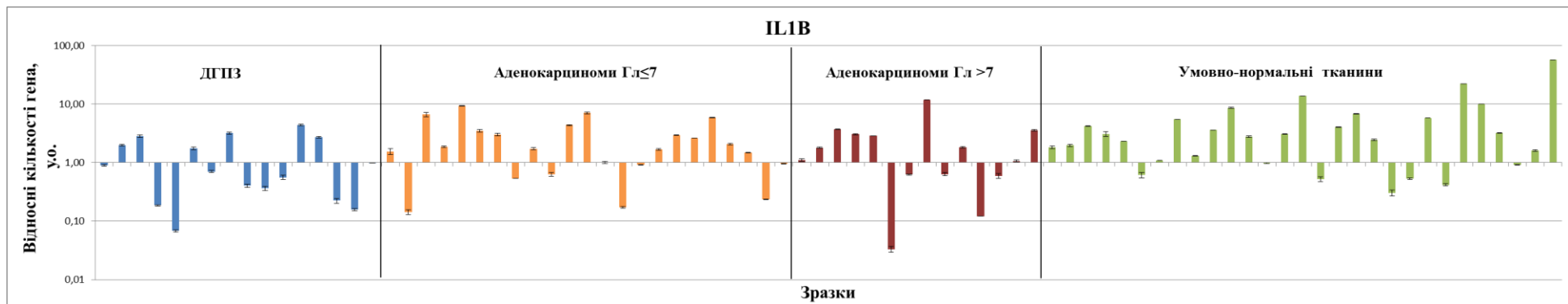


Рис. В.5. Відносні кількості гена *IL1B* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

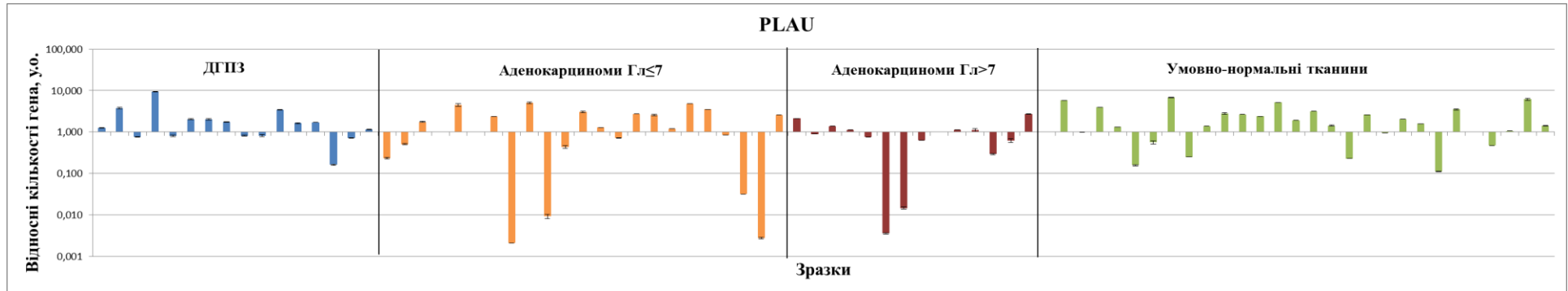


Рис. В.6. Відносні кількості гена *PLAU* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

