

На правах рукописи

Коваленко Татьяна Феликсовна

**ГЕНЫ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК: ИХ МЕТИЛИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ
И ФУНКЦИИ В РАЗВИТИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И КАРЦИНОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Специальность 1.5.3. – молекулярная биология

Москва 2022

Работа выполнена в Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Отдела функционирования живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Павлюков Марат Самвелович, доктор биологических наук

Научный консультант:

Патрушев Лев Иванович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Гаврилов Алексей Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией пространственной организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Карагяур Максим Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доцент Кафедры биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Защита состоится 26 октября 2022 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-
математических наук

В.А. Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1. Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Глиобластома (GBM) является довольно редким (выявляется приблизительно у 3 из 100 000 человек), но крайне агрессивным онкологическим заболеванием, для которого характерна чрезвычайно высокая частота возникновения рецидивов и близкая к 100% смертность пациентов. На данный момент основным методом лечения данного заболевания является максимальное хирургическое удаление опухоли, после которого проводится курс радиотерапии, нередко дополняемый химиотерапией с помощью ДНК-алкилирующего агента – темозоломида (TMZ). Однако, несмотря на комплексную терапию, 5-летняя выживаемость пациентов остается крайне низкой и не превышает 5%. Различные противоопухолевые препараты нового поколения, весьма эффективные при многих онкологических заболеваниях, не оказали существенного влияния на выживаемость пациентов с GBM. В связи с этим расширение знаний о молекулярных механизмах патогенеза глиобластомы, а также поиск новых мишеней терапевтического воздействия является крайне актуальной задачей.

По сравнению с глиобластомой карцинома эндометрия (КЭ) характеризуется более благоприятным прогнозом в плане общей выживаемости пациентов (даже для пациенток с IV стадией уровень пятилетней выживаемости превышает 20%). Однако данное заболевание чрезвычайно широко распространено. Так, КЭ выявляется у 1 – 2,5% женщин и наиболее часто развивается в период менопаузы и постменопаузы. Возникновению КЭ часто предшествуют доброкачественные новообразования: гиперплазии (ГПЭ) и полипы (ПЭ) эндометрия. Появление в ткани ГПЭ и ПЭ морфологически измененных (атипических) клеток служит индикатором предракового процесса, который с большой долей вероятности может привести к возникновению КЭ. Однако постановка диагноза на основании гистологического анализа является достаточно субъективной. В связи с этим в 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения была предложена панель маркеров: молекулярных нарушений, характерных для атипических клеток эндометрия. В то же время надо отметить, что большинство этих маркеров не отличается специфичностью, а их выявление в эндометрии часто служит свидетельством не только раковой трансформации, но и естественных физиологических процессов, происходящих в этой ткани. Таким образом, поиск молекулярных маркеров ранних этапов малигнизации эндометрия представляется весьма актуальной задачей.

В последние годы возрастающее внимание исследователей привлекают различные некодирующие РНК в связи с их большим потенциалом в качестве диагностических маркеров и терапевтических мишеней для лечения онкологических заболеваний. Значительную часть таких транскриптов составляют длинные некодирующие РНК (днРНК) - нетранслируемые транскрипты длиной 200 нуклеотидов и более. В клетке днРНК выполняют важные регуляторные функции: участвуют в формировании и поддержании ядерных структур, функционировании аппарата деления клетки, поддержании длины теломер. Данные транскрипты также участвуют в регуляции экспрессии генов на различных уровнях (транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном). Многие днРНК могут выполнять одновременно несколько функций, активируя различные сигнальные пути клетки. Таким образом, эти транскрипты часто служат своеобразными интеграторами, координируя работу нескольких регуляторных механизмов.

За последние два десятилетия становится все более очевидной важная роль днРНК как в естественных физиологических процессах (например, росте и дифференцировке тканей, апоптозе, естественном старении организма), так и в развитии заболеваний, в том числе онкологических. Многие днРНК обладают проонкогенными свойствами. В то же время известны днРНК, выполняющие онкосупрессорные функции. В связи с этим информация об экспрессии днРНК может служить важным прогностическим фактором для пациентов. С другой стороны, понимание механизмов влияния днРНК на ключевые процессы в клетке, а также знания о регуляции их экспрессии, могут открыть дорогу к разработке новых терапевтических агентов для лечения злокачественных опухолей.

Одним из примеров днРНК, играющей важную регуляторную роль, является смысловой транскрипт псевдогена *PTENP1* – lncPTENP1-S. *PTENP1* представляет собой псевдоген гена опухолевого супрессора PTEN. Данный псевдоген транскрибируется в противоположных направлениях с образованием смысловой и антисмысловой длинных некодирующих РНК, причем оба транскрипта участвуют в регуляции экспрессии гена *PTEN*. Смысловая днРНК псевдогена, lncPTENP1-S, которая считается позитивным регулятором экспрессии *PTEN*, проявляет свойства онкосупрессора при целом ряде онкологических заболеваний, в том числе, при глиомах и раке эндометрия. Механизм регуляции экспрессии *PTENP1* на данный момент остается практически неисследованным. 5'-концевая область псевдогена содержит CpG-островок, следовательно, логично предположить, что уровень lncPTENP1-S может регулироваться метилированием ДНК. Однако на данный момент влияние метилирования на уровни транскриптов псевдогена *PTENP1* не изучено.

Другой важной днРНК, задействованной в патогенезе онкологических заболеваний, является linc-RoR. Данный транскрипт участвует в установлении и поддержании плюрипотентности и экспрессируется на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках. В соматических клетках взрослого организма отмечается низкий уровень этой днРНК. Linc-RoR выполняет онкогенные функции при некоторых видах рака, в том числе, при раке эндометрия. Поскольку указанный транскрипт не полиаденилирован, он не может быть выявлен с помощью стандартного метода РНК-секвенирования, основанного на создании поли-A+ библиотек. По этой причине linc-RoR остается относительно мало изученной. В частности, при глиомах функции этой днРНК практически не исследованы.

2. Цели и задачи исследования.

Для того, чтобы расширить знания о регуляции экспрессии днРНК lncPTENP1-S, а также внести ясность в вопрос о роли некодирующего транскрипта linc-RoR в патогенезе глиобластомы, нами были поставлены следующие **цели**:

I. Исследовать роль метилирования CpG-островка *PTENP1* в регуляции экспрессии данного псевдогена, а также в развитии карциномы эндометрия и глиом;

II. Исследовать роль linc-RoR в прогрессии глиобластомы.

В рамках поставленных целей были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Провести анализ метилирования псевдогена *PTENP1* в образцах ткани нормального эндометрия, карциномы эндометрия (КЭ) и предраковых заболеваний эндометрия;
- 2) Исследовать экспрессию *PTENP1* в нормальной эндометрии женщин разных возрастных групп;
- 3) Исследовать влияние метилирования *PTENP1* на выживаемость пациентов с КЭ и глиомами;
- 4) Изучить влияние метилирования CpG-островка *PTENP1* на уровни смыслового и антисмыслового транскриптов псевдогена;
- 5) Проанализировать взаимосвязь экспрессии linc-RoR с экспрессией основных фенотипических маркеров GBM в первичных культурах нейросфер глиобластомы;
- 6) Проанализировать влияние радио- и химиотерапии на уровень linc-RoR в клетках GBM;
- 7) Исследовать влияние нокдауна и оверэкспрессии linc-RoR на фенотип клеток глиобластомы;
- 8) Определить уровень экспрессии linc-RoR в клетках GBM, находящихся на разных стадиях клеточного цикла;

- 9) Исследовать внутриклеточную локализацию linc-RoR в клетках GBM, находящихся на разных стадиях клеточного цикла;
- 10) Провести секвенирование РНК, выделенной из клеток с оверэкспрессией и нокдауном linc-RoR и выявить гены, дифференциально экспрессирующиеся в соответствующих образцах.

3. Научная новизна

В данной работе впервые было исследовано метилирование псевдогена *PTENP1* в тканях нормального эндометрия, а также в образцах тканей предраковых заболеваний (полипы и гиперплазия эндометрия) и карциномы эндометрия. Впервые было показано, что частота метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* и уровень экспрессии его смыслового транскрипта (lincPTENP1-S) увеличиваются с возрастом пациенток. Было обнаружено, что метилирование *PTENP1* коррелирует с более благоприятным прогнозом для больных глиомами и карциномой эндометрия и, следовательно, может играть онкопротекторную роль.

Были проведены эксперименты по направленному метилированию и деметилированию CpG-островка псевдогена *PTENP1* в обычных и генетически модифицированных клетках человека. Полученные результаты позволили выявить новый механизм регуляции транскрипции lincPTENP1-S, основанный на метилировании CpG-островка *PTENP1* и активности белка PTEN.

Помимо этого, в данной работе была обнаружена зависимость экспрессии linc-RoR от активности онкогенного рецептора EGFR в клетках глиобластомы. Также мы впервые продемонстрировали, что linc-RoR экспрессируется преимущественно в делящихся клетках GBM и во время митоза локализуется на хромосомах. В соответствии с этими результатами, нами было показано, что данный некодирующий транскрипт участвует в регуляции митоза.

4. Практическая и теоретическая значимость исследования.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных о механизмах регуляции экспрессии длинных некодирующих РНК (транскриптов псевдогена *PTENP1* и linc-RoR). Также данная работа расширяет наши знания об антисенс-транскрипции. Нами было показано, что метилирование последовательности псевдогена *PTENP1* может влиять на экспрессию смысловой цепи (lincPTENP1-S) и не оказывать влияние на уровень антисмыслового транскрипта (lincPTENP1-AS). Помимо этого, данная работа затрагивает интересные вопросы, касающиеся естественного биологического старения организма. Нами было обнаружено, что частота метилирования, а также уровень экспрессии псевдогена *PTENP1* в тканях эндометрия повышен у женщин старше 40 лет. В связи с этим выдвинуто предположение об участии данного псевдогена в процессах, связанных с возрастными изменениями ткани эндометрия. Наконец, исследования, проведенные в данной работе, дают представление о новых, ранее не описанных, аспектах онкогенного действия linc-RoR, связанных с регуляцией митоза.

Практическая значимость работы заключается в том, что данное исследование напрямую связано с проблемой поиска молекулярных маркеров и терапевтических мишеней онкологических заболеваний. Так, описанные нами онкогенные функции linc-RoR в клетках глиобластомы позволяют рассматривать эту днРНК в качестве потенциальной мишени для лечения GBM. В то же время нами было показано, что метилирование CpG-островка псевдогена *PTENP1* ассоциировано с более пролонгированной выживаемостью пациентов с карциномой эндометрия и глиомами. Это дает основание полагать, что данная модификация может служить маркером более благоприятного прогноза при указанных заболеваниях. Наконец, наши данные об изменении экспрессии linc-RoR в ответ на действие терапевтических агентов могут оказаться полезны для понимания механизмов возникновения опухолевой резистентности.

5. Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Все эксперименты выполнены в количестве повторностей, достаточном для получения достоверных результатов. Работа проводилась с использованием таких современных методов и подходов, как трансдукция эукариотических клеток лентивирусными частицами, направленное редактирование метилирования ДНК, проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток, пролиферативные и цитотоксические тесты, флуоресцентная микроскопия, бисульфитная модификация ДНК, ПЦР (в том числе метилчувствительная ПЦР, ПЦР в реальном времени), РНК-секвенирование и последующий биоинформатический анализ полученных данных. В работе использовались различные программы и ресурсы, такие, как Lasergene, CRISPRdirect, DeepHF, OncoLnc, MethSurv и др. Результаты были обработаны стандартными статистическими методами. Научные положения и выводы построены на основе достоверных результатов исследований и согласуются с поставленными целями и задачами.

6. Личный вклад автора.

Исследования по теме диссертации выполнены за период с 2010 по 2021 годы. Все исследования, за исключением РНК-секвенирования (проводилось сотрудниками Amity Institute of Biotechnology, Amity University Haryana, Panchgaon, Manesar, Haryana, India), проведены лично соискателем. Личный вклад диссертанта состоит в непосредственном выполнении экспериментов, а также в участии в выборе направления научной работы, обработке полученных данных, написании и подготовке к публикации статей и тезисов с результатами исследования.

7. Структура и объем диссертационной работы.

Диссертация изложена на 144 страницах текста и содержит следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение и выводы, список литературы и приложения. Материал иллюстрирован 41 рисунком и 9 таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 186 источников.

8. Апробация работы и публикации.

