

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

На правах рукописи

Коваленко Татьяна Феликсовна

**Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в
развитии глиобластомы и карциномы эндометрия**

Специальность 1.5.3. «Молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Павлюков Марат Самвелович

Научный консультант:

д.б.н. Патрушев Лев Иванович

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление.....	2
Список сокращений.....	8
Введение.....	10
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1.1. Длинные некодирующие РНК.....	14
1.1.1. Общая характеристика и классификация днРНК.....	14
1.1.2. Биосинтез и процессинг днРНК, структурные особенности, локализация в клетке, эволюционная консервативность.....	15
1.1.3. Механизмы функционирования днРНК.....	18
1.1.4. Функции днРНК.....	20
1.1.4.1. Роль днРНК в формировании ядерных структур и архитектуры хроматина.....	20
1.1.4.2. днРНК участвуют в репарации двуцепочечных разрывов ДНК.....	22
1.1.4.3. Участие днРНК в функционировании ядрышка и биогенезе рибосом.....	22
1.1.4.4. Участие в функционировании аппарата деления клетки и сегрегации хромосом.....	23
1.1.4.5. Поддержание длины теломер и защита теломерных участков хромосом.....	24
1.1.4.6. Участие днРНК в регуляции транскрипции.....	25
1.1.4.7. Участие в процессинге пре-мРНК, а также посттранскрипционном редактировании мРНК.....	26
1.1.4.8. Регуляция стабильности мРНК.....	27
1.1.4.9. Влияние днРНК на трансляцию мРНК и участие в посттрансляционной модификации и регуляции стабильности белков.....	28
1.1.4.10. Роль днРНК в функционировании митохондрий.....	28
1.1.4.11. Функции белков и пептидов, транслируемых с днРНК.....	28
1.1.4.12. Роль днРНК в межклеточной коммуникации.....	29
1.1.5. днРНК – молекулярные интеграторы, координирующие работу различных сигнальных путей клетки.....	29
1.1.6. Роль днРНК в патогенезе онкологических заболеваний.....	30
1.1.7. Некодирующие транскрипты псевдогена <i>PTENP1</i> и их роль в патогенезе злокачественных опухолей.....	31
1.1.8. Роль linc-RoR в развитии онкологических заболеваний.....	33

1.2. Молекулярно-генетические аспекты глиобластомы.....	34
1.2.1. Происхождение глиом, принципы классификации глиом и глиобластом.....	35
1.2.2. Раковые стволовые клетки глиобластомы.....	37
1.2.3. Наиболее распространенные молекулярно-генетические нарушения при GBM и ключевые маркеры глиобластомы.....	39
1.2.4. Роль длинных некодирующих РНК в патогенезе GBM.....	45
1.3. Молекулярно-генетические аспекты карциномы эндометрия и предраковых заболеваний эндометрия.....	48
1.3.1. Гиперплазия эндометрия (ГПЭ).....	48
1.3.2. Полипы эндометрия (ПЭ).....	49
1.3.3. Карцинома эндометрия (КЭ).....	50
1.3.3.1. Классификации КЭ в зависимости от стадии заболевания и степени злокачественности опухоли.....	50
1.3.3.2. Молекулярно-генетическая классификация и наиболее распространенные молекулярные нарушения при КЭ.....	51
1.3.3.3. Роль днРНК в патогенезе КЭ.....	53
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	55
2.1. Материалы.....	55
2.1.1. Материалы, полученные от пациентов.....	55
2.1.1.1. Образцы тканей эндометрия.....	55
2.1.1.2. Образцы тканей глиом.....	55
2.1.2. Коммерчески доступные штаммы прокариот и линии эукариот.....	56
2.1.2.1. Клеточные линии человека.....	56
2.1.2.2. Штаммы бактерий.....	56
2.1.3. Оборудование.....	56
2.1.4. Расходные материалы.....	57
2.1.4.1. Лабораторный пластик.....	57
2.1.4.2. Коммерческие наборы и смеси реагентов.....	57
2.1.4.3. Плазмидные векторы.....	58
2.1.4.4. Ферменты.....	58
2.1.4.5. Антитела.....	58
2.1.4.6. Антибиотики.....	58

2.1.4.7. Ростовые факторы.....	59
2.1.4.8. Основные химические реактивы.....	59
2.1.4.9. Буферные растворы и прочие растворы реагентов.....	59
2.1.4.10. Микробиологические среды.....	60
2.1.4.11. Среда для культивирования эукариотических клеток.....	60
2.1.4.12. Олигонуклеотиды.....	61
2.1.5. Основные компьютерные программы.....	61
2.2. Методы.....	62
2.2.1. Методы работы с эукариотическими клетками.....	62
2.2.1.1. Культивирование клеток.....	62
2.2.1.2. Получение первичных культур клеток GBM из клинических образцов опухолевых тканей.....	63
2.2.1.3. Определение количества клеток.....	64
2.2.1.4. Анализ пролиферации клеток с использованием аламарового голубого.....	64
2.2.1.5. Анализ цитотоксичности 5-азациитидина с использованием МТТ-теста.....	65
2.2.1.6. Глобальное деметилирование ДНК путем инкубации клеток с ингибиторами метилаз (5-азациитидином и 5-аза-2'-деоксицитидином).....	65
2.2.1.7. Анализ частоты формирования нейросфер.....	66
2.2.1.8. Индукция апоптоза.....	66
2.2.1.9. Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток.....	67
2.2.1.10. Трансфекция клеток плазмидной ДНК.....	68
2.2.1.11. Получение лентивирусных частиц.....	69
2.2.1.12. Трансдукция клеток лентивирусными частицами.....	69
2.2.1.13. Определение внутриклеточной локализации linc-RoR.....	69
2.2.2. Методы работы с бактериальными клетками.....	70
2.2.2.1. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	70
2.2.2.2. Криоконсервация компетентных клеток.....	70
2.2.2.3. Трансформация клеток <i>E. Coli</i>	71
2.2.2.4. ПЦР-скрининг колоний, выросших на агаризованной среде.....	71
2.2.2.5. Выращивание бактериальных клеток в среде LB.....	71
2.2.2.6. Консервация штаммов <i>E. coli</i>	72
2.2.3. Методы работы с ДНК.....	72

2.2.3.1. Выделение ДНК из свежеполученного биопсийного или операционного материала, а также венозной крови с использованием фенол-хлороформного метода.....	72
2.2.3.2. Выделение геномной ДНК из тканей, заключенных в парафиновые блоки.....	73
2.2.3.3. Выделение геномной ДНК из клеток, выращенных в культуре.....	73
2.2.3.4. Выделение плазмидной ДНК.....	74
2.2.3.5. Бисульфитная конверсия геномной ДНК.....	75
2.2.3.6. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	75
2.2.3.7. Очистка фрагментов ДНК из раствора.....	76
2.2.3.8. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	76
2.2.3.9. Электрофорез фрагментов ДНК.....	77
2.2.3.10. Рестрикция.....	77
2.2.3.11. Дефосфорилирование концов фрагментов ДНК.....	77
2.2.3.12. Лигирование фрагментов ДНК.....	78
2.2.3.13. Конструирование плазмидных векторов.....	78
2.2.3.14. Секвенирование плазмидной ДНК и продуктов ПЦР.....	81
2.2.4. Методы работы с РНК.....	81
2.2.4.1. Выделение РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit.....	81
2.2.4.2. Выделение РНК с помощью QIAzol Lysis Reagent.....	82
2.2.4.3. Синтез кДНК.....	82
2.2.4.4. РНК-секвенирование и анализ результатов секвенирования.....	82
2.2.5. Биоинформатический анализ.....	83
2.2.6. Статистический анализ данных.....	83
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	84
3.1. Исследование метилирования CpG-островка псевдогена <i>PTENP1</i>	84
3.1.1. Анализ метилирования <i>PTENP1</i> в тканях эндометрия.....	84
3.1.1.1. Выявление метилирования <i>PTENP1</i> в опухолевых тканях карциномы эндометрия.....	84
3.1.1.2. Исследование взаимосвязи метилирования <i>PTENP1</i> с клинико-патологическими характеристиками карциномы эндометрия.....	86
3.1.1.3. Анализ частоты выявления метилирования <i>PTENP1</i> в малигнизированных и	

немалигнизированных тканях эндометрия.....	87
3.1.1.4. Анализ частоты выявления метилирования <i>PTENP1</i> в различных возрастных группах женщин с малигнизированным и немалигнизированным эндометрием.....	88
3.1.2. Анализ экспрессии lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS в нормальной эндометрии женщин разных возрастных групп.....	92
3.1.3. Исследование влияния метилирования и экспрессии псевдогена <i>PTENP1</i> на общую выживаемость пациентов с карциномой эндометрия и глиомами.....	93
3.1.4. Влияние ингибиторов метилаз 5-азацитидина и 5-аза-2'-деоксицитидина на экспрессию lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS в клеточных линиях.....	94
3.1.5. Влияние направленного редактирования метилирования CpG-островка псевдогена <i>PTENP1</i> на экспрессию lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS.....	96
3.1.5.1. Направленное редактирование метилирования CpG-островка псевдогена <i>PTENP1</i> в линиях культивируемых клеток человека.....	96
3.1.5.2. Направленное редактирование метилирования CpG-островка псевдогена <i>PTENP1</i> в клетках глиобластомы человека.....	100
3.1.5.3. Исследование влияния $PTEN^{wt}$ на эффект метилирования/деметиличивания псевдогена <i>PTENP1</i> в клетках линии U87MG.....	102
3.1.6. Определение участков хроматина, взаимодействующих с белком PTEN.....	103
3.1.7. Исследование взаимосвязи метилирования и экспрессии <i>PTENP1</i> в линиях первичных культур нейросфер GBM человека.....	104
3.2. Изучение роли linc-RoR в патогенезе глиобластомы.....	106
3.2.1. Исследование взаимосвязи экспрессии linc-RoR с фенотипом глиобластомы.....	106
3.2.2. Изучение влияния радиотерапии и химиотерапии на уровень linc-RoR в клетках GBM.....	108
3.2.3. Исследование влияния нокдауна linc-RoR на фенотип клеток GBM.....	109
3.2.3.1. Влияние нокдауна linc-RoR на CSCs глиобластомы.....	109
3.2.3.2. Влияние нокдауна linc-RoR на устойчивость клеток GBM к апоптозу.....	111
3.2.4. Оценка влияния сверхэкспрессии linc-RoR на фенотип клеток GBM.....	113
3.2.5. Изучение роли linc-RoR в регуляции транскриптома клеток GBM.....	113
3.2.6. Исследование зависимости экспрессии linc-RoR в клетках GBM от фазы клеточного цикла.....	114
3.2.7. Исследование внутриклеточной локализации linc-RoR в клетках GBM в различ-	

ные фазы клеточного цикла.....	116
Глава 4. Заключение.....	119
Список литературы.....	122
Приложения.....	138
Приложение 1.....	138
Приложение 2.....	140
Приложение 3.....	141
Приложение 4.....	142
Приложение 5.....	143
Приложение 6.....	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГПЭ – атипическая гиперплазия эндометрия

ГПЭ – гиперплазия эндометрия

днРНК – длинные некодирующие РНК

ип-днРНК – длинные некодирующие РНК, индуцируемые повреждением

кРНК – кольцевые РНК

КЭ – карцинома эндометрия

кэРНК – конкурирующие эндогенные РНК

мРНК – матричная РНК

миРНК – микроРНК

МЧ-ПЦР – метилчувствительная ПЦР

мяРНК – малые ядерные РНК

мядРНК – малые ядрышковые РНК

нк - нуклеотид

НЭ – нормальный эндометрий

пиРНК – РНК, взаимодействующие с PIWI

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – полип эндометрия

рРНК – рибосомальная РНК

тРНК – транспортная РНК

CSCs – раковые стволовые клетки

DMSO - диметилсульфоксид

DNMT – ДНК-метилтрансфераза

GBM – глиобластома

HR – гомологичная рекомбинация

IR – ионизирующее облучение

LGG – глиомы низкой степени злокачественности

LGEC – карциномы эндометрия низкой степени злокачественности

Linc – длинная межгенная некодирующая (РНК)

NHEJ – негомологичное соединение концов ДНК

PI3P - фосфоинозитид-3,4,5-трифосфат

TCGA – атлас геномов раковых тканей

TMZ – темозоломид

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (GBM) является довольно редким (в Европе и США ежегодно 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 [1]. Многолетние усилия, направленные на поиск новых методов терапии GBM, не принесли значимых результатов. На данный момент основным методом лечения этого заболевания является максимальное хирургическое удаление опухоли, после которого проводится курс радиотерапии, нередко дополняемый химиотерапией с помощью ДНК-алкилирующего агента – темозоломида (TMZ) [2]. Однако вследствие инфильтративного роста опухоли полное удаление клеток GBM не представляется возможным. В результате, несмотря на комплексную терапию, средняя выживаемость пациентов остается крайне низкой в сравнении с другими видами рака (5-летняя выживаемость составляет лишь 2 – 5%) [1]. Различные низкомолекулярные соединения, ингибирующие рецепторные тирозинкиназы, а также моноклональные антитела к данным ферментам, весьма эффективные при многих онкологических заболеваниях, не оказали существенного влияния на выживаемость пациентов с GBM [3 – 5]. 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, в Европе и США ежегодно КЭ выявляется у 1 – 2,5% женщин. Особенно часто данное заболевание развивается у женщин периода менопаузы и постменопаузы. Возникновению КЭ часто предшествуют доброкачественные новообразования: гиперплазии (ГПЭ) и полипы (ПЭ) эндометрия [6]. Появления 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 (ВОЗ) 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.

На протяжении последних десятилетий внимание исследователей привлекают различные некодирующие РНК в связи с их большим потенциалом в качестве диагностических маркеров, а также терапевтических мишеней при онкологических заболеваниях. К таким транскриптам относят открытые в 80-е годы прошлого века длинные некодирующие РНК (днРНК), представляющие собой нетранслируемые транскрипты длиной 200 нуклеотидов и более [7]. 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, на уровне трансляции). Некоторые днРНК являются предшественниками малых некодирующих РНК. Многие днРНК могут выполнять одновременно несколько функций, активируя различные сигнальные пути клетки. Таким образом, эти транскрипты часто служат своеобразными интеграторами, координируя работу сразу нескольких регуляторных механизмов. За последние два десятилетия становится все более очевидной важная роль длинных некодирующих транскриптов 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 [7]. С другой стороны, понимание механизма влияния днРНК на ключевые процессы в клетке, а также механизмов, задействованных в регуляции экспрессии самих днРНК, может 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 псевдогена участвуют в регуляции экспрессии гена *PTEN* [8, 9]. Смысловая днРНК псевдогена, lncPTENP1-S, являясь позитивным регулятором экспрессии *PTEN*, проявляет свойства онкосупрессора при целом ряде онкологических заболеваний, в том числе при глиомах и раке эндометрия [8, 10 – 13]. Однако то, каким образом осуществляется регуляция экспрессии *PTENP1*, на данный момент остается

практически неисследованным. 5'-концевая область псевдогена содержит CpG-островок, следовательно, можно предположить, что уровень онкосупрессорной днРНК lincPTENP1-S регулируется метилированием. При этом на данный момент влияние метилирования на уровни транскриптов псевдогена не изучено.

Другой днРНК, задействованной в патогенезе онкологических заболеваний, является linc-RoR. Данный транскрипт участвует в установлении и поддержании плюрипотентности стволовых клеток и экспрессируется на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках [14]. В соматических клетках взрослого организма отмечается низкий уровень экспрессии linc-RoR. Данная некодирующая РНК выполняет онкогенные функции при некоторых видах рака, в частности, при раке эндометрия. Поскольку указанный транскрипт не полиаденилирован, он не может быть выявлен с помощью стандартного метода РНК-секвенирования, основанного на создании поли-А+ библиотек. По этой причине linc-RoR остается относительно мало изученной. В частности, при глиомах функции этой днРНК практически не исследованы.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для того, чтобы расширить знания о регуляции днРНК lincPTENP1-S, а также внести ясность в вопрос о роли некодирующего транскрипта linc-RoR в патогенезе глиобластомы, нами были поставлены следующие **цели**:

- 1) Исследовать роль метилирования CpG-островка *PTENP1* в регуляции экспрессии данного псевдогена, а также в развитии карциномы эндометрия и глиом;
- 2) 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 нормальном 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) Проанализировать 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 клетках с нокдауном и оверэкспрессией этой днРНК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Длинные некодирующие РНК

1.1.1. Общая характеристика и классификация днРНК

Некодирующие РНК (нкРНК) представляют собой транскрипты, последовательности которых не транслируются с образованием белка. К таким молекулам относят, например, хорошо изученные рибосомные РНК (рРНК) и транспортные РНК (тРНК). Однако, помимо этого, в эукариотической клетке присутствуют также длинные некодирующие РНК (днРНК), кольцевые РНК (кРНК), микро РНК (миРНК), РНК, ассоциированные с РІWІ (пиРНК), малые ядерные и малые ядрышковые РНК (мяРНК и мядРНК соответственно) [15 – 18]. днРНК представляют собой нетранслируемые транскрипты длиной 200 нуклеотидов и более. В настоящее время у человека, по разным оценкам, выявлено от 15000 до 50000 днРНК [7]. Таким образом, днРНК составляют весьма обширную фракцию некодирующих транскриптов, сопоставимую по объему с фракцией матричных РНК (мРНК) (**Рис. 1**).

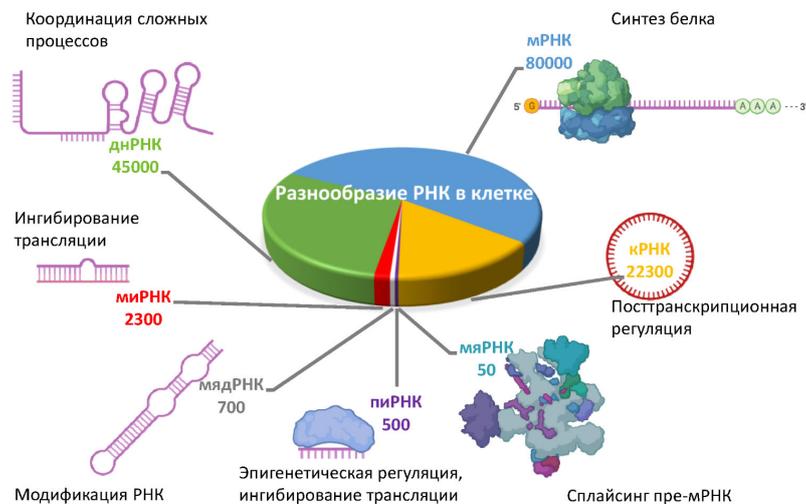


Рисунок 1. *Различные классы регуляторных нкРНК в клетке человека. Диаграмма в центре и цифры указывают приблизительное количество различных РНК. Надписи указывают основную функцию данной группы РНК. мРНК – матричные РНК; кРНК – кольцевые РНК; мяРНК – малые ядерные РНК; пиРНК – РНК, ассоциированные с РІWІ; мядРНК – малые ядрышковые РНК; миРНК – микро РНК; днРНК – длинные некодирующие РНК.*

Существуют две причины, по которым днРНК не транслируются. Во-первых, как правило, в их последовательностях отсутствуют открытые рамки считывания; во-вторых, эти РНК могут содержать различные инактивирующие мутации, делающие трансляцию невозможной [14, 19]. Однако следует отметить, что в последние годы появилась информация

о том, что некоторые днРНК содержат короткие рамки считывания (менее 300 нуклеотидов) и способны транслироваться с образованием пептидов и небольших белков [20].

Классификация днРНК может проводиться на основании различных критериев: внутриклеточной локализации, размеров, выполняемых функций. Наиболее распространенной является классификация, основанная на локализации последовательностей днРНК в геноме [7]. Согласно этой классификации, выделяют 1) *межгенные* днРНК, последовательности которых не перекрываются с последовательностями белок-кодирующих генов (например, linc-RoR, MALAT1 [14, 21]); 2) *двунаправленные или дивергентные* - их транскрипция инициируется вблизи промотора гена и происходит в противоположном направлении (CRNDE [22]); 3) *антисмысловые* - транскрибируются в противоположном направлении по отношению к белок-кодирующим генам; частично или полностью перекрываются с последовательностями генов (HOTAIR, HOXD-AS1, HOXA11-AS [23]); 4) *интронные* (смысловые и антисмысловые) - последовательности которых ограничены интронами генов (например, днРНК, транскрибируемая с интрона 1 гена *N-MYC* [24]); 5) *днРНК псевдогенов*, представляющие собой транскрипты копий генов, утративших свой кодирующий потенциал в результате инактивирующих мутаций (CYP4Z2P, PCNAP1, lincPTENP1-S [25]); 6) *центромерные* - транскрибирующиеся с центромерных участков, включают центромерные повторы (α -сателлитные РНК человека [26]); 7) *теломерные и субтеломерные* днРНК, которые транскрибируются с теломерных участков хромосом и содержат теломерные последовательности (hTERC [27], TERRA [28]); 8) *промотор-ассоциированные* (например, KHPS1 [23]), транскрибируемые с промоторов генов и 9) *энхансерные днРНК* - экспрессируются в обоих направлениях с этих регуляторных элементов генома (например, днРНК DRR [29]).

1.1.2. Биосинтез и процессинг днРНК, структурные особенности, локализация в клетке, эволюционная консервативность

Большинство днРНК образуется с участием РНК-полимеразы II, однако некоторые днРНК могут транскрибироваться с помощью РНК-полимеразы I, а также РНК-полимеразы III [7, 30, 31]. Сравнительный анализ промоторов генов днРНК и мРНК показал, что промоторы днРНК содержат меньшее количество сайтов связывания транскрипционных факторов (TFs), чем в случае промоторов генов, кодирующих белки. Следствием этого является более низкий уровень экспрессии большинства длинных некодирующих транскриптов по сравнению с

мРНК [32]. В то же время известны днРНК, транскрибирующиеся на достаточно высоком уровне (например, MALAT1, NEAT1) [33].

ДнРНК могут быть кэпированы и полиаденилированы [21]. При этом известны длинные некодирующие транскрипты (например, linc-RoR), которые не содержат указанных модификаций [14]. Многие днРНК (например, lincPTENP1-AS, GAS5) подвергаются сплайсингу, в том числе альтернативному, с образованием нескольких изоформ [9, 34]. Однако в целом днРНК демонстрируют меньшее количество изоформ, по сравнению с мРНК [32]. Ряд днРНК подвергаются процессингу с образованием малых некодирующих РНК. Примером может служить MALAT1. Данный транскрипт образует в 3'-концевой области структуру типа «листа клевера», напоминающую тРНК. В процессе созревания MALAT1 указанная структура отщепляется от первичного транскрипта с помощью РНКазы Р и далее транспортируется в цитоплазму. Зрелый транскрипт MALAT1 депонируется в ядерных спеклах. Аналогичным образом происходит процессинг 3'-концевой области одной из изоформ днРНК NEAT1 – NEAT1_2 [33].

Как и в случае мРНК, деградация днРНК осуществляется с помощью различных механизмов: 3'-деаденилирования и 5'-декэпирования с последующим экзонуклеазным распадом, миРНК-зависимой деградации, нонсенс-опосредованного распада (характерен для транслируемых днРНК, в которых часто присутствуют преждевременные стоп-кодоны) [21]. Наименее стабильными являются днРНК, транскрибируемые с энхансеров [29]. В то же время некоторые днРНК являются весьма стабильными даже в отсутствие поли-А-тракта. Например, MALAT1 и NEAT1 формируют на 3'-конце особую триплексную структуру, которая обеспечивает стабильность этих транскриптов [33].

Длинные некодирующие транскрипты присутствуют в различных компартментах клетки (**Рис. 2**). Одни днРНК локализованы преимущественно в ядре (например, NEAT1 [35]), другие – в цитоплазме (HOXD-AS1 [23]). Известны днРНК, которые присутствуют как в цитоплазме, так и в ядре клетки (HOTAIR, HOXA11-AS [23]). Цитоплазматические днРНК выявлены практически во всех органеллах и компартментах. Так, обнаружены днРНК, локализующиеся в митохондриях (например, lincCytB) [36, 37]. Выявлены длинные некодирующие транскрипты, ассоциированные с эндоплазматическим ретикулумом (7SL РНК), клеточной мембраной (LASSIE, LINK-A, SINKR), стрессорными гранулами (NORAD), протеасомами (MaIL1), рибосомами (ZFAS1), компонентами цитоскелета (linc-CRYBG3) Некоторые днРНК (например, HOTTIP) могут включаться в состав внеклеточных везикул (**Рис. 2**) [37].

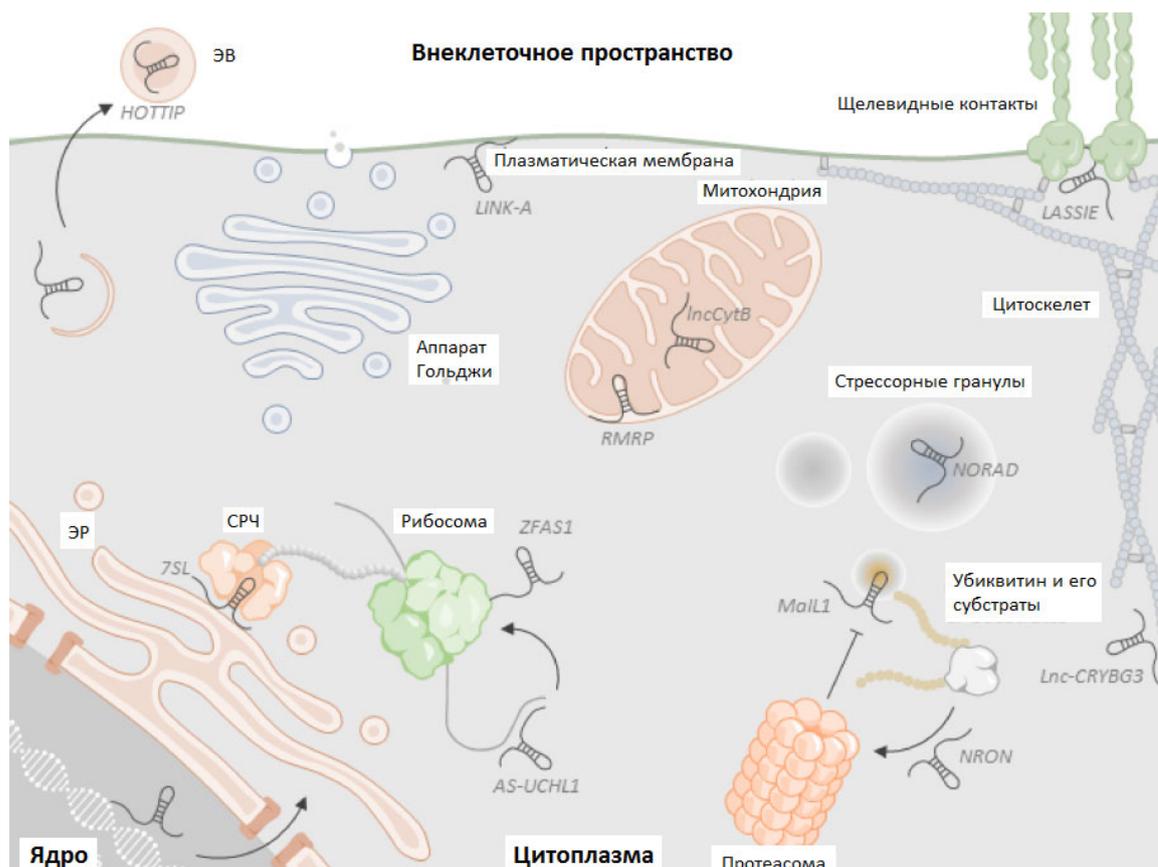


Рисунок 2. Локализация днРНК в различных компартментах клетки [37]. ЭВ – экстрахромосомная везикула; ЭР – эндоплазматический ретикулум; СРЧ – сигнал-распознающая частица.

Распределение днРНК между клеточными компартментами обеспечивается благодаря определенным мотивам первичной или вторичной структуры, которые распознаются специфическими белками. Например, выявлены Alu-подобные мотивы, обеспечивающие взаимодействие днРНК с hnRNPК (гетерогенным ядерным нуклеопротеином К) и, соответственно, преимущественно ядерную локализацию таких транскриптов. Также ядерная локализация некоторых днРНК обеспечивается благодаря взаимодействию с U1 мядРНК [32].

Некоторые днРНК (MALAT1, GAS5) широко экспрессируются в большинстве тканей человеческого организма, в то время как другие (CRNDE, HOTAIR) присутствуют только в определённых типах клеток [7]. Также известны примеры днРНК (H19), которые транскрибируются на высоком уровне во время эмбрионального развития, а увеличение их уровня в тканях взрослого человека коррелирует с возникновением патологических состояний [38].

Интересно отметить, что последовательности, кодирующие днРНК, эволюционно менее консервативны по сравнению генами, кодирующими белки [7, 21]. Лишь 12% генов днРНК человека имеет гомологи в геномах организмов других видов. При этом идентичные участки ДНК составляют 20 – 56% от последовательностей днРНК [21]. Эти данные позволяют предположить, что различия в составе длинных некодирующих транскриптов могут вносить вклад в формирование межвидовых различий [7]. В то же время нельзя не отметить наблюдаемый в ряде случаев консерватизм вторичной структуры днРНК при значительном разнообразии первичных структур. Примером может служить РНК-компонент теломеразы (TERC), для которого отмечается сходство вторичной структуры у представителей разных видов на фоне значительных различий в последовательности нуклеотидов. Этот факт подчеркивает важность вторичной структуры для функционирования днРНК [32].

1.1.3. Механизмы функционирования днРНК

В большинстве случаев в основе функционирования днРНК лежит их способность комплементарно взаимодействовать с другими нуклеиновыми кислотами. Благодаря гибридизации с миРНК днРНК могут играть роль «губок» в отношении этих некодирующих транскриптов и тем самым регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [8].

Описано два типа взаимодействия днРНК с ДНК: образование РНК-ДНК дуплекса и формирование триплекса ДНК-ДНК-РНК. В случае РНК-ДНК дуплексов молекула РНК (или ее участок) образует гибрид с одной из цепей ДНК. При этом вторая цепь ДНК вытесняется из двойной спирали, формируя так называемую R-петлю [39]. Примерами днРНК, склонных к формированию подобных структур, являются центромерные РНК, а также TERRA [39, 40]. Если R-петли образуются за счет канонической Уотсон-Криковской гибридизации РНК с комплементарной последовательностью ДНК, то формирование триплексов происходит за счет Хугстеновских взаимодействий. При этом молекула РНК внедряется в большую бороздку двойной цепи ДНК [41]. К днРНК, формирующим триплексные структуры, относятся MEG3, HOTAIR [42]. Как R-петли, так и триплексные структуры способны привлекать те или иные белки. Например, R-петли, образованные при участии центромерных днРНК, являются аттрактантами для белков сигнального пути ATR [40]. Триплекс, образуемый на промоторе гена *MAT2A* при участии днРНК PARTICLE, привлекает белки хроматин-ремоделирующего комплекса PRC2 [42]. Сами днРНК могут формировать элементы вторичной и третичной структуры, которые распознаются определенными белками [42, 43]. Такие днРНК играют роль

своеобразных «гидов», привлекая белковые молекулы к определенным последовательностям ДНК (Рис. 3).

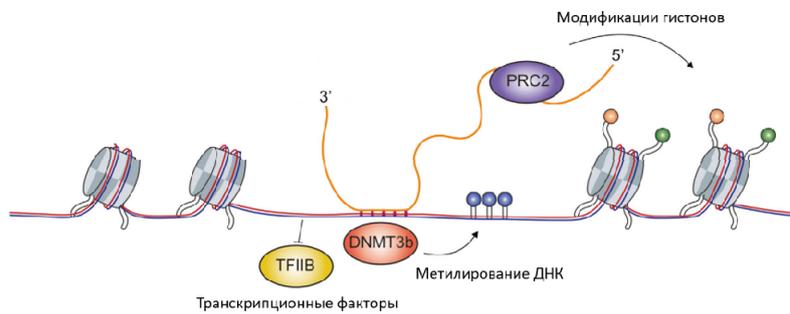


Рисунок 3. днРНК MEG3 в качестве гида, привлекающего различные белки и белковые комплексы к участкам ДНК [42].

Показано, что многие днРНК обеспечивают белок-белковые взаимодействия. Так, днРНК Xist, участвующая в инактивации одной из X-хромосом самок млекопитающих, привлекает более 80 белков. Однако лишь 10 из них непосредственно связываются с молекулой Xist. Остальные локализуются на данной РНК за счет белок-белковых взаимодействий [32]. Взаимодействуя с ДНК инактивируемой хромосомы, Xist привлекает к ней белковые комплексы, обеспечивающие модификацию хроматина и переход его в неактивное состояние. Приведенный пример является хорошей иллюстрацией «каркасной» функции днРНК, которая реализуется благодаря большим размерам этих транскриптов, а также способности взаимодействовать с другими нуклеиновыми кислотами и белками (Рис. 4). Играя роль своеобразных «точек сборки», днРНК способствуют формированию надмолекулярных комплексов и клеточных компартментов, в которых происходит локальное повышение концентрации определенных факторов, а также возникают условия для пространственного сближения ферментов и их субстратов [43, 44]. Таким образом, длинные некодирующие РНК принимают участие в разделении фаз жидкость-жидкость. Такая фазовая сепарация является средством разграничения биохимических реакций во внутриклеточной среде в жидкоподобных каплях, которые способствуют субклеточной организации [37]. Примерами компартментов, образующихся в результате фазовой сепарации с участием днРНК, могут служить ядерные спеклы и параспеклы, которые будут рассмотрены далее.

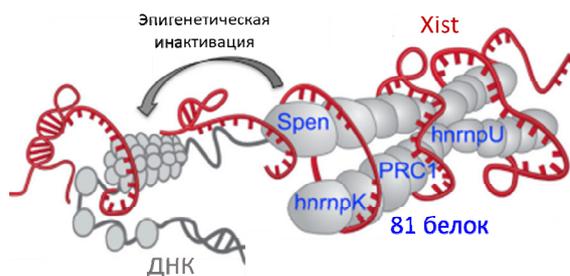


Рисунок 4. днРНК Xist в роли «каркаса» при сборке надмолекулярного белкового комплекса в процессе инактивации X-хромосомы [45]).

Как уже отмечалось выше, днРНК могут служить предшественниками других некодирующих транскриптов (миРНК, мядРНК, пиРНК), которые выполняют в клетке различные регуляторные функции. Например, межгенная днРНК H19 является предшественником миРНК miR-675 [46]. РНК-РНК-дууплексы, образованные в результате гибридизации транскриптов некоторых псевдогенов с мРНК «родительских» генов, могут подвергаться процессингу с образованием малых интерферирующих РНК [47]. В сперматозоидах и клетках зародышевой линии животных и человека обнаружены пиРНК, которые образуются в результате процессинга днРНК некоторых псевдогенов [48]. Известны днРНК, являющиеся предшественниками малых ядрышковых РНК (мядРНК). К ним относятся, например, некодирующие транскрипты генов группы *SNHG* (small nucleolar RNA host genes) [49].

Некоторые днРНК транслируются с образованием функциональных белков и пептидов [20]. Роль этих продуктов в различных внутриклеточных процессах будет рассмотрена далее.

ДнРНК могут действовать как *in cis*, так и *in trans*. В первом случае некодирующие транскрипты регулируют экспрессию генов, расположенных на тех же хромосомах, что и гены самих днРНК. Примером могут служить промоторные днРНК, которые локализованы в ядре и регулируют экспрессию тех генов, с промоторов которых они транскрибируются [31]. Во втором случае днРНК регулируют функции генов, локализованных на других хромосомах. Подобным образом действуют, например, цитоплазматические днРНК, влияющие на экспрессию генов посредством взаимодействия с регуляторными миРНК [30].

1.1.4. Функции днРНК

1.1.4.1. Роль днРНК в формировании ядерных структур и архитектуры хроматина

Некоторые днРНК участвуют в образовании ядерных структур: ядерных спеклов и параспеклов. *Ядерные спеклы* представляют собой рибонуклеопротеиновые гранулы размером 0,3 – 3 мкм, окруженные хроматином и включающие разнообразные компоненты сплайсосомы. Ядерные спеклы располагаются вблизи активно транскрибирующихся генов, что способствует котранскрипционной модификации РНК с участием компонентов спеклов [50]. В состав ядерных спеклов входит днРНК MALAT1. Данный транскрипт преимущественно локализуется в периферической зоне спеклов, где он может взаимодействовать с активными генами и их первичными транскриптами [50]. Выполняя функции молекулярного каркаса, MALAT1 обеспечивает взаимодействие различных белков и их мишеней (ДНК и РНК). Взаимодействуя с первичными транскриптами, эта днРНК привлекает к ним факторы сплайсинга, локализованные в спеклах (например, SRSF1). Кроме

того, MALAT1 рекрутирует белковые комплексы, ремоделирующие хроматин, к участкам хромосом, расположенным вблизи спеклов. Таким образом, MALAT1 участвует в регуляции транскрипции генов и сплайсинге пре-мРНК [51].

днРНК NEAT1 необходима для формирования *параспеклов* – лишенных мембраны цилиндрических гранул, расположенных вблизи ядерных спеклов [35]. NEAT1 привлекает белки SFPQ и NONO, с которыми взаимодействуют другие белковые компоненты параспеклов (такие, как FUS, ANDC1, CIRBP) [52]. Функции параспеклов до конца не исследованы. Предполагается, что эти структуры выполняют роль «молекулярных губок», депонируя определенные РНК и белки и таким образом препятствуя их функционированию. Кроме того, обнаружено, что белки параспеклов участвуют в процессинге микроРНК, способствуя вырезанию интронов, содержащих последовательности предшественников миРНК [53]. Важно отметить, что количество параспеклов возрастает при различных стрессорных состояниях: вирусной и бактериальной инфекции, тепловом шоке, гипоксии. Это свидетельствует в пользу того, что данные структуры способствуют выживанию клетки в условиях стресса [52].

Хорошим примером влияния днРНК на архитектуру хроматина является уже упомянутая ранее некодирующая РНК Xist (**Рис. 4**), привлекающая к инактивируемой X-хромосоме деацетилазы гистонов и компоненты хроматинремоделирующих комплексов PRC1 и PRC2 [45, 54]. Помимо этого, Xist способствует перемещению инактивируемой хромосомы к ядерной ламине - компартменту, расположенному вблизи ядерной мембраны и ассоциированному с транскрипционно неактивным гетерохроматином [51].

Недавно было показано, что определенные днРНК необходимы для осуществления контактов между хромосомами. К примеру, FIRRE локализуется на участке X-хромосомы, расположенном вблизи сайта инициации транскрипции этой РНК. Данный транскрипт взаимодействует с белком ядерного матрикса hnRNPU, который, в свою очередь, обеспечивает контакт участка локализации FIRRE с локусами, расположенными на других хромосомах (**Рис. 5**) [21, 55].

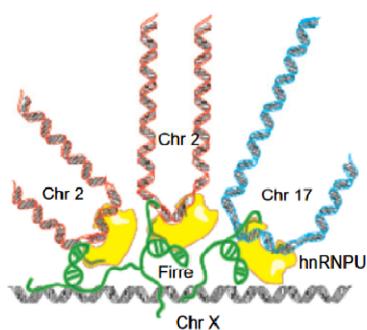


Рисунок 5. Механизм функционирования днРНК, направленный на сближение участков различных хромосом [55].

1.1.4.2. днРНК участвуют в репарации двуцепочечных разрывов ДНК

Устранение двуцепочечных разрывов может происходить посредством двух механизмов: негомологичного соединения концов ДНК (non-homologous end-joining, NHEJ) и гомологичной рекомбинации (homologous recombination, HR). Оба механизма осуществляются с участием днРНК. Так, днРНК LPIK является своего рода «сенсором», распознающим двуцепочечные разрывы. Данный транскрипт взаимодействует с ДНК в месте повреждения и привлекает к нему белок Ku70, являющийся компонентом системы NHEJ. Некодирующий транскрипт LINP1 выступает в качестве каркаса, стабилизирующего гетеродимер Ku70-Ku80, участвующего в соединении концов ДНК в месте повреждения [56].

За последние годы появилось множество свидетельств того, что двуцепочечные разрывы инициируют транскрипцию вблизи места повреждения ДНК. Это явление эволюционно консервативно и наблюдается у дрожжей, растений, насекомых и млекопитающих. Двуцепочечные разрывы распознаются белковым комплексом MRN, инициирующим HR. Данный комплекс привлекает к месту повреждения РНК-полимеразу II, которая обеспечивает синтез особого класса днРНК – длинных некодирующих РНК, индуцированных повреждением (ип-днРНК). Ип-днРНК далее подвергаются Dicer-зависимому процессингу с образованием малых РНК размером 20 – 35 нк, которые входят в состав комплекса Ago2, привлекающего белки, ремоделирующие хроматин. В результате происходит локальная релаксация хроматина в месте разрыва, что облегчает доступ белков системы репарации (таких, как RAD51 и BRCA1) к месту повреждения [56].

Многие данные свидетельствуют о том, что ип-днРНК не только служат предшественниками малых РНК, участвующих в репарации ДНК, но и сами являются необходимым компонентом системы HR. Гибридуясь с ДНК, эти транскрипты формируют R-петли, которые привлекают к участку повреждения ДНК белки системы репарации (RAD51, BRCA1) [56, 57].

1.1.4.3. Участие днРНК в функционировании ядрышка и биогенезе рибосом

Ядрышко представляет собой лишенный мембраны рибонуклеопротеиновый ядерный компартмент, в котором происходит синтез предшественников рибосомальных РНК, процессинг первичных транскриптов и формирование субъединиц рибосом. Ядрышки формируются в области кластеров рибосомальных генов и включают предшественники рРНК, находящиеся на разных стадиях процессинга, мядРНК, 5S рРНК, а также рибосомальные белки и факторы процессинга пре-рРНК (такие, как MCL, NPM1, фибрилларин, DDX21). Помимо этого, в составе ядрышек присутствуют различные днРНК. К их числу можно отнести

SLERT, взаимодействующую с белком DDX21. Данный белок является ингибитором РНК-полимеразы I. Связывание SLERT с DDX21 вызывает конформационные изменения белка, что делает его неспособным ингибировать синтез рРНК [58].

В нормальных физиологических условиях в клетке экспрессируется лишь 50% генов рибосомальных РНК. В подавлении экспрессии неактивных рибосомальных генов участвует группа днРНК, транскрибируемых РНК-полимеразой I с промоторов, расположенных в области межгенных спейсеров, разделяющих рибосомальные гены. Эти транскрипты образуют триплексные структуры с ДНК рибосомальных генов. Данные структуры привлекают белки, ремоделирующие хроматин (в том числе ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3b), что приводит к сайленсингу генов рРНК [41, 58].

1.1.4.4. Участие в функционировании аппарата деления клетки и сегрегации хромосом

В процессе митоза микротрубочки веретена деления связываются с хромосомой в области центромер. Центромерная ДНК представлена тандемными сателлитными повторами протяженностью несколько сотен тысяч п. о., которые формируют неактивный хроматин. Тем не менее, были выявлены нкРНК (в том числе днРНК), которые транскрибируются с этих участков при участии РНК-полимеразы II [59]. Примером является α -сателлитная РНК человека. Интересно отметить, что днРНК данного класса экспрессируются преимущественно в делящихся клетках [26]. Подобные РНК локализуются на хромосомах митотических клеток и непосредственно привлекают к их центромерным участкам белки CENP-A и CENP-C. Последние ассоциируются с другими белками (CENP-K, CENP-P и др.), что приводит к формированию зрелого кинетохора [59] (Рис. 6).

