

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**Tsirkuleeriva rakuvaba DNA metülatsioonitaseme
muutused kopsuvähi biomarkerina**

Magistritöö

Lõputöö maht (30 EAP)

Margot Saare

Juhendaja MD, PhD Neeme Tõnisson

Kaasjuhendajad PhD Kaie Lokk

MSc Madli Tamm

TARTU 2017

INFOLEHT

Tsirkuleeriva rakuvaba DNA metülatsioonitaseme muutused kopsuvähi biomarkerina

Käesoleva töö käigus töötati välja naatriumbisulfit-töötlusel, multipleks PCR-il ja ampliconipõhisel teise põlvkonna sekveneerimisel põhinev töövoog metülatsioonitaseme määramiseks cfDNA-s. Seejärel rakendati meetodit 32 kopsuvähiga uuritavate cfDNA ja *buffy* kihi DNA peal. Katsete tulemusena järeldati, et tsirkuleeriva rakuvaba DNA metülatsioonitaseme muutuste analüüsimine on potentsiaalselt kasutatav kopsuvähi diagnostilise biomarkerina.

Märksõnad: DNA metülatsioon, tsirkuleeriv rakuvaba DNA, kopsuvähk, biomarker, teise põlvkonna sekveneerimine.

B520 Üldpatoloogia, patoloogiline anatoomia

Altered methylation of circulating cell-free DNA as a biomarker of lung cancer

Sodium bisulfite treatment, multiplex PCR and amplicon-based next-generation based workflow was created to measure methylation levels in cfDNA. Methylation levels were analysed in plasma and *buffy coat* samples from 32 lung carcinoma patients. Based on results we concluded that analysing altered methylation levels in cell-free DNA can be potentially used as a biomarker for lung cancer diagnosis.

Key words: DNA methylation, cell-free DNA, lung cancer, biomarker, next-generation sequencing.

B520 General pathology, pathological anatomy

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	5
Kirjanduse ülevaade.....	6
Epigeneetika ja DNA metülatsioon.....	6
DNA metülatsiooni üldiseloostus.....	6
DNA metülatsiooni funktsionaalne tähendus.....	7
DNA metüültransferaasid ja DNA demetüülimine	9
Epigeneetilised muutused vähkkasvajas.....	11
DNA metülatsiooni muutused kopsuvähis	13
Metülatsiooni tuvastamise meetodid.....	15
Vedel biopsia.....	16
Eksperimentaalosa	19
Töö eesmärgid	19
Materjal ja meetodika.....	20
Meetodite väljatöötamine ning optimeerimine	20
Tervete vabatahtlike cfDNA eraldamine.....	20
DNA kontsentratsiooni ja pikkuse mõõtmine	20
Rakuvaba DNA metüleerimine	20
Lahjendusrea tegemine	21
Naatriumbisulfit-töötlus	21
Uuritavate kandidaatgeenide valik ning praimerite disain.....	21
Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine.....	24
Raamatukogu kvantifitseerimine ja sekvenerimine	25
Tulemuste analüüs	26
Uuritavad isikud	26
Uuritavate DNA eraldamine	29
Uuritavate DNA naatriumbisulfit-töötlus.....	30
Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine.....	31
Raamatukogu kvantifitseerimine ja sekvenerimine	31
Tulemuste analüüs	32
Tulemused.....	32
Meetodite väljatöötamine ning optimeerimine	32
DNA kontsentratsiooni mõõtmine.....	32
Uuritavate kandidaatgeenide valik ning praimerite disain.....	33
Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine.....	34
Sekvenerimistulemuste analüüs	35
Uuritavad isikud	36
Uuritavate DNA eraldamine	36
Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine.....	36
Sekvenerimistulemuste analüüs	37
Arutelu.....	43
Kokkuvõte.....	46
Summary	47
Tänuõnad	48
Kasutatud kirjanduse loetelu.....	49
Kasutatud veebiaadressid.....	58
Lisad.....	59
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	62

Kasutatud lühendid

CCDC181 – coiled-coil domain containing 181

CD01 – cysteine dioxygenase

cfDNA - *cell-free DNA*, rakuvaba DNA

CpG – tsütosiin-guaaniin dinukleotiid

DLEC1 – deleted in lung and esophageal cancer

FFPE – *formalin-fixed, paraffin-embedded*, formaliinis fikseeritud, paraffiini sisestatud

HOXA9 – homeobox A9

NR2E1 – nuclear receptor subfamily 2 group E member 1

NSCLC – *non-small cell lung cancer*, mitteväikerakuline kopsuvähk

ZNF154 – zinc finger protein 154

Sissejuhatus

Kopsuvähk põhjustab kõikidest vähitüüpidest enim surmajuhtumeid ning kuna kopsuvähi varajane diagnoosimine võib oluliselt suurendada elulemust, otsitakse uusi molekulaardiagnostilisi biomarkereid kasvaja varajaseks tuvastamiseks ja prognoosi määramiseks. Lisaks geneetilistele muutustele esinevad kartsinogeneesis ka epigeneetilised muutused ning vähkkasvajaid iseloomustab tuumorsupressorgeenide promootorregioonide CpG saarekete hüpermetülatsioon, mida saab kasutada kopsuvähi biomarkerina.

Tuumorsupressorgeenide CpG saarekete hüpermetülatsiooni saab analüüsida ka vedelas biopsias (enamasti vereplasma DNA-s), millel on eeliseid võrreldes tavapärase koematerjaliga. Vedel biopsia on väheinvasiivne ja peegeldab kasvaja heterogeensust, kuid samas on kasvajast pärinev tsirkuleeriv DNA vaid väike osa kogu tsirkuleerivast DNA-st ja seepärast tuleb vedela biopsia analüüsi puhul saavutada piisav tundlikkus.

Käesoleva töö eesmärkideks oli välja töötada töövoog metülatsioonimäära uurimiseks rakuvabas DNA-s ning seejärel väljatöötatud meetodi põhjal selgitada valitud geenide ja piirkondade metülatsioonitaseme muutuste kasutatavust rakuvabas DNA-s kopsuvähi potentsiaalse diagnostilise biomarkerina.

Kirjanduse ülevaade

Epigeneetika ja DNA metülatsioon

DNA metülatsiooni üldiseloostus

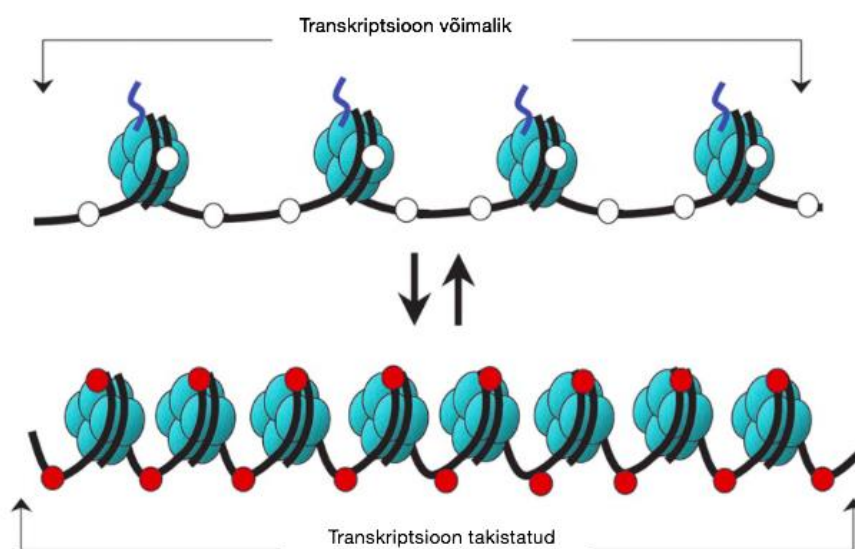
Epigeneetika uurib läbi rakutsükli päritavaid geeniekspressiooni muutusi, mis pole seotud muutustega DNA kodeerivas järjestuses (Egger *et al.*, 2004). Üheks enim uuritud epigeneetiliseks mehhanismiks on DNA metülatsioon, mis avastati esmakordselt 1948. aastal veise tüümusest (Hotchkiss, 1948).

DNA metülatsioon eukarüootides hõlmab endas tsütosiini 5' süsinikule metüülgrupi (-CH₃) lisamist peamiselt CpG (tsütosiin-guaaniin dinukleotiidi) kontekstis ning umbes 70-80% CpG dinukleotiididest on genoomis metüleeritud (Busche *et al.*, 2015). CpG-de arv inimese haploidses genoomis on umbes 28 miljonit (Rakyan *et al.*, 2011). Metüleerimata CpG dinukleotiide leidub peamiselt geeni promootorite lähedal tihedate klastritena, mida kutsutakse CpG saartekesteks (Cedar & Bergman, 2009). Umbes 70% geenide promootoritest asuvad CpG saarekete sees (Saxonov *et al.*, 2006). CpG saarekesed on peamiselt koduhoidja (*housekeeping*) geenide ja regulaatorgeenide promootorpiirkondades (Straussman *et al.*, 2009). Enamik geenisiseseid regioone on CpG-vaesed, kuid need vähesed CpG-d on samas tihedalt metüleeritud (Jones, 2012). Varasemalt on näidatud geenisiseste regioonide metülatsiooni positiivset korreleerumist geeniekspressiooniga (Ball *et al.*, 2009), kuid samas on näidatud ka geenisiseste regioonide metülatsiooni rolli transkriptsiooni elongatsiooni efektiivsuse vähendamisel (Lorincz *et al.*, 2004). Geenisiseste regioonide metülatsiooni täpse rolli ning mehhanismide väljaselgitamine vajaks veel edasist uurimist.

CpG dinukleotiidid on imetajate genoomis alaesindatud, sest metüleeritud tsütosiinid soodustavad potentsiaalselt mutatsioone (Bird, 1980). Spontaansel tsütosiini deamineerimisel tekib uratsiil, mida on võimalik efektiivselt eemaldada uratsiil DNA glükosülaasiga, kuid metüleeritud tsütosiini deamineerimisel tekib tümiin, mille eemaldamine on ebaefektiivne (Hermann *et al.*, 2004).

Rakud kontrollivad geeniekspressiooni pakkides DNA histoonivalkude ümber nukleosoomidesse. Geenid on ekspresseeritud, kui kromatiin on avatud ja inaktiveeritud, kui kromatiin on kondenseerunud (Rountree *et al.*, 2001). Metüleerimata DNA on sageli atsetüleeritud, kuid metüleeritud DNA on tihti deatsetüleeritud. DNA metülatsioon ja

histoonide deatsetülatsioon toimivad kooskõlas ning viivad kromatiini allasurutud seisundisse (joonis 1) (Fuks, 2005; Rodenhiser & Mann, 2006).



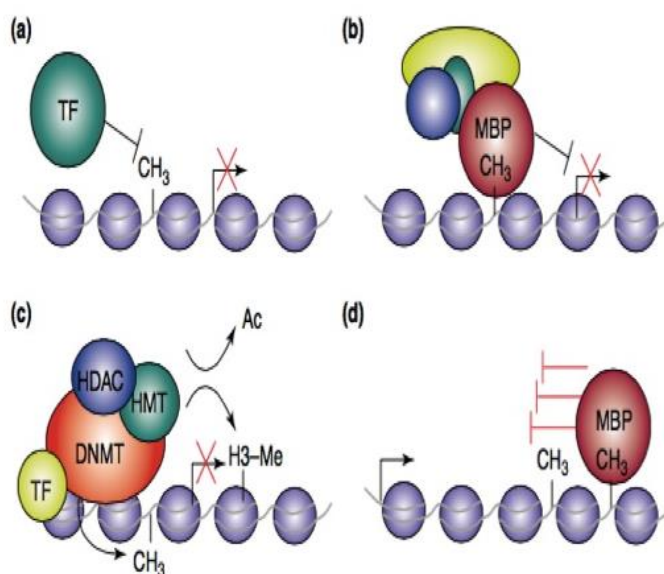
Joonis 1. Ekspresseeritud geene iseloomustab avatud kromatiin, millel on metüleerimata tsütosiinid (valged ringid) ja atsetüleeritud histoonid (sinised sabad). Vaigistatud geene iseloomustab kondenseerunud kromatiin, metüleeritud tsütosiinid (punased ringid) ja deatsetüleeritud histoonid. Kromatiini seisundid on pöörduvad (Rodenhiser & Mann, 2006).

Lisaks esineb imetajate genoomis ka hüdroksümetülatsiooni, mis seisneb 5-metüültsütosiini (*5-methylcytosine*, 5-mC) metüülgrupi oksüdatsioonis (Kriaucionis & Heintz, 2009). 5-hüdroksümetüültsütosiini (*5-hydroxymethylcytosine*, 5-hmC) funktsioon on veel ebaselge, kuid see võib omada olulist rolli DNA demetülatsioonis ja seeläbi geeniekspressiooni reguleerimisel (Moore *et al.*, 2013). Inimestel esineb kõrge 5-hmC tase ajus, maksas, neerus ning kolorektaalsetes kudedes. Kopsus on 5-hmC tase madal (Li & Liu, 2011). Uuringud on näidanud, et kartsinogeneesi korral väheneb 5-hmC tase oluliselt (Haffner *et al.*, 2011; Li & Liu, 2011; Liu *et al.*, 2013).

DNA metülatsiooni funktsionaalne tähendus

DNA metülatsiooni üks oluline funktsioon on geeniekspressiooni reguleerimine. DNA metülatsioon võib takistada transkriptsioonifaktorite seondumist märklaua-DNA järjestustele ning läbi selle vaigistada transkriptsiooni (joonis 2a) (Yin *et al.*, 2017). Lisaks on näidatud, et MeCP2 (*methyl CpG-binding protein 2*, metüleeritud CpG-d siduv valk 2) toob kohale ko-repressorid ja selle kaudu toimub samuti transkriptsiooni vaigistamine (joonis 2b) (Lyst *et al.*, 2013). DNA metüültransferaasid toimivad sageli üheaegselt histoonide modifitseerivate ensüümidega, mis takistavad transkriptsiooni läbi vaigistava kompleksi tekke (joonis 2c)

(Chang *et al.*, 2011). Samuti on näidatud, et metülatsioon geenisisestes alades võib initsieerida kinnise kromatiini struktuuri teket, mis vähendab RNA polümeraas II elongatsiooni efektiivsust (joonis 2d) (Lorincz *et al.*, 2004).



Joonis 2. DNA metülatsiooni poolt vahendatud geeniekspressiooni vaigistamise mehhanismid: (a) transkriptsioonifaktorite seondumine DNA-le on takistatud, (b) metüleeritud CpG-sid siduvad valgud toimivad koos ko-repressoritega transkriptsiooni vaigistamisel, (c) metüültransferaaside interaktsioon histoonide modifitseerijatega takistab geeniekspressiooni ja (d) tihe metülatsioon geenisisestes regioonides mõjutab transkriptsiooni elongatsiooni. T - transkriptsioonifaktor, MBP - metüleeritud CpG-sid siduvad valgud, DNMT - DNA metüültransferaasid, HMT - histoonide metüültransferaasid, HDAC - histoonide deatsetülaasid (Klose & Bird, 2006).

Metüleeritud CpG saarekesed asuvad tavaliselt geenides, millel on vajalik pikaajaline vaigistatud seisund, nagu näiteks vermitud ja inaktiivsel X-kromosoomil asetsevad geenid (Jones, 2012). Samuti on DNA tihedalt metüleeritud korduvates elementides, mis põhjustab retroviiruste, LINE1 elementide (*long interspersed nuclear elements*, pikad insertioonilised tuuma hajuskorduselemendid) ja Alu-järjestuste vaigistamise (Yoder *et al.*, 1997).

Lisaks on CpG saarekeste metülatsioonil roll nii embrüonaalsel arengul kui ka rakkude diferentseerumisel - metülatsioonimustrid on loote frontaalse korteksi arengu ajal dünaamilised (Schneider *et al.*, 2016) ning on näidatud, et DNA metülatsiooni kadu soole tüvirakkude geenide enhanserelementides põhjustab rakkude hilinenud diferentseerumise (Sheaffer *et al.*, 2014). Samuti on uuritud ülegenoomset DNA metülatsiooni enne ja pärast patogeensete bakterite infektsiooni inimeste dendriitrakkudes. Leiti, et demetülatsioon toimub ka immuunsüsteemi transkriptsioonifaktorite enhanserelementides ja seega on metülatsioon oluline immuunsüsteemi töös (Pacis *et al.*, 2015). Metülatsioonimustrite muutused omavad rolli

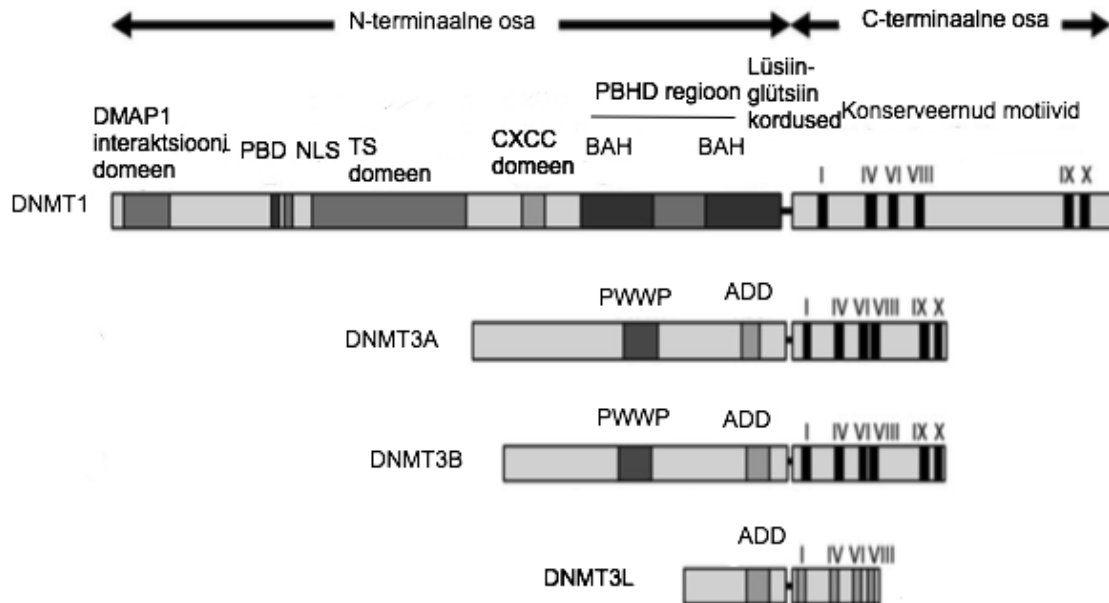
erinevates haigustes, nagu näiteks vähkkasvajates (Hulbert *et al.*, 2016) ning neurodegeneratiivsetes haigustes (Smith *et al.*, 2016).

Kõige enam esineb metüleeritud DNA-d inimese tüümuses ja ajus ning kõige vähem platsenta DNA-s (Ehrlich *et al.*, 1982). 5-mC taseme muutust ajus on seostatud Alzheimeri tõvega (Coppeters *et al.*, 2014). Platsenta korduvate elementide metülatsiooni muutusi on seostatud loote kasvu ja *in utero* kokkupuutega kindlate keskkonnas olevate ühendite nagu ksenoöstrogeenidega (Wilhelm-Benartzi *et al.*, 2012; Vilahur *et al.*, 2014).