Основные результаты работы были представлены на 4 российских и 4 международных конференциях: The 38-th FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology”, St. Petersburg, Russia, 2013; VI съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы, Ростов-на-Дону, Россия, 2014; II международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», посвященная 50-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, 2015; V Съезд биохимиков России, Сочи – Дагомыс, Россия, 2016; The 43rd FEBS congress, Prague, Czech Republic, 2018; Международный конгресс VII Съезд ВОГиС и ассоциированные симпозиумы, Санкт-Петербург, Россия, 2019; Всероссийский форум с международным участием «Продуктивное долголетие: доказательная медицина и трансдисциплинарный синтез». Москва, Россия, 2019; VII Съезд биохимиков России, Сочи – Дагомыс, Россия, 2021.

По материалам работы опубликовано 9 статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1. Исследование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1*.

Первая часть данной работы посвящена исследованию роли метилирования псевдогена *PTENP1* в патогенезе карциномы эндометрия и глиом, а также влиянию метилирования CpG-островка *PTENP1* на уровни транскриптов псевдогена – длинных некодирующих РНК lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS.

1.1. Анализ метилирования *PTENP1* в тканях эндометрия

5'-концевой участок псевдогена *PTENP1* содержит CpG-островок, метилирование которого теоретически может оказывать влияние на уровни транскриптов псевдогена, lncPTENP-S и lncPTENP1-AS (Рис. 1). Однако на данный момент статус метилирования указанной последовательности при карциноме эндометрия оставался неисследованным. Исходя из этого, на первом этапе нашей работы мы проанализировали метилирование CpG-островка *PTENP1* в образцах опухолевых тканей карциномы эндометрия методом метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР).

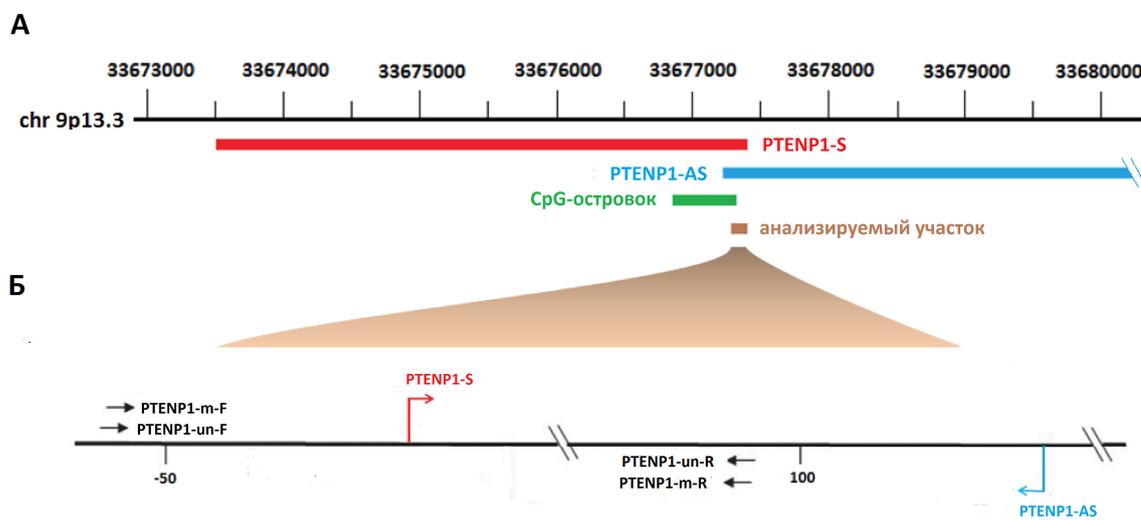


Рисунок 1. Последовательность псевдогена *PTENP1* (А) и анализируемого участка псевдогена (Б). Голубой и красной стрелками показаны сайты инициации транскрипции lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS соответственно; черными стрелками обозначены сайты посадки праймеров для МЧ-ПЦР.

Нами было проанализировано 18 образцов опухолевой ткани карциномы эндометрия (КЭ) и в 11 из них было выявлено метилирование *PTENP1* (Рис. 2А). Полученный результат был подтвержден с помощью рестрикционного анализа. Чтобы окончательно убедиться в справедливости сделанных нами выводов о метилировании 5'-концевой области псевдогена *PTENP1*, а также оценить уровень метилирования исследуемой последовательности в целом, мы секвенировали методом Сэнгера ПЦР-продукты, полученные при амплификации обработанной бисульфитом ДНК из опухолевых образцов шести пациенток с КЭ. Данные, полученные при секвенировании указанных продуктов ПЦР, подтвердили результаты МЧ-ПЦР (Рис. 2Б).

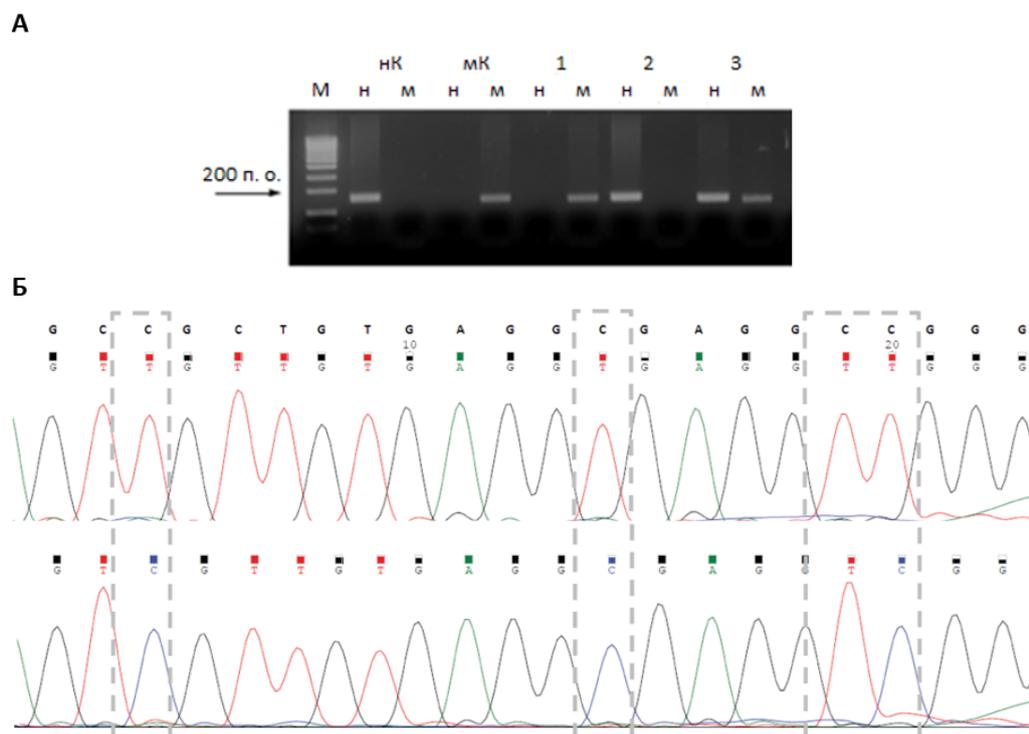


Рисунок 2. Исследование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1*. **А** – ПЦР-амплификация конвертированной бисульфитом натрия геномной ДНК с праймерами к метилированной (м) и неметилированной (н) последовательности *PTENP1*. М – маркер молекулярной массы; НК – неметилированный контроль; МК – метилированный контроль; **Б** – результаты секвенирования ПЦР-продуктов, полученных при амплификации конвертированной неметилированной (вверху) и метилированной (внизу) ДНК из опухолевых образцов пациенток с КЭ. Пунктирными линиями выделены остатки цитозина в составе CpG-динуклеотидов, которые конвертируются в неметилированной ДНК и остаются неконвертированными в метилированной матрице.

Следующим этапом мы исследовали частоту выявления метилирования псевдогена *PTENP1* в различных типах ткани эндометрия: в нормальной эндометрии (НЭ, n=69 пациенток), гиперплазии эндометрия (ГПЭ, n=64 пациента), полипах эндометрия (ПЭ, n=45 пациенток), в опухолевой ткани КЭ (n=58 пациенток), а также в 20 образцах венозной крови (К) пациенток с КЭ. Интересно, что ни в одном из образцов ДНК, выделенной из венозной крови, метилирование псевдогена не было выявлено (**Рис. 3**).

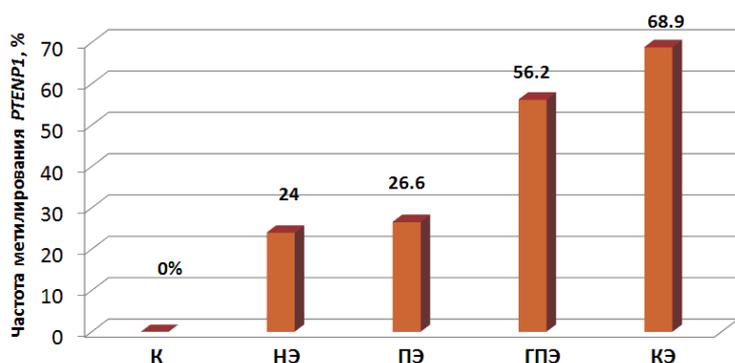


Рисунок 3. Частота выявления метилирования псевдогена *PTENP1* в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия, а также в венозной крови больных КЭ.

В то же время во всех анализируемых типах тканей эндометрия было обнаружено метилирование *PTENP1*. Эти данные могут свидетельствовать о тканеспецифичном характере метилирования псевдогена. Указанная модификация выявлялась в 24% образцов НЭ, в 26,6%

образцов ПЭ, у 56,2% пациенток с ГПЭ и у 69% больных КЭ. Таким образом, метилирование *PTENP1* чаще выявлялось в образцах гиперплазии и карциномы эндометрия по сравнению с нормальным эндометрием и полипами эндометрия. Однако после проведения статистической коррекции, учитывающей возраст пациенток, такое различие оказалось недостоверным. В связи с этим мы решили разделить пациенток на возрастные группы и сравнить частоты выявления метилирования *PTENP1* в тканях нормального эндометрия, полипов, гиперплазии и карциномы эндометрия внутри каждой из возрастных групп, а также сравнить возрастные группы между собой.

Все пациентки были разделены на 4 возрастные группы: группа I (17–34 года), состоящая из женщин репродуктивного возраста; группа II женщин позднего репродуктивного возраста (35–44 года); группа III – женщины возраста пременопаузы, менопаузы и постменопаузы (45–65 лет). Среди пациенток, страдающих КЭ, также были женщины 66–76 лет (отнесены к группе IV). Средний возраст для каждой группы, количество пациенток и тип ткани эндометрия указаны в **Табл. 1**. Следует отметить, что среди пациенток с патологиями эндометрия отсутствовали лица первой возрастной группы, так как указанные патологии крайне редко выявляются у лиц моложе 35 лет. В то же время КЭ часто диагностируется у женщин пожилого возраста.

Таблица 1. Возрастные группы пациенток, включенных в исследование.

Возрастные группы	Количество пациенток (n) и их средний возраст			
	НЭ	ПЭ	ГПЭ	КЭ
I (17–34 года)	n=26; 23,5±5,0	-	-	-
II (35–44 года)	n=24; 40,0±2,9	n=17; 39,0±2,9	n=21; 40,0±2,6	-
III (45–65 лет)	n=19; 52,5±6,0	n=28; 55,0±6,3	n=43; 52,1±6,5	n=25; 55,0±3,3
IV (66–76 лет)	-	-	-	n=33; 70,0±3,2

Сравнение частот метилирования *PTENP1* в различных типах ткани эндометрия (НЭ, ПЭ и ГПЭ) у женщин II возрастной группы не выявило существенных различий (**Рис. 4**). То же самое относится и к III возрастной группе, за исключением полипов эндометрия: частота метилирования *PTENP1* у пациенток с ПЭ III группы была значительно ниже, чем у женщин той же возрастной группы с НЭ, ГПЭ или КЭ ($p < 0,05$).

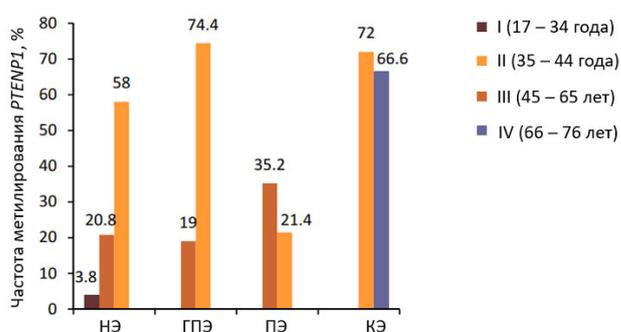


Рисунок 4. Метилирование псевдогена *PTENP1* в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия пациенток различных возрастных групп.