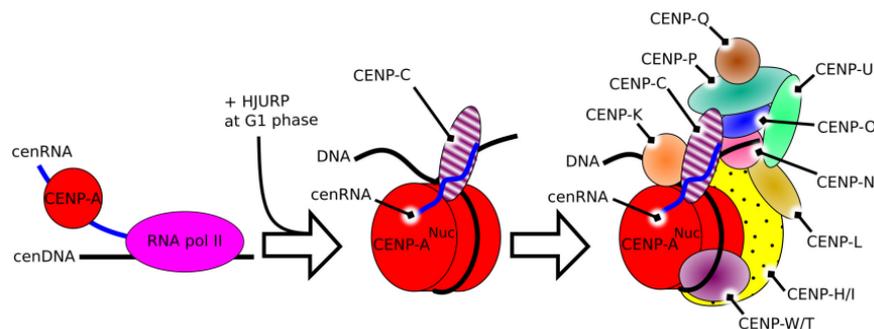


Рисунок 6. Роль центромерных днРНК в формировании аппарата деления клетки [59]. Nuc – нуклеосома, cenRNA – центромерная РНК; cenDNA – ДНК в области центромер.

Недавно было продемонстрировано, что центромерные днРНК образуют R-петли, играющие важную роль в функционировании сложного аппарата, называемого «пассажирным комплексом», который обеспечивает корректное прикрепление микротрубочек веретена

деления к кинетохору и сегрегацию хромосом. Ключевую роль в этом процессе играет Аугога В. Данный белок активируется киназой Chk1, которая, в свою очередь, фосфорилируется киназой ATR – ключевым регулятором стабильности генома. В активации ATR задействован белок RPA, который локализуется на центромерах, связываясь с одноцепочечными участками ДНК, образующимися при формировании R-петель с участием центромерных днРНК [60]. Таким образом, центромерные R-петли, образующиеся во время митоза в результате транскрипции центромерных днРНК, обеспечивают активацию ATR-зависимого сигнального пути, благодаря которому происходит активация Аугога В и привлечение к центромерам других компонентов «пассажирного комплекса» (INCENP, сурвивин и др.) [59].

1.1.4.5. Поддержание длины теломер и защита теломерных участков хромосом

Теломеры - структура, расположенная на концах линейных хромосом. У большинства организмов теломерная ДНК представлена короткими тандемными повторами [28]. С теломерными участками ДНК взаимодействуют белки-шелтерины, которые препятствуют распознаванию концов хромосом в качестве двуцепочечных разрывов, предотвращая их рекомбинацию и соединение друг с другом [28, 39]. Таким образом, данная структура выполняет важные защитные функции. В большинстве клеток взрослого организма происходит укорочение теломерной ДНК при каждом клеточном делении. В конечном итоге, при достижении теломерами определенной длины клетка перестает делиться и вступает в стадию репликативного старения [39]. Однако во многих типах клеток (стволовых, зародышевых и большинстве раковых клеток) существует механизм, препятствующий укорочению теломер. Удлинение 3'-концевых участков хромосом происходит при участии холофермента теломеразы, выполняющего функции обратной транскриптазы. В состав холофермента входит ряд белков (в том числе, обратная транскриптаза, TERT), а также РНК-компонент - TERC. Последний представляет собой днРНК длиной 451 нк и служит матрицей, на которой обратная транскриптаза синтезирует теломерные повторы. Также эта РНК создает каркас для сборки теломеразного комплекса [27].

Помимо TERC, в функционировании теломер принимает участие группа днРНК, транскрибируемых с теломерных повторов – TERRA. У млекопитающих размер TERRA достигает от 100 до 9000 нк. Синтез этих днРНК инициируется в субтеломерных последовательностях и распространяется на последовательность теломер. В нормальных нетрансформированных клетках максимальный уровень TERRA отмечается в раннюю G1 фазу клеточного цикла [28]. Данные некодирующие транскрипты привлекают к теломерным

повторам белки-шелтерины, которые, защищают концы хромосом, препятствуя их распознаванию системой репарации в качестве двуцепочечных разрывов [28].

1.1.4.6. Участие днРНК в регуляции транскрипции

Ядерные днРНК могут регулировать экспрессию генов на уровне транскрипции, привлекая к их промоторам белки, участвующие в ремоделировании хроматина, а также различные активирующие или репрессорные комплексы. Например, 5'-концевая область днРНК HOTAIR содержит участок связывания комплекса PRC2, который вызывает триметилирование гистона H3 по остатку лизина 27 (H3K27me3), что, в свою очередь, приводит к переходу хроматина в неактивное состояние. Таким образом, HOTAIR регулирует *in trans* экспрессию гомеозисных генов, привлекая вышеуказанный комплекс к HOXD-кластеру, расположенному на хромосоме 2 и вызывая репрессию генов кластера [23]. В качестве примера активирующего действия днРНК на экспрессию генов можно привести влияние антисмысловой днРНК KHPS1 на транскрипцию гена *SPHK1*. KHPS1 образует триплексную структуру с ДНК в области энхансера гена *SPHK1*. Эта структура привлекает комплексы, содержащие ацетилтрансферазы гистонов, к промотору данного гена. Указанная модификация способствует переходу хроматина на данном участке хромосомы в активное состояние [23].

Энхансерные днРНК могут участвовать в формировании петель ДНК, способствующих сближению энхансера и промотора гена, тем самым, обеспечивая влияние энхансера на промотор [29].

Описан специфический механизм регуляции транскрипции генов с участием антисмысловых днРНК. Так, между промоторами генов, расположенных в одном локусе и транскрибируемых с разных цепей в противоположных направлениях, может происходить конкуренция за связывание компонентов аппарата транскрипции. Кроме того, транскрипционные аппараты, представляющие собой мультисубъединичные белковые комплексы, продвигаясь навстречу друг другу, сталкиваются, что может привести либо к вытеснению комплекса с одной из цепей, либо к блоку транскрипции на обеих цепях ДНК. Таким образом, при одновременной транскрипции смысловой и антисмысловой РНК синтез одного из продуктов может осуществляться с меньшей эффективностью. Возможно также прекращение транскрипции смысловой РНК в случае синтеза антисмыслового транскрипта. Такое явление получило название *транскрипционной интерференции* [23, 61]. В качестве примера такого механизма можно привести антисмысловую днРНК AIRN, ген которой

перекрывается с геном опухолевого супрессора *IGF2R*. Транскрипция этой антисмысловой РНК подавляет экспрессию *IGF2R* [23].

1.1.4.7. Участие в процессинге пре-мРНК, а также посттранскрипционном редактировании мРНК

Длинные некодирующие РНК могут влиять на сплайсинг пре-мРНК. Известно, что сплайсинг пре-мРНК часто происходит котранскрипционно. При этом привлечение тех или иных регуляторов сплайсинга к образуемому транскрипту может зависеть от модификаций хроматина в тех участках ДНК, с которых данная пре-мРНК транскрибируется. Поскольку днРНК способны влиять на модификации гистонов, они могут оказывать влияние и на процесс сплайсинга. Примером служит днРНК *asFGFR2*, транскрибируемая с локуса *FGFR2* в эпителиальных клетках [62]. Данный некодирующий транскрипт привлекает к гену *FGFR2* деметилазу гистонов KDM2. Деметилирование гистонов приводит к ослаблению их взаимодействия с белком MRG15, который, в свою очередь, способен рекрутировать негативный регулятор сплайсинга PTBP1. В результате в эпителиальных клетках не происходит рекрутирования белка PTBP1, что делает возможным включение в состав зрелой мРНК экзона IIIb. В мезенхимальных стволовых клетках днРНК *asFGFR2* не экспрессируется, следовательно, в этих клетках ингибируется включение экзона IIIb в состав зрелой мРНК *FGFR2* [62].

Регуляция сплайсинга с участием днРНК может также происходить за счет РНК-РНК-взаимодействий. Гибридуясь с пре-мРНК, длинные некодирующие транскрипты могут маскировать сайты сплайсинга и тем самым изменять соотношение различных изоформ мРНК. Примером может служить днРНК, транскрибируемая с интрона 1 гена *N-MYC*. Данный транскрипт образует РНК-РНК гибрид с пре-мРНК гена и препятствует вырезанию 1-го интрона [61]. Помимо этого, некоторые днРНК могут взаимодействовать как с пре-мРНК, так и с белками-факторами сплайсинга, привлекая последние к определенным участкам транскриптов. Так, при некоторых видах опухолей с локуса *FAS* экспрессируется антисмысловая днРНК SAF, которая взаимодействует как с экзоном 6 пре-мРНК *FAS*, так и с фактором SPF45, что приводит к вырезанию экзона 6 [62].

ДнРНК также могут регулировать редактирование мРНК. У человека наиболее распространенной модификацией транскриптов является ADAR-зависимое превращение аденозина в инозин. Описаны длинные некодирующие транскрипты, способствующие привлечению ADAR к РНК-мишеням. В качестве примера можно привести днРНК PCA3, которая образует РНК-РНК дуплекс с пре-мРНК опухолевого супрессора PRUNE2. Благодаря

такому взаимодействию первичный транскрипт PRUNE2 подвергается ADAR-зависимому редактированию, что вызывает уменьшение уровня данной мРНК [23].

1.1.4.8. Регуляция стабильности мРНК

Одним из механизмов регуляции экспрессии генов является деградация РНК, опосредованная миРНК [8]. Соответственно, уменьшение содержания миРНК в результате связывания с другими транскриптами способствует возрастанию уровня мРНК-мишеней. Многие днРНК содержат сайты связывания миРНК и, таким образом, конкурируют с мРНК белок-кодирующих генов за эти регуляторные молекулы (**Рис. 7А**). Такие РНК получили название конкурирующих эндогенных РНК (кэРНК). Впервые концепция кэРНК была сформулирована в 2010 г. L. Poliseno с соавт. на примере мРНК гена *PTEN* и смысловой днРНК (*lncPTENP1-S*) его процессированного псевдогена *PTENP1* [8]. В дальнейшем гипотеза кэРНК получила многочисленные подтверждения. На данный момент известно большое количество днРНК, которые служат «ловушками» регуляторных миРНК и, соответственно, влияют на уровень их РНК-мишеней. Более того, многие днРНК могут одновременно взаимодействовать с несколькими миРНК. Например, CRNDE выполняет функции кэРНК в отношении miR-186, miR-384 и miR-136-5p [63 – 65].

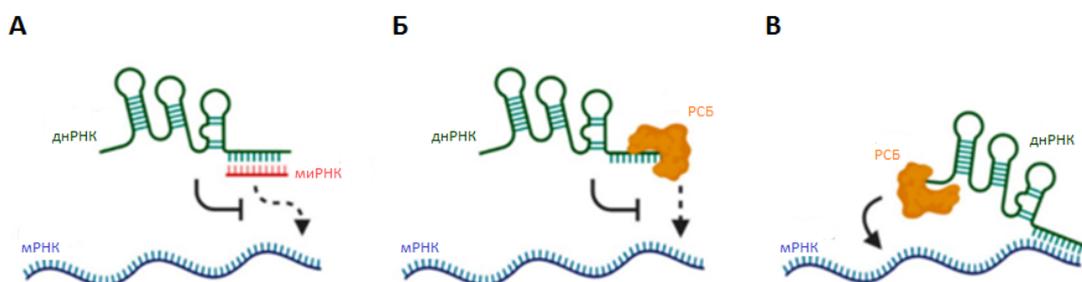


Рисунок 7. Механизмы влияния днРНК на стабильность мРНК: связывание миРНК (А) или белков, влияющих на стабильность мРНК (Б); привлечение к мРНК стабилизирующих/дестабилизирующих белков (В) [66]. РСБ - РНК-связывающий белок, стабилизирующий или дестабилизирующий мРНК.

Влияние днРНК на стабильность мРНК может осуществляться за счет конкуренции с мРНК за связывание с различными белками, стабилизирующими транскрипты, либо, напротив, способствующими их деградации (**Рис. 7Б**). Например, транскрипт псевдогена *HMGAI-p* конкурирует с 3'-UTR мРНК гена *HMGAI* за белковый фактор α CP1, стабилизирующий данную мРНК [67]. В результате происходит деградация мРНК и, как следствие, снижение уровня белка HMGAI, ассоциированное с диабетом типа 2. ДнРНК могут непосредственно взаимодействовать с мРНК и привлекать к ним стабилизирующие или дестабилизирующие белки (**Рис. 7В**). Помимо этого, некоторые днРНК сами способны

стабилизировать мРНК. Например, днРНК PDCD4-AS1 образует РНК-РНК дуплекс с мРНК гена *PDCD4*, стабилизируя этот транскрипт [66].

1.1.4.9. Влияние днРНК на трансляцию мРНК и участие в посттрансляционной модификации и регуляции стабильности белков

Некоторые днРНК участвуют в посттрансляционной модификации белков. В частности, ASB16-AS1 привлекает протеинкиназу АТМ к белку TRIM37, чем способствует его фосфорилированию. Другой пример - днРНК HOTAIR, которая связывается с белком RUNX3 и обеспечивает его взаимодействие с E3-убиквитинлигазой. Это способствует убиквитинзависимой деградации белка RUNX3 [23]. В то же время некоторые днРНК, взаимодействуя с определенными белками, препятствуют их убиквитинированию и, следовательно, замедляют деградацию этих белков [49].

1.1.4.10. Роль днРНК в функционировании митохондрий

Митохондрии представляют собой многофункциональные клеточные органеллы, играющие ключевую роль в обеспечении клеток энергией, а также в реализации программ клеточной гибели [37]. Помимо матричных РНК митохондриальных белков, а также митохондриальных рРНК и тРНК, кольцевая ДНК этих органелл кодирует несколько днРНК. К ним относятся lncND5, lncND6 и lncCytB [36]. Функции этих транскриптов на данный момент до конца не исследованы. Предполагается, что они участвуют в регуляции экспрессии генов митохондрий. Более детально изучены днРНК, кодируемые ядерным геномом и далее транспортируемые в митохондрии. Примером может служить днРНК SAMMSON. Данный транскрипт взаимодействует с белком p32 и обеспечивает его митохондриальную локализацию. p32 необходим для созревания митохондриальной 16S рРНК. Нокдаун SAMMSON снижает трансляцию митохондриальных мРНК [36, 37].

1.1.4.11. Функции белков и пептидов, транслируемых с днРНК

Как упоминалось выше, некоторые днРНК содержат открытые рамки считывания и транслируются с образованием белков и пептидов. В настоящее время изучены функции некоторых из этих продуктов. Примером может служить пептид, состоящий из 53 аминокислот, образующийся при трансляции днРНК HOXB-AS3 [68]. Данный пептид выполняет онкосупрессорные функции. Его содержание резко снижается в клетках метастазирующего колоректального рака. Пептид HOXB-AS3 связывается с hnRNP1, предотвращая его взаимодействие с последовательностью E19 мРНК пируваткиназы M

(PKM), участвуя в регуляции сплайсинга данного транскрипта. В итоге HOXB-AS3 стимулирует образование изоформы PKM1, но подавляет формирование PKM2. PKM2 является ключевым регулятором аэробного гликолиза. Таким образом, HOXB-AS3 подавляет аэробный гликолиз в клетках колоректального рака [68].

1.1.4.12. Роль днРНК в межклеточной коммуникации

Выявлены днРНК, ассоциированные с внутренней поверхностью плазматической мембраны и участвующие в формировании аппарата клеточной адгезии. К таким транскриптам относится SENCER, экспрессирующаяся в эндотелиальных клетках. Данная РНК взаимодействует с белком SKAR4, блокируя его связывание с трансмембранным белком CDH5, который, в свою очередь, участвует в адгезии эндотелиальных клеток. SKAR4 препятствует локализации CDH5 на клеточной мембране и, следовательно, предотвращает образование структуры, обеспечивающей адгезию. Таким образом, связывание SKAR4 и нарушение его взаимодействия с CDH5 способствует формированию аппарата адгезии клеток эндотелия [37].

Передача сигнала между клетками может осуществляться с помощью внеклеточных везикул – мембранных пузырьков размером от 40 до 5000 нм. Везикулы представляют собой уникальный транспортный механизм, позволяющий клеткам обмениваться различными молекулами (белками, липидами, РНК, фрагментами ДНК) и даже целыми органеллами [69, 70]. В числе молекул, переносимых с помощью внеклеточных везикул выявлены и днРНК. Среди них H19, HOTTIP, MALAT1 [37].

1.1.5. днРНК – молекулярные интеграторы, координирующие работу различных сигнальных путей клетки

Многие днРНК могут выполнять в клетке одновременно несколько функций. Например, SNHG15 служит предшественником мдРНК SNORA9. В то же время данный транскрипт является ловушкой нескольких миРНК (miR-141-3p, miR-338-3p, miR-211-3p и др.), регулируя таким образом уровень мРНК-мишеней по механизму конкурирующих эндогенных РНК. В результате SNHG15 способствует повышению уровня ряда онкогенных транскриптов, среди которых ZEB2, ZNF217. Кроме того, SNHG15 может связываться с EZH2 и привлекать его к промотерам генов онкосупрессоров *P15* и *KLF2*, вызывая триметилирование гистона H3 (H3K27me3) в области данных промоторов, что способствует сайленсингу генов. Наконец, связываясь с белком SLUG, SNHG15 предотвращает его убиквитинирование и в конечном итоге замедляет деградацию данного онкогенного белка

[49]. Все перечисленные выше механизмы обеспечивают онкогенные функции днРНК SNHG15: усиление пролиферации, миграции и инвазии раковых клеток. Еще одним примером многофункциональной днРНК является NEAT1. Как уже упоминалось ранее, данный транскрипт в основном локализуется в ядре, где участвует в формировании параспеклов [35]. Описана важная роль NEAT1 в альтернативном сплайсинге. Взаимодействуя с фактором сплайсинга SRSF5, NEAT1 способствует его фосфорилированию с помощью киназы CLK1. Фосфорилированный фактор депонируется в ядерных параспеклах и не способен взаимодействовать со своими мишенями. Это, в свою очередь, приводит к преимущественному образованию определенных изоформ мРНК [62]. Помимо этого, NEAT1 может взаимодействовать с различными миРНК, например, miR-107 [71]. Связываясь с данной миРНК, NEAT1 повышает уровень мРНК CDK6, регулятора клеточного цикла раковых стволовых клеток глиобластомы. Это приводит к усилению пролиферации клеток GBM.

Все эти примеры хорошо демонстрирует общую для многих днРНК особенность – способность активировать различные сигнальные пути клетки. Таким образом, эти транскрипты часто служат своеобразными интеграторами, координируя работу сразу нескольких регуляторных механизмов.

1.1.6. Роль днРНК в патогенезе онкологических заболеваний

За последние два десятилетия становится все более очевидной важная роль некодирующих транскриптов как в естественных физиологических процессах (например, росте и дифференцировке тканей, аутофагии, апоптозе, естественном старении организма), так и в развитии заболеваний, в том числе онкологических [7]. Многие днРНК обладают проонкогенными свойствами. Их уровень значительно повышен в раковых клетках по сравнению с нормальными тканями. Во многих случаях отмечается корреляция экспрессии соответствующей днРНК со стадией заболевания и (или) фенотипом опухоли [72]. Известны днРНК, ассоциированные с эпителиально-мезенхимальным переходом, пролиферацией раковых стволовых клеток [72]. Кроме того, есть данные о том, что онкогенные днРНК могут не только синтезироваться в опухолевых клетках, но и передаваться другим клеткам в составе внеклеточных везикул, что может способствовать дальнейшей прогрессии заболевания [73]. В то же время описано множество днРНК, выполняющих онкосупрессорные функции [74, 75]. Таким образом, информация об экспрессии днРНК может служить важным прогностическим фактором в плане характера протекания заболевания. Понимание механизма влияния днРНК на ключевые процессы в клетке, а также механизмов, задействованных в регуляции

экспрессии самих днРНК, может открыть дорогу к разработке новых терапевтических агентов для лечения злокачественных опухолей.

1.1.7. Некодирующие транскрипты псевдогена *PTENP1* и их роль в патогенезе злокачественных опухолей

К днРНК, играющих важную роль в патогенезе онкологических заболеваний, относится транскрипты псевдогена *PTENP1*. *PTENP1* представляет собой процессированный (то есть не содержащий последовательности ДНК, кодирующие интроны) псевдоген гена опухолевого супрессора PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten). Данный псевдоген, расположенный на хромосоме 9p13.3, на 98% гомологичен последовательности «родительского» гена *PTEN*. *PTENP1* транскрибируется, однако образующиеся транскрипты не транслируются по причине утраты кодона инициации трансляции в результате мутации [19]. Транскрипция псевдогена происходит в двух противоположных направлениях с образованием смысловой и антисмысловых днРНК (Рис. 8).

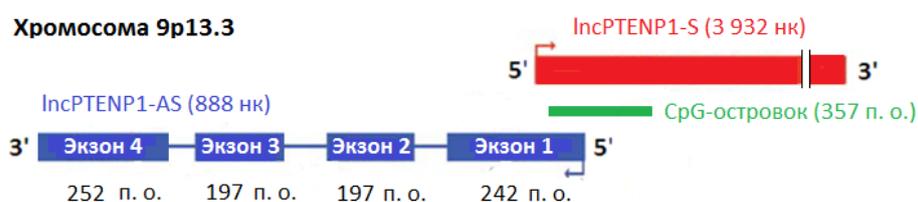


Рисунок 8. Длинные не кодирующие транскрипты псевдогена *PTENP1*

Смысловый полиаденилированный транскрипт псевдогена (lncPTENP1-S, PTENpg1 sense или psiPTEN) не содержит интронов и имеет длину 3932 нк (данные GenBank). Указанный транскрипт экспрессируется в различных тканях организма, при этом обнаруживается как в ядре, так и в цитоплазме клетки. В 3'-концевой области lncPTENP1-S локализованы сайты связывания регуляторных миРНК. Многие из этих миРНК могут также взаимодействовать с мРНК гена *PTEN*. Таким образом, днРНК псевдогена конкурирует с мРНК «родительского» гена за миРНК и тем самым регулирует экспрессию *PTEN* [8].

С антисмысловой цепи *PTENP1* транскрибируется полиаденилированный не кодирующий транскрипт, который включает 4 экзона (Рис. 8) [9]. После вырезания интронов образуется зрелый транскрипт (lncPTENP1-AS) размером 888 нк, который локализуется в ядре и является негативным регулятором экспрессии гена *PTEN*. Действуя *in trans*, lncPTENP1-AS взаимодействует с промотором *PTEN*, привлекая к нему факторы, ремоделирующие хроматин (например, EZH2), что вызывает конденсацию хроматина и снижение экспрессии *PTEN* [9]. В работе Lister и соавт. показано, что взаимодействие

lncPTENP1-AS с ДНК в области гена *PTEN* происходит не напрямую, а опосредованно, благодаря РНК-РНК-гибридизации с промоторной днРНК, транскрибируемой с 5'-концевой области *PTEN* [76]. Помимо вышеописанной антисмысловой днРНК, lncPTENP1-AS, Johnsson и коллеги выявили несплайсированную изоформу, включающую последовательности интронов, а также сплайс-вариант, лишенный экзона 3 [9]. Функции этих днРНК на данный момент неизвестны.

lncPTENP1-S проявляет свойства онкосупрессора при целом ряде онкологических заболеваний, в том числе при раке эндометрия [8, 10–13]. При многих типах рака низкий уровень этого транскрипта коррелирует с клинико-патологическими характеристиками опухоли (степенью дифференцировки, стадией, наличием метастазов), а также менее благоприятным прогнозом заболевания. В большинстве случаев онкосупрессорные свойства днРНК lncPTENP1-S объясняют позитивным влиянием на уровень мРНК гена *PTEN* [8, 11–13]. Так, например, при раке эндометрия этот некодирующий транскрипт служит ловушкой миРНК miR-200с, которая при данной патологии экспрессируется на повышенном уровне и способствует снижению уровня мРНК *PTEN* [12]. Однако имеются данные о том, что помимо мРНК гена *PTEN*, lncPTENP1-S может действовать и на другие мишени. Например, в линиях клеток рака пищевода этот транскрипт способствует повышению уровня экспрессии *SOCS-6*, который, в свою очередь, является негативным регулятором p-STAT3 и HIF-1 α [10]. lncPTENP1-S также может служить «губкой» для miR-27-3р, повышая уровень *EGR1* в линиях клеток рака шейки матки, тем самым замедляя рост клеток и препятствуя эпителиально-мезенхимальному переходу [77]. Более того, показано, что в некоторых случаях сверхэкспрессия псевдогена *PTENP1* не оказывает влияние на уровень мРНК гена *PTEN* [10].

Интересно, что при определенных условиях lncPTENP1-S может играть роль онкогена. Например, было показано, что данная днРНК усиливает пролиферацию клеток рака молочной железы, несущих рецептор эстрогена [78]. Таким образом, днРНК lncPTENP1-S может выполнять как онкосупрессорные, так и онкогенные функции в разных тканях организма, реализуя свое действие с помощью различных механизмов. В работе Ну и коллег показано, что уровень lncPTENP1-S понижен в опухолевых тканях глиом по сравнению с нормальной тканью головного мозга. Также авторы обнаружили, что сверхэкспрессия псевдогена тормозит рост, инвазию и пролиферацию клеток линий глиобластомы SHG44 и U251 [79].

Регуляция экспрессии псевдогена *PTENP1* на данный момент практически не исследована. 5'-концевая область псевдогена содержит CpG-островок, следовательно, можно предположить, что уровень экспрессии *PTENP1* регулируется метилированием.

Действительно, метилирование псевдогена было выявлено при раке легкого и светлоклеточной карциноме почки [80, 81]. Однако влияние данной модификации на экспрессию *PTENP1* не изучено. Также остается неисследованной роль метилирования CpG-островок *PTENP1* в патогенезе онкологических заболеваний, в частности, глиом и карциномы эндометрия.

1.1.8. Роль *linc-RoR* в развитии онкологических заболеваний

Другим некодирующим транскриптом, активно исследуемым в настоящее время, является *linc-RoR* (long non-protein coding RNA, regulator of reprogramming). Этот транскрипт относится к межгенным длинным некодирующим РНК. Ген *LINC-ROR* локализован на 18 хромосоме в области q21.3. Известно 14 сплайс-вариантов этой днРНК, которые различаются размерами и количеством экзонов. Полноразмерный неполиаденилированный транскрипт длиной 2603 нк состоит из четырех экзонов, разделенных протяженными интронами. Впервые эта днРНК была выявлена в 2010 г. в качестве транскрипта, участвующего в установлении и поддержании плюрипотентности индуцированных стволовых клеток [14]. *Linc-RoR* экспрессируется на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках. В соматических клетках взрослого организма уровень этой РНК невысок, при этом повышение транскрипции *linc-RoR* ассоциировано с развитием ряда онкологических заболеваний (рака молочной железы, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легкого, пищевода, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака эндометрия) [82]. Показано, что сверхэкспрессия данного некодирующего транскрипта увеличивает скорость пролиферации раковых клеток, повышает их миграцию и способность к инвазии, способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, а также стимулирует развитие резистентности клеток к радио- и химиотерапии [82]. Таким образом, при вышеперечисленных заболеваниях *linc-RoR* выполняет онкогенные функции.

Механизм действия *linc-RoR* связывают с конкуренцией с мРНК за взаимодействие с различными миРНК (Рис. 9). В частности, *linc-RoR* связывается с miR-124, miR-145, miR-204-5p, miR-205, [82, 83]. Помимо миРНК, *linc-RoR* может также взаимодействовать с белками. Так, этот транскрипт связывается с цитоплазматической фракцией белка hnRNP1, влияющего на трансляцию мРНК p53 [84] (Рис. 9). hnRNP1 взаимодействует с IRES, локализованным в 5'-концевой области мРНК p53, и стимулирует трансляцию этого транскрипта. Связываясь с

цитоплазматическим фосфорилированным hnRNP1, linc-RoR препятствует его взаимодействию с мРНК p53 и, следовательно, уменьшает эффективность трансляции p53.

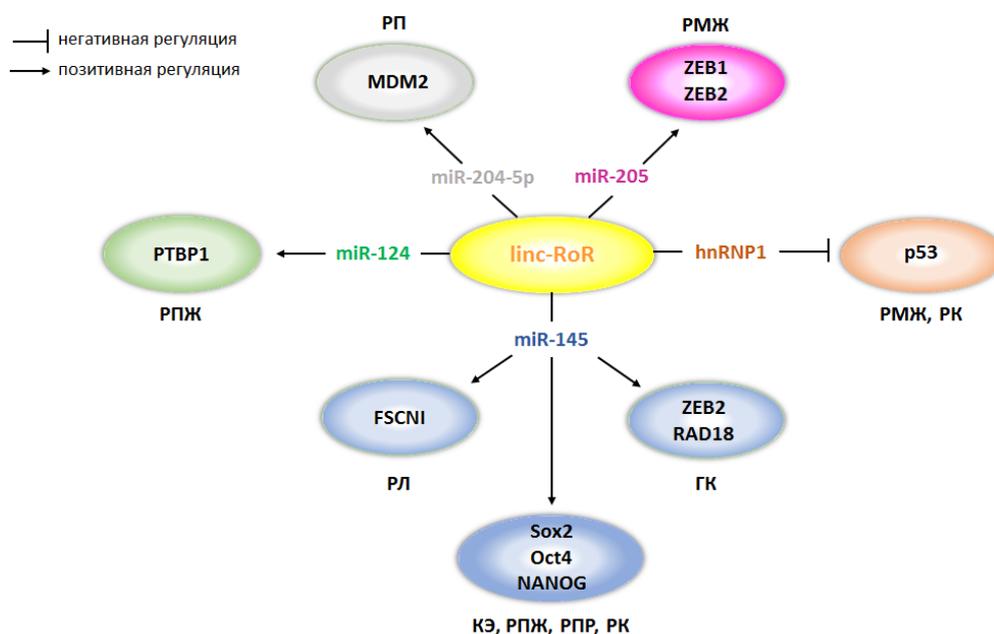


Рисунок 9. Молекулярные механизмы действия linc-RoR при разных видах рака. ГК – гепатоцеллюлярная карцинома; КЭ – карцинома эндометрия; РК – рак кишечника; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; РП – рак пищевода; РПЖ – рак поджелудочной железы; РПР – рак предстательной железы.

Роль linc-RoR при глиальных опухолях головного мозга на данный момент до конца не выяснена. С одной стороны, в 2015 г. Feng с соавт. при анализе относительного уровня экспрессии linc-RoR продемонстрировали пониженное содержание этой днРНК в тканях глиом (по сравнению с нормальной тканью головного мозга) у 23 из 26 обследованных пациентов [85]. В экспериментах *in vitro* авторы также обнаружили снижение пролиферации клеток U87 с оверэкспрессией linc-RoR. С другой стороны, Togaih и соавт. в 2019 г. показали, что повышенный уровень linc-RoR отмечается у 89,5% пациентов с глиобластомой и коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [86].

1.2. Молекулярно-генетические аспекты глиобластомы

В предыдущем разделе были детально рассмотрены функции днРНК. Многие из перечисленных выше транскриптов играют важную роль в патогенезе глиобластомы. Ниже будут кратко описаны клинические особенности и молекулярно-генетические аспекты

данного заболевания, а также приведены современные данные литературы, касающиеся участия днРНК в прогрессии GBM.

1.2.1. Происхождение глиом, принципы классификации глиом и глиобластом

Глиомы составляют 70% первичных опухолей головного мозга [87] и представляют собой группу новообразований, клетки которых имеют морфологические характеристики нейроглии – вспомогательных клеток нервной ткани. Вопрос о происхождении глиом на данный момент окончательно не решен. Есть мнение, что опухолевые клетки развиваются из зрелых глиальных клеток в результате мутаций. Однако ряд исследователей склоняется к мысли о том, что клетки глиом являются потомками нейрональных стволовых клеток либо предшественников олигодендроцитов, которые в результате онкогенных мутаций перерождаются в опухолевые стволовые клетки [1, 88, 89].

В основе традиционной классификации глиом, используемой до 2016 года, лежит морфологическое сходство с определенными гистологическими типами глиальных клеток (астроцитами, олигодендроцитами и эпендимальными клетками). Согласно этой классификации, различают астроцитомы, олигодендроглиомы, эпендимомы и смешанные нейронально-глиальные опухоли. Также в 2007 г была утверждена градация глиом в зависимости от степени злокачественности, которая варьирует от 1 до 4 (grade 1 – 4) [88, 90]. Глиомы 1 и 2 степеней, вне зависимости от их гистологических особенностей, традиционно объединяют в группу «глиомы низкой степени злокачественности» (low grade gliomas, LGG), в то время как глиомы 3 и 4 степеней являются глиомами высокой степени злокачественности (high grade gliomas, HGG) [89]. Глиомы 1 степени (например, полиморфная нейроэпителиальная опухоль низкой степени злокачественности [91]) – опухоли с низкой пролиферативной активностью и отсутствием атипии. Новообразования этой группы практически не обладают склонностью к рецидивам. Опухоли 2 степени (пример – плеоморфная ксантоастроцитома [91]) – медленно растущие новообразования, имеющие атипические клетки. Глиомы 3 степени (например, астроцитома и олигодендроглиома 3 степени злокачественности [91]) – новообразования с признаками злокачественности в виде ядерной атипии и повышенной митотической активности. Для опухолей 4 степени (глиобластома, глиосаркома) свойственна высокая митотическая активность, пролиферация эндотелия сосудов и наличие очагов некроза. Такие глиомы характеризуются быстрой инвазией в окружающие ткани мозга и высокой частотой рецидивирования [88, 90]. Поскольку для глиобластом характерен значительный полиморфизм клеток, присутствующих

в одной и той же опухоли (на гистологическом и молекулярно-генетическом уровнях), этот тип глиом также называют мультиформная глиобластома (*glioblastoma multiforme*, GBM) [89].

Исследования последнего десятилетия выявили значительные различия, касающиеся выживаемости больных глиомами с одним и тем же первоначальным диагнозом и проходящих одинаковые курсы лечения. Указанные различия в значительной мере обусловлены определенными генетическими или эпигенетическими особенностями [88 – 90]. С их учётом в 2016 г была разработана «смешанная классификация», учитывающая как клинико-гистологические особенности опухоли, так и молекулярно-генетические изменения, влияющие на выживаемость пациентов. Согласно этой классификации, глиобластомы подразделяют на опухоли, соержащие мутации в генах IDH1/2, характеризующиеся более благоприятным прогнозом, и опухоли с IDH1/2 дикого типа [88, 90]. Данная классификация позднее была скорректирована, и в настоящее время (в соответствии с требованиями ВОЗ 2021 г.) к GBM следует относить опухоли, несущие ген IDH1/2 дикого типа, в которых обнаруживается зона некроза, а также одно из трех генетических нарушений (мутация в промоторе гена *hTERT*, амплификация гена *EGFR* и/или делеция хромосомы 10 с одновременной дупликацией хромосомы 7). Опухоли, содержащие мутацию IDH1/2, в настоящее время относят к астроцитомам 2 – 4 степени [91].

Помимо описанных выше клинически ориентированных классификаций, разработаны различные молекулярные классификации GBM, используемые в научной литературе. Так, в 2006 г. Phillips и соавторы на основании различий в профилях экспрессии генов предложили подразделять GBM на опухоли с мезенхимальным, классическим (или пролиферативным) и пронеурональным фенотипами [88]. Опухоли с пронеурональным фенотипом характеризуются более благоприятным прогнозом в плане общей выживаемости пациентов. При этом подтипе GBM часто выявляется мутация в гене *IDH1*. Для классического фенотипа характерна онкогенная мутация EGFRvIII. Для глиобластом с мезенхимальным фенотипом свойственно наиболее агрессивное протекание заболевания. При данном типе часто выявляются мутации в гене *NF1*, а также отмечается повышенный уровень экспрессии генов суперсемейства *TNF*. Более подробно молекулярно-генетические аспекты глиобластомы будут рассмотрены в соответствующем разделе.

Еще одна классификация основана на данных анализа метиломов глиобластом. По этому признаку глиобластомы были разделены на две подгруппы: с повышенным и сниженным общим уровнем метилирования ДНК. Первая подгруппа была обозначена как глиобластомы с метиляторным фенотипом (*Glioma CpG Island Methylator Phenotype*, G-CIMP-

позитивные), у опухолей второй группы метилаторный фенотип отсутствует (G-CIMP-негативные). Для опухолей с G-CIMP характерно гиперметиличрование промотора гена *MGMT* и наличие мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*. Такой фенотип часто выявляется в пронеурональных опухолевых клетках и коррелирует с более пролонгированной выживаемостью пациентов с GBM [87].

Однако, в заключении этого раздела очень важно подчеркнуть, что внутриопухолевая гетерогенность, свойственная большинству глиобластом [92], сильно затрудняет отнесение конкретной опухоли к той или иной категории. И поэтому, говоря о «фенотипе глиобластомы», следует понимать, что зачастую речь идёт о свойствах небольшого участка опухолевой ткани, который был получен при взятии биопсии, и его характеристики могут не отражать особенности других зон новообразования.

1.2.2. Раковые стволовые клетки глиобластомы

Согласно современным представлениям, источником роста и возобновления глиобластомы являются раковые стволовые клетки (CSCs), которые претерпевают дифференцировку с образованием зрелых клеток опухоли. Также не исключается вероятность обратного процесса, при котором дифференцированная раковая клетка под действием мутаций претерпевает дедифференцировку с образованием CSCs. В конечном итоге опухолевая ткань представляет собой гетерогенную популяцию клеток, находящихся на разных этапах дифференцировки. При этом CSCs обладают наибольшим туморогенным потенциалом [93]. Для CSCs также характерна повышенная способность приспосабливаться к изменениям условий, которые могут быть вызваны как применением терапевтических агентов, так и микроокружением.

В глиобластоме выделяют три зоны, характеризующиеся различными условиями микроокружения: центральную некротическую зону, периваскулярную нишу и инвазивную периферию опухоли (**Рис. 10**). Каждая из этих областей характеризуется определенными условиями микроокружения, которые способствуют формированию разных типов CSCs глиобластомы. В периваскулярном пространстве эндотелиальные клетки способствуют поддержанию мультипотентности CSCs с помощью таких сигнальных путей, как NOTCH, *sonic hedgehog*. В свою очередь CSCs периваскулярной ниши продуцируют на высоком уровне ангиогенные факторы (например, VEGF), способствующие пролиферации эндотелия [94].

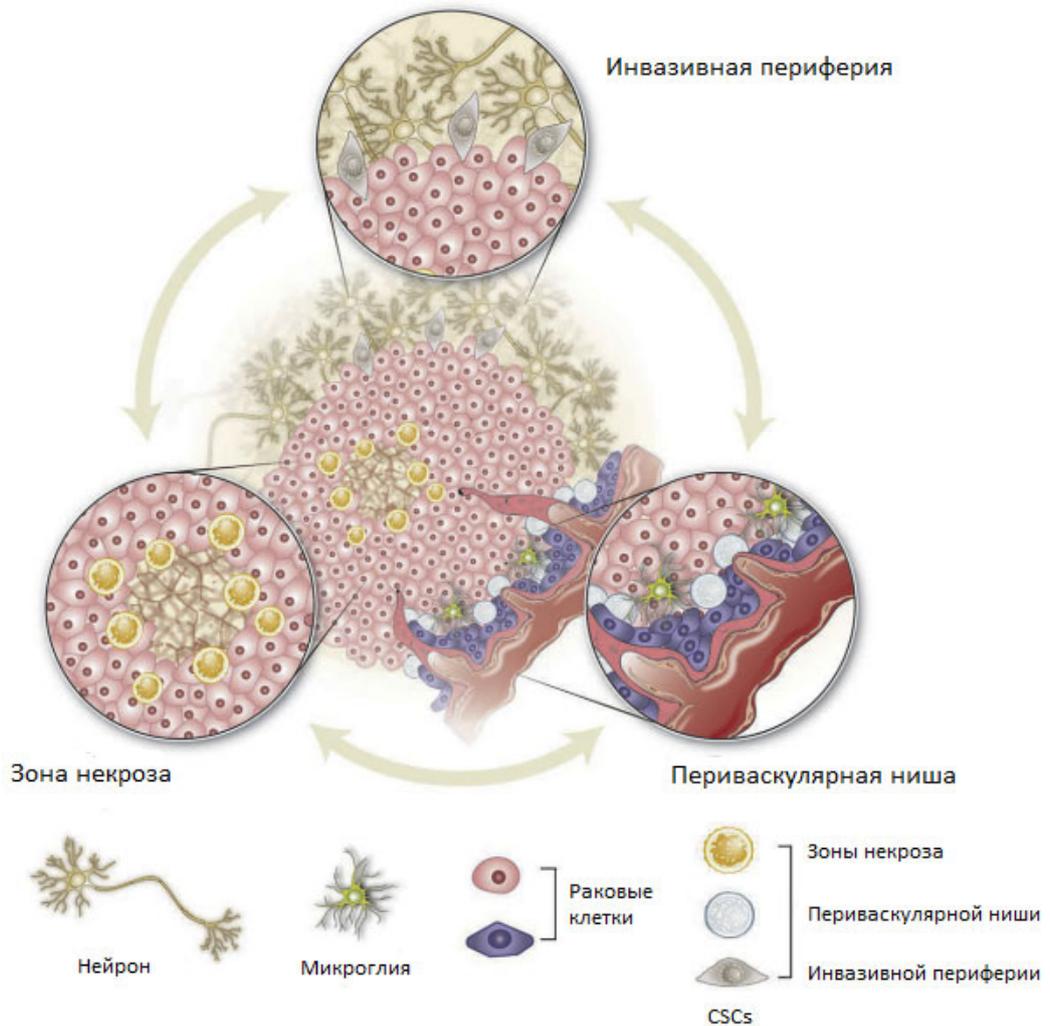


Рисунок 10. CSCs глиобластомы, характерные для различных зон опухоли [94].

CSCs центральной зоны опухоли адаптированы к условиям гипоксии, недостатку питательных веществ и кислой pH среды (порядка 5,9 – 6,0). В подобных условиях повышается уровень факторов Hif1 и Hif2, которые обеспечивают метаболическую адаптацию клеток – так называемый «мезенхимальный сдвиг». В связи с этим CSCs глиобластомы, локализованные в этой области, часто называют мезенхимальными CSCs. Этот тип клеток обладает наибольшей устойчивостью к терапии [93, 94]. CSCs периферической зоны опухоли обладают повышенным инвазивным потенциалом. Данные клетки продуцируют металлопротеиназы (MMP2, MMP9, ADAMT), которые способствуют миграции и инвазии клеток. CSCs периферийной зоны также называют пронеурональными CSCs [93, 94].

Стволовые клетки глиобластомы экспрессируют ряд маркеров, которые отличают их от остальных клеток опухоли. Среди них Sox2, Oct4, Nanog, Olig2, CD133, CD109, CD44, ALDH1A3 [94]. На данный момент не выявлен универсальный маркер CSCs глиобластомы,

однако обнаружены маркеры, которые характерны для определенных типов CSCs. Так, CSCs мезенхимального подтипа экспонируют на своей поверхности CD109, тогда как для пронеурональных стволовых клеток характерен маркер CD133 [95]. CSCs глиобластомы обладают пластичностью, то есть способностью трансформироваться в CSCs другого подтипа. В работе Minata и соавторов было показано, что при определенных условиях (например, под воздействием γ -излучения) возможно превращение пронеурональных CD133⁺/109⁻ CSCs в мезенхимальные CD109⁺/CD133⁻ CSCs, что, в конечном итоге, приводит к развитию более агрессивной GBM [95]. Указанные свойства CSCs глиобластомы способствуют формированию гетерогенности опухоли и ее высокой устойчивости к действию терапевтических агентов.