DNA metüültransferaasid ja DNA demetüülimine

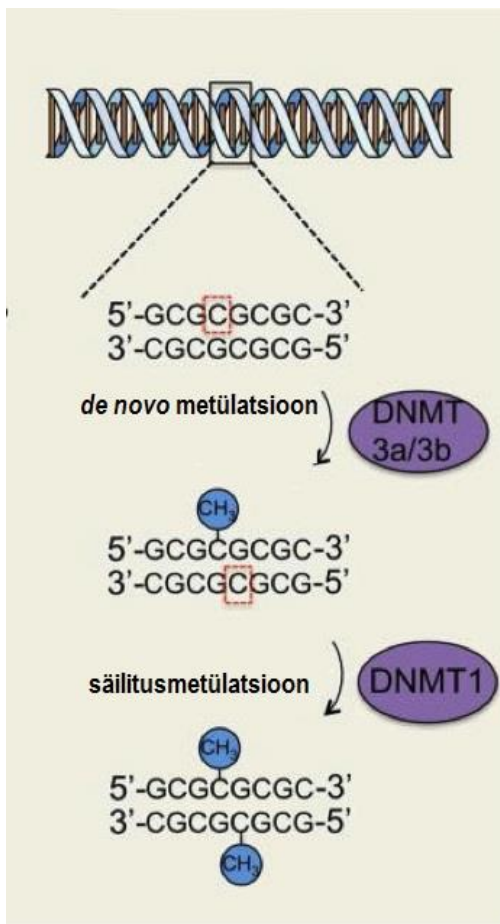
Imetajatel toimub sugurakkudes ja preimplantatsioonilistes embrüodes ülegenoomne DNA metülatsiooni reprogrammeerimine. See on vajalik olemasoleva epigeneetilise informatsiooni eemaldamiseks ja süsteemi taaskäivitamiseks uuel arenguetapil (Wang *et al.*, 2004).

DNA metüleerimist viivad läbi DNA metüültransferaasid (*DNA methyltransferase*, DNMT), mis katalüüsivad metüülrühma ülekandmist ko-faktorilt S-adenosüül-L-metioniinilt tsütosiinjäägi 5' süsiniku positsioonile. Metüültransferaasid on vastutavad tsütosiini metülatsioonimustrite säilimises nii replikatsioonil kui ka *de novo* metülatsioonis (Goll & Bestor, 2005). Imetajates esineb kolme tüüpi DNA metüültransferaase: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ning lisaks eksisteerib DNMT3L, mille puudub katalüütiline aktiivsus. Metüültransferaasid koosnevad reguleerivast N-terminaalsest osast, mis sisaldab funktsionaalseid domeene ja katalüütilisest C-terminaalsest osast, mis koosneb konserveerunud aminohappe motiividest (joonis 3) (Jurkowska *et al.*, 2011).



Joonis 3. DNA metüültransferaaside N-terminaalsed ja C-terminaalsed osad. Märjitud on N-terminaalse osa funktsionaalsed domeenid ning C-terminaalse osa konserveerunud aminohappe motiivid rooma numbrites. Lühendid: DMAP1 - DNMA metüültransferaasiga seotud valk 1, PBD - jagunevate rakkude tuuma antigeeni seondav domeen, NLS - tuuma lokalisatsioonisignaal, PWWP - proliin-trüptofaan motiiv, ADD - *ARTRX*-DNMT3-DNMT3L domeen, TS - *targeting sequence*, BAH - *bromo-adjacent homology*, BPHD - *polybromo homology domain* (Jurkowska *et al.*, 2011).

DNMT1 on peamiselt vastutav metüülatsiooni säilitamise eest, kopeerides metüülatsioonimustri uuele sünteesitud DNA-ahelale peale DNA replikatsiooni (joonis 4). DNMT1 omab 30 kuni 40-kordset eelistust hemimetüleeritud substraadile (Goyal *et al.*, 2006) ning on kõrgelt ekspresseeritud jagunevates rakkudes (Robertson *et al.*, 1999). DNMT3a ja DNMT3b metüleerivad metüleerimata ja hemimetüleeritud DNA-d ja on vastutavad metüülatsioonimustrite loomisel varajases imetajate arengus (joonis 4) (Okano *et al.*, 1999). Lisaks on leitud, et DNMT3a ja DNMT3b on ekspresseeritud eelkõige diferentseerumata tüvirakkudes ja embrüonaalses koes (Jurkowska *et al.*, 2011). DNMT3a toimib tüvirakkude proliferatsioonil ning DNMT3b võtab osa tüvirakkude diferentseerumise initsiatsioonist (Umehara *et al.*, 2013). DNMT3L toimib koos transkriptsioonifaktoritega ja soodustab seeläbi DNMT3a ja DNMT3b *de novo* metüülatsiooni (Pacaud *et al.*, 2014). Hiljuti on näidatud, et DNMT3a ja DNMT3b-l on kaitsev roll epidermise tuumorigeneesis (Rinaldi *et al.*, 2017).



Joonis 4. Metüültransferaaside skeem. Näidatud on metüülrühma lisamine 5' süsinikule ning *de novo* metüültransferaasi ja säilitus-metüültransferaasi mehhanismid (Heyward & Sweatt, 2015).

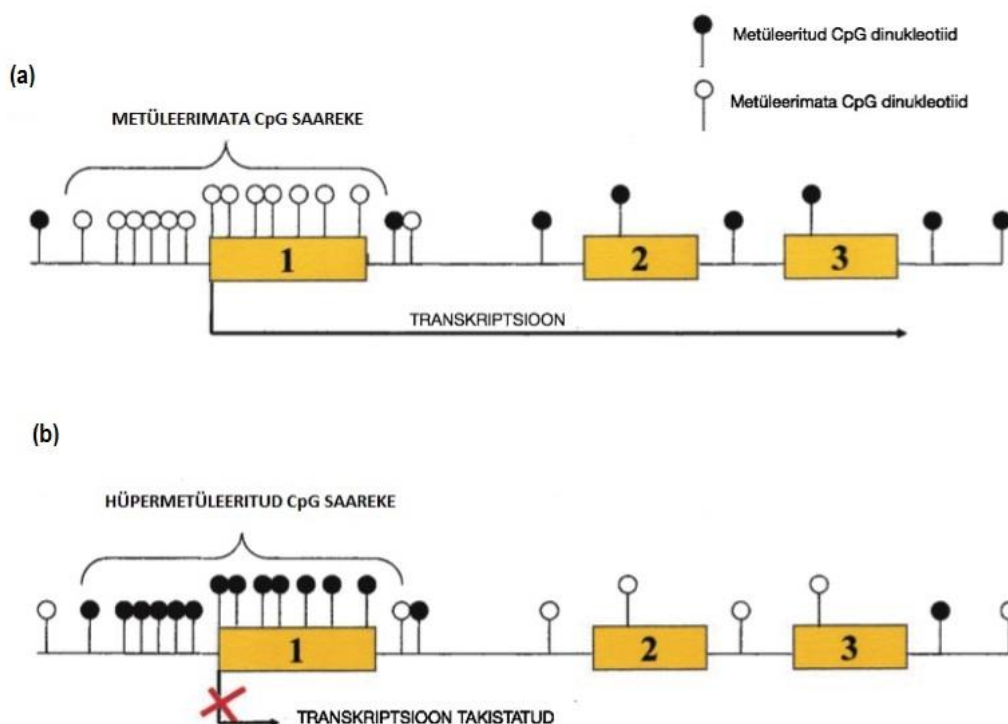
DNA demetüülimine võib toimuda passiivselt, kui DNA replikatsioonil remetüülatsiooni ei toimu (Valinluck & Sowers, 2007) või aktiivselt TET (*ten-eleven translocation*) valkude osalusel. TET valgud vahendavad 5-mC oksüdeerumist 5-hmC-ks (Guo *et al.*, 2011).

Epigeneetilised muutused vähkkasvajas

Kartsinogeneesis toimuvad selliste geneetiliste ja epigeneetiliste muutuste kuhjumised, mis põhjustavad onkogeenide, tuumorsupressorgeenide ja stabiliseerivate geenide (nende hulka kuuluvad geenid, mis parandavad DNA replikatsioonil vigu) düsregulatsiooni (Vogelstein & Kinzler, 2004). Kuigi somaatilised kõrvalekalded nagu mutatsioonid ja koopianumbri muutused omavad suurt rolli, on sihtmärkgeenide metüülatsioonitaseme muutused sagedasemad (Chan *et al.*, 2008). Samuti eksisteerivad geneetiliste ja epigeneetiliste mehhanismide vahel seosed – epigeneetilised modifikatsioonid võivad soodustada punktmutatsioonide teket ja geneetilised mutatsioonid võivad mõjutada metüülatsioonimustrit (Brena & Costello, 2007). Näiteks on avastatud, et rohkem kui 30% haigustega seotud iduliini punktmutatsioone toimuvad CpG dinukleotiidides (Rideout *et al.*, 1990).

Vähkkasvajale on iseloomulik globaalne hüpermetülatsioon ja promootorite CpG saarekete hüpermetülatsioon (Ehrlich, 2002). Promootorregioonide hüpermetülatsioon on seotud transkriptsiooni vaigistamisega ning inaktiveerib tuumorsupressorgeene, mis mõjutavad raku protsesse nagu rakutsükli regulatsioon (Wang *et al.*, 2012), DNA reparatsioon (Kordi-Tamandani *et al.*, 2010), apoptoos (Liu *et al.*, 2012) ja ravimite resistentsus (Arnold *et al.*, 2003). Globaalne hüpermetülatsioon kopsuvähis viib genoomi ebastabiilsuseni läbi retrotransposoonide suurenenud geeniekspressiooni (Daskalos *et al.*, 2009).

Enamasti on CpG saarekesed metüleerimata ja seega võimaldavad geeniekspressiooni toimumist (joonis 5a). Tuumorirakkudes on teatud tuumorsupressorgeenide CpG saarekesed hüpermetüleeritud, mis takistab transkriptsiooni (joonis 5b) (Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011). Sellise *de novo* anormaalse metülatsiooni põhjuseks on pakutud kahte mehhanismi. Vähkkasvaja korral levib metülatsioon normaalsetest metülatsioonitsentritest (näiteks Alu regioonid) metülatsioonivabade promootor CpG saarekestesse, mis asuvad lähedal (Wang *et al.*, 2011). Teiseks võimaluseks pakutakse metülatsiooni “külvamist”, kus kindlad CpG dinukleotiidid metüleeritakse ning see soodustab omakorda rohkemate CpG-de metüleerimist (Peng *et al.*, 2012).



Joonis 5. Tuumorsupressorgeeni CpG saarekete erinevus normaalses ja vähirakus. (a) metüleerimata CpG saarekesed võimaldavad transkriptsiooni, (b) hüpermetüleeritud CpG saarekesed takistavad transkriptsiooni (Esteller, 2002).

Erinevalt mutatsioonidest võivad DNA metülatsioon ja histoonide modifikatsioonid olla

Tuumorsupressorgeenide inaktivatsioon läbi promootorite hüpermetülatsiooni toimub tavaliselt juba varajases kartsinogeneesis ja on seega potentsiaalne biomarker vähi diagnoosimisel (Brock *et al.*, 2008). Lisaks saab DNA metülatsiooni uurida ka erinevatest mitte- või väheinvasiivselt kogutavatest bioloogilistest vedelikest, nagu näiteks rögast (Hulbert *et al.*, 2016), verest (Hardy *et al.*, 2016) ja bronhoalveolaarsest lavaažist (Ren *et al.*, 2017).

Kopsuvähi korral on DNA metülatsioonimustrite muutusi sageli leitud näiteks *RASSF1A* (*ras association domain family member 1*), *CDKN2A* (*cyclin dependant kinase inhibitor 2A*), *CHD13* (*cadherin 13*) ja *APC* (*APC, WNT signaling pathway regulator*) geenides (Tsou *et al.*, 2002). 2013. aasta meta-analüüsis näidati, et kopsuvähi koes on *CDKN2A* geeni promootori hüpermetülatsiooni esinemissagedus 17-80% (Gu *et al.*, 2013). Mõned kopsuvähi korral esinevad epigeneetilised muutused võivad olla seotud suitsetamisega ehk nende esinemissagedus on suurem suitsetajatel kui mittesuitsetajatel. Sellisteks on näiteks *APC* (Toyooka *et al.*, 2003), *RASSF1A* ja *CDKN2A* geenide hüpermetülatsioon (Huang *et al.*, 2015).

Hüpometülatsiooni seostatakse genoomse ebastabiilsusega, mis võib põhjustada onkogeenide aktivatsiooni (Hur *et al.*, 2014). Kopsuvähis toimub hüpometülatsioon sagedamini tuumaelementides, pikkades terminaalses kordusjärjestustes (*long terminal repeats*, LTR), segmentaalsetes duplikaatides ja subtelomeersete alade korduvates järjestustes (Rauch *et al.*, 2008). Geenispetsiifilist hüpometülatsiooni on täheldatud näiteks *MAGE* (*melanoma-associated antigen*) geenis, mille hüpometülatsioonist põhjustatud üleekspressiooni esineb 75-80% mitteväikerakulise kopsukartsinoomi puhul (Jang *et al.*, 2001).

Uute biomarkerite avastamine on oluline kasvajate varajaseks diagnoosiks ja ravimivastuse ennustamiseks. *CDKN2A* hüpermetülatsioon on mõnede kopsuvähi tüüpide korral varajase kartsinogeneesi tunnuseks ning on näidatud, et *CDKN2A* promootorite hüpermetülatsioon on tuvastatav rögast isegi kuni 3 aastat enne kopsuvähi kliinilist diagnoosi (Palmisano *et al.*, 2000). Paljud hüpermetüleeritud tuumorsupressorgeenid kopsuvähis annavad infot haiguse prognoosi kohta. Näiteks 2011. aasta meta-analüüsis näidati, et *RASSF1A* promootori hüpermetülatsiooni seostati halva prognoosiga I – II staadiumi NSCLC patsientidel, seega sellised patsiendid võiksid saada kasu agressiivsemast ravist (Wang *et al.*, 2011). *RASSF1A*, *HOXA9* (*homeobox A9*), *ALX1* (*ALX homeobox 1*), *NPBWR1* (*neuropeptides B and W*

receptor 1), *PCDHGB6* (*protocadherin gamma subfamily B, 6*), *HIST14HF* (*histone cluster 1 H4 family member F*) geenide hüpermetülatsioonil leiti seos lühema haigusvaba elulemusega I staadiumi NSCLC puhul (Sandoval *et al.*, 2013). Hiljuti on näidatud ka tuumorsupressorgeeni *ZAR1* (*zygote arrest 1*) inaktivatsiooni läbi CpG saarekete hüpermetülatsiooni kopsuvähis (Richter *et al.*, 2017) ning *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*) metülatsiooni seost väiksema kasvaja suurusega ja pikema elulemusega (Duppel *et al.*, 2016).

Metülatsiooni tuvastamise meetodid

Enamik meetodeid DNA metülatsiooni tuvastamiseks sõltuvad naatriumbisulfit-töötlustest, restriksiooniensüümidega töötlemisest või afiinsuspõhisel rikastamisel, mida saab kombineerida sekveneerimise või hübriidsatsioonimeetoditega (Kurdyukov & Bullock, 2016).

Naatriumbisulfit-töötlus deamineerib metüleerimata tsütosiinid uratsiiliks, kuid jätab metüleeritud tsütosiinid töötlemata. Peale PCR-i on metüleerimata tsütosiinid nähtavad tümiinidena ja metüleeritud tsütosiinid jäävad tsütosiinideks (Popp *et al.*, 2010). Pärast töötlust on võimalik CpG saarekete metülatsioonitaset tuvastada näiteks pürosekveneerimisega, metülatsioonispetsiifilise PCR-ga (Draht *et al.*, 2016) või ülegenoomse bisulfitsekveneerimisega (Lou *et al.*, 2014). Kasutusel on ka DNA metülatsiooni mikrokiibid, millega on võimalik korraka paljusid CpG saite analüüsida (Moran *et al.*, 2015). Suure katvusega bisulfitsekveneerimisega saab paralleelselt analüüsida mitmeid CpG saite. Kui bisulfit-töötlus on viidud läbi nõutud tingimustel, on metüleerimata tsütosiinide konversiooni efektiivsus kuni 99% (Taylor *et al.*, 2007). Bisulfit-töötluste konversiooni efektiivsust mõjutavad valkudega kontaminatsioon, DNA kvaliteet ja kaheahelalise DNA olemasolu bisulfit-reaktsioonis (Warnecke *et al.*, 2002).

Metülatsiooni saab tuvastada ka restriksiooniensüümidega, mis tunnevad ära ja lõikavad DNA järjestusi erinevalt sõltuvalt metüleeritud tsütosiini olemasolust. Paljud restriksiooniensüümid ei lõika metüleeritud järjestusi (Laird, 2010). Miinuseks on see, et analüüsida saab ainult kindla mustriga CpG saite, kus on ensüümi äratundmissait (Pan *et al.*, 2010). Restriksiooniensüüme on eelnevalt kombineeritud ka koos kiibipõhise hübriidsatsiooniga. Näiteks DMH (*differential methylation hybridization*), mis on kõrge läbilaskega DNA metülatsiooni uurimise meetod, mille puhul kasutatakse restriksiooniensüüme, et metüleeritud DNA fragmente hübriidiseerida CpG saarekete

mikrokiibile (Yan *et al.*, 2009).

Lisaks saab metüleeritud DNA-d rikastada antikehadega, mis on spetsiifilised metüleeritud tsütosiinidele või metüülseonduvatele valkudele. Näiteks metüleeritud DNA immunosadestamine (*methylated DNA immunoprecipitation*, MeDIP), kus DNA lõhutakse ultrahelitöötusega ja immunosadestatakse 5-mC antikehadega. Metüleeritud DNA on rikastatud immuunosadestatud fraktsioonis, mida saab edasi analüüsida PCR-i, sekveneerimise või mikrokiipidega (Mohn *et al.*, 2009). Selliste meetoditega saab eristada ka 5-hmC ja 5-mC, kuid tulemusena saadakse metülatsiooni profiil, kust üksikute CpG saarekeste metülatsioonitaset ei saa uurida (Thomson *et al.*, 2013).

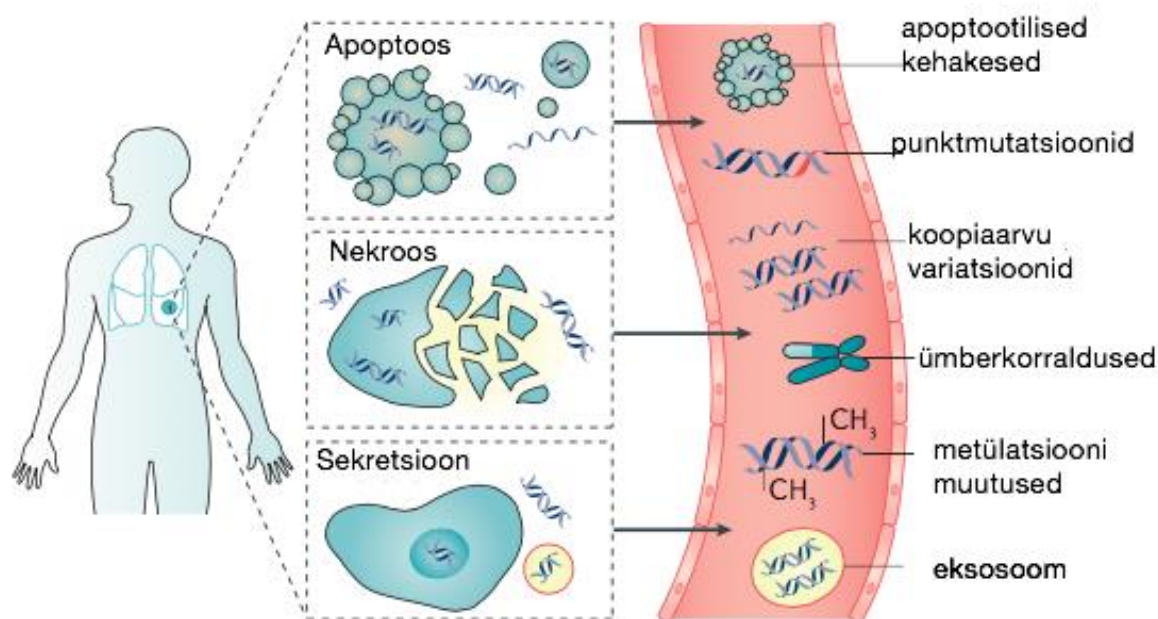
Lisaks on võimalik metülatsiooni tuvastada kolmanda põlvkonna sekveneerimisega. Näiteks MinION (Oxford Nanopore Technologies, UK) sekveneerimismasinatele on ioonilaengu signaalimuutustega võimalik teha vahet 5-hmC ja 5-mC vahel. Samas on sekveneerimistulemuste kvaliteet varieeruv, sest esinevad vead aluste modifikatsioonide äratundmises, kuna ioonilaengu jaotuse erinevus on väike (Rand *et al.*, 2017).