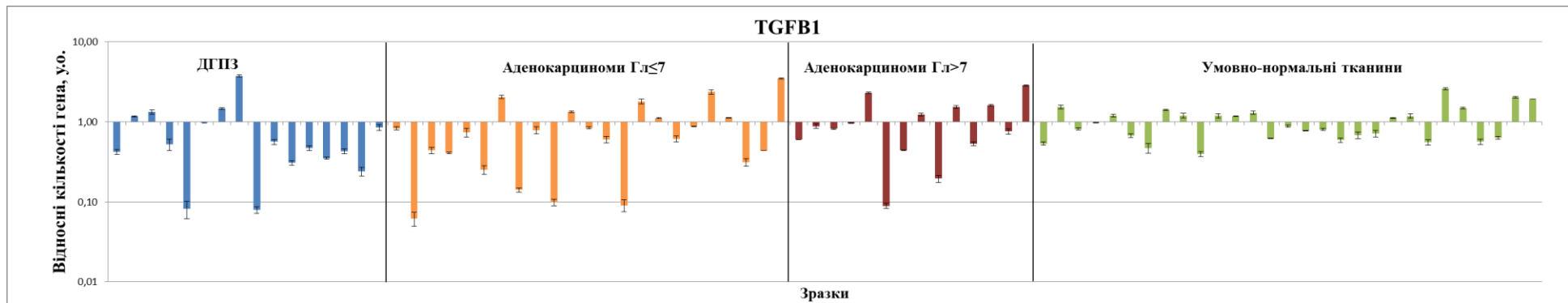


Рис. В.7. Відносні кількості гена *TGFB1* в індивідуальних зразках у групах ДГПЗ, аденокарцином та УНТ.

ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози; Гл – сума за шкалою Глісона. Блакитний колір - зразки ДГПЗ; помаранчевий колір – зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона ≤ 7 ; червоний колір - зразки аденокарцином із сумою за шкалою Глісона > 7 ; зелений колір – зразки УНТ.

ДОДАТОК Д

**ГРАФІКИ ОПИСОВОЇ СТАТИСТИКИ ВІДНОСНИХ КІЛЬКОСТЕЙ
ГЕНІВ *TAGLN*, *EFNA5*, *EPDR1*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI* У ГРУПАХ
ДГПЗ, АДЕНОКАРЦИНОМ ТА УМОВНО-НОРМАЛЬНИХ ТКАНИН**

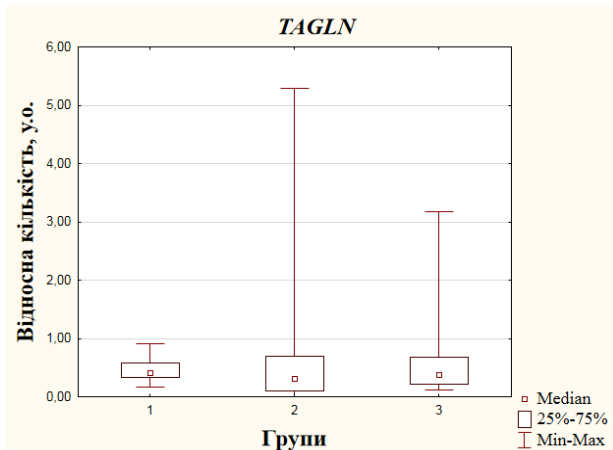


Рис Д.1. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *TAGLN* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

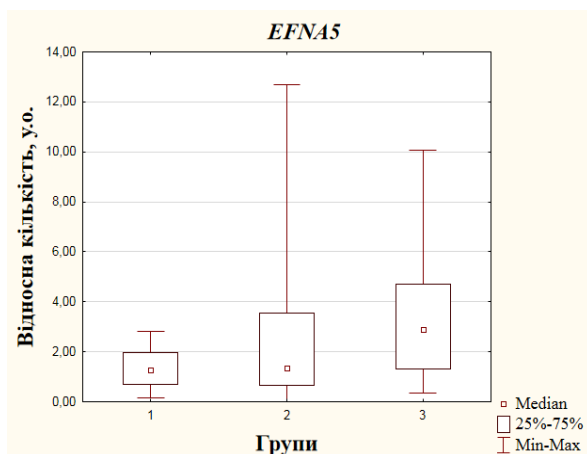


Рис Д.2. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *EFNA5* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

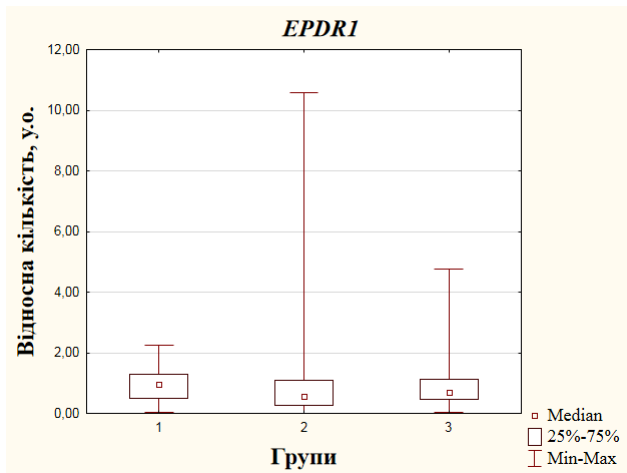


Рис Д.3. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *EPDR1* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