1.2.3. Наиболее распространенные молекулярно-генетические нарушения при GBM и ключевые маркеры глиобластомы

Мутации в генах IDH1/2 (isocitrate dehydrogenase (NADP⁺) 1/2). Данные мутации имеют большое прогностическое значение, в связи с чем выявление этих нарушений рекомендовано ВОЗ при постановке диагноза GBM. Семейство изоцитратдегидрогеназ включает два фермента – изоцитратдегидрогеназу 1 (IDH1) и изоцитратдегидрогеназу 2 (IDH2). Оба фермента катализируют превращение изоцитрата в α -кетоглутарат [88, 89]. Мутация в гене *IDH1* затрагивает кодон 132 и приводит к замене аргинина гистидином в аминокислотной последовательности белка (R132H). В гене *IDH2* мутации чаще всего локализуются в кодоне 172 [96]. Мутации в генах обоих ферментов затрагивают сайты распознавания субстратов и приводят к появлению у белков новых функций. В результате мутантные ферменты катализируют реакцию превращения α -кетоглутарата в онкометаболит D-2-гидроксиглутарат (2HG). 2HG ингибирует сразу несколько ферментов, управляющих структурой хроматина, в том числе деметилазы гистонов. Всё это вызывает избыточный уровень метилирования гистонов и ДНК и блокирует экспрессию генов-супрессоров опухолей [87, 88]. Мутации в генах *IDH1* и/или *IDH2* являются ранними событиями в развитии глиобластом. Как правило, они возникают уже на стадии глиом 2 и 3 степени. При LGG эти мутации встречаются в 65 – 90% случаев. У подавляющего большинства пациентов с первичными глиобластомами (возникающими de novo) эти мутации отсутствуют. Интересно, что мутации IDH ассоциированы с более пролонгированной выживаемостью пациентов с глиомами [88].

Повышенное метилирование промотора гена *MGMT* (*O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase) ассоциировано с более благоприятным прогнозом для больных GBM, проходящих курс лечения темозоломидом (TMZ). Часто выявляется у пациентов-носителей мутации IDH1/2 (в 60 – 80% случаев) [97]. TMZ способствует метилированию пуриновых оснований, в том числе с образованием Об-метилгуанина. Это нарушение структуры ДНК приводит к остановке клеточного цикла и в конечном итоге к гибели клетки. Являясь одним из компонентов системы репарации, фермент *MGMT* устраняет метильную группу, превращая Об-метилгуанин в гуанин, тем самым снижая терапевтический эффект TMZ. Метилирование промотора *MGMT* вызывает понижение уровня экспрессии гена и, следовательно, повышает чувствительность клеток GBM к TMZ [88].

Мутации в гене каталитической субъединицы теломеразы (*human telomerase reverse transcriptase, hTERT*). Выявлены мутации в промоторной области *hTERT* (–146 С > Т и –124 С > Т), усиливающие экспрессию гена. Данные мутации создают новые сайты связывания для транскрипционных факторов семейства ETS (E-twenty-six), что приводит к увеличению уровня транскрипции мРНК *hTERT* [98]. Опухоли с мутацией в промоторе *hTERT* демонстрируют повышенный уровень мРНК *hTERT* и повышенную теломеразную активность, которая ассоциирована с увеличением пролиферации раковых клеток [98]. Промоторные мутации в гене *hTERT* выявляются приблизительно у 80% пациентов с олигодендроглиомами, а также более, чем у 80% больных GBM, которые являются носителями IDH1/2 дикого типа. Значительно реже мутации в промоторе *TERT* встречаются у больных GBM с мутациями в генах IDH1/2 (в 26% случаев), а также при астроцитомах 2 и 3 степени (у 27,8 – 38,5% пациентов). Как правило, данные мутации ассоциированы с неблагоприятным прогнозом [97].

Мутации, затрагивающие ген опухолевого супрессора *PTEN*. *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) представляет собой фосфатазу, обладающую двойной специфичностью. Данный фермент способен дефосфорилировать как белки, так и субстраты липидной природы. Основным субстратом *PTEN* является фосфоинозитид-3,4,5-трифосфат (PIP3), который служит вторичным мессенджером при передаче проонкогенных сигналов с участием регуляторного пути PI3K/АКТ. Дефосфорилируя PIP3, *PTEN* служит антагонистом онкогенной киназы PI3K, которая активируется под действием внешних стимулов (факторов роста, гормонов) (Рис. 11А). Таким образом, дефосфорилируя PIP3, *PTEN* выполняет свои онкосупрессорные функции [99]. Указанные функции осуществляются в цитоплазме, вблизи внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Однако не менее важна роль *PTEN* в ядре клетки (Рис. 11Б). Моноубиквитинированный и фосфорилированный

Соматические мутации в гене *TP53* чаще всего затрагивают пятый экзон, который кодирует ДНК-связывающий домен белка p53 (**Рис. 12**). При этом выделяют шесть наиболее распространенных мутаций. Четыре из них (R175H, G245S, R249S, R282W) приводят к изменению конформации ДНК-связывающего домена (так называемые «конформационные» мутации), тогда как две (R248Q, R273H) нарушают ДНК-связывающие функции белка («контактные» мутации) [102, 103]. Все перечисленные выше мутации нарушают взаимодействие p53 со своими сайтами связывания. Это приводит к утрате данным белком онкосупрессорных функций, а в ряде случаев (например, в случае мутации R175H) способствует приобретению p53 свойств онкогена [103].

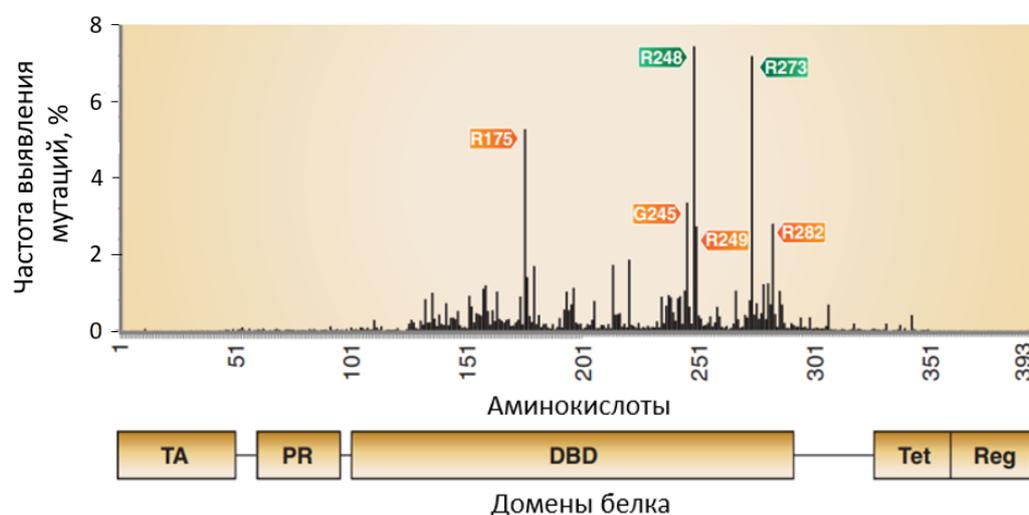


Рисунок 12. Частота выявления мутаций в гене *TP53* в спорадических раковых опухолях (N=24210). TA – транскрипционный домен; PR – домен, обогащенный пролином; DBD – ДНК-связывающий домен; Tet – домен, отвечающий за гомотетрамеризацию; Reg – регуляторный участок. Оранжевым обозначены «конформационные», зеленым – контактные мутации в гене *TP53* [102].

Мутации в гене *TP53* выявляются приблизительно у 28% пациентов с LGG и у 50 – 70% больных с GBM. Такие мутации ассоциированы с более агрессивным течением заболевания и резистентностью раковых клеток к терапии [89, 104].

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor), EGFR представляет собой рецепторную тирозинкиназу, активируемую ростовыми факторами (в том числе, EGF, HB-EGF, TGF- α) и передающую сигналы с помощью различных сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, RAS/MAPK, JAK/STAT (**Рис. 13**). Каскад реакций, запускаемый с участием данного рецептора, приводит к усилению пролиферации клеток, возрастанию их способности к миграции и инвазии [105].

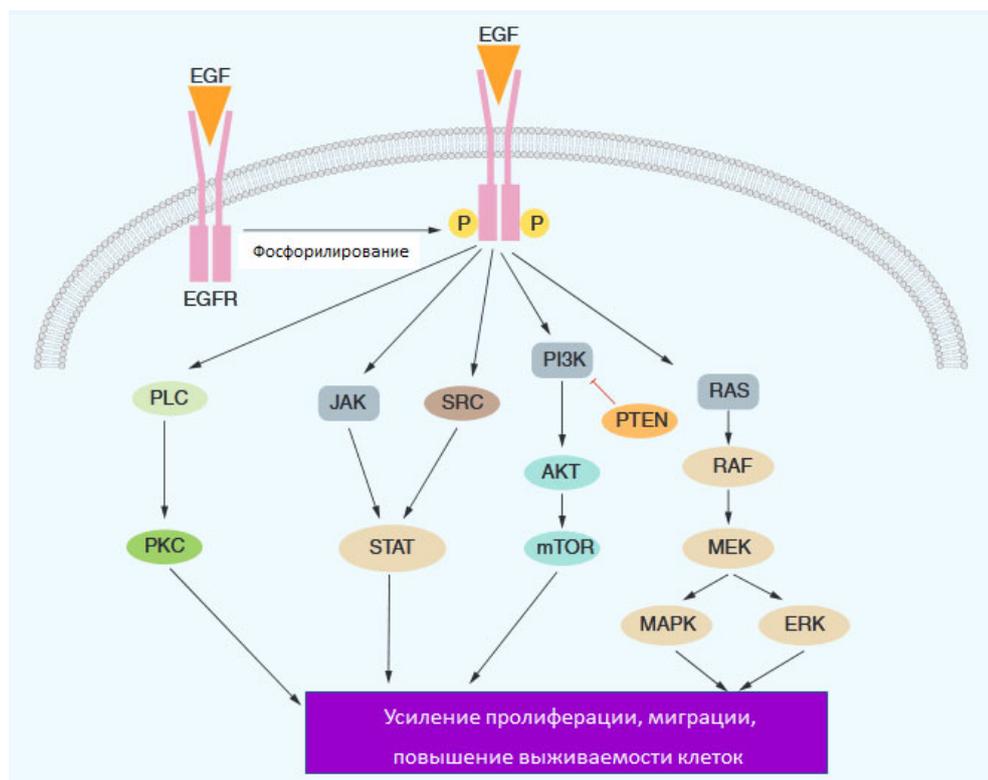


Рисунок 13. Некоторые сигнальные каскады, запускаемые с участием EGFR [105].

Существуют два механизма гиперстимуляции сигнального пути EGFR: лигандзависимый и лиганднезависимый (Рис. 14). В первом случае гиперпродукция рецептора происходит в результате амплификации гена *EGFR*. При такой сверхэкспрессии отмечается дозозависимое усиление биологического ответа клетки. Однако в ряде случаев повышенный уровень экспрессии EGFR наблюдается и в отсутствие амплификации гена рецептора. Лигандзависимый механизм также реализуется при увеличении уровня лигандов EGFR (например, TGF- α или HB-EGF) [89, 105]. Лиганднезависимый механизм связан с онкогенной делецией 2 – 7 экзонов гена *EGFR*. Данная мутация затрагивает 267 аминокислот внеклеточного участка рецептора и приводит к утрате фрагмента, ответственного за подавление аутоактивации EGFR. В результате образуется укороченная изоформа, названная EGFRvIII (Рис. 14), которая не способна связывать лиганды, однако обладает конститутивной активностью. Данная форма рецептора в отсутствие лиганда самопроизвольно формирует ферментативно активные димеры и запускает каскад онкогенных сигналов [105, 106].

Механизмы гиперстимуляции сигнального пути EGFR

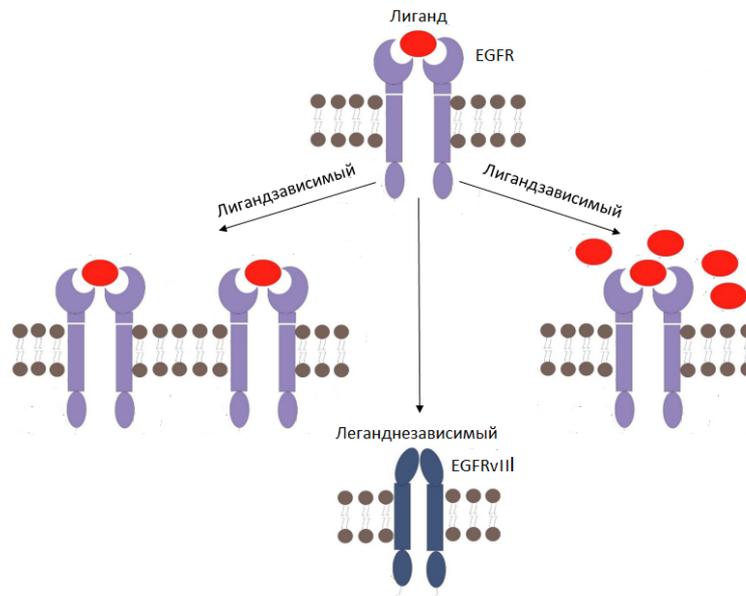


Рисунок 14. Механизмы гиперстимуляции сигнального пути EGFR. Лигандзависимый механизм: за счет амплификации или повышенного уровня экспрессии гена EGFR (слева), а также за счет повышения уровня лиганда (справа); лиганднезависимый механизм реализуется за счет экспрессии укороченной изоформы (EGFRvIII), обладающей конститутивной активностью (внизу).

Как уже отмечалось выше, мутация EGFRvIII является отличительной особенностью GBM классического подтипа [88]. Она выявляется у 25 – 50% пациентов с GBM. В целом, амплификация и/или сверхэкспрессия гена *EGFR* отмечается у 36 – 60% больных глиобластомой [96]. Интересно отметить, что амплификация *EGFR* крайне редко обнаруживается у носителей мутации IDH (лишь в 4% случаев) [97].

CD133 (проминин-1) является одним из поверхностных антигенов кластера дифференциации и в норме присутствует на поверхности нейрональных стволовых клеток. Также данный антиген служит одним из маркеров раковых стволовых клеток [107]. Есть данные, позволяющие предположить, что CD133 не только является одним из поверхностных маркеров CSCs, но и задействован в патогенезе заболевания. Так, в клетках со сверхэкспрессией CD133 наблюдался пониженный уровень белков-маркеров клеточной дифференцировки и усиление пролиферации [108]. В то же время нокдаун CD133 снижает скорость роста раковых клеток и препятствует формированию клеточных колоний.

CD44 представляет собой мембранный гликопротеин. Связываясь с различными внеклеточными лигандами (в основном с гиалуроновой кислотой), данный белок обеспечивает подвижность клеток. В центральной нервной системе CD44 участвует в развитии нейронов.

Также данный белок играет важную роль в патогенезе GBM. Являясь рецептором гиалуроновой кислоты (ГК), CD44 обеспечивает опосредованное ГК взаимодействие клеток GBM с компонентами внеклеточного матрикса (хондроитинсульфатом, фибронектином, ламинином), усиливая инвазию раковых клеток. В опухолях с мезенхимальным фенотипом уровень CD44 выше, чем в клетках, обладающих пронеурональным или классическим фенотипом. Повышенный уровень данного маркера ассоциирован с более неблагоприятным прогнозом [109].

OCT4 или POU5F1 (POU class 5 homeobox 1) относится к семейству ДНК-связывающих белков, содержащих POU-домен. Данный белок является транскрипционным фактором, который в составе гетеродимера с **SOX2 (SRY-box transcription factor 2)** активирует гены, участвующие в поддержании плюрипотентности. Указанные факторы экспрессируются на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках. OCT4 и SOX2 также относятся к числу факторов, необходимых для образования индуцированных стволовых клеток. Связываясь с конденсированным хроматином, указанные белки способствуют его переходу в активное состояние, тем самым облегчая другим активаторам транскрипции взаимодействие с промоторами генов-мишеней [110]. При глиобластоме OCT4 и SOX2 являются маркерами раковых стволовых клеток. При этом уровень данных факторов коррелирует со степенью агрессивности опухоли [93].

1.2.4. Роль длинных некодирующих РНК в патогенезе GBM

В данном разделе приведены примеры днРНК, выполняющих онкогенные и онкосупрессорные функции при GBM. Более полный перечень длинных некодирующих транскриптов, исследованных при глиомах, приведен в **Табл. 1**.

H19 (H19 imprinted maternally expressed transcript) Данная днРНК размером 2,3 т. п. о. кодируется импринтным геном, который локализован в области p15.5 хромосомы 11 и транскрибируется только с материнской хромосомы [111]. H19 участвует в установлении и поддержании геномного импринтинга [112]. Данный транскрипт экспрессируется на высоком уровне практически во всех тканях эмбриона, однако после рождения его содержание резко снижается в большинстве органов. H19 служит предшественником миРНК miR-675, мишенью которой является мРНК неклассического кадгерина CDH13, белка с противоопухолевыми свойствами [38, 46, 113]. Помимо этого, H19 играет роль «ловушки» в отношении миРНК let-7, выполняющей онкосупрессорные функции при глиомах [114]. При глиомах повышенный

уровень H19 коррелирует с прогрессией заболевания, а также с более высокой инвазивностью и миграцией клеток [113]. Повышенная экспрессия этой днРНК отмечается в CD133-позитивных клетках глиобластомы, а снижение уровня H19 сопровождается уменьшением содержания в клетках маркеров стволовых клеток (CD133, NANOG, OCT-4 и SOX2) [115]. Это может свидетельствовать о том, что данная днРНК участвует в поддержании плюрипотентности раковых стволовых клеток. Кроме того, тот факт, что уровень H19 регулируется фактором Hif-1 α (транскрипционный фактор, ассоциированный с гипоксией), может свидетельствовать в пользу того, что эта днРНК способствует выживаемости и прогрессии опухоли в условиях гипоксии [116].

GAS5 (Grow Arrest-Specific 5) Ген *GAS5*, локализованный на хромосоме 1 в области q25.1, частично перекрывается с 5'-концевой последовательностью гена *ZBTB37*, который транскрибируется в противоположном направлении. Установлена роль этого транскрипта в регуляции клеточного роста и апоптоза. Многочисленные опыты *in vitro* показывают, что при глиомах днРНК *GAS5* выполняет онкосупрессорные функции. Например, Zhao и соавт. в 2015 г. обнаружили, что *GAS5* ингибирует рост клеток линий U87 и U251 благодаря связыванию онкогенной miR-222 [117]. Кроме того, есть данные о том, что сверхэкспрессия *GAS5* повышает чувствительность клеток U87 к цисплатину [118]. Клинические исследования также демонстрируют, что повышенный уровень *GAS5* коррелирует с более благоприятным прогнозом как при LGG, так и при GBM [119, 120].

HOTTIP (HOXA Distal Transcript Antisense RNA). Эта полиаденилированная днРНК размером 3764 нк включает три экзона гена *HOTTIP* и транскрибируется в противоположном направлении по отношению к генам *HOXA*-кластера, расположенного на хромосоме 7. *НОТТИР* относится к днРНК, участвующим в эмбриональном развитии, регулируя *in cis* экспрессию ряда гомеозисных генов кластера *HOXA* [121]. Данные литературы противоречивы и не позволяют сделать однозначный вывод о роли днРНК *НОТТИР* в патогенезе злокачественных глиальных опухолей. В 2016 г было показано, что уровень этой днРНК понижен в образцах ткани глиомы по сравнению со здоровой тканью головного мозга, а также в культурах клеток U87, U118, U251 и A172 по сравнению с иммортализованными астроцитами [122]. Более того, сверхэкспрессия *НОТТИР* в линиях U87 и U118 ингибирует клеточную пролиферацию и способствует апоптозу. В то же время, в 2017 г. Zhang с соавт. продемонстрировали, что *НОТТИР* способствует пронеурально-мезенхимальному переходу клеток глиомы в условиях гипоксии. *НОТТИР* конкурирует с мРНК *ZEB1* за связывание с

регуляторной миРНК – miR-101. ZEB1, в свою очередь, является ключевым транскрипционным фактором при мезенхимальном переходе [123].

Таблица 1. Роль днРНК в патогенезе GBM

Название	Тип днРНК	Молекулярный механизм действия	Ссылки
Онкогенные днРНК			
H19	межгенная	Предшественник miR-675; кэРНК для миРНК Let-7.	[113, 114]
HOTAIR	антисмысловая	Ремонтирует хроматин-ремоделлирующие комплексы PRC2 и CoREST; является кэРНК для ряда миРНК (пример - miR-326).	[124, 125]
HOTAIRM1	антисмысловая	КэРНК для miR-129-5p and miR-493-3p.	[126]
CRNDE	дивергентная	Ремонтирует хроматин-ремоделлирующие комплексы PRC2 и CoREST; кэРНК для многих миРНК, например, miR-186.	[127, 128]
XIST	межгенная	кэРНК для многих миРНК, например, miR-152.	[129]
NEAT1	межгенная	кэРНК для многих миРНК (например, miR-107); привлекает EZH2 к промоторам генов <i>AXIN2</i> , <i>ICAT</i> и <i>GSK3B</i> .	[130, 131]
PVT1	межгенная	КэРНК для ряда миРНК (пример - miR-128-3p); взаимодействует с EZH2.	[132, 133]
Онкосупрессорные днРНК			
CASC2	дивергентная	кэРНК для miR-21	[134]
GAS5	дивергентная	кэРНК для miR-222	[117]
lncPTENP1-S	днРНК псевдогена	кэРНК для множества миРНК, регулирующих экспрессию гена <i>PTEN</i> .	[8, 11–13]
днРНК, обладающие двойственным эффектом на клетки глиом			
lincRoR	межгенная	кэРНК для miR-145.	[82, 83]
MEG3	межгенная	Способствует стабилизации p53; выступает в роли «ловушки» miR-19a.	[135, 136]
NEAT2/MALAT1	межгенная	кэРНК для многих миРНК (пример - miR-384).	[137]
HOTTIP	антисмысловая	кэРНК для miR-101.	[123]

1.3. Молекулярно-генетические аспекты карциномы эндометрия и предраковых заболеваний эндометрия

По сравнению с глиобластомой карцинома эндометрия (КЭ) характеризуется меньшей злокачественностью. Общая выживаемость пациенток, у которых данное заболевание выявляется на первой стадии, составляет 80 – 90%, на четвертой – более 20% [6]. В то же время КЭ является достаточно распространенным заболеванием, которое ежегодно выявляется у 1 – 2,5% женщин в Европе и США. При этом в 80% случаев КЭ выявляется в период менопаузы [6]. В данном разделе будут кратко описаны клинические и молекулярно-генетические особенности КЭ и заболеваний-прекурсоров (гиперплазии и полипов эндометрия), а также описана роль некоторых днРНК в развитии указанных патологий.

Эндометрий представляет собой внутренний слой, выстилающий полость матки и состоящий из эпителия (как поверхностного, так и выстилающего полость желез), желез, стромы (представлена клетками соединительной ткани), а также микрокапилляров. Карцинома эндометрия (КЭ) развивается в результате малигнизации эпителиальных клеток эндометрия [138]. Во многих случаях КЭ предшествуют заболевания-прекурсоры (**Рис. 15**), к которым относятся гиперплазия и полипы эндометрия.

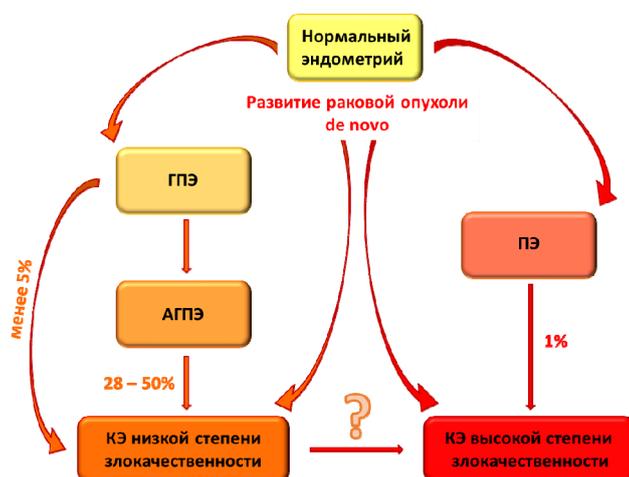


Рисунок 15. Схема, отражающая современные представления о развитии КЭ из заболеваний-прекурсоров

1.3.1. Гиперплазия эндометрия (ГПЭ)

Гиперплазия эндометрия (ГПЭ) - гормонзависимое новообразование, в основе которого лежит излишняя пролиферация ткани эндометрия (в основном, эндометриальных желез) в ответ на избыточную стимуляцию экзогенными или эндогенными эстрогенами (которые являются главными триггерами пролиферации эндометрия [138]). Согласно новой

классификации ВОЗ, утвержденной в 2020 г., различают ГПЭ без признаков атипии и атипическую гиперплазию эндометрия (АГПЭ). К признакам атипии относят повышенное соотношение железы/stroma (более 1), атипию клеточных ядер, а также утрату ряда белков (например, PAX2, PTEN, белки системы репарации), которую рекомендуется выявлять иммуногистохимическим методом [139]. ГПЭ без признаков атипии является доброкачественным новообразованием. Риск злокачественной трансформации такой опухоли в течение 20 лет составляет менее 5% (**Рис. 15**). В то же время при АГПЭ у 28 – 50% больных на протяжении 20 лет развивается карцинома эндометрия [140]. Таким образом, своевременное выявление признаков атипии является крайне важной задачей и определяет как прогноз, так и выбор методов лечения.

Постановка диагноза на основании данных гистологического анализа может быть затруднена вследствие применения пациенткой гормональных препаратов, которые влияют на цитологические характеристики эндометрия [139]. В связи с этим, в 2020 г. ВОЗ была рекомендована панель молекулярных тестов с использованием антител к определенным белкам, которые позволяют выявить нарушения, характерные для АГПЭ. К таким молекулярным маркерам относятся утрата белков PAX2, PTEN, MLH1, ARID1A, а также ядерная локализация β -катенина [139]. Эти маркеры позволяют повысить точность постановки диагноза «атипическая гиперплазия эндометрия», поскольку при данном заболевании в 92,8% случаев выявляется, по крайней мере, одно из указанных нарушений. Недостатком перечисленных маркеров является то, что некоторые из этих нарушений могут присутствовать в нормальном, морфологически неизменном эндометрии. Так, утрата белка PAX2 выявлялась в 16,5%, а PTEN – в 32,9% образцов нормального эндометрия [139]. Таким образом, поиск новых маркеров озлокачествления ткани эндометрия по-прежнему остается актуальной задачей.

1.3.2. Полипы эндометрия (ПЭ)

Полип эндометрия – патологическое образование, выступающее над поверхностью эндометрия в полость матки и включающее эндометриальные железы, строму и кровеносные капилляры. Как правило, ПЭ – доброкачественное заболевание, которое во многих случаях протекает бессимптомно. В то же время ПЭ могут служить одной из причин аномального маточного кровотечения (в 50% случаев) и женского бесплодия (35% случаев) [141].

Раковой трансформации подвержена незначительная доля ПЭ (чуть более 1%). Однако частота малигнизации увеличивается с возрастом пациенток. Опасность ПЭ также заключается в том, что их малигнизация может приводить к развитию карциномы эндометрия высокой степени злокачественности (в отличие от АГПЭ, которая, как правило, является прекурсором низкоккачественного рака эндометрия) [142]. Выявление очагов атипии в ПЭ бывает затруднено, поскольку даже в доброкачественных полипах может наблюдаться скопление желез (что является одним из критериев АГПЭ). В подобных сомнительных случаях ВОЗ рекомендует проведение анализа на молекулярные маркеры, упомянутые в разделе 1.3.1 [139].

Молекулярные основы патогенеза ПЭ до конца не исследованы. *Dal Cin* с коллегами в 1995 г. обнаружили в 57% образцов ПЭ хромосомные перестройки, затрагивающие участки 6p21-22, 12q13-15 и 7q22 [143]. Также известно, что риск развития полипов возрастает при наличии в полости матки очага хронического воспаления. В ПЭ повышен уровень циклооксигеназы-2, ключевого фермента, отвечающего за синтез простагландинов в тучных клетках. При этом содержание тучных клеток в ПЭ в 7 раз выше, чем в нормальном эндометрии [141]. Однако механизм, лежащий в основе взаимосвязи воспаления и развития ПЭ, на данный момент не установлен.

1.3.3. Карцинома эндометрия (КЭ)

1.3.3.1. Классификации КЭ в зависимости от стадии заболевания и степени злокачественности опухоли.

Существует несколько классификаций КЭ. Так, Международная федерация акушеров и гинекологов (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) предлагает клиническую классификацию КЭ. Согласно этой классификации, КЭ разделяют на несколько стадий в зависимости от объема поражения различных органов. На стадии I опухоль ограничена телом матки. Может наблюдаться прорастание в подлежащий мышечный слой (миометрий), но серозная оболочка не затронута. На II стадии опухоль распространяется на шейку матки. Для III стадии характерно распространение опухоли за пределы матки и поражение органов малого таза. Могут наблюдаться метастазы в региональные лимфоузлы. На стадии IV опухоль распространяется за пределы малого таза, выявляются отдаленные метастазы. Прогноз в плане выживаемости ухудшается по мере увеличения стадии заболевания [6].

Помимо клинической классификации по стадиям заболевания, FIGO предлагает классификацию КЭ в зависимости от злокачественности опухоли. В основе этой классификации лежит степень дифференцированности опухолевых клеток. К КЭ grade 1 относятся высокодифференцированные опухоли, клетки которых морфологически сходны с клетками нормального эндометрия; grade 2 - умереннодифференцированные; grade 3 – низкодифференцированные опухоли [6]. Согласно рекомендации ВОЗ от 2020 г., опухоли grade 1 и grade 2 объединяют в группу «КЭ низкой степени злокачественности» (low grade endometrial cancer, LGEC), а опухоли grade 3 относятся к группе «КЭ высокой степени злокачественности» (high grade endometrial cancer, HGEC). Для последней группы характерна высокая скорость прогрессии заболевания и неблагоприятный прогноз [144].

1.3.3.2. Молекулярно-генетическая классификация и наиболее распространенные молекулярные нарушения при КЭ

За последние годы накоплены данные о том, что опухоли, относящиеся к одному и тому же типу, могут характеризоваться различным клиническим течением. Причиной подобных различий являются молекулярно-генетические особенности, выявленные благодаря секвенированию опухолевых геномов. На основании анализа данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) Kandoth с соавт., а также Soslow в 2013 году предложили молекулярно-генетическую классификацию РЭ, которая в 2020 г. была одобрена ВОЗ. Согласно этой классификации, выделяют 4 подтипа КЭ: *POLEmut*, *MMRd*, *NSMP* и *p53abn* (Табл. 2) [144, 145]. При КЭ подтипа ***POLEmut*** выявляются мутации в гене *POLE* (DNA polymerase epsilon, catalytic subunit). Поскольку ДНК-полимераза эпсилон, кодируемая этим геном, участвует в репарации повреждений ДНК, для КЭ данного подтипа характерен крайне высокий уровень соматических мутаций (в частности, в генах *PTEN*, *FBXW7*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*), что, как ни странно, коррелирует с благоприятным прогнозом даже в случае КЭ grade 3. При подтипе ***MMRd (Mismatch Repair deficiency)*** также отмечается высокий уровень соматических мутаций, что связано с утратой или нарушением функций одного или нескольких белков системы репарации. Данный подтип также ассоциирован с благоприятным прогнозом. К подтипу ***NSMP (No Specific Molecular Profile)*** относят генетически стабильные опухоли, клетки которых содержат повышенный уровень рецепторов эстрогенов. В данном случае прогноз менее благоприятный по сравнению с первыми двумя подтипами. Четвертый подтип, ***p53abn***, выявляется лишь у 15% больных КЭ, однако на его долю приходится до 70% смертельных исходов. К этой группе относят КЭ высокой степени злокачественности, при

которых детектируются мутации в гене *TP53*. Помимо мутаций в гене *TP53*, при данном типе КЭ часто выявляются геномные перестройки, затрагивающие различные участки хромосом [144, 145].

Таблица 2. Характеристика различных молекулярно-генетических подтипов КЭ [144, 145].

Клинико-патологические и молекулярные характеристики	Молекулярные подтипы КЭ			
	POLEmut	MMRd	NSMP	p53abn
Уровень соматических мутаций	Крайне высокий	Высокий	Низкий	Низкий
Частота выявления мутаций в генах	<i>POLE</i> (100%), <i>PTEN</i> (94%), <i>FBXW7</i> (82%), <i>ARID1A</i> (76%), <i>PIK3CA</i> (71%), <i>PIK3R1</i> (65%), <i>KRAS</i> (53%)	<i>PTEN</i> (88%), <i>PIK3CA</i> (54%), <i>PIK3R1</i> (40%), <i>ARID1A</i> (37%)	<i>PTEN</i> (77%), <i>PIK3CA</i> (53%), <i>CTNNB1</i> (52%), <i>ARID1A</i> (42%)	<i>TP53</i> (92%), <i>PIK3CA</i> (47%)
Наличие метилирования гена <i>MLH1</i>	Есть или нет	Есть	Нет	Нет
Степень злокачественности	Разная	Разная	Разная	HGEC
Прогноз	Благоприятный	Благоприятный	Умеренно неблагоприятный	Неблагоприятный

Наряду с анализом мутаций, ассоциированных с развитием КЭ, в последние годы большое внимание уделяется выявлению участков генома, дифференциально метилированных при этом заболевании. Гиперметилирование при КЭ может затрагивать ген системы репарации *MLH1*, а также промоторы генов-опухолевых супрессоров (например, *RASSF1A*, *APC*), генов, вовлеченных в адгезию (*SVEP1*) и дифференцировку клеток (*FGF12*, *TNFSF11*, *ASCL1*) [146–148]. Дифференциальное метилирование было также обнаружено в некодирующих участках генома: энхансерных элементах, генах миРНК, а также в генах днРНК. Так, Zhang и соавторы выявили более 600 генов днРНК, которые подвергались гиперметилированию при КЭ. Среди них – ген онкосупрессорной днРНК MEG3. При этом гиперметилирование сопровождалось снижением уровня этого некодирующего транскрипта [147].

1.3.3.3. Роль днРНК в патогенезе КЭ

Установлена важная роль днРНК как в функционировании нормального эндометрия, так и в патогенезе КЭ. В физиологических условиях эндометрий подвергается циклическим изменениям, обусловленным действием стероидных гормонов – эстрогена и прогестерона. Так, в фазу пролиферации под действием эстрогена происходит рост и пролиферация клеток эндометрия. В последующую фазу секреции под влиянием прогестерона происходит остановка пролиферации ткани и стимулируется дифференцировка клеток эпителия и стромы. В эту фазу эндометрий приобретает свойства «рецептивности», то есть готовности к имплантации эмбриона. Выявлены днРНК, которые дифференциально экспрессируются в определенные фазы цикла эндометрия. Так, уровни днРНК H19, NOXA11-AS и NEAT1 возрастают под действием эстрогена. Эти некодирующие транскрипты способствуют пролиферации клеток эндометрия. Их уровень также повышен при КЭ по сравнению с нормальной тканью. Таким образом, эти днРНК играют онкогенную роль при данном заболевании [138]. К длинным некодирующим РНК, чей уровень подвержен циклическим изменениям в нормальном эндометрии, можно также отнести lncPTENP1-S. Интересно отметить, что в нормальном эндометрии уровень этого транскрипта минимален в пролиферативную фазу эндометриального цикла и достигает максимума в позднюю секреторную фазу. В эту фазу наблюдается прекращение как пролиферации, так и дифференцировки клеток эндометрия, которые затем подвергаются апоптозу. Эти наблюдения позволяют предположить, что в нормальном эндометрии lncPTENP1-S выполняет антипролиферативные и проапоптотические функции [138]. Онкосупрессорная роль данного транскрипта при КЭ обсуждалась ранее (см пункт 1.1.7. данной главы).

Помимо указанных выше длинных некодирующих транскриптов, выявлены и другие днРНК, задействованные в патогенезе КЭ (Табл. 3) [149]. При этом некоторые днРНК влияют не только на сами раковые клетки, но и на микроокружение опухоли. Так, TDRG1 и TUG1, стимулируя один из факторов роста эндотелия (VEGF-A), способствуют росту капилляров и усилению кровоснабжения опухолевой ткани.

Таблица 3. Роль днРНК в патогенезе КЭ [149].

днРНК	Уровень экспрессии при КЭ	Функции	Механизм
GAS5	снижен	онкосупрессор	Повышает уровень мРНК PTEN, взаимодействуя с miR103.
MEG3	снижен	онкосупрессор	Взаимодействует с белком P13K, снижая его активность.

FER1L4	снижен	онкосупрессор	Повышает уровень PTEN (точный механизм не известен).
LINC00672	снижен	онкосупрессор	Кофактор супрессии генов, опосредованной p53 (конкретный механизм не известен).
CCAT2	повышен	онкоген	Активирует сигнальный путь PI3K/AKT за счет снижения уровня miR-216b.
BANCR	повышен	онкоген	Активирует сигнальный путь MEK/ERK (точный механизм не известен).
MALAT1	повышен	онкоген	Понижает уровень miR-200c.
UCA1	повышен	онкоген	Механизм не известен.
TDRG1	повышен	онкоген	Связывается напрямую с белком VEGF-A, повышая его активность.
TUG1	повышен	онкоген	Повышает уровень VEGF-A, благодаря связыванию с miR-34a и miR-299.
PCGEM1	повышен	онкоген	Активирует сигнальный путь STAT3 за счет уменьшения уровня miR-129.
Linc-RoR	повышен	онкоген	КэРНК для miR-145, повышает уровень Oct-4, Sox2 и Nanog.

Таким образом, на данный момент выявлено множество днРНК, выполняющих онкогенную или онкосупрессорную функции при КЭ. Однако во многих случаях механизм действия и пути регуляции экспрессии этих транскриптов остается невыясненным. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут расширить представления о механизмах развития КЭ, а также увеличить спектр молекулярных маркеров и потенциальных мишеней для терапии данного заболевания.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы

2.1.1. Материалы, полученные от пациентов

2.1.1.1. Образцы тканей эндометрия

В работе были использованы образцы тканей эндометрия 236 пациенток Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина, Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, а также московских клинических больниц № 4 и 55. Из них 69 образцов – ткань нормального эндометрия; 64 образца – гиперплазия эндометрия; 45 образцов – полипы эндометрия и 58 образцов – карцинома эндометрия. В исследовании использовался как свежий операционный или биопсийный материал, так и образцы ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафиновые блоки. Помимо этого, у 20 пациенток с КЭ были взяты образцы периферической венозной крови. Для предотвращения коагуляции крови в процессе транспортировки в пробирку с 1 мл крови добавлялся 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9.

2.1.1.2. Образцы тканей глиом

Образцы опухолевых тканей глиом были взяты во время операции у 11 пациентов Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Н.Н. Бурденко. Характеристики образцов приведены в **Табл. 4**.

Таблица 4. Характеристика клинических образцов GBM, использованных в работе.

№ образца	Диагноз	Степень злокачественности по ВОЗ	Мутации IDH1/2	Метилирование MGMT
006	Глиобластома	Grade 4	WT	-
007	Анапластическая астроцитома	Grade 3	WT	-
010	Глиобластома	Grade 4	WT	-
011	Глиобластома	Grade 4	WT	-
012	Анапластическая астроцитома	Grade 3	WT	-
015	Анапластическая олигодендроглиома	Grade 3	MUT	+

019	Глиобластома	Grade 4	WT	-
022	Глиобластома	Grade 4	WT	-
051	Глиобластома	Grade 4	WT	-
079	Глиобластома	Grade 4	WT	-
267	Глиобластома	Grade 4	WT	-

WT – отсутствие мутации; MUT – наличие мутации

2.1.2. Коммерчески доступные штаммы прокариот и линии эукариот

2.1.2.1. Клеточные линии человека

Нами было использовано 16 перевиваемых клеточных линий из коллекции ИБХ РАН, в том числе: эпителиальные кератиноциты (HaCaT), клетки эмбриональной почки (HEK-293, Phoenix-GP), эмбрионального легкого (MRC-5), линии клеток аденокарциномы поджелудочной железы (AsPC-1, COLO-357, T3M4, VxPC-3), аденокарциномы молочной железы (MCF-7, BT-474, HBL-100, and SKBR-3), аденокарциномы шейки матки (HeLa), аденокарциномы яичника (SKOV-3), карциномы печени (HepG2) и глиобластомы (U87MG).

2.1.2.2. Штаммы бактерий

Использовался штамм компетентных клеток *E. coli* STBL-3 (ThermoFisher).

2.1.3. Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование: ламинарный культуральный бокс Logic+ (Labconco); автоматический CO₂ инкубатор (Heraeus); флуоресцентный микроскоп DIAPHOT 300 (Nikon); счетчик клеток Countess II (Thermo Fisher); центрифуги MicroCL 21R (Thermo Scientific) и SL 16R (Thermo Scientific); шейкеры Lab-Line ORBIT Environ Shaker (Labsystems automix) и Orbit environ-shaker (LAB-Line instruments); планшетный анализатор Fusion α -FP HT Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer); цитометр NovoCyte (ACEA biosciences); клеточный сортер FACS Aria III (BD Biosciences); термостаты Термит (ДНК-технология) и Innova 42 (New Brunswick scientific); спектрофотометр Nano Drop One^c (Thermo Scientific); ПЦР-амплификатор Pro Flex PCR System (ThermoFisher); амплификатор для ПЦР в реальном времени LightCyclerB 96 (Roche); камера для электрофореза в агарозном геле Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200 (Pharmacia); трансиллюминатор 2011 MACROVUE

(LKB); гель-документирующая система ImageQuant LAS 500 (Cytiva), pH-метр Five Easy (METTLER TOLEDO); прибор для очистки воды Milli-Q Standart System (Millipore); микротом ручной HM 325 (Thermo Scientific); автоматические пипетки Gilson и Eppendorf; секвенатор ДНК нового поколения Illumina HiSeq 2500 system (Illumina).

2.1.4. Расходные материалы

2.1.4.1. Лабораторный пластик

Использовались пластиковые пробирки типа Falcon на 15 и 50 мл (Corning), пластиковые микроцентрифужные пробирки на 1,5 и 2 мл типа Eppendorf (Axugen), пробирки на 1,8 мл для криохранения образцов (SPL Life Sciences), микропробирки для ПЦР на 0,2 и 0,5 мл (Axugen), планшеты для ПЦР в реальном времени (Roshe), одноразовые серологические пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл (Corning), пластиковые наконечники для автоматических пипеток на 10, 200, 1000 и 5000 мкл (OmniTip), пластиковые планшеты для клеточных культур на 12 и 96 лунок (Corning), планшеты с дном из покровного стекла Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nunc), 25 см² и 75 см² матрасы для клеточных культур (Corning), фильтры-воронки на 500 мл с диаметром пор 0,22 мкм (Corning), клеточные фильтры с диаметром пор 40, 70 и 100 мкм (Becton Dickinson), стерилизационные насадки на шприц с диаметром пор 0,2 и 0,45 мкм (Corning), слайды для измерения количества клеток (Thermo Fisher Scientific), петли (Nuova Aptaca,) и шпатели (SPL Life Sciences) микробиологические, чашки Петри (Медполимер), перчатки резиновые (NitriMAX).

2.1.4.2. Коммерческие наборы и смеси реагентов

В работе были использованы следующие наборы и смеси реагентов: для выделения плазмидной ДНК – ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research); для выделения геномной ДНК – DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen); для бисульфитной конверсии ДНК – EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen); для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля – QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen); для очистки фрагментов ДНК от низкомолекулярных соединений – DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research); для выделения РНК – RNeasy mini kit (Qiagen), маркеры молекулярного веса (Evrogen); для ПЦР-амплификации длинных фрагментов ДНК – Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific); для синтеза кДНК – cDNA Synthesis Master Mix (ThermoFisher); для ПЦР – ScreenMix-HS reagent (Evrogen); для ПЦР в реальном

времени – qPCRmix-HS SYBR reagent (Evrogen); для детектирования апоптотических клеток – Annexin Apoptosis Detection Kit with PI (Bio Legend); для РНК-секвенирования – TruSeq Stranded mRNA-Seq Library Preparation Kit (Illumina); для выделения РНК – QIAzol Lysis Reagent (Qiagen).

2.1.4.3. Плазмидные векторы

Были использованы векторы: GFP1-9P2AMCP-GFP10P2APCP-GFP11 (Addgene, #162037); pBabe-lincRNA-RoR (Addgene, #45763); pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro (System Biosciences, #CD532A-2); Pcr4-12×MBS-PBS (Addgene, #52984); pdCAS9-MQ1 (Addgene, #89633); pKAN-T (Evrogen, #TA003); pLKO.1-puro (Addgene, #8453); pMD2.G (Addgene, #12259); psPAX2 (Addgene, #12260); pPlatTET-gRNA2 (Addgene, #82559).