Vedel biopsia

Vedela biopsia all mõeldakse erinevaid kehavedelikest isoleeritud biomarkereid. Siia alla kuuluvad tsirkuleerivad vähirakud (*circulating tumor cells*, CTC), tsirkuleerivad nukleiinhapped (*circulating nucleic acids*, CNA) ja ekstratsellulaarsed vesiikulid. Vedelas biopsias biomarkerite analüüsimist saab kasutada vähkkasvajate diagnoosi, prognoosi ja ravivastuse määramiseks (Best *et al.*, 2015). Tsirkuleerivad vähirakud on rakud, mis ringlevad veres ning pärinevad tuumorist. CTC arvu veres on seostatud vähi progressiooni ja elulemusega (Aceto *et al.*, 2014). Ekstratsellulaarsed vesiikulid on rakkude poolt sekreteeritud vesiikulid, mis koosnevad geneetilisest ja valgulisest osast, mis peegeldavad raku päritolu. Tänu sellele on võimalik vesiikulitest detekteerida kasvajaspetsiifilist materjali (Santiago-Dieppa *et al.*, 2014). Tsirkuleerivate nukleiinhapete hulka kuuluvad kehavedelikest eraldatud DNA ja RNA (Karachaliou *et al.*, 2015).

Tsirkuleeriva rakuvaba DNA (*cell-free DNA*, cfDNA) analüüs on esile kerkinud kui uus väheinvasiivne verepõhine vähkkasvaja biomarker (Marzese *et al.*, 2013). Tervetel inimestel varieerub enamasti plasmast eraldatud cfDNA kontsentratsioon vahemikus 1 - 10 ng/ml (Mouliere *et al.*, 2014). Vähipatsientidel on täheldatud kõrgemat cfDNA kontsentratsiooni kui

tervetel indiviididel (Catarino *et al.*, 2008), kuid cfDNA kontsentratsiooni tõusu on näidatud ka näiteks infektsiooni (De Vlaminck *et al.*, 2015) ja füüsiliste harjutuste tulemusena (Breitbach *et al.*, 2014). Samas ei ole kindlat cfDNA kontsentratsiooni, mida saaks kasutada vähkkasvaja biomarkerina, sest tervete ja vähipatsientide cfDNA kontsentratsioonid võivad omavahel kattuda (Umetani *et al.*, 2006). Tervete inimeste plasma cfDNA pärineb enamasti hematopoeetilistest rakkudest (Lehmann-Werman *et al.*, 2016). Tuumori kasvades suureneb selle uuenevate rakkude hulk (*cellular turnover*) ning apoptootiliste ja nekrootiliste rakkude arv. Enamik cfDNA fragmente on umbes 180 bp pikkused, mis viitab, et cfDNA-d vabaneb rakkudest tõenäoliselt apoptoosil ja nekroosil (Jahr *et al.*, 2001). Lisaks on näidatud ka cfDNA vabanemist rakkudest aktiivse sekretsiooni teel (Stroun *et al.*, 2001). cfDNA geneetilised ja epigeneetilised modifikatsioonid peegeldavad originaalraku genoomi või epigenoomi (Fujiwara *et al.*, 2005; Lehmann-Werman *et al.*, 2016) (joonis 6) ning plasma DNA-st on võimalik nii hüpermetülatsiooni (Lecomte *et al.*, 2002) kui ka hüpometülatsiooni tuvastada (Chan *et al.*, 2013). Tuumorist pärinev cfDNA on ainult väike osa kogu cfDNA-st, mis mõnikord moodustab sellest vähem kui 0.01% (Diehl *et al.*, 2005). Tuumorist pärinev cfDNA kontsentratsioon sõltub kasvaja ulatusest ja varieerub suuresti indiviidide vahel (Diehl *et al.*, 2008). cfDNA-d on leitud ka teistest kehavedelikest, nagu näiteks uriinist (Schageman *et al.*, 2013), aju- ja seljaajuvedelikust (Wang *et al.*, 2015) ning pleuravedelikust (Sriram *et al.*, 2012).



Joonis 6. cfDNA päritolu ning epigeneetilised ja geneetilised muutused. cfDNA vabaneb rakust apoptoosil, nekroosil ja sekretsioonil. cfDNA-st saab tuvastada erinevaid geneetilisi ja epigeneetilisi muutusi (Wan *et al.*, 2017).

Vähkkasvaja diagnoosimisel kasutatakse laialdaselt koematerjali, millel on mitmeid miinuseid. Proovide formaliinis fikseerimine lagundab DNA-d, suurendades proovidevahelist varieeruvust ja vähendades DNA hulka, mida saab kasutada molekulaarseteks analüüsideks (Holdhoff *et al.*, 2009). Tuumori erinevad alad omavad erinevat geneetilist profiili ning ühe koebiopsia võtmine ei väljenda kogu kasvaja geneetilist heterogeensust (Gerlinger *et al.*, 2012). cfDNA-d vabaneb mitmetest tuumori regioonidest ja seega peegeldab tuumorisest heterogeensust paremini (Murtaza *et al.*, 2013). cfDNA poolväärtusaeg varieerub minutitest (Volik *et al.*, 2016) kuni mitme tunnini, mis võimaldab muutusi tuumori arengus jälgida tundide võrdluses (Diehl *et al.*, 2008; To *et al.*, 2003). cfDNA eemaldatakse tsirkulatsioonist nukleaaaside abil (Lo *et al.*, 1999), neerude filtreerimisprotsessi ja uurini kaudu (Botezatu *et al.*, 2000) ning makrofaagide fagotsütoosi teel (Diehl *et al.*, 2005).

2016. aastal näidati, et *ZPF42* (*ZPF42 zinc finger protein*), *HOXA9*, *CD01* (*cysteine dioxygenase type 1*), *HOXA7* (*homeobox A7*), *TAC1* (*tachykinin precursor 1*) ja *SOX17* (*SRY-box 17*) geenide promootori hüpermetülatsiooni plasma DNA-s saab kasutada kopsuvähi varajases diagnostikas (Hulbert *et al.*, 2017). Samuti on näidatud, et *SOX17* promootori hüpermetülatsioon mõjutab elulemust ja annab prognostilist infot NSCLC puhul (Balgkouranidou *et al.*, 2016). Erinevalt enamusest DNA metülatsiooni biomarkeritest on *PITX2* (*paired like homeodomain 2*) ja *SHOX2* (*short stature homeobox 2*) geenide hüpermetülatsiooni seostatud parema elulemusega (Dietrich *et al.*, 2012). Hiljutistes uuringutes on paljude lookuste paralleelseks uurimiseks kasutatud PCR amplikonide suunatud kõrge katvusega sekveneerimist (Forsheew *et al.*, 2012; Holmila *et al.*, 2017).

Eksperimentaalosa

Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

1. Välja töötada töövoog metülatsioonimäära uurimiseks kopsuvähiga isikute tsirkuleerivas rakuvabas DNA-s;
2. Seejärel väljatöötatud meetodi põhjal selgitada valitud geenide ja piirkondade metülatsioonitaseme muutuse kasutatavust rakuvabas DNA-s kopsuvähi potentsiaalse diagnostilise biomarkerina.

Materjal ja meetodika

Meetodite väljatöötamine ning optimeerimine

cfDNA metülatsioonitaseme määramise meetodite väljatöötamiseks ja esialgseks optimeerimiseks kasutati kuue terve vabatahtliku vereplasmast eraldatud rakuvaba DNA segu. Samuti kasutati praimerite testimiseks, multipleks PCR-i efektiivsuse optimeerimiseks ja sobiva PCR-i seondumistemperatuuri leidmiseks inimese genoomset DNA-d (gDNA) (Human Genomic DNA, Roche Holding AG, Šveits).

Tervete vabatahtlike cfDNA eraldamine

Tervetelt vabatahtlikelt koguti Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu andmekoguja poolt verd BD Vacutainer® K2E (EDTA) katsutitesse (Becton, Dickinson and Company, USA). Plasma eraldamiseks tsentrifuugiti verd 15 minutit 1600 rcf juures Eppendorf™ Centrifuge 5810 R masinas (Fisher Scientific Company L.L.C., USA). Seejärel tõsteti plasma 2 ml alikvootidena tuubidesse ja tsentrifuugiti 10 minutit 2500 rcf juures Eppendorf™ Centrifuge 5430 R masinas (Fisher Scientific Company L.L.C., USA) ning tõsteti omakorda 2 ml alikvootidena uutesse tuubidesse, mida säilitati -80°C juures.

cfDNA eraldamiseks 2 ml-st plasmast kasutati QIAamp® Circulating Nucleic Acid (CNA) (QIAGEN, Saksamaa) kitti koos QIAvac 24 Plus vaakumkollektoriga (QIAGEN, Saksamaa) vastavalt modifitseeritud juhistele (lisa 1). cfDNA-d säilitati -80°C juures.

DNA kontsentratsiooni ja pikkuse mõõtmine

cfDNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Qubit® 2.0 fluoromeetrit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ja Qubit® dsDNA HS (*High Sensitivity*) Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) kitti vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Varasemalt on tööühma teine liige mõõtnud cfDNA fragmentide pikkuseid, mis on eraldatud eelpool nimetatud meetodikat kasutades QIAamp® CNA kitiga TapeStation 2200 masinal (Agilent Technologies, USA) kasutades High Sensitivity D1000 ScreenTape®-i. Mõõdetud cfDNA fragmentide pikkus jäi vahemikku 125 - 200 bp ning seega järeldati, et rakuvaba DNA eraldamine antud kitiga on edukas ning DNA fragmentide pikkust arvestati ka praimerite disainimisel.

Rakuvaba DNA metüleerimine

Tervete isikute cfDNA-ga viidi metülatsioonpositiivse kontrollmaterjali saamiseks läbi

M.SssI CpG metüültransferaasi töötlus, kus reaktsiooni kogumaht oli 50 µl ning mis sisaldas 27 ng cfDNA-d, 4U M.SssI metülaasi (New England Biolabs®, Inc., UK), 3200 µM S-adenosüülmetioniini (New England Biolabs®, Inc., UK) ja 2,5X NEBuffer™ 2 puhvrit (125 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, pH 7,9 25°C juures) (New England Biolabs®, Inc.,UK). Reaktsiooni inkubeeriti 37°C juures 4 tundi ja seejärel peatati reaktsioon inkubeerides proovi 65°C juures 20 minutit.

Lahjendusrea tegemine

Metülatsiooni analüüsi töövoos esialgseks väljatöötamiseks ja testimiseks tehti lahjendusrida kolmes korduses 0%, 5%, 10%, 20%, 50% ja 100% metüleeritud proovidele (kokku 18 proovi). Lahjendusrea jaoks segati metüleerimata tervete isikute (0%) ja M.SssI metülaasiga (New England Biolabs®, Inc., UK) metüleeritud tervete isikute (100%) cfDNA vastavates proportsioonides kokku enne naatriumbisulfit-töötlust.

Naatriumbisulfit-töötlus

Tervete isikute cfDNA seguga viidi läbi naatriumbisulfit-konversioon kasutades EZ DNA Methylation™ kitti (Zymo Research Corp., USA). Konversioonis lähtuti tootjapoolsetest soovistest, aga cfDNA algset kogust tuli oluliselt vähendada, kuna cfDNA kontsentratsioon oli võrreldes gDNA kontsentratsiooniga rohkem kui 100 korda madalam. Konversiooniks kasutati 1 ng cfDNA-d. Inimese gDNA konversiooniks kasutati 195 ng DNA-d.

Uuritavate kandidaatgeenide valik ning praimerite disain

Metülatsioonianalüüsiks valiti kandidaatgeenid ja nende uuritavad regioonid eelnevalt teostatud kopsuvähi uuringu alusel, kus võrreldi vähivaba kopsukoe ja I staadiumi NSCLC patsientide kopsukoe DNA metülatsiooni (Lokk *et al.*, 2012). Lisaks valiti uuritavad CpG dinukleotiidid kirjanduse ja Vähigenoomi Atlase⁴ andmete põhjal, mida vaadeldi veebipõhises programmis Wanderer⁵. Analüüsimiseks otsiti kandidaatgeenides esinevaid CpG-sid, mis oleksid tervete isikute kopsukoes ja veres madala metülatsiooni tasemega ning kasvaja isikute puhul esineks metülatsiooni märgatav tõus. Kandidaatgeenide CpG-de järjestused saadi UCSC Genome Browser⁶ andmebaasist.

⁴ <https://cancergenome.nih.gov>

⁵ <http://maplab.imppc.org/wanderer/>

⁶ <https://genome.ucsc.edu>

Naatriumbisulfit-töödeldud DNA amplifitseerimise jaoks teostati praimerite disain programmis MethPrimer (Li & Dahiya, 2002) tingimustel, et PCR-i produkti suurus jääks vahemikku 100 - 150 bp, praimerite sulamistemperatuur (*melting temperature*, T_m) jääks vahemikku 50 - 60°C ning et praimerjärjestus ise ei sisaldaks CpG dinukleotiide. Disainitud praimerite seondumiskohti ning amplifitseeritavate produktide arvu genoomis kontrolliti GenomeTester 1.3 (Andreson *et al.*, 2006) programmiga. cfDNA metülatsioonitaseme analüüsiks valitud kandidaatgeenid on järgmised: *ZNF154* (*zinc finger protein 154*), *CCDC181* (*coiled-coil domain containing 181*), *CXCL5* (*C-X-C motif chemokine ligand 5*), *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *CD01* (*cysteine dioxygenase*), *HOXA7* (*homeobox A7*), *HOXA11* (*homeobox A11*), *FERD3L* (*fer3 like BHLH transcription factor*), *STAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*), *DLEC1* (*deleted in lung and esophageal cancer 1*), *AGTR1* (*angiotensin II receptor type 1*), *GALR1* (*galanin receptor 1*), *HOXA9* (*homeobox A9*), *NR2E1* (*nuclear receptor subfamily 2 group E member 1*) ja *PROX1* (*prospero homeobox 1*). Lisas 2 on välja toodud kandidaatgeenide praimerjärjestused.

Disainitud praimeritele lisati Illumina® (Illumina, Inc., USA) üleulatuvad adapterjärjestused. *Left* praimeritele lisati 5' otsa TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG järjestus ning *right* praimeritele lisati 5' otsa GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG järjestus. Praimerite järjestusi analüüsiti juuksenõelastruktuuride ning dimeeride suhtes OligoAnalyzer 3.1⁷ (Integrated DNA Technologies Inc., USA) programmiga. Praimerid jagati kahte multipleks gruppi MultiPLX 2.1. programmiga (Kaplinski *et al.*, 2005), mis võtab arvesse praimerite sulamistemperatuure, seondumisenergiaid ning produktide pikkuseid. Nii üksikute praimerite kui ka multipleks praimeritesegu efektiivsust kontrolliti tervete vabatahtlike cfDNA segu ning inimese gDNA peal.

Naatriumbisulfit-töödeldud cfDNA ja gDNA kontsentratsiooni mõõdeti Qubit® 2.0 fluoromeetril kasutades Qubit® ssDNA Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) kitti vastavalt tootjapoolsetele juhistele, mis mõõdab üheaheelalise DNA kontsentratsiooni vahemikkus 50 pg/µl kuni 200 ng/µl.

Praimerite seondumistemperatuuri määramiseks viidi läbi gradient PCR, millega testiti kõige kõrgema ja madalama sulamistemperatuuriga praimereid, et leida sobiv seondumistemperatuur PCR-ks. Praimerite sulamistemperatuurid saadi MethPrimer (L.-C. Li

⁷ <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

& Dahiya, 2002) programmist, millega disainiti ka praimereid. Gradient PCR viidi läbi Veriti® termotsükleris (Applied Biosystems, USA) seandumistemperatuuride 51°C, 53°C, 55°C, 57°C, 59°C, 61°C juures järgmise programmiga:

- Polümeraasi aktivatsioon 95°C 12 minutit
- 45 tsükli:
 - Denaturatsioon 95°C 30 sek
 - Praimerite seandumine gradient 30 sek
 - Elongatsioon 72°C 30 sek
- Lõplik elongatsioon 72°C 5 min

Programmi lõpp, temperatuuri hoidmine 4°C juures.

Üksikute praimerite PCR-i reaktsiooni kogumaht oli 20 µl, mis sisaldas lõppkontsentratsioonis 1X HOT FIREPol® GC Master Mix-i (Solis BioDyne, Eesti), 2,0 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Eesti), 10 pmol *left* praimerit, 10 pmol *right* praimerit ning 1 µl naatriumbisulfit-töödeldud cfDNA-d või 1 ng gDNA-d. PCR viidi läbi Artik™ termotsükleris (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) järgmise programmiga:

- Polümeraasi aktivatsioon 95°C 12 minutit
- 45 tsükli:
 - Denaturatsioon 95°C 30 sek
 - Praimerite seandumine 57°C 30 sek
 - Elongatsioon 72°C 30 sek
- Lõplik elongatsioon 72°C 5 min

Programmi lõpp, temperatuuri hoidmine 4°C juures.

Multipleks PCR-i reaktsiooni kogumaht oli 25 µl, mis sisaldas lõppkontsentratsioonis 1X HOT FIREPol® GC Master Mix-i, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol *left* praimerit, 10 pmol *right* praimerit ning 4 µl naatriumbisulfit-töödeldud cfDNA-d või 4 ng gDNA-d. PCR viidi läbi Artik™ termotsükleris järgmise programmiga:

- Polümeraasi aktivatsioon 95°C 12 minutit
- 45 tsükli:
 - Denaturatsioon 95°C 30 sek

Praimerite seondumine	57°C	30 sek
Elongatsioon	72°C	30 sek
• Lõplik elongatsioon	72°C	5 min

Programmi lõpp, temperatuuri hoidmine 4°C juures.