Далее мы сравнили разные возрастные группы между собой. В случае нормального эндометрия достоверные различия в частоте метилирования псевдогена *PTENP1* обнаружены между возрастными группами I и III, а также II и III ($p < 0,05$). Таким образом, метилирование

PTENP1 в нормальной эндометрии чаще выявляется у женщин в возрасте 45 лет и старше. Такая же тенденция наблюдалась среди пациенток с ГПЭ. Здесь статистически значимым было различие между возрастными группами II и III. В то же время мы не обнаружили существенных различий в частотах метилирования псевдогена между возрастными группами пациенток с ПЭ (Рис. 4). Также не было выявлено значимых различий между III и IV группами больных КЭ. Полученные нами данные позволяют предположить, что метилирование псевдогена *PTENP1* как в нормальной эндометрии, так и в опухолевых тканях эндометрия (за исключением ПЭ) значительно усиливается после 45 лет и может отражать возрастные изменения, происходящие в этой ткани.

1.2. Анализ экспрессии lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS в нормальной эндометрии женщин разных возрастных групп.

Поскольку мы обнаружили зависимое от возраста увеличение частоты метилирования *PTENP1* в нормальной и гиперплазированной эндометрии, мы предположили, что уровень экспрессии псевдогена в эндометрии также может изменяться с возрастом. Для подтверждения нашей гипотезы мы провели биоинформатический анализ ранее опубликованных данных по секвенированию РНК, выделенной из нормальной эндометрии 10 женщин 23 – 30 лет (группа «молодые») и 10 женщин 40 – 43 лет (группа «пожилые»). Мы оценили уровни экспрессии двух длинных некодирующих транскриптов псевдогена *PTENP1*: lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS. Уровень lncPTENP1-AS был очень низким в обеих группах и не позволил выявить статистически значимых различий в содержании данного транскрипта (Рис. 5). В то же время средние уровни lncPTENP1-S значительно различались у женщин моложе 30 и старше 40 лет ($p < 0,05$). Содержание смыслового транскрипта псевдогена в эндометрии женщин из группы «пожилые» было почти в 3 раза выше по сравнению с уровнем этой днРНК у более молодых доноров. Таким образом, мы выявили ассоциированное с возрастом увеличение уровня экспрессии lncPTENP1-S в здоровой эндометрии.

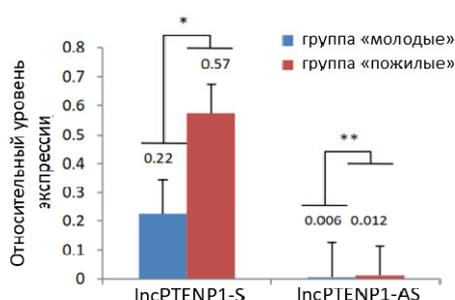


Рисунок 5. Относительные средние уровни транскриптов lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS в нормальной эндометрии женщин группы «молодые» (23 – 30 лет, средний возраст – $29 \pm 2,07$ лет, $n = 10$) и группы «пожилые» (40 – 43 года, средний возраст – $41,5 \pm 1,34$ лет, $n = 10$). * $p = 0,0313$; ** $p = 0,739$.

Так как мы выявили зависимое от возраста повышение уровня lncPTENP1-S и увеличение частоты метилирования псевдогена в нормальной эндометрии, мы предположили, что метилирование *PTENP1* может быть позитивным регулятором экспрессии этой днРНК.

1.3. Исследование влияния метилирования и экспрессии псевдогена *PTENP1* на выживаемость пациентов с карциномой эндометрия и глиомами.

Следующим шагом мы исследовали корреляцию метилирования *PTENP1* с выживаемостью больных с КЭ и глиомами. С этой целью мы проанализировали данные метилома из базы данных TCGA, полученные для 431 пациентки с КЭ и 515 пациентов с глиомами низкой степени злокачественности (LGG) (Рис. 6). В случае КЭ мы выявили взаимосвязь повышенного уровня метилирования псевдогена с более пролонгированной выживаемостью пациенток, однако различия не были статистически достоверными ($p = 0,071$). В то же время у пациентов с LGG гиперметилирование *PTENP1* строго коррелирует с более

благоприятным прогнозом выживаемости пациентов ($p=0,00096$). Далее мы изучили корреляцию уровня смыслового транскрипта псевдогена с выживаемостью больных с КЭ ($n=540$) и LGG ($n=510$). В результате было продемонстрировано, что повышенный уровень lncPTENP1-S коррелирует с более пролонгированной выживаемостью пациентов с указанными заболеваниями ($p=0,0350$ и $0,0281$ соответственно).

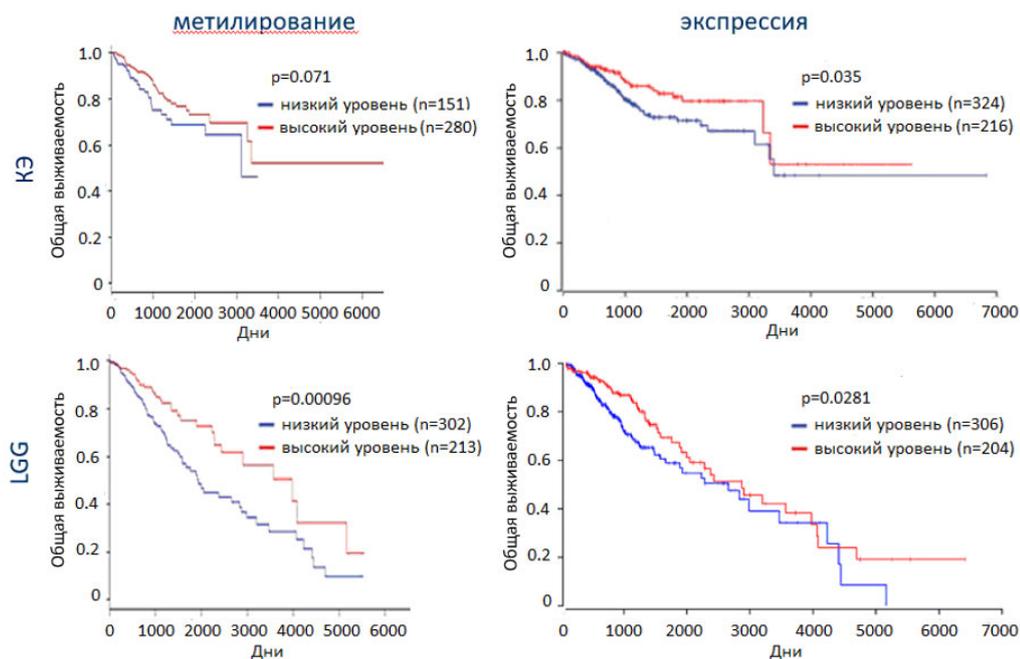


Рисунок 6. Кривые Каплан-Майера, показывающие выживаемость больных с КЭ (вверху) и LGG (внизу), разделенных на две группы в зависимости от уровня метилирования *PTENP1* (слева) или экспрессии *lncPTENP1-S* (справа). Указано количество пациентов в каждой группе, а также значение p .

Описанные результаты свидетельствуют в пользу того, что метилирование *PTENP1* является позитивным регулятором экспрессии *lncPTENP1-S*, а также демонстрируют, что при КЭ и глиомах указанная днРНК может выполнять онкосупрессорные функции.

1.4. Влияние ингибиторов метилаз на экспрессию *lncPTENP1-S* и *lncPTENP1-AS*.

Чтобы проверить наше предположение о позитивном влиянии метилирования псевдогена *PTENP1* на экспрессию *lncPTENP1-S*, мы инкубировали клетки семи перевиваемых линий человека с ДНК-деметилюющим агентом 5-азациитидином, после чего определяли уровни транскриптов псевдогена. Результаты этого эксперимента показали, что глобальное деметилюрование ДНК приводило к снижению уровня *lncPTENP1-S* во всех анализируемых линиях (Рис. 7А). В то же время уровень *lncPTENP1-AS* увеличивался в клетках линий SKBR-3, HepG2 и MCF-7, уменьшился в клетках COLO-357, HeLa и SKOV-3 и остался неизменным в линии HEK-293. 5-азациитидин инкорпорируется в состав растущей цепи ДНК, тем самым ингибируя работу метилаз. Однако, помимо этого, данное соединение способно включаться в состав синтезируемых молекул РНК, что в ряде случаев может оказывать влияние на интенсивность транскрипции и на стабильность образовавшихся РНК. Чтобы убедиться в том, что обнаруженное нами снижение уровня *lncPTENP1-S* под действием 5-азациитидина не связано с влиянием препарата на этот транскрипт, мы провели дополнительный эксперимент с другим ингибитором метилаз – 5-аза-2'-дезоксцитидином, не способным инкорпорироваться в состав молекул РНК. Согласно нашим данным, 5-аза-2'-

дезоксцитидин, подобно 5-азацитидину, подавлял экспрессию lncPTENP1-S и повышал уровень транскрипта lncPTENP1-AS. Причем эффект зависел от дозы препарата (**Рис. 7Б**).

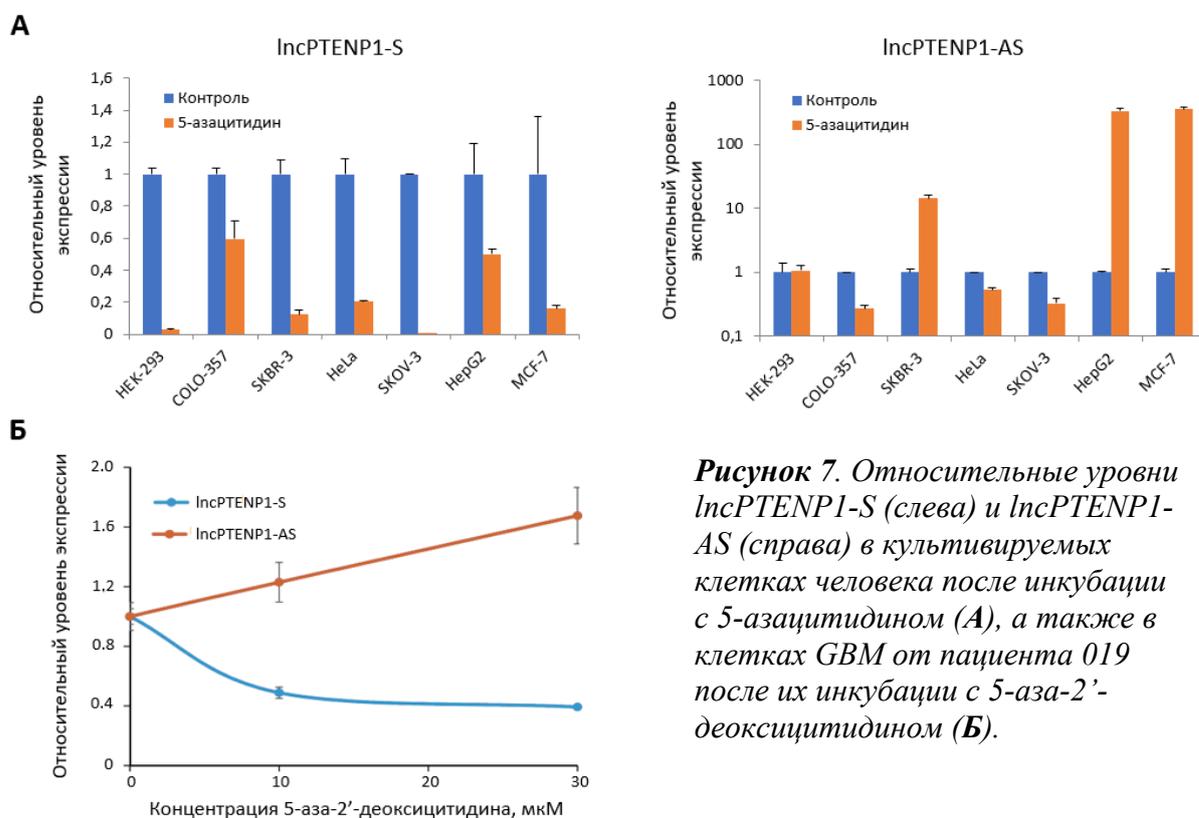


Рисунок 7. Относительные уровни lncPTENP1-S (слева) и lncPTENP1-AS (справа) в культивируемых клетках человека после инкубации с 5-азацитидином (А), а также в клетках GBM от пациента 019 после их инкубации с 5-аза-2'-деоксицитидином (Б).

1.5. Влияние направленного редактирования метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* на экспрессию lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS.

Результаты, описанные выше, подтверждают нашу гипотезу о том, что метилирование CpG-островка псевдогена *PTENP1* позитивно влияет на уровень его смыслового транскрипта. Однако эксперименты по глобальному деметилированию генома с помощью ингибиторов метилаз позволяют сделать лишь предварительные выводы, так как такое деметилирование приводит к значительным изменениям профилей экспрессии тысяч генов, которые, в свою очередь, тоже могут влиять на уровень исследуемого транскрипта. Поэтому, чтобы более детально изучить влияние метилирования *PTENP1* на его экспрессию, мы провели серию экспериментов по направленному редактированию метилирования CpG-островка данного псевдогена. Для этих целей мы использовали конструкции, в основе которых лежит система редактирования генома CRISPR/Cas9.