Также в настоящей работе были получены следующие конструкции: pCDH-PTEN, pCDH-RoR, pCDH-RoR-12×MBS-PBS, pLKO.1-shRoR, pKAN-T-gRNA-PTENP1, pPlatTET-gRNA-PTENP1.

2.1.4.4. Ферменты

Аккутаза StemPro (ThermoFisher); раствор Trypsin-Versene (Thermo Fisher); рестриктазы AgeI (New England Biolabs), BamHI, EcoRI, HinfI, NcoI, NheI, NotI, SfiI (Fermentas) и соответствующие коммерческие буферные растворы; T4-ДНК-лигаза (Thermo Scientific) с буферным раствором, щелочная фосфатаза FastAP (Thermo Scientific), ДНК-метилтрансфераза SssI (Сибэнзим) с соответствующим буферным раствором, протеиназа К (Синтол), ДНКаза (Qiagen).

2.1.4.5. Антитела

Anti-CD133/2-APC (Miltenyi Biotec); anti-N-cadherin-APC (Miltenyi Biotec).

2.1.4.6. Антибиотики

Смесь пенициллин/стрептомицин (ThermoFisher), ампициллин (Sigma Aldrich), канамицин (Sigma Aldrich), пурамицин (Sigma Aldrich).

2.1.4.7. Ростовые факторы

Основной фактор роста фибробластов, bFGF (Sigma); эпидермальный фактор роста, EGF (Sigma); MACS NeuroBrew-21 (Miltenyi Biotec).

2.1.4.8. Основные химические реактивы

Агар (Диаэм), агароза (Sigma), 5-азациитидин (Serva), 5-аза-2'-деоксицитидин (Sigma-Aldrich), бромфеноловый синий (Merck), бромид этидия (AppliChem), гликоген (Thermo Scientific), глицерин (Sigma), глюкоза (Helicon), L-глутамин (ПанЭко), 8-гидроксихиолин (Sigma Aldrich), гуанидинхлорид (Sigma Aldrich), дрожжевой экстракт (Helicon), изопропанол (Химмед), ингибитор РНКаз Ribo Lock (Thermo Scientific), ксилен (Химмед), ламинин (Sigma), кислота уксусная ледяная (Химмед), ксиленцианол (Химмед), липофектамин LTX (ThermoFisher), натрия бикарбонат (Sigma Aldrich), натрия пируват (Sigma Aldrich), натрия цитрат (Fluka), β-меркаптоэтанол (Merck), реагент AlamarBlue (ThermoFisher), реагент МТТ (Sigma), реагент Plus (ThermoFisher), параформальдегид (Serva), полибрен (EMD Millipore), пропанол-2 (Химмед), саркозил (BioReagents), триптон (Fluka), трипановый синий (AppliChem), фенол (Экросхим), хлороформ (Химмед), цисплатин (Sigma), этанол (Эко Лаб), CaCl₂ x 2H₂O (Sigma), DMSO (Merck), EDTA (Molekula), Fluoroshield with DAPI (Sigma), H₃BO₄ (Реахим), HCl (Химмед), NaOH (Химмед), Na₂HPO₄ (Химмед), NaCl (Helicon), KН₂PO₄ (Helicon), KCl (Helicon), MgCl₂ x 6H₂O (Helicon), MgSO₄ x 6H₂O (Реахим), MnCl₂ x 4H₂O (Merck), PIPES (AppliChem), SDS (Applichem), Tris-base (Promega), TritonX-100 (Merck).

2.1.4.9. Буферные растворы и прочие растворы реагентов

- 1) PBS: 8,06 мМ Na₂HPO₄, 1,47 мМ KН₂PO₄ (pH 7,4), 137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl;
- 2) TBE: 45 мМ Tris-HCl, 45 мМ H₃BO₄, 0,034% EDTA-Na;
- 3) Буфер для фиксации клеток: 4% параформальдегид в PBS (pH 7,2);
- 4) Пермеабилизирующий буфер: 0,25% TritonX-100 в PBS;
- 5) Раствор фенола для экстракции ДНК: фенол, содержащий 0,1% 8-гидроксихиолина, 0,2% β-меркаптоэтанола и насыщенный раствором 1М Tris-HCl (pH 8,0);

6) Лизирующий раствор 1 (для выделения ДНК из свежих образцов ткани): 4 М гуанидинхлорид, 25 мМ цитрат натрия, 0,1 М β -меркаптоэтанол и 0,5% саркозил.

7) Лизирующий раствор 2 (для выделения ДНК из парафиновых блоков): 10 мМ TrisHCl (pH 8,0), 100 мМ ЭДТА (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 0,5% SDS, 200 мкг/мкл протеиназы К.

8) Буфер для нанесения образца на агарозный гель (6x): 10% бромфеноловый синий, 10% ксиленцианол, 30% глицерин в TBE.

9) Буфер для трансформации: 55 мМ $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 15 мМ $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 250 мМ KCl, 10 мМ PIPES (pH 6,7). Приготовленный буфер стерилизовался путем фильтрования через фильтр-воронку 45 мм.

2.1.4.10. Микробиологические среды

1) Среда LB (на 1 л среды): 10 г NaCl (0,2 М раствор), 10 г триптона (1%), 5 г дрожжевого экстракта (0,5%), воды “Milli-Q” – до 1 л. В случае необходимости в среду вносили соответствующие антибиотики.

2) Агаризованная среда LB: 1,5% раствор агара в среде LB с добавкой различных антибиотиков.

3) Среда SOB (состав на 1 л среды): 20 г триптона (2%), 5 г дрожжевого экстракта (0,5%), 0,5 г NaCl (10 мМ раствор), 0,186 г KCl (2,5 мМ раствор), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $MgSO_4$, воды “Milli-Q” – до 1 л. Доводили pH среды до 7,0 с помощью 5 М раствора NaOH.

Среды стерилизовали путем автоклавирования в течение 40 мин при 120°C и давлении 1 атм. В охлажденную до комнатной температуры агаризованную среду вносили соответствующий антибиотик и разливали в чашки Петри (приблизительно по 20 мл среды на чашку). После застывания среды до твердого состояния края чашек обматывали полосками парафилма и хранили при +4°C.

2.1.4.11. Среды для культивирования эукариотических клеток

Смесь для замораживания клеток: 90% FBS и 10% DMSO.

Среда I: Opti-MEM (ThermoFisher);

Среда II: RPMI-1641 (ПанЭко), содержащая 10% FBS, 4,5 г/л глюкозы, 2мМ глутамин, пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл);

Среда III: DMEM (ПанЭко), содержащая 10% FBS, 4,5 г/л глюкозы, 2мМ глутамин, пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл);

Среда IV: DMEM/F12 (Sigma) с 10% FBS, 1мМ пируватом натрия, 2мМ глутамином, пенициллином (100 ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл);

Среда V: DMEM/F12 (Sigma), содержащая 1мМ пируват-Na, 2мМ глутамин, пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл);

Среда VI: DMEM/F12, содержащая 1мМ пируват-Na, 2% MACS NeuroBrew-21, 2мМ глутамин, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл).

Все среды для культивирования клеток стерилизовались путем фильтрования через фильтры-воронки с диаметром пор 0,22 мкм.

2.1.4.12. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные в данной работе, были синтезированы фирмой Evrogen. Последовательности олигонуклеотидов представлены в **Приложении 1**.

2.1.5. Основные компьютерные программы

Основные программы, использованные в работе, представлены в **Табл. 5**.

Таблица 5. Компьютерные программы, использованные в работе

Название	Назначение программы	Ссылка на Web-страницу программы
Lasergene	Проверка праймеров на наличие шпилек и на способность к образованию димеров	https://www.dnastar.com/software/lasergene/
CRISPRdirect	Подбор наиболее специфичной последовательности gRNA	https://crispr.dbcls.jp/
DeepHF	Подбор последовательности gRNA, функционирующей наиболее эффективно	https://bio.tools/DeepHF

OncoLnc	Анализ взаимосвязи экспрессии изучаемых генов и общей выживаемости пациентов	http://www.oncolnc.org/
MethSurv	Анализ взаимосвязи метилирования изучаемых генов с общей выживаемостью пациентов	https://biit.cs.ut.ee/methsurv/
Prism 6 (Graphpad Software)	Статистическая обработка данных	https://www.graphpad.com/support/prism-6-updates/

2.2. Методы

2.2.1. Методы работы с эукариотическими клетками

2.2.1.1. Культивирование клеток

Все клетки культивировали при 37°C при 100% влажности и содержании CO₂ 5%. Клетки линий AsPC-1, BT-474, VxPC-3, COLO-357, HaCaT, HBL-100, и T3M-4 культивировали на среде II, клетки HEK-293, HeLa, HepG2, MCF-7, MRC-5, SKBR-3, SKOV-3 и U87MG выращивали на среде III, для культивирования клеток линии Phoenix-GP использовали среду IV. Смена культуральной среды проводилась каждые 3 – 5 дней. При необходимости клетки диссоциировали раствором Трипсина-Версена. Клетки первичных культур глиобластомы, полученные из клинических образцов, культивировали в виде нейросфер на среде VI. Ростовые факторы добавляли дважды в неделю. Смену культуральной среды проводили каждые 5 – 14 дней. В случае необходимости клетки диссоциировали с помощью аккутазы. Для хранения клеток в случае нейросфер GBM клетки центрифугировали 5 мин при 800 rpm, далее отбирали культуральную среду и ресуспендировали осадок в 1 – 2 мл смеси для заморозки, разливали суспензию в криопробирки, которые помещали на -80°C. Через 7 дней пробирки с замороженной суспензией помещали в жидкий азот. В случае прикрепленных культур отбирали среду из культурального флакона, затем добавляли 1,5 – 2 мл раствора Трипсин-Версена, инкубировали 5 – 7 мин при 37°C, переносили в пробирку на 15 мл, добавляли 5 мл PBS, центрифугировали 5 мин при 1000 rpm, удаляли жидкость и ресуспендировали в 1 – 2 мл смеси для заморозки, как указано выше. При необходимости хранящиеся клетки размораживали, ресуспендировали в необходимом количестве среды и

культивировали. В случае суспензии нейросфер GBM размороженные клетки трижды промывали буфером PBS путем центрифугирования в течение 5 мин при 800 rpm.

2.2.1.2. Получение первичных культур клеток GBM из клинических образцов опухолевых тканей

Первичные культуры получали согласно оригинальной методике, разработанной в нашей лаборатории. Через 1 – 5 часов после хирургического удаления образец опухолевой ткани массой более 0,4 г. был последовательно промыт в трёх чашках Петри с 20 мл буфера PBS в каждой. Опухоль промывалась таким образом, чтобы максимально избавиться от эритроцитов, находящихся в кровеносных сосудах. Далее опухоль помещали в чашку Петри, содержащую 5 мл буфера PBS и 5 мл раствора Трипсин-Версена. С помощью пинцета и скальпеля ткань нарезали на фрагменты 1 – 2 мм в диаметре, после чего чашку Петри с опухолью инкубировали 10 мин при 37°C. Далее раствор из чашки Петри вместе с фрагментами опухоли переносили в 15 мл пробирку и пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. После этого пробирку инкубировали ещё 10 минут при 37°C и суспензию снова пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. Далее пробирку инкубировали 10 минут при 37°C, после чего ещё раз пипетировали 15 – 20 раз пипеткой на 10 мл. Полученную суспензию продавливали через сито с порами 100 мкм, надетое на пробирку на 50 мл. Объём смеси доводили до 35 мл буфером PBS и после тщательного перемешивания центрифугировали 10 мин при 500 x g. Супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS. Полученную суспензию без давления пропускали через сито с диаметром пор 70 мкм и центрифугировали 10 мин при 300 x g. Далее супернатант декантировали, а осадок ресуспендировали в 35 мл свежего PBS и повторно центрифугировали 10 мин при 300 x g. Затем супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 20 мл среды V, которую без давления пропускали через сито с диаметром пор 40 мкм и центрифугировали 10 мин при 300 x g. После этого осадок клеток ресуспендировали в 10 мл среды VI и выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток в 25 см² матрасе (1). На следующий день неприкрепившиеся клетки со средой переносили во второй матрас (2), покрытый ламинином, а в (1) матрас добавляли 10 мл свежей среды VI. Оба матраса выдерживали в CO₂ инкубаторе в течение суток и на следующий день в матрасе (2) меняли среду на свежую, декантируя все неприкрепившиеся клетки. Далее клетки на обоих матрасах культивировали до тех пор, пока плотность клеток не становилась более 50%, и после этого клетки диссоциировали, добавляя в матрасы по 2 мл аккутазы. Затем клетки из обоих матрасов объединяли и культивировали совместно на 25 см² матрасе на среде

VI в виде нейросфер. Периодически клетки переносили в новый матрас, отбрасывая те клетки, которые не откреплялись от пластика после интенсивного пипетирования.

2.2.1.3. Определение количества клеток

При работе с нейросферами GBM культуральную среду, содержащую суспензию нейросфер, отбирали из флакона в пробирку на 15 мл и центрифугировали 5 мин при 800 rpm. Жидкость отбрасывали, осадок ресуспендировали в 700 – 800 мкл аккутазы и инкубировали 5 – 20 мин при 37°C. Далее добавляли в пробирку 5 мл PBS и промывали клетки путем центрифугирования при 1000 rpm в течение 5 мин. В случае прикрепленных культур из культурального флакона удаляли среду и добавляли 1,5 – 2 мл раствора Трипсин-Версена, инкубировали 5 – 7 мин при 37°C, добавляли 5 мл PBS, переносили в пробирку на 15 мл и центрифугировали, как описано выше. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в 0,5 – 4 мл среды (в зависимости от величины осадка). В чистую пробирку объемом 0,5 или 1,5 мл вносили 20 мкл красителя трипановый синий. Суспензию клеток в пробирке на 15 мл перемешивали путем переворачивания пробирки, отбирали 20 мкл, переносили в пробирку с красителем, перемешивали пипетированием и наносили по 10 мкл смеси на каждую из сторон слайда для измерения. Далее проводили измерение количества клеток на счетчике Countess II.

2.2.1.4. Анализ пролиферации клеток с использованием аламарового голубого

Данный метод использовался при анализе скорости роста клеток GBM, культивируемых в виде нейросфер. Нейросферы диссоциировали с помощью аккутазы и промывали 5 мл PBS, как описано в пункте 2.2.1.3. данной главы. Далее клетки рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 6 000 клеток на лунку и культивировали в 150 мкл среды VI. Затем в лунки с суспензией клеток вносили 50 мкл смеси, содержащей 30 мкл среды V и 20 мкл аламарового голубого. Клетки инкубировали 4 часа в CO₂-инкубаторе при 37°C и измеряли флуоресценцию с помощью планшетного анализатора с фильтром поглощения на 535 нм и фильтром излучения на 620 нм. Анализ проводили в шести повторах на 1, 4, 6 и 8 дни культивирования.

2.2.1.5. Анализ цитотоксичности 5-азацитидина с использованием МТТ-теста

Клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета в количестве 1×10^4 клеток на лунку и культивировали в 200 мкл соответствующей среды. Через 24 часа культивирования среду удаляли, добавляли свежую среду, содержащую 0,5; 1; 2; 3 – 10; 20; 30 – 90 или 100 мкМ 5-азацитидин и далее культивировали, добавляя каждые 24 часа свежий 5-азацитидин в требуемом количестве. Через 72 часа культивирования среду удаляли и добавляли в лунки планшета по 100 мкл раствора МТТ в PBS (концентрация – 0,5 мг/мл). Инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 2 – 3 часов, затем удаляли раствор МТТ и вносили в лунки по 100 мкл DMSO, перемешивали пипетированием (для растворения кристаллов формазана). Измеряли оптическую плотность при 570 нм. Каждый эксперимент проводили в 6 повторах. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде, не содержащей 5-азацитидин.

2.2.1.6. Глобальное деметилирование ДНК путем инкубации клеток с ингибиторами метилаз (5-азацитидином или 5-аза-2'-деоксицитидином).

Клетки линий НЕК-293, HeLa, HepG2, MCF-7, SKBR-3, SKOV-3 и COLO-357 культивировались в матрасах на 25 см² до состояния 70% монослоя. Далее вносили требуемое количество 5-азацитидина и культивировали 72 часа, добавляя свежую порцию ингибитора каждые 24 часа. Концентрацию 5-азацитидина для каждой линии подбирали индивидуально на основании данных анализа цитотоксичности. При этом выбирали то количество ингибитора, при котором выживаемость клеток была не ниже 80%. Так, для НЕК-293 была выбрана концентрация ингибитора 1,5 мкМ (**Приложение 2**), для HeLa - 3 мкМ; HepG2 – 5 мкМ; MCF-7 – 26 мкМ; SKBR-3 – 35 мкМ; SKOV-3 – 7,5 мкМ и для COLO-357 – 26 мкМ. Через 72 часа культивирования клетки собирали и использовали для дальнейших экспериментов.

Клетки глиобластомы от пациента 019 культивировали в среде с 5-аза-2'-деоксицитидином в концентрации 10 и 30 мкМ в течение 96 ч. При этом смену среды с добавлением свежего ингибитора проводили однократно, через 48 часов после начала культивирования.

2.2.1.7. Анализ частоты формирования нейросфер

Анализ проводили согласно методике [150] с незначительными модификациями. Нейросферы GBM диссоциировали с помощью аккутазы, после чего клетки рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 100, 50, 25, 12, 6, 3, 1,5 и 0,75 клеток на лунку и культивировали в течение 7 дней в 100 мкл среды. Через неделю добавляли 100 мкл свежей среды и культивировали еще 7 дней. После этого подсчитывали количество лунок, в которых отсутствовали нейросферы. Анализ проводился в 10 повторах для каждого разведения суспензии клеток. Данные анализировали, как это было описано ранее [150].

2.2.1.8. Индукция апоптоза

А. Обработка клеток ионизирующим излучением (IR)

Нейросферы GBM диссоциировали аккутазой, промывали PBS, далее осадок ресуспендировали в 3 – 5 мл среды VI и подвергали клетки облучению в дозе 8 Гр. Далее клетки высаживали в матрас на 25 см² и культивировали в течение 8 дней, после чего клетки использовали для дальнейших экспериментов.

Б. Инкубация с препаратом цисплатин

Нейросферы диссоциировали аккутазой, промывали PBS, затем клетки высевали в 6-луночный планшет и культивировали в 2,5 мл среды VI. Через 24 ч культивирования добавляли цисплатин в количестве 8 мкМ. Спустя 3 часа культивирования нейросфер в среде с цисплатином проводили выявление апоптотических клеток с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

В. Инкубация с темозоломидом (TMZ)

Нейросферы диссоциировали аккутазой, промывали PBS, затем клетки высевали в 6-луночный планшет и культивировали в 2,5 мл среды VI. Через 24 ч культивирования добавляли TMZ до конечной концентрации 400 мкМ. Спустя 3 дня культивирования нейросфер в среде с TMZ клетки собирали и использовали для дальнейших экспериментов.

2.2.1.9. Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток

А. Определение уровня поверхностного маркера CD133 и уровня N-кадгерина

Окрашивание клеток антителами anti-CD133/2-APC и anti-N-cadherin-APC проводили по протоколу фирмы-производителя с небольшими модификациями. Для анализа использовали 2×10^5 клеток, предварительно диссоциированных аккутазой. Клетки промывали PBS, ресуспендировали осадок клеток в 60 мкл PBS и добавляли 60 мкл предварительно разбавленного раствора антител в PBS (1:50), перемешивали пипетированием. Далее инкубировали 15 мин при $+4^\circ\text{C}$, после чего добавляли 4 мл PBS и центрифугировали 5 мин при 1000 rpm. После удаления жидкости осадок ресуспендировали в 0,5 мл PBS и проводили измерение флуоресценции на канале APC (длина волны возбуждения – 650 нм, испускания – 661 нм).

Б. Детекция апоптотических клеток

Детекцию апоптотических клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии. Нейросферы диссоциировали, промывали PBS и далее окрашивали по методике, предложенной производителем набора Annexin Apoptosis Detection Kit with PI. Дважды промывали клетки холодным буфером для окрашивания фирмы BioLegend, а затем ресуспендировали клетки в буфере для связывания аннексина V в концентрации 0,25 – 1,0 $\times 10^7$ клеток/мл. Переносили 100 мкл клеточной суспензии в специальную пластиковую пробирку для сортировки объемом 5 мл. Добавляли 5 мкл аннексина V, меченного FITC, затем вносили 10 мкл раствора йодида пропидия, перемешивали и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл связывающего буфера, перемешивали и проводили сортировку клеток.

В. Получение фракций клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла

Нейросферы диссоциировали с помощью аккутазы, промывали PBS, затем клетки фиксировали смесью 95% этанол/ледяная уксусная кислота (95/5, v/v) по методике [151] и окрашивали йодидом пропидия по методике [152] с незначительными модификациями. Для этого к суспензии клеток в 1 мл PBS добавляли 10 мл предварительно охлажденного при -80°C фиксатора. Добавление проводили медленно, при постоянном перемешивании. Далее суспензию клеток инкубировали 15 мин при -20°C , после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 1500 rpm при $+4^\circ\text{C}$. Затем удаляли жидкость, а осадок ресуспендировали в 500 мкл раствора йодида пропидия в концентрации 50 мкг/мл. Суспензию клеток инкубировали 30 мин на льду, ресуспендировали в 3 – 5 мл PBS и пропускали через клеточный фильтр с

диаметром пор 70 мкм. Потом суспензию центрифугировали 5 мин со скоростью 1200 rpm при +4°C, отбрасывали жидкость, осадок ресуспендировали в 0,5 – 1 мл PBS, переносили в специальные пробирки для сортировки и разделяли на клеточном сортере при длинах волн поглощения/эмиссии 493/636 нм. Полученные фракции клеток собирали в отдельные пробирки с QIAzol Lysis Reagent с целью последующего выделения РНК и определения уровня экспрессии анализируемых генов.

Г. Сортировка клеток по флуоресцирующему маркеру (GFP)

Клетки диссоциировали раствором Трипсин-Версена или аккутазы (в случае нейросфер GBM), промывали PBS, ресуспендировали осадок в 500 мкл PBS, переносили в специальные пробирки и сортировали на клеточном сортере при длинах волн поглощения/эмиссии 475/498 нм. Клетки, несущие флуоресцентный маркер, собирали в отдельную пробирку с 1,5 мл среды III, центрифугировали 5 мин со скоростью 1000 rpm, отбрасывали жидкость. Затем клетки использовали для дальнейших экспериментов.

2.2.1.10. Трансфекция клеток плазмидной ДНК

За день до трансфекции клетки пересаживали на новый культуральный матрас. Количество клеток подбирали таким образом, чтобы в день трансфекции плотность клеток составляла 60 – 80% монослоя. Перед трансфекцией готовили две смеси, объём которых рассчитывался, исходя из площади флакона (или лунки планшета), в котором производилась трансфекция. Состав смеси «А» на 1 см² площади включал 0,4 мкг плазмидной ДНК, 0,4 мкл реагента Plus и 30 мкл среды I. Смесь «Б» содержала 30 мкл среды I и 1,2 мкл липофектамина LTX. Приготовленные смеси инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего перемешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого среду от клеток отбирали и добавляли 60 мкл полученной трансфекционной смеси и 100 мкл свежей среды для выращивания соответствующего типа клеток (данные количества также указаны из расчета на 1 см² площади). Для клеток линий SKBR-3 и SKOV-3 и линии нейросфер 079 в данном эксперименте использовали среду IV, для U87MG – среду III. Далее клетки оставляли на 24 часа в CO₂-инкубаторе, после чего среду в лунках меняли на свежую. Ещё через 24 часа трансфицированные клетки использовали для необходимых экспериментов.

2.2.1.11. Получение лентивирусных частиц

За двое суток до трансфекции клетки линии Phoenix-GP были посажены в матрас на 25 см² в таком количестве, чтобы в день трансфекции плотность клеток составила 50 – 70%. Перед трансфекцией готовили две смеси: в одну пробирку добавляли по 1 и 3 мкг «упаковочных» плазмид pMD2.G и psPAX2 соответственно и 4 мкг основной лентивирусной плазмиды (pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro, pCDH-PTEN, pCDH-RoR, pCDH-RoR-12×MBS-PBS, GFP1-9P2AMCP-GFP10P2APCP-GFP11 или pLKO1-shRoR), 8 мкл реагента Plus и 750 мкл среды I. Во вторую пробирку добавляли 20 мкл липофектамина LTX и 750 мкл среды I. Растворы инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего перемешивали друг с другом и выдерживали ещё 30 минут при комнатной температуре. После этого среду из матраса с клетками аккуратно отбирали и медленно добавляли в лунки 1,5 мл полученной трансфекционной смеси, 1 мл свежей среды I и 2,5 мл свежей среды IV. Через 24 часа осторожно меняли среду. На 4-й день после трансфекции среду с вирусными частицами отбирали и пропускали без давления через фильтр с порами 0,45 мкм. Из среды, содержащей вирусные частицы, делали аликвоты по 1 мл, замораживали их в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

2.2.1.12. Трансдукция клеток лентивирусными частицами.

Клетки диссоциировали и помещали в лунки 6-луночного планшета по 6×10^5 клеток на лунку. Объём среды с клетками в лунках доводили до 1,5 мл соответствующей средой, после чего добавляли ещё 1 мл среды с вирусными частицами и полибрен до финальной концентрации 8 мкг/мл. Суспензию клеток в лунке перемешивали покачиванием и далее инкубировали в течение 24 часов, после чего среду в лунках заменяли на свежую. Через 48 часов после трансдукции в среду к клеткам добавляли пурамицин в конечной концентрации 1 мкг/мл. На следующий день среду заменяли на свежую, также содержащую пурамицин. Ещё через двое суток среду заменяли на свежую, не содержащую пурамицина.

2.2.1.13. Определение внутриклеточной локализации linc-RoR

Для определения внутриклеточной локализации днРНК linc-RoR клетки заражали вирусными частицами, кодирующими последовательность RoR-12×MBS-PBS и проводили селекцию на среде с пурамицином. Через 7 дней после заражения клетки трансдуцировали

вирусными частицами, кодирующими GFP1-9P2AMCP-GFP10P2APCP-GFP11. Спустя 4 дня клетки высаживали на планшеты с дном из покровного стекла Lab-Tek II Chambered Coverglass и культивировали еще 24 часа. Затем удаляли среду из лунок планшета и добавляли 500 мкл буфера для фиксации клеток. Инкубировали 15 мин в темноте, далее удаляли фиксирующий буфер и однократно промывали PBS. После этого вносили в лунки пермеабилizующий буфер (500 мкл), инкубировали 10 мин, удаляли буфер, однократно промывали PBS и вносили в лунки по капле раствор Fluoroshield with DAPI. Далее клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа.

2.2.2. Методы работы с бактериальными клетками

2.2.2.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli*.

Одиночную бактериальную колонию диаметром 2 – 3 мм переносили микробиологической петлей в пробирку на 50 мл, содержащую 20 мл среды SOB, содержащей стрептомицин, и инкубировали 16 – 24 ч при 37°C при постоянном перемешивании со скоростью 220 rpm. Далее культуру переносили в колбу на 2 л, содержащую 800 мл среды SOB со стрептомицином. Колбу инкубировали при 18 – 22°C при постоянном перемешивании. Когда оптическая плотность бактериальной суспензии достигала значения 0,55 при длине волны 600 нм, колбу с суспензией помещали в ледяную баню на 10 мин. Далее суспензию переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при +4°C со скоростью 2500 x g. Клетки ресуспендировали в 80 мл предварительно охлажденного в ледяной бане буфера для трансформации. Ресуспендирование проводили осторожно, путем перемешивания, избегая вортексирования или пипетирования. Далее снова центрифугировали 10 мин при 4°C со скоростью 2500 x g. Затем снова ресуспендировали в трансформационном буфере и повторяли центрифугирование при условиях, описанных выше. С помощью вакуумного аспиратора удаляли капли оставшейся среды, прилипшие к стенкам центрифужной пробирки или попавшие в ее горлышко.

2.2.2.2. Криоконсервация компетентных клеток.

Клетки ресуспендировали в 20 мл охлажденного в ледяной бане буфера для трансформации. Добавляли 1,5 мл DMSO, перемешивали бактериальную суспензию, взбалтывая, и затем инкубировали ее во льду в течение 10 мин. Далее разливали аликвоты

суспензии (100 мкл) в стерильные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл. Далее компетентные клетки замораживали, погрузив плотно закрытые пробирки с суспензией в жидкий азот. Пробирки с аликвотами суспензии компетентных клеток хранили при температуре -80°C .

2.2.2.3. Трансформация клеток *E. coli*.

Пробирки с аликвотами компетентных клеток размораживали в ледяной бане, добавляли 7 мкл предварительно полученной лигазной смеси, перемешивали и инкубировали в ледяной бане течение 30 мин. Далее выдерживали 40 сек при температуре 42°C и помещали в лед на 5 мин. После этого в пробирку с суспензией клеток вносили 700 мкл среды LB и инкубировали 40 мин при 37°C . Далее микробную суспензию «втирали» в агаризованную среду с соответствующим антибиотиком (конечная концентрация – 100 мкг/мл), находящуюся в чашке Петри, до тех пор, пока жидкость полностью не впитывалась в агар. Затем чашки Петри помещали в термостат и инкубировали 24 ч при 37°C .

2.2.2.4. ПЦР-скрининг колоний, выросших на агаризованной среде

Для обнаружения бактериальных колоний, содержащих плазмиду, несущую целевую вставку, использовался метод ПЦР-скрининга. Для этого часть бактерий из колонии, выросшей на чашке Петри с агаризованной средой, переносили микробиологической петлей в пробирку на 0,2 мкл, содержащую смесь для ПЦР объемом 20 мкл, включающую 4 мкл ScreenMix-HS reagent, 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, комплементарных последовательности клонируемого фрагмента ДНК, и 15 мкл воды “Milli-Q”. Далее проводили 30 циклов ПЦР с температурным режимом, описанным в пункте 2.2.3.8. ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. По наличию полос ДНК соответствующей молекулярной массы определяли колонии, содержащие плазмиду с целевой клонируемой последовательностью.

2.2.2.5. Выращивание бактериальных клеток в среде LB

Часть клеток из колонии, выросшей на агаризованной среде, микробиологической петлей переносили в пробирку на 15 мл, содержащую 5 мл среды LB с соответствующим

антибиотиком (конечная концентрация – 100 мкг/мл), и инкубировали при 37°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании на шейкере со скоростью 220 rpm. Полученную культуру далее использовали для выделения плазмидной ДНК, либо консервировали.

2.2.2.6. Консервация штаммов *E. coli*.

Для консервации клеток *E. coli* 850 мкл бактериальной суспензии в среде LB переносили в пробирку для криохранения, далее добавляли 150 мкл глицерина и хранили при температуре -80°C.

2.2.3. Методы работы с ДНК

2.2.3.1. Выделение ДНК из свежеполученного биопсийного или операционного материала, а также венозной крови с использованием фенол-хлороформного метода.

Геномную ДНК выделяли стандартным методом с применением фенола и гуанидинхлорида [153] с небольшими модификациями. В случае плотных тканей 100 – 200 мг ткани измельчали в стеклянном гомогенизаторе. Измельченную ткань помещали в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл и добавляли 200 – 400 мкл лизирующего раствора 1. В случае выделения ДНК из венозной крови 200 мкл крови смешивали с 200 мкл лизирующего раствора 1. Затем пробирку с образцом помещали в термостат и инкубировали 30 мин при 65°C. К полученному лизату добавляли равный объем раствора фенола для экстракции ДНК. Затем в пробирку добавляли смесь хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) в количестве 1/5 от суммарного объема лизата и раствора фенола. Полученную смесь перемешивали на вортексе и центрифугировали 7 мин при 14000 rpm. Далее осторожно отбирали верхнюю водную фазу и помещали в новую пробирку на 1,5 мл. К отобранной жидкости добавляли двойной объем 96% этанола, перемешивали и помещали на -20°C на 30 мин. Затем центрифугировали 15 мин при 14000 rpm, удаляли этанол, вносили в пробирку с осадком 1 мл 70% этанола и центрифугировали 5 мин при 14000 rpm. Тщательно удаляли спирт, осадок подсушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды “Milli-Q”. Для полного растворения проводили нагревание в течение 5 мин при 65°C. Далее измеряли концентрацию ДНК. Раствор ДНК хранили при -20°C.

2.2.3.2. Выделение геномной ДНК из тканей, заключенных в парафиновые блоки

Каждый блок измельчали с помощью микротомы до фрагментов толщиной 10 мкм. Далее проводили депарафинизацию образца и экстракцию ДНК согласно методике [154] с незначительными модификациями. Для этого измельченные фрагменты помещали в пробирку на 1,5 мл и добавляли 800 мкл ксилена. Перемешивали встряхиванием в течение 15 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 5 мин при 14000 г_г. Отбирали ксилен, стараясь не задевать осадок. Затем снова добавляли 800 мкл ксилена и повторяли встряхивание и центрифугирование. После удаления ксилена добавляли 800 мкл 96% этанола, перемешивали на вортексе и центрифугировали 3 мин при 14000 г_г. Этанол удаляли, добавляли 800 мкл 70% этанола, перемешивали и также центрифугировали 3 мин при 14000 г_г. После удаления 70% этанола в пробирку добавляли 50% этанол, перемешивали и центрифугировали, как описано выше. Далее тщательно удаляли спирт, осадок подсушивали на воздухе в течение 5 мин. В пробирку с осадком добавляли 200 – 400 мкл лизирующего раствора 2. Инкубировали в течение 1 ч при 56°C. Далее центрифугировали при 14000 г_г в течение 7 мин. Лизат отбирали в новую пробирку на 1,5 мл. Добавляли фенол (объем фенола равен объему лизата), перемешивали и центрифугировали 5 мин при 14000 г_г. Отбирали верхнюю (водную) фазу в чистую пробирку и снова добавляли фенол (его объем равен объему отобранной водной фазы). Далее перемешивали и центрифугировали 5 мин при 14000 г_г. Снова отбирали водную фазу в новую пробирку и добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (соотношение 25:24:1), перемешивали на вортексе и центрифугировали 5 мин при 14000 г_г. Образовавшуюся водную фазу помещали в новую пробирку и добавляли 1/10 объема 3М раствор ацетата натрия (рН 5,2), перемешивали и добавляли равный объем 100% изопропанола. Тщательно перемешивали и инкубировали при -20°C в течение 12 ч. Далее центрифугировали 10 мин при 14000 г_г при температуре +4°C. Добавляли 70% этанол и центрифугировали 5 мин при 14000 г_г при температуре +4°C. Удаляли этанол, осадок подсушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 5 мин, растворяли в 50 мкл воды “Milli-Q” и измеряли концентрацию выделенной ДНК.

2.2.3.3. Выделение геномной ДНК из клеток, выращенных в культуре

ДНК выделяли с помощью DNeasy Blood & Tissue Kit по методике фирмы-производителя. Клетки, растущие в виде монослоя, диссоциировали раствором Трипсин-Версена, промывали PBS, отбрасывали жидкость. Суспензию нейросфер центрифугировали 5

мин со скоростью 300 x g, также удаляли жидкость. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл PBS и добавляли 20 мкл раствора протеиназы К, входящей в состав набора. Затем добавляли 200 мкл буфера AL, перемешивали на вортексе и инкубировали 10 мин при 56°C. После этого в пробирку вносили 200 мкл 96 – 100% этанола, перемешивали на вортексе и переносили смесь в микроколонку. Далее центрифугировали 1 мин при 8000 rpm, удаляли жидкость, а в колонку вносили 500 мкл буфера AW1, центрифугировали 1 мин со скоростью 8000 rpm, удаляли жидкость. В колонку вносили 500 мкл буфера AW2 и центрифугировали 3 мин со скоростью 14000 rpm. Жидкость отбрасывали, колонку переносили в чистую пробирку на 1,5 мл и вносили 100 мкл буфера для элюции AE. Инкубировали 1 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали 1 мин со скоростью 8000 rpm. Раствор ДНК хранили при -20°C.

2.2.3.4. Выделение плазмидной ДНК

Выделение проводили с помощью набора реагентов ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit по методике, предложенной производителем. Вначале 5 – 6 мл бактериальной суспензии центрифугировали, далее сливали жидкость, добавляли к осадку 250 мкл лизирующего раствора P1, перемешивали на вортексе. Затем добавляли раствор P2, перемешивали переворачиванием пробирки 6 – 8 раз, оставляли при комнатной температуре на 2 – 3 мин, после чего вносили 250 мкл предварительно охлажденного во льду нейтрализующего раствора P3. Лизат с растворами перемешивали переворачиванием до тех пор, пока содержимое пробирки не приобретало равномерное желтое окрашивание, инкубировали во льду в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин со скоростью 16000 x g. Далее отбирали 600 мкл супернатанта, переносили в чистую пробирку на 1,5 мл и добавляли 275 мкл связывающего буфера. Растворы перемешивали переворачиванием пробирки 8 раз, после чего смесь переносили в микроколонку, помещенную в пробирку на 2 мл (входит в состав набора) и центрифугировали 1 мин со скоростью 5000 x g. Жидкость отбрасывали, а в колонку вносили 800 мкл промывочного раствора 1 и центрифугировали 1 мин (скорость - 5000 x g). Удаляли жидкость, вносили в колонку 800 мкл промывочного раствора 2, центрифугировали 1 мин с той же скоростью, снова удаляли жидкость. Вносили 200 мкл промывочного раствора 2 и повторяли центрифугирование. Затем колонку центрифугировали 1 мин со скоростью 10000 x g и помещали колонку в чистую пробирку на 1,5 мл. В центр мембраны колонки вносили 30 – 50 мкл воды “Milli-Q” и элюировали плазмидную ДНК путем центрифугирования со скоростью 10000 x g в течение 1 мин. Раствор ДНК хранили при -20°C.

2.2.3.5. Бисульфитная конверсия геномной ДНК

Бисульфитную конверсию геномной ДНК проводили с помощью набора реагентов EpiTect Bisulfite Kit в соответствии с методикой, предложенной фирмой-производителем. Реакционная смесь содержала 1 мкг геномной ДНК, 85 мкл раствора бисульфита натрия, 35 мкл стабилизирующего раствора и воды “Milli-Q” до объема 140 мкл. Пробирку для ПЦР на 0,2 мл с реакционной смесью помещали в термоциклер и проводили реакцию при следующих условиях: 95°C – 5 мин; 60°C – 25 мин; 95°C – 5 мин; 60°C – 85 мин; 95°C – 5 мин; 60°C – 175 мин. После проведения конверсии реакционную смесь помещали в пробирку на 1,5 мл и добавляли 560 мкл связывающего буфера BL, перемешивали и переносили смесь в микроколону. Центрифугировали 1 мин при 12000 г_г. Жидкость удаляли, в колону добавляли 500 мкл промывающего раствора BW и снова центрифугировали в течение 1 мин. Жидкость сливали, а в колону помещали 500 мкл промывающего раствора BD. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 1 мин при 12000 г_г. Жидкость отбрасывали. Далее дважды промывали раствором BW путем центрифугирования при 12000 г_г в течение 1 мин. После этого помещали колону в новые пробирки на 2 мл и центрифугировали 2 мин для полного удаления жидкости. Затем помещали колону в новую пробирку на 1,5 мл и добавляли в центр колонки 20 мкл раствора для элюирования EV. Центрифугировали 1 мин при 12000 г_г. Данную процедуру повторяли дважды, а затем объединяли элюаты. Измеряли концентрацию очищенной конвертированной ДНК. Раствор хранили при -20 °C.

2.2.3.6. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Проводили набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) по методике, предложенной производителем. Требуемый фрагмент ДНК вырезали скальпелем из агарозного геля, взвешивали вырезанный кусочек геля и помещали в пробирку на 1,5 мл. Далее добавляли в пробирку тройной объем буфера QG и инкубировали 10 мин при 50°C (до полного растворения агарозы). Для улучшения растворения пробирку перемешивали каждые 2 – 3 мин. Затем добавляли 1 объем изопропанола, перемешивали и переносили смесь в микроколону. Центрифугировали 1 мин со скоростью 13000 г_г, отбрасывали жидкость и промывали колону 750 мкл буфера PE путем центрифугирования в течение 1 мин при 13000 г_г. Жидкость отбрасывали, колону переносили в чистую пустую пробирку на 2 мл и центрифугировали с той же скоростью для удаления остатков жидкости. После этого колону

помещали в чистую пробирку на 1,5 мл и вносили в центр мембраны колонки 30 мкл воды “Milli-Q”. Инкубировали 2 – 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 10000 rpm.

2.2.3.7. Очистка фрагментов ДНК из раствора

Очистку фрагментов ДНК (плазмид, продуктов ПЦР) от низкомолекулярных соединений проводили с помощью коммерческого набора DNA Clean & Concentrator-5 согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для этого в пробирку с продуктом ПЦР вносили пятикратный объем ДНК-связывающего буфера, перемешивали пипетированием. Переносили смесь в микроколону. Центрифугировали 30 с при 10000 x g, жидкость отбрасывали. Далее вносили в колонку 200 мкл промывочного буфера, центрифугировали при той же скорости 30 с, удаляли жидкость и снова повторяли этот этап. Затем центрифугировали пустую колонку 30 с для удаления остатков жидкости, переносили колонку в чистую пробирку на 1,5 мл и вносили в центр мембраны колонки 20 мкл воды “Milli-Q”. Инкубировали 2 – 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали 30 с при 10000 x g. Очищенные фрагменты ДНК использовали для дальнейших экспериментов.

2.2.3.8. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Последовательности праймеров для ПЦР приведены в **Приложении 1**. Все последовательности праймеров, использованных в работе, проверяли на наличие шпилек и димеров с помощью программы “Lasergene”. ПЦР проводили с использованием коммерческой смеси реагентов ScreenMix-HS. Для количественной ПЦР в реальном времени применяли qPCRmix-HS SYBR reagent. В реакционную смесь вносили по 4 мкл соответствующей смеси, по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 25 нг ДНК-матрицы и доводили водой «Milli-Q» объем смеси до 20 мкл. В большинстве случаев использовался следующий температурный режим: денатурация: 95°C – 2 мин, 30 сек; 17 - 45 циклов, состоящих из стадий денатурации (95°C – 30 сек), отжига (60°C – 30 сек) и элонгации (72°C – 30 сек); финальная элонгация: 72°C – 7 мин. При проведении метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР) температура отжига составляла 63°C.

При синтезе длинных фрагментов ДНК (1000 п. о. и более) использовали Phusion High Fidelity DNA Polymerase. Реакционная смесь содержала 4 мкл соответствующего буфера

(входящего в состав набора), 4 дезоксирибонуклеотида в концентрации 200 мкМ каждый, прямой и обратный праймеры (по 0,5 мкМ), 25 нг ДНК-матрицы. Объем смеси доводили водой «Milli-Q» до 20 мкл. Температурный режим был следующий: денатурация (98°C – 30 с); 25-35 циклов: денатурация (98°C – 10 с), отжиг (60°C – 30 с) и элонгация (72°C – от 40 с до 2 мин); финальная элонгация (72°C – 7) мин. Время элонгации устанавливали из расчёта, что на синтез участка ДНК длиной 1000 – 1500 нуклеотидов требуется 1 минута элонгации.

В случае количественной ПЦР в реальном времени относительный уровень продукта реакции определяли методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Для количественной МЧ-ПЦР в качестве референсной последовательности была выбрана последовательность, амплифицируемая с праймерами к неметилированной матрице. При определении относительного уровня анализируемых транскриптов в качестве внутренних контролей использовали гены β -актина (*ACT*) и ген рибосомальной РНК 18S. Все эксперименты по количественной ПЦР проводили в трех повторях. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле.