PCR produkte kontrolliti 3% agarosgeelelektroforeesil (3% agaros, 0,5X TBE (Tris-boorhape-EDTA)). Võrdlusena kasutati O'GeneRuler 50 bp DNA suurusmarkerit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine

PCR-i produktide puhastamiseks kasutati Agentcourt AMPure XP magnetkerakesi (Beckman Coulter, Inc., USA) ning Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu protokoll, mis oli kohandatud töögrupi teise liikme poolt (lisa 3). Magnetkerakestega puhastatakse PCR-i produkte praimeritest ja praimerite dimeeridest, mis mõjutavad sekvenerimise kvaliteeti. Puhastatud produktide kontsentratsioon mõõdeti kasutades Qubit® 2.0 fluoromeetrit ja Qubit® dsDNA HS Assay kitti. Puhastatud DNA fragmentide pikkuseid kontrolliti TapeStation masinal kasutades D1000 ScreenTape® reagente. Antud magistritöös TapeStation masinal teostatud mõõtmised viidi läbi töögrupi teise liikme poolt. Mõõdetud kontsentratsioonide alusel segati võrdses koguses omavahel kaks multipleks gruppi kokku.

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklabori protokoll põhjal viidi läbi indeks PCR, kasutades Nextera XT® Index Kit v2 indeksjärjestusi (Illumina, Inc., USA). Indeks PCR-i käigus ligeeritakse "koodid" iga proovi PCR produktide adapterjärjestustele, et peale sekvenerimist oleks võimalik individuaalseid proove eristada. Indeks PCR-i reaktsiooni kogumaht oli 50 µl, mis sisaldas 5 µl Nextera® XT indeks praimer 1-te, 5 µl Nextera® XT indeks praimer 2-te (Nextera® XT Index Kit v2, Illumina, Inc., USA), 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix-i (Kapa Biosystems, Inc., USA) ja 5 µl multipleks PCR produkte. Indeks PCR viidi läbi Artik™ termotsükleris järgmise programmiga:

- Polümeraasi aktivatsioon 95°C 10 minutit
- 8 tsükli:

Denaturatsioon	95°C	30 sek
Praimerite seondumine	55°C	30 sek
Elongatsioon	72°C	30 sek

- Lõplik elongatsioon 72°C 5 min

Programmi lõpp, temperatuuri hoidmine 4°C juures.

Peale indeks PCR-i puhastati produktid Agentcourt AMPure XP magnetkerakestega (lisa 3) ning DNA fragmentide pikkuseid mõõdeti TapeStation masinal kasutades D1000 ScreenTape®-i. Lisaks testiti ka kolmandat magnetkerakestega puhastamist pikemate fragmentide eraldamiseks, mille jaoks modifitseeriti lisa 3 juhendit. PCR produktile lisati magnetkerakesi suhtes 1:0,6 selleks, et PCR produktidest pikemaid fragmente seondada. Seejärel tõsteti supernatant, kus olid sees oodatud PCR-i produktid uuele PCR-plaadile ja lisati magnetkerakesi suhtes 1:0,18, et seondada oodatud PCR-i produktid uuesti kerakestele. Puhastatud produktide kontsentratsioonid mõõdeti Qubit® 2.0 fluoromeetriga kasutades Qubit® dsDNA HS Assay reagente. TapeStation masinal mõõdeti PCR produktide fragmentide pikkused kasutades D1000 ScreenTape®-i.

Sekvenerimisraamatukogu saamiseks lahjendati kõik proovid kontsentratsioonini 10 ng/μl ning segati omavahel võrdsetes kogustes kokku.

Raamatukogu kvantifitseerimine ja sekvenerimine

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklabori protokollid kasutades viidi töögrupi teise liikme poolt läbi raamatukogu kvantifitseerimine ja sekvenaatorisse laadimine. Kõigepealt viidi läbi proovide kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR), mille käigus võrreldi varem sekveneritud raamatukogusid sekvenerimisraamatukoguga ning arvutati Miseq® (Illumina, Inc., USA) sekvenaatorisse laadimise pikomolaarne (pM) kontsentratsioon. SDS v2.4 tarkvaras (Applied Biosystems, USA) vaadeldi qPCR-i tulemusi. Sekvenerimisel soovitud klastrite tiheduse 950 (K/mm²) saamiseks võrreldi varasemalt sekveneritud raamatukogude kontsentratsioone, klastrite tihedusi ja qPCR-i tulemusi. *SampleSheet* fail, mis sisaldab proovide andmeid ning mida on vaja sekvenerimise alustamiseks, koostati Illumina® Experiment Manager (IEM) v1.13.1 tarkvaraga (Illumina, Inc., USA).

Raamatukogu denatureeriti 0,2 N NaOH-ga ning lahjendati soovitud kontsentratsioonini. Seejärel segati raamatukogu kokku 0,5% PhiX kontrolliga. Raamatukogu ettevalmistus käis vastavalt Miseq® Reagent Kit v2 tootjapoolsele juhendile (Illumina, Inc., USA). Raamatukogu sekvenerimiseks kasutati MiSeq® sekvenaatorit, mille tulemusel saadi 2 x 151 aluspaari pikkused *paired-end* lugemid.

Tulemuste analüüs

Esiolguiseid kvaliteedinäitajaid nagu Q₃₀ kvaliteediskoori, üldist klastrite tihedust ja järjestuste arvu vaadati Illumina® Sequencing Analysis Viewer v.2.1.8 (Illumina, Inc., USA) tarkvaraga. Illumina® Miseq sekvenaatorist saadud FASTQ failide töötlus ja andmete analüüs tarkvarapaketi R (R Core Team, 2015) viidi läbi töögrupi teise liikme poolt. Esmaseks toorandmete kvaliteedikontrolliks kasutati programmi Trim Galore v0.4.2, millega trimmiti madala kvaliteediga lugemite lõpud ja eemaldati adapterid. Trimmitud lugemid joondati bisulfit-konverteeritud inimese genoomile (hg19) kasutades Bismark v0.16.3 tarkvara (Krueger & Andrews, 2011). Tulemuseks saadud BAM failidest loeti iga CpG saidi korral metüleeritud ja metüleerimata alused skriptiga *bismark_methylation_extractor*. Viimase etapina kasutati kohandatud R-skripti, millega arvutati iga CpG saidi metülatsiooni tase. Selleks jagati metüleeritud aluste hulk sekveneeritud aluste hulgaga.

Uuritavad isikud

Antud magistritöö valimisse kuuluvad 32 mitteväikerakulise kopsuvähiga uuritavat, kes moodustavad 30% kõikidest “Tsirkuleeriv DNA kopsuvähi biomarkerina” projekti hetkel kaasatud uuritavatest isikutest. Et tegemist on tööprotsessi esiolguise optimeerimise ja testimisega, kaasati valimisse eeskätt uuritavad, kellelt oli õnnestunud koguda enam bioloogilist materjali. Valimisse kuuluvate uuritavate kliinilised andmed on näidatud tabelis 1. Uuritavad isikud kaasasid projekti SA Põhja-Eesti Regionaalhaigla ja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi onkoloogid. Uuritavad andsid projektis osalemiseks informeeritud nõusoleku. Vereproovid kogus uuringuõde ning FFPE (*formalin-fixed, paraffin-embedded*, formaliinis fikseeritud, parafiini sisestatud) koeproovid, kust oli eelnevad tuvastatud kasvajarakkude olemasolu, saadi SA Põhja-Eesti Regionaalhaigla Patoloogiakeskusest. Isikute proovimaterjale ja andmeid kasutati kodeerituna ning kliinilisi andmeid kogus projekti jaoks TÜ arstiteaduse üliõpilane.

Magistritöö valimisse kuuluvate uuritavate keskmine vanus projekti kaasamise hetkel oli 67 eluaastat, olles vahemikus 48 - 88 aastat. Uuritavatest 15 olid naised ning 17 mehed. 22 isiku histoloogiliseks leiuks oli adenokartsinoom ning valdav osa uuritavaid oli hilisstaadiumi (III – IV staadiumi) kopsuvähi haiged.

Tabel 1. Magistritöö valimisse kuuluvate mitteväikerakulise kopsuvähiga uuritavate kliinilised andmed. Sugu: M - mees, N - naine. Esmane dgn - kas esmane diagnoos või retsidiiv. Vanus - vanus uuringusse kaasamisel. Histoloogia: AK - adenokartsinoom, TV - täpsustamata vähkkasvaja, SRNE - suurearakuline neuroendokriinvähkkasvaja, MVR - mitteväikerakuline vähkkasvaja, LR - lamarakuline vähkkasvaja. T näitab algkolde mõõtmeid ja kasvajakolde lokaalse leviku ulatust, N regionaalse te lümfisõlmede haaratust kasvajast ja M kaugmetastaaside olemasolu. IHK - immuunhistokeemia. TTF-1 ja Ki-67 - immuunhistokeemilised markerid.

Kood	Sugu	Esmane dgn	Vanus	Suissetamine	Histoloogia	T	N	M	Stadium	IHK	TTF-1	Ki-67 (%)
KA01	M	jah	77	endine	AK	4	2	1b	IV	jah	pos	50
KA44	M	retsidiiv	72	jah	AK	3	2	1	IV	jah	pos	
KA45	N	retsidiiv	71	endine	AK	0	0	1a	IV	jah	pos	
KA49	N	jah	61	jah	TV	3	2		IIIA	jah	pos	
KA50	N	jah	53		AK	2	2	1b	IV	ei		
KA52	M	jah	62		AK	2b	3	1b	IV	jah	pos	
KA53	M	jah	66	jah	AK	4	0	1a	IV	ei		
KA54	M	jah	79	endine	AK	2a	3	1b	IV	jah	pos	
KA56	N	jah	67	jah	SRNE	3	2	0	IIIA	jah	pos	50-60
KA62	N	jah	55	ei	TV	3	3	1	IV	jah	neg	
KA64	M	jah	63		AK	4b	2	1	IV	jah	pos	40
KA65	N	jah	70	endine	AK	2a	2	0	IIIA	ei		
KA66	M	jah	68		MVR	4	2		IIIB	jah	neg	50
KA67	N	jah	74	ei	AK		2	1	IV	jah	pos	

Kood	Sugu	Esmane dgn	Vanus	Suitsetamine	Histoloogia	T	N	M	Stadium	IHK	TTF-1	Ki-67 (%)
kA68	N	jah	74	ei	AK	2a	2	1a	IV	jah	pos	
kA69	M	jah	71	jah	AK	2b	2	1b	IV	jah	neg	
kA71	M	jah	53	jah	AK	2b	3	1	IV	ei		
kA72	M	retsidiiv	69	jah	LR	1a	0	1	IV	jah	pos	
kA75	M	jah	70		MVR	4	2	1b	IV	jah	neg	
kA76	N	jah	78	ei	AK	2a	2	1b	IV	jah	pos	
kA77	M	jah	65		AK	3	3	0	IIIB	ei		
kA80	M	jah	73	jah	AK	2b	3	0	IIIB	jah	pos	
kA81	M	jah	65	endine	AK	1b	2	1	IV	ei		
kA82	N	jah	54			2a	2	1	IV	ei		
kA87	N	jah	66		MVR	4b	2	1b	IV	jah	pos	
kA89	N	jah	60	endine	AK	3	2	1	IV	jah	neg	
kA90	M	jah	58	jah	AK	4b	3	1b	IV	jah	neg	
kA91	M	jah	72	jah	TV	2b	2		IIIA	jah	neg	
kA93	N	jah	72		AK	2a	2	0	IIIA	jah	pos	
kA97	N	jah	78	ei	AK	2a	1	0	IIIB	ei		
kA98	M	jah	88	ei	AK	2a	2	1a	IV	ei		
kB01	N	jah	48	ei	MVR	2b	2	1b	IV	jah	pos	

Kõigilt magistritöö valimi uuritavatelt oli kogutud veeniveri. Lisaks oli 5 isiku (kA49, kA75, kA76, kA82, kB01) puhul kogutud ka uuel ajahetkel võetud (korduv) vereproov pärast ravi alustamist. 19 isiku puhul oli olemas ka FFPE koeproovid. Nendest 19 isikust kahel (kA45, kA89) oli kaks FFPE koeproovi ning ühel (kA53) oli kolm FFPE koeproovi. Tabelisse 2 on märgitud FFPE koeproovide päritolu.

Tabel 2. Uuritavate FFPE koematerjali päritolu.

Isik	FFPE materjali päritolu
kA44	kops
kA45	kA45(1) pleura; kA45(2) kops
kA49	kops
kA50	kops
kA52	lümfisõlm
kA53	kA53(1A) kops; kA53(1) kops; kA53(2) kops
kA54	lümfisõlm
kA65	lümfisõlm
kA66	bronh
kA68	täpsustamata
kA69	bronh
kA72	kops
kA75	lümfisõlm
kA81	lümfisõlm
kA82	lümfisõlm
kA89	kA89(1) kops; kA89(2) lümfisõlm
kA91	lümfisõlm
kA93	lümfisõlm
kB01	bronh

Uuringus osalevatelt kopsuvähiga isikutelt võeti veeniverd kahte Cell-Free DNA BCT® CE 10 ml (Streck, Inc., USA) katsutisse ning koostöös tööruhma teise liikmega tsentrifugiti plasma eraldamiseks veri samadel tingimustel nagu eelnevalt kirjeldatud tervetel vabatahtlikel (lk 20). Leukotsüütide rikka kihi (*buffy* kiht) DNA eraldamiseks koguti kiht pärast esimest veenivere tsentrifugimist 1 ml alikvootidena ning säilitati -80°C juures.

Uuritavate DNA eraldamine

Uuritavate rakuvaba, *buffy* kihi ja FFPE koematerjali DNA (FFPE DNA) eraldamine tehti koostöös tööruhma teise liikmega. Plasmast cfDNA eraldamiseks kasutati QIAamp® CNA kitti koos QIAvac 24 Plus vaakumkolektoriga kasutades modifitseeritud protokollit (lisa 1).

Buffy kihi DNA eraldamiseks kasutati GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit-i (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ning FFPE DNA eraldamiseks kasutati GeneRead™ DNA FFPE (QIAGEN, Saksamaa) kitti vastavalt tootjapoolsetele juhenditele, kuid DNA-d elueeriti soojendatud elueerimispuhvriga kaks korda. Eraldatud DNA kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati Qubit® 2.0 fluoromeetrit. cfDNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Qubit® HS Assay kitti ning *buffy* kihi DNA ja FFPE DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Qubit® dsDNA Broad Range (BR) Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) kitti.

Lisaks uuritavatele sooviti sekveneerida negatiivse kontrollina tervete indiviidide cfDNA-d ja *buffy* DNA-d. Valimisse kaasati 5 tervet isikut, kelle veeniverest eraldati cfDNA ja *buffy* kihi DNA samamoodi nagu eelnevalt kirjeldatud uuritavatel. Sekveneerimisraamatukokku kuulusid lisaks uuritavatele ja tervetele indiviididele veel arvestuslikult 20% metüleeritud cfDNA positiivne kontroll kolmes korduses, mis oli eelnevalt juba sekveneeritud cfDNA lahjendusrea osana.

Tabelis 3 on välja toodud erinevad proovid, mis kuuluvad sekveneerimisraamatukokku ning eraldi on märgitud kasutatud multipleks PCR-i tsüklite arv erinevate materjalide puhul.

Tabel 3. Sekveneerimisraamatukokku kuuluvad proovid ning multipleks PCR-i tsüklite arv.

Materjal	Proovide arv	Tsüklite arv
Esmane rakuvaba DNA	32	40
Esmane <i>buffy</i> kihi DNA	32	34
Korduv rakuvaba DNA	5	40
Korduv <i>buffy</i> kihi DNA	5	34
FFPE DNA	23	34
20% kontroll	3	45
Tervete isikute rakuvaba DNA	5	40
Tervete isikute <i>buffy</i> kihi DNA	5	34

Uuritavate DNA naatriumbisulfit-töötlus

Uuritavate isikute DNA-ga teostati naatriumbisulfit-konversioon kasutades EZ DNA Methylation™ kitti vastavalt tootjapoolsetele juhistele. cfDNA konversiooniks kasutati 5 µl cfDNA-d (keskmiselt 4,68 ng, vahemikus 0,97 - 33,90 ng). *Buffy* kihi DNA ja FFPE DNA konversiooniks kasutati 50 ng DNA-d. Tervete isikute cfDNA konversiooniks kasutati samuti 5 µl cfDNA-d (keskmiselt 1,39 ng, vahemikus 0,51 - 4,1 ng). Tervete indiviidide *buffy* kihi DNA konversiooniks kasutati 50 ng DNA-d.

Sekveneerimisraamatukogu ettevalmistamine

Raamatukogu ettevalmistamine viidi läbi eelnevalt lahjendusrea proovidel kirjeldatud meetoditega, kuid multipleks PCR-i reaktsioonis kasutati vähem praimeripaare. Kontrolliks lisati sekveneerimisraamatukokku ka 20% lahjendusrea proovi kolm kordust, mis oli eelnevalt ette valmistatud ja sekveneeritud lahjendusrea proovidega sarnasel viisil.

Multipleks PCR-i reaktsioonisegu kogumaht oli 30 µl ning sisaldas lõppkontsentratsioonis 1X ZymoTaq™ PreMix-i (Zymo Research Corp., USA), 2 mM MgCl₂, 9 pmol *left* praimerit, 9 pmol *right* praimerit ning 4 µl konverteeritud DNA-d. PCR viidi läbi Artik™ termotsükleris järgmise programmiga:

- Polümeraasi aktivatsioon 95°C 10 minutit
 - 40 tsüklit cfDNA puhul, 34 tsüklit FFPE ja *buffy* kihi DNA puhul:
 - Denaturatsioon 95°C 30 sek
 - Praimerite seondumine 55°C 30 sek
 - Elongatsioon 72°C 30 sek
 - Lõplik elongatsioon 72°C 7 min
- Programmi lõpp, temperatuuri hoidmine 4°C juures.

Raamatukogu tegemiseks lahjendati kõik 110 proovi 10 ng/µl lahjendusteks ning segati võrdses mahus omavahel kokku.

Raamatukogu kvantifitseerimine ja sekveneerimine

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklabori protokolliga kasutades viidi töögrupi teise liikme poolt läbi raamatukogu kvantifitseerimine ja sekvenaatorisse laadimine eelnevalt lahjendusrea raamatukogu puhul kasutatud viisil (lk 25), kuid seekord sooviti klastrite tiheduseks saavutada 800 K/mm² ning raamatukogu segati kokku 10% PhiX kontrolliga, et vältida kiibile ülelaadimist ning muuta raamatukogu mitmekesisemaks. Raamatukogu sekveneeriti 2 x 149 *paired-end* järjestustena kasutades MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, Inc., USA) kitti.

Tulemuste analüüs

Illumina® Miseq sekvenaatorist saadud FASTQ failide töötlus ja andmete analüüs tarkvarapaketi R (R Core Team, 2015) viidi läbi töögrupi teise liikme poolt eelnevalt lahjendusrea proovidel kirjeldatud meetoditel (lk 26). Lisaks kasutati tarkvarapaketti R ka metülatsiooniprofiilide jooniste ja kuumakaartide (*heatmap*) tegemisel ning Pearsoni korrelatsiooni leidmisel ja korrelatsioonijoonise tegemisel.

Tulemused

Meetodite väljatöötamine ning optimeerimine

Uurimaks metülatsioonitaseme analüüsimise võimalikkust rakuvabas DNA-s ning optimeerimaks hilisemat uuritavate isikute sekveneerimisraamatukogu ettevalmistamist ja andmete analüüsi töötati välja töövoog kunstlikult metüleeritud DNA lahjendusrea peal.