Конструкция для направленного деметилирования, pPlatTET-gRNA2, кодирует мутантную форму Cas9 (dCas9, утратившую способность расщеплять ДНК), соединенную с 10 копиями пептида GCN4. Также данная плазмида кодирует химерный белок, состоящий из деметилазы TET1, соединенной с GFP и фрагментом антитела к пептиду GCN4. Помимо этого, данный вектор позволяет экспрессировать gRNA (**Рис. 8А**). В клетке, трансфицированной плазмидой pPlatTET-gRNA2, gRNA гибридизуется с комплементарной последовательностью ДНК и привлекает к ней белок dCas9, соединенный с 10 копиями пептида GCN4. Каждая из копий GCN4 связывается с фрагментом антитела, несущим деметилазу TET1. В результате к целевому участку генома привлекается несколько молекул деметилазы, что обеспечивает эффективное направленное деметилирование ДНК на расстоянии до 200 п. о. от сайта связывания gRNA.

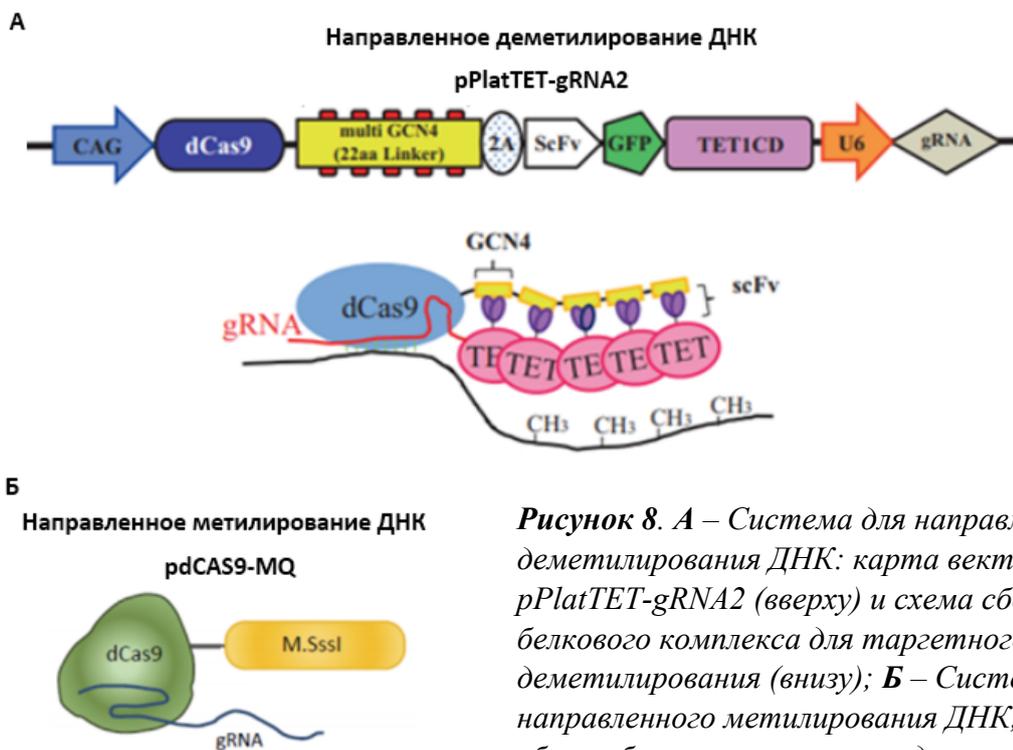


Рисунок 8. А – Система для направленного деметилирования ДНК: карта вектора pPlatTET-gRNA2 (вверху) и схема сборки белкового комплекса для таргетного деметилирования (внизу); Б – Система для направленного метилирования ДНК, схема сборки белкового комплекса для таргетного метилирования.

Для направленного метилирования мы использовали плазмиду pdCAS9-MQ, кодирующую dCas9, объединенную с метилазой SssI и GFP (**Рис. 8Б**). Для экспрессии gRNA в данном случае была создана отдельная конструкция pKAN-T-gRNA-PTENP1. Таким образом, для направленного метилирования необходима котранфекция клеток обеими конструкциями. В клетках, содержащих обе плазмиды, gRNA гибридизуется с комплементарным участком ДНК *PTENP1* и привлекает к нему dCas9, соединенный с метилазой, что обеспечивает направленное метилирование целевой последовательности ДНК.

Дизайн последовательности gRNA проводили с помощью программ CRISPRdirect и DeepHF. Первая позволяет подобрать gRNAs, наиболее селективные в отношении анализируемой последовательности ДНК, а вторая помогает выбрать олигонуклеотиды, действующие наиболее эффективно. В качестве gRNA нами была выбрана последовательность, оказавшаяся в пятерке лучших олигонуклеотидов, предложенных обеими программами.

Прежде, чем проводить направленное редактирование метилирования *PTENP1*, мы определили статус метилирования этого псевдогена в 14 клеточных линиях (**Рис. 9А**). Далее для пилотных экспериментов по направленному метилированию генома мы использовали линию SKBR-3, в которой не было выявлено метилирования псевдогена, а для таргетного деметилирования была выбрана линия SKOV-3, в которой *PTENP1* был метилирован. Мы показали, что направленное деметилирование CpG-островка *PTENP1* в клетках линии SKOV-3 приводило почти к трехкратному уменьшению уровня lncPTENP1-S и практически не влияло на уровень lncPTENP1-AS (**Рис. 9Б**). При определении уровней транскриптов псевдогена в клетках линии SKBR-3, трансфицированных метилирующими плазмидами, было обнаружено, что направленное метилирование *PTENP1* вызывало двукратное увеличение содержания lncPTENP1-S, в то время как уровень антисмысловой РНК существенно не изменился (**Рис. 9В**). Эти данные подтверждают нашу гипотезу о том, что метилирование псевдогена является позитивным регулятором транскрипции lncPTENP1-S и при этом не влияет на уровень lncPTENP1-AS.

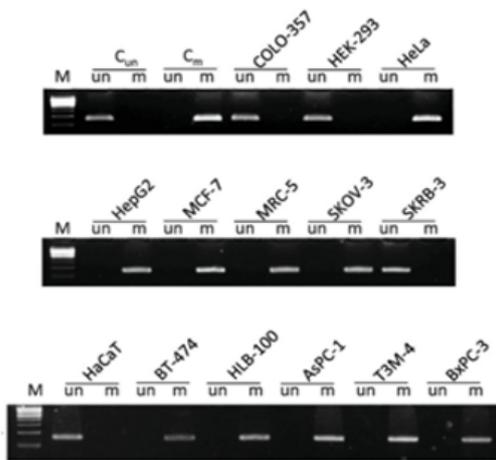
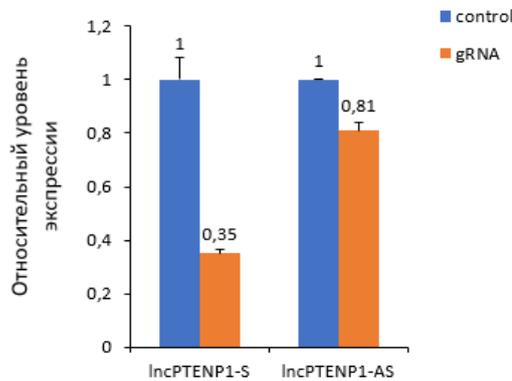
А

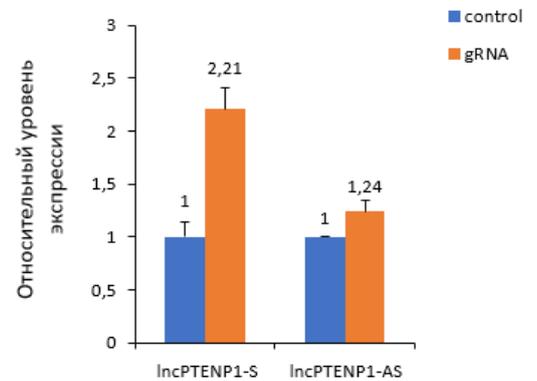
Рисунок 9. ПЦР-амплификация конвертированной ДНК с праймерами к метилированной (*m*) и неметилированной (*un*) последовательности *PTENP1* (А); направленное деметилирование (Б) и метилирование (В) CpG-островка *PTENP1* в культивируемых клетках человека. М – маркер молекулярного веса; C_{un} – неметилированный контроль; C_m – метилированный контроль; *control* – уровни транскриптов псевдогена в клетках, не содержащих конструкции для направленного редактирования метилирования *PTENP1*; *gRNA* – уровни транскриптов псевдогена в клетках, несущих плазмиды для редактирования метилирования *PTENP1*.

Б

Деметилирование: SKOV-3 (*PTENP1* met⁺)

**В**

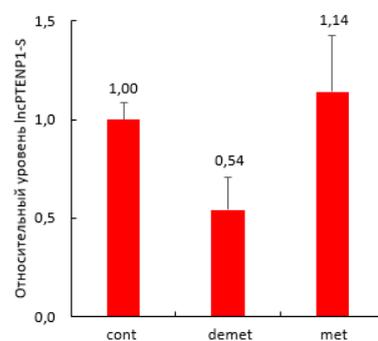
Метилирование: SKBR-3 (*PTENP1* met⁻)



Далее мы исследовали влияние метилирования CpG-островка *PTENP1* на уровень смыслового транскрипта псевдогена в клетках первичной культуры нейросфер глиобластомы от пациента 079. В соответствии с данными, полученными на клетках SKOV-3 и SKBR-3, мы показали, что в первичной культуре клеток GBM деметилирование CpG-островка *PTENP1* вызывало двукратное снижение уровня lncPTENP1-S, а метилирование, напротив, повышало экспрессию этой днРНК (Рис. 10А).

А

Нейросферы GBM от пациента 079

**Б**

U87MG

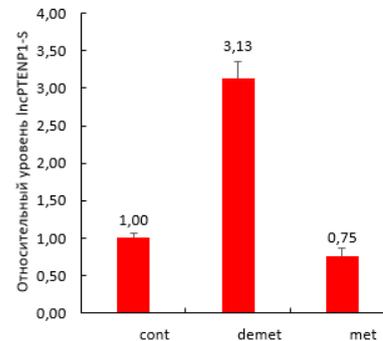


Рисунок 10. Относительный уровень lncPTENP1-S в нейросферах GBM от пациента 079 (А) и клетках линии U87MG (Б), не содержащих конструкции для направленного редактирования метилирования *PTENP1* (*cont*), а также несущих плазмиды для таргетного деметилирования (*demet*) и метилирования (*met*) CpG-островка псевдогена.

Чтобы дополнительно подтвердить полученные результаты, мы исследовали влияние метилирования и деметилирования псевдогена на экспрессию lncPTENP1-S в клетках U87MG – наиболее часто используемой стандартной линии GBM человека. К нашему удивлению, в клетках линии U87MG наблюдался эффект, противоположный результату, полученному для клеток SKOV-3, SKBR-3 и нейросфер, выделенных из опухоли пациента 079. В U87MG метилирование CpG-островка способствовало уменьшению содержания lncPTENP1-S, в то время как деметилирование приводило к возрастанию уровня этого транскрипта (**Рис. 10Б**).

Как можно объяснить такие противоречивые результаты? Анализ литературы, а также биоинформатический анализ показали:

а) Клетки линии U87MG содержат мутантный ген *PTEN*, который экспрессируется с образованием неактивного белка ($PTEN^{mut}$), в то же время в линиях SKOV-3, SKBR-3 и 079 синтезируется функциональный *PTEN* дикого типа ($PTEN^{wt}$).

б) Биоинформатический анализ последовательности CpG-островка в промоторной области *PTENP1* выявил сайты связывания, по меньшей мере двух важнейших транскрипционных факторов - TP53 и EZH2.

в) Метилирование ДНК мешает связыванию p53 и EZH2 с соответствующими промоторами.

г) Функциональный белок *PTEN* важен для активности TP53 и EZH2.

Исходя из фактов, перечисленных выше, можно предположить, что при наличии $PTEN^{wt}$ экспрессия lncPTENP1-S негативно регулируется репрессором (например, белком p53 и/или EZH2) (**Рис. 11**). В такой ситуации метилирование ДНК будет предотвращать взаимодействие *PTENP1* в комплексе с репрессором с промотором псевдогена и, в результате, приведёт к усилению экспрессии lncPTENP1-S. Однако, если в клетках отсутствует функциональный *PTEN*, то активность репрессора будет снижена, и метилирование CpG-островка *PTENP1* более не приведёт к увеличению экспрессии lncPTENP1-S, а, напротив, по классическому механизму понизит уровень транскрипции lncPTENP1-S. Такая гипотеза объясняет позитивное влияние метилирования псевдогена на уровень транскрипции lncPTENP1-S в линиях SKOV-3, SKBR-3 и GBM-079, экспрессирующих $PTEN^{wt}$, и негативное влияние метилирования на уровень этого транскрипта в линии U87MG, содержащих неактивный $PTEN^{mut}$.