2.2.3.9. Электрофорез фрагментов ДНК

Электрофорез ДНК проводили в 1,5-3% агарозном геле в буфере TBE с добавлением бромистого этидия (0,1 мкг/мл) при напряжении 300 В и силе тока 200 мА. Концентрация геля определялась, исходя из размеров анализируемых фрагментов.

2.2.3.10. Рестрикция

Для проведения рестрикции к 250 – 500 нг ДНК добавляли 1 мкл соответствующего концентрированного буфера для эндонуклеаз рестрикции и 0,5 мкл каждого фермента. Объем смеси доводили водой “Milli-Q” до 10 мкл. После внесения всех компонентов в микропробирку на 0,2 мл смесь перемешивали пипетированием и инкубировали при 37°C в термостате в течение 2 часов. В случае рестриктазы Sfi I реакцию проводили при 50°C.

2.2.3.11. Дефосфорилирование концов фрагментов ДНК

К раствору вектора после рестрикции добавляли 1 мкл щелочной фосфатазы и инкубировали при 37°C в термостате в течение 40 минут.

2.2.3.12. Лигирование фрагментов ДНК

Смесь для лигирования содержала следующие компоненты: аликвоты растворов вектора и «вставки», 2 мкл 10-кратного буфера для T4 ДНК лигазы и 1 мкл T4 ДНК лигазы. Объем смеси доводили водой “Milli-Q” до 20 мкл. После перемешивания смесь инкубировали при +12°C в течение 18 часов.

2.2.3.13. Конструирование плазмидных векторов

В целом, конструирование плазмидных векторов выполняли по стандартной схеме. На первом этапе проводили синтез необходимой ДНК («вставки») с помощью ПЦР. Праймеры для ПЦР подбирали таким образом, чтобы 3'-концевая область олигонуклеотида соответствовала амплифицируемой последовательности. В сторону 5'-конца от неё создавался сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции, после которого, на самом 5'-конце праймера, располагались произвольные 4 нуклеотида, выбранные таким образом, чтобы оптимизировать температуру отжига данного олигонуклеотида. Для проверки результатов ПЦР проводили электрофорез ДНК. Далее ПЦР-продукты обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции в оптимальном буфере. Параллельно с рестрикцией «вставки» проводили рестрикцию «вектора». На реакцию брали 2 – 4-кратный молярный избыток вставки по отношению к количеству вектора. После рестрикции проводили дефосфорилирование концов ДНК вектора по методике, описанной в пункте 2.2.3.11. Далее продукты рестрикции «вектора» и «вставки» разделяли в 1,5% агарозном геле и целевые фрагменты выделяли из геля. Затем проводили лигирование «вставки» и «вектора» по методике, описанной выше (пункт 2.2.3.12). После завершения реакции проводили трансформацию компетентных клеток полученной лигазной смесью. Трансформированные бактерии втирали на чашки с агаризованной средой, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали ночь в термостате при температуре 37°C. На следующий день проводили ПЦР скрининг 10 выросших колоний. Из 2 – 4 клонов, содержащих «вставку», выделяли плазмидную ДНК. Далее плазмиды секвенировали для подтверждения наличия «вставки», а также для того, чтобы убедиться, что клонируемая последовательность не содержит замены. Детали создания конкретных плазмидных векторов приведены ниже.

A. pKAN-T-gRNA-PTENP1

Вначале с помощью программ CRISPRdirect и DeepHF была выбрана оптимальная последовательность gRNA к псевдогену *PTENP1* (gRNA-PTENP1). Далее участок последовательности плазмиды pPlatTET-gRNA2 (Рис. 16А) амплифицировали с двумя парами праймеров: platTET-NotI-for и gRNA-PTENP1-rev, а также gRNA-PTENP1-for и pPlatTET-SfiI-rev (Рис. 16Б). При этом праймеры gRNA-PTENP1-for и gRNA-PTENP1-rev были сконструированы таким образом, что их 5'-концевые участки включали последовательность gRNA, а 3'-концевые участки были комплементарны последовательности плазмиды. Далее проводили очистку из геля полученных фрагментов (для удаления примеси плазмидной ДНК), объединяли фрагменты и амплифицировали с праймерами platTET-NotI-for и pPlatTET-SfiI-rev. Для этого 2 цикла реакции выполняли в отсутствие праймеров, после чего в реакционную смесь вносили праймеры platTET-NotI-for и pPlatTET-SfiI-rev и проводили еще 17 циклов амплификации.

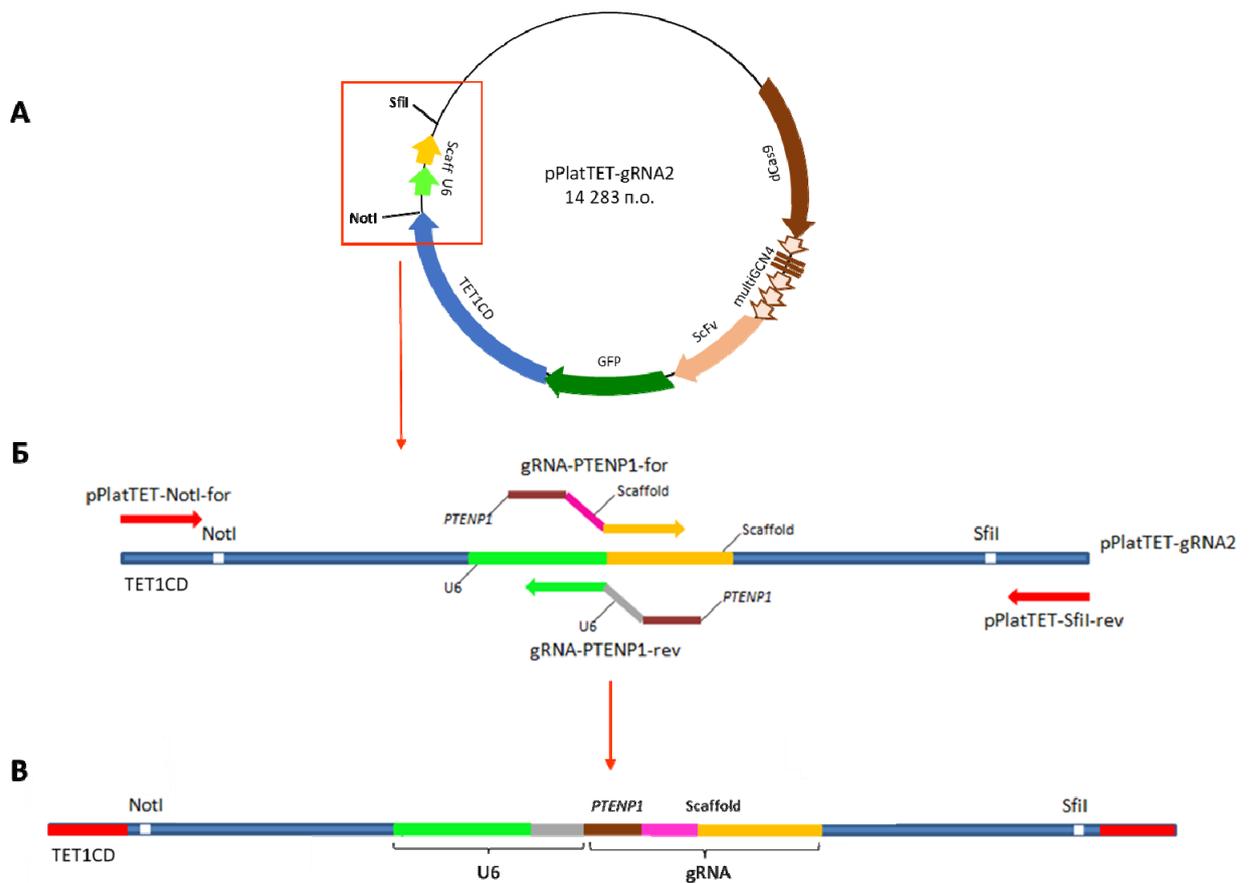


Рисунок 16. Схема строения плазмиды pPlatTET-gRNA2. Красным квадратом выделена амплифицируемая последовательность плазмиды (А); Схема конструирования gRNA-PTENP1 путем ПЦР-амплификации плазмиды pPlatTET-gRNA2 с двумя парами праймеров (Б); Конечный продукт ПЦР (В). Красным цветом обозначены последовательности «внешних»

праймеров; коричневым цветом обозначен фрагмент последовательности псевдогена *PTENP1*, входящий в состав *gRNA*; желтым выделена последовательность *scaffold*, присутствующая в плазмиде *pPlatTET-gRNA2*; малиновым обозначен участок *scaffold*, отсутствующий в плазмиде, но необходимый для функционирования *gRNA*; зеленым выделена последовательность промотора *U6*, присутствующая в плазмиде *pPlatTET-gRNA2*; серым цветом обозначена последовательность *U6*, отсутствующая в данной плазмиде, но необходимая для экспрессии *gRNA*; белыми квадратами обозначены сайты рестрикции *NotI* и *SfiI*.

Свежеполученный продукт ПЦР (Рис. 16В) лигировали с вектором рKAN-Т. После этого трансформировали полученной конструкцией рKAN-Т-*gRNA-PTENP1* бактериальные клетки и проводили селекцию на агаризованной среде с канамицином.

Б. *pPlatTET-gRNA-PTENP1*

Для создания этой конструкции проводили переклонирование последовательности *gRNA-PTENP1* из плазмиды рKAN-Т-*gRNA-PTENP1* в плазмиду *pPlatTET-gRNA2*. Для этого как рKAN-Т-*gRNA-PTENP1*, так и *pPlatTET-gRNA2* расщепляли по сайтам рестрикции *NotI* и *SfiI* (Рис. 16А), дефосфорилировали вектор *pPlatTET-gRNA2*, затем выделяли из геля вырезанный фрагмент *gRNA-PTENP1* и лигировали с очищенной из геля плазмидой *pPlatTET-gRNA2*. Полученной конструкцией *pPlatTET-gRNA-PTENP1* трансформировали компетентные клетки *E. coli* и выращивали бактерии на селективной среде с канамицином.

В. *pCDH-PTEN*

Полноразмерную последовательность кДНК *PTEN* амплифицировали с использованием праймеров *EcoRI-PTEN* и *PTEN-BamHI* и клонировали в лентивирусный вектор *pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro* по сайтам рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде с ампициллином.

Г. *pCDH-RoR*

Фрагмент ДНК, кодирующий *linc-RoR*, амплифицировали с плазмиды *pBabe-lincRNA-RoR* с помощью праймеров *NheI-RoR* и *RoR-EcoRI* и клонировали по сайтам рестрикции *NheI* и *EcoRI* в лентивирусный вектор *pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro*.

Д. *pCDH-RoR-12×MBS-PBS*

Для создания плазмиды, кодирующей последовательность *linc-RoR*, соединенную с *12×MBS-PBS*, вектор *Pcr4-12×MBS-PBS* расщепляли по сайту рестрикции *EcoRI*, далее фрагмент, кодирующий *12×MBS-PBS* клонировали по сайту *EcoRI* в полученный ранее вектор *pCDH-RoR*.

E. pLKO1-shRoR

Для получения плазмиды, кодирующей shRNA-RoR, два олигонуклеотида (shRoR-F и shRoR-R) гибридизовали путем нагревания до 95°C с последующим охлаждением до комнатной температуры. Далее образовавшуюся двуцепочечную последовательность shRNA-RoR клонировали в лентивирусный вектор pLKO1-*puro* по сайтам рестрикции AgeI и EcoRI.

Ж. Конструкция, кодирующая белки оболочки фагов

С целью получения клеток, продуцирующих белки оболочки фагов (MCP и PCP), а также фрагменты GFP, два из которых (GFP¹⁹⁴⁻²¹² и GFP²¹³⁻²³³) соединены с фаговыми белками, мы использовали лентивирусный вектор GFP1-9P2AMCP-GFP10P2APCP-GFP11.

2.2.3.14. Секвенирование плазмидной ДНК и продуктов ПЦР

Секвенирование плазмидной ДНК и ПЦР-продуктов проводилось по методике Сэнгера компанией Евроген.

2.2.4. Методы работы с РНК

2.2.4.1. Выделение РНК с помощью набора реагентов RNeasy Mini Kit

Выделение проводили по методике, предложенной производителем набора. Клетки промывали PBS, отбрасывали жидкость. К осадку добавляли 350 мкл лизирующего буфера RLT, перемешивали пипетированием. Затем добавляли в пробирку 350 мкл 70% этанола, также перемешивали пипетированием и переносили смесь в микроколонку. Центрифугировали 30 с со скоростью 10000 rpm, удаляли жидкость и вносили в колонку 350 мкл буфера RW1, центрифугировали 30 с при 10000 rpm, отбрасывали жидкость. Далее удаляли примесь ДНК путем обработки заранее приготовленным раствором ДНКазы. Для приготовления раствора ДНКазы лиофилизированный препарат фермента (1500 Ед. акт.) растворяли в 550 мкл воды. Затем 10 мкл полученного раствора смешивали с 70 мкл буфера RDD, перемешивали переворачиванием. Полученную смесь вносили на мембрану колонки и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Далее в колонку вносили 350 мкл буфера RW1, центрифугировали 30 с со скоростью 10000 rpm, отбрасывали жидкость. После этого добавляли 500 мкл буфера RPE, центрифугировали 30 с с той же скоростью, удаляли жидкость и снова добавляли 500 мкл буфера RPE. Повторное центрифугирование проводили в течение 2

мин при 10000 rpm. После удаление жидкости колонку переносили в чистую пробирку на 2 мл и центрифугировали в течение 1 мин с той же скоростью оборотов. Далее колонку помещали в чистую пробирку на 1,5 мл, вносили в центр мембраны колонки 30 мкл воды “Milli-Q”. Инкубировали 2 – 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 10000 rpm. Полученный раствор РНК сразу использовали для обратной транскрипции.

2.2.4.2. Выделение РНК с помощью QIAzol Lysis Reagent

Данную методику использовали при выделении РНК из фракций клеток, полученных при разделении клеток на сортере. Выделение проводили согласно методике фирмы-производителя с небольшими изменениями. Клеточные фракции собирали в пробирки на 1,5 мл с реагентом QIAzol (при этом соотношение объемов полученной фракции клеток и реагента QIAzol составляло 1:4) и перемешивали пипетированием в течение 1 мин для полного лизиса клеток. Затем к гомогенату добавляли 100 мкл хлороформа и перемешивали переворачиванием в течение 15 с, после чего инкубировали смесь 2 – 3 мин при комнатной температуре. Далее центрифугировали 15 мин при скорости оборотов 14000 rpm и температуре +4°C. Водную (верхнюю) фазу переносили в новую пробирку и добавляли 1,5 мкл раствора гликогена (концентрация 20 мкг/мл), перемешивали, добавляли 0,25 мл изопропанола, снова перемешивали и помещали на -80°C на ночь. На следующий день пробирки центрифугировали 15 мин при скорости 14000 rpm и температуре +4°C. Супернатант удаляли, добавляли 1 мл 70% этанола и центрифугировали 5 мин с той же скоростью при температуре +4°C. Далее отбрасывали жидкость, тщательно удаляя остатки спирта, подсушивали осадок в открытой пробирке при комнатной температуре и растворяли в 12 – 20 мкл воды “Milli-Q”.

2.2.4.3. Синтез кДНК

Обратную транскрипцию проводили с помощью коммерческой смеси реагентов cDNA Synthesis Master Mix. Реакционная смесь содержала 4 мкл данной смеси и 0,4 – 2 мкг РНК. Объем реакционной смеси доводили до 20 мкл водой “Milli-Q”.

2.2.4.4. РНК-секвенирование и анализ результатов секвенирования

Библиотеки кДНК для секвенирования парных концов готовили с использованием набора для подготовки библиотеки TruSeq Stranded mRNA-Seq (Illumina) в соответствии с

протоколом производителя. Образцы секвенировали с помощью системы Illumina HiSeq 2500 (Illumina) и считывали парные риды длиной 150 п.н. Чтения RNA-seq обрезали по качеству, парные чтения вырезали с помощью Trimmomatic (v. 0,35). Усеченные считывания RNAseq количественно оценивали по аннотации генома GRCh38 Homo Sapiens на уровне транскрипта с использованием Salmon (v. 1.4). Результаты были объединены на уровне генов с использованием пакета R tximport. Дифференциально экспрессируемые гены идентифицировали с использованием R-пакета DESeq2. Анализ основных компонентов (PCA) был использован для сравнения различий между всеми образцами с использованием пакета «FactoMineR».

2.2.5. Биоинформатический анализ

Взаимосвязь между метилированием *PTENP1* и общей выживаемостью больных определяли с помощью программы MethSurv [155]. Взаимосвязь между экспрессией *PTENP1* и общей выживаемостью пациентов определяли с помощью программного обеспечения OncoLnc [156]. Для изучения экспрессии lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS у здоровых пациентов разного возраста мы использовали ранее опубликованные данные RNA-seq (GSE102131) [157].

2.2.6. Статистический анализ данных

Статистические различия между двумя группами пациенток с заболеваниями эндометрия оценивали с помощью двустороннего t-критерия. Однофакторный дисперсионный анализ применяли при сравнении более чем двух групп после посттеста Даннетта/Тьюки. Статистическую значимость кривых выживаемости Каплана-Мейера определяли с помощью логарифмического рангового анализа. Статистический анализ выполняли с помощью программы Prism 6 (программное обеспечение Graphpad). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Количество повторов для каждого эксперимента указано в соответствующих пунктах раздела «Материалы и методы». Для данных с числом повторов менее 10 мы предполагали нормальное распределение на основе внешнего вида данных и анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1*

3.1.1. Анализ метилирования *PTENP1* в тканях эндометрия

3.1.1.1. Выявление метилирования *PTENP1* в опухолевых тканях карциномы эндометрия

Как упоминалось выше, 5'-концевой участок псевдогена *PTENP1* содержит CpG-островок, метилирование которого может оказывать влияние на уровни транскриптов псевдогена, *lncPTENP-S* и *lnc-PTENP1-AS* (Рис. 17). Однако на данный момент статус метилирования данной 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 МЧ-ПЦР с двумя парами праймеров, специфичных в отношении метилированной и неметилированной последовательности псевдогена [80] (Приложение 1). Как известно, последовательность *PTENP1* высокоомологична последовательности гена *PTEN*, поэтому при определении статуса метилирования псевдогена нами был выбран участок CpG-островка, в котором присутствовали различия в последовательностях *PTEN* и *PTENP1*. Таким образом, праймеры для МЧ-ПЦР позволяли дифференциально амплифицировать именно последовательность псевдогена.

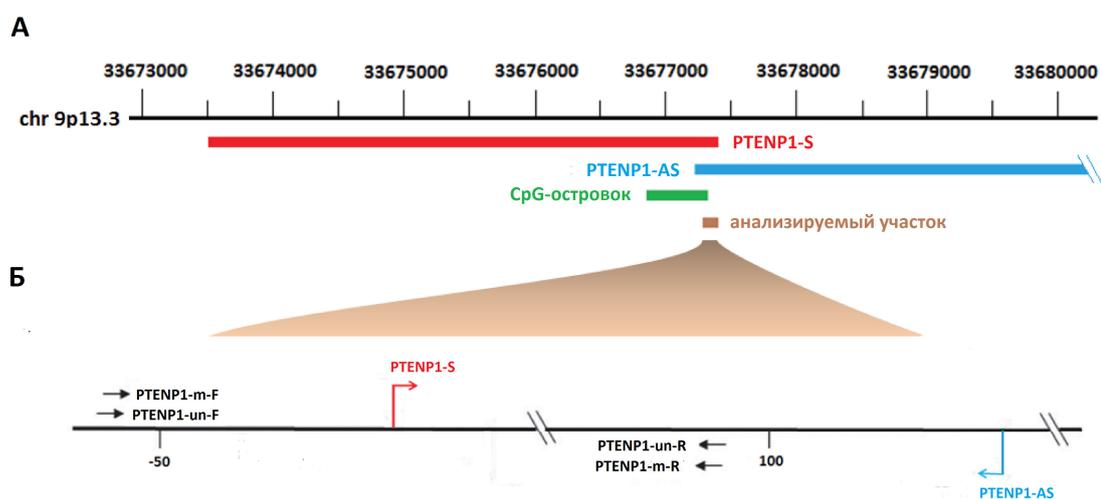


Рисунок 17. Последовательность псевдогена *PTENP1* (А) и анализируемого участка псевдогена (Б). Голубой и красной загнутыми стрелками показаны сайты инициации транскрипции *lncPTENP1-S* и *lncPTENP1-AS* соответственно; черными стрелками обозначены сайты посадки праймеров для МЧ-ПЦР.

Нами были проанализированы 18 образцов опухолевой ткани КЭ, и в 11 из них было выявлено метилирование *PTENP1* (**Рис. 18А**). Полученный результат был подтвержден с помощью рестрикционного анализа. Для этого продукты ПЦР, синтезированные с праймерами к метилированной матрице, инкубировали с рестриктазой *HinfI*. В последовательности амплифицируемого участка содержится потенциальный сайт для этой рестриктазы (GANTC) (**Рис. 18В**), который может образоваться после превращения неметилированного остатка цитозина в тимин (выделен цветом) в результате бисульфитной конверсии. Как видно на **Рис. 18Б**, продукты ПЦР, полученные при амплификации конвертированной ДНК пяти обследованных больных карциномой эндометрия, практически полностью расщепляются рестриктазой *HinfI*, а, следовательно, последний 3'-концевой нуклеотид сайта в исходных ДНК в основном метилирован. Небольшое количество нерасщепленных рестриктазой продуктов ПЦР, видимых на электрофореграмме, можно объяснить либо неполным расщеплением ДНК, либо наличием в препарате ДНК фракции с неметилированными остатками цитозина в анализируемом сайте.

Для того 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 карциномой эндометрия. Согласно данным МЧ-ПЦР, в 3 из 6 образцов, выбранных для этого эксперимента, анализируемый участок *PTENP1* был метилирован. Исследуемая область *PTENP1* содержит 17 CpG-динуклеотидов. В тех образцах, в которых метилирование было выявлено методом МЧ-ПЦР, все 17 остатков, входящих в состав CpG-динуклеотидов, оказались метилированы (**Рис. 18В, Приложение 3Г, 3Д**). Наличие двойных пиков Т/С при секвенировании 2 из 3 образцов, в которых, согласно данным МЧ ПЦР, *PTENP1* был неметилирован (**Приложение 3Б и 3В**), можно объяснить присутствием в исходном образце ДНК фракции с метилированными остатками цитозина. Отсутствие пиков, соответствующих остаткам цитозина в одном из образцов (**Приложение 3А**), свидетельствовало об отсутствии метилирования в анализируемой области, что полностью подтвердило данные МЧ ПЦР для этого образца.

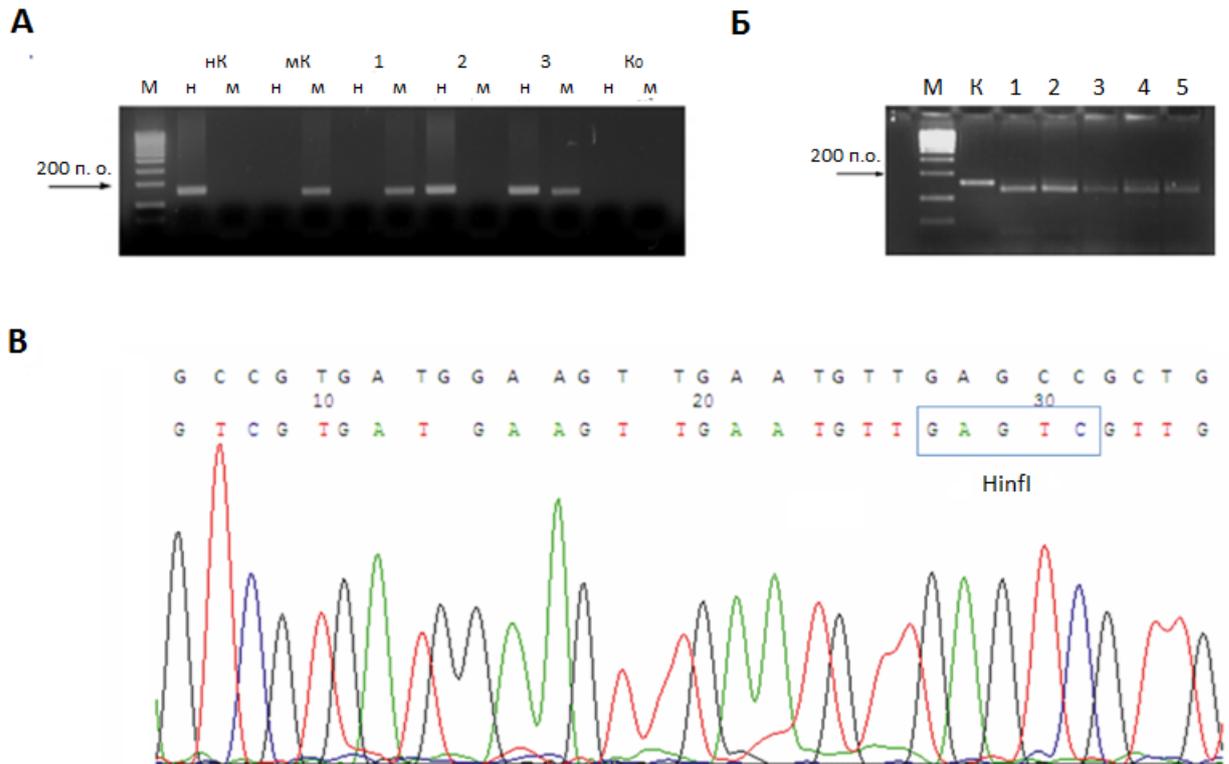


Рисунок 18. Исследование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1*. **А** - ПЦР-амплификация конвертированной бисульфитом натрия геномной ДНК с праймерами к метилированной (м) и неметилированной (н) последовательности *PTENP1*; **Б** – рестрикционный анализ фрагментов ДНК, полученных при амплификации с праймерами к метилированной матрице; **В** - результат прямого секвенирования ПЦР-продукта, полученного при амплификации конвертированной ДНК из опухолевого образца одной из пациенток с КЭ. Сайт рестрикции рестриктазы *HinfI* выделен в рамку. М – маркер молекулярной массы; нК – неметилированный контроль (ПЦР-продукт, полученный на ДНК-матрице, выделенной из лимфоцитов здорового донора и конвертированной метабисульфитом натрия); мК – метилированный контроль (ПЦР-продукт, полученный на ДНК-матрице, выделенной из лимфоцитов здорового донора, метилированной *in vitro* с помощью метилазы *SssI* и конвертированной метабисульфитом натрия); К₀ – амплификация в отсутствие ДНК-матрицы; К – контрольный ПЦР-продукт, не расщепленный рестриктазой *HinfI*.

3.1.1.2. Исследование взаимосвязи метилирования *PTENP1* с клинико-патологическими характеристиками карциномы эндометрия

Чтобы изучить роль метилирования *PTENP1* в патогенезе карциномы эндометрия мы расширили наше исследование, включив в него 57 образцов КЭ, и проанализировали взаимосвязь метилирования псевдогена с клинико-патологическими характеристиками заболевания: стадией, наличием инвазии в миометрий, степенью злокачественности опухоли.

В результате мы не выявили ассоциации метилирования псевдогена ни с одним из исследуемых показателей (см. **Табл. 6**).

Таблица 6. Взаимосвязь метилирования псевдогена *PTENP1* с клинико-патологическими характеристиками каценомы эндометрия

Клинико-патологические характеристики	Число образцов	<i>PTENP1</i> met*	<i>PTENP1</i> met, %**	p
Стадия FIGO				1,00
I	46	31	67,39	
II + III	11	8	72,73	
Инвазия в миометрий				0,359
Есть	17	10	58,82	
Нет	40	29	72,5	
Степень злокачественности				0,774
LGEC	31	21	67,74	
HGEC	26	19	73,08	

*количество образцов КЭ с метилированным *PTENP1*; **процентное содержание образцов КЭ с метилированным *PTENP1*

3.1.1.3. Анализ частоты выявления метилирования *PTENP1* в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия

Следующим этапом мы исследовали частоту встречаемости метилирования псевдогена *PTENP1* в различных типах ткани эндометрия: нормальном эндометрии (НЭ, n=69), ГПЭ (n=64), ПЭ (n=45) и КЭ (n=58), а также в 20 образцах венозной крови пациенток с карциномой эндометрия. Интересно, что ни в одном из образцов ДНК, выделенной из венозной крови, метилирование псевдогена не было выявлено (**Рис. 19**). В то же время во всех анализируемых типах тканей эндометрия было обнаружено метилирование *PTENP1*. Эти данные могут свидетельствовать о тканеспецифическом характере метилирования псевдогена. Указанная модификация выявлялась в 24% образцов нормального эндометрия, в 26,6% образцов полипов эндометрия, у 56,2% пациенток с гиперплазией и у 69% больных карциномой эндометрия.

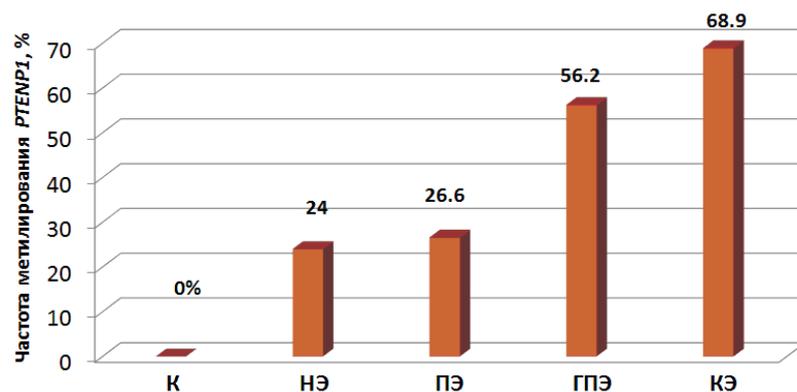


Рисунок 19. Частота выявления метилирования *PTENP1* в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия, а также в венозной крови больных карциномой эндометрия. К – венозная кровь; НЭ – нормальный эндометрий; ПЭ – полипы эндометрия; ГПЭ – гиперплазия эндометрия; КЭ – карцинома эндометрия.

Таким образом, метилирование *PTENP1* чаще выявлялось в образцах гиперплазии и карциномы эндометрия по сравнению с нормальным эндометрием и полипами. Однако после проведения статистической коррекции, учитывающей возраст пациенток, такое различие оказалось недостоверным. Так, средний возраст женщин со здоровым эндометрием составил $39 \pm 13,2$ года, пациенток с гиперплазией эндометрия - $47 \pm 7,1$ год, пациенток с полипами эндометрия - 48 ± 9 лет, а больных карциномой эндометрия - $62 \pm 7,8$ лет. В связи с этим мы решили разделить пациенток на возрастные группы и сравнить частоты метилирования *PTENP1* в нормальном эндометрии, полипах эндометрия, гиперплазии эндометрия и карциноме эндометрия внутри каждой из возрастных групп, а также сравнить возрастные группы между собой.

3.1.1.4. Анализ частоты выявления метилирования *PTENP1* в различных возрастных подгруппах женщин с малигнизированным и немалигнизированным эндометрием

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, были женщины 66 – 76 лет (отнесены к группе IV). Средний возраст для каждой группы, количество пациенток и тип ткани эндометрия указаны в **Таб. 7**. 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 [6]. В то же время карцинома эндометрия часто

выявляется у женщин пожилого возраста. Очевидно, по этой причине именно среди пациенток с данной патологией присутствовали женщины IV возрастной группы.

Таблица 7. 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 (Табл. 8, Рис. 20). 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 ($p < 0,05$).

Таблица 8. Статистическая значимость различий в частотах встречаемости метилирования *PTENP1* между типами ткани эндометрия пациенток II и III возрастных групп.

НЭ vs ГПЭ	НЭ vs ПЭ	НЭ vs КЭ	ГПЭ vs ПЭ	ГПЭ vs КЭ	ПЭ vs КЭ
Группа II (35–44 года)					
p=1,000	p=0,476	-	p=0,293	-	-
Группа III (45–65 лет)					
p=0,748	p=0,015	p=0,375	p=0,014	p=0,766	p=0,000

Далее мы сравнили разные возрастные группы между собой. В случае нормального эндометрия достоверные различия в частоте выявления 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 встречается у женщин в возрасте 45 лет и старше.

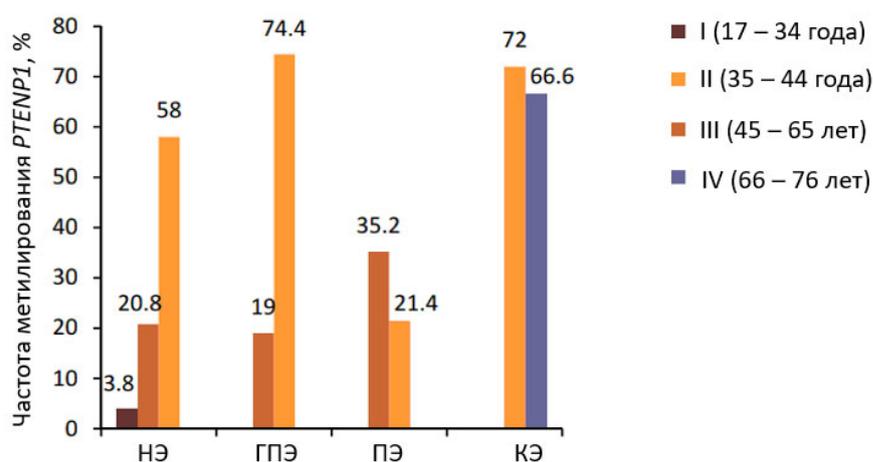


Рисунок 20. Метилирование псевдогена *PTENP1* в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия пациенток различных возрастных групп.

Такая же тенденция наблюдалась среди пациенток с гиперплазией эндометрия. Здесь различие между возрастными группами II и III также было статистически значимым. В то же время мы не обнаружили существенных различий в частотах метилирования псевдогена между возрастными группами пациенток с полипами эндометрия (Табл. 9, Рис. 20). Также не было выявлено значимых различий между III и IV группами больных карциномой эндометрия. Полученные нами данные позволяют предположить, что метилирование псевдогена *PTENP1* как в нормальной эндометрии, так и в опухолевых тканях эндометрия (за исключением ПЭ) чаще выявляется у женщин старше 45 лет.

Таблица 9. Метилирование *PTENP1* в тканях эндометрия у пациенток различных возрастных групп.

Возрастная группа, число пациенток в группе (n)	Количество образцов с метилированием <i>PTENP1</i>	% образцов с метилированием <i>PTENP1</i>	Значение p
Нормальный эндометрий			
I (17 – 34 года), n = 26	1	3,8	0,093 (I vs II) 0,000 (I vs III) 0,025 (II vs III)
II (35 – 44 года), n = 24	5	20,8	
III (45 – 65 лет), n = 19	11	58,0	
Гиперплазия эндометрия			
II (35 – 44 года), n = 21	4	19	0,016
III (45 – 65 лет), n = 43	32	74,4	

Полип эндометрия			
II (35 – 44 года) n = 17	6	35,2	0,325
III (45 – 65 лет), n = 28	6	21,4	
Карцинома эндометрия			
III (45 – 65 лет), n = 25	18	72,0	0,778
IV (66 – 76 лет), n = 33	22	66,6	

Данные, полученные в этом исследовании, показывают, что метилирование *PTENP1* может отражать возрастные изменения, происходящие в эндометрии после 45 лет, и косвенно указывать на приближение или начало менопаузы. Это утверждение может быть справедливым для нормального эндометрия, гиперплазии и карциномы эндометрия, но не для полипов эндометрия, поскольку нами не было выявлено повышение частоты метилирования псевдогена в клетках ПЭ у женщин старше 45 лет по сравнению с пациентками моложе 45.

Полипы эндометрия выявляются как у женщин репродуктивного возраста, так и в период менопаузы и постменопаузы. Следует отметить, что, по данным литературы, ПЭ имеют ряд гистологических особенностей, отличающих их от нормальной ткани эндометрия и от гиперплазии. Например, для этого новообразования характерны определенные аномалии расположения и строения желез. Есть данные о том, что ПЭ состоят из незрелых клеток эндометрия, не подвергающихся циклическим изменениям в отличие от НЭ и ГПЭ [141]. В данном исследовании мы показали, что полипы эндометрия имеют и эпигенетические особенности: частота метилирования *PTENP1* при данной патологии не зависит от возраста пациенток.

Последние годы большое внимание учёных привлекает феномен изменения паттернов метилирования с возрастом. В процессе старения организма общий уровень метилирования геномной ДНК постепенно снижается (процесс, известный как глобальное гипометилирование), в то время как отдельные генетические локусы избирательно гиперметилируются. Накопление деметилированных участков в процессе старения организма происходит в основном стохастически в результате нарушения работы аппарата, поддерживающего определенные сайты в метилированном состоянии [158]. В отличие от этого, возрастное избирательное гиперметилирование ДНК носит более закономерный характер и зависит от типа ткани [159]. Выявление корреляции между уровнем метилирования отдельных генетических локусов и хронологическим возрастом организма послужило толчком

к разработке так называемых «эпигенетических часов», позволяющих определить истинный биологический возраст [160]. При этом были выявлены как тканеспецифические, так и универсальные эпигенетические маркеры. К последним относятся участки ДНК, статус метилирования которых синхронно изменяется с возрастом в разных тканях организма [161].

Показано, что паттерны метилирования ДНК в нормальной эндометрии также подвержены возрастным изменениям [162]. С помощью эпигенетических маркеров Horvath с соавторами, продемонстрировал, что в период менопаузы происходит ускорение биологического старения в соответствии с эпигенетическими часами [163]. В настоящее время мы не располагаем убедительными данными, чтобы утверждать, что анализируемая область *PTENP1* относится к эпигенетическим маркерам, которые могут быть использованы для точного расчета биологического возраста. Однако мы полагаем, что более частое выявление метилирования псевдогена *PTENP1* у женщин старше 45 лет может отражать возрастные изменения, происходящие в эндометрии, и может быть связано с приближающейся или наступившей менопаузой.

3.1.2. 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 секвенирования РНК, выделенной из нормальной эндометрии 10 женщин 23 – 30 лет (группа «молодые») и 10 женщин 40 – 43 лет (группа «пожилые») [157]. Мы оценили уровни экспрессии двух длинных некодирующих транскриптов псевдогена *PTENP1*: lncPTENP1-S и lncPTENP1-AS. Уровень lncPTENP1-AS был очень низким в обеих группах. Поэтому мы не обнаружили статистически значимого различия в содержании данного транскрипта у женщин моложе 30 и старше 40 лет (**Рис. 21**). В то же время средние уровни lncPTENP1-S значительно различались в этих двух группах ($p < 0,05$). Содержание смыслового транскрипта псевдогена в эндометрии женщин из группы «пожилые» был почти в 3 раза выше по сравнению с уровнем этой днРНК в здоровой эндометрии лиц из группы «молодые». Таким образом, мы выявили ассоциированное с возрастом увеличение уровня экспрессии lncPTENP1-S в здоровой эндометрии.

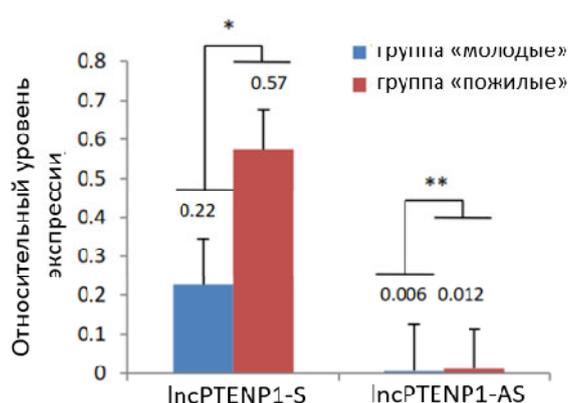


Рисунок 21. Относительные средние уровни транскриптов *lncPTENP1-S* и *lncPTENP1-AS* в нормальной эндометрии женщин группы «молодые» (23 – 30 лет, средний возраст - 29 ± 2.07 лет, $n = 10$) и группы «пожилые» (40 – 43 года, средний возраст - 41.5 ± 1.34 лет, $n = 10$). * $p = 0.0313$; ** $p = 0.739$.

Поскольку мы выявили зависимое от возраста повышение уровня *lncPTENP1-S* и увеличение частоты метилирования псевдогена в нормальной эндометрии, мы предположили, что метилирование *PTENP1* может быть положительным регулятором экспрессии этого псевдогена.

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

Следующим шагом мы провели исследование влияния метилирования *PTENP1* на общую выживаемость больных с карциномой эндометрия и глиомами. С этой целью мы проанализировали данные метилома базы данных TCGA, полученные для 431 пациентки с карциномой эндометрия и 515 пациенток с LGG (глиомы низкой степени злокачественности). (Рис. 22). В случае карциномы эндометрия 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 глиомой низкой степени злокачественности гиперметилирование *PTENP1* строго коррелирует с более благоприятным прогнозом в отношении общей выживаемости пациентов ($p=0,00096$). Мы также изучили влияние экспрессии смыслового транскрипта псевдогена на общую выживаемость больных с КЭ и LGG. В результате было выявлено, что повышенный уровень *lncPTENP1-S* коррелирует с более благоприятным прогнозом для больных с указанными патологиями ($p=0,0350$ и $0,0281$ соответственно).

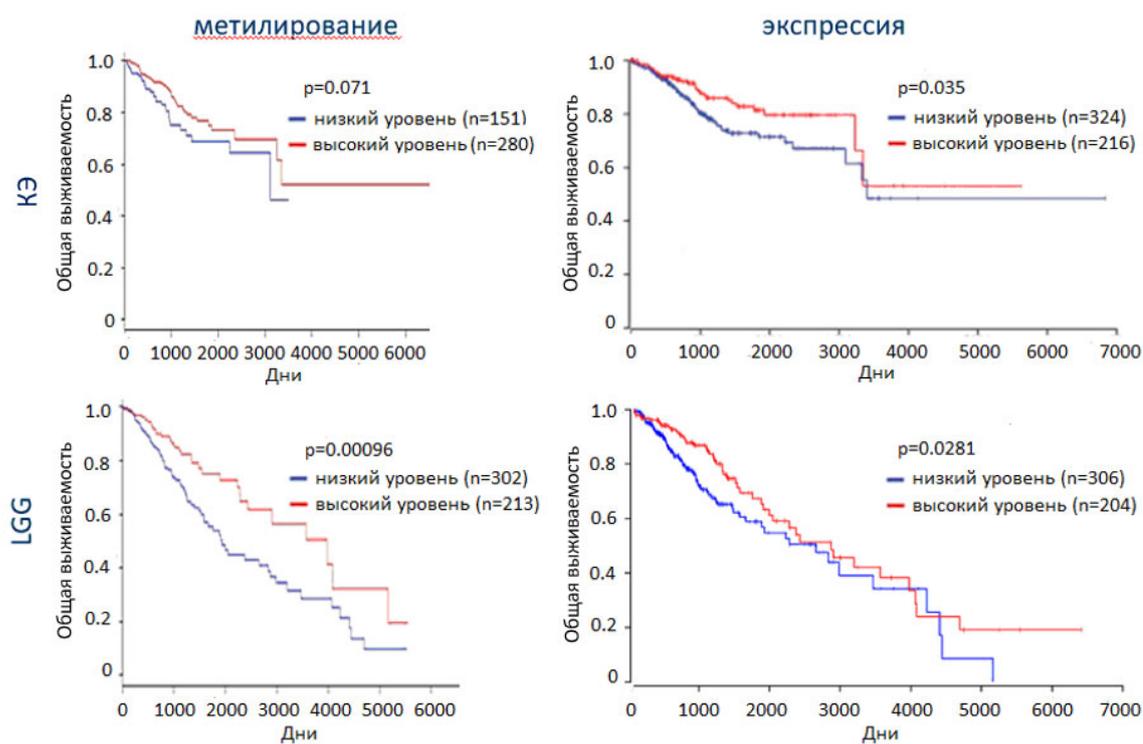


Рисунок 22. Кривые Каплан-Майера, показывающие общую выживаемость больных с КЭ (вверху) и LGG (внизу), разделенных на две группы в зависимости от уровня метилирования *PTENP1* (слева) или экспрессии *lncPTENP1-S* (справа). Указано количество пациентов в каждой группе, а также значение *p*.