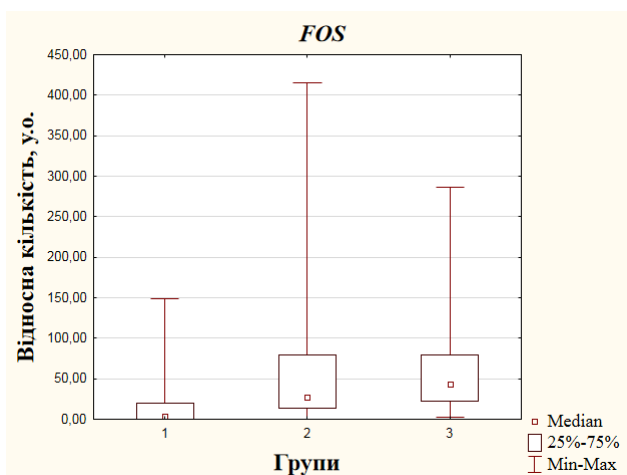


Рис Д.4. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *FOS* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

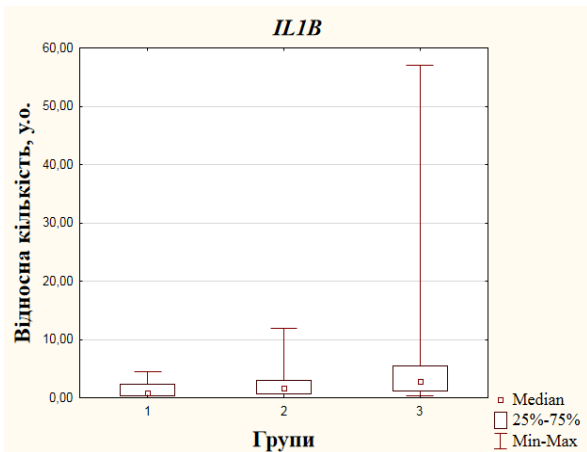


Рис Д.5. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *IL1B* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

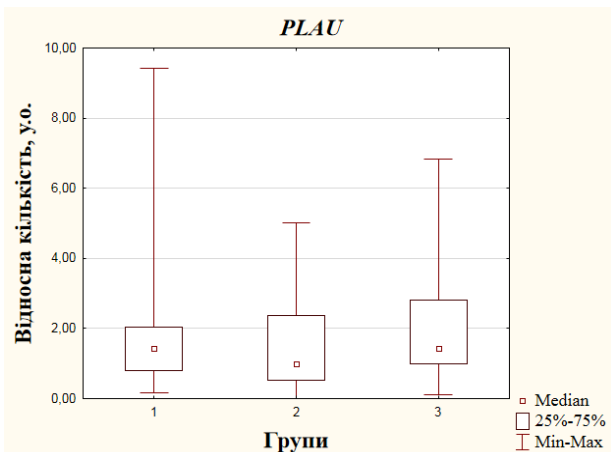


Рис Д.6. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей гена *PLA2* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

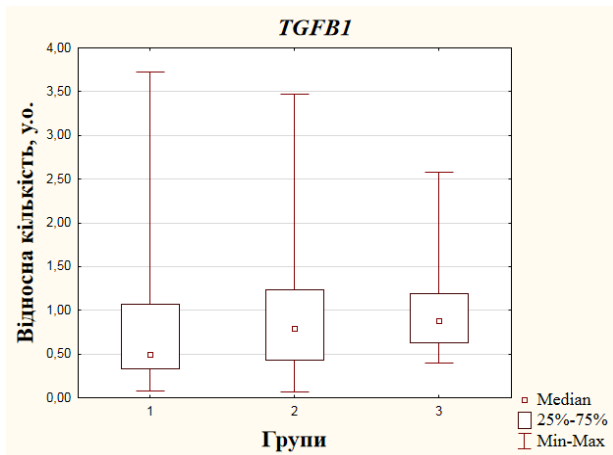


Рис Д.7. Коробковий графік описової статистики відносних кількостей генів *TGFBI* у групах ДГПЗ (1), аденокарцином (2) та умовно-нормальних тканин (3). Нижня та верхня сторони зовнішньої коробки відповідають першому та третьому квантилям, а внутрішня коробка відповідає медіані. Вуса визначають мінімальні і максимальні значення.