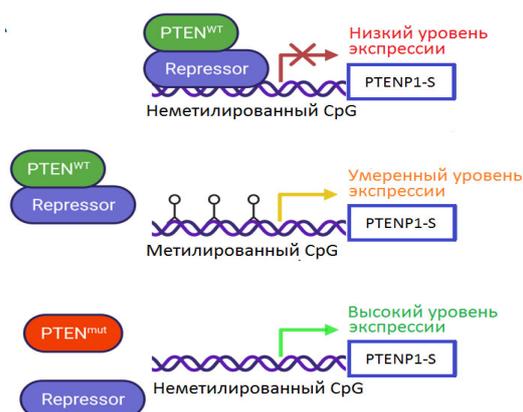


Рисунок 11. Схема, иллюстрирующая гипотезу регуляции уровня lncPTENP1-S с участием белка *PTEN*. $PTEN^{wt}$ – функционально активный *PTEN*; $PTEN^{mut}$ – мутантный, неактивный *PTEN*; repressor – гипотетический транскрипционный репрессор.

1.6. Исследование влияния белка *PTEN* на экспрессию lncPTENP1-S

Чтобы проверить нашу гипотезу об участии белка *PTEN* в регуляции экспрессии lncPTENP1-S, мы получили клетки линии U87MG со сверхэкспрессией *PTEN* дикого типа ($PTEN^{wt}$). Далее мы провели направленное метилирование и деметилирование CpG-островка *PTENP1* и определили уровень lncPTENP1-S. Результаты этого эксперимента показали, что в клетках с оверэкспрессией $PTEN^{wt}$ направленное метилирование псевдогена приводило к

двукратному увеличению уровня lncPTENP1-S, тогда как деметилирование способствовало уменьшению уровня этого транскрипта (**Рис. 12**).

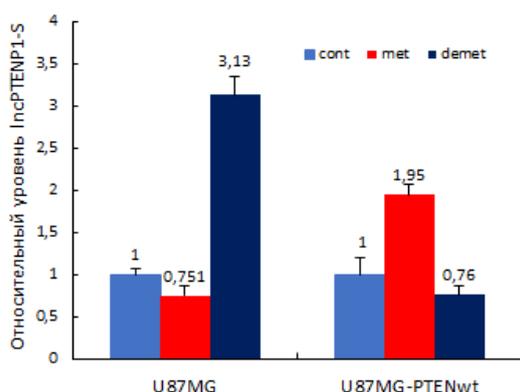


Рисунок 12. Направленное редактирование метилирования *PTENP1* в клетках U87MG и U87MG-*PTEN*^{wt}. Cont – клетки, не содержащие конструкции для направленного редактирования метилирования *PTENP1*; demet – клетки, несущие плазмиду для таргетного деметилирования псевдогена; met – клетки, трансфицированные плазмидами для направленного метилирования CpG-островка *PTENP1*.

Таким образом, появление *PTEN*^{wt} в клетках линии U87MG привело к тому, что эффект от метилирования/деметилирования *PTENP1* изменился на противоположный и стал таким же, как и в клетках SKOV-3, SKBR-3 и GBM-079. Полученные данные подтвердили нашу гипотезу об участии белка *PTEN* в регуляции экспрессии псевдогена *PTENP1* по механизму, зависящему от метилирования CpG-островка псевдогена.

1.7. Определение участков хроматина, взаимодействующих с белком *PTEN*

Из литературных источников известно, что *PTEN* способен связываться с хроматином, и такое взаимодействие необходимо для функционирования данного белка в ядре клетки. По этой причине, чтобы окончательно убедиться в том, что белок *PTEN* участвует в регуляции экспрессии псевдогена *PTENP1*, мы осуществили биоинформатический анализ результатов проведенной ранее иммунопреципитации хроматина с использованием антител, специфичных к белку *PTEN*. Результаты нашего анализа показали наличие сайта связывания белка *PTEN* в области CpG-островка *PTENP1* (**Рис. 13**).

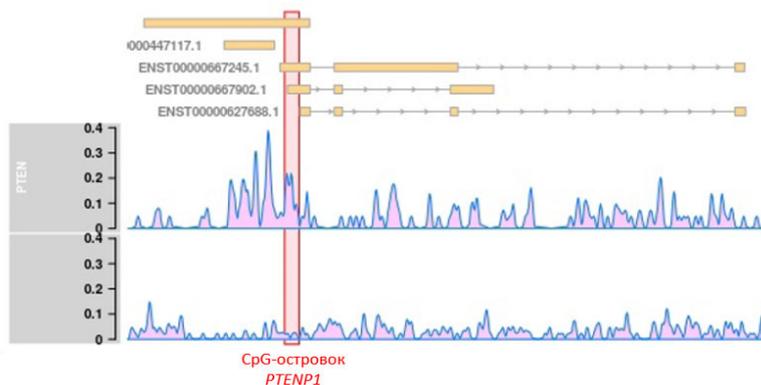


Рисунок 13. Профиль обогащения фрагментов ДНК, преципитированных с помощью антител против *PTEN*, полученный в эксперименте ChIP-seq. Участок CpG-островка *PTENP1* выделен розовым.

Таким образом, полученные данные являются прямым подтверждением нашей гипотезы об участии *PTEN* в регуляции экспрессии lncPTENP1-S.

1.8. Исследование взаимосвязи метилирования и экспрессии *PTENP1* в линиях первичных культур нейрофер GBM человека.

Для дальнейшего исследования влияния метилирования *PTENP1* на экспрессию lncPTENP1-S в клетках первичных культур GBM мы проанализировали относительные уровни метилирования псевдогена и экспрессии его смыслового транскрипта в линиях первичных культур нейрофер GBM, полученных от 8 пациентов (006, 007, 010, 011, 019, 022, 051, 079 и 267). С помощью метилчувствительной ПЦР в реальном времени было обнаружено, что повышенный уровень метилирования анализируемого участка *PTENP1* коррелирует с

повышенным уровнем смыслового транскрипта псевдогена (**Рис. 14**), что подтверждает выдвинутую нами гипотезу. Однако в одной из анализируемых линий (010) наблюдался высокий уровень экспрессии lncPTENP1-S при низком уровне метилирования псевдогена *PTENP1*. Мы предположили, что причиной такого отсутствия корреляции между уровнями метилирования и экспрессии в данной линии могут служить мутации в гене *PTEN* и/или в гене *TP53*, которые, по нашей гипотезе, могут служить негативными регуляторами экспрессии lncPTENP1-S. Анализ данных РНК-секвенирования нейросфер GBM не выявил мутации в гене *PTEN* ни в одной из 8 линий. В то же время была обнаружена мутация в гене *TP53* в клетках пациента 010. Клетки остальных 7 линий первичных культур GBM содержали ген *TP53* дикого типа.

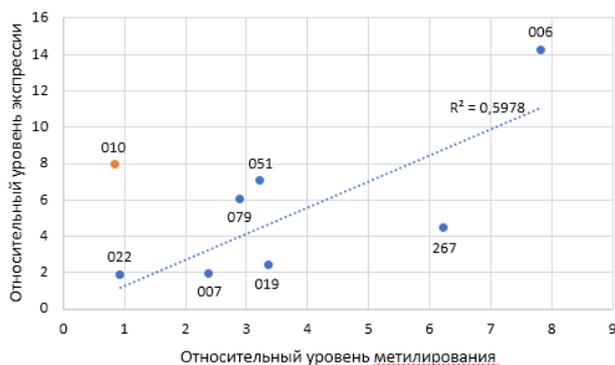


Рисунок 14. Корреляция уровня экспрессии lncPTENP1-S и уровня метилирования псевдогена *PTENP1* в линиях первичных культур нейросфер GBM. Цифрами на графике обозначены номера линий первичных культур GBM. Оранжевым цветом обозначена точка, соответствующая линии 010, в которой отмечался высокий уровень lncPTENP1-S на фоне низкого уровня метилирования псевдогена *PTENP1*.

Выявленная мутация в гене *TP53* затрагивает триплет CGC, кодирующий 175-ю аминокислоту (аргинин) в последовательности белка p53, и приводит к замене аргинина на гистидин. Из литературных источников известно, что данная мутация вызывает изменение специфичности взаимодействия p53 с ДНК-мишенями и придает мутантному белку p53^{R175H} свойства онкогена.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения о том, что функционально активные белки p53 и PTEN подавляют экспрессию lncPTENP1-S в случае неметилированной последовательности псевдогена *PTENP1*.

2. Изучение роли linc-RoR в патогенезе глиобластомы

В предыдущем разделе были описаны эксперименты по изучению регуляции экспрессии lncPTENP1-S, которая выполняет онкосупрессорные функции при многих онкологических заболеваниях, в том числе при глиомах. На следующем этапе нашей работы мы приступили к изучению роли в патогенез GBM другой днРНК, linc-RoR, которая известна в качестве онкогенного транскрипта при некоторых видах рака.

2.1. Исследование взаимосвязи экспрессии linc-RoR с фенотипом глиобластомы

Для того, чтобы исследовать взаимосвязь экспрессии linc-RoR с фенотипом клеток GBM, мы определили относительные уровни этого транскрипта, а также 8 основных фенотипических маркёров глиобластомы (CD133, CD44, CD109, Sox2, Olig2, EGFR, ALDH1A3 и GFAP) в 11 полученных нами первичных культурах нейросфер GBM. Наиболее значительная корреляция экспрессии linc-RoR наблюдалась с уровнем EGFR – онкогенного рецептора, тесно связанного с инвазивностью и чувствительностью клеток GBM к терапии (**Рис. 15А**).

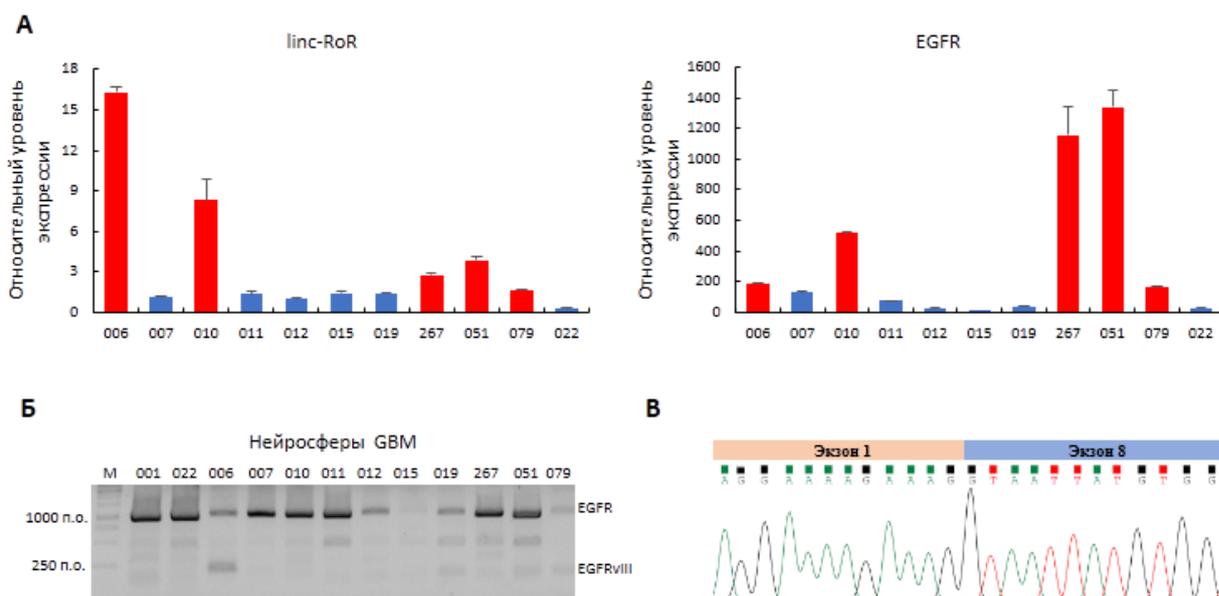


Рисунок 15. Ассоциация между уровнем *linc-RoR* и экспрессией фенотипических маркеров GBM. Относительные уровни экспрессии *linc-RoR* (слева) и *EGFR* (справа) в линиях нейросфер GBM, полученных от 11 пациентов. Линии нейросфер с повышенным уровнем *linc-RoR* выделены красным цветом (А). ПЦР-амплификация фрагмента *EGFR* (экзоны 1 – 8) из образцов кДНК, полученных из нейросфер GBM (Б). Секвенирование продукта ПЦР, полученного путем амплификации фрагмента *EGFR* из кДНК нейросфер 006 (В).