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

3.1.4. Влияние ингибиторов метилаз 5-азациитидина и 5-аза-2'-деоксицитидина на экспрессию *lncPTENP1-S* и *lncPTENP1-AS* в клеточных линиях.

Чтобы проверить наше предположение о позитивном влиянии метилирования псевдогена *PTENP1* на его экспрессию, 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 деметилирование ДНК приводило к снижению уровня *lncPTENP1-S* во всех анализируемых линиях (Рис. 23А). 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 (Рис. 23Б).

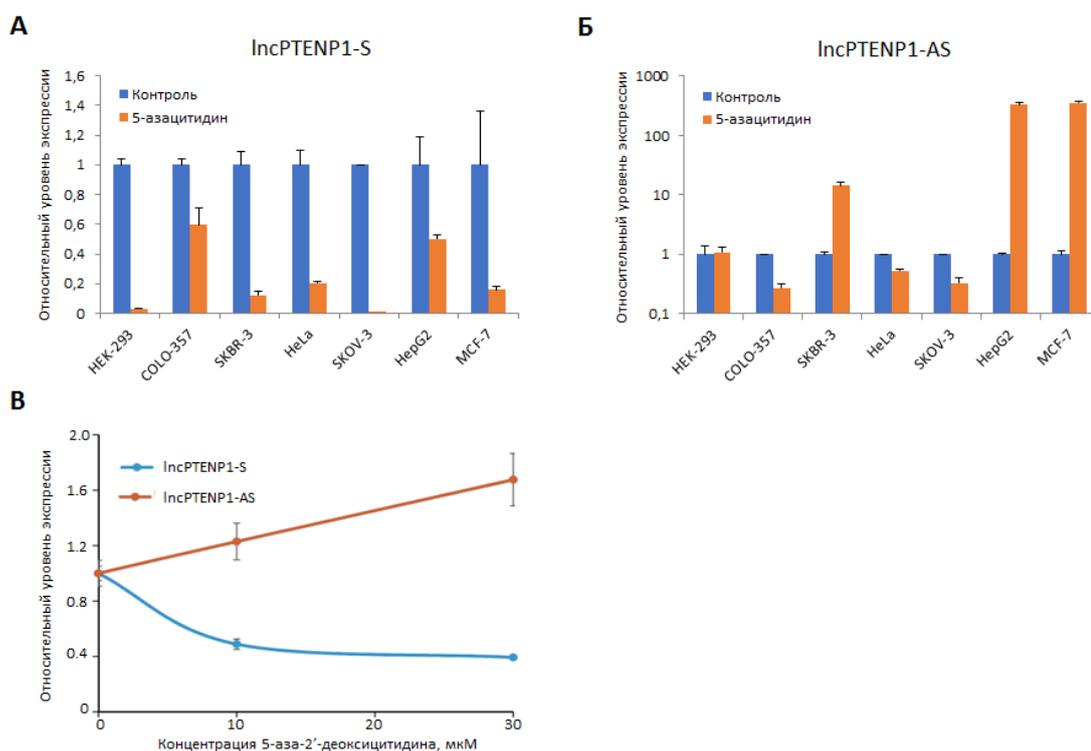


Рисунок 23. Относительные уровни *lncPTENP1-S* (А) и *lncPTENP1-AS* (Б) в культивируемых клетках человека после инкубации с 5-азацитидином, а также в клетках GBM от пациента 019 после их инкубации с 5-аза-2'-деоксицитидином (В).

5-азацитидин представляет собой аналог цитозина – субстрата ферментов ДНК-метилтрансфераз (метилаз). Данное соединение инкорпорируется в состав растущей цепи ДНК, тем самым ингибируя работу этих ферментов. Однако, помимо этого, 5-азацитидин способен включаться в состав синтезируемых молекул РНК, что в ряде случаев может влиять как на транскрипцию, так и на стабильность образовавшихся транскриптов [164]. Чтобы убедиться в том, что обнаруженное нами снижение уровня *lncPTENP1-S* под действием 5-азацитидина не связано с влиянием препарата на этот транскрипт, мы провели дополнительный эксперимент с другим ингибитором метилаз, 5-аза-2'-деоксицитидином, не способным инкорпорироваться в состав молекул РНК. Для этого мы инкубировали с разными концентрациями указанного ингибитора клетки GBM от пациента 019. Согласно нашим данным, 5-аза-2'-деоксицитидин, подобно 5-азацитидину, подавлял экспрессию *lncPTENP1-S* и повышал уровень транскриптов *lncPTENP1-AS*. Причем эффект зависел от дозы препарата (Рис. 23В).

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

3.1.5.1. Направленное редактирование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* в линиях культивируемых клеток человека.

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 генов, которые могут быть не связаны напрямую с деметилированием конкретного локуса [165]. Поэтому, чтобы более детально исследовать 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 (Рис. 24А).

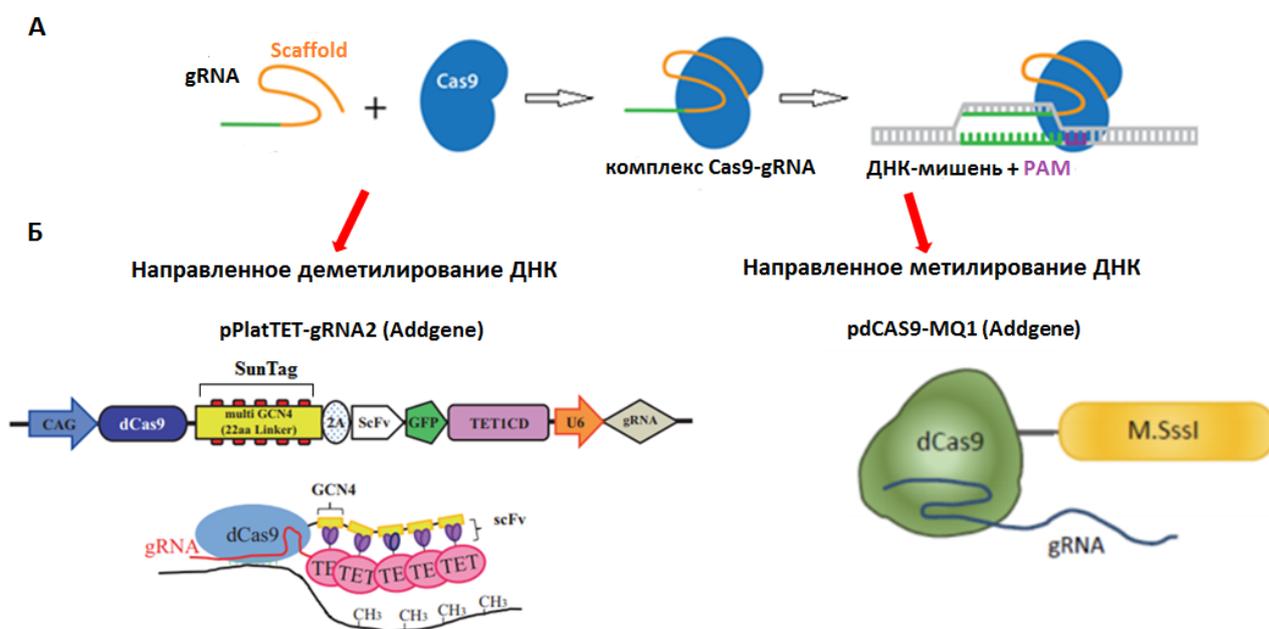


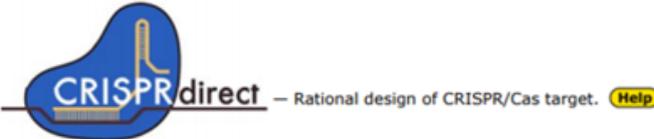
Рисунок 24. Схема, иллюстрирующая систему редактирования генома CRISPR/Cas9 (А); Конструкции для направленного деметилирования (слева) и метилирования (справа) ДНК (Б). Multi GCN4 – несколько копий пептида GCN4, разделенные линкером длиной 22 аминокислоты (22aa Linker); dCas9 – мутантная форма белка Cas9; ScFv – фрагмент антитела к пептиду GCN4.

Конструкция для направленного деметилирования, pPlatTET-gRNA2 (Addgene) [166], кодирует мутантную форму Cas9 (dCas9, утратившую способность расщеплять ДНК), соединенную с 10 копиями пептида GCN4. Также данная плаزمида кодирует химерный белок, состоящий из деметилазы TET1, соединенной с зеленым флуоресцирующим белком (GFP) и фрагментом антитела к пептиду GCN4. Помимо этого, данный вектор позволяет экспрессировать gRNA. 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-мишеней, расположенных на расстоянии до 200 п. о. от сайта связывания gRNA (**Рис. 24Б**, слева).

Для направленного метилирования мы использовали плазмиду pdCAS9-MQ (Addgene) [167], кодирующую dCas9, объединенную с метилазой SssI и GFP (**Рис. 24Б**, справа). Для экспрессии gRNA в данном случае была создана конструкция pKAN-T-gRNA-PTENP1 (см. пункт 2.2.3.13.А главы «Материалы и методы»). Таким образом, для направленного метилирования необходима котрансфекция клеток обеими конструкциями. В результате в клетках, содержащих обе плазмиды, gRNA гибридизуется с комплементарным участком *PTENP1* и привлекает к нему dCas9, соединенный с метилазой, что обеспечивает направленное метилирование целевой последовательности ДНК.

Дизайн последовательности gRNA проводили с помощью программ CRISPRdirect [166] и DeepHF [168] (**Рис. 25**). Первая позволяет подобрать gRNAs, наиболее селективные в отношении анализируемой последовательности ДНК, в то время как вторая помогает выбрать олигонуклеотиды, действующие наиболее эффективно. В качестве gRNA нами была выбрана последовательность, оказавшаяся в пятерке лучших олигонуклеотидов, предложенных обеими программами.

A



Show 20 entries

position start - end	+	target sequence 20mer+PAM (total 23mer)	sequence information				restriction sites	number of target sites		
			GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	20mer +PAM		12mer +PAM	8mer +PAM	
98 - 120	+	GAGAGGTTTAAACCAGCCGG [gRNA]	55.00 %	75.18 °C	-	DraI SmaI XmaI	1 [detail]	2 [detail]	1446 [detail]	
186 - 208	-	CCA ACTCTCCGGCGTTCCAGCC [gRNA]	70.00 %	82.95 °C	-		2 [detail]	2 [detail]	1003 [detail]	
30 - 52	-	CCG CCGAACGGCTGCCTCCCA [gRNA]	70.00 %	82.41 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	125 [detail]	
122 - 144	-	CCC TCCATGTGCCGCCGCCCG [gRNA]	80.00 %	87.39 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	7990 [detail]	
143 - 165	+	CGCCGCCGCCGCCCGGTGT [gRNA]	90.00 %	92.69 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	1198 [detail]	
146 - 168	+	CGCCGCCGCCGCCCGTGTGG [gRNA]	85.00 %	89.01 °C	-		2 [detail]	3 [detail]	2250 [detail]	
81 - 103	+	GTGCGGCCGCCGCCGACGAG [gRNA]	85.00 %	88.08 °C	-		1 [detail]	4 [detail]	251 [detail]	
18 - 40	+	AAGACGAATAATCCTCCGA [gRNA]	40.00 %	67.11 °C	-		2 [detail]	4 [detail]	887 [detail]	

Б



index	Strand	Cut_Pos	PAM	gRNA_Seq	Efficiency
83-		229	AGG	GCGGCGCGCGGCACATGG	0.71
8+		74	GGG	CTCCGGAGCCCGGCCACGG	0.70
44-		28	CGG	GGGAGCCGGCTGAGGCGCGG	0.69
97-		322	AGG	TGGAGGAGGCAGCCGTTCCGG	0.69
56-		76	CGG	GGGGGAGAAAGCGGCGCGG	0.69
54-		70	CGG	TGGAGCGGGGGAGAAAGCGG	0.69
22+		174	GGG	CGTGTGGAGGCAGTAGAAG	0.69
74-		198	CGG	TTCTACTGCCTCCAACACGG	0.68

Рисунок 25. Программы, помогающие выбрать наиболее селективную (А) и наиболее эффективную (Б) последовательность gRNA. Желтым цветом выделена последовательность, выбранная нами при дизайне gRNA.

Прежде, чем проводить направленное редактирование метилирования *PTENP1*, мы определили статус метилирования этого псевдогена в 14 клеточных линиях. В результате метилирование было выявлено в 10 из 14 линий: AsPC-1, ВТ-474, ВхРС-3, HeLa, HepG2, HBL-100, MCF-7, MRC-5, SKOV-3 и ТЗМ4 (**Приложение 4**). Далее для пилотных экспериментов по направленному метилированию генома мы использовали линию SKBR-3, в которой не было выявлено метилирования псевдогена, а для таргетного деметилирования мы выбрали линию SKOV-3, в которой *PTENP1* был метилирован. Мы показали, что после трансфекции клеток линии SKOV-3 деметилирующей плазмидой наблюдалось снижение уровня lncPTENP1-S и увеличение уровня lncPTENP1-AS. Однако, поскольку эффективность трансфекции была невысока (порядка 25%), эти изменения оказались небольшими (**Рис. 26А**, слева). В связи с этим мы отделили трансфицированные клетки путем сортировки на клеточном сортере по флуоресцирующему маркеру (GFP) и далее определяли в собранной GFP⁺ фракции уровни транскриптов псевдогена. В результате оказалось, что направленное деметилирование CpG-

островка *PTENP1* приводило почти к трехкратному уменьшению уровня lncPTENP1-S и практически не влияло на уровень lncPTENP1-AS.

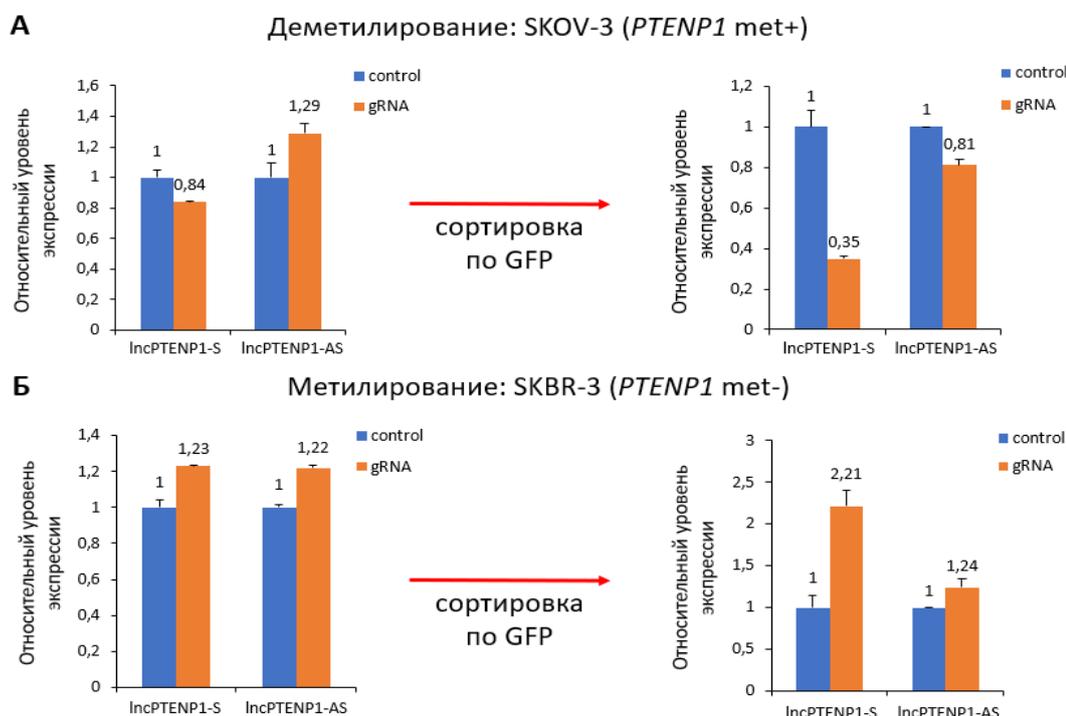


Рисунок 26. Направленное деметилирование (А) и метилирование (Б) CpG-островка псевдогена *PTENP1* в культивируемых клетках человека. Control - относительные уровни транскриптов псевдогена в клетках, не содержащих конструкции для направленного редактирования метилирования *PTENP1*; gRNA - относительные уровни транскриптов псевдогена в клетках, несущих плазмиды для направленного редактирования метилирования *PTENP1*.

Далее мы провели направленное метилирование клеток линии SKBR-3 (в которых, по нашим данным, псевдоген был неметилирован). В данном случае эффективность трансфекции метилирующими конструкциями была также невысока (30%), что вызвало необходимость в сортировке по GFP на клеточном сортере. При определении уровней транскриптов псевдогена в трансфицированных клетках было обнаружено, что направленное метилирование *PTENP1* вызывало двукратное увеличение содержания смыслового транскрипта псевдогена, в то время как уровень антисмысловой РНК существенно не изменился (Рис. 26Б).

Эти данные подтверждают нашу гипотезу о том, что метилирование псевдогена является позитивным регулятором транскрипции lncPTENP1-S. В то же время выяснилось, что метилирование *PTENP1* не оказывает существенного влияния на уровень lncPTENP1-AS.

3.1.5.2. Направленное редактирование метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* в клетках глиобластомы человека.

Далее мы решили исследовать влияние метилирования CpG-островка *PTENP1* на уровень смыслового транскрипта псевдогена в клетках первичной культуры нейросфер глиобластомы от пациента 079. Как и в описанных выше экспериментах, после трансфекции метилирующими или деметилирующими плазмидами клетки подвергались сортировке по GFP с последующим определением в трансфицированных клетках уровня lncPTENP1-S. В полном соответствии с данными, полученными для клеток SKOV-3 и SKBR-3, мы показали, что в первичной культуре клеток глиобластомы деметилирование CpG-островка в промоторе *PTENP1* вызывало двукратное снижение уровня lncPTENP1-S, а метилирование, напротив, повышало экспрессию этой длинной некодирующей РНК (**Рис. 27А**).

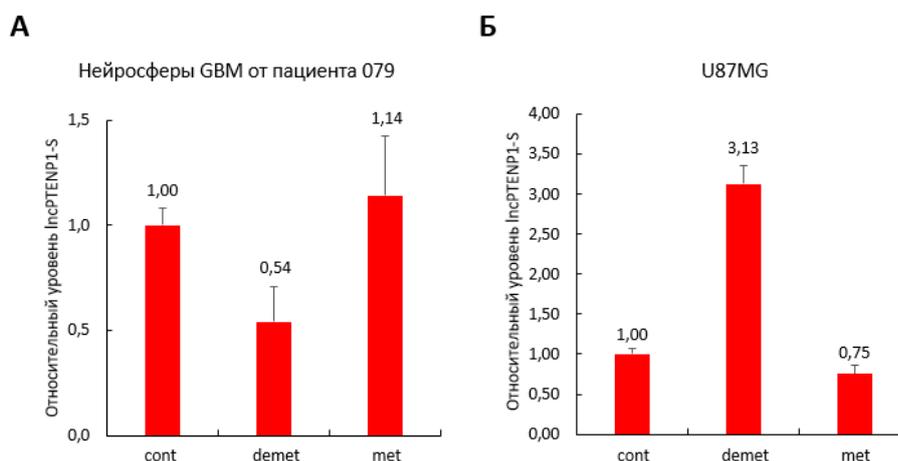


Рисунок 27. Относительный уровень lncPTENP1-S в нейросферах GBM от пациента 079 (А) и клетках линии U87MG (Б), не содержащих конструкции для направленного редактирования метилирования *PTENP1* (cont), а также несущих плазмиды для таргетного деметилирования (demet) и метилирования (met) CpG-островка псевдогена.

Чтобы дополнительно подтвердить полученные результаты, мы исследовали влияние метилирования и деметилирования псевдогена на экспрессию lncPTENP1-S в клетках U87MG – наиболее часто используемой стандартной линии клеток глиобластомы человека. К нашему удивлению, в клетках линии U87MG наблюдался эффект, противоположный результату, полученному для клеток SKOV-3, SKBR-3 и нейросфер глиобластомы, выделенных из опухоли пациента. В U87MG метилирование CpG-островка способствовало уменьшению содержания lncPTENP1-S, в то время как деметилирование приводило к возрастанию уровня этого транскрипта (**Рис. 27Б**).

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

а) Клетки линии U87MG содержат мутантный ген *PTEN*, который экспрессируется с образованием неактивного белка ($PTEN^{mut}$) [169], в то же время в линиях SKOV-3, SKBR-3 и 079 синтезируется функциональный *PTEN* дикого типа ($PTEN^{wt}$) [170, 171, наши данные].

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

в) Функциональный белок *PTEN* важен для активности TP53 и EZH2 [172, 173].

Исходя из фактов, перечисленных выше, можно предположить, что при наличии $PTEN^{wt}$ экспрессия lncPTENP1-S негативно регулируется белками TP53 и/или EZH2 (**Рис. 28А**). Важно отметить, что метилирование ДНК мешает связыванию данных транскрипционных факторов с их промоторами-мишенями [174]. Таким образом, метилирование *PTENP1* усиливает экспрессию lncPTENP1-S (**Рис. 28Б**). Однако, если в клетках отсутствует функциональный *PTEN*, то активность TP53 и EZH2 снижается, в результате чего метилирование CpG-островка *PTENP1* более не приводит к увеличению экспрессии lncPTENP1-S, а, напротив, по классическому механизму уменьшает уровень транскрипции (**Рис. 28В**). Эта гипотеза может объяснять 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.

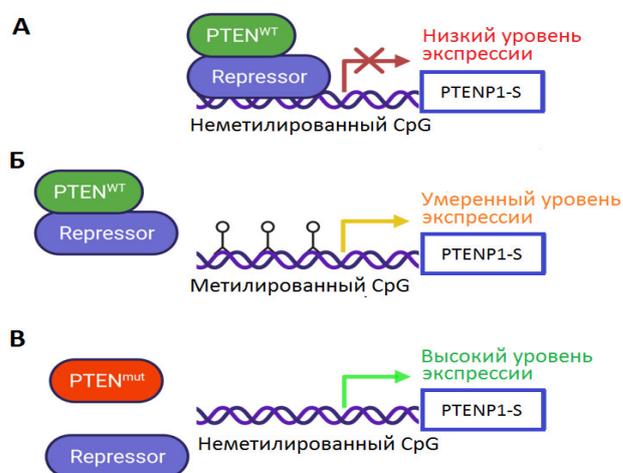


Рисунок 28. Схема, иллюстрирующая гипотезу регуляции уровня lncPTENP1-S с участием белка *PTEN*: при наличии функционально активного *PTEN* и неметилированной последовательности *PTENP1* (А); активного *PTEN* и метилированного *PTENP1* (Б); мутантного *PTEN* и неметилированного *PTENP1* (В). $PTEN^{wt}$ – функционально активный *PTEN*; $PTEN^{mut}$ – мутантный, неактивный *PTEN*; repressor – гипотетический транскрипционный репрессор (в качестве такого репрессора может выступать p53 и/или EZH2).

3.1.5.3. Исследование влияния $PTEN^{wt}$ на эффект метилирования/деметилования псевдогена $PTENP1$ в клетках линии U87MG

Чтобы проверить нашу гипотезу об участии $PTEN$ в регуляции экспрессии $lncPTENP1-S$, мы решили получить клетки линии U87MG со свежэкспрессией $PTEN$ дикого типа ($PTEN^{wt}$). Для этого мы амплифицировали фрагмент ДНК, кодирующий $PTEN$, используя кДНК из клеток 079 в качестве матрицы. Затем полученную последовательность клонировали в лентивирусный вектор и после создания соответствующих вирусных частиц заразили ими клетки U87MG. В результате были получены клетки со стабильной сверхэкспрессией функционально активного $PTEN$ (U87MG- $PTEN^{wt}$). Далее мы провели в U87MG- $PTEN^{wt}$ направленное метилирование и деметилирование CpG-островка $PTENP1$ с последующей сортировкой клеток по GFP и определением уровня $lncPTENP1-S$. Результаты этого эксперимента показали, что в клетках с сверхэкспрессией $PTEN^{wt}$ направленное метилирование псевдогена приводило к двукратному увеличению уровня $lncPTENP1-S$, тогда как деметилирование способствовало уменьшению уровня этого транскрипта (**Рис. 29А**).

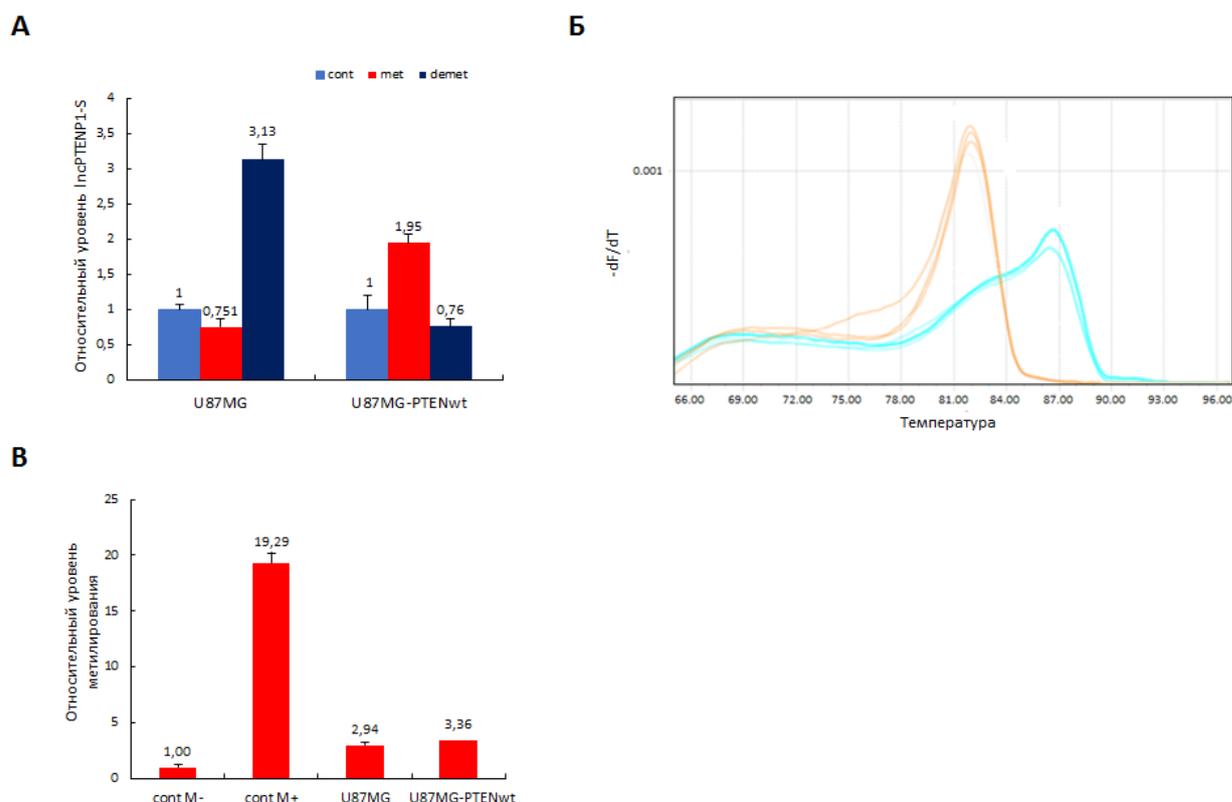


Рисунок 29. Направленное редактирование метилирования $PTENP1$ в клетках U87MG и U87MG- $PTEN^{wt}$ (**А**); кривые плавления, полученные при амплификации метилированной и неметилированной ДНК-матриц (**Б**); относительные уровни метилирования $PTENP1$ в клетках U87MG и U87MG- $PTEN^{wt}$ (**В**). Cont – 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*; *contM-* – неметилированный контроль (ДНК, выделенная из лимфоцитов здорового донора и конвертированная метабисульфитом натрия); *contM+* – метилированный контроль (ДНК, выделенная из лимфоцитов здорового донора, метилированная *in vitro* с помощью метилазы *SssI* и конвертированная метабисульфитом натрия).

Таким образом, появление в клетках U87MG *PTEN*^{wt} 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*^{wt} в регуляции экспрессии псевдогена *PTENP1* по механизму, зависящему от метилирования CpG-островка псевдогена.

В качестве дополнительного контроля мы также решили убедиться в том, что присутствие функционально активного белка *PTEN* не оказывает влияние на уровень метилирования *PTENP1* в клетках U87MG. Для этого нам необходимо было определить относительный уровень метилирования псевдогена как в нативных клетках U87MG, так и в клетках U87MG-*PTEN*^{wt}. При проведении данного эксперимента требовалась количественная оценка продуктов ПЦР, амплифицируемых с метилированной и неметилированной ДНК-матриц. Поэтому мы оптимизировали использованную нами ранее систему МЧ-ПЦР для проведения количественной МЧ-ПЦР в реальном времени. В результате мы добились строго специфичной амплификации с обоими парами праймеров к неметилированной и метилированной матрицам, что подтверждается кривыми плавления (Рис. 29Б). При этом пик, характерный для ПЦР-продукта, полученного с неметилированной ДНК, смещен в сторону более низкой температуры, что объясняется наличием в его составе большего количества остатков тимина, образовавшихся в результате конверсии неметилированных остатков цитозина. Результаты данного эксперимента показали, что присутствие *PTEN*^{wt} не влияет на уровень метилирования CpG-островка *PTENP1* (Рис. 29В).

3.1.6. 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 [100]. 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, и последующего секвенирования элюированных фрагментов ДНК [175]. Результаты нашего анализа показали наличие сайта связывания белка PTEN в области CpG-островка *PTENP1* (Рис. 30).

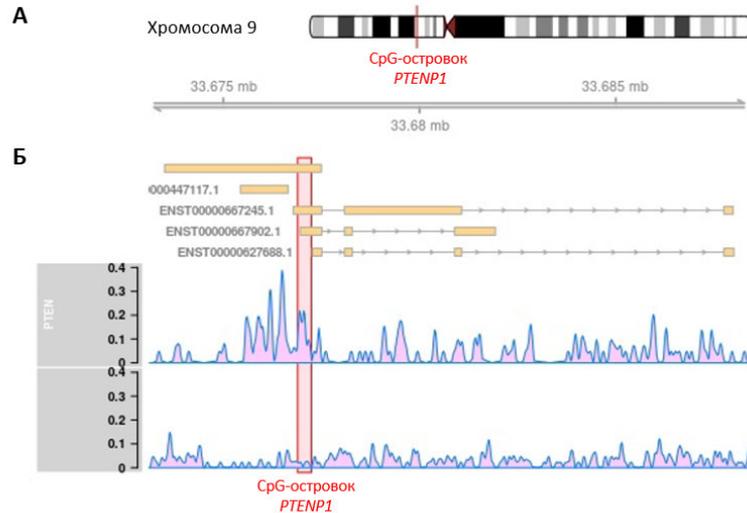


Рисунок 30. Схема расположения CpG-островка псевдогена *PTENP1* на хромосоме 9 (А); Профиль обогащения фрагментов ДНК, преципитированных с помощью антител против *PTEN*, полученный в эксперименте *ChiP-seq* (Б). Участок CpG-островка *PTENP1* выделен розовым прямоугольником.

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

3.1.7. 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). Было обнаружено, что в 7 из 8 линий повышенный уровень метилирования анализируемого участка *PTENP1* коррелирует с повышенным уровнем смыслового транскрипта псевдогена (Рис. 31), 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*, который, по нашей гипотезе, может служить негативным регулятором экспрессии *PTENP1*. 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 (**Рис. 32, Приложение 6**).

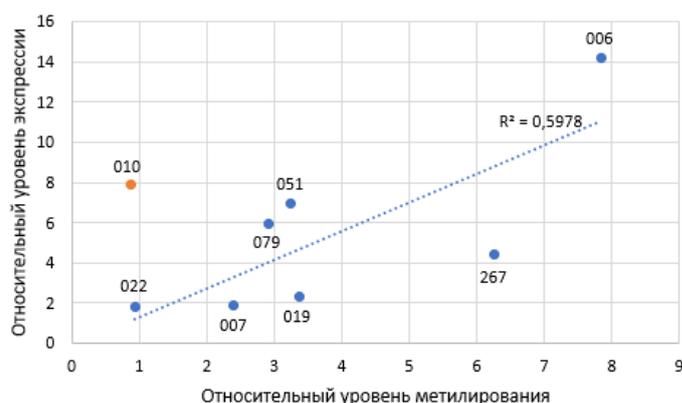


Рисунок 31. Корреляция уровня экспрессии *lncPTENP1-S* и уровня метилирования псевдогена *PTENP1* в линиях первичных культур нейросфер GBM. Цифрами на графике обозначены номера линий первичных культур GBM. Оранжевым цветом обозначена точка, соответствующая линии 010, в которой отмечался высокий уровень *lncPTENP1-S* на фоне низкого уровня метилирования псевдогена *PTENP1*.

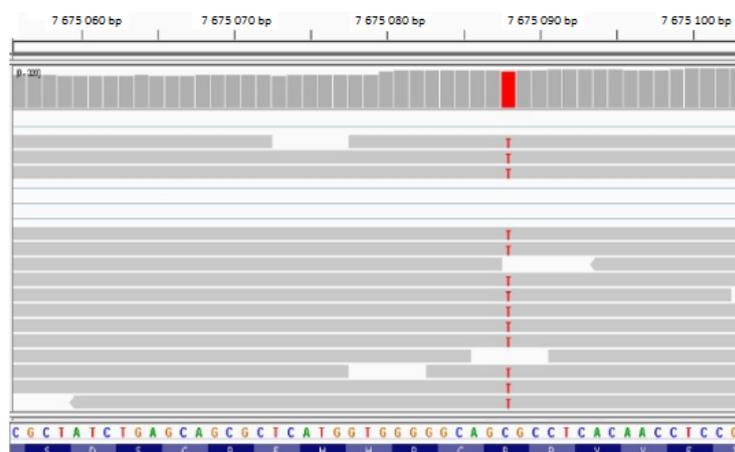


Рисунок 32. Данные РНК-секвенирования, касающиеся участка гена *TP53* для нейросфер GBM, полученных от пациента 010. Красным прямоугольником отмечен участок локализации мутации в гене *TP53*.

Выявленная мутация затрагивает позицию 7675088 хромосомы 17 и представляет собой однонуклеотидную замену G→A. Согласно данным GenBank, остаток гуанина, подвергающийся замене, является вторым нуклеотидом триплета CGC, который кодирует 175-ю аминокислоту (аргинин) в последовательности белка p53. Выявленная нами замена G→A приводит к замещению аргинина гистидином. Указанная мутация (R175H) хорошо известна в литературе. Она затрагивает сайт связывания ионов цинка в ДНК-связывающем участке p53. Данный сайт чрезвычайно важен для формирования пространственной структуры ДНК-связывающего домена белка. Таким образом, белок, содержащий мутацию R175H (p53^{R175H}),

обладает ДНК-связывающим доменом с измененной пространственной структурой. Это приводит к нарушению специфичности взаимодействия мутантного белка со своими мишенями. В результате $p53^{R175H}$ утрачивает способность взаимодействовать с ДНК-мишенями нативного белка $p53$, но в то же время приобретает сродство к новым мишеням. Известно, что $p53^{R175H}$ способен активировать экспрессию некоторых генов, ответственных за рост и пролиферацию клеток [176]. В результате, $p53^{R175H}$ в отличие от онкосупрессорного белка дикого типа, обладает свойствами 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 неметилованной последовательности псевдогена.

Влияние PTEN на активность $p53$ хорошо известно из литературных источников. Фосфорилированная фракция PTEN локализуется в ядре, где этот белок способен взаимодействовать с $p53$, усиливая его ДНК-связывающую способность [177]. Имеются данные об участии комплекса PTEN- $p53$ в регуляции экспрессии генов. Так, было показано, что в клетках глиобластомы в условиях гипоксии ядерный PTEN формирует комплекс с $p53$, который способствует усилению экспрессии опухолевого супрессора *Maspin* [178]. Мы полагаем, что подобный механизм имеет место и в случае регуляции экспрессии псевдогена *PTENP1*: комплекс PTEN- $p53$ связывается с неметилованной последовательностью псевдогена *PTENP1* и подавляет транскрипцию его смысловой днРНК.

3.2. Изучение роли *linc-RoR* в патогенезе глиобластомы

В предыдущем разделе данной главы 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, *lincRoR*, которая известна в качестве онкогенного транскрипта при некоторых видах рака.

3.2.1. Исследование взаимосвязи экспрессии *linc-RoR* с фенотипом глиобластомы

Ранее было показано, что *linc-RoR* не подвергается полиаденилированию [14], и по этой причине этот транскрипт не удаётся детектировать, используя стандартный метод приготовления библиотек для РНК секвенирования, основанный на выделении полиА+

фракции РНК. В результате, информация об уровне экспрессии linc-RoR отсутствует в наиболее обширных и часто используемых базах данных, таких, как TCGA (The Cancer Genome Atlas), REMBRANDT, IVY GAP (Ivy Glioblastoma Atlas Project) и др. Для того чтобы исследовать взаимосвязь экспрессии linc-RoR с фенотипом клеток глиобластомы, мы определили уровень экспрессии linc-RoR, а также 8 основных фенотипических маркеров глиобластомы (CD133, CD44, CD109, Sox2, Olig2, EGFR, ALDH1A3 и GFAP) в 11 полученных нами линиях первичных культур нейросфер GBM. Из **Рис. 33А** и **Приложения 6** видно, что наиболее значительная корреляция экспрессии linc-RoR наблюдается с уровнем EGFR – онкогенного рецептора, тесно связанного с инвазивностью и чувствительностью клеток GBM к терапии [179].

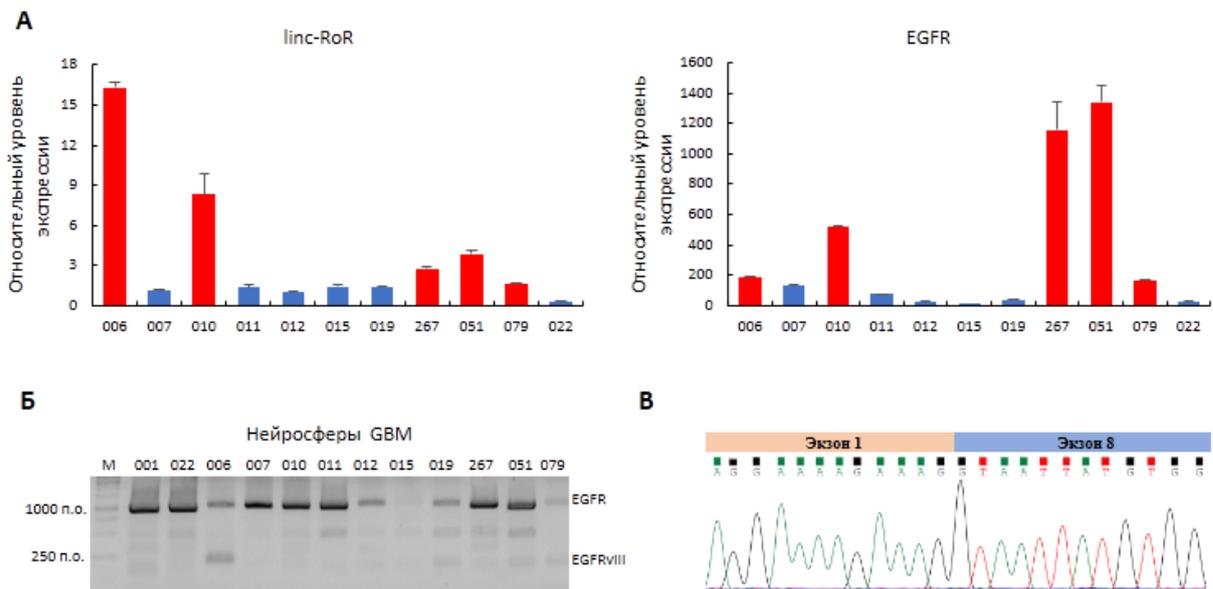


Рисунок 33. Ассоциация между уровнем linc-RoR и экспрессией фенотипических маркеров GBM. Относительные уровни экспрессии linc-RoR (слева) и EGFR (справа) в линиях нейросфер GBM, полученных от 11 пациентов (А). Линии нейросфер с повышенным уровнем linc-RoR выделены красным цветом. ПЦР-амплификация фрагмента EGFR (экзон 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 [106]. С помощью ПЦР и последующего секвенирования амплифицированной кДНК мы показали, что среди всех проанализированных нами линий глиобластомы только нейросферы

006 имеют мутацию EGFRvIII (**Рис. 33Б и 33В**). Такой результат позволяет предположить, что увеличение экспрессии linc-RoR может являться следствием активации сигнального пути с участием EGFR.

Как упоминалось выше (см. пункт 1.2.2. главы «Обзор литературы»), EGFR представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая активируется различными ростовыми факторами и передает пролиферативные и антиапоптотические сигналы через сигнальные пути (например, PI3K/Akt и RAS/MAPK). Активация данного рецептора способствует усилению пролиферации, миграции и инвазии клеток. Таким образом, нарушение регуляции EGFR является важным фактором, участвующим в патогенезе GBM. Наши результаты показывают, что одним из механизмов, с помощью которых EGFR может влиять на пролиферацию клеток глиобластомы, является повышение уровня linc-RoR.

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

Согласно данным литературы, высокий уровень linc-RoR способствует повышению резистентности раковых клеток к радио- и химиотерапии [82]. Основными методами лечения глиобластомы на данный момент являются радиотерапия (IR), а также химиотерапия алкилирующим препаратом темозоломид (TMZ) [2]. Поэтому мы решили исследовать уровень linc-RoR в клетках GBM, подвергнутых облучению в дозе 8Гр (на восьмой день после облучения), а также в нейросферах глиобластомы после их культивирования на протяжении трех дней в среде с 400 мкМ TMZ. Для данных экспериментов мы выбрали линию нейросфер от пациента 006, в которой уровень linc-RoR был наибольшим, и линию 011 с невысоким уровнем этой днРНК. Как показано на **Рис. 34**, 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 привела к повышению уровня linc-RoR. В то же время облучение клеток 011 привело к противоположному эффекту: уровень linc-RoR в этих клетках после облучения снизился на 40% (**Рис. 34Б**).

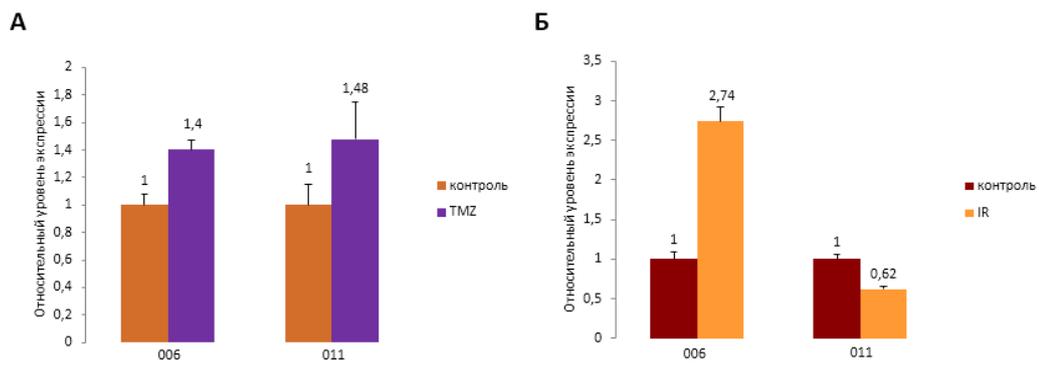


Рисунок 34. Влияние ионизирующего излучения и алкилирующего препарата темозоломид на уровень *linc-RoR* в клетках глиобластомы. Относительный уровень *linc-RoR* в клетках GBM от пациентов 006 и 011 после 3 дней инкубации с препаратом темозоломид (А); относительный уровень *linc-RoR* в клетках GBM от пациентов 006 и 011 на 8 день после воздействия ионизирующего излучения (Б). Контроль – клетки, не инкубированные с темозоломидом и не подвергнутые облучению; IR – клетки, обработанные ионизирующим излучением в дозе 8 Гр; TMZ – клетки, инкубированные в течение 3 дней с препаратом темозоломид (400 мкМ).