DNA kontsentratsiooni mõõtmine

Tervete isikute cfDNA-de segu kontsentratsioon oli 0,616 ng/μl. Naatriumbisulfit-töödeldud proovide kontsentratsiooni mõõtmisel andis Qubit® 2.0 fluoromeeter veateate, et proovidel on liiga madal kontsentratsioon. Töötlusesse pandi 1 ng tervete isikute cfDNA-de segu, mida elueeriti 10 μl-s ning kuna on teada, et naatriumbisulfit-töötlus lagundab DNA-d, siis on võimalik, et proovide kontsentratsioon oli pärast töötlust väiksem kui 50 pg/μl. Vastupidiselt saadi mõnede proovide puhul mõõtmisel kontsentratsioon, mis oli suurem kui cfDNA kontsentratsioon, mida konverteeriti. Seda võis põhjustada asjaolu, et Qubit® ssDNA Assay kit mõõdab ka kaheahelalise DNA olemasolu. Kuna cfDNA kontsentratsiooni polnud võimalik pärast naatriumbisulfit-töötlust mõõta, on cfDNA kogus reaktsioonisegus välja toodud mahuühikutes (μl). Samuti ei mõõdetud *buffy* kihi ega FFPE DNA kontsentratsiooni pärast konversiooni, vaid toodi välja DNA hulk nanogrammides, mis konversiooni lisati ning kõiki proove elueeriti pärast töötlust 10 μl-s eluatsiooni puhvris.

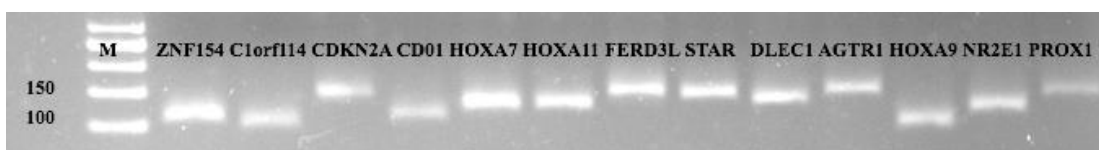
Qubit® ssDNA Assay kitiga mõõdeti inimese genoomse DNA kontsentratsiooni pärast naatriumbisulfit-konversiooni. Kuna naatriumbisulfit-töötluse jaoks kasutati suurem algkogus gDNA-d, siis võib eeldada, et DNA kontsentratsiooni mõõtmisel pärast konversiooni oli suurem täpsus. Genoomset DNA-d lisati naatriumbisulfit-töötlusesse 195 ng ning peale konversiooni oli gDNA kontsentratsiooniks 7,2 ng/μl ehk peale töötlust jäi mõõtmistulemuste

põhjal alles 72 ng gDNA-d. Genoomset DNA-d lahjendati edasi kontsentratsioonini 1 ng/μl, et kohandada PCR-i meetodeid väikese algkoguse DNA jaoks.

Uuritavate kandidaatgeenide valik ning praimerite disain

Metülatsioonimäära (ehk metülatsioonitaseme) uurimiseks kopsuvähiga uuritavate cfDNA-s valiti välja 15 geeni, mille amplifikatsiooni efektiivsust kontrolliti nii üksikult kui ka multipleks reaktsioonis gDNA ja cfDNA peal.

Kõige kõrgema ja madalama seondumistemperatuuriga praimeritega viidi läbi gradient PCR ning sobivaks seondumistemperatuuriks valiti 57°C. Üksikute praimerite testimise põhjal jäeti analüüsist välja geenid *CXL5* ja *GALRI*, sest amplifikatsioonil tekkisid kaks produkti. 13 praimeripaari PCR produkte, mis oli saadud PCR-i käigus kasutades seondumistemperatuuri 57°C, kontrolliti 3% agarosgeelelektroforeesil. Produktide pikkus jäi (ilma adapterjärjestusteta) vahemikku 101 - 149 bp, mida on näha ka geelipildil (joonis 7).



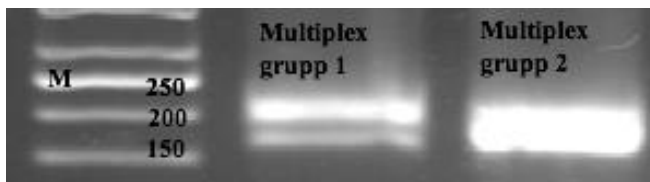
Joonis 7. Üksikute praimeripaaride testimine genoomse DNA peal PCR seondumistemperatuuriga 57°C. M - O'GeneRuler 50 bp DNA suurusmarker. Üleval toodud geenide nimetused.

MultiPLX 2.1. (Kaplinski *et al.*, 2005) programmiga jagatud praimerigrupid on näidatud tabelis 4.

Tabel 4. Praimerite jagunemine multipleks gruppidesse.

Grupp 1	<i>PROX1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>HOXA7</i>	<i>DLEC1</i>	<i>AGTRI</i>	<i>HOXA9</i>	
Grupp 2	<i>FERD3L</i>	<i>CD01</i>	<i>ZNF154</i>	<i>HOXA11</i>	<i>STAR</i>	<i>NR2E1</i>	<i>CCDC181</i>

Inimese genoomse DNA peal kontrolliti multipleks gruppide efektiivsust ning tulemused visualiseeriti 3% agarosgeelelektroforeesil (joonis 8).



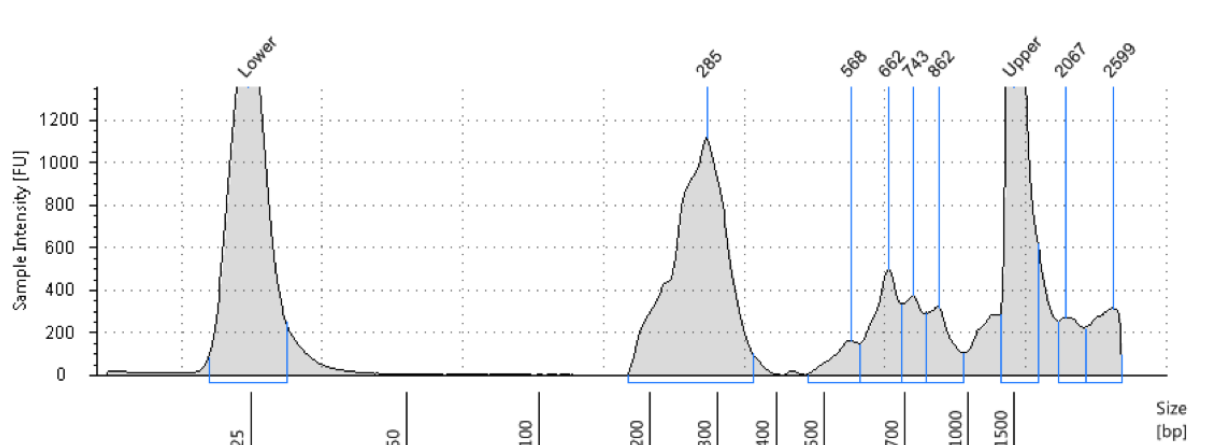
Joonis 8. Multipleks gruppide efektiivsuse testimine inimese gDNA peal. M - O'GeneRuler 50 bp DNA suurusmarker. Koos adapterjärjestustega on multipleks grupp 1 produktide pikkused vahemikus 169 - 216 bp ning multipleks grupp 2 produktide pikkused vahemikus 170 - 213 bp.

Visuaalsel geelipildi vaatamisel järelitati, et kõik PCR produktid on amplifitseerunud ja multipleks reaktsioonid on olnud edukad.

Sekveneerimisraamatukogu ettevalmistamine

DNA fragmentide pikkuste mõõtmine TapeStation masinas peale indeks PCR-i ja magnetkerakestega puhastamist näitas, et lisaks oodatud PCR-i produktidele esinevad proovis ka oodatust pikemad produktid. Tõenäoliselt on need praimerite dimeeride amplifikatsiooniproduktid ning nendest vabanemiseks otsustati teostada kolmas magnetkerakestega puhastamine, mida ei ole tavapärasel protokollis ette nähtud.

Joonisel 9 on näidatud arvestuslikult 20% metüleeritud DNA fragmentide pikkused pärast kolmandat magnetkerakestega puhastamist. Kuna oodatud PCR-i produktid koos adapter- ja indeksjärjestustega jäid vahemikku 237 - 285 bp, siis on näha, et proovis esineb lisaks oodatud PCR-i produktidele jätkuvalt ka oodatust pikemaid fragmente, mida ei suudetud ka kolmanda magnetkerakestega puhastamisega eemaldada.



Joonis 9. Proovi „20% kordus 1“ fragmentide pikkused. Oodatud PCR-i produktide pikkus on vahemikus 237 - 285 bp. X-teljel on pikkus aluspaarides, y-teljel on proovi intensiivsus fuorestsents ühikutes (FU). Lower - alumine pikkusmarker, Upper - ülemine pikkusmarker.

Sekvenerimistulemuste analüüs

Tervete vabatahtlike cfDNA teise põlvkonna sekvenerimise tulemusena saadi 346 000 *paired-end* järjestust. Kvaliteediskoor vähemalt Q₃₀ oli 92%-l proovidest. Lahjendusrea proovide keskmine katvus üle 8 ampliconi, mida kasutati hiljem ka uuritavate analüüsimiseks oli 950 (vahemikus 1 - 5075) lugemit. Lahjendusrea proovide sekvenerimisel ei peetud primaarseks suurt katvust, vaid kontrolli multipleks gruppide töötavust ja hinnati cfDNA metülatsioonitaseme analüüsi võimalikkust teisel põlvkonnal põhineval sekvenerimismetoodikal.

Kaks ampliconi, millel olid suuremad katvused võrreldes ülejäänud ampliconidega olid *HOXA9* ja *DLECI*. Keskmine katvus üle kolme proovi oli *DLECI* geenis 1232 (vahemikus 799 – 1513) ja *HOXA9* geenis 2659 (vahemikus 1624 – 3264). Lahjendusrea sekvenerimise põhjal saadud metülatsioonitase oli märgatavalt väiksem arvestuslikust (tabel 5), mis tõenäoliselt tuleneb sellest, et cfDNA on fragmenteerunud ning madala kontsentratsiooniga, mistõttu metüleerimine M.SssI metüültransferaasiga polnud edukas. Kui edaspidi on soovi täpsemalt kalibreerida metülatsioonitaseme detektsioonipiire, tuleks cfDNA metüleeritud lahjendusrea tegemiseks katsetingimusi täiendavalt optimeerida või kasutada mõnda alternatiivset kalibratsioonisüsteemi.

Tabel 5. Lahjendusrea proovide arvestuslikud ja sekvenerimise põhjal saadud metülatsioonimäärad *DLECI* ja *HOXA9* geenis.

Proov	Geen	Arvestuslik	Sekvenerimise põhjal
0% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	0%	0,50%
	<i>HOXA9</i>	0%	0,20%
5% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	5%	0,25%
	<i>HOXA9</i>	5%	1,56%
10% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	10%	7,50%
	<i>HOXA9</i>	10%	13,10%
20% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	20%	4,50%
	<i>HOXA9</i>	20%	5,30%
50% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	50%	16,00%
	<i>HOXA9</i>	50%	17,30%
100% üle kolme korduse	<i>DLECI</i>	100%	60,80%
	<i>HOXA9</i>	100%	63,30%

Sekvenerimistulemustest järeldati, et metülatsioonitaset on antud meetoditega võimalik uurida ning edaspidi kasutati lahjendusreast valitud arvestusliku 20% metülatsioonitasemega

proovi vaid positiivse kontrollina. Neljal amplikonil kolmeteistkümnest ei tuvastatud lugemeid või tuvastati väga vähe lugemeid, mis on tõenäoliselt põhjustatud multipleks gruppide sobimatuses. Metüleerimata tervete isikute cfDNA metülatsioonimäär näitab tõenäoliselt seda, et antud geenides eksisteerib madala tasemega metülatsioon.

Uuritavad isikud

Uuritavate DNA eraldamine

Antud magistritöö valimisse kuuluvate mitteväikerakulise kopsuvähiga uuritavate esmase materjali rakuvaba DNA keskmine kontsentratsioon oli 0,797 ng/μl (vahemikus 0,192 - 3,620 ng/μl) ning korduva materjali keskmine kontsentratsioon oli 1,834 ng/μl (vahemikus 0,254 - 6,780 ng/μl). Esmase materjali *buffy* kihi DNA keskmine kontsentratsioon oli 81,5 ng/μl (vahemikus 27,8 - 234 ng/μl) ning korduva materjali *buffy* kihi DNA keskmine kontsentratsioon oli 107,8 ng/μl (vahemikus 51,8 - 163 ng/μl). FFPE koematerjali DNA keskmine kontsentratsioon oli 82,4 ng/μl (vahemikus 3,48 - 484 ng/μl). Viie terve isiku cfDNA keskmine kontsentratsioon oli 0,279 ng/μl (vahemikus 0,102 - 0,820 ng/μl) ning *buffy* kihi DNA keskmine kontsentratsioon oli 88,0 ng/μl (vahemikus 80,6 - 101,0 ng/μl).

Sekvenerimisraamatukogu ettevalmistamine

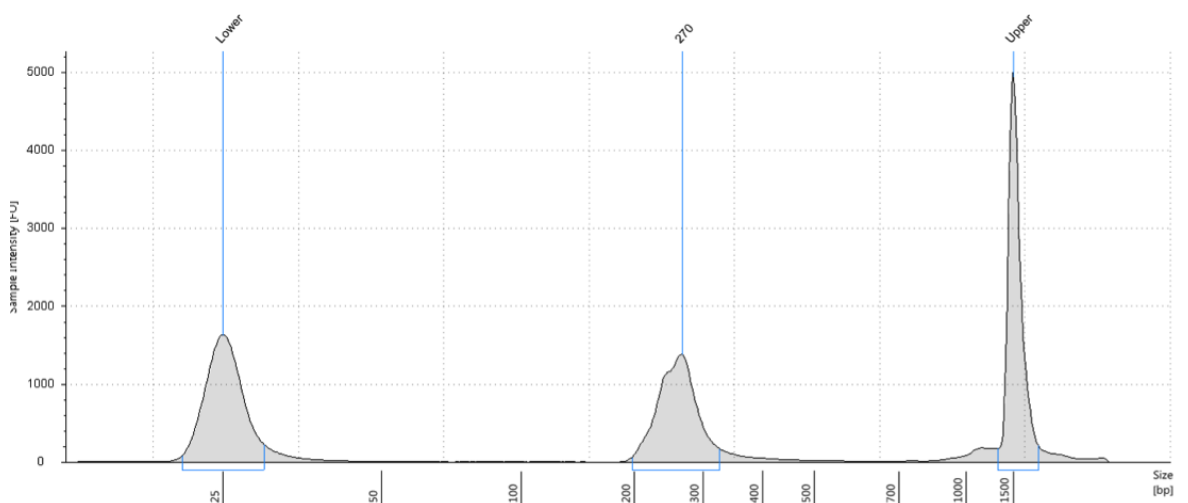
Metülatsioonitaseme muutuste hindamiseks otsustati uuritavate puhul võrrelda omavahel ühe isiku *buffy* kihi DNA-d, cfDNA-d ja FFPE DNA-d. Samuti võeti võrdluseks viie terve vabatahtliku indiviidi cfDNA ja *buffy* kihi DNA proovid.

Praimerite dimeerid võivad mõjutada sekvenerimise kvaliteeti ning seetõttu on multipleks gruppide optimeerimine tähtis. Seepärast testiti kõikide praimerite omavahelist sobivust PCR-iga ning tulemuste põhjal töötati käsitsi välja uued multipleks grupid. Selle tulemusena valiti 9 kandidaatgeeni, mis jagati kahte multipleks gruppi (tabel 6).

Tabel 6. Uued väljatöötatud multipleks grupid, mida kasutati uuritavate DNA metülatsioonitaseme määramiseks.

Grupp 1	<i>HOXA7</i>	<i>HOXA11</i>	<i>HOXA9</i>	<i>ZNF154</i>	
Grupp 2	<i>AGTR1</i>	<i>CCDC181</i>	<i>DLEC1</i>	<i>CD01</i>	<i>NR2E1</i>

Peale indeks PCR-i viidi magnetkerakestega puhastamine läbi ainult ühe korra, kuna TapeStationil mõõdetud puhastatud produktide fragmentide pikkused olid õige suurusega ning oodatust pikemaid DNA fragmente peaaegu ei esinenud. Joonisel 10 on näidatud uuritava kA44 DNA fragmentide pikkused peale indeks PCR-i ning magnetkerakestega puhastamist.



Joonis 10. Uuritava kA44 cfDNA fragmentide pikkused peale indeks PCR-i ja magnetkerakesetega puhastamist. Oodatud PCR-i produktide pikkus on vahemikus 237 - 284 bp. X-teljel on pikkus aluspaarides, y-teljel on proovi intensiivsus fuorestsents ühikutes (FU). Lower - alumine pikkusmarker, Upper - ülemine pikkusmarker.

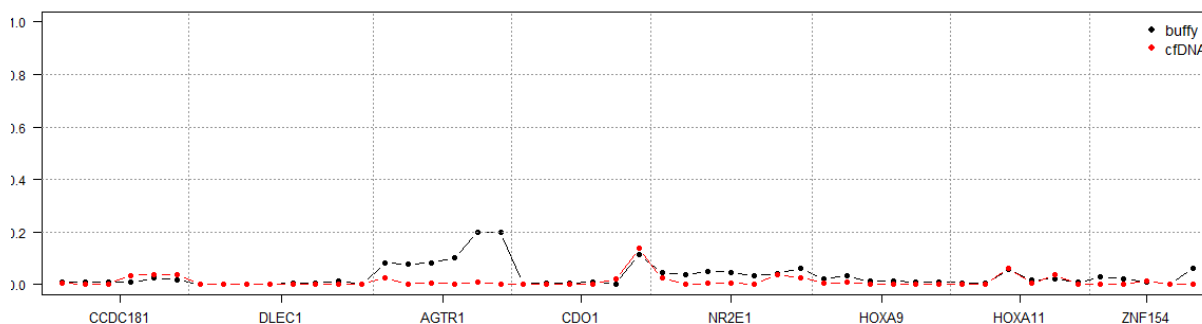
Sekvenerimistulemuste analüüs

Kopsuvähiga uuritavate DNA teise põlvkonna sekvenerimise tulemusena saadi 14,45 miljonit järjestust. Kvaliteediskooriga vähemalt Q₃₀ olid 95,22% proovidest. Amplikonid, mille keskmine katvus üle proovide oli alla 100 (N=1), jäeti analüüsist välja, sest hinnanguliselt on 10% metülatsoonitaseme muutuse tuvastamiseks vaja ligikaudu 100 lugemit. Ülejäänud amplikonide (N=8) keskmine katvus üle proovide oli 13 000 (vahemikus 600 - 32 000).

Arvestuslikult 20% metüleeritud positiivse kontrollproovi kolme kordust analüüsiti kahe amplikoni suhtes (*HOXA9* ja *DLEC1*) nagu eelnevalt. Kolme korduse keskmine metülatsoonimäär oli oodatud 20% asemel *DLEC1* geenis 4,8% ja *HOXA9* geenis 5,8%. Keskmine katvus üle kolme proovi oli *DLEC1* geenis 8244 (vahemikus 4582 – 10 514) ja *HOXA9* geenis 16 741 (vahemikus 11 671 – 20 680). Esimesel sekvenerimisel oli

metülatsioonimäär lahjendusrea 20% metüleeritud proovidel geenid *DLEC1* 4,5% ja *HOXA9* 5,3%, millest võib järeldada, et kiipidevaheline varieeruvus on väike.