Важно отметить, что наибольший уровень *linc-RoR* был детектирован в нейросферах 006, которые, однако, демонстрировали сравнительно невысокую экспрессию *EGFR*. Чтобы выяснить причины данного несоответствия, следующим шагом мы определили наличие онкогенной мутации *EGFRvIII*, приводящей к конститутивной активации этого рецептора. С помощью ПЦР и последующего секвенирования амплифицированной кДНК мы показали, что среди всех проанализированных нами линий глиобластомы только нейросферы 006 имеют мутацию *EGFRvIII* (Рис. 15Б и 15В). Такой результат позволяет предположить, что увеличение экспрессии *linc-RoR* может являться следствием повышенной активности *EGFR*.

2.2. Изучение влияния радиотерапии и химиотерапии на уровень *linc-RoR* в клетках GBM

Согласно данным литературы, высокое содержание *linc-RoR* способствует повышению резистентности раковых клеток к терапии. Основными методами лечения глиобластомы на данный момент являются радиотерапия (IR), а также химиотерапия алкилирующим препаратом темозоломид (TMZ). По этой причине мы решили исследовать уровень *linc-RoR* в клетках GBM, подвергнутых облучению или обработанных TMZ. Для данных экспериментов мы выбрали линию нейросфер от пациента 006, в которой экспрессия *linc-RoR* была наибольшей, и линию 011 с невысоким содержанием этой днРНК (Рис. 15А). Как показано на Рис. 16, уровень *linc-RoR* в клетках 006 увеличился как под воздействием IR, так и в результате инкубации с TMZ. Инкубация с TMZ клеток GBM от пациента 011 также приводила к повышению экспрессии *linc-RoR*. В то же время облучение клеток 011 вызвало противоположный эффект: уровень *linc-RoR* снизился на 40% (Рис. 16Б).

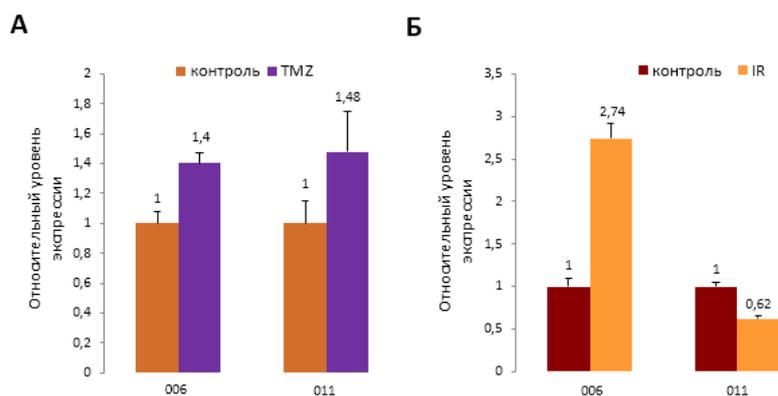


Рисунок 16. Влияние ионизирующего излучения и алкилирующего препарата темозоломид на уровень *linc-RoR* в клетках глиобластомы. Относительный уровень *linc-RoR* в клетках GBM от пациентов 006 и 011 после 3 дней инкубации с темозоломидом (А); относительный уровень *linc-RoR* в клетках GBM от пациентов 006 и 011 на 8 день после воздействия ионизирующего излучения (Б). Контроль – не обработанные летки; IR – клетки, обработанные ионизирующим излучением в дозе 8 Гр; TMZ – клетки, инкубированные с 400 мкМ темозоломида.

Такие результаты позволяют предположить, что возрастание уровня *linc-RoR* под действием TMZ и IR является одним из защитных механизмов, направленных на преодоление проапоптотических и антипролиферативных сигналов, возникающих в клетке в ответ на повреждение ДНК. Некоторое уменьшение содержания *linc-RoR* в клетках пациента 011 после их облучения, вероятно, может свидетельствовать о большей чувствительности к радиотерапии клеток с изначально низким уровнем этой днРНК.

2.3. Исследование влияния нокдауна *linc-RoR* на фенотип клеток GBM

Для дальнейшего исследования функций *linc-RoR* нами были созданы нейросферы GBM с нокдауном данного транскрипта при помощи лентивирусов, кодирующих *shRNA-RoR*. В результате нам удалось получить клетки, в которых уровень *linc-RoR* был снижен более чем в 2 раза по сравнению с контрольными клетками (Рис. 17А). Определив скорость пролиферации этих клеток, мы показали, что даже неполный нокдаун *linc-RoR* замедляет деление клеток GBM (Рис. 17Б).

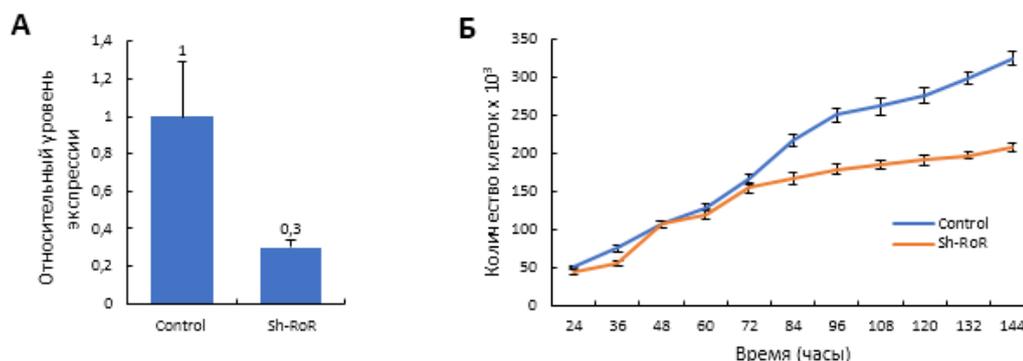


Рисунок 17. Влияние нокдауна *linc-RoR* на скорость пролиферации клеток GBM. А – относительный уровень *linc-RoR* в клетках пациента 019, зараженных контрольными вирусами (Control), и в клетках 019, заражённых вирусными частицами, кодирующими последовательность *shRoR* (Sh-RoR); Б - *in vitro*-анализ скорости роста клеток 019, трансдуцированных контрольными лентивирусами или лентивирусами, кодирующими *shRNA-RoR*.

Ранее было показано, что в эмбриональных стволовых клетках человека *linc-RoR* является позитивным регулятором экспрессии так называемых генов стволовости - *OCT4* и *SOX2*. Мы предположили, что при GBM *linc-RoR* может способствовать поддержанию популяции раковых стволовых клеток (CSCs) по вышеуказанному механизму. Для проверки этой гипотезы мы исследовали влияние нокдауна *linc-RoR* на уровни транскриптов *OCT4* и *SOX2*. Согласно нашим данным, в линиях клеток GBM, полученных от двух различных пациентов, нокдаун *linc-RoR* приводил к более чем двукратному снижению *OCT4* и *SOX2* (**Рис. 18А**). Однако основным маркёром стволовых клеток глиобластомы считается *CD133*. По этой причине далее мы определили влияние нокдауна *linc-RoR* на уровень *CD133* с помощью проточной цитофлуориметрии. Мы показали, что даже неполное подавление *linc-RoR* снижает популяцию *CD133*⁺ клеток GBM практически в 2 раза (**Рис. 18Б**).

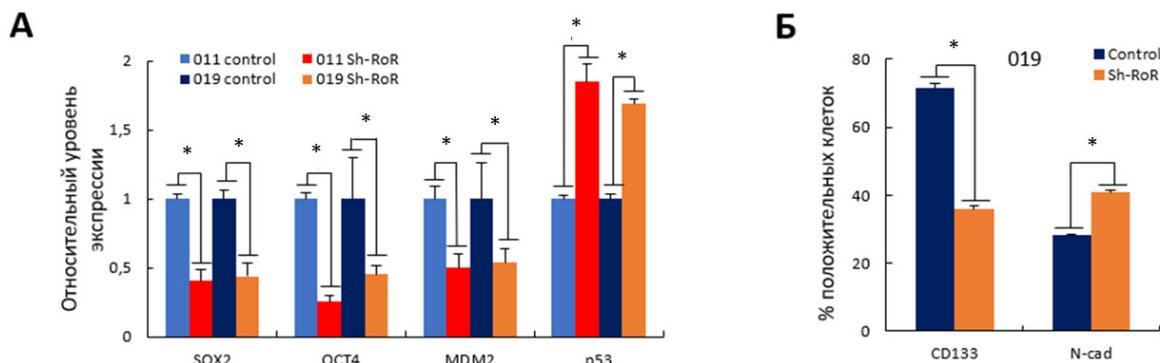


Рисунок 18. Влияние нокдауна *linc-RoR* на уровни маркеров глиобластомы. Относительные уровни экспрессии генов *SOX2*, *OCT4*, *MDM2* и *TP53* в контрольных клетках GBM от пациентов 011 и 019 (control) и в клетках с нокдауном *linc-RoR* (Sh-RoR), определённые с помощью количественной ПЦР в реальном времени (**А**); цитометрический анализ уровней *CD133* и *N*-кадгерина (*N-cad*) в контрольных клетках пациента 019 (control) и в клетках с нокдауном *linc-RoR* (Sh-RoR) (**Б**). * $p < 0,05$.

Важно отметить, что понижение *CD133* сопровождалось значительным увеличением уровня *N*-кадгерина – одного из маркёров *CD133*⁺/*CD109*⁺ мезенхимальных клеток глиобластомы. Этот факт позволяет предположить, что *linc-RoR* оказывает влияние именно на *CD133*⁺/*CD109*⁻ стволовые клетки GBM.

Предыдущие работы продемонстрировали, что *linc-RoR* может влиять на уровень проапоптотического белка *p53* с помощью различных механизмов. В частности, было показано, что этот транскрипт является позитивным регулятором экспрессии *MDM2*, который, в свою очередь, способствует деградации *p53*. Мы предположили, что данный механизм реализуется и в клетках GBM. Для проверки этой гипотезы, мы определили уровень *MDM2* в обеих линиях клеток GBM с нокдауном *linc-RoR*. Оказалось, что в клетках, экспрессирующих *shRNA-RoR*, отмечалось снижение уровня *MDM2*, что хорошо согласуется с данными, опубликованными ранее (**Рис. 18А**). Мы также показали, что нокдаун *linc-RoR* способствует повышению уровня мРНК *p53* (**Рис. 18А**).

Известно, что белок *p53* участвует в индукции клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК. Следовательно, можно предположить, что увеличение содержания этого белка будет способствовать усилению апоптоза под воздействием ДНК-повреждающего агента. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали влияние нокдауна *linc-RoR* на устойчивость клеток GBM к ДНК-повреждающему агенту цисплатин. Окрашивание апоптотических клеток аннексином V и последующая проточная цитофлуориметрия показали, что снижение уровня *linc-RoR*, действительно, значительно увеличивало гибель клеток GBM под действием цисплатина (**Рис. 19**), что подтвердило наше предположение.

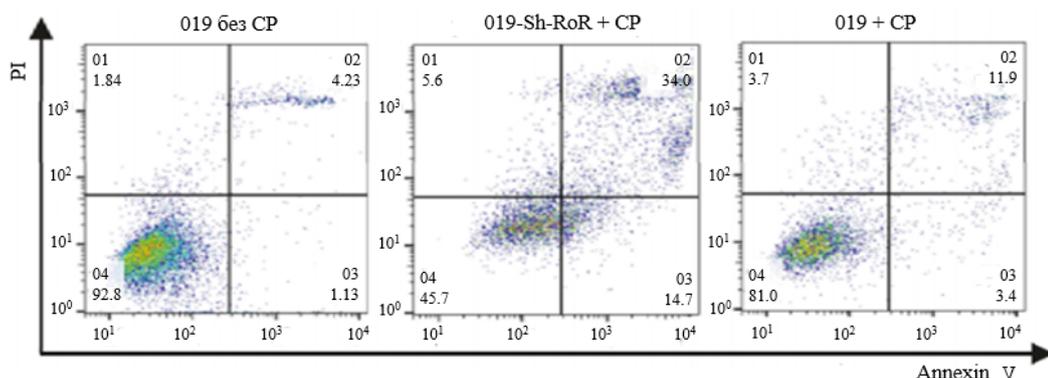


Рисунок 19. Цитофлуориметрический анализ апоптоза в контрольных клетках от пациента 019, (слева), в клетках после инкубации с циплатином (CP; справа), и в клетках с нокадаунм *linc-RoR* после инкубации с CP (в центре). Апоптотические клетки идентифицировали по окрашиванию аннексином V, конъюгированным с FITC (annexin V). Некротические клетки или клетки на поздней стадии апоптоза идентифицировали с помощью окрашивания йодистым пропидием (PI).