ДОДАТОК Е

ЧАСТОТА МЕТИЛЮВАННЯ/ДЕЛЕЦІЙ СЕРЕД ГЕНІВ З НАЙБІЛЬШИМ
ВІДСОТКОМ ЗМІН

Таблиця Е.1

Частота метилювання/делецій серед генів з найбільшим відсотком змін

№	NotI-сайт	Ген/локус	Локалізація	Частота метилювання/делецій		
				ДГПЗ	Аденокарциноми (GI ≤ 7)	Аденокарциноми (GI > 7)
1	2	3	4	5	6	7
1	NR5-IH18RS	<i>BHLHE40</i>	3p26.1	80% (14/15)	79% (11/14)	100% (4/4)
2	NR1-XM13C	<i>IQSEC1</i>	3p25.2	73% (11/15)	79% (11/14)	100% (4/4)
3	NR1-AK24R	<i>BCL6</i>	3q27	73% (11/15)	79% (11/14)	100% (4/4)
4	NL1-BA6R	<i>FOXP1</i>	3p14.1	67% (10/15)	79% (11/14)	100% (4/4)
5	NR1-KJ5R (C)	<i>FBLN2</i>	3p25.1	73% (11/15)	64% (9/14)	100% (4/4)
6	NR1-EP7RS	<i>CLASP2</i>	3p22.3	80% (12/15)	57% (8/14)	100% (4/4)
7	NL1Z216R (D)	<i>MANF</i>	3p21.1	80% (12/15)	64% (9/14)	75% (3/4)
8	NL1-GK21R (C)	<i>ROPNI/ KALRN</i>	3q13.3	60% (9/15)	79% (11/14)	100% (4/4)
9	NL4-AP18R (C)	<i>PLCL2</i>	3p24.3	53% (8/15)	86% (12/14)	75% (3/4)
10	NL1A401R (D)	<i>ITGA9</i>	3p21.3	60% (9/15)	71% (10/14)	100% (4/4)
11	NLJ-003RD	<i>CTDSPL (RBSP3)</i>	3p21.3	73% (11/15)	64% (9/14)	75% (3/4)
12	NL3003R (U)	<i>GORASP1/ TTC21A</i>	3p22-p21.33	67% (10/15)	71% (10/14)	75% (3/4)
13	NL3-CI2R (C)	<i>LOC285205</i>	3q13.12	73% (11/15)	57% (8/14)	100% (4/4)
14	NR5-FG18R (C)	<i>FSTL1</i>	3q13.33	73% (11/15)	57% (8/14)	100% (4/4)
15	NR1-WD21R (C)	<i>NEK11/ NUDT16</i>	3q22.1	60% (9/15)	64% (9/14)	100% (4/4)
16	NL3A001R (D)	<i>GNAI2</i>	3p21.31	53% (8/15)	64% (9/14)	100% (4/4)

№	NotI-сайт	Ген/локус	Локалізація	Частота метилювання/делецій		
				ДГПЗ	Аденокарциноми (GI ≤ 7)	Аденокарциноми (GI > 7)
1	2	3	4	5	6	7
17	NR1-AN24RS	<i>ABHD5/ C3orf77</i>	3p21	53% (8/15)	71% (10/14)	50% (2/4)
18	NR1-PD1R	<i>ZIC4</i>	3q24	47% (7/15)	64% (9/14)	100% (4/4)