Влияние *linc-RoR* на развитие резистентности раковых клеток к терапии ранее описано в литературе. Так, Chen и соавторы в 2018 показали, что гиперэкспрессия *linc-RoR* способствовала увеличению уровня компонента системы репарации RAD18 и повышению резистентности клеток гепатоцеллюлярной карциномы к радиотерапии [180]. В нашей работе продемонстрировано, что само действие терапевтических агентов, вызывающих повреждение ДНК (таких, как TMZ и IR), способствует увеличению уровня экспрессии *linc-RoR*. 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 уровня *linc-RoR* в клетках пациента 011 после их облучения, вероятно, может свидетельствовать о большей чувствительности к радиотерапии клеток с изначально низким содержанием этой днРНК.

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

3.2.3.1. Влияние нокдауна *linc-RoR* на CSCs глиобластомы

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. 35А**). Мы сравнили скорость пролиферации этих клеток с контрольными и показали, что даже неполный нокдаун *linc-RoR* вызывает снижение скорости пролиферации клеток GBM (**Рис. 35Б**).

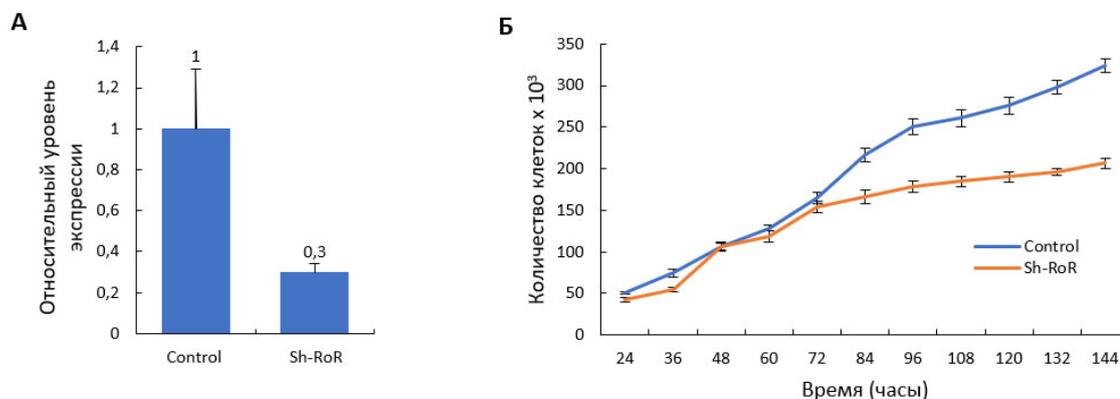


Рисунок 35. Влияние нокдауна *linc-RoR* на скорость пролиферации клеток GBM. **А** – относительный уровень *linc-RoR* в контрольных клетках пациента 019, содержащих плазмиду *pLKO.1* без вставки (*Control*), и в клетках 019, несущих плазмиду *pLKO.1-shRoR* (*Sh-RoR*); **Б** – *in vitro*-анализ скорости роста клеток 019, трансдуцированных лентивирусами, кодирующими *shRNA-RoR*, или вектором без вставки (*Control*).

Ранее было показано, что в эмбриональных стволовых клетках человека *linc-RoR* является позитивным регулятором экспрессии так называемых генов стволовости – *OCT4* и *SOX2* [181]. Мы предположили, что при GBM *linc-RoR* может способствовать поддержанию популяции CSCs по вышеуказанному механизму. Для проверки этого предположения мы исследовали с помощью количественной ПРЦ в реальном времени влияние нокдауна *linc-RoR* на уровни транскриптов *Oct4* и *Sox2*. Согласно нашим данным, в линиях клеток глиобластомы, полученных от двух различных пациентов, нокдаун *linc-RoR* приводил к более чем двукратному снижению уровня *Oct4* и *Sox2* по сравнению с соответствующими контрольными клетками (**Рис. 36А**). Однако основным маркером стволовых клеток глиобластомы считается CD133 [107]. По этой причине далее мы определили влияние нокдауна *linc-RoR* на уровень CD133 с помощью проточной цитометрии. Мы показали, что даже неполное подавление *linc-RoR* снижает популяцию CD133+ клеток GBM практически в 2 раза (**Рис. 36Б**).

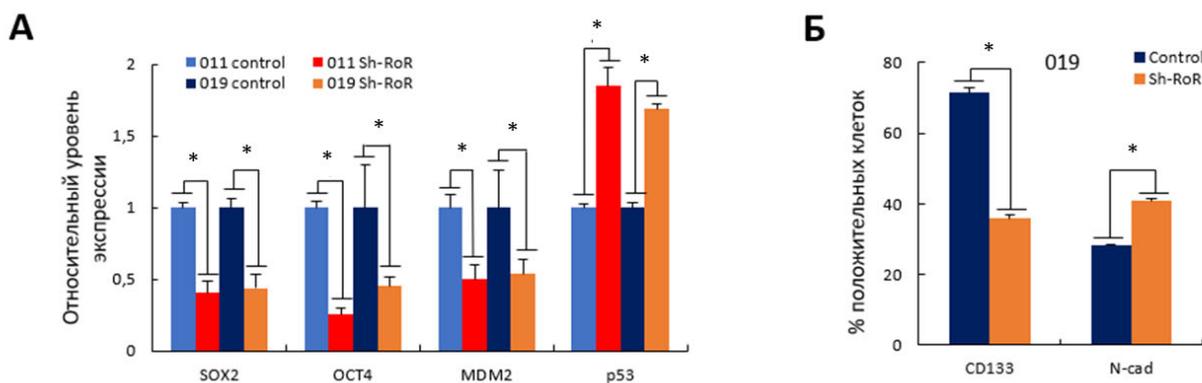


Рисунок 36. Влияние нокдауна *linc-RoR* на уровни маркеров глиобластомы. Относительные уровни экспрессии генов *SOX2*, *OCT4*, *MDM2* и *TP53* в контрольных клетках GBM от пациентов 011 и 019 (control) и в клетках с нокдауном *linc-RoR* (*Sh-RoR*) (А); цитометрический анализ уровней *CD133* и *N-кадгерина* (*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 [95]. Этот факт позволяет предположить, что *linc-RoR* оказывает влияние именно на *CD133⁺/109⁻* раковые стволовые клетки GBM (см. пункт 1.2.2. главы «Обзор литературы»).

По данным литературы, CSCs могут развиваться из более дифференцированных опухолевых клеток под действием специфических транскрипционных факторов, включая *Sox2*, *Oct4*, *Olig2*. В частности, было показано, что повышение уровня этих белков способствует переходу дифференцированных клеток GBM в индуцированные CSCs, имеющие фенотип, аналогичный натуральным CSCs [182]. Мы показали, что в клетках GBM *linc-RoR* вызывает увеличение уровня *Sox2* и *Oct4*. Таким образом, *linc-RoR* может способствовать поддержанию стволовости CSCs с помощью вышеописанных механизмов. Кроме того, нельзя исключать, что высокое содержание *linc-RoR* может индуцировать приобретению более дифференцированными раковыми клетками GBM свойств CSCs.

3.2.3.2. Влияние нокдауна *linc-RoR* на устойчивость клеток GBM к апоптозу.

Предыдущие работы продемонстрировали, что *linc-RoR* может влиять на уровень проапоптотического белка *p53* с помощью различных механизмов. В частности, было показано, что при раке пищевода эта днРНК является позитивным регулятором экспрессии

MDM2, который, в свою очередь, способствует деградации p53 [183]. 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 линиях, экспрессирующих shRNA-RoR, отмечалось снижение уровня MDM2, что хорошо согласуется с данными, опубликованными ранее (Рис. 36А). Мы также показали, что помимо опосредованного влияния на p53 за счет снижения уровня MDM2, нокдаун linc-RoR способствует повышению уровня мРНК p53 (Рис. 36А).

Известно, что белок p53 участвует в индукции клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК [184]. Следовательно, можно предположить, что увеличение содержания этого белка будет способствовать усилению апоптоза под воздействием ДНК-повреждающего агента. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние нокдауна linc-RoR на устойчивость клеток GBM к ДНК-повреждающему агенту цисплатин. Окрашивание апоптотических клеток аннексином V и последующая проточная цитометрия показали, что снижение уровня linc-RoR значительно увеличивало гибель клеток GBM под действием цисплатина (Рис. 37), что подтвердило наше предположение.

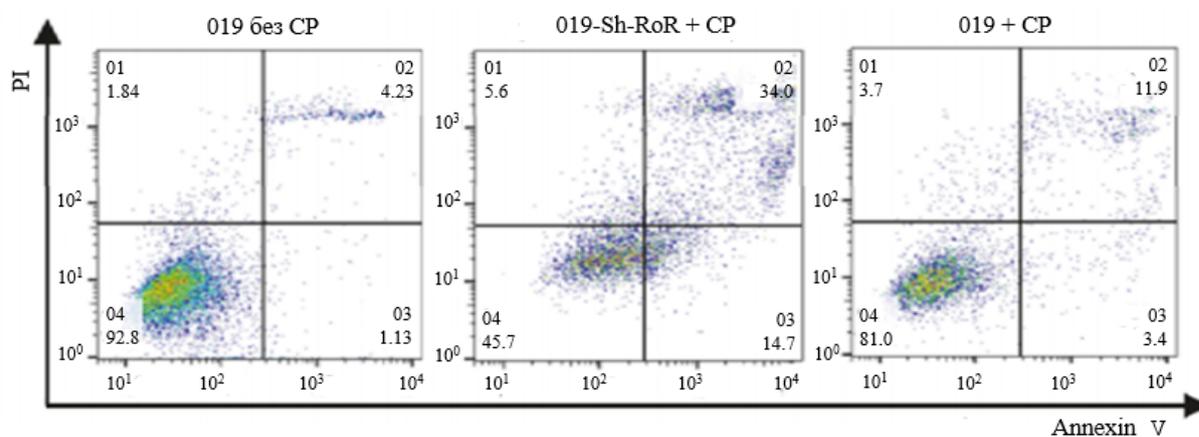


Рисунок 37. Цитофлуориметрический анализ апоптоза в контрольных клетках пациента 019, не инкубированных с цисплатином (CP) (слева), клеток 019 после инкубации с CP (справа) и клеток 019 с нокдауном linc-RoR после инкубации с CP (в центре). Апоптотические клетки идентифицировали по окрашиванию аннексином V (annexin V), конъюгированным с FITC. Мертвые клетки или клетки в позднем апоптозе окрашивали йодистым пропидием (PI).

Суммируя всё вышесказанное, можно констатировать, что даже неполный нокдаун linc-RoR приводит к уменьшению доли CSCs в общей популяции клеток GBM, а также к значительному увеличению чувствительности клеток глиобластомы к апоптозу.

3.2.4. 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. С этой целью мы получили лентивирусные частицы, кодирующие linc-RoR, и заразили ими клетки глиобластомы от пациентов 011 и 019. После отбора на среде с пурамицином мы провели анализ методом количественной ПЦР в реальном времени и показали, что в клетках с оверэкспрессией linc-RoR уровень данного транскрипта повышен более чем в 1000 раз по сравнению с клетками, трансдуцированными вектором, не содержащим вставки (**Рис. 38А**). Следующим шагом мы сравнили скорость роста 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. 38Б**). 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. 38В**), что хорошо согласуется с данными, полученными в экспериментах с нокаутом этой днРНК.

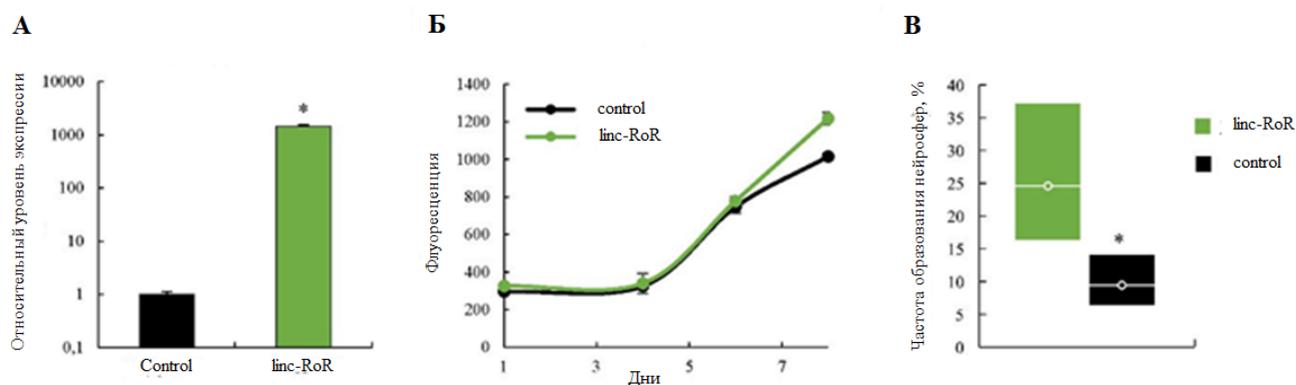


Рисунок 38. Влияние оверэкспрессии linc-RoR на фенотип клеток GBM. Относительный уровень linc-RoR в клетках от пациента 011, содержащих плазмиду без вставки (Control), а также в клетках с плазмидой, кодирующей linc-RoR (linc-RoR) (**А**); *in vitro*-анализ скорости роста контрольных клеток пациента 011, а также клеток 011 с оверэкспрессией linc-RoR (**Б**); анализ частоты формирования нейросфер контрольными клетками 011 и клетками 011 со стабильной сверхэкспрессией linc-RoR (**В**).

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

Для того, чтобы предположить возможный молекулярный механизм влияния linc-RoR на фенотип клеток GBM, мы провели секвенирование РНК из клеток с нокаутом и оверэкспрессией linc-RoR. PCA-анализ данных РНК-секвенирования не выявил значимых

различий в транскриптомах контрольных клеток и клеток с нокдауном linc-RoR (**Рис. 39А**), 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. 39Б**). Наиболее значительные отличия касались генов, участвующих в организации митотического веретена деления, разделения сестринских хроматид, генов, обеспечивающих переход G2/М и др. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что основная функция linc-RoR может заключаться в регуляции митоза.

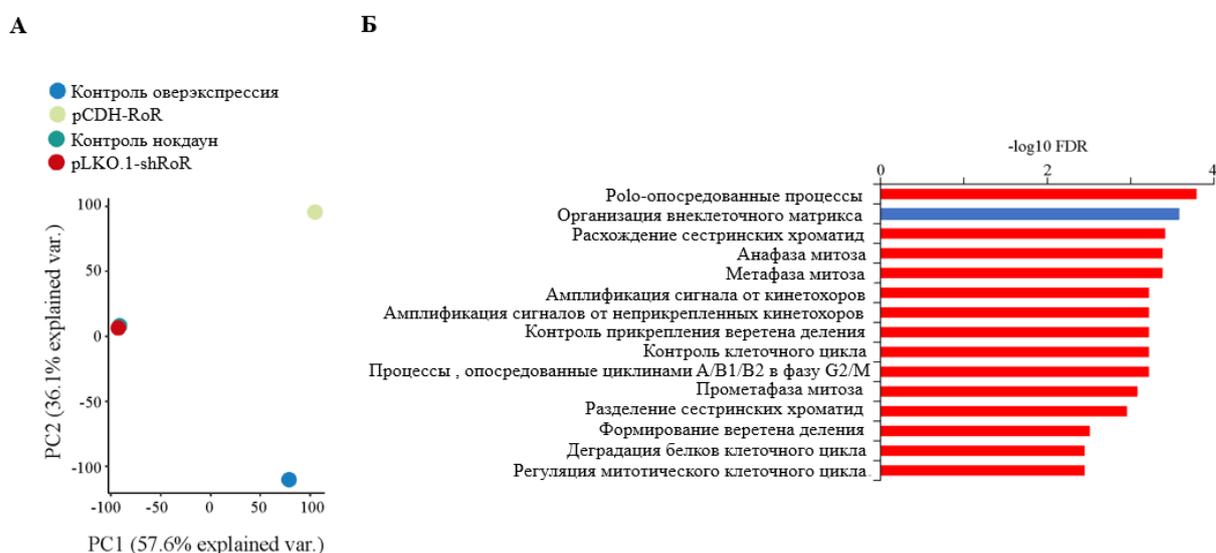


Рисунок 39. Анализ данных секвенирования РНК, полученной из клеток пациента 019, содержащих «пустую» плазмиду pLKO.1, а также клеток 019 с гиперэкспрессией lincPTENP1-S (контроль нокдаун и контроль гиперэкспрессия соответственно) и клеток с гиперэкспрессией и нокдауном linc-RoR (pCDH-RoR и pLKO.1-shRoR соответственно). Анализ данных РНК-секвенирования методом основных компонент (**А**); анализ с помощью базы данных Reactom генов, дифференциально экспрессирующихся в контрольных клетках пациента 019 и клетках данного пациента с гиперэкспрессией linc-RoR (**Б**).

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

На основании результатов РНК-секвенирования 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/M фазах клеточного цикла (**Рис. 40А**). Затем мы определили уровень linc-RoR в полученных клеточных популяциях с помощью qRT-PCR. В качестве маркера фаз клеточного цикла был использован

Ki67, который экспрессируется преимущественно в делящихся клетках [185]. В данный эксперимент мы включили клетки GBM с высоким (267) и низким (011) уровнем linc-RoR. Результаты эксперимента продемонстрировали, что в обоих случаях наибольший уровень экспрессии linc-RoR отмечается в G2/M фазе клеточного цикла (**Рис. 40Б и 40В**).

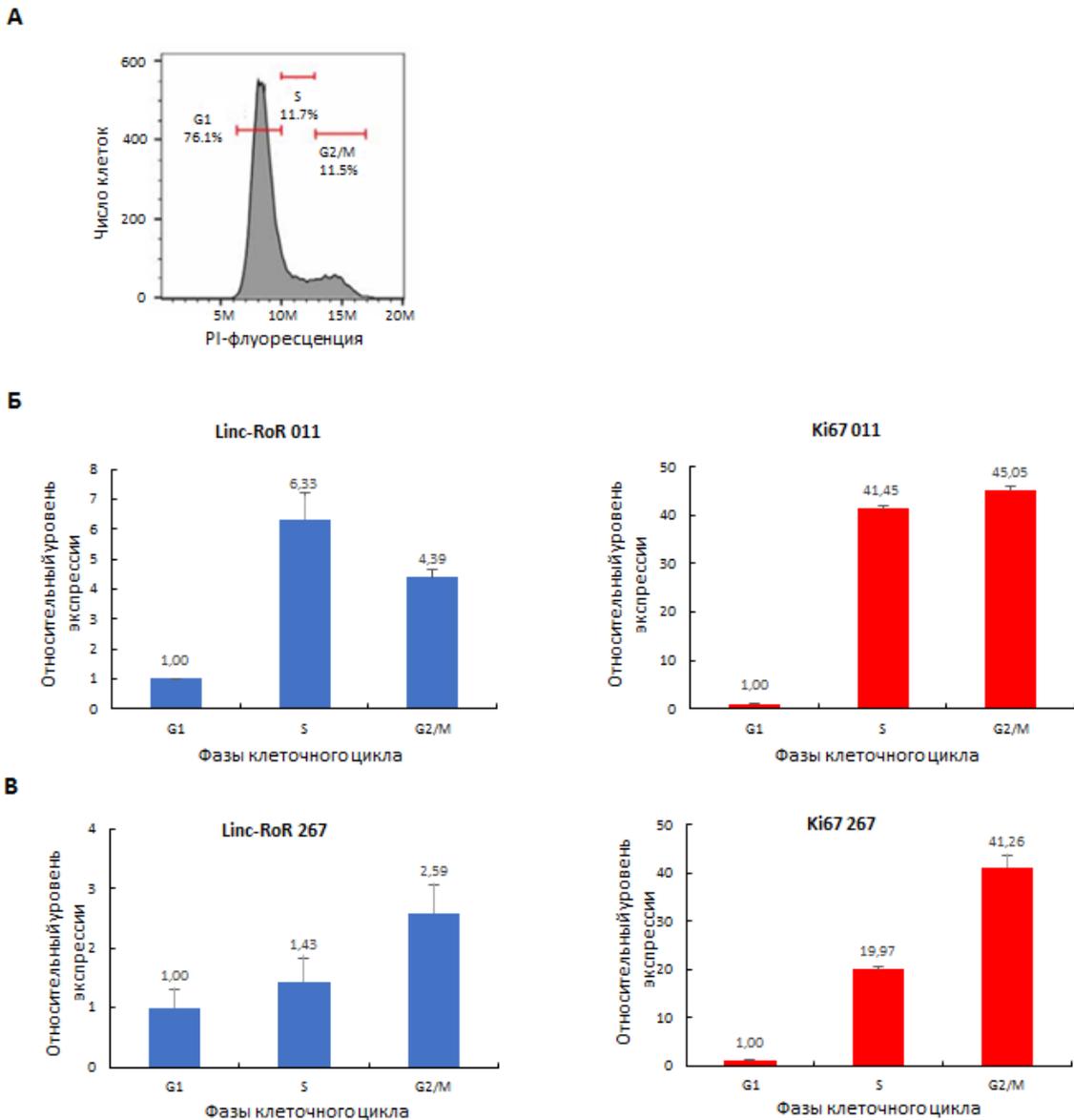


Рисунок 40. Экспрессия linc-RoR в различные фазы клеточного цикла. Цитофлуориметрический анализ клеток GBM от пациента 011, окрашенных йодидом пропидия (PI) (А); относительные уровни linc-RoR (слева) и Ki67 (справа) в популяциях G1, S и G2/M, полученных при сортировке клеток от пациента 011 (Б) и 267 (В).

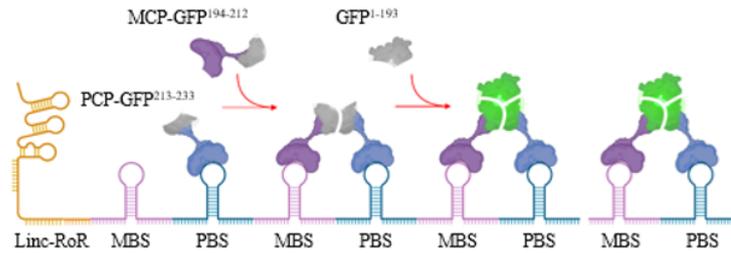
Такой результат свидетельствует в пользу нашего предположения о том, что данный транскрипт выполняет свои основные функции именно в процессе митоза.

3.2.7. Исследование внутриклеточной локализации linc-RoR в клетках GBM в различные фазы клеточного цикла.

Для того чтобы получить более полную информацию, касающуюся функций linc-RoR в процессе митоза, мы решили исследовать внутриклеточную локализацию этой днРНК на разных стадиях клеточного цикла. Использование метода FISH, несмотря на длительные попытки оптимизации, не позволило нам достоверно визуализировать linc-RoR в клетках. По этой причине мы решили использовать более сложный, но крайне чувствительный метод с применением системы, основанной на трёх фрагментах GFP, два из которых присоединены к РНК-связывающим доменам фаговых белков MCP и PCP [186]. Данная система была выбрана, поскольку она позволяет определять локализацию РНК при минимальной фоновой флуоресценции.

Прежде всего, нами была создана конструкция, включающая последовательность linc-RoR, соединенную на 3'-конце с 12 копиями сайта связывания белка оболочки фага MS2, а также с 12 копиями сайта связывания белка фага PP7 (12×MBS–PBS). Далее мы заразили соответствующими лентивирусными частицами клетки от пациента 019. После отбора на среде с пуромицином клетки, экспрессирующие linc-RoR-12×MBS–PBS, были трансдуцированы вирусными частицами, кодирующими белки оболочки фагов (MCP и PCP), соединенные с фрагментами GFP [185]. В результате в клетках, несущих обе конструкции, наблюдалась флуоресценция в участках локализации linc-RoR-12×MBS–PBS вследствие взаимодействия MCP и PCP со своими сайтами связывания, приводящего к пространственному сближению фрагментов GFP (**Рис. 41А**). Как показано на **Рис. 41Б**, 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

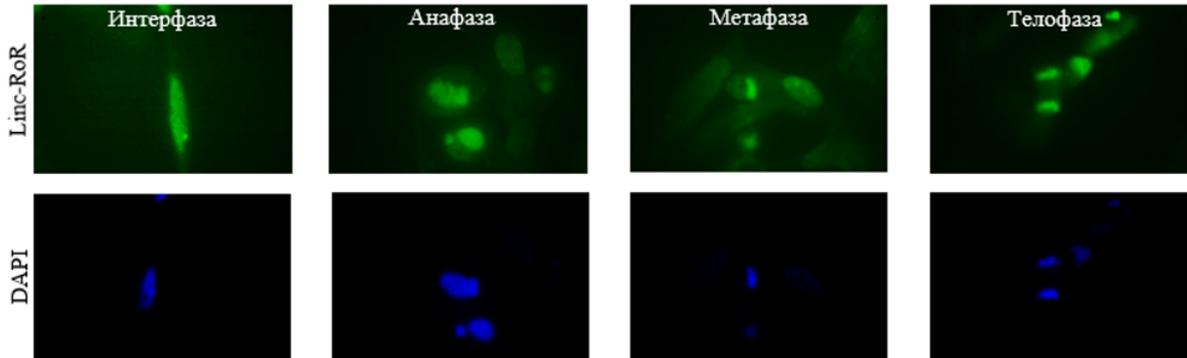


Рисунок 41. Внутриклеточная локализация *linc-RoR*. **А** - схема трехкомпонентной системы GFP MBS–PBS. GFP^{1-193} , $GFP^{194-212}$ и $GFP^{213-233}$ - фрагменты GFP; MCP - РНК-связывающий белок оболочки фага MS2; PCP - РНК-связывающий белок оболочки фага PP7; MBS и PBS являются сайтами связывания белков MCP и PCP соответственно. **Б** - флуоресцентные микрофотографии клеток пациента 019, коинфицированных вирусными частицами, кодирующими RoR-12×MBS-PBS, и частицами, кодирующими фьюжн-белки GFP^{1-193} , $GFP^{194-212}$ -MCP и $GFP^{213-233}$ -PCP, и впоследствии окрашенных DAPI для визуализации ДНК.

В настоящее время основным известным механизмом, с помощью которого *linc-RoR* выполняет свои функции, является механизм конкурирующих эндогенных РНК. В целом ряде работ показано, что, находясь в цитоплазме клеток, *linc-RoR* играет роль «губки» в отношении различных миРНК, регулируя таким образом экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне [82, 83]. Наши исследования позволяют рассматривать и другие возможные механизмы действия *linc-RoR* при GBM. Поскольку *linc-RoR* экспрессируется преимущественно в делящихся клетках и в процессе митоза локализуется на хромосомах, нельзя исключать, что при GBM этот некодирующий транскрипт может выполнять функции, аналогичные функциям центромерных днРНК, которые принимают непосредственное участие в формировании аппарата деления клеток и расхождении хромосом (см. пункт 1.1.4.4. главы «Обзор литературы»).

Суммируя все данные, приведенные в пункте 3.2, 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 лнРНК экспрессируется преимущественно во время деления клетки и в эту фазу клеточного цикла локализуется на хромосомах, что, по-видимому, обуславливает основные функции указанного транскрипта, связанные с регуляцией митоза. Эти данные указывают на существование новых механизмов функционирования linc-RoR в клетках глиобластомы.

ГЛАВА 4. 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* (смыслового, lncPTENP1-S, и антисмыслового, lncPTENP1-AS) 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 частности карциномы эндометрия и глиом. Поэтому первую часть нашей работы мы посвятили решению этих вопросов. Мы проанализировали статус метилирования псевдогена в малигнизированных и немалигнизированных тканях эндометрия и не обнаружили взаимосвязи данной эпигенетической модификации с клинико-патологическими характеристиками КЭ. Однако мы обнаружили, что метилирование *PTENP1* гораздо чаще выявляется в эндометрии женщин старше 45 лет. Таким образом, мы впервые показали взаимосвязь этой модификации с возрастом пациенток. Более того, оказалось, что уровень смыслового транскрипта в ткани нормального эндометрия также увеличивается с возрастом. Помимо этого, мы обнаружили, что уровень метилирования и экспрессии псевдогена ассоциирован с более пролонгированной выживаемостью пациентов с карциномой эндометрия и глиомами. Эти данные позволяют нам предположить, что метилирование *PTENP1* может выполнять протективные функции, препятствуя более агрессивному течению данных заболеваний. Также полученные результаты привели нас к предположению о возможном позитивном влиянии метилирования псевдогена на его экспрессию. Дальнейшая серия экспериментов по исследованию влияния метилирования *PTENP1* на его экспрессию позволила нам выявить новый механизм регуляции экспрессии смыслового транскрипта псевдогена (lncPTENP1-S), зависимый от метилирования CpG-островка *PTENP1* и наличия функционально активного белка PTEN. Мы полагаем, что в регуляции экспрессии lncPTENP1-S задействован механизм, при котором PTEN образует комплекс с p53, который в свою очередь связывается с неметирированной последовательностью *PTENP1* и подавляет транскрипцию смысловой днРНК псевдогена.

Во второй части работы мы исследовали роль linc-RoR в патогенезе глиобластомы. 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 впервые 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 впервые показали взаимосвязь повышенного уровня этой днРНК с высоким уровнем транскрипции *EGFR* или конститутивной активностью этого онкогенного рецептора. Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод о том, что linc-RoR играет онкогенную роль при глиобластоме.

На основании полученных результатов можно сделать следующие **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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berger M.S., Weller M. Glioblastoma // Handbook of Clinical Neurology, 2016, Vol. 134, P. 381–397.
2. Simon J.M., Toubiana T., Lang P., Taillibert S., Mazon J.J. Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy // Cancer Radiother., 2005, Vol. 9, No. 5, P. 322–331.
3. Lee E.Q., Reardon D.A., Schiff D., Drappatz J., Muzikansky A., Grimm S.A., Norden A.D., Nayak L., Beroukhi R., Rinne M.L., Chi A.S., Batchelor T.T., Hempfling K., McCluskey C., Smith K.H., Gaffey S.C., Wrigley B., Ligon K.L., Raizer J.J., Wen P.Y. Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma // Neuro Oncol., 2015, Vol. 17, No. 6, P. 862–867.
4. Castro B.A., Aghi M.K. Bevacizumab for glioblastoma: current indications, surgical implications, and future directions // Neurosurg Focus, 2014, Vol. 37, No 6, P. E9.
5. Sepúlveda-Sánchez J.M., Vaz M.Á., Balañá C., Gil-Gil M., Reynés G., Gallego Ó., Martínez-García M., Vicente E., Quindós M., Luque R., Ramos A., Ruano Y., Pérez-Segura P., Benavides M., Sánchez-Gómez P., Hernández-Lain A. Phase II trial of dacomitinib, a pan-human EGFR tyrosine kinase inhibitor, in recurrent glioblastoma patients with EGFR amplification // Neuro Oncol., 2017, Vol. 19, No. 11, P. 1522–1531.
6. Deligdisch-Schor L., Mareş Miceli A. Hormonal Pathology of the Uterus // Adv. Exp. Med. Biol., 2020, Vol. 1242, P. 1–12.
7. Rao M.R.S. Long non-coding RNA biology. Singapore: Springer Nature, 2017. 323 p.
8. Poliseno L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W.J., Pandolfi P.P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology // Nature, 2010, Vol. 465, No. 7301, P. 1033–1038.
9. Johnsson P., Ackley A., Vidarsdottir L., Lui W.O., Corcoran M., Grandér D., Morris K.V. A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells // Nat. Struct. Mol. Biol., 2013, Vol. 20, No. 4, P. 440–446.
10. Gong T., Zheng S., Huang S., Fu S., Zhang X., Pan S., Yang T., Sun Y., Wang Y., Hui B., Guo J., Zhang X. PTENP1 inhibits the growth of esophageal squamous cell carcinoma by regulating

SOCS6 expression and correlates with disease prognosis // *Mol. Carcinog.*, 2017, Vol. 56, No. 12, P. 2610–2619.

11. Yu G., Yao W., Gumireddy K., Li A., Wang J., Xiao W., Chen K., Xiao H., Li H., Tang K., Ye Z., Huang Q., Xu H. Pseudogene *PTENP1* functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression // *Mol. Cancer Ther.*, 2014, Vol. 13, No. 12, P. 3086–3097.

12. Chen R., Zhang M., Liu W., Chen H., Cai T., Xiong H., Sheng X., Liu S., Peng J., Wang F., Chen H., Lin W., Xu X., Zheng W., Jiang Q. Estrogen affects the negative feedback loop of *PTENP1*-miR200c to inhibit PTEN expression in the development of endometrioid endometrial carcinoma // *Cell Death Dis.*, 2018, Vol. 10, No. 1, P. 4.

13. Zhang R., Guo Y., Ma Z., Ma G., Xue Q., Li F., Liu L. Long non-coding RNA *PTENP1* functions as a ceRNA to modulate PTEN level by decoying miR-106b and miR-93 in gastric cancer // *Oncotarget*. 2017, Vol. 8, No. 16, P. 26079–26089.

14. Loewer S., Cabili M.N., Guttman M., Loh Y.H., Thomas K., Park I.H., Garber M., Curran M., Onder T., Agarwal S., Manos P.D., Datta S., Lander E.S., Schlaeger T.M., Daley G.Q., Rinn J.L. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells // *Nat. Genet.*, 2010, Vol. 42, No. 12, P. 1113–1117.

15. Jorjani H., Kehr S., Jedlinski D.J., Gumienny R., Hertel J., Stadler P.F., Zavolan M., Gruber A.R. An updated human snoRNAome // *Nucleic Acids Res.*, 2016, Vol. 44, No. 11, P. 5068–5082.

16. Yu Y., Xiao J., Hann S.S. The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers // *Cancer Manag. Res.*, 2019, Vol. 11, P. 5895–5909.

17. Alles J., Fehlmann T., Fischer U., Backes C., Galata V., Minet M., Hart M., Abu-Halima M., Grässer F.A., Lenhof H.P., Keller A., Meese E. An estimate of the total number of true human miRNAs // *Nucleic Acids Res.*, 2019, Vol. 47, No. 7, P. 3353–3364.

18. Xu T., Wu J., Han P., Zhao Z., Song X. Circular RNA expression profiles and features in human tissues: a study using RNA-seq data // *BMC Genomics*, 2017, Vol. 18, Suppl 6, P. 680.

19. Dahia P.L., FitzGerald M.G., Zhang X., Marsh D.J., Zheng Z., Pietsch T., von Deimling A., Haluska F.G., Haber D.A., Eng C. A highly conserved processed *PTEN* pseudogene is located on chromosome band 9p21 // *Oncogene*, 1998, Vol. 16, No. 18, 2403–2406.

20. Ruiz-Orera J., Messeguer X., Subirana J.A., Alba M.M. Long non-coding RNAs as a source of new peptides // *Elife*, 2014, Vol. 3, P. e03523.
21. Ransohoff J.D., Wei Y., Khavari P.A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 19, No. 3, P. 143–157.
22. Wang Y., Wang Y., Li J., Zhang Y., Yin H., Han B. CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling // *Cancer Lett.*, 2015, Vol. 367, No. 2, P. 122–128.
23. Zhao S., Zhang X., Chen S., Zhang S. Natural antisense transcripts in the biological hallmarks of cancer: powerful regulators hidden in the dark // *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2020, Vol. 39, No. 1, P. 187.
24. Louro R., Smirnova A.S., Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? // *Genomics*, 2009, Vol. 93, No. 4, P. 291–298.
25. Lou W., Ding B., Fu P. Pseudogene-Derived lncRNAs and Their miRNA Sponging Mechanism in Human Cancer // *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2020, Vol. 8, P. 85.
26. Arunkumar G., Melters D.P. Centromeric Transcription: A Conserved Swiss-Army Knife // *Genes (Basel)*, 2020, Vol. 11, No. 8, P. 911.
27. Rubtsova M., Dontsova O. Human Telomerase RNA: Telomerase Component or More? // *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, No. 6, P. 873.
28. Barral A., Déjardin J. Telomeric Chromatin and TERRA // *J. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 432, No. 15, P. 4244–4256.
29. Hou T.Y., Kraus W.L. Spirits in the Material World: Enhancer RNAs in Transcriptional Regulation // *Trends Biochem. Sci.*, 2021, Vol. 46, No. 2, P. 138–153.30.
30. Massone S., Ciarlo E., Vella S., Nizzari M., Florio T., Russo C., Cancedda R., Pagano A. NDM29, a RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid β secretion // *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1823, No. 7, P. 1170–1177.
31. Chellini L., Frezza V., Paronetto M.P. Dissecting the transcriptional regulatory networks of promoter-associated noncoding RNAs in development and cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020, Vol. 39, No. 1, P. 51.
32. Rinn J.L., Chang H.Y. Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions // *Annu. Rev. Biochem.*, 2020, Vol. 89, P. 283–308.
33. Wilusz J.E. Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016, Vol. 1859, No. 1, P. 128–138.

34. Pickard M.R., Williams G.T. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA // *Genes (Basel)*, 2015, Vol. 6, No. 3, 484–499.
35. Yamazaki T., Hirose T. The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs // *Front. Biosci.*, 2015, Vol. 7, P. 1–41.
36. Liu X., Shan G. Mitochondria Encoded Non-coding RNAs in Cell Physiology // *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, P. 713729.
37. Aillaud M., Schulte L.N. Emerging Roles of Long Noncoding RNAs in the Cytoplasmic Milieu // *Noncoding RNA*, 2020, Vol. 6, No. 4, P. 44.
38. Yoshimura H., Matsuda Y., Yamamoto M., Kamiya S., Ishiwata T. Expression and role of long non-coding RNA H19 in carcinogenesis // *Front. Biosci (Landmark Ed)*, 2018, Vol. 23, P. 614–625.
39. Toubiana S., Selig S. DNA : RNA hybrids at telomeres - when it is better to be out of the (R) loop // *FEBS J.*, 2018, Vol. 285, No. 4, P. 2552–2566.
40. Corless S., Höcker S., Erhardt S. Centromeric RNA and Its Function at and Beyond Centromeric Chromatin // *J. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 432, P. 4257–4269.
41. Vydzhak O., Luke B., Schindler N. Non-coding RNAs at the Eukaryotic rDNA Locus: RNA-DNA Hybrids and Beyond // *J. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 432, P. 4287–4304.
42. Li Y., Syed J., Sugiyama H. RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs // *Cell Chem. Biol.*, 2016, Vol. 23, No. 11, P. 1325–1333.
43. Wu T., Du Y. LncRNAs: From Basic Research to Medical Application // *Int. J. Biol. Sci.*, 2017, Vol. 13, No. 3, P. 295–307.
44. Guo Q., Shi X., Wang X. RNA and liquid-liquid phase separation // *Noncoding RNA Res.*, 2021, Vol. 6, No. 2, P. 92–99.
45. Chu C., Zhang Q.C., da Rocha S.T., Flynn R.A., Bharadwaj M., Calabrese J.M., Magnuson T., Heard E., Chang H.Y. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins // *Cell*, 2015, Vol. 161, No. 2, P. 404–416.
46. Cai X., Cullen B.R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor // *RNA*, 2007, No. 3, P. 313–316.
47. Chan W.L., Chang J.G. Pseudogene-derived endogenous siRNAs and their function // *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1167, P. 227–239.
48. Pantano L., Jodar M., Bak M., Ballescà J.L., Tommerup N., Oliva R., Vavouri T. The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes // *RNA*, 2015, No. 6, P. 1085–1095.

49. Zimta A.A., Tigu A.B., Braicu C., Stefan C., Ionescu C., Berindan-Neagoe I. An Emerging Class of Long Non-coding RNA With Oncogenic Role Arises From the snoRNA Host Genes // *Front Oncol.*, 2020, Vol. 10, P. 389.
50. Chen Y., Belmont A.S. Genome organization around nuclear speckles // *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2019, Vol. 55, P. 91–99.
51. Sun Q., Hao Q., Prasanth K.V. Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression // *Trends Genet.*, 2018, Vol. 34, No. 2, P. 142–157.
52. McCluggage F., Fox A.H. Paraspeckle nuclear condensates: Global sensors of cell stress? // *Bioessays*, 2021, Vol. 43, No. 5, P. e2000245.
53. Fox A.H., Nakagawa S., Hirose T., Bond C.S. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation // *Trends Biochem. Sci.*, 2018, Vol. 43, No. 2, P. 124–135.
54. Brockdorff N., Bowness J.S., Wei G. Progress toward understanding chromosome silencing by Xist RNA // *Genes Dev.*, 2020, Vol. 34, No. 11–12, P. 733–744.
55. Marin-Bejar O., Huarte M. Long non-coding RNAs: from identification to functions and mechanisms // *Advances in Genomics and Genetics*, 2015, Vol. 5, P. 1–18.
56. Shaw A., Gullerova M. Home and Away: The Role of Non-Coding RNA in Intracellular and Intercellular DNA Damage Response // *Genes (Basel)*, 2021, Vol. 12, No. 10, P. 1475.
57. Palancade B., Rothstein R. The Ultimate (Mis)match: When DNA Meets RNA // *Cells*, 2021, Vol. 10, No. 6, P. 1433.
58. Mamontova V., Trifault B., Boten L., Burger K. Commuting to Work: Nucleolar Long Non-Coding RNA Control Ribosome Biogenesis from Near and Far // *Noncoding RNA*, 2021, Vol. 7, No. 3, P. 42.
59. Leclerc S., Kitagawa K. The Role of Human Centromeric RNA in Chromosome Stability // *Front. Mol. Biosci.*, 2021, Vol. 8, P. 642732.
60. Kabeche L., Nguyen H.D., Buisson R., Zou L. A mitosis-specific and R loop-driven ATR pathway promotes faithful chromosome segregation // *Science*, 2018, Vol. 359, P. 108–114.
61. Louro R., Smirnova A.S., Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? // *Genomics*, 2009, Vol. 93, No. 4, 291–298.
62. Pisignano G., Lodomery M. Epigenetic Regulation of Alternative Splicing: How LncRNAs Tailor the Message // *Noncoding RNA*, 2021, Vol. 7, No. 1, P. 21.
63. Zheng J., Li X.D., Wang P., Liu X.B., Xue Y.X., Hu Y., Li Z., Li Z.Q., Wang Z.H., Liu Y.H. CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 // *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, P. 25339–25355.