Terve isiku number 2 metülatsiooni profiil on toodud välja joonisel 11, kust on näha, et *AGTR1* metülatsioonitase oli *buffy* kihi DNA-s kõrgem kui cfDNA-s.



Joonis 11. Terve isiku number 2 metülatsiooniprofiil. X-teljel on amplikonide CpG saidid, y-teljel on metülatsioonimäär skaalal 0 - 100%.

Kuna geeni *AGTR1* CpG saidid olid osaliselt metüleeritud ka *buffy* kihi DNA-s nii tervetel kui uuritavatel, siis selle geeni leide uuritavate korral ei vaadeldud. Ülejäänud uuringusse valitud geenide puhul sarnanes tervetel isikutel cfDNA metülatsioonimäär *buffy* kihi DNA-ga.

Tabelis 7 on välja toodud amplikonisisesed keskmised metülatsioonimäära erinevused cfDNA ja *buffy* kihi DNA vahel, kus metülatsioonitase on cfDNA-s vähemalt 10% kõrgem kui *buffy* kihi DNA-s.

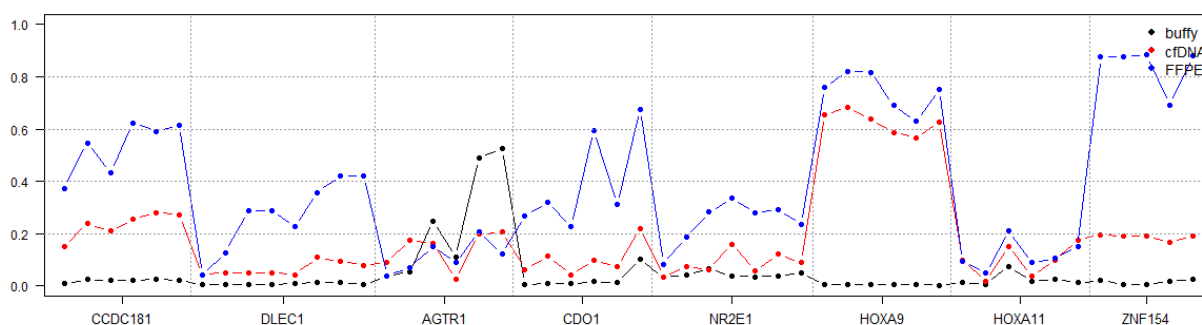
Tabel 7. Uuritavad isikud, kelle cfDNA-s olid antud geenide piirkonnad vähemalt 10% kõrgema metülatsioonitasemega kui *buffy* kihi DNA-s.

Isik	<i>CCDC181</i>	<i>DLEC1</i>	<i>NR2E1</i>	<i>HOXA9</i>	<i>ZNF154</i>
kA49				18,7%	
kA50					24,8%
kA69					36,1%
kA72		20,5%	14,4%		
kA81		21,5%			
kA82	21,4%			62,3%	17,2%
kA89	11,2%				42,0%
kA91					34,1%

Kõige enam leiti cfDNA metülatsioonitaseme tõusu võrreldes buffy kihi DNA-ga *ZNF154* geenis. 32-st isikust tuvastati seda 5 isikul, ehk 15,6% uuritavatest, aga ka50 proovi puhul jättis soovida antud piirkonna metülatsioonitaseme kvantitatiivne analüüs, kuna selle katvus oli vaid 43-kordne.

NR2E1 geeni CpG saitides nägime ühe uuritava cfDNA puhul 14% metülatsiooni tõusu võrreldes buffy kihi DNA-ga. Uuritav ka72 oli retsidiveerunud kasvajaga ning oli valimi ainus lamerakulise kopsuvähi histoloogiaga isik.

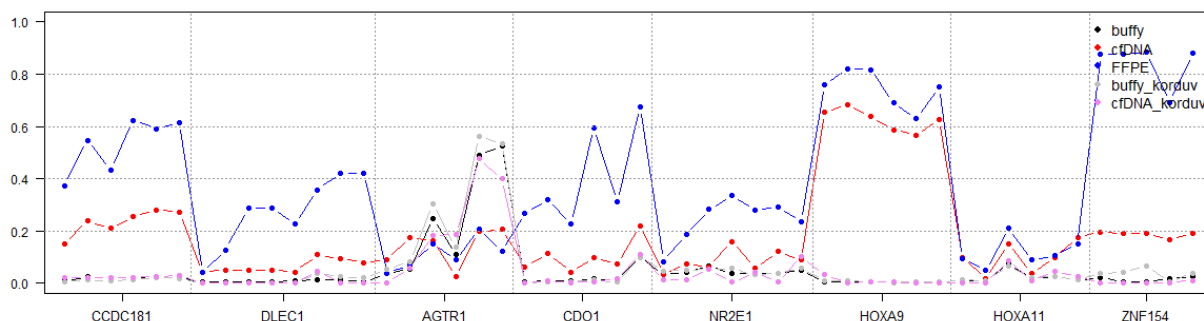
CCDC181, *DLEC1* ja *HOXA9* geenide puhul nägime üle 10% metülatsiooni tõusu cfDNA-s kahel uuritaval. Kõige suuremat tõusu täheldati isiku ka82 *HOXA9* geeni uuritavas piirkonnas, kus keskmine metülatsioonitase cfDNA-s oli võrreldes buffy kihi DNA-ga tõusnud 62% (joonis 12). Uuritavalt oli võetud ka FFPE koeproov ning jooniselt on selgelt näha, et nii cfDNA kui ka FFPE DNA metülatsioonitase on *HOXA9* geenis tunduvalt kõrgem kui buffy kihi DNA-s. Leidu toetab *HOXA9* kõrge metülatsioonitase FFPE kasvajakoes. Samuti esineb uuritaval ka82 vähemalt 10% metülatsioonitaseme tõus cfDNA-s võrreldes buffy kihi DNA-ga *CCDC181* ja *ZNF154* geenides. Kahjuks selle isiku puhul ei suudetud täpsustada kopsuvähi histoloogilist vormi.



Joonis 12. Uuritava ka82 metülatsiooniprofiil. Geen *HOXA9* on väga suur metülatsioonitaseme erinevus buffy kihi DNA ja cfDNA vahel. Leidu toetab FFPE DNA kõrge metülatsioonitase. X-teljel on amplikonide CpG saidid, y-teljel on metülatsioonimäär skaalal 0 - 100%.

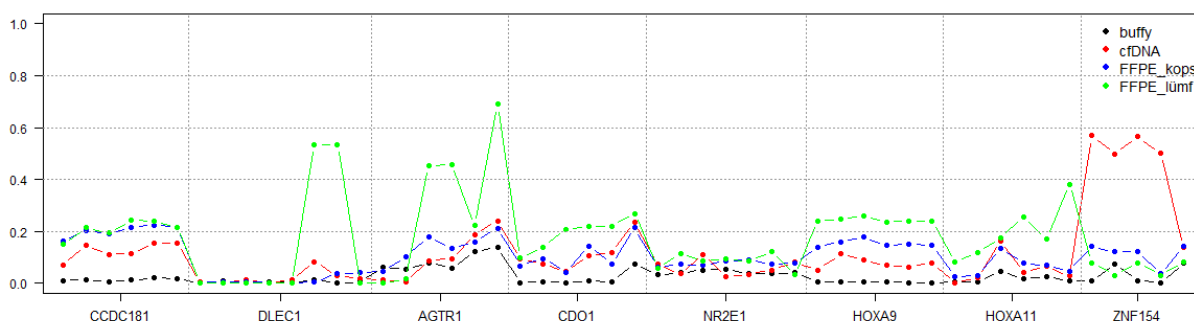
Uuritavalt ka82 oli võetud lisaks ka teisel ajahetkel vereproov ning joonisel 13 on toodud korduva proovi cfDNA ja buffy kihi DNA metülatsioonitase võrdluses esialgse cfDNA ja buffy kihi DNA-ga ning FFPE DNA materjaliga. Korduval proovil oli cfDNA metülatsioonitase ligilähedane buffy kihi DNA omaga. Selle põhjuseks on eeldatavalt kasvaja DNA osakaalu langus cfDNA-s või kasvaja epigeneetilise profiili muutus (tegemist on ravi alustamise järgselt võetud materjaliga). Kuna buffy kihi DNA sisaldab

mittekasvajaliste rakkude DNA-d, siis peaksid algne ning korduv *buffy* kihi DNA olema sarnase metülatsioonimääraga. Seda on ka profiilides näha. Samuti on hästi näha, et kõrgem cfDNA metülatsioonitase *CCDC181*, *HOXA9* ja *ZNF154* geenides võiks tuleneda kopsukoest, sest kopsuvähi FFPE proovis on samuti näha kõrge metülatsioonimäär.



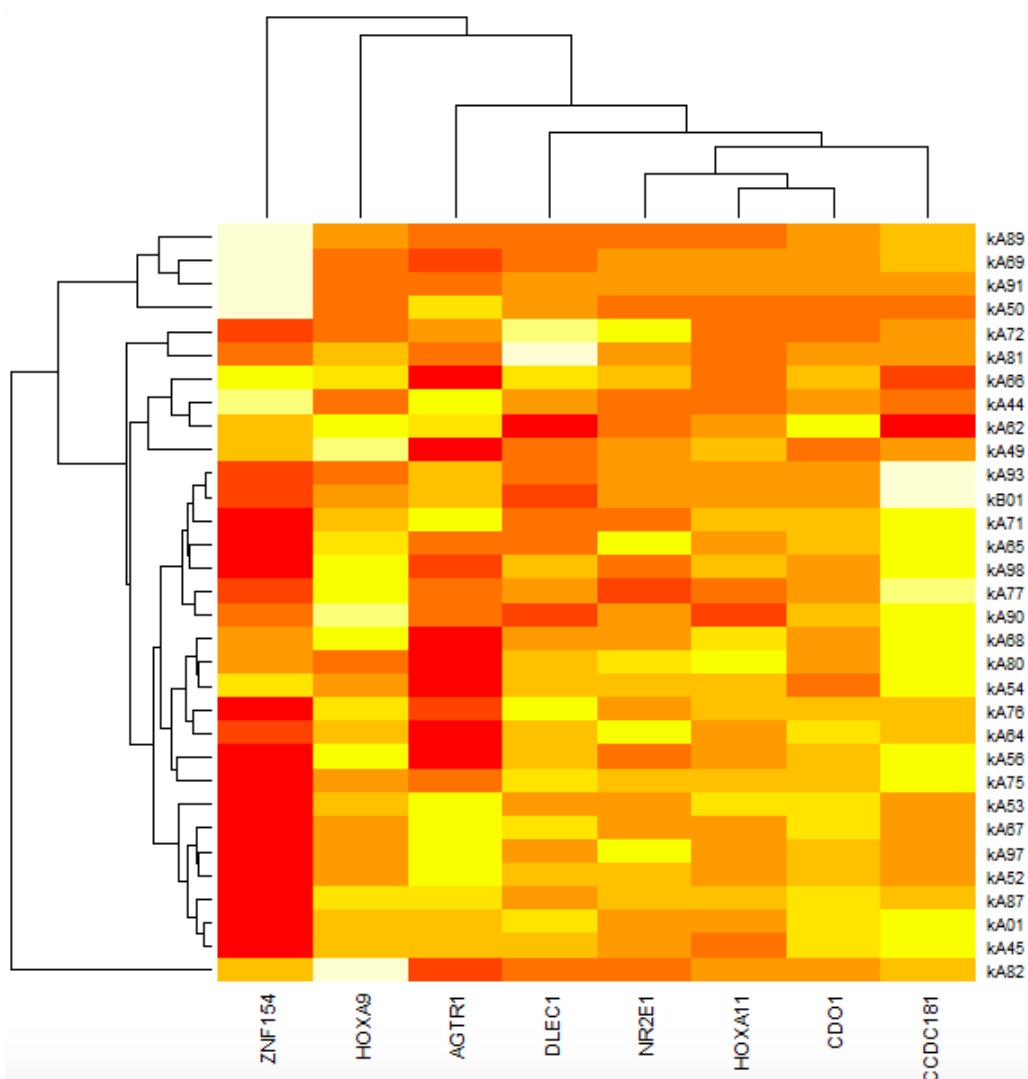
Joonis 13. Uuritava kA82 metülatsiooniprofiil, kus on näidatud ka teisel ajahetkel võetud cfDNA ja *buffy* kihi DNA metülatsioonimäär. X-teljel on amplikonide CpG saidid, y-teljel on metülatsioonimäär skaalal 0 - 100%.

Joonisel 14 on näha uuritava kA89 metülatsiooniprofiili, kus 11% metülatsiooni tõusu täheldati geenis *CCDC181* ja 42% tõusu *ZNF154* geenis. Antud uuritaval on FFPE koeproov võetud nii kopsust kui ka lümfisõlmest. Lümfisõlme FFPE materjalis on DNA metülatsioonitase kõrgem *DLEC1*, *AGTR1*, *CDO1*, *HOXA9* ja *HOXA11* geenides kui kopsukoe FFPE materjalis, mis võib osalt peegeldada koespetsiifilist metülatsiooni ja osalt olla seotud kasvajakude hulgaga uuritavas materjalis. Kui üldiselt oli kasvajakke sisaldava FFPE koematerjali metülatsioonitase kõrgem kui cfDNA-s, siis antud proovi puhul esineb *ZNF154* geenis vastupidine olukord. Tulemus võib peegeldada koematerjali epigeneetilist või klonaalset heterogeensust.



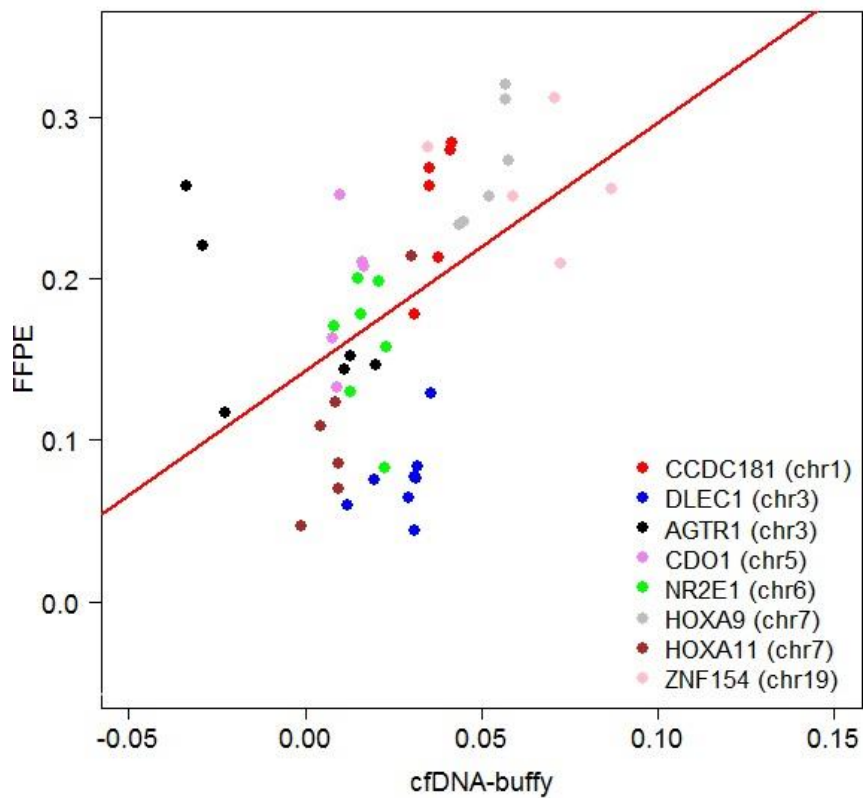
Joonis 14. Uuritava kA89 metülatsiooniprofiil. X-teljel on amplikonide CpG saidid, y-teljel on metülatsioonimäär skaalal 0 - 100%.

Joonisel 15 on kuumakaardina näidatud isikute ning ampliconide klasterdumist. Mida heledam kast, seda erinevamad on üksteisest cfDNA ja *buffy* kihi DNA metülatsioonitasel. Üksteisele sarnasemad proovid ja ampliconid klasterduvad kokku.



Joonis 15. Kuumakaart (*heatmap*) isikute ning ampliconide klasterdumisest. Mida heledam kast, seda erinevamad on üksteisest antud proovi antud ampliconi *buffy* kihi ja cfDNA metülatsioonimäär.

Joonisel 16 on näidatud korrelatsiooni cfDNA (kust on maha arvatud *buffy* kihi DNA keskmine metülatsioonitasel) ja FFPE DNA keskmiste metülatsioonitasemete vahel. Pearsoni korrelatsioonikordaja FFPE ja cfDNA keskmiste metülatsioonitasemete vahel on 0,44 (seos näidatud punase joonega; $p=0,002$), mis tähendab, et cfDNA ja FFPE metülatsioonitasemed korreleeruvad positiivselt.



Joonis 16. X-teljel on kujutatud cfDNA metülatsioonitase, millest on maha arvatud *buffy* kihi DNA metülatsioonitase. Y-teljel on kujutatud FFPE DNA metülatsioonitase. Punase joonega on toodud Pearsoni korrelatsioonikordaja. Joonisel tähistab üks punkt ühte CpG saiti ning erinevad amplikonid on näidatud erinevate värvidega.

Arutelu

Vähkkasvajaid iseloomustab tuumorsupressorgeenide promootorregioonide CpG saarekeste hüpermetülatsioon, mis toimub juba varajases kartsinogeneesis (Nawaz *et al.*, 2014). Vedel biopsia on väheinvasiivne meetod, millega saab verest uurida kasvajatest tulenevaid metülatsioonitaseme muutusi. Vedela biopsia analüüs peegeldab kasvaja heterogeensust ning võimaldab vähkkasvajaga seotud muutusi tuvastada reaalajas.

Antud magistr töö eesmärgiks oli esmalt koostada töövoog metülatsioonitaseme uurimiseks rakuvabas DNA-s ning seejärel uurida pilootprojektina uuritavate kopsuvähiga isikute metülatsioonimäära rakuvabas DNA-s valitud kandidaatgeenides.

Eksperimentaalse töö esimeses etapis töötati välja meetod, millega on võimalik metülatsioonimäära hinnata rakuvabas DNA-s. Analüüsimiseks otsiti kandidaatgeenides esinevaid CpG-sid, mis oleksid tervete isikute kopsukoos ja veres madala metülatsiooni tasemega ning kus kasvajaga isiku puhul esineb metülatsiooni tõusu.

Väljatöötatud töövoog põhineb proovide naatriumbisulfit-töötlusel, millele järgneb multipleks PCR ning amplikonipõhine teise põlvkonna sekveneerimine. Multipleks PCR-i eelis võrreldes tavapärase PCR-ga on see, et on võimalik väikesest algkogusest cfDNA-st amplifitseerida mitmeid uuritavad geene. Esialgu testiti töövoogu tervete isikute cfDNA lahjendusrea peal, mis saadi segades metüleeritud ja metüleerimata cfDNA-d omavahel vastavates kogustes kokku. Katsete põhjal leiti, et cfDNA metülaasiga metüleerimine vajaks optimeerimist, sest lahjendusrea proovide arvestuslikud metülatsioonitasemed olid palju kõrgemad kui sekveneerimisel saadud tegelikud metülatsioonimäärad. Tõenäoliselt pole kasutatud tootjapoolsed juhendid optimaalsed madala kontsentratsiooniga cfDNA jaoks ja samuti võib reaktsiooni efektiivsust mõjutada ka see, et cfDNA fragmendid on väga lühikesed. Samuti järeldati katsete põhjal, et naatriumbisulfit-töötlusel, multipleks PCR-il ja teise põlvkonna amplikonipõhisel sekveneerimisel põhineva töövooga on võimalik metülatsioonimäära tuvastamine. Kuna kõigil analüüsitavatel amplikonitel ei olnud piisavalt lugemeid, kohandati multipleks PCR-i tingimusi - praimerite kontsentratsiooni reaktsioonisegus ja võeti kasutusele Zymotag™ Premix polümeraas, mis on spetsiifiliselt mõeldud naatriumbisulfit-töödeldud DNA-le. Samuti katsetati uute multipleks gruppide disainimiseks kõiki praimereid omavahel praimerite dimeeride tekkimise suhtes.