Продовження таблиці Е.1

1	2	3	4	5	6	7
19	NL1-VJ14R (C)	<i>LOC285375</i>	3p25.1	60% (9/15)	43% (6/14)	100% (4/4)
20	NL4-BC8R (C)	<i>ALDH1L1</i>	3q21.3	33% (5/15)	79% (11/14)	75% (3/4)
21	NL1-YJ5R (C)	<i>C3orf46/ CHCHD6</i>	3q21.3	60% (9/15)	50% (7/14)	75% (3/4)
22	NL1-GC10C	<i>HMGB1L5 (Pseudo)</i>	3p24	67% (10/15)	43% (6/14)	50% (2/4)
23	NR5-FK16RS	<i>MINA</i>	3q11.2	40% (6/15)	57% (8/14)	100% (4/4)
24	NL1-FK10R (C)	<i>PPP2R3A</i>	3q22.1	33% (5/15)	64% (9/14)	100% (4/4)
25	NL1-ZD4R	<i>SOX2</i>	3q26.3-q27	40% (6/15)	57% (8/14)	100% (4/4)
26	NR1-NH1R (C)	<i>FGF12</i>	3q28	53% (8/15)	64% (9/14)	25% (1/4)
27	NR5-FK11R (C)	<i>CMTM8</i>	3p22.3	67% (10/15)	50% (7/14)	0% (0/4)
28	NL4-BH3R (C)	<i>GATA2</i>	3q21.3	20% (3/15)	71% (10/14)	100% (4/4)
29	NL4-BK12R (C)	<i>WNT7A</i>	3p25	40% (6/15)	43% (6/14)	100% (4/4)
30	NR1-WD23R (C)	<i>LRRC58</i>	3q13.33	53% (8/15)	29% (4/14)	100% (4/4)
31	NL4-BI4RS	<i>RAP2B</i>	3q25.2	47% (7/15)	57% (8/14)	25% (1/4)
32	NL1-ZP13R (C)	<i>KBTBD8</i>	3p14	47% (7/15)	50% (7/14)	25% (1/4)
33	NR1-WE11RS	<i>CGGBP1</i>	3p12-p11.1	33% (5/15)	43% (6/14)	100% (4/4)
34	HSJ4-AB7R (C)	<i>RPL32/ IQSEC1</i>	3p25.2	27% (4/15)	43% (6/14)	100% (4/4)
35	NL4-DP2RS	<i>FGD5</i>	3p25.1	33% (5/15)	36% (5/14)	100% (4/4)
36	NL1-CJ4R (C)	<i>NKIRAS1/ RPL15</i>	3p24.2	40% (6/15)	50% (7/14)	25% (1/4)
37	NL6-II3R	<i>USP19</i>	3p21.31	27% (4/15)	43% (6/14)	100% (4/4)

38	NL1268R (P65D)	<i>TMEM45A</i>	3q12.2	27% (4/15)	50% (7/14)	75% (3/4)
39	NR1-WJ2RS	<i>SOX14</i>	3q22-q23	27% (4/15)	57% (8/14)	50% (2/4)
40	NL1-VC9R (C)	<i>GPR149</i>	3q25.2	47% (7/15)	43% (6/14)	25% (1/4)
41	NR1-WH9R (C)	<i>RRP9/ PARP3</i>	3p21.2	47% (7/15)	29% (4/14)	50% (2/4)

Продовження таблиці Е.1

1	2	3	4	5	6	7
42	NR1-NC7RS	<i>PPM1M</i>	3p21.2	40% (6/15)	43% (6/14)	25% (1/4)
43	NR5-IG2R (C)	<i>KY</i>	3q22.2	60% (9/15)	14% (2/14)	50% (2/4)
44	NR1-WL7R (C)	<i>DZIP1L</i>	3q22.3	53% (8/15)	36% (5/14)	0% (0/4)
45	NR1-NM7R (C)	<i>B3GALNT1</i>	3q25	27% (4/15)	43% (6/14)	75% (3/4)
46	NL3-CA11RS	<i>LRRC3B</i>	3p24	27% (4/15)	29% (4/14)	100% (4/4)
47	NL6-AF21R (C)	<i>PDZRN3</i>	3p13	40% (6/15)	29% (4/14)	50% (2/4)
48	NL1A079R (D)	<i>EPHB1</i>	3q21-q23	27% (4/15)	36% (5/14)	75% (3/4)
49	NL3A006R (D)	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	20% (3/15)	36% (5/14)	75% (3/4)
50	NR1-WB21R (C)	<i>EPHB3</i>	3q27.1	40% (6/15)	36% (5/14)	0% (0/4)

Примітки: 1. ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози. 2. G1 - сума за шкалою Глісона.