2.4. Оценка влияния сверхэкспрессии *linc-RoR* на фенотип клеток GBM

Для дальнейшего исследования роли *linc-RoR* в патогенезе GBM нами также были созданы линии клеток GBM с оверэкспрессией этой днРНК (Рис. 20А). Мы сравнили скорость пролиферации контрольных клеток и клеток с оверэкспрессией *linc-RoR*. Результаты этого эксперимента показали небольшое, но статистически достоверное ускорение пролиферации клеток с повышенным уровнем *linc-RoR* (Рис. 20Б). Для исследования влияния оверэкспрессии *linc-RoR* на содержание CSCs в общей популяции клеток глиобластомы был использован функциональный тест – метод определения частоты формирования нейросфер. Результаты этого эксперимента показали, что повышение уровня *linc-RoR* значительно увеличивает содержание CSCs в общей популяции клеток GBM (Рис. 20В), что хорошо согласуется с данными, полученными в экспериментах с нокадаунм этой РНК.

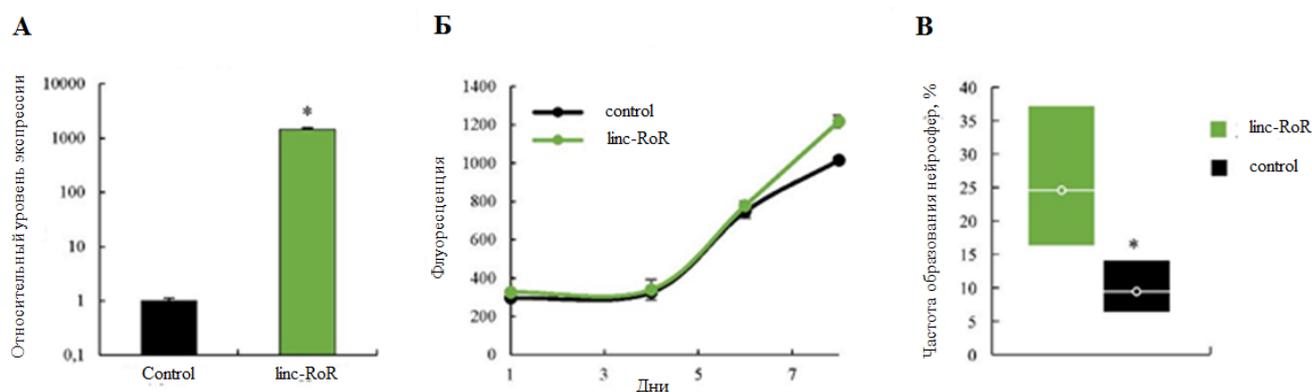


Рисунок 20. Влияние оверэкспрессии *linc-RoR* на фенотип клеток GBM. Относительный уровень *linc-RoR* в клетках от пациента 011, заражённых контрольными лентивирусными частицами (control) или частицами, кодирующими *linc-RoR* (*linc-RoR*) (А); *in vitro*-анализ скорости роста контрольных клеток пациента 011, а также клеток 011 со стабильной оверэкспрессией *linc-RoR* (Б); анализ частоты формирования нейросфер контрольными клетками 011 и клетками 011 со стабильной сверхэкспрессией *linc-RoR* (В).

2.5. Изучение роли linc-RoR в регуляции транскриптома клеток GBM

Чтобы предположить возможный молекулярный механизм влияния linc-RoR на фенотип клеток GBM, мы провели секвенирование РНК из клеток с нокдауном и сверхэкспрессией linc-RoR. PCA-анализ данных РНК-секвенирования не выявил значимых различий в транскриптомах контрольных клеток и клеток с нокдауном linc-RoR (Рис. 21А), что, очевидно, является следствием неполного нокдауна этой днРНК. В то же время с помощью базы данных Reactom были выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся в клетках GBM с повышенным уровнем linc-RoR (Рис. 21Б). Наиболее значительные отличия касались генов, участвующих в организации митотического веретена деления, разделения сестринских хроматид, генов, обеспечивающих переход G2/М и др.

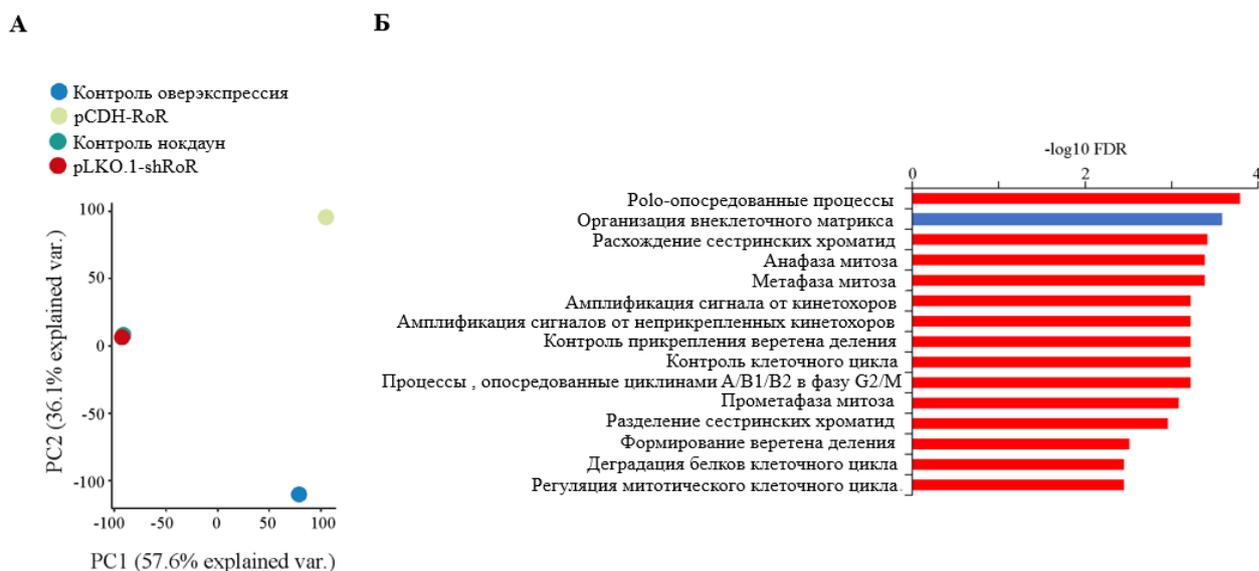


Рисунок 21. Анализ данных секвенирования РНК, полученной из контрольных клеток от пациента 019, клеток с сверхэкспрессией linc-RoR и клеток с нокдауном linc-RoR. Анализ данных РНК-секвенирования методом основных компонент (А); анализ с помощью базы данных Reactom генов, дифференциально экспрессирующихся в контрольных клетках пациента 019 и клетках с сверхэкспрессией linc-RoR (Б). Контроль – контрольные клетки; pCDH-RoR – клетки с сверхэкспрессией linc-RoR; pLKO.1-shRoR – клетки с нокдауном linc-RoR.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что основная функция linc-RoR может заключаться в регуляции митоза.

2.6. Исследование зависимости экспрессии linc-RoR в клетках GBM от фазы клеточного цикла

Поскольку результаты РНК-секвенирования продемонстрировали участие linc-RoR в регуляции митоза, мы предположили, что уровень linc-RoR может зависеть от фазы клеточного цикла. Чтобы проверить эту гипотезу, мы окрасили клетки GBM, полученные от двух различных пациентов, йодистым пропидием и с помощью клеточного сортера выделили популяции клеток, находящихся в G1, S и G2/М фазах клеточного цикла. Затем мы определили уровень linc-RoR в полученных клеточных популяциях. В качестве маркера фаз клеточного цикла был использован Ki67, который экспрессируется преимущественно в делящихся клетках. В данном эксперименте мы использовали клетки GBM с высоким (267) и низким (011) уровнем linc-RoR (Рис. 15А). Полученные результаты продемонстрировали в обоих случаях повышение уровня linc-RoR в G2/М фазе клеточного цикла (Рис. 22А и 22Б).

Такой результат свидетельствует в пользу нашего предположения о том, что данный транскрипт выполняет свои основные функции именно в процессе митоза.

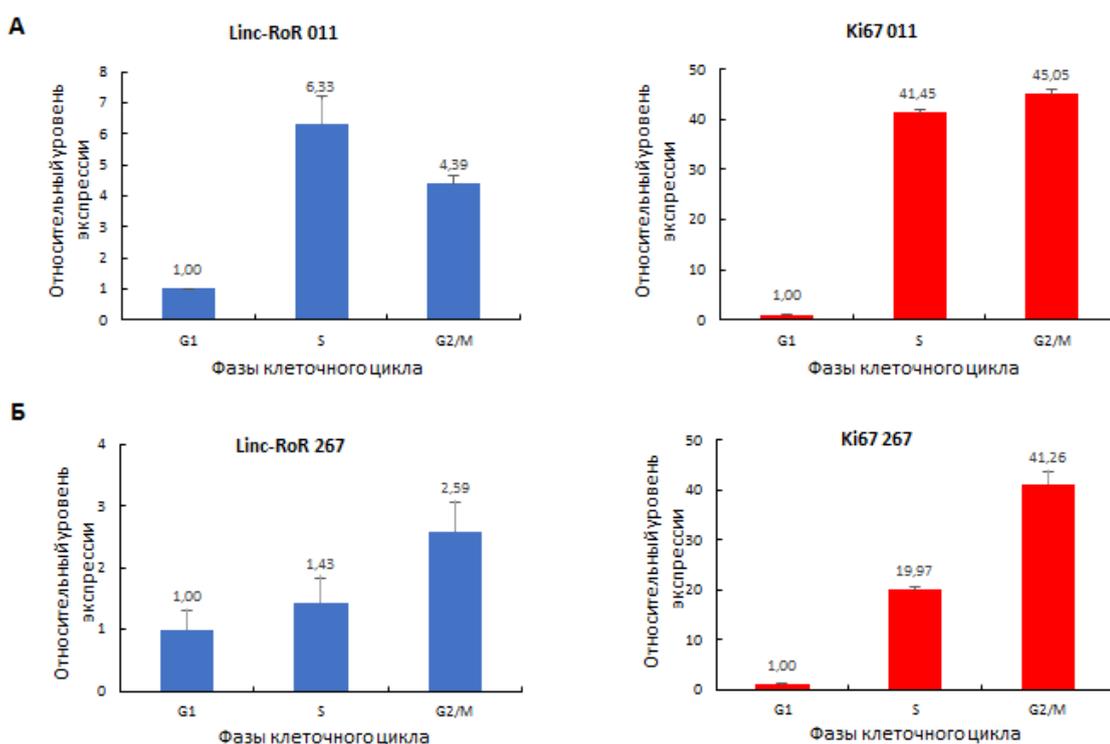


Рисунок 22. Экспрессия *linc-RoR* в различные фазы клеточного цикла. Относительные уровни *linc-RoR* (слева) и *Ki67* (справа) в популяциях G1, S и G2/M, полученных при сортировке клеток от пациента 011 (А) и 267 (Б).

2.7. Исследование внутриклеточной локализации *linc-RoR* в различные фазы клеточного цикла.

Для того чтобы получить более полную информацию о функциях *linc-RoR* в процессе митоза, мы исследовали внутриклеточную локализацию этой днРНК на разных стадиях клеточного цикла. Для этого мы использовали систему, основанную на трёх фрагментах GFP, два из которых присоединены к РНК-связывающим доменам фаговых белков MCP и PCP. Принцип работы данной системы заключается в том, что РНК-связывающие домены взаимодействуют с соответствующими сайтами (MBS и PBS соответственно), расположенными на исследуемой молекуле РНК. В результате происходит пространственное сближение фрагментов GFP, что приводит к сборке и флуоресценции данного белка в участках локализации исследуемой РНК.

Для этого эксперимента нами были созданы клетки, стабильно оверэкспрессирующие последовательность *linc-RoR*, соединенную на 3'-конце с 12 копиями сайта связывания белка MCP, а также с 12 копиями сайта связывания белка PCP (12×MBS–PBS). Затем полученная клеточная линия была трансдуцирована вирусными частицами, кодирующими белки MCP и PCP, соединенные с фрагментами GFP. В результате в клетках, несущих обе конструкции, наблюдалась флуоресценция в участках локализации *linc-RoR* (Рис. 23А). Как показано на Рис. 23Б, в интерфазных клетках *linc-RoR* присутствует как в цитоплазме, так и в ядре. В то же время в клетках, находящихся в процессе митоза, эта днРНК локализуется преимущественно на хромосомах. Важно отметить, что ассоциация *linc-RoR* с хромосомами наблюдалась на всех стадиях митоза.