64. Zheng J., Liu X., Wang P., Xue Y., Ma J., Qu C., Liu Y. CRNDE promotes malignant progression of glioma by attenuating miR-384/PIWIL4/STAT3 axis // *Mol. Ther.*, 2016, Vol. 24, No. 7, P. 1199–1215.
65. Li D.X., Fei X.R., Dong Y.F., Cheng C.D., Yang Y., Deng X.F., Huang H.L., Niu W.X., Zhou C.X., Xia C.Y., Niu C.S. The long non-coding RNA CRNDE acts as a ceRNA and promotes glioma malignancy by preventing miR-136-5p-mediated downregulation of Bcl-2 and Wnt2 // *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, No. 50, P. 88163–88178.
66. Sebastian-delaCruz M., Gonzalez-Moro I., Olazagoitia-Garmendia A., Castellanos-Rubio A., Santin I. The Role of lncRNAs in Gene Expression Regulation through mRNA Stabilization // *Noncoding RNA*, 2021, Vol. 7, No. 1, P. 3.
67. Chiefari E., Iiritano S., Paonessa F., Le Pera I., Arcidiacono B., Filocamo M., Foti D., Liebhaber S.A., Brunetti A. Pseudogene-mediated posttranscriptional silencing of HMGA1 can result in insulin resistance and type 2 diabetes // *Nat. Commun.*, 2010, No. 1, P. 40.
68. Wu P., Mo Y., Peng M., Tang T., Zhong Y., Deng X., Xiong F., Guo C., Wu X., Li Y., Li X., Li G., Zeng Z., Xiong W. Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA // *Mol. Cancer.*, 2020, Vol. 19, No. 1, P. 22.
69. Quezada C., Torres Á., Niechi I., Uribe D., Contreras-Duarte S., Toledo F., San Martín R., Gutiérrez J., Sobrevia L. Role of extracellular vesicles in glioma progression // *Mol. Aspects Med.*, 2018, Vol. 60, P. 38–51.
70. Giusti I., Di Francesco M., Dolo V. Extracellular Vesicles in Glioblastoma: Role in Biological Processes and in Therapeutic Applications // *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2017, Vol. 17, No. 3, P. 221–235.
71. Yang X., Xiao Z., Du X., Huang L., Du G. Silencing of the long non-coding RNA NEAT1 suppresses glioma stem-like properties through modulation of the miR-107/CDK6 pathway // *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 37, No. 1, P. 555–562.
72. Zhang J.X., Han L., Bao Z.S., Wang Y.Y., Chen LY, Yan W, Yu SZ, Pu PY, Liu N, You YP, Jiang T, Kang CS; Chinese Glioma Cooperative Group. HOTAIR, a cell cycle-associated long noncoding RNA and a strong predictor of survival, is preferentially expressed in classical and mesenchymal glioma // *Neuro Oncol.*, 2013, Vol. 15, No. 12, P. 1595–1603.
73. Ma X., Li Z., Li T., Zhu L., Li Z., Tian N. Long non-coding RNA HOTAIR enhances angiogenesis by induction of VEGFA expression in glioma cells and transmission to endothelial cells via glioma cell derived-extracellular vesicles // *Am. J. Transl. Res.* 2017, Vol. 9, No. 11, P. 5012–5021.

74. Yu L., Chen S., Bao H., Zhang W., Liao M., Liang Q., Cheng X. The role of lncRNA CASC2 on prognosis of malignant tumors: a meta-analysis and bioinformatics // *Onco Targets Ther.*, 2018, Vol. 11, P. 4355–4365.
75. Wang Y., Xin S., Zhang K., Shi R., Bao X. Low GAS5 levels as a predictor of poor survival in patients with lower-grade gliomas // *J. Oncol.*, 2019, Vol. 2019, P. 1785042.
76. Lister N., Shevchenko G., Walshe J.L., Groen J., Johnsson P., Vidarsdóttir L., Grandér D., Ataíde S.F., Morris K.V. The molecular dynamics of long noncoding RNA control of transcription in PTEN and its pseudogene // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2017, Vol. 114, P. 9942–9947.
77. Wu C., Wang F., Tan L. Role and the molecular mechanism of lncRNA PTENP1 in regulating the proliferation and invasion of cervical cancer cells // *Gene Ther.*, 2020, doi: 10.1038/s41434-020-00189-8.
78. Yndestad S., Austreid E., Skafnesmo K.O., Lønning P.E., and Eikesdal H.P. Divergent activity of the pseudogene PTENP1 in ER-positive and negative breast cancer // *Mol. Cancer. Res.*, 2018, Vol. 16, No. 1, P. 78–89.
79. Hu S., Xu L., Li L., Luo D., Zhao H., Li D., Peng B. Overexpression of lncRNA PTENP1 suppresses glioma cell proliferation and metastasis in vitro // *Onco Targets Ther.*, 2018, No. 12, P. 147–156.
80. Marsit C.J., Zheng S., Aldape K., Hinds P.W., Nelson H.H., Wiencke J.K., Kelsey K.T. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration // *Hum. Pathol.*, 2005, Vol. 36, No. 7, P. 768–776.
81. Yu G., Yao W., Gumireddy K., Li A., Wang J., Xiao W., Chen K., Xiao H., Li H., Tang K., Ye Z., Huang Q., Xu H. Pseudogene PTENP1 functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression // *Mol. Cancer Ther.*, 2014, Vol. 13, No. 12, P. 3086–3097.
82. Chen W., Yang J., Fang H., Li L., Sun J. Relevance Function of Linc-ROR in the Pathogenesis of Cancer // *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2020, No. 8, P. 696.
83. Sun D.E., Ye S.Y. Emerging Roles of Long Noncoding RNA Regulator of Reprogramming in Cancer Treatment // *Cancer Manag. Res.*, 2020, No. 12, P. 6103–6112.
84. Zhang A., Zhou N., Huang J., Liu Q., Fukuda K., Ma D., Lu Z., Bai C., Watabe K., Mo Y.Y. The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage // *Cell Res.*, 2013, Vol. 23, No. 3, P. 340–350.
85. Feng S., Yao J., Chen Y., Geng P., Zhang H., Ma X., Zhao J., Yu X. Expression and Functional Role of Reprogramming-Related Long Noncoding RNA (lincRNA-ROR) in Glioma // *J. Mol. Neurosci.*, 2015, Vol. 56, No. 3, P. 623–630.

86. Toraih E.A., El-Wazir A., Hussein M.H., Khashana M.S., Matter A., Fawzy M.S., Hosny S. Expression of long intergenic non-coding RNA, regulator of reprogramming, and its prognostic value in patients with glioblastoma // *Int. J. Biol. Markers*, 2019, Vol. 34, No. 1, P. 69–79.
87. Gussyatiner O., Hegi M.E. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options // *Semin. Cancer Biol.*, 2018, Vol. 51, P. 50–58.
88. Chen R., Smith-Cohn M., Cohen A.L., Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance // *Neurotherapeutics*, 2017, Vol. 14, No. 2, P. 284–297.
89. Stoyanov G.S., Dzhankov D.L. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics // *Folia Med. (Plovdiv)*, 2018, Vol. 60, No. 1, P. 48–66.
90. Кобяков Г.Л., Абсалямова О.В., Поддубский А.А., Лодыгина К.С., Кобякова Е.А. Классификация ВОЗ первичных опухолей центральной нервной системы 2016 г.: взгляд клинициста // *Вопросы нейрохирургии*, 2018, № 3, С. 88–96.
91. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., von Deimling A., Ellison D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // *Neuro Oncol.*, 2021, Vol. 23, No. 8, P. 1231–1251.
92. Yabo Y.A., Niclou S.P., Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma // *Neuro Oncol.*, 2022, Vol. 24, No. 5, P. 669–682.
93. Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S.T., Peng L., Davis P.F., Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme // *Front. Surg.*, 2016, No. 3, P. 21.
94. Prager B.C., Bhargava S., Mahadev V., Hubert C.G., Rich J.N. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos // *Trends Cancer.*, 2020, Vol. 6, No. 3, P. 223–235.
95. Minata M., Audia A., Shi J., Lu S., Bernstock J., Pavlyukov M.S., Das A., Kim S.H., Shin Y.J., Lee Y., Koo H., Snigdha K., Waghmare I., Guo X., Mohyeldin A., Gallego-Perez D., Wang J., Chen D., Cheng P., Mukheef F., Contreras M., Reyes J.F., Vaillant B., Sulman E.P., Cheng S.Y., Markert J.M., Tannous B.A., Lu X., Kango-Singh M., Lee L.J., Nam D.H., Nakano I., Bhat K.P. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation // *Cell Rep.*, 2019, Vol. 26, No. 7, P. 1893–1905.e7.
96. Li Q.J., Cai J.Q., Liu C.Y. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma // *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2016, Vol. 129, No. 4, P. 464–471.
97. Park S.H., Won J., Kim S.I., Lee Y., Park C.K., Kim S.K., Choi S.H. Molecular Testing of Brain Tumor // *J. Pathol. Transl. Med.*, 2017, Vol. 51, No. 3, P. 205–223.

98. Leão R., Apolónio J.D., Lee D., Figueiredo A., Tabori U., Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer // *J. Biomed. Sci.*, 2018, Vol. 25, No. 1, P. 22.
99. Worby C.A., Dixon J.E. PTEN // *Annu. Rev. Biochem.*, 2014, Vol. 83, P. 641–669.
100. Ho J., Cruise E.S., Dowling R.J.O., Stambolic V. PTEN Nuclear Functions // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2020, Vol. 10, No. 5, P. a036079.
101. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // *Oncogene*, 2017, Vol. 36, P. 3943–3956.
102. Shetzer Y., Molchadsky A., Rotter V. Oncogenic Mutant p53 Gain of Function Nourishes the Vicious Cycle of Tumor Development and Cancer Stem-Cell Formation // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2016, Vol. 6, No. 10, P. a026203.
103. Pitolli C., Wang Y., Mancini M., Shi Y., Melino G., Amelio I. Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, P. 6241.
104. Zhang Y., Dube C., Gibert M. Jr., Cruickshanks N., Wang B., Coughlan M., Yang Y., Setiady I., Deveau C., Saoud K., Grello C., Oxford M., Yuan F., Abounader R. The p53 Pathway in Glioblastoma // *Cancers (Basel)*, 2018, Vol. 10, No. 9, P. 297.
105. Oprita A., Baloi S.C., Staicu G.A., Alexandru O., Tache D.E., Danoiu S., Micu E.S., Sevastre A.S. Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma // *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, No. 2, P. 587.
106. Mozumdar D., Doerner A., Zhang J.Y., Rafizadeh D.N., Schepartz A. Discrete Coiled Coil Rotamers Form within the EGFRvIII Juxtamembrane Domain // *Biochemistry*, 2020, Vol. 59, P. 3965–3972.
107. Ahmed S.I., Javed G., Laghari A.A., Bareeqa S.B., Farrukh S., Zahid S., Samar S.S., Aziz K. CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review // *Cureus*, 2018, Vol. 10, No. 10, P. e3439.
108. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond // *Exp. Hematol. Oncol.*, 2013, Vol. 2, No. 1, P. 17.
109. Mooney K.L., Choy W., Sidhu S., Pelargos P., Bui T.T., Voth B., Barnette N., Yang I. The role of CD44 in glioblastoma multiforme // *J. Clin. Neurosci.*, 2016, Vol. 34, P. 1–5.
110. Bakhmet E.I., Tomilin A.N. Key features of the POU transcription factor Oct4 from an evolutionary perspective // *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, P. 7339–7353.
111. Zhang Y., Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene // *Nat. Genet.*, 1992, No. 1, P. 40–44.

112. Kanduri C. Long noncoding RNAs: lessons from genomic imprinting // *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1859, No. 1, P. 102–111.
113. Shi Y., Wang Y., Luan W., Wang P., Tao T., Zhang J., Qian J., Liu N., You Y. Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675 // *PLoS One*. 2014, Vol. 9, No. 1, P. e86295.
114. Kallen A.N., Zhou X.B., Xu J., Qiao C., Ma J., Yan L., Lu L., Liu C., Yi J.S., Zhang H., Min W., Bennett A.M., Gregory R.I., Ding Y., Huang Y. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs // *Mol. Cell.*, 2013, Vol. 52, No. 1, P. 101–112.
115. Li W., Jiang P., Sun X., Xu S., Ma X., Zhan R. Suppressing H19 modulates tumorigenicity and stemness in U251 and U87MG glioma cells // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016, Vol. 36, No. 8, P. 1219–1227.
116. Moon Y., Kim I., Chang S., Park B., Lee S., Yoo S., Chae S., Hwang D., Park H. Hypoxia regulates allele-specific histone modification of the imprinted H19 gene // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, 2020, Vol. 1863, No. 11, P. 194643.
117. Zhao X., Wang P., Liu J., Zheng J., Liu Y., Chen J., Xue Y. GAS exerts tumor-suppressive functions in human glioma cells by targeting miR-222 // *Mol. Ther.*, 2015, Vol. 23, No. 12, P. 1899–1911.
118. Huo J.F., Chen X.B. Long noncoding RNA growth arrest-specific 5 facilitates glioma cell sensitivity to cisplatin by suppressing excessive autophagy in an mTOR-dependent manner // *J. Cell. Biochem.*, 2019, Vol. 120, No. 4, P. 6127–6136.
119. Wang Y., Xin S., Zhang K., Shi R., Bao X. Low GAS5 levels as a predictor of poor survival in patients with lower-grade gliomas // *J. Oncol.*, 2019, Vol. 2019, P. 1785042.
120. Shen J., Hodges T.R., Song R., Gong Y., Calin G.A., Heimberger A.B., Zhao H. Serum HOTAIR and GAS5 levels as predictors of survival in patients with glioblastoma // *Mol. Carcinog.*, 2018, Vol. 57, No. 1, P. 137–141.
121. Wang K.C., Yang Y.W., Liu B., Sanyal A., Corces-Zimmerman R., Chen Y., Lajoie B.R., Protacio A., Flynn R.A., Gupta R.A., Wysocka J., Lei M., Dekker J., Helms J.A., Chang H.Y. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression // *Nature*, 2011, Vol. 472, P. 120–124.
122. Xu L.M., Chen L., Li F., Zhang R., Li Z.Y., Chen F.F., Jiang X.D. Over-expression of the long non-coding RNA HOTTIP inhibits glioma cell growth by BRE // *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 35, No. 1, P. 162.

123. Zhang S., Wang W., Liu G., Xie S., Li Q., Li Y., Lin Z. Long non-coding RNA HOTTIP promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition of malignant glioma by regulating the miR-101/ZEB1 axis // *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 95, P. 711–720.
124. Tsai M.C., Manor O., Wan Y., Mosammamarast N., Wang J.K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H.Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes // *Science*, 2010, Vol. 329, P. 689–693.
125. Ke J., Yao Y.L., Zheng J., Wang P., Liu Y.H., Ma J., Li Z., Liu X.B., Li Z.Q., Wang Z.H., Xue Y.X. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326 // *Oncotarget*, 2015, No. 6, P. 21934–21949.
126. Yadav B., Pal S., Rubstov Y., Goel A., Garg M., Pavlyukov M., Pandey A.K. LncRNAs associated with glioblastoma: From transcriptional noise to novel regulators with a promising role in therapeutics // *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2021, Vol. 24, P. 728–742.
127. Ellis B.C., Molloy P.L., Graham L.D. A long non-coding RNA involved in cancer, neurobiology, and development // *Front. Genet.*, 2012, No. 3, P. 270.
128. Zheng J., Li X.D., Wang P., Liu X.B., Xue Y.X., Hu Y., Li Z., Li Z.Q., Wang Z.H., Liu Y.H. CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 // *Oncotarget*, 2015, No. 6, P. 25339–25355.
129. Yao Y., Ma J., Xue Y., Wang P., Li Z., Liu J., Chen L., Xi Z., Teng H., Wang Z., Li Z., Liu Y. Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions of human glioblastoma stem cells by up-regulating miR-152 // *Cancer Lett.*, 2015, Vol. 359, No. 1, P. 75–86.
130. Yang X., Xiao Z., Du X., Huang L., Du G. Silencing of the long non-coding RNA NEAT1 suppresses glioma stem-like properties through modulation of the miR-107/CDK6 pathway // *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 37, No. 1, P. 555–562.
131. Chen Q., Cai J., Wang Q., Wang Y., Liu M., Yang J., Zhou J., Kang C., Li M., Jiang C. Long noncoding RNA NEAT1, regulated by the EGFR pathway, contributes to glioblastoma progression through the WNT/b-catenin pathway by scaffolding EZH2 // *Clin. Cancer Res.*, 2018, Vol. 24, No. 3, P. 684–695.
132. Fu C., Li D., Zhang X., Liu N., Chi G., Jin X. LncRNA PVT1 Facilitates Tumorigenesis and Progression of Glioma via Regulation of MiR-128-3p/GREM1 Axis and BMP Signaling Pathway // *Neurotherapeutics*, 2018, Vol. 15, No. 4, P. 1139–1157.
133. Yang A., Wang H., Yang X. Long non-coding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of glioma and promotes cell proliferation and invasion via target EZH2 // *Biosci. Rep.*, 2017, Vol. 37, No. 6, P. BSR20170871.

134. Wang P., Liu Y.H., Yao Y.L., Li Z., Li Z.Q., Ma J., Xue Y.X. Long non-coding RNA CASC2 suppresses malignancy in human gliomas by miR-21 // *Cell Signal.*, 2015, Vol. 27, No. 2, 275–282.
135. Uroda T., Anastasakou E., Rossi A., Teulon J.M., Pellequer J.L., Annibale P., Pessey O., Inga A., Chillón I., Marcia M. Conserved Pseudoknots in lncRNA MEG3 Are Essential for Stimulation of the p53 Pathway // *Mol. Cell*, 2019, Vol. 75, No. 5, P. 982–995.e9.
136. Qin N., Tong G.F., Sun L.W., Xu X.L. Long Noncoding RNA MEG3 Suppresses Glioma Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Acting as a Competing Endogenous RNA of miR-19a // *Oncol. Res.*, 2017, Vol. 25, No. 9, P. 1471–1478.
137. Ma R., Zhang B.W., Zhang Z.B., Deng Q.J. LncRNA MALAT1 knockdown inhibits cell migration and invasion by suppressing autophagy through miR-384/GOLM1 axis in glioma // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2020, Vol. 24, No. 5, P. 2601–2615.
138. Aljubran F., Nothnick W.B. Long non-coding RNAs in endometrial physiology and pathophysiology // *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2021, Vol. 525, P. 111190.
139. Chen H., Strickland A.L., Castrillon D.H. Histopathologic diagnosis of endometrial precancers: Updates and future directions // *Semin. Diagn. Pathol.*, 2022, Vol. 39, No. 3, P. 137–147.
140. Nees L.K., Heublein S., Steinmacher S., Juhasz-Böss I., Brucker S., Tempfer C.B., Wallwiener M. Endometrial hyperplasia as a risk factor of endometrial cancer // *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2022, 10.1007/s00404-021-06380-5. Epub ahead of print.
141. Nijkang N.P., Anderson L., Markham R., Manconi F. Endometrial polyps: Pathogenesis, sequelae and treatment // *SAGE Open Med.*, 2019, Vol. 7, P. 2050312119848247.
142. Dallaire Nantel L., Renaud M.C., Gregoire J., Sebastianelli A., Plante M. High-grade endometrial carcinoma limited to the endometrium or a polyp: is adjuvant treatment necessary? // *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2021, Vol. 31, No. 10, P. 1335–1340.
143. Dal Cin P., Vanni R., Marras S., Moerman P., Kools P., Andria M., Valdes E., Deprest J., Van de Ven W., Van den Berghe H. Four cytogenetic subgroups can be identified in endometrial polyps // *Cancer Res.*, 1995, Vol. 55, No. 7, P. 1565–1568.
144. McCluggage W.G., Singh N., Gilks C.B. Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumours introduced in the 5th edition (2020) // *Histopathology*, 2022, Vol. 80, No. 5, P. 762–778.
145. Murali R., Soslow R.A., Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types // *Lancet Oncol.*, 2014, Vol. 15, No. 7, P. e268–278.
146. Pallarés J., Velasco A., Eritja N, Santacana M., Dolcet X., Cuatrecasas M., Palomar-Asenjo V., Catasús L., Prat J., Matias-Guiu X. Promoter hypermethylation and reduced expression of

RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma // *Mod. Pathol.*, 2008, Vol. 21, No. 6, P. 691–699.

147. Zhang B., Xing X., Li J., Lowdon R.F., Zhou Y., Lin N., Zhang B., Sundaram V., Chiappinelli K.B., Hagemann I.S., Mutch D.G., Goodfellow P.J., Wang T. Comparative DNA methylome analysis of endometrial carcinoma reveals complex and distinct deregulation of cancer promoters and enhancers // *BMC Genomics*, 2014, Vol. 15, No.1, P. 868.

148. Trimarchi M.P., Yan P., Groden J., Bundschuh R., Goodfellow P.J. Identification of endometrial cancer methylation features using combined methylation analysis methods // *PLoS One*, 2017, Vol. 12, No. 3, P. e0173242.

149. Dong P., Xiong Y., Yue J., J. B. Hanley S., Kobayashi N., Todo Y., Watari H. Exploring lncRNA-Mediated Regulatory Networks in Endometrial Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Advances and Challenges // *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, No. 2, P. 234.

150. Hu Y., Smyth G.K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays // *J. Immunol. Methods*. 2009, Vol. 347, No. 1–2, P. 70–78.

151. Esser C., Göttlinger C., Kremer J., Hundeiker C., Radbruch A. Isolation of full-size mRNA from ethanol-fixed cells after cellular immunofluorescence staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS) // *Cytometry*, 1995, Vol. 21, No. 4, P. 382–386.

152. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining // *J. Cell Biol.*, 1975, Vol. 66, No. 1, P. 188–193.

153. Lindblom B., Holmlund G. Rapid DNA purification for restriction fragment length polymorphism analysis // *Gene Anal. Tech.*, 1988, Vol. 5, No. 5, P. 97–101.

154. Pikor L.A., Enfield K.S., Cameron H., Lam W.L. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses // *J. Vis. Exp.* 2011, Vol. 49, P. 2763.

155. Modhukur V., Iljasenko T., Metsalu T., Lokk K., Laisk-Podar T., Vilo J. MethSurv: a web tool to perform multivariable survival analysis using DNA methylation data // *Epigenomics*, 2018, Vol. 10, No. 3, P. 277–288.

156. Anaya J. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs // *Peer J. Computer Science*, 2016, Vol. 2, P. e67.

157. Brighton P., Yojiro M., Fishwick K., Vrljicak P., Tewary S., Fujihara R, et al. Genome wide expression analysis of young and aged human endometrium // 2020, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE102131>.

158. Johansson A., Enroth S., Gyllensten U. Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan // *PLoS One*, 2013, Vol. 8, No. 6, P. e67378.

159. Christensen B.C., Houseman E.A., Marsit C.J., Zheng S., Wrensch M.R., Wiemels J.L., Nelson H.H., Karagas M.R., Padbury J.F., Bueno R., Sugarbaker D.J., Yeh R.F., Wiencke J.K., Kelsey K.T. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context // *PLoS Genet.*, 2009, Vol. 5, No. 8, P. e1000602.
160. Field A.E., Robertson N.A., Wang T., Havas A., Ideker T., Adams P.D. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences // *Mol. Cell.*, 2018, Vol. 71, No. 6, P. 882–895.
161. Jones M.J., Goodman S.J., Kobor M.S. DNA methylation and healthy human aging // *Aging Cell*, 2015, Vol. 14, No. 6, P. 924–932.
162. Levine M.E., Lu A.T., Chen B.H., Hernandez D.G., Singleton A.B., Ferrucci L., Bandinelli S., Salfati E., Manson J.E., Quach A., Kusters C.D., Kuh D., Wong A., Teschendorff A.E., Widschwendter M., Ritz B.R., Absher D., Assimes T.L., Horvath S. Menopause accelerates biological aging // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2016, Vol. 113, P. 9327–9332.
163. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.*, 2013, Vol. 14, No. 10, P. R115.
164. Qiu X., Hother C., Ralfkiær U.M., Søgaard A., Lu Q., Workman C.T., Liang G., Jones P.A., Grønbaek K. Equitoxic doses of 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine induce diverse immediate and overlapping heritable changes in the transcriptome // *PLoS One*, 2010, Vol. 5, No. 9, P. e12994.
165. Seelan R.S., Mukhopadhyay P., Pisano M.M., Greene R.M. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression // *Drug Metab. Rev.*, 2018, Vol. 50, No. 2, 193–207.
166. Morita S., Noguchi H., Horii T., Nakabayashi K., Kimura M., Okamura K., Sakai A., Nakashima H., Hata K., Nakashima K., Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions // *Nat. Biotechnol.*, 2016, Vol. 34, No. 10, P. 1060–1065.
167. Lei Y., Zhang X., Su J., Jeong M., Gundry M.C., Huang Y.H., Zhou Y., Li W., Goodell M.A. Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein // *Nat. Commun.*, 2017, No. 8, P. 16026.
168. Wang D., Zhang C., Wang B., Li B., Wang Q., Liu D., Wang H., Zhou Y., Shi L., Lan F., Wang Y. Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning // *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, No. 1, P. 4284.
169. Pore N., Liu S., Haas-Kogan D.A., O'Rourke D.M., Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter // *Cancer Res.*, 2003, Vol. 63, No. 1, P. 236–241.

170. Hlobilkova A., Knillova J., Svachova M., Skypalova P., Krystof V., Kolar Z. Tumour suppressor PTEN regulates cell cycle and protein kinase B/Akt pathway in breast cancer cells // *Anticancer Res.*, 2006, Vol. 26, No. 2A, P. 1015–1022.
171. Phadngam S., Castiglioni A., Ferraresi A., Morani F., Follo C., Isidoro C. PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells // *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, P. 84999–85020.
172. Freeman D.J., Li A.G., Wei G., Li H.H., Kertesz N., Lesche R., Whale A.D., Martinez-Diaz H., Rozengurt N., Cardiff R.D., Liu X., Wu H. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms // *Cancer Cell*, 2003, Vol. 3, No. 2, P. 117–130.
173. Ma L., Yan Y., Bai Y., Yang Y., Pan Y., Gang X., Karnes R.J., Zhang J., Lv Q., Wu Q., Huang H. Overcoming EZH2 Inhibitor Resistance by Taxane in PTEN-Mutated Cancer // *Theranostics*, 2019, Vol. 9, P. 5020–5034.
174. Nabils N.H., Broaddus R.R., Loose D.S. DNA methylation inhibits p53-mediated survivin repression // *Oncogene*, 2009, Vol. 28, P. 2046–2050.
175. Steinbach N., Hasson D., Mathur D., Stratikopoulos E.E., Sachidanandam R., Bernstein E., Parsons R.E. PTEN interacts with the transcription machinery on chromatin and regulates RNA polymerase II-mediated transcription // *Nucleic Acids Res.*, 2019, Vol. 47, No. 11, P. 5573–5586.
176. Chiang Y.T., Chien Y.C., Lin Y.H., Wu H.H., Lee D.F., Yu Y.L. The Function of the Mutant p53-R175H in Cancer // *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, P. 4088.
177. Chang C.J., Mulholland D.J., Valamehr B., Mosessian S., Sellers W.R., Wu H. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression // *Mol. Cell Biol.*, 2008, Vol. 28, No. 10, P. 3281–3289.
178. Eitel J.A., Bijangi-Vishehsaraei K., Saadatzadeh M.R., Bhavsar J.R., Murphy M.P., Pollok K.E., Mayo L.D. PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells // *Cell Cycle*, 2009, Vol. 8, No. 6, P. 896–901.
179. Talasila K.M., Soentgerath A., Euskirchen P., Rosland G.V., Wang J., Huszthy P.C., Prestegarden L., Skaftnesmo K.O., Sakariassen P.Ø., Eskilsson E., Stieber D., Keunen O., Brekka N., Moen I., Nigro J.M., Vintermyr O.K., Lund-Johansen M., Niclou S., Mørk S.J., Enger P.O., Bjerkvig R., Miletic H. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis // *Acta Neuropathol.*, 2013, Vol. 125, No. 5, P. 683–698.
180. Chen Y., Shen Z., Zhi Y., Zhou H., Zhang K., Wang T., Feng B., Chen Y., Song H., Wang R., Chu X. Long non-coding RNA ROR promotes radioresistance in hepatocellular carcinoma cells by

- acting as a ceRNA for microRNA-145 to regulate RAD18 expression // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2018, Vol. 645, P. 117–125.
181. Wang Y., Xu Z., Jiang J., Xu C., Kang J., Xiao L., Wu M., Xiong J., Guo X., Liu H. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal // *Dev. Cell*, 2013, Vol. 25, No. 1, P. 69–80.
182. Cabrera M.C., Hollingsworth R.E., Hurt E.M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy // *World J. Stem Cells*, 2015, Vol. 7, No. 1, P. 27–36.
183. Gao H., Wang T., Zhang P., Shang M., Gao Z., Yang F., Liu R. Linc-ROR regulates apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma via modulation of p53 ubiquitination by targeting miR-204-5p/MDM2 // *J. Cell Physiol.*, 2020, Vol. 235, No. 3, P. 2325–2335.
184. Lees A., Sessler T., McDade S. Dying to Survive-The p53 Paradox. *Cancers (Basel)* // 2021, Vol. 13, P. 3257.
185. Sobacki M., Mrouj K., Colinge J., Gerbe F., Jay P., Krasinska L., Dulic V., Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels // *Cancer Res.*, 2017, Vol. 77, No. 10, 2722–2734.
186. Park S.Y., Moon H.C., Park H.Y. Live-cell imaging of single mRNA dynamics using split superfolder green fluorescent proteins with minimal background // *RNA*, 2020, Vol. 26, No. 1, 101–109.

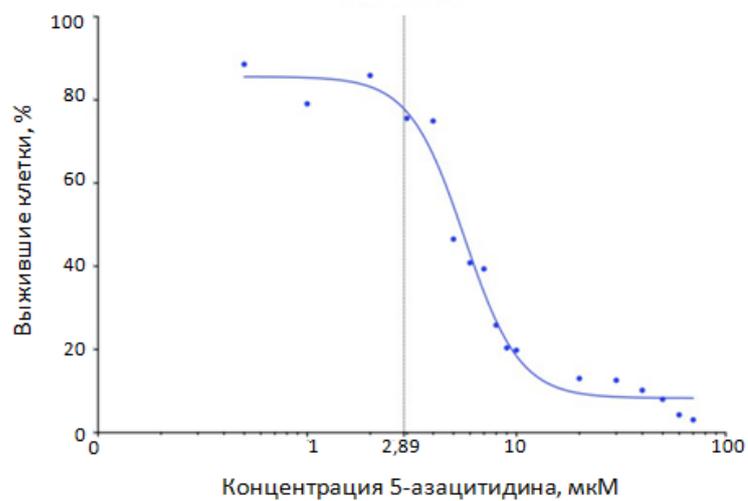
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Олигонуклеотиды, использованные в работе, и их последовательности

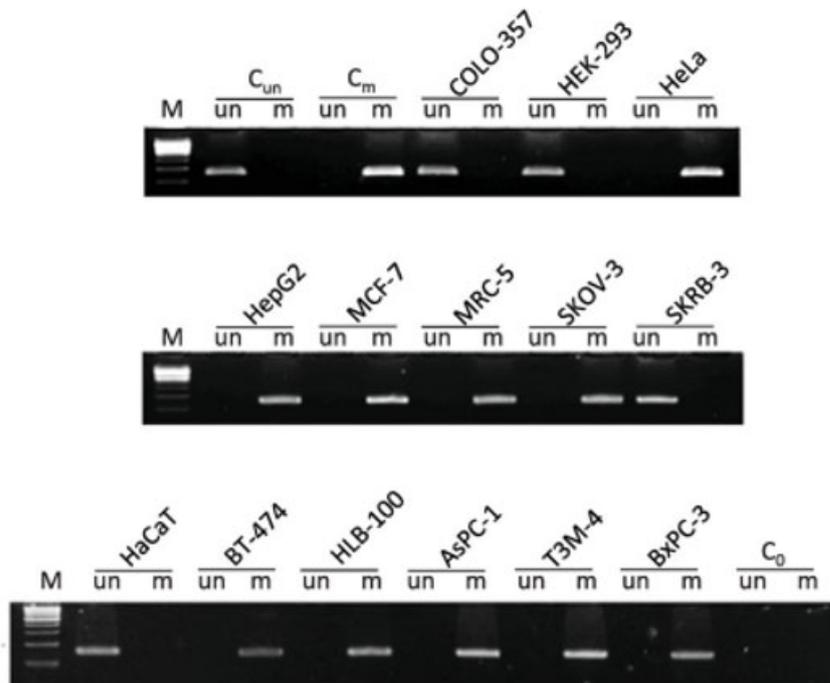
Ген	Олигонуклеотид	Последовательность, 5' -> 3'
Олигонуклеотиды для нокдауна linc-RoR		
<i>LINC-ROR</i>	shRoR-F	CCG GAA GCT CAT GAA ATT TGG TGA TAA CCC TCG AGA AGT TAT CAC CAA ATT TCA TGA GCT TTT TG
	shRoR-R	AAT TCA AAA AAG CTC ATG AAA TTT GGT GAT AAC TTC TCG AGG GTT ATC ACC AAA TTT CAT GAG CTT
Праймеры для клонирования		
<i>LINC-ROR</i>	NheI-RoR	ATA CGC TAG CAG CCT GTT TGG TGG TCT CTT C
	RoR-EcoRI	AAT AGA ATT CTA CAT TTT ATT TTT TGA GGA ACT GTC AT
<i>PTEN</i>	EcoRI-PTEN	AAA AGA ATT CGC ATC AGC TAC CGC CAA G
	PTEN-BamHI	ATC AGG ATC CAT TCA GAC TTT TGT AAT TTG TGT ATG CT
Праймеры для создания gRNA и последующего клонирования		
<i>pPlatTET-gRNA2/PTENP1</i>	pPlatTET-NotI-for	GTC CCC TTA TGC TCT CAC ACA C
	pPlatTET-SfiI-rev	AAA AAA GCC TCC TCA CTA CTT CTG
	gRNA-PTENP1-for	GCT GGA GGA GGC AGC CGT TCG GGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC AAG TTA AAA TAA GGC TAG TCC G
	gRNA-PTENP1-rev	CCG AAC GGC TGC CTC CTC CAG CGG TGT TTC GTC CTT TCC ACA AGA TAT ATA AAG CCA AGA AAT CG
Праймеры для амплификации кДНК		
<i>EGFRvIII</i>	F	ATG CGA CCC TCC GGG ACG
	R	ATT CCG TTA CAC ACT TTG CGG C
Праймеры для метилчувствительной ПЦР		
<i>PTENP1-m</i>	F	TGT AGT CGT GAT GGA AGT TTG AAT
	R	CCC CCG CGA ATA CTC ACG
<i>PTENP1-un</i>	F	TTG TAG TTG TGA TGG AAG TTT GAA T
	R	CCA CCC CCA CAA ATA CTC ACA
Праймеры для ПЦР в реальном времени		
<i>18S</i>	F	GGC CCT GTA ATT GGA ATG AGT C
	R	CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT
<i>ACT</i>	F	5'-5' CTC CTC CTG AGC GCA AGT ACT C
	R	CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T
<i>PTENP1-S</i>	F	TGA AAA ATC GGA CGT CAT CA
	R	CTG TCC CTT ATC AGA TAC ATG
<i>PTENP1-AS</i>	F	GGA TGC TCA CGG G
	R	AGG TTG GAA AGG AAA AAG TAG AAC TCT

<i>PTEN</i>	F	GTT TAC CGG CAG CAT CAA AT
	R	CCCCCACTTTAGTGCACAGT
<i>pPlatTET-gRNA2/PTENP1</i>	F	GAG GAG GCA GCC GTT CG
	R	CGG ACT AGC CTT ATT TTA ACT TGC
<i>LINC-ROR</i>	F	CCG TGA GAA AGA TCC ACC TAC A
	R	CAA GAA GAT CTG GGA AGG AGT CA
<i>KI67</i>	F	CCC TGA GCA ACA CTG TCT TTT
	R	TGA CCC TGA TGA GAA AGC TCA A
<i>EGFR</i>	F	TGA CTG AGG ACA GCA TAG ACG A
	R	GGG CTG GAC AGT GTT GAG ATA C
<i>TP53</i>	F	ACC TAT GGA AAC TAC TTC CTG AAA A
	R	CCG GGG ACA GCA TCA AAT CA
<i>SOX2</i>	F	GTC ATT TGC TGT GGG TGA TG
	R	AGA AAA ACG AGG GAA ATG GG
<i>OLIG2</i>	F	AGA AAA AGG TCA TCG GGC TC
	R	CTC CTC AAA TCG CAT CCA GA
<i>GFAP</i>	F	ACC TGC AGA TTC GAG AAA CC
	R	CTC CTT AAT GAC CTC TCC ATC C
<i>ALDH1A3</i>	F	TGG ATC AAC TGC TAC AAC GC
	R	CAC TTC TGT GTA TTC GGC CA
<i>CD133</i>	F	ACT CCC ATA AAG CTG GAC CC
	R	TCA ATT TTG GAT TCA TAT GCC TT
<i>CD44</i>	F	CCC AGA TGG AGA AAG CTC T
	R	ACT TGG CTT TCT GTC CTC CA
<i>CD109</i>	F	CAT CAA ACC TCA CTG TCT CTG TC
	R	CTG GGT ACG TCC GGT TAC AC
<i>OCT4</i>	F	GGA AGG TAT TCA GCC AAA CGA CCA
	R	CTC ACT CGG TTC TCG ATA CTG GTT
<i>MDM2</i>	F	ATC GGA CTC AGG TAC ATC TGT GAG
	R	AGG TTT CTC TTC CTG AAG CTC TTG

Приложение 2.

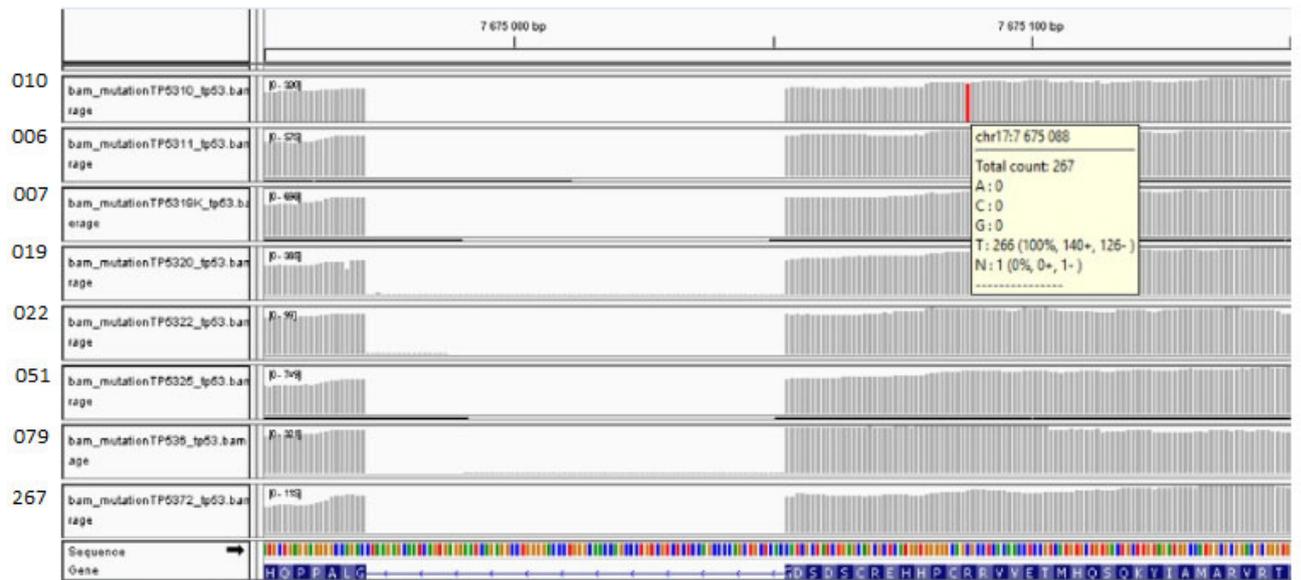
Анализ выживаемости клеток линии HeLa после инкубации с различными концентрациями 5-азацитина.

Приложение 4.



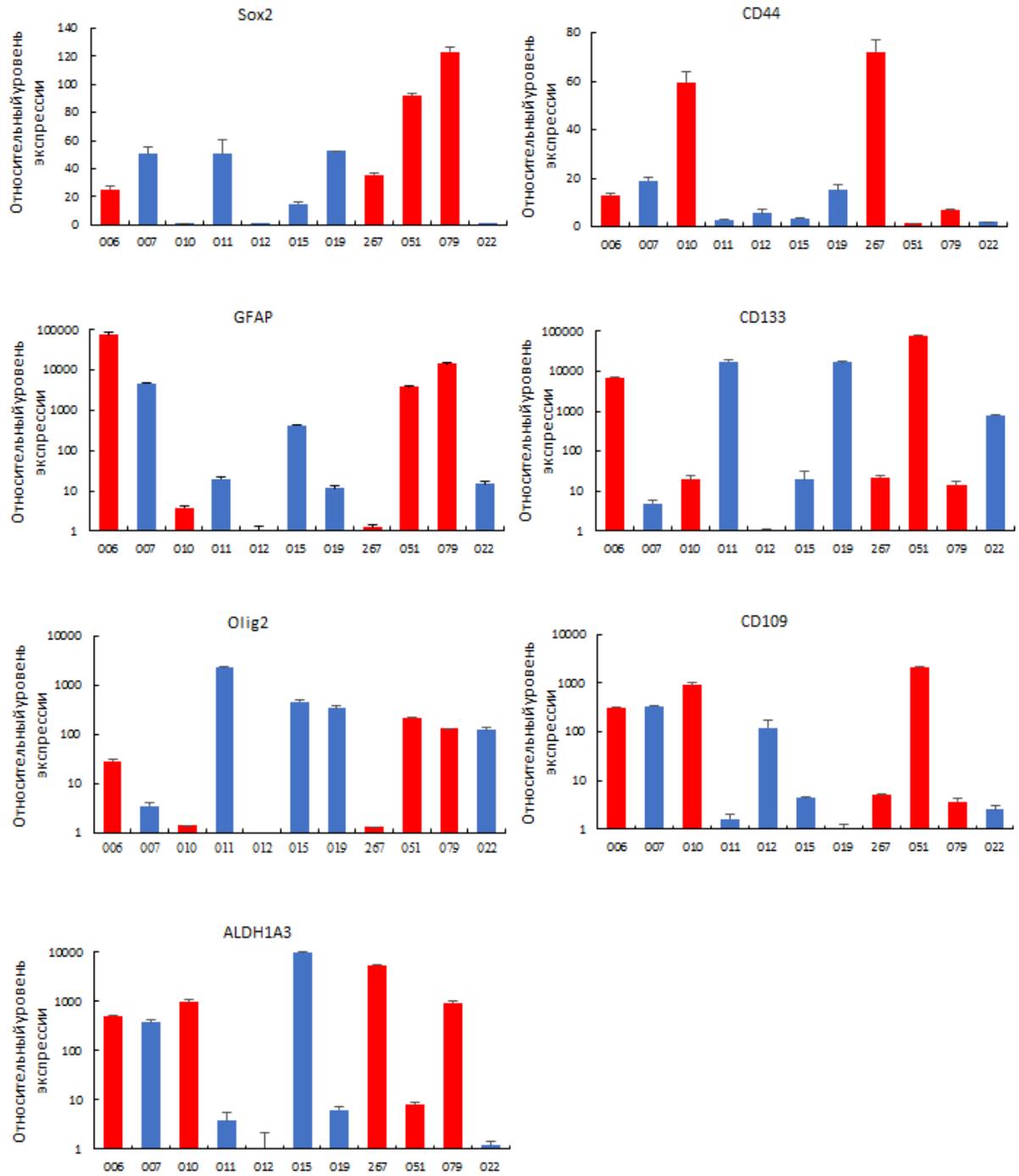
ПЦР-амплификация конвертированной бисульфитом геномной ДНК из клеточных линий с праймерами к метилированной (m) и неметилированной (un) последовательности PTENP1. M – маркер молекулярного веса; C_{un} – неметилированный контроль (ПЦР-продукт, полученный на ДНК-матрице, выделенной из лимфоцитов здорового донора и конвертированной метабисульфитом натрия); C_m – метилированный контроль (ПЦР-продукт, полученный на ДНК-матрице, выделенной из лимфоцитов здорового донора, метилированной *in vitro* с помощью метилазы SssI и конвертированной метабисульфитом натрия); C₀ – амплификация в отсутствие ДНК-матрицы.

Приложение 5.



Данные РНК-секвенирования, касающиеся участка гена TP53. Цифрами слева обозначены номера линий первичных культур нейрофер глиобластомы. Красной чертой отмечена локализация мутации.

Приложение 6.



Анализ уровней экспрессии ключевых фенотипических маркеров GBM. Относительные уровни экспрессии Sox2, CD44, GFAP, CD133, Olig2, CD109 и ALDH1A3 в нейросферах GBM, полученных от 11 пациентов. Линии нейросфер GBM с повышенным уровнем linc-RoR выделены красным.