Eksperimentaalse töö teises etapis testiti antud töövoogu 32 mitteväikerakulise kopsuvähiga isiku rakuvaba DNA peal. Metülatsioonitaseme muutuste hindamiseks otsustati uuritavatel võrrelda sama isiku cfDNA-d (peamine uuritav materjal), *buffy* kihi DNA-d (negatiivne kontroll), ja FFPE DNA-d (positiivne kontroll). Samuti kasutati täiendava negatiivse kontrollina viie terve vabatahtliku cfDNA ja *buffy* kihi DNA proove. cfDNA metülatsioonitasemest lahutati analüüsis *buffy* kihi DNA metülatsioonitase, kuna *buffy* kihi DNA sisaldab mittekasvajaliste vererakkude DNA-d, mida on eeldatavalt ka cfDNA-s.

Uuritavatel isikutel otsiti metülatsioonitaseme muutusi, kus amplikonisiselt oleks cfDNA keskmine metülatsioonimäär vähemalt 10% suurem kui *buffy* kihi DNA-s. 7-l uuritaval 32-st ehk 21,8%-l uuritavatest tuvastati vähemalt ühe geeni puhul 10% metülatsioonitaseme erinevus cfDNA ja *buffy* kihi DNA vahel.

cfDNA metülatsioonitaseme alusel on *ZNF154* valitud geenidest potentsiaalselt enamkasutatav kopsuvähi cfDNA põhise diagnostilise biomarkerina, kuna selle osas esines 15%-l uuritavatest vähemalt 10% metülatsioonitaseme tõus cfDNA-s. Varasemalt on näidatud, et *ZNF154* hüpermetülatsiooni esineb erinevates kasvajates (ka kopsuvähis) ning see omab potentsiaali kasuliku biomarkerina erinevat tüüpi vähi diagnoosimisel (Margolin *et al.*, 2016). Absoluutskaalas kõige suurem cfDNA metülatsioonitaseme muutus leiti kA82 uuritava *HOXA9* geenis, kus metülatsioonitase oli 62,6%. Varasemalt on näidatud, et *HOXA9* inhibeerib kopsuvähi rakkude migratsiooni ning selle hüpermetülatsiooni on seostatud NSCLC puhul kasvaja retsidiivide suurenenud tõenäosusega (Hwang *et al.*, 2015). *DLEC1* metülatsioonitaseme tõus esines uuritavatel kA72, kes oli retsidiiveerunud kasvajaga ning kA81, kellel oli diagnoositud IV staadiumi adenokartsioom. On näidatud, et *DLEC1* hüpermetülatsioon seostub vähkkasvaja levikuga kui võrreldi lokaalseid ja metastaatilisi kasvajaid (Castro *et al.*, 2010). Retsidiiveerunud kasvajaga oli valimis kolm isikut. Tegemist on esialgsete hinnangutega tingituna sellest, et valim on üsna väike ning pakutud biomarkerite kasutatavus rakuvabas DNA-s vajaks edasist uurimist.

cfDNA kasutatavust kopsuvähi metülatsioonipõhise biomarkerina toetab ka üldise korrelatsiooni esinemine kasvajatega isikute FFPE DNA metülatsioonitaseme ja cfDNA metülatsioonitaseme

vahel. Uuringu eelselt eeldasime, et oluline osa isikute cfDNA-st pärineb kopsukasvajast ja selle metastaasidest.

Uuringu alusel ei ole võimalik anda täpsemat infot ravi tulemuslikkuse kohta, kuna vereproove võeti valdavalt enne ravi algust ning kasvaja progressioonil. Enamate proovide kogumist takistasid logistilised probleemid, mistõttu suurel osal uuritavatest õnnestus koguda vaid esmane vereproov.

Lahjendusrea arvestusliku 20% kontrolli metülatsioonitaseme võrdlemine lahjendusrea kiibi ja uuritavate DNA-ga kiibil näitas, et kiipidevaheline varieeruvus on väike.

Naatriumbisulfit-töödeldud proovide amplikonipõhine multipleks suunatud kõrge katvusega sekveneerimine sobib cfDNA metülatsioonimäära hindamiseks ning antud meetodi üheks eeliseks on analüüsimiseks väikese algkoguse DNA vajalikkus. Uuringu põhjal järeldame, et cfDNA metülatsiooniprofiilide analüüsimine on potentsiaalselt kasutatav uute biomarkerite testimisel ja leidmisel.

Kokkuvõte

Antud magistritöö kirjanduse peatükis anti ülevaade imetajates toimuvast DNA metülatsioonist, ja metülatsiooni funktsionaalsest tähendusest. Lisaks käsitleti ka tuumorsupressorgeenide promotorite CpG saarekete hüpermetülatsiooni vähi kontekstis ning anti ülevaade peamistest metülatsiooni määramise meetoditest. Samuti kirjeldati vedela biopsia analüüsi ning selle eeliseid võrreldes tavapärase koeproovi analüüsiga.

Eksperimentaalse osa esimeseks eesmärgiks oli välja töötada töövoog metülatsioonitaseme tuvastamiseks rakuvabas DNA-s. Töövoog, mis põhineb proovide naatriumbisulfit-töötlusel, multipleks PCR-l ning amplikonipõhisel teise põlvkonna sekveneerimisel, töötati esialgu välja kunstlikult metüleeritud lahjendusrea proovidel.

Eksperimentaalse osa teiseks eesmärgiks oli rakendada väljatöötatud meetodeid mitteväikerakulise kopsuvähiga uuritavate cfDNA, *buffy* kihi DNA ja FFPE DNA peal ning hinnata cfDNA metülatsioonitaseme kopsuvähi biomarkerina. Metülatsioonitaseme muutuste analüüsimiseks vaadeldi cfDNA metülatsioonitaseme erinevust *buffy* kihi DNA metülatsioonitasemega. FFPE DNA metülatsioonitaset kasutati positiivse kontrollina.

7-l isikul 32-st ehk 21,8%-l uuritavatest tuvastati vähemalt ühes amplikonis rohkem kui 10%-line CpG saitide keskmine metülatsioonitaseme erinevus cfDNA ja *buffy* DNA vahel. Kõige suuremat kasulikkust cfDNA metülatsioonitaseme mõõtmisel näitas *ZNF154* geen, kus esines 15%-l antud magistritöö valimisse kuuluvates isikutest vähemalt 10%-line metülatsioonitaseme erinevus cfDNA-s. Kõige suurem metülatsioonitaseme erinevus (62%) esines *HOXA9* amplikonis.

Sekveneerimistulemuste põhjal järelitati, et väljatöötatud töövoog võimaldab metülatsioonitaseme täpset määramist ning rakuvaba DNA metülatsioonitaseme muutus on potentsiaalselt kasutatav diagnostilise biomarkerina.

Altered methylation of circulating cell-free DNA as a biomarker of lung cancer

Margot Saare

Summary

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths and early diagnosis of lung cancer could increase survival rate. Thus researching for new biomarkers for lung cancer detection is important. Carcinogenesis is characterized by epigenetic and genetic changes in the genome. Hypermethylation of CpG sites in promoter regions of tumor suppressor genes is a common epigenetic change that is present in different types of cancer. Liquid biopsy is a blood-based method which has several advantages over tissue biopsy and it is possible to detect DNA fragments from tumor cells in cell-free DNA. The challenges of liquid biopsy are that cell-free DNA is highly fragmented, contains low concentrations of tumor derived circulating DNA and methods for detecting circulating cell-free DNA must be sensitive.

The aim of this study was to create a workflow for analysing methylation levels in cell-free DNA and then to use this workflow to analyse altered methylation of selected genes and regions as biomarkers for lung cancer. The workflow was based on treating samples with sodium bisulfite, performing multiplex PCR and then proceeded by next generation sequencing. Methylation level changes were analysed in 37 plasma and buffy coat samples with 23 matching FFPE samples from 32 lung carcinoma patients. In 7 lung cancer patients average methylation level in cell-free DNA was at least 10% higher than in buffy coat DNA at least in one candidate gene. Gene ZNF154 showed the most potential as lung cancer biomarker since there was at least 10% methylation level change in 15% lung carcinoma patients.

We concluded that this workflow is suitable for analysing methylation levels of cell-free DNA and analysing methylation profiles of selected genes in cell-free DNA can be potentially used as biomarkers for lung cancer diagnosis.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajat Neeme Tõnissoni võimaluse eest teostada oma magistritöö nii huvitaval teemal. Suured tänuõnad lähevad ka kaasjuhendajatele Madli Tammele ja Kaie Lokkile kannatlikuse, abivalmiduse ning näpunäidete eest antud lõputöö valmimisel.

Suured tänud ka kõigile, kes aitasid kaasa töö erinevates etappides.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., ... Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, *158*, 1110–1122.
- Agarwal, N., Hardt, T., Brero, A., Nowak, D., Rothbauer, U., Becker, A., ... Cardoso, M. C. (2007). MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Research*, *35*, 5402–5408.
- Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L., & Remm, M. (2006). GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. *BMC bioinformatics*, *7*, 172.
- Arnold, C. N., Goel, A., & Boland, C. R. (2003). Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, *106*, 66–73.
- Balgkouranidou, I., Chimonidou, M., Milaki, G., Tsaroucha, E., Kakolyris, S., Georgoulis, V., & Lianidou, E. (2016). SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *54*, 1385–1393.
- Ball, M. P., Li, J. B., Gao, Y., Lee, J.-H., LeProust, E. M., Park, I.-H., ... Church, G. M. (2009). Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nature biotechnology*, *27*, 361–8.
- Best, M. G., Sol, N., Zijl, S., Reijneveld, J. C., Wesseling, P., & Wurdinger, T. (2015). Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathologica*.
- Bird, A. P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research*, *8*, 1499–1504.
- Botezatu, I., Serdyuk, O., Potapova, G., Shelepov, V., Alechina, R., Molyaka, Y., ... Lichtenstein, A. (2000). Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clinical Chemistry*, *46*, 1078–1084.
- Breitbach, S., Sterzing, B., Magallanes, C., Tug, S., & Simon, P. (2014). Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *117*, 119–30.
- Brena, R. M., & Costello, J. F. (2007). Genome-epigenome interactions in cancer. *Human molecular genetics*, *16 Spec No*, R96-105.
- Brock, M. V., Hooker, C. M., Ota-Machida, E., Han, Y., Guo, M., Ames, S., ... Herman, J. G. (2008). DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *The New England journal of medicine*, *358*, 1118–28.
- Busche, S., Shao, X., Caron, M., Kwan, T., Allum, F., Cheung, W. A., ... Grundberg, E. (2015). Population whole-genome bisulfite sequencing across two tissues highlights the environment as the principal source of human methylome variation. *Genome biology*, *16*, 290.
- Castro, M., Grau, L., Puerta, P., Gimenez, L., Venditti, J., Quadrelli, S., & Sánchez-Carbayo, M. (2010). Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *Journal of translational medicine*, *8*, 86.
- Catarino, R., Ferreira, M. M., Rodrigues, H., Coelho, A., Nogal, A., Sousa, A., & Medeiros, R. (2008). Quantification of Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer. *DNA and Cell Biology*, *27*, 415–421.
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification:

- patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics*, *10*, 295–304.
- Chan, K. C. A., Jiang, P., Chan, C. W. M., Sun, K., Wong, J., Hui, E. P., ... Lo, Y. M. D. (2013). Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 18761–18768.
- Chan, T. A., Glockner, S., Joo, M. Y., Chen, W., Van Neste, L., Cope, L., ... Baylin, S. B. (2008). Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. *PLoS Medicine*, *5*, 0823–0837.
- Chang, Y., Sun, L., Kokura, K., Horton, J. R., Fukuda, M., Espejo, A., ... Cheng, X. (2011). MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nature Communications*, *2*, 533.
- Coppieters, N., Dieriks, B. V., Lill, C., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., & Dragunow, M. (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiology of Aging*, *35*, 1334–1344.
- Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., ... Liloglou, T. (2009). Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, *124*, 81–87.
- De Vlaminck, I., Martin, L., Kertesz, M., Patel, K., Kowarsky, M., Strehl, C., ... Quake, S. R. (2015). Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*, 13336–41.
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., ... Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 16368–73.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. a, Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... Diaz, L. a. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, *14*, 985–990.
- Dietrich, D., Hasinger, O., Liebenberg, V., Field, J. K., Kristiansen, G., & Soltermann, A. (2012). Methylation of the Homeobox Genes PITX2 and SHOX2 Predicts Outcome in Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Diagn Mol Pathol*, *21*, 93–104.
- Draht, M. X. G., Smits, K. M., Jooste, V., Tournier, B., Vervoort, M., Ramaekers, C., ... Melotte, V. (2016). Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clinical Epigenetics*, *8*, 44.
- Duppel, U., Woenckhaus, M., Schulz, C., Merk, J., & Dietmaier, W. (2016). Quantitative detection of TUSC3 promoter methylation - A potential biomarker for prognosis in lung cancer. *Oncology Letters*, *12*, 3004–3012.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. a. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, *429*, 457–63.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, *21*, 5400–5413.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., Mccune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, *10*, 2709–2721.
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, *21*, 5427–40.
- Forshe, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D. W. Y., Kaper, F., ... Rosenfeld, N. (2012). Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted

- deep sequencing of plasma DNA. *Science Translational Medicine*, 4, 136ra68-136ra68.
- Fujiwara, K., Fujimoto, N., Tabata, M., Nishii, K., Matsuo, K., Hotta, K., ... Tanimoto, M. (2005). Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 1219-1225.
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics and Development*.
- Gambichler, T., Sand, M., & Skrygan, M. (2013). Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma. *Melanoma research*, 23, 218-20.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., ... Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine*, 366, 883-92.
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 74, 481-514.
- Goyal, R., Reinhardt, R., & Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 34, 1182-1188.
- Gu, J., Wen, Y., Zhu, S., Hua, F., Zhao, H., Xu, H., ... Zhou, Q. (2013). Association between P16INK4a Promoter Methylation and Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0060107
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145, 423-434.
- Haffner, M. C., Chau, A., Meeker, A. K., Esopi, D. M., Gerber, J., Pellakuru, L. G., ... Yegnasubramanian, S. (2011). Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget*, 2, 627-637.
- Hardy, T., Zeybel, M., Day, C. P., Dipper, C., Masson, S., McPherson, S., ... Mann, J. (2016). Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, gutjnl-2016-311526.
- Hermann, A., Gowher, H., & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2571-2587.
- Heyward, F. D., & Sweatt, J. D. (2015). DNA Methylation in Memory Formation Emerging Insights. *The Neuroscientist*, 21, 475-489.
- Holdhoff, M., Schmidt, K., Donehower, R., & Diaz, L. A. (2009). Analysis of Circulating Tumor DNA to Confirm Somatic KRAS Mutations. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101, 1284-1285.
- Holmila, R., Sklias, A., Muller, D. C., Esposti, D. D., Guilloureau, P., McKay, J., ... Da Costa, A. N. (2017). Targeted deep sequencing of plasma circulating cell-free DNA reveals Vimentin and Fibulin 1 as potential epigenetic biomarkers for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 12. doi:10.1371/journal.pone.0174265
- Hotchkiss, R. D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of biological chemistry*, 175, 315-332.
- Huang, T., Chen, X., Hong, Q., Deng, Z., Ma, H., Xin, Y., ... Duan, S. (2015). Meta-analyses of gene methylation and smoking behavior in non-small cell lung cancer patients. *Scientific reports*, 5, 8897.
- Hulbert, A., Jusue-Torres, I., Stark, A., Chen, C., Rodgers, K., Lee, B., ... Herman, J. G. (2017). Early Detection of Lung Cancer Using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clinical Cancer Research*, 23, 1998 LP-2005.

- Hulbert, A., Jusue Torres, I., Stark, A., Chen, C., Rodgers, K., Lee, B., ... Herman, J. G. (2016). Early Detection of Lung Cancer using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23, 1998–2006.
- Hur, K., Cejas, P., Feliu, J., Moreno-Rubio, J., Burgos, E., Boland, C. R., & Goel, A. (2014). Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*, 63, 635–646.
- Hwang, J. A., Lee, B. Bin, Kim, Y., Hong, S. H., Kim, Y. H., Han, J., ... Kim, D. H. (2015). HOXA9 inhibits migration of lung cancer cells and its hypermethylation is associated with recurrence in non-small cell lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 54, E72–E80.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., & Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research*, 61, 1659–1665.
- Jang, S. J., Soria, J. C., Wang, L., Hassan, K. A., Hong, W. K., Mao, L., ... Walsh, G. L. (2001). Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Research*, 61, 7959–7963.
- Jjingo, D., Conley, A. B., Yi, S. V, Lunyak, V. V, & Jordan, I. K. (2012). On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*, 3, 462–74.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 13, 484–92.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., & Jeltsch, A. (2011). Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*, 12, 206–222.
- Kaplinski, L., Andreson, R., Puurand, T., & Remm, M. (2005). MultiPLX: Automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics*, 21, 1701–1702.
- Karachaliou, N., Mayo-de-las-Casas, C., Molina-Vila, M. A., & Rosell, R. (2015). Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Annals of Translational Medicine*, 3, 36.
- Klose, R. J., & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Kordi-Tamandani, D. M., Moazeni-Roodi, A. K., Rigi-Ladiz, M. A., Hashemi, M., Birjandian, E., & Torkamanzehi, A. (2010). Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Archives of Oral Biology*, 55, 809–814.
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 324, 929–30.
- Krueger, F., & Andrews, S. R. (2011). Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571–1572.
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5, 3.
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11, 191–203.
- Lecomte, T., Berger, A., Zinzindohoué, F., Micard, S., Landi, B., Blons, H., ... Laurent-Puig, P. (2002). Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International Journal of Cancer*, 100, 542–548.
- Lehmann-Werman, R., Neiman, D., Zemmour, H., Moss, J., Magenheimer, J., Vaknin-Dembinsky, A., ... Dor, Y. (2016). Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 113, E1826-34.
- Li, L.-C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18, 1427–1431.
- Li, W., & Liu, M. (2011). Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *Journal of nucleic acids*, 2011, 870726.
- Liu, C., Liu, L., Chen, X., Shen, J., Shan, J., Xu, Y., ... Qian, C. (2013). Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1. *PLoS ONE*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0062828
- Liu, Y., Zhou, Z. T., He, Q. B., & Jiang, W. W. (2012). DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. *Medical Oncology*, 29, 729–733.
- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American journal of human genetics*, 64, 218–24.
- Lokk, K., Vooder, T., Kolde, R., Välk, K., Võsa, U., Roosipuu, R., ... Tõnisson, N. (2012). Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, 7. doi:10.1371/journal.pone.0039813
- Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M., & Groudine, M. (2004). Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1068–1075.
- Lou, S., Lee, H.-M., Qin, H., Li, J.-W., Gao, Z., Liu, X., ... Yip, K. Y. (2014). Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biology*, 15, 408.
- Lyst, M. J., Ekiert, R., Ebert, D. H., Merusi, C., Nowak, J., Selfridge, J., ... Bird, A. (2013). Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat Neurosci*, 16, 898–902.
- Margolin, G., Petrykowska, H. M., Jameel, N., Bell, D. W., Young, A. C., & Elnitski, L. (2016). Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *Journal of Molecular Diagnostics*, 18, 283–298.
- Marzese, D. M., Hirose, H., & Hoon, D. S. B. (2013). Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*, 13, 827–44.
- Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D., & Roloff, T.-C. (2009). *Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)*. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* (Kd 507). doi:10.1007/978-1-59745-522-0_5
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 584–94.
- Momparler, R. L. (2005). Pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in Hematology*. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.002
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38, 23–38.
- Moran, S., Arribas, C., & Esteller, M. (2015). Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*, 6, epi.15.114.
- Mouliere, F., El Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A., & Thierry, A. R. (2014). Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal

- cancer. *Molecular Oncology*, 8, 927–941.
- Murtaza, M., Dawson, S.-J., Tsui, D. W. Y., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A. M., ... Rosenfeld, N. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 497, 108–12.
- Nam, J. S., Ino, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., & Hirohashi, S. (2004). 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 21, 49–56.
- Nawaz, I., Qiu, X., Wu, H., Li, Y., Fan, Y., Hu, L. F., ... Ernberg, I. (2014). Development of a multiplex methylation specific PCR suitable for (early) detection of non-small cell lung cancer. *Epigenetics*, 9, 1138–1148.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247–257.
- Pacaud, R., Sery, Q., Oliver, L., Vallette, F. M., Tost, J., & Cartron, P.-F. (2014). DNMT3L interacts with transcription factors to target DNMT3L/DNMT3B to specific DNA sequences: Role of the DNMT3L/DNMT3B/p65-NFκB complex in the (de-)methylation of TRAF1. *Biochimie*, 104, 36–49.
- Pacis, A., Tailleux, L., Morin, A. M., Lambourne, J., MacIsaac, J. L., Yotova, V., ... Barreiro, L. B. (2015). Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Research*, 25, 1801–1811.
- Palmisano, W. A., Divine, K. K., Saccomanno, G., Gilliland, F. D., Baylin, S. B., Herman, J. G., & Belinsky, S. A. (2000). Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Research*, 60, 5954–5958.
- Pan, S., Xu, J., Shu, Y., Wang, F., Xia, W., Ding, Q., ... Lu, S. (2010). Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface plasmon resonance biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 850–853.
- Peng, Z., Shen, R., Li, Y. W., Teng, K. Y., Shapiro, C. L., & Lin, H. J. L. (2012). Epigenetic Repression of RARRES1 is mediated by methylation of a proximal promoter and a loss of CTCF binding. *PLoS ONE*, 7. doi:10.1371/journal.pone.0036891
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., ... Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463, 1101–5.
- Prébet, T., Gore, S. D., Esterni, B., Gardin, C., Itzykson, R., Thepot, S., ... Vey, N. (2011). Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine Treatment failure. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 3322–3327.
- R Core Team. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria*.
- Rakyan, V. K., Down, T. a, Balding, D. J., & Beck, S. (2011). Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature reviews. Genetics*, 12, 529–41.
- Rand, A. C., Jain, M., Eizenga, J. M., Musselman-Brown, A., Olsen, H. E., Akeson, M., & Paten, B. (2017). Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nature Methods*, 14, 411–413.
- Rauch, T. a, Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K. H., Wang, Z., ... Pfeifer, G. P. (2008). High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 252–257.
- Ren, M., Wang, C., Sheng, D., Shi, Y., Jin, M., & Xu, S. (2017). Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis. *Annals of*

- Diagnostic Pathology*, 27, 57–61.
- Richter, A. M., Kiehl, S., Köger, N., Breuer, J., Stiewe, T., & Dammann, R. H. (2017). ZAR1 is a novel epigenetically inactivated tumour suppressor in lung cancer. *Clinical Epigenetics*, 9, 60.
- Rideout, W. M., Coetzee, G. A., Olumi, A. F., & Jones, P. A. (1990). 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, 249, 1288–1290.
- Rinaldi, L., Avgustinova, A., Martín, M., Datta, D., Solanas, G., Neus, P., & Benitah, S. A. (2017). Loss of dnmt3a and dnmt3b does not affect epidermal homeostasis but promotes squamous transformation through PPAR-g. *eLife*, 6. doi:10.7554/eLife.21697
- Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F. A., & Jones, P. A. (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research*, 27, 2291–2298.
- Rodenhiser, D., & Mann, M. (2006). Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*.
- Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*, 17, 330–339.
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20, 3156–65.
- Sandoval, J., Mendez-Gonzalez, J., Nadal, E., Chen, G., Carmona, F. J., Sayols, S., ... Esteller, M. (2013). A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31, 4140–4147.
- Santiago-Dieppa, D. R., Steinberg, J., Gonda, D., Cheung, V. J., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2014). Extracellular vesicles as a platform for „liquid biopsy“ in glioblastoma patients. *Expert review of molecular diagnostics*, 14, 819–25.
- Sarkar, S., Goldgar, S., Byler, S., Rosenthal, S., & Heerboth, S. (2013). Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics*, 5, 87–94.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1412–1417.
- Schageman, J., Zeringer, E., Li, M., Barta, T., Lea, K., Gu, J., ... Vlassov, A. V. (2013). The complete exosome workflow solution: From isolation to characterization of RNA cargo. *BioMed Research International*, 2013. doi:10.1155/2013/253957
- Schneider, E., Dittrich, M., Bock, J., Nanda, I., Müller, T., Seidmann, L., ... Haaf, T. (2016). CpG sites with continuously increasing or decreasing methylation from early to late human fetal brain development. *Gene*, 592, 110–118.
- Sheaffer, K. L., Kim, R., Aoki, R., Elliott, E. N., Schug, J., Burger, L., ... Kaestner, K. H. (2014). DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes & development*, 28, 652–64.
- Smith, A. R., Smith, R. G., Condliffe, D., Hannon, E., Schalkwyk, L., Mill, J., & Lunnon, K. (2016). Increased DNA methylation near TREM2 is consistently seen in the superior temporal gyrus in Alzheimer’s disease brain. *Neurobiology of Aging*, 47, 35–40.
- Sriram, K. B., Relan, V., Clarke, B. E., Duhig, E. E., Windsor, M. N., Matar, K. S., ... Fong, K. M. (2012). Pleural fluid cell-free DNA integrity index to identify cytologically negative malignant pleural effusions including mesotheliomas. *BMC cancer*, 12, 428.

- Stewart, D. J., Issa, J. P., Kurzrock, R., Nunez, M. I., Jelinek, J., Hong, D., ... Wistuba, I. I. (2009). Decitabine effect on tumor global DNA methylation and other parameters in a phase I trial in refractory solid tumors and lymphomas. *Clinical Cancer Research*, *15*, 3881–3888.
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., ... Cedar, H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature structural & molecular biology*, *16*, 564–571.
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta* (Kd 313, lk 139–142).
- Taylor, K. H., Kramer, R. S., Davis, J. W., Guo, J., Duff, D. J., Xu, D., ... Shi, H. (2007). Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Research*, *67*, 8511–8518.
- Thomson, J. P., Hunter, J. M., Nestor, C. E., Dunican, D. S., Terranova, R., Moggs, J. G., & Meehan, R. R. (2013). Comparative analysis of affinity-based 5-hydroxymethylation enrichment techniques. *Nucleic Acids Research*, *41*. doi:10.1093/nar/gkt1080
- To, E. W. H., Chan, K. C. A., Leung, S. F., Chan, L. Y. S., To, K. F., Chan, A. T. C., ... Lo, Y. M. D. (2003). Rapid clearance of plasma epstein-barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *9*, 3254–3259.
- Tong, M., Ding, Y., & Tai, H.-H. (2006). Histone deacetylase inhibitors and transforming growth factor-beta induce 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in human lung adenocarcinoma cells. *Biochemical pharmacology*, *72*, 701–9.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: a cancer journal of clinicians.*, *65*, 87–108.
- Toyooka, S., Maruyama, R., Toyooka, K. O., McLerran, D., Feng, Z., Fukuyama, Y., ... Gazdar, A. F. (2003). Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, *103*, 153–160.
- Tsou, J. A., Hagen, J. A., Carpenter, C. L., & Laird-Offringa, I. A. (2002). DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene*, *21*, 5450–5461.
- Umehara, Y., Hanaoka, K., & Watanabe, D. (2013). Distinct functions of Dnmt3a and Dnmt3b de novo DNA methyltransferases in ES cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Discovery*, *3*, 127–132.
- Umetani, N., Kim, J., Hiramatsu, S., Reber, H. A., Hines, O. J., Bilchik, A. J., & Hoon, D. S. B. (2006). Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical Chemistry*, *52*, 1062–1069.
- Valinluck, V., & Sowers, L. C. (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Research*, *67*, 946–950.
- Vilahur, N., Bustamante, M., Byun, H. M., Fernandez, M. F., Santa Marina, L., Basterrechea, M., ... Baccarelli, A. A. (2014). Prenatal exposure to mixtures of xenoestrogens and repetitive element DNA methylation changes in human placenta. *Environment International*, *71*, 81–87.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*, 789–799.
- Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D., & Collins, C. (2016). Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Molecular Cancer*

- Research*, 14, 898 LP-908.
- Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., ... Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer*, 17, 223–238.
- Wang, J., Wang, B., Chen, X., & Bi, J. (2011). The prognostic value of RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*, 32, 411–416.
- Wang, L., Tang, L., & Xie, R. (2012). p16 promoter hypermethylation is associated with increased breast cancer risk. *Molecular medicine ...*, 6, 904–8.
- Wang, X., Fan, J., Liu, D., Fu, S., Ingvarsson, S., & Chen, H. (2011). Spreading of alu methylation to the promoter of the mlh1 gene in gastrointestinal cancer. *PLoS ONE*, 6. doi:10.1371/journal.pone.0025913
- Wang, Y., Springer, S., Zhang, M., McMahon, K. W., Kinde, I., Dobbyn, L., ... Bettegowda, C. (2015). Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 9704–9.
- Wang, Z., Meissner, A., & Jaenisch, R. (2004). Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming. *Handbook of Stem Cells* (Kd 1, lk 119–127).
- Warnecke, P. M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J. R., & Clark, S. J. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*, 27, 101–107.
- Wilhelm-Benartzi, C. S., Houseman, E. A., Maccani, M. A., Poage, G. M., Koestler, D. C., Langevin, S. M., ... Marsit, C. J. (2012). In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta. *Environmental health perspectives*, 120, 296–302.
- Yan, P. S., Potter, D., Deatherage, D. E., Lin, S., & Huang, T. H.-M. (2009). Differential Methylation Hybridization: Profiling DNA Methylation with a High-Density CpG Island Microarray. *DNA Methylation: Methods and Protocols* (Kd 507, lk 89–106).
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., ... Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science*, 356, eaaj2239.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*.

Kasutatud veebiaadressid

<http://pxweb.tai.ee/PXWeb2015/index.html>

<http://www.tai.ee/et/tegevused/registrid/vahiregister>

https://www.cancer.org/content/cancer/en_header.html

<https://cancergenome.nih.gov>

<http://maplab.imppc.org/wanderer/>

<https://genome.ucsc.edu>

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

Lisad

Lisa 1.

Modifitseeritud protokoll cfDNA eraldamiseks 2 ml plastmast QIAamp® CNA kitiga.

1. Pipeteeri 200 µl QIAGEN Proteinase K-d 15 ml tsentrifuugi tuubi.
2. Lisa tuubi 2 ml plasmat.
3. Lisa 1,6 ml ACL puhvrit. Sulge kork ja sega vorteksil 30 sekundit.
4. Inkubeeri proovi 60°C juures 60 minutit.
5. Aseta proov töölaule ja keera kork lahti.
6. Lisa lüsaadile 3,6 ml ACB puhvrit. Sulge kork ning sega proovi vorteksil 15-30 sekundit.
7. Inkubeeri lüsaadi ja ACB puhvri segu 5 minutit jääl.
8. Aseta QIAamp Mini kolonnid QIAvac 24 Plus vaakumkonnektorisse. Sisesta 20 ml tuubi pikendaja (tube extender) avatud QIAamp Mini kolonni. Jäta kogumistuub alles.
9. Lisa hoolikalt lüsaadi ja ACB puhvri segu QIAamp Mini kolonni tuubi pikendajasse. Lülita sisse vaakumpump (800-900 mbar). Kui kogu lüsaat on läbinud kolonni, siis lülita vaakumpump välja. Ettevaatlikult eemalda ning viska tuubipikendaja ära.
10. Lisa 600 µl ACW1 puhvrit QIAamp Mini kolonnile. Jäta kolonni kaas lahti ning lülita sisse vaakumpump (800-900 mbar). Kui kogu puhver on jooksnud läbi kolonni, lülita vaakumpump välja.
11. Lisa 700 µl ACW2 puhvrit QIAamp Mini kolonnile. Jäta kolonni kaas lahti ning lülita sisse vaakumpump (800-900 mbar). Kui kogu puhver on jooksnud läbi kolonni, lülita vaakumpump välja.
12. Lisa 750 µl 96-100% EtOH QIAamp Mini kolonnile. Jäta kolonni kaas lahti ning lülita sisse vaakumpump (800-900 mbar). Kui kõik puhver on jooksnud läbi kolonni, lülita vaakumpump välja.
13. Sulge QIAamp Mini kolonni kaas, eemalda see vaakumkollektorist ning viska ära vaakumkonnektor. Aseta kolonn puhtasse 2 ml kogumistuubi ja tsentrifuugi 13 000 rcf juures 3 minutit.
14. Aseta QIAampi Mini kolonn uude 2 ml kogumistuubi, ava kaas ning inkubeeri proovi 10 min 56°C juures, et membraan täielikult kuivatada.

15. Aseta kolonn uude 1,5 ml eluatsiooni tuubi ning viska 2 ml kogumistuub ära. Lisa 60 µl soojendatud AVE puhvrit kolonni keskele, sulge kaas ning inkubeeri toatemperatuuril 3 minutit.
16. Tsentrifuugi 13 000 rcf juures 1 minut, et elueerida DNA. Elueeri sama eluaadiga DNA teist korda ning inkubeeri proovi toatemperatuuril 3 minutit.
17. Tsentrifuugi 13 000 rcf juures 1 minut.

Lisa 2.

Kandidaatgeenide praimerite järjestused.

Geen	Praimerite järjestus 5'-3'	
<i>ZNF154</i>	<i>left</i>	TTTTTGAGTTTTTATTGGTTTAGTAG
	<i>right</i>	AAAAAATTAATACAAAAAATCCCC
<i>CCDC181</i>	<i>left</i>	TTAGTGAAGTTGAGGTTTTTAAGGG
	<i>right</i>	AAAAAAAATTTCCACAACCAACACA
<i>CXCL5</i>	<i>left</i>	TAGGAGGTTTATAGTGGTTAAGAGAG
	<i>right</i>	TAAATAAAAAAATACAAAAAACAC
<i>CDKN2A</i>	<i>left</i>	AAATTTGAGGTTAAAGATGTGTGGTATAT
	<i>right</i>	CTAAACCAAAAAAATATAAAAAAAC
<i>CD01</i>	<i>left</i>	TTTAGATTTGTGGGGTTTATTTTTT
	<i>right</i>	CCACCTTCTTAAATAACTCTCC
<i>HOXA7</i>	<i>left</i>	GTTTTTTTTGTGAGTTGGGAGTAAAG
	<i>right</i>	AATCACAAATCAAATTATAAATTCT
<i>HOXA11</i>	<i>left</i>	TGTTTGTGTTTAATTGTAGGGTTTT
	<i>right</i>	CTAACTATCCCCAATCCAAAACAT
<i>FERD3L</i>	<i>left</i>	GGGAGGTTAGGGATAGGTTTG
	<i>right</i>	AACTATTA AAAATCCCCACCAACA
<i>STAR</i>	<i>left</i>	GTTTTTTTTGAGTTTTTTAAGTTT
	<i>right</i>	CCCTTCCTTACACAATAAATAATA
<i>DLECI</i>	<i>left</i>	TGTTATGGAGATTAGGAGTTTTAAAA
	<i>right</i>	AAAAACTTCAAATAAACTAACTAAACTA
<i>AGTR1</i>	<i>left</i>	TAGGTATGTTTGGGGGATTTTAAG
	<i>right</i>	AATATAACCAACTCCAAAACAAAC
<i>GALR1</i>	<i>left</i>	ATTTGTGTAGAGAGGTTTTTTGGT
	<i>right</i>	AAAAAACTAATTCTACTAAACCATAC
<i>HOXA9</i>	<i>left</i>	TGTTTAGGGTTTTAGTGGTGGTTAT
	<i>right</i>	CAAATTATTACATAAAATCTACAATTTCA
<i>NR2E1</i>	<i>left</i>	GAAATTTAAGGATGTTTAAATTTTTATTGT
	<i>right</i>	ACTACCCTCCAACCTACAAAACCTC
<i>PROX1</i>	<i>left</i>	TTTTAGGAGAAAATGGTGTATTTTAAAT
	<i>right</i>	AAAAAAAATAAAAACCAAAAAAATCACT

Lisa 3.

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklabori protokoll PCR produktide puhastamiseks Agentcourt AMPure XP magnetkerakestega, mida on modifitseeritud töögrupi teise liikme poolt.

1. Enne PCR produktide puhastamist too magnetkerakesed toatemperatuurile ning valmista värske 80% EtOH lahus. Toatemperatuurini jõudnud magnetkerakesi sega vorteksil 30 sekundit.
2. Nii multipleks PCR reaktsiooniseigule kui ka indeks PCR reaktsiooniseigule lisa magnetkerakesi suhtes 1:1,8 ja pipeteeri ettevaatlikult segu 10 korda üles-alla.
3. DNA seondumiseks magnetkerakestele inkubeeri proovi 5 minutit toatemperatuuril.
4. Aseta PCR-i plaat/tuubid magnetalusel. Kui supernatant on muutunud läbipaistvaks, eemalda see ettevaatlikult.
5. Hoiat PCR-i plaat/tuubid magnetalusel ning lisa magnetkerakeste pesemiseks 200 µl 80% EtOH lahust. Inkubeeri 30 sekundit ning seejärel eemalda kogu EtOH lahus. Korda magnetkerakeste pesu. Viimaks eemalda peenikest pipetiotsa kasutades kogu EtOH lahus.
6. Hoiat PCR-i plaat/tuube magnetalusel ning lase kerakestel õhu käes kuivada 10 minutit.
7. Eemalda PCR-i plaat/tuubid magnetaluselt ja lisa proovidele 10 mM Tris pH 8,5 puhvrit. Multipleks PCR-i proovidele lisa puhvrit 52,5 µl ja indeks PCR-i proovidele 27,5 µl. Pipeteeri segu kümme korda üles-alla.
8. Inkubeeri segu toatemperatuuril 2 minutit, et elueerida DNA kerakestelt.
9. Aseta PCR-i plaat/tuubid 2 minutiks magnetalusel. Läbipaistvaks muutunud supernatant tõsta uuele plaadile/tuubidesse. Multipleks PCR-i korral tõsta 50 µl eluaati, indeks PCR-i korral tõsta 25 µl eluaati.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Margot Saare (sünnikuupäev: 23.02.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“Tsirkuleeriva rakuvaba DNA metülatsioonitaseme muutused kopsuvähi biomarkerina”,

mille juhendajad on MD, PhD Neeme Tõnisson, PhD Kaie Lokk ja MSc Madli Tamm

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.08. 2017