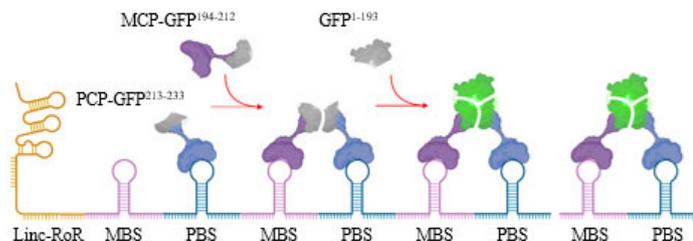
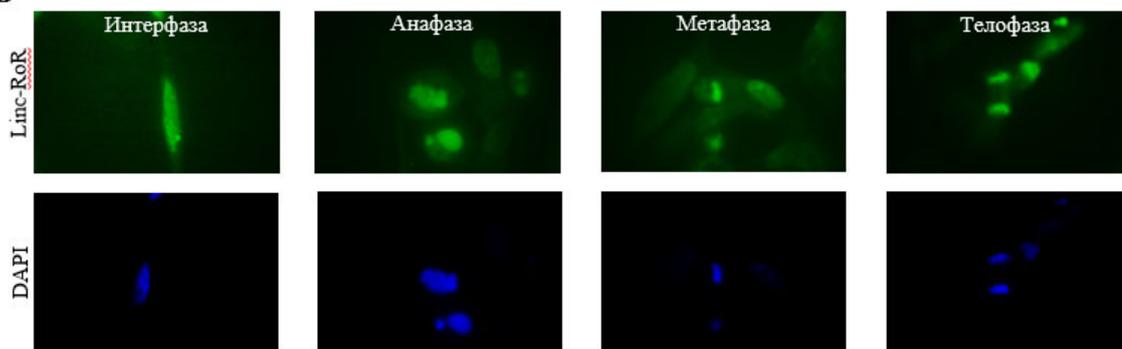
А**Б**

Рисунок 23. Внутриклеточная локализация *linc-RoR*. **А** - схема трехкомпонентной системы *GFP MBS–PBS*. *GFP¹⁻¹⁹³*, *GFP¹⁹⁴⁻²¹²* и *GFP²¹³⁻²³³* - фрагменты *GFP*; *MCP* – РНК-связывающий белок оболочки фага *MS2*; *PCP* – РНК-связывающий белок оболочки фага *PP7*; *MBS* и *PBS* являются сайтами связывания белков *MCP* и *PCP* соответственно. **Б** - флуоресцентные микрофотографии клеток пациента 019, коинфицированных вирусными частицами, кодирующими *lincRoR-12×MBS-PBS*, и частицами, кодирующими фьюжн-белки *GFP¹⁻¹⁹³*, *GFP¹⁹⁴⁻²¹²-MCP* и *GFP²¹³⁻²³³-PCP*. Для визуализации ДНК клетки окрашивали *DAPI*.

Суммируя данные, приведенные выше, можно утверждать, что *linc-RoR* способствует усилению пролиферации клеток GBM, снижению их чувствительности к апоптозу, а также поддержанию популяции CSCs. Также мы впервые продемонстрировали, что данная днРНК экспрессируется преимущественно во время митоза и локализуется на хромосомах, что, по-видимому, обуславливает основные функции указанного транскрипта, связанные с регуляцией клеточного деления. Эти данные указывают на возможность существования ранее неописанных функций *linc-RoR* в клетках глиобластомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа была посвящена исследованию представителей класса длинных некодирующих РНК – некодирующих транскриптов псевдогена *PTENP1* (*lncPTENP-S* и *lncPTENP1-AS*) и длинной некодирующей межгенной РНК *linc-RoR*.

Функции транскриптов *PTENP1* хорошо изучены при многих онкологических заболеваниях. Однако механизмы регуляции экспрессии этого псевдогена на данный момент были практически не исследованы. Также оставалась не изученной роль метилирования *PTENP1* в патогенезе онкологических заболеваний. В первой части данной работы мы проанализировали статус метилирования псевдогена в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия и обнаружили, что метилирование *PTENP1* чаще выявляется в эндометрии женщин старше 45 лет. Кроме того, оказалось, что уровень *lncPTENP-S* в ткани нормального эндометрия также увеличивается с возрастом. Помимо этого, мы показали, что уровень метилирования и экспрессии *lncPTENP-S* ассоциирован с

более пролонгированной выживаемостью пациентов с карциномой эндометрия и глиомами. Эти данные позволяют предположить, что метилирование *PTENP1* может выполнять онкосупрессорные функции. Дальнейшая серия экспериментов по исследованию влияния метилирования *PTENP1* на его экспрессию позволила нам выявить новый механизм регуляции транскрипции lncPTENP1-S. Мы полагаем, что в регуляции экспрессии lncPTENP1-S задействован белок PTEN, который в комплексе с другим транскрипционным фактором связывается с неметилированной последовательностью *PTENP1* и подавляет транскрипцию смысловой днРНК псевдогена.

Во второй части работы мы исследовали роль linc-RoR в патогенезе GBM. Данные литературы в этой области крайне противоречивы. Чтобы внести ясность в этот вопрос, мы провели ряд экспериментов на первичных культурах нейросфер, полученных от пациентов с GBM. Проведенные исследования показали, что linc-RoR способствует пролиферации раковых клеток, снижает их чувствительность к апоптозу, а также обеспечивает поддержание популяции CSCs глиобластомы. Нами впервые было обнаружено увеличение уровня linc-RoR под действием терапевтических агентов, что, как мы полагаем, является одним из возможных механизмов формирования резистентности клеток глиобластомы к терапии. Мы также показали, что linc-RoR экспрессируется преимущественно в делящихся клетках и во время митоза локализуется на хромосомах. Анализ данных РНК-секвенирования позволил нам сделать вывод о том, что linc-RoR участвует в регуляции прогрессии митоза. Помимо этого, мы уделили внимание изучению регуляции экспрессии linc-RoR, поскольку на данный момент этот вопрос также является практически неисследованным. Мы выявили взаимосвязь повышенного уровня этой днРНК с высоким уровнем транскрипции *EGFR* или конститутивной активностью этого онкогенного рецептора. Суммируя все вышесказанное, из наших результатов можно сделать вывод о том, что linc-RoR играет онкогенную роль при глиобластоме и теоретически может являться прогностическим маркером для пациентов с этим заболеванием.

ВЫВОДЫ:

1. Частота метилирования и уровень экспрессии псевдогена *PTENP1* в тканях эндометрия увеличиваются с возрастом пациенток.
2. Повышенный уровень метилирования *PTENP1* коррелирует с более благоприятным прогнозом при карциноме эндометрия и глиомах низкой степени злокачественности.
3. Повышенный уровень экспрессии lncPTENP1-S ассоциирован с более пролонгированной выживаемостью больных с КЭ и LGG.
4. Метилирование *PTENP1* не оказывает влияния на уровень антисмыслового транскрипта псевдогена, lncPTENP1-AS.
5. Описан новый механизм регуляции экспрессии lncPTENP1-S, основанный на метилировании CpG-островка *PTENP1*, а также на активности белков PTEN и p53.
6. Наибольший уровень linc-RoR отмечается в клетках с повышенной экспрессией *EGFR*. Высказано предположение о том, что *EGFR* может участвовать в регуляции экспрессии linc-RoR.
7. Linc-RoR способствует увеличению доли раковых стволовых клеток в общей популяции клеток GBM.
8. Linc-RoR экспрессируется преимущественно в делящихся клетках и во время митоза локализован на хромосомах.
9. Linc-RoR участвует в регуляции прогрессии митоза.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Коваленко Т.Ф. Метилирование генома млекопитающих. *Молекулярная медицина*. 2010; 6, 7 – 18.
2. Коваленко Т.Ф., Сорокина А.В., Озолия Л.А., Патрушев Л.И. Метилирование 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* при раке и гиперплазиях эндометрия. *Биоорганическая химия*. 2013; 39 (4), 1 – 10.
3. Т.Ф. Коваленко, К.В. Морозова, Л.А. Озолия, И.А. Лапина, Л.И. Патрушев. Псевдоген *PTENP1*, в отличие от гена *PTEN*, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста. *Acta Naturae*. 2018; 10 (1), 13 – 21.
4. Т.Ф. Коваленко, Л.И. Патрушев. Псевдогены как функционально значимые элементы генома. *Биохимия*. 2018; 83 (11), 1643 – 1662.
5. Gularyan SK, Gulin AA, Anufrieva KS, Shender VO, Shakhparonov MI, Bastola S, Antipova NV, Kovalenko TF, Rubtsov YP, Latyshev YA, Potapov AA, Pavlyukov MS. Investigation of Inter- and Intratumoral Heterogeneity of Glioblastoma Using TOF-SIMS. *Mol Cell Proteomics*. 2020; 19(6): 960 - 970.
6. Kovalenko TF, Morozova KV, Pavlyukov MS, Anufrieva KS, Bobrov MY, Gamisoniya AM, Ozolina LA, Dobrokhotova YE, Shakhparonov MI, Patrushev LI. Methylation of the *PTENP1* pseudogene as potential epigenetic marker of age-related changes in human endometrium. *PLoS One*. 2021; 16 (1), e0243093.
7. Т.Ф. Коваленко, Т.Д. Ларионова, Н.В. Антипова, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Роль некодирующих РНК в патогенезе глиальных опухолей. *Acta Naturae*. 2021; 13 (3), 28 – 41.
8. Т.Д. Ларионова, Т.Ф. Коваленко, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Прогностическая значимость белков-регуляторов сплайсинга РНК для пациентов с глиобластомой. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2022; 503 (1), 166 –171.
9. Tatyana F. Kovalenko, Bhupender Yadav, Ksenia S. Anufrieva, Yury P. Rubtsov, Timofey S. Zatsepin, Evgenya Y. Shcherbinina, Ekaterina M. Solyus, Dmitry B. Staroverov, Tatyana D. Larionova, Yaroslav A. Latyshev, Michail I. Shakhparonov, Amit Kumar Pandey and Marat S. Pavlyukov. Functions of Long Non-Coding RNA ROR in Patient-derived Glioblastoma Cells. *Biochimie*. 2022; 200, 131–139.

Тезисы конференций:

1. Т.Ф. Коваленко, А.В. Сорокина, Л.А. Озолия и Л.И. Патрушев. Methylation of *PTEN* Gene Promoter and *PTENP1* Pseudogene in Endometrial and Ovarian Tumors. The 38-th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 “Mechanisms in Biology”, St. Petersburg, Russia.
2. Коваленко Т.Ф., Сорокина А.В., Озолия Л.А., Патрушев Л. И. Метилирование псевдогена *PTENP1* в качестве потенциального маркера рака эндометрия. VI съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы, Ростов-на-Дону, 15 – 20 июня 2014, с. 96.
3. Т.Ф. Коваленко, А.В. Сорокина, К.В. Морозова, Л.А. Озолия, Л.И. Патрушев. Анализ статуса метилирования промотора гена *PTEN* и 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* при доброкачественных и злокачественных опухолях эндометрия. II международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», посвященная 50-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, 13 – 13 октября 2015, с. 227.

4. **Т.Ф. Коваленко**, И.А. Лапина, К.В. Морозова, Л.А. Озолия, Л.И. Патрушев. Исследование метилирования 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* у пациенток с гиперплазией и раком эндометрия. V Съезд биохимиков России, Сочи – Дагомыс, Россия, 4 – 8 октября 2016, с. 169.
5. **Т.Ф. Kovalenko**, L.A. Ozolinya and L.I. Patrushev. The effect of *PTENP1* pseudogene methylation on *PTENP1* and *PTEN* transcription in human cells. The 43rd FEBS congress, Prague, Czech Republic, 7 – 12 VII 2018, FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1) (2018), p. 140.
6. **Коваленко Т.Ф.**, Морозова К.В., Лапина И.А., Бобров М.Ю., Озолия Л.А., Патрушев Л.И. Метилирование псевдогена *PTENP1* в тканях эндометрия и различных линиях клеток человека. Международный конгресс VII Съезд ВОГиС и ассоциированные симпозиумы, Санкт-Петербург, Россия, 18 – 22 июня 2019, с. 322.
7. **Коваленко Т.Ф.**, Морозова К.В., Бобров М.Ю., Ашба А.М., Озолия Л.А., Патрушев Л.И. Метилирование псевдогена *PTENP1* как маркер возрастных изменений тканей эндометрия. Всероссийский форум с международным участием «Продуктивное долголетие: доказательная медицина и трансдисциплинарный синтез». Москва, Россия, 17 – 19 октября 2019, с. 41 – 43.
8. **Т.Ф. Коваленко**, Л.И. Патрушев, К.С. Ануфриева, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Исследование роли некодирующих транскриптов псевдогена *PTENP1* в прогрессии глиобластомы и карциномы эндометрия. VII Съезд биохимиков России, Сочи – Дагомыс, Россия, 3 – 8 октября 2021, с. 225.